

020

Biomed. Technik  
36 (1991), 201–205

K. König  
S. Auchter

## Einfacher Streumeßplatz zur Testung der photodynamischen Wirksamkeit von Farbstoffen

Setup for the Determination of the Photodynamic Activity of Dyes on the Basis of Scattering Measurements

*Institut für Lasertechnologien in der Medizin an der Universität Ulm*

**Schlüsselwörter:** Photodynamische Aktivität, Porphyrine, Photoprodukt, Aktionsspektrum, Mie-Streuung

Es wird ein einfacher Streumeßplatz zur Bestimmung der photodynamischen Wirksamkeit von Farbstoffen vorgestellt, der photochemisch induzierte morphologische Änderungen und Lyseerscheinungen von Zellen registriert und durch Variation der Bestrahlungswellenlänge die Aufnahme von Aktionsspektren ermöglicht. Verschiedene Photoprodukte des Photosensibilisators Hämatoporphyrin-Derivat (HPD) wurden in Erythrozytensuspensionen getestet. Dabei zeigt sich in Abhängigkeit vom Absorptionsverhalten eine photodynamische Wirkung dieser Produkte, die jedoch im Vergleich zum HPD als geringer einzuschätzen ist.

**Key-words:** Photodynamic activity – porphyrin – photoproduct – action spectrum – scatter measurement

An experimental setup for the determination of the photodynamic activity of dyes on the basis of scattering measurements is described. With its aid, photochemically induced morphological changes and the process of cell lysis can be registered, and action spectra measured by varying the irradiation wavelength. Different photoproducts of the photosensitizer hematoporphyrin derivative (HPD) were tested in human erythrocyte suspensions. The photodynamic activity of these products was found to depend on absorption behavior, but is lower than that of HPD.

### Einleitung

Bei der Photochemotherapie von Tumoren wird üblicherweise der Photosensibilisator Hämatoporphyrin-Derivat (HPD) eingesetzt [2], der neben dem Nachteil einer nicht unerheblichen Akkumulation in den äußeren Hautschichten nach systemischer Applikation und einer damit bedingten Lichtempfindlichkeit des Patienten über ein nur geringes Absorptionsvermögen im roten Spektralbereich verfügt. Die Verwendung von Strahlung in diesem Spektralbereich ist aufgrund der dort geringen Absorption von biologischem Gewebe vorteilhaft, denn es können so tieferliegende und ausgedehnte Tumoreareale erfaßt und die Gefahren thermisch induzierter Nekrosen reduziert werden. Gegenwärtig wird eine Vielzahl von Farbstoffen hinsichtlich einer potentiellen Alternative zur systemischen HPD-Applikation getestet, z. B. [12, 5, 11, 10].

Auch aus dem Porphyringemisch HPD durch photochemische Umwandlungen formierte Photoprodukte [1, 6, 7] sind aufgrund zusätzlicher Absorptionsbanden und einer Erhöhung der integralen Extinktion im längerwelligen roten Spektralbereich von Interesse. Das zudem durch gleichzeitiges Photobleaching abnehmende Absorptionsvermögen im kurzwelligen Spektralbereich bewirkt bei Applikation eine geringere Lichtempfindlichkeit des Patienten.

Dabei formieren die HPD-Komponenten Hämatoporphyrin (HP) und Protoporphyrin (PP) jeweils unterschiedlich absorbierende Photoprodukte (Photohämatoporphyrin, Photoporphyrin).

Im folgenden wird ein einfacher Meßaufbau zur Bestimmung der Wirksamkeit von potentiellen Photosensibilisatoren beschrieben, der auf der Methode der Kleinwinkelstreuung an Zellsuspensionen beruht, und Messungen zur photodynamischen Aktivität der Photoprodukte von HP und PP vorgestellt.

### Methode

Ein einfaches Modell für die Testung der photodynamischen Wirksamkeit potentieller Farbstoffe stellen mit dem jeweiligen Sensibilisator versetzte Erythrozytensuspensionen dar [3, 4]. Die photochemisch induzierten Membrandefekte an den Zellen (Funktionsbeeinträchtigung membrangebundener Enzyme und erhöhte passive Kationenpermeabilität verursacht durch Photooxydation von Aminosäuren und folgendem cross-linking von Membranproteinen [3]) bewirken eine osmosebedingte Formveränderung (Übergang in eine Kugelform und Volumenvergrößerung) sowie die anschließende Hämolysen. Die Kinetik der Quellphase und der Lyse lassen sich beispielsweise durch Messung des Streuverhaltens erfassen.

