

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INTERVENTIONELLE IMMUNOLOGIE
KOMMISSARISCHE LEITUNG: PROF. DR. PHILIPP BECKHOVE
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchung der *in-vitro* Effektivität von
verschiedenen Photosensibilisatoren bei der
photodynamischen Inaktivierung von *Leishmania major***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anna Sophia Hurst

2016

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INTERVENTIONELLE IMMUNOLOGIE
KOMMISSARISCHE LEITUNG: PROF. DR. PHILIPP BECKHOVE
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchung der *in-vitro* Effektivität von
verschiedenen Photosensibilisatoren bei der
photodynamischen Inaktivierung von *Leishmania major***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anna Sophia Hurst

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Ritter

2. Berichterstatter: PD Dr. Tim Maisch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2017

Für meine Eltern

*Ulrike und Günther,
die mir mein Studium ermöglicht haben*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Die Erkrankung Leishmaniose	4
1.1.1 Beschreibung und Klassifikation des Parasiten <i>Leishmania</i>	4
1.1.1 Epidemiologie und geographische Verbreitung der Leishmaniose	6
1.1.2 Lebenszyklus des Parasiten <i>Leishmania</i>	10
1.1.3 Adaptive Immunantwort gegen die Leishmanien	13
1.1.4 Klinik der kutanen, mukokutanen und viszeralen Leishmaniose	14
1.1.5 Diagnostik der Leishmaniose.....	19
1.1.6 Therapie der Leishmaniose	21
1.2 Photodynamische Inaktivierung	29
1.2.1 Photochemische und photophysikalische Grundlagen.....	29
1.2.2 Überblick über die photodynamische Inaktivierung	31
1.2.3 Klinische Anwendungsgebiete der photodynamischen Inaktivierung.....	35
1.3 Zielsetzung der Arbeit	38
2. Material und Methoden	39
2.1 Material	39
2.1.1 Laborgeräte	39
2.1.2 Glas- und Plastikwaren	40
2.1.3 Kulturmedien und Puffer	41
2.1.4 Photosensibilisatoren	41
2.1.5 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen.....	42
2.1.6 Oligonukleotide.....	43
2.1.7 Zelllinie	43
2.1.8 Leishmanienstamm	43
2.1.9 Mauslinie.....	44
2.1.10 Software	44
2.2 Methoden	45
2.2.1 Kultivierung und Präparation der Leishmanien.....	45
2.2.2 Kultivierung und Präparation der J774A.1-Makrophagenzelllinie.....	47
2.2.3 Zellzählung und Bestimmung der Leishmanienzahl.....	48

2.2.4	Generierung und Isolation von Peritoneal-Exsudat-Makrophagen aus der Maus.....	49
2.2.5	Kultivierung und <i>in-vitro</i> -Infektion von Peritoneal-Exsudat-Makrophagen mit Leishmanien.....	49
2.2.6	Photosensibilisatoren.....	50
2.2.7	Lichtquelle und Bestrahlungsparameter.....	52
2.2.8	Photodynamische Inaktivierung von <i>L. major</i> Promastigoten: anti-promastigote Wirkung von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a.....	54
2.2.9	Photodynamische Inaktivierung der J774A.1-Makrophagenzelllinie: Zytotoxizität von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a.....	55
2.2.10	Photodynamische Inaktivierung von mit <i>L. major</i> infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen: anti-amastigote Wirkung und Zytotoxizität von SAPyR.....	56
2.2.11	MTT-Assay.....	57
2.2.12	Genomische DNA Isolation aus Peritoneal-Exsudat-Makrophagen.....	58
2.2.13	Quantitative real Time-PCR zur Bestimmung der Parasitenlast in Peritoneal-Exsudat-Makrophagen.....	59
2.2.14	Analyse der Daten.....	63
3.	Ergebnisse.....	64
3.1	OD-Wert Messung und Bestimmung der Vitalität von Proben mit bekannter Anzahl an <i>L. major</i> Promastigoten mittels MTT-Assay.....	64
3.2	Photodynamische Inaktivierung von <i>L. major</i> Promastigoten.....	67
3.2.1	Anti-promastigote Wirkung von TMPyP.....	67
3.2.2	Anti-promastigote Wirkung von SAPyR.....	71
3.2.3	Anti-promastigote Wirkung von FLASH-07a.....	74
3.2.4	Vergleich der Effektivität von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a bei der photodynamischen Inaktivierung von <i>L. major</i> Promastigoten.....	77
3.3	OD-Wert Messung und Bestimmung der Vitalität von Proben mit bekannter Anzahl der J774A.1-Makrophagenzelllinie mittels MTT-Assay	81
3.4	Photodynamische Inaktivierung der J774A.1 Makrophagenzelllinie.....	83
3.4.1	Zytotoxizität von TMPyP.....	83
3.4.2	Zytotoxizität von SAPyR.....	86

3.4.3	Zytotoxizität von FLASH-07a	89
3.4.4	Vergleich der Zytotoxizität von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a bei der der photodynamischen Inaktivierung der J774A.1-Makrophagenzelllinie.....	92
3.5	Vergleich der anti-promastigoten Wirkung von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a mit der Zytotoxizität der Photosensibilisatoren auf die J774A.1-Makrophagenzelllinie.....	96
3.6	Photodynamische Inaktivierung von mit <i>L. major</i> infizierten Peritoneal- Exsudat-Makrophagen: anti-amastigote Wirkung und Zytotoxizität von SAPyR.....	103
4.	Diskussion	106
5.	Zusammenfassung	123
	Abkürzungsverzeichnis	125
	Literaturverzeichnis	130
	Anhang	144
	Danksagung	
	Eidesstattliche Erklärung	

1. Einleitung

1.1 Die Erkrankung Leishmaniose

1.1.1 Beschreibung und Klassifikation des Parasiten *Leishmania*

Benannt nach dem britischen Pathologe und Tropenarzt Sir William B. Leishman (Pschyrembel et al., 2007, S. 1083) handelt es sich bei Leishmanien um begeißelte Protozoen aus der Familie *Trypanosomatidae*.

Der Parasit kommt, wie in **Abb. 1** dargestellt, in zwei morphologischen Formen vor. Die promastigote Form ist 15 - 25 µm lang, hat einen Zellkern (Nukleus) sowie eine weitere DNA-haltige Struktur neben dem Zellkern (Kinetoplast) und ein freies, vorderes Flagellum. Sie ist im Intestinaltrakt der Sandmücke zu finden sowie die einzige morphologische Form, die in Zellkultur anzüchtbar ist.

Die amastigote Form ist 2 - 5 µm lang, besitzt einen Nukleus und einen Kinetoplast, ist aber unbegeißelt. In dieser Form sind die Leishmanien obligat intrazelluläre Parasiten im Monozyten-Makrophagensystem des Wirts (Farrar et al., 2014, S. 635; Löscher et al., 2010, S. 600).

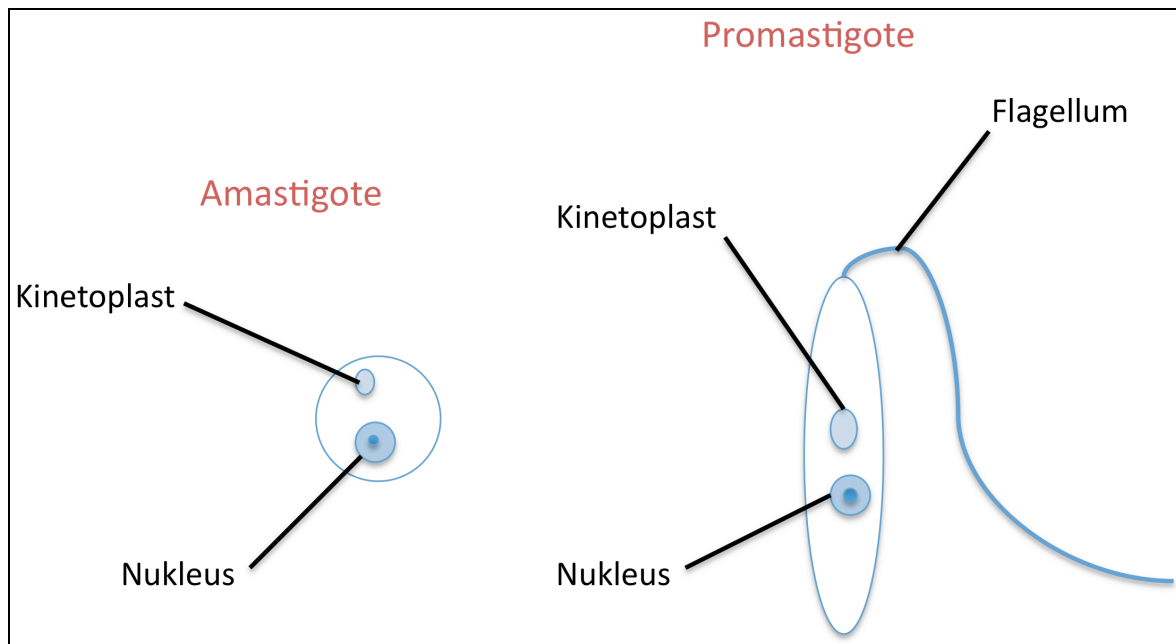


Abb. 1: Morphologie der Leishmanien. Auf der linken Seite sind *Leishmania* Amastigote gezeigt. In dieser Form sind die Leishmanien 2 - 5 μm lang, unbegeißelt und obligat intrazelluläre Parasiten. Auf der rechten Seite sind *Leishmania* Promastigote zu sehen. In dieser Form sind die Leishmanien 15 - 25 μm lang, besitzen ein Flagellum und sind im Intestinaltrakt der Sandmücke zu finden (Löscher et al., 2010, S. 600).

Die verschiedenen Spezies der Gattung *Leishmania* sind morphologisch schwer zu unterscheiden. Um sie zu differenzieren und zu klassifizieren werden deshalb Isoenzym Charakterisierungen (Goldstandard) und DNA-Analysen angewendet (Cook et al., 2009, S. 1341).

Die humanpathogenen Arten des Parasiten *Leishmania* (*L.*) werden in zwei Subgenera eingeteilt: *L. (Leishmania)*, die in der Alten Welt (Europa, Afrika, Asien) und in der Neuen Welt (amerikanischer Kontinent) vorkommen und *L. (Viannia)*, die nur in der Neuen Welt zu finden sind. Die beiden Gruppen können wiederum in verschiedene Spezies unterteilt werden, von denen bis heute über 20 verschiedene identifiziert wurden. Die Untergattung *L. (Leishmania)* kann weiterhin je nach Krankheitsbild in dermatotrope und viszerotrope Arten unterteilt werden, wobei es einige Arten gibt, die beide Formen der Leishmaniose hervorrufen können. Einige dermatotrope Arten der Untergattung *L. (Viannia)* können sich auf die Schleimhäute ausbreiten und werden daher zusätzlich als mukotrop bezeichnet (Farrar et al., 2014, S. 635).

Tab. 1 gibt einen Überblick über die Taxonomie der Leishmanien, wobei zu beachten ist, dass die Klassifizierung international nicht einheitlich erfolgt (Löscher et al., 2010, S. 600).

Untergattung	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Alte Welt	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> ^a <i>L. aethiopica</i>		
Neue Welt	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> ^a <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> ^a <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> ^b	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Tropismus	Viszerotrop	Dermatotrop	Dermatotrop	Mukotrop
^a Spezies unter Diskussion ^b Taxonomische Position unter Diskussion				

Tab. 1: Überblick über humanpathogene Leishmanien. Die Tab. zeigt die Einteilung des Parasiten *Leishmania (L.)*: Es werden die Subgenera *L. (Leishmania)* und *L. (Viannia)* unterschieden, die sich in ihrer geographischen Verbreitung unterscheiden (Alte Welt und Neue Welt). Die beiden Gruppen können wiederum in verschiedene Spezies unterteilt werden, die je nach der von ihnen hervorgerufenen Form der Leishmaniose weiter in viszerotrope, dermatotrope und mukotrope Arten unterteilt werden können. Modifiziert nach (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasoses, 2010, S. 7, Tab.1).

1.1.2 Epidemiologie und geographische Verbreitung der Leishmaniose

Unter Leishmaniose versteht man eine Gruppe von Erkrankungen, die durch 20 verschiedene Arten der Gattung *Leishmania* hervorgerufen werden. Es werden drei Hauptgruppen unterschieden: Die viszerale, die kutane und die mukokutane Leishmaniose (Farrar et al., 2014, S. 631). Die Erkrankung wird zu den „Neglected Tropical Diseases“ (Farrar et al., 2014, S. 631) gezählt, da es Schätzungen nach 1 - 2 Millionen Neuerkrankungen und 40.000 Todesfälle pro Jahr gibt (RKI, 2014). Über 350 Millionen Menschen leben in Risikogebieten (Farrar et al., 2014, S. 631), in denen die Erkrankungsfälle momentan noch zunehmen (RKI, 2011, S. 130). Zu den Risikogebieten zählen 98 Länder der Erde, die sich über fast alle Kontinente verteilen. Die betroffenen Länder werden in die Alte Welt, wozu Asien, Afrika und Südeuropa zählen und die Neue Welt, die den Südamerikanischen Kontinent umfasst, unterteilt (Farrar et al., 2014, S. 631). Da auch Südeuropa zu den betroffenen Gebieten gehört, gibt es durch den Tourismus auch

jährlich Fälle in Deutschland. Im Jahr 2013 wurden zehn Fälle kutaner, aber kein Fall viszeraler Leishmaniose gemeldet. Von den zehn kutanen-Leishmaniose-Fällen stammten acht aus Europa (sechs aus Spanien und zwei aus Malta) sowie zwei aus dem Iran und Syrien (RKI, 2014).

In der Regel erstreckt sich die Ausbreitung der Erkrankung aber zwischen dem 45. Breitengrad Nord und dem 32. Breitengrad Süd und korreliert mit dem Lebensraum der übertragenden Sandmücke (Cook et al., 2009, S. 1344). Die Leishmaniose der Alten Welt tritt typischerweise in halbtrockenen Gebieten oder der Wüste auf. Die der Neuen Welt in tropischen und subtropischen Wäldern (Farrar et al., 2014, S. 632; Sanchez, 2014a).

Die Erkrankung ist mit sozioökonomischen Faktoren wie Armut, ärmlichen Wohnverhältnissen und mangelnden Ressourcen assoziiert. Außerdem zählt Immunsuppression durch Unterernährung oder durch eine HIV-Koinfektion zu den Risikofaktoren für die Reaktivierung einer ausgeheilten Erkrankung. Die Epidemiologie der Leishmaniose wird zudem durch Bevölkerungsmigration, Umwelt- und Klimaveränderungen beeinflusst (WHO, 2015a, n.d.).

Die kutane Leishmaniose ist weltweit verbreitet. Allerdings ereignen sich wie **Abb. 2** zeigt, über 90 % der 700.000 - 1,5 Millionen jährlichen Neuerkrankungen in Südamerika, dem Mittelmeerraum (Nordafrika und Südeuropa), dem Mittleren Osten und in Zentralasien. Zu den meist betroffenen Ländern gehören Afghanistan, Syrien, Pakistan, Iran, Saudi Arabien, Algerien, Peru, Kolumbien und Brasilien (Farrar et al., 2014, S. 632; WHO, 2015a).

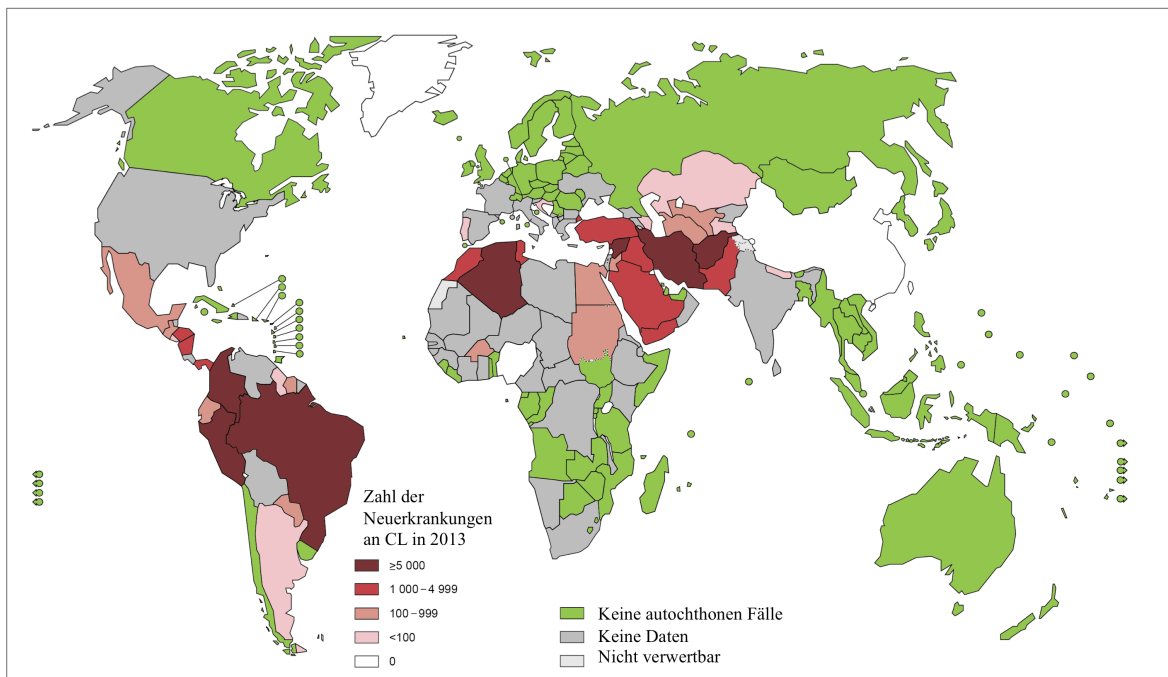


Abb. 2: Weltweite Verbreitung der kutanen Leishmaniose (CL) im Jahr 2013. Modifiziert nach (WHO, 2015b).

Die kutane Leishmaniose der Alten Welt (*Orient- oder Aleppobeule*), wird hauptsächlich durch *L. tropica* und *L. major* sowie seltener durch *L. aethiopica* übertragen (Magill, 2013, S. 751). Dermatotrope enzymatische Varianten der normalerweise viszerotropen Spezies *L. infantum* können zudem die kutane Leishmaniose des Mittelmeerraums verursachen (Farrar et al., 2014, S. 635; Löscher et al., 2010, S. 604).

L. major und *L. aethiopica* werden als Zoonose übertragen, wobei das Verbreitungsgebiet von *L. major* von Nordafrika bis Süd-Ostasien reicht und das von *L. aethiopica* auf Äthiopien und Kenia beschränkt ist (Farrar et al., 2014, S. 635; Magill, 2013, S. 751–752). Hierbei kann *L. aethiopica* die Sonderform der diffusen kutanen Leishmaniose hervorrufen (Farrar et al., 2014, S. 641). Durch *L. tropica* kann die Erkrankung auch als Anthroponose übertragen werden. Das Verbreitungsgebiet dieser Art ist kleiner als das von *L. major* (Farrar et al., 2014, S. 635; Magill, 2013, S. 751–752). *L. tropica* ist für die Entstehung der Leishmaniasis recidivans, einer weiteren Sonderform, verantwortlich (Farrar et al., 2014, S. 641).

An der Übertragung der kutanen Leishmaniose der Neuen Welt sind Arten der Subgattung *L. (Leishmania)* und *L. (Viannia)* beteiligt. Die wichtigsten humanpathogenen Arten sind *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Leishmania) venezuelensis* sowie *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (Viannia) peruviana* und *L. (Viannia) guyanensis* (Sanchez, 2014b).

L. (Leishmania) amazonensis und seltener *L. (Leishmania) mexicana* können die diffuse kutane Leishmaniose der Neuen Welt hervorrufen. *L. (Viannia) braziliensis* ruft gelegentlich eine Leishmaniasis recidivans hervor (Farrar et al., 2014, S. 641). Alle Arten werden als Zoonosen übertragen (Cook et al., 2009, S. 1344).

Die mukokutane Leishmaniose, auch genannt *Espundia*, gibt es nur in der Neuen Welt. Die Länder Bolivien, Brasilien und Peru sind besonders betroffen (WHO, 2015a). Sie ist eine seltene Komplikation der kutanen Leishmaniose, die vor allem nach Infektion mit *L. (Viannia) braziliensis* auftritt (Farrar et al., 2014, S. 635).

Die viszerale Leishmaniose, auch *Kala-Azar* genannt, ist wie **Abb. 3** zeigt, im indischen Subkontinent sowie in Ostafrika und Brasilien endemisch. Neunzig Prozent der Fälle ereignen sich in sechs Ländern: Bangladesch, Indien, Südsudan, Sudan, Äthiopien und Brasilien. Jährlich werden ca. 200.000 - 400.000 Neuerkrankungen gemeldet (WHO, 2015a).

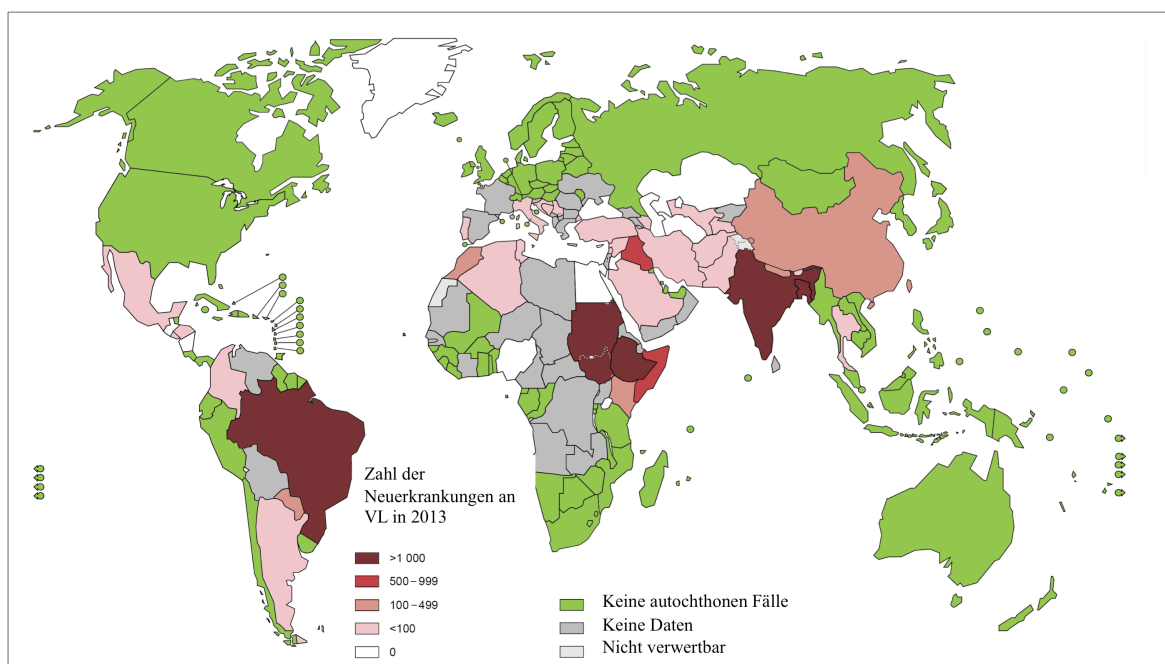


Abb. 3: Weltweite Verbreitung der viszeralen Leishmaniose (VL) im Jahr 2013. Modifiziert nach (WHO, 2015c).

Die viszerale Leishmaniose der Alten Welt wird in Ostafrika und Indien durch *L. donovani* als Anthroponose von Mensch zu Mensch übertragen (Farrar et al., 2014, S. 631).

Eine Komplikation der durch *L. donovani* übertragenen viszeralen Leishmaniose ist das Post-Kala-Azar dermale Leishmanoid (Farrar et al., 2014, S. 639).

Im Mittelmeerraum, mittleren Osten, Zentralasien und China wird die viszerale Leishmaniose durch *L. infantum* als Zoonose von Tieren auf den Mensch übertragen.

Die viszerale Leishmaniose der Neuen Welt wird ebenfalls als Zoonose durch *L. infantum* (hier Synonym *L. chagasi*) übertragen, besonders betroffen ist das Land Brasilien (Farrar et al., 2014, S. 631–632; Magill, 2013, S. 743).

1.1.3 Lebenszyklus des Parasiten *Leishmania*

Die meisten Leishmaniosen sind Zoonosen, wobei viele verschiedene Säugetiere als Wirt fungieren. In der Alten Welt sind das unter anderem im häuslichem Umfeld lebende sowie wild lebende Hunde, Füchse, Wölfe, Schakale, Waschbären, Nagetiere, Schliefer, Erdferkel und Rennmäuse (Cook et al., 2009, S. 1343; Farrar et al., 2014, S. 633). In der Neuen Welt sind es die in den Wäldern Zentral- und Südamerikas lebenden Tiere, wie zum Beispiel Waldnagetiere, Faultiere, Gürteltiere, Tamanduas und das Opossum (Cook et al., 2009, S. 1343; Farrar et al., 2014, S. 633).

Die durch *L. donovani* und *L. tropica* verursachte Leishmaniose wird dagegen nur (*L. donovani*) bzw. meistens (*L. tropica*) von Mensch zu Mensch übertragen (Anthroponose) (Cook et al., 2009, S. 1343).

Die Wirte fungieren als natürliches Reservoir und sind somit für den Fortbestand der Leishmanien in der Natur verantwortlich. Die meisten dieser Wirte sind gut an die Leishmanien gewöhnt und erkranken deshalb nur mild. Sie werden auch als latente Infektionsträger bezeichnet. Eine wichtige Ausnahme sind Hunde, sie erkranken meistens schwer und versterben (Cook et al., 2009, S. 1343). Durch Infektion von Tieren, die in der Umgebung des Menschen leben, wird die Infektionskette zum Menschen geschlossen (Löscher et al., 2010, S. 602).

Die Übertragung der Leishmanien auf den Wirt findet durch Sandmücken (*Phlebotomen*) statt. Es sind etwa 1000 Arten von Sandmücken bekannt (Farrar et al., 2014, S. 633), die fünf Gattungen zugeordnet werden können: *Phlebotomus* und *Sergentomyia* in der Alten Welt und *Lutzomyia*, *Brumptomyia* und *Warileya* in der Neuen Welt (Cook et al., 2009, S. 1342). Von den bekannten Arten gelten 70 als Vektoren für Leishmanien. Sie gehören alle

zu den Gattungen *Phlebotomus* und *Lutzomyia*. Die verschiedenen Sandmückenspezies übertragen jeweils bestimmte Leishmanienarten (Farrar et al., 2014, S. 633).

Die Sandmücken sind 1,5 - 2,5 mm lange, behaarte Mücken. Wie **Abb. 4** zeigt, sind sie an ihrer V-förmigen Flügelstellung zu erkennen (Magill, 2013, S. 740).



Abb. 4: Sandmücke bei der Blutmahlzeit. Bereitgestellt von (WHO, 2013).

Die Sandmücken bewegen sich mit hüpfenden Bewegungen fort (Magill, 2013, S. 740), weshalb ihr Flugradius begrenzt ist. Sie werden erst zur Dämmerung aktiv. Während des Tages halten sie sich dagegen an schattigen, feuchten Orten auf dem Erdboden auf (Farrar et al., 2014, S. 633). Hier findet wahrscheinlich auch die Entwicklung der Larven zur Mücke statt. Sie dauert je nach Spezies, Temperatur und Nahrungsangebot 30 - 60 Tage. Die weiblichen Sandmücken benötigen eine Blutmahlzeit um ihre Eier legen zu können (Farrar et al., 2014, S. 633).

Ist der Wirt infiziert, nimmt die weibliche Sandmücke, wie in **Abb. 5** dargestellt, durch die Blutmahlzeit die intrazellulären (selten extrazellulären), amastigoten Leishmanien auf (Cook et al., 2009, S. 1343–1344). Die Sandmücken bleiben dann ihr komplettes Leben (einige Wochen) infektiös (Magill, 2013, S. 742). Im Darm der Mücke wandeln sich die amastigoten Leishmanien in die promastigote Form um. Die Vermehrung der Promastigoten findet bei der *L. (Leishmania)* Subgattung im Mitteldarm und bei der *L. (Viannia)* Subgattung im Mittel- und Hinterdarm statt. Unabhängig davon wo die Vermehrung stattgefunden hat, wandern die Promastigoten in den Saugrüssel der Mücke. In diesem Stadium sind sie für den Säugetierwirt infektiös, da die Parasiten mit der nächsten Blutmahlzeit auf einen neuen Wirt übertragen werden können (Farrar et al., 2014,

S. 636). Der Vorgang von der Aufnahme der Parasiten bis zur erneuten Übertragung dauert sieben bis zehn Tage (Magill, 2013, S. 740). Die Übertragung auf den Wirt wird durch den Speichel der Sandmücke vereinfacht, da er unter anderem vasodilatierende, gerinnungshemmende und immunsupprimierende Substanzen enthält (Cook et al., 2009, S. 1344).

Nach Inokulation der Promastigoten in die Haut (Löscher et al., 2010, S. 602), können diese der angeborenen Immunabwehr entkommen, indem sie von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden. Die Aufnahme wird durch spezielle Oberflächenmoleküle auf den Parasiten erleichtert. Nach der Aufnahme befinden sich die Leishmanien dann in einem speziellen intrazellulären Kompartiment, dem Phagolysosom. Dort wandeln sie sich in die amastigote Form um, die an die Bedingungen im Phagolysosom angepasst ist und sich hier replizieren kann (Ritter, 2012, S. 124–125). Makrophagen und Neutrophile sind dabei die Immunzellen mit zentraler Bedeutung für die Replikation der Leishmanien (Ritter, 2012, S. 127). Nach einiger Zeit platzen die Wirtszellen und die Amastigoten werden freigesetzt. Sie werden dann von weiteren phagozytierenden Zellen aufgenommen und breiten sich im Körper des Wirts aus (Ritter, 2012, S. 125). Der Zyklus schließt sich mit einer weiteren Blutmahlzeit der weiblichen Sandmücke (Farrar et al., 2014, S. 636).

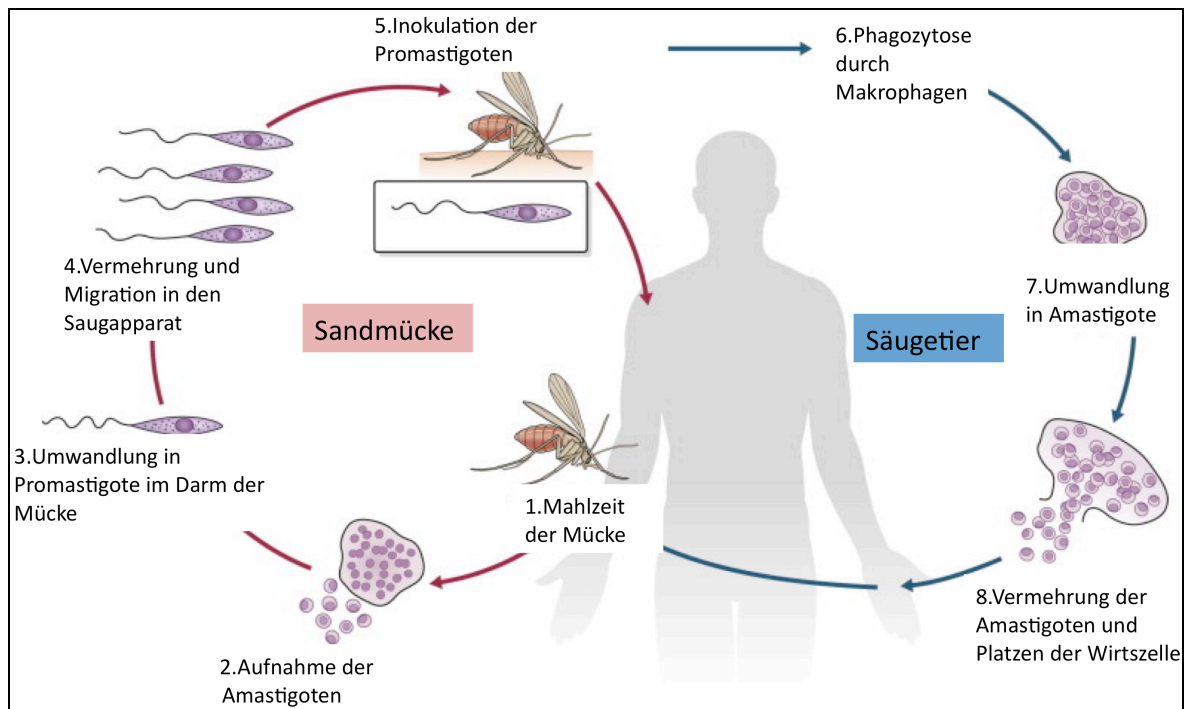


Abb. 5: Lebenszyklus der Leishmanien. Der Zyklus beginnt mit einer Blutmahlzeit der weiblichen Sandmücke, durch die sie von einem infizierten Wirt amastigote Leishmanien aufnimmt (1 und 2). Nach Umwandlung und Vermehrung im Darm wandern die Promastigoten in den Saugapparat der Mücke (3 und 4). Mit der nächsten Blutmahlzeit können die Parasiten auf den Wirt übertragen werden (5). Nach Inokulation werden die Promastigoten von phagozytierenden Zellen aufgenommen, in denen sie sich in Amastigote umwandeln und replizieren (6 und 7). Nach einiger Zeit platzen die Wirtszellen und die Amastigoten breiten sich im Körper des Wirts aus (8). Der Zyklus schließt sich mit einer weiteren Blutmahlzeit der Sandmücke. Modifiziert nach (Farrar et al., 2014, S. 636 Abb. 47.6).

1.1.4 Adaptive Immunantwort gegen die Leishmanien

Mit einiger Verzögerung kommt es zur Entwicklung einer adaptiven Immunantwort gegen die Leishmanien, die sich in den Immunzellen des Wirts verstecken (Ritter, 2012, S. 126). Sie beginnt, indem spezielle antigenpräsentierende Zellen Leishmanien-Antigene prozessieren und über MHC Klasse II Moleküle naiven $CD4^+$ T-Zellen präsentieren. Diese Präsentation erfolgt in den hautdrainierenden Lymphknoten. In Anwesenheit von Zytokinen wie Interleukin (IL)-12 und IL-2 führt die Aktivierung der naiven $CD4^+$ T-Zellen zur Ausbildung und Replikation von antigenspezifischen T-Helfer 1 (TH1)-Zellen, die auch als TH1-Effektorzellen bezeichnet werden (Ritter, 2012, S. 126–127). Bei TH1-Zellen handelt es sich um eine Untergruppe der $CD4^+$ T-Helfer-Zellen, für die unter anderem die Interferon- γ (IFN- γ) Produktion und die Expression des Oberflächenmarkers CD40L kennzeichnend ist (Ritter, 2012, S. 127). Nachdem die TH1-Effektorzellen an den

Ort der Infektion gewandert sind, aktivieren sie dort die infizierten Makrophagen. Dies geschieht durch die Produktion von Zytokinen wie IFN- γ und der Interaktion ihres Oberflächenmarkers CD40L mit dem Oberflächenmarker CD40 der Makrophagen (Ritter, 2012, S. 128). Die aktivierten Makrophagen exprimieren das Enzym induzierbare NO-Synthase und produzieren so intrazellulär leishmanizides Stickstoffmonoxid (NO). Dadurch werden die in den Immunzellen liegenden Parasiten abgetötet (Ritter, 2012, S. 127).

Die Entwicklung einer CD4⁺ TH1 vermittelten Immunantwort ist also essentiell für die effektive Bekämpfung der Parasiten und für die Heilung (Ritter, 2012, S. 127). Neben der CD4⁺ zellvermittelten Immunantwort können auch über MHC Klasse I Moleküle aktivierte antigenspezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellen eine Rolle bei der Elimination der Leishmanien spielen (Ritter, 2012, S. 128).

Die verschiedenen T-Zellen werden jeweils von bestimmten antigenpräsentierenden Zellen aktiviert. Die für die Immunantwort so wichtigen CD4⁺ TH1-Zellen entstehen durch die Interaktion von Langerin⁻ dermalen dendritischen Zellen (dDZ) mit naiven CD4⁺ T-Zellen (Ritter, 2012, S. 131). Durch die Interaktion von Langerin⁺ dDZ mit naiven CD8⁺ T-Zellen entstehen antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen (Ritter, 2012, S. 132). Langerhanszellen aktivieren naive CD4⁺ T-Zellen zu IL-10 und IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Zellen. Diese Zellen scheinen keine Rolle bei der Bekämpfung der Parasiten zu spielen, wohl aber bei der Chronifizierung der Erkrankung (Ritter, 2012, S. 131-133).

1.1.5 Klinik der kutanen, mukokutanen und viszeralen Leishmaniose

Wie und ob sich die Infektion mit Leishmanien klinisch zeigt, hängt zum einen von der Leishmanienspezies und den möglicherweise jahrelang intrazellulär persistierenden Amastigoten ab. Zum anderen ist der klinische Verlauf von genetischen Faktoren und dem Immunstatus des Wirts abhängig (Farrar et al., 2014, S. 636; Ritter, 2012, S. 125).

Die unterschiedlichen klinischen Verläufe werden im Folgenden dargestellt:

Bei der spontan heilenden, lokalisierten Form der kutanen Leishmaniose (LCL; *engl.: localized cutaneous leishmaniasis*), verbleiben die Amastigoten nach Inokulation in der Nähe der Einstichstelle und es kommt zu einer effektiven zellvermittelten Immunantwort,

die sich bei den meisten Patienten in einer Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion zeigt (Ritter, 2012, S. 126). Nach einer Inkubationszeit von Wochen bis Monaten (RKI, 2011, S. 130) entwickelt sich zunächst eine rote Papel, die sich langsam zu einem Nodus vergrößert und nach einigen Monaten ihre endgültige Größe von bis zu 10 cm Durchmesser erreicht. Danach entwickelt sich, wie in **Abb. 6** zu sehen, ein Ulkus mit erhabenem Randwall, dessen Mitte mit einer Kruste bedeckt sein kann (Farrar et al., 2014, S. 640; RKI, 2011, S. 130). Das histologische Korrelat entspricht einer Infiltration der Haut mit Histiozyten voller Amastigoten sowie Lymphozyten und Plasmazellen (Farrar et al., 2014, S. 638). Die Läsionen sind schmerzlos, können multiple auftreten und entstehen meist an unbedeckten Körperteilen wie im Gesicht und an den Extremitäten (RKI, 2011, S. 130) Die LCL der Neuen Welt kann auch das Ohr läppchen betreffen, sie wird dann als *Chiclero-Ulkus* bezeichnet (Sanchez, 2014b). Eine systemische Entzündungsreaktion fehlt in der Regel, allerdings kann es bei einigen Arten zur Ausbreitung entlang der Lymphgefäße kommen (Farrar et al., 2014, S. 640). Die Läsionen heilen abhängig von der Spezies innerhalb von Monaten bis Jahren unter Narbenbildung von selbst ab (Farrar et al., 2014, S. 641). Danach besteht dauerhaft Immunität, die vor einer Reinfektion schützt (Ritter, 2012, S. 126).



Abb. 6: Kind mit kutaner Leishmaniose. Bereitgestellt von (WHO, 2013).

Kommt es dagegen zu keiner ausreichenden zellvermittelten Immunität, entsteht die nicht heilende, diffuse kutane Leishmaniose, bei der sich die Parasiten in andere Hautareale ausbreiten (Ritter, 2012, S. 126). Klinisch imponieren nicht-ulzerierende Knoten, die sich fast über den kompletten Körper verteilen und nie spontan abheilen (Farrar et al., 2014, S. 641). Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der lepromatösen Lepra, die deshalb eine wichtige Differentialdiagnose ist (Löscher et al., 2010, S. 609). Die Histologie der betroffenen

Areale zeigt Makrophagen voller Amastigoten, aber kaum Lymphozyten (Farrar et al., 2014, S. 638).

Eine weitere nichtheilende, chronische Form der kutanen Leishmaniose, die durch eine fehlerhafte Immunantwort entsteht (Magill, 2013, S. 752), ist die Leishmaniasis recidivans. Hier bilden sich, wie in **Abb. 7** dargestellt, im Außenbereich einer narbig abgeheilten Primärläsion nach ein bis zwei Jahren neue Papeln. Der abgeheilte, innere Teil der Läsion ist also von einem nicht heilenden, äußeren Bereich umgeben. Häufig sind die Läsionen im Gesicht lokalisiert und ähneln denen des *Lupus vulgaris* (Farrar et al., 2014, S. 641; Löscher et al., 2010, S. 608). Die Histologie zeigt im äußeren Bereich nicht-verkäsende Granulome, die wenig Parasiten enthalten (Magill, 2013, S. 752).

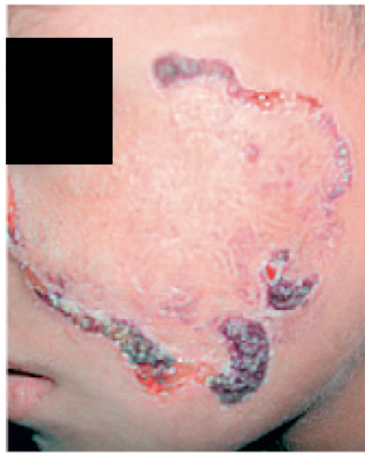


Abb. 7: Leishmaniasis recidivans. Die dargestellte Läsion besteht aus einem narbig abgeheilten inneren Bereich und einem aktiven, äußeren Bereich in dem sich neue Papeln gebildet haben. Modifiziert nach (Reithinger et al., 2007).

Bei der mukokutanen Leishmaniose kommt es Wochen bis Jahre nach Abheilung einer kutanen Leishmaniose ähnlichen Läsion zur sekundären Ausbreitung auf die Schleimhaut des Nasen-Rachenraumes (Ritter, 2012, S. 126).

Typische Symptome sind dabei Epistaxis und eine verstopfte Nase (Farrar et al., 2014, S. 642; Löscher et al., 2010, S. 609). Histologisch zeigt sich besonders im Bereich der Arteriolen ein entzündliches Infiltrat aus Lymphozyten und Makrophagen, die kaum Parasiten enthalten. Die damit assoziierte Vaskulitis führt schnell zu Ulzerationen der Schleimhaut (Farrar et al., 2014, S. 638). Im Verlauf kommt es zur Zerstörung des Nasenseptums, des Gaumens und der Lippen, bis zur kompletten Verstümmelung des Gesichts (Farrar et al., 2014, S. 642; RKI, 2011, S. 131). Das führt zu hohem Leidensdruck der Patienten (Farrar et al., 2014, S. 642). Die Läsionen können sich auch in den Larynx

und die Trachea ausbreiten. Häufige Symptome sind dabei Heiserkeit, Husten, Schluckbeschwerden und Atemnot. Im Endstadium der Erkrankung ist eine komplette Verlegung der Atemwege möglich. Aspirationspneumonien und Superinfektionen sind eine häufige Todesursache (Farrar et al., 2014, S. 642; Löscher et al., 2010, S. 609–610). Wichtige Differentialdiagnosen sind Mykosen, Syphilis, Lepra und Neoplasien der Haut (Löscher et al., 2010, S. 610).

Bei der viszeralen Leishmaniose verbleiben die Parasiten nicht an der Einstichstelle, sondern infiltrieren die inneren Organe. Vor allem Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark sind betroffen (Ritter, 2012, S. 125). Die Histologie ist dabei organspezifisch, es kommt aber überall zur Hyperplasie des retikuloendothelialen Systems mit Proliferation von parasitenbeladenen Makrophagen (Farrar et al., 2014, S. 636).

Nach einer Inkubationszeit von in der Regel zwei bis sechs Monaten, die allerdings auch zehn Tage bis zwei Jahre dauern kann, kommt es zu typischen Symptomen. Dazu gehören eine deutliche Splenomegalie, etwas seltener und weniger ausgeprägt eine Hepatomegalie, remittierendes Fieber und Panzytopenie. Letztere führt zu Anämie, erhöhter Blutungsneigung und Infektanfälligkeit. Häufig kommt es außerdem zur Mitbeteiligung des Respirationstrakts und des Intestinaltrakts (Farrar et al., 2014, S. 638; Sanchez, 2014a). Bei Patienten im Sudan kann es zu Lymphadenopathie kommen, bei der indischen viszeralen Leishmaniose kann in seltenen Fällen eine Hyperpigmentierung der Haut beobachtet werden, weshalb die Krankheit auch *Kala-Azar* (schwarzes Fieber) genannt wird (Farrar et al., 2014, S. 639). Die Krankheit schreitet über Monate bis Jahre langsam voran. Im Verlauf kommt es zu Gewichtsverlust. Gleichzeitig zeigen die Patienten, wie in **Abb. 8** gezeigt, durch die extreme Splenomegalie, teilweise in Kombination mit Hepatomegalie einen vergrößerten Bauchumfang. Es kann zur Ausbildung von Ödemen bis zu Anasarka kommen (Farrar et al., 2014, S. 639; Sanchez, 2014a). Seltener kommt es zu fulminanten Leberfunktionsstörungen mit Ikterus und Aszites, die als prognostisch schlechte Zeichen zu werten sind (Löscher et al., 2010, S. 607). Unbehandelt verläuft die viszerale Leishmaniose in den meisten Fällen letal. Der Tod tritt meist durch Superinfektionen, extreme Anämie oder schwere Blutungen ein (RKI, 2011, S. 131).

Neben der manifesten Verlaufsform gibt es auch die häufigeren asymptomatischen und subklinischen Verläufe (Farrar et al., 2014, S. 639). Eine Ausnahme sind dabei HIV-Infizierte, bei ihnen verläuft die Erkrankung meist atypisch und fulminant (Löscher et al., 2010, S. 607). Differentialdiagnostisch sind vor allem Erkrankungen, die mit Fieber,

Hepatosplenomegalie und Blutbildveränderungen einhergehen zu berücksichtigen (Löscher et al., 2010, S. 610).



Abb. 8: Mädchen mit viszeraler Leishmaniose. Bereitgestellt von (WHO, 2013).

Monate bis Jahre nach Behandlung der viszeralen Leishmaniose kann es zu einem Post-Kala-Azar dermalen Leishmanoid (PKDL) kommen. Selten wird es auch gleichzeitig mit einer viszeralen Leishmaniose oder ohne vorangegangene viszerale Leishmaniose beobachtet (Farrar et al., 2014, S. 639; Löscher et al., 2010, S. 607). Risikofaktoren für die Entwicklung eines PKDL sind eine nicht abgeschlossene oder ungeeignete Behandlung sowie die Behandlung mit 5-wertigen Antimonpräparaten (Farrar et al., 2014, S. 639).

