

Kapitel 2

Grundlagen

Die Bildgebung und das Beobachten von funktionellen Zusammenhängen innerhalb von Proben, Zellen und Gewebe auf molekularer Ebene wird in den letzten Jahren immer wichtiger in der medizinischen Forschung. Ziele dieser Bildgebung sind die Verbesserung des Verständnisses der Abläufe im Gewebe auf Zellebene, die Früherkennung von solchen Veränderungen und die Beobachtung von Therapieeffekten auf molekularer Ebene. Werden diese Ziele erreicht, so kann die diagnostische Spezifität und die anschließende Therapie optimal an die erkannte Veränderung angepasst werden. Etablierte Bildgebungsverfahren haben in Hinblick auf diese Ziele verschiedene Nachteile, wie mangelnde Sensitivität, unzureichende funktionelle Darstellung der Veränderungen und hohe Kosten. Es werden daher neue Bildgebungssysteme für die funktionelle Bildgebung mit hoher Selektivität, hohem Kontrast und mit relativ geringen Kosten benötigt. Eine Methode, die diese Ziele ermöglicht, ist die optische molekulare Bildgebung, das 'Optical Molecular Imaging'. Für die Verwirklichung dieser Methode werden krankheitsspezifische Marker, die sich selektiv im Gewebe anlagern und deren Signalkontrast auf unterschiedlichen physikalischen Ursachen beruht, sowie ein auf die Marker angepasstes Bildgebungssystem verwendet. Die zur Zeit größte Gruppe von Markern sind solche, die lumineszieren. Die Grundlagen der Lumineszenz, die Definition der Lumineszenzlebensdauer und auftretende Quenchingprozesse sind im Kap. 2.1 beschrieben. Das Prinzip der optischen Bildgebung und der lumineszierenden Marker ist im Kap. 2.2 dargestellt.

Ein Parameter, der z. B. bei der photodynamischen Therapie wichtig ist, ist die molekulare Sauerstoffkonzentration. Der molekulare Sauerstoff bestimmt den Ablauf und damit die Effektivität der Therapie. Ein minimal invasives, bildgebendes Messverfahren zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration *in vivo* ist daher gefordert. Eine Möglichkeit der Messung ist die Verwendung optischer Methoden. Die Grundlage hierfür bilden Farbstoffkomplexe, deren Lebensdauer durch molekularen Sauerstoff gequenchet wird. Die Eigenschaften von molekularem Sauerstoff, einige Nachweismethoden für molekularen Sauerstoff und das Prinzip der PDT sind in den Kap. 2.3 und 2.4 erläutert.

2.1 Lumineszenz

2.1.1 Fluoreszenz und Phosphoreszenz

Die Lumineszenz wird allgemein als die Aussendung von Photonen von elektronisch angeregten Atomen und Molekülen verstanden. Sie unterscheidet sich in Fluoreszenz und Phosphoreszenz, wobei bei ersterer die Übergänge zwischen Zuständen mit gleichen Spins und bei letzterer die Übergänge zwischen Zuständen mit unterschiedlichen Spins auftreten. Die elektronische Anregung der Atome und Moleküle erfolgt durch die Zufuhr von Energie, z. B. durch Lichteinstrahlung, und wird dann Photolumineszenz genannt. Trifft Licht mit einer Wellenlänge im Absorptionsspektrum eines Moleküls auf dieses, so kann es ein Photon absorbieren und dabei in einen höheren elektronischen Zustand übergehen. Die Anregung erfolgt bei Raumtemperatur vom untersten Schwingungsniveau des S_0 -Zustands in den ersten angeregten Singulettzustand S_1 , in dessen schwingungsangeregte Unterniveaus oder in einen höheren Singulettzustand S_n . Die Geschwindigkeitsrate für die Absorption beträgt $k_a \approx 10^{15} s^{-1}$. Bei der Anregung ändern sich die Spinverhältnisse nicht, das heißt, dass die Übergänge spinerlaubt sind. Die Deaktivierung der höheren S_n -Zustände und der höher liegenden Schwingungs- oder Rotationsniveaus erfolgt innerhalb von $10^{-12} s$ strahlungslos durch interne Konversion (Internal Conversion, IC) in den Schwingungsgrundzustand des S_1 -Zustands. Bei der internen Konversion wird die Energie in Streck- und Torsionsschwingungen umgewandelt und in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben.

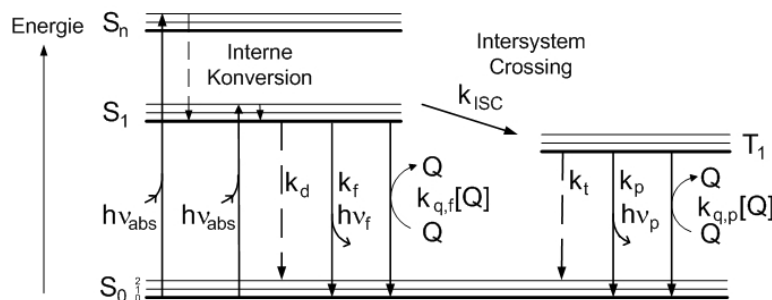


Abbildung 2.1: JABLONSKI-Diagramm für die Deaktivierungsprozesse des S_1 und des T_1 -Zustands: k_d interne Konversionsrate vom S_1 -Zustand, k_f Fluoreszenzrate, $k_{q,f}[Q]$ Quenchingrate des S_1 -Zustands mit der Quencherkonzentration $[Q]$, k_{ISC} Intersystem Crossing-Rate, k_t interne Konversionsrate vom T_1 -Zustand, k_p Phosphoreszenzrate, $k_{q,p}[Q]$ Quenchingrate des T_1 -Zustands.

Die Deaktivierung des S_1 -Zustands zurück zum elektronischen Grundzustand S_0 erfolgt über verschiedene Deaktivierungsprozesse, die in Abb. 2.1 in einem JABLONSKI-Diagramm veranschaulicht sind. Die von einem angeregten Zustand möglichen Deaktivierungsprozesse stehen stets miteinander in Konkurrenz und bestimmen gemeinsam die Kinetik des Gesamtsystems.

Ein für die optische Bildgebung wichtiger Deaktivierungsprozess des S_1 -Zustands ist

die Fluoreszenz, bei der die Energie durch Aussendung eines Photons abgegeben wird. Die Geschwindigkeitsraten für diesen Prozess betragen typischerweise $k_f = 10^9$ - $10^6 s^{-1}$, d. h. die Zeit, in der das Photon ausgesandt wird, liegt im Nanosekundenbereich [7].

Eine andere Möglichkeit der Deaktivierung des S_1 -Zustands ist die strahlungslose interne Energieumwandlung, bei der es zwei Formen gibt. Einmal kann sie in Form von interner Konversion mit der Rate k_d auftreten, bei der das Molekül seinen Spinzustand beibehält und die Energie wiederum in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben wird. Andererseits kann die Energieumwandlung durch Interkombination, auch Intersystem Crossing (ISC) genannt, mit der Rate k_{ISC} erfolgen, bei der das Molekül vom ersten angeregten Singulettzustand in den ersten angeregten Triplettzustand T_1 übergeht. Der Triplettzustand kann gewöhnlich nicht durch Lichtabsorption erreicht werden, da der Übergang quantenmechanisch verboten ist. Das Spinverbot für den Übergang vom S_1 zum T_1 -Zustand ist für Moleküle mit schweren Atomen auf Grund der starken Spin-Bahn-Kopplung aufgehoben und ist daher wesentlich schneller als der Übergang vom S_1 zum S_0 -Zustand. Eine größere Anzahl von Molekülen kann deshalb in den Triplettzustand übergehen [8].

Vom T_1 -Zustand gibt es verschiedene Deaktivierungsprozesse zurück in den S_0 -Zustand. Da auch dieser Übergang einer Multiplizitätsänderung unterliegt, ist er verboten und der T_1 -Zustand hat daher eine deutlich längere Lebensdauer im Bereich von $10^{-5} s$ bis hin zu Sekunden [7, 9]. Die strahlende Deaktivierung erfolgt durch Aussendung eines Photons, der Phosphoreszenzstrahlung. Diese ist wegen der geringeren Energiedifferenz zwischen den Zuständen wesentlich langwelliger als die vom S_1 -Zustand ausgehende Fluoreszenz. Die Phosphoreszenz wird ebenso wie die Fluoreszenz für die optische Bildgebung genutzt. Die strahlungslose Deaktivierung des Zustands in Form von Wärmeabgabe findet mit relativ kleiner Geschwindigkeit $k_t \approx 10^5 s^{-1}$ statt. Da die Phosphoreszenz zwischen Zuständen mit unterschiedlichen Spins stattfindet, sind die Geschwindigkeitsraten für die Übergänge meist kleiner als die der Fluoreszenz. Die Unterscheidung zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz kann daher auch nach der Lebensdauer erfolgen, wobei $10^{-8} s$ die Grenze ist [10].

Eine weitere Gruppe von strahlungslosen Deaktivierungsprozessen sind Prozesse, bei denen die Energie vom angeregten Molekül, dem Donator, strahlungslos auf ein anderes Molekül, den Akzeptor, übertragen wird. Diese Prozesse werden Quenchingprozesse (Löschprozesse) genannt. Der Akzeptor befindet sich vor dem Prozess im Grundzustand und wird durch die übertragene Energie angeregt, wohingegen der Donator vor dem Prozess angeregt ist und durch diesen deaktiviert wird. Der Akzeptor der Energie wird auch Quencher (Löschler) genannt. Durch geeignete Quencher-Moleküle sind vom S_1 und vom T_1 -Zustand strahlungslose Deaktivierungsprozesse möglich. Diese Prozesse sind abhängig von der Konzentration des Quenchers [Q]. Die Geschwindigkeitsrate des Prozesses wird mit $k_q[Q]$ angegeben.

2.1.2 Definition der Lebensdauer

Die Lebensdauer für Reaktionen erster Ordnung ist definiert als die Zeit, nach der die Konzentration eines Stoffes auf den $\frac{1}{e}$ -Teil der Konzentration zum Zeitpunkt $t = 0$ abgefallen ist. Dabei gilt:

$$\tau = \frac{1}{\sum_i k_i} \quad (2.1)$$

wobei k_i die beteiligten Reaktionsgeschwindigkeitsraten sind. Man unterscheidet die Lebensdauern nach wahren τ^n (natürlicher oder Strahlungslebensdauer) und experimentell gemessenen τ . Wahre Lebensdauern eines Zwei-Niveau-Systems sind z. B. die Fluoreszenz- und Phosphoreszenz-Strahlungslebensdauer:

$$\tau_f^n = \frac{1}{k_f}, \quad \tau_p^n = \frac{1}{k_p} \quad (2.2)$$

Wohingegen bei im Normalfall vorliegenden Mehr-Niveau-Systemen die experimentell ermittelten Lebensdauern für die Fluoreszenz und Phosphoreszenz in Abwesenheit von Quenchern wie folgt definiert sind:

$$\tau_f^0 = \frac{1}{k_f + k_d + k_{ISC}} = \tau_s^0, \quad \tau_p^0 = \frac{1}{k_p + k_t} = \tau_t^0 \quad (2.3)$$

Dabei sind die Übergangsraten für Absorptionsprozesse in höhere Niveaus vernachlässigt, da deren Übergangswahrscheinlichkeiten sehr gering sind. Treten jedoch zusätzlich Quenchprozesse auf, so ändern sich die Lebensdauern zu:

$$\tau_f = \frac{1}{k_f + k_d + k_{ISC} + k_{q,f}[Q]} = \tau_s \quad (2.4)$$

$$\tau_p = \frac{1}{k_p + k_t + k_{q,p}[Q]} = \tau_t \quad (2.5)$$

Reaktionen, die nicht in der ersten Ordnung ablaufen, sind abhängig von der Konzentration eines Stoffes, wie es bei Quenchingprozessen der Fall ist. Die Lebensdauer ist dann keine eindeutige Größe mehr, sondern abhängig von der Konzentration c : $\tau_{(2.Ord.)} = 1/(k \cdot c)$. In vielen Experimenten liegt aber der Quencher in weit größerer Konzentration vor als das angeregte Molekül, so dass die Reaktion als Reaktionen pseudoerster Ordnung gilt und die Lebensdauerbeziehung nach Gl. 2.1 gilt.

Die Konzentration der im angeregten Zustand befindlichen Moleküle wird bei kontinuierlicher Bestrahlung $I(t)$ nach ca. $10^{-7}s$ stationär, d. h. es zerfallen genauso viele Moleküle durch die verschiedenen Deaktivierungsprozesse wie sie durch Absorption $I_{abs}(t)$ gebildet werden (BODENSTEIN-Prinzip) [9]. Die zeitliche Änderung der Konzentration der angeregten Moleküle ist also $d[S_1]/dt = 0$. Die Konzentration der angeregten Moleküle kann damit

auch so beschrieben werden:

$$\text{ohne Quencher} \quad \frac{d[S_1]}{dt} = I_{abs}(t) - (k_f + k_d + k_{ISC}) \cdot [S_1] = 0 \quad (2.6)$$

$$\text{mit Quencher} \quad \frac{d[S_1]}{dt} = I_{abs}(t) - (k_f + k_d + k_{ISC} + k_{q,f}[Q]) \cdot [S_1] = 0 \quad (2.7)$$

Da die Fluoreszenzintensität proportional zur Konzentration der angeregten Moleküle ist, ergibt sich aus den beiden Gleichungen für die Intensität [7, 9, 11]:

$$\frac{I_{0,f}}{I_f} = \frac{k_f + k_d + k_{ISC} + k_{q,f}[Q]}{k_f + k_d + k_{ISC}} = 1 + \tau_s^0 k_{q,f}[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2.8)$$

Dies ist die STERN-VOLMER-Gleichung mit der STERN-VOLMER-Quenching-konstanten $K_{SV} = k_{q,f} \tau_s^0$. Diese Gleichung gilt für die Phosphoreszenzintensität analog, da auch diese proportional zur Anzahl der angeregten Moleküle ist. Der Intensitätsabfall der Fluoreszenz bzw. der Phosphoreszenz nach einem Anregungspuls ist einfach exponentiell [12, 13].

$$I_f(t) = I_{0,f} \cdot e^{-(k_f + k_d + k_{ISC} + k_{q,f}[Q]) \cdot t} = I_{0,f} \cdot e^{-t/\tau_s} \quad (2.9)$$

Durch die Messung des Intensitätsabfalls der Fluoreszenz bzw. der Phosphoreszenz nach einem Anregungspuls können die Lebensdauern τ_s^0 und τ_f^0 bzw. τ_s und τ_f im Beisein von Quenchern bestimmt werden.

