

Photodynamische Aktivität von Methylenblau

K. König¹, H. Meyer²

¹ Institut für Lasertechnologien in der Medizin an der Universität Ulm (Direktor: Prof. Dr. R. Steiner)

² Zentrale Tierversuchsanlage der Universität Ulm (Direktor: Prof. Dr. H. Schnappauf)

Zusammenfassung

Der kationische Phenothiazinfarbstoff Methylenblau eignet sich aufgrund seiner hohen Quantenausbeute der Singulett-Sauerstoff-Formation und des hohen Absorptionsvermögens im roten Spektralbereich als effektiver Photosensibilisator in der photodynamischen Therapie von Tumoren und Akne-Erkrankungen. Die Aktivierung von Methylenblau-haltigem Tumorgewebe mittels Kryptonionen-Laser (647 nm, 676 nm) oder Farbstofflaser (600 nm–700 nm) induziert Tumordstrukturen. Die Farbstoffmonomere erweisen sich gegenüber den Dimeren als photodynamisch aktiver. Die Bestrahlung von Methylenblau-gefärbten *Propionibacteria acnes* bewirkt eine effektive Inaktivierung. Die photodynamische Behandlung von Hauttumoren und *Acne vulgaris* mittels langwelliger sichtbarer Strahlung und topischer Methylenblau-Applikation erscheint möglich.

Photodynamic Activity of Methylene Blue

Based on the properties of high quantum yield of singlet oxygen formation and strong absorbance in the red spectral region, the cationic phenothiazine dye methylene blue is qualified for the use as an efficient photosensitizer in the photodynamic therapy of tumours and acne diseases. The activation of tumours containing methylene blue by means of a krypton ion laser (647 nm, 676 nm) or dye laser (600 nm–700 nm) results in tumour destruction. The monomers of the dye are better sensitizers than the dimers. The irradiation of *Propionibacteria acnes* stained with methylene blue leads to efficient inactivation. A photodynamic treatment of skin tumours and *acne vulgaris* with long-wavelength visible radiation and topical administration of methylene blue seems possible.

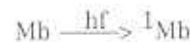
Einleitung

Seit über 100 Jahren wird der trizyklische Phenothiazinfarbstoff Methylenblau (Mb) in der klinischen Medizin eingesetzt, beispielsweise zur Behandlung der Methämoglobinämie, bei Cyanidvergiftungen oder in der Histologie. 1882 führte *Robert Koch* Bakterienfärbungen mittels Methylenblau ein (1) und 1886 gelang *Paul Ehrlich* die In-vivo-Mb-Färbung von Nervenzellen (2).

Methylenblau ist nur gering toxisch (3), beeinflusst jedoch als Redoxsystem bei systemischer Gabe Energiestoffwechsel und Atmung (4, 5).

In wässriger Lösung liegt Methylenblau ($M = 320$ g) in monomerer und dimerer Form vor. Das Absorptionsmaximum der Monomere liegt bei 664 nm ($\epsilon_M = 80\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), das der Dimere bei 605 nm ($\epsilon_D = 132\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Abb. 1). Die Dimerisationskonstante hat den Wert $k_d = 0,17 \text{ mM}$ (6). Nach Elektronenaufnahme wird Mb zur neutralen Leucoform reduziert. Die damit verbundene Unterbrechung des konjugierten 18 π -Elektronensystems führt zum Verlust der Absorption im sichtbaren Spektralbereich. Als Reduktionsmittel fungieren beispielsweise NADH und Flavine.

Nach Lichtabsorption erfolgt durch Intersystem Crossing (ISC) eine Besetzung des metastabilen Triplett-niveaus ($\tau_T = 0,016 \text{ ms}$ / Argon, $\phi_T = 0,58$ (7)). Dieser ist Ausgangspunkt für den Energietransfer zu dem im Triplett-Grundzustand befindlichen molekularen Sauerstoff:



Der dabei entstehende Singulett-Sauerstoff induziert zytotoxische Reaktionen. Methylenblau verfügt über eine Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute von $> 0,55$ (8) und stellt damit einen potentiellen Photosensibilisator dar.

Bereits 1924 zeigte *Passow* (9), daß lichtaktiviertes Methylenblau auf grampositive Bakterien phototoxisch wirkt. Eine damalige Anwendung als Desinfektionsmittel für lichtexponierte Wasserbäder wird heute erneut diskutiert (10).

