

Aus dem Institut für Lasermedizin  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Bayer)

**Aufnahme und Phototoxizität von  
Palladium-Bacteriochlorophyllid- $\beta$ -Serinester in  
Gefäßendothelzellen (Zelllinie CRL 1730)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Semih Özlügedik

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Referent: Univ.-Prof. Dr. Moser

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Bojar

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden auf der ESP 99 in Granada publiziert.

Moser, J., G., und Özlügedik, S. (1999): Pd-Bacteriochlorophyllid- $\beta$ -Serinester: Uptake and Phototoxicity in Human Vascular Endothelial Cells. Abstr. #023

Herzlichen Dank:

Prof. Dr. J. G. Moser, für die Bereitstellung und Betreuung der Arbeit.

Birgit Wagner, für die Züchtung der Zellkulturen.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Prinzip der Photodynamischen Therapie.....	1
1.2	Bacteriopheophorbide, Bacteriochlorine.....	2
1.3	Das Photodynamische Fenster .....	4
1.4	Reaktionsmechanismus der Photosensibilisatoren.....	5
1.5	O <sub>2</sub> -Partialdruck-Verhältnisse im Tumorgewebe während einer <i>PDT</i> mit BChl-Ser	6
2	Material und Methoden.....	10
3	Ergebnisse.....	14
3.1	Aufnahme von Pd-BChlSer in CRL 1730.....	14
3.2	Phototoxizität bei Kurzzeit-Inkubation .....	15
3.3	Phototoxizität bei Langzeit-Inkubation.....	17
4	Diskussion.....	20
5	Zusammenfassung .....	24
6	Anhang.....	25
6.1	Literaturverzeichnis.....	25
7	Lebenslauf.....	31

# 1 Einleitung

## 1.1 Prinzip der Photodynamischen Therapie

In der Photodynamischen Tumortherapie (*PDT*) kommen lichtempfindliche Substanzen (Photosensibilisatoren, *PS*) zum Einsatz, die durch Anregung mit Licht eine toxische Wirkung auf Zellen entfalten.

Dabei appliziert man dem Patienten i.v. den *PS* und bestrahlt *nach einer bestimmten Zeit* die malignen Gewebsanteile mit einer Lichtquelle, die auf einer Wellenlänge maximaler Absorption des *PS* arbeitet. Der Photosensibilisator wird angeregt und überträgt im Gewebe Energie auf molekularen Sauerstoff ( $^3\text{O}_2$ ), wodurch dieser zu Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) aktiviert wird. Je nach Ausmaß der Zellschädigung durch dieses starke Zellgift erreicht man einen Wachstumsstopp bis hin zu einem vollständigen Untergang des Tumors.

Die Blutversorgung spielt beim Wachstum eines Tumors eine wichtige Rolle [3]. Jeder Tumor bedient sich des Gefäßnetzes des Gesamtorganismus. Alle Tumoren bilden Wachstumsfaktoren für die Neubildung von Blutgefäßen, die sich durch verschiedene angiographische Merkmale [4] auszeichnen und die Grundlage für ein rasches Tumorwachstum sind. Ein Tumor besitzt ein inhomogenes Gefäßnetz. Der Tumorrand ist besser durchblutet als das Zentrum, welches auf Grund des in der Wachstumsgeschwindigkeit retardierten Gefäßnetzes zur Nekrosebildung neigt. Durch ungehemmtes Tumorwachstum resultieren Gefäßkaliberschwankungen, so daß Gefäße an einer Stelle ausgeweitet und an einer anderen Stelle durch Gewebsdruck komprimiert werden. Häufig werden in den Tumoren ein unregelmäßiges Aufzweigungsmuster der Gefäße beobachtet, das infolge von Gefäßabbrüchen zu arteriovenösen Shunts und somit zur Stase sowie Strömungsumkehr führen kann.

Zilberstein et al. (1998) führten an Mäusen mit M2R-Tumoren eine *PDT* mit Bacteriochlorophyllid- $\beta$ -Serinester (BChlSer) als Photosensibilisator durch. Sie bestrahlte *während* der i.v. Infusion des *PS*. 85% der Mäuse wurden geheilt. Die Tumoren wurden hämorrhagisch und metastasierten nicht. Dieses Verhalten ließ einen toxischen Effekt des *PS* auf das Gefäßsystem vermuten. Mittlerweile wurde der Sensibilisator zu einem Palladium-Derivat (Pd-BChlSer) [5] weiterentwickelt, das wir in seiner Phototoxizität auf Endothelzellen untersucht haben.

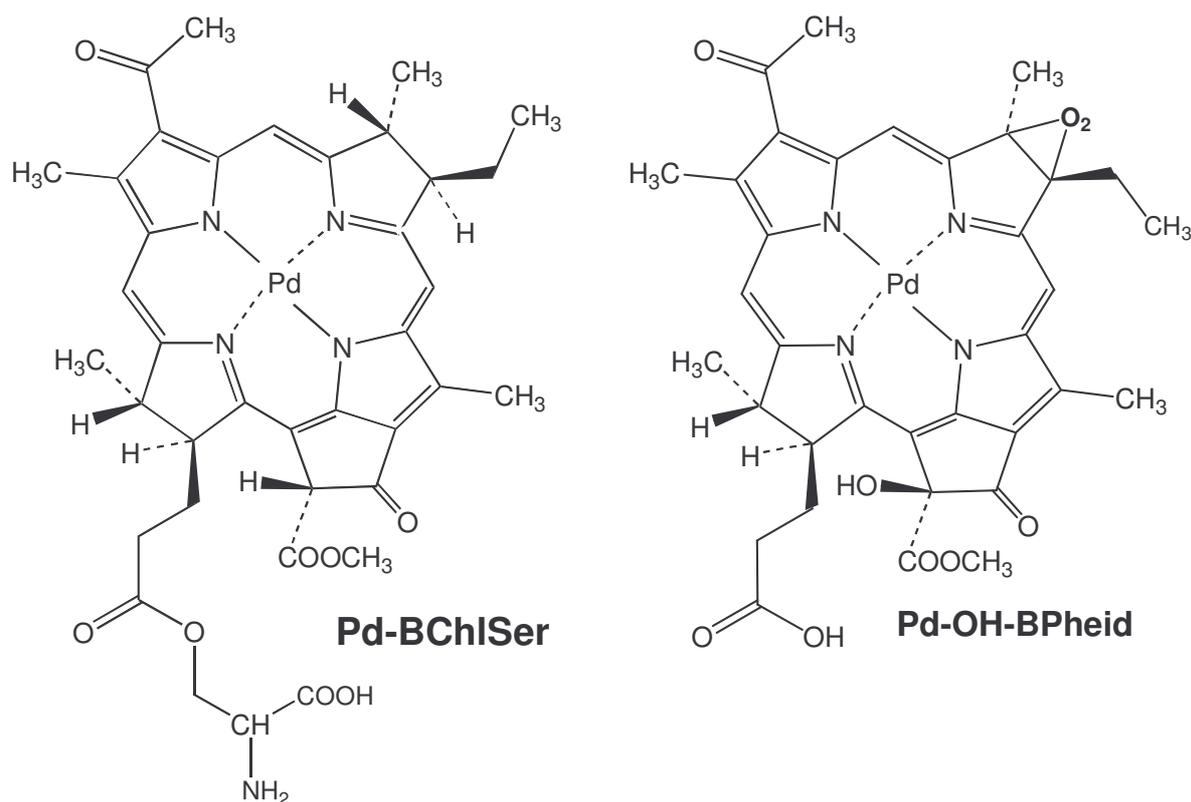


Abb. 1: Strukturformeln von Pd-BchlSer und Pd-OH-BPheid.

## 1.2 Bacteriopheophorbide, Bacteriochlorine

Bacteriochlorophylle sind Naturprodukte, die von Bakterien und Algen produziert werden. Ein wichtiger Vertreter ist das Bacteriochlorophyll a des *Rhodobacter spheroides*. Diese Sensibilisatoren können in größeren Mengen gewonnen werden [6], wobei die Reinheit durch *HPTLC* und *MALDI* [7], [8] bewiesen wird.

Ein wichtiges Merkmal ist, daß die Absorptionsmaxima der Bacteriochlorophylle und auch anderer Sensibilisatoren im photodynamischen Fenster liegen (650-850 nm) (s. a. Kapitel 1.3). Dadurch ist es unter anderem möglich, die *PDT* mit preisgünstigen Diodenlasern durchzuführen.

Bacteriochlorophylle sind wegen ihrer geringen Löslichkeit und Aufnahme in Tumorzellen für die photodynamische Tumorthherapie eigentlich ungeeignet [9]. Erst durch chemische oder eine enzymatische Reaktion mit Chlorophyllase [1], welche neben einigen Grünpflanzen auch in Grünalgen vorkommt, und Alkylierung oder Veresterung mit Aminosäuren erlangt man wasserlösliche Derivate. Weitere Derivate sind möglich.

Die Aufnahme und Anreicherung der *PS* in den Zellen ist für hydrophile Substanzen vom pH-Wert [10] und für hydrophobe von Interaktionen mit Lipoproteinen im Blutplasma [11] abhängig. Auf diesen Sachverhalt basierend reichern sich *PS* der 2. Generation nicht nur im Tumor an, sondern auch im Gesamtorganismus. Bestrebungen laufen, diese Defizite mit *PS* der 3. Generation, die eine erhöhte Tumorspezifität aufweisen, zu verbessern.

Bacteriopheophorbide und deren Ester, die aus Bacteriochlorophyll a über Bacteriopheophytin synthetisiert werden, sind besonders gute Photosensibilisatoren, wenn sie direkt in den Tumor appliziert werden. Das zentrale  $Mg^{2+}$ -Atom im Porphyrinring kann durch  $Fe^{2+}$ ,  $Pd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  und einige andere zweiwertige Kationen ausgetauscht werden [12]. Die wichtigste Beobachtung bei  $Pd^{2+}$ -haltigen Farbstoffen ist, daß für deren Phototoxizität bei melanotischen Tumoren wegen Verlängerung der Triplettlebensdauer keine nennenswerte Schwellenwertdosis („Threshold dose“) existiert [8], [13], [14]. Anstrengungen zur Modifizierung der Peripherie der Pd-Bacteriopheophorbide wurden schon unternommen [15]. Ziel war es, Pd-Bacteriopheophorbid-Cyclodextrin-Komplexe zu bilden [16] und diese mit Hilfe von Tumormarkern und Biotin-Avidin-Komplexen gezielt auf Tumoren anzuwenden. Auf Grund ungünstiger Bindungskonstanten der Komplexe war bis jetzt eine gezielte Anwendung auf Tumoren nicht möglich.