2.1.3 Effizienz und Quantenausbeute

Die Effizienz eines Prozesses ist definiert als der Anteil des Prozesses am Gesamtvorgang. Sie ist bei Reaktionen erster Ordnung durch die Geschwindigkeitsraten gegeben.

$$\eta_i = \frac{k_i}{\sum_j k_j} \quad (2.10)$$

Die Effizienz der Fluoreszenz bzw. Phosphoreszenz ist demnach im Beisein von einem Quencher gegeben durch:

$$\eta_f = \frac{k_f}{k_f + k_d + k_{ISC} + k_{q,f}[Q]} \quad (2.11)$$

$$\eta_p = \frac{k_p}{k_p + k_t + k_{q,p}[Q]} \quad (2.12)$$

Eine weitere wichtige Größe ist die Quantenausbeute, die angibt, mit welchem Wirkungsgrad die Photonen in dem betroffenen Prozess genutzt werden. Die Quantenausbeute des Absorptionsprozesses ϕ_{abs} beträgt 1, da nach dem EINSTEIN-STOKES-Gesetz ein Photon bei der Lichtabsorption als ein Ganzes wirkt. Die Quantenausbeute für Reaktionen, die auf die Absorption folgen, ist gegeben durch

$$\Phi_i = \Phi_{abs} \eta_i \quad (2.13)$$

Die Quantenausbeuten der Deaktivierungsprozesse des S_1 -Zustands sind entsprechend

$$\Phi_f = \Phi_{abs}\eta_f = k_f\tau_s, \quad \Phi_d = \Phi_{abs}\eta_d = k_d\tau_s, \quad \text{und} \quad \Phi_{ISC} = \Phi_{abs}\eta_{ISC} = k_{ISC}\tau_s. \quad (2.14)$$

Die Quantenausbeuten von Folgeprozessen, ergeben sich aus der Multiplikation der einzelnen Reaktionseffizienzen η_i , so dass die Quantenausbeuten der Deaktivierungsprozesse des T_1 -Zustands wie folgt aussehen:

$$\Phi_p = \Phi_{abs}\eta_{ISC}\eta_p = k_{ISC}\tau_s \cdot k_p\tau_t \quad \text{und} \quad \Phi_t = \Phi_{abs}\eta_{ISC}\eta_t = k_{ISC}\tau_s \cdot k_t\tau_t. \quad (2.15)$$

2.1.4 Quenchingprozesse

Wie bereits erwähnt, gibt es strahlungslose Deaktivierungsprozesse, bei denen die Deaktivierung des angeregten Moleküls durch die Energieübertragung auf ein anderes Molekül, Quencher genannt, erfolgt. Diese Prozesse werden Quenchingprozesse genannt. Dabei ist für alle Prozesse nach dem Spinerhaltungssatz gefordert, dass das Gesamtspinnmoment des Systems erhalten bleibt. Die vier wichtigsten Quenchingarten sind der Singulett-Singulett-Energietransfer, der Triplett-Triplett-Energietransfer, der Triplett-Singulett-Energietransfer und der Elektronentransfer. Da für diese Arbeit maßgeblich die Triplett-Energieübertragung relevant ist, wird hier nur dieser Typ vorgestellt. Die anderen Prozesse sind z. B. in [7, 9] oder [14] detailliert beschrieben.

Bei der Triplett-Singulett-Energieübertragung wird die Energie vom angeregten Triplettzustand des Moleküls $^3M^*$ auf den im Triplettzustand befindlichen Quencher 3Q_0 übertragen. Das Molekül geht dabei in den Grundzustand 1M_0 über, während der Quencher in den angeregten Singulettzustand $^1Q^*$ übergeht. Da die Energieübertragung durch Stöße zwischen dem Molekül und dem Quencher erfolgt, wird dieser Quenchingprozess auch dynamisches oder 'collisional' Quenching genannt.



Die Lebensdauer τ eines angeregten Zustands wird in Abhängigkeit von der Quencherkonzentration verkürzt, so dass die Phosphoreszenzabklingkurve deutlich schneller abfällt. Die STERN-VOLMER-Gleichung für den dynamischen Quenchprozess sieht wie folgt aus [11, 15]:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{dyn}[Q] \quad (2.17)$$

Da die Intensität proportional zur Lebensdauer des Zustandes ist, ist das Verhältnis $I_0/I = \tau_0/\tau$. Trägt man das Intensitätsverhältnis oder das Abklingzeitverhältnis in einem Stern-Volmer-Graphen in Abhängigkeit der Quencherkonzentration auf, so ergibt sich eine Gerade wie in Abb. 2.2 links dargestellt ist.

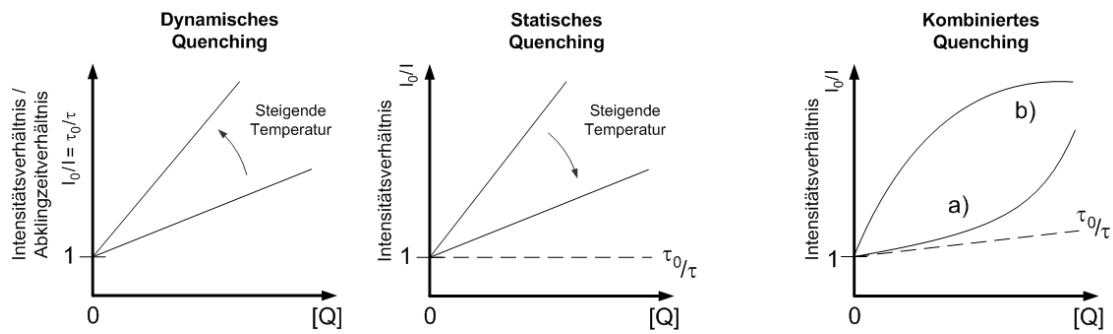


Abbildung 2.2: Stern-Volmer-Graphen für dynamisches (links), statisches (Mitte) und kombiniertes Quenching (rechts): Fall a) Komplexbildung oder Molekül-Quencher-Interaktion, Fall b) Quenching des S_1 und des T_1 -Zustands durch eine Quencherart.

Der Anstieg der Geraden gibt dabei die dynamische Quenchingkonstante K_{dyn} an mit $K_{dyn} = k_q \tau_0$, wobei k_q die bimolekulare Quenchratenkonstante ist [11, 15]. Diese Quenchratenrate k_q kann theoretisch aus der SMOLUCHOWSKI-Gleichung berechnet werden:

$$k_q = \gamma k \quad \text{mit} \quad k = 4\pi D R_0 N / 1000 \quad (2.18)$$

wobei γ als die Kollisionsrate zwischen frei diffundierenden Molekülen verstanden werden kann. D ist die Summe der Diffusionskoeffizienten von Molekül und Quencher, R_0 ist der mittlere Molekülradius von Molekül und Quencher, N ist die AVOGADRO-Zahl. Die Diffusionskoeffizienten der einzelnen Spezies können unter Vernachlässigung des transienten Terms mit der STOKES-EINSTEIN-Gleichung bestimmt werden [15]:

$$D_i = \frac{k_B T}{6\pi R_i \eta_L} \quad (2.19)$$

Dabei ist η_L die Viskosität der Lösung, k_B ist die BOLTZMANN-Konstante, T ist die absolute Temperatur, und R_i ist der Radius der Spezies. Da die Diffusionskonstanten mit steigender Temperatur größer werden, wird mit steigender Temperatur auch die bimolekulare Quenchingrate k_q größer. Im Stern-Volmer-Graphen ergibt sich daher für zunehmende Temperaturen ein steilerer Anstieg der Geraden.

Der am besten bekannte Quencher ist molekularer Sauerstoff 3O_2 [7, 11], der fast alle Moleküle quencht. Besonders gut werden aber metall-organische Komplexe aus Ruthenium, Osmium und Platin gequencht, die langlebige angeregte Zustände (bis zu $5\mu s$) haben und deshalb als gute Sauerstoffsensoren bekannt sind [2, 7].

Wenn in einer Probe mehrere Formen des angeregten Moleküls vorliegen, z. B. ein ungebundener und ein gebundener Anteil, und die Absorptionsbanden sich überschneiden, so können beide Formen des Moleküls gleichzeitig angeregt werden. Die Lebensdauer der angeregten Zustände aber, muss für diese beiden Formen nicht identisch sein, so dass die In-

tensitätsabklingkurve nicht mehr einfach, sondern multi-exponentiell abfällt.

$$I(t) = \sum_i I_{0,i} e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2.20)$$

Die Intensitäten $I_{0,i}$ sind die Anfangsintensitäten der Lumineszenz der einzelnen Molekülformen, die τ_i die entsprechenden Lebensdauern. Diese Lebensdauern sind charakteristisch für die vorliegende Form der Moleküle und resultieren aus den veränderten Geschwindigkeitsraten k_i der jeweiligen angeregten Zustände. Multi-exponentielles Abklingverhalten wird auch bei Farbstoffen beobachtet, die in Schichtsystemen oder Folien eingebettet sind [16].

Ein weiterer Quenchingprozess, der jedoch nicht die Lebensdauer eines Zustandes verändert, ist das statische Quenching. Bei diesem Quenchingprozess verbindet sich das Molekül M im Grundzustand mit dem Quencher Q und bildet einen Komplex $[M-Q]$. Dieser Komplex kann nicht mehr zur Lumineszenz angeregt werden. Die Geschwindigkeitsraten für die Deaktivierungsprozesse des angeregten Zustandes ändern sich dadurch also nicht, und die Lebensdauer bleibt unverändert. Das Abklingzeitverhältnis im Stern-Volmer-Graphen ist also konstant gleich 1. Die Intensität der Lumineszenz jedoch ändert sich in Abhängigkeit der Quencherkonzentration, da mit steigender Konzentration $[Q]$ mehr Komplexe gebildet werden können und somit weniger Moleküle $[M]$ in den angeregten Zustand gebracht werden können. Im Stern-Volmer-Graphen zeigt sich das Intensitätsverhältnis als eine Gerade (siehe Abb. 2.2 Mitte). Die STERN-VOLMER-Gleichung für diesen Fall lautet:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{stat}[Q] \quad \text{mit} \quad K_{stat} = \frac{[M-Q]}{[M][Q]} \quad (2.21)$$

Dabei ist K_{stat} die Komplexbildungsrate von Molekül und Quencher, die mit zunehmender Temperatur kleiner wird. Im Stern-Volmer-Graphen wird die Steigung also im Gegensatz zum dynamischen Quenchingprozess mit zunehmender Temperatur kleiner.

In der Realität liegen die verschiedenen Quenchingprozesse häufig nicht einzeln, sondern in Kombinationen vor. Die STERN-VOLMER-Gleichung ist dann eine Kombination der beiden vorher beschriebenen Prozesse und daher nicht linear:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{dyn}[Q])(1 + K_{stat}[Q]) \quad (2.22)$$

Je nach Ursache der Quenchingprozesse ändert sich die Formulierung der STERN-VOLMER-Gleichung. Die verschiedenen Formen der STERN-VOLMER-Gleichung sind z. B. in [9] und [15] beschrieben.

Die Kombination der beiden Quenchingprozesse zeigt sich im Stern-Volmer-Graphen durch einen nicht-linearen Zusammenhang, z. B. durch eine nach oben gekrümmte Kurve (siehe Abb. 2.2 rechts Fall a)). Die Ursache dieser nach oben gekrümmten Kurve kann verschiedene Gründe haben, wie z. B., dass entweder der transiente Term nicht wie in Gl. 2.19

vernachlässigt werden kann, dass ein nicht-lumineszierender Grundzustandskomplex gebildet wird und/oder dass das Molekül in dem Moment, wo es angeregt wird, benachbart ist zu einem Quencher, ohne aber notwendigerweise mit diesem zu interagieren.

Ein anderer nicht-linearer Stern-Volmer-Verlauf entspricht dem einer Sättigungskurve, die bis zu einem Plateau ansteigt (Abb. 2.2 rechts Fall b)). Die Ursache hierfür liegt in der Löschung des Triplettzustands durch den Quencher, wobei aber eine Komplexbildung sowohl aus dem Singulett-, als auch aus dem Triplettzustand möglich ist [9].

2.2 Das Prinzip 'Optical Molecular Imaging'

Der Begriff molekulare Bildgebung wird im Allgemeinen als die *in vivo* Charakterisierung und Messung von biologischen Prozessen auf molekularer und zellulärer Ebene bezeichnet [17, 18]. Das Ziel der molekularen Bildgebung ist im Gegensatz zur konventionellen Bildgebung die Darstellung von molekularen Veränderungen, die die Ursache einer Erkrankung sind und nicht erst die Auswirkungen dieser Veränderungen. Erkrankungen können damit im Frühstadium erkannt, ihre Ursachen und Wachstumsprozesse und auch Therapieeffekte auf molekularer Ebene beobachtet werden. Um dieses Ziel zu erreichen, bedient sich die molekulare Bildgebung spezifischer Moleküle, die die Quelle des Signalkontrasts sind und wegen ihrer Spezifität Marker genannt werden [19, 20, 21]. Diese Moleküle müssen hoch spezifisch an das Ziel, z. B. tumorspezifische Rezeptoren, angepasst sein; sie müssen biokompatibel und so ausgelegt sein, dass sie barrierefrei die gewünschten Zellen erreichen [18]. Weiterhin müssen diese Moleküle einen hohen Signalkontrast zu dem übrigen, nicht markierten Gewebe liefern, der auf physikalischen Effekten wie z. B. der Absorption oder der erhöhten Emission von elektromagnetischer Strahlung beruht. Ein auf die Ursache des Signalkontrasts und das Anwendungsgebiet der Marker angepasstes Bildgebungssystem ist ebenfalls erforderlich.

