

## 2 PROBLEMSTELLUNG

Die selektive Anreicherung im Zielgewebe stellt eine pharmakokinetische Größe dar, d.h., sie ist unter anderem substanz- und gewebskompartimentspezifisch und auch zeitabhängig. Der Wirkungsgrad für die Lichtenergieumwandlung hingegen ist eine physikalische Größe, die sich analog zum Absorptionsspektrum für jede einzelne Substanz spezifisch verhält, und von der jeweiligen applizierten Lichtwellenlänge abhängt<sup>76</sup>.

Die Basis der therapeutischen Wirkung der PDT liegt in der Reaktivität der Superoxid-, Hydroxyl- und Peroxidradikale und des Singulett-Sauerstoffs, die durch die Wirkung der angeregten Photosensibilisatormoleküle aus Sauerstoff entstehen können. Diese Reaktionsfreudigkeit ist gleichbedeutend mit einer extremen Kurzlebigkeit der Produkte, deren experimenteller Nachweis dementsprechend schwierig ist.

Die verschiedenen Photosensibilisatoren erzeugen unterschiedlich große absolute Mengen an aktiviertem Sauerstoff bei sonst gleichen Parametern. Es gibt auch eine große Variation der relativen Mengen von generierten Typ I- und Typ II-Produkten. Weil die physikochemischen Eigenschaften dieser Produkte wie Redoxpotential, Löslichkeit und Polarität so verschieden sind, kann man differierende biologische Auswirkungen erwarten. Dies beeinflusst wiederum die Wirksamkeit von Photosensibilisatoren, die unter den gleichen klinischen Bedingungen eingesetzt werden.

Es existieren physikalische, chemische und biologische Methoden, die die  $^1\text{O}_2$ -Generierung verschiedener Photosensibilisatoren quantitativ erfassen können. Spezifische Methoden für den Nachweis insbesondere von  $^1\text{O}_2$  schließen die Lumineszenz und die Oxidation von Reagenzien wie z. B. 2,5-Diphenylfuran ein. Vertreter biologischer Meßverfahren schließen die Degradation verschiedener Aminosäuren, wie z.B. Tryptophan oder Photobleaching von Chromophoren ein. Auch die Wirkung der ROS auf Enzyme wurde eingesetzt.

Zu den physikalischen Methoden zählt auch die *ElektronenSpinResonanz (ESR)*. Sie ist von den genannten Methoden die einzige, die nicht nur die Möglichkeit bietet, unter einheitlichen Bedingungen den Nachweis der Bildung sowohl der Sauerstoffradikale als auch des Singulett-Sauerstoffs qualitativ und quantitativ zu messen, sondern noch dazu, diese

Untersuchungen in wäßrigem Milieu durchzuführen<sup>77</sup>.

Radikale sind durch das Vorhandensein eines Einzelelektrons als Teil ihrer Molekülstruktur gekennzeichnet<sup>78</sup>. Die ESR stützt sich auf die energetischen Zustände dieser Elektronen, die als elementare Magneten agieren, und dadurch den Einfluß ihrer nächsten Umgebung, d.h. ihrer eigenen Moleküle, spezifisch widerspiegeln. Mit der Hilfe von Analyseprogrammen können die Radikale anhand von Spektren genau identifiziert werden.

Gerade die Reaktionsfreudigkeit der aktivierten Sauerstoffspezies, die der toxischen und therapeutischen Wirkung der PDT zugrunde liegt, ist gleichzeitig ein großes experimentelles Hindernis für jeglichen Versuch, diese Stoffe nachzuweisen. Sie haben nur eine sehr kurze Lebensdauer, die im Bereich von Nano- bis Mikrosekunden liegt. Wegen der außerordentlichen Kurzlebigkeit wird der Einsatz von sogenannten *Spintraps* erforderlich. Diese Verbindungen können extrem rasch viel stabilere Addukte mit den Radikalen bilden, die die Radikalnatur behalten, d.h. ohne die Einzelelektronen in feste chemische Bindungen zu bringen. Die Spezifität bezüglich des jeweiligen Radikals bleibt erhalten.

Auch Singulett-Sauerstoff kann auf indirekte Weise durch die ESR spezifisch nachgewiesen werden. Er bildet nämlich mit manchen organischen Verbindungen, den Spintraps verwandt, langlebige Radikale. Diese werden dann mittels der ESR nachgewiesen<sup>79</sup>.

Durch Variation des Magnetfelds bei konstanter Mikrowellenfrequenz finden Übergänge des Einzelelektrons zu unterschiedlichen Feldstärken statt. Dadurch ergeben sich typische Spektren für die einzelnen Addukte. Aufgrund des Spektrumbildes und der Positionen der Spitzen dieser Spektren gelingt eine eindeutige, spezifische Zuordnung zu Spin-Trap-Radikaladdukten. Beispielhaft sind in Abbildung 36 (S. 69) typische Spektren dargestellt.

Neben der qualitativen Analyse können die Spektren auch quantitativ ausgewertet werden. Die Amplitude des detektierten Signals verändert sich mit der Konzentration der Spintrap-Addukte. Sie erlaubt daher im Vergleich die Ermittlung der relativen Intensität, oder im Vergleich zu Referenzspektren die Konzentration des Spintrap-Adduktes.

Vereinfacht ausgedrückt entstehen Radikale durch Elektronentransfer (Typ I-Reaktion), Singulett-Sauerstoff durch Energietransfer (Typ II-Reaktion). Anhand der Erzeugung von langlebigen Radikalen spezifisch durch Singulett-Sauerstoff erlaubt die Methode der Elektronenspinresonanz den direkten Vergleich der Generierung sowohl von Radikalen als auch von Singulett-Sauerstoff durch verschiedene Photosensibilisatoren.

Reaktionstyp	Spezies
Typ I	Hydroxylradikal $\text{OH}\bullet$
	Hydroperoxid $\text{HO}_2^-$
	Superoxid(radikal) $\text{O}_2^-\bullet$
Typ II	Singulett-Sauerstoff: $^1\text{O}_2$

**Tabelle 1                      Aktivierte Sauerstoffspezies, die im Rahmen einer  
Typ 1- oder Typ II-Reaktion gebildet werden können**

In dieser Arbeit waren die Ziele :

- Die grundsätzliche Erforschung der Möglichkeit, anhand der ESR quantitative und verlässliche Aussagen bezüglich der Generierung von aktivierten Sauerstoffspezies im Rahmen der PDT zu machen
- Eine Spezifizierung der Erzeugung dieser Spezies, sowohl in Form von verschiedenen Radikalen als auch von Singulett-Sauerstoff
- Die Entwicklung von Methoden zur vergleichenden Quantifizierung einer solchen Erzeugung durch klinisch repräsentativen Photosensibilisatoren