Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion

Das Lumineszenzlebensdauermesssystem wurde für die Messung und Darstellung der molekularen Sauerstoffkonzentration mittels zweier sauerstoffsensitiver Farbstoffe aufgebaut. Die Lumineszenzlebensdauern dieser beiden Farbstoffe, $Ru(bpy)_3^{2+}$ und die FOXY-SGS-M-Schicht, und deren Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration wurden mit dem aufgebauten System untersucht.

Der Farbstoff $Ru(bpy)_3^{2+}$ wurde für die Messungen in wässrigen Medien gelöst und liegt in flüssiger Form vor. Er soll für *in vitro* und für *in vivo* Messungen, wie auch für Untersuchungen an lebenden Zellen verwendet werden, um die Sauerstoffkonzentration direkt an und in den Zellen detektieren zu können. In den ersten Untersuchungen wurden das Abklingverhalten der Lumineszenz, sowie der Einfluss der Umgebungstemperatur und des pH-Werts auf die Stern-Volmer-Konstanten untersucht. Weiter wurden Messungen an *in vitro* Präparaten durchgeführt, um das Ansprechverhalten des Farbstoffs zu zeigen. Die mit dem Farbstoff erzielten Ergebnisse sind im ersten Teil dieses Kapitels dargestellt.

Der zweite Sensor, die FOXY-SGS-M-Schicht, ist ein fest in einer sauerstoffdurchlässigen Sol-Gel-Schicht eingebetteter Rutheniumkomplex, der aus der Schicht nicht herausdiffundieren kann. Molekularer Sauerstoff kann durch Poren bis zum Farbstoff diffundieren und dessen Lumineszenzlebensdauer verändern. Der FOXY-Sensor ist daher für den nicht invasiven Einsatz an humaner Haut gut geeignet. Das Abklingverhalten der Lumineszenz, sowie der Einfluss der Temperatur und des pH-Werts auf die Stern-Volmer-Charakteristik wurden für diesen Farbstoff ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Kap. 4.2 gezeigt. Weiter wurde das Ansprechverhalten an *in vitro* Präparaten untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Lebensdauermesssystem aufgebaut und die Lumineszenzlebensdauern der beiden Farbstoffe und deren Abhängigkeiten untersucht, um die zweidimensionale Messung der Sauerstoffkonzentration zu realisieren. Das diagnostische Potential dieser Messmethode für den Einsatz während der photodynamischen Therapie ist, beruhend auf den erzielten Ergebnissen, im Kap. 4.3 abgeleitet und diskutiert.

4.1 Charakterisierung des Systems mit dem Farbstoff $Ru(bpy)_3^{2+}$

Der Farbstoff $Ru(bpy)_3^{2+}$ wurde in Pulverform bei der Firma Sigma-Aldrich in Form von Tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-ruthenium(II) hexahydrate ($Ru(bpy)_3^{2+}Cl^{2-}$) (Reinheit $99,99\,\%$) erworben und für die Messungen in wässrigen Lösungen mit physiologisch relevanten pH-Werten gelöst. Die hergestellten Farbstofflösungen wurden für die Messungen entweder in die Durchfluss- oder in die Kalibrierküvette pipettiert und mittels des Thermostaten auf die gewünschte Temperatur erwärmt. Anschließend erfolgte die Einstellung der gewünschten Sauerstoffkonzentration und die Vermessung der Probe.

Die Untersuchung des Abklingverhaltens, die Messungen zur pH-Wert-Abhängigkeit und die ersten Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit wurden in der Durchflussküvette durchgeführt. Hierfür wurde am Gasflussmesser die gewünschte Sauerstoffkonzentration eingestellt und das Gas mittels eines perforierten Schlauchendes in die Farbstofflösung eingeleitet. Durch dieses Sprudeln des Gases in die Lösung konnte eine schnellere Angleichung des Sauerstoffpartialdrucks im Gas und in der Lösung erzielt werden. Nach 5 Minuten Sprudelzeit wurde die Küvette am Gasein- und -auslass geschlossen und die Probe vermessen. Die Sprudelzeit musste auf 5 Minuten pro eingestellter Sauerstoffkonzentration begrenzt werden, da sonst die Lösung innerhalb der Messzeit verdunstet wäre. Für die Aufnahme eines Stern-Volmer-Graphen wurden 10 Sauerstoffkonzentrationen eingestellt und sowohl die Abklingkurven vermessen, als auch die Lebensdauer nach der RLD-Methode τ_{RLD} bestimmt. Diese berechneten Lebensdauern τ_{RLD} wurden nach den Messungen mit den Lebensdauern τ_{Fit} aus den angepassten Modellkurven der Abklingkurven der Lumineszenzintensität verglichen.

Die Durchflussküvette bietet keine Möglichkeit, eine gute Durchmischung der Probe zu realisieren. Die Anzahl der Sauerstoffkonzentrationseinstellungen ist daher begrenzt, da diese direkt eingestellt werden müssen und die Farbstofflösung mit dem Gas gesättigt werden muss. Zusätzlich ist im Sauerstoffkonzentrationsbereich von $c < 100\,\mu mol/l$ die Einstellung am Gasflussmesser ungenau. Dieser Bereich ist jedoch der für die PDT relevante Sauerstoffkonzentrationsbereich. Um den Einfluss der Temperatur auf die Stern-Volmer-Charakteristik genauer untersuchen und eine Vielzahl an Sauerstoffkonzentrationen einstellen zu können, wurde daher im zweiten Schritt die Kalibrierküvette aufgebaut und die Proben mit diesem Aufbau vermessen. Die Bestimmung der Ansprechzeit erfolgte mit der Durchflussküvette, da in diesem Fall keine gute Durchmischung, sondern eine geschlossene Gasatmosphäre benötigt wird.

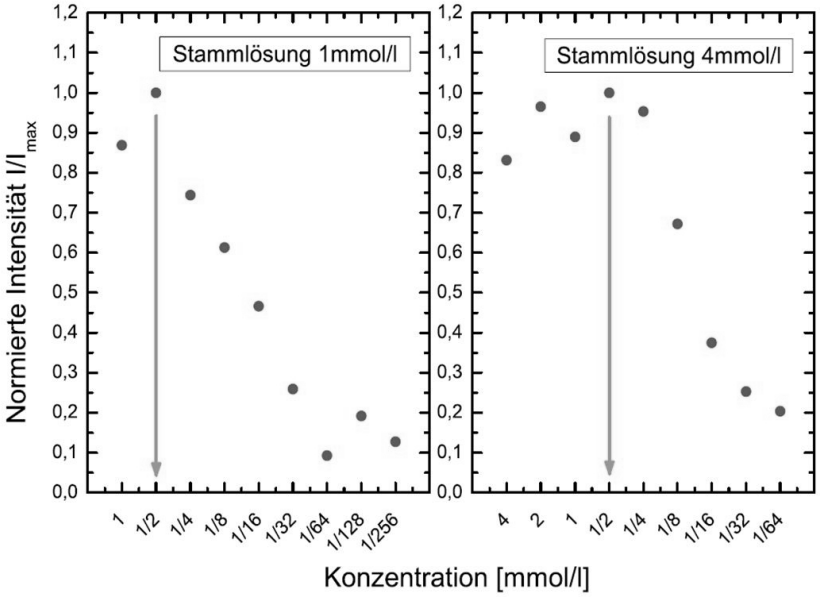


Abbildung 4.1: Einfluss der Farbstoffkonzentration von $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen auf die Phosphoreszenzintensität, gemessen durch zwei Verdünnungsreihen von zwei Stammlösungen mit den Konzentrationen $c = 1\,mmol/l$ und $c = 4\,mmol/l$.

4.1.1 Untersuchung des Abklingverhaltens

Da die Konzentration des gelösten Farbstoffs einen Einfluss auf die Phosphoreszenzintensität hat, wurde die optimale Farbstoffkonzentration in einer Voruntersuchung ermittelt. Dabei steigt die Phosphoreszenzintensität bei kleinen Farbstoffkonzentrationen linear mit der Konzentration an, bis bei einer Grenzkonzentration c_{gr} ein Intensitätsmaximum erreicht ist [109]. Lösungen mit Konzentrationen größer als diese Grenzkonzentration weisen eine geringere Intensität auf, da einerseits die Lichtintensität exponentiell mit der steigenden Absorption abnimmt, andererseits die Detektion des emittierten Lichts durch die erhöhte Absorption abnimmt und weiterhin strahlungslose Deaktivierungsprozesse zwischen den Farbstoffmolekülen und Resorptionsprozesse an Zahl zunehmen und die Phosphoreszenzaussendung unterdrücken [109]. Die optimale Konzentration der Farbstofflösung liegt daher bei der Grenzkonzentration, die in zwei Verdünnungsreihen von $Ru(bpy)_3^{2+}$-Stammlösungen mit Konzentrationen von $c = 1\,mmol/l$, bzw. $c = 4\,mmol/l$ ermittelt wurde. Diese Messungen ergaben eine maximale Phosphoreszenzintensität bei der Konzentration von $c_{gr} = 0,5\,mmol/l$, wie in Abb. 4.1 gezeigt ist. Diese Konzentration wurde für alle weiteren Messungen mit dem Farbstoff verwendet. Auf die Lebensdauer τ zeigte die Konzentration keinen Einfluss.

Ein weiterer Einfluss auf die Phosphoreszenzintensität kann sich durch bestrahlungsinduzierte Photodegradation des Farbstoffs oder durch den durch die Bestrahlung generierten Singulettsauerstoff ergeben, der durch Reaktionen mit dem Farbstoff dessen Photodegradation bewirkt. Dies würde einer Intensitätsabnahme mit zunehmender Bestrahlungszeit ent-

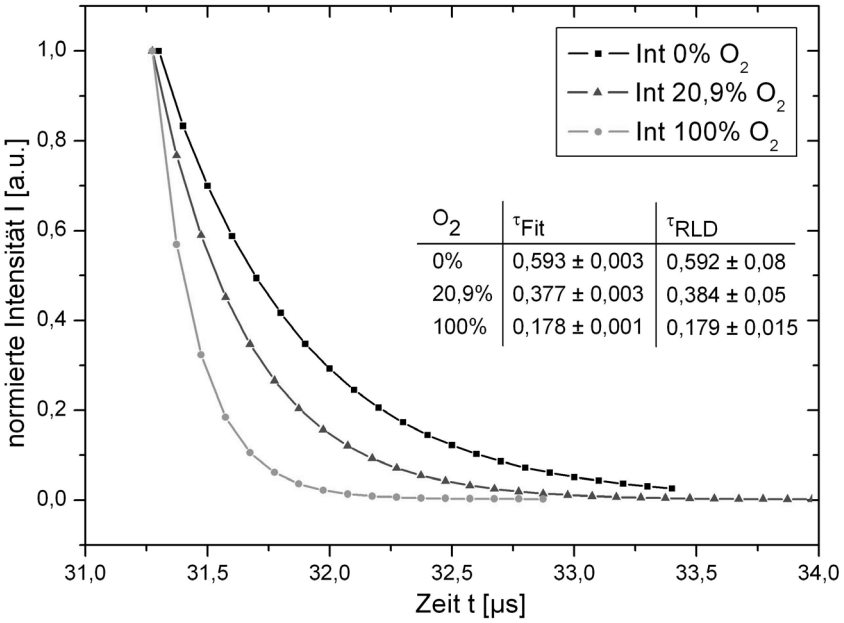


Abbildung 4.2: Darstellung der normierten Abklingkurven der Lumineszenz von $Ru(bpy)_3^{2+}$ für 100% Sauerstoffatmosphäre, Luftatmosphäre (20,9% Sauerstoff) und 100% Stickstoffatmosphäre (0% Sauerstoff). Die Lebensdauern liegen im Bereich von $\tau = 0,178 - 0,593\,\mu s$.

sprechen, so dass der Zeitpunkt der Messung Einfluss auf die Messwerte hat. Die Messung der Phosphoreszenzintensität von $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen über 8 Stunden zeigte dieses Verhalten jedoch nicht, so dass angenommen werden kann, dass keine Photodegradation in den Farbstofflösungen auftritt. Die Messung der Intensität wie auch der Lebensdauer kann daher über mehrere Stunden kontinuierlich erfolgen.

Die zweidimensionale Messung der molekularen Sauerstoffkonzentration beruht auf der Bestimmung der sauerstoffsensitiven Lebensdauer mittels der Rapid-Lifetime-Determination-Methode. Das Prinzip dieser Methode, wie in Kap. 3.1.2 dargestellt ist, beruht auf der Detektion zweier zeitlich benachbarter Detektionszeitfenster während des Abklingens einer einfach exponentiellen Lumineszenzabklingkurve. Die Kenntnis des Abklingverhaltens der verwendeten Farbstoffe ist daher für die genaue Anwendung der Methode wichtig. Bei $Ru(bpy)_3^{2+}$ ist dieses, wie in Abb. 4.2 gezeigt ist, einfach exponentiell und abhängig von der Sauerstoffkonzentration. Mit steigender molekularer Sauerstoffkonzentration wird sowohl die Phosphoreszenzintensität I wie auch die Lebensdauer τ kleiner. In Abhängigkeit der Umgebungstemperatur ist bei Abwesenheit von Quenchern die Lebensdauer $\tau_0 \sim 0,6\,\mu s$ und sinkt bei 100% Sauerstoffkonzentration auf $\tau \sim 0,18\,\mu s$. Die Dynamik der Lebensdaueränderung in dem gesamten Konzentrationsbereich beträgt daher ca. $0,42\,\mu s$. Im für die PDT relevanten Konzentrationsbereich von $0-10\%$ Luftsättigung ($c = 0-100\,\mu mol/l$) beträgt die maximale Lebensdaueränderung ca. $0,12\,\mu s$.

Die für die Verwendung der RLD-Methode wichtige Grundvoraussetzung des ein-

fach exponentiellen Abklingverhaltens ist für den Farbstoff $Ru(bpy)_3^{2+}$ gegeben. Die Inte grations zeitpunkte t_1 und t_2 sowie die Integrationszeit Δt_{Int} müssen nun an den Lebensdauerwertebereich des Farbstoffs angepasst werden, um eine korrekte Berechnung der Lebensdauer im gesamten Wertebereich zu ermöglichen. Die Wahl dieser Messparameter hat dabei einen großen Einfluss auf die Berechnung der Lebensdauer und somit auf die Genauigkeit des Messverfahrens. Sie können während der Messungen fest eingestellt oder variabel angepasst werden, wobei für die variable Anpassung Rechenzeit benötigt wird und so die Schnelligkeit des Verfahrens beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden für das aufgebaute System feste Werte ausgewählt und im System integriert.

Die Fehler der Lebensdauerberechnung, die durch die Wahl der Messparameter bedingt sind, haben zwei verschiedene Ursachen [97]. Wenn erstens für die RLD-Berechnung eine im Vergleich zur Lebensdauer lange Integrationszeit $\Delta t_{Int} \gg \tau$ und zwei weit auseinander liegende Zeitpunkte t_1 und t_2 mit $t_2 - t_1 \gg \tau$ zu Grunde gelegt werden, so entstehen bei der Berechnung kleiner Lebensdauern große Fehler. Dieser Wertebereich entspricht bei dem vorliegenden Quenchingprozess großen Sauerstoffkonzentrationen. Wenn zweitens statt dessen kurze Integrationszeiten $\Delta t_{Int} \approx \tau$ und dicht beieinander liegende Integrationszeitpunkte $t_2 - t_1 \approx \tau$ gewählt werden, so können kleine Lebensdauern genauer, grosse dagegen ungenauer berechnet werden. Weiter müssen die Integrationszeitfenster für ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) ausreichend lang gewählt werden. Zu lange Zeiten fügen der Messung jedoch keine weiteren Informationen hinzu. Aus diesem Grund muss für die optimale Auswahl der Messparameter eine Balance zwischen der Integrationszeit Δt_{Int} und der Separation der Integrationszeiten t_1 und t_2 erfolgen. Wenn die Wahl der Parameter erfolgt ist, so hat die Höhe des Rauschens oder eine Änderung dessen keinen Einfluss auf die Genauigkeit der Lebensdauerberechnung [97]. Die Anpassung des Messparametersets muss für jeden Farbstoff und dessen Ensemble an Lebensdauern neu durchgeführt werden.

Für die Untersuchung der pH-Wert-Abhängigkeit und für die ersten Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit wurde ein Parameterset mit weit auseinander liegenden Zeitpunkten t_1 und t_2 ausgewählt. Aus diesem Grunde sind die Berechnungen der Lebensdauern für höhere Sauerstoffkonzentrationen ungenau und wurden in der Berechnung der Stern-Volmer-Konstanten nicht gewertet. Das Parameterset wurde für den Aufbau mit der Kalibrierküvette neu angepasst, so dass bei diesen Messungen die Ungenauigkeit der Berechnung nicht auftritt. Wie in Abb. 4.2 gezeigt ist, liegen die Abweichungen der berechneten Lebensdauern τ_{RLD} und der angepassten Lebensdauern τ_{Fit} in diesem Fall innerhalb der Fehlergrenzen des Messverfahrens.

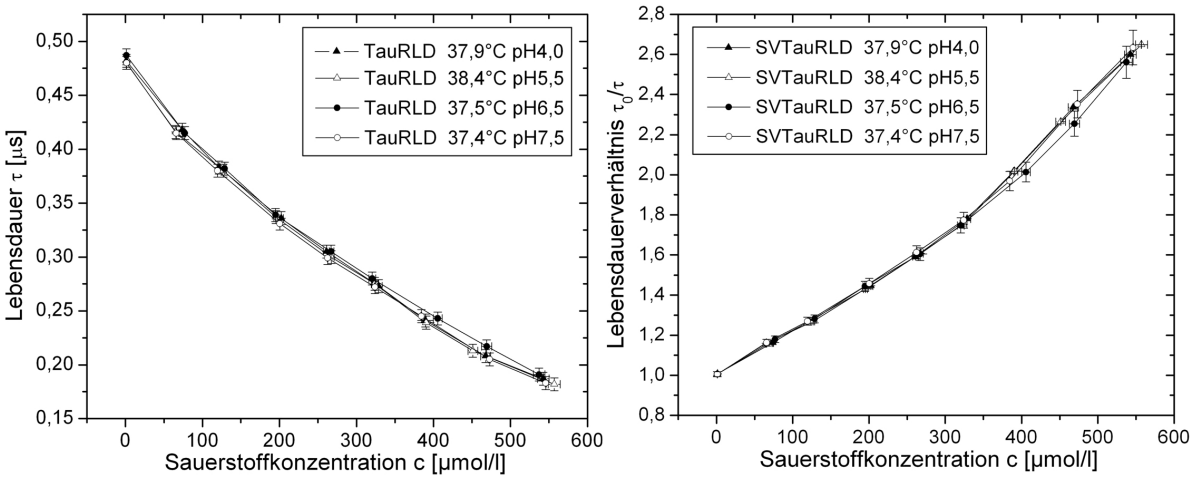


Abbildung 4.3: Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen für $T = 38°C$ von $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen mit den pH-Werten 4,0, 5,5, 6,5 und 7,5.

4.1.2 Abhängigkeit der Lebensdauer vom pH-Wert

Der physiologische Bereich des humanen pH-Werts ist abhängig von der Körperregion und liegt bei $pH = 4 - 7,5$ (siehe Kap. 3.2.3). Die Abhängigkeit der Stern-Volmer-Charakteristika vom pH-Wert wurde daher für diesen Bereich überprüft. Die Messungen der Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten erfolgte für die Temperaturen $T = 25\,°C$, $36\,°C$, $38\,°C$ und $50\,°C$, um über den physiologisch relevanten Temperaturbereich hinaus einen Effekt nachzuweisen. Exemplarisch sind die Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen der berechneten Lebensdauern τ_{RLD} für $T = 38\,°C$ in Abb. 4.3 gezeigt.

Die Kalibrierkurven weisen unabhängig vom pH-Wert einen $1/[O_2]$-Verlauf in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration auf. An diesen Verlauf wurde für die Ermittlung der Lebensdauern τ_0 eine Modellkurve mit der Form $\tau = \frac{1}{A+B[O_2]}$ angepasst. Von diesem Verlauf weichen jedoch die Messwerte für Konzentrationen größer als $c = 300\,\mu mol/l$ ab, wobei sie kleiner als der $1/x$-Verlauf sind. Dies ist auch im linearen Stern-Volmer-Graphen zu erkennen, wo die Abweichung zu größeren Abklingzeitverhältnissen τ_0/τ erfolgt. Der Grund hierfür liegt in der Wahl der Detektionszeitfenster t_1 und t_2 für die Berechnung der Lebensdauer τ_{RLD} (siehe Abschnitt 4.1.1). Die beiden Zeitpunkte sind für die Messungen so gewählt worden, dass für kleine ($c < 100\,\mu mol/l$) und mittlere ($c \sim 200\,\mu mol/l$) Sauerstoffkonzentrationen, die für die PDT relevant sind, die Fehler der Lebensdauerbestimmung im Vergleich zu den Lebensdauern τ_{Fit} minimiert sind. Daraus resultiert ein größerer Fehler für die Bestimmung der Lebensdauern bei großen Sauerstoffkonzentrationen ($c > 300\,\mu mol/l$). In diesem Bereich erscheint die berechnete Lebensdauer τ_{RLD} auf Grund von zwei weit auseinander gewählten Zeitpunkten t_1 und t_2 kleiner als die tatsächliche Lebensdauer. Der Vergleich der Lebensdauern τ_{RLD} und τ_{Fit} für $T = 38\,°C$ und $pH = 5,5$ verdeutlicht dieses Ver-

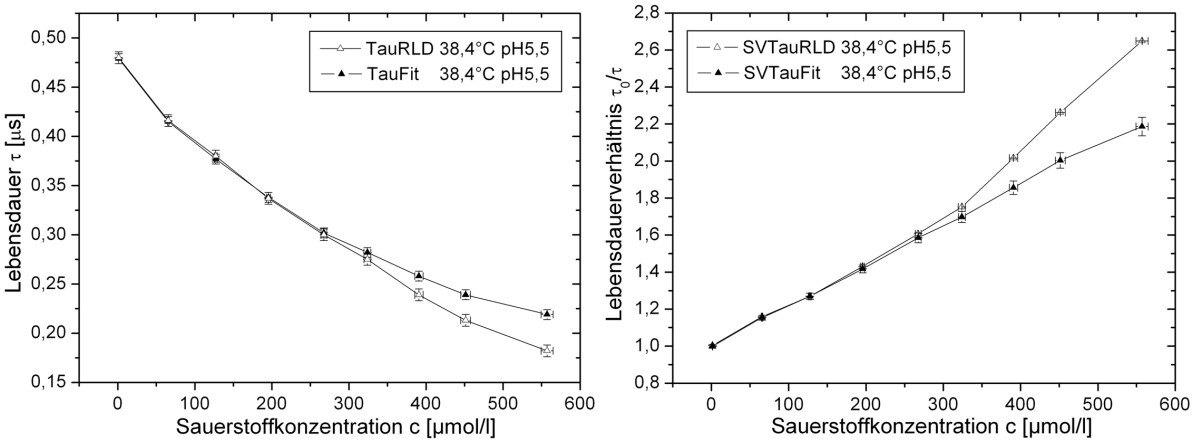


Abbildung 4.4: Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen für $T = 38°C$ und $pH = 5,5$ von $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen mit den berechneten Lebensdauern τ_{RLD} und den aus den Modellkurven berechneten Lebensdauern τ_{Fit}.

halten, wie in Abb. 4.4 gezeigt ist. Die Messwerte der Lebensdauern τ_{Fit} verfolgen eindeutig den $1/x$-Verlauf in den Kalibrierkurven und zeigen einen linearen Stern-Volmer-Graphen, wie in der Literatur für den Farbstoff $Ru(bpy)_3^{2+}$ beschrieben ist [109]. Die berechneten Lebensdauern τ_{RLD} weichen von diesem Verlauf bei höheren Sauerstoffkonzentrationen ab. Dennoch ist die $1/[O_2]$-Abhängigkeit in den Kalibrierkurven und die Linearität des Stern-Volmer-Graphen mit einem positiven Geradenanstieg auch für τ_{RLD} zu erkennen. Dieses Verhalten weist auf einen rein dynamischen Quenchingprozess hin.