Eine Möglichkeit, die Ziele der molekularen Bildgebung zu erreichen, sind optische Methoden, also das 'Optical Molecular Imaging' (OMI). Das 'Optical Molecular Imaging' ist wie das 'Molecular Imaging' ein minimal invasives Verfahren für die Beobachtung von Veränderungen auf zellulärer Ebene wie auch im meso- und makrooptischen Bereich [18]. Die dem OMI zu Grunde liegenden Verfahren beruhen auf den Prinzipien der Spektroskopie wie z. B. der Absorption, der Reflexion oder der Lumineszenz [2, 18]. Die aus heutiger Sicht größte Gruppe sind Verfahren basierend auf der Lumineszenz, wobei eine Vielzahl von Parametern wie z. B. die Intensität, die Lebensdauer, Energieübertragungs- oder auch Quenchingprozesse Grundlage der Methoden sein können [2]. Einige dieser Verfahren kommen bis heute nur an Kleintieren [22], andere auch schon am Menschen zur Anwendung [23, 24].

2.2.1 Optische Gewebeeigenschaften

Die Grundlage der optischen Bildgebung beruht auf der Photonenausbreitung im Gewebe. Diese wird zum einen durch die Reflexion und Brechung an Grenzflächen und zum anderen durch die Absorption und die Streuung bestimmt. Zusätzlich kann durch Absorption von Licht auch Fluoreszenz oder Phosphoreszenz auftreten. Diese Effekte beeinflussen die Intensität und die Ausbreitungsrichtung des Lichts.

Mathematisch wird die Ausbreitung von Photonen in Gewebe oder auch anderen streuenden und absorbierenden Medien mit der Strahlungstransportgleichung beschrieben:

$$\frac{dL(\mathbf{r}, \mathbf{s})}{ds} = -(\mu_a + \mu_s)L(\mathbf{r}, \mathbf{s}) + \frac{\mu_s}{4\pi} \int 4\pi p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')L(\mathbf{r}, \mathbf{s}')d\Omega + S(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \quad (2.23)$$

Dabei ist $L(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ die Strahlungsdichte am Ort \mathbf{r} in Richtung \mathbf{s} , μ_a ist der Absorptionskoeffizient, μ_s der Streukoeffizient und $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$ die Streuphasenfunktion. Die Intensität des Lichts wird durch Absorptions- und Streuprozesse und durch Quellen, wie z. B. Fluoreszenz oder Einstrahlung von Licht, verändert. Die Richtungsänderung nach einem Streuprozess wird durch die Phasenfunktion wiedergegeben. Die Quellen sind in Gl. 2.23 durch den Quellterm $S(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ beschrieben. Die Parameter, die die Lichtausbreitung wiedergeben, sind der Absorptionskoeffizient μ_a , der Streukoeffizient μ_s und die Phasenfunktion $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$.

Absorption und Autofluoreszenz

Absorption von Photonen in humanem Gewebe findet durch unterschiedliche Substanzen, wie z. B. Hämoglobin, Melanin, Proteine und Flavine, statt. Der Hauptbestandteil von Gewebe ist aber Wasser, das auch einen Haupteinfluss auf die Absorption hat. Der Parameter, der die Absorption beschreibt, ist der Absorptionskoeffizient μ_a . Dieser ist von der Wellenlänge des Lichts λ abhängig und setzt sich aus der Absorberkonzentration c_a und dem Absorptionswirkungsquerschnitt σ_a zusammen:

$$\mu_a = \sum c_a \sigma_a \quad (2.24)$$

Die Werte des Absorptionskoeffizienten liegen für humanes Gewebe im Bereich von 0,01 bis 100 cm^{-1} [25, 26]. Die Absorptionskoeffizienten von Wasser, Haut und Hämoglobin sind in Abb. 2.3 in Abhängigkeit der Wellenlänge dargestellt. Abb. 2.3 zeigt, dass im nahinfraroten Spektralbereich von ca. $700 - 1100 \text{ nm}$ die Absorption am geringsten ist [19, 27].

Im sichtbaren Spektralbereich tragen zur Absorption auch viele Fluorophore, wie z. B. die Cytokeratine oder NADH, bei [19, 29]. Diese absorbieren aber nicht nur das Licht, sondern emittieren anschließend Fluoreszenz. Letztere wird, da sie von körpereigenen Substanzen ausgesandt wird, Autofluoreszenz genannt. Bei der optischen molekularen Bildgebung, die mit Wellenlängen im sichtbaren Spektralbereich durchgeführt wird, führt die Autofluo-

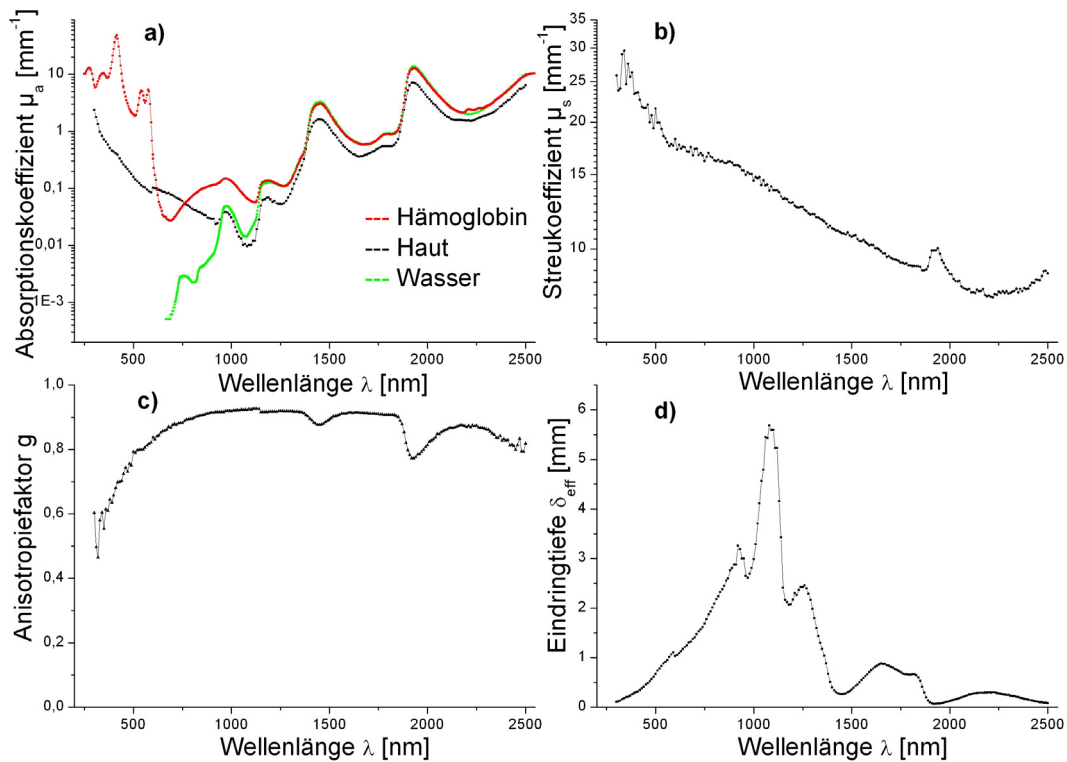


Abbildung 2.3: a) Absorptionskoeffizient μ_a von Hämoglobin, Wasser und Haut, sowie b) Streukoeffizient μ_s , c) Anisotropiefaktor g und d) Eindringtiefe δ_{eff} von Haut [27], Werte für Hämoglobin entnommen aus [28].

reszenz zu einem deutlich erhöhten Untergrundsignal. Deshalb ist eine langwelligere Anregung, bei der weniger Absorption durch Gewebesubstanzen stattfindet und damit weniger Fluoreszenz auftritt, zu bevorzugen.

Streuung und Anisotropie

Streueignisse finden, wie auch bei der Absorption, an verschiedenen Substanzen im Gewebe statt. Die Ursachen für die Streuung sind Brechungsindexänderungen, z. B. an Membranen, Zellkernen oder Mitochondrien [26]. Der Parameter, der die Streuung beschreibt, ist der Streukoeffizient μ_s . Dieser ist ebenfalls abhängig von der Wellenlänge und wird aus der Streuzentrenkonzentration c_s und dem Streuwirkungsquerschnitt σ_s berechnet. Die Werte für humanes Gewebe liegen bei $10 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ [25, 26].

$$\mu_s = \Sigma c_s \sigma_s \quad (2.25)$$

Die Beschreibung des Streuwirkungsquerschnitts ist von der Geometrie der Streuzentren abhängig. Da aber im Gewebe eine Vielzahl an geometrischen Strukturen vorliegen, ist die exakte mathematische Beschreibung schwierig. Die einfachste Beschreibung kann mit der Annahme erfolgen, dass die Zentren homogene, kugelförmige Strukturen sind und Einfachstreuung vorliegt (MIE-Theorie) [27]. Dann kann der Streuquerschnitt durch Lösung der

MAXWELL-Gleichungen bestimmt werden. Einfachstreuung liegt dann vor, wenn die einzelnen Streueignisse als voneinander unabhängig betrachtet werden können, d. h. wenn der Streuzentrenabstand groß gegen die Wellenlänge ist, was für biologisches Gewebe jedoch nur eingeschränkt gilt.

Der Parameter, der die Richtungsänderung eines Photons nach einem Streueignis im Gewebe wiedergibt, ist die Phasenfunktion $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$. Das Photon, welches sich in Richtung \mathbf{s} bewegt, wird durch das Streueignis in Richtung \mathbf{s}' gestreut. Die dabei auftretenden Winkel zwischen den beiden Richtungen sind der Streuwinkel Θ und der Azimutalwinkel Φ . In homogenen Medien ist die Streuung vom Azimutalwinkel unabhängig und die Phasenfunktion beinhaltet nur noch den Streuwinkel Θ .

$$\int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') d\Omega = \int_0^{2\pi} d\Phi \int_0^\pi p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') \sin\Theta d\Theta = 1 \quad (2.26)$$

Eine mathematische Beschreibung der Phasenfunktion, die eine gute Übereinstimmung mit Experimenten liefert, ist schwierig zu finden. Eine Näherungslösung, die eine relativ gute Übereinstimmung mit Experimenten liefert, ist die HENYEY-GREENSTEIN-Streuphasenfunktion [30, 31]:

$$p_{HG}(\mathbf{s}, \mathbf{s}') = \frac{1 - g_{HG}^2}{4\pi(1 + g_{HG}^2 - 2g_{HG} \cos\Theta)^{3/2}} \quad (2.27)$$

mit

$$g_{HG} = \langle \cos\Theta \rangle = \int_{4\pi} p_{HG}(\mathbf{s}, \mathbf{s}') (\mathbf{s}, \mathbf{s}') d\Omega \quad (2.28)$$

g_{HG} ist der Anisotropiefaktor, der den Erwartungswert des Kosinus des Streuwinkels, also den räumlich gemittelten Wert, repräsentiert. Der Anisotropiefaktor kann Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen. Der Wert -1 entspricht der Rückwärtsstreuung, 0 der isotropen Streuung und $+1$ der Vorwärtsstreuung. In biologischem Gewebe liegt im sichtbaren Spektralbereich hauptsächlich Vorwärtsstreuung mit Werten von $g = 0,8 - 0,99$ vor [25].

Damit lassen sich die optischen Eigenschaften von Gewebe durch die folgenden drei Parameter beschreiben: den Absorptionskoeffizienten μ_a , den Streukoeffizienten μ_s und den Anisotropiefaktor g . Alle drei sind abhängig von der Wellenlänge λ , von Gewebebestandteilen und deren Konzentration sowie von zugeführten Farbstoffen. Sie müssen deshalb für jede Gewebeart bestimmt werden.

Reflexion und Brechung

Beim Eintritt von Strahlung von einem optisch dünneren in ein optisch dickeres Medium kommt es an der Grenzfläche zur teilweisen Reflexion. Der Anteil der reflektierten Intensität I_R hängt dabei von der Wellenlänge λ ab und wird durch eine Reemission von Strahlung aus dem Gewebe verändert. Das transmittierte Licht I_T wird an der Grenzfläche gebrochen und

ändert seine Ausbreitungsrichtung. Diese beiden Effekte hängen von den Brechungsindizes der beiden Medien und dem Einfallswinkel des Lichts α ab. Der Brechungsindex von biologischem Gewebe ähnelt häufig dem von Wasser, da in den meisten Geweben Wasser der Hauptbestandteil ist.

Die an der Geweboberfläche reflektierte Intensität, die FRESNEL-Reflexion, ist für optische Messungen interessant und wichtig, um die gemessenen Intensitäten, z. B. bei Transmissionsmessungen oder auch bei Fluoreszenzmessungen, zu quantifizieren [29].

Eindringtiefe

Absorptions- und Streuprozesse von Licht begrenzen die optische Eindringtiefe in Gewebe. Bei homogenen Medien, in denen nur Absorption stattfindet, kann die Eindringtiefe des Lichts nach dem BOUGUER-LAMBERT-Gesetz bestimmt werden [32]:

$$I_d = I_0 e^{-\mu_a d} \quad (2.29)$$

I_d ist dabei die transmittierte Intensität, I_0 ist die Eingangsintensität und d die Gewebedicke. I_0 ist dabei schon die um den reflektierten Anteil des Lichts R an der Oberfläche geschwächte Intensität. Die Gewebedicke, bei der die Intensität I_d auf den $\frac{1}{e}$ -ten Teil abgefallen ist, nennt man die Eindringtiefe δ_{eff} .

