

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die Photodynamische Therapie (PDT) ist ein Therapieverfahren für oberflächennahes tumoröses und dysplastisches Gewebe, bei der mittels Licht Photosensibilisatoren im Gewebe angeregt werden, die durch Energieübertragungsprozesse den im Gewebe befindlichen molekularen Sauerstoff in Sauerstoffradikale umwandeln. Da die Anreicherung der Sensibilisatoren selektiv im Gewebe erfolgt, finden die zytotoxischen Reaktionen der Sauerstoffradikale, mit denen das umliegende Gewebe zerstört wird, ebenfalls nur im anvisierten Gewebe statt. Die Wirkung der PDT beruht auf der Umwandlung von molekularem Sauerstoff in Radikale, so dass entscheidend für den Erfolg der Therapie die genaue Kenntnis der Sauerstoffkonzentration im Gewebe ist. Daher wird ein Sauerstoffmonitoringsystem gefordert.

Mit Hilfe der optischen molekularen Bildgebung, bei der selektive Lumineszenzmarker für die Diagnose von Krankheiten oder Stoffwechselprozessen verwendet werden, kann die molekulare Sauerstoffkonzentration durch Messung der Lumineszenzlebensdauer sauerstoffsensitiver Marker gemessen werden. Die Lumineszenzlebensdauer dieser Farbstoffe wird in Abhängigkeit der Konzentration von Quencher-molekülen durch Energieübertragungsprozesse verkürzt, so dass bei bekannter Lebensdauercharakteristik dieser eine Quencherkonzentration zugeordnet werden kann. Dieser Prozess wird dynamisches Quenching genannt und durch die Stern-Volmer-Gleichung beschrieben. Der Zusammenhang zwischen Lebensdauer und Quencherkonzentration wird mit der Stern-Volmer-Konstanten quantifiziert, die, da sie abhängig von den Diffusionskonstanten von Molekül und Quencher ist, auch von der Temperatur und dem Lösungsmittel abhängt. Ein solcher Quencher ist molekularer Sauerstoff für lumineszierende Ruthenium-Komplexverbindungen. Deren Lumineszenzlebensdauer kann mit der Rapid-Lifetime-Determination-Methode (RLD) mit Hilfe einer Kamera pixelweise bestimmt werden, so dass die Berechnung eines Sauerstoffkonzentrationsbildes möglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein komplexes und dennoch modulares Lumineszenzlebensdauer-messsystem aufgebaut, mit dem es möglich ist, die Lebensdauer und damit die Sauerstoffkonzentration sowohl ein-, als auch zweidimensional mit Hilfe einer CCD-Kamera und der RLD-Methode zu bestimmen und als Bilder online darzustellen. Somit ist ein Mo-

monitoring der Sauerstoffkonzentration möglich, wobei bis zu 6 Bilder/min dargestellt werden können und die farbige Markierung relevanter Sauerstoffkonzentration automatisch erfolgt. Das System wurde mit zwei Farbstoffen, Ruthenium-tris-bipyridyl ($Ru(bpy)_3^{2+}$) gelöst in wässrigen Lösungen und der kommerziell erhältlichen sauerstoffpermeablen Sol-Gel-Schicht FOXY-SGS-M mit eingebettetem Ruthenium-Komplex, in aufwändigen Temperatur- und Sauerstoffkonzentrationsmessreihen in zwei ebenfalls in dieser Arbeit realisierten Küvetten, einer Kalibrier- und einer Durchflussküvette, überprüft. Die Funktionalität des Systems wurde mit $Ru(bpy)_3^{2+}$ -Lösungen an Hand eines Vergleichs mit Literaturwerten für die Stern-Volmer-Konstante überprüft, die eine sehr gute Übereinstimmung zeigte.

Die Abhängigkeit der Lebensdauer der $Ru(bpy)_3^{2+}$ -Lösung, sowie der FOXY-Schicht vom pH-Wert und der Temperatur wurde in beiden Küvetten vermessen und zeigte keine pH-Wert-Abhängigkeit, aber eine Temperaturabhängigkeit. Diese macht eine *in situ* Messung der Temperatur oder eine Temperaturstabilität von $\pm 1^\circ C$ für die $Ru(bpy)_3^{2+}$ -Lösung erforderlich. Die Temperaturabhängigkeit der FOXY-Schicht ist dagegen geringer, so dass nur eine Temperaturstabilität von $\pm 3^\circ C$ gefordert ist. Die Sensitivität der Farbstoffe ist im Bereich kleiner Sauerstoffkonzentrationen, die für die PDT relevant sind, am größten, wobei die der FOXY-Schicht trotz der längeren Lebensdauer geringer ist als die von $Ru(bpy)_3^{2+}$. Die *in vitro* Messungen an Schweinehautproben mit $Ru(bpy)_3^{2+}$ zeigten, dass einerseits die Lebensdauer bereits durch den Kontakt zur Schweinehaut verändert wird und andererseits die Dynamik der Lebensdaueränderung im relevanten Konzentrationsbereich abnimmt, so dass vermutet werden kann, dass der Farbstoff für *in vivo* Messungen nicht geeignet ist. Ob sich dies jedoch *in vivo* bestätigt, muss in nachfolgenden Applikationsprojekten festgestellt werden. Die Lebensdauer und die Dynamik der FOXY-Sensoren verändern sich durch den Kontakt zur Schweinehaut nicht. Die Ansprechzeiten beider Sensorfarbstoffe sind vergleichbar mit etablierten Sauerstoffsonden, so dass diese gut geeignet für Sauerstoffkonzentrationsmessungen sind. Der FOXY-Sensor erscheint durch die kurze Ansprechzeit, sowie die pH-Wert-Unabhängigkeit und die geringe Temperaturabhängigkeit ideal für minimal invasive Messungen an Gewebe und stellt wegen des nur oberflächlichen Kontakts keine Gefahr für den Menschen und keine Beeinträchtigung der PDT dar.

Das realisierte Lebensdaueremesssystem ist für bildgebende Sauerstoffkonzentrationsanalysen von Proben und Gewebe mit Dicken von 1mm hervorragend geeignet und stellt einen entscheidenden Schritt in Richtung Monitoringverfahren der PDT dar. In wie weit aus der oberflächennahen Messung auf die im Gewebe befindliche Sauerstoffkonzentration geschlossen werden kann, ist das Forschungsziel weiterer Projekte. Da das System modular aufgebaut ist, ist es auch für Untersuchungen anderer Marker geeignet. Weitere Anwendungsgebiete könnten daher molekular-medizinische Problemstellungen, wie z. B. Tests der Targetspezifität neu entwickelter Anker-moleküle für Kontrastmittel und Therapeutika sein.