

## 5 DISKUSSION

Alle Photosensibilisatoren bilden reaktive Sauerstoffspezies in der Form von  $^1\text{O}_2$  oder auch Radikale, die für die Wirkung der PDT verantwortlich sind. Vor kurzem wurde auch der qualitative Nachweis der Bildung von  $^1\text{O}_2$  durch Photosensibilisatoren *in vivo* erbracht<sup>105</sup>. Somit besteht prinzipiell die Möglichkeit, die Effektivität der PDT anhand der Quantifizierung der gebildeten ROS zu messen.

Die physikalische Methode der Lumineszenzdetektion kann  $^1\text{O}_2$  anhand der Emission eines Lichtquants und mit der Wellenlänge von 1270 nm hochspezifisch nachweisen. Dieses Verfahren liefert allerdings keine direkten Erkenntnisse bezüglich der Erzeugung, sondern nur bezüglich des Zerfalls von  $^1\text{O}_2$ . Sie gibt zudem keine Auskunft über weitere Reaktionen, wie z.B. Elektronentransfer-Reaktionen mit Radikalbildung, die für verschiedene Photosensibilisatoren nachgewiesen werden konnten. Außerdem werden diese Messungen häufig in mit  $\text{D}_2\text{O}$ -substituierten Lösungen durchgeführt, um die sonst sehr geringe Sensitivität der Meßmethode zu erhöhen. Diese Substitution verbessert die Qualität der Meßergebnisse erheblich, da sie die Möglichkeit des nicht-radiativen Zerfalls des  $^1\text{O}_2$  reduziert, und die Lebensdauer des Singulett-Sauerstoffs um ein mehrfaches verlängert. Messungen in physiologischen Lösungen, wie sie für aussagekräftige Untersuchungen zu fordern sind, sind mit diesem Meßverfahren schwer durchzuführen<sup>106</sup>.

Chemische Meßverfahren beruhen meistens auf einer Oxidation von Doppelbindungen. Hierzu zählen beispielsweise die Oxidation von 2,5-Dimethylfuran zu 2-Methoxy-5-Hydroperoxy-2,5-Dimethyldihydrofuran, oder 2,5-Diphenylfuran zu *cis*-Benzoylthylen<sup>101,103</sup>. Messungen in rein physiologischen Lösungen sind nicht möglich. Es werden organische Lösungsmittel wie Methanol zugesetzt, die oxidierbar sind, und somit die Generierung von Sauerstoffradikalen beeinflussen können. Alternativ wurde von anderen die Umsetzung von 1,3-Diphenylisobenzofuran als spezifische Nachweismethode für  $^1\text{O}_2$  eingesetzt<sup>107,108</sup>. Generell setzen solche Methoden die Furane als "Quencher" ein, indem sie deren protektive Wirkung gegen die Oxidation von organischen Substraten durch Singulett-Sauerstoff benutzen. Sie sind somit indirekte Nachweismethoden.

Vertreter biologischer Meßverfahren schließen die Degradation von verschiedenen Aminosäuren wie z.B. Tryptophan, die spezifische Erzeugung von verschiedenen Hydroperoxiden durch die Oxidation von Cholesterol<sup>109</sup>, und das Photobleaching von Chromophoren ein. So untersuchten Gottfried et al<sup>110</sup> die Quantenausbeute nach Anregung von unterschiedlichen Photosensibilisatoren wie Hämatoporphyrinderivat und Photofrin II<sup>®</sup> anhand des Sauerstoffverbrauchs, der Tryptophandegradation und des Photobleaching von p-Nitrosodimethylanilin bei Wellenlängen von 540 nm bzw. 630 nm. Auch die Wirkung der ROS auf Enzyme wurde eingesetzt. Fernandez et al<sup>111</sup> benutzten die Inaktivierung von Hühner-Lysozym als Maß für die <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Generierung durch u.a. PpIX, Photofrin<sup>®</sup> und Hämatoporphyrin IX bei den Wellenlängen 546 nm und 630 nm.

Diese Verfahren sind mit physiologischen Lösungen durchführbar, weisen aber eine für quantitative Messungen nur unzureichende Spezifität bezüglich der <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Generierung auf, da die eingesetzten Substanzen auch mit Radikalen reagieren können.