Wie **Abb. 9** zeigt, kommt es bei dem PKDL oft zu gemischt makulonodulären Läsionen. Der Ausschlag kann aber auch als hypopigmentierte Makulae imponieren. Die Läsionen beginnen meist im Gesicht und können sich auf weitere Körperteile ausbreiten (Farrar et al., 2014, S. 639).



Abb. 9: Patient mit einem Post-Kala-Azar dermalen Leishmanoid. Bereitgestellt von (WHO, 2013).

1.1.6 Diagnostik der Leishmaniose

Das Aussehen der Läsionen der kutanen Leishmaniose kann stark variieren, wodurch wie oben beschrieben, andere Hauterkrankungen als Differentialdiagnosen in Betracht kommen. Deshalb wird weitere Diagnostik benötigt, um den klinischen Verdacht zu bestätigen (Farrar et al., 2014, S. 644).

Sehr zuverlässig ist der direkte Erregernachweis in Gewebeproben. Das Material wird durch Abkratzen, Ausdrücken von Flüssigkeit, Feinnadelaspiration oder Stanzbiopsien gewonnen (Farrar et al., 2014, S. 644; Löscher et al., 2010, S. 611). Mittels Mikroskopie, Kultur und Polymerasekettenreaktion (PCR; *engl.: polymerase chain reaction*) wird der Erreger dann nachgewiesen (RKI, 2011, S. 131). In Endemiegebieten ist oft nur die mikroskopische Untersuchung möglich, da die anderen Methoden mit einem hohen technischen Aufwand verbunden sind (Farrar et al., 2014, S. 644). Eine Speziesidentifizierung sollte dennoch angestrebt werden, da in einigen Gebieten verschiedene Leishmanienarten als Erreger der kutanen Leishmaniose in Frage kommen (Farrar et al., 2014, S. 644; Löscher et al., 2010, S. 612).

Die Antikörperproduktion ist bei der kutanen Leishmaniose meist gering ausgeprägt, weshalb serologische Tests keine große Bedeutung in der Diagnostik haben (Farrar et al., 2014, S. 644).

Als weiteres diagnostisches Mittel steht der Leishmanin skin test (LST, Montenegro Test) zur Verfügung. Dabei wird intrakutan Leishmanienantigen injiziert und eine Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion erzeugt (Farrar et al., 2014, S. 644). Er fällt bei der LCL, der Leishmaniasis recidivans und der mukokutanen Leishmaniose in der Regel positiv aus. Bei der diffusen kutanen Leishmaniose ist er immer negativ (Löscher et al., 2010, S. 611; Magill, 2013, S. 757; Ritter et al., 1996).

Der Verdacht auf eine viszerale Leishmaniose sollte vor Beginn einer Therapie ebenfalls bestätigt werden (Farrar et al., 2014, S. 643).

Die für den direkten Erregernachweis benötigten Proben können aus der Milz, dem Knochenmark, der Leber oder vergrößerten Lymphknoten gewonnen werden (Löscher et al., 2010, S. 610). Nach Gewinnung des Aspirats wird es auf einem Objektträger ausgestrichen und unter anderem nach Giemsa oder Leishman gefärbt. Dann können amastigote Leishmanien lichtmikroskopisch nachgewiesen werden (Löscher et al., 2010, S.

610). Die höchste Sensitivität mit $> 95\%$ Amastigotennachweis hat ein Aspirat aus der Milz (Magill, 2013, S. 747). Da in vielen Risikogebieten die korrekte Technik der Milzpunktion nicht bekannt ist, wird dort die weniger sensitive Knochenmarksaspiration (50 - 85 %) bevorzugt durchgeführt (Magill, 2013, S. 747).

Bei der Untersuchung des gewonnenen Aspirats können durch eine Kultur bessere Ergebnisse erreicht werden. Während der Anzucht in speziellen Nährmedien wandeln sich die Amastigoten in Promastigote um. Sie wachsen langsam und sind nach Tagen bis Wochen mikroskopisch sichtbar (Farrar et al., 2014, S. 643; Löscher et al., 2010, S. 610).

Eine PCR weist Leishmanien DNA in Aspiraten, Blut und Urin mit hoher Sensitivität und Spezifität nach. Bei der PCR besteht zudem die Möglichkeit der Differenzierung der einzelnen Spezies. Wegen hoher Kosten und großem Aufwand bei der Durchführung, sowie möglicher falsch positiver Ergebnisse bei klinisch Gesunden, ist die PCR aber dennoch keine Routinediagnostik in Endemiegebieten (Farrar et al., 2014, S. 644).

Neben dem direkten Erregernachweis kommen wegen der hohen Antikörpertiter im akuten Stadium der viszerale Leishmaniose auch serologische Methoden in Frage (Magill, 2013, S. 747). Dazu zählen der indirekte Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT), der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) sowie der direkte Agglutinationstest (DAT) und der immunchromatografische rK39 Antikörpertest (rK39 ICT) (Farrar et al., 2014, S. 643; Magill, 2013, S. 747). Wegen seiner leichten und schnellen Durchführbarkeit hat sich der rK39 ICT zur Erstdiagnose in Endemiegebieten durchgesetzt (Farrar et al., 2014, S. 643). Die Sensitivität des rK39 ICT variiert je nach Gebiet, sie ist in Indien höher als in Ostafrika und Brasilien. Zudem ist die Sensitivität bei allen serologischen Tests bei HIV-koinfizierten Patienten erniedrigt (Farrar et al., 2014, S. 644; Löscher et al., 2010, S. 611). Weitere Nachteile der serologischen Tests sind, dass bei Patienten nach durchgemachter Infektion jahrelang spezifische Antikörper vorhanden sind, weshalb ein Rückfall nicht durch Antikörperrnachweis bestätigt werden kann. Außerdem gibt es in den Endemiegebieten Individuen ohne Krankengeschichte, die aufgrund einer asymptomatischen Infektion positiv auf Leishmanienantikörper getestet werden (Farrar et al., 2014, S. 643–644).

Der LST fällt während der akuten viszerale Leishmaniose typischerweise negativ aus. Nach Heilung ist innerhalb von sechs Wochen bis zwölf Monaten bei fast allen Patienten ein positives Ergebnis zu erwarten (Magill, 2013, S. 748). Der LST hat also in der akuten Diagnostik keine Bedeutung, wird aber in Instituten zur epidemiologischen Erfassung der Leishmaniose verwendet (Farrar et al., 2014, S. 644).

1.1.7 Therapie der Leishmaniose

Die bei der Therapie der Leishmaniose verwendeten Medikamente sollten unter Aufsicht und engmaschiger Kontrolle durch medizinisches Personal gegeben werden, da sie nebenwirkungsreich sind und ein geringes therapeutisches Fenster haben (Löscher et al., 2010, S. 612–613; WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 54–57). In **Tab. 2** sind die gebräuchlichen Medikamente zusammengefasst.

Medikamente	Nebenwirkungen
5-wertige Antimone (SB^V) (Natrium-Stibogluconat, Megluminantimonat), i. v., i. m., periläsional	Myalgien, Arthralgien, Übelkeit, Abdominelle Beschwerden, Erhöhung der Pankreas- und Leberwerte, Herzrhythmusstörungen und QT-Zeit Verlängerung
Amphotericin B, i.v. Polyen-Antimykotikum	Infusionsreaktionen und Nephrotoxizität
Liposomales Amphotericin B, i. v Lipidbasierte Formulierung	Deutlich weniger als bei konventionellem Amphotericin, aber dennoch zu beachten
Miltefosin, oral Alkylphosphocholin	Gastrointestinale NW wie Erbrechen und Durchfall, Erhöhung der Leber- und Nierenwerte, Teratogen
Paromomycin i. m., topisch Aminoglykosid Antibiotikum	Schmerzen an der Injektionsstelle, reversible Ototoxizität, Leberwerterhöhung, selten Niereninsuffizienz
Pentamidin i. v., i. m.	Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Myokarditis
Azole, oral, Antimykotika	Arzneimittelinteraktionen

Tab. 2: Medikamente der Leishmaniose-Therapie Stand 2010 (Löscher et al., 2010, S. 612–613; WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 55–57).

Die kutane Leishmaniose der Alten Welt heilt in mehr als der Hälfte der Fälle innerhalb von 6 - 15 Monaten unter Narbenbildung spontan ab. Deshalb ist eine Therapie nicht zwingend erforderlich. Um sekundäre Infektionen und Narbenbildung zu minimieren, wird oft dennoch eine Therapie durchgeführt (Löscher et al., 2010, S. 613). Diese sollte jedoch, falls möglich, lokal erfolgen, um schwerwiegende Nebenwirkungen der Medikamente zu vermeiden (Löscher et al., 2010, S. 613; WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 60). Lokal werden vor allem Infektionen durch *L. major* therapiert. Es sollten weniger als vier Läsionen vorhanden sein und der Durchmesser der Läsionen < 5 cm sein (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 60–61).

Zur lokalen Behandlung können 5-wertige Antimonpräparate periläsional appliziert werden und Paromomycin 15 % + Methylbenzethoniumchlorid 12 % als Salbe aufgetragen

werden. Als nichtmedikamentöse Option stehen topische Kryotherapie (flüssiger Stickstoff bei - 195 °C) und Thermotherapie (50 °C für 30 Sekunden) zur Verfügung (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 61). Obwohl die Effektivität beider Verfahren in Studien gezeigt werden konnte (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 61), haben sie entscheidende Nachteile: Bei der Kryotherapie besteht das Problem, dass sie in lokalen Versorgungszentren kaum verfügbar ist. Bei der Thermotherapie können Verbrennungen 2. Grades entstehen und sie muss wegen Schmerzhaftigkeit unter Lokalanästhesie durchgeführt werden (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 61). Es besteht daher das Interesse, andere nichtmedikamentöse Verfahren in der lokalen Therapie der kutanen Leishmaniose zu etablieren.

In schweren Fällen oder nach erfolgloser lokaler Therapie sollte eine systemische Therapie erfolgen (Farrar et al., 2014, S. 648). Die Leishmaniasis recidivans und die diffuse kutane Leishmaniose werden grundsätzlich systemisch therapiert (Löscher et al., 2010, S. 614). In den letzten Jahrzehnten waren die 5-wertigen Antimone Mittel der Wahl für die systemische Therapie der kutanen Leishmaniose. Studien der letzten Jahre konnten allerdings zeigen, dass es kaum Evidenz für die Effektivität der Behandlung gibt (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 61–62). Auch für den Effekt von oral applizierbarem Miltefosin und oralen Azolen wie Fluconazol gibt es wenig überzeugende Daten (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 62).

Eine Zusammenfassung der Therapieoptionen bei der kutanen Leishmaniose der Alten Welt gibt **Tab. 3**. Die Empfindlichkeit gegenüber den Medikamenten hängt von der Spezies und der Region ab, was zu unterschiedlichen Behandlungsempfehlungen führt. Zu beachten ist dabei, dass der Evidenzgrad der durchgeführten Studien nicht in allen Gebieten gleich hoch ist (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 60).

Lokale Therapie	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i> , <i>L. aethiopica</i> *, <i>L. infantum</i> *	
	Paromomycinsalbe für 20 Tage (A) ⁵	Paromomycinsalbe für 20 Tage (D) ⁵	
	5-wertige Antimone intraläsional + Kryotherapie alle 3-7 Tage, insgesamt 1-5mal (A) ⁶	5-wertige Antimone intraläsional + Kryotherapie alle 3-7 Tage, insgesamt 1-5mal (D) ⁶	
	Thermotherapie 1-2 mal (A) ²	Thermotherapie 1-2 mal (A) ¹	
	5-wertige Antimone intraläsional oder Kryotherapie allein, wie oben (D) ⁶	5-wertige Antimone intraläsional (B) ⁶ oder Kryotherapie allein, wie oben (C) ⁶	
Systemische Therapie	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i> , <i>L. infantum</i> *	<i>L. aethiopica</i> *
	Fluconazol oral, 6 Wochen (A) ³	5-wertige Antimone i.m./i.v 10-20 Tage (D) ⁸	
	5-wertige Antimone i.m./i.v 10-20 Tage (D) ⁸	Recidivans: 5-wertige Antimone i.m./i.v 15 Tage + Allopurinol oral 30 Tage (C) ⁷	Diffuse kutane Leishmaniose: 5-wertige Antimone i.m./i.v. + Paromomycin i.m., min. 60 Tage (C)
	5-wertige Antimone + Pentoxifylline 10-20 Tage (A) ⁴		
*: wenig Daten vorhanden			

Tab. 3: Medikamentöse Therapie der kutanen Leishmaniose (CL) der Alten Welt. Modifiziert nach (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 69, Box 2 und S. 57).

Evidenzklasse (A): Mindestens eine randomisiert, kontrollierte Studie (³ Alrajhi et al., 2002; ² Aronson et al., 2010; ⁶ Asilian et al., 2004; ⁵ González et al., 2008; ¹ Reithinger et al., 2005; ⁴ Sadeghian und Nilforoushzadeh, 2006).

Evidenzklasse (B): nicht randomisierte Studien (⁶ Asilian et al., 2004).

Evidenzklasse (C): Expertenausschüsse (⁶ Asilian et al., 2004; ⁷ Momeni und Aminjavaheri, 1995).

Evidenzklasse (D): Expertenmeinung ohne eindeutige Studien (⁶ Asilian et al., 2004; ⁵ González et al., 2008; ⁸ Herwaldt und Berman, 1992).

Die kutane Leishmaniose der Neuen Welt verläuft schwerer, dauert länger und hat geringere Selbstheilungsraten als die kutane Leishmaniose der Alten Welt. Außerdem ist ein Übergang in die mukokutane Form möglich (Farrar et al., 2014, S. 648). Es wird deshalb bevorzugt systemisch therapiert, weshalb die Erfahrungen mit lokaler Therapie begrenzt sind (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 62). Aber auch für die Effektivität der systemischen Therapie gibt es, außer für *L. (Viannia) braziliensis*, wenig zuverlässige Daten (Farrar et al., 2014, S. 648). Seit einiger Zeit werden deshalb vermehrt lokale Therapien ausprobiert (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 62). Wie in **Tab. 4** dargestellt, kommen dabei vor allem die Thermotherapie und Paromomycin zum Einsatz (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 63).

In der systemischen Therapie kommen hauptsächlich 5-wertige Antimone (alle Spezies außer *L. (Viannia) guyanensis*), Pentamidin (*L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) panamensis*), Ketokonazol (*L. (Viannia) panamensis*, *L. (Leishmania) mexicana*) und Miltefosin (*L. (Viannia) panamensis*, *L. (Viannia) braziliensis* in Bolivien) zur Anwendung (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 63).

Die diffuse kutane Leishmaniose und die Leishmaniasis recidivans sind wegen häufiger Rückfälle schwer zu behandeln. Wegen schlechter Datenlage konnte bis jetzt kein einheitliches Therapieschema etabliert werden (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 64).

Die mukokutane Leishmaniose wird grundsätzlich systemisch behandelt, wobei der Erfolg von der Lokalisation der Läsionen abhängt (Löscher et al., 2010, S. 614; WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 64). 5-wertige Antimone werden mit Heilungsraten von 30 - 100 % eingesetzt (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 64). In Studien konnte gezeigt werden, dass die Kombination mit Pentoxifyllin zu einer Wirkungssteigerung führt (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 65). Amphotericin B, liposomales Amphotericin B, Miltefosin und Pentamidin werden ebenfalls eingesetzt.

Lokale Therapie	Alle Arten				
	Paromomycin-salbe für 20 Tage (B) ^{2, 8}				
	Thermotherapie 1-3mal, (A) ⁵				
	Antimone intraläsional, 3-7 Tage, insgesamt 1-5 mal (B) ¹				
Systemische Therapie	<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis, L. panamensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. amazonensis, L. peruviana, L. venezuelensis</i>	Alle Arten* Mukokutane Leishmaniose
	Ketokonazol oral für 28 Tage (B) ⁴	Pentamidin i.v./i.m., 3 mal (C) ^{3, 11}	5-wertige Antimone i.m./i.v. für 20 Tage (A) ⁷	5-wertige Antimone i.m./i.v. für 20 Tage ⁷	5-wertige Antimone i.m./i.v. für 30 Tage (C) ¹³ 5-wertige Antimone i.m./i.v. für 30 Tage + Pentoxifyllin (A) ⁶
	Miltefosin oral für 28 Tage (B) ¹²	5-wertige Antimone i.v./i.m. für 20 Tage (C) ⁷	Amphotericin B i.v. 25-30 Dosen (C)		Amphotericin B i.v. 25-45 Dosen (C) ¹⁵
		Miltefosin oral für 28 Tage (B) ¹²	Liposomales Amphotericin i.v. (C) ¹⁰		Liposomales Amphotericin B i.v. (C) ¹⁴
					Bolivien: Miltefosin oral für 28 Tage (B) ⁹
*: wenig Daten für die mukokutane Leishmaniose durch <i>L. aethiopica</i>					

Tab. 4: Medikamentöse Therapie der kutanen Leishmaniose (CL) der Neuen Welt. Modifiziert nach (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 70–71, Box 3+Box 4 und S. 57).

Evidenzklasse (A): Mindestens eine randomisiert, kontrollierte Studie (⁷ Ballou et al., 1987; ⁶ Machado et al., 2007; ⁵ Vega et al., 2009).

Evidenzklasse (B): nicht randomisierte Studien (¹ Ameen, 2007; ² Arana et al., 2001; ⁸ Krause und Kroeger, 1994; ⁴ Navin et al., 1992; Soto et al., ⁹ 2007, ¹² 2004).

Evidenzklasse (C): Expertenausschüsse (¹⁴ Amato et al., 2011; ¹³ Franke et al., 1994; ³ Nacher et al., 2001; ¹⁵ Rodriguez et al., 1995; ¹¹ Soto et al., 1994; ¹⁰ Wortmann et al., 2010).

Evidenzklasse (D): Expertenmeinung ohne eindeutige Studien.

Auch bei der Therapie der viszeralen Leishmaniose unterscheiden sich, wie in **Tab. 5** zusammengefasst, je nach Gebiet die Effektivität der Medikamente und die Empfehlungen für die medikamentöse Therapie. Zudem wurde die Wirksamkeit der Medikamente auch hier nicht in allen Endemiegebieten durch Studien mit hohem Evidenzgrad nachgewiesen (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 57). In allen betroffenen Gebieten werden in Zukunft allerdings Kombinationsregime mehr an Bedeutung gewinnen, da sie Vorteile gegenüber der Monotherapie zeigen: Unter Anderem wird die Dauer der Therapie verkürzt, Resistenzbildungen vorgebeugt und die Heilungsrate durch die synergistische Wirkung einiger Medikamente erhöht (Löscher et al., 2010, S. 613; WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 59).

VL durch <i>L. donovani</i> , Indischer Subkontinent	VL durch <i>L. donovani</i> , Ostafrika, Yemen	VL durch <i>L. infantum</i> , Mittelmeerraum, Mittlerer Osten, Zentralasien, Südamerika	Post-Kala-Azar
Liposomales Amphotericin B täglich i.v. über 3-5 Tage (A) ¹ oder Einmaldosis i.v. (A) ²	5-wertige Antimone i.v. oder i.m. + Paromomycin i.m. für 17 Tage (A) ¹⁶	Liposomales Amphotericin B täglich i.v. über 3-6 Tage (B) ^{3,4}	Ostafrika: Falls indiziert, 5-wertige Antimone i.v. oder i.m. 30-60 Tage (C) ¹¹ oder Liposomales Amphotericin B täglich i.v. über 20 Tage (C) ¹²
Liposomales Amphotericin B Einmaldosis i.v. + Miltefosin für 7 Tage (A) ¹⁵ + Paromomycin 10 Tage (A) ¹⁵ Miltefosin + Paromomycin für 10 Tage (A) ¹⁵	5-wertige Antimone i.v. oder i.m. für 30 Tage (A) ¹⁴	5-wertige Antimone i.v. oder i.m. über 28 Tage (B) ¹⁴	Indischer Subkontinent: Amphotericin B i.v. 60-80 Dosen über 4 Monate (C) ¹⁰ oder Miltefosin oral für 12 Wochen (A) ⁹
Amphotericin B i.v. täglich oder an wechselnden Tagen, 15-20 Dosen (A) ¹³	Liposomales Amphotericin B täglich i.v. über 6-10 Tage (B) ⁴	Amphotericin B i.v. täglich oder an wechselnden Tagen, 20-30 Dosen (C) ¹³	
Miltefosin oral für 28 Tage (A) ^{6,7} Paromomycin i.m. für 21 Tage (A) ⁵	Amphotericin B i.v. täglich oder an wechselnden Tagen, 15-20 Dosen (A) ¹³		
5-wertige Antimone i.v. oder i.m. über 30 Tage (A) ¹⁴ Cave: Resistenz in Region Bihar, Indien und Nepal	Miltefosin oral für 28 Tage (A) ⁸		

Tab. 5: Medikamentöse Therapie der viszeralen Leishmaniose (VL). Modifiziert nach (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 67, Box 1 und S. 57)

Evidenzklasse (A): Mindestens eine randomisiert, kontrollierte Studie (⁷ Bhattacharya et al., 2007; ¹⁴ Herwaldt und Berman, 1992; ¹⁶ Melaku et al., 2007; ⁹ Ramesh et al., 2011; ⁸ Ritmeijer et al., 2006; Sundar et al., ¹⁵ 2011, ² 2010, ¹³ 2007a, ⁵ 2007b, ⁶ 2002; ¹ Sundar und Chakravarty, 2010).

Evidenzklasse (B): nicht randomisierte Studien (⁴ Berman et al., 1998; ³ Davidson et al., 1994; ¹⁴ Herwaldt und Berman, 1992).

Evidenzklasse (C): Expertenausschüsse (¹³ Sundar et al., 2007a; ¹⁰ Thakur et al., 1997; ¹¹ Zijlstra et al., 2003).

Evidenzklasse (D): Expertenmeinung ohne eindeutige Studien.

Seit 70 Jahren sind die 5-wertigen Antimone weltweit mit einer Heilungsrate von > 90 % Mittel der 1. Wahl bei der Behandlung der viszeralen Leishmaniose (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 57–58). Ausnahmen bilden die Region Bihar in Indien und Nepal, wo es bis zu 60 % Resistenzen gibt sowie Südeuropa (Löscher et al., 2010, S. 612; WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 58). Amphotericin B und Pentamidin wurden als Medikamente der 2. Wahl eingesetzt (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 57). Vor Allem in Indien zeigt Amphotericin B mit 99 % Heilungsrate eine gute Wirksamkeit (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 58). Pentamidin wird wegen starker Nebenwirkungen kaum mehr eingesetzt (Löscher et al., 2010, S. 613), da in den letzten zehn Jahren neue Medikamente für die Behandlung der viszeralen Leishmaniose auf den Markt gekommen sind. Dazu gehören liposomales

Amphotericin B, Miltefosin und Paromomycin (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 57) .

Liposomales Amphotericin B wird heute als Mittel der 1. Wahl bei der Behandlung der viszeralen Leishmaniose mit 90 - 98 % Wirksamkeit in Südeuropa und mit > 95 % Heilungsrate in Indien eingesetzt (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 58). Miltefosin, das erste orale Mittel, zeigt eine Wirksamkeit von 94 % in Indien und um die 90 % in Ostafrika (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 58). Paromomycin findet vor Allem in Indien mit Heilungsraten von 93 - 95 % und in Ostafrika mit 85 % Wirksamkeit Verwendung (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 58). Zusätzlich ist bei der Behandlung der viszeralen Leishmaniose oft eine symptomatische Therapie notwendig, da sich die Patienten in deutlich reduziertem Allgemeinzustand befinden (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 57). Ein Ansprechen auf die Therapie äußert sich durch Fieberfreiheit, Gewichtszunahme, Anstieg des Hämoglobinwertes, der Thrombozyten und der Leukozyten sowie Rückgang der Splenomegalie (Löscher et al., 2010, S. 613). Bis zum kompletten Rückgang der Splenomegalie kann es allerdings Monate dauern (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 57). Außerdem sind Rückfälle und der Übergang in eine PKDL möglich (Löscher et al., 2010, S. 613). Deshalb kann von einer Heilung erst sechs Monate nach Ende der Therapie gesprochen werden (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 57).

Die Behandlung des indischen PKDL wird immer empfohlen. Die Behandlung wird mit Amphotericin B oder Miltefosin durchgeführt. In Ostafrika wird die PKDL nur bei schweren Verläufen behandelt, da 85 % der Fälle innerhalb eines Jahres spontan heilen. In schweren Fällen werden 5-wertige Antimone oder liposomales Amphotericin B verabreicht (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 59).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Therapie der Leishmaniose komplex ist. Es gibt nur wenig wirksame Medikamente, die nebenwirkungsreich sind und deren Effektivität je nach Region und Spezies unterschiedlich ist. Rückfälle nach Beginn der Behandlung sind zudem nicht selten, vor allem bei HIV-koinfizierten Patienten werden sie vermehrt beobachtet (Farrar et al., 2014, S. 645). Obwohl einige Versuche unternommen wurden, gibt es zudem im Moment keinen wirksamen Impfstoff gegen die Leishmaniose (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 71–72).

Es besteht also die Notwendigkeit zur Verbesserung der Leishmaniose-Therapie und zur Entwicklung neuer Therapien. Die Kombination der verwendeten Medikamente mit immunmodulierender Therapie ist dabei ein neuer Therapieansatz, der aber im Moment noch nicht routinemäßig angewandt wird (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 73). Bei der Entwicklung von neuen nichtmedikamentösen Verfahren in der lokalen Therapie, ist die von uns untersuchte photodynamische Inaktivierung eine vielversprechende Option. Zusätzlich sind die Prävention und die Bekämpfung der Übertragung wichtig, um die Ausbreitung der Erkrankung zu stoppen.

1.2 Photodynamische Inaktivierung

1.2.1 Photochemische und photophysikalische Grundlagen

Der erste Schritt des photodynamischen Prozesses ist die Absorption von Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich durch einen nicht toxischen Farbstoff, der als Photosensibilisator (PS) bezeichnet wird (Aveline, 2001, S. 19). Es wird meist Rotlicht im 600 - 900 nm Bereich verwendet, da hier die Eindringtiefe in das Gewebe maximal ist. Für oberflächliche Läsionen wird auch Blaulicht mit 400 - 420 nm Wellenlänge verwendet, das energiereicher ist, aber weniger Eindringtiefe hat (Aveline, 2001, S. 21; Sharma et al., 2011, S. 3). Ein geeigneter PS sollte also für die entsprechenden Wellenlängen einen hohen Extinktionskoeffizienten ϵ haben (Sharma et al., 2011, S. 3). Der Extinktionskoeffizient ϵ gibt an, wieviel elektromagnetische Strahlung eine spezielle Substanz in molarer Konzentration bei einer bestimmten Durchtrittslänge und Wellenlänge absorbiert (Aveline, 2001, S. 24). Daher ist der spektrale Überlapp des Absorptionsspektrums eines PS mit dem Emissionsspektrum der verwendeten Lichtquelle von Bedeutung (Cieplik et al., 2015).

Die durch die Lichtabsorption aufgenommene Energie versetzt die Moleküle des PS von ihrem Grundzustand (S_0) in einen angeregten Zustand (S_n). Dabei wird ein Elektron der Atomhülle aus seinem ursprünglichen Orbital in eines höherer Energie befördert (Aveline, 2001, S. 21). Die Elektronen sind dann nicht mehr paarig in den Orbitalen angeordnet. Ihre Ausrichtung kann dabei wie im Grundzustand antiparallel bleiben (S_n , Singulettzustand) oder parallel werden (T_n , Triplettzustand) (Aveline, 2001, S. 22). Der angeregte Zustand ist instabiler als der Grundzustand. Deshalb wird die aufgenommene Energie auf verschiedene Arten schnell wieder abgegeben (Aveline, 2001, S. 23). Besonders die angeregten Zustände höherer Energiestufen (S_2 , T_2) sind extrem kurzlebig (Aveline, 2001, S. 24). Im angeregten Singulettzustand niedrigster Energie (S_1) gibt es drei verschiedene Möglichkeiten, die Energie wieder abzugeben: Durch Fluoreszenz, strahlungslos durch Hitze oder es findet ein Übergang in den Triplettzustand niedrigster Energie (T_1) statt. Dieser Vorgang wird als *intersystem crossing* (ISC) bezeichnet (Aveline, 2001, S. 23–24). Der T_1 Zustand ist wesentlich langlebiger als der S_1 Zustand und kann deshalb besser mit umliegenden Molekülen interagieren. Er ist der wichtigste Ausgangspunkt für die nachfolgenden Prozesse (Aveline, 2001, S. 24). Der PS sollte also eine hohe Quanteneffizienz ϕ für das ISC mit Bildung des T_1 Zustands haben (Sharma et al., 2011,

S. 3). Die Quanteneffizienz ϕ ist definiert als das Verhältnis zwischen Lichtabsorption und daraus folgendem Ereignis wie Fluoreszenz, Wärmeabgabe oder chemischer Reaktion (Aveline, 2001, S. 25).

Im nächsten Schritt kann es unter Anwesenheit von Sauerstoff zu zwei verschiedenen Reaktionen des im T1 Zustand befindlichen PS kommen (Aveline, 2001, S. 26).

Bei Typ 1 Reaktionen reagiert der PS direkt mit einem biologischen Substrat. Es werden dabei Elektronen oder Wasserstoffatome zwischen PS und Substrat übertragen, wobei der Transfer abhängig vom Redoxpotenzial in beiden Richtungen ablaufen kann (Aveline, 2001, S. 27; Maisch, 2007). Die dabei entstehenden Radikale reagieren wiederum abhängig von den Bedingungen entweder mit Sauerstoff oder miteinander. Bei der Reaktion mit Sauerstoff bilden sich reaktive Sauerstoffspezies (ROS; *engl.: reactive oxygen species*) wie Superoxidanionen-Radikale ($O_2^{\bullet -}$), Hydroxyl-Radikale ($\bullet OH$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Aveline, 2001, S. 27-28). Die ROS oxidieren Biomoleküle wie Aminosäuren, ungesättigte Fettsäuren und am Aufbau der DNA und RNA beteiligte Pyrimidin- und Purinbasen und schädigen diese dadurch (Aveline, 2001, S. 28; Sharma et al., 2011, S. 3). Die meisten PS akkumulieren in aus Lipiddoppelschichten bestehenden Membranen, wo sie zur oxidativen Schädigung von Fettsäuren und darin enthaltenen Proteinen führen. Die schädigende Wirkung auf genomisches Material ist dagegen gering ausgeprägt (Schäfer et al., 1998).

Bei Typ 2 Reaktionen reagiert der PS direkt mit Sauerstoff in der Umgebung. Es findet ein Energietransfer vom angeregten PS im Triplettzustand auf Sauerstoff im Triplettgrundzustand (3O_2) statt. Dabei entsteht Sauerstoff im angeregten Singulettzustand niedrigster Energie. Dieser wird als Singulett-Sauerstoff (1O_2) bezeichnet (Aveline, 2001, S. 28). Die Bildung von 1O_2 ist also nur in der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff möglich (Aveline, 2001, S. 28) und die Effizienz abhängig vom vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck. Da der molekulare Sauerstoff während der Reaktion verbraucht wird, verläuft der Prozess selbstlimitierend (Maisch, 2007; Maisch et al., 2007). Der hochreaktive 1O_2 reagiert schnell mit Substratbiomolekülen in der Umgebung und führt zu deren Oxidation und damit zur Schädigung (Aveline, 2001, S. 29).

Durch direkten (Lumineszenz) und indirekten („Quencher“) Nachweis der entstehenden Reaktionsprodukte konnte gezeigt werden, dass die Typ 2 Reaktion mit Generierung von 1O_2 die entscheidende Rolle bei der photodynamischen Inaktivierung (PDI) von Mikroorganismen spielt (Aveline, 2001, S. 31–32).

Abb. 10 gibt einen Überblick über die ablaufenden Prozesse bei der PDI.

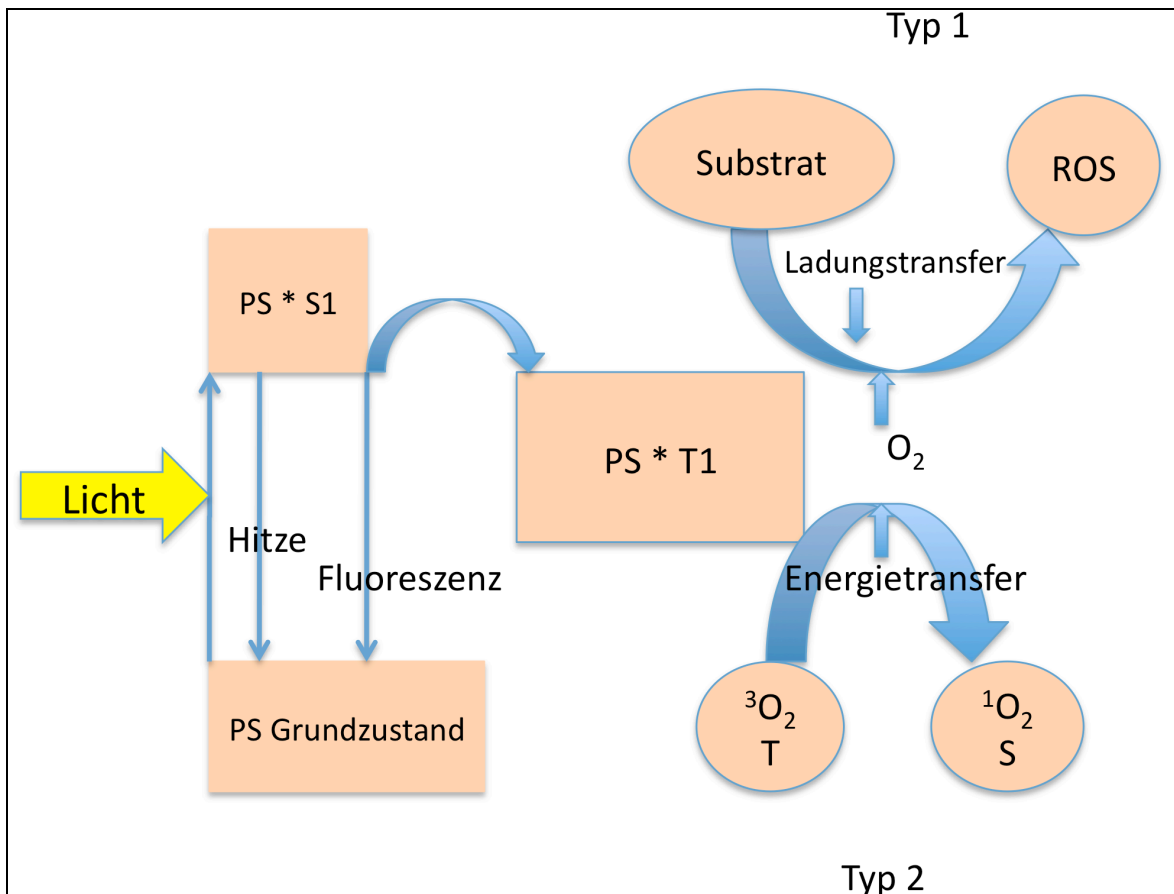


Abb. 10: Überblick über die ablaufenden Prozesse bei der photodynamischen Inaktivierung (PDI). Die PDI beginnt mit der Absorption von Licht sichtbarer Wellenlänge durch einen Photosensibilisator (PS), wodurch der PS von seinem Grundzustand in einen angeregten Zustand (S1) versetzt wird. Aus dem instabilen S1 Zustand kann die Energie auf drei verschiedene Arten wieder abgegeben werden: Durch Fluoreszenz, durch Hitze oder durch Übergang in den Triplettzustand (T1). Vom T1 Zustand aus kann es zu zwei verschiedenen Reaktionen kommen: Bei der Typ 1 Reaktion reagiert der PS direkt mit einem Substrat, wobei durch Ladungstransfer, in Anwesenheit von Sauerstoff (O₂), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. Bei der Typ 2 Reaktion reagiert der PS direkt mit Sauerstoff. Durch Energietransfer vom T1 Zustand auf Sauerstoff im Triplettgrundzustand (³O₂ T), entsteht Singulett-Sauerstoff (¹O₂ S).

1.2.2 Überblick über die photodynamische Inaktivierung

Das vor über 100 Jahren (Kharkwal et al., 2011, S. 2) entdeckte Phänomen der Photosensibilisierung ist einerseits, wie zum Beispiel bei Patienten mit Porphyrurie, ein endogenes Phänomen. Zum anderen wird das Phänomen der Photosensibilisierung unter Verwendung von exogen zugeführten PS bei verschiedenen Indikationen therapeutisch eingesetzt und dann als photodynamische Therapie (PDT) bezeichnet (Aveline, 2001, S. 19).

Typische Anwendungsgebiete der PDT sind die Behandlung von nicht-Melanom-Hautkrebs (NMSC; *engl.: non-melanoma skin cancer*) und die Behandlung von Augenerkrankungen sowie dermatologischen Erkrankungen (Dougherty et al., 1998; Levy und Obochi, 1996). Beispielsweise sind folgende dermatologische Krankheitsbilder für die PDT zugelassen: Die Behandlung von aktinischer Keratose, die Behandlung einer Vorstufe des Plattenepithelkarzinoms der Haut (*carcinoma in situ*/Morbus Bowen) sowie die Behandlung des superfiziellen und nodulären Basalioms (European Dermatology Forum, n.d.; Morton et al., 2015).

Abgesehen von diesen Anwendungen gibt es seit längerem Bestrebungen, das Prinzip der Photosensibilisierung auch zum Abtöten von pathogenen Mikroorganismen zu benutzen, also auch zur Therapie von lokalen Infektionen einzusetzen. Die Photosensibilisierung wird dann als PDI von Mikroorganismen oder antimikrobielle PDT (aPDT) bezeichnet (Sharma et al., 2011, S. 2). Der wichtigste Grund für das gesteigerte Interesse in den letzten Jahren ist, dass die Wirksamkeit der konventionellen Therapie bei Infektionen durch steigende Resistenzraten der pathogenen Mikroorganismen abgeschwächt wird (Gleckman und Borrego, 1997). Ein aktuelles Beispiel hierfür ist das erstmalige Auftreten einer Infektion mit einem Vancomycin-resistenten *Staphylococcus aureus* (VRSA)-Keim in Europa (Friães et al., 2015).

Gleichzeitig bringt die PDI viele Vorteile mit sich, wozu die bis jetzt nicht nachgewiesene mutagene Wirkung und die lokal begrenzte Wirkung ohne systemische Nebenwirkungen gehören (Maisch et al., 2011). Sogar multi-resistente Bakterien können durch die PDI abgetötet werden (Maisch, 2009) und bis jetzt ist keine Bildung von photoresistenten Mikroorganismen beschrieben (Giuliani et al., 2010; Tavares et al., 2010). Sowohl die gute Wirkung in entzündetem Gewebe und sogar gegenüber biofilmbildenden Bakterien (Cieplik et al., 2013), sowie die beschleunigte Wundheilung durch Zerstörung von Proteasen sind weitere Vorteile (Hamblin et al., 2003). Außerdem werden durch die bei der PDI entstehenden ROS bzw. durch den entstehenden $^1\text{O}_2$ eine Vielzahl von Mikroorganismen geschädigt. Sie ist deshalb zur Abtötung von Pilzen, Parasiten, Viren und Bakterien inklusive multi-resistenter Keime (Maisch, 2009) geeignet (Sharma et al., 2011, S. 2 und 3).

Allerdings ist die Wirksamkeit der PDI bei den Mikroorganismen unterschiedlich gut. Bei gram-positiven Bakterien ist sie beispielsweise besser als bei gram-negativen Bakterien (Malik et al., 1992). Die Effektivität bei Pilzen liegt dazwischen. Die Ursache hierfür ist

die Morphologie der Mikroorganismen: Je nach Aufbau der Zellwand ist die Durchlässigkeit für die PS unterschiedlich gut (Sharma et al., 2011, S. 3).

Eine Herausforderung der PDI ist also, PS zu finden, die gegen die verschiedenen pathogenen Mikroorganismen gleich wirksam sind. Körpereigenes Gewebe und Zellen sollten dagegen kaum geschädigt werden (Sharma et al., 2011, S. 3). Eine weitere für die Effektivität eines PS entscheidende Eigenschaft ist die Photostabilität, da ein stabiler Farbstoff öfters angeregt werden kann und daher viel $^1\text{O}_2$ und ROS produzieren kann (Kuimova et al., 2009). Für Porphyrin-Derivate wie TMPyP konnte beispielsweise bereits gezeigt werden, dass die Substanzen photostabil sind (Kramer-Marek et al., 2006). Geeignete PS sollten außerdem sicher sein und gleichzeitig bei niedrigen Farbstoffkonzentrationen und geringer Strahlungsexposition effektiv Mikroorganismen abtöten (Maisch et al., 2014). Die Farbstoffe sollten ihr Absorptionsmaximum im sichtbaren Wellenlängenbereich haben (Maisch et al., 2014) und eine hohe Quanteneffizienz ϕ für die Bildung von ROS und $^1\text{O}_2$ haben (Sharma et al., 2011, S. 3). Die Effektivität eines PS ist zudem von der Anlagerung und Aufnahme durch die Mikroorganismen abhängig (Eichner et al., 2015). Die Diffusion der Farbstoffe zum Wirkort kann generell durch Modifikation der Molekülstruktur (Sharma et al., 2011, S. 3 und 4) sowie bei nicht oberflächlichen Läsionen zusätzlich durch eine geeignete Applikationsform (Sharma et al., 2011, S. 8) verbessert werden.

So wurden an die seit längerem beispielsweise in der Krebstherapie verwendeten PS (u. a. Porphyrine) positive Ladungen gekoppelt (Sharma et al., 2011, S. 4) oder die PS mit permeabilitätssteigernden Stoffen wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; *engl.: ethylenediaminetetraacetic acid*) (Valduga et al., 1993) und Polymyxin Nonapeptid B kombiniert (Nitzan et al., 1992). Die Kopplung an Aminosäure Polymere (PI-ce6: Chlorin (e6) + poly-Lysin; PEI-ce6: Chlorin (e6) + poly-Ethylenimin) und Antikörper verbessert die antimikrobielle Wirksamkeit ebenfalls. Auch das Einhüllen der PS in kationische Liposomen oder Nanopartikel ist vielversprechend (Sharma et al., 2011, S. 6).

Tab. 6 zeigt Beispiele für Substanzen, die *in-vitro* und *in-vivo* in Tiermodellen zur PDI von Mikroorganismen eingesetzt werden (Kharkwal et al., 2011, S. 2; Sharma et al., 2011, S. 4–6). Die Zahl der in klinischen Studien getesteten PS ist allerdings wesentlich geringer (Kharkwal et al., 2011, S. 2).

Übersicht ausgewählter antimikrobiell eingesetzter Photosensibilisatoren (Kationische PS)	
Substanzklasse	Wichtige Vertreter
Phenothiazine	Methylenblau (MB) Toluidinblau O (TBO) Neues Methylenblau Dimethyl-Methylenblau PP904
Kationische Porphyrine	5,10,15,20-tetrakis (1-methyl-4-pyridino)-porphyrin tetra-(<i>p</i> -toluenesulfonat) (TMPyP) Tetra (4N,N,N-trimethyl-anilinium) porphin tetraiodid (T4MAP) 5-phenyl-10,15,20-tris (N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin chlorid (PTMPP oder Sylsens B) XF70 Porphyrin
Kationische Phthalocyanine	Zn-PPC Zn-PC-Me Ga (III)-substituiertes Phthalocyanin RLP068
Kationische Bacteriochlorine	Bis-kationische Bacteriochlorine Tetrakis-kationische Bacteriochlorine Hexakis-kationische Bacteriochlorine
Kationische Fullerene	BF6, BF24, DTC ₆₀ ²⁺
7-Perinaphthenone	2-((4-pyridinyl)methyl)-1H-phenalen-1-one Chlorid (SAPyR)
Naturstoffe	Kationische Hypericinderivate Kationische Riboflavinderivate (FLASH-01a, FLASH-07a)
Gekoppelte PS	PI-ce6 PEI-ce6 Antikörper Nanopartikel Kationische Liposomen

Tab. 6: Übersicht über *in-vitro* und *in-vivo* in Tiermodellen zur photodynamischen Inaktivierung von Mikroorganismen eingesetzte Photosensibilisatoren (Sharma et al., 2011, S. 4–6).

Neben diesen PS spielen die in **Tab. 7** zusammengefassten, schon lange verwendeten PS auch bei der antimikrobiellen PDI eine wichtige Rolle (Kharkwal et al., 2011, S. 18, Abb.3; Maisch et al., 2011; Zane et al., 2001).

Übersicht ausgewählter älterer Photosensibilisatoren	
Substanzklassen	Wichtige Vertreter
Porphyrine	Hematoporphyrin Derivat (HPD) ̂-Aminolävulinsäure (ALA)-Protoporphyrin IX Methyl aminolävulinat (MAL)-Protoporphyrin IX Endogen von Bakterien produziertes-Protoporphyrin IX
Phthalocyanine (PC)	Zink Phthalocyanin (ZnPc)
Chlorine	Benzoporphyrin Derivat Monoacid Ring A (BPD-MA) Mono-l-Asparthyl-Chlorin e6 (NPe6) u. a.
Naturstoffe	Furanocumarin (Psoralen) Hypericin

Tab. 7: Übersicht über ältere Photosensibilisatoren (Kharkwal et al., 2011, S. 18, Abb.3; Maisch et al., 2011; Zane et al., 2001).

1.2.3 Klinische Anwendungsgebiete der photodynamischen Inaktivierung

Das Prinzip der PDI wird therapeutisch bereits in verschiedenen Gebieten der Medizin angewendet (siehe Seite 32) und dann als PDT bezeichnet (Dougherty et al., 1998; Levy und Obochi, 1996).

Bei dermatologischen Erkrankungen beispielsweise wird für die Behandlung von aktinischer Keratose nach den Leitlinien des European Dermatology Forums die PDT mit den Protoporphyrin IX (PpIX) Vorstufen δ -Aminolävulinsäure (ALA) und Methyl-Aminolävulinat (MAL) empfohlen (Empfehlungsstärke A, Qualität der Evidenz 1) (European Dermatology Forum, n.d.; Morton et al., 2015). Auch zur Behandlung einer Vorstufe des Plattenepithelkarzinoms der Haut (*carcinoma in situ*/Morbus Bowen) sowie zur Behandlung des superfiziellen und nodulären Basalioms kann die MAL-PDT gemäß den Leitlinien angewendet werden (Empfehlungsstärke A, Qualität der Evidenz 1) (European Dermatology Forum, n.d.; Morton et al., 2015).