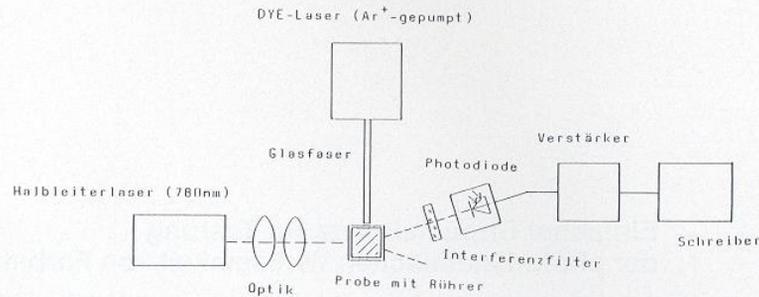


Bild 1. Schematischer Aufbau des Kleinwinkel-Streumeßplatzes.

Die zellkernlosen Erythrozyten nehmen in intaktem Zustand annähernd die Form einer Hantel ein (Abstand der Kugelmittelpunkte  $\approx 6 \mu\text{m}$ , Kugelradius  $\approx 1,2 \mu\text{m}$ ) und weisen damit Miesche Streuparameter  $\beta = \pi R/2$  ( $R$ : Teilchengröße) von 10–50 für Strahlung im roten Spektralbereich auf. Formänderungen und Brechzahländerungen ( $1,38 \rightarrow 1,33$ ) erschweren eine theoretische Beschreibung des Streuverhaltens, experimentell läßt sich jedoch das Auftreten bevorzugter Streurichtungen  $\alpha$  im Kleinwinkelbereich  $0-14^\circ$  beobachten. Die Lage der Extrema läßt sich nach [9] näherungsweise aus der Fraunhofer Beugung mit:

$$I_s \sim (2J_1[\beta \sin \alpha] / [\beta \sin \alpha])^2$$

$J_1$  = Besselfunktion 1. Ordnung

berechnen. Für die Anwendung dieser einfachen Beziehung müssen jedoch bestimmte Anforderungen an den relativen Brechungsindex  $m$  gestellt werden. Insbesondere können die Abweichungen für einige diskrete,  $\beta$ -abhängige  $m$ -Werte beträchtlich werden.

Bei geeigneten Beobachtungswinkeln kann der Beginn der Quellphase beobachtet werden, der mit einer Verschiebung der Streumaxima in Richtung kleinerer Winkel korreliert. Die folgende Hämolyse bewirkt eine Abnahme des Streusignals und somit einen gegen Null gehenden Photostrom eines Photodioden- oder Photomultiplier-Detektors. Die Messung der Kinetik von Quell- und Lysephase erlaubt eine Determinierung der photodynamischen Wirksamkeit des untersuchten Farbstoffes.

Die Hämolyse bewirkt auch eine Absorptionsänderung des Lösungsmittels infolge Hämoglobinzuführung. Dem muß beispielsweise durch die Wahl eines He-Ne-Lasers (633 nm-Strahlung im Bereich minimaler Hb-Absorption) als Streulichtquelle begegnet werden. Andererseits liegt diese Strahlung im Wellenlängenbereich der Porphyrinabsorption und kann bei genügender Leistung selbst photodynamische Wirkungen induzieren. Alternativ bietet sich die Verwendung von im längerwelligen sichtbaren oder im IR-Bereich emittierenden Strahlungsquellen an.

#### Meßaufbauten

Zwei experimentelle Anordnungen zur Messung der Kleinwinkelstreuung werden vorgestellt, die als für die Photodynamik wirksame Strahlung einen durchstimmbaren Farbstofflaser sowie einen bei 780 nm emittierenden Halbleiterlaser oder einem He-Ne-Laser geringer Leistung (ca. 1 mW) als Streulichtquelle verwenden.