Auch mittels der ESR ist es möglich, quantitative und spezifische Messungen der <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Generierung anhand der Oxidation von TEMP zu machen. Gerade die ESR bietet nicht nur die Möglichkeit der Quantifizierung der "Wirksamkeit" der verschiedenen Photosensibilisatoren anhand deren Vermögen, reaktiven Sauerstoff zu erzeugen, sondern darüber hinaus die Möglichkeit, zwischen den Photosensibilisatoren hinsichtlich der Unterschiede in den relativen Anteilen der generierten ROS zu differenzieren. Während die Anteile der so gebildeten Radikale und <sup>1</sup>O<sub>2</sub> untereinander unter gegebenen Bedingungen für einen bestimmten Photosensibilisator konstant sind, weisen die relativen Beiträge zwischen den verschiedenen Photosensibilisatoren Unterschiede auf. Dies haben ESR-Versuche mit dem Spintrap DMPO zeigen können<sup>99</sup>. Darüber hinaus kann die ESR eine Singulett-Sauerstofferzeugung durch klinisch eingesetzte cw-Laser bei 633 nm und in wäßrigen Lösungen messen.

Bei dieser Arbeit wurde zunächst eine Prüfung der Streuung der Meßwerte an zehn Tagen durchgeführt. Diese wies eine Standardabweichung von unter 3 % nach. Diese Wiederholbarkeit belegte die meßtechnische Stabilität des Systems.

### 5.1 Untersuchung zur Spezifität der Generierung von Singulett-Sauerstoff

Photosensibilisatoren aus den Klassen von Farbstoffen und Phthalocyaninen können neben Singulett-Sauerstoff auch Radikale der Typ I-Reaktion wie z.B. Hydroxylradikale bilden.

Als spezifischer Reaktionspartner für Singulett-Sauerstoff wurde die hydrophobe Substanz Tetramethylpiperidin (TEMP) verwendet, die mittels des Emulgators Triton-X in Lösung gebracht wurde. Um die Spezifität der Singulett-Sauerstoffmessung mit unserem System zu überprüfen, wurden die Singulett-Sauerstoffquencher Histidin und  $\beta$ -Karatol eingesetzt. Zum Nachweis von Radikalen wurde DMPO eingesetzt. Da in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, daß die Bildung von Radikalen durch Typ I-Reaktionen nach Anregung von Porphyrinderivaten unter der Nachweisgrenze unseres ESR-Systems lag, wurde hierfür der Farbstoff Methyleneblau verwendet<sup>99</sup>. Reaktionslösungen wurden mit einer Methyleneblau-Endkonzentration von 0,1 mM und mit  $\beta$ -Karatol bzw. unterschiedlichen Konzentrationen von Histidin hergestellt.  $^1\text{O}_2$  reagiert chemisch mit Histidin, während es mit  $\beta$ -Karatol in erster Linie energetisch reagiert, und in den  $^3\text{O}_2$  Grundzustand zurückkehrt. Durch die Zugabe von  $\beta$ -Karatol und Histidin konnte ein mit TEMP gebildetes Signal unterdrückt werden. Im Gegensatz dazu übten die beiden Substanzen keinen Einfluß auf die Bildung von DMPO-OH-Addukten aus. Mit steigender Konzentration von Histidin im Intervall von 0 - 0,5 mM konnte das TEMP-Signal vollständig unterdrückt werden. Im Gegensatz dazu wurde die Bildung von DMPO-OH-Addukten durch Histidin in diesen Konzentrationen nicht unterdrückt.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß Singulett-Sauerstoff für die Bildung von TEMP verantwortlich ist. Radikale wie z.B. OH-Radikale können mit TEMP nicht direkt detektiert werden. Sie üben keinen Einfluß auf die TEMP-Bildung aus.

### 5.2 Vorversuche zur Untersuchung der Singulett-Sauerstoffgenerierung

Um eine optimale Konzentration der Reagenzien zu ermitteln, wurde zunächst die Bildung von TEMP in Abhängigkeit von der TEMP-Konzentration untersucht. Diese Versuche fanden bei einer konstanten Konzentration von Photosan 3<sup>®</sup> von 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  statt, da diese in den Vorversuchen ein gutes TEMP-Signal insbesondere bei niedrigeren TEMP-Konzentrationen ermöglichte. Lösungen mit Konzentrationen von TEMP zwischen 40 und 80 mM wiesen ein lineares Verhältnis zum TEMP-Signal bei einer vorgegebenen Energie von 100 J auf. Da TEMP bei Raumtemperatur flüssig ist, wurde eine TEMP-Konzentration im Reaktionsansatz

von 10 µl/ml für die Untersuchungen gewählt, entsprechend 59 mM.

In unseren darauffolgenden Messungen stieg das Signal bei Photosan 3<sup>®</sup>- und Photofrin II<sup>®</sup>-Konzentrationen im Bereich von 1 bis 3 µg/ml und bei konstanter TEMP-Konzentration von 59 mM mit zunehmender eingestrahelter Gesamtenergie anfänglich linear an. Hierbei konnte die Linearität der TEMPO-Bildung in Abhängigkeit von der Photosensibilisatorkonzentration im Bereich von 1 µg/ml für beide Porphyrinderivate bestätigt werden. Somit erwies sich diese Konzentration als zweckmäßig für die weiteren Untersuchungen.