Versuche, die Photosensibilisatoren in Mizellen und Liposomen unterzubringen, um sie so in die Zellen zu schleusen, wurden ebenfalls durchgeführt. Eine phototoxische Aktivität der Substanzen war dabei zu erkennen, während der Energietransfer auf Sauerstoff bei den Cyclodextrin-Komplexen aus bisher ungeklärten Gründen nicht stattfand [17].

Im Allgemeinen erfordern *PS* für eine effektive Phototoxizität eine Regeneration des Sauerstoff-Partialdrucks [18] in den Zellen, da dieser Druck bei der Bestrahlung auf Grund des  $O_2$ -Verbrauches nach einer gewissen Zeit deutlich erniedrigt ist (s. a. Kapitel 1.5).

Bis jetzt wurde keine bedeutende Dunkeltoxizität mit *PS*-Konzentrationen bis hin zu  $100 \mu M$  erreicht. Dies ist die höchste Konzentration, bei der sich die Porphyrine ohne weitere Hilfsstoffe im Serum lösen.

Die Untersuchung der Lokalisation von Bacteriopheophorbid-methyl- und -ethylestern in Zellen führte zu folgenden Ergebnissen [19]: ca. 50% ( $0,15 \text{ mM}$ ) des Sensibilisators ist im Zytoplasma enthalten, etwa die 10fache Konzentration ( $1,8 \text{ mM}$ ) befindet sich im Golgi-Apparat. Der Zellkern enthält keinen *PS*, so daß genetische Schädigungen durch die *PDT* mit diesen *PS* unwahrscheinlich werden. Durch die fehlende Schwellenwertdosis im

Zusammenspiel mit dem biologischen Abbau in den Zellen sind Bacteriopheophorbid-Derivate möglicherweise die *PS* der Wahl.

Bacteriochlorin a und Bacteriochlorophyllin a sind wasserlösliche *PS*, so daß sie die Zellmembran schlecht passieren können. Ihre Absorptionsmaxima liegen etwa bei 760 nm. Ihr Absorptionskoeffizient von  $\epsilon = 40 - 70000$  [l/(mol x cm)] ist groß genug, um den photodynamischen Effekt von *HpD*, deutlich zu übertreffen. Der  $O_2$ -Verbrauch in physiologischer Umgebung (pH 7,4) ist in Gegenwart von  $^1O_2$ -Akzeptoren (Histidin, Tryptophan) 4 mal höher als bei *HpD*, jedoch liegt der photodynamische Effekt gegenüber L929-Zellen in der gleichen Größenordnung.

Die entsprechenden Experimente wurden an Kaninchen, Ratten und Hamstern mit einer *PS*-Konzentration von 20 mg/kg Körpergewicht durchgeführt. 24 Stunden nach der Verabreichung des *PS* wurde mit einer Lichtdosis von  $150 \text{ J/cm}^2$  bestrahlt. Dabei erreichte man fast vollständige Nekrosen von Tumoren, die im Durchmesser 4-7 mm maßen (grünes amelanotisches Melanom, RMA Brustkrebs, Rhabdomyosarkom). Des weiteren beobachtete man eine Unterbrechung der Perfusion im Tumorgewebe durch Schädigungen der zugehörigen Gefäßendothelien mit Schwellung der Erythrozyten. Die unvollständigen Nekrosen wurden mit einem Auswaschen des *PS* in der Peripherie der Tumor versorgenden Gefäße begründet. Möglicherweise ist dieser Effekt durch Sensibilisator-Zugabe während der Bestrahlung abzustellen [1], wie es von Rosenbach-Belkin et al. mit Bacteriochlorophyllid- $\beta$ -Serinester durchgeführt worden ist.

### 1.3 Das Photodynamische Fenster

Photosensibilisierung von Zellen ist im gesamten sichtbaren Spektrum des Lichtes möglich. Photosensibilisatoren der zweiten und dritten Generation absorbieren Licht in einem Bereich von 650-850 nm, wo im allgemeinen biologische Farbstoffe, außer pflanzlichen Chlorophyllen und Bacteriochlorophyllen, nicht absorbieren. Dieser Wellenlängenbereich wird als photodynamisches Fenster bezeichnet (Abb. 2).

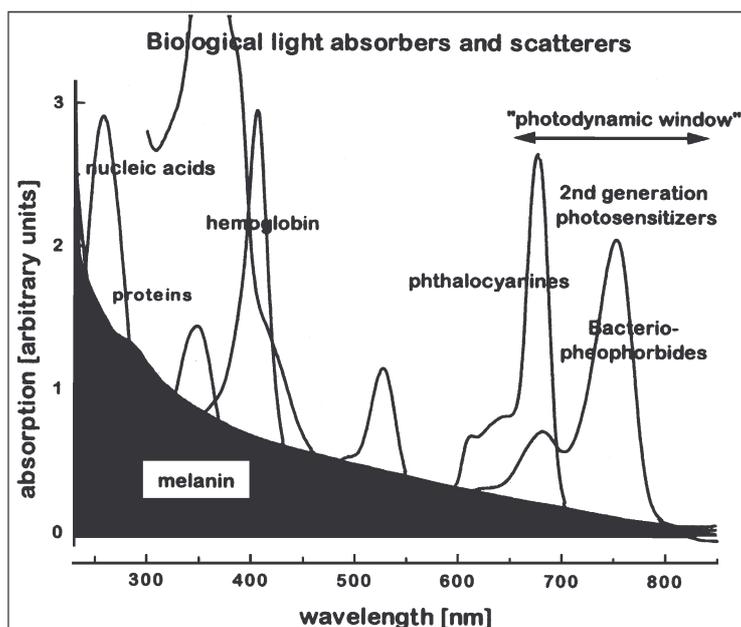


Abb. 2: Photosensibilisatoren der 2. Generation absorbieren Licht im sog. „photodynamischen Fenster“ des sichtbaren Spektrums [23].

Eine Anreicherung dieser Farbstoffe nur in Tumoren und nicht im gesunden Gewebe des Gesamtorganismus schafft die Möglichkeit, eine gezielte Behandlung durchzuführen, die sich auf den Tumor beschränkt und gesundes Gewebe verschont. Dadurch sind geringere Mengen an Sensibilisator nötig, was eine Reduzierung möglicher Nebenwirkungen dieser Behandlungsmethode zulässt.

#### 1.4 Reaktionsmechanismus der Photosensibilisatoren

Bei der Bestrahlung der mit *PS* dotierten Zellen werden die Farbstoffe angeregt. Dieses führt zu einem Energietransfer auf  $^3\text{O}_2$ , wodurch der Sauerstoff zu  $^1\text{O}_2$  aktiviert wird. Singulett-Sauerstoff geht mit einer Reihe von Molekülen (Aminosäuren, Kohlenhydraten, ungesättigte Fettsäuren...) Reaktionen ein. Die oxidativen Schädigungen durch Singulett-Sauerstoff wurden mit Cholesterol [24] und Diphenylisobenzofuran [25] nachgewiesen. Mit *ESR* (Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie) lassen sich in vitro auch OH-Radikale nachweisen, die in einer weiteren Reaktion von Singulett-Sauerstoff aus Wasser entstehen.

Die Arbeitsgruppe um A. Scherz [26] untersuchte mit Hilfe von *ESR* die Reaktionsprodukte, die durch Bacteriochlorophyllid- $\beta$ -Serinester bei einer Lichtbestrahlung in wässriger Lösung entstehen. BChl-Ser ist ein Vertreter der 2. Generation und gilt als ein sehr effizienter *PS*. Die Proben sind *mit Argon begast* und in Quarzzellen gegeben worden. Es wurde mit einer *PDT*-Lampe in einem Frequenzbereich von 720-830 nm und einer Lichtintensität von 27 [mW/cm<sup>2</sup>] bestrahlt. Um OH $\cdot$ -, O<sub>2</sub><sup>-</sup>- und CH<sub>3</sub>-Radikale nachzuweisen, bediente man sich *DMPO* in *PBS* als Indikator, für den Nachweis von Singulett-Sauerstoff wurde *TEMP* eingesetzt. Des Weiteren wurde die Beteiligung von OH-Radikalen aus O<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Super-Oxide-Dismutase (*SOD*) und Katalase untersucht. Beteiligungen von Metallionen hat man mit Desferrioxamin (1 mM) ausgeschlossen.

Die Gruppe kam zu folgenden Ergebnissen:

Während der Bestrahlung wurden OH-Radikale im *ESR*-Spektrum nachgewiesen. Ein fehlendes Triplet-Signal nach Zugabe von *TEMP* sprach für eine kaum nennenswerte Singulett-Sauerstoffproduktion. Des Weiteren erklärten sie auf Grund mehrerer Veränderungen im *ESR*-Spektrum, daß Sauerstoff mit aktiviertem BChl-Ser im Singulettzustand in Interaktion tritt, und chlorinähnliche Substanzen sowie Kationen bildet. Daraus folgerten sie, daß möglicherweise ein neuer Mechanismus vorhanden ist, in dem ein Sauerstoffatom vor der Bestrahlung als Elektronenakzeptor fungiert und die OH-Radikalbildung anregt.

Jedoch steht diese Tatsache im Widerspruch mit anderen Beobachtungen, in denen unter vergleichbaren Bedingungen und gleichen Sensibilisatoren Singulett-Sauerstoff als Hauptprodukt entsteht.

### **1.5 O<sub>2</sub>-Partialdruck-Verhältnisse im Tumorgewebe während einer *PDT* mit BChl-Ser**

Während der *PDT* (Typ II) [27] wird durch Übertragung von Energie auf Sauerstoff dieser zu Singulett-O<sub>2</sub> aktiviert, der eine zellschädigende Wirkung aufweist. Infolgedessen nimmt der Sauerstoffgehalt in den Zellen ab, d.h. für eine effektive photodynamische Therapie ist eine Reoxygenierung des Gewebes notwendig. Tumorgewebe haben oft eine ungleichmäßige Blutversorgung und damit auch unterschiedlich oxygenierte Zellen innerhalb des Tumors [28], [29]. Hypoxische Zellbereiche sind gegen Radio- und Chemotherapie sowie Typ II-*PDT* resistenter, so daß sich die Therapie auf gut oxygenierte Bereiche beschränkt [30], [31], [32]. Deswegen ist die Kenntnis der Sauerstoffverhältnisse während der Therapie eine wichtige

Grundlage für die Planung, Durchführung und Effizienz der Behandlung.