Bild 1 zeigt den schematischen Aufbau des Streumeßplatzes. Die zu untersuchende Zellsuspension befindet sich in einer allseitig polierten 1-cm-Glasküvette und kann gerührt werden. Die Küvette wird von dem aufgeweiteten Strahl des Pilotlasers durchstrahlt. Die verstellbare Photodiode wird z. B. im Bereich zwischen den ersten beiden Streumaxima positioniert.

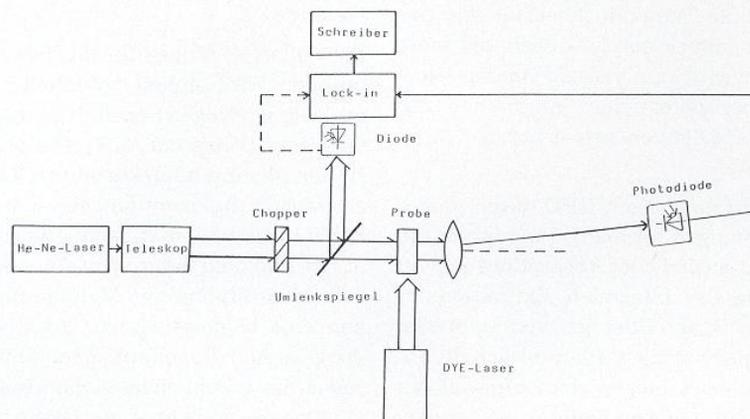


Bild 2. Streumeßplatz mit modulierter Strahlungsquelle.

Bei Verwendung eines Halbleiterlasers mit 780-nm-Emission entspricht diese Lage einem Streuwinkel von ca. 12°. Der Photostrom des von der Diode detektierten Signals wird verstärkt und über einen x-t-Schreiber registriert.

Der durchstimmbare Argonionen-Laser gepumpte DCM-Farbstofflaser (590 nm bis 700 nm) bestrahlt die Küvette senkrecht zum Pilotlaserstrahl. Um die Registrierung von Streustrahlung des Farbstofflaserstrahls zu vermeiden, ist vor der Detektorfläche der Diode ein entsprechendes Interferenzfilter (633 nm oder 780 nm) positioniert. Sollte jedoch bei den Wellenlängen der Pilotstrahlung mit dem Farbstofflaser eingestrahlt werden, kann durch die Verwendung eines Choppers und Lock-in-Technik bzw. eines Bandpaßfilters der Einfluß störender Untergrundstrahlung vom Meßsignal separiert werden. Der Halbleiterlaser kann mittels Frequenzgenerator auch intern moduliert (Anregungsstrommodulation) werden, Bild 2.

Die Erythrozytensuspension wurde durch Verdünnung von frisch abgenommenem Blut mit isotonischer Kochsalzlösung auf eine Konzentration von 1 Millionen Zellen/ml eingestellt.

**Messungen zur photodynamischen Wirksamkeit von Photoprodukten des Hämatoporphyrins**

Das Bild 3 zeigt die zeitliche Änderung des Spektralverhaltens von Hämatoporphyrin (HP) während der Lichtbestrahlung. Neben dem Photobleaching erfolgt die Formation von bei 640 nm absorbierenden Photoprodukten. Im folgenden wurde die photodynamische Wirkung an Erythrozyten verglichen, die zum einen mit unbestrahltem HP und andererseits mit bestrahlter HP-Lösung (hoher Anteil an Photoprodukten) inkubiert wurden (Messung nach 30minütiger Inkubationszeit, 2x mit PBS gewaschen).

Eine typische Meßkurve ist in Bild 4 dargestellt, in der

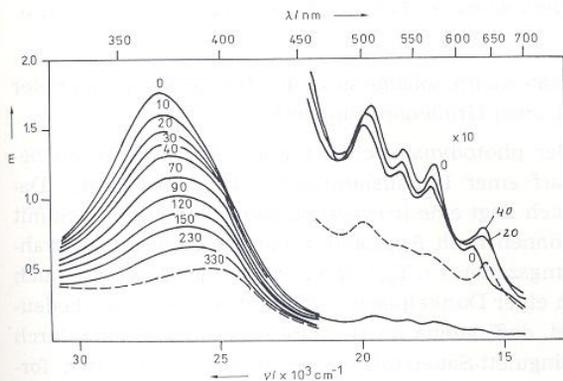


Bild 3. Photoinduzierte Änderung des Absorptionsverhaltens von HP (HP in PBS, Bestrahlung: Quecksilberlampe, 50 mW/cm²). Mit zunehmender Bestrahlungsdauer nimmt die Extinktion insbesondere im Bereich der Soretbande ab, während das Absorptionsvermögen im roten Spektralbereich durch die Formation einer zusätzlichen Bande bei 640 nm zunimmt.