Das BOUGUER-LAMBERT-Gesetz gilt in dieser Form allerdings nicht, wenn deutlich mehr Streuung als Absorption vorliegt. Dies trifft vor allem im nahinfraroten Spektralbereich zu. Dort übertrifft die Streuung die Absorption um 1 – 2 Größenordnungen. Für die Berechnung der Eindringtiefe muss deshalb die Streuung berücksichtigt werden.

Für die Bestimmung der Eindringtiefe muss dann die Diffusionsnäherung betrachtet werden, die einen Lösungsansatz der Strahlungstransportgleichung darstellt, unter der Annahme, dass nur schwach anisotrope Streuung und geringe Absorption vorliegen. Ziel der Diffusionsnäherung ist die Umformulierung der Strahlungstransportgleichung in eine Diffusionsgleichung für die Gesamtstrahlungsdichte $\Psi(\mathbf{r})$. Die Lösung erfolgt durch das Einsetzen von LEGENDRE-Polynomen, sowohl für die Strahlungsdichte $L(\mathbf{r}, s)$, als auch für den Quellterm $S(\mathbf{r}, s)$. Nach Umrechnen und mit der Annahme, dass eine einfache Punktquelle mit der Leistung P_0 am Ort r_0 in einem unendlich ausgedehnten Medium mit isotroper Strahlung vorliegt, ergibt sich für die Strahlungsdichte [3, 25]:

$$\Psi(\mathbf{r}) = \frac{P_0}{4\pi D_{p1}(\mathbf{r} - r_0)} e^{-\mu_{eff}(\mathbf{r} - r_0)} \quad (2.30)$$

μ_{eff} ist dabei der effektive Schwächungskoeffizient und δ_{eff} die effektive Eindringtiefe:

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s(1 - g))} \quad , \quad \delta_{eff} = \frac{1}{\mu_{eff}} \quad (2.31)$$

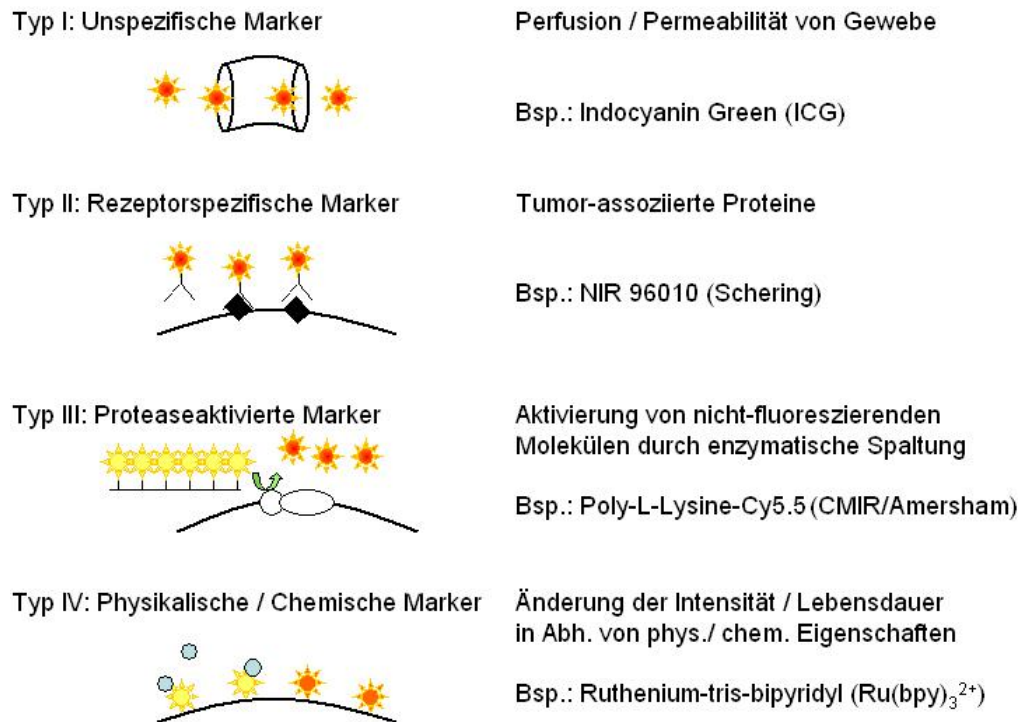


Abbildung 2.4: Die vier Markertypen und -mechanismen für das Optical Molecular Imaging.

Da im nahinfraroten Spektralbereich sowohl die Absorption als auch die Streuung am geringsten sind, ist in diesem Bereich die effektive Eindringtiefe am größten, wie in Abb. 2.3 gezeigt ist. Der Spektralbereich wird daher auch optisches Fenster genannt. Ein optischer Marker sollte in diesem Wellenlängenbereich anregbar sein und emittieren, wenn er im Gewebe eingesetzt werden soll. Wird der Marker jedoch nur für Messungen an der Oberfläche von Gewebe verwendet, so ist diese Einschränkung nicht notwendig.

2.2.2 Marker für das 'Optical Molecular Imaging'

Um das auf der Lumineszenz beruhende 'Optical Molecular Imaging' zu nutzen, ergeben sich aus dem vorher genannten drei Kernelemente, die benötigt werden:

1. ein biokompatibler Marker, der die gewünschte Zelle markiert,
2. ein lumineszierendes Kontrastmittel, anregbar im nahinfraroten Spektralbereich und
3. ein auf den Marker angepasstes Bildgebungssystem.

Die eingesetzten Marker sind je nach ihrer Wirkungsweise in vier Typen eingeteilt: unspezifische, rezeptorspezifische, proteaseaktivierte sowie physikalische oder chemische Marker. Die vier Markermechanismen und Beispiele sind in Abb. 2.4 dargestellt.

Typ I: Unspezifische Marker

Der erste Markertyp, die unspezifischen Kontrastmittel, akkumulieren nicht selektiv, sondern können nur für die Bildgebung von Perfusion und Permeabilität verwendet werden. Die Marker sind biokompatible Fluorophore ohne weitere biologisch relevante Eigenschaften. Sie werden mittels Licht zu Fluoreszenz angeregt und diese Fluoreszenz kann dynamisch z. B. mit einer Kamera beobachtet werden. Ein Beispiel für einen solchen Marker ist Indocyanin Green (ICG) [33]. Dieser wird für das Beobachten von Organfunktionen, z. B. für die Beurteilung von Ischämien am Herzen, verwendet [24, 34].

Typ II: Rezeptorspezifische Marker

Die rezeptorspezifischen Kontrastmittel lagern sich im Gegensatz dazu spezifisch an, z. B. bei Tumoren. Der Farbstoff NIR96010 von der Firma Schering ist ein Marker dieses Typs. Das Kontrastmittel besteht aus einem Fluorophor und einem Rezeptor-spezifischen Liganden. Der Ligand bindet an den Rezeptor und markiert damit die ausgewählte Zelle. Wird der Marker mit Licht zu Fluoreszenz angeregt, so tritt diese direkt an den Zellen im Gewebe auf, wo sich die Rezeptoren befinden. Das restliche Gewebe leuchtet nur schwach von noch ungebundenen oder schon im Ausscheidungsprozess befindlichen, bzw. durch den Stoffwechsel abgelagerten Markern. Der Farbstoff NIR96010 befindet sich in der zweiten klinischen Phase und wird bereits für Tierexperimente eingesetzt [1, 35, 36].

Typ III: Proteaseaktivierte Marker

Einen deutlich höheren Kontrast versprechen proteaseaktivierte Marker, wenn die Protease tumor- oder krankheitsspezifisch auftritt [33]. Diese Kontrastmittel bestehen aus bis zu 20 Fluorophoren, die über spezifische Ligandenbrücken an ein Trägerteilchen gekoppelt sind. Wird der Marker in diesem Zustand mit Licht angeregt, so ist die Fluoreszenz durch interne Energieübertragung unterdrückt. Erst wenn die Ligandenbrücken durch tumor- oder krankheitsspezifische Enzymreaktionen aufgebrochen werden, werden die Fluorophore voneinander getrennt, die intramolekulare Energieübertragung ist damit nicht mehr möglich, und die nun freien Fluorophore fluoreszieren mit höherer Quantenausbeute. Die detektierte Fluoreszenz ist örtlich auf die Enzymreaktionen begrenzt, während das umliegende Gewebe keine Fluoreszenz aufweist. Der Kontrast ist damit maximal. Diese Markertypen werden zur Zeit entwickelt und sind noch nicht für humane Anwendungen zugelassen. Ein Beispiel ist der Farbstoff Poly-L-Lysin-Cy5.5 (CMIR/Amersham) [22, 37, 38].

Typ IV: Physikalische oder chemische Marker

Eine weitere Klasse von Markern sind optische Sensoren, die physikalische oder chemische Parameter *in vivo* messen können. Die optischen Parameter, die für solche Messsonden zur Verfügung stehen, sind zum einen die Lumineszenzintensität und zum anderen die Lebensdauer. Diese Parameter verändern sich auf Grund von Quenchingprozessen in Abhängigkeit des zu messenden Analyten. Durch deren Messung ist daher eine Konzentrationsbestimmung des Analyten möglich. Die Wahl des Markers richtet sich nach dem zu messenden Analyten und der für das Anwendungsgebiet benötigten Sensitivität und Spezifität. Sie können in Schicht- oder Foliensysteme eingebettet und dadurch chemisch und mechanisch stabil angepasst werden [11]. Ein Beispiel für einen solchen Marker ist $Ru(bpy)_3^{2+}$, der für die Messung von molekularem Sauerstoff geeignet ist.

Wird bei *in vivo* Messungen die Lumineszenzintensität der Messung zu Grunde gelegt, so hängt diese von verschiedenen Faktoren ab, die für eine Referenzierung der Messwerte berücksichtigt werden müssen. Diese sind die Anregungsintensität, die Absorption des Gewebes, die Konzentration des Farbstoffs, die optische Weglänge, die Lumineszenzquantenausbeute in der Probe und die Detektorsensitivität. Weiter hängt sie von der Reflexion, der Absorption und der Streuung in der Probe ab. Ein weiteres Problem ist, dass viele Farbstoffe sehr schnell ausbleichen (Photobleaching) und sich die Intensität damit zeitlich verändert, obwohl sich die Analytenkonzentration nicht verändert hat [11]. Um quantitative *in vivo* Intensitätsmessungen durchzuführen, müssen diese Einflüsse berücksichtigt werden und auf die tatsächlich im Gewebe vorhandenen Werte zurück gerechnet werden. Dieses Verfahren nennt man Reskalierung [1, 20].

Eine Referenzierung der Messwerte ist auch ohne Reskalierung erreichbar, wenn die Lebensdauer der Messung zu Grunde gelegt wird. Dann ist man von lokalen Intensitätsschwankungen unabhängig (siehe Abschnitt 3.1.2), da nur das Verhältnis zweier Intensitäten aus der Lumineszenzabklingkurve zur Berechnung der Lebensdauer herangezogen wird. Lokale Konzentrationsschwankungen des Markers, Inhomogenitäten der Anregungsleistung, optische Verluste, bedingt durch die Geometrie des Sensors, sowie durch Streulicht, welches in den Sensor gelangt, werden somit ausgeschlossen. Zusätzlich kann, wenn der Farbstoff eine hinreichend lange Lebensdauer ($\sim \mu s$) hat, die kurzlebige Autofluoreszenz (einige ns) des Gewebes ausgeschlossen werden.

2.3 Molekularer Sauerstoff

Einer der am besten untersuchten Quencher der Lumineszenz von Farbstoffen ist molekularer Sauerstoff im Grundzustand 3O_2 . Molekularer Sauerstoff besitzt im Grundzustand im Gegensatz zu den meisten anderen Molekülen Tripletcharakter. Ein spinerlaubter Energie-

transfer von einem im Triplettzustand befindlichen Molekül ist daher mit hoher Quantenausbeute möglich, wenn der Intersystem Crossing-Übergang des Moleküls ausreichend hoch ist. Die Lebensdauer des T_1 -Zustands eines solchen Moleküls wird durch diesen dynamischen Quenchingprozess in Abhängigkeit von der molekularen Sauerstoffkonzentration im Grundzustand verkürzt. Mit Hilfe dieses Energietransfers ist daher einerseits die Generierung von molekularem Singulett-Sauerstoff und andererseits auch der Nachweis von molekularem Sauerstoff im Grundzustand möglich.

2.3.1 Eigenschaften von Sauerstoff

Molekularer Sauerstoff befindet sich auf Grund von zwei ungepaarten Elektronen in den antibindenden π^* -Orbitalen im Grundzustand in einem Triplettzustand [3]. Dieser Zustand wird mit $^3\Sigma_g^-$ bezeichnet und im weiteren molekularen Sauerstoff genannt. Die elektronische Anregung von molekularem Sauerstoff führt zum Übergang in den ersten angeregten Singulettzustand $^1\Delta_g$. Dabei paaren sich die Elektronen in einem der beiden Orbitale, während das andere leer bleibt. Dieser Übergang ist ein Intersystem Crossing-Übergang, d. h. er ist spinverboten und strahlungslos. Die direkte Anregung dieses Zustands mit Licht erfolgt daher nur mit geringer Quantenausbeute [39]. Die benötigte Energie für die Anregung beträgt $0,98\text{ eV}$ ($22,5\text{ kcal}$) [8, 39, 40]. Der generierte angeregte Singulett-Sauerstoff $^1\Delta_g$ ist sehr reaktiv und hat eine Lebensdauer von $2\text{ }\mu\text{s}$ in wässriger Lösung und $10 - 100\text{ }\mu\text{s}$ in organischen Lösungsmitteln [3, 40].

Für die Anregung des zweiten angeregten Singulettzustands $^1\Sigma_g^+$ wird eine Energie von $1,63\text{ eV}$ ($37,5\text{ kcal}$) benötigt [8]. In diesem Zustand sind die beiden Elektronen gepaart und befinden sich in den beiden Orbitalen. Dieser Zustand ist deutlich kurzlebiger als der $^1\Delta_g$ -Zustand und relaxiert nach 10^{-9} s zu $^1\Delta_g$ ohne vorherige chemische Reaktionen. Die Bezeichnung Singulett-Sauerstoff bezieht sich daher auf den $^1\Delta_g$ -Zustand. Die Besetzung der Orbitale der Zustände von Sauerstoff ist in Abb. 2.5 gezeigt.