Für die Anpassung der Modellkurven und die Bestimmung der Stern-Volmer-Konstanten wurde auf Grund der Abweichungen bei höheren Konzentrationen nur der Sauerstoffkonzentrationsbereich von $c < 300\,\mu mol/l$ betrachtet, wobei die Lebensdauern τ_{RLD} zu Grunde gelegt wurden. Die Lebensdauern τ_{Fit} geben den physikalischen Zusammenhang der Stern-Volmer-Graphen genauer wieder, können jedoch nicht verwendet werden, da die Sauerstoffbildgebung auf der Lebensdauer τ_{RLD} und deren Sauerstoffkonzentrationsabhängigkeit basiert. Die Auswertung der Messungen erfolgt daher stets für die Lebensdauern τ_{RLD}, wobei die Lebensdauern τ_{Fit} als Vergleich dienen.

Wie in Abb. 4.3 weiter zu erkennen ist, ist kein Effekt des pH-Werts auf die Stern-Volmer-Charakteristik nachweisbar. Dies gilt auch für die hier nicht dargestellten Messungen bei den anderen Temperaturen von $25\,°C$, $36\,°C$ und $50\,°C$. Der pH-Wert hat daher keinen Effekt auf die Sauerstoffkonzentrationsabhängigkeit der Lebensdauer von $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen im Temperaturbereich von $T = 25 - 50\,°C$. Dies entspricht auch der Literatur, in der die pH-Wert-Unabhängigkeit im Bereich von $pH = 5 - 7,2$ angegeben wird [53]. Der Farbstoff ist aus diesem Grunde für Messungen an menschlichem Gewebe gut geeignet.

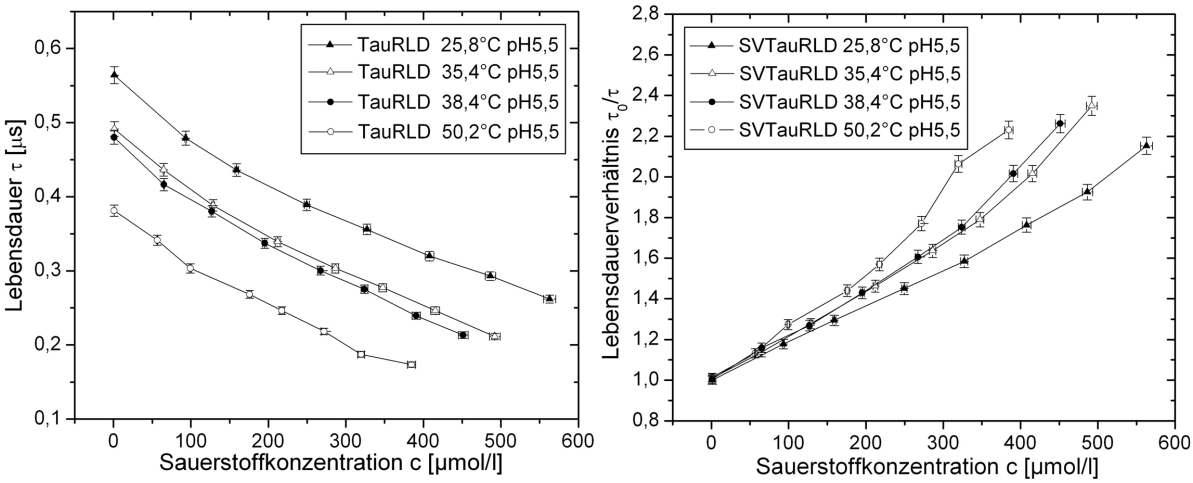


Abbildung 4.5: Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen von $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen für den pH-Wert 5,5 und die Temperaturen 24°C, 36°C, 38°C und 50°C.

4.1.3 Abhängigkeit der Lebensdauer von der Temperatur

Die Messungen zur Abhängigkeit der Stern-Volmer-Charakteristik vom pH-Wert und von der Temperatur erfolgten in der Durchflussküvette für die Temperaturen $T = 25\,°C$, $36\,°C$, $38\,°C$ und $50\,°C$. Der für die PDT relevante Temperaturbereich liegt im Bereich von $T = 27 - 37\,°C$, der für Messungen an lebenden Zellen, die im Brutschrank kultiviert werden, um $37\,°C$. Es wurden daher für die ersten Messungen zwei dicht benachbarte Temperaturen um $37\,°C$ und die beiden Temperaturen $25\,°C$ und $50\,°C$ ausgewählt. Die Messungen erfolgten für die vier ausgewählten pH-Werte, die jedoch wie im vorherigen Abschnitt dargestellt wurde, keinen Effekt auf die Stern-Volmer-Charakteristik zeigten. Aus diesem Grunde wurden alle nachfolgenden Messungen bei dem festen pH-Wert von $pH = 5,5$ durchgeführt, der einen Mittelwert des humanen Haut-pH-Werts darstellt. In Abb. 4.5 sind exemplarisch die Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen für den pH-Wert 5,5 gezeigt.

Die mit der Durchflussküvette erzielten Ergebnisse zur Temperaturabhängigkeit zeigen sowohl in den Kalibrierkurven, als auch in den Stern-Volmer-Graphen eine deutliche Temperaturabhängigkeit. In den Kalibrierkurven werden die Werte der Lebensdauern mit steigender Temperatur kleiner und die Kurven sind zu kleineren Lebensdauern hin verschoben, wobei die $1/x$-Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration erhalten bleibt. Die Lebensdauern in Abwesenheit von Quenchern τ_0 und die Dynamik der Lebensdaueränderung nimmt mit steigender Temperatur ab, was sich in den Stern-Volmer-Graphen in den mit der Temperatur steigenden Geradenanstiegen zeigt. Die Stern-Volmer-Konstanten K_{SV} und dynamischen Quenchingkonstanten k_q steigen somit mit zunehmender Temperatur.

Der Einfluss der Temperatur ist bei den beiden Messungen für $T = 36\,°C$ und $T = 38\,°C$ bereits in den Kalibrierkurven zu erkennen, wobei die beiden Kurven lediglich zueinander

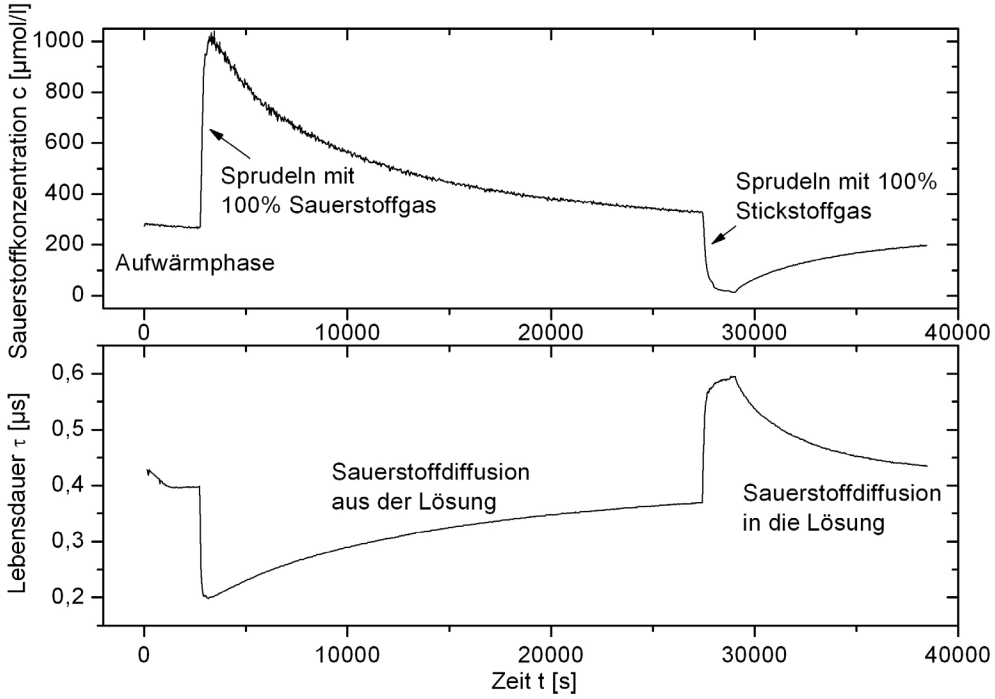


Abbildung 4.6: Zeitprofil der Messung der Kalibrierkurve und des Stern-Volmer-Graphen für $Ru(bpy)_3^{2+}$ für $T = 25\,°C$ und $pH = 5,5$ gemessen mit der Kalibrierküvette. In der oberen Grafik ist das Referenzsignal und in der unteren das Lebensdauermesssignal in Abhängigkeit der Zeit gezeigt.

verschoben erscheinen und die Dynamik sich kaum ändert. Weiter liegen die Lebensdauerwerte innerhalb der Fehlergrenzen voneinander. In den Stern-Volmer-Graphen liegen die Werte τ_0/τ im Bereich kleiner und mittlerer Sauerstoffkonzentrationen ($c < 300\,\mu mol/l$) ebenfalls innerhalb der Fehlergrenzen voneinander und können daher nicht unterschieden werden. Erst bei größeren Sauerstoffkonzentrationen ($c > 300\,\mu mol/l$) wird die Änderung des Anstiegs im Stern-Volmer-Graphen sichtbar. Eine Änderung der Temperatur im Bereich von $\pm 1\,°C$ während der Messung im PDT relevanten Sauerstoffkonzentrationsbereich liegt damit innerhalb der Fehlergrenzen des Messverfahrens und beeinflusst nicht die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration.

Die genauere Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Stern-Volmer-Charakteristik im für die PDT relevanten Temperaturbereich sowie die Überprüfung der Funktionalität des Messverfahrens wurden mit der Kalibrierküvette durchgeführt. Diese Küvettenhalterung bietet eine gleichmäßige Temperierung und Durchmischung der Probe und somit die Möglichkeit über die Diffusion eine Vielzahl an Sauerstoffkonzentrationen zu vermessen. Die erste Messung mit diesem Aufbau wurde für die Temperatur $T = 25\,°C$ durchgeführt, da für diese Werte der Stern-Volmer-Konstanten und der dynamischen Quenchingkonstanten in der Literatur genannt sind. Die Überprüfung des Systems ist somit durch einen Vergleich der Werte möglich.

Die Messungen in der Kalibrierküvette wurden so durchgeführt, dass zuerst in der Aufwärmphase die Küvette gleichmäßig temperiert wurde. In dieser Phase sinkt die mit dem Referenzsystem gemessene Sauerstoffkonzentration in der Lösung und dem entsprechend auch die gemessene Lebensdauer, da mit steigender Temperatur die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser abnimmt und der Sauerstoff durch Diffusion aus der Lösung entweicht. Bereits in dieser Phase wurde mit der kontinuierlichen und zeitgleichen Messung der Sauerstoffkonzentration mittels des Referenzsystems und der Lebensdauer mittels des aufgebauten Systems begonnen (siehe Abb. 4.6). Da für die Messung der Lebensdauer drei Intensitätsbilder aufzunehmen sind, zwischen den Bildern die Messzeiten des Generators umgeschaltet werden müssen und die Lebensdauer zu berechnen ist, ist die Messung der Lebensdauer nicht sekundengenau. Als Messzeitpunkt der Lebensdauerberechnung wurde daher stets der Zeitpunkt zwischen der Aufnahme des ersten und des zweiten Intensitätsbildes gewertet, da sich die Intensität des Untergrundbildes als unabhängig von der Sauerstoffkonzentration zeigte. Die Messung des Referenzsystems erfolgte dagegen sekundengenau und wurde zeitlich auf den Zeitpunkt der Lebensdauermessung gelegt. Der zeitliche Abstand der Messwerte betrug $30\,s$.

Im Anschluss an die Aufwärmphase wurde 100% Sauerstoffgas mittels des Schlauchendes in die Lösung gesprudelt, um diese mit Sauerstoff anzureichern. Dieser Prozess wurde bei einer erreichten Sauerstoffkonzentration von ca. $c = 900\,\mu mol/l$ gestoppt. Anschließend änderte sich die Sauerstoffkonzentration in der Lösung durch Diffusion aus der Lösung. Während dieser Zeit wurden weiter kontinuierlich die Sauerstoffkonzentration und die Lebensdauer gemessen. Nach ca. $3-4$ Stunden Messzeit näherte sich die Sauerstoffkonzentration an die mit Luft gesättigte Lösung an und statt Sauerstoffgas wurde nun 100% Stickstoffgas in die Lösung gesprudelt, um den Sauerstoff aus dieser zu entfernen. Da die vollständige Sauerstoffverarmung nur unter viel Zeitaufwand und einer geschlossenen Atmosphäre zu erreichen ist, wurde dieser Prozess bei ca. $c = 30\,\mu mol/l$ abgebrochen und anschließend der Diffusionsprozess in umgekehrter Richtung beobachtet. Da die Sauerstoffdiffusion in die Lösung hinein und heraus temperaturabhängig ist und je nach Temperatur einige Stunden benötigt, wurden beide Diffusionsprozesse nach ca. $3-4$ Stunden abgebrochen. Die Gesamtdauer einer Messung mit Aufwärmphase wurde so auf 10 bis 12 Stunden begrenzt. Aus diesem Grunde erscheint in den Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen im Bereich von ca. $c = 200-300\,\mu mol/l$ eine Lücke ohne Messwerte. Das Zeitprofil für die Messung bei $T = 25\,°C$ und $pH = 5,5$ ist exemplarisch in Abb. 4.6 gezeigt.

Die aus dieser Messung ermittelte Kalibrierkurve und die Stern-Volmer-Gerade sind in Abb. 4.7 dargestellt. Wie bereits in der Kalibrierkurve deutlich wird, liegen dieser Messung eine Vielzahl an Messwerten (ca. 1100) zu Grunde, die eindeutig der $1/[O_2]$-Abhängigkeit folgen. Aus der an die Messwerte angepassten Modellkurve ergibt sich eine Lebensdauer

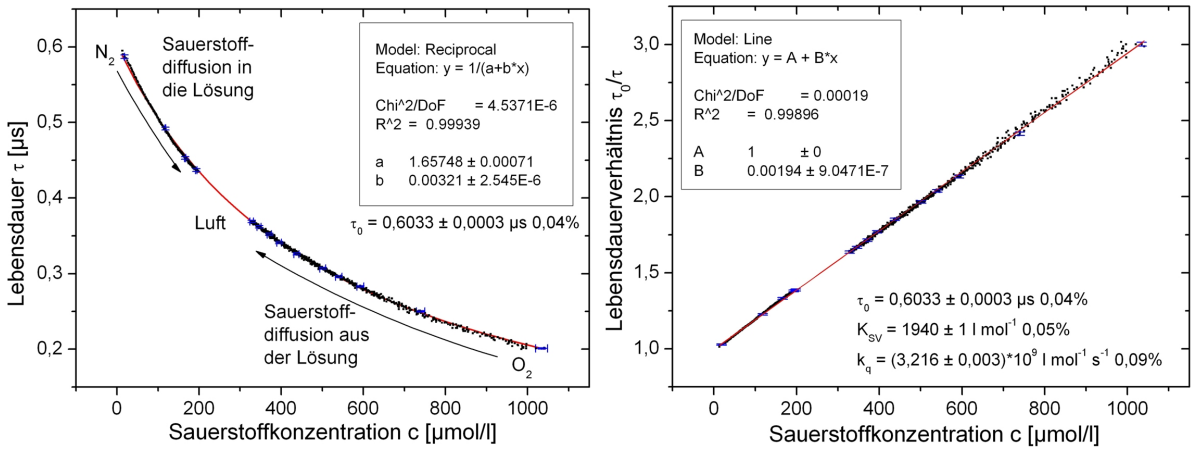


Abbildung 4.7: Kalibrierkurve und Stern-Volmer-Graph für $Ru(bpy)_3^{2+}$ für $T = 25\,°C$ und $pH = 5,5$ gemessen mit der Kalibrierküvette. Die an die Messwerte angepassten Modellkurven sind rot und exemplarisch sind einige Fehlerbalken blau dargestellt. Die Lebensdauer ist $\tau_0 = 0,6\,\mu s$, die Stern-Volmer-Konstante $K_{SV} = 1940\,l\,mol^{-1}$ und die dynamische Quenchingkonstante $k_q = 3,216 \cdot 10^9\,l\,mol^{-1}s^{-1}$.

von $\tau_0 = 0,6\,\mu s$, wie auch in der Literatur beschrieben ist [109, 110]. Weiter zeigt sich im Stern-Volmer-Graphen ein linearer Zusammenhang der τ_0/τ-Werte zur Sauerstoffkonzentration c mit der Stern-Volmer-Konstanten $K_{SV} = 1940\,l\,mol^{-1}$. Die dynamische Quenchingkonstante ist daher $k_q = 3,216 \cdot 10^9\,l\,mol^{-1}s^{-1}$ für $T = 25\,°C$. In der Literatur werden für $Ru(bpy)_3^{2+}$ gelöst in Wasser für $T = 25°C$ für die Lebensdauer $\tau_0 = 0,6\,\mu s$, für die Stern-Volmer-Konstante $K_{SV} = (2,0 \pm 0,1) \cdot 10^3 M^{-1}$ und für die dynamische Quenchingkonstante $k_q = (3,3 \pm 0,2) \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$ angegeben [109]. Die mit dem in dieser Arbeit präsentierten System gemessenen Werte entsprechen daher innerhalb der Fehlergrenzen vollständig den Literaturangaben und beweisen damit die Funktionalität des Messsystems.

Die mittlere Hauttemperatur des Menschen wird mit $T = 32\,°C$ angegeben und wurde aus diesem Grunde der in Abb. 4.8 dargestellten Messung zu Grunde gelegt. Ein Vergleich der gemessenen Werte für τ_0, K_{SV} und k_q ist auf Grund fehlender Literaturangaben für diese Temperatur nicht möglich. Jedoch zeigt sich in der Literatur, dass mit steigender Temperatur die Lebensdauer τ_0 abnimmt und die Stern-Volmer-Konstante K_{SV}, sowie die Quenchingkonstante k_q steigen, was sich in einem steileren Anstieg der Stern-Volmer-Geraden zeigt [54]. Die ermittelten Werte für $T = 32\,°C$ sind $\tau_0 = 0,5382\,\mu s$, $K_{SV} = 2090\,l\,mol^{-1}$ und $k_q = 3,846 \cdot 10^9\,l\,mol^{-1}s^{-1}$, so dass die in der Literatur beschriebene Tendenz bestätigt wird.

Der Grund für das Absinken der Lebensdauer τ_0 mit steigender Temperatur liegt in der thermischen Deaktivierung des angeregten Triplettzustands von $Ru(bpy)_3^{2+}$ über den ^3MC-Zustand. Die Temperaturabhängigkeit der Lebensdauer wird, wie in Abschnitt 2.3.2 erläutert, durch die ARRHENIUS-Gleichung beschrieben [16, 54]:

$$\tau_0 = \frac{1}{k_p + k_{nr} + k_{dd}} = \frac{1}{k_p + k_{nr} + k' e^{-\Delta E/k_B T}} \tag{4.1}$$

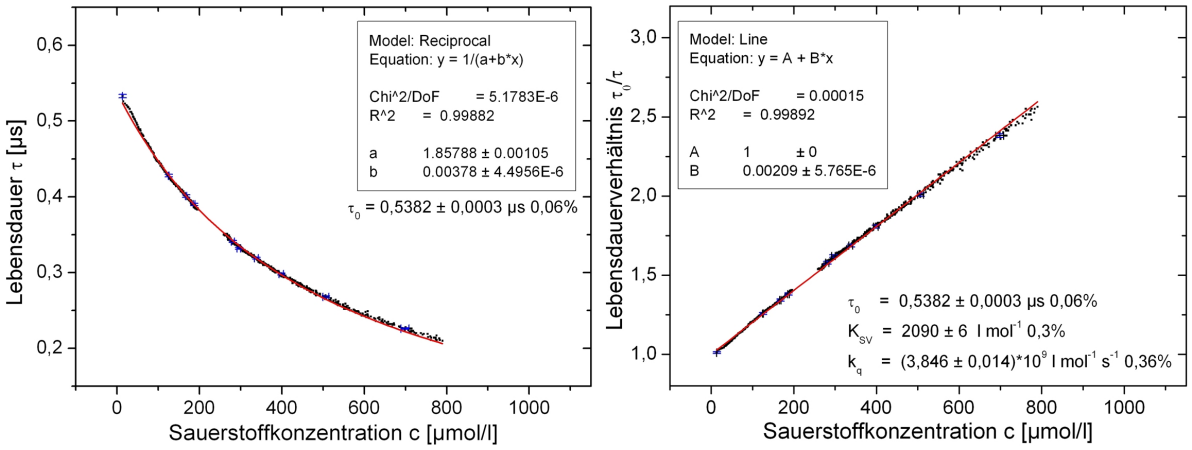


Abbildung 4.8: Kalibrierkurve und Stern-Volmer-Graph für $Ru(bpy)_3^{2+}$ für $T = 32\,°C$ und $pH = 5,5$ gemessen mit der Kalibrierküvette. Die Lebensdauer ist $\tau_0 = 0,5382\,\mu s$, die Stern-Volmer-Konstante $K_{SV} = 2090\ l\,mol^{-1}$ und die dynamische Quenchingkonstante $k_q = 3,846 \cdot 10^9\ l\,mol^{-1}s^{-1}$.

