



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Die Wirkung von ausgewählten Porphycenen auf die Vitalität und Proliferation von Zellen der Gefäßwand

Autor: Anja Lüdemann
Einrichtung: Böhringer Mannheim
Doktorvater: Prof. Dr. G. Sponer

Die Restenose nach PTCA stellt einen limitierenden Faktor dieser therapeutischen Maßnahme dar, wobei verglichen mit anderen Verfahren (Stent, DCA, Rotationsatherektomie und Laser) lediglich für den Stent eine etwas geringere Rezidivrate dokumentiert werden konnte. Die Applikation systemischer medikamentöser Therapien konnte die Restenoseinzidenz ebenfalls nicht befriedigend verbessern.

Ein neues Therapiekonzept könnte die Photodynamische Therapie (PDT) unter lokaler Anwendung sogenannter Photosensibilisatoren (PS) - Farbstoffe, die sich selektiv in hyperproliferierenden und neovaskularisierenden Geweben anreichern und nach Anregung mit (Laser-) Licht über nachgeschaltete Energieübertragungsmechanismen cytotoxische Reaktionen auslösen, darstellen. Ihr postulierter Angriffspunkt liegt im Bereich der 1. Phase der post-PTCA induzierten pathogenetischen Veränderungen der Gefäßwand auf zellulärer Ebene, insbesondere der koronaren glatten Muskelzellen, die letztendlich zur intimalen Hyperplasie (IH) führen. Die Porphycene stellen eine neuartige und hinsichtlich der physikochemischen Eigenschaften wesentlich verbesserte Substanzklasse von Photosensibilisatoren dar.

Ziel der Untersuchung war die Auswahl eines Porphycens mit optimaler Phototoxizität bei möglichst geringer antiproliferativer Wirkung unter Dunkelbedingungen. Dazu wurden drei Porphycene (HexoTMPn, GlamTPPn und $\text{Glut(OH)}_2\text{GlamTMPn}$) mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften hinsichtlich ihrer wachstumshemmenden Potenz auf koronaren Gefäßwandzellen und vergleichend aortalen glatten Muskelzellen mit und ohne Laserbelichtung in vitro untersucht und dem „Standard“ Photofrin® gegenübergestellt. Dargestellt wurden die aus den Ergebnissen eines Proliferations- und Zytotoxizitätsassays abgeleiteten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen (EC_{50} , MEC). Durch die Anwendung der Licht- und Elektronenmikroskopie sowie immunhistochemischer Methoden wurden morphologische Veränderungen auf zellulärer und subzellulärer Ebene untersucht. Die Aufnahmekinetik wurde durch ein neu zu etablierendes Extraktionsverfahren aufgezeigt und quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten eine in erster Linie konzentrationsabhängige antiproliferative Wirkung der Porphycene, gefolgt von den in etwa gleich großen Haupteinflussfaktoren Laserenergiedosis und Inkubationszeit, wobei die koronaren Endothelzellen eine größere Photosensibilisatorsensitivität als die koronaren glatten Muskelzellen aufwiesen.

HexoTMPn bewirkte unter Laserbedingungen bei allen Zellarten einen klaren konzentrationsabhängigen antiproliferativen Effekt (zwischen 25 μM und 12,5 μM) mit marginaler proliferationsinhibierender Wirkung unter Dunkelbedingungen (ab 12,5 μM). Unter Berücksichtigung der zellulären Aufnahmekinetik (Extraktionsausbeute) sind bei den koronaren glatten Muskelzellen nach Anwendung einer Konzentration von 12,5 μM bei 15-minütiger Inkubationszeit und Applikation einer Laserenergiedosis von 1 J/cm^2 optimale antiproliferative Ergebnisse zu erwarten. Photofrin® wies eine dem HexoTMPn ähnliche antiproliferative Potenz bei allerdings deutlich höherer Dunkeltoxizität auf. GlamTPPn war bei allen Zellarten offensichtlich schon im niedrigsten Konzentrationsbereich zu hoch dosiert. Es traten nahezu konzentrationsunabhängig maximal ausgeprägte proliferationsinhibierende Effekte auf. Die Anwendung niedrigerer Konzentrationen würde differenziertere Aussagen ermöglichen. $\text{Glut(OH)}_2\text{GlamTMPn}$ zeigte im verwendeten Konzentrationsbereich keine Wirksamkeit, was auf einer zu großen relativen Hydrophilie dieser Substanz basieren könnte. Aussagen über zytotoxische Effekte der Porphycene konnten aufgrund einer laserinduzierten Beeinflussung der dem Testverfahren zugrundeliegenden zellspezifischen LDH-Aktivität nicht erfaßt werden.

Zelluläre Veränderungen traten bei Konzentrationen zwischen 0,391 μM und 50 μM unabhängig von Zelltyp und Porphycen in Form einer ballonförmigen Schwellung und dem Herauslösen einzelner

Zellen aus dem Monolayer, einer bläschenförmigen Vorstülpung der Plasmamembran und späteren Zellkernfragmentierung bishin zur vollständigen Zytolyse auf. Bevorzugtes Target auf subzellulärer Ebene stellten die Membranstrukturen von Mitochondrien und dem RER dar, bei GlamTPPn zusätzlich insbesondere die Zellkernmembran. Bei HexoTMPn imponierte eine weitgehend intakte organisierte Zellmorphologie. Zudem konnte eine von der Zellart unabhängige Akkumulation von Porphycenen in Peroxisomen beobachtet werden. Durch die Bestimmung von Aktivitäten peroxisomenspezifischer Enzyme während der PDT könnte diese Beobachtung verifiziert werden.