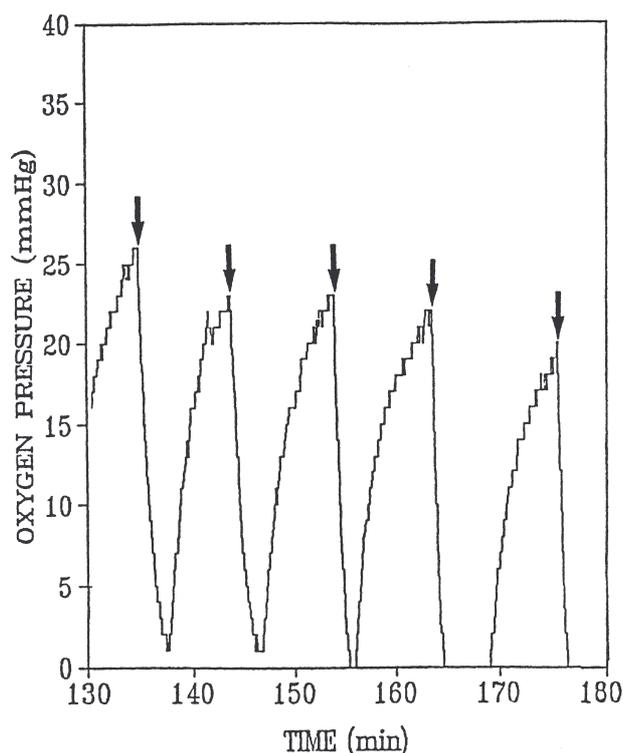


Abb. 3: Messung des  $p(O_2)$  in M2R-Tumor während der PDT: Der Sensor wurde den sedierten Mäusen eingeführt, danach wurde der  $p(O_2)$ -Grundpegel über mehrere Stunden gemessen und die Lichtunempfindlichkeit des Sensors durch Ein- und Ausschalten des Lichtes kontrolliert. Schließlich wurde der PS in der Tumor injiziert und nach 2 stündiger Inkubation das Licht eingeschaltet (Pfeil), fiel die Kurve gegen 0 ab, so wurde die Lichtquelle ausgeschaltet. In 10 minütigem Zeitabstand ist dieser Zyklus mehrmals wiederholt worden [nach Zilberstein et al. 1997].

Frühere Messungen zur Ermittlung des Sauerstoffverbrauches wurden in vitro mit elektrochemischen Verfahren durchgeführt [33], [34], [35], mit polarographischen Messungen und transkutaner Sauerstoffelektrode wurden ebenfalls der  $O_2$ -Verbrauch beobachtet [36], und mit Mikroelektroden wurde der Sauerstoffpartialdruck vor und nach der PDT mit *HpD* [37] gemessen. Die Gewebeoxygenierung, die einerseits von der  $O_2$ -Versorgung und andererseits von der  $O_2$ -Aufnahmerate in die Zellen abhängig ist, spiegelt die  $p(O_2)$ -Verhältnisse im Gewebe wieder. Die Oxygenierung kann durch eine Vielzahl von Faktoren wie metabolisches Mikromilieu, Zelldichte oder Temperatur beeinflusst werden, und ist bei Tumoren mit den strukturellen und funktionellen Störungen der Mikrozirkulation begründet. Die  $O_2$ -Versorgung errechnet sich aus dem Produkt von Blutflußrate und der  $O_2$ -Konzentration im

Blut. Da die arterielle  $O_2$ -Konzentration für alle Gewebe im Gesamtorganismus gleich ist (ca. 0,2 ml  $O_2$ /ml Blut), hängt die Sauerstoffversorgung im Körper, außer bei Tumoren, die venös versorgt werden, von der Blutflußrate ab. Tumoren haben einen mittleren Sauerstoffverbrauch, und die  $O_2$ -Verwertung ist nicht gestört. Mit  $O_2$ -Mikroelektroden wurden in verschiedenen Tumoren die  $p(O_2)$  gemessen. Dabei sind geringere Drücke als in gesunden Geweben beobachtet worden. Des weiteren korrelierte die Oxygenierung nicht mit dem pathologischen Tumorstatus sowie den histologischen Befunden [38].

Doch die Genauigkeit und die zeitliche Auflösung dieser und ähnlicher Verfahren war gering. Das lag einerseits daran, daß besonders bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen der  $O_2$ -Verbrauch der Elektrode und die angelegte elektrische Spannung zu Ungenauigkeiten führten, und andererseits konnte die Stabilität der Elektrode durch Kontamination der Kathode beeinträchtigt sein. Außerdem erforderte die transkutane Elektrode eine Erhöhung der Hauttemperatur auf  $44^\circ\text{C}$  und war nur bei subkutanen Tumoren einsetzbar [36]. Auch andere Analyseverfahren wie *MRT* und *ESR* schufen keine Abhilfe [39]. Fluoreszenzquenching kombiniert mit einem neu entwickelten Sensor [40], [41] konnten die Nachteile der vorangegangenen Methoden beseitigen. Mit einem Fiberglassensor wurde der  $p(O_2)$  durch Fluoreszenzquenching von Pyren ermittelt. Damit war man in der Lage, auch noch sehr geringe Konzentrationen von Sauerstoff mit einer zeitlich hohen Auflösung zu detektieren, so daß man auch vorübergehende  $p(O_2)$  Veränderung sofort „online“ verfolgen konnte. Der Sensor wurde, um optische Interferenzen zu vermeiden, am Endstück vergoldet und hatte keinen  $O_2$ -Eigenverbrauch. Die Versuche wurde an Mäusen durchgeführt, denen man M2R-Tumorzellen auf den Rücken implantierte [43], 2-3 Wochen später hatten die Versuchsobjekte Tumoren von 8-12 mm Durchmesser. Die Tiere wurden mit einem Anästhetikum, welches eine geringe Wirkung auf das Gefäßsystem aufwies, sediert, und anschließend injizierte man den *PS* direkt in den Tumor. Nach 2h Inkubation hat man den Sensor in den Tumor eingeführt; danach wurde mit einer Lampe ( $12 \text{ mW/cm}^2$ ) bestrahlt. Abb. 3 zeigt den  $p(O_2)$  in Abhängigkeit der Zeit. Der  $O_2$ -Partialdruck sinkt erst bei Beginn der Bestrahlung (Pfeil) des Tumors merklich gegen 0 mmHg ab. Nach Abschalten der Lichtquelle steigt der Druck an, erreicht aber nicht mehr den Ausgangswert. Dieser Zyklus wurde alle 10 Minuten über einen Zeitraum von 5 Stunden wiederholt. Der Verbrauch an Sauerstoff ist schneller ( $T_{1/2}=24\text{Sek.}$ ) als die Reoxygenierung des Gewebes ( $T_{1/2}=60\text{Sek.}$ ). Aus der Reoxygenierungskinetik läßt sich eine Schädigung des Gefäßnetzes des Tumors ausschließen.

Durch diese neue Methode, die eine direkte, schnelle und genaue Ablesung des O<sub>2</sub>-Partialdruckes ermöglicht, sind die Autoren der Ansicht, daß eine optimale *PDT* vom Typ II in diesem Falle eine 30s/60s hell/dunkel Phase erfordert.

Auf diese Ergebnisse gestützt, erfolgte in unseren Versuchen bei mittleren bis hohen Leistungen eine intermittierende Bestrahlung. Nach 30 Sekunden Bestrahlung wurde das Röhrchen gewechselt und vor erneuter Bestrahlung 20 Sekunden lang, zur Oxygenierung der Zellen, mit der Hand geschüttelt.

## 2 Material und Methoden

Pd-BChlSer wurde im biochemischen Labor des Weizmann Institutes für Wissenschaften (Rehovot, Israel) von Varda Rosenbach-Belkin synthetisiert und uns als eine unter Argon getrocknete Substanz zur Verfügung gestellt. Der Farbstoff wurde in 2-Methoxyethanol gelöst und später in einem serumhaltigen Medium ohne weitere Reinigung der Substanz verdünnt (weniger als 1% 2-Methoxyethanol). Geringe Verunreinigungen lassen sich durch Chromatographie an Kieselgel60 (Eluat: Chloroform- Methanol 9:1) beseitigen. Mit *MALDI* wurde das Molekulargewicht der intrazellulären Komponente bei  $R_f=0,76$  bestimmt ( $M+H^+ = 714$ : Pd-hydroxychlorophyllid). Der molare Absorptionskoeffizient beträgt nach Angabe des Labors A. Scherz  $\epsilon = 71500$  [l/(mol x cm)] in Wasser und Methanol.

Die Fluoreszenzmaxima der Verunreinigungen und der Muttersubstanz, BChlSer, liegen bei 761 nm. Auf diese Wellenlänge wurde ein Diodenlaser-Array (Klotz, Analytical Laser Techniques, Unterhaugstett-Bad Liebenzell, Deutschland) durch Kühlung abgestimmt. Die Leistungsdichte variierte in den Versuchen zwischen 0.047 und 14 [mW/cm<sup>2</sup>] und wurde mit unterschiedlich langen Zeitintervallen kombiniert. Auf den Bestrahlungstisch wurde eine in vertikaler Richtung bewegliche Temperiervorrichtung angebracht, in der durch 2 Öffnungen Wasser mit einem temperierten Wasserbad in Verbindung stand, und in einer dritten Öffnung oben auf der Platte die Probe Platz fand. Die Zellen, die während des gesamten Versuchs in Medium suspendiert sind, wurden in kleinen Plastikröhrchen bestrahlt (Abb. 4), wobei eine Meßreihe aus vier Röhrchen besteht. Reoxygenierung der Proben wurden durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach Moser [42].