Aufgrund der bereits vielversprechenden Anwendung der PDI in einigen Bereichen, wird die Wirksamkeit der PDI bei vielen weiteren Indikationen in Studien untersucht, wodurch sich in den letzten Jahren viele neue Anwendungsgebiete aufgetan haben, in denen die PDI erfolgreich ist, es jedoch noch keine klinische Zulassung gibt.

Beispiele hierfür sind im Bereich Dermatologie die Behandlung sowie die Prävention von NMSC bei immunsupprimierten Patienten (Empfehlungsstärke B, Qualität der Evidenz 1), die Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms (Empfehlungsstärke C, Qualität der Evidenz 2), die Behandlung von Akne (Empfehlungsstärke B, Qualität der Evidenz 1) sowie die Behandlung von therapierefraktären Hand/Fußwarzen und Genitalwarzen (Empfehlungsstärke B, Qualität der Evidenz 1). Bei den infektiösen Hauterkrankungen ist die kutane Leishmaniose ein weiteres Beispiel für ein potentielles Anwendungsgebiet der PDI. In klinischen Studien war die antimikrobielle ALA-PDI und MAL-PDI bei der Behandlung der Erkrankung effektiv. Die antimikrobielle PDI mit ALA und MAL wird deshalb nach den Leitlinien des European Dermatology Forums zur Behandlung der kutanen Leishmaniose empfohlen (Empfehlungsstärke B, Qualität der Evidenz 1) (European Dermatology Forum, n.d.; Morton et al., 2015).

Daneben gehören im Bereich Dermatologie viele weitere entzündliche und infektiöse Hauterkrankungen, aber auch kosmetische Eingriffe wie Hautverjüngung

(Empfehlungsstärke A, Qualität der Evidenz 1) zu den potentiellen Anwendungsgebieten der PDI (European Dermatology Forum, n.d.; Morton et al., 2015).

Auch bei nicht oberflächlichen Infektionen kommt die antimikrobielle PDI als Therapieoption in Frage. Ein Beispiel dafür ist die *Helicobacter-pylori*-Infektion des Magens, die schon in einigen klinischen Studien durch PDI erfolgreich behandelt werden konnte (Ganz et al., 2005; Lembo et al., 2009; Wilder-Smith et al., 2002).

Ein weiteres wichtiges klinisches Anwendungsgebiet der PDI ist die Zahnmedizin. Sie ist einer der Bereiche, wo die antimikrobielle PDI aktuell schon eine große Rolle spielt. Die Indikationen sind dabei Parodontitis, Periimplantitis, Endodontie, Karies, Behandlung von Mundschleimhauterkrankungen wie zum Beispiel Pilzinfektionen, Herpes und Aphthen sowie die Behandlung von Wundheilungsstörungen nach chirurgischen Maßnahmen (Braun, 2013).

Bei der Parodontitisbehandlung beispielsweise, die momentan eines der bedeutendsten Anwendungsgebiete in der Zahnmedizin ist, wird der PS direkt in die parodontale Tasche injiziert und anschließend durch Belichtung mit einem Diodenlaser aktiviert. Die optische Faser der Lichtquelle wird dabei ebenfalls direkt in die parodontale Tasche eingebracht (Rieger, 2012). Dass die antimikrobielle PDI (vor allem geprüft sind die PS Methylenblau und Toluidinblau O sowie Diodenlaser als Lichtquelle) effektiv parodontalpathogene Keime reduzieren kann, konnte in *in-vitro* Untersuchungen (Takasaki et al., 2009) belegt und in *in-vivo* Tiermodellen bestätigt werden. Hier konnte außerdem gezeigt werden, dass die Entzündung durch die antimikrobielle PDI effektiv reduziert wird und das Verfahren sicher ist (Luan et al., 2009). Es gibt zudem bereits viele klinische Studien zur Behandlung von Patienten mit Parodontitis mittels PDI. Sie zeigen vor allem bei Patienten mit chronischer Parodontitis, dass eine zusätzlich zur Standardtherapie durchgeführte PDI einen positiven Effekt sowohl in der Initialtherapie als auch in der Erhaltungstherapie hat (Lulic et al., 2009; Sgolastra et al., 2013; Soukos und Goodson, 2011). Die Verwendung von Methylenblau in Kombination mit einem Diodenlaser ist dabei wissenschaftlich am besten untersucht worden (Sgolastra et al., 2013), weshalb für die antimikrobielle PDI mit dieser Licht-Farbstoffkombination momentan die höchste Evidenz vorliegt (Rieger, 2014) und sie daher für die klinische Anwendung zu empfehlen ist (Soukos und Goodson, 2011). Noch nicht evidenzbasiert ist dagegen der Einsatz der antimikrobiellen PDI anstelle einer systemischen Antibiose bei schwerer chronischer oder aggressiver Parodontitis (Rieger, 2014).

Zusammengefasst machen die bereits vielversprechende therapeutische Anwendung in einigen Bereichen sowie die durch Studien belegte Wirksamkeit der PDI in vielen neuen Anwendungsgebieten die PDI zu einem Verfahren mit großem Potenzial. In der Zukunft sollten deshalb unbedingt weitere Anwendungsmöglichkeiten sowie die Wirksamkeit neuer Farbstoffe und Lichtquellen wissenschaftlich untersucht werden.

In diesem Zusammenhang wurde aufgrund der in klinischen Studien bereits effektiv durchgeführten Behandlung der kutanen Leishmaniose mit ALA-PDI und MAL-PDI (siehe Seite 35), in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob auch andere, neue PS zur Therapie der Erkrankung geeignet wären.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Wie beschrieben, besteht die Notwendigkeit zur Verbesserung der Leishmaniose-Therapie und zur Entwicklung neuer Therapien. In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit die PDI als neue, nichtmedikamentöse Therapieoption der kutanen Leishmaniose untersucht. Um die Frage zu klären, ob auch andere PS als Porphyrin-Derivate zur Therapie der Erkrankung geeignet wären, wurden in dieser Arbeit die PS TMPyP, SAPyR und FLASH-07a getestet.

Folgende *in-vitro* Experimente wurden durchgeführt:

1. Es wurde die Vitalität von *L. major* Promastigoten nach Inkubation mit den drei PS TMPyP, SAPyR und FLASH-07a und anschließender Belichtung, in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten und Farbstoffkonzentrationen gemessen.
2. Es wurde die Zytotoxizität der PDI auf die Wirtszellen der Leishmanien untersucht. Hierfür wurde die Vitalität der J774A.1-Makrophagenzelllinie, welche die Wirtszelle der Parasiten widerspiegelt, nach Inkubation mit den PS und anschließender Belichtung gemessen. Die Bedingungen waren die Selben wie bei den Leishmanienexperimenten.
3. Um die Frage nach einem therapeutischen Fenster zu klären, wurde die Vitalität des isolierten Parasiten *L. major* mit der Vitalität der J774A.1-Makrophagenzelllinie nach der PDI verglichen.
4. Um die anti-amastigoten Aktivität, also der Effekt der PDI auf die intrazelluläre, amastigote Form von *L. major* zu testen, wurden Peritoneal-Exsudat-Makrophagen mit *L. major* infiziert und die Parasitenlast in den Zellen nach Durchführung der PDI bestimmt.
5. In Ergänzung zu den Experimenten zur anti-amastigoten Aktivität wurde die anti-amastigote Wirkung der PDI mit der zytotoxischen Wirkung der PDI auf infizierte Peritoneal-Exsudat-Makrophagen verglichen.

Die Ergebnisse der Experimente können als Grundlage für weitere *in-vivo* Tierexperimente sowie für klinische Studien angesehen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
CO ₂ Inkubator für Leishmanienkulturen	Memmert GmbH + Co KG, Schwabach
ELISA Microplate- Reader	Molecular Devices, Ismaning
ICycler iQ™ 5	Bio-Rad, München
Implen Nano Photometer	Implen, München
Inkubator für Zellkultur Heraeus BBD 6220	Thermo Scientific, München
Lampe: Prototyp Waldmann BlueV	Waldmann Medizintechnik, Villingen-Schwenningen
Mikroskope: AxioStar plus Olympus CK2	Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, München Olympus Optical Co. (Europa) GmbH, Hamburg
Neubauer-Zählkammer für Leishmanien (Tiefe 20 µm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Neubauer-Zählkammer für Zellen (Tiefe 100 µm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipetten: 100 - 1000 µl; 20 - 200 µl; 10 - 100 µl (Mehrkanalpipette); 2 - 20 µl; 0,2 - 2 µl	Thermo Scientific, München
Pipettierhelfer accu-jet pro	BRAND, Deutschland
Sterile Arbeitsbank (Hera Safe)	Thermo Scientific, München
Vortexer	IKA, Deutschland
Waage PJ400	Mettler-Toledo, Deutschland
Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifugen: Centrifuge 5810 R, 5417 R	Eppendorf, Hamburg

Tab. 8: Auflistung der verwendeten Laborgeräte. Die Tab. zeigt die Handelsnamen (linke Spalte) und die Hersteller (rechte Spalte) der Geräte.

2.1.2 Glas- und Plastikwaren

BD Discardit™ II Spritzen 2 ml und 10 ml	BD Biosciences, Heidelberg
BD Falcon Zellkulturplatte mit 96 und 12 Vertiefungen, Flachboden und Deckel	BD Biosciences, Heidelberg
BD Falcon™ Zellkulturschale 100 x 20 mm	BD Biosciences, Heidelberg
BD Falcon™ Zellkulturschale 60 x 15 mm	BD Biosciences, Heidelberg
BD Microlance™ 3 Kanülen (0,4 x 19 mm und 0,7 x 30 mm)	BD Biosciences, Heidelberg
Biozym Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 20 µl, 200 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Deckgläschen für Zählkammer 20 x 26 x 0,4 mm	A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Folie für PCR Platten	Thermo Scientific, München
Nunc™ Kryoröhrchen (1,8 ml)	Thermo Scientific, München
Parafilm®M	A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim
PCR-Platten mit 96 Vertiefungen	Thermo Scientific, München
Petrischale 60 x 15 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischale 92 x 16 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (0,5 - 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Tissue Culture (TC)-Flaschen (T75 Standard und T175 Standard)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber 2-Positionen Klinge 25	Sarstedt, Nümbrecht

Tab. 9: Auflistung der verwendeten Glas- und Plastikwaren. Die Tab. zeigt die Handelsnamen (linke Spalte) und die Hersteller (rechte Spalte) der Waren.

2.1.3 Kulturmedien und Puffer

Blutagar für Leishmanienkultur	50ml defibriniertes Kaninchen-Vollblut 50 ml NaCl (0,9 % in destilliertem H ₂ O (dH ₂ O)) 1 x Penicillin G-Streptomycin 200 ml BHI-Agar (52 g/l in dH ₂ O)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ohne Magnesium und Calcium	PAN Biotech, Aidenbach
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 L-Glutamin Medium für Leishmanienkultur, J774A.1-Kultur und Peritoneal-Exsudat-Makrophagen-Kultur	10 % (v/v) FCS 100 Units (U)/ml Penicillin G 100 U/ml Streptomycin 50 µM 2-Mercaptoethanol in RPMI-1640 (PAN Biotech, Aidenbach)

Tab. 10: Auflistung der verwendeten Kulturmedien und Puffer. Die Tab. zeigt die Handelsnamen (linke Spalte) sowie die Zusammensetzung und Hersteller (rechte Spalte) der Medien und Puffer.

2.1.4 Photosensibilisatoren

FLASH-07a (acht positive Ladungen, molare Masse 1180.74g mol ⁻¹); Reinheit FLASH-07a-Hydrochlorid > 95 %	Bereitgestellt von Dr. Andreas Späth, Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg, Deutschland
SAPyR (2-((4-pyridinyl)methyl)-1H-phenalen-1-one Chlorid); Reinheit > 99 %	Bereitgestellt von Dr. Andreas Späth, Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg, Deutschland
TMPyP (5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridino)-porphyrin tetra-(p-toluenesulfonat); Reinheit 97 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

Tab. 11: Auflistung der verwendeten Photosensibilisatoren. Die Tab. zeigt die Handelsnamen (linke Spalte) und die Hersteller (rechte Spalte) der Photosensibilisatoren.

2.1.5 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Propanol	Merck, Darmstadt
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Brain-Heart-Infusion (BHI)-Agar	Institut für medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Regensburg
Brewer Thioglykolat Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cell Lysis Solution	QIAGEN, Hilden
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Appllichem, Gatersleben
Ethanol (100 %)	J. T. Baker, Griesheim
Fetal calf serum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
IQ™ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München
Kaninchen-Vollblut, defibriniert	Charles River, Sulzfeld; Harlan Laboratories U.K. Ltd., Hillcrest, United Kingdom
Mucocit-Lösung	Merz, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd 36,5 - 38 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin G-Streptomycin Lösung (100x)	Invitrogen, Darmstadt
Protein Precipitation Solution	QIAGEN, Hilden
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trypanblau (0,2 % in 0,9 % NaCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	PAN Biotech, Aidenbach
Water PCR Reagent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tab. 12: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungen. Die Tab. zeigt die Handelsnamen (linke Spalte) und die Hersteller (rechte Spalte) der Chemikalien, Reagenzien und Lösungen.

2.1.6 Oligonukleotide

Die für die quantitative real Time-PCR verwendeten Oligonukleotidsequenzen wurden von Metabion International AG, Martinsried bezogen:

Zielgen	Bezeichnung	Nukleotidsequenz
<i>Leishmania major</i> 18S-rRNA	ISS1 (forward)	5' – GCT CCA AAA GCG TAT ATT AAT GCT GT – 3'
	ISR1 (reverse)	5' – TCC TTC ATT CCT AGA GGC CGT GAG T – 3'
Maus- β -Aktin	β -Aktin_forward	5' – TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A – 3'
	β -Aktin_reverse	5' – GGA TGC CAC AGG ATT CCA TAC CCA – 3'

Tab. 13: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide. Die Tab. zeigt das Zielgen (linke Spalte), die Bezeichnung (mittlere Spalte) und die Sequenz der Primer.

2.1.7 Zelllinie

J-774A.1 Zellen	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
-----------------	---

Tab. 14: Auflistung der verwendeten Zelllinie. Die Tab. zeigt den Namen (linke Spalte) und den Hersteller (rechte Spalte) der Zelllinie.

2.1.8 Leishmanienstamm

<i>Leishmania major</i> (MHOM/IL/81/FE/BNI)	Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg
---	----------------------------------

Tab. 15: Auflistung des verwendeten Leishmanienstamms. Die Tab. zeigt den Namen (linke Spalte) und den Hersteller (rechte Spalte) des Stamms.

2.1.9 Mauslinie

Die für diese Arbeit verwendeten Mäuse wurden unter *specific pathogen-free* (SPF) Bedingungen am Klinikum Regensburg gehalten. Futter (Firma ssniff®) und H₂O wurden den Tieren *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Es wurde folgende Mauslinie verwendet:

C57BL/6	Janvier S.A.S. (LeGenest-St-Isle, Frankreich)
---------	--

Tab. 16: Auflistung der verwendeten Mauslinie. Die Tab. zeigt den Namen (linke Spalte) und den Hersteller (rechte Spalte) der Mäuse.

2.1.10 Software

GraphPad Prism	GraphPad Software, La Jolla, USA
IQ5™ Optical System Software 2.0	Bio-Rad, München
Microsoft Excel	Microsoft Deutschland
Microsoft PowerPoint	Microsoft Deutschland
Microsoft Word	Microsoft Deutschland

Tab. 17: Auflistung der verwendeten Software. Die Tab. zeigt den Handelsnamen (linke Spalte) und den Hersteller (rechte Spalte) der Programme.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Präparation der Leishmanien

Die Herstellung der für die Leishmanienkultur benötigten Blutagarplatten erfolgte durch Vermischung von 25 ml defibriniertem Kaninchen-Vollblut, 25 ml Natriumchlorid (NaCl), 1 x Penicillin G-Streptomycin und 100 ml Brain-Heart-Infusion (BHI)-Agar. 50 µl des flüssigen Agars wurden dann pro Vertiefung auf eine vorgekühlte 96-Well-Platte gegeben. Dabei ist zu beachten, dass durch schräges Eingießen des Agars und schnelles Aushärten aufgrund der niedrigen Temperatur dabei der Boden der Vertiefungen nur zu ca. 50 % mit Agar bedeckt wurde und es sich dementsprechend um Schrägagar handelte. Nach vier Stunden Trocknungszeit konnten die Platten bei 8 °C gelagert werden.

Zur Kultivierung wurden ca. 80.000 - 160.000 Leishmanien in 190 µl Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-Vollmedium pro Vertiefung einer 96-Well-Blutagarplatte ausgesät. Die Platten wurden in einem Inkubator bei 28 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt. Innerhalb von sieben Tagen wuchsen die Leishmanien zu einem dichten Rasen (ca. 400 Millionen pro Platte) und konnten entnommen werden. Sie wurden dann entweder auf einer neuen Blutagarplatte ausgesät, wofür je nach Dichte 2 - 4 Vertiefungen entnommen und in eine Petrischale zu 20 ml RPMI-Vollmedium gegeben wurden, oder für die Experimente aufgereinigt. Um die Virulenz der Parasiten aufrechtzuerhalten, erfolgte zudem im Abstand von etwa sechs Wochen eine Passage durch eine BALB/c-Maus (Solbach et al., 1986).

Die Aufreinigung der Leishmanien für die Experimente erfolgte folgendermaßen:

Die Leishmanien wurden mittels einer Mehrkanalpipette aus den 96-Well-Blutagarplatten entnommen und in einer Petrischale gepoolt. Danach wurden sie mit 50 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; *engl.: phosphate buffered saline*) in eine 50 ml Sarstedt Röhre überführt und bei 4000 Umdrehungen pro Minute (rpm; *engl.: revolutions per minute*) 8 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 50 ml PBS resuspendiert und der erste Schritt wiederholt. Insgesamt wurde drei Mal mit PBS gewaschen.

Um die Leishmanien zu zählen, wurde nach dem letzten Waschvorgang das Pellet in 1ml PBS resuspendiert. 10 µl der Leishmanien-Suspension wurden dann für 5 Minuten in 90 µl

einer 4%igen Paraformaldehydlösung fixiert und anschließend 10 µl der nun fixierten Leishmaniensuspension für 5 Minuten in 90 µl PBS inkubiert. Aus der 1:100 Verdünnung der Leishmaniensuspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 20 µm, Kammerfaktor 5×10^4) die Parasitenzahl bestimmt.

Nach Ermittlung der Leishmanienzahl konnte die Parasitensuspension auf die gewünschte Konzentration eingestellt und in den Experimenten verwendet werden:

Für die Experimente mit *L. major* Promastigoten wurde die Parasitensuspension mit PBS auf eine Konzentration von 1×10^7 *L. major*/ml eingestellt. Es wurden 50 µl der 1×10^7 /ml Verdünnung in jede Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert (= 500.000 Leishmanien pro Vertiefung).

Für die Erstellung einer Standardreihe von *L. major* wurden 100 µl der 1×10^7 /ml Verdünnung entsprechend 1×10^6 Leishmanien pro Vertiefung pipettiert. Davon wurden dann 50 µl entnommen und im nächsten Nöpfchen mit 50 µl PBS vermischt. Davon wurden wieder 50 µl entnommen, in die nächste Vertiefung gegeben und wieder mit PBS vermischt (insgesamt sechs Mal). Die letzten 50 µl wurden verworfen. Dementsprechend befanden sich in der ersten Vertiefung 500.000 Leishmanien, in der zweiten 250.000, in der dritten 125.000, in der vierten 62.500, in der fünften 31.250 und in der sechsten 15.625.

Für die *in-vitro* Infektion von Peritoneal-Exsudat-Makrophagen wurde die Leishmanien-Suspension mit RPMI-Vollmedium auf 4×10^5 *L. major*/ml verdünnt und 500 µl entsprechend 200.000 Leishmanien pro Vertiefung einer 12-Well-Platte pipettiert.

Die bei den Experimenten nicht benötigten Volumina der Leishmanien-Suspension wurden bei 4000 rpm 8 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet mit möglichst wenig Flüssigkeit belassen. Das Pellet wurde in 500 µl vorgekühlter 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO)/80 % fötales Kälberserum (FCS; *engl.: fetal calf serum*) Eingefrierlösung resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Diese wurden direkt im Anschluss bei - 80 °C weggefroren. Das Vorkühlen sowie die schnelle Abfolge der Arbeitsschritte sollte die toxische Wirkung des DMSO minimieren.

Bei allen Experimenten mit Leishmanien wurde der infektiöse Flüssigabfall über Nacht in eine Glasflasche mit Mucocit-Lösung gegeben. Der Hartabfall wurde bei 121 °C autoklaviert.

2.2.2 Kultivierung und Präparation der J774A.1-Makrophagenzelllinie

Die J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde bei - 80 °C gelagert. Um sie zu kultivieren, wurden die Zellen in den Kryoröhrchen schnell aufgetaut, um die toxische Eingefrierlösung DMSO rasch zu entfernen. Dafür wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad erwärmt. Nach dem Auftauen wurde der Inhalt der Kryoröhrchen in eine 50 ml Sarstedt Röhre überführt, in der 10 ml warmes RPMI-Vollmedium vorgelegt war. Anschließend wurde die Suspension bei 1500 rpm 8 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Waschvorgang erfolgte, um das DMSO komplett zu entfernen. Das Pellet wurde dann in 15 - 20 ml RPMI-Vollmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen (TC-Flasche; *engl.: tissue culture*) überführt. Diese wurden in einem Inkubator für Zellkulturen gelagert.

Die Zellen wurden dann ca. alle drei Tage passagiert. Dafür wurde das RPMI-Vollmedium mit einer Pasteurpipette aus Glas abgesaugt, mit 20 ml PBS gespült und erneut abgesaugt. Der Boden der TC-Flasche wurde dann für 3 Minuten mit 2 ml einer 10 mmol Trypsin-Lösung benetzt, um die Zellen vom Boden zu lösen. Anschließend wurden 4 ml Medium zugegeben und die Flaschen gedreht, um die Zellen vollständig zu lösen. Die Zellsuspension wurde dann entweder im Verhältnis 1:2 entsprechend 3 ml in jeder neuen TC-Flasche oder im Verhältnis 1:3 entsprechend 2 ml in jeder neuen Flasche gesplittet. Jede TC-Flasche wurde mit ca. 15 ml Medium gefüllt und anschließend wieder im Inkubator für Zellkulturen gelagert.

Nach ausreichender Kultivierung konnte die J774A.1-Makrophagenzelllinie für die Experimente verwendet werden. Sie wurde dafür wie folgt geerntet und aufgereinigt: Die TC-Flaschen wurden zunächst ca. 30 Minuten auf Eis gelagert und der Inhalt anschließend mit 10 ml PBS gespült. Um die Zellen vollständig zu lösen, wurden sie mit einem Zellschaber abgeschabt. Dann wurde die Suspension in eine 50 ml Sarstedt Röhre überführt und bei 1500 rpm 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals in 10 ml PBS resuspendiert und der erste Schritt wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert und die Sarstedt Röhre auf Eis gelagert. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblau

angefärbt. Die 1:10 Verdünnung wurde anschließend in einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 100 μm , Kammerfaktor 1×10^4) ausgezählt.

Für die Experimente wurde die J774A.1-Makrophagenzelllinie mit PBS auf eine Konzentration von 2×10^6 J774A.1/ml eingestellt. Davon wurden 50 μl pro Vertiefung einer 96-Well-Platte entsprechend 100.000 Zellen pro Vertiefung pipettiert.

Für die Erstellung einer Standardreihe der J774A.1-Makrophagenzelllinie wurden 100 μl der 2×10^6 /ml Verdünnung entsprechend 200.000 Zellen Vertiefung pipettiert. Dann wurde analog wie bei Erstellung der Verdünnungsreihe von *L. major*, wie in 2.2.1 beschrieben, verfahren. Dementsprechend befanden sich in der ersten Vertiefung 100.000 Zellen der J774A.1- Makrophagenzelllinie, in der zweiten 50.000, in der dritten 25.000, in der vierten 12.500, in der fünften 6250 und in der sechsten 3125.

Der nicht benötigte Teil der Zellsuspension wurde bei 1500 rpm 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet mit möglichst wenig Flüssigkeit belassen. Das Pellet wurde dann in 500 μl vorgekühlter 10 % DMSO/90 % FCS Eingefrierlösung resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Gleich danach wurden diese bei - 80 °C weggefroren.

2.2.3 Zellzählung und Bestimmung der Leishmanienzahl

Um die Zellzahl einer Suspension der J774A.1-Makrophagenzelllinie oder einer Suspension von Peritoneal-Exsudat-Makrophagen zu bestimmen, wurden die Zellen, wie in 2.2.2 beschrieben, mit Trypanblau gefärbt. Der saure Farbstoff dringt in die Zellen ein und färbt diese tiefblau. Lebende Zellen können den Farbstoff aus ihrem Zytosol transportieren, wohingegen tote Zellen blaugefärbt bleiben. Dadurch können tote von vitalen Zellen unter dem Mikroskop unterschieden werden und nur letztere gezählt werden. Um in einer Leishmanien-Suspension nur die lebenden Leishmanien zu zählen, wurden bei der Bestimmung der Parasitenzahl nur spindelförmige Leishmanien mit sichtbarem Flagellum berücksichtigt.

Die Verdünnungen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Für die Zählung der Zellen und die Bestimmung der Leishmanienzahl wurden Neubauer-Zählkammern unterschiedlicher Tiefe und Kammerfaktoren verwendet (siehe 2.2.1 und 2.2.2). Die Gesamtzahl der lebenden Zellen bzw. der Parasiten in der Suspension ergab sich aus dem

Produkt der durchschnittlichen Anzahl aus den vier Großquadraten mit dem Kammerfaktor, der Verdünnung und dem Volumen der Suspension.

$$\begin{aligned} & \text{Mittelwert aus 4 Großquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} \\ & = \text{Zellzahl/ml Suspension} \end{aligned}$$

2.2.4 Generierung und Isolation von Peritoneal-Exsudat-Makrophagen aus der Maus

Zur Gewinnung von Peritoneal-Exsudat-Zellen, deren größter Anteil Makrophagen sind (Bogdan et al., 1989), erfolgte an Tag eins das Einspritzen von 1 ml einer 3%igen Thioglykolat-Lösung in C57BL/6 Mäuse. Das Thioglykolat wurde in Millipore H₂O verdünnt, erwärmt und anschließend mit einer 0,4 x 19 mm Kanüle intraperitoneal verabreicht. An Tag vier wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und der Bauchraum mit 10 ml RPMI-Vollmedium gespült. Die durch Herausziehen der Flüssigkeit erhaltenen Peritoneal-Exsudat-Makrophagen wurden in eine 50 ml Sarstedt Röhre überführt und bei 1500 rpm 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Peritoneal-Exsudat-Makrophagen wurden insgesamt zwei Mal mit RPMI-Vollmedium gewaschen.

2.2.5 Kultivierung und *in-vitro*-Infektion von Peritoneal-Exsudat-Makrophagen mit Leishmanien

Nach Ermittlung der Zellzahl (siehe 2.2.3) wurden die Peritoneal-Exsudat-Makrophagen mit RPMI-Vollmedium auf 4×10^5 Peritoneal-Exsudat-Makrophagen/ml verdünnt. Es wurden 500 µl der Verdünnung entsprechend 200.000 Zellen pro Vertiefung einer 12-Well-Platte pipettiert.

In acht der zwölf Vertiefungen wurden die Zellen mit *L. major* infiziert. Die Infektion erfolgte mit 200.000 Parasiten in 500 µl RPMI-Vollmedium je Vertiefung (siehe 2.2.1). Dies entspricht einer Infektionsrate von einem Parasit pro Zelle. Alle Vertiefungen wurden anschließend mit RPMI-Vollmedium aufgefüllt und für 24 Stunden in einem Inkubator bei

28 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und zur selektiven Gewinnung von adhärennten Makrophagen, die bis dahin nicht adhärennten Zellen, mit PBS gewegewaschen. Die verbliebenen, adhärennten Makrophagen, die in acht der zwölf Vertiefungen infiziert und in vier der zwölf Vertiefungen der 12-Well-Platte nicht infiziert waren, konnten dann in den Experimenten eingesetzt werden.

2.2.6 Photosensibilisatoren

Der Photosensibilisator (PS) SAPyR (2-((4-pyridinyl)methyl)-1H-phenalen-1-one Chlorid) ist ein wasserlöslicher Farbstoff, der auf einer 7-Perinaphthenon (phenalen-1-one)-Struktur basiert. Die Herstellung erfolgte nach Patent No. WO/2012/113860 durch Dr. Andreas Späth (Institut für organische Chemie, Universität Regensburg). Die photodynamische antibakterielle Wirkung des Farbstoffs konnte bereits gezeigt werden (Cieplik et al., 2013). SAPyR hat einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 9000 \text{ (L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$ bei der Wellenlänge $(\lambda)_{\text{max}}$ 360 - 410 nm.

Der PS TMPyP (5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridino)-porphyrin tetra-(*p*-toluene-sulfonat) ist ein Porphyrin-Derivat. Der Farbstoff hat einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon > 220\,000 \text{ (L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$ bei λ_{max} 422 nm (Cieplik et al., 2013).

Der PS FLASH-07a ist ein Riboflavin-Derivat. Die Herstellung erfolgte folgendermaßen: Es wurden acht positive Ladungen an einen Riboflavin-PS angehängt, indem die Alkoholgruppen der Ribose-Kette mit Lysin nach dem Steglich-Protokoll verestert wurden (Maisch et al., 2014). FLASH-07a hat einen Extinktionskoeffizienten ϵ von $9800 \pm 300 \text{ (L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$ bei λ_{max} 372 nm und einen Extinktionskoeffizienten ϵ von $10600 \pm 500 \text{ (L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$ bei λ_{max} 445 nm (Dr. Andreas Späth; Institut für organische Chemie, Universität Regensburg).

Die chemischen Strukturen der Farbstoffe sind in **Abb. 11** dargestellt.

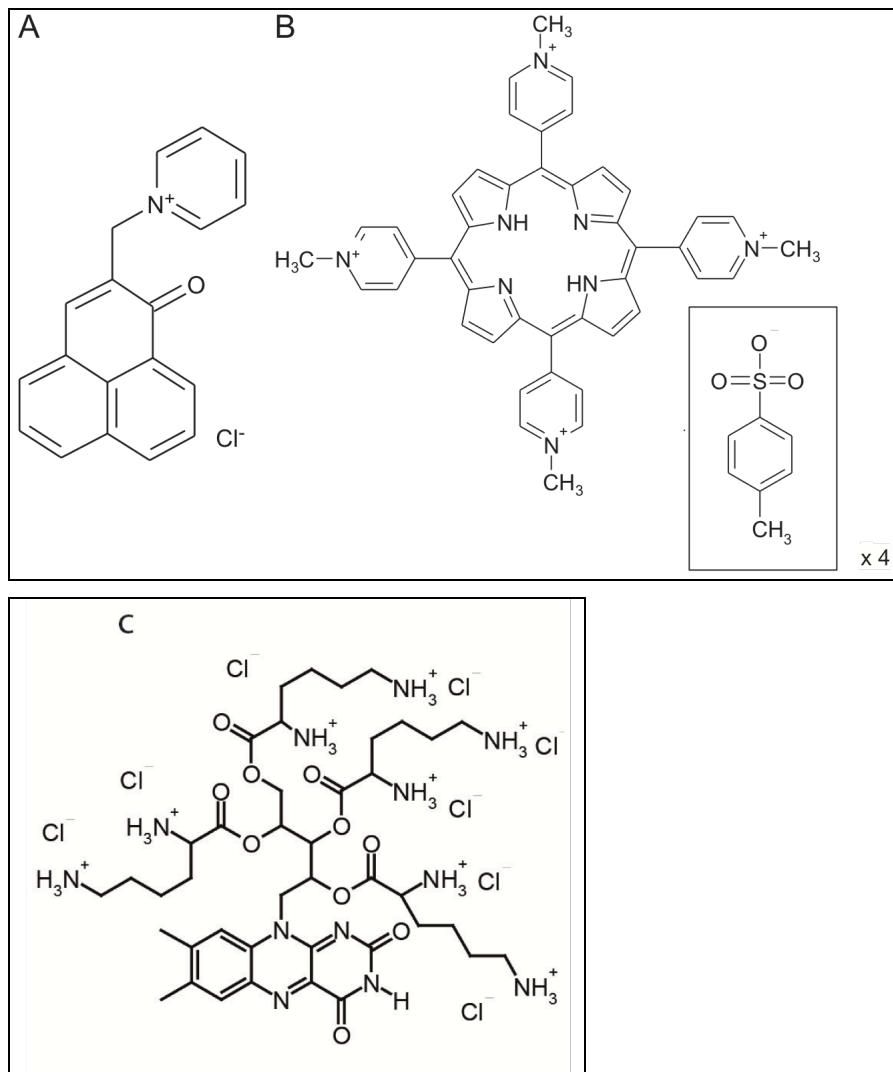


Abb. 11: Chemische Strukturen von SAPyR, TMPyP und FLASH-07a. (A) SAPyR ist einfach positiv geladen. (B) TMPyP hat vier positive Ladungen pro Molekül. (C) FLASH-07a hat acht positive Ladungen pro Molekül. Bereitgestellt von (Cieplik et al., 2013; Maisch et al., 2014).

Von den Farbstoffen TMPyP, SAPyR und FLASH-07a wurde je eine 200 μM Stammlösung hergestellt.

Durch Erstellung einer Verdünnungsreihe, ausgehend von der 200 μM Stammlösung, erhielt man folgende Konzentrationen des PS TMPyP: 20 μM (1:10 Verdünnung mit destilliertem H_2O), 2 μM (1:100), 1 μM (1:200), 0,2 μM (1:1000), 0,02 μM (1:10000).

Von den Farbstoffen SAPyR und FLASH-07a wurden die Konzentrationen 20 μM (1:10), 10 μM (1:20), 2 μM (1:100), 0,2 μM (1:1000), 0,02 μM (1:10000) hergestellt.

2.2.7 Lichtquelle und Bestrahlungsparameter

Die Bestrahlung erfolgte mit der Lichtquelle Waldmann BlueV mit λ_{em} 380 - 475 nm. Das Emissionsspektrum der Lampe entspricht also in etwa dem Wellenlängenbereich, bei welchem der Extinktionskoeffizient ϵ der Farbstoffe (siehe 2.2.6) am größten ist. Dabei ist das Integral des spektralen Überlapps des Emissionsspektrums der Lichtquelle und des Absorptionsspektrums der Farbstoffe, bei den drei verwendeten Farbstoffen unterschiedlich (TMPyP > FLASH-07a > SAPyR).

Je größer der Extinktionskoeffizient ϵ bei der Wellenlänge λ_{max} ist und je besser der spektrale Überlapp der Absorption des Farbstoffs mit der Emission der Lampe ist, desto mehr Photonen können absorbiert werden.

In **Abb. 12** sind die Absorptionsspektren aller drei Farbstoffe und das Emissionsspektrum der Lampe zusammengefasst.

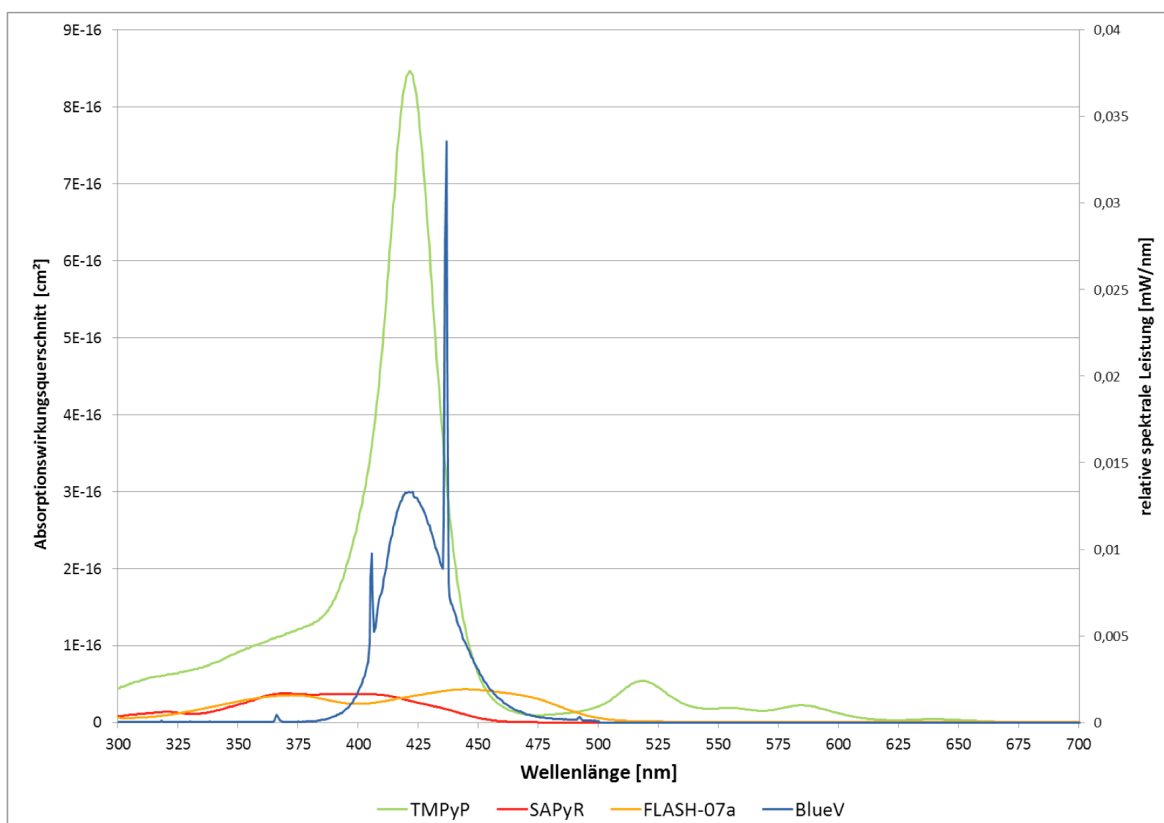


Abb. 12: Charakteristisches Absorptionsspektrum von SAPyR, TMPyP und FLASH-07a sowie das Emissionsspektrum der Lichtquelle BlueV. Die linke y-Achse zeigt den Absorptionswirkungsquerschnitt der drei PS (grüne Linie: TMPyP; rote Linie: SAPyR; gelbe Linie: FLASH-07a), die rechte y-Achse die relative Spektrale Leistung der Lichtquelle (blaue Linie: BlueV). Auf der x-Achse ist die Wellenlänge in nm abgebildet.

Die Proben wurden mit einer Intensität von 20,0 mW/cm² bestrahlt. Die effektive Strahlungsexposition wurde durch Multiplikation der Intensität mit der Belichtungszeit berechnet:

$$\text{Strahlungsexposition [J/cm}^2\text{]} = \text{Kraft/Fläche} \times \text{Zeit [W/cm}^2 \times \text{s]}$$

Bei einer Belichtungszeit von 600 Sekunden betrug die applizierte Dosis daher 12 J/cm².

Aufgrund der unterschiedlich hohen Extinktionskoeffizienten ε der Farbstoffe und des unterschiedlichen spektralen Überlapps der einzelnen Farbstoffe, kann die Effektivität der PS bei der photodynamischen Inaktivierung (PDI) nicht bei einer bestimmten Konzentrationen miteinander verglichen werden. Es wurde stattdessen die Effektivität bei gleicher Anzahl an absorbierten Photonen miteinander verglichen. Dafür wurde die Menge an absorbierten Photonen pro Sekunde durch einen bestimmten Farbstoff, bei Belichtung mit einer bestimmten Bestrahlungsquelle, in Kooperation mit Dr. Johannes Regensburger (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg) nach folgender Formel berechnet (Cieplik et al., 2015):

Absorbierte Photonen/Sekunde =

$$\sum (1 - 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d}) \cdot P_{em}(\lambda) \cdot \lambda / c_0 \cdot h$$

$\varepsilon(\lambda)$	Extinktionskoeffizient [(mol x cm ⁻¹)]	Gemessen mit einem Photospektrometer
$P_{em}(\lambda)$	Spektrale Bestrahlungsstärke der Lichtquelle [mW/nm]	Gemessen mit einem CCD Detektorsystem
c	Konzentration des Farbstoffes [μM]	Hier: 0,7175 μM TMPyP, 15 μM SAPyR, 10 μM FLASH-07a
d	Dicke der Lösung [mm]	Hier: 1,3 mm
c_0	Lichtgeschwindigkeit [m/s]	299,792,458 m/s
h	Plancksche Konstante [J x s]	6,62606957 x 10 ⁻³⁴ Js
λ	Wellenlänge [nm]	

Ausgehend von der Konzentration 10 μM FLASH-07a wurde die Konzentration bestimmt, bei der die anderen beiden PS die gleiche Anzahl an Photonen pro Sekunde absorbieren. Nach Einsetzen der Werte in die Formel ergaben sich für die Bestrahlung der Proben mit der Lampe Waldmann BlueV mit einer Intensität von $20,0 \text{ mW/cm}^2$ folgende Werte:

Farbstoffkonzentration	0,7175 μM TMPyP	15 μM SAPyR	10 μM FLASH-07a
Absorbierte Photonen/Sekunde	$2,6355 \times 10^{18}$	$2,6346 \times 10^{18}$	$2,6356 \times 10^{18}$

Tab. 18: Anzahl an absorbierten Photonen pro Sekunde von 0, 7175 μM TMPyP, 15 μM SAPyR und 10 μM FLASH-07a bei Bestrahlung mit der Lampe Waldmann BlueV mit einer Intensität von $20,0 \text{ mW/cm}^2$. Die Tab. zeigt die Farbstoffkonzentrationen von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a, bei denen die Farbstoffe die gleiche Anzahl an Photonen pro Sekunde absorbieren.

2.2.8 Photodynamische Inaktivierung von *L. major* Promastigoten: anti-promastigote Wirkung von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a

Die wie in 2.2.1 beschrieben ausplattierten *L. major* Promastigoten wurden entweder mit dem gleichen Volumen an doppelt konzentriert angesetzter Farbstofflösung oder mit dem gleichen Volumen an destilliertem H_2O gemischt. Es wurden verschiedene Konzentrationen der Farbstoffe (siehe 2.2.6) zugegeben. Bei der Zugabe von TMPyP ergaben sich durch die 1:1 Verdünnung die Endkonzentrationen 10 μM , 1 μM , 0,5 μM , 0,1 μM , 0,01 μM und 0 μM (H_2O statt Farbstoff) in den Vertiefungen. Bei den Farbstoffen SAPyR und FLASH-07a ergaben sich die Endkonzentrationen 10 μM , 5 μM , 1 μM , 0,1 μM , 0,01 μM und 0 μM (H_2O statt Farbstoff). Die Platten wurden dann im Dunkeln bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 für 30 Minuten, 5 Minuten oder 1 Minute mit den Farbstoffen bzw. mit H_2O inkubiert.

Unmittelbar nach der Inkubation wurden die Platten entweder für 600 Sekunden mit einer Leistung von $20,0 \text{ mW/cm}^2$ entsprechend einer applizierten Energiedosis von 12 J/cm^2 bestrahlt oder für diese Zeit im Dunkeln belassen.

Dabei wurden folgende Bedingungen getestet (**Tab. 19**):

	unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle)	Dunkelkontrolle (DK)	Lichtkontrolle (LK)	Phototoxizitäts -Proben
+/- Photosensibilisator (PS)	-	+	-	+
+/- Licht (L)	-	-	+	+

Tab. 19: Getestete Bedingungen bei der photodynamischen Inaktivierung von *L. major* Promastigoten. Die Tab. zeigt, wie die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle), die Dunkelkontrolle, die Lichtkontrolle und die Phototoxizitäts-Proben in den Experimenten definiert wurden (+/- : mit/ohne).

Anschließend wurde pro Vertiefung der 96-Well-Platte 50 μ l Medium zugegeben. Außerdem wurde eine Leerwert-Reihe (*engl.: Blank*) erstellt. Diese bestand aus 50 μ l Medium, 50 μ l PBS und 50 μ l destilliertem H₂O pro Vertiefung. Dann wurden die Platten bei 28 °C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert.

Um die anti-promastigote Wirkung der PDI mit TMPyP, SAPyR und FLASH-07a zu evaluieren, wurde die Vitalität der *L. major* Promastigoten am nächsten Tag mit dem 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid (MTT)-Test bestimmt.

Außerdem wurden die mit dem MTT-Assay gemessenen optische Dichte (OD)-Werte der Standardreihe mit der Zellzahl korreliert und die entsprechende Vitalität bestimmt.

2.2.9 Photodynamische Inaktivierung der J774A.1-Makrophagenzelllinie: Zytotoxizität von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a

Die wie in 2.2.2 beschrieben ausplattierte J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde entweder mit dem gleichen Volumen an doppelt konzentriert angesetzter Farbstofflösung oder mit dem gleichen Volumen an destilliertem H₂O gemischt. Es wurden verschiedene Konzentrationen der Farbstoffe (siehe 2.2.6) zugegeben. Bei der Zugabe von TMPyP ergaben sich durch die 1:1 Verdünnung die Endkonzentrationen 10 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M und 0 μ M (H₂O statt Farbstoff) in den Vertiefungen. Bei den Farbstoffen SAPyR und FLASH-07a ergaben sich die Endkonzentration 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M und 0 μ M (H₂O statt Farbstoff). Die Platten wurden dann im Dunkeln bei 28 °C und 5 % CO₂ für 30 Minuten, 5 Minuten oder 1 Minute mit den Farbstoffen bzw. mit H₂O inkubiert. Unmittelbar nach der Inkubation wurden die Platten entweder für 600 Sekunden

mit einer Leistung von $20,0 \text{ mW/cm}^2$ entsprechend einer applizierten Energiedosis von 12 J/cm^2 bestrahlt, oder für diese Zeit im Dunkeln belassen.

