

Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus dem Institut für Medizinische Physik und Lasermedizin
Direktor: Prof. Dr.-Ing. Gerhard J. Müller, Prof. h. c., Dr. h. c. mult.

Experimentelle Grundlagenuntersuchungen zur
zweidimensionalen Sauerstoffkonzentrationsanalyse für die
photodynamische Therapie mittels zeitaufgelöster
Lumineszenzbildgebung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)
der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Cornelia Andrea Lochmann geb. Mahnke
aus Berlin

Referent: Prof. Dr.-Ing. Prof. h. c. Dr. h. c. mult. G. Müller

Koreferent: Prof. Dr. Dr.-Ing. J. Lademann

Gedruckt mit der Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 23.03.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
2	Grundlagen	5
2.1	Lumineszenz	6
2.1.1	Fluoreszenz und Phosphoreszenz	6
2.1.2	Definition der Lebensdauer	8
2.1.3	Effizienz und Quantenausbeute	9
2.1.4	Quenchingprozesse	10
2.2	Das Prinzip 'Optical Molecular Imaging'	13
2.2.1	Optische Gewebeeigenschaften	14
2.2.2	Marker für das 'Optical Molecular Imaging'	18
2.3	Molekularer Sauerstoff	20
2.3.1	Eigenschaften von Sauerstoff	21
2.3.2	Nachweis von Sauerstoff	23
2.4	Photodynamische Therapie	26
2.4.1	Mechanismen der Photosensibilisierung	27
2.4.2	Prinzip und Wirkung der Photodynamischen Therapie	29
2.4.3	Dosimetrie der Photodynamischen Therapie	35
3	Methoden und Materialien	39
3.1	Methoden zur Bestimmung der Lebensdauer	40
3.1.1	Lebensdauerbestimmung durch Messung der Abklingkurve	40
3.1.2	Methode der Rapid-Lifetime-Determination	40
3.1.3	Bestimmung der Stern-Volmer-Konstanten	43
3.1.4	Bestimmung der Ansprechzeit von Gewebe	44
3.2	Verwendete Sensorfarbstoffe und Proben	45
3.2.1	Ruthenium-tris-bipyridyl in wässriger Lösung	45
3.2.2	FOXY-SGS-M-Schicht	47
3.2.3	Physiologische Einflüsse auf die Lebensdauerermessung	48
3.2.4	Verwendete <i>in vitro</i> Proben	49

	1
3.3 Konstruktion und Aufbau des Messsystems	50
3.3.1 Aufbau des Systems	52
3.3.2 Ansteuerung und Auswertung	55
3.3.3 Anregungseinheit	57
3.3.4 Detektionseinheit	63
3.3.5 Kalibrieraufbau	64
3.3.6 Durchflussküvette	66
4 Ergebnisse und Diskussion	69
4.1 Charakterisierung des Systems mit dem Farbstoff $Ru(bpy)_3^{2+}$	70
4.1.1 Untersuchung des Abklingverhaltens	71
4.1.2 Abhängigkeit der Lebensdauer vom pH-Wert	74
4.1.3 Abhängigkeit der Lebensdauer von der Temperatur	76
4.1.4 Sensitivität und Fehlerbetrachtung	82
4.1.5 <i>In vitro</i> Messungen mit $Ru(bpy)_3^{2+}$ -Lösungen	86
4.2 Charakterisierung des Systems mit der FOXY-SGS-M-Schicht	90
4.2.1 Untersuchung des Abklingverhaltens	91
4.2.2 Abhängigkeit der Lebensdauer vom pH-Wert	94
4.2.3 Abhängigkeit der Lebensdauer von der Temperatur	96
4.2.4 Sensitivität und Fehlerbetrachtung	100
4.2.5 <i>In vitro</i> Messungen mit der FOXY-SGS-M-Schicht	104
4.3 Potential der Messmethode als Monitoringsystem	109
4.3.1 Anwendbarkeit des Systems in der Medizin	109
4.3.2 $Ru(bpy)_3^{2+}$ als Sensorfarbstoff	113
4.3.3 Die Farbstoffschicht FOXY-SGS-M als Sensorfarbstoff	114
5 Zusammenfassung	115
6 Summary	117
Literaturverzeichnis	119
A.1 Abkürzungsverzeichnis	125
A.2 Tabelle der Messergebnisse	129
A.3 Veröffentlichungsliste	130
A.4 Curriculum Vitae	131
A.5 Danksagung	132