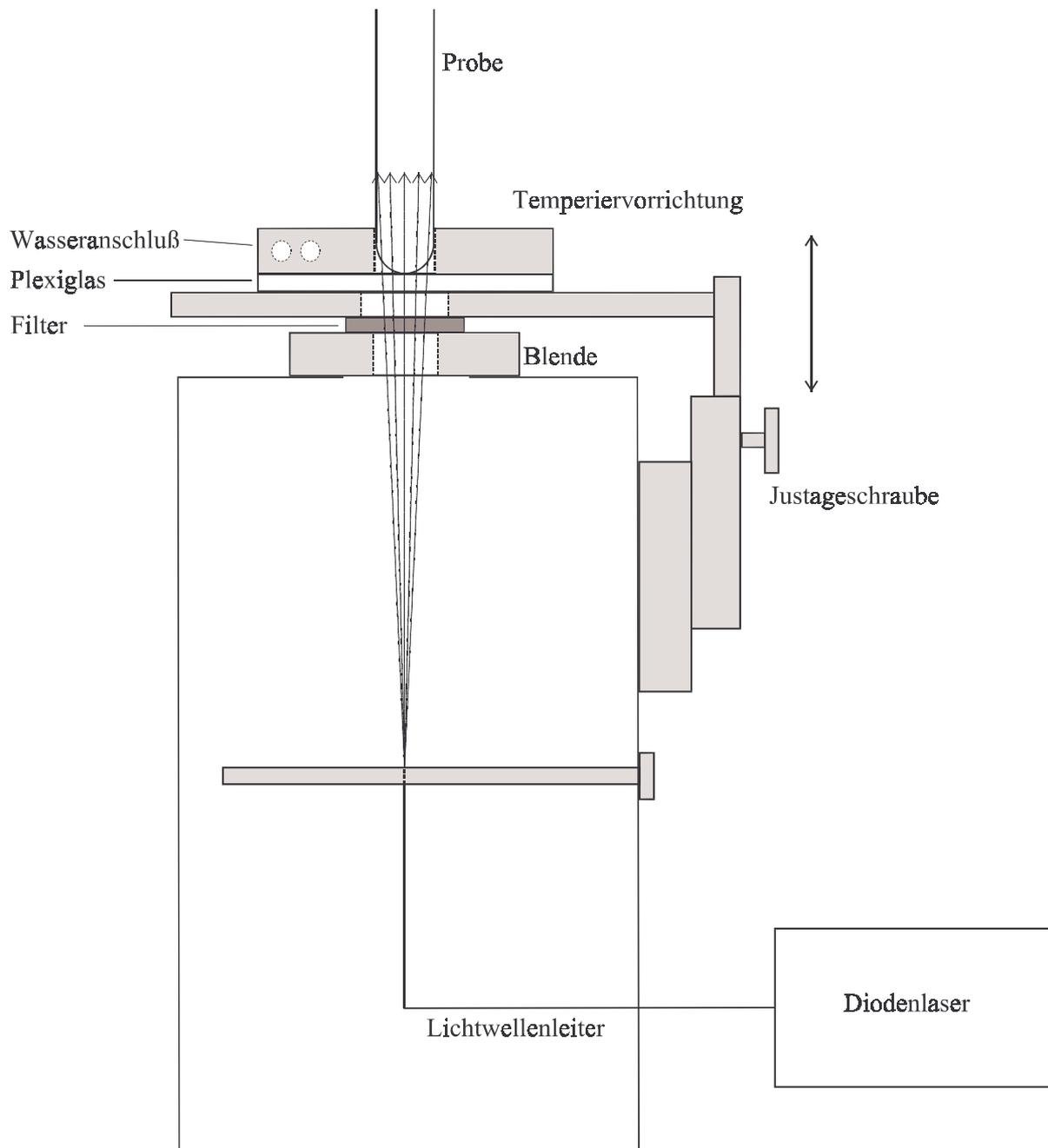


Abb. 4: Schematische Darstellung der Bestrahlungsvorrichtung im Querschnitt.

Nach der Bestrahlung werden die Proben (1 ml) mit Versuchsmedium auf 5 ml aufgefüllt und die Proben M (Versuchsmedium ohne Zellen) und M+ (Versuchsmedium ohne Zellen mit 100  $\mu$ l 0,1N HCl) zusätzlich angesetzt. Nach 18-23 Stunden Nachinkubation aller Röhrrchen, einschließlich M, M+, und C (Kontrolle, PS-haltig, keine Bestrahlung) in einer

Drehvorrichtung bei 37°C, werden die Proben zentrifugiert und photometrisch die Absorption des pH-Indikators im Überstand gemessen. Aus diesen Werten wird anschließend die Phototoxizität errechnet und je nach Versuchsanordnung gegen die *PS*-Konzentration, Energie- oder Leistungsdichte graphisch aufgetragen.

Berechnung der Phototoxizität aus den einzelnen Werten:

$$\text{Log } F/F_0 = \log (\bar{M} - E) / (\bar{M} - C_q),$$

$\bar{M}$  – arithmetischer Mittelwert der photometrisch erhaltenen M-Werte

E – aus der photometrischen Messung erhaltener Wert jeder einzelnen Probe

$C_q$  – arithmetischer Mittelwert der photometrisch erhaltenen C-Werte

Der Heidelberger Cell Distribution Service lieferte menschliche Gefäßendothelzellen (*HUVEC* – human vascular endothelial cells) der Zellreihe CRL 1730 (*ATTS*). Die Menge der Zellen war wegen der langen Verdopplungszeit beschränkt (ca. 50-60 Stunden laut Literatur, Abb. 5) und zeigten eine geringere Säureproduktion als Tumorzellen auf.

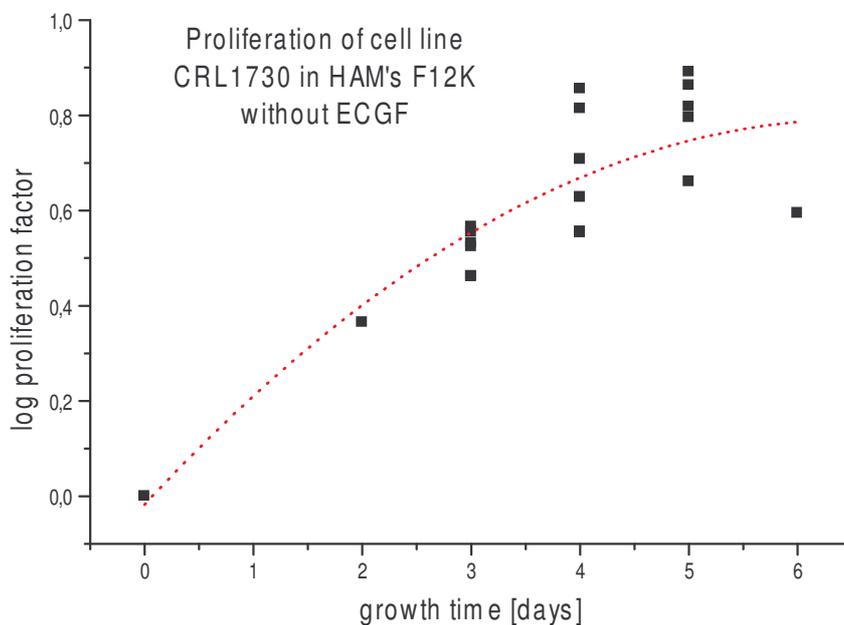


Abb. 5: Proliferationskurve der CRL 1730 in der Kultur.

Die Versuchszellen wurden in Ham's F12K (Sigma St. Louis MO, USA) und mit 10% Neugeborenen-Kalbsserum (Gräber & Cie, Hamburg, Deutschland) angezüchtet. Manchmal wurde auch ein Endothelzellwachstumsfaktor (ECGF – endothelial cell growth factor) hinzugegeben. Zum Schutz gegen Infektionen wurden Antibiotika verabreicht, pro Liter Medium waren 40 mg Gentamycin (Refobacin<sup>®</sup>), 16 mg Trimethoprim und 80 mg Sulfamethazol (Bactrim<sup>®</sup>) beigefügt. In seltenen Fällen wurde 2,5 mg/l Amphotericin B bei Pilzbefall oder 40 mg/l Sulbactam und 80 mg/l Ampicillin (Unacid<sup>®</sup>) bei bakterieller Superinfektion gegeben. Die Zellen wurden für die Versuche mit Trypsin-EDTA geerntet. Da Trypsin-EDTA die Zellwände angreift, wurden die Zellen über Nacht langsam geschüttelt, um dann mit „geheilten“ Zellen die Versuche durchführen zu können. Versuche zur Vitalitätsbestimmung der Zellen wurden ebenfalls durchgeführt. Dazu wurden sie mit Ethidiumbromid/Acridin orange präpariert [45]. Für den intrazellulären *PS*-Gehalt wurden die Zellen durch eine Dichtestufe (PERCOLL<sup>®</sup>) zentrifugiert, anschließend die Sedimente mit Methanol-Aceton 1:1 extrahiert [42] und dann mit einem Photometer (SHIMADZU UV 200) die Absorption im Überstand bestimmt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Aufnahme von Pd-BChlSer in CRL 1730

Die Dünnschichtchromatographie ergab Verunreinigungen der Originalsubstanz, die nicht weiter analysiert wurden. Stark apolar zeigte sich die Hauptkomponente Pd-BChlSer. Für die Chromatographie des PS wurde dieser mit Aceton-Methanol aus den Zellen extrahiert, der Überstand mit Toluol abgedampft und schließlich in einer sehr geringen Menge Aceton gelöst.

Pd-BChlSer	EXCRL 1730	EXCRL 1998	EXOAT
0.95	(0.96)	(0.96)	-
0.75	0.75	0.76	0.75
0.61	-	-	-

Tabelle 1:  $R_f$ -Werte der Komponenten in der Hauptsubstanz, und die aus den einzelnen Zellextraktionen.

CRL 1730 – menschliche Endothelzelle, CRL 1998 – menschliche Gallenblasenwandzelle, OAT – menschliche Lungentumorzelle.

Die folgende Abbildung zeigt das optische Absorptionsspektrum des Pd-BChlSer, das aus CRL 1730 und CRL 1998 nach 2 Stunden Inkubation extrahiert wurde. Die Aufnahmegeschwindigkeit des Photosensibilisators in CRL 1730 ist im Vergleich zu OAT SCLC [2] 10-20 fach langsamer. Das intrazelluläre Hauptprodukt nach Aufnahme von Pd-BChlSer ist Pd-Bacteriochlorophyllid. Im Gegensatz dazu wird BChlSer, das sein zentrales  $Mg^{2+}$ -Ion und den Serin-Rest bei der Aufnahme verliert und nach anschließender Oxygenierung, zu  $13^2$ -Bacteriohydroxypheophorbid umgewandelt [2].