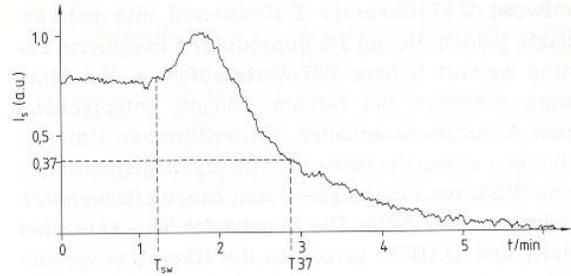


Bild 4. Kinetik des Streusignals einer mit HP inkubierten Erythrozytensuspension während der Bestrahlung (630 nm, 100 mW/cm²). Dem Prozeß des Anschwellens (Signalzunahme) folgt die Hämolyse (Signal fällt auf 0).

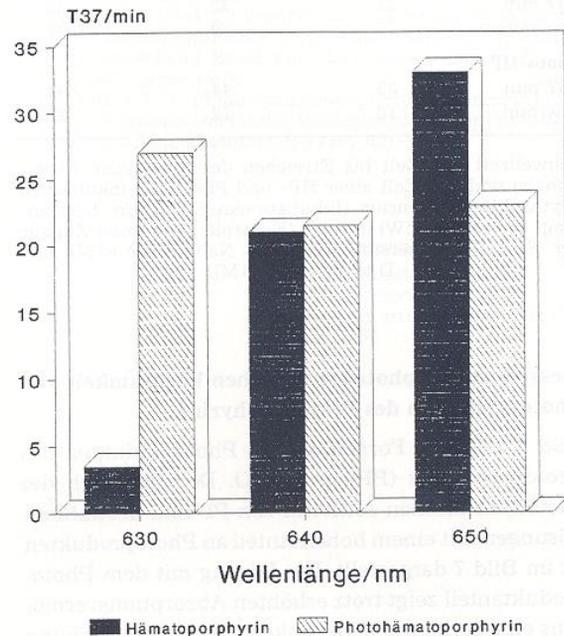


Bild 5. Aktionsspektrum von HP und HP-Photoprodukten. T37: Zeit nach welcher der Anteil lebender Zellen 37% der Anfangszellzahl beträgt.

das Streusignal in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt ist. Zu Beginn der Farbstofflaserbestrahlung bleibt das Signal konstant entsprechend der konstanten Form und Anzahl der Streupartikel. Nach der Zeit  $T_{sw}$  ist eine Signalerhöhung infolge Transformation der Erythrozyten in eine Kugelform und einer Radienerhöhung zu beobachten, gefolgt von einer exponentiellen Abnahme, die mit dem Prozeß der Hämolyse korreliert.

Durch Variation der Bestrahlungswellenlänge konnte ein Aktionsspektrum erhalten werden, wobei als Kriterium für die photodynamische Wirksamkeit die Zeit T 37 gewählt wurde, bei der das Signal auf den Wert  $1/e$  abfiel. Wie Verdünnungsreihen zeigten, entspricht dieser Wert etwa 37 % der Ausgangszellzahl. Die in Bild 5 dargestellten Werte belegen, daß HP die größte Wirksamkeit im roten Spektralbereich bei 630 nm

aufweist (T 37 [620 nm] > T 37 [630 nm], hier nicht gezeigt), jedoch die mit Photoprodukten inkubierte Lösung weitaus höhere T37-Werte aufweist. Ein Minimum erscheint bei 640 nm – 650 nm entsprechend dem Absorptionsverhalten. Weiterführende Untersuchungen zeigen bei beiden Erythrozytensuspensionen eine Wirkungsabhängigkeit vom Singulett-Sauerstoff-Gehalt, siehe Tabelle. Die Zugabe der  $^1\text{O}_2$  – Quencher  $\text{NaN}_3$  und DABCO verzögern die Hämolyse wesentlich.