Dabei wurden folgende Bedingungen getestet (**Tab. 20**):

	unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle)	Dunkelkontrolle (DK)	Lichtkontrolle (LK)	Phototoxizitäts- -Proben
+/- Photosensibilisator (PS)	-	+	-	+
+/- Licht (L)	-	-	+	+

Tab. 20: Getestete Bedingungen bei der photodynamischen Inaktivierung der J774A.1-Makrophagenzelllinie. Die Tab. zeigt, wie die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle), die Dunkelkontrolle, die Lichtkontrolle und die Phototoxizitäts-Proben in den Experimenten definiert wurden (+/-: mit/ohne).

Anschließend wurde pro Vertiefung der 96-Well-Platte $50 \mu\text{l}$ Medium zugegeben. Außerdem wurde eine Leerwert-Reihe (*engl.: Blank*) erstellt. Diese bestand aus $50 \mu\text{l}$ Medium, $50 \mu\text{l}$ PBS und $50 \mu\text{l}$ destilliertem H_2O pro Vertiefung. Dann wurden die Platten bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5\% \text{ CO}_2$ über Nacht inkubiert.

Um die Zytotoxizität der PDI mit TMPyP, SAPyR und FLASH-07a zu evaluieren, wurde die Vitalität der J774A.1-Makrophagenzelllinie am nächsten Tag mit dem 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid (MTT)-Test bestimmt.

Außerdem wurden die mit dem MTT-Assay gemessenen OD-Werte der Standardreihe mit der Zellzahl korreliert und die entsprechende Vitalität bestimmt.

2.2.10 Photodynamische Inaktivierung von mit *L. major* infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen: anti-amastigote Wirkung und Zytotoxizität von SAPyR

Zu den wie in 2.2.5 beschrieben ausplattierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen und *L. major* Amastigoten wurden entweder $500 \mu\text{l}$ SAPyR der Endkonzentration $5 \mu\text{M}$ oder $500 \mu\text{l}$ destilliertes H_2O pro Vertiefung zugegeben. Die Platten wurden dann für 1 Minute bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5\% \text{ CO}_2$ im Dunkeln inkubiert.

Unmittelbar nach der Inkubation wurden die Platten entweder für 600 Sekunden mit einer Leistung von 20,0 mW/cm² entsprechend einer applizierten Energiedosis von 12 J/cm² bestrahlt oder für diese Zeit im Dunkeln belassen.

Dabei wurden folgende Bedingungen getestet (**Tab. 21**):

	unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle)		Dunkelkontrolle (DK)		Phototoxizitäts-Proben	
	Peritoneal-Exsudat-Makrophagen	Peritoneal-Exsudat-Makrophagen + <i>L. major</i>	Peritoneal-Exsudat-Makrophagen	Peritoneal-Exsudat-Makrophagen + <i>L. major</i>	Peritoneal-Exsudat-Makrophagen	Peritoneal-Exsudat-Makrophagen + <i>L. major</i>
+/- PS	-	-	/	+	/	+
+/- L	-	-	/	-	/	+

Tab. 21: Getestete Bedingungen bei der photodynamischen Inaktivierung von mit *L. major* infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen. Die Tab. zeigt, wie die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle), die Dunkelkontrolle und die Phototoxizitäts-Proben in den Experimente definiert wurden (+/- PS: mit/ohne Photosensibilisator; +/- L: mit/ohne Licht; /: nicht getestet).

Anschließend wurde der Farbstoff aus den Vertiefungen abgesaugt, mit Medium gewaschen und 2 ml frisches Medium pro Vertiefung der 12-Well-Platte zugegeben. Dann wurden die Platten bei 28 °C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde eine genomische DNA-Isolierung durchgeführt. Der Effekt der PDI mit SAPyR wurde dann durch Bestimmung der Parasitenlast mittels quantitativer real Time-PCR (qRT-PCR) gemessen.

2.2.11 MTT-Assay

Bei dem MTT-Assay (Durchführung nach Mosmann, 1983) handelt es sich um einen colorimetrischen Assay, der auf dem Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid) basiert. Der blassgelbe MTT-Farbstoff wird von Dehydrogenase-Enzymen durch Spaltung des Tetrazoliumrings in das schlecht wasserlösliche blau-violette Formazan umgewandelt. Die Reaktion findet nur in den Mitochondrien metabolisch aktiver Zellen statt und ist deshalb nur bei lebenden Zellen zu beobachten. Die Vitalität der Zellen konnte also durch Messung der Menge des

entstehenden Formazans ermittelt werden. Die Menge des Formazans wurde durch Messung der optische Dichte mit einem ELISA Mikroplattenlesegerät (*engl.: ELISA microplate reader*) bestimmt. Das Prinzip dabei ist, dass Licht von einer im Gerät integrierten Lichtquelle emittiert wird und die Absorption des Lichts durch die Proben gemessen wird. Um nur die Absorption durch Formazan zu messen, wurde der Absorptionshintergrund, der durch Medium, PBS und die Farbstoffe alleine entsteht, mit einer Leerwert-Reihe bestimmt. Der Absorptionshintergrund wurde dann bei der Analyse der Daten von den OD-Werten der eigentlichen Proben abgezogen.

Der MTT-Assay wurde wie folgt durchgeführt: In jede Vertiefung wurden 10 µl MTT-Lösung (5mg/ml in H₂O gelöst) gegeben. Danach wurden die Platten für 4 Stunden bei 28 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 20%iger Dodecylsulfat.Na-Salz-Lösung (SDS; *engl.: sodium dodecyl sulfate*) abgestoppt. Pro Vertiefung wurden dabei 100 µl SDS pipettiert und sorgfältig mit den blau-violetten Kristallen vermischt. Dadurch wurde das schlechtlösliche Formazan aufgelöst und eine homogene, zur Messung geeignete Lösung hergestellt. Nach einigen Minuten bei Raumtemperatur hatten sich alle Kristalle in der SDS-Lösung aufgelöst und innerhalb einer Stunde wurden die Proben mit dem ELISA Mikroplattenlesegerät bei 540 nm vermessen. Anschließend wurden die Daten zur Auswertung in Microsoft Excel importiert.

2.2.12 Genomische DNA Isolation aus Peritoneal-Exsudat-Makrophagen

Um genomische DNA aus Peritoneal-Exsudat-Makrophagen zu isolieren, erfolgte ein Verdau der Zellen in 500µl Zellyse-Puffer (*engl.: cell lysis solution*). Es zeigte sich, dass die adhärenen Makrophagen sich durch die vorherige Belichtung lösen. Daher wurde das in der Vertiefung befindliche Medium nicht verworfen, sondern in eine 50 ml Sarstedt Röhre überführt und bei 1500 rpm 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 250 µl Zellyse-Puffer aufgelöst. Die anderen 250 µl des Zellyse-Puffers wurden nach Spülung mit PBS direkt in die entsprechende Vertiefung gegeben und anschließend in die gleiche Sarstedt Röhre überführt.

Da keine Proteinase K zugegeben wurde, erfolgte die sofortige Lagerung auf Eis, um störende Enzyme wie Desoxyribonukleasen (DNasen) und Ribonukleasen (RNasen) zu inaktivieren. Durch anschließende Zugabe von 200 µl Proteinpräzipitations-Puffer (*engl.:*

protein precipitation solution) und starkem Vortexen für 20 Sekunden, wurden die Proteine dann ausgefällt. Die Abtrennung der Proteine erfolgte anschließend durch zentrifugieren der Proben bei 4000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Fällung der DNA wurde der proteinfreie Überstand zu 700 µl 100%igem Isopropanol, entsprechend einer 1:1 Verdünnung mit der Ausgangslösung gegeben. Die Proben wurden ca. 50 Mal invertiert und dann bei 14000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und 500 µl 70 %iger, unvergällter Ethanol zum Pellet gegeben. Dann wurde erneut bei 14000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und der restliche Ethanol mit einer Pipette abgenommen. Das DNA-Pellet wurde dann 30 - 45 Minuten luftgetrocknet und am Ende in 50 µl DNase- und RNase-freiem Wasser gelöst. Bis zur weiteren Verarbeitung und Analyse wurde die DNA bei - 20 °C weggefroren.

2.2.13 Quantitative real Time-PCR zur Bestimmung der Parasitenlast in Peritoneal-Exsudat-Makrophagen

Die qRT-PCR ist eine Methode, bei der eine bestimmte DNA-Sequenz soweit amplifiziert wird, dass sie detektiert und quantifiziert werden kann. In dieser Arbeit erfolgte die Detektion der Zunahme des PCR-Produkts mit dem Farbstoff SYBR Green I. Dabei handelt es sich um einen Cyaninfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Nach der Bindung an die DNA verstärkt sich das Fluoreszenzsignal des Farbstoffs, wodurch der Einbau des Farbstoffs in die DNA messbar ist. Der DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht von 494 nm und emittiert grünes Licht von 522 nm. Je mehr DNA in einer Probe enthalten ist, desto früher ist der sogenannte Schwellenwertzyklus (*Ct*; *engl.: cycle threshold*) erreicht, das heißt, das Fluoreszenzsignal des SYBR Green I Farbstoffs übersteigt das Hintergrundsignal und es ist genug DNA vorhanden, um vom System detektiert zu werden. Da der SYBR Green I Farbstoff unspezifisch an doppelsträngige DNA-Fragmente bindet, müssen Qualitätskontrollen stattfinden, um sicherzustellen, dass auch die Vervielfältigung des durch die Primer-Sequenzen bestimmten, gewünschten PCR-Produkts erfolgt. Deshalb wurden Schmelzkurven-Analysen nach jedem Lauf durchgeführt. Dafür wurden die PCR-Produkte nach 40 Zyklen für 5 Minuten auf 24 °C abgekühlt. Anschließend wurden die Proben in 0,5 °C-Schritten bis 95 °C aufgeheizt. Das

Fluoreszenzsignal nimmt dabei langsam ab, bis bei ca. 85 °C die doppelsträngige DNA auseinander geht (Schmelztemperatur) und das Signal fast verschwindet. Findet nur einmal ein solcher Abfall statt, ist nur ein PCR-Produkt entstanden und nicht mehrere unspezifische.

Da von den DNA-Proben, Standards und Nicht-Template Kontrollen (NTC; *engl.: non template control*) jeweils Triplikate pipettiert wurden, entstehen drei Amplifikationskurven und drei Schmelzkurven je Probe. Diese sollten zusammen verlaufen, was ebenfalls zur Qualitätskontrolle der PCR herangezogen werden kann. Die Vervielfältigung des gewünschten Produkts sollte außerdem exponentiell verlaufen.

In den **Abb. 13 und 14** sind Beispiele für die Schmelzkurve und die Amplifikationskurve einer PCR dargestellt.

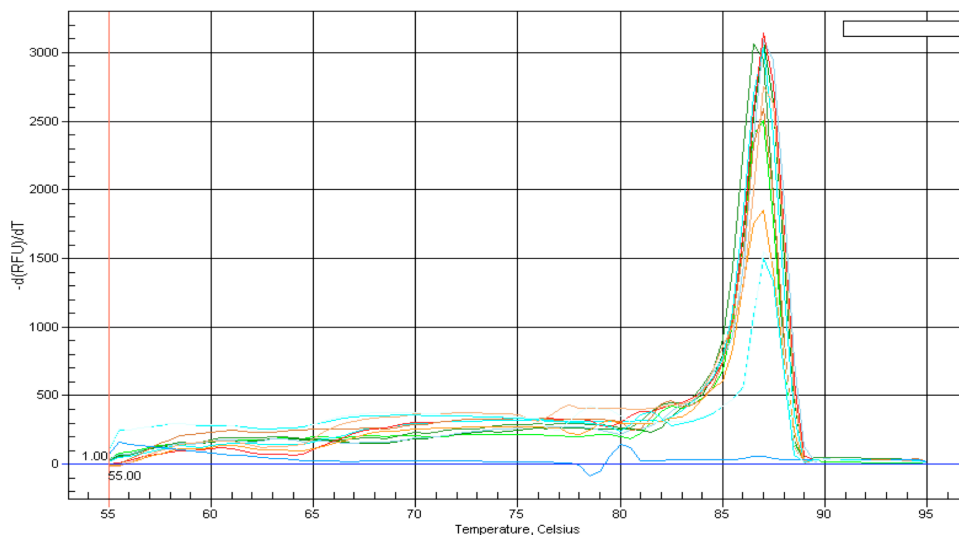


Abb. 13: Änderung des Fluoreszenzsignals der Schmelzkurven von drei β -Aktin-Standard-Proben auf einer 96-Well-PCR-Platte. Auf der x-Achse ist die Temperatur in °C gezeigt, die y-Achse zeigt die Änderung der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU; *engl. relative fluorescence units*) über die Zeit (T) ($-d(RFU)/dT$): Die Änderung des Fluoreszenzsignals ist bei der Schmelztemperatur am größten (Peak in der Abb.).

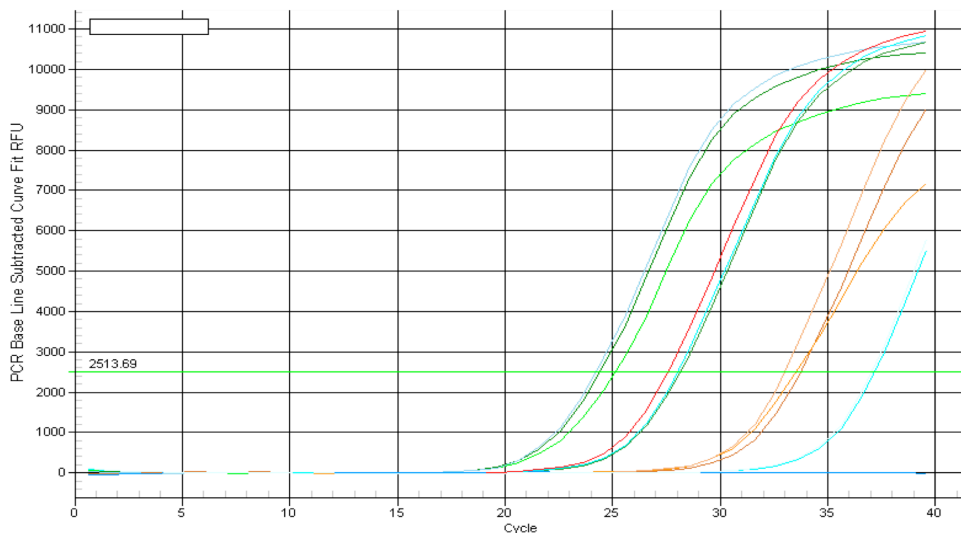


Abb. 14: Amplifikationskurven von drei β -Aktin-Standard-Proben auf einer 96-Well-PCR-Platte. Auf der x-Achse ist die Zyklusnummer gezeigt, die y-Achse zeigt die Zunahme der Fluoreszenzintensität (RFU; engl. *relative fluorescence units*) über das Hintergrundfluoreszenzsignal (engl. *PCR Base Line Subtracted Curve Fit*): Je niedriger der Gehalt an genomischer Maus-DNA ist, desto mehr Zyklen braucht es, bis der Schwellenwertzyklus erreicht ist und das Signal der Standardprobe detektiert werden kann (grüne waagrechte Linie: Schwellenwert des Hintergrundfluoreszenzsignals).

Um die Parasitenlast in Peritoneal-Exsudat-Makrophagen mit Hilfe der qRT-PCR zu bestimmen, musste zunächst genomische DNA aus den Peritoneal-Exsudat-Makrophagen gewonnen werden (siehe 2.2.12). Die photometrische Bestimmung des DNA-Gehalts der Proben erfolgte mittels eines Photometers bei 280/260 nm. Da das Absorptionsmaximum für Proteine, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm liegt, zeigt das Verhältnis der OD_{260} zur OD_{280} an, wie stark die DNA-Probe durch Alkohol und Reste von Proteinen verunreinigt ist.

Anschließend wurde die DNA-Konzentration der Probe mit DNase- und RNase-freiem Wasser auf 125 pg/ μ l eingestellt.

In dieser Arbeit wurde mittels qRT-PCR zum einen Maus- β -Aktin-DNA und zum anderen Leishmanien-18S-rRNA detektiert und quantifiziert.

Zur Bestimmung des β -Aktin Gehalts der Proben sowie des Gehalts an Leishmanien-DNA wurde jeweils eine Standardkurve erstellt. Die β -Aktin-Standardkurve wurde aus genomischer DNA erstellt, die von einer Mäusemilz isoliert wurde. Die Maus-DNA wurde auf die Konzentration 12500 pg/ μ l eingestellt und davon die Verdünnungen 1250 pg/ μ l, 125 pg/ μ l und 12,5 pg/ μ l hergestellt. Diese Konzentrationen wurden dann zur Erstellung der Standardkurve verwendet.

Die Leishmanien-Standardkurve wurde mit der Plasmid-DNA von Christian Drostens (Schulz et al., 2003), die mehrere Kopien der 18S-rRNA-Sequenz des Leishmaniengenoms

enthält, erstellt. Ausgehend von einer 10^{-2} -Verdünnung entsprechend 10^8 *L. major* Units/ μ l, die vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg zur Verfügung gestellt wurde, wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 10^{-5} (10^5 Units/ μ l), 10^{-6} (10^4 Units/ μ l), 10^{-7} (10^3 Units/ μ l) und 10^{-8} (10^2 Units/ μ l) hergestellt. Diese wurde zur Erstellung der Standardkurve verwendet. Die Verdünnung erfolgte in der für die β -Aktin-Standardkurve isolierten genomischen Maus-DNA (Konzentration =125 pg/ μ l).

Mit Hilfe der gemessenen Ct-Werte und der oben beschriebenen Standardkurven konnte dann die Anzahl der Parasiten bezogen auf die Menge an Peritoneal-Exsudat-Makrophagen berechnet werden.

Für die PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz pro Vertiefung einer 96-Well-PCR-Platte pipettiert (25 μ l Gesamtvolumen):

- 12,5 μ l iQ™ SYBR Green Supermix
- 2 μ l Primer (entweder Maus- β -Aktin-Primer oder *Leishmania major* 18S-rRNA-Primer)
- 9,5 μ l H₂O
- 1 μ l genomischer DNA-Probe oder Standard-Probe oder H₂O für die Nicht-Template Kontrollen (NTC)

Dann wurde die PCR-Platte mit einer selbstklebenden Folie versiegelt, kurz zentrifugiert und am BioRad iCycler iQ™ 5 folgendes Programm gewählt:

- Schritt 1: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 13 Minuten
- Schritt 2: Denaturierung bei 95 °C für 20 Sekunden
- Schritt 3: Primerhybridisierung bei 58 °C für 30 Sekunden
- Schritt 4: Elongation bei 72 °C für 30 Sekunden
- Schritt 5: 24 °C für 5 Minuten
- Schritt 6: Schmelzkurve in 0,5 °C Schritten bis 95 °C (= 81 Zyklen)

Die Schritte 2 - 4 wurden 40 Mal wiederholt.

2.2.14 Analyse der Daten

Die Auswertung der Phototoxizitäts-Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel, die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung, in den Graphen sind die Mittelwerte mit Standardfehler gezeigt. Die Ergebnisse der Experimente mit *L. major* Promastigoten und mit der J774A.1-Makrophagenzelllinie wurden mit Werten aus mindestens vier unabhängigen Experimenten berechnet. Jeder getestete Parameter wurde dabei vierfach bestimmt. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte durch Bezug der Proben auf die Referenzkontrolle (= unbehandelte Kontrolle; Photosensibilisator (PS)-, Licht (L)-). Dabei wurde eine Schwankung um den Referenzwert um $\pm 10\%$ als „kein Einfluss“ definiert. Eine Reduktion der Vitalität um mindestens 90 % bezogen auf den Referenzwert wurde als „effizient abgetötet“ definiert.

Die Standardreihe der *L. major* Promastigoten und der J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde als Dubletten ausgeführt. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte durch Korrelation der OD-Werte mit der Zellzahl und anschließendem Bezug der Werte auf die Referenzkontrolle (Probe mit der höchsten Zellzahl).

Die Ergebnisse der Peritoneal-Exsudat-Makrophagen-Experimente wurden mit Werten aus zwei unabhängigen Experimenten berechnet. Jeder getestete Parameter wurde dabei dreifach bestimmt. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte durch Vergleichen der Werte der Proben mit denen der Standardkurve.

3. Ergebnisse

3.1. OD-Wert Messung und Bestimmung der Vitalität von Proben mit bekannter Anzahl an *L. major* Promastigoten mittels MTT-Assay

Um bei einer bestimmten Anzahl von Leishmanien den OD-Wert bzw. die Vitalität mit dem MTT-Assay zu bestimmen, wurden die Standardreihen mit einer berechneten Zellzahl von 500.000 bis 15.625 *L. major* Promastigoten pro Vertiefung einer 96-Well-Platte erstellt. Nach Inkubation bei 28 °C und 5 % CO₂ für 30 Minuten, 5 Minuten oder 1 Minute wurden die Platten mit den Standardreihen im Dunkeln belassen. Die mit dem MTT-Assay gemessenen OD-Werte wurden anschließend mit der bekannten, berechneten Zellzahl korreliert und die entsprechende Vitalität durch Bezug auf die Proben mit 500.000 Zellen (= Referenzkontrolle) bestimmt.

In **Abb. 15** sind die Ergebnisse des MTT-Tests dargestellt.

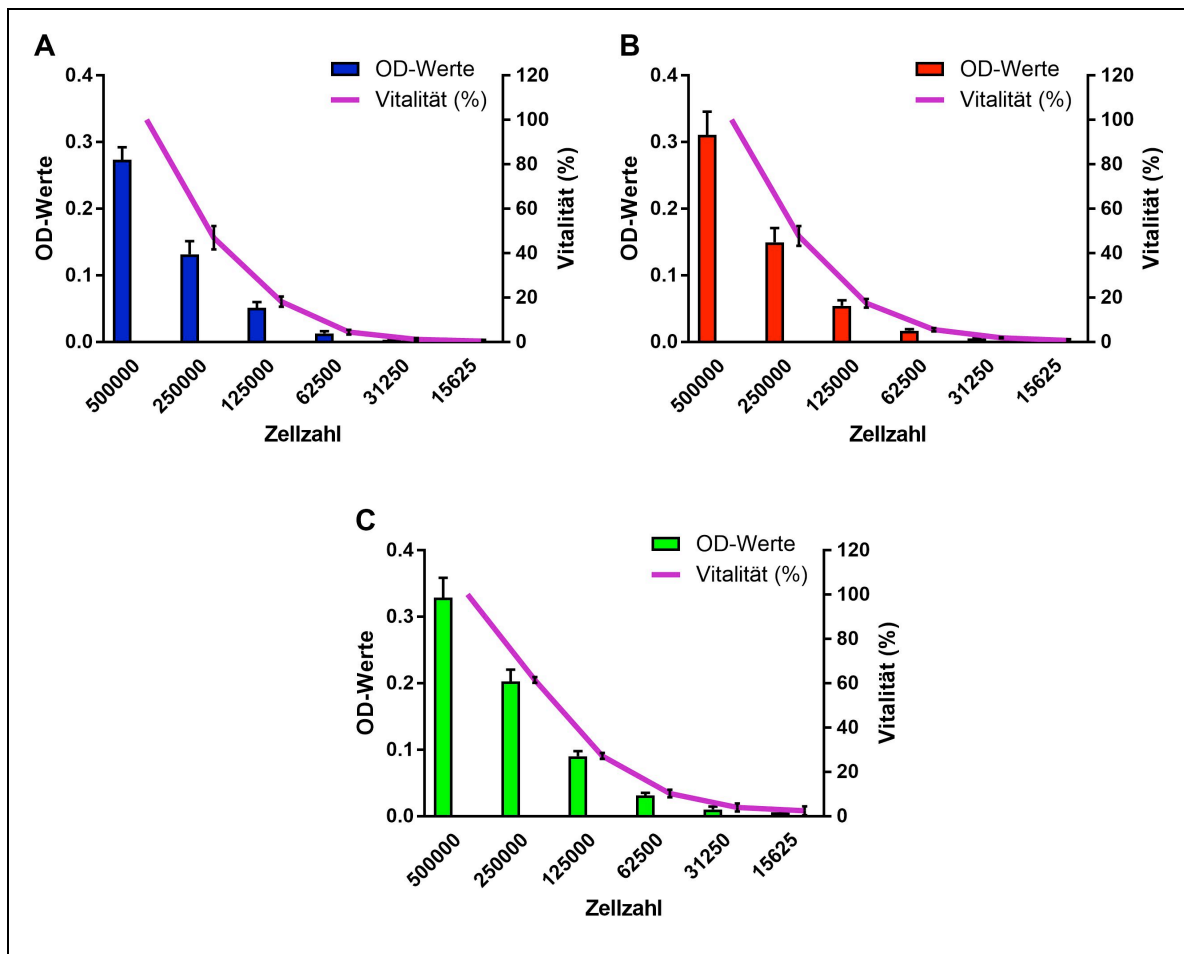


Abb. 15: Gemessener OD-Wert und gemessene Vitalität bei einer bestimmten Leishmanienzahl in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten. (A-C) Von den *L. major* Promastigoten wurden Standardreihen erstellt, die gemessenen OD-Werte mit der bekannten Zellzahl korreliert und die entsprechende Vitalität durch Bezug auf die Proben mit 500.000 Zellen (= Referenzkontrolle) bestimmt. Es sind der mit dem MTT-Assay gemessene OD-Wert (linke y-Achse) sowie die gemessene Vitalität bei einer bestimmten Zellzahl (rechte y-Achse) abgebildet. (A) Inkubation (Ink.) der Proben für 30 min. OD-Werte: blaue Balken. Vitalität in [%]: lila Linie. (B) Ink. der Proben für 5 min. OD-Werte: rote Balken. Vitalität in [%]: lila Linie. (C) Ink. der Proben für 1 min. OD-Werte: grüne Balken. Vitalität in [%]: lila Linie. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt (n = 9 für 30 min Ink.; n = 6 für 5 min Ink.; n = 7 für 1 min Ink.).

Die Ergebnisse des MTT-Assays zeigten, dass die Menge an entstehendem Formazan im getesteten Bereich abhängig von der Zellzahl war: Je höher die Leishmanienzahl in der Probe war, desto höher war der gemessene OD-Wert bzw. die entsprechende Vitalität in Prozent. Umgekehrt entsprachen dementsprechend wenige Zellen in der Probe einem geringen OD-Wert.

Die Höhe der Absorption im MTT-Assay war dabei nicht direkt proportional zur Leishmanienzahl: Bei 30 Minuten Inkubation nahm der gemessene OD-Wert von $0,27 \pm 0,06$ (500.000 Zellen) auf $0,00 \pm 0,01$ (15.625 Zellen) ab. Dementsprechend zeigte sich in Abhängigkeit von der Zellzahl, bezogen auf die Proben mit 500.000 Zellen

(= Referenzkontrolle), eine Abnahme der Vitalität von $46,9 \pm 15,8$ % auf $0,3 \pm 2,0$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 22** gezeigt.

Bei 5 Minuten Inkubation nahm der gemessene OD-Wert von $0,31 \pm 0,09$ (500.000 Zellen) auf $0,00 \pm 0,00$ (15.625 Zellen) ab. Dementsprechend zeigte sich in Abhängigkeit von der Zellzahl, bezogen auf die Proben mit 500.000 Zellen (= Referenzkontrolle), eine Abnahme der Vitalität von $47,7 \pm 11,0$ % auf $0,7 \pm 1,5$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 22** gezeigt.

Bei 1 Minute Inkubation nahm der gemessene OD-Wert von $0,33 \pm 0,08$ (500.000 Zellen) auf $0,01 \pm 0,01$ (15.625 Zellen) ab. Dementsprechend zeigte sich in Abhängigkeit von der Zellzahl, bezogen auf die Proben mit 500.000 Zellen (= Referenzkontrolle), eine Abnahme der Vitalität von $61,7 \pm 3,0$ % auf $2,2 \pm 4,5$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 22** gezeigt.

Zellzahl <i>L. major</i> 30 min Inkubation - Bestrahlung	500.000	250.000	125.000	62.500	31.250	15.625
Vitalität [%]	100 ^a	$46,9 \pm 15,8$	$18,2 \pm 6,9$	$4,4 \pm 3,2$	$1,2 \pm 1,8$	$0,3 \pm 2,0$
OD-Wert	$0,27 \pm 0,06$	$0,13 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,01$
Zellzahl <i>L. major</i> 5 min Inkubation - Bestrahlung	500.000	250.000	125.000	62.500	31.250	15.625
Vitalität [%]	100 ^a	$47,7 \pm 11,0$	$17,4 \pm 4,8$	$5,5 \pm 1,9$	$1,9 \pm 0,6$	$0,7 \pm 1,5$
OD-Wert	$0,31 \pm 0,09$	$0,15 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
Zellzahl <i>L. major</i> 1 min Inkubation - Bestrahlung	500.000	250.000	125.000	62.500	31.250	15.625
Vitalität [%]	100 ^a	$61,7 \pm 3,0$	$27,7 \pm 3,3$	$9,8 \pm 4,0$	$3,4 \pm 4,3$	$2,2 \pm 4,5$
OD-Wert	$0,33 \pm 0,08$	$0,20 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,01$

Tab. 22: Gemessene Vitalität und gemessener OD-Wert bei einer bestimmten Leishmanienzahl. Die Tab. zeigt die Vitalität von *L. major* in [%] und die mit dem MTT-Assay gemessenen OD-Werte (^a: die Vitalität der Leishmanien wurde auf die Proben mit der Zellzahl 500.000 normalisiert). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n = 9 für 30 min (Inkubation) Ink.; n = 6 für 5 min Ink.; n = 7 für 1 min Ink.).

Zusammengefasst entsprach eine Vitalität von ≤ 10 % (Vitalitätsabnahme um mindestens 90 % bezogen auf die Referenzkontrolle), unabhängig von der Inkubationszeit, einer Anzahl von *L. major* Promastigoten pro Vertiefung von ≤ 62.500 . Dementsprechend befinden sich 62.500 oder weniger Leishmanien in den Proben, wenn laut Definition in den folgenden Experimenten dieser Arbeit, die Ergebnisse zur photodynamischen Inaktivierung (PDI) als „effizient abgetötet“ definiert werden.

Eine Anzahl von ≤ 31.250 *L. major* Promastigoten pro Vertiefung entsprach unabhängig von der Inkubationszeit, kaum noch messbaren OD-Werten. Dementsprechend sind im Bereich der Detektionsgrenze des MTT-Assays 31.250 oder weniger Leishmanien in den Proben vorhanden.

3.2 Photodynamische Inaktivierung von *L. major* Promastigoten

Im ersten Teil der Arbeit wurde die photodynamische Effektivität der Photosensibilisatoren (PS) TMPyP, SAPyR und FLASH-07a bei der Inaktivierung von *L. major* Promastigoten *in-vitro*, in Suspension getestet. Dafür sind die Parasiten mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen für 30 Minuten, 5 Minuten oder 1 Minute inkubiert worden. Die Suspensionen sind dann mit der Lampe Waldmann BlueV mit einer Intensität von $20,0 \text{ mW/cm}^2$ für 600 Sekunden, entsprechend einer applizierten Energiedosis von 12 J/cm^2 , bestrahlt worden. Die Vitalität der *L. major* Promastigoten wurde anschließend mit dem MTT-Test bestimmt.

3.2.1 Anti-promastigote Wirkung von TMPyP

Um die Wirkung des PS TMPyP gegen *L. major* Promastigote zu testen, wurden die Parasiten mit den Konzentrationen $0 \text{ }\mu\text{M}$, $0,01 \text{ }\mu\text{M}$, $0,1 \text{ }\mu\text{M}$, $0,5 \text{ }\mu\text{M}$, $1 \text{ }\mu\text{M}$ und $10 \text{ }\mu\text{M}$ TMPyP inkubiert und belichtet.

In **Abb. 16** sind die Ergebnisse des MTT-Tests dargestellt.

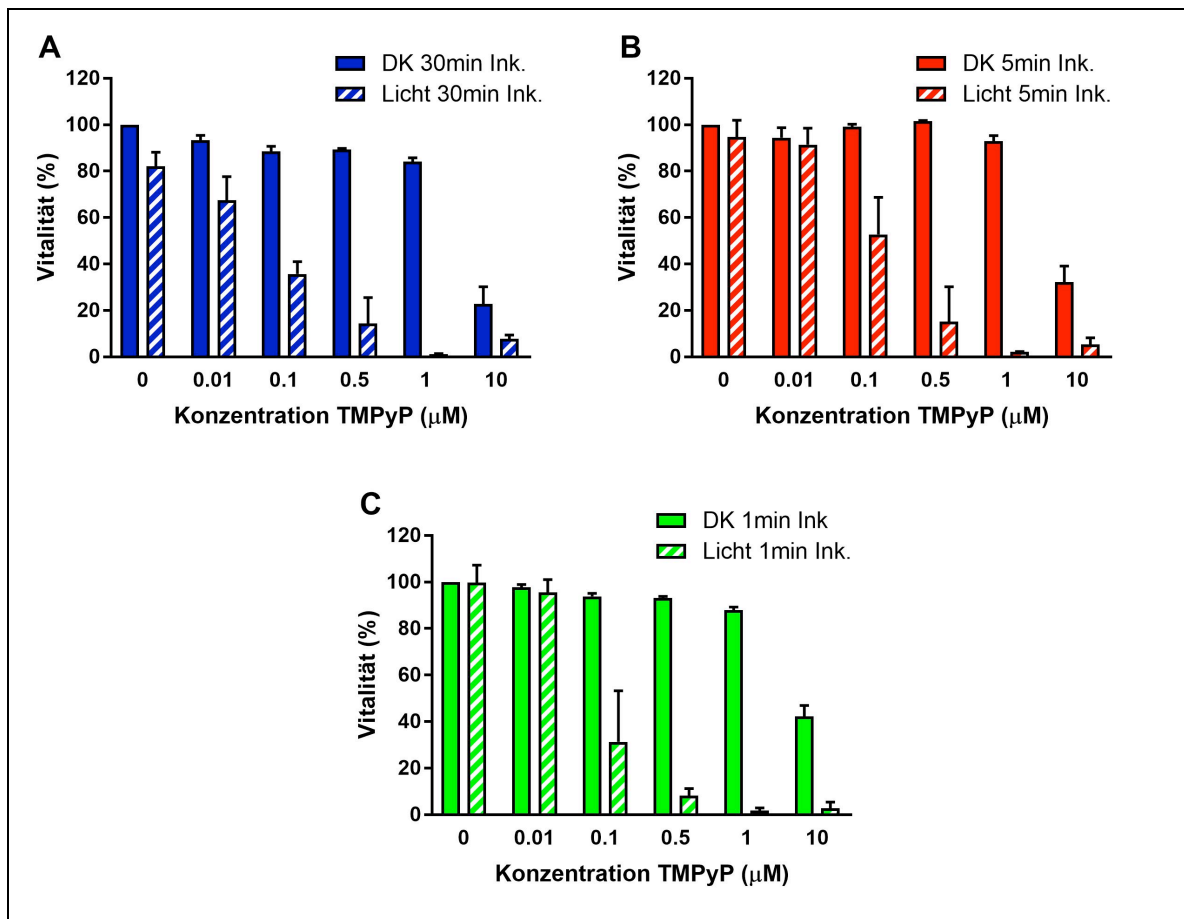


Abb. 16: Anti-promastigote Wirkung von TMPyP in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten. (A-C) Die *L. major* Promastigoten wurden mit 0 - 10 μM TMyP inkubiert und mit einer Energiedosis von 12 J/cm^2 bestrahlt oder im Dunkeln belassen. Die Vitalitätsabnahme bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (Photosensibilisator (PS)- Licht (L)-) (ausgefüllte Balken, Konz. 0 μM), wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. **(A)** Inkubation (Ink.) von *L. major* Promastigoten mit TMPyP für 30 min. Dunkelkontrollen (DK) (PS+ L-): blau ausgefüllte Balken. Lichtkontrolle (LK) (PS- L+): blau gestrichelter Balken, Konz. 0 μM . Mit TMPyP und Licht behandelte Proben (PS+ L+): blau gestrichelte Balken. **(B)** Ink. von *L. major* Promastigoten mit TMPyP für 5 min. DK (PS+ L-): rot ausgefüllte Balken. LK (PS- L+): rot gestrichelter Balken, Konz. 0 μM . Mit TMPyP und Licht behandelte Proben (PS+ L+): rot gestrichelte Balken. **(C)** Ink. von *L. major* Promastigoten mit TMPyP für 1 min. DK (PS+ L-): grün ausgefüllte Balken. LK (PS- L+): grün gestrichelter Balken, Konz. 0 μM . Mit TMPyP und Licht behandelte Proben (PS+ L+): grün gestrichelte Balken. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt ($n = 4$).

Nach Inkubation von *L. major* Promastigoten mit TMPyP für 30 Minuten ohne nachfolgende Bestrahlung (Dunkelkontrolle (DK); Photosensibilisator (PS)+, Licht (L)-) zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $93,4 \pm 4,1 \%$ auf $22,8 \pm 14,9 \%$. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 23** gezeigt.

In den Proben, die nach 30 Minuten Inkubation mit TMPyP bestrahlt wurden, zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte

Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $67,5 \pm 20,3$ % auf $1,2 \pm 0,5$ %. Die Lichtkontrolle (LK) (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $82,1 \pm 12,2$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 23** gezeigt.

In den Proben, die für 5 Minuten mit TMPyP inkubiert, aber nicht bestrahlt wurden (DK; PS+, L-), zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $94,4 \pm 8,6$ % auf $32,3 \pm 13,8$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 23** gezeigt.

Wenn die Proben nach 5 Minuten Inkubation mit TMPyP bestrahlt wurden, zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $91,4 \pm 14,3$ % auf $2,1 \pm 0,5$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $94,7 \pm 14,5$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 23** gezeigt.

Nach Inkubation mit TMPyP für 1 Minute ohne nachfolgende Bestrahlung (DK; PS+, L-) zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $97,8 \pm 2,4$ % auf $42,2 \pm 9,5$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 23** gezeigt.

Nach Inkubation mit TMPyP für 1 Minute und anschließender Bestrahlung zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $95,5 \pm 10,9$ % auf $1,7 \pm 2,4$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $99,7 \pm 15,1$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 23** gezeigt.

TMPyP 30 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	0,5µM	1µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	82,1 ± 12,2	67,5 ± 20,3	35,7 ± 10,6	14,3 ± 15,8	1,2 ± 0,5	7,8 ± 3,3
- Bestrahlung (Dunkelkontrollen)	100 ^a	93,4 ± 4,1	88,4 ± 4,7	89,4 ± 0,6	84,1 ± 3,4	22,8 ± 14,9
TMPyP 5 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	0,5µM	1µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	94,7 ± 14,5	91,4 ± 14,3	52,8 ± 31,9	15,2 ± 21,3	2,1 ± 0,5	5,4 ± 5,6
-Bestrahlung (Dunkelkontrollen)	100 ^a	94,4 ± 8,6	99,1 ± 2,3	101,5 ± 0,5	93,0 ± 4,7	32,3 ± 13,8
TMPyP 1 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	0,5µM	1µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	99,7 ± 15,1	95,5 ± 10,9	31,4 ± 38,0	8,1 ± 6,2	1,7 ± 2,4	2,7 ± 5,5
- Bestrahlung (Dunkelkontrollen)	100 ^a	97,8 ± 2,4	93,8 ± 2,7	93,2 ± 1,3	87,9 ± 2,8	42,2 ± 9,5

Tab. 23: Anti-promastigote Wirkung von TMPyP. Die Tab. zeigt die Vitalität von *L. major* in [%] (^a: die Vitalität der Leishmanien wurde auf die unbehandelten Kontrollen (= Referenzkontrolle; PS- L-) normalisiert; grün ausgefüllte Kästchen: „effizient abgetötet“, d.h. Reduktion der Vitalität > 90 % bezogen auf den Referenzwert). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n = 4).

Zusammengefasst war die Vitalitätsabnahme der mit TMPyP und Licht behandelten Proben in dem untersuchten Konzentrationsbereich, von 0 µM bis 10 µM, abhängig von der Farbstoffkonzentration. Dabei konnte ab der Konzentration 1 µM bereits bei der kürzesten Inkubationszeit (1 Minute), eine über 90%ige Inaktivierung von *L. major* Promastigoten *in-vitro*, in Suspension erzielt werden. Dementsprechend wurden *L. major* Promastigote in Suspension unabhängig von der Inkubationszeit, von 1 µM TMPyP und Licht effizient abgetötet. Zudem zeigte der PS TMPyP ab der Konzentration 10 µM eine Dunkeltoxizität. Eine Lichttoxizität zeigte sich nicht.

3.2.2 Anti-promastigote Wirkung von SAPyR

Um die Wirkung des PS SAPyR gegen *L. major* Promastigote zu testen, wurden die Parasiten mit den Konzentrationen 0 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM SAPyR inkubiert und belichtet.

In **Abb. 17** sind die Ergebnisse des MTT-Tests dargestellt.

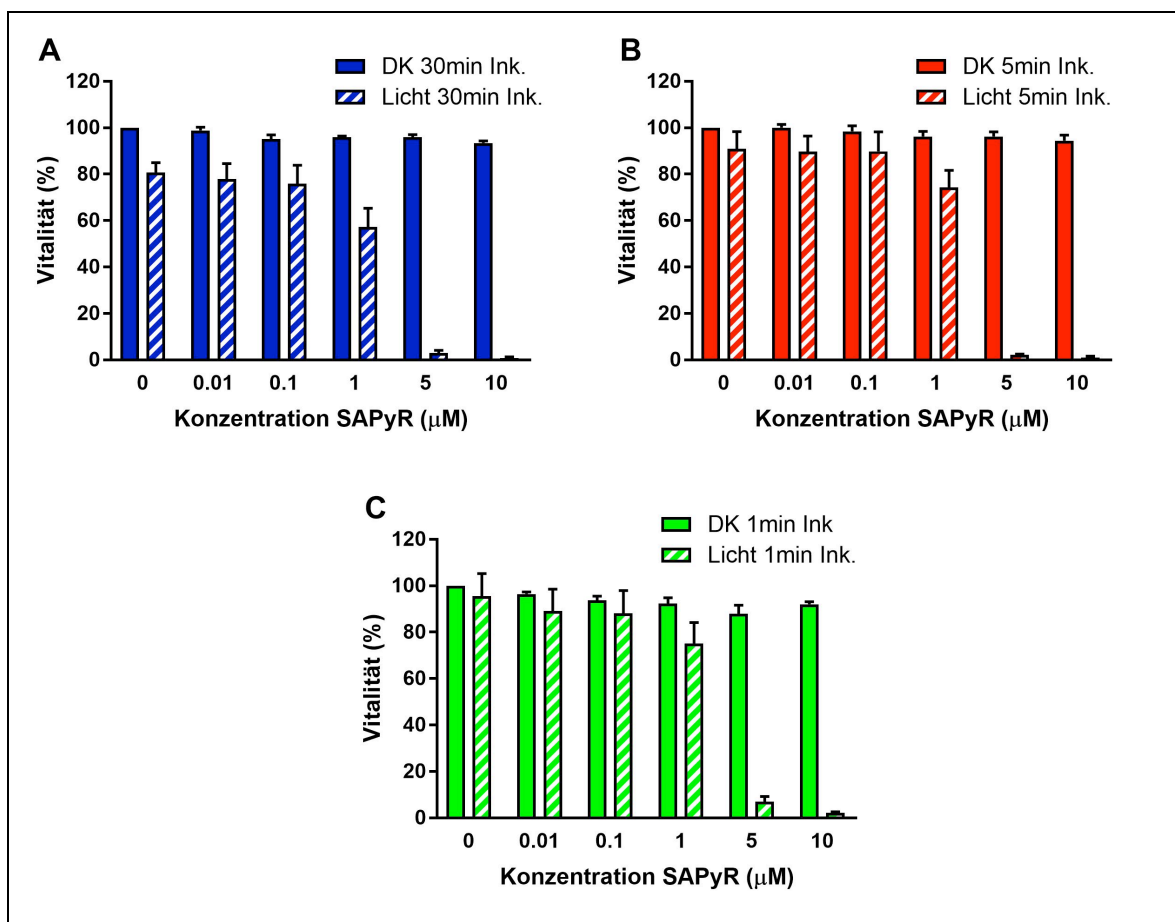


Abb. 17: Anti-promastigote Wirkung von SAPyR in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten. (A-C) Die *L. major* Promastigoten wurden mit 0 - 10 μM SAPyR inkubiert und mit einer Energiedosis von 12 J/cm^2 bestrahlt oder im Dunkeln belassen. Die Vitalitätsabnahme bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) (ausgefüllte Balken, Konz. 0 μM), wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. (A) Inkubation (Ink.) von *L. major* Promastigoten mit SAPyR für 30 min. DK (PS+ L-): blau ausgefüllte Balken. LK (PS- L+): blau gestrichelter Balken, Konz. 0 μM . Mit SAPyR und Licht behandelte Proben (PS+ L+): blau gestrichelte Balken. (B) Ink. von *L. major* Promastigoten mit SAPyR für 5 min. DK (PS+ L-): rot ausgefüllte Balken. LK (PS- L+): rot gestrichelter Balken, Konz. 0 μM . Mit SaPyR und Licht behandelte Proben (PS+ L+): rot gestrichelte Balken. (C) Ink. von *L. major* Promastigoten mit SaPyR für 1 min. DK (PS+ L-): grün ausgefüllte Balken. LK (PS- L+): grün gestrichelter Balken, Konz. 0 μM . Mit SAPyR und Licht behandelte Proben (PS+ L+): grün gestrichelte Balken. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt (n = 4).

Nach Inkubation von *L. major* Promastigoten mit SAPyR für 30 Minuten ohne nachfolgende Bestrahlung (DK; PS+, L-) zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $98,8 \pm 2,9$ % auf $93,4 \pm 1,9$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 24** gezeigt.

In den Proben, die nach 30 Minuten Inkubation mit SAPyR bestrahlt wurden, zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $78,0 \pm 13,3$ % auf $0,8 \pm 1,0$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $80,8 \pm 8,4$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 24** gezeigt.

In den Proben, die für 5 Minuten mit SAPyR inkubiert, aber nicht bestrahlt wurden (DK; PS+, L-), zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $100,0 \pm 3,0$ % auf $94,5 \pm 4,7$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 24** gezeigt.

Wenn die Proben nach 5 Minuten Inkubation mit SAPyR bestrahlt wurden, zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $89,7 \pm 13,5$ % auf $1,0 \pm 1,2$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $90,9 \pm 14,8$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 24** gezeigt.

Nach Inkubation mit SAPyR für 1 Minute ohne nachfolgende Bestrahlung (DK; PS+, L-) zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $96,5 \pm 1,4$ % auf $92,1 \pm 2,1$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 24** gezeigt.