Anhang A.1: Abkürzungsverzeichnis

Begriffe

CCD	Charge Coupled Device
DK	Durchflussküvette
EPR	Elektronenspinresonanzverfahren
FOXY-Schicht	FOXY-SGS-M-Schicht
ICG	Indocyanin Green
ISC	Intersystem Crossing
KK	Kalibrierküvette
LED	Leuchtdiode
MLCT	Metall-Ligand Charge Transfer - Metall-zu-Ligand Ladungstransfer
MC	metal centered - Metall-zentriert
MCP	Multi-Channel Plate - Bildverstärker
NADH	Nicotinamid-Adenin Dinucleotid-Hydroeen
NIR	nahinfraroter Spektralbereich
NMR	nuclear magnetic resonance - Kernresonanzspektroskopie
OMI	Optical Molecular Imaging - Optische molekulare Bildgebung
PDD	Photodynamische Diagnostik
PDT	Photodynamische Therapie
PPIX	Protoporphyrin IX
RLD	Rapid-Lifetime-Determination-Methode - Lebensdauerbestimmungsmethode
$Ru(bpy)_3^{2+}$	Ruthenium-tris-bipyridyl
UV	ultravioletter Spektralbereich
VIS	visueller Spektralbereich

Symbole

A	Akzeptormoleküle
[A]	Akzeptormolekülkonzentration
A_p	Akkumulationsindex
c	Konzentration
c_a	Absorberkonzentration
c_s	Streuzentrenkonzentration
d	Dicke
δx	Ortsauflösung
δ_{eff}	effektive Eindringtiefe
$d\tau/dO_2$	Ableitung der Lebensdauerfunktion nach der Sauerstoffkonzentration
D	Diffusionskonstante
D_{p1}	Diffusionskonstante in der Diffusionsnäherung
$^1\Delta_g$	erster angeregter Singulettzustand von molekularem Sauerstoff
E	Energie
ΔE	Energiedifferenz
$\Delta\tau$	Lebensdauerdifferenz
Δt	Integrationszeit
Δt_{Akk}	Belichtungszeit der Kamera
Δt_{Flanke}	Flankensteilheit des LED-Pulsendes
Δt_{LED}	Verzugszeit der LED-Arrays

Δt_{Puls}	Anregungspulslänge
Δt_{Res}	Ansprechzeit
$\Delta [O_2]$	Differenz der Sauerstoffkonzentration
f	Wiederholfrequenz der Anregungspulse
g	Anisotropiefaktor
h	PLANCKsches Wirkungsquantum
k'	preexponentieller Faktor der ARRHENIUS-Gleichung
k_2	Deaktivierungsrate des 3MC -Zustands
k_a	Absorptionsrate
k_B	BOLTZMANN-Konstante
k_d	interne Konversionsrate vom ersten angeregten Singulettzustand
k_{dd}	thermisch aktivierte Deaktivierungsrate über den 3MC -Zustand
k_f	Fluoreszenzrate
k_{ISC}	Intersystem Crossing-Rate
k_p	Phosphoreszenzrate
k_{p,O_2}	Phosphoreszenzrate von molekularem Sauerstoff
k_{PO}	Rate für Reaktionen zwischen 1P_0 und 3O_2
k_q	bimolekulare Quenchratenkonstante
$k_{q,A}$	Quenchingrate von 1O_2 durch biologische Akzeptormoleküle A
$k_{q,f}$	Quenchingrate des ersten angeregten Singulettzustands
k_{q,O_2}	Quenchingrate des ersten angeregten Triplettzustands durch 3O_2
$k_{q,p}$	Quenchingrate des ersten angeregten Triplettzustands
K_{dyn}	dynamische Stern-Volmer-Konstante
K_{stat}	statische Stern-Volmer-Konstante
K_{SV}	Stern-Volmer-Konstante
k_t	interne Konversionsrate vom ersten angeregten Triplettzustand
k_{t,O_2}	interne Konversionsrate von molekularem Sauerstoff
K_{sv}	Stern-Volmer-Konstante
λ	Wellenlänge
$L(s,s')$	Strahlungsdichte
I	Intensität
\bar{I}	Leistungsdichte
I_0	Anfangsintensität
I_{abs}	absorbierte Intensität
Int	Intensität
$[M]$	Molekülkonzentration
μ_a	Absorptionskoeffizient
μ_{eff}	effektiver Schwächungskoeffizient
μ_s	Streukoeffizient
n	Anzahl der Akkumulationen
η	Effizienz
η_f	Fluoreszenzeffizienz
η_L	Viskosität der Lösung
η_p	Phosphoreszenzeffizienz
η_{ISC}	Intersystem Crossing-Effizienz
O_2	molekularer Sauerstoff
$[O_2]$	molekulare Sauerstoffkonzentration
1O_2	molekularer Sauerstoff im ersten angeregten Singulettzustand
3O_2	molekularer Sauerstoff im Triplett-Grundzustand