Ein Vergleich der für die $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen mit dem pH-Wert 5,5 erzielten Werte zeigt dieses Verhalten (Abb. 4.9), wobei im für die PDT relevanten Temperaturbereich von $20-50\,°C$ die Abhängigkeit als linear angesehen werden kann [56]. Der an die Messwerte angepasste lineare Fit durchläuft die Werte innerhalb der Fehlergrenzen und hat einen hohen Korrelationskoeffizienten R^2. Die dargestellten Fehler der Temperaturen sind für die mit der Durchflussküvette erzielten Werte deutlich größer auf Grund von Temperaturdrifts in der Küvette während der Messungen. Die Fehler der Lebensdauern τ_0 ergeben sich aus der Genauigkeit der an die Kalibrierkurven angepassten Modellkurven. Da diese jedoch nur auf $5-6$ Messwerten für die Messungen in der Durchflussküvette beruhen, sind die tatsächlichen Fehler der Lebensdauern höher und liegen im Bereich der Fehler der einzelnen Lebensdauern von 2%. Diese sind in der Grafik dargestellt. Die Fehler der beiden in der Kalibrierküvette gemessenen Werte für $T = 25\,°C$ und $T = 32\,°C$ entsprechen ebenfalls den aus den Modellkurven berechneten. Da diese aber auf ca. 1100 Messwerten beruhen, entsprechen sie den tatsächlichen Fehlern. Die Temperatur unterliegt in der Kalibrierküvette keinen Drifts und kann daher genauer eingehalten werden. Der Fehler der Temperatur entspricht daher dem Messfehler der Temperatursonde.

Die in der Durchflussküvette gemessen Werte für τ_0 liegen tendenziell unterhalb der angepassten Modellgeraden. Der Grund hierfür liegt in der Messmethode der Lebensdauern τ. Da die Farbstofflösung mit Gas durchsprudelt wurde, um eine feste Sauerstoffkonzentration zu erreichen, und die Sprudelzeit auf 5 Minuten begrenzt war, sind die gemessenen Lebensdauern τ ebenfalls tendenziell zu klein, da kein vollständiger Sauerstoffkonzentrationsaustausch zwischen der Gasatmosphäre und der Lösung erreicht wurde. Die Messung der Lebensdauer erfolgte daher nicht im Gleichgewicht des Gasaustausches, so dass gerade bei geringen Sauerstoffkonzentrationen diese in der Lösung erhöht sind. Die gemessenen

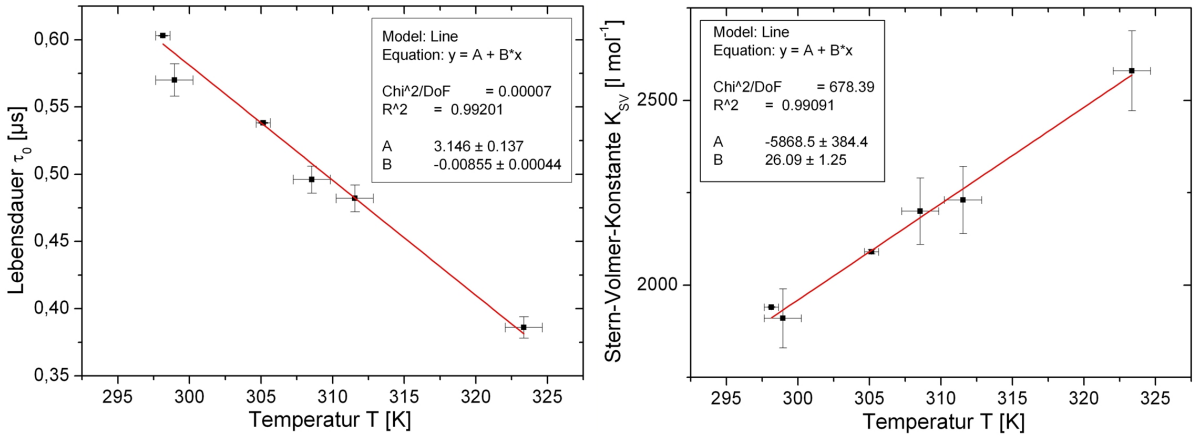


Abbildung 4.9: Temperaturabhängigkeit der Lebensdauer τ_0 und der Stern-Volmer-Konstanten K_{SV} für $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen mit dem pH-Wert 5,5. Die Werte für $T = 25,8$, $35,4$, $38,4$ und $50,3°C$ sind mit der Durchflussküvette gemessen, die bei $T = 25°C$ und $32°C$ mit der Kalibrierküvette.

Lebensdauern sind daher kleiner als erwartet und wirken sich auf die Kalibrierkurvenanpassung für die Bestimmung von τ_0 aus. Dieser Effekt tritt bei den mit der Kalibrierküvette gemessenen Werten wegen der längeren Sprudelzeit und des Diffusionsprozesses nicht auf. Die lineare Temperaturabhängigkeit der Lebensdauer τ_0 wird dennoch auch durch die mit der Durchflussküvette gemessenen Werte bestätigt.

Die dynamische Quenchingkonstante k_q steigt proportional mit der Temperatur auf Grund der Proportionalität zu den Diffusionskonstanten von Molekül D_M und Quencher D_Q, die beide abhängig von der Temperatur sind:

$$k_q = \gamma \cdot k = \gamma \cdot 4\pi R_0\, N\, 10^{-3}(D_M + D_Q) = \gamma \cdot 4\pi R_0\, N\, 10^{-3} \cdot \frac{k_B\, T}{6\pi\, R_0\, \eta} \tag{4.2}$$

Die Stern-Volmer-Konstante K_{SV} und damit die Steigung der Stern-Volmer-Geraden ist gegeben durch das Produkt aus τ_0 und k_q. Da die Temperaturabhängigkeit von k_q einen stärkeren Einfluss als die Temperaturabhängigkeit von τ_0 hat, steigt K_{SV} ebenfalls linear mit der Temperatur an, wie die berechneten Werte bestätigen (siehe Abb. 4.9). Die eingezeichneten Fehler der mit der Durchflussküvette gemessenen Werte sind auch hier deutlich größer und entsprechen wegen der geringen Anzahl an Messwerten den Einzelfehlern von τ_0 und τ. Die Fehler der Werte, die in der Kalibrierküvette gemessen wurden, beruhen auf den Fehlern der an die Stern-Volmer-Graphen angepassten Modellkurven. Die an die Werte angepasste Modellgerade durchläuft innerhalb der Fehlergrenzen alle Messwerte.

Die festgestellte Temperaturabhängigkeit der Lebensdauern und der Stern-Volmer-Charakteristik bewirken, dass die Temperatur für Sauerstoffkonzentrationsmessungen beachtet und *in situ* gemessen werden muss. Die Kalibrierparameter τ_0 und C für die Zuordnung der gemessenen Lebensdauern zur Sauerstoffkonzentration, wie sie durch die Gl. 4.3 gegeben sind, sind daher abhängig von der Temperatur. Für eine exakte Sauerstoffkonzen-

trationsberechnung muss daher die Temperatur mittels einer Temperatursonde im Messareal gemessen und an das Steuerprogramm weitergegeben werden.

$$[O_2] = \frac{\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0(T)}}{C(T)} \tag{4.3}$$

Für Messungen an lebenden Zellkulturen oder an Gewebe mit konstanter Temperatur kann die Temperaturmessung einmalig zu Beginn der Messung erfolgen und in die Berechnung eingegeben werden, da innerhalb eines Temperaturtoleranzbereiches von $\pm 1\,^{\circ}C$ die Zuordnung zur Sauerstoffkonzentration innerhalb der Fehlergrenzen des Messverfahrens liegt.

Die Bestimmung der Parameter $\tau_0(T)$ und $C(T)$ erfolgt durch die Aufnahme einer Kalibrierkurve, wie es für die Temperaturen von $T = 25\,^{\circ}C$ und $T = 32\,^{\circ}C$ in der Kalibrierküvette durchgeführt wurde. Da dieses Messverfahren jedoch sehr zeitaufwändig ist, kann die Bestimmung der Kalibrierparameter auch mittels der Messung zweier Lebensdauerwerte bei zwei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen erfolgen. Die beiden Sauerstoffkonzentrationen sollten dabei für eine Minimierung der Fehler den für die Messung relevanten Messbereich erfassen. Für Anwendungen an Gewebe werden daher der Wert für 0% Sauerstoffkonzentration und für luftgesättigte Lösung (20,9% Sauerstoff) empfohlen.

Eine schnellere, jedoch ungenauere Methode für die Bestimmung der Kalibrierparameter bieten die Modellkurven der Temperaturabhängigkeiten der Lebensdauer τ_0, sowie der Stern-Volmer-Konstanten K_{SV}. Aus der Modellkurve für die Stern-Volmer-Konstante kann die Stern-Volmer-Konstante der gewünschten Temperatur $K_{SV}(T)$ berechnet werden und ein Stern-Volmer-Graph für diese Temperatur erstellt werden. Weiter kann aus der Temperaturabhängigkeit von τ_0 die Lebensdauer $\tau_0(T)$ für die gesuchte Temperatur errechnet werden und aus dieser und der Stern-Volmer-Geraden die Kalibrierkurve generiert werden. Da die Bestimmung der in diesem Abschnitt dargestellten Werte für τ_0 und K_{SV} durch die Messungen in der Durchflussküvette fehlerbehaftet sind, liegt der Berechnung von $\tau_0(T)$ und $K_{SV}(T)$ ebenfalls ein Fehler zu Grunde. Für eine exaktere und dennoch unaufwändige Bestimmung der Kalibrierparameter wird daher die Kalibrierung mittels zweier Sauerstoffkonzentrationen empfohlen.

4.1.4 Sensitivität und Fehlerbetrachtung

In den dargestellten Abbildungen der Messergebnisse sind Fehler und Fehlerbalken angegeben, die auf unterschiedlichen Fehlerquellen der Messungen beruhen. Dabei unterscheiden sich insbesondere die in der Durchflussküvette durchgeführten Messungen von denen in der Kalibrierküvette, da die Einstellung der Sauerstoffkonzentration in der Durchflussküvette wesentlich schwieriger zu realisieren war. Aus diesem Grunde sind die Fehler der Mittelwerte der Intensität und der Lebensdauer stets größer.

Messwert		Fehler des Einzelwerts	Fehler des Mittelwerts
Intensität I	DK	4%	4%
Lebensdauer τ	DK	12 %	2%
Intensität I	KK	4%	1%
Lebensdauer τ	KK	12%	0,4%

Tabelle 4.1: Fehler der Einzel- und der Mittelwerte für die Intensität und die Lebensdauer für Messungen mit $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen gemessen in der Durchfluss- (DK) und der Kalibrierküvette (KK).

Die Fehler der Messwerte für die Intensität I und die Lebensdauer τ sind für die Durchfluss- und die Kalibrierküvette in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Die Intensität entspricht dabei der pixelweise untergrundkorrigierten Intensität, also $I_1 - I_3$ bzw. $I_2 - I_3$. Als Fehler der Einzelwerte sind die Fehler der pixelweise gemessenen Werte angegeben, die Fehler der Mittelwerte sind die Fehler der über die Gesamtanzahl der Pixel $1024 \cdot 1024$ gemittelten Werte.

Die Fehler der Einzelwerte der Intensitäten resultieren aus der Schwankung der Anregungsintensität und aus dem verstärkungsbedingten Rauschen der Bildverstärkung. Der Fehler beträgt sowohl in der Durchflussküvette als auch in der Kalibrierküvette 4%. Die Fehler der Mittelwerte der Intensitäten ergeben sich aus den Standardabweichungen des Mittelwerts und betragen ca. 0,02%. Die tatsächlich zu Grunde liegenden Fehler der Messungen sind jedoch auf Grund der Messanordnungen wesentlich größer. In der Durchflussküvette schwankt die Intensität wegen der geringeren Durchmischung der Lösung und des zeitlich begrenzten Sprudelvorgangs, so dass keine homogene Sauerstoffkonzentration in der Lösung vorliegt. Der aus verschiedenen Sprudelzeiten und den daraus resultierenden Schwankungen der Intensität ermittelte Fehler beträgt 4%. Weiter bewirkt die Verstärkung des Bildverstärkers eine Schwankung der mittleren Intensitäten, die jedoch nur 1% beträgt und somit kleiner als der aus dem Sprudelvorgang resultierende Fehler ist. Der durch die Verstärkung bedingte Fehler von 1% liegt den in der Kalibrierküvette gemessenen Werten zu Grunde, in der eine gute Durchmischung realisiert ist.

Die Reproduzierbarkeit der Intensitätswerte wurde über einen Zeitraum von ca. 8 Stunden gemessen und zeigte sowohl in der Durchfluss-, als auch in der Kalibrierküvette eine geringe Schwankung von max. 1%. Dies entspricht dem durch den Bildverstärker bedingten Fehler von 1%. Die Reproduzierbarkeit der Messwerte ist daher sehr gut und es tritt keine Photodegradation auf, wie bereits in Abschnitt 4.1.1 gezeigt wurde.

Die Fehler der pixelweise berechneten Lebensdauern liegen auf Grund der Schwankungen der Intensitäten bei 12%. Die Fehler der Mittelwerte beruhen auf der Standardabweichung des Mittelwerts und betragen rechnerisch 0,012%. Da der Sprudelvorgang und die geringe Durchmischung in der Durchflussküvette jedoch ebenfalls einen Einfluss auf die Lebensdauer haben, beträgt dieser Wert tatsächlich 2%. In der Kalibrierküvette ist der Fehler

bedingt durch die Schwankungen der Intensitäten und liegt bei $0,4\%$. Dieser Fehler wurde auch bei der Langzeitmessung der Lebensdauer über 8 Stunden festgestellt. Die Reproduzierbarkeit der Lebensdauerwerte ist daher sehr gut.

Für die Zuordnung der Lebensdauerwerte zur Sauerstoffkonzentration wurden zeitgleich die Temperatur und die Sauerstoffkonzentration mit dem Referenzmesssystem gemessen. Die Fehler dieser Messwerte sind vom Hersteller angegeben und betragen:

$$\Delta T = 0,5\,^{\circ}C$$
$$\Delta[O_2] = 1\% \quad \text{für} \quad c < 250\,\mu mol/l$$
$$\Delta[O_2] = 1,4\% \quad \text{für} \quad c > 250\,\mu mol/l$$

Diese Fehlerangaben entsprechen den tatsächlichen Fehlern der Messwerte, wenn einerseits der Temperaturdrift innerhalb der Probe unter $0,5\,^{\circ}C$ pro Messvorgang gehalten werden kann und andererseits der Messfühler der Sauerstoffkonzentration innerhalb des Bildfeldes positioniert ist. Dies konnte durch die Kontrolle der Temperatur und der Positionierung der beiden Sonden während der Messungen in der Kalibrierküvette realisiert werden und die angegebenen Fehler entsprechen daher den Fehlern der Messwerte. Bei den Messungen in der Durchflussküvette betrug der Temperaturdrift jedoch nicht unter $0,5\,^{\circ}C$, sondern $1,3\,^{\circ}C$. Der Fehler dieser Temperaturmessungen beträgt daher $1,3\,^{\circ}C$.

Die Fehler der Lebensdauer τ_0 und der Stern-Volmer-Konstanten K_{SV} ergeben sich aus den Parametern der an die Messwerte angepassten Modellkurven. Diese sind mit der Least-Square-Fit-Methode an die ca. 1100 Messwerte pro Messreihe angepasst und geben daher die Genauigkeit der Anpassung der Modellkurve wieder. Bei den Messungen in der Durchflussküvette liegen der Modellkurvenanpassung jedoch nur $5-6$ Messwerte zu Grunde, so dass der tatsächliche Fehler der Lebensdauer τ_0 dem Fehler der Messwerte der Lebensdauern entspricht. Der relative Fehler der Stern-Volmer-Konstanten entspricht der Addition der relativen Fehler von τ_0 und τ, da im Stern-Volmer-Graph das Verhältnis τ_0/τ dargestellt ist.

Die absolute Empfindlichkeit S_A der Sauerstoffkonzentrationsmessung ist durch die Änderung der Lebensdauer τ um den Betrag $\Delta\tau$ bei einer Änderung der Sauerstoffkonzentration um $\Delta[O_2]$ gegeben. Sie ist daher durch den Quotienten der Änderungen gegeben.

$$S_A = \frac{\Delta\tau}{\Delta[O_2]} \tag{4.4}$$

Da die Änderung $\Delta\tau$ abhängig vom Sauerstoffkonzentrationsbereich ist, ist diese nicht konstant und muss für jeden Bereich ermittelt werden. Dies ist durch den infinitesimalen Übergang von

$$\frac{\Delta\tau}{\Delta[O_2]} \longrightarrow \frac{d\tau}{d[O_2]} \tag{4.5}$$

möglich. Die absolute Empfindlichkeit kann so durch die Ableitung der Kalibrierkurven (sie-

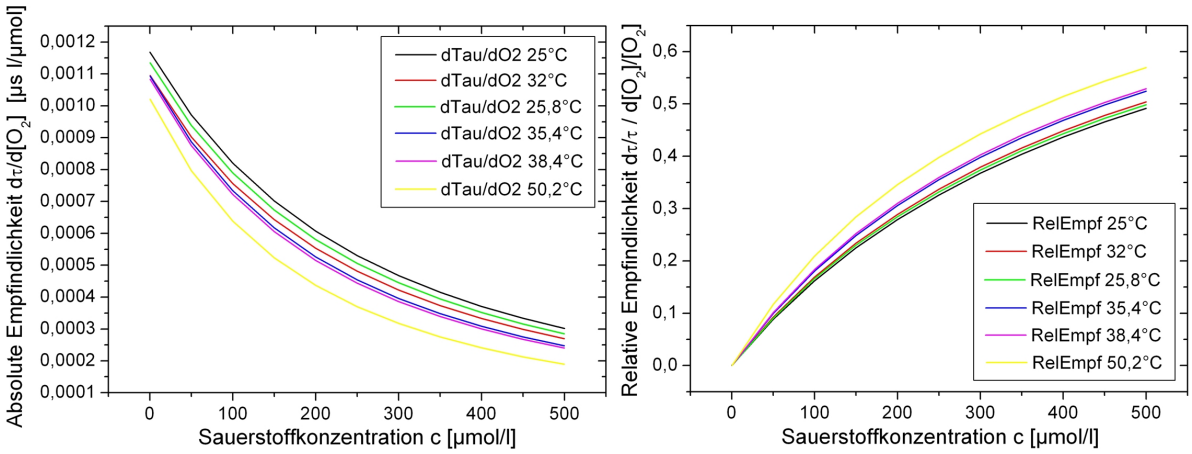


Abbildung 4.10: Absolute und relative Sensitivität der Messungen der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen mit dem pH-Wert 5,5. Die absolute Empfindlichkeit sinkt mit steigender Temperatur, die relative steigt an.

he Gl. 3.7) berechnet werden, wobei $A(T) = \frac{1}{\tau_0}$ und $B(T) = \frac{K_{SV}}{\tau_0}$ sind:

$$S_A([O_2]) = \frac{B(T)}{(A(T) + B(T)[O_2])^2} \tag{4.6}$$

Die Werte der absoluten Sensitivität für verschiedene Sensoren mit unterschiedlich großen Lebensdauern können jedoch nicht verglichen werden, so dass für einen Vergleich die Änderungen auf die tatsächlichen Werte der Lebensdauer, bzw. der Sauerstoffkonzentration bezogen werden müssen. Dies ist definiert als die relative Sensitivität, die durch die folgende Gleichung gegeben ist:

$$S_R([O_2]) = \frac{\frac{\Delta\tau}{\tau}}{\frac{\Delta[O_2]}{[O_2]}} = \frac{\Delta\tau}{\Delta[O_2]} \cdot \frac{[O_2]}{\tau} = \frac{B(T)}{(A(T) + B(T)[O_2])^2} \cdot \frac{[O_2]}{\tau} \tag{4.7}$$

Für die in dieser Arbeit gezeigten Messreihen für den pH-Wert 5,5 wurden die absolute und die relative Sensitivität aus der Ableitung der angepassten Modellkurven der Kalibrierkurven berechnet. Hierfür wurden die Parameter $A(T)$ und $B(T)$, die durch die Modellkurven gegeben sind, eingesetzt. Die berechneten Kurven sind in Abb. 4.10 dargestellt und zeigen die Temperaturabhängigkeit der Sensitivität. Die absolute Sensitivität nimmt mit steigender Temperatur und mit steigender Sauerstoffkonzentration ab. Dies zeigt sich auch in der Darstellung der relativen Sensitivität. Diese Werte steigen mit steigender Temperatur und Sauerstoffkonzentration an, wobei höhere Werte einer geringen Empfindlichkeit entsprechen. Ein Wert von 1 entspricht dabei der vollständigen Unempfindlichkeit des Verfahrens. Die absolute Sensitivität der Messungen ist im Bereich kleiner Sauerstoffkonzentrationen am größten, was sich in den geringen Werten der relativen Sensitivität zeigt.

Im für die PDT relevanten Sauerstoffkonzentrationsbereich ($c = 0 - 100\,\mu mol/l$) sinkt die absolute Sensitivität abhängig von der Temperatur von Werten zwischen

$0,0010 - 0,0012\,\mu s/\mu mol\,l^{-1}$ auf Werte zwischen $0,0006 - 0,0008\,\mu s/\mu mol\,l^{-1}$, während die relative Sensitivität auf Werte zwischen $0,16 - 0,2$ ansteigt. Dies entspricht einer Halbierung der Sensitivität in dem für die PDT relevanten Sauerstoffkonzentrationsbereich.

4.1.5 *In vitro* Messungen mit $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen

Die Ansprechzeit des Sensorfarbstoffs in Verbindung mit Gewebe ist für die Anwendung des Systems in der Medizin wichtig. Sie wurde daher für den Farbstoff $Ru(bpy)_3^{2+}$ an Hand von Schweinehautproben in der Durchflussküvette bestimmt, in der eine konstante Sauerstoffkonzentration und eine Änderung dieser mittels des Gasdurchflusses eingestellt werden kann. Durch die kontinuierliche Messung der Lebensdauer und der Sauerstoffkonzentration während einer Änderung der Sauerstoffkonzentration kann die Ansprechzeit Δt ermittelt werden.