	NaCl	$\text{NaN}_3$	DABCO
<b>HP</b>			
T37/min	24	32	32
Tsw/min	7	9	11
<b>Photo-HP</b>			
T37/min	35	44	44
Tsw/min	10	12	20

Schwellzeit  $T_{sw}$  (Zeit bis Erreichen des maximalen Streusignals) und T37-Zeit einer HP- und Photo-HP-inkubierten Erythrozytensuspension (Inkubationszeit: 20 min, Bestrahlung: 633 nm, 20 mW) in NaCl (Kontrolle) und unter Zugabe der Singulett-Sauerstoff-Quencher  $\text{NaN}_3$  (10E-03M) und DABCO (10E-03M).

#### Messungen zur photodynamischen Wirksamkeit von Photoprodukten des Protoporphyrins

Bild 6 zeigt die Formation von Photoprodukten des Protoporphyrins (PP) in DMSO. Der Vergleich der photodynamischen Aktivität von PP und bestrahlten Lösungen mit einem hohen Anteil an Photoprodukten ist im Bild 7 dargestellt. Die Lösung mit dem Photoproduktanteil zeigt trotz erhöhten Absorptionsvermögens eine geringere Wirksamkeit. Die höhere Wirkung der Photoprotoporphyrinlösung bei 630 nm Einstrahlung im Vergleich zu 670 nm Einstrahlung (Absorptionsmaximum bei 670 nm) wird infolge des nicht unerheblichen Anteils von PP in der Lösung (nicht in Photoprodukte umgesetzter Anteil) erklärbar.

#### Diskussion

Die beschriebenen Meßaufbauten, basierend auf der Methode der Kleinwinkelstreuung, gestatten die Beobachtung von Formveränderungsprozessen, bevorzugt die Erfassung von Lyseerscheinungen. Die Anwendung ist nicht auf Erythrozytensuspensionen beschränkt, jedoch bieten sich diese Zellen aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit insbesondere für die Untersuchung z. B. photodynamisch induzierter Membrandefekte an. Obwohl weder eine uniforme Zellform noch eine simultane Formveränderung vorliegt, sind die Resultate vergleichender Untersuchungen reproduzierbar. Die absoluten T37-Werte zeigen jedoch eine Abhängigkeit vom Blutspender und vom Alter der Zellsuspension. Fremdzellen beeinflussen die Streusi-

Spektren von Protoporphyrin IX und daraus hergestelltem Photoprotoporphyrin:

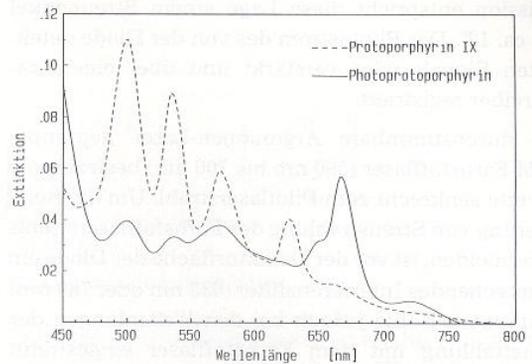


Bild 6. Formation von Photoprodukten des Protoporphyrins (PP in DMSO, Bestrahlung: 514 nm,  $0,5 \text{ W/cm}^2$ ). Es sind die Q-Banden des Porphyrins dargestellt.

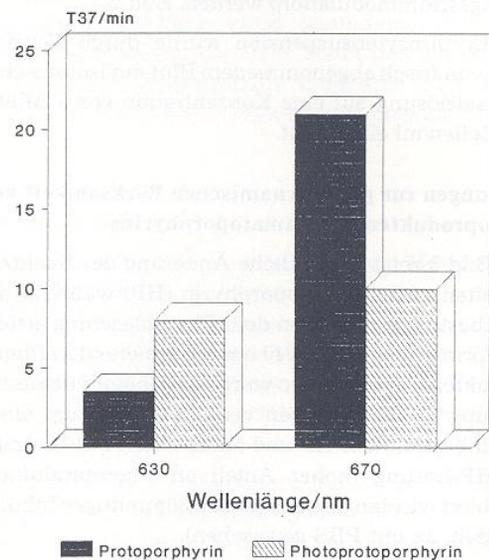


Bild 7. Photodynamische Wirkung bei 630-nm- und 670-nm-Bestrahlung von Protoporphyrin und Photoprotoporphyrin.

gnale kaum, solange sie nicht Miesche Streuparameter gleicher Größenordnung aufweisen.