1961 erzielten *Bellin et al.* (11) eine photodynamisch induzierte Inaktivierung von Tumorzellen und 1966 konnten *Berg und Jungstaud* (12) durch intratumo-

rale Methyleneblau-Applikation und Bestrahlung mittels Hochdrucklampen in Tierversuchen eine Reduktion des Tumorstwachstums demonstrieren.

Köllner (13,14) untersuchte den photodynamischen Wirkungsmechanismus von Mb auf intrazellulärer Ebene. Nach Farbstoffinkubation beobachtete er die Entstehung von Mb-haltigen Speicherorganellen, vermutlich Lysosomen, die bei Bestrahlung zerstört wurden und Zell-Lysen induzierten. Diese korrelierten mit einem Fluoreszenzanstieg und der Bildung einer vor der Bestrahlung nicht beobachteten Zellkern-Fluoreszenz.

Ziel dieser Untersuchungen war die photodynamisch induzierte Tumordestruktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungswellenlänge und die Photoinaktivierung der grampositiven Propionibacteria acnes nach Mb-Applikation. Als Bestrahlungsquellen wurden im roten Spektralbereich emittierende Kryptonionen- und Farbstofflaser eingesetzt.

Material und Methoden

Photosensibilisator

Methyleneblau (Merck, Darmstadt) wurde mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und 0,25 ml den Versuchstieren intratumoral (in und um Tumorbett) in einer Konzentration von 3 mM verabreicht. Mit einer 10-mM-Lösung wurden die auf Agar wachsenden Bakterienkulturen gefärbt (nach 20minütiger Inkubationszeit NaCl-Waschung).

Tumormodell

Es wurden solide, subkutan wachsende Ehrlich-Karzinome verwendet, die durch Injektion von 0,2 ml Ehrlich-Aszites-Zellen (5 Mio Zellen/ml) männlichen ICR-Mäusen induziert wurden. Die Bestrahlung der narkotisierten Tiere erfolgte vier Tage post injectionem.

Bakterienkulturen

Propionibacteria acnes wuchsen auf Blut-Agar-Grundsubstrat (ohne Blutzusatz) No. 2, OXOID, pH = 6,5 bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen (Gas Pack System, OXOID). Die Bestrahlung erfolgte an kulturhaltigen Agarplatten unter normalen aeroben Bedingungen.

Bestrahlungsanordnung

Die Strahlung eines Kryptonionen-Lasers (647 nm, 676 nm) und eines DCM-Farbstofflasers (durchstimmbare im Bereich 600 nm–700 nm) wurde in eine 0,2-mm-Quarzfaser eingekoppelt und der Probe zugeführt. Die Bestrahlung der tumortragenden Versuchstiere erfolgte sechs Stunden nach Mb-Applikation mit einer Bestrahlungsdosis von 200 J/cm².

Auswertung

Zehn Tage nach der Bestrahlung wurden die Tiere getötet und die Tumorfleischmassen bestimmt. Für die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (CFU) der bestrahlten Bakterienkulturen wurden Einzel-

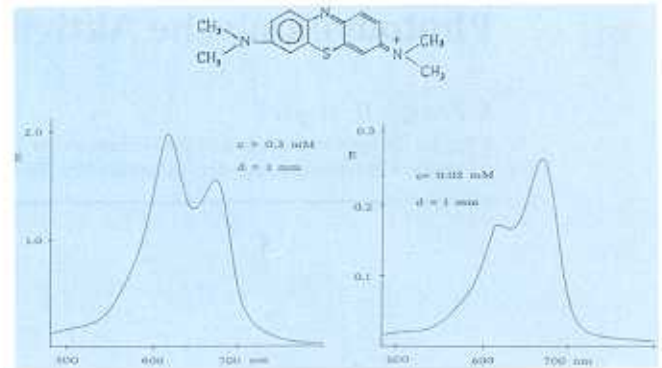


Abb. 1 Metachromasie des Photosensibilisators Methyleneblau. Der Farbstoff liegt in wässriger Lösung als Monomer-Dimer-Gemisch vor.

kolonien des Propionibacterium acnes mit dem darunter liegenden Agar entnommen, in anaerobes Nährmedium (RCM, OXOID) gegeben und in Verdünnungsreihen bis zu 10⁻⁸ eingeteilt. 0,1 ml der entsprechenden Verdünnungsstufe wurde auf B₂-Agarplatten ausgestrichen und unter anaeroben Bedingungen für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt.