Ω	Raumwinkel
$p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$	Streuphasenfunktion
P	Photosensibilisator
$[P]$	Photosensibilisatorkonzentration
P_0	Photosensibilisator im Grundzustand
1P	Photosensibilisator im ersten angeregten Singulettzustand
$^3P^*$	Photosensibilisator im ersten angeregten Triplettzustand
φ_x	Lichtflussrate am Ort x
$\varphi_i(t)$	Flussrate
Φ	Azimutalwinkel
Φ_{abs}	Absorptionsquantenausbeute
Φ_{Δ}	Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute
Φ_{ISC}	Intersystem Crossing-Quantenausbeute
Φ_t	Triplettquantenausbeute
$[Q]$	Quencherkonzentration
R	Korrelationskoeffizient
R^2	Bestimmtheitsmaß
RelEmpf	relative Empfindlichkeit
σ_a	Absorptionswirkungsquerschnitt
σ_s	Streuwirkungsquerschnitt
$\sigma_{^1P_0}$	Absorptionswirkungsquerschnitt des Sensibilisators im Grundzustand
S	Substratmolekül
S_A	absolute Sensitivität
S_0	Singulett-Grundzustand
S_1	erster angeregter Singulettzustand
$[S_1]$	Molekülkonzentration im ersten angeregten Singulettzustand
S_n	n -ter angeregter Singulettzustand
S_R	relative Sensitivität
$S(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$	Quellterm der Strahlungstransportgleichung
S_{Δ}	Anzahl der Energieübertragungsprozesse
$^1\Sigma_g^+$	zweiter angeregter Singulettzustand von molekularem Sauerstoff
$^3\Sigma_g^-$	Grundzustand von molekularem Sauerstoff
SUR	spezifische Aufnahme rate - specific uptake ratio
SVTauFit	Lebensdauer verhältnis der Lebensdauern τ_0/τ_{Fit}
SVTauRLD	Lebensdauer verhältnis der Lebensdauern τ_0/τ_{RLD}
τ_0	Lebensdauer in Abwesenheit von Quenchern
τ_f	Fluoreszenzlebensdauer
τ_f^0	Fluoreszenzlebensdauer in Abwesenheit von Quenchern
τ_f^n	natürliche Fluoreszenzlebensdauer
τ_p	Phosphoreszenzlebensdauer
τ_p^0	Phosphoreszenzlebensdauer in Abwesenheit von Quenchern
τ_p^n	natürliche Phosphoreszenzlebensdauer
τ_s	Lebensdauer des Singulettzustands
τ_t	Lebensdauer des Triplettzustands
τ_{Δ}	Singulett-Sauerstofflebensdauer
τ_{MLCT}	Lebensdauer des <i>MLCT</i> -Zustands
t	Zeit
t_1	Zeitpunkt des ersten Detektionszeitfensters
t_2	Zeitpunkt des zweiten Detektionszeitfensters