Singulett-Sauerstoff kann im Körper durch verschiedene Reaktionen, wie z. B. enzymatischen Reaktionen, Peroxy-Reaktionen oder auch durch Desaktivierung von Hydroxyl- oder Sauerstoffanion-Radikalen entstehen. Die effizienteste Methode aber ist der Energietransfer von einem angeregten Molekül im Triplettzustand zum molekularen Sauerstoff (siehe Kap. 2.1.4). Liegt die freiwerdende Energie des Moleküls über der Aktivierungsenergie von Sauerstoff, so kann der Quenchingprozess mit hoher Quantenausbeute ablaufen. Die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_Δ setzt sich bei diesem Mechanismus aus der Intersystem Crossing-Quantenausbeute Φ_{ISC} und der Lebensdauer des Triplettzustands τ_t des Moleküls, der Quenchingrate k_{q,O_2} und einem Faktor S_Δ zusammen. Der Faktor S_Δ gibt an, wie hoch der Anteil der Quenchingprozesse mit Sauerstoff ist, da nicht alle Moleküle durch

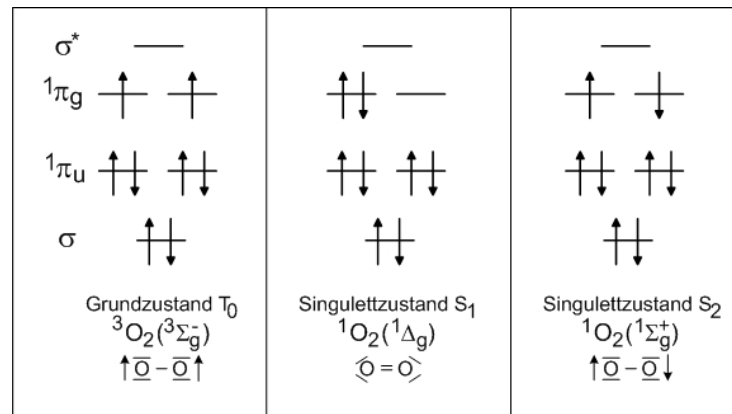


Abbildung 2.5: Besetzung der σ , $1\pi_{g,u}$ und σ^* -Orbitale von molekularem Sauerstoff im Grundzustand $^3O_2(^3\Sigma_g^-)$, im ersten angeregten Singulett-Sauerstoff $^1O_2(^1\Delta_g)$ und im zweiten angeregten Singulettzustand $^1O_2(^1\Sigma_g^+)$ mit den p-Elektronen der Sauerstoffatome.

diesen Deaktivierungsprozess deaktiviert werden [41, 42].

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{ISC} \cdot \tau_t \cdot k_{q,O_2}[O_2] \cdot S_{\Delta} \tag{2.32}$$

Die Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff kann, wie in Abb. 2.6 gezeigt ist, strahlend, strahlungslos oder über Quenchingprozesse erfolgen. Da der Übergang in den Grundzustand sowohl spin- als auch paritätsverboten ist, ist die strahlende Übergangsrate k_{p,O_2} sehr gering. Die Lebensdauer τ_{Δ} von Singulett-Sauerstoff hängt damit hauptsächlich von strahlungslos ablaufenden Prozessen mit den Raten k_{t,O_2} für interne Konversion und $k_{q,A}$ für Quenchingprozesse mit Akzeptormolekülen A ab. Die Wellenlänge der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff liegt bei 1270 nm [3, 42, 43].

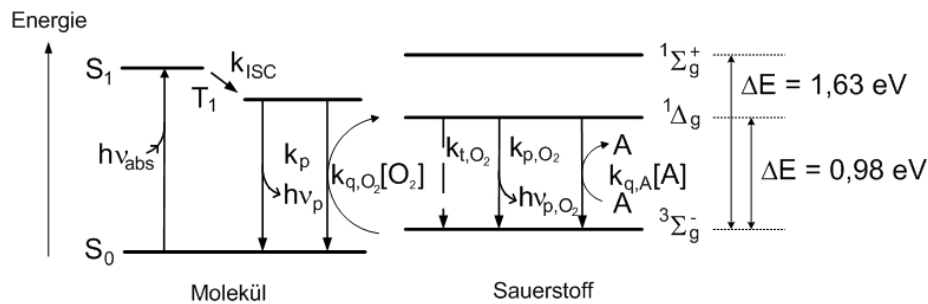


Abbildung 2.6: JABLONSKI-Diagramm mit Aktivierungs- und Deaktivierungsprozessen von Singulett-Sauerstoff $^1\Delta_g$, mit der internen Konversionsrate k_{t,O_2} , der Lumineszenzrate k_{p,O_2} und der Quenchingrate $k_{q,A}[Q]$ mit Akzeptormolekülen A.

Neben diesen Deaktivierungsprozessen können auch chemische Reaktionen von Sauerstoff mit seiner Umgebung erfolgen. Die wichtigsten sind Oxidationen, Cycloadditionen und SCHENK-En-Reaktionen. Substanzen im Körper, die empfänglich sind für Reaktionen von Sauerstoff, sind z. B. Lipide, Proteine, Cholesterin sowie Tryptophan, Histidin und ungesättigte Fettsäuren [44, 45].

2.3.2 Nachweis von Sauerstoff

In vielen Bereichen, wie beispielsweise bei Meerwasseruntersuchungen und in der Medizin, ist die Bestimmung der molekularen Triplet- oder auch der Singulett-Sauerstoffkonzentration von Bedeutung. Dafür stehen sowohl optische, als auch elektrochemische Verfahren (CLARK-Sonden) zur Verfügung. Die optischen Verfahren haben dabei gegenüber elektrochemischen den Vorteil, dass sie keinen elektrischen Einflüssen unterliegen, sie verbrauchen den zu messenden Analyten nicht und man kann in mehreren Kanälen gleichzeitig messen. Die Sensitivität und die Spezifität der optischen Sonden sind gut und durch die Wahl des verwendeten Farbstoffs beeinflussbar. Sie sind weiter an die chemischen und mechanischen Einsatzbedingungen durch Immobilisierung in Sol-Gel-Schichten oder Foliensysteme adaptierbar [2, 11].

Eine Möglichkeit des Singulett-Sauerstoffnachweises ist das Elektronenspinresonanz-Verfahren (EPR) [46]. Dieses ist ein spektroskopisches Verfahren, das prinzipiell auch für *in vivo*-Untersuchungen geeignet ist. Der Nachweis von Singulett-Sauerstoff erfolgt dabei indirekt über die Verwendung von Spintraps oder durch die Erzeugung von stabilen Radikalen, die Tripletcharakter besitzen [46]. Dieses Verfahren ist jedoch sehr aufwändig und es bestehen derzeit noch Probleme bei der Empfindlichkeit der EPR-Oxymetrie [47, 48].

Optische Sonden basieren entweder auf der Messung der Lumineszenzlebensdauer von angeregten Farbstoffen, die in Abhängigkeit der molekularen Sauerstoffkonzentration gequencht wird, oder auf der Detektion der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff. Da die Lumineszenz eine geringe Ausbeute hat, die durch Gewebe zusätzlich geschwächt wird und Detektoren bei der Wellenlänge der Lumineszenz geringe Quanteneffizienzen aufweisen, ist die direkte Detektion im Gewebe sehr schwierig. Zusätzlich wird die Lumineszenz durch andere Moleküle wie z. B. Proteine stark gequencht und hat deshalb eine sehr kurze Lebensdauer [41, 49].

Ein optischer Sensor, der auf der Messung der Lebensdauer beruht, bietet durch die Wahl des Farbstoffs und dessen Verwendung im Sensor, eine hohe Anpassungsfähigkeit an das Einsatzgebiet und eine hohe Empfindlichkeit. Die Bedingung an das Messverfahren ist die Verwendung eines Farbstoffes, der eine lange Lebensdauer hat, die durch Sauerstoff gequencht wird. Eine Klasse von Farbstoffen mit langer Lebensdauer (bis zu einigen μs), welche für die Messung von molekularem Sauerstoff geeignet sind, sind organische Metallkomplexe. Diese bestehen typischerweise aus Ruthenium [Ru(II)], Rhenium [Re(I)] oder Osmium [Os(II)] mit einem oder mehreren Diimine-Liganden [7, 16, 50, 51, 52]. Ein Beispiel ist der Metall-Komplex Ruthenium-tris-bipyridyl [7, 53, 54].

Der Farbstoff Ruthenium-tris-bipyridyl

Die Lumineszenz von transienten Metall-Komplexen erfolgt im Gegensatz zur Regel von KASHA für organische Moleküle stets aus dem untersten angeregten Zustand. Diese Variation der Regel beruht auf der Beobachtung, dass strahlungslose Deaktivierung aus höher angeregten Zuständen sehr schnell (in ca. 300 fs) erfolgt, auch wenn sie einer Änderung der Spinmultiplizität unterliegt. Dies ist möglich, da für schwere Atome mit starker Spin-Bahn-Kopplung das Übergangsverbot für das Intersystem Crossing aufgehoben ist. Daher erfolgt unabhängig von dem durch Absorption angeregten Zustand die Relaxation mit fast 100% Effizienz. Bei Ru(II)-polypyridine Komplexen ist der Grundzustand ein Singulettzustand. Durch Absorption können entweder Metall-zu-Ligand Ladungstransfer angeregte Zustände (metal-ligand charge transfer, MLCT), Metall-zentrierte angeregte Zustände (metal centered, MC) oder Ligand-zentrierte angeregte Zustände (ligand centered, LC) erreicht werden. Die energetisch höheren Zustände relaxieren schnell strahlungslos in den untersten angeregten Zustand und in Zustände, die auf Basis der BOLTZMANN-Verteilung besetzt sein können. Nur diese spielen für die Lumineszenz und für Quenchingprozesse eine Rolle.

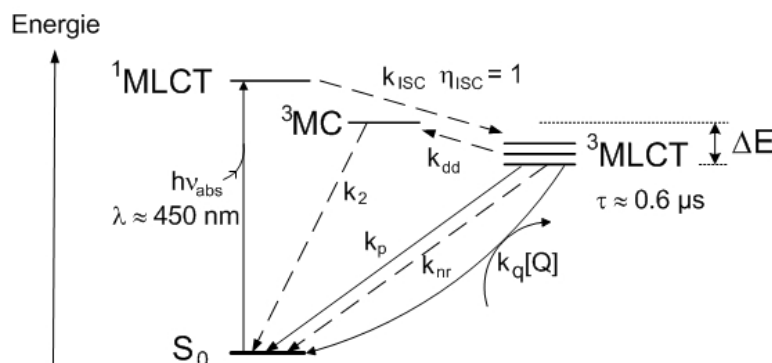


Abbildung 2.7: JABLONSKI-Diagramm für $Ru(bpy)_3^{2+}$ mit den Raten: Intersystem Crossing-Rate k_{ISC} mit $\eta_{ISC} = 1$, Deaktivierungsraten des 3MLCT -Zustand: Phosphoreszenzrate k_p , nicht strahlende Deaktivierungsrate k_{nr} , Quenchingrate $k_q[Q]$, sowie thermisch aktivierte Deaktivierung über den 3MC -Zustand mit den Raten k_{dd} und k_2 .

Die angeregten Zustände des Farbstoffs $Ru(bpy)_3^{2+}$ und deren Deaktivierungsprozesse sind in Abb. 2.7 gezeigt. Durch Anregung bei $\sim 450\text{nm}$ erfolgt die Anregung des 1MLCT -Zustands [54]. Von diesem erfolgt mit einem Intersystem Crossing-Übergang mit der Effizienz $\eta = 1.0$ der Übergang in den 3MLCT -Triplettzustand. Dieser ist der niedrigste angeregte Zustand. Von diesem Zustand kann eine strahlende Deaktivierung mit der Rate k_p in den Grundzustand erfolgen. Diese erfolgt relativ langsam, dementsprechend lang ist die beobachtete Lebensdauer $\tau_0 \approx 0,6\ \mu\text{s}$ für eine stickstoffgesättigte wässrige Lösung. Die Quantenausbeute der Phosphoreszenz beträgt ca. 4% [54]. Eine strahlungslose Deaktivierung des Zustands kann durch Quenchingprozesse mit der Rate $k_q[Q]$ oder durch andere nicht strahl-

lende Prozesse mit der Rate k_{nr} erfolgen. Letztere sind abhängig von der Temperatur und werden mit steigender Temperatur größer. Bei höheren Temperaturen kann die Lumineszenz aber auch durch die thermisch aktivierte strahlungslose Deaktivierung über den nächst höheren 3MC -Zustand erfolgen [16, 54]. Die Rate k_{dd} für diesen Prozess ist definiert durch die ARRHENIUS-Gleichung:

$$k_{dd} = k' e^{-\Delta E/k_B T} \quad (2.33)$$

Dabei ist ΔE die Energiedifferenz zwischen dem 3MLCT und dem 3MC -Zustand. k_B ist die BOLTZMANN-Konstante, T die absolute Temperatur und k' der preexponentielle Faktor für die strahlungslose Deaktivierung über den 3MC -Zustand. Daraus ergibt sich eine Temperaturabhängigkeit der Lebensdauer des 3MLCT -Zustands.

$$\tau_{MLCT} = \frac{1}{k_p + k_t + k_q[Q] + k_{dd}} \quad (2.34)$$

Diese ist auch von der Quencherkonzentration $[Q]$ abhängig. Der angeregte 3MLCT -Zustand hat eine lange Lebensdauer und ist somit ein geeigneter Ausgangspunkt für Quenchingprozesse. Da der angeregte Zustand ein Triplettzustand ist, findet der dynamische Quenchingprozess zu molekularem Sauerstoff mit hoher Effizienz statt (bis zu 85 %) [16, 45]. Die Energie, die vom Farbstoff bei der Deaktivierung freigesetzt wird, beträgt 2,12 eV [54]. Diese ist deutlich größer als die benötigte Aktivierungsenergie von 0,98 eV für molekularen Sauerstoff. Nach dem Energietransfer befindet sich der Farbstoff wieder im Grundzustand, während der Sauerstoff im angeregten Zustand vorliegt. Der Farbstoff kann somit sofort wieder für Messungen genutzt werden.