### 5.3 Ergebnisse der quantitativen Vergleiche

Nach der oben beschriebenen Optimierung des Meßsystems und der Reaktionsbedingungen wurde die Singulett-Sauerstoffgenerierung unterschiedlicher Porphyrinderivate anhand der TEMPO-Bildung untersucht. Als Porphyrinderivate wurden das Polyhämatoporphyrinderivat Photosan 3<sup>®</sup>, Porfimer-Natrium (Photofrin II<sup>®</sup>), Protoporphyrin IX und Mesoporphyrin eingesetzt.

Alle verwendeten Photosensibilisatoren bildeten in Abhängigkeit von der eingestrahelten Gesamtenergie ein TEMPO-Signal, d.h. Singulett-Sauerstoff. Das Kurvenprofil war für alle Porphyrine ähnlich. Nach einem initialen maximalen Anstieg der Kurven flachten die Steigungen der Kurven ab, und erreichten bei ca. 500 J Gesamtenergie ihr Maximum.

Mesoporphyrin zeigte initial einen langsameren, aber über einen weiten Energiebereich hin einen linearen Kurvenanstieg. Die Photosensibilisatoren unterscheiden sich allerdings wesentlich hinsichtlich der maximal erreichbaren Intensitäten und der initialen Anstiege.

Die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Signalintensitäten von der Photosensibilisatorkonzentration zeigten, daß eine Zunahme der Konzentration generell zu einem Anstieg des Signals führte. Bei einer Photosan 3<sup>®</sup>- bzw. Photofrin II<sup>®</sup>-Konzentration von 1 µg/ml erhöhte sich das Signal kontinuierlich. Bei den stärksten Konzentrationen wurde der Höchstwert bei niedrigeren Energien erreicht, die Signalstärke fiel bei Weiterbestrahlung wieder ab. Die vergleichenden Untersuchungen für alle Photosensibilisatoren wurden danach bei der einheitlichen Konzentration von 1 µg/ml durchgeführt.

Unsere Interpretation des Signalverlaufs berücksichtigt die geschlossene Anordnung des Systems. Die initiale Konzentration von gelöstem Sauerstoff betrug circa 0,2 mM. Da die initiale Konzentration von TEMP bei ca. 60 mM lag, befand sich dieses im Überschuß, so daß

der Sauerstoff der limitierende Faktor in der TEMPO-Generierung war. Mit zunehmendem Verbrauch des Sauerstoffs wurde seine Umsetzung zugleich langsamer. Der schnellere Signalanstieg bei höheren Photosensibilisatorkonzentrationen entspricht der schnelleren Sauerstoffumsetzung. Die Verringerung der Sauerstoffmenge führte folglich zu einem früheren und stärkeren Abfall des TEMPO-Signals. Nach dem völligen Sauerstoffverbrauch hat die weitere Einstrahlung von Energie und die Anregung des noch intakten Photosensibilisators offenbar zur Zerstörung des signalgebenden TEMPO geführt, wie insbesondere die Kurven für die stärksten Photosensibilisatorkonzentrationen zeigen.

Wegen der unterschiedlichen Verhältnisse zwischen der Erzeugung und der Zerstörung des TEMPO-Signals bei den verschiedenen Photosensibilisatorkonzentrationen, die durch die stärkere Signalkurvenkrümmung bei höheren Photosensibilisatorkonzentrationen nachgewiesen werden, kann nur die Anfangssteigung einer Kurve der jeweiligen Generierungsaktivität direkt entsprechen. Dort ist der Signalverlust nämlich am geringsten. Der Signalthöchstwert würde der ursprünglich vorhandenen Menge an Sauerstoff nur unter der Bedingung entsprechen, daß kein Abbau des TEMPO-Signals stattfinden würde.

Wenn die Bildung von TEMPO proportional zur Photosensibilisatorkonzentration wäre, dann wäre die Anfangsphase durch eine Kinetik erster Ordnung zu beschreiben.

Die hierdurch errechneten initialen Generierungsraten für Singulett-Sauerstoff zeigen tatsächlich eine Proportionalität sowohl zur Energie als auch zur Konzentration des Photosensibilisators.

Die mathematische Auswertung läßt sich durch die Anpassung einer Polynomgleichung an die Anfangssteigungen durchführen. Dies ermöglicht eine präzisere Berechnung dieser Steigungen und somit einen besseren Vergleich der unterschiedlichen Photosensibilisatoren. Die initiale Singulett-Sauerstoffgenerierungsrate wird durch den Koeffizient für den linearen Anteil des Polynoms dargestellt.

