

Aus dem Laser-Forschungslabor im LIFE-Zentrum  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Hofstetter

## **Zeitaufgelöste Fluoreszenzbildgebung für die Tumordiagnostik**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Frank Ließmann  
aus  
Stuttgart

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Hofstetter

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J.C. Tonn

Prof. Dr. K. Häußinger

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. H. Stepp

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen der zeitaufgelösten Fluoreszenzdiagnostik</b>	<b>3</b>
2.1	Fluoreszenz und Fluoreszenzabklingzeit . . . . .	3
2.1.1	Wechselwirkung mit Licht und Umgebungsmolekülen . . . . .	3
2.1.2	Die Fluoreszenzabklingzeit . . . . .	7
2.2	Methoden der zeitaufgelösten Fluoreszenzdiagnostik . . . . .	10
2.2.1	Messung im Zeitbereich . . . . .	10
2.2.2	Messung im Phasenbereich . . . . .	13
2.2.3	Bestimmung von Abklingzeiten $\tau_M$ und $\tau_\Phi$ . . . . .	22
2.3	Medizinische und biologische Fragestellungen . . . . .	26
2.3.1	Grundlegende Gewebeparameter . . . . .	26
2.3.2	Tumordiagnostik . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Das Messsystem</b>	<b>33</b>
3.1	Laser-AOM-Mikroskopsystem . . . . .	34
3.1.1	Anregungsweig . . . . .	35
3.1.2	Detektionsweig . . . . .	38
3.1.3	Steuereinheit . . . . .	40
3.2	Modifiziertes Messsystem mit Laserdiode . . . . .	45
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>47</b>
4.1	In-vitro-Messungen an Farbstofflösungen . . . . .	47
4.1.1	Fluoreszenzabklingzeiten homogener Farbstofflösungen . . . . .	47
4.1.2	Scheinbare Fluoreszenzabklingzeiten heterogener Farbstofflösungen . . . . .	49
4.2	In-vitro-Messungen endogener und exogener Fluorophore . . . . .	50
4.2.1	Reinsubstanzen endogener Gewebefluorophore . . . . .	50
4.2.2	Exogene Fluorophore: Kationische Liposomkonjugate mit Rhodamin . . . . .	52
4.3	Messungen an Gefrierschnitten . . . . .	56
4.4	In-vivo-Messungen mit Rhodamin-Liposomen am Hamstermodell . . . . .	60
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
5.1	In-vitro-Messungen an Farbstofflösungen . . . . .	63
5.1.1	Fluoreszenzabklingzeiten homogener Farbstofflösungen . . . . .	63

---

5.1.2	Scheinbare Fluoreszenzabklingzeiten heterogener Farbstofflösungen . . . . .	67
5.2	In-vitro-Messungen endogener und exogener Fluorophore . . . . .	69
5.2.1	Reinsubstanzen der endogenen Gewebefluoreszenz . . . . .	69
5.2.2	Exogene Fluorophore: Kationische Liposomkonjugate mit Rhodamin . . . . .	71
5.3	Messungen an Gefrierschnitten . . . . .	77
5.3.1	Fluoreszenzabklingzeiten in Gewebearealen . . . . .	80
5.3.2	Dysplasiegrad und Abklingzeiten im Gesamtepithel . . . . .	82
5.3.3	Linienauswertung . . . . .	84
5.4	In-vivo-Messungen mit Rhodamin-Liposomen am Hamstermodell . . . . .	86
5.4.1	Rohwerte der Abklingzeiten $\tau_M$ und $\tau_\Phi$ . . . . .	86
5.4.2	Extraktion der Rhodamin-Kinetik und Rhodaminabklingzeiten . . . . .	92
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
6.1	In-vitro-Messungen an Farbstofflösungen . . . . .	97
6.1.1	Fluoreszenzabklingzeiten homogener Farbstofflösungen . . . . .	97
6.1.2	Scheinbare Fluoreszenzabklingzeiten heterogener Farbstofflösungen . . . . .	99
6.2	In-vitro-Messungen endogener und exogener Fluorophore . . . . .	101
6.2.1	Reinsubstanzen der endogenen Gewebefluoreszenz . . . . .	101
6.2.2	Exogene Fluorophore: Kationische Liposomkonjugate mit Rhodamin . . . . .	109
6.3	Messungen an Gefrierschnitten . . . . .	116
6.4	In-vivo-Messungen mit Rhodamin-Liposomen am Hamstermodell . . . . .	123
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>129</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>133</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>153</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>155</b>

# 1 Einführung

Die Dimension *Zeit* als Quelle zusätzlicher Informationen bei der Untersuchung medizinisch-biologischer Fragestellungen zu nutzen — darin liegt die Motivation für die vorliegende Arbeit. Grundlegender Ansatzpunkt für eine mögliche Verbesserung der Diagnostik ist der Umstand, dass durch die zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion mit der *Fluoreszenzabklingzeit*  $\tau^1$  ein zusätzlicher Parameter zur Verfügung steht, welcher auf anderem Wege nicht zugängliche Informationen liefern kann:

Anhand von Weißlichtuntersuchungen erschließt sich zunächst vor allem die *Morphologie* eines Untersuchungsobjekts. Dies gilt für in-vivo-Untersuchungen an Patienten ebenso wie für die Untersuchung biologischer Präparate oder Zellen, auch unter Zuhilfenahme konventioneller Färbemethoden. Im Falle der Tumordiagnostik lassen sich so auffällige, oberflächliche Veränderungen aufgrund ihrer abweichenden Struktur oder Färbung erkennen. Gewebeproben werden dabei anhand von Kriterien wie Zelldichte, Kern-Plasma-Verhältnis der Zellen und Veränderungen der Kernmorphologie begutachtet. Bei in-vitro-Kulturen von Zellen stehen neben rudimentären Informationen über die Zellvitalität aufgrund der Zellform auch eine Vielzahl an Färbemethoden für unterschiedliche Fragestellungen zur Verfügung.

Weitergehende Informationen kann die Fluoreszenzuntersuchung liefern, indem durch sie die *Lokalisation* bestimmter Fluorophore im Untersuchungsobjekt direkt sichtbar wird. Dabei lässt sich die Fluoreszenz zahlreicher endogener Fluorophore, wie zum Beispiel NADH, Flavine, Kollagen, Elastin und einer Vielzahl an Proteinen vor allem mit Tryptophan- und Tyrosinresten nutzen. Darüber hinaus kommen auch zahlreiche exogen zugeführte oder induzierte Fluorophore zum Einsatz. Ihre jeweiligen Transport- und spezifischen Anreicherungsmechanismen, zum Beispiel im dysplastisch veränderten Gewebe, bestimmen dabei bei welchen Fragestellungen anhand der Fluoreszenzemission dieser Fluorophore Aussagen über den Zustand des Untersuchungsobjekts erhältlich sind.

*Zeitaufgelöste Fluoreszenzuntersuchungen* ermöglichen nun darüber hinausgehende detailliertere Informationen über die Herkunft der Fluoreszenz und die Umgebungsbedingungen der Fluorophore:

- *Identifikation von Fluorophoren:* Die Vielzahl der in biologischen Proben endogen vorkommenden Fluorophore und ihre breiten, sich überlappenden Emissionsspektren führen in der Regel zu einer Gesamtfluoreszenzemission, aus der sich schwerlich quantitative Aussagen über die einzelnen Fluoreszenzbei-

---

<sup>1</sup> Zur Definition des Begriffs Fluoreszenzabklingzeit siehe Abschnitt 2.1.2

träge gewinnen lassen. Gerade aber ein vermindertes oder erhöhtes Vorkommen einzelner Fluorophore ist als Indikator für „von der Norm abweichende“ Bedingungen und Abläufe im Untersuchungsobjekt von großem Interesse für die Diagnostik. Auch bei der zeitaufgelösten Detektion der Fluoreszenz tragen alle Beiträge zum Gesamtsignal bei. Gemäß ihren relativen Anteilen bestimmen sie dabei aber den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz unterschiedlich stark. Auf diese Weise lassen sich daher Verschiebungen in der Stärke einzelner Beiträge erkennen.

- *Fluorophore als Mikrosonden:* Die Mikroumgebung, in welcher sich die Fluorophore befinden, nimmt auf den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz auf vielfältige Weise Einfluss. Vor allem spielen dabei Umgebungsparameter wie Polarität der Umgebung, Temperatur, pH-Wert und  $p\text{CO}_2$ -Wert, die Sauerstoffkonzentration und Ionenkonzentrationen sowie die Bindung des Fluorophors an andere Moleküle eine Rolle. Unabhängig von der Konzentration der Fluorophore selbst führen diese Umgebungseinflüsse zu einer Fluoreszenzabklingzeit, die die Umgebungsbedingungen des Fluorophors erkennen lässt.

Während also anhand von Weißlichtuntersuchungen und konventionellen Fluoreszenzmethoden in erster Linie die Morphologie des Untersuchungsobjekts und die Lokalisation von Fluorophoren in ihm untersucht werden können, ermöglicht es die zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion zusätzlich genauere Informationen über die Art der Fluorophore und ihre Mikroumgebung zu erhalten.

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Realisierung eines Messsystems für die bildgebende Bestimmung von Fluoreszenzabklingzeiten um die zeitaufgelösten Fluoreszenzinformationen für medizinisch-biologische Fragestellungen zugänglich zu machen. Durch die durchgeführten Anwendungen des Messsystems sollten darüber hinaus die Grundlagen für den weiteren Einsatz des Systems vor allem in der Tumordiagnostik gelegt werden.

## 2 Grundlagen der zeitaufgelösten Fluoreszenzdiagnostik

Was ist die Fluoreszenzabklingzeit? Wie kann sie durch die Mikroumgebung der Fluorophore beeinflusst werden? Wie kann man Fluoreszenzabklingzeiten messen? Welche medizinisch-biologischen Fragestellungen sind so durch die zeitaufgelöste Fluoreszenzdiagnostik zugänglich? Das sind die Fragen, die in diesem Kapitel durch die Darstellung der Grundlagen geklärt werden sollen. Der erste Abschnitt befasst sich mit dem physikalischen Hintergrund der Fluoreszenz und Fluoreszenzabklingzeit. Die technischen Methoden der Messung von Fluoreszenzabklingzeiten sind im zweiten Abschnitt dargestellt. Auf diese physikalisch-technischen Grundlagen aufbauend wird im letzten Abschnitt ein Überblick über die Anwendung der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion auf medizinisch-biologische Fragestellungen gegeben.

### 2.1 Fluoreszenz und Fluoreszenzabklingzeit

#### 2.1.1 Wechselwirkung mit Licht und Umgebungsmolekülen

Während Atome, außer den Lanthaniden, in der Regel nur in gasförmiger Phase Fluoreszenz zeigen, finden sich vor allem unter den organischen Molekülen mit konjugierten  $\pi$ -Elektronensystemen Fluorophore, die durch Licht im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich zur Fluoreszenz angeregt werden können. Für die Fluoreszenz sind neben dem initierenden Prozess der Wechselwirkung von Licht mit einem Fluorophor, besonders die im Anschluss an die Anregung des Moleküls stattfindenden Prozesse und möglichen Wechselwirkungen mit Umgebungsmolekülen von äußerster Bedeutung.

Die Energieniveaus eines Moleküls und die Übergänge zwischen den Niveaus bei der Absorption und der folgenden Relaxation aus dem angeregten Zustand lassen sich anhand eines in Abbildung 2.1 gezeigten Jablonski-Diagramms visualisieren. Ausgangspunkt ist der elektronische Grundzustand, der Singulettzustand  $S_0$ , in dem sich Moleküle unter normalen Bedingungen und Raumtemperatur befinden. In ihm sind die Spins aller Elektronen paarweise entgegengesetzt orientiert. Durch die Absorption eines Photons wird ein Elektron des höchstenergetischsten Paares unter Beibehaltung seiner Spin-Orientierung auf das nächsthöhere elektronische Energieniveau  $S_1$  oder ein noch höheres Niveau  $S_n$  gebracht. Das Molekül als Ganzes befindet sich dadurch in einem der vielen möglichen Schwingungszustände  $S_{1i}$  des elektronisch angeregten Zustands. Die diskrete Quantelung der Energieniveaus und die Unteil-

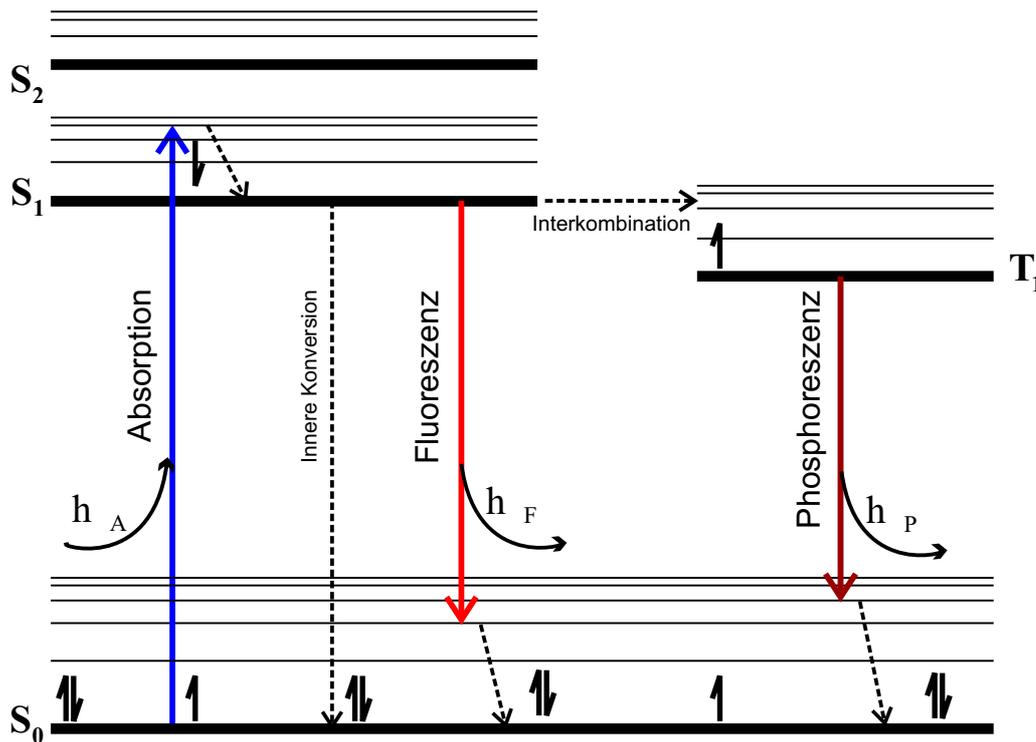


Abbildung 2.1: Jablonskidiagramm: Das Diagramm veranschaulicht die elektronischen Energieniveaus  $S_i$  und  $T_i$  eines Moleküls mit ihren Schwingungsniveaus und die Übergänge zwischen ihnen nach der Absorption eines Photons (kleine Pfeile: Orientierung der Elektronenspins). Die weitere Untergliederung der Energieniveaus durch Rotationen des Moleküls ist nicht eingezeichnet. Übergänge unter Beteiligung von Photonen sind als durchgezogene Pfeile dargestellt, die nichtstrahlenden Wege gestrichelt. Die zeitliche Dimension ist in der Anordnung der Prozesse von links nach rechts enthalten.

barkeit der Photonenenergie bedingt, dass die Photonenenergie  $E_A$  gleich der Energiedifferenz der Molekülniveaus zwischen denen der Übergang erfolgt sein muss:

$$E_A = h\nu_A = \frac{hc}{\lambda_A} = E_{S_{1i}} - E_{S_{00}} \quad (2.1)$$

Dabei bezeichnen  $\lambda_A$  und  $\nu_A$  die Wellenlänge und Frequenz des Anregungslichts,  $E_{S_{1i}}$  und  $E_{S_{00}}$  die Energie des angeregten und des Grundzustands,  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum und  $c$  die Lichtgeschwindigkeit.

Der Elektronenübergang bei der Anregung des Moleküls erfolgt so schnell (die Zeitskala der Wechselwirkung beträgt circa  $10^{-15}$  s), dass das Kerngerüst des Moleküls nicht dem Gleichgewichtszustand der veränderten elektronischen Struktur entspricht (Franck-Condon-Prinzip). Das Molekül in einem höheren Schwingungszustand  $S_{1i}$  relaxiert so nach der Absorption zunächst innerhalb von  $10^{-12}$  s in den thermisch equilibrierten Zustand  $S_{10}$ . Dieser ist der Ausgangspunkt für die möglichen Wege,

auf denen das Molekül in den elektronischen Grundzustand zurückkehren kann und dabei die überschüssige Energie wieder abgibt.

### 2.1.1.1 Fluoreszenz

Bei der als Fluoreszenzerscheinung beobachtbaren Abgabe der überschüssigen Energie geht das Molekül von  $S_{10}$  unter Emission eines Fluoreszenzphotons in ein Schwingungsniveau  $S_{0i}$  des elektronischen Grundzustands über. Aus diesem relaxiert das Molekül innerhalb von  $10^{-12}$  s in den thermisch equilibrierten Grundzustand  $S_{00}$ . Das emittierte Fluoreszenzphoton trägt dabei die Energie

$$E_F = h\nu_F = \frac{hc}{\lambda_F} = E_{S_{10}} - E_{S_{0i}} \quad (2.2)$$

Aus der Übergangswahrscheinlichkeit für den elektronischen Dipolübergang, welche durch die energetische Struktur der Singulettzustände bestimmt ist, ergibt sich die Übergangsrates  $\Gamma$ , also die intrinsische Fluoreszenzrate ohne andere Relaxationsmöglichkeiten. Bei den meisten Molekülen liegt sie typischerweise um  $10^8 \text{ s}^{-1}$ . Die Emission eines Fluoreszenzphotons erfolgt somit ungefähr  $10^{-9}$  s (1 Nanosekunde, 1 ns) nach Absorption eines Photons des Anregungslichts.

Die Dissipation von Energie bei der Schwingungsrelaxation sowohl vor als auch nach der Emission hat eine geringere Energie der Fluoreszenzphotonen im Vergleich zur Energie der absorbierten Photonen zur Folge, die Fluoreszenz ist daher zu längeren Wellenlängen hin verschoben (Stokes-Verschiebung). Besonders bei organischen Molekülen ist diese Verschiebung wegen der Vielzahl an Schwingungszuständen des Moleküls oftmals sehr ausgeprägt. Stokes-Verschiebungen von 100 nm und darüber sind bei ihnen keine Seltenheit.

Experimentell treten bei der nichtmonochromatischen Anregung einer homogenen Probe breite Absorptions- und Fluoreszenzbanden auf, die sich spiegelbildlich entsprechen. Die Ursache dafür liegt in der Vielzahl und Dichte der Schwingungs- und Rotationsniveaus des Moleküls, die im Grundzustand  $S_0$  und im angeregten Zustand  $S_1$  annähernd gleiche Energien haben. Da die Absorption aus dem Grundzustand  $S_{00}$  in ein Energieniveau  $S_{1i}$  erfolgt, gibt das Absorptionsspektrum die Schwingungsniveaus des angeregten Zustands wieder. Entsprechend zeigen sich im Emissionsspektrum die Schwingungsniveaus des Grundzustands.