Zusätzlich zu den bereits genannten Deaktivierungsprozessen kann der Ruthenium-Komplex durch Liganden-Substitution zerstört werden. In wässriger Lösung ist die Quantenausbeute für diesen Prozess im Bereich von $10^{-5} - 10^{-3}$ und abhängig von dem pH-Wert und der Temperatur der Lösung [54].

In homogenen Medien, wo die Lumineszenzabklingkurve des Ruthenium-Farbstoffs einfach exponentiell abfällt, geht in die STERN-VOLMER-Gleichung nur das dynamische Quenching ein:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2.35)$$

Die Lebensdauern τ_0 und τ und daher die Stern-Volmer-Konstante K_{SV} sind abhängig von der Temperatur und dem pH-Wert. Dementsprechend verändern sich in Abhängigkeit dieser Werte die Stern-Volmer-Graphen. Ist die Abhängigkeit der Lebensdauer von der Sauerstoffkonzentration, von der Temperatur und vom pH-Wert für einen Sensor bekannt, so ist die Messung der molekularen Sauerstoffkonzentration möglich.

Sensorschichten

Für viele Anwendungen ist es erforderlich, den Sensorfarbstoff in planare Schichten oder Folien einzubetten. Der einfach exponentielle Verlauf der Abklingkurve gilt für diese heterogenen Systeme allerdings nicht mehr [16]. In diesen Fällen ist das Abklingverhalten meist multi-exponentiell durch das Vorhandensein von verschiedenen Farbstoffformen oder -zuständen mit unterschiedlichen Lebensdauern und Quenchingraten [16]. Diese Schichten sind für die Sauerstoffkonzentrationsbestimmung geeignet, wenn sie gasdurchlässig, aber Lösungsmittel undurchlässig sind. Lösungsmittelpenetration verändert die Probe und macht Kalibrierungen abhängig von der Umgebung des Sensors. Ist dies nicht gegeben, so ist auch in diesem Fall bei bekannten Abhängigkeiten von der Temperatur, dem pH-Wert und der Sauerstoffkonzentration die Bestimmung der molekularen Sauerstoffkonzentration möglich.

Systeme, die auf der optischen Messung der Sauerstoffkonzentration beruhen, sind unter anderem ein Messplatz zur Untersuchung von Mikrotiterplatten [55, 56], eine Sauerstoff-Mikro-Optode [50], ein modulares Lebensdauerbildgebungssystem (MOLLI) [57] und ein Lebensdauer-basiertes Fluoreszenzmikroskop [58]. Einige kommerziell erhältliche Optoden sind der FOXY-Sensor (Fibre Optic Oxygen Sensor, Firma Ocean Optics) oder der punktuell messende Fibox-Sensor (Firma PreSens), der punktuell den Sauerstoffgehalt in Gasen und in Flüssigkeiten messen kann.

2.4 Photodynamische Therapie

Die photodynamische Therapie, kurz PDT, ist ein minimal invasives Verfahren zur Behandlung von oberflächennahen Gewebedysplasien (Präkanzerosen) und Tumoren, wie z. B. Hautkrebs im Hals- und Kopfbereich [59], Tumoren des Gastrointestinaltraktes im Frühstadium [60] und Behandlungen des Barrett-Ösophagus [61]. Farbstoffe, die erst durch die Bestrahlung mit Licht eine phototoxische Wirkung besitzen, sind die Grundlage der PDT. Diese Farbstoffe, sogenannte Photosensibilisatoren oder 'Photosensitizer', werden dem Patienten systemisch oder topisch verabreicht und lagern sich innerhalb einer Sensibilisator-spezifischen Retentionszeit selektiv im erkrankten Gewebe an. Nach der Anlagerungszeit wird das betroffene Gewebeareal mit Licht bestrahlt, und durch photochemische Reaktionen des Farbstoffs werden phototoxische Substanzen generiert, die mit dem erkrankten Gewebe reagieren. Bei den am häufigsten verwendeten Photosensibilisatoren ist molekularer Sauerstoff beteiligt, der entweder selbst zu einem Sauerstoffradikal wird oder durch Folgereaktionen andere Radikale bildet. Diese Radikale bewirken durch Reaktionen mit Bestandteilen der umliegenden Zellen die selektive Tumorerstörung. Je nach Energieübertragungsprozess vom Sensibilisator zum Radikal unterscheiden sie sich und sind in zwei Sensibilisator-Typen eingeteilt, die im Kap. 2.4.1 erläutert sind. Das Prinzip und die Wirkung der PDT im Gewebe

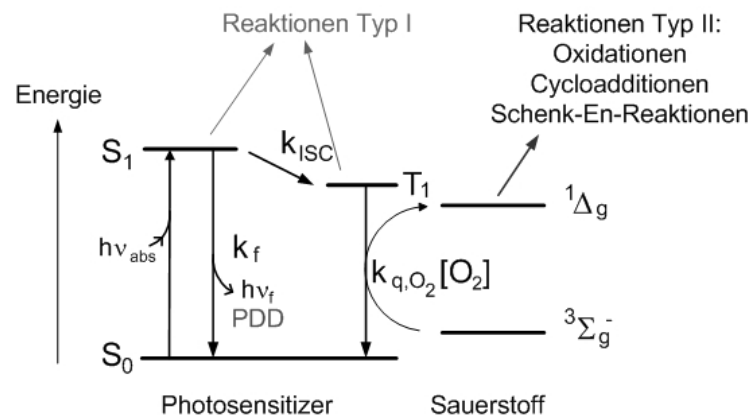


Abbildung 2.8: JABLONSKI-Diagramm für die Aktivierungs- und Deaktivierungsprozesse von Photosensibilisatoren für die PDD und PDT: Typ I und Typ II Reaktionen.

sind im Kap. 2.4.2 dargestellt.

Obwohl die phototoxische Wirkung von Farbstoffen seit 1900 durch Untersuchungen von Oscar Raab bekannt ist und die PDT auch bereits seit 1960 in der Klinik angewandt wird [62], sind viele Fragen zur Dosimetrie von Farbstoff, Licht und Sauerstoff ungeklärt und eine Möglichkeit zur Kontrolle oder Beobachtung des Therapieverlaufs wird gefordert [62, 63, 64]. Die Probleme der Dosimetrie, bisherige Methoden und ein Ansatz zur Beobachtung der Therapie sind in Kap. 2.4.3 dargelegt.

2.4.1 Mechanismen der Photosensibilisierung

Die photodynamische Therapie basiert auf zwei Typen von Photosensibilisatoren. Diese unterscheiden sich in ihren photochemischen Reaktionen und Reaktionsprodukten und damit in den Wirkungsmechanismen der Therapie. In Abb. 2.8 sind für die Typen I und II die Aktivierungs- und Deaktivierungsprozesse der Photosensibilisatoren in einem JABLONSKI-Diagramm veranschaulicht.

Die Photosensibilisatoren P werden durch Absorption des Anregungslichts in den ersten oder auch höher angeregten Singulettzustand angeregt. Sie relaxieren innerhalb von Piko-sekunden in den ersten angeregten Singulettzustand S_1 . Die Deaktivierung des S_1 -Zustands erfolgt strahlend in Form von Fluoreszenz oder strahlungslos (siehe auch Kap. 2.1). Die Fluoreszenz wird häufig für die photodynamische Diagnostik (PDD) genutzt. Dabei wird der verabreichte Sensibilisator durch Licht mit geringerer Intensität angeregt und die entstehende Fluoreszenz beobachtet. Dies dient der genauen Lokalisation von Tumoren und wird meist vor und nach einer PDT durchgeführt [65, 66].

Eine weitere Möglichkeit der Deaktivierung ist der verbotene Intersystem Crossing-Übergang in den ersten angeregten Triplettzustand T_1 , bei dem sich die Multiplizität ändert. Obwohl der Übergang spinverboten ist, ist die Triplettquantenausbeute für viele Sensibi-

lisatoren sehr hoch (>75%) [67]. Die Deaktivierung des Triplettzustands zurück in den S_0 -Grundzustand ist wiederum spinverboten und hat deshalb eine längere Lebensdauer im Bereich von μs bis hin zu s [7]. Dieser Übergang kann strahlend in Form von Phosphoreszenz, strahlungslos mit interner Konversion oder über Quenchingprozesse erfolgen. Wegen der deutlich höheren Lebensdauer ist der Triplettzustand ein geeigneter Ausgangspunkt für photochemische Reaktionen.

Typ I - Reaktionen

Reaktionen vom Typ I sind Elektronentransferprozesse des angeregten Sensibilisators, bei denen Radikale des Sensibilisators selbst oder Substratmolekülradikale gebildet werden [43, 44]. Der Ausgangszustand der Transferprozesse ist dabei in der Literatur nicht einheitlich beschrieben. Einige Autoren gehen ausschließlich von Reaktionen vom T_1 -Zustand aus, wie z. B. [44] und [67], wohingegen andere auch Transferprozesse vom S_1 -Zustand zum Typ I zählen [3], (Zitate in [43]).

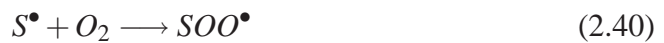
Bei Reaktionen vom Typ I wird zwischen einem Photosensibilisator P und einem Substratmolekül S entweder ein Elektron



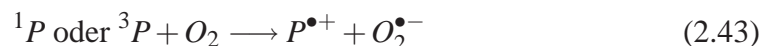
oder ein Wasserstoffatom übertragen.



Die entstehenden Radikale können im Beisein von Sauerstoff Peroxidradikale und Hydroperoxide bilden.



Über Radikalreaktionen oder über direkten Elektronentransfer kann aber auch das Superoxidanionradikal gebildet werden.



Dabei ist die Bildung des Superoxidanionradikals nach Gl. 2.43 mit dem Triplettensensibilisator relativ selten und die Reaktion mit dem Singulettensensibilisator führt häufig zur schnellen Rekombination der beiden Reaktionspartner [43]. Die Quantenausbeute von $O_2^{\bullet-}$ ist dementsprechend gering. Bei Reaktionen des Superoxidanionradikals in biologischen

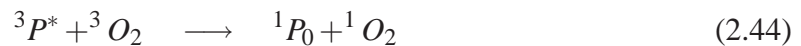
Medien können Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder das Hydroxylradikal ($\bullet OH$) gebildet werden [41].

Typ I-Reaktionen, die ohne Sauerstoff ablaufen, werden häufig auch als Typ III-Reaktionen bezeichnen. Da die Effektivität bei diesem PDT-Mechanismus jedoch von vielen Autoren angezweifelt wird und diese Reaktionen für die vorliegende Arbeit nicht relevant sind, wird auf die Beschreibung hier verzichtet und auf weiterführende Literatur verwiesen (siehe z. B. [41], [62] und Zitate in [43]).

Alle Typ I-Reaktionen haben gemeinsam, dass sie eine geringe Ausbeute haben, nur im Beisein von Substratmolekülen ablaufen und die Energie durch Elektronen- oder Wasserstoffatomtransferprozesse übertragen wird. Der Sensibilisator ist daher bereits nach einer Reaktion verbraucht und steht für weitere nicht mehr zur Verfügung. Bei den meisten Photosensibilisatoren dominieren daher Typ II-Reaktionen, wobei jedoch angenommen wird, dass stets beide Reaktionen stattfinden. Es wird vermutet, dass Typ I-Reaktionen erst dann überwiegen, wenn entweder der Sensibilisator hoch konzentriert ist oder hypoxische Bedingungen herrschen [3].

Typ II - Reaktionen

Der angeregte Photosensibilisator ${}^3P^*$ kann auch durch Energietransfer mit molekularem Sauerstoff 3O_2 reagieren. Bei der Reaktion wird die Anregungsenergie durch Energietransfer an den Sauerstoff abgegeben und dieser in radikalen Singulett-Sauerstoff 1O_2 umgewandelt:



Der Energietransfer vom Sensibilisator zum Sauerstoff findet über dynamische Quenchingprozesse statt und hängt deshalb von der Sauerstoffkonzentration im Gewebe ab. Nach der Reaktion liegt der Sensibilisator wieder im Grundzustand vor und kann für weitere Singulett-Sauerstoffgenerierungen genutzt werden. Der Sensibilisator hat in der Reaktion daher die Funktion eines Katalysators. Reaktionen des Photosensibilisators sind auch mit anderen Molekülen möglich, die ebenfalls im Grundzustand Triplettscharakter besitzen, wie z. B. Stickoxid und Vitamin A [3]. Die dominierende Reaktion ist allerdings der Energietransfer zum Sauerstoff. Der entstandene Singulett-Sauerstoff ist hoch reaktiv und reagiert durch Oxidationen, Cycloadditionen oder SCHENK-En-Reaktionen mit Gewebestandteilen, wie im nächsten Abschnitt erläutert wird.

2.4.2 Prinzip und Wirkung der Photodynamischen Therapie

Die photodynamische Therapie beruht auf dem Zusammenwirken von drei Kernelementen: erstens dem Photosensibilisator, zweitens dem Licht, mit dem das betroffene Areal bestrahlt

wird, und drittens dem molekularen Sauerstoff, der die Bildung hochreaktiver Radikale vermittelt, die die Zellen zerstören. Nur bei gleichzeitigem Vorhandensein dieser drei Elemente kann die effektive Tumorzerstörung bei gleichzeitiger Schonung des umliegenden gesunden Gewebes erzielt werden.