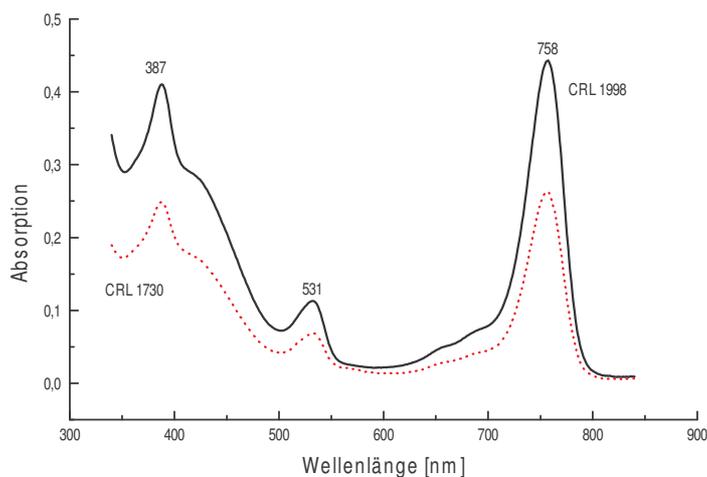


Abb. 6: Optisches Absorptionsspektrum des Pd-BChlSer (extrahiert aus CRL 1730 und CRL 1998) nach 2 Stunden Inkubation. Extraktion: Methanol-Aceton 1:1.

### 3.2 Phototoxizität bei Kurzzeit-Inkubation

Zur Bestimmung der erforderlichen Inkubationszeit des Photosensibilisators wurden die Zellen in 6 Reihen mit je 4 Röhrchen nach unterschiedlich langer Inkubation des *PS* bestrahlt. Nach 15 Minuten Inkubation erlangt man die volle Toxizität des *PS* (Abb. 7).

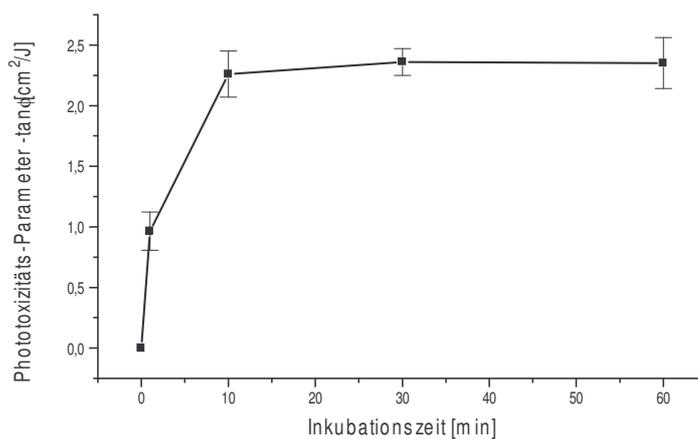


Abb. 7: Abhängigkeit der Phototoxizität von der Inkubationszeit bei CRL 1730.

Eine signifikante Phototoxizität zeichnet sich schon bei einem kurzen Sensibilisatorkontakt (weniger als 1 min) und hohen Lichtintensitäten ab, während bei gleicher Inkubationszeit und niedrigen Intensitäten ein Threshold-Verhalten zu verzeichnen ist (Abb. 8).

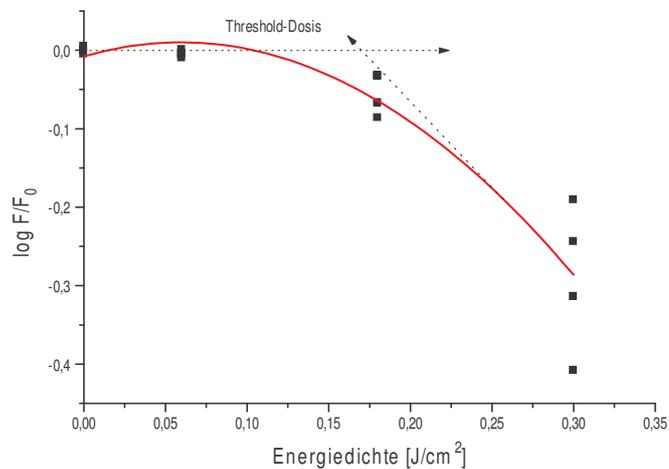


Abb. 8: Threshold-Verhalten bei niedriger Energiedichte (CRL 1730).

Dieser Effekt wurde mit einem weiterem Versuch bestätigt (Abb. 9). Das Threshold-Verhalten erscheint auch bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten (Abb. 10).

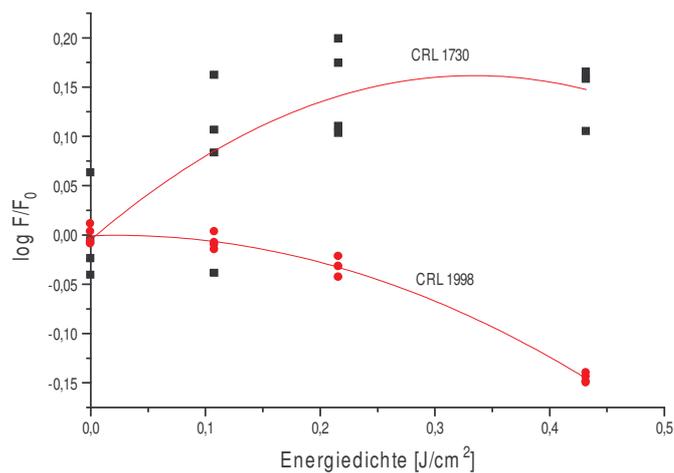


Abb. 9: Phototoxizität von Pd-BChlSer <1 min Sensibilisatorkontakt.

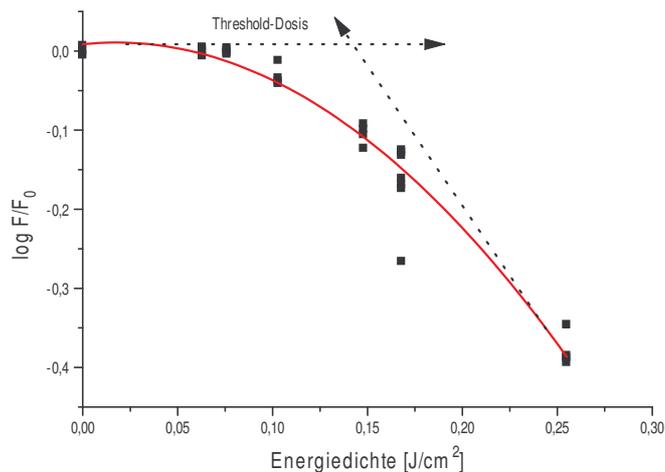


Abb. 10: Threshold-Verhalten bei 30 min Inkubation und 10  $\mu\text{M}$  [Pd-BChlSer], (CRL 1730).

### 3.3 Phototoxizität bei Langzeit-Inkubation

Eine zweistündige Inkubation der CRL 1730 erfolgte bei 37°C im Brutschrank. Danach wurden die mit unterschiedlichen Konzentrationen des *PS* dotierten Zellen bei niedriger Intensität bestrahlt. Abb. 11 zeigt die Phototoxizität in Abhängigkeit der *PS*-Konzentration. Eine signifikante Phototoxizität tritt erst bei einer  $3 \times 10^{-7}$  molaren Sensibilisatorkonzentration auf. Geringere Konzentrationen an Photosensibilisator zeigen keinen Effekt. Die Streuungen sind auf Pipettierfehler zurückzuführen, dennoch ist die Aussage des Versuches eindeutig.

Eine Bestrahlung mit höheren Intensitäten (bis zu 3,15 [J/cm<sup>2</sup>] bei 10,5 mW) zeigt Abb. 12, in der die volle Aktivierung des *PS* erfolgt. Diese Intensitäten sind im Vergleich zu früheren Versuchen sehr gering, in denen Lichtintensitäten von 150 [J/cm<sup>2</sup>] [20], [21], [22] eingesetzt wurden. Ein Threshold-Verhalten existiert nicht und die LD<sub>90</sub> liegt etwa bei 0,88 [J/cm<sup>2</sup>], was auf eine gute Phototoxizität des Pd-BChlSer deutet.

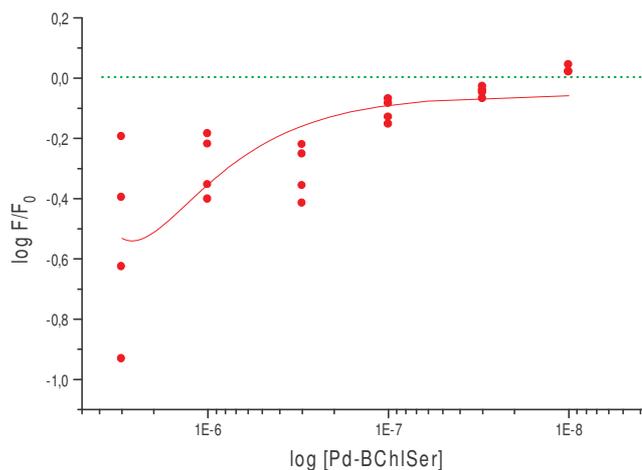


Abb. 11: Abhängigkeit der Phototoxizität von der *PS*-Konzentration bei CRL 1730.

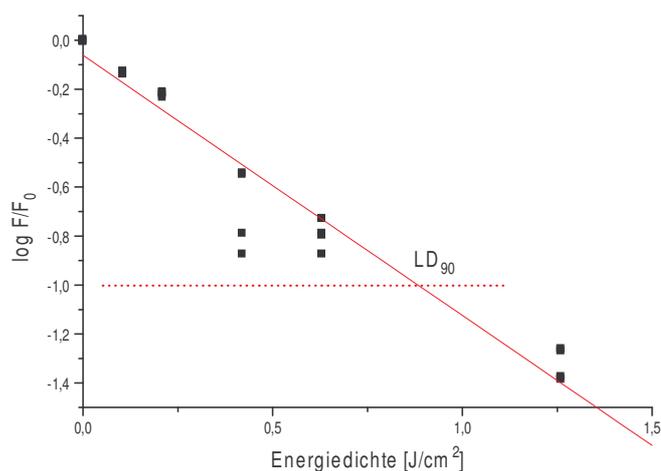


Abb. 12: Normaler Verlauf der PDT, 5  $\mu\text{M}$  [Pd-BChlSer]. Sensitivitätsbestimmung des Pd-BChlSer gegenüber Licht.