T	Temperatur
T_1	erster angeregter Triplettzustand
Θ	Streuwinkel
Tau0	Lebensdauer in Abwesenheit von Quenchern
TauFit	mit einer Modellfunktion angepasste Lebensdauer
TauRLD	nach der RLD-Methode bestimmte Lebensdauer
ν	Wellenzahl
γ	Kollisionsrate zwischen frei diffundierenden Molekülen
χ^2	Summe der quadratischen Abweichungen
$\Psi(\mathbf{r})$	Strahlungsdichte am Ort \mathbf{r}

Anhang A.2: Tabelle der Messergebnisse

Die mit den $Ru(bpy)_3^{2+}$ -Lösungen und der FOXY-SGS-M-Schicht gemessenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Bezeichnung		Symbol	$Ru(bpy)_3^{2+}$ KK	FOXY-SGS-M DK
Lebensdauer	25°C	τ_0 [μs]	0,6	4,488 *
Stern-Volmer-Konstante	25°C	K_{SV} [$l mol^{-1}$]	1940	4190 *
Quenchingkonstante	25°C	k_q [$10^9 l mol^{-1} s^{-1}$]	3,216	0,908 *
Lebensdauer	32°C	τ_0 [μs]	0,5382	4,23 *
Stern-Volmer-Konstante	32°C	K_{SV} [$l mol^{-1}$]	2090	4490 *
Quenchingkonstante	32°C	k_q [$10^9 l mol^{-1} s^{-1}$]	3,846	1,06 *
pH-Wert Abhängigkeit			keine	keine
Temperaturstabilität		ΔT [°C]	± 1	± 3
relative Sensitivität	0 – 100 $\mu mol/l$	S_R	0 - 0,2	0 - 0,3
Lebensdauer mit Schweinehaut	20,9%	τ [μs]	0,718	keine Änderung
Dynamik mit Schweinehaut	0-20,9%	$\Delta \tau$ [μs]	0,04	keine Änderung
Ansprechzeit im Gas		Δt_{Gas} [s]		32 \pm 16
Ansprechzeit mit Wasser		Δt_{H_2O} [s]		53 \pm 29
Ansprechzeit mit Schweinehaut	$d = 0,5 mm$	Δt_{d_1} [μs]	105 \pm 22	55 \pm 18
Ansprechzeit mit Schweinehaut	$d = 1 mm$	Δt_{d_2} [μs]		94 \pm 40

Tabelle A.2: Zusammenfassung der gemessenen Ergebnisse mit den $Ru(bpy)_3^{2+}$ -Lösungen mit der Konzentration $c = 0,5 \mu mol/l$ und mit der FOXY-SGS-M-Schicht gemessen in der Durchfluss- (DK) bzw. in der Kalibrierküvette (KK).
* Werte abhängig vom Schichtausschnitt, Zustand der Schicht und den eingestellten Kalibrierparametern (siehe Kap. 4.2).

Anhang A.3: Veröffentlichungsliste

Einige Teilergebnisse dieser Arbeit konnten bereits in Journalen und auf Konferenzen zur Diskussion gestellt werden:

Veröffentlichungen:

MINET O., BEUTHAN J., LICHA K., AND MAHNKE C.: The Biomedical Use of Rescaling Procedures in Optical Biopsy and Optical Molecular Imaging. *Fluorescence Spectroscopy, Imaging and Probes*, Chapter 21, 349-360, Springer, 2002

MINET O., BEUTHAN J., LICHA K., AND MAHNKE C.: The Medical Use of Rescaling Procedures in Optical Biopsy and Optical Molecular Imaging. *J Fluoresc*: 12(2), 201-204, 2002

BEUTHAN J., MAHNKE C., NETZ U., MINET O., AND MÜLLER G.: Optical Molecular Imaging: Overview and Technological Aspects. *Med Las Appl*: 17(1), 25-30, 2002

HÄUPL T., LOCHMANN C., AND BEUTHAN J.: Optical Molecular Imaging - funktionelle optische Diagnostik. *Berliner Wissenschaftliche Gesellschaft, Jahrbuch*, 2004

LOCHMANN C., HÄUPL T., AND BEUTHAN J.: Optical Molecular Imaging - funktionelle optische Bildgebung. *Biomed Tech*: 49(2), 158-159, 2004