### 2.1.1.2 Konkurrierende Prozesse

Fluoreszenz ist nicht der einzige Weg auf dem ein Molekül die überschüssige Energie abgeben kann. In Konkurrenz zur Fluoreszenz stehen mehrere Prozesse, die nicht nur eine Rückkehr in den Grundzustand  $S_0$  sondern auch eine chemische Veränderung des Moleküls zur Folge haben können:

- *Innere Konversion:* Aus dem angeregten Zustand  $S_{10}$  ist ein direkter strahlungsloser Übergang zu hohen Schwingungsniveaus von  $S_0$  möglich. Bei den meisten organischen Molekülen spielt die Innere Konversion keine wesentliche Rolle. Die Energiedifferenz zwischen den beteiligten elektronischen Niveaus  $S_0$  und  $S_1$  ist so groß, dass die Fluoreszenzrate  $\Gamma$  sehr viel größer als die Rate  $k_{IK}$  ist. Allerdings ist der energetische Abstand der elektronisch angeregten Zustände  $S_n$  bei diesen Molekülen relativ gering. Als Konsequenz dessen wird in der Regel nur Fluoreszenz aus  $S_1$  beobachtet, da das Molekül nach Anregung in ein höheres Niveau  $S_n$  durch innere Konversion strahlungslos in den ersten angeregten Zustand  $S_1$  übergeht.

- *Interkombination:* Durch sogenannte Interkombination kann als Folge der Spin-Bahn-Kopplung ein strahlungsloser Übergang vom Singulettzustand  $S_1$  zum Triplettzustand  $T_1$  des Moleküls erfolgen, bei welchem die Elektronenspins gleichgerichtet sind. Eine direkte Anregung in den Triplettzustand  $T_1$  durch Absorption eines Photons ist nach den Auswahlregeln für elektronische Dipolübergänge aufgrund der dafür erforderlichen Spinumkehr nicht möglich.

Die Rate  $k_P$  für den Übergang aus dem Triplettzustand  $T_1$  in den Singulettzustand  $S_0$  unter Emission eines Photons — die Phosphoreszenz — ist um mehrere Größenordnungen kleiner als die Fluoreszenzübergangsrates  $\Gamma$ . Der Übergang ist quantenmechanisch „verboten“. Entsprechend länger ist die Verweildauer im Triplettzustand ( $10^{-6} - 10^{-3}$  s), wodurch eine Wechselwirkung mit Umgebungsmolekülen und die strahlungslose Übertragung der Energie auf diese begünstigt wird.

- *Wechselwirkungsprozesse:* Unter diesem Begriff sollen hier die Prozesse zusammengefasst werden, bei denen unter Wechselwirkung mit Umgebungsmolekülen die überschüssige Energie abgeführt wird:
  - Bimolekulare Fluoreszenzlöschung: Entweder durch Energieübertragung bei Stoß mit einem Umgebungsmolekül (dynamic quenching) oder durch Komplexbildung mit einem anderen Molekül (static quenching) wird die Energie des angeregten Zustandes abgegeben. Beide Arten der Fluoreszenzlöschung nehmen mit höherer quencher-Konzentration zu, zeigen aber eine gegenläufige Temperaturabhängigkeit, da einerseits bei höherer Temperatur die Stoßwahrscheinlichkeit zunimmt, andererseits die durch die thermische Bewegung verminderte Wechselwirkungszeit eine entsprechend geringere Wahrscheinlichkeit der Komplexbildung zur Folge hat.
  - Resonanzenergietransfer: Beim Resonanzenergietransfer (FRET) wird die überschüssige Energie des angeregten Zustands ohne Emission eines Photons über direkte Dipol-Dipol-Wechselwirkung auf einen Akzeptor übertragen. Ausschlaggebend für die Transferrate sind neben dem spektralen Überlapp des Donor-Emissionsspektrums mit dem Akzeptor-Absorptionsspektrum und der relativen Orientierung ihrer Dipolmomente vor allem der Abstand der Moleküle.

- excited state reactions: In vielen Fluorophoren erzeugt die Absorption eines Photons eine derart veränderte elektronische Verteilung, dass seine chemischen und physikalischen Eigenschaften verändert werden. Dies kann Reaktionen mit anderen in der Umgebung befindlichen Molekülen ermöglichen, wie typischerweise excimer und exciplex-Bildung, oder zur Protonierung beziehungsweise Deprotonierung des angeregten Moleküls führen. Das Produkt dieser Reaktionen fluoresziert oftmals wegen der veränderten Energiestruktur bei anderen Wellenlängen oder zeigt gar keine Fluoreszenz. Sind derartige Reaktionen nichtreversibel, so zeigen sie sich bei einer zeitlich konstanten Intensität des Anregungslichts in einer kontinuierlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität. Dieser Effekt ist als Ausbleichen bekannt.

### 2.1.2 Die Fluoreszenzabklingzeit

Die grundlegende Definition der Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$  ergibt sich phänomenologisch aus dem zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz einer Probe nach Anregung durch einen ideal kurzen Lichtimpuls: Die Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$  gibt den Zeitpunkt nach der Anregung an, zu dem die Fluoreszenzintensität auf  $1/e$  des ursprünglichen Wertes abgefallen ist. Für das Ensemble der angeregten Moleküle bedeutet somit die Fluoreszenzabklingzeit — die „fluorescence lifetime“ — die mittlere Verweildauer im angeregten Zustand.

Konkurrenzprozesse zur Fluoreszenz, die auf anderem Wege die Zahl der angeregten Moleküle vermindern, und Heterogenität einer Probe mit unterschiedlichen Fluorophoren und Umgebungsbedingungen führen zu einem komplexen Abklingverhalten. Die einfache phänomenologische Definition *einer* Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$  trägt allerdings solchen Gegebenheiten keine Rechnung und bedarf einer Erweiterung.

#### 2.1.2.1 Intrinsische Abklingzeit

Der einfachste Fall liegt vor, wenn das Molekül ausschließlich über Fluoreszenzemission in den Grundzustand zurückkehren kann. Bestimmend für die Übergangsrate  $\Gamma$  ist dann lediglich die energetische Struktur des Moleküls. Sie ist außer durch den Aufbau des Moleküls und seiner Konformation auch durch äußere Parameter wie zum Beispiel die Polarität des Lösungsmittels bestimmt. Die Ratengleichung, welche für jeden Zeitpunkt  $t$  nach einer Anregung eines Ensembles von Molekülen die Veränderung der Anzahl  $N$  der Moleküle im angeregten Zustand angibt, ist:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -\Gamma N(t) \quad (2.3)$$

Aufgrund der statistischen Natur der Fluoreszenzemission zeigt eine Probe in diesem Fall nach einer Pulsanregung zum Zeitpunkt  $t_0$  ein monoexponentielles Abklingverhalten der Fluoreszenzintensität  $I(t)$ :

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t-t_0}{\tau_0}\right) \quad (2.4)$$

mit einer intrinsischen Abklingzeit  $\tau_0 = 1/\Gamma$ , die gleich dem Kehrwert der Rate  $\Gamma$  der strahlenden Relaxation ist. Die Zahl der absorbierten Photonen ist dabei gleich der Zahl der emittierten, das heißt die Quantenausbeute ist maximal ( $\Phi = 1$ ). Ein derartiges Fluoreszenzabklingverhalten findet sich annähernd zum Beispiel bei Laserfarbstoffen in Lösungen mit nicht zu hohen Farbstoffkonzentrationen.

### 2.1.2.2 Einflüsse der Mikroumgebung

Alle Konkurrenzprozesse zur Fluoreszenz wie Interkombination, innere Konversion, Fluoreszenzlöschung und Resonanzenergietransfer entvölkern den angeregten Zustand mit ihren jeweiligen Raten  $k_i$ , was zu einer geringeren Quantenausbeute und somit auch Fluoreszenzintensität führt. Die Ratengleichung ist daher mit  $k := \sum k_i$ :

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(\Gamma + k) N(t) \quad (2.5)$$

Aus der Ratengleichung 2.5 ist ersichtlich, dass die Fluoreszenz nach wie vor monoexponentiell abnimmt, dieses Abklingen aber mit einer Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$  erfolgt, die geringer ist als die intrinsische Abklingzeit  $\tau_0$ :

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k} \quad (2.6)$$

### 2.1.2.3 Fluoreszenzabklingzeit bei Probenheterogenität

Insbesondere in biologischen Systemen ist, abgesehen von Unterschieden zur intrinsischen Abklingzeit durch Wechselwirkungen mit Umgebungsmolekülen, ein wesentlich komplexeres Abklingverhalten die Regel:

- Aufgrund der Vielzahl an Fluorophoren lassen sich unterschiedliche Fluorophore, welche wegen gleicher oder ähnlicher Substituenten ähnliche Absorptions- und Emissionsspektren aufweisen können, oftmals spektral dementsprechen nicht trennen. Sie tragen mit dem ihnen eigenen Abklingverhalten zur Gesamtfluoreszenz bei.

- Je nach Lokalisation zum Beispiel in Membranen oder Zytoplasma herrschen auch für die jeweiligen Fluorophore heterogene Bedingungen. Dabei variieren entsprechend den lokalen Umgebungsbedingungen<sup>1</sup> die Bedingungen für die unterschiedlichen Relaxationsarten.

Jeder einzelne Beitrag zur Gesamtfluoreszenz ist durch seine Fluoreszenzabklingzeit  $\tau_i$  und seine relative Amplitude  $\alpha_i$  charakterisiert. Das Abklingverhalten bei Heterogenität der Probe ist multi- oder auch nichtexponentiell. Zur Charakterisierung des Gesamtabklingverhaltens werden die mittlere Intensitätsabklingzeit

$$\langle \tau \rangle_i = \frac{\sum \alpha_i \tau_i^2}{\sum \alpha_i \tau_i} \quad (2.7)$$

und die mittlere Amplitudenabklingzeit

$$\langle \tau \rangle_a = \sum \alpha_i \tau_i \quad (2.8)$$

verwendet ([Sil98]). Physikalisch bedeutet die mittlere Intensitätsabklingzeit  $\langle \tau \rangle_i$  die mittlere Verweildauer der Fluorophore der heterogenen Probe im angeregten Zustand. Die mittlere Amplitudenabklingzeit  $\langle \tau \rangle_a$  ist die Abklingzeit, welche ein Fluorophor hätte, wenn es bei zeitlich konstanter Anregungslichtintensität die gleiche Fluoreszenz wie die heterogene Probe zeigen würde.

---

<sup>1</sup> Polarität, Temperatur, pH-Wert, Zugänglichkeit des Fluorophors für Quencher- und Energieakzeptormoleküle, Konzentration von Quenchemolekülen, Bindung des Fluorophors an andere Moleküle

### 2.2 Methoden der zeitaufgelösten Fluoreszenzdiagnostik

Nach den im vorigen Abschnitt anhand der relevanten molekularen Prozesse und der Einflussmöglichkeiten der Umgebungsparameter dargestellten physikalischen Grundlagen der zeitaufgelösten Fluoreszenzdiagnostik, sollen nun die Methoden erläutert werden, mit denen sich Fluoreszenzabklingzeiten von einigen Nanosekunden messen lassen. Durch sie wird erst das Instrumentarium für die Gewinnung an Informationen über medizinische und biologische Parameter anhand von Fluoreszenzabklingzeiten zur Hand gegeben.

In der konventionellen, nicht-zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie (Dauerstrich beziehungsweise cw- oder steady-state-Spektroskopie) wird die Probe durch eine Lichtquelle mit konstanter Intensität angeregt. Zwar bestimmen auch in diesem Fall die in Abschnitt 2.1.1 erwähnten Prozesse gemäss ihren Übergangsraten die Rückkehrwege der Fluorophore in den Grundzustand. Sie wirken sich dabei aber lediglich auf die zeitlich konstante Fluoreszenzintensität aus, sofern nicht durch irreversible Prozesse nichtanregbare oder nichtfluoreszierende Produkte entstehen. Auf diese Weise lässt sich daher über die Prozesse selbst und ihr Auftreten in der untersuchten Probe keine Information gewinnen.

Für die Messung von Fluoreszenzabklingzeiten stehen zwei Methoden zur Verfügung, die sich in der Art der Fluoreszenzanregung und Detektion unterscheiden: Die Messung der Fluoreszenz durch Pulsanregung, auch als Messung im Zeitbereich bezeichnet, und die Messung im Phasenbereich durch die Anregung mit intensitätsmoduliertem Licht. In dieser Arbeit wird die Bestimmung von Fluoreszenzabklingzeiten unter Verwendung der Phasenbereichsmethode durchgeführt. Die Methode der Messung im Zeitbereich soll hier dennoch, auch wegen ihrer weiten Verbreitung, kurz in ihren Grundzügen erläutert werden.

#### 2.2.1 Messung im Zeitbereich

Bei der Pulsmethode zur Messung von Fluoreszenzabklingzeiten wird die Probe durch einen kurzen Lichtimpuls angeregt. Dabei wird aus den Fluorophoren in der Probe durch die Absorption von Photonen ein Ensemble von Molekülen im angeregten Zustand präpariert. Die Moleküle des Ensembles relaxieren individuell entsprechend den statistischen Übergangswahrscheinlichkeiten der verschiedenen Abregungswege in den Grundzustand, so dass die hervorgerufene Fluoreszenz zeitlich abklingt. Die Fluoreszenzintensität zeigt dabei je nach Art und Anzahl der beitragenden Fluoreszenzbeiträge einen monoexponentiellen, multiexponentiellen oder auch nichtexponentiellen Verlauf.

Bei der technischen Umsetzung ist auf Anregungsseite eine Lichtquelle erforderlich, die Lichtpulse mit Pulsdauern liefert, die deutlich kürzer als die zu messenden Zeiten sein sollten. Für die in biologischen Präparaten in der Regel interessierenden

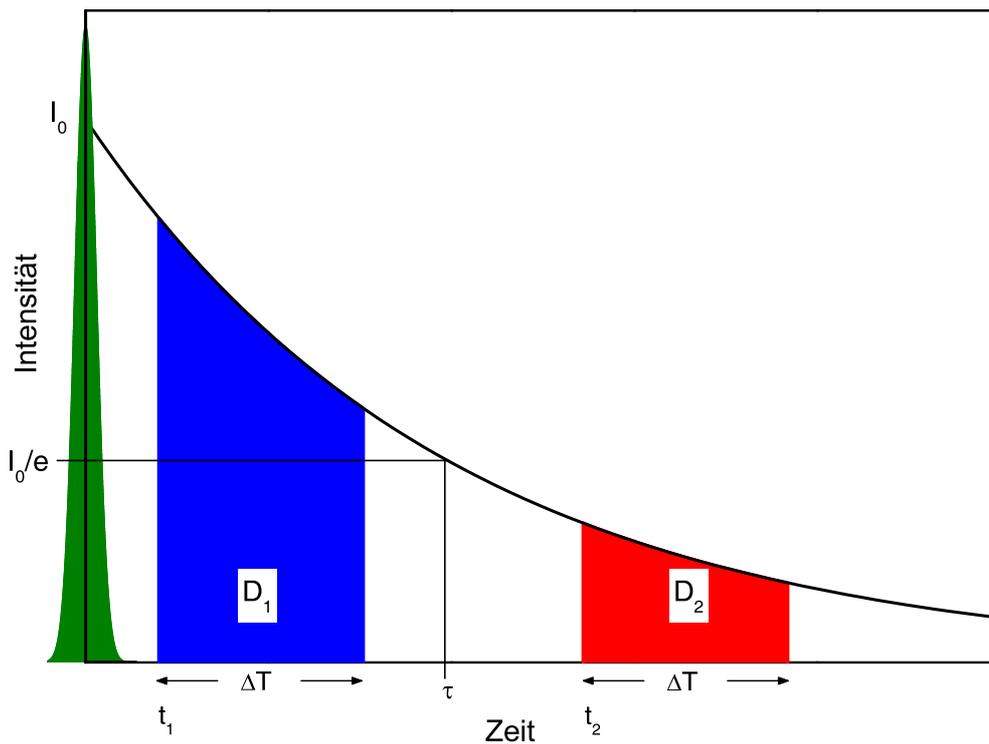


Abbildung 2.2: Prinzip der Pulsmethode: Durch einen kurzen Lichtimpuls wird eine Anzahl von Molekülen in den angeregten Zustand gebracht, aus dem sie unter Emission eines Fluoreszenzphotons relaxieren können. Die Bestimmung des Abklingverhaltens erfolgt durch mindestens zwei Messungen der Fluoreszenzintensität zu zwei Zeitpunkten  $t_1$  und  $t_2$  nach dem Anregungslichtimpuls.

Zeitskalen von Nanosekunden macht dieser Umstand aufwendige, gepulste Lasersysteme erforderlich und stellt dadurch einen klaren Nachteil der Methode dar. Erst seit neuerer Zeit stehen auch wesentlich einfachere und preisgünstigere Laserdioden als gepulste Anregungslichtquellen zur Verfügung.

**Intensitätsintegrierende Messung:** Die Bestimmung der Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$ , beziehungsweise der Abklingzeiten  $\tau_i$  und relativen Amplituden  $\alpha_i$  im Falle mehrerer Beiträge, ist durch die Aufnahme des Fluoreszenzsignals zu mehreren Messzeitpunkten nach dem Anregungslichtimpuls möglich. Für monoexponentielles Abklingverhalten beziehungsweise für die Bestimmung einer mittleren Abklingzeit  $\langle \tau \rangle$  sind dafür zwei Stützstellen ausreichend (Abbildung 2.2). Zu zwei Messzeiten  $t_1$  und  $t_2$  nach dem Anregungslichtimpuls wird jeweils für ein Messfenster  $\Delta T$  das Detektorsignal integriert. Aus dem Verhältnis der Messsignale  $D_1$  und  $D_2$  läßt sich unter der Annahme monoexponentiellen Abklingverhaltens die Abklingzeit  $\tau$  beziehungsweise mittlere Abklingzeit  $\langle \tau \rangle$  berechnen:

$$\tau = \frac{t_2 - t_1}{\ln(D_1/D_2)} \quad (2.9)$$

Genauere Informationen über Abklingzeiten  $\tau_i$  und relative Amplituden  $\alpha_i$  im Falle mehrerer Beiträge zum Fluoreszenzsignal macht ein Abtasten der Abklingkurve zu vielen Messzeitpunkten erforderlich. Die zumeist geringe Fluoreszenzintensität hat dann jedoch ein schlechtes Signal-Rauschverhältnis zur Folge, das durch Integration der jeweiligen Messfenster über viele repetitive Lichtimpulse verbessert werden kann.