Zur Bestimmung der Sensitivität des *PS* gegenüber Licht wurden dotierte Proben mit sehr geringen Leistungen (ab 66  $\mu\text{W}$ ) sehr lange (bis zu 1h) ohne Intervalle bestrahlt (Abb. 13 und Abb. 14). Um die Leistung des Lasers soweit abzuschwächen, wurden geeignete Filter in den Strahlengang des Lasers eingelegt. Die Aktivierung des Photosensibilisators bei gleicher Energiedichte ist bei Leistungen unter 200  $\mu\text{W}$  wesentlich besser als die bei höheren. Dieses Phänomen wurde auch bei OH-BPheid beobachtet [14]. Die Phototoxizität ist unter diesen Bedingungen fast 3 mal so stark. Da in tiefer gelegenen Tumoren während einer Bestrahlung

keine hohen Lichtintensitäten auftreten, wirkt sich möglicherweise dieses Phänomen auf die Tumorzellzerstörung sehr positiv aus. Jedoch ist dieses außergewöhnliche Verhalten mit den durchgeführten Versuchen bisher nicht zu erklären.

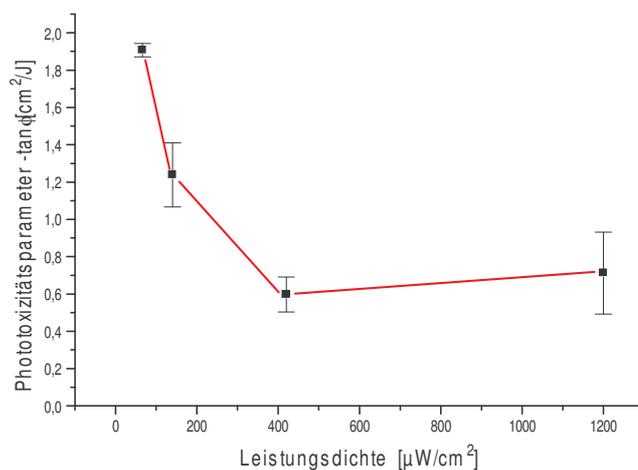


Abb. 13: Abhängigkeit der Phototoxizität von der Leistungsdichte (Pd-BChlSer ( $5 \mu\text{M}$ ) dotierte CRL 1730).

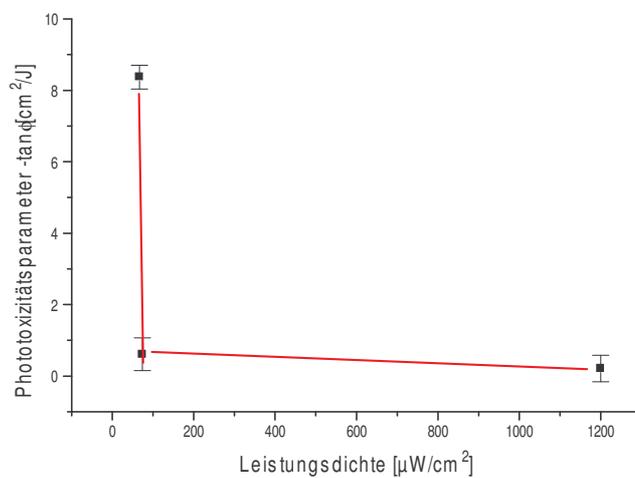


Abb. 14: Abhängigkeit der Phototoxizität von der Leistungsdichte (Pd-BChlSer ( $5 \mu\text{M}$ ) dotierte CRL 1730).

## 4 Diskussion

Die Verwendung von Pd-Bacteriochlorophyllid als Photosensitizer schließt eine wesentliche Verlängerung üblicher Triplettlebensdauer in den Mikrosekundenbereich ein. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit Sauerstoff (Bildung von  $^1\text{O}_2$ ). Daraus wird verständlich, daß Pd-Porphyrine häufig eine höhere Phototoxizität als ihre Muttersubstanzen besitzen. Auch in unseren Untersuchungen zeigt sich eine ganz erhebliche Erhöhung der Phototoxizität über den Wert von  $1 \text{ [J/cm}^2\text{]}$  hinaus. Zum Teil wurden Phototoxizitäten bis zu  $0,5 \text{ [J/cm}^2\text{]}$  gefunden.

Die in den Resorptionsexperimenten sichtbare erhöhte Lipophilie macht Pd-Bacteriochlorophyllid und seinen Serin-Ester für die Applikation in wässrigen Lösungen (auch unter Albuminzusatz) problematischer als das  $\text{Mg}^{2+}$ -Derivat.

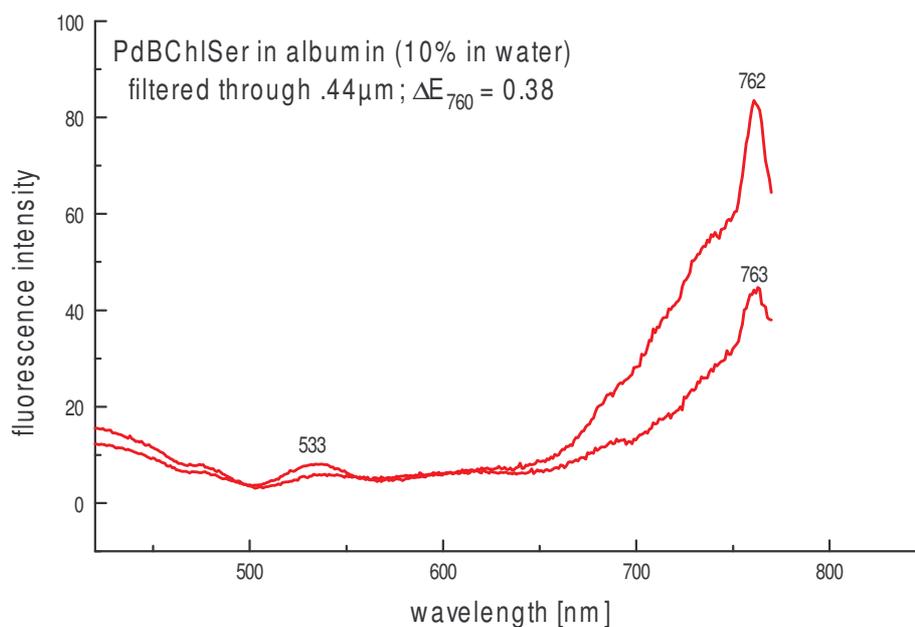


Abb. 15: Fluoreszenzanregungsspektrum von Pd-BChlSer in Albumin.

Wahrscheinlich müssen zusätzliche Lösungsvermittler gesucht werden, ehe diese Präparate für die Injektion und Infusion bei Patienten brauchbar werden.

Die Abspaltung des  $\beta$ -Serin-Esters bei der Resorption in Zellen findet genauso bei Endothelzellen wie bei Tumorzellen statt, wobei in diesem Falle das  $\text{Pd}^{2+}$ -Atom im

Ringsystem erhalten bleibt (Abb. 16). Infolgedessen bildet sich an der Zellmembran ein Ungleichgewicht mit Bevorzugung des Reaktionsproduktes („shifted equilibrium“), das zu einer erhöhten Anreicherung des Chlorophyllids in der Zelle führt.

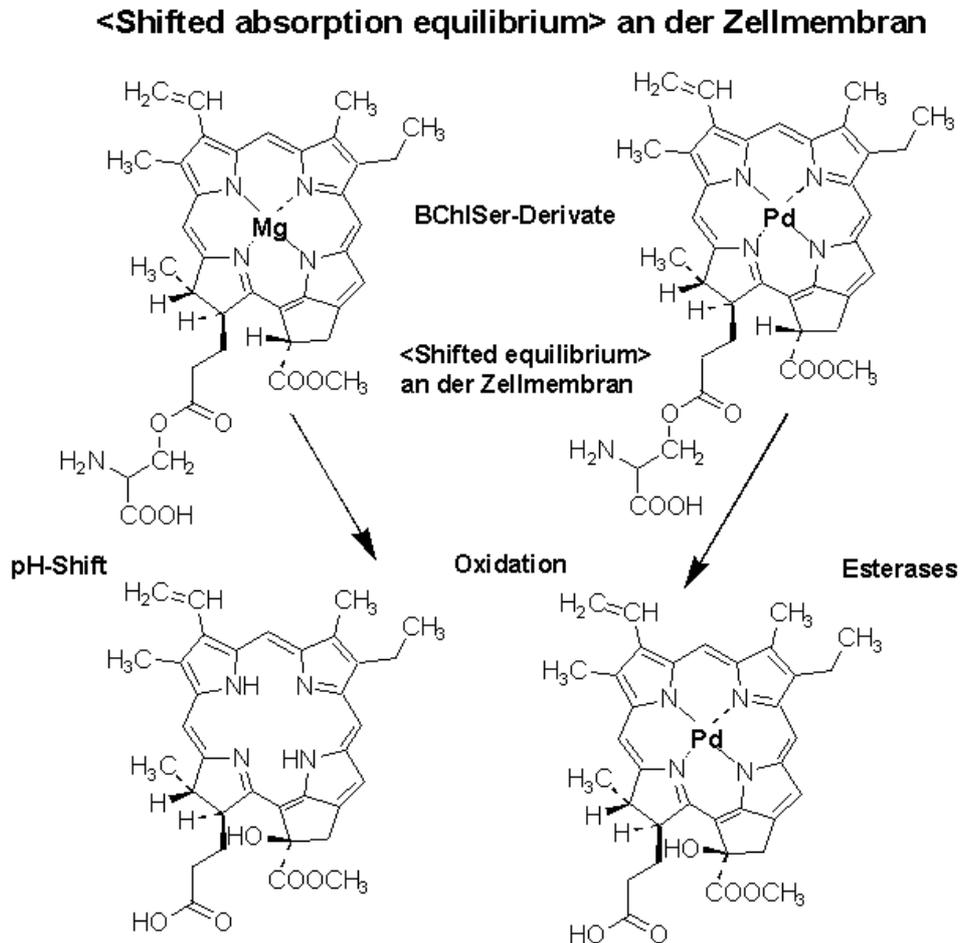


Abb. 16: Umwandlung der BChlSer-Derivate an der Zellmembran während der Aufnahme in die Zelle.

Nach 2 Stunden läßt sich die Phototoxizität zu 75% auf die inkorporierte Menge an Substanz zurückführen, während etwa 25% auf der Droge an und außerhalb der Zellmembran beruhen (Abb. 17).