LOCHMANN C., HÄUPL T., AND BEUTHAN J.: An Oxygen Imaging System for Medical Applications: Preliminary Results. *Biomed Tech*: 51, 111-115, 2006

Konferenzbeiträge:

MINET O., BEUTHAN J., LICHA K., AND MAHNKE C.: Rescaling Method in Optical Molecular Imaging. *7th Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes*, Amsterdam, Poster, 2001

BRÜNING E., HÄUPL T., MAHNKE C., AND BEUTHAN J.: NIR-Fluorescence based integrative imaging with a modified surgical microscope. *14th Annual Meeting of DGLM*, München, Vortrag, 2003

LOCHMANN C., HÄUPL T., AND BEUTHAN J.: Optical Molecular Imaging - funktionelle optische Bildgebung. *Biomedizinische Technik 2004*, Ilmenau, Vortrag, 2004

LOCHMANN C.: Optical Molecular Imaging - Techniques of Functional Imaging. *Laser Optic Berlin*, Berlin, Vortrag, 2004

LOCHMANN C., HANSEL T., HÄUPL T., AND BEUTHAN J.: Time-gated Luminescence Lifetime Imaging - Optical Monitoring of Oxygen in Tissue. *15th Annual Meeting of DGLM*, München, Vortrag, 2005

LOCHMANN C., HÄUPL T., AND BEUTHAN J.: A Two-dimensional Oxygen Imaging System for Medical Applications. *Biomedizinische Technik 2006*, Zürich, Vortrag, 2006

LOCHMANN C., HÄUPL T., AND BEUTHAN J.: Optical Molecular Imaging - funktionelle Fluoreszenzbildgebung. *Deutsche Physikerinnen Tagung 2006*, Berlin, Vortrag, 2006

Anhang A.4: Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Anhang A.5: Danksagung

Die vorliegende Forschungsarbeit habe ich am Institut für Medizinische Physik und Lasermedizin an der Charité - Universitätsmedizin Berlin mit der Unterstützung vieler Kollegen durchgeführt, denen ich hiermit herzlich danken möchte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Prof. h. c. Dr. h. c. mult. Dr.-Ing. Gerhard J. Müller, unter dessen Leitung diese Arbeit entstand. Ich danke ihm für die Aufgabenstellung, die Möglichkeit der Durchführung und die Unterstützung während der gesamten Dauer der Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Jürgen Beuthan, unter dessen Leitung das Forschungsprojekt durchgeführt wurde, für seine Anleitung und Betreuung sowie die Diskussionen zu dieser Arbeit.

Herrn Dr. Tilmann Häupl gebührt Dank für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung des Projekts und die zahlreichen Diskussionen zu den erzielten Ergebnissen. Erst durch diese konnte der Aufbau zu seiner jetzigen Leistungsfähigkeit gelangen.

Ich danke Herrn Thomas Hansel für die gemeinsame Durchführung einiger Messungen im Rahmen seiner Diplomarbeit und für die Diskussionen über die erzielten Ergebnisse.

Mein weiterer Dank gilt den Kollegen des Instituts, insbesondere Herrn Rijk Schütz, der mich in die C++-Programmierung einarbeitete. Frau Lesley Hirst und Frau Dr. Cathrin Dressler danke ich für die Hilfe bei der Präparation der Schweinehautproben und der Herstellung der Zellkulturen.

Für die Durchführung der mechanischen Arbeiten und die Herstellung der Durchflussküvette, sowie für den Aufbau der elektronischen Schaltung der Anregungslichtquellen danke ich den Kollegen Jürgen Massuthe, Enno Ott und Lutz Krebs.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinem Mann Marc Anatol Lochmann.

Selbständigkeitserklärung

Ich, Cornelia Andrea Lochmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema 'Experimentelle Grundlagenuntersuchungen zur zweidimensionalen Sauerstoffkonzentrationsanalyse für die photodynamische Therapie mittels zeitaufgelöster Lumineszenzbildgebung' selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin 8.11.2006

Cornelia Andrea Lochmann