**Einzelphotonenzählung:** Für die Bestimmung von Fluoreszenzabklingzeitkurven mit höchster Präzision hat sich bei der Messung im Zeitbereich die Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonendetektion (TCSPC, time-correlated single photon counting) durchgesetzt ([Har77], [Koe78]). Statt der in einem Zeitintervall auf den Detektor fallenden Intensität wird dabei die Zeit bestimmt, welche nach dem Anregungsimpuls bis zum ersten Ereignis am Detektor, dem Eintreffen eines Photons, vergeht. Das Histogramm der Detektorereignisse zu verschiedenen Zeiten nach dem Anregungslichtimpuls stellt so die Fluoreszenzabklingkurve dar. Nachteilig wirkt sich dabei die Notwendigkeit vieler Messzyklen aus, die lange Messzeiten bedingt. Darüber hinaus existieren keine zweidimensionalen Detektoren, die die Einzelphotonendetektion bildgebend realisieren. Für die bildgebende Anwendung muss die Probe punktweise abgerastert werden, wodurch die Messzeiten unter Verwendung dieser Methode zumeist bei mindestens einigen Minuten liegen.

Die auf diese Weise gewonnenen Fluoreszenzabklingkurven ermöglichen eine genaue Analyse der Fluoreszenzabklingzeiten und relativen Amplituden bei mehreren Fluoreszenzbeiträgen durch eine numerische Kurvenanpassung einer zwei- oder multiexponentiellen Modellfunktion an die Messdaten. Außer in Fällen, die durch die a-priori-Kennntnis über entsprechende Gegebenheiten der Probe gerechtfertigt sind, ist die Beschränkung auf maximal drei Beiträge in der Modellfunktion angebracht. Höher multiexponentielle Modellfunktionen können zwar das Fehlerquadrat zwischen Modellfunktion und Messdaten verringern, das als „Gütekriterium“ für numerische Anpassungen verwendet wird. Durch die zusätzlichen Exponentialfunktionen in der Modellfunktion werden aber in der Regel nicht die Parameter tatsächlicher Fluoreszenzkomponenten berechnet, sondern eher Messungenauigkeiten bereinigt.

**Gegatete Fluoreszenzdetektion:** Eine andere Anwendungsmöglichkeit der Puls-methode als zur quantitativen Bestimmung von Fluoreszenzabklingzeiten, liegt in der gegateten Detektion der Fluoreszenz. Mit schnell gatebaren Kamerasystemen lassen sich bei einem Fluoreszenzsignal, in welchem mehrere Beiträge mit hinreichend unterschiedlichen Abklingzeiten vorliegen, zum Beispiel Fluoreszenzbeiträge mit kürzeren Abklingzeiten unterdrücken. Die Kamera detektiert dabei erst zu einem Zeitpunkt, zu dem die Fluoreszenz dieser kurzlebigen Komponente weitestgehend abgeklungen ist, so dass nur die langlebigen Fluoreszenzbeiträge wesentlich zum Signal beitragen. ([Cub91], [Sch94], [Sch95a])

### 2.2.2 Messung im Phasenbereich

Als Alternative zu der obigen Messmethode steht die in dieser Arbeit verwendete Phasenbereichsmethode zur Verfügung, wie sie erstmals schon 1926 von Gaviola ([Gav26a] [Gav26b]) für die Messung schneller Prozesse wie Fluoreszenzabklingzeiten vorgeschlagen wurde. Mit ihrer Hilfe konnte er das damals technisch nicht zu bewältigende Problem umgehen, dass für die Zeitbereichsmessung von Prozessen, welche sich im Bereich von Nanosekunden abspielen, weder Laser noch andersartige gepulste Systeme mit Pulsdauern in der Größenordnung von Pikosekunden bis Nanosekunden zur Verfügung standen. Die Methode wurde für die Messung von Fluoreszenzabklingzeiten weiter eingesetzt ([Web52], [Bai53], [Spe69], [Web72], [Cho83]). Besondere Bedeutung hat die Methode in der Folge vor allem bei der Untersuchung biologischer Fragestellungen ([Lak73b], [Lak81], [Gra83], [McG84], [Gra84a], [Lak85]) gewonnen, da durch sie auch bildgebend in kurzen Messzeiten das Fluoreszenzabklingverhalten auch schnell zerstörbarer, empfindlicher Proben möglich ist.

#### 2.2.2.1 Prinzip der Phasenbereichsmessung

Bei der Phasenbereichsmessung wird, anders als bei der Messung im Zeitbereich, nicht repetitiv ein Ensemble von Molekülen im angeregten Zustand präpariert, dessen zeitliche Entwicklung dann abgefragt wird, sondern die Fluoreszenz kontinuierlich angeregt, dabei aber die Intensität des Anregungslichts mit Frequenzen von einigen MHz (siehe Abschnitt 2.2.3.1) moduliert (Abbildung 2.3).

Durch die kontinuierliche Anregung werden entsprechend der Absorptionswahrscheinlichkeit und Anregungsintensität ständig Moleküle in den angeregten Zustand gebracht, aus dem sie, im Mittel nach Ablauf der Abklingzeit  $\tau$ , unter Emission eines Fluoreszenzphotons in den Grundzustand zurückkehren. Ist das Anregungslicht sinusförmig in seiner Intensität moduliert, so zeigt auch die Fluoreszenz sinusförmige Intensitätsmodulation. Dabei besitzt sie eine geringere Modulationstiefe  $M_F$  und weist eine Phasenverschiebung  $\Delta\Phi$  gegenüber dem Anregungslicht auf. Demodulation  $M$  und Phasenverschiebung  $\Delta\Phi$  sind umso stärker ausgeprägt, je länger die Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$  ist. Multi- oder auch nichtexponentielles Abklingverhalten der Fluoreszenz führen dabei ebenso wie rein monoexponentielles Abklingverhalten zu sinusförmiger Intensitätsmodulation der Fluoreszenz (siehe Abschnitt 2.2.3.2).

Demodulation und Phasenverschiebung der Fluoreszenz im Vergleich zum Anregungslicht sind die Messparameter, die bei dieser Methode für die Bestimmung von Fluoreszenzabklingzeiten zur Verfügung stehen.

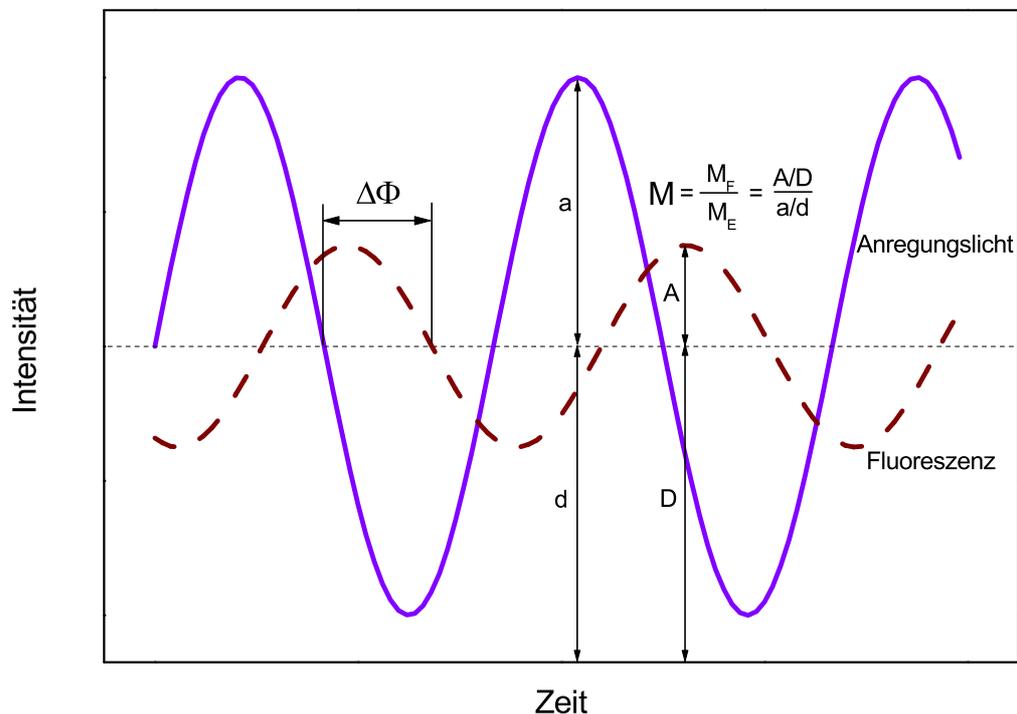


Abbildung 2.3: Prinzip der Phasenbereichsmethode: Intensitätsmoduliertes Anregungslicht führt zu einer Fluoreszenzemission, die mit gleicher Frequenz moduliert ist, aber eine Demodulation  $M$  und Phasenverschiebung  $\Delta\Phi$  im Vergleich zum Anregungslicht aufweist

### 2.2.2.2 Zusammenhang der Messparameter mit Abklingzeiten

Der Zusammenhang der Messparameter Demodulation  $M$  und Phasenverschiebung  $\Delta\Phi$  soll zunächst anhand des einfachsten Falls rein sinusförmig mit Frequenz  $f$  (Kreisfrequenz  $\omega = 2\pi f$ ) intensitätsmodulierten Anregungslichts und eines monoexponentiell abklingenden Fluoreszenzverhaltens entwickelt werden.

Die Modulation des Anregungslichts mit der Kreisfrequenz  $\omega$ , welches durch Modulationstiefe  $M_E = a/d$ , dem Verhältnis von Gleichanteil  $d$  und Wechselanteil  $a$ , und die Phasenlage  $\Phi_E$  charakterisiert ist,

$$E(t) = E_0 (1 + M_E \sin(\omega t - \Phi_E)) \quad (2.10)$$

führt zu einem entsprechend modulierten Fluoreszenzsignal  $F(t)$  mit Modulation  $M_F = A/D$  und Phasenlage  $\Phi_F$

$$F(t) = F_0 (1 + M_F \sin(\omega t - \Phi_F)) \quad (2.11)$$

Die Ratengleichung 2.5, welche die Veränderung der Anzahl der angeregten Moleküle angibt, weist nun wegen der kontinuierlichen Anregung außer dem Relaxationsterm einen weiteren Term auf. Er gibt die Zunahme an angeregten Molekülen durch

die Absorption des Anregungslichts an. Die Absorptionsrate  $\tilde{E}(t)$  ist der Intensität des Anregungslichts proportional ( $\tilde{E}(t) \sim E(t)$ ):

$$\frac{dN(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau}N(t) + \tilde{E}(t)N(t) \quad (2.12)$$

Die Fluoreszenzintensität ist zu jedem Zeitpunkt durch die Anzahl der im angeregten Zustand befindlichen Moleküle bestimmt ( $F(t) \sim N(t)$ ). Aus der Ratengleichung 2.12 ergibt sich so die Verknüpfung von Fluoreszenzabklingzeit und Fluoreszenzemissionsverhalten bei intensitätsmoduliertem Anregungslicht, woraus sich unter Verwendung der Gleichungen 2.10 und 2.11 durch einfache mathematische Operationen der Zusammenhang zwischen den Messparametern Demodulation  $M = M_F/M_E$  sowie Phasenverschiebung  $\Delta\Phi = \Phi_F - \Phi_E$  und der Abklingzeit  $\tau$  bestimmen lässt (Zu allen mathematischen Herleitungen siehe [Lak83], [Cle96]) und [Sch97c]):

$$M = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2\tau^2}} \quad (2.13)$$

$$\tan \Delta\Phi = \omega\tau \quad (2.14)$$

Die Methode stellt somit zwei Wege der Berechnung der Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$  zur Verfügung: Entweder aus der Demodulation  $M$  oder aus der Phasenverschiebung  $\Delta\Phi$  des Fluoreszenzsignals. Beide Wege liefern, wenn nur ein monoexponentieller Fluoreszenzbeitrag vorliegt, ein identisches Ergebnis das die mittlere Verweildauer der Fluorophore im angeregten Zustand angibt.

**Allgemeiner Fall** Die Herleitung der Bestimmungsgleichungen 2.13 und 2.14 erfolgte unter der Annahme rein sinusförmig modulierten Anregungslichts und eines einzigen monoexponentiell abklingenden Fluoreszenzbeitrags, wodurch sie nur unter diesen Bedingungen Gültigkeit für die Berechnung der Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$  besitzen.

Setzt sich das Fluoreszenzsignal aus Beiträgen mehrerer unterschiedlicher Fluorophore zusammen, wie es gerade in biologischen Präparaten normalerweise der Fall ist, sind die im Fluoreszenzsignal (einer Anregungslichtfrequenzkomponente  $E_\omega$ ) auftretende Demodulation und Phasenverschiebung nicht durch eine einzige Abklingzeit bestimmt. Die Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzbeiträge  $F_k$  mit jeweiligen Abklingzeiten  $\tau_k$  führt zu einer von den relativen Intensitätsamplituden  $\alpha_k$  abhängigen Gesamtdemodulation und -phasenverschiebung ([Gad93]):

$$M_\omega = \sqrt{\left(\sum_k \frac{\alpha_k \omega \tau_k}{1 + (\omega \tau_k)^2}\right)^2 + \left(\sum_k \frac{\alpha_k}{1 + (\omega \tau_k)^2}\right)^2} \quad (2.15)$$

$$\Delta\Phi_\omega = \tan^{-1} \left( \frac{\sum_k \frac{\alpha_k \omega \tau_k}{1 + (\omega \tau_k)^2}}{\sum_k \frac{\alpha_k}{1 + (\omega \tau_k)^2}} \right) \quad (2.16)$$

Aus der Anzahl der Parameter in den Gleichungen 2.16 und 2.15 ist ersichtlich, dass bei mehr als einem Fluoreszenzbeitrag lediglich aus der Bestimmung der Gesamtmodulation  $M_\omega$  und der Gesamtphasenverschiebung  $\Delta\Phi_\omega$  bei einer einzigen Modulationsfrequenz  $\omega$  nicht alle Parameter  $\alpha_k$  und  $\tau_k$  der einzelnen Fluoreszenzbeiträge zu erhalten sind. Eine hinreichende Anzahl von Einzelmessungen bei unterschiedlichen Modulationsfrequenzen  $\omega_n$  der Anregungslichtintensität liefert unabhängige Demodulationen  $M_{\omega_n}$  und Phasenverschiebungen  $\Phi_{\omega_n}$ . Aus diesen kann mittels einer numerischen Anpassung von multiexponentiellen Modellfunktionen die Berechnung von Abklingzeiten und relativen Beiträgen der einzelnen Beiträge erfolgen. Dieses Vorgehen wird vor allem in nichtbildgebenden Phasenspektrometern verwendet und entspricht in seiner Anwendung auf die Bestimmung komplexer multiexponentieller Fluoreszenzabklingcharakteristiken der Einzelphotonendetektion im Zeitbereich.

Nicht nur die Heterogenität einer Probe ist im allgemeinen Fall zu berücksichtigen, sondern auch Abweichungen von einer sinusförmigen Modulation des Anregungslichts. Zusätzliche Frequenzkomponenten  $E_i(t) = E_n^0 (1 + M_{E_n} \sin(\omega_n t - \Phi_{E_n}))$  im Anregungslicht liefern jeweils Beiträge zur Gesamtfluoreszenz und somit zur Demodulation und Phasenverschiebung, deren Stärke durch ihre relativen Amplituden bestimmt wird. Abweichungen von einer rein sinusförmig modulierten Anregungslichtintensität können technisch bedingt bei der Intensitätsmodulation der Lichtquelle hervorgerufene Frequenzbeiträge sein und wirken sich auf die Messung meist störend aus. Gewollt herbeigeführte höhere Frequenzbeiträge im Anregungslicht hingegen lassen sich gewinnbringend für die Bestimmung von Fluoreszenzabklingzeiten einsetzen:

- Periodische nichtsinusförmige Signale (Periode  $T$ ) sind gemäß ihrer Fourierreiheentwicklung einer Überlagerung kontinuierlicher sinusförmiger Beiträge mit Vielfachen der Fundamentalfrequenz  $f = 1/T$  äquivalent. Diesen Umstand nutzend, lässt sich die Phasenbereichsmethode unter Verwendung von gepulsten Lasersystemen mit Repetitionsraten von einigen MHz auf die Messung von Abklingzeiten in der Größenordnung von  $10^{-12}$  Sekunden erweitern. Die Bestimmung der Fluoreszenzabklingcharakteristik erfolgt dabei bei einem Vielfachen der Fundamentalfrequenz ([Lak86],[Lac90],[Ber90]).
- Der harmonische Gehalt einer zeitlich rechteckförmigen, periodischen Anregungsintensität lässt sich durch eine angepasste Art der Detektion auf besondere Weise anwenden. Die Fluoreszenzabklingcharakteristik lässt sich dabei sogar simultan bei mehreren Modulationsfrequenzen gleichzeitig abfragen ([Fed89], [Per92], [Gra90]), [Squ00]).

### 2.2.2.3 Heterodyne und homodyne Detektion

Die kontinuierliche intensitätsmodulierte Anregung der Fluoreszenz transformiert die Bestimmung von Fluoreszenzabklingzeiten auf die Messung von Phasenverschiebung und Demodulation des Fluoreszenzsignals. Da bei Abklingzeiten von einigen Nanosekunden die erforderlichen Modulationsfrequenzen bei einigen MHz (siehe 2.2.3.1) liegen, würde die Aufzeichnung des Fluoreszenzsignals Abstraten in der Größenordnung von MHz bis GHz erfordern, wodurch kein Vorteil dieser Methode gegeben wäre. Erst die bei der Phasenbereichsmethode angewandte Art der Detektion des Fluoreszenzsignals mit einem in der Verstärkung ebenfalls hochfrequent modulierten Detektor gibt die Möglichkeit, durch Aufnahme mehrerer Einzelmesspunkte die Rekonstruktion der hochfrequenten Fluoreszenzantwort auch auf Zeitskalen von Millisekunden durchzuführen. Auf diese Weise kann die Bestimmung von Fluoreszenzabklingzeiten aus den Messparametern Phasenverschiebung und Demodulation nicht nur punktweise mit schnellen elektronischen Methoden, sondern auch 2-dimensional bildgebend mit einem Kamerasystem für alle Bildpunkte gleichzeitig durchgeführt werden. Darin liegt neben der Umgehung aufwendiger gepulster Lasersysteme der besondere Vorteil der Phasenbereichsmethode.