Ergebnisse

Photodynamische Tumörtherapie

Zunächst wurde das Transmissionsverhalten der ca. 0,2 mm dicken Hautschicht der Versuchstiere in vitro getestet. Für 610-nm-Strahlung ergab sich ein Wert von $T = 0,7 \pm 0,1$, für 670-nm-Strahlung $T = 0,8 \pm 0,1$ (Fehler ergibt sich aus Schwankungen der Dicke und Hämoglobingehalt). Ausgehend von diesen Resultaten wurde die photodynamische Behandlung der Tumoren ohne Entfernung der darüber liegenden Hautschicht durchgeführt. Die intratumorale Mb-Injektion führte zu einer Färbung des Tumor- und peritumoralen Gewebes. Histologische Untersuchungen zeigten, daß keine vollständig homogene Anreicherung des Farbstoffs vorlag. Im folgenden wurde in die Absorptionsbanden der Monomere (670 nm) und der Dimere (610 nm) eingestrahlt. Eine geringe bathochrome Bandenverschiebung infolge veränderter Mikroumgebung (7) wurde berücksichtigt. Abb. 2 zeigt die Ergebnisse der Bestrahlung. Eine signifikante Tumorreduktion konnte durch die photodynamische Behandlung gegenüber den Kontrolltumoren (Gruppe K) erreicht werden. Die langwelligere Bestrahlung bei 670 nm ergab die geringsten Tumorfleischmassen. Eine geringe Hemmung des Tumorstwachstums durch alleinige Gabe des Sensibilisators (keine Bestrahlung, Gruppe: Mb) konnte beobachtet werden.

Photodynamisch induzierte Inaktivierung

Abb. 3 zeigt Resultate der Bestrahlung von Propionibacteria acnes. Die alleinige Bestrahlung mit dem Kryptonionen-Laser bewirkte eine geringe Inaktivierung der Bakterien. Die zusätzliche Mb-Färbung erhöhte dagegen die Rate der Photodestruktion wesentlich. Gegenüber den Kontrollkulturen wurde eine 99%ige Reduktion der koloniebildenden Keime erzielt.

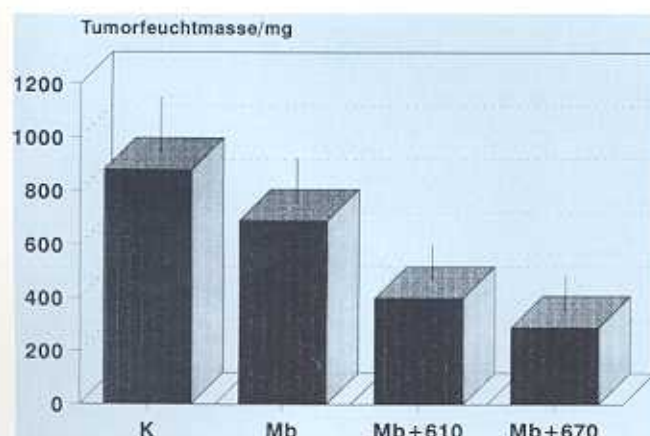


Abb. 2 Durchschnittliche Tumorfeuchtmassen und Standardabweichung von 10 Versuchstieren 10 Tage nach der 610 nm/670 nm-Bestrahlung (200 J/cm^2). K = Kontrollgruppe, Mb = Gruppe, die nur Mb-Applikation erhielt, keine Bestrahlung.

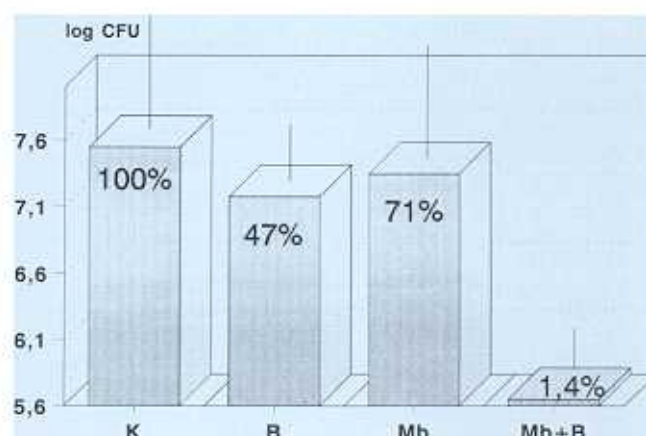


Abb. 3 Inaktivierung nach 647 nm/676 nm-Bestrahlung (10 J/cm^2). Die kolonieformenden Einheiten (CFU) sind logarithmisch aufgetragen. K = Kontrolle, B = Bestrahlung, Mb = Mb-Färbung.