Nach Inkubation mit SAPyR für 1 Minute und anschließender Bestrahlung zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $89,1 \pm 19,0$ % auf $2,2 \pm 1,0$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $95,6 \pm 19,4$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 24** gezeigt.

SAPyR 30 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	80,8 ± 3,4	78,0 ± 13,3	75,9 ± 15,8	57,2 ± 16,2	3,0 ± 1,6	0,8 ± 1,0
- Bestrahlung (Dunkelkontrollen)	100 ^a	98,8 ± 2,9	95,1 ± 3,7	95,9 ± 1,1	96,0 ± 1,6	93,4 ± 1,9
SAPyR 5 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	90,9 ± 14,8	89,7 ± 13,5	89,8 ± 16,9	74,3 ± 14,8	2,2 ± 0,7	1,0 ± 1,2
-Bestrahlung (Dunkelkontrollen)	100 ^a	100 ± 3,0	98,5 ± 4,8	96,3 ± 4,4	96,3 ± 2,8	94,5 ± 4,7
SAPyR 1 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	95,6 ± 19,4	89,1 ± 19,0	88,2 ± 19,4	75,1 ± 18,1	6,9 ± 4,7	2,2 ± 1,0
- Bestrahlung (Dunkelkontrollen)	100 ^a	96,5 ± 1,4	93,7 ± 3,7	92,4 ± 4,9	88,0 ± 7,3	92,1 ± 2,1

Tab. 24: Anti-promastigote Wirkung von SAPyR. Die Tab. zeigt die Vitalität von *L. major* in [%] (^a: die Vitalität der Leishmanien wurde auf die unbehandelten Kontrollen (= Referenzkontrolle; PS- L-) normalisiert; grün ausgefüllte Kästchen: „effizient abgetötet“, d.h. Reduktion der Vitalität > 90 % bezogen auf den Referenzwert). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n = 4).

Zusammengefasst war die Vitalitätsabnahme der mit SAPyR und Licht behandelten Proben in dem untersuchten Konzentrationsbereich, von 0µM bis 10 µM, abhängig von der Farbstoffkonzentration. Dabei konnte ab der Konzentration 5 µM bereits bei der kürzesten Inkubationszeit (1 Minute), eine über 90%ige Inaktivierung von *L. major* Promastigoten *in-vitro*, in Suspension erzielt werden. Dementsprechend wurden *L. major* Promastigote in Suspension unabhängig von der Inkubationszeit, von 5 µM SAPyR und Licht effizient abgetötet. Der PS SAPyR zeigte in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine Dunkeltoxizität. Eine Lichttoxizität zeigte sich ebenfalls nicht. Eine Ausnahme bildeten dabei die Proben, die für 30 Minuten inkubiert wurden: Hier zeigte sich eine Abnahme der Vitalität um 20 %.

3.2.3 Anti-promastigote Wirkung von FLASH-07a

Um die Wirkung des PS FLASH-07a gegen *L. major* Promastigote zu testen, wurden die Parasiten mit den Konzentrationen 0 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM FLASH-07a inkubiert und belichtet.

In **Abb. 18** sind die Ergebnisse des MTT-Tests dargestellt.

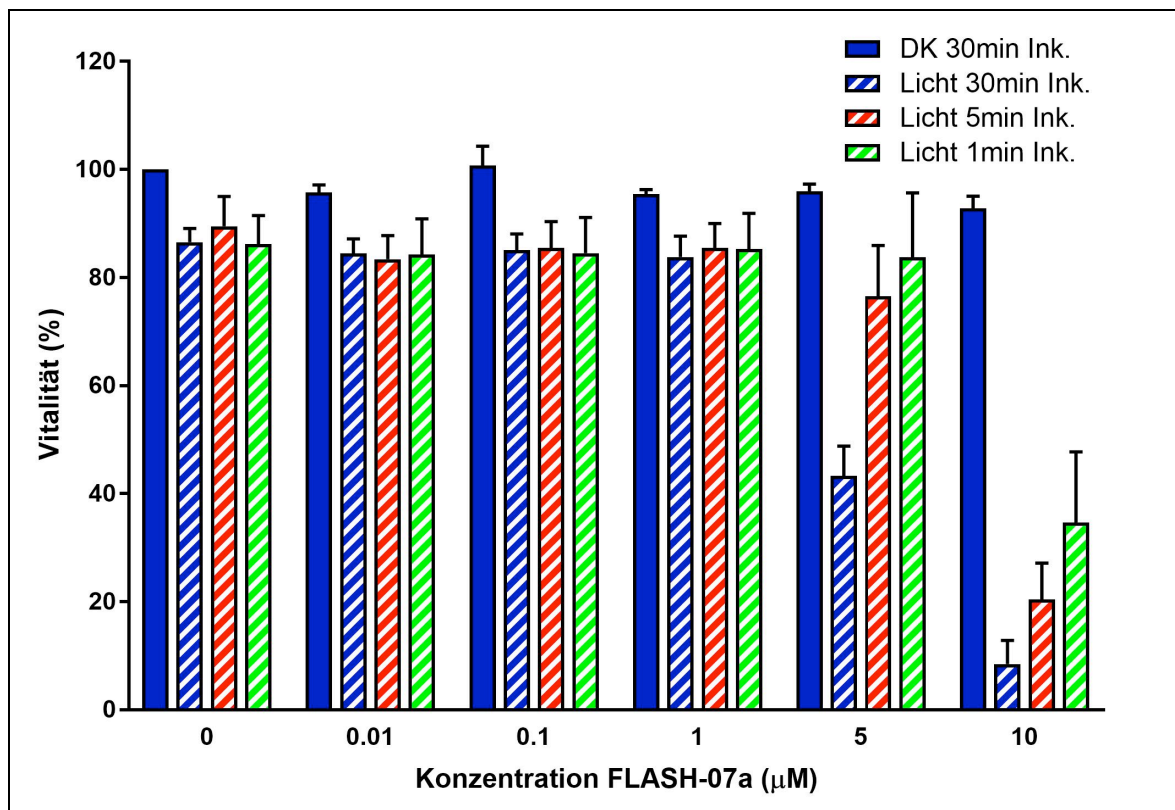


Abb. 18: Anti-promastigote Wirkung von FLASH-07a in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten. Die *L. major* Promastigoten wurden mit 0 - 10 μM FLASH-07a inkubiert und mit einer Energiedosis von 12 J/cm^2 bestrahlt oder im Dunkeln belassen. Die Vitalitätsabnahme, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) 30 min Inkubation (Ink.) (blau ausgefüllte Balken, Konz. 0 μM), wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. **DK (PS+ L-) 30 min Ink.:** blau ausgefüllte Balken. **Ink. von *L. major* Promastigoten mit FLASH-07a für 30 min:** LK (PS- L+): blau gestrichelter Balken, Konz. 0 μM . Mit FLASH-07a und Licht behandelte Proben (PS+ L+): blau gestrichelte Balken. **Ink. von *L. major* Promastigoten mit FLASH-07a für 5 min:** LK (PS- L+): rot gestrichelter Balken, Konz. 0 μM . Mit FLASH-07a und Licht behandelte Proben (PS+ L+): rot gestrichelte Balken. **Ink. von *L. major* Promastigoten mit FLASH-07a für 1 min:** LK (PS- L+): grün gestrichelter Balken, Konz. 0 μM . Mit FLASH-07a und Licht behandelte Proben (PS+ L+): grün gestrichelte Balken. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt (n = 4).

Nach Inkubation von *L. major* Promastigoten mit FLASH-07a für 30 Minuten ohne nachfolgende Bestrahlung (DK; PS+, L-) zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-),

eine Abnahme der Vitalität von $95,7 \pm 2,8$ % auf $92,8 \pm 4,6$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 25** gezeigt.

In den Proben, die nach 30 Minuten Inkubation mit FLASH-07a bestrahlt wurden, zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $84,4 \pm 5,4$ % auf $8,5 \pm 8,7$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $86,6 \pm 5,0$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 25** gezeigt.

Wenn die Proben nach 5 Minuten Inkubation mit FLASH-07a bestrahlt wurden, zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle 30 Minuten Inkubation (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $83,4 \pm 8,8$ % auf $20,4 \pm 13,5$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $89,5 \pm 11,1$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 25** gezeigt.

Nach Inkubation mit FLASH-07a für 1 Minute und anschließender Bestrahlung zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle 30 Minuten Inkubation (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $84,3 \pm 13,2$ % auf $34,6 \pm 26,2$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $86,2 \pm 10,5$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 25** gezeigt.

FLASH-07a 30 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	86,6 ± 5,0	84,4 ± 5,4	85,1 ± 6,0	83,8 ± 7,7	43,3 ± 9,6	8,5 ± 8,7
FLASH-07a 5 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	89,5 ± 11,1	83,4 ± 8,8	85,5 ± 9,7	85,5 ± 9,1	76,6 ± 16,3	20,4 ± 13,5
FLASH-07a 1 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	86,2 ± 10,5	84,3 ± 13,2	84,5 ± 13,2	85,3 ± 13,3	83,7 ± 20,7	34,6 ± 26,2
FLASH-07a 30 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
- Bestrahlung (Dunkelkontrollen)	100 ^a	95,7 ± 2,8	100,7 ± 7,2	95,5 ± 1,6	96,0 ± 2,3	92,8 ± 4,6

Tab. 25: Anti-promastigote Wirkung von FLASH-07a. Die Tab. zeigt die Vitalität von *L. major* in [%] (^a: die Vitalität der Leishmanien wurde auf die unbehandelte Kontrolle 30 min Inkubation (= Referenzkontrolle; PS- L-) normalisiert; grün ausgefülltes Kästchen: „effizient abgetötet“, d.h. Reduktion der Vitalität > 90 % bezogen auf den Referenzwert). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n = 4).

Zusammengefasst war die Vitalitätsabnahme der mit FLASH-07a und Licht behandelten Proben in dem untersuchten Konzentrationsbereich, von 0 µM bis 10 µM, abhängig von der Farbstoffkonzentration. Dabei konnte ab der Konzentration 10 µM bei der längsten Inkubationszeit (30 Minuten), eine über 90%ige Inaktivierung von *L. major* Promastigoten *in-vitro*, in Suspension erzielt werden. Dementsprechend wurden *L. major* Promastigote in Suspension in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, von 10 µM FLASH-07a und Licht effizient abgetötet. Der PS FLASH-07a zeigte in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine Dunkeltoxizität. Eine Lichttoxizität zeigte sich ebenfalls nicht.

3.2.4 Vergleich der Effektivität von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a bei der photodynamischen Inaktivierung von *L. major* Promastigoten

Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionscharakteristika der untersuchten PS und da nach dem Grundsatz der Photodynamik nur die durch einen PS absorbierten Photonen zur Bildung von Singulett-Sauerstoff und reaktiven Sauerstoffspezies beitragen (Cieplik et al., 2015), kann mit dem Vergleich der Inaktivierungsrate bei einer bestimmten Konzentration keine Aussage darüber getroffen werden, welcher PS photodynamisch effizienter *L. major* Promastigote abtöten kann. Daher wurde die Effektivität der PS bei der PDI von *L. major* Promastigoten bei gleicher Anzahl an absorbierten Photonen miteinander verglichen.

Dafür wurde in Kooperation mit Dr. Johannes Regensburger (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg) unter Verwendung der Formel von Cieplik et al. (Cieplik et al., 2015), ausgehend von der Konzentration 10 μM FLASH-07a, die Konzentration bestimmt, bei welcher die anderen beiden PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbieren. Bei der Bestrahlung mit der Lampe Waldmann BlueV mit einer Intensität von 20,0 mW/cm^2 für 600 Sekunden, entsprechend einer applizierten Energiedosis von 12 J/cm^2 , werden bei der Konzentration 10 μM FLASH-07a $1,5814 \times 10^{21}$ Photonen absorbiert. Um unter diesen Bedingungen die gleiche Anzahl an Photonen zu absorbieren, benötigt man bei TMPyP und SAPyR folgende Konzentrationen:

Farbstoffkonzentration	0,7175 μM TMPyP	15 μM SAPyR	10 μM FLASH-07a
Absorbierte Photonen	$1,5813 \times 10^{21}$	$1,5808 \times 10^{21}$	$1,5814 \times 10^{21}$

Tab. 26: Anzahl an absorbierten Photonen durch die verwendeten Photosensibilisatoren. Die Tab. zeigt die Konzentrationen von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a, bei denen die Farbstoffe basierend auf der Formel von Cieplik et al., die gleiche Anzahl an Photonen absorbieren. Die Bestrahlung erfolgte mit der Lampe Waldmann BlueV mit einer Intensität von 20,0 mW/cm^2 für 600 Sekunden, entsprechend einer applizierten Energiedosis von 12 J/cm^2 .

Abb. 19 gibt einen Überblick über die photodynamische Effektivität von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a bei der Inaktivierung von *L. major* Promastigoten, indem die anti-promastigote Wirkung der drei Farbstoffe in einer Graphik zusammengefasst ist.

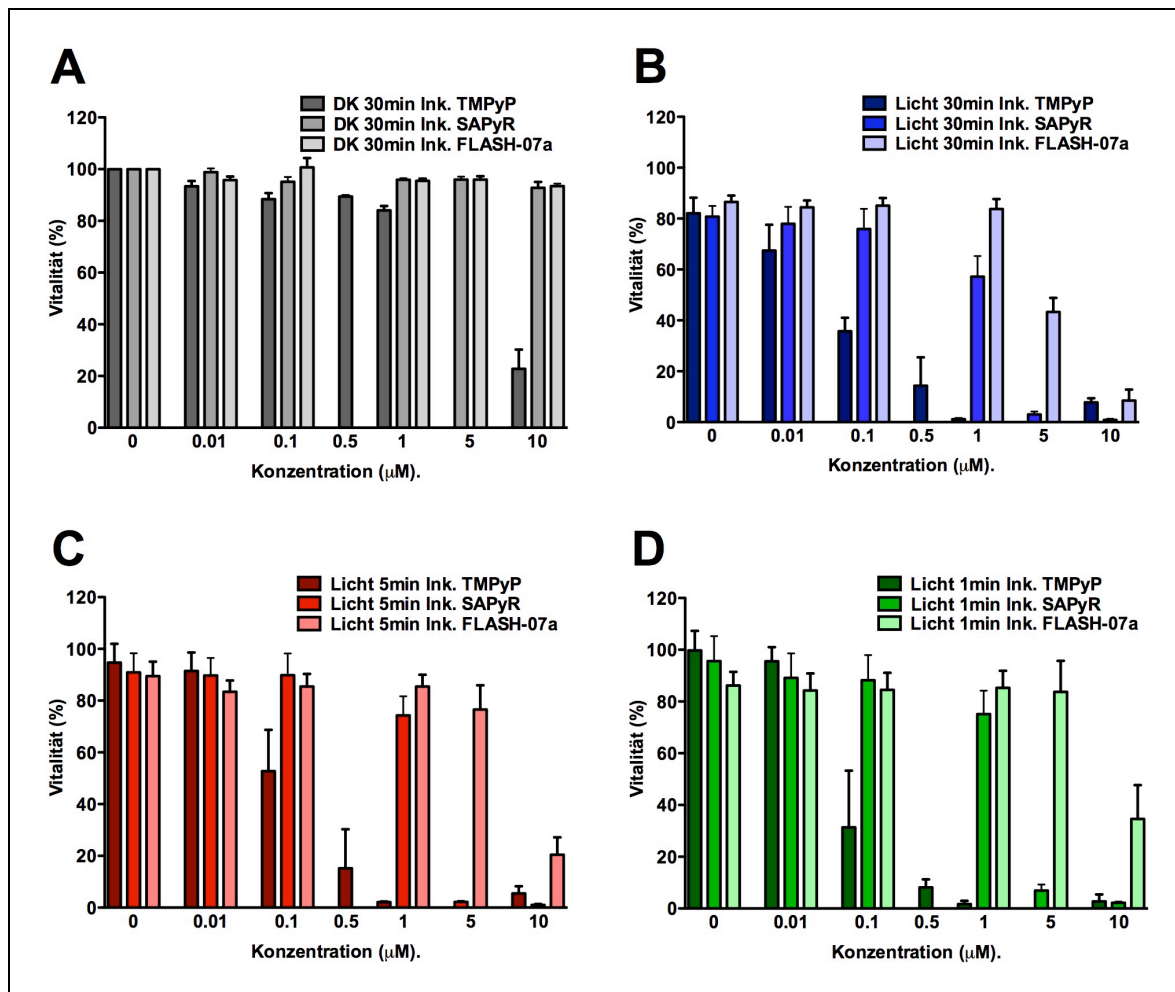


Abb. 19: Photodynamische Effektivität von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a bei der Inaktivierung von *L. major* Promastigoten in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten. (A) Dargestellt ist die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) 30 min Inkubation (Ink.) (graue Balken, Konz. 0µM) sowie die DK (PS+ L-) 30 min Ink. (graue Balken) für alle drei PS. (B-D) Die *L. major* Promastigoten wurden mit 0 - 10 µM PS inkubiert und mit einer Energiedosis von 12 J/cm² bestrahlt. Die Vitalitätsabnahme bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) (hier nur 30 min Ink. dargestellt), wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. (B) Ink. von *L. major* Promastigoten mit den PS für 30 min. TMPyP: dunkelblauer Balken; SAPyR: mittelblauer Balken; FLASH-07a: hellblauer Balken. (C) Ink. von *L. major* Promastigoten mit den PS für 5 min. TMPyP: dunkelroter Balken; SAPyR: mittelroter Balken; FLASH-07a: hellroter Balken. (D) Ink. von *L. major* Promastigoten mit den PS für 1 min. TMPyP: dunkelgrüner Balken; SAPyR: mittelgrüner Balken; FLASH-07a: hellgrüner Balken. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt (n = 4).

Um nun die Effektivität der PS miteinander vergleichen zu können, wurden die Farbstoffe, wie auf Seite 77 beschrieben, bei gleicher Anzahl an absorbierten Photonen miteinander verglichen.

Bei 30 Minuten Inkubation führte die PDI mit 10 µM FLASH-07a ($1,5814 \times 10^{21}$ absorbierte Photonen) zu einer über 90%igen Inaktivierung von *L. major* Promastigoten. Die PDI mit 1 µM TMPyP, was einer etwas höheren Konzentration entspricht als die berechnete Konzentration, bei welcher der PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert

wie 10 μM FLASH-07a, führte ebenfalls zu einer über 90%igen Inaktivierung von *L. major* Promastigoten. Auch die PDI mit 5 μM SAPyR führte bereits zu einer über 90%igen Inaktivierung von *L. major* Promastigoten, obwohl die Konzentration, bei welcher der PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert wie 10 μM FLASH-07a, um den Faktor drei höher berechnet wurde. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 27** gezeigt. Bei 5 Minuten Inkubation führte die PDI mit 10 μM FLASH-07a ($1,5814 \times 10^{21}$ absorbierte Photonen) zu einer Inaktivierungsrate von 80 %. Die PDI mit 1 μM TMPyP, was einer etwas höheren Konzentration entspricht als die berechnete Konzentration, bei welcher der PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert wie 10 μM FLASH-07a, führte dagegen zu einer über 90%igen Inaktivierung von *L. major* Promastigoten. Die PDI mit 5 μM SAPyR führte ebenfalls zu einer über 90%igen Inaktivierung der *L. major* Promastigoten, obwohl die Konzentration, bei welcher der PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert wie 10 μM FLASH-07a, um den Faktor drei höher berechnet wurde. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 27** gezeigt.

Bei 1 Minute Inkubation führte die PDI mit 10 μM FLASH-07a ($1,5814 \times 10^{21}$ absorbierte Photonen) zu einer Inaktivierungsrate von unter 70 %. Die PDI mit 1 μM TMPyP, was einer etwas höheren Konzentration entspricht als die berechnete Konzentration, bei welcher der PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert wie 10 μM FLASH-07a, führte dagegen zu einer über 90%igen Inaktivierung der *L. major* Promastigoten. Die PDI mit 5 μM SAPyR führte ebenfalls zu einer über 90%igen Inaktivierung der *L. major* Promastigoten, obwohl die Konzentration, bei welcher der PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert wie 10 μM FLASH-07a um den Faktor drei höher berechnet wurde. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 27** gezeigt.

	FLASH-07a	TMPyP	SAPyR
Farbstoffkonzentration	10 μ M	0,7175 μ M	15 μ M
Absorbierte Photonen	1,5814 x 10 ²¹	1,5813 x 10 ²¹	1,5808 x 10 ²¹
Für den Vergleich verwendete Farbstoffkonzentration	10 μ M	1 μ M	5 μ M
30 min Inkubation	8,5 \pm 8,7	1,2 \pm 0,5	3,0 \pm 1,6
5 min Inkubation	20,4 \pm 13,5	2,1 \pm 0,5	2,2 \pm 0,7
1 min Inkubation	34,6 \pm 26,2	1,7 \pm 2,4	6,9 \pm 4,7

Tab. 27: Vergleich der photodynamischen Effektivität von FLASH-07a, TMPyP und SAPyR bei der Inaktivierung von *L. major* Promastigoten. Die Tab. zeigt die berechneten Konzentrationen von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a, bei denen die Farbstoffe die gleiche Anzahl an Photonen absorbieren (siehe Tab. 26) und die Vitalität von *L. major* in [%] bei der Konzentration 10 μ M FLASH-07a, 1 μ M TMPyP und 5 μ M SAPyR (Ausschnitt aus den Tab. 25, 23 und 24); (grün ausgefüllte Kästchen: „effizient abgetötet“, d.h. Reduktion der Vitalität > 90 % bezogen auf den Referenzwert). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n = 4).

Zusammengefasst erzielte bei der PDI mit 10 μ M FLASH-07a (1,5814 x 10²¹ absorbierte Photonen) nur die längste Inkubationszeit (30 Minuten) eine effiziente Abtötung von *L. major* Promastigoten *in-vitro*, in Suspension. Bei den kürzeren Inkubationszeiten konnte keine effiziente Abtötung von *L. major* Promastigoten in Suspension erreicht werden.

Bei der PDI mit 1 μ M TMPyP, entsprechend einer etwas höheren Konzentration als die beim Angleichen der Anzahl an absorbierten Photonen berechnete, zeigte sich dagegen unabhängig von der Inkubationszeit eine effiziente Abtötung von *L. major* Promastigoten *in-vitro*, in Suspension. Bei der PDI mit 5 μ M SAPyR, entsprechend einer um den Faktor drei niedrigeren Konzentration als die beim Angleichen der Anzahl an absorbierten Photonen berechnete, zeigte sich bereits unabhängig von der Inkubationszeit eine effiziente Abtötung von *L. major* Promastigoten *in-vitro*, in Suspension.

Dementsprechend nahm die photodynamische Effektivität bei der Inaktivierung von *L. major* Promastigoten in Suspension, in folgender Reihenfolge zu: FLASH-07a < TMPyP < SAPyR. Dies war auch unabhängig von den Inkubationszeiten. Eine Ausnahme bildete dabei 30 Minuten Inkubation: Hier war die PDI mit FLASH-07a bei einer ähnlichen Anzahl an absorbierten Photonen vergleichbar effektiv wie die PDI mit TMPyP.

3.3 OD-Wert Messung und Bestimmung der Vitalität von Proben mit bekannter Anzahl der J774A.1-Makrophagenzelllinie mittels MTT-Assay

Um bei einer bestimmten Anzahl der J774A.1-Makrophagenzelllinie den OD-Wert bzw. die Vitalität mit dem MTT-Assay zu bestimmen, wurden die Standardreihen mit einer berechneten Zellzahl von 100.000 bis 3125 Zellen der J774A.1-Makrophagenzelllinie pro Vertiefung einer 96-Well-Platte erstellt. Nach Inkubation bei 28 °C und 5 % CO₂ für 30 Minuten wurden die Platten mit den Standardreihen im Dunkeln belassen. Die mit dem MTT-Assay gemessenen OD-Werte wurden anschließend mit der bekannten, berechneten Zellzahl korreliert und die entsprechende Vitalität durch Bezug auf die Proben mit 100.000 Zellen (= Referenzkontrolle) bestimmt.

In **Abb. 20** sind die Ergebnisse des MTT-Tests dargestellt.

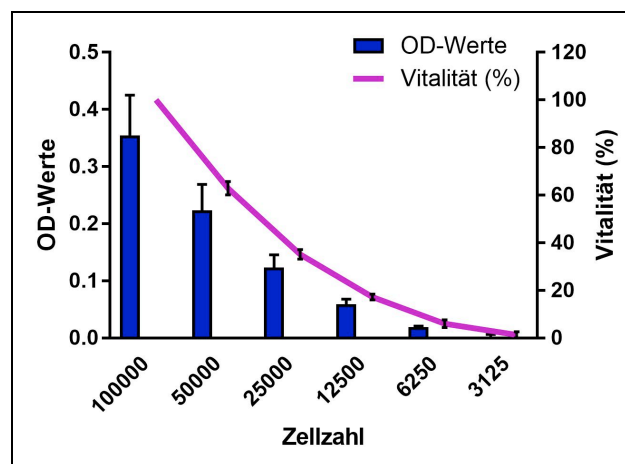


Abb. 20: Gemessener OD-Wert und gemessene Vitalität bei einer bestimmten Anzahl der J774A.1-Makrophagenzelllinie bei 30 min Inkubationszeit. Von der J774A.1-Makrophagenzelllinie wurden Standardreihen erstellt, die gemessenen OD-Werte mit der bekannten Zellzahl korreliert und die entsprechende Vitalität durch Bezug auf die Proben mit 100.000 Zellen (= Referenzkontrolle) bestimmt. Es sind der mit dem MTT-Assay gemessene OD-Wert (linke y-Achse) sowie die gemessene Vitalität bei einer bestimmten Zellzahl (rechte y-Achse) abgebildet. Inkubation der Proben für 30 min: OD-Werte: blaue Balken. Vitalität in [%]: lila Linie. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt (n = 4).

Die Ergebnisse des MTT-Assays zeigten, dass die Menge an entstehendem Formazan im getesteten Bereich abhängig von der Zellzahl war: Je höher die Anzahl der J774A.1-Makrophagenzelllinie in der Probe war, desto höher war der gemessene OD-Wert bzw. die entsprechende Vitalität in Prozent. Umgekehrt entsprachen dementsprechend wenige Zellen in der Probe einem geringen OD-Wert.

Die Höhe der Absorption im MTT-Assay war dabei nicht direkt proportional zur J774A.1-Zellzahl: Bei 30 Minuten Inkubation nahm der gemessene OD-Wert von $0,35 \pm 0,14$ (100.000 Zellen) auf $0,00 \pm 0,01$ (3125 Zellen) ab. Dementsprechend zeigte sich in Abhängigkeit von der Zellzahl, bezogen auf die Proben mit 100.000 Zellen (= Referenzkontrolle), eine Abnahme der Vitalität von $63,0 \pm 5,6$ % auf $1,4 \pm 2,6$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 28** gezeigt.

Zellzahl J774A.1 30 min Inkubation - Bestrahlung	100.000	50.000	25.000	12.500	6250	3125
Vitalität [%]	100 ^a	$63,0 \pm 5,6$	$35,1 \pm 4,0$	$17,2 \pm 2,4$	$6,1 \pm 3,1$	$1,4 \pm 2,6$
OD-Wert	$0,35 \pm 0,14$	$0,22 \pm 0,09$	$0,12 \pm 0,04$	$0,06 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,01$

Tab. 28: Gemessene Vitalität und gemessener OD-Wert bei einer bestimmten Anzahl der J774A.1-Makrophagenzelllinie. Die Tab. zeigt die Vitalität der J774A.1-Makrophagenzelllinie in [%] und die mit dem MTT-Assay gemessenen OD-Werte (^a: Die Vitalität der J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde auf die Proben mit der Zellzahl 100.000 normalisiert). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n = 4).

Zusammengefasst entsprach eine Vitalität von ≤ 10 % (Vitalitätsabnahme um mindestens 90 % bezogen auf die Referenzkontrolle), einer Anzahl der J774A.1-Makrophagenzelllinie pro Vertiefung von ≤ 6250 . Dementsprechend befinden sich 6250 oder weniger Zellen in den Proben, wenn laut Definition in den folgenden Experimenten dieser Arbeit, die Ergebnisse zur PDI als „effizient abgetötet“ definiert werden.

Eine Anzahl der J774A.1-Makrophagenzelllinie von ≤ 3125 pro Vertiefung entsprach kaum noch messbaren OD-Werten. Dementsprechend sind im Bereich der Detektionsgrenze des MTT-Assays 3125 oder weniger Zellen in den Proben vorhanden.

3.4 Photodynamische Inaktivierung der J774A.1-Makrophagenzelllinie

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Zytotoxizität der PS TMPyP, SAPyR und FLASH-07a auf die J774A.1-Makrophagenzelllinie *in-vitro*, in Suspension getestet. Dafür ist die J774A.1-Makrophagenzelllinie mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen für 30 Minuten, 5 Minuten oder 1 Minute inkubiert worden. Die Suspensionen sind dann mit der Lampe Waldmann BlueV mit einer Intensität von $20,0 \text{ mW/cm}^2$ für 600 Sekunden, entsprechend einer applizierten Energiedosis von 12 J/cm^2 , bestrahlt worden. Die Vitalität der J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde anschließend mit dem MTT-Test bestimmt.

3.4.1 Zytotoxizität von TMPyP

Um die Zytotoxizität von TMPyP zu testen, wurde die J774A.1-Makrophagenzelllinie mit den Konzentrationen $0 \text{ }\mu\text{M}$, $0,01 \text{ }\mu\text{M}$, $0,1 \text{ }\mu\text{M}$, $0,5 \text{ }\mu\text{M}$, $1 \text{ }\mu\text{M}$ und $10 \text{ }\mu\text{M}$ TMPyP inkubiert und belichtet.

In **Abb. 21** sind die Ergebnisse des MTT-Tests dargestellt.

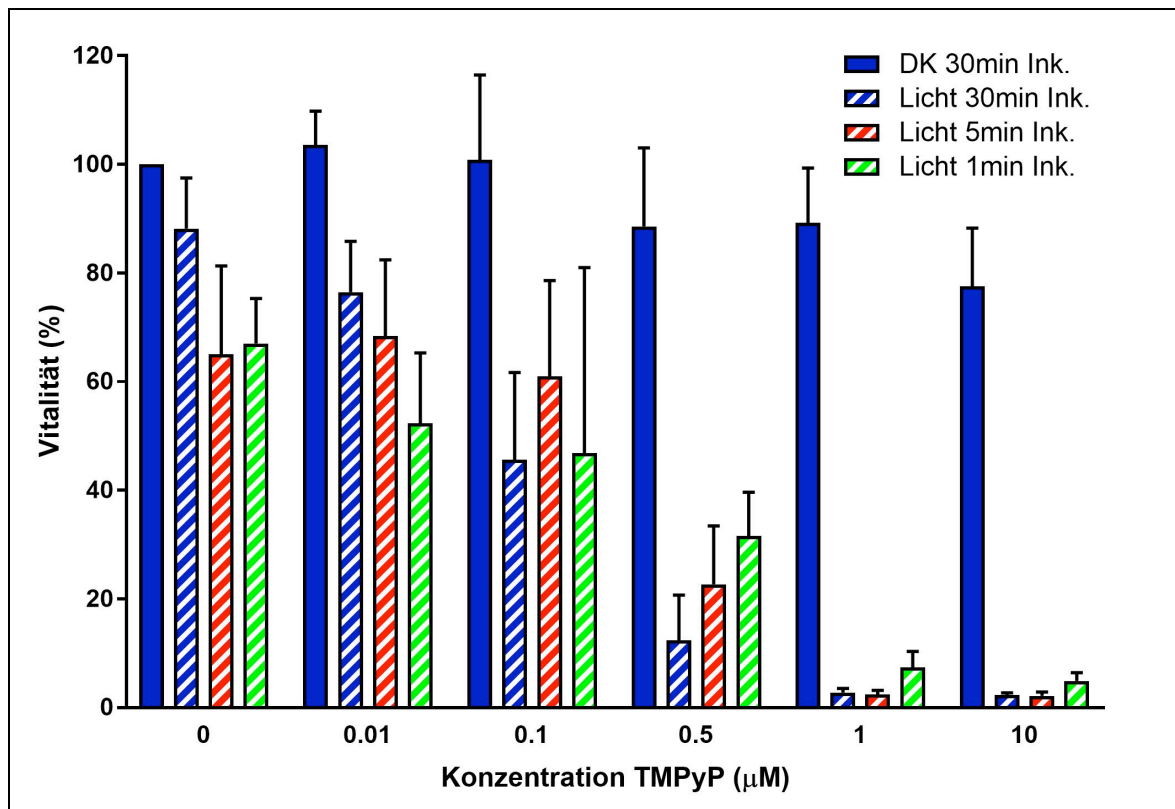


Abb. 21: Zytotoxische Wirkung von TMPyP in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten. Die J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde mit 0 - 10µM TMPyP inkubiert und mit einer Energiedosis von 12 J/cm² bestrahlt oder im Dunkeln belassen. Die Vitalitätsabnahme, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) 30 min Inkubation (Ink.) (blau ausgefüllte Balken, Konz. 0 µM), wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. DK (PS+ L-) 30 min Ink.: blau ausgefüllte Balken. **Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit TMPyP für 30 min:** LK (PS- L+): blau gestrichelter Balken, Konz. 0µM. Mit TMPyP und Licht behandelte Proben (PS+ L+): blau gestrichelte Balken. **Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit TMPyP für 5 min:** LK (PS- L+): rot gestrichelter Balken, Konz. 0µM. Mit TMPyP und Licht behandelte Proben (PS+ L+): rot gestrichelte Balken. **Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit TMPyP für 1 min:** LK (PS- L+): grün gestrichelter Balken, Konz. 0µM. Mit TMPyP und Licht behandelte Proben (PS+ L+): grün gestrichelte Balken. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt (n = 4).

Nach Inkubation der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit TMPyP für 30 Minuten ohne nachfolgende Bestrahlung (DK; PS+, L-) zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $103,6 \pm 12,4$ % auf $77,5 \pm 21,5$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 29** gezeigt.

In den Proben, die nach 30 Minuten Inkubation mit TMPyP bestrahlt wurden, zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $76,5 \pm 18,7$ % auf $2,3 \pm 0,6$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $88,1 \pm 18,7$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 29** gezeigt.

Wenn die Proben nach 5 Minuten Inkubation mit TMPyP bestrahlt wurden, zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle 30 Minuten Inkubation (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $68,4 \pm 28,1$ % auf $2,2 \pm 1,5$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $65,0 \pm 28,3$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 29** gezeigt.

Nach Inkubation mit TMPyP für 1 Minute und anschließender Bestrahlung zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle 30 Minuten Inkubation (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $52,3 \pm 18,4$ % auf $4,9 \pm 3,0$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $67,1 \pm 11,6$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 29** gezeigt.

TMPyP 30 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	0,5µM	1µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	88,1 ± 18,7	76,5 ± 18,7	45,6 ± 32,1	12,4 ± 16,7	2,7 ± 1,6	2,3 ± 0,6
TMPyP 5 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	0,5µM	1µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	65,0 ± 28,3	68,4 ± 28,1	61,0 ± 35,2	22,7 ± 21,5	2,4 ± 1,5	2,2 ± 1,5
TMPyP 1 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	0,5µM	1µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	67,1 ± 11,6	52,3 ± 18,4	46,8 ± 48,3	31,5 ± 16,3	7,4 ± 5,9	4,9 ± 3,0
TMPyP 30 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	0,5µM	1µM	10µM
- Bestrahlung (Dunkelkontrollen)	100 ^a	103,6 ± 12,4	100,8 ± 31,2	88,6 ± 28,9	89,2 ± 20,2	77,5 ± 21,5

Tab. 29: Zytotoxische Wirkung von TMPyP. Die Tab. zeigt die Vitalität der J774A.1-Makrophagenzelllinie in [%] (^a: die Vitalität der J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde auf die unbehandelte Kontrolle 30 min Inkubation (= Referenzkontrolle; PS- L-) normalisiert; grün ausgefülltes Kästchen: „effizient abgetötet“, d.h. Reduktion der Vitalität > 90 % bezogen auf den Referenzwert). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n = 4).

Zusammengefasst war die Vitalitätsabnahme der mit TMPyP und Licht behandelten Proben in dem untersuchten Konzentrationsbereich, von 0 µM bis 10 µM, abhängig von der Farbstoffkonzentration. Dabei wurde die J774A.1-Makrophagenzelllinie *in-vitro*, in Suspension ab der Konzentration 1 µM bereits bei der kürzesten Inkubationszeit (1 Minute), zu über 90 % abgetötet. Dementsprechend wurde die J774A.1-Makrophagenzelllinie in Suspension von 1 µM TMPyP und Licht unabhängig von der Inkubationszeit, effizient abgetötet. Der PS TMPyP hatte in dem untersuchten

Konzentrationsbereich keine dunkeltoxische Wirkung auf die J774A.1-Makrophagenzelllinie. Eine Lichttoxizität zeigte sich ebenfalls nicht. Eine Ausnahme bildeten dabei die Proben, die für 1 Minute inkubiert wurden: Hier zeigte sich eine Abnahme der Vitalität von über 20 %.

3.4.2 Zytotoxizität von SAPyR

Um die Zytotoxizität von SAPyR zu testen, wurde die J774A.1-Makrophagenzelllinie mit den Konzentrationen 0 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM SAPyR inkubiert und belichtet.

In **Abb. 22** sind die Ergebnisse des MTT-Tests dargestellt.

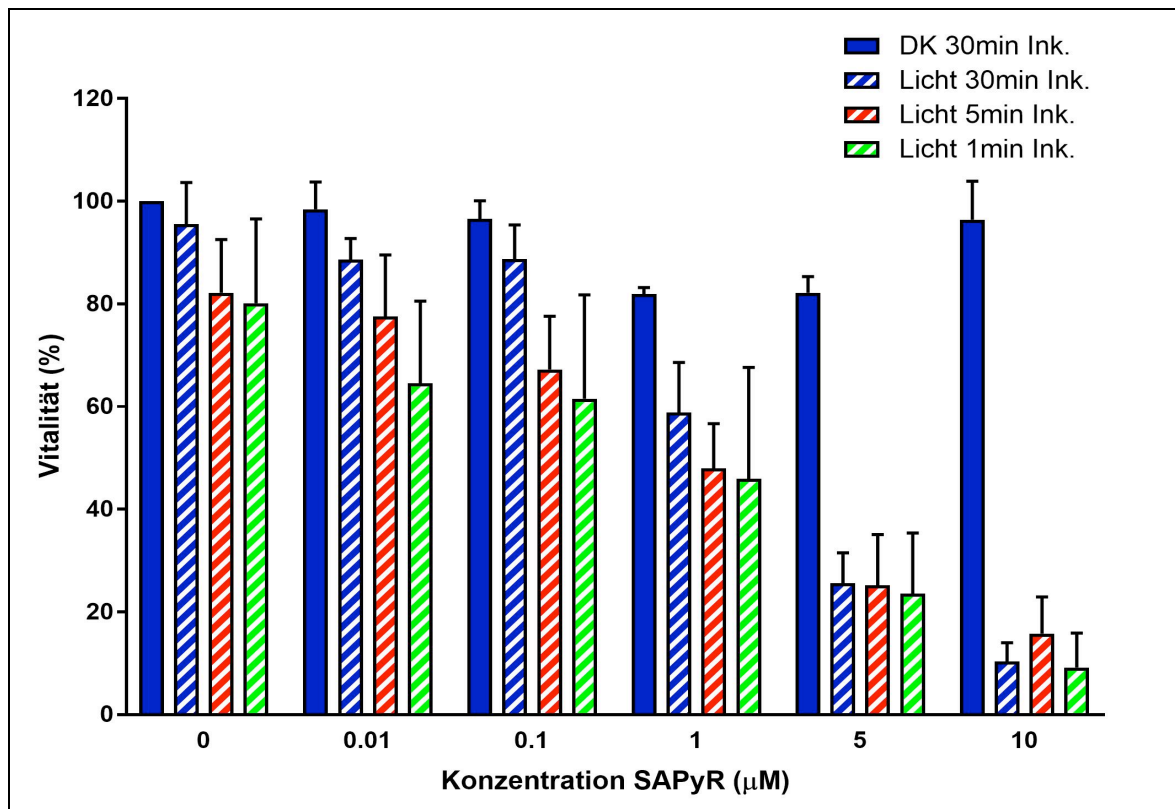


Abb. 22: Zytotoxische Wirkung von SAPyR in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten. Die J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde mit 0 - 10µM SAPyR inkubiert und mit einer Energiedosis von 12 J/cm² bestrahlt oder im Dunkeln belassen. Die Vitalitätsabnahme, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) 30 min Inkubation (Ink.) (blau ausgefüllte Balken, Konz. 0 µM), wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. **DK (PS+ L-) 30 min Ink.:** blau ausgefüllte Balken. **Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit SAPyR für 30 min:** LK (PS- L+): blau gestrichelter Balken, Konz. 0µM. Mit SAPyR und Licht behandelte Proben (PS+ L+): blau gestrichelte Balken. **Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit SAPyR für 5 min:** LK (PS- L+): rot gestrichelter Balken, Konz. 0µM. Mit SAPyR und Licht behandelte Proben (PS+ L+): rot gestrichelte Balken. **Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit SAPyR für 1 min:** LK (PS- L+): grün gestrichelter Balken, Konz. 0µM. Mit SAPyR und Licht behandelte Proben (PS+ L+): grün gestrichelte Balken. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt (n = 6 für DK 30 min Ink.; n = 5 für Licht 30 und 5 min Ink.; n = 4 für Licht 1 min Ink.).

Nach Inkubation der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit SAPyR für 30 Minuten ohne nachfolgende Bestrahlung (DK; PS+, L-) zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $98,4 \pm 13,0$ % auf $96,4 \pm 18,4$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 30** gezeigt.

In den Proben, die nach 30 Minuten Inkubation mit SAPyR bestrahlt wurden, zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $88,7 \pm 9,1$ % auf $10,3 \pm 8,2$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle

(= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $95,6 \pm 18,1$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 30** gezeigt.

Wenn die Proben nach 5 Minuten Inkubation mit SAPyR bestrahlt wurden, zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle 30 Minuten Inkubation (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $77,6 \pm 26,8$ % auf $15,8 \pm 16,0$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $82,2 \pm 20,7$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 30** gezeigt.

Nach Inkubation mit SAPyR für 1 Minute und anschließender Bestrahlung zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle 30 Minuten Inkubation (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $64,5 \pm 27,7$ % auf $9,2 \pm 11,6$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $80,2 \pm 28,4$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 30** gezeigt.

SAPyR 30 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	95,6 ± 18,1	88,7 ± 9,1	88,8 ± 14,9	58,8 ± 21,9	25,6 ± 13,2	10,3 ± 8,2
SAPyR 5 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	82,2 ± 20,7	77,6 ± 26,8	67,2 ± 23,2	47,9 ± 19,5	25,2 ± 22,0	15,8 ± 16,0
SAPyR 1 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	80,2 ± 28,4	64,5 ± 27,7	61,6 ± 35,0	46,0 ± 37,5	23,6 ± 23,6	9,2 ± 11,6
SAPyR 30 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
- Bestrahlung (Dunkelkontrollen)	100 ^a	98,4 ± 13,0	96,6 ± 8,7	81,9 ± 3,1	82,2 ± 7,7	96,4 ± 18,4

Tab. 30: Zytotoxische Wirkung von SAPyR. Die Tab. zeigt die Vitalität der J774A.1-Makrophagenzelllinie in [%] (^a: die Vitalität der J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde auf die unbehandelte Kontrolle 30 min Inkubation (Ink.) (= Referenzkontrolle; PS- L-) normalisiert; grün ausgefülltes Kästchen: „effizient abgetötet“, d.h. Reduktion der Vitalität > 90 % bezogen auf den Referenzwert). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n = 6 für DK 30 min Ink.; n = 5 für Licht 30 und 5 min Ink.; n = 4 für Licht 1 min Ink.).

Zusammengefasst war die Vitalitätsabnahme der mit SAPyR und Licht behandelten Proben in dem untersuchten Konzentrationsbereich, von 0µM bis 10 µM, abhängig von der Farbstoffkonzentration. Dabei wurde die J774A.1-Makrophagenzelllinie *in-vitro*, in Suspension ab der Konzentration 10 µM bei der kürzesten Inkubationszeit (1 Minute), zu

über 90 % abgetötet. Dementsprechend wurde die J774A.1-Makrophagenzelllinie in Suspension von 10 μM SAPyR und Licht effizient abgetötet. Der PS SAPyR hatte in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine dunkeltoxische Wirkung auf die J774A.1-Makrophagenzelllinie. Eine Lichttoxizität zeigte sich ebenfalls nicht.

3.4.3 Zytotoxizität von FLASH-07a

Um die Zytotoxizität von FLASH-07a zu testen, wurde die J774A.1-Makrophagenzelllinie mit den Konzentrationen 0 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM FLASH-07a inkubiert und belichtet.

In **Abb. 23** sind die Ergebnisse des MTT-Tests dargestellt.