Der Farbstoff $Ru(bpy)_3^{2+}$ wurde für die Messungen in Wasser mit dem pH-Wert $5,5$ gelöst und in die auf $T = 25\,°C$ temperierte Durchflussküvette pipettiert. Da die Ansprechzeit des in der Flüssigkeit gelösten Farbstoffs abhängig von der Sauerstoffdiffusion von der Gasatmosphäre in bzw. aus dem Volumen der Flüssigkeit heraus ist, ist die Ansprechzeit abhängig vom Volumen der Flüssigkeit. Sie gibt daher nicht die tatsächliche Ansprechzeit des Farbstoffs wieder und wurde aus diesem Grund nicht bestimmt. Es wurde daher nur die Ansprechzeit in Verbindung mit Gewebe bestimmt.

Für die Bestimmung der Ansprechzeit des Farbstoffs mittels Schweinehautproben wurde der Farbstoff in die Küvette pipettiert. Die kontinuierliche Messung der Lebensdauer und der Sauerstoffkonzentration in der Gasatmosphäre wurde gestartet und diese ca. 1 Stunde beobachtet. Dann wurde die Schweinehautprobe auf die Farbstofflösung aufgelegt und wiederum einige Zeit die Lebensdauer beobachtet. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abb. 4.11 dargestellt. Die Dicke der Schweinehautprobe betrug aus den im Kap. 3.2.4 angeführten Gründen $d = 500\,\mu m$.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, ändert sich die Lebensdauer des Farbstoffs, sobald dieser in Kontakt mit der Schweinehautprobe ist. Sie springt innerhalb von $150\,s$ von $\tau = 0,437 \pm 0,002\,\mu s$ auf $\tau = 0,718 \pm 0,002\,\mu s$. Dieser Lebensdauerwert liegt deutlich über der Lebensdauer in Abwesenheit von Quenchern von $\tau = 0,6\,\mu s$. Aus dieser Lebensdaueränderung kann daher geschlossen werden, dass sich die Übergangsraten des Farbstoffs in der Gewebeumgebung verändert haben. Der Grund dieser Änderung liegt wahrscheinlich in einer Verbindung des Farbstoffs mit einer Komponente der Schweinehaut. Welche Komponente jedoch den Rutheniumfarbstoff bindet, ist bisher ungeklärt. In der Abbildung ist weiter zu erkennen, dass sich die Lebensdauer auch weiter mit der Zeit verändert und pro Stunde um $0,02\,\mu s$ ansteigt. Dies könnte an der Diffusion der Farbstoffmoleküle in die Schweinehaut liegen. Die am Anfang des Verlaufs noch freien Moleküle diffundieren mit der Zeit in

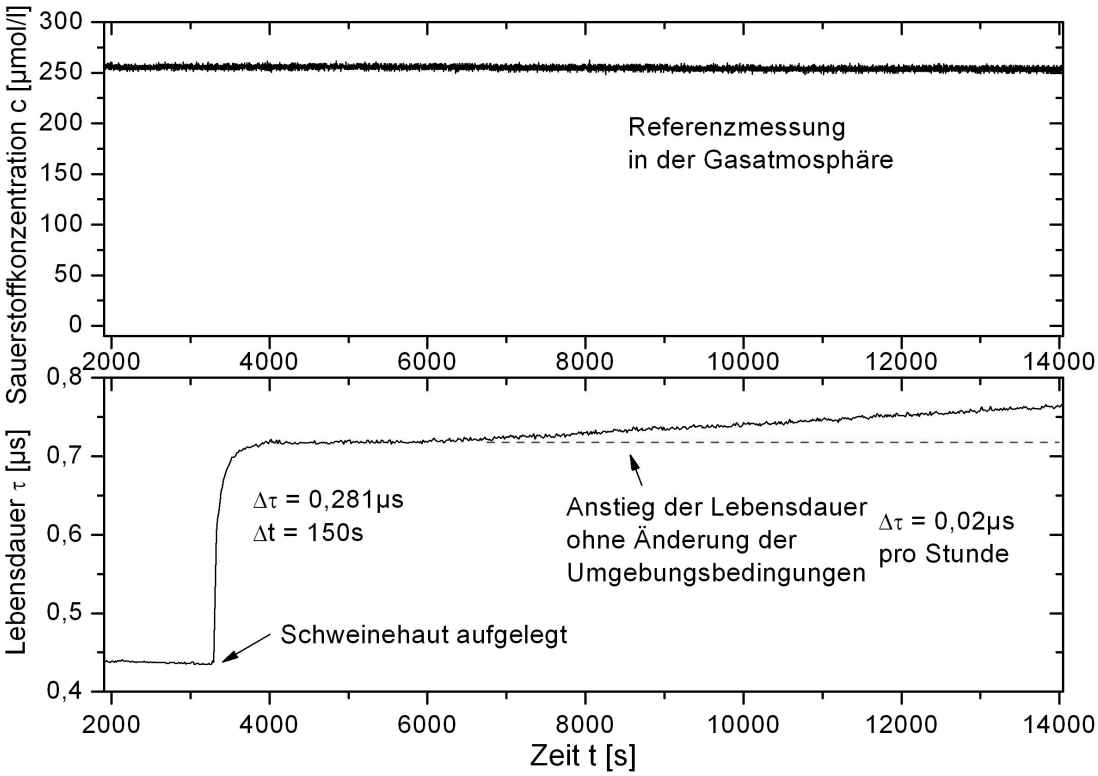


Abbildung 4.11: Änderung der Lebensdauer von $Ru(bpy)_3^{2+}$ durch das Auflegen von Schweinehaut.

die Hautschicht und verbinden sich dann mit ihr. Ob es mehrere Komponenten gibt, mit denen der Farbstoff Verbindungen eingeht, und ob die Verbindungen außerhalb oder innerhalb der Zellen liegen, ist nicht geklärt.

Die Änderung der Lebensdauer in Verbindung von $Ru(bpy)_3^{2+}$ mit der Schweinehaut, hat keinen Einfluss auf die Anwendbarkeit des Messverfahrens, wenn die Empfindlichkeit des Systems im relevanten Sauerstoffkonzentrationsbereich nicht verändert ist. Die Empfindlichkeit des Messverfahrens ergibt sich aus der Dynamik der Lebensdaueränderung, die für die Farbstoff-Schweinehautprobe in der Durchflussküvette gemessen wurde. Die Dynamik und die Ansprechzeit wurden drei Mal für die Sauerstoffkonzentrationsänderung von Luftatmosphäre (20,9 % Sauerstoff) auf 100 % Stickstoffatmospäre (0 % Sauerstoff) gemessen. Dieser Bereich von $c = 0 - 240\,\mu mol/l$ umfasst den für die PDT relevanten Konzentrationsbereich von $3 - 55\,mmHg$ ($c \approx 5 - 100\,\mu mol/l$).

Die Änderung der Sauerstoffkonzentration wurde durch das Einströmen von Stickstoffgas bewirkt, welches bedingt durch die Einströmgeschwindigkeit auf die Gewebeschicht drückt. Somit wird der Sauerstoff aus der Probe und durch den Gasauslass auch aus der Küvette herausgespült. Zwischen den Sprungantworten wurde die Küvette geöffnet, um einen schnellen Atmosphärenaustausch zu bewirken. Die Sauerstoffkonzentration änderte sich so von Stickstoffatmosphäre auf Luftatmosphäre. Da die Luft nicht durch die Gewebe-

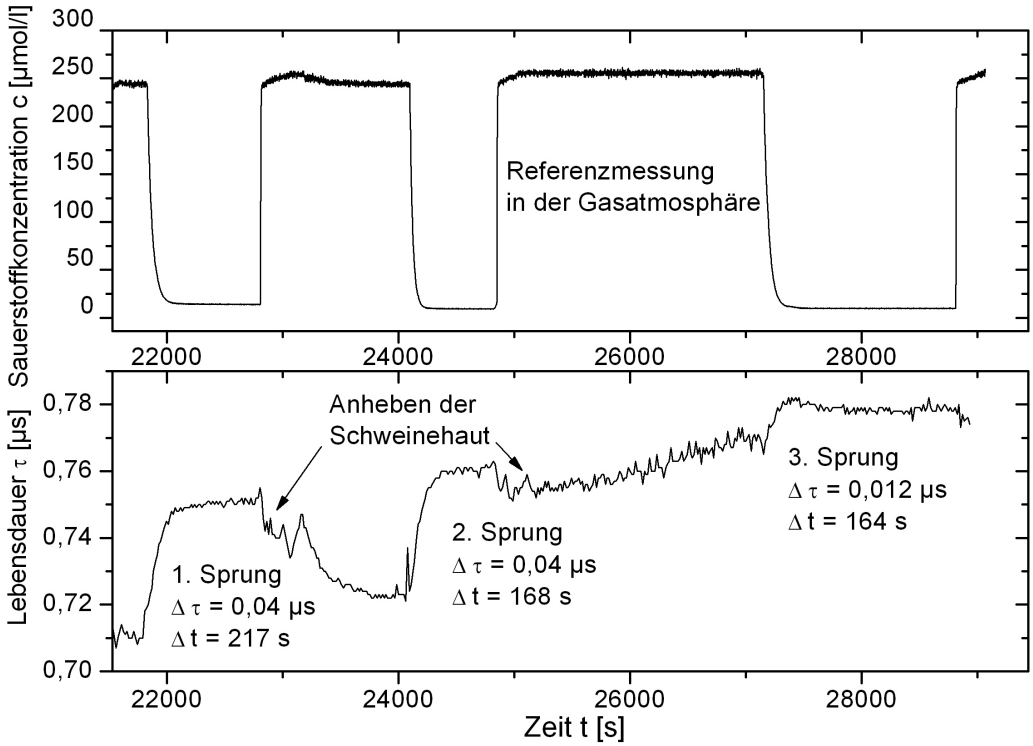


Abbildung 4.12: Bestimmung der Ansprechzeit von $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung mit aufgelegter Schweinhaut mit der Dicke $d = 500\,\mu m$. Die mittlere Ansprechzeit beträgt $\Delta t_{Res} = 183\,s$, die Dynamik der Lebensdaueränderung $\Delta\tau = 0,04\,\mu s$ für eine Änderung von Luftatmosphäre auf 0% Sauerstoff.

schicht gepresst wird, wird der Gasaustausch in der Gewebeschicht nur durch Diffusion erreicht. Da die Diffusion durch die Gewebeschicht jedoch zu lange dauern würde, wurde nach jeder Messung die Schweinehaut angehoben, um den Prozess des Gasaustausches zu beschleunigen. Einige Lebensdauerwerte, die nach den Sprungantwortmessungen berechnet wurden, zeigen daher ein verstärktes Rauschen. Dies ist durch die Bewegung der Probe während der Aufnahme der beiden Intensitätsbilder verursacht und gibt nicht den tatsächlichen Lebensdauerwert wieder. Die gemessene Lebensdauerkurve mit der Sauerstoffkonzentrationskurve ist in Abhängigkeit der Zeit in Abb. 4.12 gezeigt.

Die Ansprechzeit Δt_{Res} wurde durch die Messung von drei Sprungantworten bestimmt. Die mittlere Ansprechzeit beträgt $\Delta t_{Res} = 183\,s$, wobei die Werte um $30\,s$ schwanken. Diese Werte erscheinen recht lang für ein schnelles Monitoringmesssystem, sind aber bedingt durch verschiedene Eigenschaften im System. Erstens wird für den vollständigen Atmosphärenaustausch in der Küvette einige Zeit benötigt, zweitens wird Zeit für die Aufnahme der drei Intensitätsbilder benötigt und drittens dauert die Diffusion des Sauerstoffs aus der Flüssigkeit und aus der Schweinehautprobe einige Zeit. Letzteres ist die eigentliche Ansprechzeit des Sensors in Verbindung mit der Schweinehaut und verändert sich mit der Dicke und der Durchlässigkeit der Probe.

Die Dauer des Atmosphärenaustauschs, also die Ansprechzeit der Küvette, ist abhängig

von der Strömungsgeschwindigkeit des Gases und kann aus der Ansprechzeit des Referenzsensors bestimmt werden. Diese beträgt bei dem ersten und dritten Sprung $90\,s$, im zweiten Sprung jedoch nur $54\,s$. Die unterschiedlichen Werte für die Küvettenansprechzeit sind durch die ungenaue Einstellbarkeit des Gasstromes am Gasflussmesser bedingt. Die Dauer der Aufnahme eines Lebensdauerbildes dieser Messreihe beträgt im Durchschnitt $16\,s$. Die um die Küvettenansprechzeit reduzierte Ansprechzeit hat daher einen Fehler von $16s$. Die Werte der reduzierten Ansprechzeiten betragen $127\,s$, $114\,s$ und $74\,s$. Die mittlere Ansprechzeit des Sensorfarbstoffs mit der Schweinehautprobe der Dicke $d = 0,5\,mm$ beträgt daher $105\,s$. Die Schwankungen der Ansprechzeit des Gewebes sind darauf zurückzuführen, dass das Gewebe nicht gleichmäßig eben geschnitten ist und sich die Durchlässigkeit des Gewebes im abgebildeten Bildfeld durch das Verschieben der Probe zwischen den Sprungantworten verändert.

Die Dynamik der drei Sauerstoffkonzentrationsänderungen zeigt eine verringerte Sauerstoffempfindlichkeit der Lebensdauermessung. Während in den ersten beiden Messungen noch eine Dynamik von $\Delta\tau = 0,04\,\mu s$ auftritt, sinkt diese bei der dritten Messung auf $\Delta\tau = 0,012\,\mu s$. Die Lebensdaueränderung der ersten beiden Messungen beträgt $5\,\%$ der Lebensdauer, während die letzte innerhalb von $1,5\,\%$ liegt. Die Lebensdaueränderung liegt damit außerhalb der Fehlergrenzen des Messverfahrens von $0,4\,\%$, übersteigt diese aber nur gering. Zusätzlich steigt auch während dieser Messung ohne Änderung der Sauerstoffkonzentration die Lebensdauer weiter an. Die Änderung der Lebensdauer in der Zeit zwischen dem zweiten und dritten Sprung beträgt $\Delta\tau = 0,017\,\mu s$ in nur $32\,min$ und ist größer als der Anstieg der Lebensdauer während der letzten Sprungantwort.

Da die Schweinehautprobe nach dem Sprung zur Stickstoffatmosphäre nicht vollständig wieder mit Luft durchspült wurde, ist die Dynamik der dritten Sprungantwort wahrscheinlich verfälscht. Vermutlich fand in der Schweinehautprobe kein Gasaustausch statt, so dass diese noch mit Stickstoff angereichert war. Die Lebensdauer vor dem Sprung entspricht daher nicht der Sauerstoffkonzentration von Luft, sondern einer Mischkonzentration. Die Dynamik des dritten Sprungs ist aus diesem Grunde kleiner als die der ersten beiden Sprungantworten. Die Dynamik der Sprungantworten wird daher mit $\Delta\tau = 0,04\,\mu s$ angegeben. Diese ist gegenüber der Dynamik der reinen Farbstofflösung verringert, die einen Wert von $\Delta\tau = 0,19\,\mu s$ hat. Dies entspricht einer Lebensdaueränderung von $45\,\%$, die in Verbindung mit Schweinehaut auf $5\,\%$ abfällt.

Da die Lebensdauer auch bei gleichbleibender Sauerstoffkonzentration nicht konstant ist und die Empfindlichkeit der Messung in Verbindung mit der Schweinehaut verringert ist, ist der Farbstoff $Ru(bpy)_3^{2+}$ für direkte Messungen der Sauerstoffkonzentration an *in vitro* Gewebeproben nicht geeignet. Ob diese verringerte Dynamik und die Änderung der Lebensdauer jedoch bei *in vivo* Messungen und an lebenden Zellen ebenfalls auftritt, muss in weiteren Untersuchungen überprüft werden. In einem ersten Schritt wurden hierfür humane

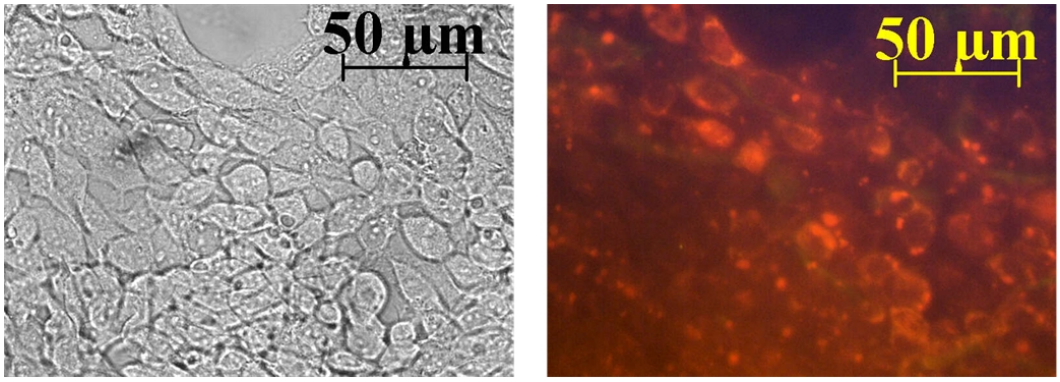


Abbildung 4.13: Natives (links) und Lumineszenzbild (rechts) von mit $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung inkubierten humanen Ösophaguskarzinomzellen aufgenommen mit einem hochauflösenden Fluoreszenzmikroskop.

Ösophaguskarzinom-Zellkulturen (Kyse-140, human esophageal squamous cell carcinoma) mit dem Farbstoff inkubiert.

Die Beobachtung der Zellen mit einem hochauflösenden Fluoreszenzmikroskop zeigte eine Anlagerung des Farbstoffs an der Zellmembran, so dass Sauerstoffkonzentrationsmessungen direkt an den Zellen möglich erscheinen. Das mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommene native und das Lumineszenzbild der inkubierten Ösophaguskarzinomzellen, die die Anlagerung zeigen, sind in Abb. 4.13 dargestellt. Weiter zeigte die Messung, dass die Zellen auch nach einigen Stunden Inkubationszeit nicht durch den Farbstoff starben. Ob aber eine Messung an Zellen Erfolg hat und die Dynamik für Sauerstoffkonzentrationsmessungen ausreicht, muss in weiteren Experimenten, für die das System an ein hochauflösendes Mikroskop angebaut werden muss, geprüft werden. Durch eine geringe Adaption des Lumineszenzlebensdauermesssystems ist der Anbau an ein hochauflösendes Fluoreszenzmikroskop, mit welchem die Zellexperimente durchgeführt werden können, möglich. Sollten diese Experimente erfolgreich verlaufen, könnten sie zur Aufklärung der während der PDT an den Zellen direkt stattfindenden Prozesse beitragen.

4.2 Charakterisierung des Systems mit der FOXY-SGS-M-Schicht

Die Farbstoffschicht FOXY-SGS-M, im weiteren FOXY-Schicht genannt, ist als Sensorplättchen in der Größe eines Mikroskopobjektträgers bei der Firma Ocean Optics erhältlich. Sie ist nach Herstellerangaben für die Messung von Sauerstoff in Gasen und in wässrigen Lösungen im Bereich von $0-760\,mmHg$ geeignet. Für die Messungen in der Durchflussküvette wurde der Objektträger auf die Größe von ca. $25\cdot 25\,mm^2$ zugeschnitten, für Messungen in der Kalibrierküvette auf $9\cdot 25\,mm^2$. Die Schichten wurden in die jeweilige Küvette gelegt

und fixiert und wässrige Lösungen mit physiologisch relevanten pH-Werten in die Küvette pipettiert. Die Küvetten mit den in die Lösungen eingelegten Schichten wurden anschließend mittels des Thermostaten auf die gewünschte Temperatur erwärmt.

Die Untersuchung des Abklingverhaltens, die Messungen zur pH-Wert-Abhängigkeit und die ersten Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit wurden, wie auch beim Farbstoff $Ru(bpy)_3^{2+}$, in der Durchflussküvette durchgeführt. Die gewünschte Sauerstoffkonzentration wurde durch das Sprudeln von Sauerstoff- bzw. Stickstoffgas in die Lösung eingestellt, wobei auch hier die Sprudelzeit auf Grund der Verdunstung der wässrigen Lösungen auf 5 Minuten begrenzt war. Für die Aufnahme eines Stern-Volmer-Graphen wurden 10 Sauerstoffkonzentrationen eingestellt und sowohl die Abklingkurven vermessen, als auch die Lebensdauer nach der RLD-Methode τ_{RLD} bestimmt. Die genaueren Messungen zur Temperaturabhängigkeit der Stern-Volmer-Charakteristik wurden ebenfalls in der Kalibrierküvette durchgeführt. Die Bestimmung der Ansprechzeit erfolgte jedoch wieder mit der Durchflussküvette, da in dieser eine geschlossene Gasatmosphäre eingestellt werden kann.

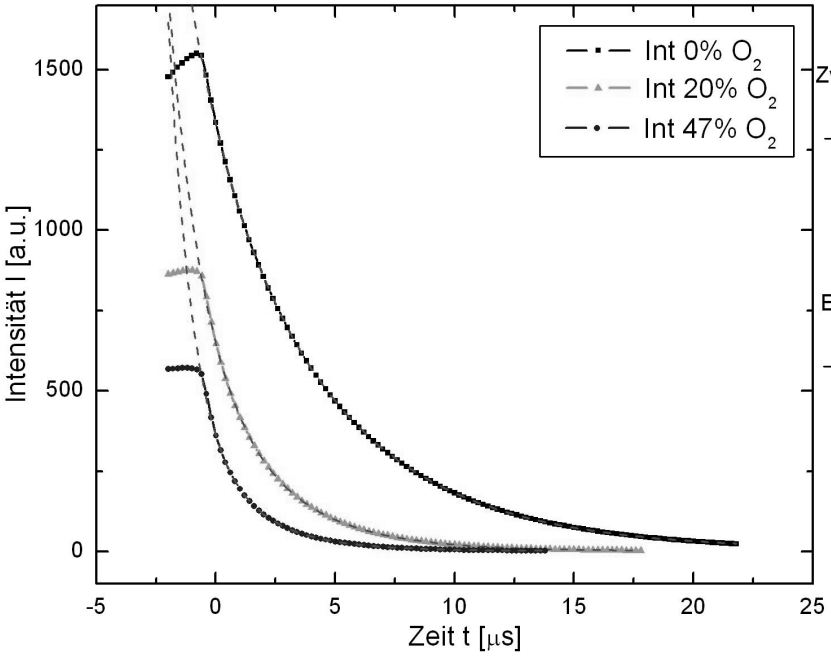
4.2.1 Untersuchung des Abklingverhaltens

Die zweidimensionale Messung der molekularen Sauerstoffkonzentration beruht auf der Bestimmung der Lumineszenzlebensdauer τ nach der Rapid-Lifetime-Determination-Methode. Für die Anwendung der Methode ist das einfach exponentielle Abklingverhalten der Lumineszenz Bedingung. Bei der Farbstoffschicht FOXY-SGS-M ist dies nicht gegeben, wie in Abb. 4.14 gezeigt ist. Die Lumineszenz klingt bei diesem Farbstoff näherungsweise zweifach exponentiell ab, wobei die Lebensdauern τ_1 und τ_2 die Abklingzeiten der einzelnen exponentiellen Anteile beschreiben.

$$I(t) = I_{0,1}e^{-t/\tau_1} + I_{0,2}e^{-t/\tau_2} \tag{4.8}$$

Das mehrfach exponentielle Abklingverhalten beruht auf mindestens zwei unterschiedlichen Zuständen der Farbstoffmoleküle in der Sol-Gel-Schicht. Die Sol-Gel-Schichten sind durch Poren sauerstoffpermeabel, wobei die Porengröße und -dichte, sowie die Schichtdicke von den Komponenten und der Herstellung der Sol-Gel-Schichten abhängen. Die Farbstoffmoleküle können an oder neben den Poren angeordnet sein, so dass sich ihre Wirkungsquerschnitte mit den durch die Poren in die Schicht diffundierenden Sauerstoffmoleküle unterscheidet. Aus diesem Grunde können dem Abklingverhalten noch weitere exponentielle Anteile zu Grunde liegen, die aber bei dieser Farbstoffschicht innerhalb des Rauschens liegen.