Diskussion

Applikation von Methylenblau und Lichtexposition induzieren phototoxische Wirkungen, die auch für eine photodynamische Behandlung von Tumoren und Akne-Erkrankungen genutzt werden können. Sowohl die Einstrahlung in die Absorptionsbande der Monomere als auch in die kurzwelligere Bande der Dimere führt zu zytotoxischen Effekten. Obwohl die 3-mM-Injektionslösung entsprechend der Dimerisationskonstanten von $k_d = C_{\text{Mon}}^2 / C_{\text{Dim}}$ (C : Konzentration) einen Dimeranteil von 85 % enthielt, wurden bei der 670-nm-Einstrahlung größere Tumorreduktionen erzielt.

Eine vollständige Tumordestruktion konnte bei diesen Versuchen nicht beobachtet werden. Frühere Untersuchungen belegen jedoch (16), daß die Wirksamkeit der photodynamischen Behandlung durch mehrmalige Bestrahlung und Mb-Injektion gesteigert werden kann.

Die Mb-Applikation sollte topisch erfolgen, da bei systemischer Gabe eine Reduktion des Farbstoffs zur farblosen Leucoform erfolgt (17). Über eine bevorzugte Mb-Anlagerung in Hauttumoren berichtet *Canti* (18), von einer intensiven Tumorfärbung in der Blase nach Mb-Instillation und anschließender aqua-Spülung *Fukui* et al. (19) und *König* et al. (16). Eine selektive photodynamische Behandlung bei großflächiger Bestrahlung ist somit möglich. Eine erste photodynamische Therapie von Harnblasentumoren (20, 21) führte zu einer partiellen, bis zu 30%igen Tumorzerstörung. Die unvollständige Destruktion konnte auf eine unzureichende Penetration des Farbstoffs im Tumorgewebe zurückgeführt werden. Für eine Abschätzung der therapeutischen Wirkung ist die detaillierte Kenntnis des Eindringverhaltens der Strahlung und des Photosensibilisators notwendig. Tiefenaufgelöste Messungen zur Verteilung des Sensibilisators in biologischem Gewebe sind mittels photothermischer Meßverfahren durchführbar (15).

Die bereits vor mehr als 70 Jahren erkannte, photodynamisch induzierte keiminaktivierende Wir-

kung des Methylenblau und die Möglichkeit der Mb-Färbung grampositiver Bakterien kann für die Behandlung von Akne-Erkrankungen genutzt werden. Strahlung im roten Spektralbereich induziert bei Mb-gefärbten *Propionibacteria acnes* effektive Photoinaktivierungen.

Die alleinige Bestrahlung der Bakterien ohne Farbstoff-Inkubation induziert ebenfalls keiminaktivierende Wirkungen (Abb. 3). Diese wird hauptsächlich durch die Aktivierung photodynamisch aktiver Porphyrine verursacht, die von den *Propionibacteria acnes* produziert werden (22). Die Inaktivierungsrate kann in diesem Fall noch gesteigert werden, wenn in die Absorptionsmaxima der Porphyrine eingestrahlt wird (23, 24, 25). Jedoch wird dann der Wirkungsbereich wesentlich durch die optische Eindringtiefe der Lichtstrahlung bestimmt. Der Wellenlängenbereich großer Lichttransmission in biologischem Gewebe (optisches Fenster) liegt im roten und NIR-Spektralbereich. Photosensibilisatoren sollten in diesem Bereich absorbieren. Mit einem molaren Absorptionskoeffizient von $\epsilon_M = 80\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ erfüllt Methylenblau diese Forderung.

Danksagung

Die Autoren danken, *M. Schubert*, *V. Bockhorn* und *W. Dietel* für viele hilfreiche Diskussionen.