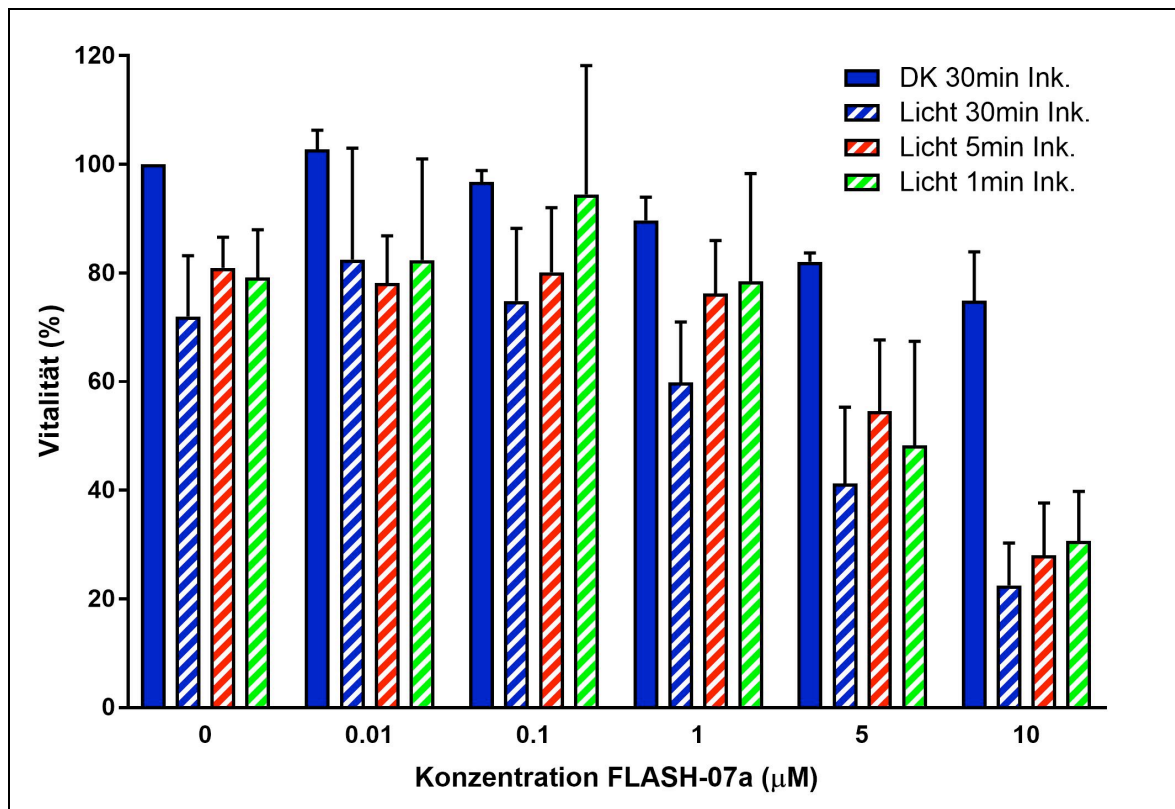


Abb. 23: Zytotoxische Wirkung von FLASH-07a in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten. Die J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde mit 0 - 10 μM FLASH-07a inkubiert und mit einer Energiedosis von 12 J/cm² bestrahlt oder im Dunkeln belassen. Die Vitalitätsabnahme, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) 30 min Inkubation (Ink.) (blau ausgefüllte Balken, Konz. 0 μM), wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. DK (PS+ L-) 30 min Ink.: blau ausgefüllte Balken. **Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit FLASH-07a für 30 min:** LK (PS- L+): blau gestrichelter Balken, Konz. 0 μM. Mit FLASH-07a und Licht behandelte Proben (PS+ L+): blau gestrichelte Balken. **Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit FLASH-07a für 5 min:** LK (PS- L+): rot gestrichelter Balken, Konz. 0 μM. Mit FLASH-07a und Licht behandelte Proben (PS+ L+): rot gestrichelte Balken. **Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit FLASH-07a für 1 min:** LK (PS- L+): grün gestrichelter Balken, Konz. 0 μM. Mit FLASH-07a und Licht behandelte Proben (PS+ L+): grün gestrichelte Balken. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt (n = 6 für DK 30 min Ink.; n = 5 für Licht 30, 5 und 1 min Ink.).

Nach Inkubation der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit FLASH-07a für 30 Minuten ohne nachfolgende Bestrahlung (DK; PS+, L-) zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $102,8 \pm 8,6$ % auf $74,9 \pm 17,9$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 31** gezeigt.

In den Proben, die nach 30 Minuten Inkubation mit FLASH-07a bestrahlt wurden, zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $82,5 \pm 41,0$ % auf $22,5 \pm 15,6$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle

(= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $72,0 \pm 22,3$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 31** gezeigt.

Wenn die Proben nach 5 Minuten Inkubation mit FLASH-07a bestrahlt wurden, zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle 30 Minuten Inkubation (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $78,2 \pm 19,3$ % auf $28,0 \pm 21,6$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $81,0 \pm 11,2$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 31** gezeigt.

Nach Inkubation mit FLASH-07a für 1 Minute und anschließender Bestrahlung zeigte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle 30 Minuten (= Referenzkontrolle; PS-, L-), eine Abnahme der Vitalität von $82,4 \pm 37,3$ % auf $30,7 \pm 20,4$ %. Die LK (PS-, L+) zeigte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (= Referenzkontrolle; PS-, L-) eine Abnahme der Vitalität auf $79,2 \pm 17,5$ %. Die dazugehörigen Werte sind zusammengefasst in **Tab. 31** gezeigt.

FLASH-07a 30 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	72,0 ± 22,3	82,5 ± 41,0	74,9 ± 26,7	59,9 ± 22,3	41,3 ± 28,1	22,5 ± 15,6
FLASH-07a 5 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	81,0 ± 11,2	78,2 ± 19,3	80,2 ± 26,5	76,2 ± 21,8	54,5 ± 29,5	28,0 ± 21,6
FLASH-07a 1 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)	79,2 ± 17,5	82,4 ± 37,3	94,5 ± 47,5	78,4 ± 39,8	48,3 ± 38,3	30,7 ± 20,4
FLASH-07a 30 min Inkubation	0µM	0,01µM	0,1µM	1µM	5µM	10µM
- Bestrahlung (Dunkelkontrollen)	100 ^a	102,8 ± 8,6	96,8 ± 4,7	89,7 ± 8,5	82,1 ± 3,2	74,9 ± 17,9

Tab. 31: Zytotoxische Wirkung von FLASH-07a. Die Tab. zeigt die Vitalität der J774A.1-Makrophagenzelllinie in [%] (^a: die Vitalität der J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde auf die unbehandelte Kontrolle 30 min Inkubation (Ink.) (= Referenzkontrolle; PS- L-) normalisiert). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n = 6 für DK 30 min Ink.; n = 5 für Licht 30, 5 und 1 min Ink.).

Zusammengefasst war die Vitalitätsabnahme der mit FLASH-07a und Licht behandelten Proben in dem untersuchten Konzentrationsbereich, von 0 µM bis 10 µM, abhängig von der Farbstoffkonzentration. Dabei zeigte sich bei der höchsten Konzentration (10 µM) auch bei der längsten Inkubationszeit (30 Minuten) eine Abtötungsrate der J774A.1-Makrophagenzelllinie *in-vitro*, in Suspension von unter 80 %. Dementsprechend wurde die

J774A.1-Makrophagenzelllinie in Suspension von 10 μM FLASH-07a und Licht unabhängig von der Inkubationszeit, noch nicht effizient abgetötet. Ab der Konzentration 5 μM hatte der PS FLASH-07a eine dunkeltoxische Wirkung auf die J774A.1-Makrophagenzelllinie. Eine Lichttoxizität zeigte sich nicht.

3.4.4 Vergleich der Zytotoxizität von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a bei der photodynamischen Inaktivierung der J774A.1-Makrophagenzelllinie

Die Zytotoxizität der PS bei der PDI der J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde wie der Vergleich der Effektivität der PS bei der PDI von *L. major* Promastigoten (siehe 3.2.4), bei einer bestimmten Anzahl an absorbierten Photonen miteinander verglichen. Da die Bestrahlungsparameter und die experimentellen Bedingungen die gleichen waren wie bei der PDI von *L. major* Promastigoten, waren auch hier die in Kooperation mit Dr. Johannes Regensburger (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg), unter Verwendung der Formel von Cieplik et al. (Cieplik et al., 2015) berechneten Konzentrationen, bei welcher ausgehend von der Konzentration 10 μM FLASH-07a, die anderen beiden PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbieren, folgende:

Farbstoffkonzentration	0,7175 μM TMPyP	15 μM SAPyR	10 μM FLASH-07a
Absorbierte Photonen	$1,5813 \times 10^{21}$	$1,5808 \times 10^{21}$	$1,5814 \times 10^{21}$

Tab. 32: Anzahl an absorbierten Photonen durch die verwendeten Photosensibilisatoren. Die Tab. zeigt die Konzentrationen von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a, bei denen die Farbstoffe basierend auf der Formel von Cieplik et al., die gleiche Anzahl an Photonen absorbieren. Die Bestrahlung erfolgte mit der Lampe Waldmann BlueV mit einer Intensität von 20,0 mW/cm^2 für 600 Sekunden, entsprechend einer applizierten Energiedosis von 12 J/cm^2 .

Abb. 24 gibt einen Überblick über die Zytotoxizität von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a bei der PDI der J774A.1-Makrophagenzelllinie, indem die zytotoxische Wirkung der drei Farbstoffe in einer Graphik zusammengefasst ist.

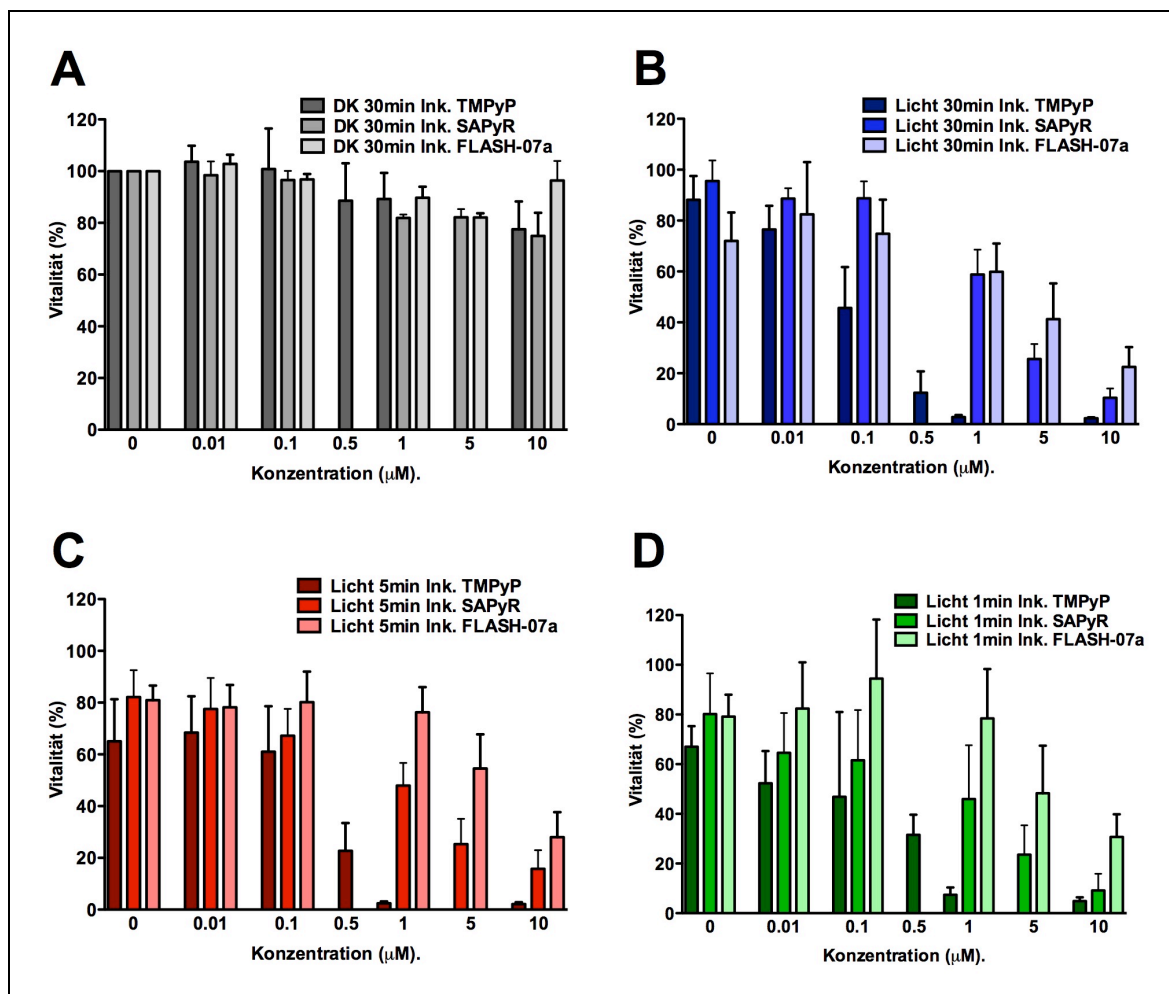


Abb. 24: Zytotoxische Wirkung von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a auf die J774A.1-Makrophagenzelllinie in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten. (A) Dargestellt ist die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) 30 min Inkubation (Ink.) (graue Balken, Konz. 0µM) sowie die DK (PS+ L-) 30 min Ink. (graue Balken) für alle drei PS. (B-D) Die J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde mit 0 - 10 µM PS inkubiert und mit einer Energiedosis von 12 J/cm² bestrahlt. Die Vitalitätsabnahme bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) 30 min Ink., wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. (B) Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit den PS für 30 min. TMPyP: dunkelblauer Balken; SAPyR: mittelblauer Balken; FLASH-07a: hellblauer Balken. (C) Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit den PS für 5 min. TMPyP: dunkelroter Balken; SAPyR: mittelroter Balken; FLASH-07a: hellroter Balken. (D) Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie mit den PS für 1 min. TMPyP: dunkelgrüner Balken; SAPyR: mittelgrüner Balken; FLASH-07a: hellgrüner Balken. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt (TMPyP: n = 4; SAPyR: n = 6 für DK 30 min Ink.; n = 5 für Licht 30 und 5 min Ink.; n = 4 für Licht 1 min Ink.; FLASH-07a: n = 6 für DK 30 min Ink.; n = 5 für Licht 30, 5 und 1 min Ink.).

Um nun die Effektivität der PS miteinander vergleichen zu können, wurden die Farbstoffe, wie auf Seite 92 beschrieben, bei gleicher Anzahl an absorbierten Photonen miteinander verglichen.

Bei 30 Minuten Inkubation führte die PDI mit 10 µM FLASH-07a ($1,5814 \times 10^{21}$ absorbierte Photonen) zu einer Abtötungsrate der J774A.1-Makrophagenzelllinie von unter 80 %. Die PDI mit 1 µM TMPyP, was einer etwas höheren Konzentration entspricht als

die berechnete Konzentration, bei welcher der PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert wie 10 μM FLASH-07a, führte dagegen zu einer über 90%igen Abtötung der J774A.1-Makrophagenzelllinie. Die PDI mit 10 μM SAPyR führte ebenfalls zu einer 90%igen Abtötung der J774A.1-Makrophagenzelllinie, obwohl die Konzentration, bei welcher der PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert wie 10 μM FLASH-07a um den Faktor 1,5 höher berechnet wurde. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 33** gezeigt.

Bei 5 Minuten Inkubation führte die PDI mit 10 μM FLASH-07a ($1,5814 \times 10^{21}$ absorbierte Photonen) zu einer Abtötungsrate der J774A.1-Makrophagenzelllinie von knapp über 70 %. Die PDI mit 1 μM TMPyP, was einer etwas höheren Konzentration entspricht als die berechnete Konzentration, bei welcher der PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert wie 10 μM FLASH-07a, führte dagegen zu einer über 90%igen Abtötung der J774A.1-Makrophagenzelllinie. Die PDI mit 10 μM SAPyR führte bereits zu einer Abtötungsrate von 85 %, obwohl die Konzentration, bei welcher der PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert wie 10 μM FLASH-07a um den Faktor 1,5 höher berechnet wurde. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 33** gezeigt.

Bei 1 Minute Inkubation führte die PDI mit 10 μM FLASH-07a ($1,5814 \times 10^{21}$ absorbierte Photonen) zu einer Abtötungsrate der J774A.1-Makrophagenzelllinie von unter 70 %. Die PDI mit 1 μM TMPyP, was einer etwas höheren Konzentration entspricht als die berechnete Konzentration, bei welcher der PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert wie 10 μM FLASH-07a, führte dagegen zu einer über 90%igen Abtötung der J774A.1-Makrophagenzelllinie. Die PDI mit 10 μM SAPyR führte ebenfalls zu einer über 90%igen Abtötung der J774A.1-Makrophagenzelllinie, obwohl die Konzentration, bei welcher der PS die gleiche Anzahl an Photonen absorbiert wie 10 μM FLASH-07a um den Faktor 1,5 höher berechnet wurde. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 33** gezeigt.

	FLASH-07a	TMPyP	SAPyR
Farbstoffkonzentration	10 μM	0,7175 μM	15 μM
Absorbierte Photonen	$1,5814 \times 10^{21}$	$1,5813 \times 10^{21}$	$1,5808 \times 10^{21}$
Für den Vergleich verwendete Farbstoffkonzentration	10 μM	1 μM	10 μM
30 min Inkubation	22,5 \pm 15,6	2,7 \pm 1,6	10,3 \pm 8,2
5 min Inkubation	28,0 \pm 21,6	2,4 \pm 1,5	15,8 \pm 16,0
1 min Inkubation	30,7 \pm 20,4	7,4 \pm 5,9	9,2 \pm 11,6

Tab. 33: Vergleich der zytotoxischen Wirkung von FLASH-07a, TMPyP und SAPyR auf die J774A.1-Makrophagenzelllinie. Die Tab. zeigt die berechneten Konzentrationen von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a, bei denen die Farbstoffe die gleiche Anzahl an Photonen absorbieren (siehe Tab. 32) und die Vitalität der J774A.1-Makrophagenzelllinie in [%] bei der Konzentration 10 μM FLASH-07a, 1 μM TMPyP und 10 μM SAPyR (Ausschnitt aus den Tab. 31, 29 und 30); (grün ausgefüllte Kästchen: „effizient abgetötet“, d.h. Reduktion der Vitalität $> 90\%$ bezogen auf den Referenzwert). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (TMPyP: n = 4; SAPyR: n = 6 für DK 30 min Ink. (Inkubation); n = 5 für Licht 30 und 5 min Ink.; n = 4 für Licht 1 min Ink.; FLASH-07a: n = 6 für DK 30 min Ink.; n = 5 für Licht 30, 5 und 1 min Ink.).

Zusammengefasst zeigte die PDI mit 10 μM FLASH-07a ($1,5814 \times 10^{21}$ absorbierte Photonen) unabhängig von der Inkubationszeit, keine effiziente Abtötung der J774A.1-Makrophagenzelllinie *in-vitro*, in Suspension.

Bei der PDI mit 1 μM TMPyP, entsprechend einer etwas höheren Konzentration als die beim Angleichen der Anzahl an absorbierten Photonen berechnete, zeigte sich dagegen unabhängig von der Inkubationszeit eine effiziente Abtötung der J774A.1-Makrophagenzelllinie *in-vitro*, in Suspension. Bei der PDI mit 10 μM SAPyR, entsprechend einer um den Faktor 1,5 niedrigeren Konzentration als die beim Angleichen der Anzahl an absorbierten Photonen berechnete, zeigte sich bereits bei der kürzesten Inkubationszeit eine effiziente Abtötung der J774A.1-Makrophagenzelllinie *in-vitro*, in Suspension.

Dementsprechend nahm die Zytotoxizität bei der photodynamischen Inaktivierung der J774A.1-Makrophagenzelllinie in Suspension, in folgender Reihenfolge zu: FLASH-07a $<$ TMPyP $<$ SAPyR. Dies war auch unabhängig von den Inkubationszeiten.

3.5 Vergleich der anti-promastigoten Wirkung von TMPyP, SAPyR und FLASH-07a mit der Zytotoxizität der Photosensibilisatoren auf die J774A.1-Makrophagenzelllinie

Um die anti-promastigote Wirkung, die durch den photodynamischen Prozess erzeugt wird, mit der zytotoxischen Wirkung vergleichen zu können, wurde die Vitalitätsabnahme der *L. major* Promastigoten mit der Vitalitätsabnahme der J774A.1-Makrophagenzelllinie bei einer Farbstoffkonzentration des jeweiligen PS verglichen.

Abb. 25 gibt einen Überblick über die anti-promastigote und zytotoxische Wirkung des PS TMPyP, indem die Wirkung auf *L. major* Promastigote und die Wirkung auf die J774A.1-Makrophagenzelllinie vergleichend dargestellt ist.

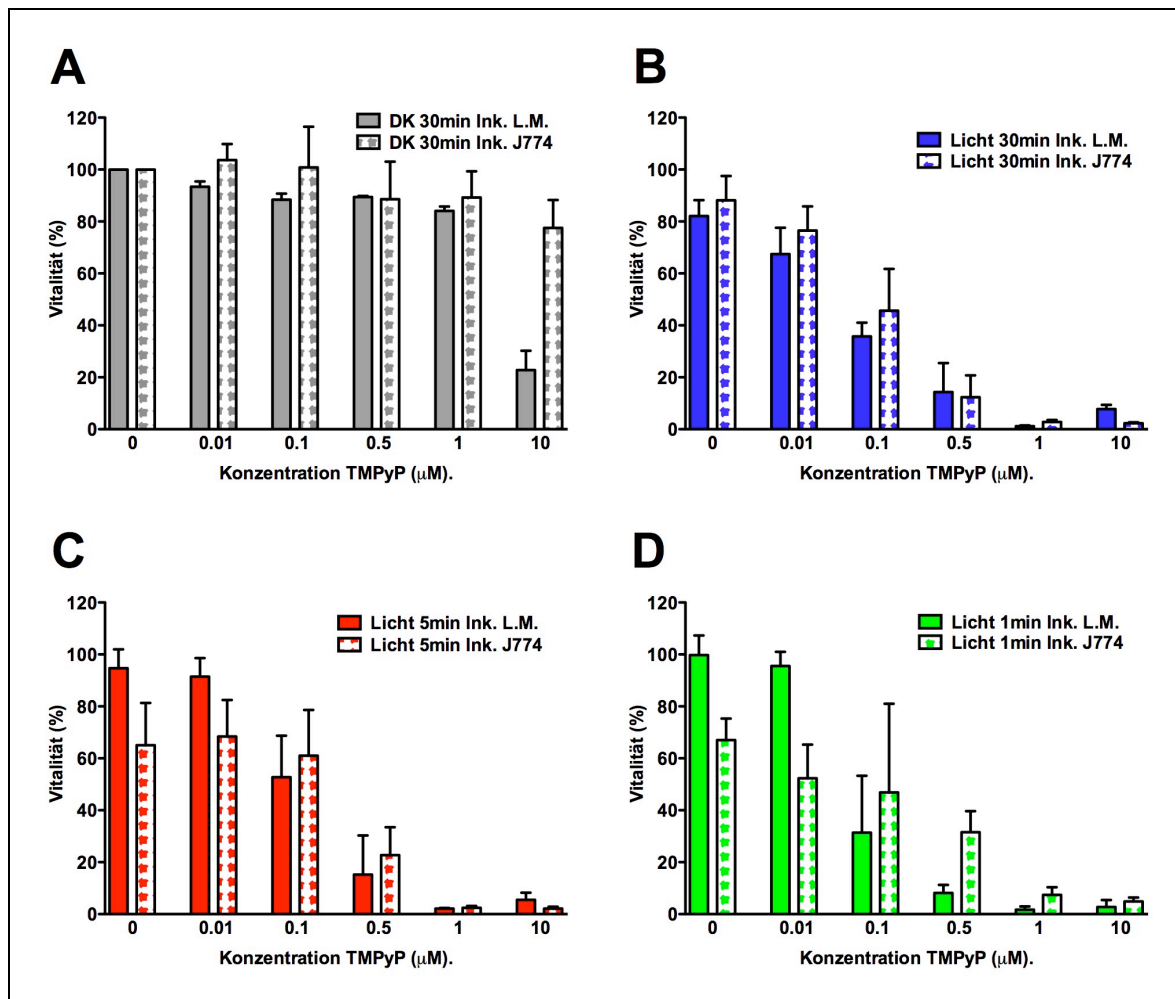


Abb. 25: Anti-promastigote Wirkung und zytotoxische Wirkung von TMPyP in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten. (A) Dargestellt ist die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) 30 min Inkubation (Ink.) (graue Balken, Konz. 0 μM) sowie die DK (PS+ L-) 30 min Ink. (graue Balken) von *L. major* (*L. M.*) (grau ausgefüllte Balken) und der J774A.1-Makrophagenzelllinie (grau gestrichelte Balken). (B-D) Die *L. M.* Promastigoten und die J774A.1-Makrophagenzelllinie wurden mit 0 - 10 μM PS inkubiert und mit einer Energiedosis von 12 J/cm² bestrahlt. Die Vitalitätsabnahme bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) (hier nur 30 min Ink. dargestellt), wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. (B) Ink. mit TMPyP für 30 min. Ink. von *L. M.*: blau ausgefüllte Balken; Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie: blau gestrichelte Balken. (C) Ink. mit TMPyP für 5 min. Ink. von *L. M.*: rot ausgefüllte Balken; Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie: rot gestrichelte Balken. (D) Ink. mit TMPyP für 1 min. Ink. von *L. M.*: grün ausgefüllte Balken; Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie: grün gestrichelte Balken. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt (*L. M.*: n = 4; J774A.1-Makrophagenzelllinie: n = 4).

Um nun die anti-promastigote Wirkung mit der zytotoxischen Wirkung vergleichen zu können, wurden die Farbstoffe, wie auf Seite 96 beschrieben, bei einer Farbstoffkonzentration des jeweiligen PS miteinander verglichen. Bei dem PS TMPyP wurde dabei exemplarisch die Konzentration 1 μM für den Vergleich verwendet.

Bei 30 Minuten Inkubation führte die PDI mit 1 μM TMPyP zu einer über 90%igen Abtötung der *L. major* Promastigoten sowie der J774A.1-Makrophagenzelllinie. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 34** gezeigt.

Bei 5 Minuten Inkubation führte die PDI mit 1 μM TMPyP ebenfalls zu einer Abtötungsrate der *L. major* Promastigoten sowie der J774A.1-Makrophagenzelllinie von über 90 %. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 34** gezeigt.

Auch bei 1 Minute Inkubation wurden Beide durch die PDI mit 1 μM TMPyP zu über 90 % abgetötet. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 34** gezeigt.

	TMPyP	
	<i>L. major</i>	J774A.1-Makrophagenzelllinie
Für den Vergleich verwendete Konzentration	1 μM	1 μM
30 min Inkubation	1,2 \pm 0,5	2,7 \pm 1,6
5 min Inkubation	2,1 \pm 0,5	2,4 \pm 1,5
1 min Inkubation	1,7 \pm 2,4	7,4 \pm 5,9

Tab. 34: Vergleich der anti-promastigoten Wirkung mit der zytotoxischen Wirkung von TMPyP. Die Tab. zeigt die Vitalität von *L. major* und der J774A.1-Makrophagenzelllinie in [%] bei der Konzentration 1 μM TMPyP (Ausschnitt aus den Tab. 23 (*L. major*) und 29 (J774A.1-Makrophagenzelllinie)); (grün ausgefüllte Kästchen: „effizient abgetötet“, d.h. Reduktion der Vitalität > 90 % bezogen auf den Referenzwert). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (*L. major*: n = 4; J774A.1-Makrophagenzelllinie: n = 4).

Zusammengefasst wurden die *L. major* Promastigoten sowie die J774A.1-Makrophagenzelllinie *in-vitro*, in Suspension durch die PDI mit 1 μM TMPyP unabhängig von der Inkubationszeit effizient abgetötet.

Abb. 26 gibt einen Überblick über die anti-promastigote und zytotoxische Wirkung des PS SAPyR, indem die Wirkung auf *L. major* Promastigote und die Wirkung auf die J774A.1-Makrophagenzelllinie vergleichend dargestellt ist.

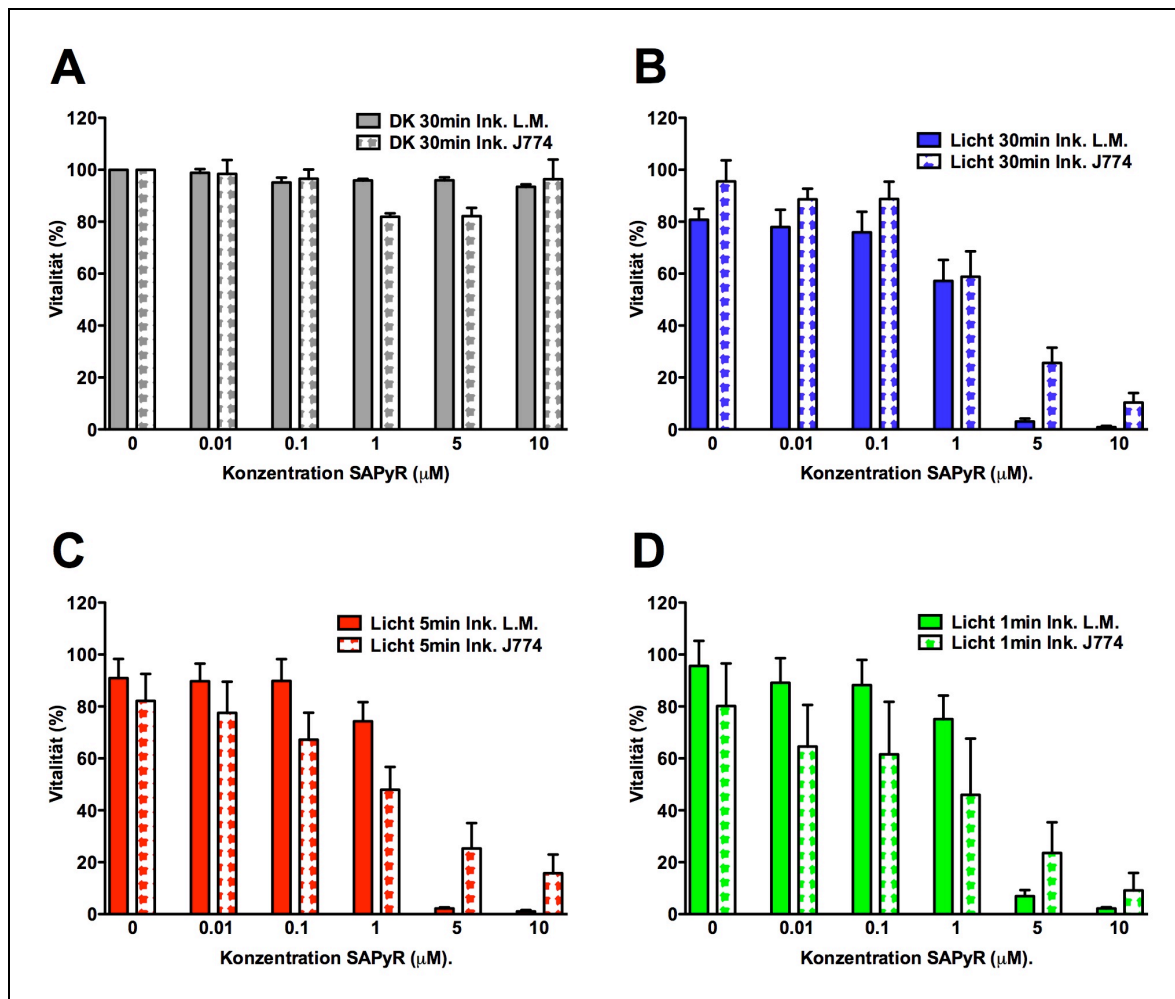


Abb. 26: Anti-promastigote Wirkung und zytotoxische Wirkung von SAPyR in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten. (A) Dargestellt ist die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) 30 min Inkubation (Ink.) (graue Balken, Konz. 0 μM) sowie die DK (PS+ L-) 30 min Ink. (graue Balken) von *L. major* (*L. M.*) (grau ausgefüllte Balken) und der J774A.1-Makrophagenzelllinie (grau gestrichelte Balken). (B-D) Die *L. M.* Promastigoten und die J774A.1-Makrophagenzelllinie wurden mit 0-10 μM PS inkubiert und mit einer Energiedosis von 12 J/cm^2 bestrahlt. Die Vitalitätsabnahme bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) (hier nur 30 min Ink. dargestellt), wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. (B) Ink. mit SAPyR für 30 min. Ink. von *L. M.*: blau ausgefüllte Balken; Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie: blau gestrichelte Balken. (C) Ink. mit SAPyR für 5 min. Ink. von *L. M.*: rot ausgefüllte Balken; Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie: rot gestrichelte Balken. (D) Ink. mit SAPyR für 1 min. Ink. von *L. M.*: grün ausgefüllte Balken; Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie: grün gestrichelte Balken. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt (*L. M.*: $n = 4$; J774A.1-Makrophagenzelllinie: $n = 6$ für DK 30 min Ink.; $n = 5$ für Licht 30 und 5 min Ink.; $n = 4$ für Licht 1 min Ink.).

Um nun die anti-promastigote Wirkung mit der zytotoxischen Wirkung vergleichen zu können, wurden die Farbstoffe, wie auf Seite 96 beschrieben, bei einer Farbstoffkonzentration des jeweiligen PS miteinander verglichen. Bei dem PS SAPyR wurde dabei exemplarisch die Konzentration 5 μM für den Vergleich verwendet.

Bei 30 Minuten Inkubation führte die PDI mit 5 μM SAPyR zu einer über 90%igen Abtötung der *L. major* Promastigoten. Von der J774A.1-Makrophagenzelllinie überlebten dagegen über 20 %. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 35** gezeigt.

Bei 5 Minuten Inkubation führte die PDI mit 5 μM SAPyR ebenfalls zu einer Abtötungsrate der *L. major* Promastigoten von über 90 %. Von der J774A.1-Makrophagenzelllinie überlebten wiederum über 20 %. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 35** gezeigt.

Auch bei 1 Minute Inkubation wurden die *L. major* Promastigoten durch die PDI mit 5 μM SAPyR zu über 90 % abgetötet. Von der J774A.1-Makrophagenzelllinie überlebten dagegen über 20 %. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 35** gezeigt.

	SAPyR	
	<i>L. major</i>	J774A.1-Makrophagenzelllinie
Für den Vergleich verwendete Konzentration	5 μM	5 μM
30 min Inkubation	3,0 \pm 1,6	25,6 \pm 13,2
5 min Inkubation	2,3 \pm 0,7	25,2 \pm 22,0
1 min Inkubation	6,9 \pm 4,7	23,6 \pm 23,6

Tab. 35: Vergleich der anti-promastigoten Wirkung mit der zytotoxischen Wirkung von SAPyR. Die Tab. zeigt die Vitalität von *L. major* und der J774A.1-Makrophagenzelllinie in [%] bei der Konzentration 5 μM SAPyR (Ausschnitt aus den Tab. 24 (*L. major*) und 30 (J774A.1-Makrophagenzelllinie)); (grün ausgefüllte Kästchen: „effizient abgetötet“, d.h. Reduktion der Vitalität > 90 % bezogen auf den Referenzwert). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (*L. major*: n = 4; J774A.1-Makrophagenzelllinie: n = 6 für DK 30 min (Inkubation) Ink.; n = 5 für Licht 30 und 5 min Ink.; n = 4 für Licht 1 min Ink.).

Zusammengefasst wurden die *L. major* Promastigoten *in-vitro*, in Suspension durch die PDI mit 5 μM SAPyR unabhängig von der Inkubationszeit effizient abgetötet. Die J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde *in-vitro*, in Suspension dagegen durch die PDI mit 5 μM SAPyR unabhängig von der Inkubationszeit noch nicht effizient abgetötet. Eine effiziente Abtötung der J774A.1-Makrophagenzelllinie war erst ab der Konzentration 10 μM SAPyR zu beobachten (siehe 3.4.2).

Abb. 27 gibt einen Überblick über die anti-promastigote und zytotoxische Wirkung des PS FLASH-07a, indem die Wirkung auf *L. major* Promastigote und die Wirkung auf die J774A.1-Makrophagenzelllinie vergleichend dargestellt ist.

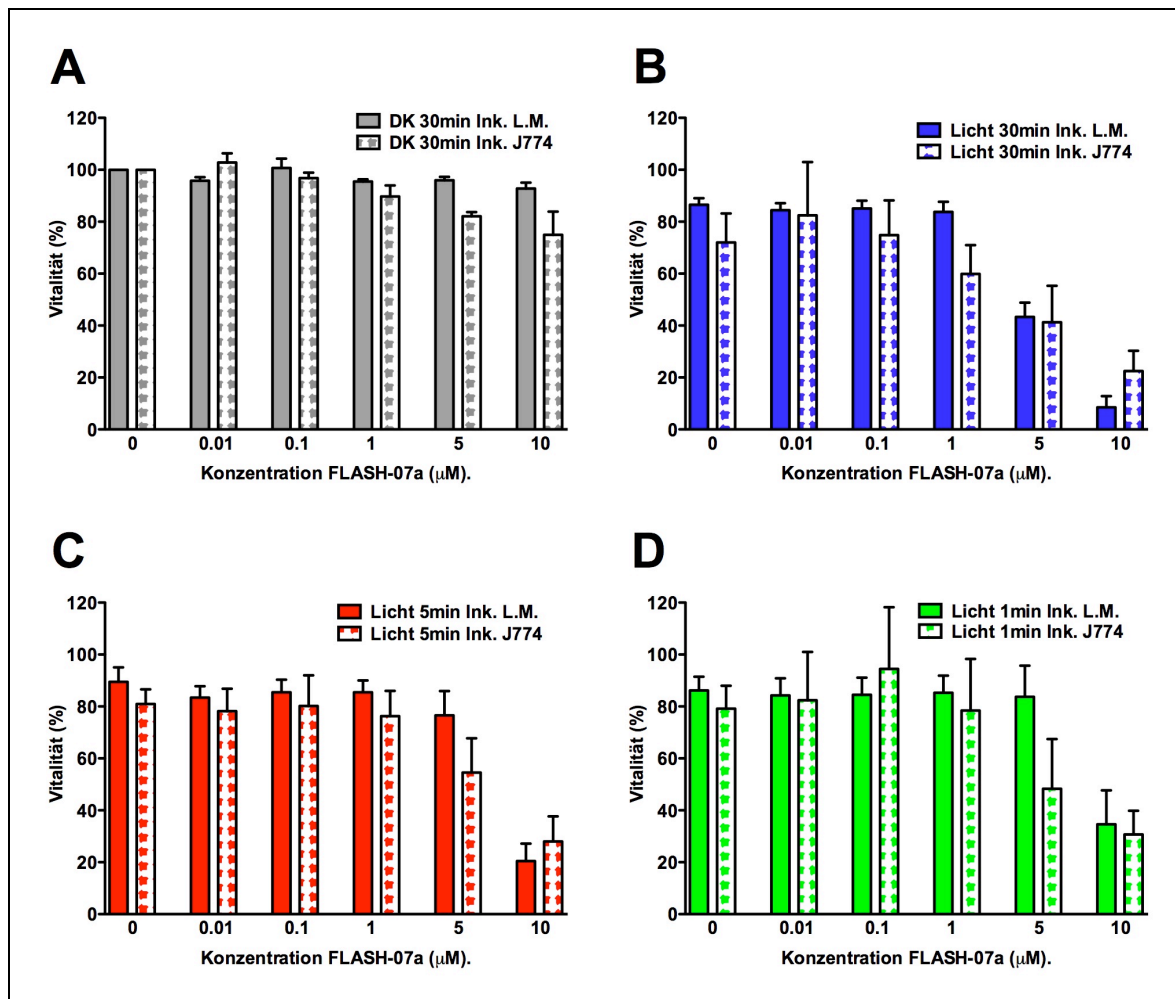


Abb. 27: Anti-promastigote Wirkung und zytotoxische Wirkung von FLASH-07a in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten. (A) Dargestellt ist die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) 30 min Inkubation (Ink.) (graue Balken, Konz. 0 µM) sowie die DK (PS+ L-) 30 min Ink. (graue Balken) von *L. major* (*L. M.*) (grau ausgefüllte Balken) und der J774A.1-Makrophagenzelllinie (grau gestrichelte Balken). (B-D) Die *L. M.* Promastigoten und die J774A.1-Makrophagenzelllinie wurden mit 0-10 µM PS inkubiert und mit einer Energiedosis von 12 J/cm² bestrahlt. Die Vitalitätsabnahme bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (PS- L-) 30 min Ink., wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. (B) Ink. mit FLASH-07a für 30 min. Ink. von *L. M.*: blau ausgefüllte Balken; Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie: blau gestrichelte Balken. (C) Ink. mit FLASH-07a für 5 min. Ink. von *L. M.*: rot ausgefüllte Balken; Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie: rot gestrichelte Balken. (D) Ink. mit FLASH-07a für 1 min. Ink. von *L. M.*: grün ausgefüllte Balken; Ink. der J774A.1-Makrophagenzelllinie: grün gestrichelte Balken. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt (*L. M.*: n = 4; J774A.1-Makrophagenzelllinie: n = 6 für DK 30 min Ink.; n = 5 für Licht 30, 5 und 1 min Ink.).

Um nun die anti-promastigote Wirkung mit der zytotoxischen Wirkung vergleichen zu können, wurden die Farbstoffe, wie auf Seite 96 beschrieben, bei einer Farbstoffkonzentration des jeweiligen PS miteinander verglichen. Bei dem PS FLASH-07a wurde dabei exemplarisch die Konzentration 10 µM für den Vergleich verwendet.

Bei 30 Minuten Inkubation führte die PDI mit 10 µM FLASH-07a zu einer über 90%igen Abtötung der *L. major* Promastigoten. Von der J774A.1-Makrophagenzelllinie überlebten dagegen über 20 %. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 36** gezeigt.

Bei 5 Minuten Inkubation erzielte die PDI mit 10 µM FLASH eine Abtötungsrate der *L. major* Promastigoten von 80 %. Von der J774A.1-Makrophagenzelllinie überlebten knapp 30 %. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 36** gezeigt.

Bei 1 Minute Inkubation wurden beide durch die PDI mit 10 µM FLASH-07a zu weniger als 70 % abgetötet. Die dazugehörigen Werte sind in **Tab. 36** gezeigt.

	FLASH-07a	
	<i>L. major</i>	J774A.1-Makrophagenzelllinie
Für den Vergleich verwendete Konzentration	10 µM	10 µM
30 min Inkubation	8,5 ± 8,7	22,5 ± 15,6
5 min Inkubation	20,4 ± 13,5	28,0 ± 21,6
1 min Inkubation	34,6 ± 26,2	30,7 ± 20,4

Tab. 36: Vergleich der anti-promastigoten Wirkung mit der zytotoxischen Wirkung von FLASH-07a. Die Tab. zeigt die Vitalität von *L. major* und der J774A.1-Makrophagenzelllinie in [%] bei der Konzentration 10 µM FLASH-07a (Ausschnitt aus den Tab. 25 (*L. major*) und 31 (J774A.1-Makrophagenzelllinie)); (grün ausgefüllte Kästchen: „effizient abgetötet“, d.h. Reduktion der Vitalität > 90 % bezogen auf den Referenzwert). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (*L. major*: n = 4; J774A.1-Makrophagenzelllinie: n = 6 für DK 30 min Inkubation (Ink.); n = 5 für Licht 30, 5 min und 1 min Ink.).

Zusammengefasst wurden die *L. major* Promastigoten *in-vitro*, in Suspension durch die PDI mit 10 µM FLASH-07a in Abhängigkeit von der Inkubationszeit effizient abgetötet. Die J774A.1-Makrophagenzelllinie wurde *in-vitro*, in Suspension dagegen durch die PDI mit 10 µM FLASH-07a unabhängig von der Inkubationszeit noch nicht effizient abgetötet.

In Zusammenschau der Ergebnisse bei allen drei PS, war die Spanne zwischen Zunahme der anti-promastigoten Wirkung und Zunahme der Zytotoxizität, entsprechend der Differenz zwischen der Vitalitätsabnahme der *L. major* Promastigoten und der J774A.1-Makrophagenzelllinie, bei folgendem PS am größten: SAPyR > FLASH-07a > TMPyP.

3.6 Photodynamische Inaktivierung von mit *L. major* infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen: anti-amastigote Wirkung und Zytotoxizität von SAPyR

In den bisherigen Ergebnissen konnten für den PS SAPyR Bedingungen definiert werden (PDI mit 5 μ M SAPyR), bei denen die *L. major* Promastigoten effizient abgetötet wurden, von der J774A.1-Makrophagenzelllinie aber noch über 20 % vital waren. Dies konnte bisher unter den untersuchten Bedingungen für TMPyP und FLASH-07a nicht definiert werden: Die *L. major* Promastigoten und die J774A.1-Makrophagenzelllinie wurden durch die PDI mit 1 μ M TMPyP beide zu über 90 % abgetötet. Bei der PDI mit 10 μ M FLASH-07a wurden die *L. major* Promastigoten nur bei 30 Minuten Inkubation effizient abgetötet, ansonsten wurden die *L. major* Promastigoten sowie die J774A.1-Makrophagenzelllinie nicht effizient abgetötet.

Um die Bedingungen im menschlichen Organismus, wo die Leishmanien nicht als Promastigote, sondern in intrazellulär, amastigoter Form vorliegen, *in-vitro* besser nachzustellen, wurde im dritten Teil der Arbeit die anti-amastigoten Aktivität der PDI mit 5 μ M SAPyR auf *L. major* getestet. Zudem wurde der Effekt der PDI auf *L. major* Amastigote mit der toxischen Wirkung der PDI auf infizierte Peritoneal-Exsudat-Makrophagen, die aus C57BL/6 Mäusen isoliert wurden, verglichen.

Dafür wurden die mit *L. major* infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen für 1 Minute mit 5 μ M SAPyR inkubiert. Dann wurden die Suspensionen mit der Lampe Waldmann BlueV mit einer Intensität von 20,0 mW/cm² für 600 Sekunden, entsprechend einer applizierten Energiedosis von 12 J/cm² bestrahlt.

Anschließend wurde aus den Peritoneal-Exsudat-Makrophagen genomische DNA isoliert (siehe 2.2.12) und eine qRT-PCR durchgeführt (siehe 2.2.13). Dabei wurde die Parasitenlast durch Ermittlung der Menge an 18S-rRNA bestimmt. Die Anzahl an Peritoneal-Exsudat-Makrophagen wurde durch Bestimmung des β -Aktin Gehalts ermittelt.

In **Abb. 28** sind die Ergebnisse der qRT-PCR dargestellt.