Sind die Lebensdauern τ_1 und τ_2 beide wie im vorliegenden Fall abhängig von der Sauerstoffkonzentration, so kann die RLD-Methode dennoch für die Sauerstoffkonzentrationsbestimmung verwendet werden. Hierfür müssen lediglich die Integrationszeiten t_1 und t_2, sowie die Separation der Integrationszeiten Δt für die Lebensdauerbestimmung fest einge-



Zweifach exponentiell angepasst:

O_2	τ_1	τ_2
0%	5,27 ± 0,02	1,69 ± 0,04
20%	3,26 ± 0,02	1,36 ± 0,02
47%	2,50 ± 0,01	0,95 ± 0,01

Einfach exponentiell angepasst:

O_2	τ_{Fit}	τ_{RLD}
0%	5,02 ± 0,02	4,47 ± 0,05
20%	2,67 ± 0,02	2,33 ± 0,05
47%	1,92 ± 0,03	1,66 ± 0,05

Abbildung 4.14: Darstellung der Abklingkurven der FOXY-Schicht für 47%, 20% und 0% Sauerstoffatmosphäre. Die Lebensdauern liegen im Bereich von $\tau = 2-5\,\mu s$. Die an die Messwerte angepassten einfach exponentiellen Modellkurven sind rot dargestellt.

stellt werden. Die so bestimmte Lebensdauer entspricht keiner physikalischen Lebensdauer, sondern einer Mischung aus den beiden Lebensdauern τ_1 und τ_2. Um die Messparameter an den Wertebereich der Lebensdauern der FOXY-Schicht anzupassen, wurde an die zweifach exponentiellen Abklingkurven eine einfach exponentielle Modellkurve angepasst. Die so ermittelte Lebensdauer τ_{Fit} wurde anschließend mit der berechneten Lebensdauer τ_{RLD} verglichen. Das Messparameterset, bestehend aus den Integrationszeitpunkten t_1 und t_2 sowie der Separationszeit Δt, bei dem die Abweichung der Lebensdauer τ_{RLD} von der Lebensdauer τ_{Fit} im gesamten Sauerstoffkonzentrationsbereich am geringsten ist, liefert den kleinsten Fehler der Lebensdauerbestimmung und wurde für die Messungen verwendet. Die Lebensdauer τ_{RLD} ist bei diesem Parameterset stets kleiner als die Lebensdauer τ_{Fit}, was durch die Wahl der Zeitpunkte t_1 und t_2 bedingt ist. Diese sind zeitlich kurz nach dem Pulsende gelegt, um eine möglichst hohe Intensität in beiden Integrationszeitfenstern zu erhalten und so das Signal-zu-Rauch-Verhältnis zu maximieren. Da jedoch im ersten Teil des Lumineszenzabfalls auf Grund des zweifach exponentiellen Verhaltens die Lumineszenz steiler abfällt als ein vergleichbarer einfach exponentieller Abfall, ist die Lebensdauer kürzer als die aus der Modellkurve ermittelte Lebensdauer τ_{Fit}. Die einfach exponentielle Modellkurve liegt, um die Fehler der Anpassung an die Messwerte im gesamten Abfall zu minimieren, näher an dem tatsächlichen Verlauf der zweifach exponentiellen Abklingkurve und verläuft daher im ersten Teil des Abfalls flacher. Die ermittelte Lebensdauer τ_{Fit} ist daher größer als die

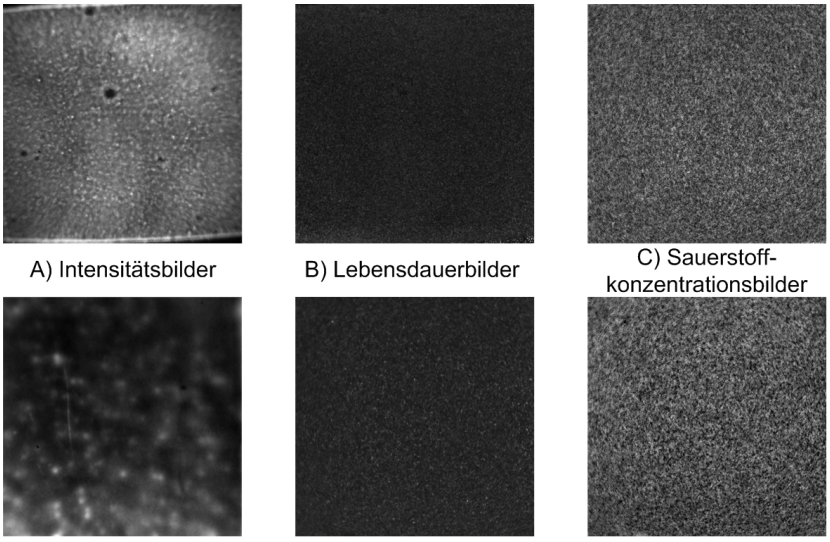


Abbildung 4.15: Beispiele von Intensitäts- (A), Lebensdauer- (B) und Sauerstoffkonzentrationsbildern (C) der FOXY-Schicht, gemessen in der Durchfluss- (oben) und der Kalibrierküvette (unten).

Lebensdauer τ_{RLD}.

Die Lebensdauern τ_1 und τ_2 sind beide, wie die Abb. 4.14 zeigt, abhängig von der Sauerstoffkonzentration, so dass die Lebensdauern τ_{Fit} und τ_{RLD} ebenfalls von dieser abhängig sind. Die Dynamik der Lebensdauer beträgt $4\,\mu s$ mit Lebensdauern von $\tau_{RLD} = 1-5\,\mu s$ im Bereich von $0-100\,\%$ Sauerstoff. Die Dynamik ist damit größer als bei der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung, wobei die Lebensdauern selbst um den Faktor 10 größer sind. Im PDT-relevanten Sauerstoffkonzentrationsbereich von $c = 0-100\,\mu mol/l$ beträgt die Dynamik ca. $1,5\,\mu s$ mit Lebensdauern zwischen $\tau = 3,5-5\,\mu s$.

Die Konzentration des Farbstoffs in der Sol-Gel-Schicht hat einen Einfluss auf die Lumineszenzintensität, ist aber, da die Schichten käuflich erworben werden, nicht veränderbar. Die Lumineszenzintensität der FOXY-Sol-Gel-Schichten kann jedoch durch Auswaschen der Farbstoffmoleküle aus der Schicht und durch Photodegradation mit der Zeit geringer werden. Letztere ist nach Herstellerangaben unter anderem bedingt durch das Anregungslicht, welches daher in seiner Leistung minimiert werden soll. Weiter kann die Schicht durch Verschmutzungen und Abrieb verändert werden, was sich ebenfalls in der Photodegradation des Farbstoffs zeigen kann. Durch Alterungsprozesse des Sol-Gels kann sich die Lebensdauer der Schicht zusätzlich verändern. Aus diesem Grunde wurde die Lumineszenzintensität, sowie die Lebensdauer τ_{RLD} über 8 Stunden kontinuierlich gemessen. Diese Messung zeigte keine Intensitätsabnahme oder Lebensdaueränderung, so dass Messungen kontinuierlich über den gesamten Tag erfolgen können.

Die angegebenen Werte für die Dynamik und die Mittelwerte der Lebensdauern und der Intensitäten sind abhängig vom abgebildeten Ausschnitt der Sol-Gel-Schicht. In der Durchflussküvette wird ein Bildfeld von $25 \cdot 25\,mm^2$ abgebildet, welches eine homogene Inten-

sitäts- sowie Lebensdauerverteilung im Bildfeld zeigt. Die mittlere Intensität und die mittlere Lebensdauer schwanken daher bei diesem Bildfeld nur gering ($3,3\,\%$ bzw. $0,6\,\%$) bei einer Änderung des Schichtausschnitts. Dies ist jedoch in der Kalibrierküvette nicht der Fall. Hier wird bei dem abgebildeten Bildfeld von nur $5 \cdot 5\,mm^2$ die inhomogene Verteilung der Farbstoffmoleküle innerhalb der Schicht deutlich. Laut Hersteller sollte die Verteilung homogen sein, der Farbstoff sammelt sich jedoch in Clustern, so dass die Anzahl der abgebildeten Cluster die Mittelwerte der Intensitäten und der Lebensdauer des Bildfeldes beeinflusst. Der Fehler der Intensitätsmittelwerte, bedingt durch die Wahl des Schichtausschnitts, beträgt daher für Messungen in der Kalibrierküvette $10\,\%$, der Fehler der mittleren Lebensdauer $1,2\,\%$. Beispiele der Intensitäts- und der Lebensdauerbilder, gemessen in der Durchfluss- und der Kalibrierküvette, sind in Abb. 4.15 gezeigt.

Da die Auswahl des Schichtausschnitts bereits innerhalb einer Schichtprobe einen Einfluss auf die gemessenen Mittelwerte hat, ist leicht verständlich, dass auch die Auswahl der Schichtprobe selbst einen Einfluss auf diese hat. Die Intensität und Lebensdauer einer Schichtprobe können zusätzlich durch Verschmutzung, Abrieb und Auswaschung und durch den Alterungsprozess des Sol-Gels verändert werden, so dass die Herstellergarantie für die Proben auf ein Jahr festgelegt ist. Die Kalibrierkurven für die abgebildeten Schichtausschnitte sind daher stets nur für diese gültig und nur für einen begrenzten Zeitraum.

4.2.2 Abhängigkeit der Lebensdauer vom pH-Wert

Die Abhängigkeit der Lebensdauer und der Stern-Volmer-Charakteristik vom pH-Wert wurde für die FOXY-Schicht für den physiologisch relevanten pH-Wertebereich von $4-7,5$ untersucht. Die Messungen wurden für die Temperaturen $T = 25\,°C$, $32\,°C$ und $38\,°C$ jeweils für die pH-Werte 4, 5,5 und 7,5 durchgeführt. Exemplarisch sind die Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen für $T = 32\,°C$, die mittlere Hauttemperatur des Menschen, in Abb. 4.16 gezeigt.

Die Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen der FOXY-Schicht für verschiedene pH-Werte zeigen, dass keine pH-Wert-Abhängigkeit der Lebensdauer sowie der Stern-Volmer-Charakteristik innerhalb der Fehlergrenzen des Messverfahrens zu erkennen ist. Der pH-Wert, bzw. örtliche Schwankungen des pH-Werts haben daher keinen Einfluss auf die zweidimensionale Messung der Sauerstoffkonzentration mittels der FOXY-Schicht, so dass diese für Messungen an menschlichem Gewebe gut geeignet ist.

Die Kalibrierkurven weisen im Gegensatz zur denen der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen keine einfache $1/[O_2]$-Abhängigkeit nach Gl. 3.7 auf. Statt dessen ist der Verlauf durch folgenden Zusammenhang gegeben:

$$\tau = \frac{1}{A(T) + B(T)[O_2] + C(T)[O_2]^2} = \frac{1}{\frac{1}{\tau_0} + \frac{K_{SV,1}+K_{SV,2}}{\tau_0}[O_2] + \frac{K_{SV,1} \cdot K_{SV,2}}{\tau_0}[O_2]^2} \tag{4.9}$$

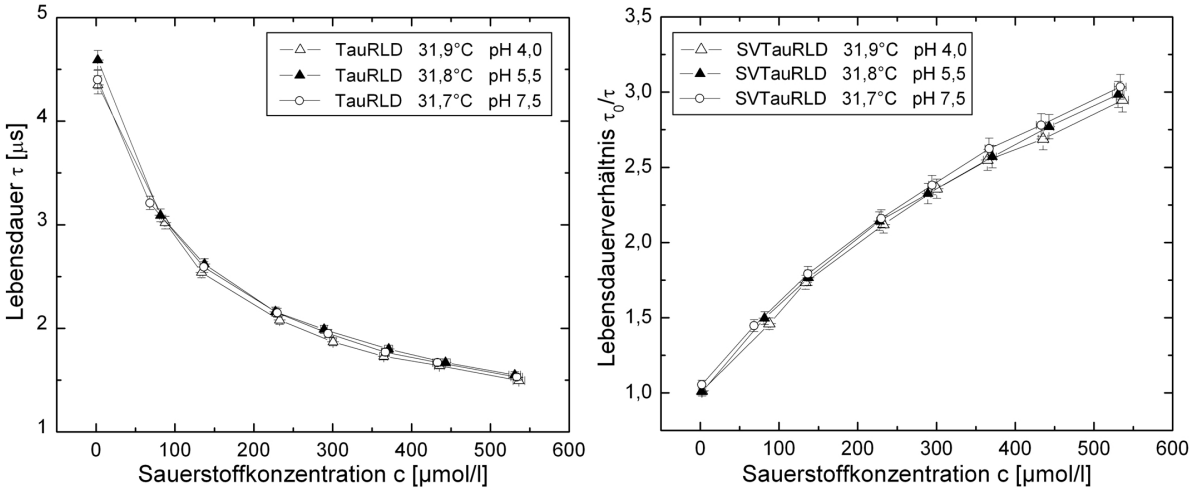


Abbildung 4.16: Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen der FOXY-Schicht für $T = 32°C$ und für die pH-Werte 4,0, 5,5 und 7,5.

Die Ursache dieses Verlaufs liegt in den zwei Zuständen des Farbstoffs in der Schicht. Da zwei Farbstoffzustände vorliegen, die beide durch Sauerstoff gequencht werden, ist die Stern-Volmer-Charakteristik durch zwei Stern-Volmer-Konstanten $K_{SV,1}$ und $K_{SV,2}$ gegeben, die sich beide auf die Intensitäten und die einfach exponentiell angepassten Lebensdauern τ_{Fit} und τ_{RLD} auswirken.

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = (1 + K_{SV,1}[O_2]) \cdot (1 + K_{SV,2}[O_2]) \tag{4.10}$$

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + (K_{SV,1} + K_{SV,2})[O_2] + K_{SV,1} \cdot K_{SV,2}[O_2]^2 \tag{4.11}$$

Die Stern-Volmer-Charakteristik ist daher ebenfalls nicht linear und kann nur mit einem großen Fehler durch eine einfache Stern-Volmer-Konstante beschrieben werden. Der Hersteller selbst gibt für die Kalibrierung der Schicht zwei Möglichkeiten an:

1. Die Kalibrierung kann durch die Messung von zwei Werten erfolgen, wobei einer bei 0% und einer im hohen Konzentrationsbereich des relevanten Messbereichs liegen sollte. Die Kalibrierkurve ist durch die Anpassung der einfachen $1/[O_2]$-Abhängigkeit nach Gl. 3.7 gegeben. Die Stern-Volmer-Charakteristik ist dann linear.

2. Die Kalibrierung kann durch drei Messwerte erfolgen. Ein Wert sollte dabei bei 0% und einer im hohen Konzentrationsbereich des relevanten Messbereichs liegen. Die Kalibrierkurve ist durch die $[O_2]$-Abhängigkeit nach Gl. 4.9 gegeben. Die Stern-Volmer-Charakteristik folgt dann dem Verlauf eines Polynoms zweiter Ordnung.

Die zweite Kalibrierungsmethode ist genauer, es wird aber eine dritte fest eingestellte Sauerstoffkonzentration benötigt. Für eine schnelle und einfache Kalibrierung ist sie daher nicht

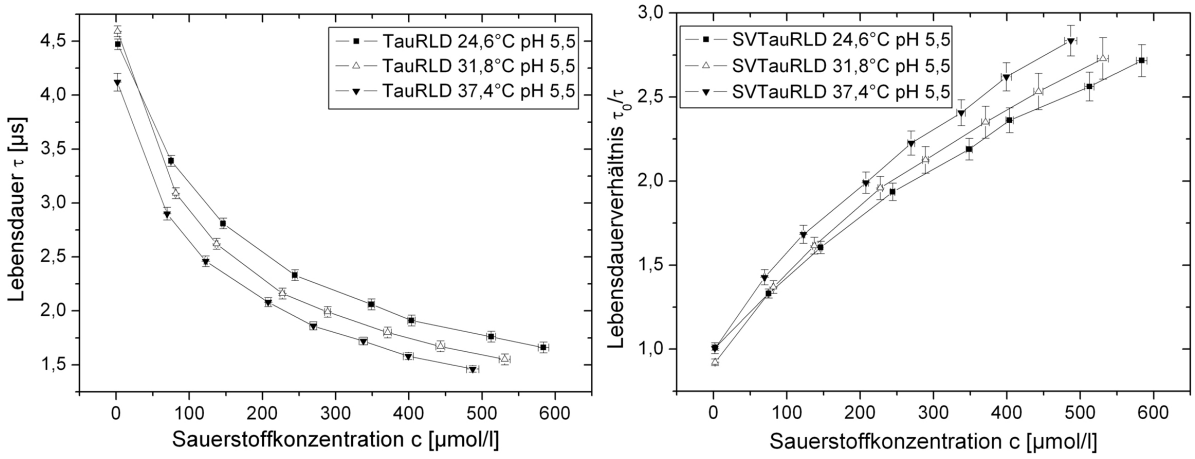


Abbildung 4.17: Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen der FOXY-Schicht, gemessen in der Durchflussküvette für den pH-Wert 5,5 und die Temperaturen $24,6°C$, $31,8\,°C$ und $37,4\,°C$.

geeignet. Der Fehler der ersten Methode dagegen ist beschränkt auf den hohen Konzentrationsbereich, bei dem die Stern-Volmer-Charakteristik von dem geraden Verlauf abweicht. Im für die PDT relevanten Sauerstoffkonzentrationsbereich von $c < 100\,\mu mol/l$ weicht die Stern-Volmer-Charakteristik nur gering von einer Geraden ab und diese Abweichung liegt innerhalb der Fehlergrenzen des Messverfahrens. Zur Kalibrierung der FOXY-Schicht für Anwendungen an menschlichem Gewebe wird daher eine lineare Kalibrierung mit den Werten 0% und 20,9% Sauerstoffkonzentration (Luftatmosphäre, $c \sim 240\,\mu mol/l$) vorgeschlagen. Diese Methode ist einfach und schnell zu realisieren und bietet darüber hinaus die Möglichkeit, die verwendete Schicht schnell auszuwechseln.

4.2.3 Abhängigkeit der Lebensdauer von der Temperatur

Die Temperaturabhängigkeit der Lebensdauer und der Stern-Volmer-Charakteristik des FOXY-Sensors wurde in der Durchfluss- und in der Kalibrierküvette untersucht. Für die Untersuchung des Temperatureinflusses im für die PDT relevanten Bereich von $T = 27 - 37\,°C$ wurden die Temperaturen $25\,°C$, $32\,°C$ und $37\,°C$ ausgewählt und der Einfluss in der Durchflussküvette untersucht. Diese ausgewählten Werte entsprechen der Zimmertemperatur, der mittleren Hauttemperatur und der Körpertemperatur des Menschen, bzw. von Zellkulturen. Die Messungen erfolgten für die pH-Werte 4, 5,5 und 7,5, wobei sich kein Einfluss des pH-Werts auf die Stern-Volmer-Charakteristik zeigte. Für die genauere Untersuchung des Temperatureinflusses wurde ein Stück des FOXY-Sensors abgeschnitten und in der Kalibrierküvette fixiert. Hierfür wurden die Temperaturen $25,5\,°C$, $32\,°C$, $37\,°C$ und $40\,°C$ und der pH-Wert 5,5 ausgewählt. Die in der Durchflussküvette gemessenen Kalibrier- und Stern-Volmer-Graphen sind für den pH-Wert 5,5 in Abb. 4.17 gezeigt.

Die Ergebnisse zur Temperaturabhängigkeit zeigen, dass auch bei dem FOXY-Sensor ei-

ne Temperaturabhängigkeit der Kalibrier- und der Stern-Volmer-Kurven vorhanden ist. Diese ist jedoch kleiner als die der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen, wobei die Lebensdauern ebenfalls mit steigender Temperatur sinken, so dass bei höheren Temperaturen die Kalibrierkurven zu kleineren Lebensdauern hin verschoben sind. Die Form der Kalibrierkurve ist unabhängig von der Temperatur durch den Zusammenhang in Gl. 4.9 gegeben und folgt nicht der einfachen $1/[O_2]$-Abhängigkeit. Für die Stern-Volmer-Kurve ergibt sich daher keine Gerade und auch keine einfache Stern-Volmer-Konstante. Da die Abweichung der Stern-Volmer-Kurve von einer Geraden im für die PDT relevanten Bereich von $c < 100\,\mu mol/l$ nur gering ist und innerhalb der Fehlergrenzen des Messverfahrens liegt, wird für die Kalibrierung der FOXY-Schichten die lineare Kalibrierung im Bereich von $0-20,9\,\%$ Luftatmosphäre vorgeschlagen. Im Konzentrationsbereich von $c = 0-230\,\mu mol/l$ wurde daher die Stern-Volmer-Kurve linear angepasst und die Stern-Volmer-Konstante K_{SV} nach dem Zusammenhang in Gl. 3.7 bestimmt. Diese steigt mit zunehmender Temperatur an, während die Lebensdauer τ_0 und die Dynamik der Lebensdaueränderung im gesamten Konzentrationsbereich abnehmen. Im für die PDT relevanten Konzentrationsbereich von $c = 0-100\,\mu mol/l$ steigt die Dynamik der Lebensdaueränderung mit steigender Temperatur an, da die $1/[O_2]^2$-Abhängigkeit der Kalibrierkurven mit steigender Temperatur zunimmt. Der Einfluss des Kalibrierparameters $C(T) = K_{SV,1} \cdot K_{SV,2}$ steigt mit steigender Temperatur stärker an als der des Parameters $B(T) = K_{SV,1} + K_{SV,2}$. Dies zeigt sich in einem mit der Temperatur steigenden Abfall der Kalibrierkurven im Bereich kleiner Sauerstoffkonzentrationen.