Literatur

- 1 Koch, R.: Berl. klin. Wschr. 19 (1882) 221
- 2 Ehrlich, P.: Ueber die Methylenblaureaction der lebenden Nervensubstanz. Dtsch. med. Wschr. 4 (1886) 49–52
- 3 Blass, R., D. Fung: Dyed but not dead – Methylene Blue overdose. Anesthesiology 4 (1976) 458–459
- 4 Michaelis, L., K. Salomon: Methämoglobin-Erzeugung und Atmungssteigerung durch organische Farbstoffe. Biochem. Z. 234 (1931) 107–115
- 5 Glogner, P., H. Wolf, H. Holzner: Einfluß von Methylenblau auf Glykolyse und Atmung von Aszites-Tumorzellen. Biochem. Z. 332 (1959) 407–415
- 6 Bergmann, K., C. T. O'Konski: A spectroscopic study of Methylene Blue monomer, dimer and complexes with Montmorillonite. J. Phys. Chem. 67 (1963) 2169–2177
- 7 Kelly, J. M., J. M. Wilhelm, J. M. van der Putten, D. J. McConnell: Laser flash spectroscopy of Methylene Blue with nucleic acids. Photochem. Photobiol. (Kronb.) 2 (1987) 167–175
- 8 Bonneau, R., R. Pottier, O. Bagno, J. Joussot-Dubien: pH dependence of singlet oxygen production in aqueous solutions using thiazine dyes as photosensitizers. Photochem. Photobiol. (Kronb.) 21 (1975) 159–163
- 9 Passow, A., W. Rimpau: Untersuchungen über photodynamische Wirkungen auf Bakterien. Münch. med. Wschr. 23 (1924) 733–737
- 10 Redaktion: Wasser mit Farbe desinfiziert. Bild der Wissenschaft 9 (1991) 9
- 11 Bellin, J., S. Mohos, G. Oster: Dye-sensitized photoinactivation of tumour cells in vitro. Cancer Res. (Balt.) 21 (1961) 1365–1371
- 12 Berg, H., W. Jungst: Photodynamische Wirkung auf das solide Ehrlich-Karzinom. Naturwissenschaften 18 (1966) 481–482
- 13 Köllner, T.: Untersuchungen zur intrazellulären Aufnahme, Fluoreszenz und Phototoxizität von Methylenblau – Ein Beitrag zur Klärung der Wirkung von Sensibilisatoren in der Photodynamischen Therapie. Dissertation Ulm (1990)
- 14 Köllner, T., A. Rück: Light-induced fast changes of intracellular fluorescence of phenothiazine dyes and other cationic sensitizers. Eingereicht 1992
- 15 König, K., E. Welsch, H. J. Walther: Photoacoustic Absorption Measurements on Tumor Tissue stained with the Photosensitizer Methylene Blue. Lasers in the Life Sciences. 4 (1992) 209–218
- 16 König, K., V. Bockhorn, W. Dietel, H. Schubert: Photochemotherapy of animal tumours with the photosensitizer Methylene Blue using a krypton laser. J. Cancer Res. clin. Oncol. 113 (1987) 301–303
- 17 DiSanto, A., J. Wagner: Pharmacokinetics of highly ionized drugs III: Methylene Blue-blood levels in the dog and tissue levels in the rat following intravenous administration. J. pharm. Sci. 61 (1972) 1090–1094
- 18 Cantù, G.: Rapid cytological diagnosis of skin lesions. Advanc. Clin. Cytol. 2 (1984) 243–266
- 19 Fukui, I. et al.: In vivo staining test with Methylene Blue for Bladder Cancer. J. Urol. (Balt.) 130 (1983) 252–255
- 20 König, K., W. Dietel, V. Bockhorn, A. Möller: Laserpilotanlage zum Einsatz in der Urologie. Medizintechnik (Berlin) 29 (1989) 50–51
- 21 König, K., V. Bockhorn, W. Dietel: Patent DD 272 033 (1987)
- 22 Plewig, G., A. M. Kligman: Acne morphogenesis and treatment. Springer, Berlin (1975)
- 23 Meffert, H., K. Gaunitz, T. Gutewart, U. J. Amlong: Aknetherapie mit sichtbarem Licht. Dermatol. Mschr. 176 (1990) 597–603
- 24 Kjeldstad, B., A. Johnsson: An action spectrum for blue and near ultraviolet inactivation of Propionibacterium acnes; with emphasis on a possible porphyrin photosensitization. Photochem. Photobiol. (Kronb.) 43 (1986) 67–70
- 25 König, K., H. Schneckenburger, H. Meyer, A. Rück: Fluoreszenzverhalten und photodynamische Aktivität von Propionibacterium acnes. Vortrag auf Photodermatologie-Kongreß, März 1992

Dr. rer. nat. Karsten König

Institut für Lasertechnologien in der Medizin
an der Universität Ulm
Helmholtzstr. 12
D-89081 Ulm