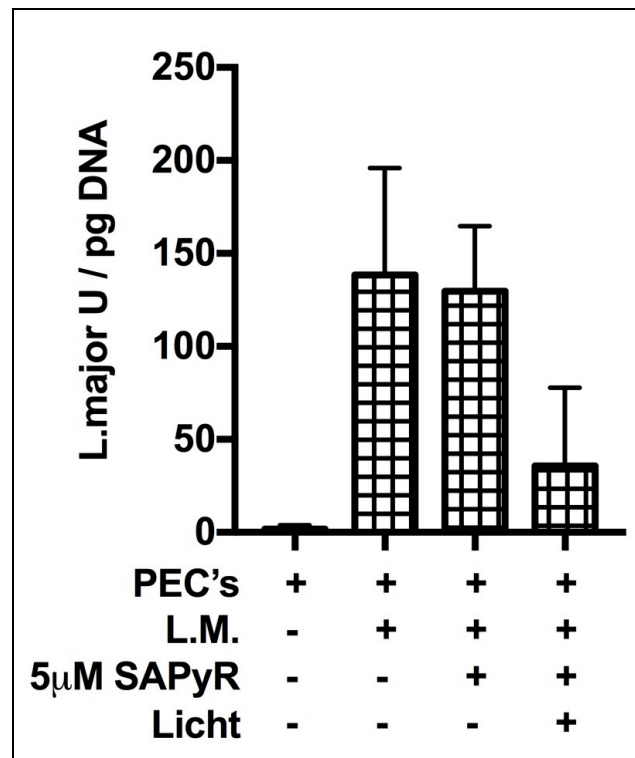


Abb. 28: Bestimmung der Parasitenlast in Peritoneal-Exsudat-Makrophagen. Mit *L. major* (*L. M.*) infizierte Peritoneal-Exsudat-Makrophagen (PEC's; engl. *peritoneal exudat cells*) wurden mit 5 µM SAPyR für 1 min inkubiert und anschließend mit einer Energiedosis von 12 J/cm² bestrahlt oder im Dunkeln belassen. Nach Isolation der genomischen DNA wurde die Anzahl der Leishmanien durch die Menge an 18S-rRNA und die Anzahl an Peritoneal-Exsudat-Makrophagen durch Bestimmung des β-Aktin Gehalts ermittelt. Abgebildet ist die Anzahl von Leishmanien pro DNA in [U/pg]. Unbehandelte Kontrolle PEC's (PS- L-): erster Balken. Unbehandelte Kontrolle PEC's + *L. M.* (PS- L+): zweiter Balken. DK PEC's + *L. M.* (PS+ L-): dritter Balken. Mit Farbstoff und Licht behandelte Proben PEC's + *L. M.* (PS+ L+): vierter Balken. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n = 2).

Die Anzahl von Leishmanien pro infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen nahm nach Inkubation mit 5 µM SAPyR für 1 Minute und anschließender Bestrahlung ab. Sie fiel von $138,3 \pm 57,5$ U/pg DNA (unbehandelte Kontrolle Peritoneal-Exsudat-Makrophagen + *L. major*; PS-, L-) (**Tab. 37, Nr.2**) auf $35,7 \pm 42,2$ U/pg DNA ab (**Tab. 37, Nr. 4**).

Bei alleiniger Behandlung mit dem PS (DK Peritoneal-Exsudat-Makrophagen + *L. major*; PS+, L -) wurde eine Parasitenlast von $129,7 \pm 34,9$ U/pg DNA (**Tab. 37, Nr. 3**) gemessen. In den Proben mit nicht infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen (unbehandelte Kontrolle Peritoneal-Exsudat-Makrophagen; PS-, L-), war die 18S-rRNA wie erwartet kaum nachweisbar: $1,8 \pm 2,1$ U/pg DNA (**Tab. 37, Nr. 1**).

Der Effekt von Inkubation für 1 Minute mit 5 µM SAPyR und anschließender Bestrahlung auf die Peritoneal-Exsudat-Zellen ist nicht dargestellt, da ein Wirtszellphotodynamik-Experiment fehlt. Allerdings konnte aus der Änderung des Verhältnisses von *L. major* pro pg DNA von $138,3 \pm 57,5$ U/pg DNA (unbehandelte Kontrolle Peritoneal-Exsudat-

Makrophagen + *L. major*; PS-, L-) (Tab. 37, Nr. 2) auf $35,7 \pm 42,2$ U/pg DNA (mit Farbstoff und Licht behandelte Proben Peritoneal-Exsudat-Makrophagen + *L. major*; PS+, L+) (Tab. 37, Nr. 4) geschlossen werden, dass die PDI mit SAPyR auf die infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen weniger toxisch wirkt als auf die intrazellulären Leishmanien.

			<i>L. major</i> U/pg DNA
- Bestrahlung			
1.	Peritoneal-Exsudat-Makrophagen	0 μ M SAPyR	$1,8 \pm 2,1$
2.	Peritoneal-Exsudat-Makrophagen + <i>L. major</i>	0 μ M SAPyR	$138,3 \pm 57,5$
3.	Peritoneal-Exsudat-Makrophagen + <i>L. major</i>	5 μ M SAPyR	$129,7 \pm 34,9$
+ Bestrahlung (12 J/cm ²)			
4.	Peritoneal-Exsudat-Makrophagen + <i>L. major</i>	5 μ M SAPyR	$35,7 \pm 42,2$

Tab. 37: Bestimmung der Parasitenlast in Peritoneal-Exsudat-Makrophagen. Die Tab. zeigt die Anzahl von Leishmanien pro Maus DNA in [U/pg]. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n = 2).

Zusammengefasst nahm die Anzahl der Leishmanien pro infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen nach Inkubation mit 5 μ M SAPyR für 1 Minute und anschließender Bestrahlung ab. Dementsprechend wurde auch die intrazelluläre, amastigote Form von *L. major in-vitro* durch die PDI mit 5 μ M abgetötet. Eine dunkeltoxische Wirkung hatte der PS SAPyR bei der untersuchten Konzentration nicht.

Wie viele Peritoneal-Exsudat-Makrophagen *in-vitro* durch die PDI mit 5 μ M SAPyR abgetötet werden, wurde nicht untersucht. Die Änderung des Verhältnisses von *L. major* pro pg DNA zeigte allerdings, dass die Abtötungsrate der infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen geringer war als die der *L. major* Amastigoten.

4. Diskussion

Die Therapie der kutanen, der mukokutanen sowie der viszeralen Leishmaniose ist komplex und es gibt momentan keine optimale Therapiestrategie für die Behandlung dieser infektiösen Erkrankung. Zudem haben die derzeit in der klinischen Praxis verwendeten Medikamente viele Nebenwirkungen (Löscher et al., 2010, S. 612- 613; WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 55–57) und sind je nach Region und Spezies unterschiedlich effektiv (WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, 2010, S. 57 und S. 60). Außerdem können bei allen Formen der Leishmaniose Rückfälle nach Beginn der Behandlung auftreten (Farrar et al., 2014, S. 645). Es besteht also die Notwendigkeit zur Verbesserung der Leishmaniose-Therapie sowie zur Entwicklung neuer Therapien. Für die Behandlung der kutanen Leishmaniose beispielsweise könnte die photodynamische Inaktivierung (PDI) eine vielversprechende neue nichtmedikamentöse, lokale Therapieoption darstellen.

Die PDI mit den Protoporphyrin IX (PpIX) Vorstufen δ -Aminolävulinsäure (ALA) und Methyl-Aminolävulinat (MAL), die über den Häm-Synthese-Weg enzymatisch in PpIX umgewandelt werden (Kosaka et al., 2007), wurde bereits in mehreren klinischen Studien untersucht (van der Snoek et al., 2008). Alle Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die PDI mit PpIX Vorstufen (ALA, MAL) bei der Behandlung der kutanen Leishmaniose effektiv war: Die Heilung betrug 14 Tage nach der letzten Behandlung mindestens 96,1 % und bis zu 100 %, wobei die Nebenwirkungen moderat waren (van der Snoek et al., 2008). Bei der Behandlung von mit *L. major* infizierten kutane-Leishmaniose-Patienten wurde zudem gezeigt, dass die PDI effektiver war als die herkömmliche lokale Therapie mit Paromomycin 15 % + Methylbenzethoniumchlorid 12 % Salbe (González et al., 2008).

Aufgrund limitierter Daten gibt es aber in den Leitlinien momentan noch kein zugelassenes Verfahren zur Behandlung der Leishmaniose mittels Photodynamik (van der Snoek et al., 2008).

Um die Frage zu klären, ob auch andere Photosensibilisatoren (PS) als Porphyrin-Derivate für die Therapie der kutanen Leishmaniose geeignet wären, ist die Untersuchung des Wirkmechanismus der PDI bei der kutanen Leishmaniose sowie die Testung anderer PS Gegenstand der Forschung.

In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit unter Anderem die *in-vitro*-Effektivität der exogenen PS TMPyP, SAPyR und FLASH-07a, die per se während der Bestrahlung

photoaktiv sind und nicht erst verstoffwechselt werden müssen (Vorteil gegenüber ALA und MAL), bei der PDI der promastigoten Form von *L. major* untersucht.

Die Ergebnisse der Versuche zeigten, dass die PDI mit TMPyP, SAPyR und FLASH-07a unter Verwendung von Licht im Wellenlängenbereich 380 nm - 475 nm (Energiedosis 12 J/cm²), gegen *L. major* Promastigote effektiv war. Die anti-promastigote Wirkung nahm in dem untersuchten Bereich, von 0 µM bis 10 µM, mit steigender Konzentration zu. Dabei bildete die höchste TMPyP-Konzentration (10 µM) eine Ausnahme. Der erneute Anstieg der mit dem MTT-Assay gemessenen Vitalität bei dieser Konzentration kann aber durch die Erhöhung des Absorptionshintergrunds durch die große Anzahl an TMPyP-Farbstoffmolekülen bei hohen Konzentrationen erklärt werden. Eine Dunkeltoxizität zeigte sich nur bei der höchsten TMPyP-Konzentration (10 µM), wobei die anti-promastigote Wirkung auch hier durch Bestrahlung erhöht werden konnte. Die alleinige Behandlung mit Licht führte zu keiner Reduktion der Vitalität von *L. major* Promastigoten *in-vitro*, in Suspension.

Eine vergleichbar gute *in-vitro*-Effektivität gegen promastigote Leishmanien zeigte sich auch in anderen Studien. Zum Beispiel beschrieben Bristow *et al.* bereits 2006, dass kationische Porphyrin-Derivate in mikromolaren Konzentrationen *L. major* Promastigote effektiv abtöten (Bristow *et al.*, 2006). Auch Phthalocyanine wurden schon erfolgreich eingesetzt. Beispielsweise war die PDI von *L. chagasi* und *L. panamensis* Promastigoten mit Zink-Phthalocyanin und Aluminium-Phthalocyanin-Chlorid in mikromolaren Dosen und 670 nm Licht der Energiedosis 2,5 - 10 J/cm², effektiv: Die halbmaximal effektive Konzentration betrug bei der Behandlung mit Aluminium-Phthalocyanin-Chlorid bei *L. chagasi* 0,0033 (10 J/cm²), 0,0083 (5 J/cm²) und 0,0093 µM (2.5 J/cm²) und bei *L. panamensis* 0,17 (10 J/cm²), 0,25 (5 J/cm²) und 0,34 µM (2.5 J/cm²). Die halbmaximal effektive Konzentration von Zink-Phthalocyanin war signifikant höher und bei beiden Spezies gleich (Escobar *et al.*, 2006). Auch die Behandlung von *L. amazonensis* Promastigoten mit Aluminium-Phthalocyanin-Chlorid (bis 40 µg/ml) und Bestrahlung mit Rotlicht der Energiedosis 1,5 - 3 J/cm² führte zur Abtötung der Parasiten (Dutta *et al.*, 2005).

Im Gegensatz dazu konnten Perez *et al.* 2014 durch die Inkubation mit 0,01 µM und 0,1 µM freiem Zink-Phthalocyanin oder liposomalem Zink-Phthalocyanin und Bestrahlung mit 0,2 J/cm² keine Vitalitätsabnahme von *L. braziliensis* Promastigoten erreichen (Perez *et al.*, 2014).

Akilov *et al.* zeigten, dass *L. major* Promastigote durch die PDI mit den Phenothiazin-Analoga 5-ethylamino-9-diethylaminobenzo(*a*)phenoselenazinium Chlorid (EtNBSE) und 3,7-Bis (*N,N*-dibutylamino) Phenothiazin Bromid (PPA904) und Bestrahlung mit Rotlicht der Energiedosis 10 J/cm^2 abgetötet wurden. Die Phototoxizität des PS EtNBSE war dabei signifikant höher als die des Farbstoffs PPA904: Die halbmaximal effektive Konzentration betrug bei EtNBSE $9,3 \times 10^{-9} \text{ M}$ und bei PPA904 $7,2 \times 10^{-6} \text{ M}$ (Akilov *et al.*, 2007a). Dagegen zeigte sich bei der von der gleichen Arbeitsgruppe durchgeführten *in-vitro* Inaktivierung von *L. major* Promastigoten mit ALA-PDI (Dosen bis 1 mM) und Bestrahlung mit 10 J/cm^2 (635 nm) keine mit dem MTT-Test messbare Vitalitätsabnahme der Promastigoten. Bei der PDI mit exogenem PpIX (Dosen bis 1 mM) und Bestrahlung mit 10 J/cm^2 kam es dagegen bei hohen Konzentrationen zu einer Vitalitätsabnahme der Parasiten von über 90 % (Akilov *et al.*, 2007b; Kosaka *et al.*, 2007).

Im Anschluss an die Versuche zur PDI von *L. major* Promastigoten wurde die Effektivität der PS TMPyP, SAPyR und FLASH-07a miteinander verglichen.

Um die photodynamische Effektivität der drei verwendeten Farbstoffe richtig miteinander vergleichen zu können, mussten die Bestrahlungsparameter angeglichen werden, da die Farbstoffe jeweils verschiedene Absorptionscharakteristika aufweisen. Dies erfolgte durch Angleichen der Anzahl an absorbierten Photonen, weil dadurch eine bessere Vergleichbarkeit gegeben ist, da nach dem Grundsatz der Photodynamik jeweils ein Farbstoffmolekül durch die Absorption von einem Photon angeregt wird und somit ein Vergleich bei gleicher Anzahl an angeregten Farbstoffmolekülen möglich ist (Cieplik *et al.*, 2015). Dafür wurde die Menge an absorbierten Photonen pro Sekunde durch einen bestimmten Farbstoff, bei Belichtung mit einer bestimmten Bestrahlungsquelle nach der Formel von Cieplik *et al.*, in Kooperation mit Dr. Johannes Regensburger (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg) berechnet (Cieplik *et al.*, 2015).

Der Vergleich der anti-promastigoten Wirkung der drei PS zeigte, dass bei der PDI mit $10 \text{ }\mu\text{M}$ FLASH-07a ($1,5814 \times 10^{21}$ absorbierte Photonen) nur bei der längsten Inkubationszeit (30 Minuten) eine über 90%ige Inaktivierung von *L. major* Promastigoten *in-vitro*, in Suspension erzielt werden konnte. Bei der PDI mit $1 \text{ }\mu\text{M}$ TMPyP, entsprechend einer etwas höheren Konzentration als die beim Angleichen der Anzahl an absorbierten Photonen berechnete, zeigte sich dagegen unabhängig von der Inkubationszeit eine über 90%ige Inaktivierung von *L. major* Promastigoten *in-vitro*, in Suspension. Auch bei der

PDI mit 5 μM SAPyR, entsprechend einer um den Faktor drei niedrigeren Konzentration als die beim Angleichen der Anzahl an absorbierten Photonen berechnete, zeigte sich bereits unabhängig von der Inkubationszeit eine über 90%ige Inaktivierung von *L. major* Promastigoten *in-vitro*, in Suspension. Die anti-promastigote Wirkung nahm also in folgender Reihenfolge zu: FLASH-07a < TMPyP < SAPyR.

Zudem wurde in dieser Arbeit die *in-vitro* Zytotoxizität der PDI mit TMPyP, SAPyR und FLASH-07a auf die nicht infizierte J774A.1-Makrophagenzelllinie evaluiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass die PDI mit TMPyP, SAPyR und FLASH-07a unter Verwendung von Licht im Wellenlängenbereich 380 nm - 475 nm (Energiedosis 12 J/cm²) *in-vitro* auch einen zytotoxischen Effekt hatte. Die Zytotoxizität auf die untersuchte J774A.1-Makrophagenzelllinie nahm in dem untersuchten Bereich, von 0 μM bis 10 μM , mit steigender Konzentration zu. Die PS TMPyP und SAPyR hatten in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine dunkeltoxische Wirkung auf die J774A.1-Makrophagenzelllinie. Der PS FLASH-07a zeigte dagegen ab der Konzentration 5 μM eine Dunkeltoxizität, wobei die zytotoxische Wirkung auch hier durch Bestrahlung erhöht werden konnte. Eine Lichttoxizität zeigte sich bei allen drei PS nicht.

Beim anschließenden Vergleich der Zytotoxizität der PS nach Angleichen der Anzahl an absorbierten Photonen (siehe Seite 108), zeigte die PDI mit 10 μM FLASH-07a ($1,5814 \times 10^{21}$ absorbierte Photonen) unabhängig von der Inkubationszeit, eine Abtötungsrate der J774A.1-Makrophagenzelllinie *in-vitro*, in Suspension von unter 80 %. Bei der PDI mit 1 μM TMPyP, entsprechend einer etwas höheren Konzentration als die beim Angleichen der Anzahl an absorbierten Photonen berechnete, zeigte sich dagegen unabhängig von der Inkubationszeit eine über 90%igen Abtötung der J774A.1-Makrophagenzelllinie. Auch bei der PDI mit 10 μM SAPyR, entsprechend einer um den Faktor 1,5 niedrigeren Konzentration als die beim Angleichen der Anzahl an absorbierten Photonen berechnete, zeigte sich bereits eine 90%ige Abtötung der J774A.1-Makrophagenzelllinie. Dementsprechend nahm die Zytotoxizität in folgender Reihenfolge zu: FLASH-07a < TMPyP < SAPyR.

Die unterschiedliche Effektivität der Farbstoffe nach Angleichen der photophysikalischen Bedingungen, die sich bei der Inaktivierung von *L. major* Promastigoten sowie bei der Inaktivierung der J774A.1-Makrophagenzelllinie zeigte, kann durch Eigenschaften der Farbstoffe selbst erklärt werden. Zu den charakteristischen Eigenschaften eines PS zählen

die Art der Energieübertragung (Typ 1 oder Typ 2 Reaktion; Quanteneffizienz ϕ bei der Bildung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)) sowie die Bindung, Aufnahme, intrazelluläre Lokalisation und Photostabilität des PS (Cieplik et al., 2015).

Die unterschiedliche Quanteneffizienz ϕ der drei Farbstoffe für die Bildung von hochreaktivem $^1\text{O}_2$, der die entscheidende Rolle bei der PDI spielt (Maisch et al., 2007), kann also ein möglicher Grund für die höhere Effektivität von SAPyR sein: SAPyR hat eine Quanteneffizienz ϕ von $0,99 \pm 0,05$ (Cieplik et al., 2013) für die Bildung von hochreaktivem $^1\text{O}_2$. Der PS überträgt seine Energie also zu 99 % direkt auf den Sauerstoff in der Umgebung (Typ 2 Reaktion, siehe Seite 30) (Maisch, 2007). Im Vergleich dazu ist die Quanteneffizienz ϕ für die Bildung von $^1\text{O}_2$ bei den anderen Farbstoffen geringer. TMPyP bildet $^1\text{O}_2$ mit einer Quanteneffizienz ϕ von 0,74 (Wilkinson et al., 1993), FLASH-07a bildet $^1\text{O}_2$ mit einer Quanteneffizienz ϕ von $0,78 \pm 0,05$ (Maisch et al., 2014). Beide Farbstoffe übertragen ihre Energie also auch durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie $\text{O}_2^{\bullet -}$, $\bullet\text{OH}$ und H_2O_2 (Typ 1 Reaktion, siehe Seite 30), sowie durch Wärmeabgabe und Fluoreszenz (Maisch et al., 2014).

Der $^1\text{O}_2$ muss wegen seiner kurzen Lebensdauer von wenigen Mikrosekunden (Maisch et al., 2007) und seiner kurzen Diffusionsstrecke ($< 1 \mu\text{m}$) (Maisch et al., 2009) in der Nähe der Mikroorganismen gebildet werden, um diese effektiv zu zerstören. Die Anlagerung der Farbstoffmoleküle an die Mikroorganismen ist also eine Voraussetzung für die Bindung, Aufnahme und intrazelluläre Lokalisation der PS und somit für die effektive PDI (Eichner et al., 2015).

Daher kann die Molekülgröße der drei Farbstoffe ein weiterer Grund für die unterschiedliche Effektivität sein, da eine größere Molekülstruktur durch sterische Hinderung zu einer erschwerten Diffusion der Farbstoffe an den Zielort führen kann (Stewart, 1998). Aufgrund der geringeren molaren Masse von SAPyR (272,3 g/mol) (Cieplik et al., 2013) im Vergleich zu TMPyP (682,2 g/mol) (Cieplik et al., 2013) und FLASH-07a (1180,74 g/mol) (Maisch et al., 2014) könnte es sein, dass SAPyR leichter den Zielort erreicht und von den Parasiten und Zellen aufgenommen wird. Da die molare Masse von FLASH-07a größer ist als die von TMPyP, könnte die zunehmende sterische Hinderung bei größerer Molekülmasse zudem erklären, warum TMPyP trotz ähnlich hoher Quanteneffizienz ϕ für die Bildung von $^1\text{O}_2$ im Vergleich zu FLASH-07a eine höhere Effektivität zeigte.

Bei der Inaktivierung von biofilmbildenden Bakterien konnte gezeigt werden, dass es bei positiv geladenen Substanzen verstärkt zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit Biofilmkomponenten wie negativ geladenen extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) kommt, die ebenfalls zu einer erschwerten Diffusion der Substanz zum Zielort führen können (Mah und O'Toole, 2001; Stewart und Costerton, 2001).

Da SAPyR einfach positiv geladen ist (Cieplik et al., 2013), TMPyP vier positive Ladungen pro Molekül hat (Cieplik et al., 2013) und FLASH-07a sogar achtfach positiv geladen ist (Maisch et al., 2014), könnte es abhängig von der Anzahl der positiven Ladungen bei der Inaktivierung von *L. major* Promastigoten und der J774A.1-Makrophagenzelllinie ebenfalls zu unterschiedlich starken elektrostatischen Wechselwirkungen mit Substanzen in der Umgebung der Mikroorganismen und Zellen gekommen sein, die zu einer erschwerten Diffusion zu den Parasiten und Zellen geführt haben.

Im Gegensatz dazu konnte allerdings auch gezeigt werden, dass die Bindung an die negativ geladene Oberfläche von Mikroorganismen bei mehrfach positiv geladenen Farbstoffen erleichtert ist (Alves et al., 2009; Eichner et al., 2015).

Ein weiterer Grund dafür, dass SAPyR im Vergleich zu den anderen Farbstoffen leichter zu den Parasiten und Wirtszellen durchdringen kann und somit die *L. major* Promastigoten und die J774A.1-Makrophagenzelllinie effektiver inaktiviert, könnte die chemische Struktur des Farbstoffs sein: Cieplik *et al.* zeigten 2013, dass SAPyR sich wie ein Tensid verhält, was die Auflösung von EPS in der Umgebung der Mikroorganismen erleichtern könnte (Cieplik et al., 2013).

Eine weitere für die Effektivität eines PS entscheidende Eigenschaft ist die Photostabilität, da ein stabiler Farbstoff öfters angeregt werden kann und daher viel $^1\text{O}_2$ und ROS produzieren kann (Kuimova et al., 2009). Kommt es dagegen zur Photobleichung (= irreversible Zerstörung des Farbstoffmoleküls durch die Bestrahlung) (Kramer-Marek et al., 2006), Selbstauslöschung („Eigenquenchen“) (Davies, 2003), Deaktivierung durch einen zusätzlichen Quencher (Maisch et al., 2005) oder Dimerisierung der Farbstoffmoleküle (Felgenträger et al., 2013), geht der Farbstoff kaputt. Die Folge ist ein Rückgang der Bildung von $^1\text{O}_2$ und ROS sowie eine Änderung des Spektrums des Farbstoffs (Knak et al., 2014).

Die Photostabilität von Porphyrin-Derivaten wie TMPyP konnte bereits gezeigt werden: Beispielsweise kam es bei den in Liposomen eingebrachten Porphyrin-Derivaten 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-Tritolylporphyrin (C16-TTP) und 5-(4-hexadecyloxyphenyl)-

10,15,20-Tri-pyridylporphyrin (TPYR-PP) nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 610 nm, mit einer Energiedosis von 7,5 J/cm² und 15 J/cm², nur zu einer geringen Abnahme des Absorptionsspektrums um maximal 6 % (Kramer-Marek et al., 2006).

Die durch eine Amidbindung verbundenen *meso*-Tetraphenylporphyrin Dimere D2, D3 und D4 zeigten nach 30 Minuten Bestrahlung mit Rotlicht ebenfalls keine Änderung des optischen Spektrums (Faustino et al., 2000).

In Experimenten zur Photostabilität von SAPyR zeigten der erzeugte Singulett-Sauerstoff sowie der Tripletzustand des PS keine Deaktivierung durch Selbstausschöpfung („Eigenquenchen“) (Cieplik et al., 2013). Außerdem kam es zu keiner Dimerisierung der Farbstoffmoleküle. Die Photostabilität von SAPyR ist dementsprechend gut, obwohl eine geringe Abnahme der ¹O₂ Produktion nach 20 Minuten Langzeitbestrahlung festgestellt werden konnte (Cieplik et al., 2013).

Bei der Untersuchung der Photostabilität der Flavinderivate FLASH-07a und FLASH-01a zeigte sich eine Abnahme der Absorptionsmaxima um bis zu 11 % nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 320 - 500 nm mit 70 J/cm² (Eichner et al., 2015). Dieses Ergebnis kann auf eine etwas geringere Photostabilität der Flavinderivate im Vergleich zu TMPyP und SAPyR hindeuten, was zu der geringeren Effektivität von FLASH-07a beitragen könnte.

Daneben gibt es noch andere Eigenschaften, die für einen PS entscheidend sind: Ein geeigneter PS sollte sicher sein und gleichzeitig bei niedrigen Farbstoffkonzentrationen und geringer Strahlungsexposition unter 10 J/cm² effektiv Mikroorganismen abtöten (Maisch et al., 2014). Außerdem sollte der Farbstoff sein Absorptionsmaximum im sichtbaren Wellenlängenbereich haben (Maisch et al., 2014), um einen schädlichen Effekt kurzwelliger Strahlung (< 380 nm) auszuschließen (Eichner et al., 2013). Diese Eigenschaften wurden von den von uns getesteten PS erfüllt, da sie bei niedrigen Farbstoffkonzentrationen zwischen 0,01 µM und 10 µM sowie geringer Energiedosis von 12 J/cm² bereits eine toxische Wirkung zeigten und ihr Absorptionsmaximum im sichtbaren Wellenlängenbereich lag (TMPyP: λ_{max} 422 nm (Cieplik et al., 2013); SAPyR: λ_{max} 360 - 410 nm (Cieplik et al., 2013); FLASH-07a: λ_{max} 371 nm und 443 nm (Eichner et al., 2015)).

Der spektrale Überlapp des Absorptionsspektrums der Farbstoffe mit dem Emissionsspektrum der verwendeten Lampe Waldmann BlueV war bei TMPyP besser als bei den anderen beiden PS. Cieplik *et al.* zeigten 2015, dass die Kombination von SAPyR mit einer Lampe mit optimiertem Emissionsspektrum zu einer effektiveren Inaktivierung

von *Actinomyces naeslundii* (Cieplik et al., 2013) führte. Zusätzlich konnten dabei die Behandlungszeit und Bestrahlungsintensität aufgrund der besseren spektralen Überlagerung des Emissionsspektrum der verwendeten Lampe mit dem Absorptionsspektrum des PS, verkürzt werden (Cieplik et al., 2015).

Dementsprechend könnte auch bei der PDI von *L. major*, durch Kombination von SAPyR bzw. FLASH-07a mit einer Lampe mit geeigneterem Emissionsspektrum, die Behandlungsdauer und Intensität der Bestrahlung reduziert werden und gleichzeitig die Effektivität gesteigert werden.

Neben Eigenschaften des PS selbst, ist die fehlende Resistenzbildung der Parasiten gegenüber dem photodynamischen Prinzip eine weitere Voraussetzung für die effektive Anwendung eines PS. Dabei geht es speziell um die amastigote Form der Leishmanien, die sich aufgrund ihrer intrazellulären Lage vor oxidativen Stress schützen muss (Paramchuk et al., 1997). Da allerdings bei der PDI von Bakterien, die ebenfalls Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress besitzen (Lushchak, 2001), bisher keine Resistenzbildung beschrieben ist (Giuliani et al., 2010; Tavares et al., 2010), könnte es sein, dass es bei Leishmanien ebenfalls nicht dazu kommt. Eine sehr kurze photodynamische Inaktivierungszeit (Inkubation und Bestrahlung) von Sekunden könnte von Vorteil sein, die Mikroorganismen davon abzuhalten Resistenzen zu bilden (Eichner et al., 2013).

Zudem wurde bereits gezeigt, dass eine lange Inaktivierungszeit Nachteile haben kann: Wie zum Beispiel für das Porphyrin-Derivat Exeorphinium Chlorid (XF73) gezeigt, führten bei einer längeren Inkubationszeit wesentlich geringere Farbstoffkonzentrationen bei humanen Keratinozyten (NHEKs; engl.: *normal human epidermal keratinocytes*) und humanen Fibroblasten zu einer vergleichbaren toxischen Wirkung wie sonst höhere Konzentrationen (Maisch et al., 2005). Auch könnte eine lange Behandlungszeit unangenehm für die Patienten sein und deshalb zu fehlender Compliance führen. Hinzu kommt, dass in den von uns durchgeführten Experimenten längere Inkubationszeiten nur einen geringen Effekt auf eine gesteigerte Abnahme der Vitalität hatten, da sie zu keiner oder nur zu einer geringfügig höheren Abnahme der Vitalität der *L. major* Promastigoten und der J774A.1-Makrophagenzelllinie führten.

Zusätzlich zur fehlenden Resistenzbildung sollte die effektive Anwendung eines PS unabhängig von der die Erkrankung verursachenden Leishmanienspezies sein. Da durch die PDI eine Vielzahl von Biomolekülen wie zum Beispiel Lipide und Proteine geschädigt werden (Maisch et al., 2014), hat sie ein breites Wirkspektrum (Sharma et al., 2011, S. 3) und es ist daher unwahrscheinlich, dass die Wirkung auf bestimmte Leishmanienspezies

beschränkt ist. Zudem wurde die PDI bereits bei verschiedenen Leishmanienarten *in-vitro* erfolgreich durchgeführt: Beispielsweise bei *L. major* Promastigoten mit kationischen Porphyrin-Derivaten (Bristow et al., 2006) und den Phenothiazin-Analoga EtNBSE und PPA904 (Akilov et al., 2007a). Bei *L. chagasi* and *L. panamensis* Promastigoten mit Zink-Phthalocyanin und Aluminium-Phthalocyanin-Chlorid (Escobar et al., 2006) und bei *L. amazonensis* Promastigoten mit Aluminium-Phthalocyanin-Chlorid (Dutta et al., 2005) (siehe Seite 107 - 108).

In diesem Zusammenhang sollte in nachfolgenden Studien die Effektivität der hier verwendeten PS TMPyP, SAPyR und FLASH-07a nicht nur bei *L. major*, sondern auch bei der Inaktivierung von weiteren dermatotropen und mukotropen Leishmanienarten getestet werden.

Bei der Photosensibilisierung von Bakterien konnte bereits gezeigt werden, dass die Effektivität der Behandlung mit dem PS TMPyP unabhängig vom Erregerstamm ist (Eichner et al., 2013). Auch SAPyR (Cieplik et al., 2013) und FLASH-07a (Maisch et al., 2014) zeigten sowohl bei gram-positiven als auch bei gram-negativen Bakterienstämmen sehr gute antimikrobielle Effektivität. Lediglich die photodynamischen Parameter (Inkubationszeit, Farbstoffkonzentration und Strahlungsexposition), die verwendet werden müssen um einen guten bakteriziden Effekt zu erreichen, sind abhängig vom Erregerstamm (Grinholc et al., 2008).

Da die Leishmanien im menschlichen Organismus als obligat intrazelluläre Parasiten im Monozyten-Makrophagensystem vorliegen, ist die Frage nach einem therapeutischen Fenster zu klären, indem Leishmanien durch die PDI abgetötet werden, die Wirtszellen aber unbeschadet bleiben. Deshalb wurde die *in-vitro* Zytotoxizität der PDI auf die J774A.1-Makrophagenzelllinie mit der photodynamischen Wirkung der PS gegenüber dem isolierten Parasiten *L. major* verglichen. Die J774A.1-Makrophagenzelllinie spiegelt die Wirtszelle der Leishmanien im menschlichen Organismus wider, da sie Makrophagen-ähnliche Eigenschaften aufweist (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, n.d.).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Zunahme der anti-promastigoten Wirkung im untersuchten Bereich zwischen 0 μM und 10 μM gleichzeitig mit einer Zunahme der Zytotoxizität verbunden war. Beim Vergleich der Vitalität zeigte sich, dass die *L. major* Promastigoten und die J774A.1-Makrophagenzelllinie *in-vitro*, in Suspension durch die PDI mit 1 μM TMPyP unabhängig von der Inkubationszeit, zu über 90 % abgetötet

wurden. Auch bei der PDI mit 5 μM SAPyR wurden die *L. major* Promastigoten unabhängig von der Inkubationszeit zu über 90 % abgetötet. Die Abtötungsrate der J774A.1-Makrophagenzelllinie betrug bei der PDI mit 5 μM SAPyR dagegen unabhängig von der Inkubationszeit unter 80%. Eine effiziente Abtötung der J774A.1-Makrophagenzelllinie war erst ab der Konzentration 10 μM SAPyR zu beobachten. Bei der Photosensibilisierung mit 10 μM FLASH-07a wurden die *L. major* Promastigoten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zu über 90 % abgetötet. Bei der J774A.1-Makrophagenzelllinie zeigte sich dagegen unabhängig von der Inkubationszeit eine Abtötungsrate von unter 80 %.

Folglich war die Spanne zwischen Zunahme der anti-promastigoten Wirkung und Zunahme der Zytotoxizität, entsprechend der Differenz der Vitalitätsabnahme der *L. major* Promastigoten und der J774A.1-Makrophagenzelllinie, bei SAPyR größer als bei FLASH-07a und bei FLASH-07a wiederum größer als bei TMPyP. Dementsprechend ist ein potentes „Therapeutisches Fenster“, indem die Vitalität der *L. major* Promastigoten deutlich abnimmt, die J774A.1-Makrophagenzelllinie aber noch vital ist, bei den drei Farbstoffen unterschiedlich groß: $\text{TMPyP} < \text{FLASH-07a} < \text{SAPyR}$.

Bei Verwendung des Begriffs „Therapeutisches Fenster“ sollte allerdings bedacht werden, dass die Zytotoxizität ebenfalls recht hoch war: Durch die PDI mit 10 μM FLASH-07a wurde die J774A.1-Makrophagenzelllinie zu 70 - 80 % abgetötet. Die PDI mit 1 μM TMPyP sowie die PDI mit 10 μM SAPyR führte sogar zu einer über 90%igen Abtötung der J774A.1-Makrophagenzelllinie. Es ist daher fraglich, ob es einen Bereich gibt, indem die Leishmanien abgetötet werden, ohne dass die Immunzellen geschädigt werden.

In einer früheren *in-vitro* Studie zeigten Taylor *et al.* ebenfalls, dass die PDI mit freien und liposomalen Dimethyl- und Diethyl-Carbaporphyrin-Ketalen für die Wirtszellen zytotoxisch ist: Bei der Bestrahlung mit einer Energiedosis von 1,1 oder 2,1 J/cm^2 betrug die halbmaximal effektive Konzentration bei der humanen Promonozyten-Zelllinie U937 zwischen 0,27 μM (freies Dimethyl-Carbaporphyrin-Ketal; 2,1 J/cm^2) und 0,94 μM (freies Diethyl-Carbaporphyrin-Ketal; 1,1 J/cm^2). Die ebenfalls untersuchten Peritoneal-Makrophagen aus Hamstern waren resistenter, bei ihnen betrug die halbmaximal effektive Konzentration beispielsweise 5,7 μM (freies Dimethyl-Carbaporphyrin-Ketal; 2,1 J/cm^2) bis 272,2 μM (liposomales Dimethyl-Carbaporphyrin-Ketal; 2,1 J/cm^2) (Taylor *et al.*, 2011).

Dagegen zeigten Dutta *et al.* bereits 2005, dass bei der Photosensibilisierung von *L. amazonensis* Promastigoten und J774A.1-Zellen mit Aluminium-Phthalocyanin-Chlorid

(bis 40 µg/ml) und Bestrahlung mit Rotlicht der Energiedosis 1,5 - 3 J/cm², die Vitalitätsabnahme der Parasiten mindestens 10 - 20 mal so hoch war wie die der Makrophagen, die selbst bei einer Dosis von 40 µg/ml kaum lysiert wurden (Dutta et al., 2005).

In einer *in-vitro* Studie zur PDI von *L. panamensis* und *L. chagasi* mit liposomalem und freiem Chloraluminium-Phthalozyanin in nanomolaren Dosen und Bestrahlung mit 17 J/cm² zeigte sich ebenfalls, dass die toxische Wirkung der PS auf die promastigote Form der beiden Leishmanienarten viel größer war als auf die nichtinfizierte humane leukämische-Monozytenzelllinie THP-1: Die halbmaximal effektive Konzentration betrug bei *L. panamensis* 0,31 nM (liposomal) und 4,00 nM (frei) und bei *L. chagasi* 0,03 nM (liposomal) und 2,73 nM (frei). Bei der THP-1-Monozytenzelllinie betrug die halbmaximal effektive Konzentration 1,35 nM (liposomal) und 22,50 nM (frei) (Hernández et al., 2012). Damit übereinstimmend zeigten Perez *et al.* 2014 in einer *in-vitro* Studie, dass die Inkubation mit 0,01 µM und 0,1 µM freiem Zink-Phthalozyanin sowie 0,01 µM liposomalem Zink-Phthalozyanin und anschließender Bestrahlung mit 0,2 J/cm² für Makrophagen (J774-Zellen) aber auch humane Keratinozyten (HaCaT Zellen) und dendritische Zellen unschädlich war. Bei den dendritischen Zellen führte sogar die Photosensibilisierung mit 0,1 µM liposomalem Zink-Phthalozyanin zu keiner Vitalitätsabnahme, was dafür spricht, dass dieser Zelltyp am resistentesten gegen die PDI ist. Es könnte daher sein, dass die Immunabwehr des haut-assoziierten lymphatischen Gewebes durch die PDI kaum oder gar nicht beeinträchtigt wird (Perez et al., 2014).

Die Ergebnisse von Perez *et al.* stimmen mit den wenigen *in-vivo* Studien überein, in denen sich zeigte, dass es bei der PDI von kutanen-Leishmaniose-Läsionen am Ohr von mit *L. major* infizierten BALB/c Mäusen, mit 20%iger ALA-Lösung und Bestrahlung mit 50 J/cm² (635 nm Licht), sieben Tage nach der ALA-PDI trotz der dramatischen Abnahme des Anteils der Makrophagen in der Läsion, zu einer systemischen Immunantwort mit Gewebeerstörung im Bereich der behandelten Haut kommt: Nach der Behandlung nimmt der Anteil der B-Lymphozyten in der kutanen-Leishmaniose-Läsion extrem zu. Zudem steigt die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 und IL-6 signifikant an (Akilov et al., 2007b; Kosaka et al., 2007). Von den wenigen verbliebenen Makrophagen, von denen fast alle mit *L. major* infiziert sind, wird zudem im Vergleich zu nicht-infizierten Makrophagen vermehrt Tumornekrosefaktor-α gebildet (Akilov et al., 2007b; Kosaka et al., 2007).

Die potentiell lokal toxische Wirkung der PDI auf die Makrophagen des Wirts könnte dementsprechend nur eine geringe Auswirkung auf den Organismus haben.

Zudem konnte in anderen photodynamischen Experimenten mit NHEKs, wie es Perez *et al.* 2014 für freies und liposomales Zink-Phthalozyanin zeigten, auch für die Flavinderivate FLASH-07a und FLASH-01a und das Porphyrinderivat TMPyP gezeigt werden, dass die topische Anwendung keinen oder nur einen präferentiell schädlichen Effekt auf das umliegende Wirtsgewebe hat: Bei Inkubation von NHEKs mit 10 μM FLASH-07a oder FLASH-01a kam es bis zu einer Strahlungsexposition von 30 J/cm^2 zu keiner Vitalitätsabnahme der Zellen, weshalb beide Flavinderivate als potentiell unschädlich für den Menschen angesehen werden können (Maisch et al., 2014). Bei der Inkubation von NHEKs mit dem PS TMPyP und Bestrahlung mit 0,5 J/cm^2 oder 3 J/cm^2 konnte dagegen eine Abnahme der Vitalität der NHEKs festgestellt werden. Dennoch ist die topische Anwendung von TMPyP als sicher anzusehen, da der PS unabhängig von der Inkubationszeit nur im *Stratum corneum* der Haut nachzuweisen ist und nicht in tiefere Gewebeschichten diffundiert und dementsprechend dort auch keine toxische Wirkung entfaltet (Eichner et al., 2013). Auch *in-vivo* konnte bereits gezeigt werden, dass beispielsweise die Behandlung von mit *L. amazonensis* infizierten Hamstern (*Mesocricetus auratus*) mit Dimethyl-Carbaporphyrin-Ketal (0,5 mg/kg) und Bestrahlung mit 7 mW/cm^2 für 2 oder 4 Stunden, zu keiner systemischen Toxizität führt und auch keinen schädlichen Effekt auf die umliegende Haut hat (Taylor et al., 2011). Die Wirkung des Farbstoffs SAPyR auf das Wirtsgewebe ist momentan noch Gegenstand der Forschung.

Eine geringe systemische und lokale Toxizität könnte deshalb von besonderer Bedeutung sein, da auch nach einer erfolgreichen Behandlung noch Parasiten in den kutanen Leishmaniose-Läsionen nachgewiesen werden können. Eine komplette Elimination der Parasiten findet also nicht statt (Akilov et al., 2007a; Taylor et al., 2011) und nachfolgende Behandlungen sind notwendig, um die Anzahl der Parasiten verringern (Akilov et al., 2007b).

Um die Bedingungen im menschlichen Organismus *in-vitro* besser nachzustellen, wurde in Ergänzung zu den Experimenten mit *L. major* Promastigoten und der J774A.1-Makrophagenzelllinie die anti-amastigoten Aktivität, also der Effekt der PDI auf die intrazellulär, amastigote Form von *L. major* getestet. Bei den mit *L. major* infizierten Zellen handelte es sich um Peritoneal-Exsudat-Makrophagen, die aus C57BL/6 Mäusen isoliert wurden. Da es sich bei den Peritoneal-Exsudat-Makrophagen um Immunzellen aus

der Maus handelt, sind diese den gewebständigen Makrophagen in ihren Eigenschaften ähnlicher, als die immortalisierte BALB/c Maus Monozyten-Makrophagen-Tumorzelllinie J774A.1 (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, n.d.).

Bei den Experimenten zeigte sich, dass die Anzahl von Leishmanien pro infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen, nach Inkubation für 1 Minute mit 5 μM SAPyR und anschließender Bestrahlung (12 J/cm^2), von 138,3 U/pg DNA (unbehandelte Kontrolle) auf 35,7 U/pg DNA abnahm. Dementsprechend hatte die PDI mit SAPyR auch auf die intrazelluläre, amastigote Form von *L. major* eine toxische Wirkung.

Dieses Ergebnis wird durch die *in-vitro* Studie von Perez *et al.* unterstützt, in der gezeigt wurde, dass die PDI von mit *L. braziliensis* infizierten J774-Zellen mit liposomalem Zink-Phthalocyanin schon bei niedriger Farbstoffkonzentration ($0,01 \mu\text{M}$) und Bestrahlungsintensität ($0,2 \text{ J/cm}^2$) zu einer Abtötung der intrazellulären Parasiten führte (Perez *et al.*, 2014).

Auch Taylor *et al.* zeigten, dass die *in-vitro* PDI mit freien und liposomalen Dimethyl- und Diethyl-Carbaporphyrin-Ketalen und einer Energiedosis von 1,1 oder $2,1 \text{ J/cm}^2$, mit einer halbmaximal effektiven Konzentration zwischen $1,8 \mu\text{M}$ (liposomales Dimethyl-Carbaporphyrin-Ketal; $2,1 \text{ J/cm}^2$) und $12,8 \mu\text{M}$ (freies Diethyl-Carbaporphyrin-Ketal; $1,1 \text{ J/cm}^2$) auf *L. amazonensis* Amastigote in infizierten U937-Zellen toxisch wirkte (Taylor *et al.*, 2011).

Die Inaktivierung von mit Aluminium-Phthalocyanin-Chlorid (1 und $5 \mu\text{g/ml}$) vorbehandelten *L. amazonensis* Amastigoten in infizierten J774A.1-Zellen, nach Inkubation für 5 oder 24 Stunden und Bestrahlung mit Rotlicht ($> 650 \text{ nm}$) bis zu einer Energiedosis von $4,5 \text{ J/cm}^2$, war ebenfalls effektiv: Die Anzahl der mikroskopisch gezählten, lebenden Parasiten war dabei abhängig von der Farbstoffkonzentration, applizierten Energiedosis und der Inkubationszeit. Bei $1 \mu\text{g/ml}$ Farbstoffkonzentration kam es auch nach 24 Stunden Inkubationszeit und der höchsten Energiedosis nur zu einer limitierten Abnahme der Parasitenzahl. Bei $5 \mu\text{g/ml}$ Farbstoffkonzentration, 24 Stunden Inkubationszeit und Bestrahlung mit $4,5 \text{ J/cm}^2$ fanden sich dagegen keine lebenden Parasiten mehr (Dutta *et al.*, 2005).

Weiterhin war die PDI von *L. panamensis* und *L. chagasi* Amastigoten in infizierten THP-1-Zellen, mit liposomalem und freiem Chloraluminium-Phthalocyanin und Licht (17 J/cm^2), mit einer halbmaximal effektiven Konzentration von $1,49 \text{ nM}$ (liposomal) und $31,19 \text{ nM}$ (frei) bei *L. panamensis* und mit einer halbmaximal effektiven Konzentration

von 0,69 nM (liposomal) und 14,24 nM (frei) bei *L. chagasi* effektiv (Hernández et al., 2012).