Die gemessenen Stern-Volmer-Graphen für die drei Temperaturen liegen dicht beieinander und können zum Teil innerhalb des Fehlerbereichs nicht voneinander unterschieden werden. Die Abhängigkeit der Stern-Volmer-Charakteristik von der Temperatur ist kleiner als bei der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung, so dass eine geringere Temperaturstabilität für die Messung nötig ist. Der Hersteller fordert aus diesem Grunde für die Messung mit der FOXY-Schicht nur eine Temperaturstabilität von $\pm 3°C$ und erst für größere Schwankungen eine kontinuierliche Messung der Temperatur im Messbereich. Bei der Einhaltung der Temperatur im Bereich von $\pm 3°C$ ist das Messverfahrens unter Verwendung des FOXY-Sensors der Temperatur gegenüber unempfindlicher als unter Verwendung der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung und daher besser geeignet für Messungen an menschlichem Gewebe. Für Messungen an Zellkulturen ist die Schicht ebenso geeignet, wobei die Messung auf Grund der Einbettung des Farbstoffs nicht an oder in den Zellen, sondern nur an der Oberfläche der Zellkulturen erfolgen kann.

Die exaktere Messung der Temperaturabhängigkeit der FOXY-Schicht im für die PDT relevanten Temperaturbereich erfolgte in der Kalibrierküvette. Hierfür wurde ein Stück der Schicht abgeschnitten und in der Küvette fixiert. Dann wurde die wässrige Lösung mit dem pH-Wert 5,5 zugegeben und die Küvette auf die Temperaturen $25,5\,°C$, $32\,°C$, $37\,°C$, bzw. $40\,°C$ temperiert. Die Messung der Lebensdauer für die verschiedenen Sauerstoffkonzentra-

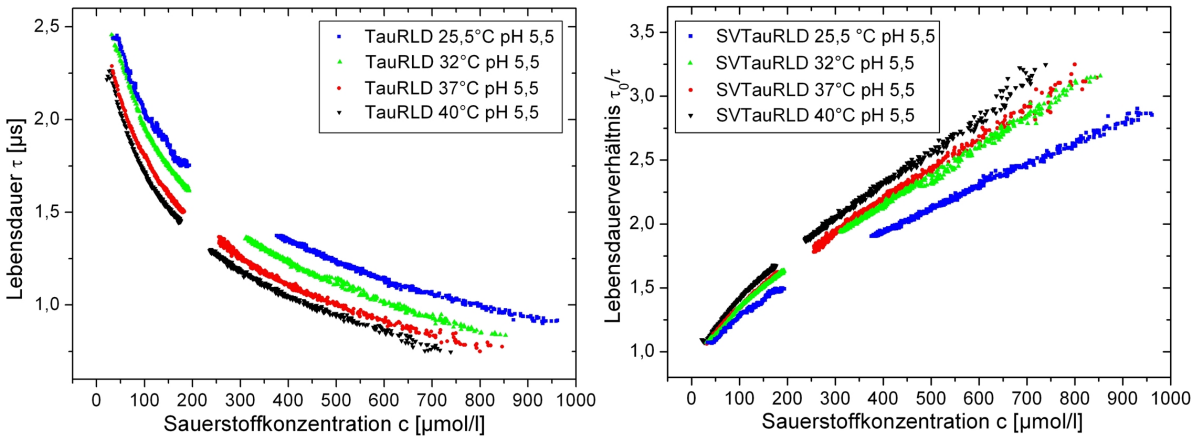


Abbildung 4.18: Kalibrierkurven und Stern-Volmer-Graphen der FOXY-Schicht, gemessen in der Kalibrierküvette für den pH-Wert 5,5 und die Temperaturen $25,5\,°C$, $32\,°C$, $37\,°C$ und $40\,°C$.

tionen wurde, wie auch bei der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung, durch das Sprudeln mit Sauerstoff-, bzw. Stickstoffgas und anschließender Sauerstoffdiffusion durchgeführt. Der zeitliche Abstand der Messwerte beträgt ebenfalls $30\,s$ und die Gesamtdauer einer Messung 10-12 Stunden.

Bei den Messungen in der Kalibrierküvette hat der abgebildete Schichtausschnitt auf Grund des kleinen Bildfeldes von $5 \cdot 5\,mm^2$ und der inhomogenen Verteilung des Farbstoffs in der Schicht einen Einfluss auf die Mittelwerte der Intensität und der Lebensdauer. Die gemessenen Werte für die Lebensdauern τ und τ_0 und die Stern-Volmer-Konstante K_{SV} gelten daher nur für den abgebildeten Schichtausschnitt und können nur unter Verwendung desselben Schichtausschnitts miteinander verglichen werden. Für die spätere Verwendung der Schicht bedeutet dies, dass vor jeder Messung eine Kalibrierung erfolgen oder der Schichtausschnitt exakt eingehalten werden muss. Die Messung der Temperaturabhängigkeit der FOXY-Schicht wurde deshalb für einen fest eingestellten Schichtausschnitt durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 4.18 gezeigt. Für die Bestimmung der Stern-Volmer-Konstanten wurden auch diese Stern-Volmer-Graphen im Bereich von $c = 0 - 200\,\mu mol/l$ linear angepasst.

Die geringe Abhängigkeit der Stern-Volmer-Graphen von der Temperatur zeigt sich auch in diesen Messungen, wobei die Kurven für die Temperaturen $T = 32\,°C$ und $T = 37\,°C$ im Konzentrationsbereich von $c < 230\,\mu mol/l$ nicht voneinander unterschieden werden können. Eine Abweichung der Temperatur um $5\,°C$ wirkt sich daher nicht auf die gemessene Lebensdauer aus. Für die Verwendung des Systems während der PDT bedeutet dies, dass bei einer Therapie ohne Kühlung oder unter Verwendung eines Kühlsystems mit nur geringer Kühlwirkung das Lebensdauermesssystem ohne Temperaturkontrolle für die Messung der Sauerstoffkonzentration verwendet werden kann. Eine einmalige lineare Kalibrierung des verwendeten Sensorplättchens mit den Messwerten bei $0\,\%$ und $20,9\,\%$ Luftatmosphäre kann vor der Therapie erfolgen, und es wird keine Temperaturkorrektur benötigt.

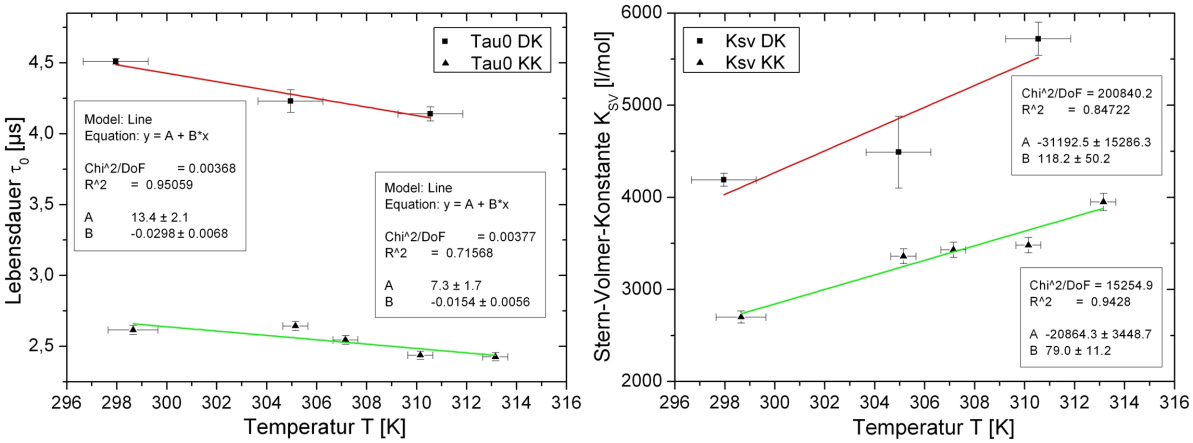


Abbildung 4.19: Temperaturabhängigkeit der Lebensdauer τ_0 und der Stern-Volmer-Konstanten K_{SV} der FOXY-Schicht mit dem pH-Wert 5,5. Die Werte für $T = 24,6°C$, $31,8°C$ und $37,4°C$ sind mit der Durchflussküvette gemessen, die anderen Werte in der Kalibrierküvette. Die in der Kalibrierküvette gemessenen Werte sind bei einem fest eingestellten Schichtausschnitt durchgeführt worden.

Die in der Durchfluss- und in der Kalibrierküvette ermittelten Werte der Lebensdauern τ_0 und der Stern-Volmer-Konstanten K_{SV} sind in Abb. 4.19 in Abhängigkeit der Temperatur dargestellt. Diese Abbildung zeigt, dass die Lebensdauer τ_0 mit steigender Temperatur sinkt, während die Stern-Volmer-Konstante K_{SV} ansteigt. Der Zusammenhang ist für beide Werte innerhalb des untersuchten Temperaturbereichs linear und ähnelt damit dem der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung. Der Grund hierfür liegt in der thermischen Deaktivierung des Triplettzustands, der eine Vergrößerung der thermischen Übergangsrate k_{dd} und damit eine Verkürzung der Lebensdauer τ_0 zur Folge hat. Die Stern-Volmer-Konstante K_{SV}, die sich aus der Lebensdauer τ_0 und der dynamischen Quenchingkonstante k_q zusammensetzt, steigt, da der Einfluss der Quenchingkonstanten größer als der der Lebensdauer ist.

Der Fehler der Lebensdauerwerte τ_0 ergibt sich für die in der Durchflussküvette gemessenen Werte aus dem Messfehler der Lebensdauer τ. Der Grund hierfür liegt in der geringen Anzahl an Messwerten für die Anpassung der Modellkurven an die Lebensdauerwerte und damit für die Bestimmung der Lebensdauer τ_0. Die in der Kalibrierküvette gemessenen Werte unterliegen der Wiederherstellung des Schichtausschnitts für die Messreihen bei den verschiedenen Temperaturen, so dass die Schwankungen der Lebensdauern auf dem Einfluss des Schichtausschnitts beruhen. Der Fehler der Lebensdauer bedingt durch den Schichtausschnitt und damit der Lebensdauer τ_0 beträgt daher $1,2\%$. Die Stern-Volmer-Konstante K_{SV} setzt sich aus der Lebensdauer τ und der berechneten Lebensdauer τ_0 zusammen, so dass sich die Fehler dieser addieren und den Fehler der Stern-Volmer-Konstanten ergeben. Für die in der Kalibrierküvette gemessenen Werte beträgt er daher $2,4\%$. Der Fehler der eingestellten Temperaturen beträgt, wie bei den Messungen mit dem ersten Farbstoff, $1,3\,°C$ in der Durchflussküvette, bzw. $0,5\,°C$ in der Kalibrierküvette. Der Fehler des in der Kali-

brierküvette gemessenen Werts bei $25,5\,°C$ beträgt jedoch $1\,°C$, da die Temperatur während der Messzeit einem Temperaturdrift von $1\,°C$ unterlag.

Der Vergleich der mit der Durchfluss- und der Kalibrierküvette gemessenen Werte der Lebensdauer τ_0 und der Stern-Volmer-Konstanten K_{SV} zeigt den Einfluss der Schichtalterung und des Schichtausschnitts auf die Werte. Die in der Kalibrierküvette gemessenen Werte liegen deutlich unterhalb der in der Durchflussküvette gemessenen Werte, da sie ca. 9 Monate später gemessen wurden und mit der Zeit die Dynamik und die Lebensdauer der Schicht sinken. Die Werte sind daher nicht miteinander vergleichbar und wurden getrennt voneinander durch Modellgeraden angepasst. Der Abfall der Lebensdauer τ_0 sowie der Anstieg der Stern-Volmer-Konstanten K_{SV} mit der Temperatur ist für beide Messreihen jedoch ähnlich, und die Steigungen der Modellgeraden liegen innerhalb der Fehlergrenzen voneinander.

Für die Verwendung des Messsystems mit dem FOXY-Sensor bedeutet dies, dass eine Kalibrierung des Sensors vor jeder Messreihe erfolgen muss, da die Werte für τ_0 und K_{SV} nicht aus den Modellgeraden berechnet werden können. Lediglich die Abhängigkeit der Kalibrierparameter von der Temperatur kann aus den Modellgeraden bestimmt werden. Da diese jedoch einem großen Fehler unterliegen, sollte eine Kalibrierung mittels 2 oder 3 Werten vor den Messungen erfolgen. Für die Anwendung des Systems an menschlichem Gewebe ist die lineare Kalibrierung mit den Lebensdauerwerten bei $0\,\%$ und $20,9\,\%$ Luftatmosphäre ausreichend und gewährleistet eine einfache und schnelle Handhabung des Systems.

4.2.4 Sensitivität und Fehlerbetrachtung

Die erzielten Ergebnisse haben auf Grund der Messanordnung, der Messdurchführung und der Eigenschaften der Farbstoffschicht einige Fehlerquellen, die in diesem Abschnitt erläutert sind. Dabei unterscheiden sich die Fehlerursachen der Messungen, die in der Durchflussküvette durchgeführt wurden, von denen, die in der Kalibrierküvette durchgeführt wurden, da in letzterer die Einstellung der Sauerstoffkonzentration einfacher und genauer zu realisieren war. Die Fehler der Mittelwerte der Intensität und der Lebensdauer sind daher für Werte, die in der Kalibrierküvette gemessen wurden, kleiner.

Die Fehler der Intensitätswerte I und der Lebensdauerwerte τ sind für die Durchfluss- und die Kalibrierküvette in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Intensität entspricht dabei der pixelweise untergrundkorrigierten Intensität, also $I_1 - I_3$, bzw. $I_2 - I_3$. Als Fehler der Einzelwerte sind die Fehler der pixelweise gemessenen Werte angegeben, die Fehler der Mittelwerte sind die Fehler der über die Gesamtanzahl der Pixel $1024 \cdot 1024$ gemittelten Werte.

Die Einzelwerte der Intensitäten unterliegen wegen der Schwankung der Anregungsleistung und wegen der Verstärkung durch den Bildverstärker ebenfalls Schwankungen. Der aus diesen resultierende Fehler beträgt sowohl in der Durchflussküvette als auch in der Ka-

Messwert		Fehler des Einzelwerts	Fehler des Mittelwerts
Intensität I	DK	4%	4%
Lebensdauer τ	DK	12%	2%
Intensität I	KK	4%	1%
Lebensdauer τ	KK	12%	0,4%

Tabelle 4.2: Fehler der Einzel- und der Mittelwerte für die Intensität I und die Lebensdauer τ für die FOXY-Sol-Gel-Schicht gemessen in der Durchfluss- (DK) und der Kalibrierküvette (KK). Diese sind mit denen der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung identisch.

librierküvette 4%. Die Mittelwerte der Intensitäten schwanken aus den genannten Gründen ebenfalls, wobei bei der Durchflussküvette der Einfluss der inhomogenen Sauerstoffkonzentration in der Lösung durch den Sprudelvorgang hinzukommt. Dies führt zu einem Fehler der Intensitätsmittelwerte von 4%. In der Kalibrierküvette ist dies nicht der Fall. Hier resultiert der Fehler aus dem verstärkungsbedingten Rauschen und beträgt daher 1%. Wenn der in der Kalibrierküvette abgebildete Schichtausschnitt verändert wird, führt dies auf Grund der inhomogenen Farbstoffverteilung zu einer Schwankung von 10%. In der Durchflussküvette beträgt die Schwankung 3,3% wegen des größeren Bildfeldes, wodurch die Farbstoffverteilung in der Schicht homogener erscheint und die einzelnen Farbstoffcluster nicht abgebildet werden.

Die Schwankungen der Intensitäten wirken sich auf die Einzel- und Mittelwerte der Lebensdauer aus. Die Fehler betragen daher in der Durchflussküvette 12% für die Einzelwerte und auf Grund des Sprudelvorgangs 2% für die Mittelwerte. In der Kalibrierküvette schwanken die Einzelwerte um 4%, die Mittelwerte rechnerisch um 0,04%. Aus der Messung des Langzeitverhaltens der Lebensdauer ergibt sich jedoch ein Fehler von 0,4%. Der Fehler, bedingt durch den abgebildeten Schichtausschnitt, beträgt 1,2% in der Kalibrierküvette und 0,6% in der Durchflussküvette.

Die Reproduzierbarkeit der Intensitäts- und Lebensdauerwerte wurde über einen Zeitraum von 8 Stunden gemessen und zeigte in beiden Küvetten eine geringe Schwankung der Werte. Der Fehler der Intensität beträgt 0,2% und der der Lebensdauer 0,4%. Sie liegen damit innerhalb des durch den Bildverstärker hervorgerufenen Fehlers von 1%. Die Reproduzierbarkeit der Messwerte ist daher sehr gut, und es tritt keine Photodegradation des Farbstoffs in der Schicht auf.

Die Fehler der angegebenen Temperaturwerte und der Sauerstoffkonzentration sind vom Hersteller des Referenzmesssystems angegeben und im Abschnitt 4.1.4 dargelegt. Der Fehler der Temperatur beträgt $0,5\,°C$ für Messungen in der Kalibrierküvette und 1%, bzw. 1,4% für Sauerstoffkonzentrationen in den Bereichen $c < 250\,\mu mol/l$, bzw. $c > 250\,\mu mol/l$. Da der Temperaturdrift in der Durchflussküvette größer als $0,5\,°C$ ist, beträgt der Fehler der Temperatur bei diesen Messungen $1,3\,°C$.

Die Fehler der Lebensdauer τ_0 und der Stern-Volmer-Konstanten K_{SV} ergeben sich aus den Parametern der an die Messwerte angepassten Modellkurve. Für die Anpassung einer Modellkurven an eine Kalibrierkurve, die in der Durchflussküvette gemessen wurde, werden jedoch nur 9 Messwerte verwendet, so dass der tatsächliche Fehler der Lebensdauer τ_0 dem Fehler der Lebensdauern entspricht. Für Messreihen in der Kalibrierküvette liegen zwar ca. 1100 Messwerte für die Anpassung vor, der Fehler des ausgewählten Schichtausschnitts beträgt jedoch $1,2\,\%$, so dass dieser dem Fehler der Lebensdauern τ_0 entspricht. Die Stern-Volmer-Konstante ergibt sich ebenso wie bei der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung aus dem Verhältnis von τ_0/τ, so dass sich der relative Fehler aus der Addition der relativen Fehler von τ_0 und τ ergibt.

Die absolute Sensitivität der FOXY-Schicht ergibt sich aus der Ableitung der an die Messwerte der Kalibrierkurven angepassten Modellkurven. Da diese nicht der einfachen $1/[O_2]$-Abhängigkeit folgen, ergibt sich für die absolute Empfindlichkeit der folgende Zusammenhang:

$$S_A([O_2]) = \frac{B(T)+C(T)[O_2]}{(A(T)+B(T)[O_2]+C(T)[O_2]^2)^2} \tag{4.12}$$

Die Parameter $A(T) = \frac{1}{\tau_0}$, $B(T) = K_{SV,1} + K_{SV,2}$ und $C(T) = K_{SV,1} \cdot K_{SV,2}$ sind durch die Modellkurven gegeben und abhängig von der Temperatur. Für die relative Empfindlichkeit ergibt sich entsprechend folgende Gleichung:

$$S_R([O_2]) = \frac{\frac{\Delta\tau}{\tau}}{\frac{\Delta[O_2]}{[O_2]}} = \frac{B(T)+C(T)[O_2]}{(A(T)+B(T)[O_2]+C(T)[O_2]^2)^2} \cdot \frac{[O_2]}{\tau} \tag{4.13}$$

Mit Hilfe dieser beiden Gleichungen wurde für die dargestellten Messungen der FOXY-Schicht bei dem pH-Wert $5,5$ die absolute und relative Empfindlichkeit berechnet. Die absoluten und relativen Empfindlichkeitskurven sind in Abb. 4.20 dargestellt.