Verwendung finden bei der Detektion der Fluoreszenzantwort Sekundärelektronenvervielfacher (Photomultiplier) oder Bildverstärker, deren Verstärkungsfaktoren mit einer Frequenz nahe der Anregungsmodulationsfrequenz  $\omega_G = \omega_E + \Delta\omega$  (heterodyne Detektion) beziehungsweise exakt mit der Anregungsmodulationsfrequenz  $\Delta\omega = 0$  (homodyne Detektion) moduliert wird. Das Fluoreszenzsignal 2.11 erfährt dadurch in dem Sekundärelektronenvervielfacher beziehungsweise den einzelnen Kanälen des Bildverstärkers eine Verstärkung

$$G(t) = G_0 (1 + M_G \sin(\omega_G t - \Phi_G)) \quad (2.17)$$

welche zu einem Detektorsignal  $D(t)$  mit mehreren Frequenzbeiträgen führt ( $D_0 := F_0 G_0$ ):

$$\begin{aligned} D(t) = D_0 \left( 1 + \frac{1}{2} M_G M_F \cos(\Delta\omega t + (\Phi_F - \Phi_G)) \right. \\ \left. + M_F \sin(\omega_F t + \Phi_F) + M_G \sin(\omega_G t + \Phi_G) \right. \\ \left. - \frac{1}{2} M_G M_F \cos((2\omega_F + \Delta\omega)t + (\Phi_G + \Phi_F)) \right) \end{aligned} \quad (2.18)$$

Neben einem konstanten Anteil liegen im Detektorsignal ein Beitrag mit der Differenzfrequenz  $\Delta\omega$ , Beiträge mit den Frequenzen  $\omega_F$  der Modulation des Fluoreszenzsignals und  $\omega_G$  des Verstärkungsfaktors sowie ein Summenfrequenzbeitrag mit der Frequenz  $2\omega_F + \Delta\omega$  vor. Durch Integration des Detektorsignals über Zeiten, die lang gegenüber den Perioden der höherfrequenten Beiträge sind, lässt sich experimentell erreichen, dass die höherfrequenten Beiträge lediglich einen konstanten Beitrag liefern. Ausschlaggebend für das detektierte Signal sind in diesem Fall lediglich die ersten beiden Terme. Die Differenzfrequenz  $\Delta\omega$  bestimmt dabei die Zeitskala, auf der die Bestimmung des Fluoreszenzsignals erfolgen kann ([Lak83], [Cle96]).

**Heterodyn:** Die heterodyne Detektion der intensitätsmodulierten Fluoreszenz mit Differenzfrequenzen von einigen Hz bis kHz schafft technisch einfach zu realisierende Bedingungen für die Bestimmung der interessierenden Parameter Phasenverschiebung und Demodulation. Bei der Anwendung in nichtbildgebenden Phasenspektrometern lassen sich die Parameter auf diese Weise mit Lock-in-Amplifiern oder äquivalenten elektronischen Schaltungen aus dem langsam mit der Differenzfrequenz  $\Delta\omega$  variierenden Signal extrahieren ([Lak85] [Lak86]). Anhand von Vergleichsmessungen mit Referenzproben bekannter Fluoreszenzabklingzeit können die sich im Fluoreszenzsignal  $F(t)$  niederschlagende Modulationstiefe und Phasenlage des Anregungslichts bestimmt werden. Eine sukzessive Anwendung dieses Vorgehens bei mehreren über einen weiten Bereich variierenden Frequenzen  $\omega_n$  ermöglicht die genaue Analyse auch komplexen Fluoreszenzabklingverhaltens mit mehreren Fluoreszenzbeiträgen unterschiedlicher Abklingzeit.

Die heterodyne Methode läßt sich auch 2-dimensional für die Erzeugung von Bildern des untersuchten Objekts verwenden, in denen jedem Bildpunkt in Falschfarbendarstellung die Information der gemessenen Fluoreszenzabklingzeit zugeordnet wird ([Cle92], [Gad93], [Man93]). Mittels einer Torschaltung an der Photokathode eines hochfrequent modulierten Bildverstärkers, werden in einem Zeitfenster zu variabler Zeit nach einem Startsignal – hier durch das Signal mit der Differenzfrequenz  $\Delta\omega$  definiert – auftreffende Fluoreszenzphotonen detektiert. Sukzessive wird eine Serie von Einzelintensitätsbildern zu verschiedenen Zeitpunkten in der Periode der Differenzmodulation aufgenommen. Aus den so gewonnenen Stützstellen läßt sich die Form des Differenzsignals und daraus die Phasenlage und Modulationstiefe bestimmen. Nachteilig wirkt sich dabei der Umstand aus, daß die aufgrund der üblicherweise geringen Fluoreszenzintensitäten zugunsten eines guten Signal-Rauschverhältnisses erforderliche Integration der jeweiligen Zeitfenster über viele Perioden dazu führt, dass in der Gesamtmesszeit lediglich ein kleiner Teil der Fluoreszenzphotonen wirklich detektiert wird.

**Homodyn:** Die in dieser Arbeit realisierte homodyne Messmethode, bei der die Modulation des Anregungslichts und des Verstärkungsfaktors am Detektor mit der gleichen Frequenz erfolgt, ist unter Verwendung hochfrequent modulierbarer Bildverstärker insbesondere für die bildgebende Anwendung von Fluoreszenzabklingzeitmessungen geeignet und wird in nahezu allen derzeit realisierten Systemen angewandt ([Lak91], [Miz95], [Wag97b], [Wag97a], [Miz98], [Sch97d], [Sch97c], [Lak92a], [Lak92b], [Squ00]). Bei der Darstellung der homodynen Messmethode wird im Folgenden von der bildgebenden Anwendung mittels Bildverstärker ausgegangen.

Aufgrund der im homodynen Fall verschwindenden Differenzfrequenz  $\Delta\omega = 0$ , setzt sich der Photostrom des Detektors aus einem zeitlich konstanten Anteil und den hochfrequenten Anteilen bei den Frequenzen  $\omega$  und  $2\omega$  zusammen. Bei der Verwendung eines Bildverstärkers gilt dies für den Photostrom der einzelnen Verstärkungskanäle. Der am Ausgang des Bildverstärkers befindliche Phosphorschirm, auf den die Elektronen der einzelnen Verstärkungskanäle treffen, wirkt dabei wegen seiner

im Vergleich zu den Perioden der hochfrequenten Anteile langen Phosphoreszenzabklingzeiten als Tiefpassfilter. Auf dem Phosphorschirm entsteht so ein zeitlich konstantes Bild, wobei das Signal für jeden Verstärkungskanal, abgesehen von konstanten Faktoren und den Parametern  $\Phi_E$  und  $M_E$  des Anregungslichts, lediglich von der relativen Phasenlage der auf die Photokathode abgebildeten Fluoreszenz und des Verstärkungsfaktors am Bildverstärker abhängt:

$$\begin{aligned}
 D(t) &= D_0 \left( 1 + \frac{1}{2} M_G M_F \cos(\Phi_F - \Phi_G) \right) \\
 &= D_0 \left( 1 + \frac{1}{2} M_G M_E M \cos(\Delta\Phi + \Phi_E - \Phi_G) \right)
 \end{aligned}
 \tag{2.19}$$

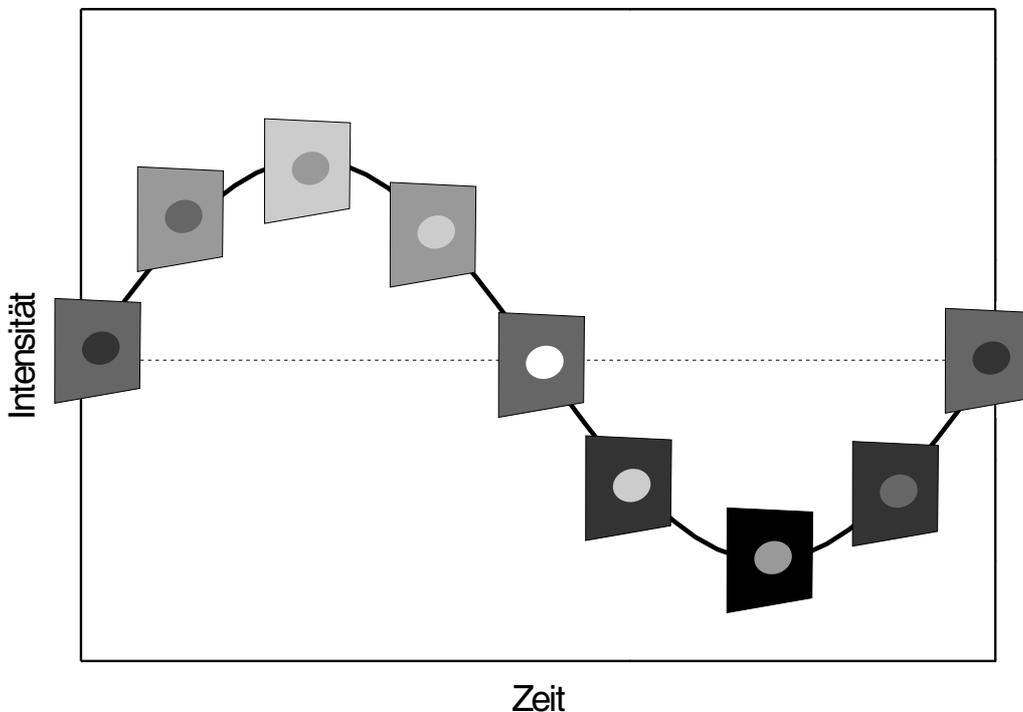


Abbildung 2.4: Homodyne Messmethode: Für die Bestimmung der Demodulation und Phasenverschiebung der Fluoreszenz wird das von der relativen Phasenlage der Fluoreszenz und der Modulation des Bildverstärkers abhängige Detektorsignal bei unterschiedlichen relativen Phasenlagen gemessen. Fluoreszenzbeiträge mit unterschiedlichen Abklingzeiten ergeben in den Einzelbildern unterschiedliche Intensitätswerte.

Die mit den Fluoreszenzabklingzeiten in dem oben angegebenen Zusammenhang (2.15 und 2.16) stehenden Parameter  $M$  und  $\Delta\Phi$  müssen für jeden Bildpunkt bestimmt werden. Um dies zu ermöglichen, wird bei der initialen Phasenlage  $\Phi^0 \Delta\Phi + \Phi_E - \Phi_G$  das Intensitätsbild des Untersuchungsobjekts auf dem Phosphorschirm

des Bildverstärkers mit einer CCD-Kamera aufgenommen (siehe Abbildung 2.4). Anschließend wird jeweils die relative Phasenlage verändert und weitere Intensitätsbilder aufgenommen. Durch eine Folge von  $N$  Intensitätsbildern wird auf diese Weise der von der Demodulation und Phasenverschiebung der Fluoreszenz abhängige Beitrag im Signal abgefragt. Prinzipiell ist für die Bestimmung der Fluoreszenzparameter  $M$  und  $\Delta\Phi$ , aus denen sich die Fluoreszenzabklingzeiten berechnen lassen, eine Folge von mindestens drei Einzelbildern erforderlich.

### **Bestimmung der Demodulation $M$ und Phasenverschiebung $\Delta\Phi$**

numerischem Weg lässt sich anhand der über die Messung der Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichen relativen Phasenlagen zwischen Fluoreszenz und Detektor gewonnenen Intensitätswerte der zugrundeliegende Signalverlauf berechnen. Als Modellfunktion für eine Kurvenanpassung ist dabei aus dem theoretischen Wissen (2.18) über den Funktionsverlauf eine Sinusfunktion zu wählen. Die Kurvenanpassung liefert dann mit Amplitude, Wechselanteil und Phasenlage die interessierenden Fluoreszenzparameter. Die bis zum Unterschreiten einer zuvor gesetzten Schwelle für die Abweichung zwischen Modellfunktion und Messdaten als Konvergenzkriterium der Anpassung benötigten Rechendurchläufe sind jedoch bei numerischen Anpassungsmethoden stark von der Wahl der Startparameter der Modellfunktion abhängig. Darüber hinaus erfordert jeder Rechendurchlauf bei  $N$  Stützstellen mindestens  $2N$  Rechenschritte allein für die Bestimmung der Modellfunktion an den Messpunkten und der Berechnung des Fehlerquadrates. Der so insbesondere bei der bildgebenden Anwendung anfallende große Rechenaufwand, der für jeden Bildpunkt einzeln durchzuführen ist, resultiert in langen Berechnungszeiten, die gerade im Hinblick auf einen diagnostischen Einsatz der Messung von Fluoreszenzabklingzeiten nachteilig ist.

Wesentlich schneller lässt sich die Berechnung der Fluoreszenzparameter Demodulation  $M$  und Phasenverschiebung  $\Delta\Phi$  aus der Serie der Intensitätsbilder mittels einer numerischen harmonischen Analyse durchführen. Dabei wird das durch die Stützstellen definierte Signal durch eine Serie trigonometrischer Funktionen oder äquivalent dazu Exponentialfunktionen einer bestimmten Fundamentalfrequenz dargestellt. Die in dieser Arbeit verwendete „schnelle Fouriertransformation“ (Fast Fourier Transform, FFT) erfordert dafür eine gerade Anzahl äquidistanter Messpunkte, die ausgehend von der initialen Phasenlage  $\Phi^0$  durch eine Aufnahme von  $N$  Intensitätsbildern über eine ganze Periode der relativen Phasenlage von Fluoreszenz und Modulation des Bildverstärkers in Schritten von  $2\pi/N$  gewonnen werden. Für jeden Bildpunkt liegt so eine Serie von  $N$  Intensitätswerten  $S(\Phi^0 + 2\pi k/N)$  vor. Daraus werden die nullte (konstante), die Sinus- und die Kosinuskomponente der Fundamentalfrequenz der Fourierentwicklung des Signals berechnet:

$$\tilde{F}_0 = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} S \left( \Phi^0 + \frac{2\pi k}{N} \right) \quad (2.20)$$

$$\tilde{F}_{\sin} = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} \sin \left( \frac{2\pi k}{N} \right) S \left( \Phi^0 + \frac{2\pi k}{N} \right) \quad (2.21)$$

$$\tilde{F}_{\cos} = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} \cos \left( \frac{2\pi k}{N} \right) S \left( \Phi^0 + \frac{2\pi k}{N} \right) \quad (2.22)$$

Die konstante nullte Fourierkomponente gibt die mittlere Intensität des Messsignals wieder. Aus den Sinus- und Kosinuskomponenten lässt sich die Modulationstiefe und Phasenlage des gemessenen Signals bestimmen:

$$M M_{EG} = \frac{2}{\tilde{F}_0} \sqrt{\tilde{F}_{\sin}^2 + \tilde{F}_{\cos}^2} \quad (2.23)$$

$$\Delta\Phi - \Delta\Phi_{EG} = -\arctan \frac{\tilde{F}_{\cos}}{\tilde{F}_{\sin}} \quad (2.24)$$

Alle Parameter im Messsignal, die nicht von der Fluoreszenz selbst, sondern von der Modulation des Anregungslichts und des Verstärkungsfaktors am Bildverstärker herrühren sind dabei in den Faktoren  $M_{EG}$  und  $\Delta\Phi_{EG}$  zusammengefasst. Sie müssen über eine Referenzmessung des Anregungslichts oder einer Probe mit bekannter Fluoreszenzabklingzeit bestimmt werden.

Ausser der nullten und ersten Sinus- und Kosinusfourierkomponenten, welche eine Mindestzahl von drei Messpunkten erfordern, können bei hinreichend grosser Anzahl an Stützstellen auch höhere Fourierkomponenten berechnet werden, wodurch wie oben angegeben die Analyse komplexer multiexponentieller Fluoreszenzcharakteristiken ermöglicht wird.

Durch die Bestimmung der Fluoreszenzparameter Demodulation  $M$  und Phasenverschiebung  $\Delta\Phi$  stehen so alle nötigen Informationen zur Verfügung, um aus einer Serie von Intensitätsbildern die Fluoreszenzabklingzeiten des untersuchten Objekts für jeden Bildpunkt berechnen zu können. Die dabei zu beachtenden Gegebenheiten sowie der Informationsgehalt und die Bedeutung der berechneten Werte werden im folgenden Unterabschnitt erläutert.

### 2.2.3 Bestimmung von Abklingzeiten $\tau_M$ und $\tau_\Phi$

#### 2.2.3.1 Wahl der Modulationsfrequenz

Wie bei der Darstellung der Phasenbereichmethode bereits erwähnt wurde, ist für die Bestimmung von Fluoreszenzabklingzeiten eine Modulation des Anregungslichts mit Frequenzen  $f = \omega/2\pi$  von einigen MHz erforderlich. Die Fluoreszenzemission ist in ihrer Gesamtintensität mit derselben Frequenz moduliert wie das Anregungslicht, wobei die Fluoreszenzabklingzeit bestimmt, wie lange die einzelnen Fluorophormoleküle im Mittel im angeregten Zustand verharren, bevor sie unter Emission eines Fluoreszenzphotons in den Grundzustand zurückkehren. Bei im Vergleich zu der Fluoreszenzabklingzeit langen Perioden der Anregungslichtmodulation, also bei geringen Modulationsfrequenzen, kann die Fluoreszenz fast instantan der Veränderung der Anregungslichtintensität folgen. Die resultierende Phasenverschiebung ist gering, und die Modulation der Fluoreszenz ist nahe der Modulation des Anregungslichts. Wird dagegen eine hohe Modulationsfrequenz gewählt, so emittieren in der Zeit, in der die Intensität des Anregungslichts von ihrem Maximalwert auf den Minimalwert abnimmt, nur wenige aus einer bestimmten Anzahl zuvor angeregter Moleküle. Die schnelle Intensitätsveränderung des Anregungslichts „verschmiert“ zu einem Signal geringer Modulationstiefe. Dabei ist die Phasenverschiebung der Fluoreszenz groß. Das Verhalten der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Modulationsfrequenz ist das einer erzwungenen Schwingung, wobei die Fluoreszenzabklingzeit der Stärke der Rückstellkraft entspricht.

Für jeden Fluoreszenzbeitrag mit einer Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$  und jede Frequenzkomponente  $\omega$  im Anregungslicht ist die Abhängigkeit der Parameter Demodulation  $M$  und Phasenverschiebung  $\Phi$  durch die Gleichungen 2.13 und 2.14 gegeben. Für sie ergibt sich die in Abbildung 2.5 gezeigte Abhängigkeit von dem Produkt  $\omega\tau$  aus Fluoreszenzabklingzeit und Kreisfrequenz der Modulation. Experimentell ist die Bestimmung der Modulationstiefe und Phasenverschiebung der Fluoreszenz mit einer Messungengenauigkeit behaftet. Das Ziel ist, Fluoreszenzabklingzeiten im interessierenden Zeitfenster gut auflösen zu können und die Auswirkung der prinzipiell bedingten Messungengenauigkeit auf die Fehler der Abklingzeitberechnung möglichst gering zu halten. Dies ist, wie aus Abbildung 2.5 ersichtlich, in dem Bereich gegeben, in welchem das Produkt  $\omega\tau$  ungefähr 1 ergibt. Die Demodulation beträgt dann circa 50 %, die Phasenverschiebung circa  $\pi/4$ .