Dagegen funktionierte in einer früheren Studie die *in-vitro* PDI von *L. major* Amastigoten in infizierten J774A.2-Zellen, mit 1 mM ALA und Bestrahlung mit 0-50 J/cm² (635 nm) nicht, da es zu keiner Abnahme der lichtmikroskopisch gezählten Anzahl an *L. major* Amastigoten pro 100 J774A.2-Zellen kam (Akilov et al., 2007b; Kosaka et al., 2007). Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass Leishmanien PpIX aus ALA nicht produzieren können, da ihnen sieben der acht Enzyme des dafür erforderlichen Häm-Synthese-Wegs fehlen. Exogenes PpIX kann der Parasit dagegen aufnehmen (Akilov et al., 2007b; Kosaka et al., 2007). Allerdings ist die Menge an PpIX, die von *L. major* Amastigoten in infizierten J774A.2-Zellen nach Inkubation mit 1 mM ALA über die Wirtszellen aufgenommen werden kann, 500 Mal so gering wie die Menge an PpIX, die benötigt wird, um einen *Leishmania* Parasiten bei Bestrahlung mit 10 J/cm² abzutöten. Die Menge an aufgenommenem PpIX reicht demnach nicht aus, um eine phototoxische Wirkung zu erzielen (Akilov et al., 2007a). Im Widerspruch dazu zeigte sich bei einer von der gleichen Arbeitsgruppe durchgeführten *in-vivo* ALA-PDI von kutane-Leishmaniose-Läsionen am Ohr von BALB/c Mäusen, die drei Wochen zuvor mit *L. major* infiziert worden waren, folgendes: Nachdem die Läsionen 4 Stunden nach Applikation von einer 20%igen ALA-Lösung, mit 50 J/cm² (635 nm Licht) bestrahlt wurden, kam es im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe und einer Gruppe, die nur mit ALA behandelt wurde, zu einer signifikanten Abnahme der *L. major* Parasitenlast pro Ohr (Akilov et al., 2007b; Kosaka et al., 2007).

Zusammengenommen könnte dies darauf hindeuten, dass die Parasiten durch die Inaktivierung mit Protoporphyrin als PS nicht direkt abgetötet werden, sondern *in-vivo* als Folge der PDI eine systemische Immunantwort entsteht, die mit einer Abnahme der Makrophagen in der kutanen-Leishmaniose-Läsion einhergeht (siehe Seite 116) (Akilov et al., 2007a; Kosaka et al., 2007). Dagegen deutet eine hohe Effektivität sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo*, wie es beispielsweise von Akilov *et al.* für das Phenothiazin-Analogon PPA904 gezeigt werden konnte, darauf hin, dass es sich um eine Kombination aus direkter antiparasitärer Wirkung und Stimulation der systemischen Immunantwort handelt (Akilov et al., 2007a).

Da es in den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten *in-vitro* Experimenten zu einer Eliminierung der promastigoten und amastigoten Form von *L. major* kam, ist es wahrscheinlich, dass die PS TMPyP, SAPyR und FLASH-07a ebenfalls einen direkten

antiparasitären Effekt haben. Allerdings konnte von Dr. Maximilian Schmid (Institut für Immunologie, Universität Regensburg; seit 01.06.2015: Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Regensburg) inzwischen gezeigt werden, dass der von uns getestete PS SAPyR von den Wirtszellen der Leishmanien kaum aufgenommen wird, was darauf hinweisen könnte, dass der direkte toxische Effekt von SAPyR auf die intrazellulären Parasiten gering ausgeprägt ist (persönliche Kommunikation). Die weitere Untersuchung des Wirkmechanismus der hier verwendeten PS ist also ein interessantes Gebiet für nachfolgende *in-vivo* Experimente.

In Ergänzung zu den Experimenten zur anti-amastigoten Aktivität wurde in dieser Arbeit die anti-amastigote Wirkung der PDI mit der zytotoxischen Wirkung der PDI auf infizierte Peritoneal-Exsudat-Makrophagen verglichen.

Der Effekt von Inkubation für 1 Minute mit 5 μM SAPyR und anschließender Bestrahlung auf die Peritoneal-Exsudat-Zellen ist nicht direkt dargestellt, da ein Wirtszellphotodynamik-Experiment fehlt. Allerdings konnte aus der Änderung des Verhältnisses von *L. major* pro pg DNA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle geschlossen werden, dass die PDI mit SAPyR (5 μM) und Licht (12 J/cm^2) auf die infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen weniger toxisch wirkt als auf die in den Peritoneal-Exsudat-Makrophagen liegenden Leishmanien.

Aufgrund der Ergebnisse der vorangehenden Experimente dieser Arbeit zur toxischen Wirkung auf die nichtinfizierte J774A.1-Makrophagenzelllinie ist es aber wahrscheinlich, dass die PDI ebenfalls eine zytotoxische Wirkung auf die infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen hat. Akilov *et al.* konnten allerdings zeigen, dass nichtinfizierte J774A.2-Zellen für die PDI mit Phenothiazin-Analoga (EtNBSE und PPA904) und Bestrahlung mit 10 J/cm^2 empfindlicher waren als die mit *L. major* infizierten Zellen (Akilov *et al.*, 2007a). Dutta *et al.* zeigten, dass infizierte J774A.1-Zellen gegen die PDI mit Aluminium-Phthalocyanin-Chlorid zwar resistenter sind als die Parasiten, die Inaktivierung von intrazellulären *L. amazonensis* Amastigoten dennoch nicht möglich ist, ohne dabei die Wirtszellen zu schädigen (Dutta *et al.*, 2005).

Akilov *et al.* und Kosaka *et al.* zeigten sogar, dass die *in-vitro* PDI von *L. major* Amastigoten in infizierten J774A.2-Zellen mit 1 mM ALA und Bestrahlung mit 0 - 50 J/cm^2 (635 nm), zu einer Abtötung der Wirtszellen mit Freisetzung der lebenden intrazellulären Parasiten führte, wohingegen die Anzahl der *L. major* Amastigoten nicht abnahm (siehe Seite 119). Das deutet darauf hin, dass die Wirtszellen sensitiver für die

PDI mit ALA sind und sterben, bevor es zu einer Eliminierung der Parasiten kommt (Akilov et al., 2007b; Kosaka et al., 2007). Dazu passt auch das Ergebnis der *in-vivo* Studie der selben Arbeitsgruppe, wo sich sieben Tage nach der ALA-PDI eine dramatische Abnahme der Makrophagen in der kutanen-Leishmaniose-Läsion zeigte (siehe Seite 116) (Akilov et al., 2007b; Kosaka et al., 2007). Akilov *et al.* konnten außerdem für die *in-vitro* PDI von mit *L. major* infizierten J774A.2-Zellen mit zwei verschiedenen Phenothiazin-Analoga (EtNBSE und PPA904) und Bestrahlung mit 10 J/cm² zeigen, dass die J774A.2-Zellen entweder gleich sensibel (PPA904) oder sogar 1,6 Mal so sensibel (EtNBSE) wie die intrazellulären Parasiten waren (Akilov et al., 2007a).

Auch Hernández *et al.* zeigten, dass die THP-1-Monozytenzelllinie durch die PDI mit liposomalem und freiem Chloraluminium-Phthalozyanin in nanomolaren Dosen und Bestrahlung mit 17 J/cm² durch ähnlich hohe oder sogar niedrigere Dosen wie amastigote Leishmanien abgetötet wird: Die halbmaximal effektive Konzentration betrug bei *L. panamensis* 1,49 nM (liposomal) und 31,19 nM (frei) und bei *L. chagasi* 0,69 nM (liposomal) und 14,24 nM (frei). Bei der THP-1-Monozytenzelllinie betrug die halbmaximal effektive Konzentration 1,35 nM (liposomal) und 22,50 nM (frei). Eine selektive Abtötung der intrazellulären Parasiten war demnach nicht möglich (Hernández et al., 2012).

Dementsprechend sollte die Differenz der Vitalitätsabnahme von *L. major* Amastigoten und infizierten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen nach der PDI mit TMPyP, SAPyR und FLASH-07a als Fortsetzung zu den Experimenten zur anti-amastigoten Aktivität, in einem Wirtszellphotodynamik-Experiment untersucht werden, um zu klären, ob es einen Bereich gibt, indem die intrazellulären Leishmanien abgetötet werden, die infizierten Wirtszellen aber noch vital sind („Therapeutisches Fenster“).

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass TMPyP, SAPyR und FLASH-07a gegen *L. major* Promastigote und *L. major* Amastigote vergleichbar effektiv sind wie die im Text erwähnten, in anderen *in-vitro* Studien getesteten PS.

In den wenigen bereits durchgeführten Tierstudien zur Behandlung der kutanen Leishmaniose mit PDI konnte zudem bereits gezeigt werden, dass es auch hier zu einer Reduktion der Parasitenzahl kommt. Dabei wurden mit *L. major* infizierte BALB/c Mäuse mit einer 20%igen ALA-Lösung behandelt und anschließend mit 50 J/cm² (635 nm Licht) bestrahlt (siehe Seite 119) (Akilov et al., 2007b; Kosaka et al., 2007). Akilov *et al.* behandelten mit *L. major* infizierte BALB/c Mäuse auch erfolgreich mit dem

Phenothiazin-Analogen PPA904 ($10,7 \times 10^{-6}$ M) und Bestrahlung mit 50 J/cm^2 (Akilov et al., 2007a). Taylor *et al.* verwendeten Dimethyl-Carbaporphyrin-Ketal zur Behandlung von mit *L. amazonensis* infizierten Hamstern (*Mesocricetus auratus*) (siehe Seite 117) (Taylor et al., 2011).

Daher wurde anknüpfend an die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche von Dr. Maximilian Schmid (Institut für Immunologie, Universität Regensburg; seit 01.06.2015: Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Regensburg) untersucht, ob auch der neue PS SAPyR *in-vivo* als mögliche Therapieform angewendet werden kann. Zunächst wurden hierfür BALB/c Mäuse mit 3×10^6 *L. major* infiziert, die in einer $10 \text{ }\mu\text{M}$ SAPYR-Lösung injiziert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Tiere mit einer PDI-Behandlung keine Leishmaniose entwickelten, was darauf hindeutet, dass die Belichtung im Gewebe erfolgreich ist. Um nun eine therapeutische Anwendung nachzuahmen, wurden im nächsten Schritt BALB/c Mäuse mit 3×10^6 *L. major* infiziert. Nach 7 und 14 Tagen wurde eine $100 \text{ }\mu\text{M}$ SAPYR-Lösung direkt in die Läsion gespritzt und anschließend belichtet. Dabei zeigte sich eine geringe Abnahme der Fußdicke, was nur einer geringen Verbesserung des Krankheitsverlaufs im Vergleich zur Kontrollgruppe entspricht (persönliche Kommunikation).

Da sich dennoch ein positives Fazit über das Projekt ziehen lässt, ist die weitere Klärung des genauen Wirkmechanismus der verwendeten PS *in-vivo* wichtig. Zudem ist die Frage, ob eine potentiell lokal toxische Wirkung auf die Immunzellen, eine relevante Schädigung des menschlichen Organismus zur Folge hat, von zentraler Bedeutung, um abschließend die Frage zu klären, ob die hier verwendeten PS sicher beim Menschen angewendet werden können. Ferner sollten die photodynamischen Parameter optimiert werden, um unerwünschte Nebenwirkungen auf nichtinfizierte Zellen und Gewebe zu minimieren und gleichzeitig die Effektivität zu erhöhen. Da die Effektivität auch von der Aufnahme des PS durch die Parasiten abhängig ist, sollte sowohl eine detaillierte Aufklärung des Aufnahme- und Adhäsionsmechanismus der PS erfolgen als auch eine geeignete Applikationsform entworfen werden, mit der die PS gut in die kutanen Läsionen eingebracht werden können, damit die Farbstoffkonzentrationen im Gewebe ausreichend hoch sind, um eine photodynamische Reaktion hervorzurufen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die photodynamische Effektivität der PS TMPyP, SAPyR und FLASH-07a bei der Inaktivierung von *L. major* Promastigoten und *L. major* Amastigoten *in-vitro* getestet und miteinander verglichen. Um die Effektivität der einzelnen PS miteinander vergleichen zu können, wurden die Farbstoffe bei gleicher Anzahl an absorbierten Photonen, entsprechend gleicher Anzahl an angeregten Farbstoffmolekülen, miteinander verglichen.

Zusätzlich wurde die Zytotoxizität der PDI auf die Wirtszellen der Leishmanien *in-vitro* evaluiert und mit der photodynamischen Wirkung der PS gegenüber dem Parasiten *L. major* verglichen. Dabei wurde zunächst die immortalisierte J774A.1-Makrophagenzelllinie und in nachfolgenden Experimenten Peritoneal-Exsudat-Makrophagen, die aus C57BL/6 Mäusen isoliert wurden, untersucht.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die drei verwendeten Farbstoffe in Kombination mit sichtbarem Licht zu einer effizienten Inaktivierung von *L. major* Promastigoten führen. Dabei nahm die Effektivität der Inaktivierung in folgender Reihenfolge zu: FLASH-07a < TMPyP < SAPyR. Die PDI der intrazellulär, amastigoten Form von *L. major* mit SAPyR war ebenfalls effektiv.

Gleichzeitig hatte die Photosensibilisierung aber auch auf Wirtszellen, wie die untersuchte J774A.1-Makrophagenzelllinie oder Peritoneal-Exsudat-Makrophagen, eine toxische Wirkung. In diesem Zusammenhang wurde im Anschluss an die in dieser Arbeit vorgestellten *in-vitro* Experimente von Dr. Maximilian Schmid (Institut für Immunologie, Universität Regensburg; seit 01.06.2015: Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Regensburg) untersucht, ob der PS SAPyR von eukaryotischen Zelllinien (J774, HEK293, RAW 264.7, A431) aufgenommen wird. Dabei konnte mittels Fluoreszenzmessung kein direkter Nachweis von SAPyR in Zellen erbracht werden. Um nicht nur Zelllinien auf die Empfindlichkeit gegenüber der PDI zu untersuchen, wurden von Dr. Maximilian Schmid, Teresa Meyer, Felix Grünberger, Kristina Stricker und Julius Dürck (Institut für Immunologie, Universität Regensburg) anschließend Primärzellen aus der Mausmilz durchflusszytometrisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Wirtszellen der Leishmanien (myeloide Zellen) auf eine PDI mit SAPyR empfindlicher reagieren als Lymphozyten (persönliche Kommunikation).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die von unserer Arbeitsgruppe im Folgenden durchgeführten Experimente sollten dazu anregen, noch weitere Experimente zur PDI von Leishmanien mit den PS TMPyP, SAPyR und FLASH-07a zu machen. Dabei sollte weiter untersucht werden, ob die PDI eine schädliche Wirkung auf den menschlichen Organismus hat und ob die PDI optimiert werden kann, um unerwünschte Nebenwirkungen auf nichtinfizierte Zellen und Gewebe zu minimieren und gleichzeitig die Effektivität zu steigern.

Es sollten unbedingt auch andere neue phototoxische Substanzen getestet werden, um die PDI als vielversprechenden neuen Ansatz in der Therapie der kutanen Leishmaniose weiter zu etablieren.

Vorausgesetzt, dass die PS als sicher für die Anwendung beim Menschen angesehen werden, wäre ein langfristiges Ziel, die neuen PS in einer kontrollierten klinischen Studie bei mit *Leishmania* infizierten Patienten zu testen.

Abkürzungsverzeichnis

•OH	Hydroxyl-Radikal
/	Nicht getestet
%	Prozent
°C	Grad Celsius
+/-	mit/ohne
<	Kleiner als
>	Größer als
≤	Kleiner gleich
$O_2^{\bullet -}$	Superoxidanion-Radikal
1O_2	Singulett-Sauerstoff
3O_2	Sauerstoff im Triplettgrundzustand
Abb.	Abbildung
ALA	δ-Aminolävulinsäure
aPDT	Antimikrobielle PDT
BHI-Agar	Brain-Heart-Infusion-Agar
c	Konzentration des Farbstoffs
c_0	Lichtgeschwindigkeit
C16-TTP	5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-Tritolylporphyrin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CL	Kutane Leishmaniose (<i>engl.: cutaneous leishmaniasis</i>)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	Schwellenwertzyklus (<i>engl.: cycle threshold</i>)
d	Dicke der Lösung
DAT	Direkter Agglutinationstest
dDZ	Dermale dendritische Zellen
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DK	Dunkelkontrolle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: deoxyribonucleic acid</i>)

DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>engl.: ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
<i>et al.</i>	Und andere (<i>lat.: et alii</i>)
EtNBSE	5-ethylamino-9-diethylaminobenzo(a)phenoselenazinium Chlorid
FCS	Fötale Kälberserum (<i>engl.: fetal calf serum</i>)
g	Gramm
h	Plancksche Konstante
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
i. m.	intramuskulär
i. v.	intravenös
IFAT	Immunofluoreszenz-Antikörper-Test
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
Ink.	Inkubation
ISC	<i>Intersystem crossing</i>
J	Joule
L	Licht
l	Liter
L	Liter
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
<i>L. M.</i>	<i>Leishmania major</i>
LCL	Lokalisierte kutane Leishmaniose (<i>engl.: localized cutaneous leishmaniasis</i>)
LK	Lichtkontrolle
LST	<i>Leishmanin skin test</i>
M	Molar
MAL	Methyl-Aminolävulinat
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>

min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid
mW	Milliwatt
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NHEKs	Humane Keratinozyten (<i>engl.: normal human epidermal keratinocytes</i>)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMSC	Nicht-Melanom Hautkrebs (<i>engl.: non-melanoma skin cancer</i>)
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
NTC	Nicht-Template Kontrolle (<i>engl.: non template control</i>)
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl.: phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>engl.: polymerase chain reaction</i>)
PDI	Photodynamische Inaktivierung
PDT	Photodynamische Therapie
PEC`s	Peritoneal-Exsudat-Makrophagen (<i>engl. peritoneal exudat cells</i>)
PEI-ce6	Chlorin (e6) + poly-Ethylenimin
P _{em}	Spektrale Bestrahlungsstärke der Lichtquelle
pg	Pikogramm
PKDL	Post-Kala-Azar dermales Leishmanoid
Pl-ce6	Chlorin (e6) + poly-Lysin
PPA904	3,7-Bis (N,N-dibutylamino) Phenothiazin Bromid
PpIX	Protoporphyrin IX
PS	Photosensibilisator
qRT-PCR	Quantitative real time-PCR
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit (<i>engl. relative fluorescence units</i>)

rK39 ICT	Immunchromatografischer rK39 Antikörpertest
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.: ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>engl.: reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.: revolutions per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	Ribosomale RNA
s	Sekunde
S0	Grundzustand
S1	Singulettzustand niedrigster Energie
S2, T2	Angeregte Zustände höherer Energiestufen
SAPyR	2-((4-pyridinyl)methyl)-1H-phenalen-1-one Chlorid
Sb ^v	5-wertige Antimone
SDS	Dodecylsulfat.Na-Salz in Pellets (<i>engl.: sodium dodecyl sulfate</i>)
Sn	Angeregter Zustand, Singulettzustand
SPF	<i>Specific pathogen-free</i>
T	Zeit
T1	Triplettzustand niedrigster Energie
Tab.	Tabelle
TC-Flasche	Zellkulturflasche (<i>engl.: tissue culture</i>)
TH1 Zelle	T-Helfer 1 Zelle
TMPyP	(5,10,15,20-tetrakis (1-methyl-4-pyridino)-porphyrin tetra-(<i>p</i> -toluenesulfonat)
Tn	Angeregter Zustand, Triplettzustand
TPYR-PP	5-(4-hexadecyloxyphenyl)-10,15,20-Tri-pyridylporphyrin
U	Units
VL	Viszerale Leishmaniose (<i>engl.: visceral leishmaniasis</i>)
VRSA	Vancomycin-resistenter Staphylococcus aureus
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>engl.: world health organization</i>)
XF73	Exeporfinium Chlorid
ε	Extinktionskoeffizient

λ	Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
ϕ	Quanteneffizienz

Literaturverzeichnis

- Akilov, O.E., Kosaka, S., O’Riordan, K., Hasan, T.,** 2007a. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 6, 1067–1075. doi:10.1039/b703521g
- Akilov, O.E., Kosaka, S., O’Riordan, K., Hasan, T.,** 2007b. Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Exp. Dermatol.* 16, 651–660. doi:10.1111/j.1600-0625.2007.00578.x
- Alrajhi, A.A., Ibrahim, E.A., De Vol, E.B., Khairat, M., Faris, R.M., Maguire, J.H.,** 2002. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N. Engl. J. Med.* 346, 891–895. doi:10.1056/NEJMoa011882
- Alves, E., Costa, L., Carvalho, C.M.B., Tomé, J.P.C., Faustino, M.A., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.A.S., Cunha, A., Almeida, A.,** 2009. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol.* 9, 70. doi:10.1186/1471-2180-9-70
- Amato, V.S., Tuon, F.F., Camargo, R.A., Souza, R.M., Santos, C.R., Nicodemo, A.C.,** 2011. Can we use a lower dose of liposomal amphotericin B for the treatment of mucosal American leishmaniasis? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85, 818–819. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0287
- Ameen, M.,** 2007. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. *Expert Opin. Pharmacother.* 8, 2689–2699. doi:10.1517/14656566.8.16.2689
- Arana, B.A., Mendoza, C.E., Rizzo, N.R., Kroeger, A.,** 2001. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 466–470.

- Aronson, N.E., Wortmann, G.W., Byrne, W.R., Howard, R.S., Bernstein, W.B., Marovich, M.A., Polhemus, M.E., Yoon, I.-K., Hummer, K.A., Gasser, R.A., Oster, C.N., Benson, P.M.,** 2010. A randomized controlled trial of local heat therapy versus intravenous sodium stibogluconate for the treatment of cutaneous *Leishmania major* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e628. doi:10.1371/journal.pntd.0000628
- Asilian, A., Sadeghinia, A., Faghihi, G., Momeni, A.,** 2004. Comparative study of the efficacy of combined cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) vs. cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) alone for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Dermatol.* 43, 281–283. doi:10.1111/j.1365-4632.2004.02002.x
- Aveline, B.M. (Ed.),** 2001. Primary processes in photosensitization mechanisms, Chapter 2, 1st ed. ed, Comprehensive series in photosciences. Elsevier Science, Amsterdam ; New York.
- Ballou, W.R., McClain, J.B., Gordon, D.M., Shanks, G.D., Andujar, J., Berman, J.D., Chulay, J.D.,** 1987. Safety and efficacy of high-dose sodium stibogluconate therapy of American cutaneous leishmaniasis. *Lancet Lond. Engl.* 2, 13–16.
- Berman, J.D., Badaro, R., Thakur, C.P., Wasunna, K.M., Behbehani, K., Davidson, R., Kuzoe, F., Pang, L., Weerasuriya, K., Bryceson, A.D.,** 1998. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull. World Health Organ.* 76, 25–32.
- Bhattacharya, S.K., Sinha, P.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Jha, T.K., Pandey, K., Das, V.R., Kumar, N., Lal, C., Verma, N., Singh, V.P., Ranjan, A., Verma, R.B., Anders, G., Sindermann, H., Ganguly, N.K.,** 2007. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 196, 591–598. doi:10.1086/519690
- Bogdan, C., Streck, H., Röllinghoff, M., Solbach, W.,** 1989. Cyclosporin A enhances elimination of intracellular *L. major* parasites by murine macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 75, 141–146.
- Braun, V.,** 2013. Die antimikrobielle photodynamische Therapie. *Plaque N Care.*
- Bristow, C.-A., Hudson, R., Paget, T.A., Boyle, R.W.,** 2006. Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 3, 162–167. doi:10.1016/j.pdpdt.2006.04.004

- Cieplik, F., Pummer, A., Regensburger, J., Hiller, K.-A., Späth, A., Tabenski, L., Buchalla, W., Maisch, T., 2015.** The impact of absorbed photons on antimicrobial photodynamic efficacy. *Front. Microbiol.* 6, 706. doi:10.3389/fmicb.2015.00706
- Cieplik, F., Späth, A., Regensburger, J., Gollmer, A., Tabenski, L., Hiller, K.-A., Bäuml, W., Maisch, T., Schmalz, G., 2013.** Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR--an exclusive singlet oxygen photosensitizer. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 477–487. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.031
- Cook, G.C., Zumla, A.I., Manson, P. (Eds.), 2009.** Manson's tropical diseases, 22. ed., reprinted. ed. Saunders, Elsevier, Edinburgh.
- Davidson, R.N., Di Martino, L., Gradoni, L., Giacchino, R., Russo, R., Gaeta, G.B., Pempinello, R., Scott, S., Raimondi, F., Cascio, A., 1994.** Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. *Q. J. Med.* 87, 75–81.
- Davies, M.J., 2003.** Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 761–770.
- Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Peng, Q., 1998.** Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 889–905.
- Dutta, S., Ray, D., Kolli, B.K., Chang, K.-P., 2005.** Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminum phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4474–4484. doi:10.1128/AAC.49.11.4474-4484.2005
- Eichner, A., Gollmer, A., Späth, A., Bäuml, W., Regensburger, J., König, B., Maisch, T., 2015.** Fast and effective inactivation of *Bacillus atrophaeus* endospores using light-activated derivatives of vitamin B2. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 14, 387–396. doi:10.1039/c4pp00285g
- Eichner, A., Gonzales, F.P., Felgenträger, A., Regensburger, J., Holzmann, T., Schneider-Brachert, W., Bäuml, W., Maisch, T., 2013.** Dirty hands: photodynamic killing of human pathogens like EHEC, MRSA and *Candida* within seconds. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 12, 135–147. doi:10.1039/c2pp25164g

- Escobar, P., Hernández, I.P., Rueda, C.M., Martínez, F., Páez, E.,** 2006. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania promastigotes*. *Bioméd. Rev. Inst. Nac. Salud* 26 Suppl 1, 49–56.
- European Dermatology Forum,** n.d. European Dermatology Forum - Guidelines miscellaneous [WWW Document]. URL <http://www.euroderm.org/edf/index.php/edf-guidelines/category/5-guidelines-miscellaneous> (accessed 25.8.16).
- Farrar, J., Hotez, P., Junghanss, T., Gagandeep, K., Laloo, D., White, N., Manson, P. (Eds.),** 2014. *Manson's tropical diseases*, 23. ed. ed. Elsevier Saunders, Edinburgh.
- Faustino, M.A., Neves, M.G., Cavaleiro, J.A., Neumann, M., Brauer, H.D., Jori, G.,** 2000. meso-tetraphenylporphyrin dimer derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy. Part 2. *Photochem. Photobiol.* 72, 217–225.
- Felgenträger, A., Maisch, T., Dobler, D., Späth, A.,** 2013. Hydrogen bond acceptors and additional cationic charges in methylene blue derivatives: photophysics and antimicrobial efficiency. *BioMed Res. Int.* 2013, 482167. doi:10.1155/2013/482167
- Franke, E.D., Llanos-Cuentas, A., Echevarria, J., Cruz, M.E., Campos, P., Tovar, A.A., Lucas, C.M., Berman, J.D.,** 1994. Efficacy of 28-day and 40-day regimens of sodium stibogluconate (Pentostam) in the treatment of mucosal leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 77–82.
- Friães, A., Resina, C., Manuel, V., Lito, L., Ramirez, M., Melo-Cristino, J.,** 2015. Epidemiological survey of the first case of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Europe. *Epidemiol. Infect.* 143, 745–748. doi:10.1017/S0950268814001423
- Ganz, R.A., Viveiros, J., Ahmad, A., Ahmadi, A., Khalil, A., Tolkoff, M.J., Nishioka, N.S., Hamblin, M.R.,** 2005. *Helicobacter pylori* in patients can be killed by visible light. *Lasers Surg. Med.* 36, 260–265. doi:10.1002/lsm.20161
- Giuliani, F., Martinelli, M., Cocchi, A., Arbia, D., Fantetti, L., Roncucci, G.,** 2010. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 637–642. doi:10.1128/AAC.00603-09
- Gleckman, R.A., Borrego, F.,** 1997. Adverse reactions to antibiotics. Clues for recognizing, understanding, and avoiding them. *Postgrad. Med.* 101, 97–98, 101–104, 107–108.

- González, U., Pinart, M., Reveiz, L., Alvar, J.,** 2008. Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD005067. doi:10.1002/14651858.CD005067.pub3
- Grinholc, M., Szramka, B., Kurlenda, J., Graczyk, A., Bielawski, K.P.,** 2008. Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent. *J. Photochem. Photobiol. B* 90, 57–63. doi:10.1016/j.jphotobiol.2007.11.002
- Hamblin, M.R., Zahra, T., Contag, C.H., McManus, A.T., Hasan, T.,** 2003. Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections in vivo. *J. Infect. Dis.* 187, 1717–1725. doi:10.1086/375244
- Hernández, I.P., Montanari, J., Valdivieso, W., Morilla, M.J., Romero, E.L., Escobar, P.,** 2012. In vitro phototoxicity of ultradeformable liposomes containing chloroaluminum phthalocyanine against New World *Leishmania* species. *J. Photochem. Photobiol. B* 117, 157–163. doi:10.1016/j.jphotobiol.2012.09.018
- Herwaldt, B.L., Berman, J.D.,** 1992. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 296–306.
- Kharkwal, G.B., Sharma, S.K., Huang, Y.-Y., Dai, T., Hamblin, M.R.,** 2011. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg. Med.* 43, 755–767. doi:10.1002/lsm.21080
- Knak, A., Regensburger, J., Maisch, T., Bäumlner, W.,** 2014. Exposure of vitamins to UVB and UVA radiation generates singlet oxygen. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 13, 820–829. doi:10.1039/c3pp50413a
- Kosaka, S., Akilov, O.E., O’Riordan, K., Hasan, T.,** 2007. A mechanistic study of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1546–1549. doi:10.1038/sj.jid.5700719
- Kramer-Marek, G., Serpa, C., Szurko, A., Widel, M., Sochanik, A., Snietura, M., Kus, P., Nunes, R.M.D., Arnaut, L.G., Ratuszna, A.,** 2006. Spectroscopic properties and photodynamic effects of new lipophilic porphyrin derivatives: efficacy, localisation and cell death pathways. *J. Photochem. Photobiol. B* 84, 1–14. doi:10.1016/j.jphotobiol.2005.12.011

- Krause, G., Kroeger, A.**, 1994. Topical treatment of American cutaneous leishmaniasis with paramomycin and methylbenzethonium chloride: a clinical study under field conditions in Ecuador. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 92–94.
- Kuimova, M.K., Collins, H.A., Balaz, M., Dahlstedt, E., Levitt, J.A., Sergent, N., Suhling, K., Drobizhev, M., Makarov, N.S., Rebane, A., Anderson, H.L., Phillips, D.**, 2009. Photophysical properties and intracellular imaging of water-soluble porphyrin dimers for two-photon excited photodynamic therapy. *Org. Biomol. Chem.* 7, 889–896. doi:10.1039/b814791d
- Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH**, n.d. Details: ACC-170 / J-774A.1- Zellen [WWW Document]. URL https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-170.html?tx_dsmzresources_pi5%255BreturnPid%255D (accessed 12.11.15).
- Lembo, A.J., Ganz, R.A., Sheth, S., Cave, D., Kelly, C., Levin, P., Kazlas, P.T., Baldwin, P.C., Lindmark, W.R., McGrath, J.R., Hamblin, M.R.**, 2009. Treatment of *Helicobacter pylori* infection with intra-gastric violet light phototherapy: a pilot clinical trial. *Lasers Surg. Med.* 41, 337–344. doi:10.1002/lsm.20770
- Levy, J.G., Obochi, M.**, 1996. New applications in photodynamic therapy. Introduction. *Photochem. Photobiol.* 64, 737–739.
- Löscher, T., Burchard, G.-D., Lang, W., Bendick, C. (Eds.)**, 2010. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis: mit Reise- und Migrationsmedizin*, 4., komplett überarb. und erw. Aufl. ed. Thieme, Stuttgart.
- Luan, X.L., Qin, Y.L., Bi, L.J., Hu, C.Y., Zhang, Z.G., Lin, J., Zhou, C.N.**, 2009. Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers Med. Sci.* 24, 162–166. doi:10.1007/s10103-007-0513-3
- Lulic, M., Leiggener Görög, I., Salvi, G.E., Ramseier, C.A., Mattheos, N., Lang, N.P.**, 2009. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* 36, 661–666. doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01432.x
- Lushchak, V.I.**, 2001. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochem. Biokhimiia* 66, 476–489.

- Machado, P.R.L., Lessa, H., Lessa, M., Guimarães, L.H., Bang, H., Ho, J.L., Carvalho, E.M.,** 2007. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 44, 788–793. doi:10.1086/511643
- Magill, A.J. (Ed.),** 2013. *Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases*, Ninth edition. ed. Saunders/Elsevier, London.
- Mah, T.F., O'Toole, G.A.,** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9, 34–39.
- Maisch, T.,** 2009. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 974–983.
- Maisch, T.,** 2007. *Photodynamische Inaktivierung von Bakterien* Springer Spektrum, 751–753.
- Maisch, T., Baier, J., Franz, B., Maier, M., Landthaler, M., Szeimies, R.-M., Bäumlner, W.,** 2007. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7223–7228. doi:10.1073/pnas.0611328104
- Maisch, T., Bosl, C., Szeimies, R.-M., Lehn, N., Abels, C.,** 2005. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1542–1552. doi:10.1128/AAC.49.4.1542-1552.2005
- Maisch, T., Eichner, A., Späth, A., Gollmer, A., König, B., Regensburger, J., Bäumlner, W.,** 2014. Fast and effective photodynamic inactivation of multiresistant bacteria by cationic riboflavin derivatives. *PloS One* 9, e111792. doi:10.1371/journal.pone.0111792
- Maisch, T., Hackbarth, S., Regensburger, J., Felgenträger, A., Bäumlner, W., Landthaler, M., Röder, B.,** 2011. Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - a new approach to treat superficial infections in the 21st century. *J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG* 9, 360–366. doi:10.1111/j.1610-0387.2010.07577.x
- Maisch, T., Wagner, J., Papastamou, V., Nerl, H.-J., Hiller, K.-A., Szeimies, R.-M., Schmalz, G.,** 2009. Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry in vitro. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1569–1578. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04342.x

- Malik, Z., Ladan, H., Nitzan, Y.,** 1992. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J. Photochem. Photobiol. B* 14, 262–266.
- Melaku, Y., Collin, S.M., Keus, K., Gatluak, F., Ritmeijer, K., Davidson, R.N.,** 2007. Treatment of kala-azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: a retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 89–94.
- Momeni, A.Z., Aminjavaheri, M.,** 1995. Treatment of recurrent cutaneous Leishmaniasis. *Int. J. Dermatol.* 34, 129–133.
- Morton, C., Szeimies, R.-M., Sidoroff, A., Wennberg, A.-M., Basset-Seguín, N., Calzavara-Pinton, P., Gilaberte, Y., Hofbauer, G., Hunger, R., Karrer, S., Lehmann, P., Piaserico, S., Ulrich, C., Braathen, L., European Dermatology Forum,** 2015. European Dermatology Forum Guidelines on topical photodynamic therapy. *Eur. J. Dermatol. EJD* 25, 296–311. doi:10.1684/ejd.2015.2570
- Mosmann, T.,** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Nacher, M., Carme, B., Sainte Marie, D., Couppié, P., Clyti, E., Guibert, P., Pradinaud, R.,** 2001. Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 95, 331–336. doi:10.1080/00034980120064355
- Navin, T.R., Arana, B.A., Arana, F.E., Berman, J.D., Chajón, J.F.,** 1992. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J. Infect. Dis.* 165, 528–534.
- Nitzan, Y., Gutterman, M., Malik, Z., Ehrenberg, B.,** 1992. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem. Photobiol.* 55, 89–96.
- Paramchuk, W.J., Ismail, S.O., Bhatia, A., Gedamu, L.,** 1997. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 90, 203–221.
- Perez, A.P., Casasco, A., Schilrreff, P., Tesoriero, M.V.D., Defain Tesoriero, M.V., Duempelmann, L., Altube, M.J., Higa, L., Morilla, M.J., Petray, P., Romero, E.L.,** 2014. Enhanced photodynamic leishmanicidal activity of hydrophobic zinc phthalocyanine within archaeolipids containing liposomes. *Int. J. Nanomedicine* 9, 3335–3345. doi:10.2147/IJN.S60543

- Pschyrembel, W., Witzel, S., Dornblüth, O. (Eds.),** 2007. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 261., neu bearb. und erw. Aufl. ed. de Gruyter, Berlin.
- Ramesh, V., Katara, G.K., Verma, S., Salotra, P.,** 2011. Miltefosine as an effective choice in the treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Br. J. Dermatol.* 165, 411–414. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10402.x
- Reithinger, Dujardin, Louzir,** 2007. *Lancet Infectious Diseases*, Cutaneous leishmaniasis.
- Reithinger, R., Mohsen, M., Wahid, M., Bismullah, M., Quinnell, R.J., Davies, C.R., Kolaczinski, J., David, J.R.,** 2005. Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan: a randomized, controlled trial. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 40, 1148–1155. doi:10.1086/428736
- Rieger, S.,** 2014. Die antimikrobielle photodynamische Therapie in der Parodontologie. Quintessenz.
- Rieger, S.,** 2012. Die antimikrobielle photodynamische Therapie in der Parodontologie – aktueller Wissensstand. ZMK.
- Ritmeijer, K., Dejenie, A., Assefa, Y., Hundie, T.B., Mesure, J., Boots, G., den Boer, M., Davidson, R.N.,** 2006. A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 43, 357–364. doi:10.1086/505217
- Ritter, U.,** 2012. Presentation of Skin-Derived *Leishmania* Antigen by Dendritic Cell Subtypes, Chapter 9, Immune Response to Parasitic Infections. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS.
- Ritter, U., Moll, H., Laskay, T., Bröcker, E., Velazco, O., Becker, I., Gillitzer, R.,** 1996. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 173, 699–709.
- RKI,** 2014. Epidemiologisches Bulletin 42/2014. Berlin.
- RKI (Ed.),** 2011. Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten, Neuaufl. ed. Robert-Koch-Institut, Berlin.
- Rodriguez, L.V., Dedet, J.P., Paredes, V., Mendoza, C., Cardenas, F.,** 1995. A randomized trial of amphotericin B alone or in combination with itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90, 525–528.

- Sadeghian, G., Nilforoushzadeh, M.A.,** 2006. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Dermatol.* 45, 819–821. doi:10.1111/j.1365-4632.2006.02867.x
- Sanchez, J.D.,** 2014a. PAHO WHO | Visceral Leishmaniasis [WWW Document]. Pan Am. Health Organ. World Health Organ. URL http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420&Itemid=39347&lang=en (accessed 24.8.16).
- Sanchez, J.D.,** 2014b. PAHO WHO | Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis [WWW Document]. Pan Am. Health Organ. World Health Organ. URL http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417&Itemid=39345&lang=en (accessed 24.8.16).
- Schäfer, M., Schmitz, C., Horneck, G.,** 1998. High sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to photodynamically-produced singlet oxygen. *Int. J. Radiat. Biol.* 74, 249–253.
- Schulz, A., Mellenthin, K., Schönian, G., Fleischer, B., Drosten, C.,** 2003. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1529–1535.
- Sgolastra, F., Petrucci, A., Severino, M., Graziani, F., Gatto, R., Monaco, A.,** 2013. Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Periodontol.* 40, 514–526. doi:10.1111/jcpe.12094
- Sharma, S.K., Dai, T., Kharkwal, G.B., Huang, Y.-Y., Huang, L., De Arce, V.J.B., Tegos, G.P., Hamblin, M.R.,** 2011. Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models. *Curr. Pharm. Des.* 17, 1303–1319.
- Solbach, W., Forberg, K., Kammerer, E., Bogdan, C., Röllinghoff, M.,** 1986. Suppressive effect of cyclosporin A on the development of *Leishmania tropica*-induced lesions in genetically susceptible BALB/c mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 137, 702–707.
- Soto, J., Arana, B.A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J.C., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J.D., Junge, K., Engel, J., Sindermann, H.,** 2004. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 38, 1266–1272. doi:10.1086/383321

- Soto, J., Buffet, P., Grogl, M., Berman, J.**, 1994. Successful treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis with four injections of pentamidine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 107–111.
- Soto, J., Toledo, J., Valda, L., Balderrama, M., Rea, I., Parra, R., Ardiles, J., Soto, P., Gomez, A., Molleda, F., Fuentelsaz, C., Anders, G., Sindermann, H., Engel, J., Berman, J.**, 2007. Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 44, 350–356. doi:10.1086/510588
- Soukos, N.S., Goodson, J.M.**, 2011. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol.* 2000 55, 143–166. doi:10.1111/j.1600-0757.2010.00346.x
- Stewart, P.S.**, 1998. A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 59, 261–272.
- Stewart, P.S., Costerton, J.W.**, 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet Lond. Engl.* 358, 135–138.
- Sundar, S., Chakravarty, J.**, 2010. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. *J. Glob. Infect. Dis.* 2, 159–166. doi:10.4103/0974-777X.62886
- Sundar, S., Chakravarty, J., Agarwal, D., Rai, M., Murray, H.W.**, 2010. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N. Engl. J. Med.* 362, 504–512. doi:10.1056/NEJMoa0903627
- Sundar, S., Chakravarty, J., Rai, V.K., Agrawal, N., Singh, S.P., Chauhan, V., Murray, H.W.**, 2007a. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 45, 556–561. doi:10.1086/520665
- Sundar, S., Jha, T.K., Thakur, C.P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A., Berman, J.**, 2002. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* 347, 1739–1746. doi:10.1056/NEJMoa021556
- Sundar, S., Jha, T.K., Thakur, C.P., Sinha, P.K., Bhattacharya, S.K.**, 2007b. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. *N. Engl. J. Med.* 356, 2571–2581. doi:10.1056/NEJMoa066536

- Sundar, S., Sinha, P.K., Rai, M., Verma, D.K., Nawin, K., Alam, S., Chakravarty, J., Vaillant, M., Verma, N., Pandey, K., Kumari, P., Lal, C.S., Arora, R., Sharma, B., Ellis, S., Strub-Wourgaft, N., Balasegaram, M., Olliaro, P., Das, P., Modabber, F., 2011.** Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 377, 477–486.
doi:10.1016/S0140-6736(10)62050-8
- Takasaki, A.A., Aoki, A., Mizutani, K., Schwarz, F., Sculean, A., Wang, C.-Y., Koshy, G., Romanos, G., Ishikawa, I., Izumi, Y., 2009.** Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol.* 2000 51, 109–140. doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00302.x
- Tavares, A., Carvalho, C.M.B., Faustino, M.A., Neves, M.G.P.M.S., Tomé, J.P.C., Tomé, A.C., Cavaleiro, J.A.S., Cunha, A., Gomes, N.C.M., Alves, E., Almeida, A., 2010.** Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar. Drugs* 8, 91–105. doi:10.3390/md8010091
- Taylor, V.M., Cedeño, D.L., Muñoz, D.L., Jones, M.A., Lash, T.D., Young, A.M., Constantino, M.H., Esposito, N., Vélez, I.D., Robledo, S.M., 2011.** In vitro and in vivo studies of the utility of dimethyl and diethyl carbaporphyrin ketals in treatment of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4755–4764. doi:10.1128/AAC.00671-11
- Thakur, C.P., Narain, S., Kumar, N., Hassan, S.M., Jha, D.K., Kumar, A., 1997.** Amphotericin B is superior to sodium antimony gluconate in the treatment of Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91, 611–616.
- Valduga, G., Bertoloni, G., Reddi, E., Jori, G., 1993.** Effect of extracellularly generated singlet oxygen on gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B* 21, 81–86.
- Van der Snoek, E.M., Robinson, D.J., van Hellemond, J.J., Neumann, H. a. M., 2008.** A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 22, 918–922. doi:10.1111/j.1468-3083.2008.02805.x

- Vega, J.C., Sanchez, B.F., Montero, L.M., Montaña, R., Mahecha, M. del P., Dueñas, B., Baron, A.R., Reithinger, R.,** 2009. The efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparative observational study in an operational setting. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 703–706. doi:10.1016/j.trstmh.2008.10.039
- WHO,** 2015a. WHO | Leishmaniasis, Fact Sheet N°375 [WWW Document]. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> (accessed 5.7.15).
- WHO,** 2015b. WHO | Endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2013 [WWW Document]. URL http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_CL.png (accessed 17.8.15).
- WHO,** 2015c. WHO | Endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2013 [WWW Document]. URL http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_VL.png (accessed 17.8.15).
- WHO,** 2013. WHO | Photos on leishmaniasis for download [WWW Document]. URL <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/photos/leishmaniasis/en/> (accessed 14.7.15).
- WHO,** n.d. WHO | Leishmaniasis, Situation and trends [WWW Document]. URL http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/ (accessed 5.7.15).
- WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases (Ed.),** 2010. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010, WHO technical report series. World Health Organization, Geneva.
- Wilder-Smith, C.H., Wilder-Smith, P., Grosjean, P., van den Bergh, H., Woodtli, A., Monnier, P., Dorta, G., Meister, F., Wagnières, G.,** 2002. Photoeradication of *Helicobacter pylori* using 5-aminolevulinic acid: preliminary human studies. *Lasers Surg. Med.* 31, 18–22. doi:10.1002/lsm.10066
- Wilkinson, F., Helman, W.P., Ross, A.B.,** 1993. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 22, 113–262.

- Wortmann, G., Zapor, M., Ressler, R., Fraser, S., Hartzell, J., Pierson, J., Weintrob, A., Magill, A.,** 2010. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83, 1028–1033.
doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0171
- Zane, C., De Panfilis, G., Calzavara-Pinton, P. (Eds.),** 2001. Photosensitizers- Systemic sensitization, Chapter 7, 1st ed. ed, *Comprehensive series in photosciences.* Elsevier Science, Amsterdam ; New York.
- Zijlstra, E.E., Musa, A.M., Khalil, E. a. G., el-Hassan, I.M., el-Hassan, A.M.,** 2003. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 3, 87–98.

Anhang

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist erschienen:

- Posterpräsentation „ Photodynamic inactivation of *Leishmania major* parasites by SAPYR“ beim zehnten internationalen Symposium über Photodynamische Therapie und Photodiagnostik in der klinischen Praxis, 14. - 18. Oktober 2014 in Brixen, Italien.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt den Betreuern dieser Doktorarbeit, Prof. Dr. Uwe Ritter und PD Dr. Tim Maisch, die mir dieses interessante Thema überlassen haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Danke für die gute, unkomplizierte Zusammenarbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Maximilian Schmid, für die Hilfe im Labor.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Immunologie danke ich für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Mein Dank gilt ferner der Lektorin dieser Arbeit, meiner Mutter Ulrike.

Meinen Eltern, meiner Schwester Melanie, Mubin und Zina danke dafür, dass wir eine so tolle Familie sind.

Ich danke Jens, der immer an meiner Seite ist.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne die 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 Arbeiten 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 23.01.2017

Anna Sophia Hurst