Die absolute Sensitivität der Messungen der FOXY-Schicht zeigt ebenso wie bei den Messungen mit der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung eine Temperaturabhängigkeit. Diese unterscheidet sich jedoch im Bereich kleiner Sauerstoffkonzentrationen derart, dass in diesem Bereich die absolute Sensitivität mit steigender Temperatur ansteigt. Im Bereich großer Konzentrationen ($c > 200\,\mu mol/l$) kehrt sich dieses Verhalten um und zeigt mit steigender Temperatur eine kleiner werdende Sensitivität. Diese Temperaturabhängigkeit stimmt mit den Messungen mit der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung überein und ist aus der geringer werdenden Dynamik der Lebensdauerändern ableitbar. Die steigende Sensitivität im Bereich kleiner Konzentrationen ist auf die mit der Temperatur steigende $1/[O_2]^2$-Abhängigkeit zurückzuführen, die eine vergrößerte Dynamik in dem Konzentrationsbereich bewirkt. Die absolute Sensitivität sinkt mit steigendem Sauerstoffgehalt, da die Dynamik im Bereich großer Sauerstoffkonzentrationen abnimmt, was durch den Hersteller auch angegeben ist. Weiter zeigt sich, dass sich die Sensitivität der in der Durchfluss- und in der Kalibrierküvette gemessenen Messreihen unter-

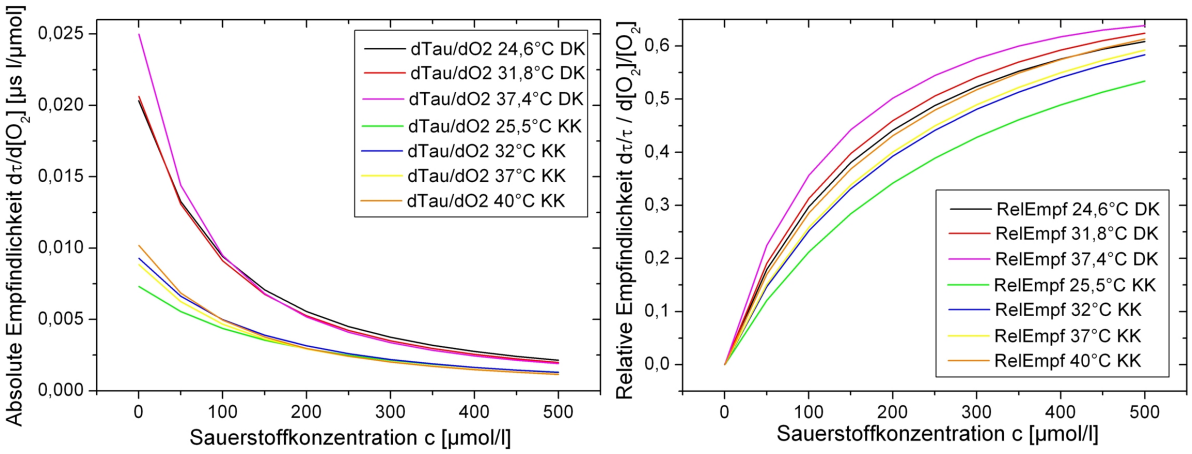


Abbildung 4.20: Absolute und relative Sensitivität der Messungen der FOXY-Schicht mit dem pH-Wert 5,5. Die absolute Empfindlichkeit steigt im Bereich von $c = 0 - 100\,\mu mol/l$ mit steigender Temperatur und sinkt im Bereich ab $c > 100\,\mu mol/l$. Die relative Empfindlichkeit steigt mit steigender Temperatur an.

scheidet. Die absolute Sensitivität der in der Durchflussküvette gemessenen Kalibrierkurven ist höher, wobei das Temperaturverhalten innerhalb der in der Durchfluss-, bzw. der Kalibrierküvette gemessenen Messungen übereinstimmt. Lediglich die in der Kalibrierküvette gemessenen Sensitivitätskurven bei $T = 32\,°C$ und $T = 37\,°C$ folgen dem nicht. Der Grund liegt in den Kalibrierkurven der beiden Messreihen, die sehr dicht beieinander liegen und einen ähnlichen Verlauf zeigen. Die Werte der Kalibrierkurven und damit der Sensivitätskurven liegen innerhalb der Fehlergrenzen voneinander und können daher nicht unterschieden werden.

Die relative Empfindlichkeit der Messungen mit der FOXY-Schicht zeigt ein ähnliches Verhalten wie die der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Messungen. Die Werte der relativen Empfindlichkeit nehmen einerseits mit steigendem Sauerstoffgehalt und andererseits mit steigender Temperatur zu. Die Empfindlichkeitskurven sind jedoch auf Grund der $1/[O_2]^2$-Abhängigkeit stärker gekrümmt und liegen tendenziell höher als die der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen. Im Bereich von $c = 0 - 100\,\mu mol/l$ steigt die relative Empfindlichkeit stärker an und erreicht bei $c = 100\,\mu mol/l$ schon Werte um 0,3. Bei den Messungen mit $Ru(bpy)_3^{2+}$ waren es maximal Werte um 0,2.

Weiter liegen die in der Durchflussküvette gemessenen Kurven höher als die in der Kalibrierküvette gemessenen. Dies verdeutlicht, dass die absolute Empfindlichkeit für einen Vergleich der Messungen nicht herangezogen werden kann, da die absoluten Empfindlichkeitskurven der Durchflussküvette höher liegen als die der Kalibrierküvette. Dies würde für eine empfindlichere Messung sprechen, was der relativen Empfindlichkeit widerspricht. Die Werte der absoluten Empfindlichkeit aller Messungen mit der FOXY-Schicht liegen zudem um einen Faktoren von $10 - 20$ höher als die der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösungen, so dass auch hier vermu-

tet werden könnte, dass die Messungen mit der FOXY-Schicht empfindlicher sind. Dies zeigt sich jedoch in den relativen Empfindlichkeitskurven nicht. Im PDT relevanten Bereich steigt die relative Empfindlichkeit der FOXY-Schicht statt dessen auf Werte zwischen $0,21-0,36$ an, während es bei der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung nur Werte von maximal $0,16-0,2$ waren. Die FOXY-Schicht ist also trotz der um den Faktor 10 längeren Lebensdauer im PDT relevanten Konzentrationsbereich unempfindlicher als die $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung. Der Grund liegt in der nur näherungsweisen Berechnung der Lebensdauer mit der RLD-Methode, die nur für einfach exponentielle Lumineszenzabklingverhalten gültig ist und so einen größeren Fehler bei der Lebensdauerberechnung von mehrfach exponentiellen Abklingkurven aufweist.

4.2.5 *In vitro* Messungen mit der FOXY-SGS-M-Schicht

Die Ansprechzeit der Sensorschicht und die der Schicht in Verbindung mit Gewebe ist für die Verwendung des Systems wichtig, um die zeitliche Ansprechzeit des Messsystems bewerten zu können. Für diese Messungen wurde Schweinehaut verwendet, da diese in Hinblick auf die Permeation der menschlichen Haut ähnelt und daher als *in vitro* Modell gut geeignet ist. Zuvor wurde die Ansprechzeit des Sensors in Gasatmosphäre und in wässriger Lösung in der Kalibrierküvette bestimmt, um die Ansprechzeit des Gewebes von der des Sensors trennen zu können. In der Kalibrierküvette kann zwar nicht wie in der Durchflussküvette eine konstante Sauerstoffkonzentration eingestellt werden, durch das Sprudeln mit Gas durch den Gasschlauch kann aber eine schnelle Konzentrationsänderung sowohl im Gas, wie auch in wässriger Lösung herbeigeführt werden. Aus diesem Grund wurde die Ansprechzeit Δt_{Res} von $20,9\,\%$ Sauerstoffatmosphäre (Luftatmosphäre) auf $0\,\%$ Sauerstoffatmosphäre (Sprudeln mit $100\,\%$ Stickstoffgas) in der Kalibrierküvette bestimmt. Die Farbstoffschicht wurde in der Küvette fixiert und kontinuierlich die Lebensdauer und mit dem Referenzmesssystem die Sauerstoffkonzentration in Höhe des Bildfeldes gemessen. Der zeitliche Abstand der Messungen beträgt beim Referenzsystem $1\,s$, bei der Lebensdauermessung auf Grund der Aufnahme von drei Intensitätsbildern und der Berechnungsroutine $16\,s$. Die zeitliche Genauigkeit der Ansprechzeit beträgt daher ebenfalls nur $16\,s$. Für die Messungen wurde die Küvette auf $T = 25\,°C$ temperiert.

Die Ansprechzeit des Sensors in Gasatmosphäre wurde durch das Einleiten von Stickstoffgas in die Kalibrierküvette bestimmt. Die Messung wurde 10 Mal durchgeführt und die Ansprechzeit bestimmt. Der Fehler der Werte ergibt sich aus der Standardabweichung der ermittelten Ansprechzeiten. Für den Referenzsensor beträgt die gemessene Ansprechzeit in Gasatmosphäre $\Delta t_{R,Gas} = 5,89 \pm 0,02\,s$ und für die FOXY-Schicht $\Delta t_{\mathrm{FOXY},Gas} = 31,8 \pm 0,4\,s$. Der Fehler der Ansprechzeit des FOXY-Sensors entspricht jedoch nicht dem tatsächlichen Fehler, sondern ergibt sich aus der zeitlichen Genauigkeit des Messsystems von $16\,s$. Die tatsächliche Ansprechzeit ist daher $\Delta t_{\mathrm{FOXY},Gas} = 32 \pm 16\,s$. Dieser Wert zeigt, dass nach zwei

Messwerten der neue Lebensdauerwert und damit die neue Sauerstoffkonzentration mit dem Messsystem in Verbindung mit dem FOXY-Sensor ermittelt wird. Der Hersteller der FOXY-Schicht gibt für Gasatmosphären eine Ansprechzeit von $1\,s$ an, die jedoch durch die zeitliche Genauigkeit des Messsystems überdeckt wird.

Für die Bestimmung der Ansprechzeit in wässriger Lösung wurde die FOXY-Schicht in der Kalibrierküvette fixiert und die Küvette mit wässriger Lösung mit dem pH-Wert $5,5$ gefüllt. Die Lebensdauer und die Sauerstoffkonzentration wurden kontinuierlich gemessen und die Sauerstoffkonzentration nach einer Messzeit von einigen Minuten durch das Einsprudeln von Stickstoffgas in die Lösung verändert. Die Ansprechzeiten der beiden Sensoren sind daher bedingt durch den Gasaustausch, der durch das Sprudelverhalten und den Gasdruck bestimmt wird, sowie durch die Diffusion des Sauerstoffs in der Lösung. Die Ansprechzeit der Lösung wird daher größer vermutet als die Ansprechzeit im Gas. Die Messung der Ansprechzeiten erfolgte 10 Mal, so dass sich der Fehler aus der Standardabweichung der Messwerte ergibt. Die Messungen ergaben für die Ansprechzeit des Referenzsensors $\Delta t_{R,H_2O} = 149 \pm 22\,s$ und für die Ansprechzeit des FOXY-Sensors $\Delta t_{\mathrm{FOXY},H_2O} = 53 \pm 29\,s$. Der FOXY-Sensors ist damit, obwohl die zeitliche Auflösung des Messsystems $16\,s$ beträgt, schneller als vergleichbare, etablierte Sensoren und damit gut geeignet für die Messung innerhalb von wässrigen Lösungen. Die Ansprechzeit für die maximale Sauerstoffkonzentrationsänderung im PDT relevanten Konzentrationsbereich beträgt somit für die eingestellte Strömungsgeschwindigkeit des Gases ca. $1\,Minute$. Der Fehler der Ansprechzeit ist auf Grund der großen Schwankung der Werte sehr groß. Diese ist jedoch durch die zeitliche Genauigkeit der Lebensdauermessung von $16\,s$ bedingt.

Bei der $Ru(bpy)_3^{2+}$-Lösung wurde eine Änderung der Lebensdauer durch den Kontakt zur Schweinehaut festgestellt, so dass dieses Verhalten für die FOXY-Schicht ebenfalls untersucht wurde. Hierfür wurde die Sensorschicht bei Raumluftatmosphäre in der Durchflussküvette platziert und die Lebensdauer unter diesen Bedingungen einige Minuten beobachtet. Dann wurde eine Schweinehautprobe aufgelegt und nach einigen Minuten wieder entfernt, wobei kontinuierlich die Lebensdauer beobachtet wurde. Die Messung zeigte sowohl beim Auflegen, wie auch beim Entfernen der Schweinehaut keine Änderung der Lebensdauer. Ein Anstieg der Intensitäten erfolgte in den beiden Detektionszeitfenstern, der sich jedoch durch die Quotientenbildung nicht auf die Lebensdauer auswirkt. Der Grund für den Intensitätsanstieg liegt in der Autofluoreszenz der Gewebeprobe, die eine Referenzierung der Intensitätswerte erschwert. Für die Sauerstoffkonzentrationsbestimmung ist daher die Messung der Lebensdauer geeigneter.

Die Messung der Ansprechzeit der FOXY-Schicht mit Gewebe wurde in der Durchflussküvette durchgeführt und hierfür eine Schweinehautprobe auf die Schicht gelegt. Die Probendicke betrug $d = 500\,\mu m$ aus den in Kap. 3.2.4 erläuterten Gründen. Durch das Ein-

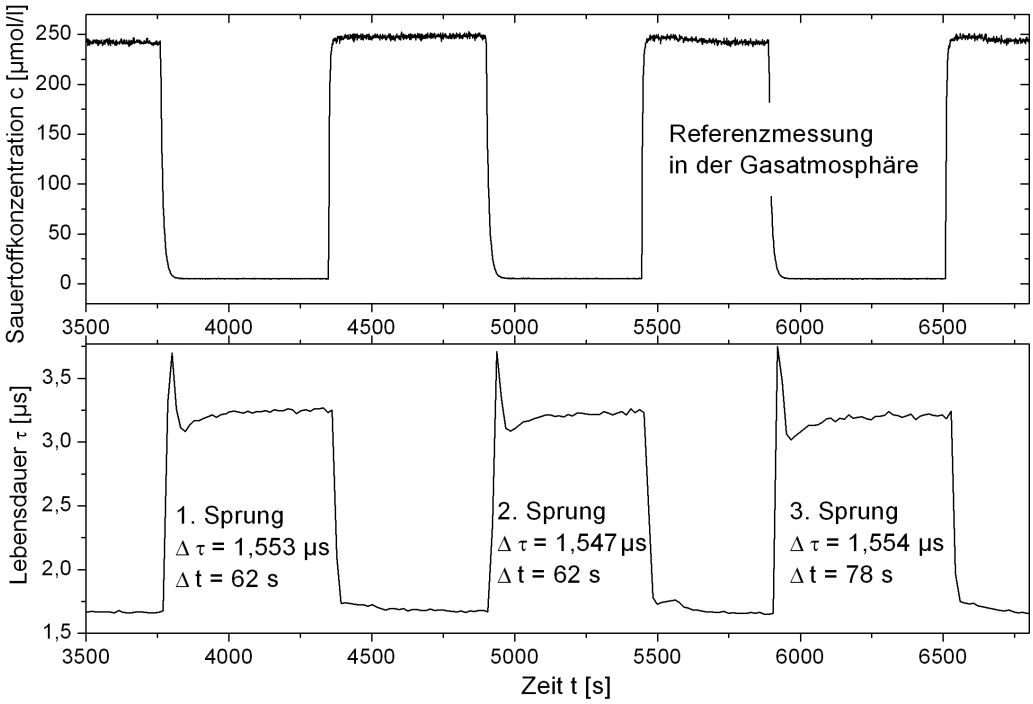


Abbildung 4.21: Messung der Ansprechzeit der FOXY-Schicht mit einer Schweinehautprobe der Dicke $d = 500\,\mu m$. Das Referenzsignal (oben) und das Lebensdauersignal (unten) sind in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Es sind 3 der 10 gemessenen Ansprechzeiten dargestellt.

strömen von 100 % Stickstoffgas in die Küvette wurde die Luftatmosphäre verdrängt und so eine 0 % Sauerstoffatmosphäre hergestellt. Bedingt durch die Einströmgeschwindigkeit drückt das einströmende Gas auf die Gewebeschicht und verdrängt so den im Gewebe befindlichen Sauerstoff. Zwischen den Sprungantworten wurde die Küvette geöffnet, um einen schnellen Atmosphärenaustausch zu bewirken und die Probe wieder mit Luft zu sättigen. Um die Ansprechzeit der Küvette zeitgleich zu messen, wurde im Gasstrom mit dem Referenzsystem die Sauerstoffkonzentration sekundengenau gemessen. Exemplarisch ist die Messung einer Ansprechzeit in Abb. 4.21 gezeigt.

Die Ansprechzeit Δt_{Res} wurde durch die Messung von 10 Sprungantworten und Mittelung der Werte bestimmt. Sie beträgt $\Delta t_{\mathrm{FOXY},d_1} = 75 \pm 18\,s$, wobei das Referenzsignal eine Ansprechzeit von $\Delta t_R = 20,4 \pm 0,4\,s$ hat. Der Atmosphärenaustausch in der Küvette dauert demnach $20\,s$, so dass die um diese Zeit korrigierte Ansprechzeit der Schicht $\Delta t_{\mathrm{FOXY},d_1} = 55 \pm 18\,s$ beträgt. Die gemessene Ansprechzeit ist einerseits bedingt durch die Permeationseigenschaften der Schweinehautprobe, andererseits durch die eingestellte Einströmgeschwindigkeit des Gases und durch die Ansprechzeit des Sensors selbst. Der Fehler der Ansprechzeit ist auf Unebenheiten und die veränderte Durchlässigkeit des Gewebes im abgebildeten Bildfeld durch das Verschieben der Probe zwischen den Sprungantworten, sowie auf die zeitliche Genauigkeit des Systems von $16\,s$ zurückzuführen.

Medium		Messwert [s]	Referenz [s]	Ansprechzeit [s]
Gas	KK	32 ± 16	$5,89 \pm 0,02$	32 ± 16
Wasser mit $pH = 5,5$	KK	53 ± 29	149 ± 22	53 ± 29
Schweinehaut $d_1 = 0,5\,mm$	DK	75 ± 18	$20,4 \pm 0,4$	55 ± 18
Schweinehaut $d_2 = 1\,mm$	DK	115 ± 40	$21,1 \pm 1,7$	94 ± 40

Tabelle 4.3: Ansprechzeiten der FOXY-Schicht und des Referenzsystems, gemessen in der Kalibrierküvette (KK) in Gasatmosphäre und in wässriger Lösung mit $pH = 5,5$ und gemessen in der Durchflussküvette (DK) mit Schweinehautproben mit den Dicken $d_1 = 0,5\,mm$ und $d_2 = 1\,mm$.

Die Dynamik der Messung ist aus den gemessenen mittleren Lebensdauern nicht ermittelbar, da die Schweinehautproben bedingt durch die Präparationsmöglichkeiten nur ca. $15 \cdot 25\,mm^2$ gross waren. Sie bedecken daher nur zu ca. $2/3$ die Schicht, so dass die mittlere Lebensdauer nicht der mit reiner Schweinehautprobe entspricht. Die Lebensdauerwerte zur Berechnung der Dynamik wurden daher aus den Mittelwerten von ausgewählten Regionen (ROI, Region of Interest) der Lebensdauerbilder, die vollständig mit Schweinehaut bedeckt waren, bestimmt. Sie betragen $1,59\,\mu s$ in Luftatmosphäre und $3,10\,\mu s$ in Stickstoffatmosphäre, so dass die Dynamik $1,51\,\mu s$ beträgt. Diese ist mit der Dynamik der Sensorschicht ohne Gewebe vergleichbar, so dass geschlossen werden kann, dass sich die Charakteristik der Schicht durch Gewebe nicht verändert.

Die Lebensdauerwerte zeigen bei den gemessenen Sprungantworten stets ein Überschwingverhalten. Dies liegt an der Bestimmung der Lebensdauer mit der RLD-Methode und der zeitlichen Aufnahmedauer des Systems. Diese beträgt $16\,s$, so dass sich bei den berechneten Lebensdauern, die zum Zeitpunkt der Sauerstoffkonzentrationsänderung berechnet wurden, die Sauerstoffkonzentration zwischen den Intensitätsbildern stark verändert. Das zweite Intensitätsbild ist daher bedingt durch das einströmende Stickstoffgas heller, so dass die berechnete Lebensdauer größer erscheint. Erst wenn die Sauerstoffkonzentrationsänderung zwischen den Bildern konstant ist, wird die tatsächliche Lebensdauer berechnet.

Um den Einfluss der Schichtdicke der Gewebeprobe auf die gemessene Ansprechzeit zu ermitteln, wurde diese auch für die doppelte Schichtdicke von $d = 1\,mm$ bestimmt. Die Durchführung des Versuchs erfolgte wie bei der Verwendung der einfachen Dicke mit 10maliger Messung. Die gemittelte Ansprechzeit des Referenzsensors beträgt $\Delta t_R = 21,1 \pm 1,7\,s$, so dass die gemessene Ansprechzeit des Sensors von $\Delta t_{\mathrm{FOXY},d_2} = 115 \pm 40\,s$ die um diesen Wert korrigierte Zeit von $\Delta t_{\mathrm{FOXY},d_2} = 94 \pm 40\,s$ ergibt. Die gemessene Zeit ist damit doppelt so lang, wie die der einfachen Schichtdicke. Dieses Verhalten entspricht jedoch nur dem durch den Gasdruck erzielten Verhalten des Sauerstoffs durch das Gewebe und ist *in vivo* nicht bekannt. *In vivo* wird die Ansprechzeit durch das Diffusionsverhalten von Sauerstoff von der Kapillare hin zum Interstitium, also dem Gradienten der Sauerstoffkonzentration,

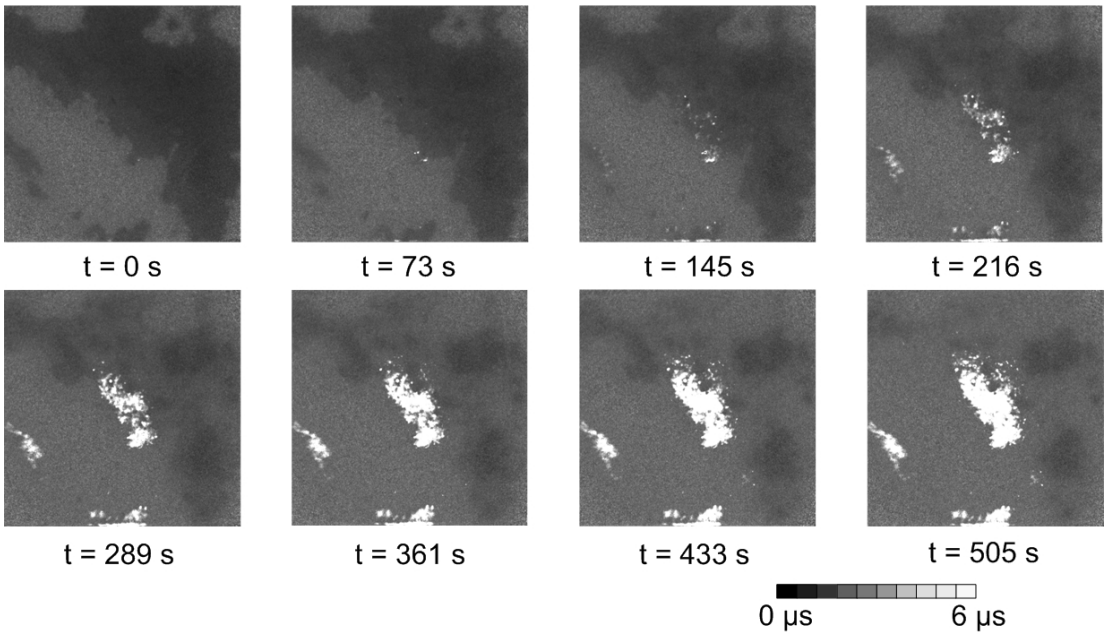


Abbildung 4.22: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Lebensdauer einer Ansprechzeitmessung mit der FOXY-Schicht mit einer Putenbrustscheibe der Dicke $d = 0,8\,mm$.

bestimmt. Dieser Gradient steigt durch den erhöhten Sauerstoffverbrauch während der PDT an, so dass die Diffusion erleichtert ist.