#### 2.2.3.2 Scheinbare mittlere Abklingzeiten $\tau_M$ und $\tau_\Phi$ bei mehreren Fluoreszenzbeiträgen

Wird die Intensität des Anregungslichts sinusförmig mit einer einzigen Modulationsfrequenz  $\omega$  moduliert, und rührt die Fluoreszenz nur von einem einzigen Beitrag mit einer Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$  her, so lässt sich, sofern alle Relaxationswege aus

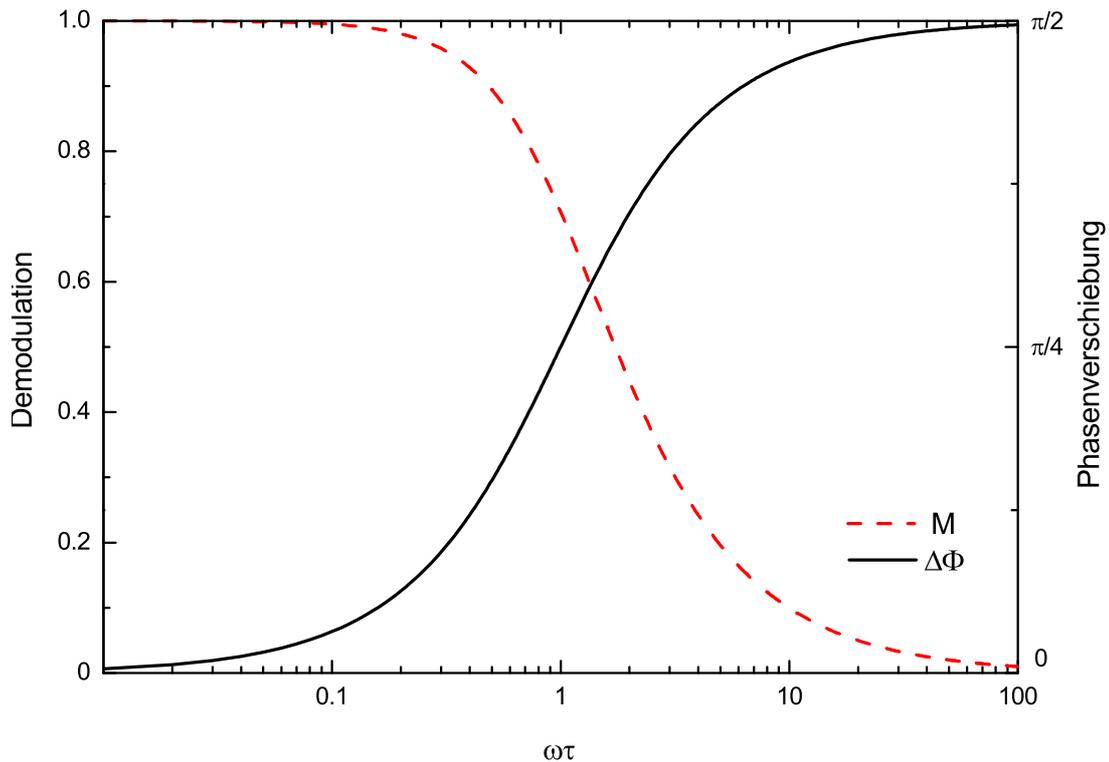


Abbildung 2.5: Demodulation  $M$  und Phasenverschiebung  $\Delta\Phi$  der Fluoreszenz sind sowohl von der Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$ , als auch von der Frequenz  $\omega = 2\pi f$  mit der das Anregungslicht moduliert wird abhängig. Die Simulation zeigt die Abhängigkeit bei einer Abklingzeit  $\tau = 4$  ns und einer Frequenz  $f = 40$  MHz

den angeregten Zustand die Fluorophore wieder in den Grundzustand  $S_0$  zurückbringen, die Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$  gemäß der Gleichungen 2.13 und 2.14 berechnen:

$$\tau_M = \frac{1}{\omega} \sqrt{\frac{1}{M^2} - 1} \quad (2.25)$$

$$\tau_\Phi = \frac{1}{\omega} \tan \Delta\Phi \quad (2.26)$$

Auf beiden Wegen wird das gleiche Ergebnis erzielt. Das berechnete Resultat ist die Fluoreszenzabklingzeit  $\tau$ , die mittlere Verweildauer der Fluorophore im angeregten Zustand.

Für die Berechnung von Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  im Fall mehrerer Fluoreszenzbeiträge mit unterschiedlichen Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_k$  und jeweiligen relativen Intensitätsbeiträgen  $\alpha_k$  zur Dauerstrich-Fluoreszenzintensität lassen sich die Formeln 2.25 und 2.26 jedoch nicht anwenden. Der Zusammenhang mit den Messparame-

tern Demodulation  $M$  und Phasenverschiebung  $\Delta\Phi$  ist durch die Beziehungen 2.15 und 2.16 gegeben. Erst durch mehrere Messungen mit unterschiedlichen Modulationsfrequenzen stehen hinreichend viele unabhängige Messparameter zur Verfügung, anhand derer sich diese Beziehungen auflösen lassen.

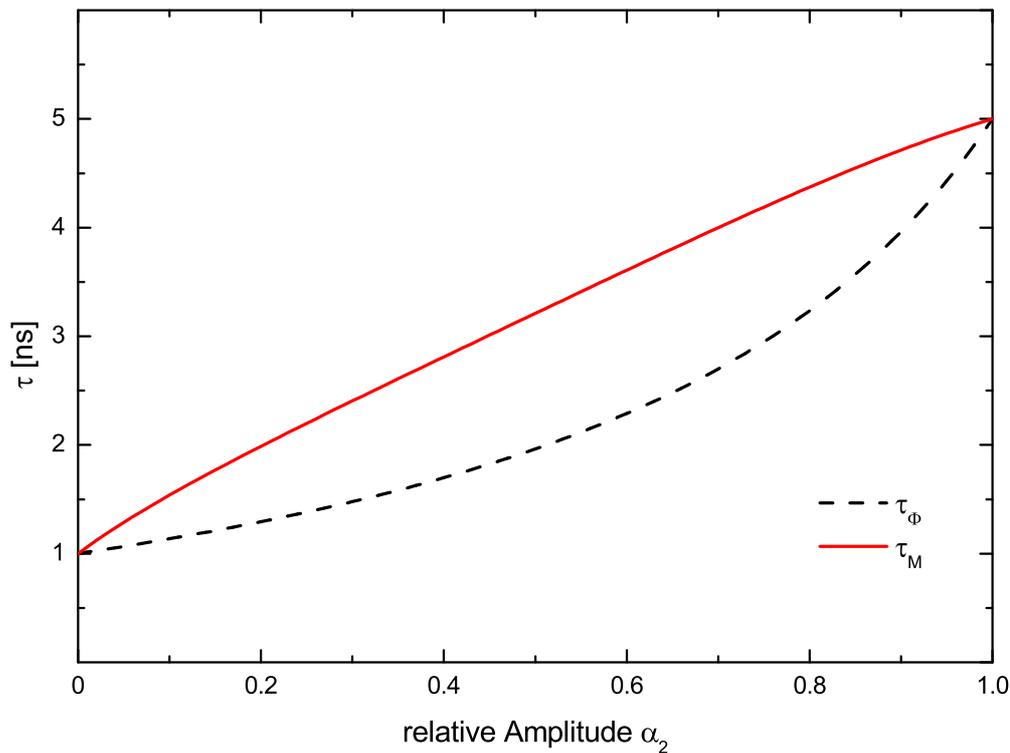


Abbildung 2.6: Mehrere Fluoreszenzbeiträge mit unterschiedlichen Abklingzeiten führen bei Berechnung von Abklingzeiten unter Verwendung eines monoexponentiellen Modells zu differierenden Werten bei  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$ . Simulation mit  $\tau_1 = 5$  ns,  $\tau_2 = 1$  ns bei einer Modulationsfrequenz von  $f = 40$  MHz in Abhängigkeit von der relativen Amplitude  $\alpha_2$  zur Fluoreszenzintensität

Steht jedoch nicht die absolute Bestimmung aller Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_k$  und der relative Amplituden  $\alpha_k$  mehrerer Fluoreszenzbeiträge zum Gesamtsignal im Vordergrund, so lässt sich durch die Anwendung der Formeln 2.25 und 2.26 auf die bei einer einzigen Modulationfrequenz  $\omega$  gewonnenen Demodulation  $M$  und Phasenverschiebung  $\Delta\Phi$  dennoch Information gewinnen. In Abbildung 2.6 ist das Ergebnis einer solchen Anwendung auf das Fluoreszenzsignal einer Mischung simuliert. Das in diesem Beispiel zugrundegelegte Szenario entspricht zwei Lösungen gleicher Dauerstrich-Fluoreszenzintensität mit Fluoreszenzabklingzeiten von 1 ns und 5 ns, die in unterschiedlichen Konzentrationen gemischt werden. Die anhand der monoexponentiellen Formeln aus der bei einer Modulationsfrequenz von 50 MHz sich erge-

benden Demodulation  $M$  und Phasenverschiebung  $\Delta\Phi$  berechneten Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  sind in Abhängigkeit der Konzentration des Beitrags mit einer Abklingzeit von 5 ns dargestellt.

Sowohl für die aus der Modulation berechnete Abklingzeit  $\tau_M$  als auch für die aus der Phasenverschiebung  $\Delta\Phi$  berechnete Abklingzeit  $\tau_\Phi$  ergeben sich bei Heterogenität der Fluoreszenz Werte, die zwischen der kurzen und der langen Abklingzeit der einzelnen Beiträge liegen. Dabei ist bei allen Mischungsverhältnissen der Wert für  $\tau_M$  grösser als der für  $\tau_\Phi$ . Der Unterschied zwischen ihnen ist, außer von der relativen Amplitude der Beiträge, von den Abklingzeiten selbst und von der verwendeten Modulationsfrequenz abhängig. Es handelt sich bei diesen „auf falschem Wege berechneten“ Abklingzeiten um „scheinbare“ Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$ , die nicht mit mittleren Abklingzeiten  $\langle\tau\rangle = \sum_k \alpha_k \tau_k^2 / \sum_k \alpha_k \tau_k$  zu verwechseln sind. Streng genommen müsste bei der verwendeten Methode in Fall mehrerer Fluoreszenzbeiträge stets der Begriff scheinbare Abklingzeiten verwendet werden. Dies wird zumeist unterlassen werden, da im Weiteren die richtige Interpretation bei Unterschieden zwischen Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  vorausgesetzt werden kann.

Anhand differierender Werte für die scheinbaren Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  bei einer sinusförmigen Modulation der Anregungsintensität ist ein Abweichen von einem monoexponentiellen Abklingverhalten der Fluoreszenz festzustellen. Wenn aufgrund des Wissens über die Zusammensetzung der Probe von Fluoreszenzbeiträgen bekannter Abklingzeit ausgegangen werden kann, lässt sich über die Unterschiede der scheinbaren Abklingzeiten die Information der relativen Amplituden bestimmen ([Alc87], [Bar90]). So können zum Beispiel Veränderungen in der Konzentration eines Fluorophors detektiert und berechnet werden. Auch wenn dies allgemein ohne a-priori-Wissen über die Probe nicht möglich ist, liefern die scheinbaren Abklingzeiten wertvolle Information, wie im experimentellen Teil zu zeigen sein wird.

### 2.3 Anwendung zeitaufgelöster Methoden auf medizinisch-biologische Fragestellungen

Im Folgenden sollen die Ansatzpunkte, welche sich aus einer zeitaufgelösten Detektion der Fluoreszenz für medizinisch-biologische Fragestellungen und dabei insbesondere für die Tumordiagnostik ergeben, anhand von durchgeführten Anwendungen dieser Methodik tabellarisch zusammengestellt werden. Diese Ansatzpunkte und die sich daraus ergebenden Möglichkeiten sind die zentrale Grundlage und Motivation für den Einsatz zeitaufgelöster Messmethoden in der Fluoreszenzdiagnostik.

#### 2.3.1 Grundlegende Gewebeparameter

Die Bestimmung von Gewebeparametern wie Oxygenierung und pH-Wert und grundlegende Untersuchungen von Zelleigenschaften stellen ein wichtiges Hilfsmittel in der Diagnostik dar. Über sie sind Veränderungen auf dem Weg zu einer Entartung von Gewebe zu erkennen und die Mechanismen zu erschließen. In den Tabellen 2.1 und 2.2 sind mit zeitaufgelösten Methoden untersuchte Gewebe- und Zelleigenschaften aufgeführt. Dabei werden auch die im vorangegangenen Teil dieses Kapitels erläuterten Wirkmechanismen der Fluoreszenzabklingzeitveränderung angegeben.

#### 2.3.2 Tumordiagnostik

Der Einsatz der Fluoreszenzdiagnostik bei der Erkennung maligner und prä-maligner Gewebeveränderungen macht sich die Fluoreszenz sowohl körpereigener (endogener) als auch exogen zugeführter oder induzierter Fluorophore ([Wag98], [RK96]) zu Nutze:

- endogene Fluorophore: Die für die Tumordiagnostik wichtigsten endogenen Fluorophore sind neben dem Koenzym NADH und den Flavinen, welche im Energiemetabolismus der Zellen eine wichtige Rolle spielen, die Strukturproteine Kollagen und Elastin sowie zahlreiche Proteine. Die Absorptionsspektren der Fluorophore liegen im Bereich vom nahen Ultraviolett um 300 nm bis zu 600 nm (siehe Abbildung 2.7). Die Fluoreszenzabklingeneigenschaften dieser endogenen Fluorophore sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.
- exogene (induzierte) Fluorophore: Spezifische Anreicherungsmechanismen in neoplastischen und tumorösen Gewebeveränderungen bestimmen den Einsatz exogen zugeführter Tumormarker und Photosensibilisatoren bei der Diagnose und Therapie. Porphyrinderivate und durch die Gabe der körpereigenen  $\delta$ -Aminulävulinsäure im Körper auf dem Weg der Hämbiosynthese über das normale physiologische Maß produziertes Protoporphyrin IX (zu Literaturangaben siehe Abschnitt 4.3) werden mit nichtzeitaufgelöster Fluoreszenzdetektion

schon seit Jahren eingesetzt. Andere wichtige Photosensibilisatoren sind Phtalocyanine ([Cub97a]) und Tetrachlorin (mTHPC) die wegen ihrer phototoxischen Eigenschaften wie die Porphyrine auch in der Tumorthherapie Einsatz finden.

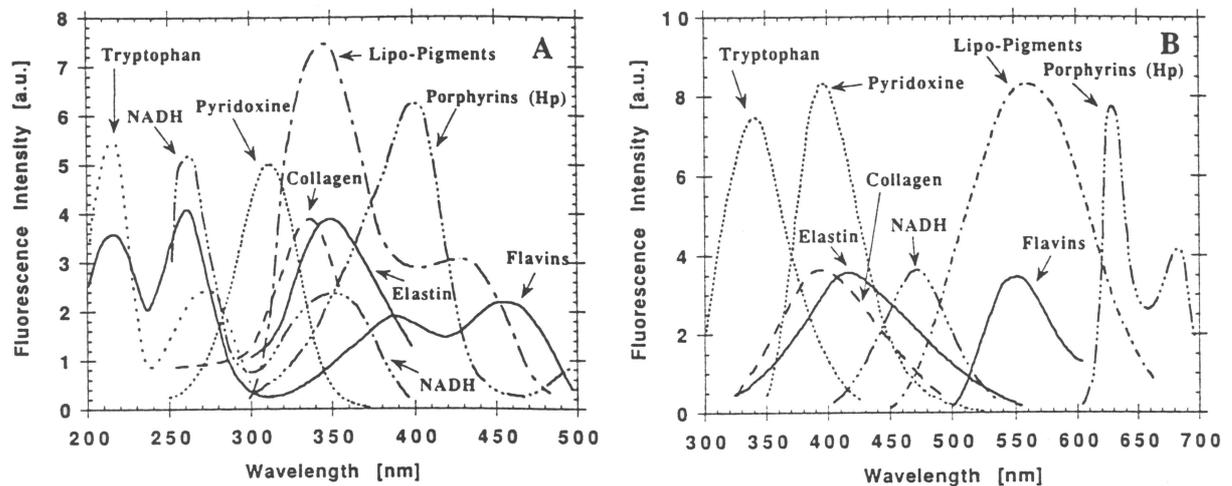


Abbildung 2.7: Anregungs- (A) und Emissionsspektren (B) der wichtigsten endogenen Fluorophore (nach [Wag98]).

Sowohl die körpereigenen, als auch exogen zugeführte Fluorophore lassen sich bei der Fluoreszenzdiagnostik nutzen. Nur wenige zeitaufgelöste Untersuchungen der Tumordiagnose basierend auf den Abklingzeiten endogener und exogener Fluorophore sind bislang veröffentlicht. In vielen der Arbeiten liefern die im Vergleich zur Gewebeautofluoreszenz langen Abklingzeiten der exogen (induzierten) Porphyrine und Phtalocyanine den Kontrast.

Charakterisierung von Gewebeparametern		
T	Im biologisch interessierenden Bereich von 0-50°C kann die Temperatur, zum Beispiel mit Metallkomplexen, mit einer Auflösung unter 0,15°C gemessen werden	[Zha93] [Kli96] [Hol97]
pH	Metallliganden-Komplexe und andere Fluorophore (SNAFL, SNARF, BCEF) reagieren im physiologischen Bereich sehr sensitiv auf den pH-Wert. Er bestimmt das Konzentrationsverhältnis ihrer protonierten und unprotonierten Form, die unterschiedliche Fluoreszenzabklingzeiten haben.	[Szm93] [San95] [Mur97] [Lil99]
pO <sub>2</sub>	Oxy- und Deoxyhämoglobin bewirken durch unterschiedliche Stärke des FRET des Tryptophans auf Häm unterschiedliche ps-Abklingzeiten	[Buc88] [Buc90] [Gry97]
	Das Ausmaß des Quenchens der Fluoreszenz von Übergangsmetallkomplexen oder der Phosphoreszenz von Palladium-porphyrin zeigt die Sauerstoffkonzentration der Umgebung an. Die langen Abklingzeiten der Metallkomplexe begünstigen die Wechselwirkung mit molekularem Sauerstoff. Die Untersuchungen wurden sowohl in-vitro als auch in-vivo (Gehirn, Hamsterkammer, Rattenleber) durchgeführt.	[Ber92] [Sin94] [Bam95] [Ger97] [Cas98] [Tor93] [Vin94] [McI98]
pCO <sub>2</sub>	Diffusion von CO <sub>2</sub> in einen wasserhaltigen Fasersensor verändert die Stärke des FRET wegen der pH-Sensitivität des Akzeptors SRh101-MCP	[Lak93] [Sip95] [Hol96]
[Ca <sup>++</sup> ]	Die eingesetzten Fluorophore (Calcium Green, BTC, Fura2, Quin2) weisen bei Komplexbildung mit Calcium von der ungebundenen Form abweichende Fluoreszenzabklingzeiten auf. Die Konzentrationsbestimmung über die Fluoreszenzabklingzeit ist unabhängig von der starken Akkumulation in Zellkernen in allen Zellkompartimenten gleich möglich.	[Lak92c] [Lak94] [So95] [Szm95] [Sch99b]

Tabelle 2.1: Tabellarische Zusammenstellung mit zeitaufgelösten Fluoreszenzmethoden untersuchter Gewebeparameter. Bei der Angabe der verwendeten Fluorophore wurde aus Platzgründen zum Teil auf die gängigen Abkürzungen zurückgegriffen.