Noch nicht untersucht ist die Oberflächenbesetzungsdichte durch Pd-BChlSer, die nur näherungsweise aus Resorptionskurven durch Extrapolation auf den Zeitpunkt 0 bestimmbar ist. Diese würde dann auch mit der relativ geringen, aber meßbaren Phototoxizität unmittelbar mit der Zugabe des Photosensitizers korrelieren.

Die Feststellung einer Phototoxizität bereits bei einer äußeren Konzentration von  $10^{-9}$  M, die

Salomon (1999, persönliche Mitteilung) genannt hat, erscheint nach unseren Untersuchungen eher unwahrscheinlich und ist bisher auch bei anderen Sensitizern nie gefunden worden. Allerdings arbeitet der Autor mit einem vergleichsweise empfindlicheren Test ( $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation). Auch die von uns ermittelte Sensitizerempfindlichkeit von  $1 - 3 \times 10^{-7}$  M gemessene Sensitivität ist noch immer mindestens eine Zehnerpotenz niedriger als übliche Photosensitizerkonzentrationen. Zu dem ist die Sensitivität stark zeitabhängig.

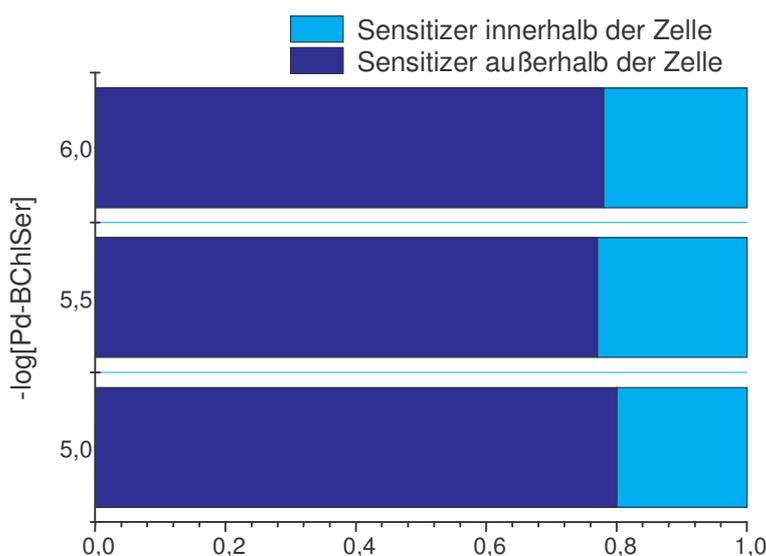


Abb. 17: Gegenüberstellung der Phototoxizität des Sensitizers innerhalb und außerhalb der Zelle (CRL 1998)

Zu der Frage der Ausscheidung des Pd-Bacteriochlorophyllids haben wir hier keine Daten beibringen können, da die Sensitizermengen, die uns zur Verfügung standen, für derartige Versuche nicht zureichend waren. Bekannt ist bereits, daß diese Ausscheidung zweiphasig mit relativ kurzen Halbwertszeiten abläuft, so daß in der Regel die generelle Photosensibilisierung eines Patienten sehr schnell (nach 3-5 Tagen) erlischt.

Der merkwürdigste Befund dieser Studie ist die mehrfach getroffene Feststellung, daß bei langzeitiger Bestrahlung mit geringen Leistungsdichten die Phototoxizität höher ist als bei kurzzeitiger Bestrahlung mit höherer Leistungsdichte, aber *gleicher Energiedichte*. Die 1 Quant / 1 Wirkungs – Hypothese läßt eine Gerade der Funktion  $\log F/F_0$  vs. Energiedichte zu, nicht aber eine nicht-lineare Funktion  $\log F/F_0$  vs. Leistungsdichte. Hier kann es sich

demzufolge nur um unterschiedliche Mechanismen zur Auslösung des Zelltodes in den beiden Lichtleistungsbereichen handeln. Man kann *unnötigerweise* darüber spekulieren, ob es sich um unterschiedliche Ausprägungen der Primärprozesse am Photosensitizer (Radikationen vs. Singulett-Sauerstoff; SCHERZ 1998) oder um unterschiedliche Ausprägungen des Zelltodes (Apoptose vs. Nekrose; OLEINICK 1994) in den unterschiedlichen Leistungsdichtebereichen handelt - wir wissen es einfach nicht. Dieses Phänomen muß aber dazu führen, daß innerhalb von Tumoren mit selbst bei einer hohen Bestrahlungsdichte notorisch geringen Leistungsdichten innerhalb des Gewebes eine überproportionale Verstärkung des Zelltodes erfolgt, sei es in Gefäßendothelzellen oder in den Tumorzellen selbst.

Die Konzeption, in dieser Arbeit nur Endothelzellen zu untersuchen, ist im Grunde genommen verfehlt. Abgesehen von einer etwas geringeren Sensitivität der Endothelzellen gegenüber Tumorzellen sind im übrigen die Reaktionen gegenüber diesem Photosensitizer sehr ähnlich. Dies hat sich bereits in früheren Untersuchungen an Bacteriopheophorbid-Ethyl-Ester bestätigt [14], wobei auch bereits das Phänomen der Wirkungsverstärkung bei geringer Bestrahlungsdichte auftrat. Insofern hätte man diese Untersuchung auch einfacher an Tumorzellen durchführen können. Lediglich der Befund von SALOMON, daß die Phototoxizität derartiger Sensitizer bereits während der Infusion bei gleichzeitiger Bestrahlung auftritt, hat uns veranlaßt, in diesen Untersuchungen uns auf Endothelzellen zu beschränken. Dennoch hat die Untersuchung der Gefäßendothelzellen den Befund von SALOMON eigentlich etwas unwahrscheinlich gemacht, da gerade diese Zellen geringer als Tumorzellen durch Pd-Bacteriochlorophyllid beeinflusst werden. Es fragt sich daher, ob es nicht sinnvoller gewesen wäre, diese Untersuchungen auf Blutzellen auszudehnen, von denen bekannt ist, daß sie unter Photosensitizern auf Bestrahlung durch Quellung und Gefäßverschluß reagieren [46]. Diese Untersuchungen sind in jedem Falle nachzuholen.

## 5 Zusammenfassung

### **Aufnahme und Phototoxizität von Palladium-Bakteriochlorophyllid- $\beta$ -Serinester in Gefäß-endothelzellen (Zelllinie CRL 1730)**

Die Photodynamische Tumorthherapie (*PDT*) ist eine Form der Tumorthherapie mit Hilfe von Photosensibilisatoren. Sie übertragen in Zellen durch Anregung mit Licht, Energie auf Sauerstoffmoleküle. Dabei entstehen Singulett-Sauerstoff und Radikale, die stark phototoxisch sind und somit zum Zelltod führen.

Vom Bakteriochlorophyllid- $\beta$ -Serinester (BChlSer) [ROSENBACH-BELKIN et al., (1996), MOSER et al., 1998] und seinem Derivat, Pd-Bakteriochlorophyllid- $\beta$ -Serinester (Pd-BChlSer), werden von verschiedenen Tumorzelllinien während einer 2 stündigen Inkubationszeit bis zu  $10^8$  Moleküle pro Zelle aufgenommen. Im Gegensatz dazu nehmen menschliche Gefäßendothelzellen (HUVEC: Zelllinie CRL 1730) nur  $10^6 - 10^7$  Moleküle auf. Bei  $10^{-9}$  M Photosensibilisator-Konzentration wurden bereits reversible Zellschädigungen beobachtet [SALOMON 1999], während in unseren Experimenten eine Zellschädigung ab einer Sensibilisator-Konzentration von  $10^{-7}$  M in der Zellsuspension eintritt.

Es wurde die Phototoxizität von Pd-BChlSer in Abhängigkeit von Lichtintensität und PS-Konzentration am Zellstamm CRL 1730 untersucht. Dazu wurden Proben zu je 2 Mio. Zellen präpariert, die auf einem Bestrahlungstisch mit einem Diodenlaser-Array in verschiedenen Zeitintervallen bestrahlt worden sind. Dabei trat ein ungewöhnliches Phänomen auf: Die Phototoxizität bei sehr geringer Leistungsdichte kombiniert mit sehr langer Bestrahlungsdauer ist bei gleicher Strahlendosis wesentlich effektiver (Faktor 3) als hohe Leistungsdichten mit kürzerer Bestrahlungszeit. Jedoch ist zur Zeit die Ursache dieses Phänomens unklar.

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

- [1] Rosenbach-Belkin, V., Chen, L., Fiedor, L., Tregub, I., Pavlotsky, F., Brumfeld, V., Salomon, Y., Scherz, A. (1996): Serine conjugates of chlorophyll and bacteriochlorophyll: Phototoxicity in vitro and tissue distribution in mice bearing melanoma tumors, *Photochem. Photobiol.* 64, 174-181
- [2] Moser, J.G., Rosenbach-Belkin, V., Brandis, A., Scherz, A., Scheer, H., Salomon, Y. (1998): Bacteriochlorophyllide-Serine: Cellular uptake kinetics and transformation. *Proc. 7th Biennial Congress IPA. #RC210. Nantes*
- [3] Folkman, J., :Die Gefäßversorgung von Tumoren. *Spektrum der Wissenschaft* 3. Auflage 1989, Krebs-Tumoren-Zellen-Gene, Hrsg. Schirmacher S. 134-147.
- [4] Riede, U.-N., Wiestler, O. D. und Müller Hj. (1995): Autonomes Zellwachstum (Tumorpathologie) in: *Allgemeine und spezielle Pathologie* (4. Auflage), (Hrsg. Riede, U.-N., Schaefer, H.-E.), Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York
- [5] Zilberstein, J., Schreiber, S., Bloemers, M. C., Bendel, P., Neeman, M., Schechtman, E., Kohen, F., Scherz, A., Salomon, Y. (2001): Antivascular treatment of solid melanoma tumors with bacteriochlorophyll-serine-based photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.* 73(3): 257-66
- [6] Mironow, A. F. (1995): Synthesis and properties of new chlorin and bacteriochlorin photosensitizers. *SPIE Biomed. Optics* 2625, 23-32.
- [7] Kirsch, D., Kaufmann, R., Spengler, B., Heuermann, A., und Moser, J. G. (1995): Cyclodextrin-Chemie: Schnelle Analyse von Reaktionsprodukten durch MALDI-Massenspektroskopie. *Abstr. INCOM `95.*
- [8] Moser, J. G. (1993): Attempts to treat malignant melanoma by photodynamic therapy using bacteriopheophorbide ester as the sensitizer. *SPIE Biomed. Optics* 1881, 116-125

