

Kapitel 1

Einleitung

Die Bildgebung von strukturellen und funktionellen Zusammenhängen auf molekularer Ebene entwickelt sich zu der zentralen Fragestellung in der biomedizinischen Forschung. Ziel dieser Bildgebung ist die Untersuchung von molekularen Abläufen innerhalb von Zellen und Gewebe *in vivo*. Werden diese Ziele erreicht, können Moleküle und Proben optimal an ihre spezifischen Einsatzgebiete in der Medizin angepasst werden und als Diagnostika oder Therapeutika eingesetzt werden. Etablierte Bildgebungsverfahren haben in Hinblick auf diese Ziele verschiedene Nachteile, wie mangelnde Sensitivität, unzureichende funktionelle Darstellung und hohe Kosten. Es werden daher neue Bildgebungssysteme für die funktionelle Bildgebung mit hoher Selektivität, hohem Kontrast und mit relativ geringen Kosten gesucht. Besonders aussichtsreich für die Realisierung dieser Ziele ist die optische molekulare Bildgebung, das 'Optical Molecular Imaging'.

Für die optische molekulare Bildgebung werden spezifische Moleküle, sogenannte Marker, verwendet, deren Signalkontrast auf unterschiedlichen Wechselwirkungen angeregter Elektronen beruht. Die zur Zeit größte Gruppe von Markern sind solche, die lumineszieren. Diese können gezielt in Proben eingebracht oder an Moleküle gekoppelt werden, um deren Anlagerung oder Verteilung zu beobachten [1]. Da die Lumineszenz stets in Konkurrenz zu anderen Deaktivierungsprozessen steht, kann durch die Messung der Intensität oder der Lebensdauer der Lumineszenz auf die chemische Umgebung des Markers geschlossen werden [2]. Dabei hat die zeitaufgelöste Messung der Lebensdauer gegenüber der 'steady-state' Messung der Intensität den Vorteil, unabhängig von Inhomogenitäten der Anregungsintensität und von Konzentrationsschwankungen des Markers zu sein.

Die Lumineszenz optisch angeregter Marker kann auch durch Quenchingprozesse (Deaktivierung durch Elektronen- oder Energieübertragungsprozesse) gelöscht werden und fungiert deshalb als Indikator für molekulare Prozesse. Mit zunehmender Quencherkonzentration steigt die Wahrscheinlichkeit der Energieübertragung vom Marker auf den Quencher, wodurch sich die Lumineszenzlebensdauer verkürzt. Dieser Prozess wird dynamisches oder 'collisional' Quenching (Löschung) genannt, da die Energie durch bimolekulare Stoßpro-

zesse übertragen wird. Ein Beispiel für einen solchen Quencher ist molekularer Sauerstoff.

Der Zusammenhang von Lebensdauer und Quencherkonzentration wird in Stern-Volmer-Graphen wiedergegeben und mit der Stern-Volmer-Konstanten quantifiziert. Diese ist, da sie von den Diffusionskonstanten von Marker und Quencher abhängig ist, abhängig von der Temperatur und dem verwendeten Lösungsmittel. Bei bekannter Stern-Volmer-Konstante für einen Marker kann durch Messung der Lebensdauer die Konzentration des Quenchers bestimmt werden. Ist die Lebensdauerbestimmung zudem in Echtzeit bildgebend möglich, kann die Quencherkonzentration zweidimensional dargestellt und während eines Prozesses beobachtet werden. Eine Methode, die hierfür geeignet ist, ist die 'Rapid-Lifetime-Determination'-Methode (RLD), mit der die pixelweise Bestimmung der Lebensdauer mit Hilfe eines schaltbaren Bildverstärkers und einer hochsensitiven CCD-Kamera möglich ist.