Charakterisierung von Zelleigenschaften		
Metabolismus	FRET vom Donor NADH auf den Mitochondrienmarker Rhodamin 123 ergibt Verschwinden eines auf freies NADH zurückgeführten Fluoreszenzbeitrags korreliert mit dem Auftauchen der Rhodaminfluoreszenz mit $\tau = 4,5$ ns. Eine selektive Detektion mitochondrialer Fehlfunktion bei Zugabe eines Atmungsketteninhibitors konnte so über die Fluoreszenzabklingzeit nachgewiesen werden.	[Gsc96] [Sch97b] [Sch97a] [Sch99a]
Zellmembran und Cytoplasma	Über den Einfluss der Dielektrizitätskonstante auf die Abklingzeit des Farbstoffs DPH gibt die Breite der Abklingzeitverteilung ein Maß für die Heterogenität von Zellmembranen	[Gra95] [Fio87]
	Unterschiede zwischen freiem und an Makromoleküle gebundenem Farbstoff SRhB zeigen sich bei der polarisationssensitiven Detektion der Abklingcharakteristik (Anisotropiezerfall). Die Viskosität des Cytoplasma wirkt sich auf die Rotationsmöglichkeiten aus.	[Sri97]
Zellschäden	Die Fluoreszenz des Koenzyms NADH weist in CHO-Zellen bei oxidativem Stress durch UV-Bestrahlung einen stärkeren Beitrag des freien NADH auf.	[Kön96]
DNA- und Proteingehalt	Mit zwei fluoreszierenden Markern (Propidium Iodid, FITC) versehene Zellen lassen sich in einem Durchflusszytometer zeitaufgelöst detektiert simultan auf DNA- und Proteingehalt untersuchen. Das Vorliegen der Marker mit Abklingzeiten von 15 ns und 3,6 ns in einzelnen Zellen wird mit der Phasenbereichmethode über die Phasenverschiebung detektiert ( <i>Identifikation von Fluorophoren</i> )	[Ste97]

Tabelle 2.2: Tabellarische Zusammenstellung mit zeitaufgelösten Fluoreszenzmethoden durchgeführter Zelluntersuchungen. Bei der Angabe der verwendeten Fluorophore wurde aus Platzgründen zum Teil auf die gängigen Abkürzungen zurückgegriffen.

Gewebediagnostik - endogene Fluorophore		
NADH	NADH und NADPH haben in der reduzierten Form ein biexponentielles Abklingverhalten, dessen Grund in unterschiedlichen Konformationen der Koenzyme liegt. Die Beiträge weisen Zeiten um 260 ps ( $\alpha_1 \approx 0,7$ ) und 510 - 700 ps auf. Die mittlere Abklingzeit liegt bei rund 0,4 ns. Die Bindung an Makromoleküle schlägt sich in rund 3-fach längeren Abklingzeiten nieder. Bei physiologischen Konzentrationen ist für die oxidierten Formen NAD <sup>+</sup> und NAD(P) <sup>+</sup> kaum Fluoreszenz nachweisbar.	[Spe69] [Mil77] [Ber96a] [Lak92b] [Wak95]
Flavine	Für Riboflavin und FMN liegen die Abklingzeiten bei 4,2 - 5,0 ns. Die reduzierte Form von FMN zeigt eine multiexponentielle Abklingcharakteristik mit deutlich kürzeren Zeiten als bei der oxidierten Form. Gebunden an Proteine liegt auch bei der oxidierten Form ein multiexponentielles Abklingen mit mittleren Zeiten von 330 ps vor. FAD weist in seiner oxidierten Form eine Abklingzeit von rund 2,3 - 3,3 ns auf. Die reduzierte Form ist nicht fluoreszierend. Eine pH-Abhängigkeit der Abklingzeit in TRIS-Pufferlösung wird für FAD angegeben.	[Lak73b] [Wah74] [Lee93] [Höh95] [Pfe91] [Ber96b] [Pau96]
Porphyrine	Bei den Porphyrinen hat die Aggregationsform starke Auswirkung auf die Fluoreszenzabklingzeiten. Monomere der Porphyrine zeigen mit 10 - 20 ns deutlich längere Abklingzeiten als Dimere mit 3 - 5 ns und höhere Aggregate mit 0,1 - 0,3 ns. Einem bei der Anregung von Monomeren entstehenden Photoprodukt werden Abklingzeiten um 5 ns zugeschrieben.	[And82] [Yam84] [Sch93] [Kön93] [Kön94] [Ric95] [Spi96]
Elastin	Die Abklingcharakteristik von gereinigtem Elastinpuder ist biexponentiell mit Zeiten von 1,3 - 2,0 ns und 5,8 - 7,3 ns. Bei der längeren Abklingzeit zeigt sich eine spektrale Abhängigkeit der Abklingzeit.	[Maa97] [Maa00a] [Lee01]
Kollagen	Wie bei Elastin tragen bei Kollagen zwei Komponenten in ihrer Stärke wellenlängenabhängig bei. Die Abklingzeiten liegen um 2,5 ns und 8,7 ns. Die mittlere Abklingzeit von Kollagen liegt bei 5,5 ns.	[Maa97] [Maa00a]
Proteine	Vor allem Tryptophan- und Tyrosinreste bestimmen bei vielen Proteinen die Fluoreszenzeigenschaften. Ihre Abklingzeiten liegen in Proteinen im Bereich von 1 - 9 ns.	[Lak81]

Tabelle 2.3: Zusammenstellung der wichtigsten endogenen Gewebefluorophore mit einer Übersicht des von verschiedenen Autoren bestimmten Fluoreszenzabklingverhaltens.

Gewebediagnostik - zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen		
endogene Fluorophore	In metastatisierenden Zelllinien sowohl humaner als auch muriner Herkunft wird eine um etwa den Faktor 3 kürzere mittlere Abklingzeit als in nicht-metastasierenden Zelllinien gefunden. Als Ursache wird ein erhöhtes Vorkommen des Beitrags des Koenzyms NADH mit kurzer Abklingzeit von 0,3 ns angegeben.	[Pra95]
	Normale und maligne Brustzelllinien zeigen Unterschiede im Abklingverhalten. Maligne Zelllinien haben bei Rückführung des Abklingverhaltens auf einen kurzlebigen Beitrag (ca 400 ps) und einen langlebigen Beitrag (3 ns) doppelt so große Abklingzeiten wie die normalen Zellen.	[Gla94]
	Widersprüchliche Ergebnisse liegen bei der Autofluoreszenz ( $\lambda_{Em} = 430-680$ nm) bronchialer mucosa vor: Fasergestützte Punktmessungen zeigen keine signifikanten Unterschiede von dysplastischer Mucosa und carcinomata in situ (CIS) zu normaler Mucosa. Mit endoskopgestützter Bildgebung können Unterschiede festgestellt werden.	[Gla01]
	Fallstudien ex-vivo und in-vivo zeigen zum Teil Unterschiede in Abklingzeiten dysplastischer Gewebeveränderungen und CIS sowie nekrotischer Tumoren in Bronchien, Blase und Mundschleimhaut im Vergleich zum Normalgewebe	[Miz98]
exogene Fluorophore	Basalzellcarcinomata stellen sich mit ALA-induziertem PPIX in den Abklingzeiten in-vivo gut von umgebenden Normalgewebe demarkiert dar.	[AE00]
	Die langen Monomerabklingzeiten der Porphyrine heben sich in einem Mausmodell von den kurzen Abklingzeiten des Normalgewebes ab. Entsprechendes Verhältnisse wurden auch bei den Phtalocyaninen gefunden	[Cub92] [Cub93] [Cub97b] [Cub95] [Cub97c] [Cub91]

Tabelle 2.4: Arbeiten über die Diagnose maligner und prämaligener Gewebeveränderungen in-vivo und in-vitro anhand von zeitaufgelösten Messmethoden.



### 3 Das Messsystem

Die Zielsetzung dieser Arbeit waren der Aufbau und erste grundlegende Anwendungen eines Messsystems, mit dem sich Fluoreszenzabklingzeiten zweidimensional bildgebend messen lassen sollten. Diese Zielsetzung ist dadurch motiviert, dass durch ein derartiges zeitaufgelöstes Messsystem mit der Fluoreszenzabklingzeit weitergehende Informationen gewonnen werden, die mit nichtzeitaufgelösten fluoreszenzgestützten Untersuchungsmethoden nicht zugänglich sind. Für die photodynamische Diagnostik kann so neben Fluoreszenzintensitätskontrasten und spektralen Kontrasten endogener und exogener Fluorophore auch ein Fluoreszenzabklingzeitkontrast herangezogen werden. Die Zeitskala von einigen 100 Pikosekunden bis wenigen Nanosekunden, in der die Fluoreszenzabklingzeiten der gängigsten endogenen und exogenen Fluorophore liegen, macht einen technischen Aufwand erforderlich, der größer ist als bei nichtzeitaufgelösten Messungen, bei denen handelsübliche Lichtquellen und Detektionseinheiten wie CCD-Kameras verwendet werden. Eine Anforderung die das System erfüllen sollte, war eine hohe Geschwindigkeit der Datenaufnahme. Es sollte mit dem System auch möglich sein, in weniger als einer Sekunde („Quasi-Echtzeit“) die bildgebende Fluoreszenzabklingzeitbestimmung durchzuführen. Messzeiten von einigen Minuten, wie sie bei den meisten Messsystemen mit Einzelphotonzählung (siehe Abschnitt 2.2.1) allein für einen Messpunkt erforderlich sind, schränken die Anwendung dieser Messsysteme auf unbewegliche und photochemisch stabile Untersuchungsobjekte ein.

Das Messsystem wurde in zwei Ausbaustufen realisiert, die sich in der Art des modulierten Anregungslichts unterscheiden: Die erste Ausbaustufe, basierend auf einem am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen erstellten Messaufbau ([Sch97c]), verwendet einen Argon-Ionen-Laser und akustooptische Modulatoren (AOM), in der zweiten Ausbaustufe wurde eine modulierte Laserdiode verwendet. Nachdem im vorigen Kapitel die Phasenbereichmethode, die bei diesem Messsystem angewendet wird, erläutert wurde, soll im Folgenden in erster Linie der Aufbau des Messsystems und die charakteristischen Eigenschaften der wichtigsten Komponenten dargestellt werden.

### 3.1 Laser-AOM-Mikroskopsystem

Das grundlegende Konzept des Messsystems ist ein modularer Aufbau, der für weitere Ausbaustufen des Systems eine große Flexibilität in der Anpassung an unterschiedlichste Messaufgaben und eine einfache Erweiterbarkeit gewährleistet. Entsprechend den Funktionen die sie im Gesamtsystem erfüllen, lassen sich die Einzelkomponenten zu drei Grundeinheiten zusammenfassen (siehe Abbildung 3.1):

- **Anregungszeit:** Der Anregungszeit umfasst alle Komponenten, die erforderlich sind, modulierte Anregungslicht für die Messung bereitzustellen und an den Messort zu transportieren.
- **Detektionszeit:** Der Detektionszeit besteht aus dem Mikroskop als Messplatz und der Detektionseinheit aus modulierbarem Bildverstärker und CCD-Kamera mit der das Fluoreszenzlicht der Probe aufgenommen wird.
- **Steuereinheit:** Über einen Computer mit Schnittstellenkarten zur Ansteuerung der Komponenten im Anregungs- und Detektionszeit werden alle Abläufe der Messung geregelt, Fluoreszenzabklingzeiten berechnet und visualisiert sowie die quantitative Datenauswertung durchgeführt.

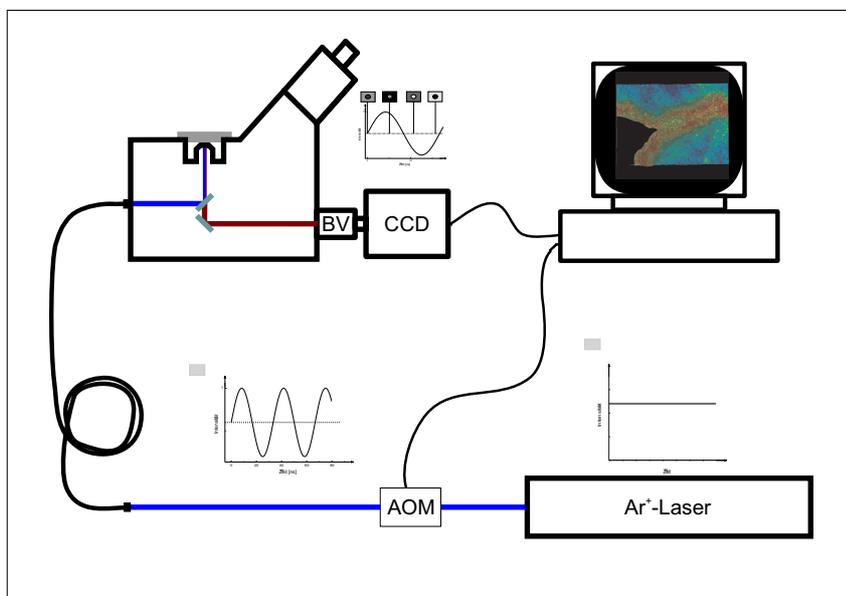


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau des Messsystems aus ...

### 3.1.1 Anregungsweig

**Argon-Ionen-Laser** Als Anregungslichtquelle wurde bei der ersten Ausbaustufe des Systems ein Argon-Ionen-Laser (Innova Sabre DBW 15, Coherent GmbH, Dieburg, Deutschland) mit einer maximalen Gesamtleistung von 15 W verwendet, der im Singlelinemodus betrieben wurde. Die Anforderung eines monochromatischen Anregungslichts wird bei dem Aufbau durch die unten erläuterten weiteren Komponenten des Anregungszeigs gestellt. Im Singlelinemodus lässt sich jeweils ein einziger der möglichen Laserübergänge des Gases selektieren, wodurch eine diskrete Anpassung der Wellenlänge im Bereich zwischen 454,5 - 528,7 nm möglich ist. Die Linien bei 514 nm und 488 nm stellen die größte Anregungsleistung ( $\approx 5$ W maximale Leistung) für die Experimente zur Verfügung, im kurzwelligen Bereich kann bei 457,9 nm ungefähr 1 W maximale Ausgangsleistung genutzt werden. Mit dieser Einstellmöglichkeit der Anregungswellenlänge in einem Bereich von ungefähr 60 nm kann das Messsystem für viele Anwendung an die Absorptionseigenschaften der untersuchten Fluorophore angepasst werden.

**Intensitätsmodulation** Für die Phasenbereichmethode ist die Anregung der Fluoreszenz mit einer phasenstabilen Modulation der Anregungsintensität essentiell. In dem Aufbau mit dem Argon-Ionen-Laser, der eine zeitlich konstante Intensität emittiert, wird die Modulation des Anregungslichts mit Hilfe von akustooptischen Modulatoren (SFM102F1-1, SFM202F1-1 und SFM502F1-1 von IntraAction Corp., Bellwood Illinois, USA) durchgeführt. Die Modulatoren haben als optisches Medium einen Kristall aus dichtem Flintglas auf den ein piezoelektrischer Schallwandler aus Lithium Niobat aufgebracht ist. Durch den Schallwandler wird eine akustische Welle erzeugt, die den Kristall durchläuft und wegen des exakten Schliffs des Glasblocks in hoher Güte reflektiert wird. Entspricht der Laufweg der akustischen Welle im Kristall einem Vielfachen der halben Wellenlänge, so bildet sich im Kristall eine stehende Welle aus.

Das Prinzip der Intensitätsmodulation mit akustooptischen Modulatoren basiert auf den durch die stehende Welle im Kristall hervorgerufenen Dichteschwankungen (Abbildung 3.2). Sie sind gleichbedeutend mit einem zeitlich variierenden Beugungsgitter der Gitterkonstante  $\Lambda$ . Zweimal pro akustischer Periode  $T$  - bei den Nulldurchgängen der Bäuche der stehenden Welle - liegt im Kristall eine homogene Dichteverteilung vor. Wie die akustische Welle erfolgen die Dichteänderungen zeitlich sinusförmig. Die maximale Ausprägung liegt jeweils eine viertel Periode nach den Nulldurchgängen vor. Für einen Laserstrahl der das Beugungsgitter senkrecht, das heißt parallel zu den akustischen Wellenfronten durchläuft (Raman-Nath-Anordnung), ergeben sich konstruktive Interferenzen unter den Winkeln  $\theta_n = \frac{n\lambda}{\Lambda}$ , wobei  $\lambda$  die optische Wellenlänge und  $n$  die Beugungsordnung bezeichnet. Die zeitlich sinusförmige Ausprägung des Beugungsgitters führt zu einer zeitlich entsprechend variierenden Beugungseffizienz. Werden alle höheren Beugungsordnungen außer der Nullten, die den Kristall gerade durchläuft, ausgeblendet, so ergibt sich eine Intensitätsmodulation des Laserlichts mit der doppelten Frequenz der akustischen Welle. Die Beugungseffizienz, die mit den verwendeten Modulatoren erreicht werden kann, liegt bei 80 %.

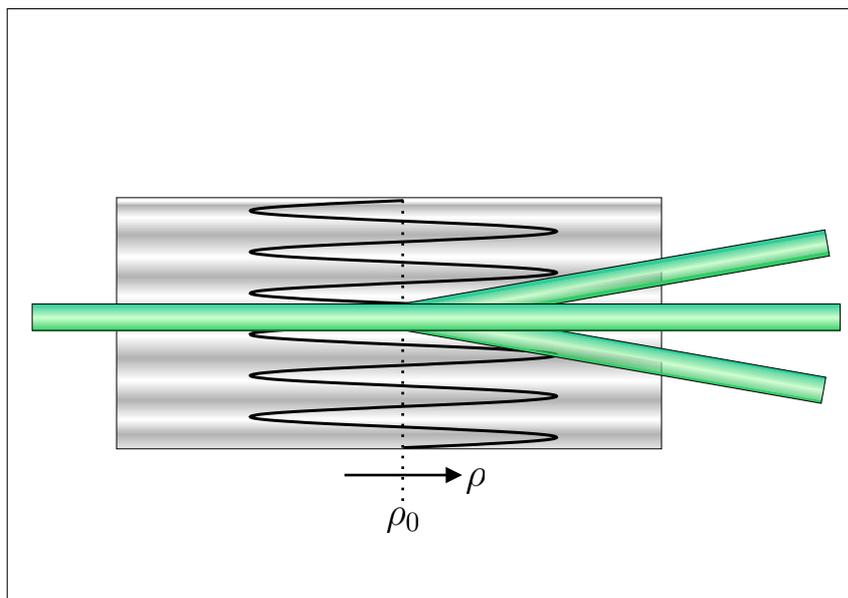


Abbildung 3.2: Prinzip der Intensitätsmodulation mit akustooptischen Modulatoren: Eine stehende akustische Welle im Kristall erzeugt wegen der hervorgerufenen Dichteschwankungen ein zeitlich variierendes Beugungsgitter.