Die Werte für die mit den zwei Gewebedicken ermittelten Ansprechzeiten der FOXY-Schicht und des Referenzsensors sind in Tabelle 4.3 zusammen mit den Werten für die Gasatmosphäre und die wässrige Lösung aufgeführt. Diese Zusammenfassung macht deutlich, dass im Gas die Ansprechzeit am kürzesten ist und nach zwei Lebensdauerbildern die neue Sauerstoffkonzentration detektiert wird. Diese Zeit wird in wässrigen Medien verlängert, bedingt durch den Gasaustausch im Wasser und die Diffusion des Sauerstoffs in bzw. aus der Schicht heraus, so dass die neue Sauerstoffkonzentration nach ca. $3-4$ Bildern gemessen wird. Dies wurde auch bei der Schweinehautprobe mit der Dicke $d = 500\,\mu m$ gemessen, so dass die Sauerstoffkonzentrationsmessung aus dieser Tiefe möglich erscheint. Die doppelt so lange Ansprechzeit mit der Dicke $d = 1\,mm$ zeigt, dass hier für die Sauerstoffkonzentrationsdarstellung 6 Bilder benötigt werden und die Ansprechzeit abhängig von der Dicke der Probe ist. Die Messung der Sauerstoffkonzentration des Gewebes erscheint daher möglich, wobei vermutet wird, dass die Ansprechzeit im Gewebe durch die freie Diffusion des Sauerstoffs aus dem Gewebe verlängert ist. Weiterhin ist sie abhängig von der Tiefe, aus der der Sauerstoff herausdiffundiert, und von den Permeationseigenschaften des Gewebes.

Der FOXY-Sensor ist wegen seiner schnellen Ansprechzeit, der Lebensdauerstabilität und der unveränderten Dynamik sehr gut geeignet für Sauerstoffkonzentrationsmessungen in Gasen, wässrigen Lösungen und auch an Gewebe. Die Ansprechzeiten sind vergleichbar mit etablierten Messsonden, so dass die oberflächliche Messung der Sauerstoffkonzentra-

tion von den Permeationseigenschaften des Gewebes abhängt. Wie die Ansprechzeit des Gewebes sich *in vivo* an humaner Haut verhält, kann mit den hier dargestellten Messungen nicht abgeschätzt werden. Sie muss daher *in vivo* für verschiedene Gewebearten und Tiefen ermittelt werden, um die Einsatzmöglichkeit des Systems zu zeigen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen mit Gewebeproben zeigen hingegen, dass eine Messung auch aus der Tiefe von $500\,\mu m$ möglich ist, so dass der Sauerstoffgehalt des Gewebes gemessen werden kann. Die für die Diffusion des Sauerstoffs aus dieser Tiefe benötigte Zeit kann jedoch nicht ermittelt werden, da insbesondere bei den *in vitro* Präparaten kein Sauerstoffverbrauch des Gewebes auftritt. Dieser Verbrauch hat aber einen maßgeblichen Einfluss auf das Diffusionsverhalten des Sauerstoffs durch das Gewebe und muss für die Bestimmung des Ansprechverhaltens berücksichtigt werden. *In vivo* Messungen, die dieses Verhalten zeigen können, sollten daher in weiteren Forschungsvorhaben in enger Kooperation mit Medizinern durchgeführt werden.

Die Abhängigkeit der Ansprechzeit vom Gewebetyp und dessen Permeationseigenschaften macht auch die folgende Messung deutlich. Hier wurde auf die FOXY-Schicht eine Putenbrustscheibe mit der Dicke $d = 0,8\,mm$ aufgelegt und auf die luftgesättigte Probe Stickstoffgas geströmt. Der zeitliche Verlauf der Lebensdauerbilder, wie er in Abb. 4.22 dargestellt ist, zeigt, dass an einigen Stellen des Gewebes die Durchlässigkeit sehr gut ist, während an anderen Stellen das einströmende Stickstoffgas nicht bis zur Sensorschicht gelangt. Die Lebensdauer steigt an den 'durchlässigen' Stellen bereits nach $1\,Minute$ an, während sich die Lebensdauer an 'dichteren' Stellen des Gewebes kaum verändert. Es wird daher vermutet, dass das Stickstoffgas in diese Bereichen nicht durch die Gewebeschicht, sondern entlang der Sensorschicht zu diesen Stellen diffundiert. Die Lebensdauer ist zusätzlich am Ende, wie auch bei Beginn der Messung im Bild nicht gleichmäßig, sondern stellt die Struktur des Gewebes dar. Der in der Abb. 4.22 dargestellte Lebensdauerverlauf zeigt eine Auswahl der Lebensdauerbilder, die während der Messung im Durchschnitt alle $12\,s$ aufgenommen wurden.

4.3 Potential der Messmethode als Monitoringsystem

4.3.1 Anwendbarkeit des Systems in der Medizin

Die molekulare Sauerstoffkonzentration kann mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Lebensdauermesssystem ein- und auch zweidimensional gemessen und bildlich dargestellt werden indem die Lumineszenzlebensdauer sauerstoffsensitiver Farbstoffe berechnet wird. Die Berechnung erfolgt dabei mit der RLD-Methode, so dass sie pixelweise erfolgt und der Lebensdauer durch eine Kalibrierung des Sensorfarbstoffs eindeutig eine Sauerstoffkonzentration zugeordnet werden kann. Die Umrechnung in die Sauerstoffkonzentration erfolgt nach Ein-

gabe der Kalibrierparameter automatisch, so dass Sauerstoffkonzentrationsbilder kontinuierlich berechnet und angezeigt werden können. Die Anzahl der mit dem System berechneten Sauerstoffkonzentrationsbilder ist durch die Wahl des Generators auf $6\,Bilder/min$ begrenzt. Dies ist jedoch für die Durchführung einer PDT, die durchschnittlich $20-30$ Minuten dauert, ausreichend. Eine Überlagerung der berechneten Sauerstoffkonzentrationsbilder mit dem nativen Bild des Behandlungsareals ist zusätzlich möglich und dient der direkten Zuordnung der Sauerstoffkonzentration zur Anatomie. Derzeit ist dies im Programm nicht integriert, kann aber ohne Veränderungen der Systemkomponenten hinzugefügt werden. Mit einem solchen Werkzeug sind örtliche Schwankungen der Sauerstoffkonzentration, die z. B. durch inhomogene PDT-Bestrahlung oder Schwankungen der Photosensibilisatorkonzentration bedingt sind, darstellbar.

Die Messung der molekularen Sauerstoffkonzentration beruht auf der gepulsten Anregung sauerstoffsensitiver Farbstoffe, die den Effekt der PDT einerseits nicht beeinflussen und andererseits keine schädigenden Effekte im Gewebe hervorrufen darf. Die Anregungswellenlänge liegt bei den untersuchten Sensorfarbstoffen nicht in den Absorptionsbanden der derzeit klinisch verwendeten Photosensibilisatoren der 2. und 3. Generation, wie z. B. Photofrin, so dass die zusätzliche Beleuchtung keinen Einfluss auf den Verlauf der photodynamischen Therapie hat. Weiter wird auch der Sensorfarbstoff selbst durch das Bestrahlungslicht der PDT nicht beeinflusst, da dieser im roten Spektralbereich, in dem die heute für die PDT verwendeten Lasersysteme Licht emittieren, nicht absorbiert und das Bestrahlungslicht für die PDT nahezu zu 100 % transmittiert.

Die Bestrahlungsleistung der Farbstoffanregung darf weiter nur so groß sein, dass keine thermischen Effekte im Gewebe auftreten und die Singulettsauerstoffgenerierung durch den Sensorfarbstoff minimiert ist. Die für eine PDT-Behandlung benötigte Leistungsdichte liegt im Bereich von $I_{PDT} = 50-200\,mW \cdot cm^{-2}$, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die um einen Faktor von $10-40$ darunter liegende Bestrahlungsleistung für die Sauerstoffmessung keinen Einfluss auf das Gewebe hat. Dies gilt obwohl die Eindringtiefe im blauen Spektralbereich nur ca. $1-2\,mm$ beträgt (siehe Abb. 2.3) und somit die Erwärmung im bestrahlten Gewebe größer ist als mit langwelligerem Licht [27]. Die durch die Sauerstoffmessung hervorgerufene Singulettsauerstoffgenerierung findet in dem oberflächlich aufgebrachten Sensorfarbstoff und nur während der Anregungspulse statt. Bedingt durch die kleine Diffusionslänge von Singulettsauerstoff kehrt er daher bereits an der Oberfläche wieder in den Grundzustand zurück. Die Anzahl der generierten Singulettsauerstoffradikale, die das Gewebe erreichen und dort reagieren können, kann daher im Vergleich zur während der PDT-Behandlung generierten Anzahl vernachlässigt werden, so dass das Messsystem keinen Einfluss auf die PDT-Behandlung hat.

Für die Anwendbarkeit des Messsystems als Monitoringsystem für die PDT sind wei-

ter die Sensitivität der Sensorfarbstoffe im PDT relevanten Sauerstoffkonzentrationsbereich, sowie die Ansprechzeit des Systems ausschlaggebend. Für die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe konnte eine gute Sensitivität nachgewiesen werden. Zudem wird für das Monitoring der PDT nicht der tatsächliche Wert der Sauerstoffkonzentration benötigt, sondern lediglich die Aussage, ob die Sauerstoffkonzentration in weiten Bereichen unter den Wert von $8\,mmHg$ ($c \approx 12\,\mu mol/l$) gefallen ist. Dieser Wert stellt z. B. nach Henderson et al. und Pogue et al. eine Grenze für die Wirksamkeit der PDT-Behandlung dar [79, 94]. Die Bereiche, in denen die Sauerstoffkonzentration unterhalb dieses Werts fällt, werden mit dem System automatisch in den Sauerstoffkonzentrationsbildern farbig markiert, so dass noch während der Therapie die Bestrahlung individuell an den Patienten und an das behandelte Gewebeareal angepasst werden kann.

Die Ansprechzeiten des Systems und der Farbstoffe wurden in Gasen, wässrigen Lösungen und an *in vitro* Gewebeproben gemessen und sind vergleichbar mit etablierten Messsonden. Da die Messung der Ansprechzeiten auf der Konzentrationsänderung durch einströmendes Gas beruht, kann aus den gemessenen Werten der Ansprechzeiten jedoch nicht auf die Ansprechzeit von lebendem humanen Gewebe geschlossen werden. Dies muss in *in vivo* Experimenten in enger Zusammenarbeit mit Medizinern für verschiedene Gewebetypen und Tiefen untersucht werden. Die Messungen zeigten jedoch, dass auch aus Tiefen bis zu $1\,mm$ die oberflächliche Messung der Sauerstoffkonzentration nur durch den Kontakt zu einem Sensorfarbstoff möglich ist. Dies ist für den Einsatz des Systems als minimal invasives Messsystem der molekularen Sauerstoffkonzentration des Gewebes entscheidend.

In der lebenden humanen Haut ist die Sauerstoffversorgung einerseits durch den aus der Atmosphäre aufgenommenen und andererseits durch den aus dem Blut aufgenommenen Sauerstoff bedingt. Das Sauerstoffangebot im Korium ist daher eine Balance zwischen Sauerstofftransport des Blutes und transepidermaler Sauerstoffaufnahme aus der Atmosphäre [107]. Bis zu einer Tiefe von $d = 250 - 423\,\mu m$ kann so bei normalem Sauerstoffverbrauch die Haut mit atmosphärischem Sauerstoff versorgt werden [108]. Für die oberflächliche minimal invasive Messung der Sauerstoffkonzentration des Gewebes muss daher der molekulare Sauerstoff aus einer Tiefe von $d \approx 500\,\mu m$ an die Oberfläche diffundieren können, um einen für die PDT aussagekräftigen Messwert zu erhalten. Der Transport des Sauerstoffs im Gewebe erfolgt dabei nicht durch aktive Transportmechanismen, sondern durch die freie Diffusion des molekularen Sauerstoffs aus dem Blut. Der Diffusion erfolgt nach dem 1. FICKschen Diffusionsgesetz und ist daher abhängig vom Partialdruckgefälle $\delta P_{O_2}/\delta x$ zwischen Blut und Zellen, von der Größe der Austauschfläche, der Länge der Diffusionsstrecke und der Größe des Diffusionswiderstandes des Gewebes κ [108]. Der Sauerstofffluss J_{O_2} ist daher gegeben durch:

$$J_{O_2} = -\kappa \frac{\delta P_{O_2}}{\delta x} \tag{4.14}$$

Für die freie Diffusion des Sauerstoffs in der humanen Haut stellt weiter das Stratum Corneum eine Diffusionsbarriere dar, wobei 97,5% des Diffusionswiderstandes der gesamten Epidermis durch das Stratum Corneum erzielt wird [107]. Die Dickes des Stratum Corneum variiert zwischen verschiedenen Patienten und Körperregionen und auch bei einem Patienten zwischen Winter und Sommer [111]. Die Diffusion im Stratum Corneum ist bei erhöhter Temperatur und feuchter Haut bis zu 20mal besser, so dass für die oberflächliche Messung der Sauerstoffkonzentration der Sensorfarbstoff durch einen Wasserfilm in den Kontakt zur Haut gebracht werden sollte. Zusätzlich wird ein Teil des durch die Epidermis hindurch diffundierenden molekularen Sauerstoffs durch die Haut selbst verbraucht.

Der Einsatz des minimal invasiven Messsystems für die oberflächliche Messung der Sauerstoffkonzentration erscheint auf Grund der hier dargestellten Messergebnisse für die beiden Schweinehautdicken erfolgversprechend, wobei die Ansprechzeit des Sensors auf Grund der freien Diffusion des Sauerstoffs nicht abgeschätzt werden kann. Die Untersuchung dieses Verhaltens ist daher Ziel weiterführender Forschungsprojekte, in denen beispielsweise mit Hilfe invasiver Nadelelektroden, die in verschiedenen Gewebetiefen platziert werden, die Aussagekraft der oberflächlichen Sauerstoffkonzentrationsmessung auf die Gewebeoxygenierung bei *in vivo* Messungen abgeleitet werden kann.

Derzeit ist das Messprinzip durch die Verwendung der in dieser Arbeit untersuchten Farbstoffe auf oberflächliche äußere Anwendungen begrenzt. Da jedoch auch andere Farbstoffe und Farbstoff-Foliensysteme für die Messung verwendet werden können, ist die endoskopische Anwendung des Systems denkbar. Mit diesen könnten beispielsweise durch das Einbringen und Aufblasen von Farbstofffolien oder durch die topische Behandlung mit einem viskosen Farbstoffgel Behandlungen am Barrett-Ösophagus verfolgt werden. Das Messsystem würde für solche Anwendungen direkt an das Endoskop angebracht oder mittels Lichtübertragungssystemen an dieses gekoppelt werden. Um die Sauerstoffkonzentration auch innerhalb des Gewebes direkt an den Zellen bestimmen zu können, kann das System auch mit geeigneten Nanosensoren verwendet werden. Diese können, wenn sie so ausgelegt sind, dass sie sich an den Zellen anlagern, zur Messung des Sauerstoffgehalts *in vivo* verwendet werden. Die Aussage über die Tiefeninformation kann entweder über Laufzeitbestimmung oder über einen sauerstoffunsensiblen Referenzfarbstoff erfolgen.

Die Messung der Sauerstoffkonzentration an und in Zellen und Zellkulturen mit dem hier vorgestellten System ist denkbar und geplant, wobei es hierfür an ein hochauflösendes Mikroskop angebaut werden muss. Die örtliche Messung der Sauerstoffkonzentration an Zellen mit und ohne PDT-Bestrahlung, sowie Messungen mit neuen Photosensibilisatoren sind so möglich und dienen der Erforschung der funktionellen Abläufe auf Zellebene während einer PDT-Behandlung. Ebenso sind Untersuchungen auch ohne PDT-Bestrahlung oder den Einsatz von Photosensibilisatoren möglich. So kann mit Zelluntersuchungen unter verschie-

denen Sauerstoffatmosphären die Bedeutung der Sauerstoffkonzentration für das Überleben und die Prozesse in Zellen aufgeklärt werden. Weiter kann der Sauerstoffverbrauch von Zellen unter Stressbedingungen, wie z. B. Hitze, pH-Wert-Änderungen und anderen Einflüssen, evaluiert werden. Neben diesen Anwendungen ist der Einsatz des Systems auch für Sauerstoffkonzentrationsmessungen am Gehirn geplant, da viele neurologische Fragestellungen, wie z. B. die Sauerstoffversorgung der durch einen Schlaganfall beeinträchtigten Gehirnareale, so bildgebend untersucht werden können.

Untersuchungen anderer Marker und Quencher sind mit dem realisierten Lebensdauermesssystem ebenfalls möglich, da es für bildgebende Konzentrationsanalysen von Proben und Gewebe gut geeignet und zudem modular aufgebaut ist. Weitere Anwendungsgebiete des Messsystems könnten daher neue molekular-medizinische Problemstellungen, wie z. B. Tests der Targetspezifität von neu entwickelten Ankermolekülen für Kontrastmittel und Therapeutika sein.

4.3.2 $Ru(bpy)_3^{2+}$ als Sensorfarbstoff

Der Farbstoff Ruthenium-tris-bipyridyl wurde gelöst in Wasser verwendet und ist daher für Messungen an Zellen und Zellkulturen geeignet. Die Lebensdauercharakteristik des Farbstoffs zeigte sich unabhängig vom pH-Wert, jedoch stark abhängig von der Temperatur, so dass dies für Messungen entweder auf $\pm 1\,^{\circ}C$ konstant gehalten oder kontinuierlich *in situ* gemessen werden muss. Die Kalibrierung des Farbstoffs kann durch eine einfache und schnelle Zwei-Punkt-Kalibrierung bei Luft- und 0 % Sauerstoffatmosphäre durchgeführt werden.

Bei den durchgeführten *in vitro* Messungen an Schweinehautproben zeigte sich, dass sich die Lumineszenzlebensdauer des Farbstoffs durch die Verbindung zur Schweinehaut stark veränderte und auf Werte oberhalb des Lebensdauerbereichs in Wasser anstieg. Weiter nahm sie auch anschließend ohne Änderungen der Sauerstoffkonzentration mit der Zeit zu. Dies deutet auf eine Verbindung des Farbstoffs zu einer oder mehreren Komponenten der Schweinehaut hin, die sich in einer Änderung der Übergangsraten und damit der Lebensdauer zeigt. Die Messung der Ansprechzeit von Gewebe ergab weiter, dass die Dynamik der Lebensdauer durch diese Verbindung zur Schweinehaut stark abgenommen hat, so dass Sauerstoffkonzentrationsmessungen *in vitro* nicht möglich sind. Die Ansprechzeit des Sensors ist jedoch mit etablierten Messsonden vergleichbar.

Die Verbindung des Farbstoffs mit Komponenten der Probe zeigt eine Änderung der Lebensdauer und eine verminderte Dynamik, so dass das Auftreten dieses Verhaltens für Messungen an *in vivo* Proben und Zellkulturen evaluiert werden muss. Dies ist das Ziel weiterer Untersuchungen. Die Inkubation von Ösophaguskarzinomzellen mit dem Farbstoff zeigte die Anlagerung des Farbstoffs an der Zellmembran und dass die Zellen auch nach einigen Stunden Inkubationszeit nicht starben, so dass die Messung direkt an Zellen möglich wäre.

Die Adaption des System an ein hochauflösendes Fluoreszenzmikroskop dient dann der Sauerstoffmessung direkt an den Zellen, wobei der Sensorfarbstoff auch gleichzeitig als Photosensibilisator dienen kann. Sollte sich also die Dynamik nicht oder nur wenig in Verbindung mit Zellkulturen verändern, so könnten hochauflösende Zellmessungen der Aufklärung molekularer Mechanismen der PDT auf Zellebene dienen.

4.3.3 Die Farbstoffschicht FOXY-SGS-M als Sensorfarbstoff

Die Sol-Gel-Schicht FOXY-SGS-M ist eine kommerziell erhältliche Farbstoffschicht, in die der sauerstoffsensitive Farbstoff fest eingebettet ist. Die Schicht ist sauerstoffpermeabel und für den Einsatz in wässrigen Medien geeignet, so dass er für Messungen an Gewebe ebenfalls geeignet ist. Die Schichten sind mechanisch, chemisch und thermisch stabil und haben eine geringe Absorption im sichtbaren und nahinfraroten Spektralbereich. Sie sind 1 Jahr haltbar und haben geringe Kosten, so dass eine individuelle Verwendung möglich ist.

Die Sensorschicht zeigte in der Lebensdauercharakteristik keine pH-Wert-Abhängigkeit und nur eine geringe Temperaturabhängigkeit, so dass eine Temperaturstabilität von $\pm 3\,°C$ oder die *in situ* Temperaturmessung gefordert ist. Der Sensor ist für Messungen im PDT relevanten Sauerstoffkonzentrationsbereich einfach und schnell durch eine Zwei-Punkt-Kalibrierung bei 0% Sauerstoff- und Luftatmosphäre (20,9% Sauerstoff) kalibrierbar und kann daher schnell gewechselt werden. Dies ist z. B. aus hygienischen Gründen für *in vivo* Messungen an humanem Gewebe gewünscht. Die Ansprechzeiten des Sensors in Gasatmosphäre und in wässrigen Medien, sowie mit Schweinehautproben sind vergleichbar mit etablierten Sonden und abhängig von den Permeationseigenschaften und der Dicke des Gewebes.

Bei *in vitro* Messungen mit Schweinehautproben zeigte der Sensor keine Veränderung der Lebensdauer oder der Dynamik der Lebensdauermessung, so dass der Sensor auf Grund der guten Sensitivität für Sauerstoffkonzentrationsmessungen an Gewebe geeignet ist. Die Messung der Ansprechzeit an Schweinehautproben zeigte, dass auch aus Tiefen bis zu $1\,mm$ Sauerstoffkonzentrationsmessungen durch Gewebe möglich sind. Wie sich dies jedoch *in vivo* verhält, wird in nachfolgenden Forschungsvorhaben untersucht.

Die FOXY-Schicht ist auf Grund der pH-Wert-Unabhängigkeit, der geringen Temperaturabhängigkeit, der leichten Austauschbarkeit und Kalibrierung, sowie der geringen Kosten sehr gut geeignet für *in vivo* Messungen an humanem Gewebe. Der fest in die Sol-Gel-Schicht eingebettete Farbstoff kann diese nicht verlassen, die Schicht jedoch kann individuell auf die Haut des Patienten aufgebracht und für jede Messung ausgetauscht werden. Durch die Verbindung zur Haut über einen Wasserfilm kann die Diffusion des Sauerstoffs aus dem Gewebe erleichtert werden. So wird die transepidermale Sauerstoffversorgung der oberen Hautschichten durch den Kontakt der FOXY-Schicht zur Haut unterbunden und ermöglicht die Messung der Sauerstoffkonzentration des Gewebes.