Ein aktuelles Forschungsgebiet, bei der die molekulare Sauerstoffkonzentration ein Kernelement darstellt, ist die Photodynamische Therapie (PDT), eine Therapie für oberflächliche Dysplasien und Tumore. Bei dieser Therapie werden durch Licht Photosensibilisatoren angeregt, die den im Gewebe vorhandenen molekularen Sauerstoff durch Energietransferprozesse in radikalen Singulett-Sauerstoff umwandeln [3]. Dieser greift das umliegende Gewebe an und zerstört es durch zytotoxische Reaktionen. Da die Anlagerung der Photosensibilisatoren selektiv im erkrankten Gewebe erfolgt und diese zudem erst durch Bestrahlung mit Licht aktiviert werden, finden die gewebezerstörenden Reaktionen nur im gewünschten Behandlungsareal statt [3]. Die Menge des im Gewebe generierten Singulett-Sauerstoffs hängt von der molekularen Sauerstoffkonzentration ab, da diese die Umwandlungsrate bestimmt. Die molekulare Sauerstoffkonzentration bestimmt daher den Therapieeffekt der PDT. Sie variiert je nach Gewebetyp, nach Erkrankung und innerhalb des Gewebes und kann weiter durch die Behandlung selbst absinken, so dass eine Bestrahlung wirkungslos ist [4]. Die bildgebende nicht-invasive Messung und Darstellung der molekularen Sauerstoffkonzentration wird daher für die Beobachtung des Therapieverlaufs gefordert, ist aber bisher nicht realisiert [5, 6].

Ein Ansatz, die bildgebende Messung der molekularen Sauerstoffkonzentration zu realisieren, ist mit Hilfe von sauerstoffsensitiven Markern und der RLD-Methode möglich. Eine Klasse von Markern, deren Lumineszenz durch molekularen Sauerstoff gequencht wird, sind Ruthenium-diimide-Komplexe [2]. Diese sind für die Messung von Sauerstoff etabliert und werden in den unterschiedlichsten Forschungsgebieten, wie z. B. der Meeresforschung, eingesetzt [2, 7]. Der Aufbau eines bildgebenden Sauerstoffmesssystems unter Verwendung dieser Farbstoffe ist Ziel dieser Arbeit. Dabei soll das Messsystem so aufgebaut sein, dass die ein- und die zweidimensionale Messung und Darstellung der Sauerstoffkonzentration von *in vitro* und *in vivo* Proben möglich ist, wobei zwei Farbstoffe, ein flüssiger und ein fest in einer Schicht eingebetteter, verwendet werden können. Zwei geeignete Sensoren sind Rutheniumtris-bipyridyl ($Ru(bpy)_3^{2+}$) und die kommerziell erhältliche Sol-Gel-Schicht FOXY-SGS-M.

Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau eines Lumineszenzlebensdauermesssystems für die zweidimensionale Messung und Darstellung der molekularen Sauerstoffkonzentration. Das System soll im Rahmen dieser Arbeit aufgebaut und anschließend in Hinblick auf die Anwendung charakterisiert werden. Die Funktionalität des Systems kann dann mittels Untersuchungen des bekannten Farbstoffs $Ru(bpy)_3^{2+}$ überprüft und die erzielten Werte der Stern-Volmer-Konstanten mit Werten aus der Literatur verglichen werden. Weiter sollen mit diesem Farbstoff Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen für verschiedene human relevante Temperaturen und pH-Werte erstellt werden, um die Zuordnung der Lebensdauer zur molekularen Sauerstoffkonzentration zu erhalten. Durch Implementierung der Kalibrierdaten im System ist die eindeutige Zuordnung der Lebensdauer zur molekularen Sauerstoffkonzentration möglich, und somit können Sauerstoffkonzentrationsbilder berechnet und dargestellt werden.

Die Messungen der Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen sollen für den zweiten Farbstoff, die FOXY-Schicht, wiederholt werden. Diese Farbstoffschicht erscheint auf Grund der festen Einbettung des Farbstoffs und der Sauerstoffdurchlässigkeit für den Einsatz in wässrigen Medien und daher für die nicht-invasive oberflächliche Messung der Sauerstoffkonzentration während der PDT gut geeignet. Die Sauerstoffcharakteristik muss jedoch für die Umgebungsbedingungen, die im menschlichen Körper vorliegen, untersucht werden.

Um die Möglichkeit des Einsatzes des Systems auch für die Medizin zu zeigen, sollen mit beiden Farbstoffen Messungen der Antwortzeiten an Gewebeproben durchgeführt werden. Diese sollen zum einen zeigen, wie gross die Ansprechzeiten der Sensoren im Vergleich zu etablierten, punktuell messenden Sauerstoffsonden sind und wie gross andererseits die Ansprechzeiten für verschiedene Gewebedicken sind. Daraus lässt sich ableiten, in welchem Maße eine oberflächliche Messung der Sauerstoffkonzentration eine Hilfestellung für die Durchführung der PDT sein kann.

Die für die Realisierung dieser Ziele notwendigen Grundlagen, die verwendeten Methoden und Materialien, sowie die erzielten Ergebnisse und das diagnostische Potential der Messmethode sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.