Vorraussetzung für die Ausbildung einer stehenden Welle ist die Resonanz von akustischer Wellenlänge und Kristallabmessung. Mit akustooptischen Modulatoren kann die Frequenz der Intensitätsmodulation daher nicht kontinuierlich durchgestimmt werden, es lassen sich aber diskrete Resonanzfrequenzen in einem Bereich von  $\pm 20\%$  um die zentrale Trägerfrequenz nutzen. Bei den verwendeten Kristallen mit zentralen Trägerfrequenzen von 10, 20 und 50 MHz beträgt der Abstand zwischen den Resonanzfrequenzen jeweils ungefähr 200 kHz. Werden mehrere akustooptische Modulatoren mit unterschiedlichen Trägerfrequenzen in Serie verwendet, so lassen sich auch die Summen- und Differenzfrequenzen der jeweiligen Trägerfrequenzen nutzen. Mit den verwendeten Modulatoren kann auf diese Weise die Intensitätsmodulation in einem Frequenzbereich von ungefähr 10 - 120 MHz eingestellt werden. Thermische Einflüsse auf die Lage der Resonanzfrequenzen wurden durch eine zusätzliche Kapselung der Modulatoren und eine geregelte Wasserkühlung minimiert.

Eine Ausblendung der höheren Beugungsordnungen aus dem Laserstrahl durch eine Irisblende erfordert eine Aufspaltung der Strahlen verschiedener Ordnungen, die mindestens das doppelte des Strahldurchmessers beträgt. Die Winkel  $\theta_n$ , unter denen die Beugungsordnungen auftreten, hängen sowohl von der akustischen Trägerfrequenz, als auch von der optischen Wellenlänge ab. Bei den in diesem Aufbau verwendeten Modulatoren und Wellenlängen beträgt der Laufweg des Laserlichts, der nach den Modulatoren für die Ausblendung erforderlich ist, ungefähr 3 m.

Um eine möglichst flexible Nutzung des Messsystems zu erreichen, wurde der optische Aufbau des Anregungszeigs auf einer eigenen Befestigungsplatte (90x120cm) durchgeführt. Auf diese Weise ist ein Umbau für die Verwendung anderer Laser als Lichtquelle oder der mobile Einsatz in einfacher Weise möglich. Das Laserlicht wird über zwei Spiegel in den optischen Aufbau gelenkt, über die sich thermisch verursachte Veränderungen der Laserstrahlage kompensieren lassen. Der optische Weg ist auf der Befestigungsplatte mehrfach gefaltet, um die erforderliche Weglänge nach Durchlaufen der Modulatoren in kompakter Bauweise zu erreichen. Die Modulatoren sind auf drei-Achsen-Manipulatoren befestigt, die eine exakte Ausrichtung auf die optische Achse ermöglichen, was für die Erreichung einer maximalen Beugungseffizienz erforderlich ist. Für die Erzeugung der akustischen Welle in den Modulatoren wird das sinusförmige Ausgangssignal von Frequenzgeneratoren (Modell 2023 von Marconi Instruments, Stevenage, UK), nachverstärkt mit 3 W Leistungsverstärkern (ENI 403LA von ENI, Rochester N.Y., USA) auf den piezoelektrischen Schallwandler der Modulatoren gegeben.

**Lichttransport** Die Entkoppelung von Anregungszeig und Detektionszeig wird mit Hilfe von Glasfasern durchgeführt, die eine flexible Lichtführung über viele Meter Entfernung ermöglichen. Werden für den Lichttransport Multimodefasern verwendet, so lassen sich dank des großen Akzeptanzwinkels und der großen Kerndurchmesser der Fasern von mehreren 100  $\mu\text{m}$  mit einer einfachen Linse hohe Koppel-effizienzen um 80 % erreichen. Der entscheidende Nachteil von Multimodefasern liegt in dem Specklemuster, das bei ihnen in der Beleuchtungsebene durch die Interferenz unterschiedlicher Lichtausbreitungsmoden in der Faser erzeugt wird. Bei der angewendeten Messmethode (siehe Abschnitt 2.2.2.3) werden die Fluoreszenzabklingzeiten aus einer Folge von Einzelaufnahmen berechnet, die bei unterschiedlichen Phasenlagen zwischen Fluoreszenz- und Detektormodulation aufgenommen werden. Da schon kleinste Bewegungen der Fasern zu einer räumlichen Veränderung des Interferenzmusters führt ist mit Multimodefasern nicht gewährleistet, dass die Verteilung der Anregungsintensität auf der Probe für alle Einzelaufnahmen gleich ist. Prinzipiell lässt sich dieser Nachteil von Multimodefasern beheben, indem die Faser kontinuierlich gezielt bewegt wird. Damit sich durch die Bewegung innerhalb der Messzeit einer Einzelaufnahme eine hinreichende Mittelung des Interferenzmusters erreichen lässt, sind Bewegungen der Faser im kHz-Bereich erforderlich, was technisch schwer zu realisieren ist und darüber hinaus zu Faserbrüchen führen kann. Derartige Probleme treten bei der Verwendung von Singlemodefasern, in denen es für das Laserlicht nur eine einzige Ausbreitungsmode gibt, nicht auf, weswegen sie in dem Aufbau des Messsystems zum Einsatz kamen. Singlemodefasern haben mit typischerweise 5  $\mu\text{m}$  einen deutlich geringeren Kerndurchmesser als Multimodefasern. Die Einkoppelung von Laserlicht erfordert eine präzise Justage der verwendeten Optik und ist empfindlich gegen Veränderungen der Strahlage. Diese unvermeidlichen thermischen Veränderungen der Strahlage machen eine gelegentliche Nachjustage erforderlich. Die verwendete Einkoppeloptik (Pointsource, Winchester, UK) bietet über einen 4-Achsen-Manipulator sehr empfindliche Ausrichtungsmöglichkeiten der

Faserendfläche und ist für den Strahldurchmesser und die verwendeten Wellenlängen optimiert, wodurch eine exakte Justage auf relativ einfache Weise möglich ist und Koppel effizienzen bis zu 40 % erreicht werden können.

Am Faserausgang wird das Laserlicht mit einer Linse parallelisiert und über ein umgekehrtes Galileofernrohr im Strahldurchmesser an die Mikroskopoptik (Strahlteiler, Objektivlinsen) angepasst. In der Auskoppeloptik ist ein ansteuerbarer Strahlunterbrecher integriert, mit dem sich der Lichtweg des Anregungslichts sperren und öffnen lässt.

#### 3.1.2 Detektionszweig

**Mikroskop** Ein inverses Mikroskop (DM-IRB von Leica, Bensheim, Deutschland) ist der zentrale Messplatz des realisierten Messsystems, an dem die Untersuchungsobjekte positioniert, zur Fluoreszenz angeregt werden und die Fluoreszenzemission auf die eigentliche Detektoreinheit abgebildet wird. Das Mikroskop bietet für diese erste Umsetzung des Messprinzips den Vorteil, dass in kompakter Bauweise alle erforderlichen optischen Komponenten integriert sind und auf eine Abbildungsoptik zurückgegriffen werden kann, die durch die Entwicklungsarbeit der Mikroskophersteller auch für Fluoreszenzaufnahmen optimiert ist. Für den Einsatz der Messmethode in der Tumordiagnostik lassen sich so in einem breiten Anwendungsspektrum die grundlegenden Experimente von der Vermessung von Farbstoff- und Tumormarkerlösungen über Zelleexperimente und Vermessung von Gewebebiopsien bis zu in-vivo-Anwendungen durchführen.

Von der Faserauskoppeleinheit kommend, die am rückwärtigen Epifluoreszenz-Beleuchtungseingang des Mikroskops angebracht ist, wird das Anregungslicht über einen Fluoreszenzfilterblock und das Mikroskopobjektiv auf die Probe gelenkt. Vier unterschiedliche Filterblöcke, die auf einer Revolverscheibe angebracht sind, können für die Umlenkung des Anregungslichts auf das Messobjekt und die Filterung des emittierten Fluoreszenzlichts verwendet werden. Durch die Interferenzbeschichtung der dichroitischen Strahlteiler der Filterblöcke wird eine spektrale Aufspaltung erreicht, indem kurzwellige Strahlung reflektiert, langwellige Strahlung transmittiert wird. Der Grad der Reflexion und Transmission ist von der Beschichtung abhängig, so dass durch die Auswahl der Strahlteiler das Anregungslicht vollständig reflektiert und so aus der Beobachtungsoptik des Mikroskops ausgeblendet, oder auch teilweise mit der Fluoreszenzemission transmittiert werden kann. Über einen weiteren Emissionsfilter nach dem Filterblock lässt sich das spektrale Fenster der Detektion weiter einschränken. Die transmittierte Strahlung wird über die Beobachtungsoptik des Mikroskops entweder direkt durch Okulare beobachtet oder in einen der Kameraports des Mikroskops umgelenkt und mit der Detektionseinheit vermessen.

**Detektionseinheit** Die Detektionseinheit des Messsystems, mit der für die Bestimmung der Fluoreszenzabklingzeiten eine Sequenz von Fluoreszenzbildern aufgenommen wird, besteht aus einem modulierbaren Bildverstärker C5825 und einer peltiergekühlten fast-scan CCD-Kamera C4880-81 (beide Hamamatsu Phot. Deutschland, Herrsching, Deutschland). Die zentrale Funktion des Bildverstärkers im Messsystem liegt nicht in der Verstärkung eines schwachen Fluoreszenzsignals, sondern in der hochfrequenten Modulation des Verstärkungsfaktors der Detektoreinheit. Das in dem Messsystem verwendete Messprinzip der homodynen Phasenbereichmethode (siehe Abschnitt 2.2.2.3) beruht auf dieser Modulation der Detektorsensitivität mit der gleichen Frequenz, mit der das Fluoreszenzsignal moduliert ist.

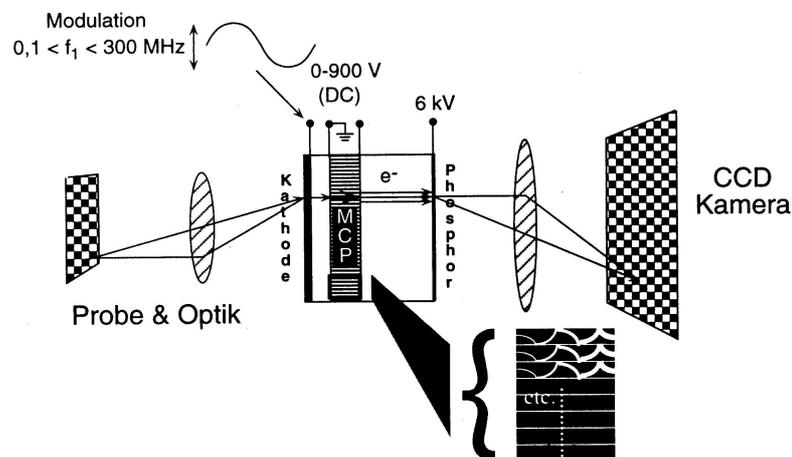


Abbildung 3.3: Detektionseinheit aus modulierbarem Bildverstärker und CCD-Kamera (nach [Sch97c]).

Photokathode, Mikrokanalplatte und Phosphorschirm bilden die drei Grundeinheiten, aus denen der Bildverstärker aufgebaut ist (Abbildung 3.3). Die Fluoreszenz des Messobjekts wird auf die Photokathode des Bildverstärkers abgebildet, wo die auftreffenden Photonen über den photoelektrischen Effekt Photoelektronen auslösen. Diese Photoelektronen werden in einem elektrischen Feld auf eine Mikrokanalplatte beschleunigt. Die parallel zur optischen Achse des Systems angeordneten Kapillaren der Mikrokanalplatte wirken wie eine zweidimensionale Matrix aus Sekundärelektronenvervielfachern. Das an der Phosphorscheibe resultierende Intensitätsbild ist monochrom, die spektralen Informationen des auf die Photokathode abgebildeten Objekts gehen nur indirekt über die wellenlängenabhängige Auslösewahrscheinlichkeit von Photoelektronen an der Kathode in das Intensitätsbild ein.

Die Modulation der Kathodenspannung wird durch ein sinusförmiges Spannungssignal von einem Frequenzgenerator (Modell 2030, Marconi Instruments, Stevenage, UK) getrieben, dessen Signal mit den Frequenzgeneratoren der akustooptischen Modulatoren phasengekoppelt ist. Der Gesamtverstärkungsfaktor des Bildverstärkers und ein Verstärkungsoffset mit dem eine 100 %-ige Modulationstiefe erreicht wird, ist an der Steuereinheit des Bildverstärkersystems einstellbar.

Die zeitlich stationäre Intensitätsverteilung auf dem Phosphorschirm des Bildverstärkers, die von der relativen Phasenlage der Modulation der Fluoreszenz und der Modulation des Verstärkungsfaktors abhängt, wird mit einem 50 mm-Objektiv (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) auf den Chip der CCD-Kamera abgebildet, der bei einer Größe von 6,52 mm x 4,89 mm 656 x 494 Bildpunkte hat. Die Serie der Intensitätsbilder bei unterschiedlichen Phasenlagen wird mit 10 bit Auflösung und der eingestellten Integrationszeit aufgenommen und über eine digitale Videointerfacekarte (SDV von EDT Inc., Beaverton Oregon, USA) in direktem DMA-Modus in den Arbeitsspeicher des Steuercomputers übertragen.

#### 3.1.3 Steuereinheit

Alle Schritte der Datenerfassung und -visualisierung sowie die Auswertung der Messdaten erfolgt an einer SUN Sparc Workstation mit einem 200 MHz Sparc2 Prozessor, 320 MB Arbeitsspeicher und einer hardwarebeschleunigten Graphikkarte Creator 3D (SUN Microsystems, Grasbrunn, Deutschland). Die Workstation ist mit einer GPIB 488.2 SBus-Karte ausgerüstet, über die alle Ansteuerungsvorgänge für die Frequenzgeneratoren von Marconi übertragen werden. Die digitale Videointerfacekarte überträgt die Steuerbefehle an die CCD-Kamera und liest die aufgenommenen Bilddaten direkt in den Arbeitsspeicher des Computers. Die Software des Messsystems ist auf der Basis des Datenvisualisierungspaketes EXPRESS von AVS (AVS, Waltham Massachusetts, USA) realisiert. Dieses Datenvisualisierungspaket stellt eine graphische Programmierschnittstelle zur Verfügung, in der vorgefertigte Module für die zwei- und dreidimensionale Datenvisualisierung zu einem Netzwerk zusammengefügt werden können. Schnittstellen zu Peripheriegeräten und komplexere Datenverarbeitungswerkzeuge sind in den vorgefertigten Modulen nicht implementiert. Durch die Einbindung in C programmierter Routinen in neue Module können aber zusammen mit den vorgefertigten Visualisierungsmodulen komplexe Netzwerke erstellt werden, die alle gewünschten Datenerfassungs-, Datenverarbeitungs- und Datenvisualisierungsaufgaben erfüllen können.

**Messnetzwerk** In dem Messnetzwerk können in einem zentralen Steuerfenster (siehe Abbildung 3.4) alle Messoptionen eingestellt werden und die eigentliche Messung gestartet werden. Die wesentlichen Messparameter sind neben der Modulationsfrequenz in MHz (FREQUENZ) die Integrationszeit in Einheiten der minimalen Integrationszeit der Kamera von 30 ms (FRAMES) und die Anzahl an Messungen (LOOPS),



Abbildung 3.4: Steuer- und Ausgabefenster des Messnetzwerks.

die mit den gemachten Einstellungen hintereinander durchgeführt werden sollen. Weitere Einstellmöglichkeiten gibt es bei der Anzahl der Phasenschritte (NIMAGES) für eine Einzelmessung und der Schließung des Strahlunterbrechers (SHUTTER) zwischen den Einzelmessungen, womit ein Ausbleichen der Probe minimiert werden kann. Auch eine Reduktion der Auflösung durch Zusammenfassung mehrerer Kamerapixel kann hier geregelt werden (PIXEL). Dieses „binning“ ermöglicht schnellere Messungen wegen des schnelleren Datentransfers. Durch Aktivierung des Auswahlschalters SAVE kann festgelegt werden, dass die Messdaten nach Beendigung der Messung abgespeichert werden.

Wird eine Messung beziehungsweise Messserie über den START-Knopf gestartet, so erfolgt als erstes die Initialisierung der Peripheriegeräte: Über die GPIB-Karte werden

die Frequenzgeneratoren auf die gewählte Frequenz geregelt und die CCD-Kamera über die digitale Videokarte auf die gewählte Auflösung und Integrationszeit eingestellt. Bei geschlossenem Strahlunterbrecher wird dann eine Bestimmung des Hintergrundsignals ohne Fluoreszenz durchgeführt. Der Strahlunterbrecher wird geöffnet und eine erste Aufnahme bei der aktuellen Phasenlage zwischen Fluoreszenzsignal und Verstärkermodulation aufgenommen. Aus den Intensitätswerten des Bildes werden darauf für jeden Bildpunkte die Beiträge zu den Fourierkomponenten  $F_0$ ,  $F_{\sin}$  und  $F_{\cos}$  errechnet (siehe Abschnitt 2.2.2.3). Über die GPIB-Karte wird darauf die relative Phasenlage der Bildverstärkermodulation jeweils um  $2\pi/NIMAGES$  weitergestellt und eine weitere Aufnahme durchgeführt, bis alle NIMAGES Einzelaufnahmen der Messsequenz vorliegen. Aus den Fourierkomponenten werden dann die Modulationstiefe und Phasenlage berechnet und als dreidimensionales Falschfarbenbild dargestellt. Diese Darstellung gibt eine Überlagerung der Messparameter, indem die mittlere Intensität jedes Bildpunktes die Höhe im Bildprofil und die Modulation beziehungsweise Phasenlage die Farbe des Bildpunktes bestimmt (siehe auch Abschnitt 6.1.1). Über die im Programm enthaltenen Visualisierungsmodule lassen sich das angewendete Farbmodell auswählen, die Skalierung der Farbverteilung ändern, sowie das Farb-Höhenprofil im Raum drehen. Bei der visuellen Darstellung wird im Messnetzwerk auf eine Umrechnung auf Fluoreszenzabklingzeiten verzichtet. Die Darstellung von Modulationstiefe und Phasenlage liefert bereits bei der Messung ein Abbild der Abklingzeitinformation, auch wenn die genaue Phasenlage und Modulation des Anregungslichts noch nicht direkt oder indirekt über eine homogene Referenzprobe bestimmt wurde. Zusätzlich zu den Farbdarstellungen wird in einem weiteren Fenster die über die NIMAGES Einzelbilder gemittelte Intensität als zweidimensionales Graustufenbild ausgegeben. Für eine spätere Verarbeitung der Messinformationen werden drei Dateien abgespeichert, in denen die mittlere Intensität, die Modulationstiefe und die Phasenlage der Bildpunkte geschrieben werden.