- [9] Henderson, B., Sumlin, A. B., Owczarczak, B. L., Dougherty, T. J. (1991): Bacteriochlorophyll a as photosensitizer for photodynamic treatment of transplantable murine tumors. *J. Photochem. Photobiol.* 10, 303-313.
- [10] Pottier, R., Kennedy, J. (1990): The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. *J. Photochem. Photobiol.* 8, 1-16.
- [11] Jori, G., Reddi, E., (1992): The role of lipoproteins in the delivery of tumor-targeting photosensitizers. *Int. J. Biochem.* 25, 1369-1375
- [12] Scheer, H. (ed.) (1991): *The Chlorophylls*. CRC Press, Boca Raton FL (USA).
- [13] Moser, J. G., Suchomski, R., Danielowski, T., Wagner, B. (1994): Significance of threshold doses for photodynamic therapy of melanotic and amelanotic tumors. *SPIE Biomed. Optics* 2371, 178-186.
- [14] Moser, J. G., Ostrowsky, A., Gümüşdaglı, M., Kleiber, B. (1993): Bacteriopheophorbide esters; Photosensitizers without „threshold dose“? *SPIE Biomed. Optics* 2078, 193-204 (1994).
- [15] Roehrs, S., Ruebner, A., Hartwich, G., Scheer, H., Moser, J. G. (1995): Peripheral substitution of pheophorbides and bacteriopheophorbides to promote inclusion into inert carrier system for *PDT*. *SPIE Biomed. Optics* 2625, 333-338
- [16] Moser, J. G., Heuermann, A., Oehr, P., Scheer, H., Vervoorts, A., Andrees, S. (1994): Carrier systems in *PDT*: On the way to novel anti-tumor drugs. *SPIE Biomed. Optics* 2325, 90-99.
- [17] Oelckers, S., Hanke, T., Moser, J., Röder, B. (1994): Time resolved detection of singlet oxygen luminescence in red cell ghosts generated by photosensitizers via excitation in the far red. *SPIE Biomed. Optics* 2325, 116-120.
- [18] Herzog, M., Moser, J. G., Wagner, B., Broecker, J. (1994): Shielding effects and hypoxia in Photodynamic Therapy. *J. Oral Maxillo-Facial Surgery* 23, 406-408.

- [19] Moser, J. G., Dembeck, U., Hubert, M., Spengler, B., Bayer, R., Wagner, B. (1993): Subcellular storage compartments of bacteriopheophorbide sensitizers, *SPIE Biomed. Optics* 2078, 532-538 (1994).
- [20] van Lengoed, H.L., Schuitmaker, J. J., van der Veen, N., Dubbelman, T. M. A. R., Star, W. M. (1993): Fluorescence and photodynamic effects on bacteriochlorin a observed in vivo in sandwich observation chambers. *Br. J. Cancer* 67, 898-903
- [21] Schuitmaker, J. J., van Lengoed, H. L. L. M., van der Veen, N., Dubbelman, T. M. A. R., Star, W. M. (1993): Laser-induced in vivo fluorescence of bacteriochlorin a: preliminary results. *Lasers in Medical Science* 8, 39-42
- [22] Schuitmaker, J. J., van Best, J. A., van Delft, J. L., Dubbelman, T. M. A. R., Oosterhuis, J. A., de Wolff-Rouendaal, D. (1990): Bacteriochlorin a, a new photosensitizer in photodynamic therapy. *Ophthalmol. A. Visual Sci.* 31, 1444-1450.
- [23] Moser, J. G., (1997b) Definitions and general properties of 2nd and 3rd generation photosensitizers. In: *Photodynamic Tumor Therapy – 2nd & 3rd Generation Photosensitizers*. (Moser, J. G., ed). London: Harwood Academic Publishers. 1997. pp. 21-31.
- [24] Bachowsky, B. J., Ben Hur, E., Girotti, A.W. (1991): Phthalocyanine-sensitized lipid peroxidation in cell membranes: use of cholesterol and azide as probes of primary photochemistry. *J. Photochem. Photobiol.* 9, 307-321.
- [25] Weishaupt, K. R., Gomer, C. J., Dougherty, T.J. (1976): Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* 36, 2326-2329.
- [26] Katz S., Vakrat Y., Brumfeld V., Weiner L., Gabelmann E., Paul A., Hild M., Lendt. R., Leopold. D., Norris J.R., Scheer, H., Moser, J. G., Salomon Y., Scherz (1998): Bacteriochlorophyll-serin generates only OH radicals under Near-Infra-Red illumination (NIR) 7th Biennial Congress IPA'98 #RC208Nantes

- [27] Foote, C. (1976): Photosensitized oxidation and singlet oxygen: Consequences in biological systems. In: (W. A. Pryor ed.) Free radicals in biology. 2, 85-133
- [28] Lartigau, E., Vitu, L., Haie-Meder, C., Cosset, M. F., Delapierre, M., Gerbaulet, A., Eschwege, F., Guichard, M. (1992): Feasibility of measuring oxygen tension in uterine cervix carcinoma. *Eur. J. Cancer* 28, 1354-1357.
- [29] Vaupel, P., Schlenger, K., Knoop, C., Hockel, M. (1991): Oxygenation of human tumors: Evaluation of tissue distribution in breast cancer by computerized O<sub>2</sub>tension measurements. *Cancer Res.* 51, 3316-3322.
- [30] Henderson, B. W., Fingar, V. H. (1989): Oxygen limitation of direct tumor cell kill during photodynamic treatment of murine tumor model. *Photochem. Photobiol.* 49, 299-304.
- [31] Hirst, D. G. (1989): Tumor hypoxia implication for therapy. *Int. J. Radiat. Biol* 56, 207-213.
- [32] Moulder, J. P., Rockwell, S. (1987): Tumor hypoxia: Its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 5,313-341.
- [33] Gottfried, V., Peled, D., Winkelman, J. W., Kimel, S. (1988): Photosensitizers in organized media: singlet oxygen production and spectral properties. *Photochem. Photobiol.* 48,157-163.
- [34] Kimel, S., Tromberg, B. G., Roberts, W. G., Berns, M. W. (1989): Singlet oxygen generation of porphyrins, chlorins, and phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 50, 175-183.
- [35] Murasecco, P., Oliveros, E., Braun, A. M., Monnier, P. (1985): Quantum yield measurements of hematoporphyrin derivative sensitized singlet oxygen production, *Photochem. Photobiol.* 9, 193-201.

- [36] Tromberg, B. J., Orenstein, A., Kimel, S., Barker, S. J., Hayatt, J., Nelson, J. S., Berns, M. W. (1990): In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 52, 375-385.
- [37] Reed, M. W. R., Mullins, A. P., Anderson, G. L., Miller, F. N., Wieman, T. J. (1989): The effect of photodynamic therapy on tumor oxygenation. *Surgery* 106, 94-99.
- [38] Vaupel, W. P. (1994): Blood Flow, Oxygenation, Tissue pH Distribution, and Bioenergetic Status of Tumors. Ernst Schering Research Foundation, lecture 23
- [39] Stone, H. B., Brown, J. M., Philips, L. T., Sutherlands, R. M. (1993): Oxygen in human tumor: Correlation between methods of measurements and response to therapy. *Radiat. Res.* 136, 422-434.
- [40] Bromberg, A., Zilberstein, J., Riesenber, S., Benor, I. E., Silberstein, E., Zimnavoda, J. Frishman, G., Krietzman, A. (1996): Optical fiber sensors for blood gases and pH based on porous glass tips. *Sensor and Actuators B31*, 181-191.
- [41] Zilberstein, J., Bromberg, A., Berkovic, G. (1994b): Fluorescence study of pyrene chemically bound to controlled-pore glass. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 77, 69-81.
- [42] Moser, J. G. (1997b) Biological Parameters of Photosensitization. In: *Photodynamic Tumor Therapy – 2nd & 3rd Generation Photosensitizers*. (Moser, J. G., ed). London: Harwood Academic Publishers. 1997. pp. 21-31.
- [43] DeJordy, J. O., Bendel, P., Horowitz, A., Salomon, Y., Degani, H. (1992): Correlation of MR Imaging and histologic findings in mouse melanoma. *J. Magn. Reson. Imag.* 2, 695-700.
- [44] Moser, J. G., Karmakova, T., Andrees, S., Wagner, B. (1997a): Photosensitization of tumors cells: Are comparable conditions an unreal dream? *SPIE Biomed. Optics* 3191, 114-123.

- [45] Parks, D. R., Bryan, V. M., Oi, V. M., Oi, V. T., Herzenberg, L.A. (1979): Antigen specific identification and cloning of hybridomas with a Fluorescence Activated Cell Sorter. Proc. Natl. Acad. Sci USA 76, 1962
- [46] Ben-Hur, E. (1993): Phthalocyanines as photosensitizing agents for tumors -mechanism of action (Invited Paper) Progress in Biomedical Optics 2078, 102-106

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Semih Özlügedik  
 Geburtsdatum/-ort: 14. Dezember 1975 in Solingen  
 Eltern: Muhsine Özlügedik, geb. Bümen  
 Mehmet Özlügedik  
 Staatsangehörigkeit: türkisch  
 Familienstand: ledig

### Schulbildung

08/1982 – 07/1986 Grundschule Kreuzweg in Solingen  
 09/1986 – 07/1988 Theodor-Heuss Realschule in Solingen  
 08/1988 – 05/1995 Gymnasium Schwertstrasse in Solingen  
 24.05.1995 Allgemeine Hochschulreife

### Studium

10/1995 – 04/2002 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
 04/2001 – 03/2002 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Düsseldorf:  
 Tertiale in Innerer Medizin, Chirurgie & Anaesthesiologie

### Prüfungen

13.03.1998 Ärztliche Vorprüfung  
 23.03.1999 1. Staatsexamen  
 28.03.2001 2. Staatsexamen  
 19.04.2002 3. Staatsexamen

**Studienbegleitende Tätigkeit**

07/2000 – 03/2002

Studentische Hilfskraft im Institut für Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf

**Beginn der Dissertation**

07/1999

Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. J. G. Moser am Institut für Lasermedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Thema: „Aufnahme und Phototoxizität von Palladium-Bacteriochlorophyllid- $\beta$ -Serinester in Gefäßendothelzellen (Zelllinie CRL 1730)“

**Berufstätigkeit**

seit 06/2002

Beschäftigung als AiP in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums Essen