Der photodynamisch bedingte Hämolyseprozeß bedarf einer Initialisierungsstrahlungsenergie  $E_0$ . Danach liegt eine irreversible Prozeßkinetik vor. Somit können nach Applikation von  $E_0$  (auch für Bestrahlungszeiten  $t < T_{sw}$ ), Quellphase und Hämolyse auch in einer Dunkelphase registriert werden. Dies bedeutet, daß bereits im Bestrahlungszeitraum eine durch Singulett-Sauerstoff (siehe Tabelle) und durch formierte Radikale ausreichende Membranschädigung induziert wurde und der weitere Prozeß diffusionskontrolliert abläuft.

Die auch in-vivo während der Bestrahlung beobachtete Photoproduktformation der Porphyrine HP und PP

[8] und der damit verbundene Anstieg des Absorptionsvermögens im therapeutisch interessanten roten Spektralbereich wirft die Frage auf, ob die Photoprodukte als Photosensibilisatoren eingesetzt werden können. Wie die Untersuchungen zeigen, sind diese photodynamisch aktiv, jedoch in geringerem Umfang als die unbestrahlten Ausgangsporphyrine. In weiterführenden Untersuchungen mit den Methoden der Teststrahlspektroskopie und der IR-Lumineszenz-Detektion [8] konnte gezeigt werden, daß die Photoprodukte gegenüber HpD über geringere Triplettlebensdauern und einer geringeren Singulett-Sauerstoff-Bildungsrate verfügen. Damit wird die verminderte photodynamische Wirksamkeit erklärbar.

#### Literatur:

- [1] Dietel, W., K. König und E. Zenkevich: Photobleaching of HpD Fluorescence and Formation of Photoproduct In Vivo and in Solution. *Lasers in the Life Sciences* 3 (1990), 197–203.
- [2] Doiron, D. R. und C. J. Gomer: Porphyrin localization and treatment of tumors. New York, Liss. 1983.
- [3] Dubbelman, T., A. de Goeij und J. van Steveninck: Photodynamic effects of Protoporphyrin on human erythrocytes. Nature of the cross-linking of membran proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 511 (1978), 141–151.
- [4] Gurinovich, G. P. et al.: Structural damages of erythrocytes photosensitized by chlorins and porphyrines. *Biophysica*. 2 (1989), 314–317.
- [5] König, K., V. Bockhorn, W. Dietel und H. Schubert: Photochemotherapy of animal tumors with the photosensitizer Methylene Blue using a krypton laser. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113 (1987), 301–303.
- [6] König, K., H. Wabnitz und W. Dietel: Variation in the fluorescence decay properties of hematoporphyrin-derivative during its conversion to photoproducts. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 8 (1990), 103–111.
- [7] König, K., H. Schneckenburger, A. Rück und S. Auchter: Photoproduct formation of endogeneous Protoporphyrin and its photodynamic activity. SPIE, Berlin, Mai 1990, in Druck.
- [8] König, K. et al.: Spectral behaviour, fluorescence decay parameters and photodynamic activity of HpD-photoproducts. Eingereicht.
- [9] Ravey, J. C.: The first Extrema in the radiation pattern of the light scattered by Micrometer-Sized Spheres and Spheroids. *J. Colloid Sci.* 2 (1984), 435–446.
- [10] Röder, B.: Tetrapyrroles: A Chemical Class of Potent Photosensitizers for the Photodynamic Treatment of Tumors. *Lasers in Med. Scie.* 5 (1990), 99–100.
- [11] Santaro, O. et al.: Photodynamic Therapy by Tetraphenylporphinesulfonate Tetrasodium Salt Administration in Superficial Basal Cell Carcinomas. *Cancer Res.* 50 (1990), 4501–4503.
- [12] Spikes, J. D.: Phtalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem. Photobiol.* 6 (1986), 691–699.

509

#### Korrespondenzanschrift:

Dr. rer. nat. Karsten König  
Institut für Lasertechnologien  
in der Medizin an der Universität Ulm  
Postfach 40 66  
D-7900 Ulm