Inwieweit ein biologisches System einem offenen bzw. geschlossenen System entspricht, hängt von Sauerstoffzufuhr und -verbrauch ab. Unabhängig von einer solchen Fragestellung bleibt die Anfangssteigung ein zuverlässiger physikalischer Parameter der Substanz.

Als ein Beispiel für die Anwendung dieser Methodik dient ein Vergleich zwischen den beiden Photosensibilisatoren Photosan 3<sup>®</sup> und Photofrin II<sup>®</sup>. Bei beiden handelt es sich um ein

Gemisch unterschiedlicher Porphyrinderivate bzw. –aggregate, weshalb ein direkter molarer Vergleich nicht möglich ist. Für diese Arbeit wurde daher eine Generierung bei gleicher Gewichtskonzentration durchgeführt. Nach Herstellerangaben besteht Photofrin II<sup>®</sup> aus einem reinen Gemisch photoaktiver Porphyrinderivate („Rote Liste 2002“), während Photosan 3<sup>®</sup> zu circa 30 % photodynamisch inaktive Anteile enthält (Seehof Laboratorium). Vergleicht man die beiden Substanzen bei gleichen Einwaagen pro Volumeneinheit, so weist Photofrin II<sup>®</sup> mit einem  $\alpha$  von 1,03 gegenüber Photosan 3<sup>®</sup> mit einem von 0,71 eine scheinbar höhere Generierungsaktivität auf. Nach einer linearen Umrechnung auf die Konzentration photoaktiver Substanz (mit einem Faktor von ca.  $10 / 7 = 1,4$ ) ist der Unterschied zwischen den beiden Substanzen nur noch gering.

#### 5.4 Validität der Messungen

Vergleiche mit den Ergebnissen anderer Gruppen zeigen deutliche Diskrepanzen untereinander und auch gegenüber unseren Daten. Beispielsweise bei den erwähnten Versuchen von Gottfried et al<sup>110</sup>, die auf dem Sauerstoffverbrauch, der Tryptophandegradation und dem Photobleaching von p-Nitrosodimethylanilin basierten, lagen die Quantenausbeuten für das HpD um das 2- bis 3-fache höher als für Photofrin II<sup>®</sup>. Bei den Studien von Fernandez et al<sup>111</sup>, bei denen eine Enzyminaktivierung zugrunde lag, hatte PpIX eine Quantenausbeute von ca. 0,54, Hämatoporphyrin IX von 0,74 und Photofrin<sup>®</sup> eine von mehr als 1 bei  $\lambda = 630$  nm. Letzteres Ergebnis wurde durch die Bildung von photoaktiven Photoprodukten erklärt. Die Analysen zeigen deutlich, daß die verwendete Meßmethode und die Lösungsumgebung bzw. die eingesetzten Reagenzien selbst einen erheblichen Einfluß auf die Messungen der nominell verwandten physikalischen Größen ausüben. Demzufolge dürfen solche experimentell ermittelten Größen nicht absolut, sondern nur im Rahmen der Versuchsanordnung interpretiert werden. Hierbei muß beachtet werden, daß der Ort der Entstehung der ROS, nämlich die Photosensibilisatormoleküle, und der Ort ihrer Wirkung wegen derer sehr hohen Reaktivität extrem dicht beieinander sind. Unterschiede zwischen den Verteilungen der verschiedenen Arten von Markermolekülen aus z.B. sterischen Gründen, durch Aggregatbildung oder wegen unterschiedlicher Hydrophilität könnten für die anscheinend widersprüchlichen Meßergebnisse verantwortlich sein.

In diesem Zusammenhang könnte der Einsatz eines solch verhältnismäßig kleinen Moleküls wie TEMP von Vorteil sein.

### **5.5 Einschränkungen der Methode**

Mit unserem Meßsystem sind zwar quantitative, wenn auch nur relative, Vergleiche möglich. Absolute Messungen der absorbierten Energie durch die Reaktionslösung, die mit dem ESR-Spektrometer nicht möglich sind, wären hierfür eine Voraussetzung.

Die Aussagekraft physikalisch orientierter Meßmethoden für die klinische Wirksamkeit eines Photosensibilisators ist in sich beschränkt. Diesbezüglich könnten sich weitere Unterschiede zwischen Photofrin II<sup>®</sup> und Photosan 3<sup>®</sup> beispielsweise aus einer unterschiedlichen Pharmakokinetik ergeben. Photofrin II<sup>®</sup> besteht aus Oligomeren von bis zu 8 Porphyrineinheiten, die hauptsächlich durch Etherbindungen verknüpft sind, während Photosan 3<sup>®</sup> dagegen aus Oligomeren mit überwiegend Esterbindungen besteht (siehe Abbildung 4). Solche Unterschiede in der chemischen Struktur könnten zu Unterschieden in den klinischen Eigenschaften führen.