Photosensibilisatoren *in vivo*

Bei der PDT wird der Photosensibilisator entweder systemisch oder topisch verabreicht. Die Menge richtet sich dabei nach dem Sensibilisator, den Eigenschaften des Zielgewebes und dem Körpergewicht des Patienten. Nach Verabreichung lagert sich der Sensibilisator innerhalb einer für den Sensibilisator spezifischen Retentionszeit selektiv im erkrankten Gewebe an. Die Anreicherung erfolgt je nach Sensibilisator aktiv, z. B. wegen besonderer Membranaffinität oder passiv über die verminderte 'Clearance' des Substrats [68]. Es hat sich gezeigt, dass die Amphilizität von Photosensibilisatoren die Anlagerung an die Ziele in den Tumorzellen beeinflusst. Amphiphile Sensibilisatoren haben sich als photodynamisch aktiver gezeigt, da sie sich in hydrophob-hydrophilen Bereichen der Membran und an Proteinoberflächen anlagern [3].

Nach Ablauf der Wartezeit ist die Konzentration des Sensibilisators zwischen erkranktem und gesundem Gewebe maximal. Der Konzentrationsunterschied wird mit dem Akkumulationsindex A_P oder mit der spezifischen Aufnahmerate SUR (specific uptake ratio) angegeben:

$$A_P = \frac{\text{Konzentration im erkrankten Gewebe}}{\text{Konzentration im gesunden Gewebe}} \quad (2.46)$$

$$SUR = \frac{\text{Photosensibilisatorkonzentration pro g Gewebe}}{\text{Photosensibilisator dosis pro kg Körpergewicht}} \quad (2.47)$$

Die spezifische Aufnahmerate SUR hat bei einer gleichmäßigen Konzentrationsverteilung im Tumor und im umliegenden Gewebe einen Wert von 1, für tumorspezifische Anreicherung ein Wert größer als 1 und für eine geringe Aufnahme im Tumor ein Wert kleiner 1. Je höher also der Akkumulationsindex oder die Aufnahmerate ist, desto mehr wird das umliegende gesunde Gewebe während der Therapie geschont, da ohne Farbstoff auch kein Singulett-Sauerstoff generiert wird. Die Sensibilisatorkonzentration und damit der Akkumulationsindex und die Aufnahmerate richten sich nach der spezifischen Pharmakokinetik des Sensibilisators. Diese ist so komplex, dass sie in aufwändigen Studien für jede Gewebeart und jeden Sensibilisator einzeln untersucht werden muss, um die optimale Dosierung und Retentionszeit zu ermitteln [69]. Die Konzentration kann innerhalb des Gewebes und für jeden individuellen Patienten sehr stark schwanken. So wurden Konzentrationsunterschiede von bis zu 75% bei Mäusen mit der gleichen Tumorart und Größe [70], bzw. Schwankungen um den Faktor 3 bei verschiedenen Patienten festgestellt [71]. Die aktive Sensibilisatorkonzentration kann sich auch während der PDT durch Clearanceeffekte, Aggregationen oder

auch durch Photodegradation verändern [3]. Nicht alle Sensibilisatormoleküle tragen dann zur Singulett-Sauerstoffgenerierung bei. Die Farbstoffkonzentration ist im Gewebe punktuell messbar durch die Entnahme von Biopsien oder mit punktuellen Sensoren sowie durch die Detektion der Fluoreszenz des Sensibilisators [5, 72, 73].

Bestrahlungslicht

Die Wellenlänge des Bestrahlungslichts richtet sich nach der Absorptionscharakteristik des Sensibilisators. Bei vielen Sensibilisatoren, wie z. B. bei Protoporphyrin IX (PPIX) liegt das Absorptionmaximum im sichtbaren Spektralbereich bei ca. 400nm . In diesem Wellenlängenbereich ist die Eindringtiefe in das Gewebe durch die höhere Absorption sehr gering, so dass eine größere Umwandlung der Energie in Wärme erfolgt. Aus diesem Grund wird für die Bestrahlung ein Kompromiss zwischen langwelligerer Anregungswellenlänge und damit größerer Eindringtiefe ins Gewebe und geringerer Wärmewirkung und der mit steigender Wellenlänge geringeren Absorption des Sensibilisators eingegangen. Bei PPIX liegt der am weitesten im roten Spektralbereich liegende Absorptionspeak bei 630nm , was einer Eindringtiefe von $2 - 3\text{mm}$ entspricht [44].

Auch im nahinfraroten Spektralbereich ist die Eindringtiefe auf einige mm beschränkt. Die Anwendungsbereiche der PDT sind deshalb oberflächliche Dysplasien und Tumore, die aber auch an inneren Oberflächen wie beispielsweise in der Harnblase oder im Ösophagus liegen können [5]. Tumore mit geringen Durchmessern, die nicht an Oberflächen liegen, können auch mit interstitieller PDT behandelt werden. Die Eindringtiefe ins Gewebe muss aber auch dann beachtet werden, damit das Tumorumfang vollständig behandelt wird. Dies kann durch die Verwendung mehrerer Lichtquellen im Gewebe erzielt werden [74, 75].

Für die Bestrahlung bei der PDT können Laser oder LEDs verwendet werden. Wichtig ist, dass bei der Bestrahlung die eingebrachte Leistung zu keinen thermischen Effekten im Gewebe führt, da sonst auch das gesunde Gewebe geschädigt wird. Nach Dysart et. al. [76] ergibt sich die Rate der vom Sensibilisator absorbierten Photonen nach folgendem Zusammenhang:

$$I_{abs(x)} = [{}^1P_0] \frac{\sigma_{1P_0} \varphi_x}{h\nu} \quad (2.48)$$

Dabei ist $[{}^1P_0]$ die Konzentration des Sensibilisators im Grundzustand, σ_{1P_0} ist der Absorptionseffizienzwirkungsquerschnitt des Sensibilisators im Grundzustand, φ_x die Flussrate des Lichts am Ort x und $h\nu$ die Energie des Lichts. Wird für die Flussrate φ_x die tatsächlich eingebrachte Gesamtflussrate φ_i eingesetzt, so kann, wenn die Sensibilisatorkonzentration im gesamten Behandlungsareal bekannt ist, die Gesamtrate der absorbierten Photonen I_{abs} für die PDT berechnet werden. Aus dieser könnte dann die für die PDT benötigte Energie berechnet werden. Tatsächlich aber ist weder die Sensibilisatorkonzentration, noch die Flussrate *in vivo* an allen Stellen bekannt, und die vom Sensibilisator absorbierte Lichtdosis muss abgeschätzt

werden.

Die maximale Lichtflussrate ist nach oben hin begrenzt durch das Eintreten thermischer Effekte. Jedoch gibt es für die Bestrahlung auch eine untere Grenze. Es hat sich gezeigt, dass die Zellen bei geringer Flussrate des Lichts in der Lage sind, sich gegen die Zerstörung zu wehren oder diese zu reparieren [77, 78]. Dies erhöht die Überlebenschance von Tumorzellen und kann zu Rezidiven führen. Weiter zeigte sich, dass, obwohl die Eindringtiefe in Gewebe, definiert als die Tiefe, bei der die eingestrahelte Leistungsdichte auf $\sim 37\%$ abgefallen ist, nur ca. $1 - 3\text{ mm}$ ist, die effektive Behandlungstiefe bis zu 6 mm betrug. Daraus lässt sich schließen, dass schon 10% des eintretenden Lichts zu einem photodynamischen Effekt führen [3]. Da der Akkumulationsindex bzw. die spezifische Aufnahme rate vieler Sensibilisatoren meist nicht ausreichend hoch ist, kann die Schonung des umliegenden Gewebes somit nicht gewährleistet werden. Diese muss dann durch eine selektive Bestrahlung des Gewebes erzielt werden, da ohne Lichtanregung auch kein Singulett-Sauerstoff generiert wird.

Sauerstoffkonzentration *in vivo*

Der Mechanismus der PDT beruht auf der Energieübertragung vom angeregten Sensibilisator zum molekularen Sauerstoff. Deshalb sind die molekulare Sauerstoffkonzentration und die Sauerstoffversorgung des Gewebes von großer Bedeutung für den Therapieerfolg. Diese sind abhängig vom Gewebetyp, der Erkrankung, der Durchblutung und dem Sauerstoffverbrauch. Die Sauerstoffkonzentration ist im Gewebe vor der Behandlung nicht bekannt, sie variiert innerhalb des Gewebes und verändert sich während der Therapie.

Die in Studien gemessenen Werte der molekularen Sauerstoffkonzentration *in vivo* betragen vor, während und nach der PDT zwischen $3 - 55\text{ mmHg}$ ($c \approx 5 - 100\ \mu\text{mol/l}$) [4, 64, 79]. Es zeigte sich, dass die durch die PDT bedingten Sauerstoffkonzentrationsänderungen sehr heterogen sind und Unterschiede der Sauerstoffkonzentration bereits bei kleinen Distanzen gemessen werden. Punktuelle Messungen geben daher nicht immer die Mikrodynamik des Gewebes wieder [4]. In Regionen mit Konzentrationen kleiner als 8 mmHg ($c \approx 12\ \mu\text{mol/l}$) zeigte sich, dass diese während der PDT schnell an Sauerstoff verarmten, wohingegen Bereiche mit höheren Werten nahezu konstant blieben [4]. Der Sauerstoffverbrauch ist während der PDT abhängig von der Lichtflussrate und zeigt einen langsameren Verlauf bei intermittierender Beleuchtung, die zu besseren Therapieergebnissen führt [3, 80]. In anderen Studien wurde hingegen auch gezeigt, dass sich die Sauerstoffkonzentration in hypoxischen Bereichen des Gewebes durch das Einatmen von sauerstoffangereicherten Gasen steigern ließ [62, 81]. Dies würde eine deutliche Verbesserung der PDT bedeuten, da sich hypoxische Zellen, bei denen die Sauerstoffkonzentration unter 5% Oxygenierung liegt, resistent auf die PDT gezeigt haben [3].

Da die biologische Wirkung der PDT durch den aus molekularem Sauerstoff generierten Singulett-Sauerstoff erzielt wird, kann die PDT-Dosis als die Gesamtmenge des während der Behandlungsdauer T generierten Singulett-Sauerstoffs definiert werden. Die Erzeugungsrate von $[^1O_2]$ ist dabei zu jedem Zeitpunkt t gleich der Verlustrate $[^1O_2]/\tau_\Delta$, wobei τ_Δ die Singulett-Sauerstofflebensdauer ist. Die PDT-Dosis ist daher [82]:

$$Dosis = \frac{1}{\tau_\Delta} \int_0^T [^1O_2](t) dt \quad (2.49)$$

Die momentane Singulett-Sauerstoffkonzentration $[^1O_2]$ setzt sich aus der Rate der vom Sensibilisator absorbierten Photonen I_{abs} , aus der Triplettquantenausbeute Φ_t des Sensibilisators, aus der molekularen Sauerstoffkonzentration $[^3O_2]$ und aus der Anzahl der Energieübertragungsprozesse S_Δ zwischen dem Sensibilisator und molekularem Sauerstoff zusammen [83].

$$[^1O_2] = S_\Delta \Phi_t I_{abs} \left(\frac{[^3O_2]}{k_p/k_{q,O_2} + [^3O_2]} \right) \left(\frac{1}{k_{p,O_2} + k_{q,A}[A]} \right) \quad (2.50)$$

Reaktionen mit biologischen Substanzen $[A]$, mit denen radikaler Sauerstoff reagieren kann, bewirken dabei den PDT-Effekt. Die Übergangsraten k_i sind im Kap. 2.3 in Abb. 2.6 gezeigt. Für die PDT, bei der die Anzahl S_Δ und die Übergangsquantenausbeuten und -raten Φ_t , k_p , k_{q,O_2} , k_{p,O_2} und $k_{q,A}[A]$ konstant sind, kann die Singulett-Sauerstoffkonzentration durch Einsetzen der absorbierten Energie I_{abs} aus Gl. 2.48 in Abhängigkeit der Flussrate $\varphi_i(t)$, der Sensibilisatorkonzentration $[^1P_0](t)$ und der molekularen Sauerstoffkonzentration $[^3O_2](t)$ ausgedrückt werden [76]:

$$[^1O_2](t) = \frac{C}{k_{pO}} \varphi_i(t) [^1P_0](t) \frac{[^3O_2](t)}{k_p/k_{q,O_2} + [^3O_2](t)} \quad (2.51)$$

Dabei ist k_{pO} die Rate für Reaktionen zwischen dem Sensibilisator im Grundzustand und radikalem Sauerstoff 1O_2 , die die Photodegradation des Sensibilisators bewirken [83, 84]. Die Konstante C ist bestimmt durch:

$$C = S_\Delta \Phi_t \frac{\sigma_{1P_0}}{h\nu} \left(\frac{1}{k_{p,O_2}/k_{pO} + k_{q,A}[A]/k_{pO}} \right) \quad (2.52)$$

Durch Einsetzen der Singulett-Sauerstoffkonzentration ergibt sich für die Dosis der PDT folgender Zusammenhang:

$$Dosis = \frac{C}{\tau_\Delta k_{pO}} \int_0^T \varphi_i(t) [^1P_0](t) \frac{[^3O_2](t)}{k_p/k_{q,O_2} + [^3O_2](t)} dt \quad (2.53)$$

Diese PDT-Dosis ist abhängig von der Lichtflussrate, der Sensibilisatorkonzentration und der molekularen Sauerstoffkonzentration. Diese drei Parameter variieren je nach Patient, Gewebetyp, innerhalb des Gewebes und verändern sich während der Therapie.

Wirkung der PDT

Die biologische Wirkung der PDT beruht auf der Generierung von Sauerstoff- oder Substratradikalen, die die umliegenden Zellen durch zytotoxische Reaktionen zerstören. Das durch Typ II-Reaktionen entstehende Sauerstoffradikal 1O_2 ist sehr reaktiv und hat eine Lebensdauer von 2 – 100 μs . Auf Grund dieser schnellen Reaktionszeit, ist die oxidative Wirkung des Sauerstoffs räumlich sehr stark auf den Entstehungsort begrenzt. Der Wirkungsbereich entspricht dabei einer Kugel mit einem Durchmesser von 10 nm mit dem Entstehungsort als Zentrum, bzw. einer Diffusionslänge von 20 nm [77]. Dies entspricht etwa der Dicke einer Zellmembran [3]. Das Sauerstoffradikal reagiert im Gewebe mit Substanzen, die empfänglich sind für Oxidation, Cycloadditionen und SCHENK-En-Reaktionen [45]. Diese Substanzen sind z. B. Lipide, Proteine, Cholesterin, sowie Seitengruppen von Aminosäuren (Tryptophan, Histidin, Methionin) [44]. Diese Gewebebestandteile treten häufig in der Zellmembran auf, wo sich auch viele Photosensibilisatoren anlagern. Diese besitzen häufig einen amphiphilen Charakter und lagern sich daher in amphiphilen Bereichen der Zellen wie der Zellmembran oder an Oberflächen von Proteinen an.

Die Wirkung der Sensibilisatoren wird auch nach der Zeit ihrer Wirkung unterschieden. So gibt es kurzzeitige wirkende Sensibilisatoren, deren Wirkung zwischen 2 – 24 h stattfindet, intermediär wirkende mit einer Zeitkonstante von 24 – 72 h und langfristig wirkende mit einer Zeitkonstante von 72 – 288 h. Beispiele für erstere sind die Pheophorbide, für intermediär wirkende Aluminium-Phthalocyanin und für letztgenannte Gruppe Zink-Phthalocyanin. Dieser Sensibilisator lagert sich nicht an der Zellmembran an, sondern wird nur am Golgi-Apparat und an den Mitochondrien gefunden [85]. Einige Sensibilisatoren wie beispielweise Photofrin lagern sich dagegen sowohl an den Mitochondrien als auch an der Plasmamembran, am endoplasmatischem Retikulum und dem Golgi-Apparat an [77].

Die Tumorerstörung der PDT resultiert aus drei individuellen Prozessen: erstens der direkten Tumorzellzerstörung, zweitens der Schädigung der Gefäßstruktur und drittens einer nicht spezifischen Immunreaktion [77]. Obwohl alle drei Prozesse zum Effekt der PDT beitragen, ist die Rolle des einzelnen schwer zu beziffern. Durch Veränderung der Lichtflussrate und des Bestrahlungszeitpunkts nach Sensibilisatorgabe, sowie durch Kombination von diesen kann der Einfluss der Prozesse verändert werden. Unter optimalen PDT-Bedingungen, d. h. mit ausreichender Sensibilisatorkonzentration und Licht, ergeben Experimente, dass Tumore durch Nekrose zerstört werden. Es wird vermutet, dass Sensibilisatoren, die sich am Mitochondrium anlagern, vermehrt Apoptose induzieren, während jene, die sowohl an der Plasmamembran, als auch an den Mitochondrien anlagern, Nekrose verursachen [77]. Tatsächlich können die verschiedenen Zelltötungsmechanismen *in vitro* sehr gut beobachtet werden. *In vivo* ist der Sachverhalt aber weit komplexer und der Effekt wird vermutlich aus einer Kombination von Apoptose und Nekrose bewirkt. Die beobachteten Wirkungen in den

verschiedenen Gewebearten und für die verschiedene Sensibilisatoren sind sehr unterschiedlich und sind an anderer Stelle detailliert beschrieben [3, 77, 86, 87].

2.4.3 Dosimetrie der Photodynamischen Therapie

Um eine gezielte und schonende photodynamische Therapie durchzuführen, müssen die drei Komponenten Farbstoff, Licht und Sauerstoff an den Patienten und dessen Erkrankung angepasst werden. Dafür müssen die Sensibilisatorkonzentration, der Lichtfluss und die Sauerstoffkonzentration zu jedem Zeitpunkt und an jedem Ort im Behandlungsvolumen bekannt sein. Da die Farbstoffkonzentration, der Lichtfluss und die Sauerstoffkonzentration nicht an jedem Ort *in vivo* gemessen werden können, ist eine individuelle Dosimetrie und Kontrolle der Parameter zur Zeit nur eingeschränkt möglich. Es gibt jedoch Ansätze für die Dosimetrie und Kontrolle der PDT, von denen hier einige genannt werden.

Die am häufigsten verwendete Methode zur Bestimmung der Sensibilisatorkonzentration ist die Entnahme einer Biopsie mit chemischer Extraktion des Farbstoffs [5]. Diese Methode ist jedoch invasiv, das erkrankte Gewebe muss hierfür punktiert werden, und die Messung liefert nur punktuelle Ergebnisse. Es gibt daher Versuche, durch optische Methoden die Konzentration *in vivo* nicht invasiv zu bestimmen. Aus der Messung der Fluoreszenzintensität kann bei bekannter Fluoreszenzquantenausbeute die Konzentration berechnet werden. Das Problem dieser Messmethode besteht in der Referenzierung der Intensitätswerte. Die Intensität wird durch die optischen Parameter verändert und diese schwanken sehr stark von Patient zu Patient und verändern sich zudem während der Therapie [88]. Weiter ist die Intensität abhängig von der Aggregation des Sensibilisators und von Clearanceeffekten [3]. *In situ* wurden Schwankungen der Fluoreszenzintensität um den Faktor 10 gemessen [71] und festgestellt, dass die gemessenen *in vivo* Werte von denen der *ex vivo* Messungen abweichen können [70]. Da die Eindringtiefe und daher auch die Tiefe aus der die Fluoreszenz noch gemessen werden kann zudem begrenzt sind, ist die Farbstoffverteilung in der Tiefe und in ihrer Ausdehnung nicht erkennbar [69].

Eine weitere Messmethode ist die Fluoreszenzintensitätsabnahme während der Therapie. Von dieser wird angenommen, dass sie auf dem Photobleaching des Farbstoffs beruht, welches durch den während der PDT generierten Singulett-Sauerstoff verursacht wird [82]. Die Abnahme ist daher ein Indikator für die applizierte Dosis, zeigte aber bisher nicht für alle Messungen eine gute Übereinstimmung [76]. Die quantitative Messung der Sensibilisatorkonzentration *in vivo* zeigt sich als komplex und ist bisher nicht erfolgreich gelöst. Es wird daher ein Messsystem für die Sensibilisatorkonzentration gefordert und eine individuelle Anpassung der Sensibilisator- und Lichtdosis vorgeschlagen [70, 88].

Die Lichtausbreitung im Gewebe ist abhängig von den optischen Parametern und kann mit Hilfe von Monte-Carlo-Simulationen berechnet werden [89]. Diese Simulationen dauern

jedoch einerseits zu lange für die Anwendung in der Klinik und beruhen andererseits auf den vor der PDT gemessenen optischen Parametern. Diese variieren jedoch innerhalb eines Gewebetyps eines Patienten schon bis zu einem Faktor 3 und verändern damit die Eindringtiefe und den Lichtfluss im Gewebe [90]. Zusätzlich verändern sie sich während der Therapie, z. B. durch Blutungen oder durch den Sauerstoffverbrauch [91]. Da also der Lichtfluss nicht im voraus bestimmt werden kann und auch *in vivo* nur punktuell beispielsweise mit optischen Fasern [90, 91] messbar ist, wird ein *in situ* Lichtdosismonitor gefordert [63, 91]. Dies ist notwendig, um die Effekte der PDT besser quantifizieren zu können [62].

Die molekulare Sauerstoffkonzentration bestimmt die Effizienz der PDT und ist daher Ziel vieler invasiver und nicht invasiver Ansätze für die Dosimetrie und Kontrolle der Therapie. Die am häufigsten angewandte Messmethode der Sauerstoffkonzentration ist die invasive punktuelle Messung mit sauerstoffsensitiven Nadelelektroden (z. B. Eppendorf Histogramm) oder mit Lebensdauermeßsonden (z. B. OxyLite) [6]. Die Messmethode mit Hilfe von Nadelelektroden hat einige Nachteile, wie z. B. die Punktion des Tumors und damit das Risiko der Gewebeerstörung und der Metastasenbildung. Weiter können Werte kleiner als 5 mmHg nicht akkurat gemessen werden, da durch die Messung selbst Sauerstoff verbraucht wird und sich daher die Sauerstoffkonzentration in der Umgebung der Nadel verändern kann. Zusätzlich sind die Elektroden für wiederholte Messungen nicht geeignet. Unklar ist auch, ob die Messungen durch Druck und durch die Zerstörung des Gewebes durch die Nadel selbst verfälscht werden. Bei den Lebensdauermeßsonden beruht die Methode auf der Messung der Lebensdauer von Rutheniumkomplexen, die sich in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration verändert. Diese Methode ist gerade bei geringen Sauerstoffkonzentrationen sehr genau und ist für wiederholte Messungen geeignet, die Nachteile der Invasivität und der punktuellen Messung bestehen hier aber ebenso. Beide punktuellen Sonden werden zwar heute in Studien verwendet, können aber wegen der hohen örtlichen Variation der Sauerstoffkonzentration innerhalb des Gewebes nicht als Monitoringsystem dienen.

Eine Methode, die sowohl invasiv als auch nicht invasiv für punktuelle Messungen genutzt werden kann, ist die NIR-Spektroskopie. Aus dem reflektierten und gestreuten Licht, das mittels einer Faser in das Gewebe eingestrahlt wird, wird der Anteil von oxygeniertem zu deoxygeniertem Hämoglobin gemessen und daraus die Sauerstoffsättigung des Bluts StO_2 berechnet [92, 93]. Diese Methode, auch optische Reflexionsspektrophotometrie genannt, gibt jedoch nur die Sauerstoffsättigung des Bluts und nicht die für die PDT relevante Sauerstoffkonzentration des Gewebes an. Sie kann jedoch für die Untersuchung der Wirkung der PDT als Referenz zur Sauerstoffkonzentrationsmessung genutzt werden, um z. B. die Durchblutung zu beobachten [64].

Zwei apparativ und finanziell sehr aufwändige Methoden sind die EPR-Oximetrie und die NMR-Spektroskopie, bei denen sauerstoffsensitive Marker für den Nachweis verwendet

werden. Die Nachteile der beiden Methoden liegen in der Injektion der spezifischen Moleküle und deren Eigenschaften im Gewebe sowie der begrenzten Sensitivität der Verfahren [6, 48, 53, 64, 94].

Eine nicht invasive Messmethode wäre die Lumineszenzmessung des Sauerstoffs selbst. Diese hat, wie bereits in Kap. 2.3.2 dargestellt, eine geringe Quantenausbeute und wird zusätzlich durch chemische Reaktionen mit biologischen Substanzen unterdrückt [49]. Die Sauerstofflumineszenzmessung ist daher nicht geeignet für *in vivo* Messungen.

Eine minimal invasive Messung des Sauerstoffgehalts ist mit phosphoreszierenden Nanopartikeln möglich [2]. Diese Partikel bestehen aus Markerfarbstoffen, deren Lebensdauer sauerstoffsensitiv ist und die entweder direkt oder eingebettet in eine Ummantelung verabreicht werden. Wie auch bei den EPR-Partikeln ist die Anlagerung des Farbstoffs abhängig von deren Größe und Löslichkeit im Blut, von dem Zellstoffwechsel und der Durchblutung des Gewebes. Können durch geeignete Umkapselung und Targetierung die Farbstoffe bis zum Zielgewebe gebracht werden, so könnte durch Lumineszenzlebensdauermessungen die Sauerstoffkonzentration direkt an den Zellen bestimmt werden. Die Messung der Lebensdauer erfolgt von außen und kann durch eine Referenz, z. B. einen zweiten, eingebetteten, sauerstoffunsensiblen, lumineszierenden Farbstoff, einer Tiefe zugeordnet werden. Ein Beispiel für einen solchen Marker ist der Nanosensor PEBBLE (probes encapsulated by biologically localized embedding) [95]. Wichtig ist, dass die Farbstofflebensdauer nicht durch Bindungen oder Quenchingprozesse mit biologischen Substanzen verändert wird und dass die Farbstoffe selbst nicht phototoxisch sind. Ein solcher Farbstoff kombiniert mit einem bildgebendem Messsystem für die Sauerstoffkonzentration würde eine *in vivo* Bildgebung ermöglichen. Bisher ist ein solches System aber nicht bekannt.

Die *in vivo* Messung des Sauerstoffgehalts stellt sich auf Grund der heterogenen Konzentrationen und deren Änderungen als komplex und schwierig dar. Da der Sauerstoffgehalt jedoch die Effektivität der Therapie bestimmt, wird ein Messsystem gefordert, dass schnell, nicht invasiv und repetitiv die Tumoroxygenierung misst und somit für die klinische PDT eingesetzt werden kann [64].

Ein Ansatz, der sowohl für die nicht invasive als auch für die minimal invasive zweidimensionale Messung der molekularen Sauerstoffkonzentration geeignet ist, ist die bildgebende Lebensdauerermessung von sauerstoffsensitiven Farbstoffen. Die nicht invasive Messung erfolgt mit Farbstoffen, die in Sol-Gel-Schichten oder Film-Foliensysteme eingebettet sind. Eine minimal invasive Anwendung ist mit angepassten Farbstoffen eingebettet in Nanosensoren möglich. Bei der nicht invasiven Messung werden die Schichten von außen in Kontakt zur Haut gebracht und der molekulare Sauerstoff erreicht durch Diffusion die eingebetteten Farbstoffe und verändert deren Lumineszenzlebensdauer. Der im Gewebe befindliche Sauerstoff muss hierfür durch die Haut diffundieren, wobei die Diffusionszeit abhängig

vom Sauerstoffkonzentrationsgradienten im Gewebe ist. Gelangt der Sauerstoff zum Sensor, so ist die Änderung der Lebensdauer messbar und kann in ein zweidimensionales Sauerstoffkonzentrationsbild umgerechnet werden. Da die Messung mehrfach pro Minute und über den gesamten Behandlungszeitraum erfolgen kann, könnte dieses Verfahren als Monitoringsystem für die klinische PDT genutzt werden, bei der die Nicht-Invasivität gefordert ist [64]. Die Messung kann bei gleichzeitig ablaufender PDT durchgeführt werden, erfolgt online und könnte damit der individuellen Anpassung der Lichtdosis dienen.