Ein wichtige Funktion des Messnetzwerks ist die Überprüfung der Stabilität der Modulationstiefe und Phasenlage, die vor den eigentlichen Messungen anhand des Anregungslichts oder des Fluoreszenzsignals einer homogenen Probe durchgeführt wird. Dafür kann in dem Fenster mit der Intensitätsdarstellung ein beliebiger Bereich (ROI = region of interest) ausgewählt werden, aus dessen Bildpunkten dann eine Auswertung der Modulationstiefe und Phasenlage errechnet wird. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Modulationstiefe und Phasenlage, sowie das Minimum und Maximum der mittleren Intensität der Bildpunkte werden in einem eigenen Fenster ausgegeben. Über einen Auswahlschalter (<M,PHI>) im zentralen Steuerfenster kann eine graphische Darstellung der Mittelwerte im Verlauf einer Messserie aktiviert werden.

**Auswertenetzw** Großes Gewicht wurde auf die Entwicklung vielseitiger Auswertehilfsmittel gelegt, mit denen erst quantitative Aussagen über die Verteilung von Fluoreszenzabklingzeiten in den untersuchten Proben zu gewinnen sind. Aus den Messungen selbst liegen neben der mittleren Fluoreszenzintensität die Modulationstiefe und Phasenlage für jeden Bildpunkt vor. Der erste Schritt aller Auswertevorgänge ist die Umrechnung dieser Rohwerte auf Fluoreszenzabklingzeiten. Mit den Daten einer Referenzmessung des Anregungslichts oder einer homogenen Probe mit bekannter Abklingzeit unmittelbar vor oder nach der eigentlichen Messung müssen aus der Modulationstiefe und Phasenlage der Messpunkte die jeweilige Demodulation und Phasenverschiebung bestimmt werden. Diese Werte lassen sich dann für jeden Bildpunkt mit dem Ansatz eines monoexponentiellen Abklingverhaltens in Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  umrechnen und wie die unkorrigierte Modulationstiefe und Phasenlage bei der Messung als dreidimensionale Falschfarbenbilder visualisieren.

Eine genaue Analyse von Fluoreszenzabklingzeitunterschieden in lokalen Bereichen der Probe erfordert die Möglichkeit, in dem Gesamtbild der Fluoreszenzabklingzeiten beliebige Areale auszuwählen und die Auswerteroutinen dann nur in diesem Bereich anzuwenden. Im Auswertenetzw ist diese Definition von Auswertebereichen realisiert, indem mit der Maus im Intensitätsfenster rechteckige, runde oder frei gezeichnete Kurven definiert werden können (siehe Abbildung 3.5 links). Das Auswertebereich wird so auf alle Punkte die innerhalb der gezeichneten Kurve liegen festgelegt.

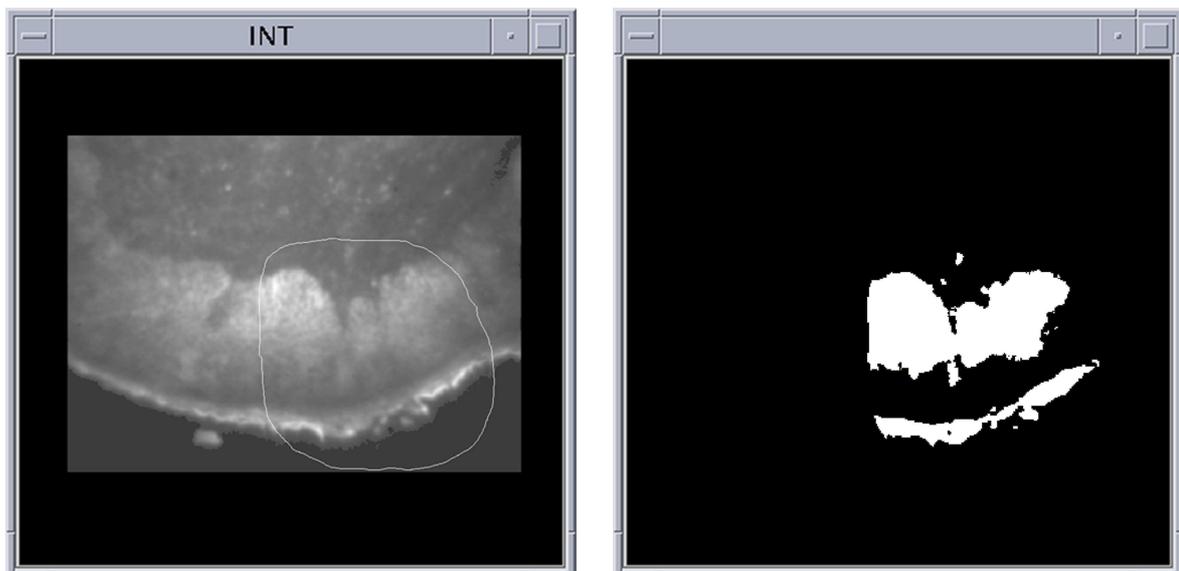


Abbildung 3.5: Intensitätsbild mit ausgewähltem ROI und umgesetzt

### 3 Das Messsystem

---

Für viele Proben, wie zum Beispiel Schnitte von Gefrierbiopsien, muss eine weitere Einschränkung der für die Auswertung verwendeten Bildpunkte erfolgen, da die Proben nicht flächig homogen sind, sondern auch Fehlstellen aufweisen können. Diese Einschränkung auf die Bildpunkte des Auswertebereichs, in denen wirklich Probenmaterial liegt, wurde durch die Verwendung einer Intensitätsschwelle im Auswertebereich realisiert. Die Bildpunkte ohne Probenmaterial, wo das gemessene Signal zum Beispiel nur von der Fluoreszenz des Objektträgers herrührt, lassen sich durch Anpassung des Schwellenwertes ausblenden (siehe Abbildung 3.5 rechts).

Als weitere Auswertemöglichkeit wurde die Mittelwertberechnung entlang einer Linie realisiert, wie sie für Messungen an Gewebeproben bei denen eine Tiefenabhängigkeit untersucht werden soll erforderlich ist (siehe Abschnitt 4.3). Wie das flächige Auswertebereich wird die Auswertelinie im Intensitätsbild der Messung definiert. Bei der Auswertung werden für die Linienpunkte jeweils Mittelwerte der getroffenen Bildpunkte und ihrer links und rechts senkrecht zum Linienverlauf fünf nächsten Nachbarn berechnet. Die Werte der gemittelten scheinbaren Abklingzeiten oder der Intensität, wie in Abbildung 3.6 gezeigt, werden in einem eigenen Graphikfenster gegen die Pixel der Auswertelinie dargestellt.

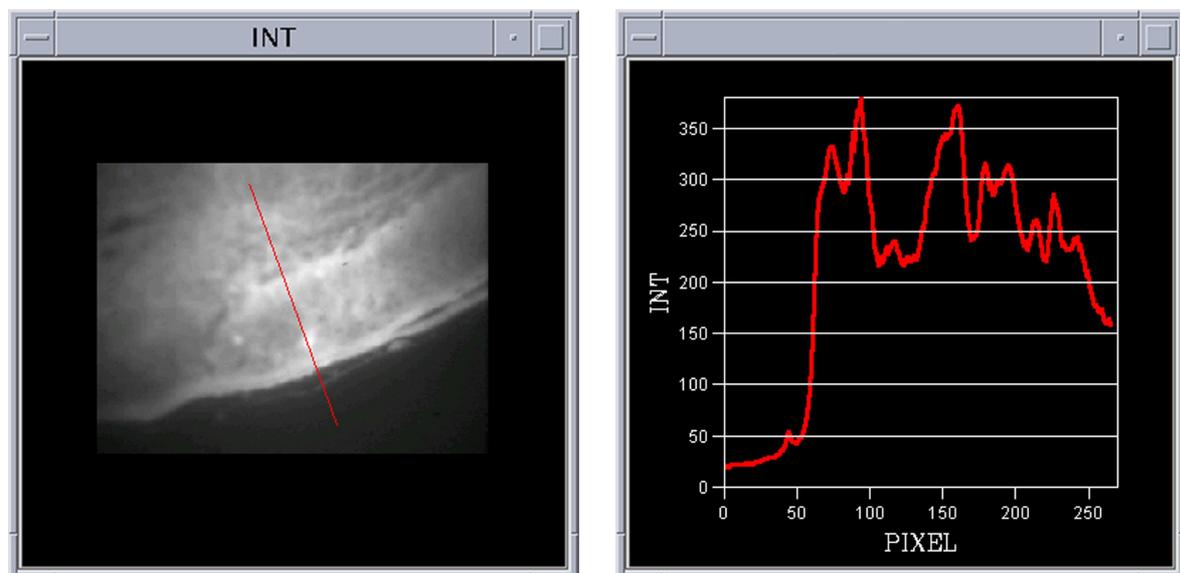


Abbildung 3.6: Durch die Auswahl einer Linie im Intensitätsbild lässt sich die Auswertung der Daten entlang dieser Linie statt in Arealen anwählen.

Alle Auswertemöglichkeiten wurden derart realisiert, dass die Verarbeitung von Messserien möglichst einfach erfolgen kann. Zwei miteinander kombinierbare Serienverarbeitungen wurden realisiert: Wurde nicht nur eine Einzelmessung durchgeführt, sondern eine ganze Serie gleicher Einzelmessungen, so kann die Auswertung der Daten

im Auswertebereich über die ganze Serie durchgeführt werden. Dies erfolgt indem nur eine Messung geladen, aber die Mittelwertbildung über alle im Steuerfenster durch zwei Regler gewählten Messungen durchgeführt wird. Zusätzlich wurde eine Möglichkeit realisiert, bei Messserien, die mit drei unterschiedlichen Emissionsfiltern jeweils hintereinander aufgenommen wurden, die Auswertergebnisse getrennt für die drei Spektralmessungen in den identischen Auswertebereichen zu erhalten. Diese Auswertemöglichkeit wird durch die Auswahl des spektralen Auswertemodus aktiviert. Die Ergebnisse aller Auswertungen werden in einem eigenen Ausgabefenster angezeigt und wenn gewünscht in Tabellenform abgespeichert. Alle Auswertevorgänge lassen sich ebenso an den Rohdaten der Modulationstiefe und Phasenlage ohne eine Umrechnung auf Fluoreszenzabklingzeiten mit einem Referenzwert durchführen.

### **3.2 Modifiziertes Messsystem mit Laserdiode**

In der zweiten Ausbaustufe des Messsystems besteht der Anregungsarm statt in der Kombination aus Argon-Ionen-Laser und akustooptischen Modulatoren aus einem Diodenlasersystem DL 100 mit Faserkopplung von Toptica (Toptica Photonics, Martinsried, Deutschland). Zwischen den beiden unterschiedlichen Anregungsarmen kann dank des modularen Aufbaus des Messsystems je nach Anforderungen der durchzuführenden Messungen durch den Austausch der Fasern an der Schnittstelle zwischen Anregungsarm und Detektionsarm auf einfachste Weise gewechselt werden. Die erste Ausbaustufe mit Argon-Ionen-Laser und akustooptischen Modulatoren bietet im Prinzip den Vorteil einer hohen Ausgangslichtleistung des Laser und mehrerer Wellenlängen, mit der die Fluoreszenz der Probe angeregt werden kann, ist aber wegen der akustischen Resonanzbedingung bei den akustooptischen Modulatoren auf diskrete Modulationsfrequenzen eingeschränkt. Durch die Verluste an der Vielzahl an optischen Komponenten im Anregungsarm und wegen der in diesem Aufbau deutlich unter dem Idealwert von rund 40 % liegenden Einkoppeleffizienz in die Monomodefaser steht am Messplatz nur ein Bruchteil der Ausgangsleistung zur Verfügung. Für den experimentellen Ablauf von entscheidendem Nachteil ist die Empfindlichkeit des Aufbaus auf thermische Einflüsse, die die Strahlage des Lasers und die Resonanzlage für die stehenden akustischen Wellen im Modulator beeinflussen. Vor dem Einsatz des Systems ist eine genaue optische Justage und ein Abgleich der Modulationsfrequenz auf die Resonanzbedingung sowie die Kontrolle der Stabilität erforderlich. Diese Probleme treten bei der Verwendung einer Laserdiode als Lichtquelle nicht auf, wodurch eine schnelle und flexible Nutzung des Systems auch ausserhalb eines Labors ermöglicht wird.

Im verwendeten Diodenlasersystem DL 100 wird die um 400 nm liegende Laseremission einer blauen Hochleistungslaserdiode von Nichia durch eine Linse kollimiert und mit einem Gitter, von dem die erste Beugungsordnung in die Laserdiode zurückreflektiert wird, spektral auf eine Wellenlänge von 396,7 nm stabilisiert. Bei Laserdioden kann eine Intensitätsmodulation wegen der linearen Kennlinie der Emissions-

### 3 Das Messsystem

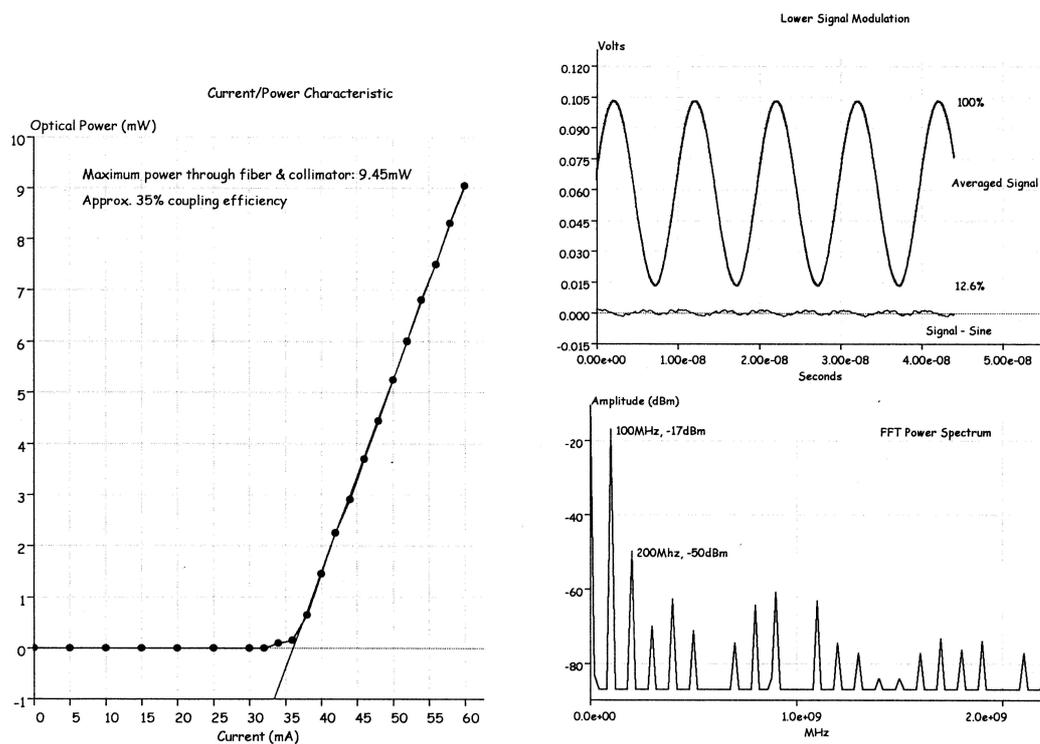


Abbildung 3.7: Strom-Leistungs-Kennlinie der Laserdiode (links), Laserintensität bei der Modulation des Diodenstroms mit 100 MHz (rechts oben) und zugehöriges Leistungsspektrum

leistung in Abhängigkeit vom Diodenstrom oberhalb der Laserschwelle auf einfache Weise durchgeführt werden (siehe Abbildung 3.7). Durch eine sogenannte Bias-T-Schaltung wird mit einem zeitlich konstanten Diodenstrom die mittlere Ausgangsleistung der Laserdiode eingestellt. Über einen zeitlich variierenden Anteil des Diodenstroms, der durch ein sinusförmiges Ausgangssignal des Frequenzgenerators getrieben wird, kann eine Intensitätsmodulation mit 100 % Modulationstiefe bei Frequenzen bis zu mehreren 100 MHz erreicht werden. Da es sich bei dieser Art der Modulation nicht um ein Resonanzphänomen handelt, ist eine kontinuierliche Durchstimmung der Modulationsfrequenz möglich. In dem Diodenlasersystem ist eine Koppeleinheit integriert, mit der die Laseremission in eine Monomodefaser eingekoppelt wird. Am Ausgang der Faser stehen 13 mW Leistung zur Verfügung.

## 4 Material und Methoden

Der experimentelle Teil dieser Arbeit ist darauf ausgerichtet, nach der Realisierung des Messsystems grundlegende Messungen durchzuführen, die die Einsatzmöglichkeiten der zeitaufgelösten Fluoreszenzdiagnostik mit der Phasenbereichsmethode als diagnostisches Werkzeug ausloten sollen. Als erster Schritt wird dabei anhand von homogenen und heterogenen Farbstofflösungen das System hinsichtlich Genauigkeit sowie Auflösbarkeit und visueller Darstellung von Fluoreszenzlebensdauerkontrasten validiert. Grundlegend für folgende Messungen an biologischem Gewebe in-vitro und in-vivo werden Reinsubstanzen der endogenen Gewebefluoreszenz untersucht. Die folgenden Messungen, die den Einsatz der Methode bei der Entwicklung neuer Tumormarker aufzeigen, sind die Anwendung auf Rhodamin-markierte Liposomen, ein neues, in seinen Fluoreszenzabklingeigenschaften unbekanntes System. Über Messungen an Gefrierschnitten der zervikalen intraepithelialen Neoplasie erfolgt der Schritt zur diagnostischen Anwendung des Systems an biologischem Gewebe, die abschließend bei den Messungen am Rückenammermodell bei Hamstern in-vivo zum Einsatz kommt.

### 4.1 In-vitro-Messungen an Farbstofflösungen

Für die Validierung des Messsystems hinsichtlich der Richtigkeit der mit ihm bestimmten Fluoreszenzabklingzeiten und der Genauigkeit, mit welcher die Bestimmung möglich ist, dienen die Messungen an Farbstofflösungen. Die verwendeten Farbstofflösungen sind „ideal einfachste“ Modellsysteme mit nahezu monoexponentiellem Abklingverhalten. Durch Mischung mehrerer Lösungen unterschiedlicher Abklingzeiten sind mit ihnen auch komplexere Fluoreszenzgegebenheiten herbeiführbar, wobei das genaue Wissen um die Eigenschaften der einzelnen Beiträge die Überprüfung der mit dem Messsystem bestimmten Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  ermöglicht.

#### 4.1.1 Fluoreszenzabklingzeiten homogener Farbstofflösungen

Für die Validierung der Messapparatur wurden homogene Lösungen der Laserfarbstoffe Rhodamin 101 (Rh101), Sulforhodamin B (SRhB), und DCM (alle Lambda Physik) und des als Mitochondrienmarker eingesetzten Rhodamin 123 (Rh123) in Ethanol hergestellt. Die Konzentrationen der Farbstoffe lag dabei im Bereich von  $0,1 \mu\text{M}$  bis  $20 \mu\text{M}$ . Alle Farbstoffe absorbieren Licht im nahen ultravioletten und sichtbaren

Spektralbereich, ihre Absorptionsmaxima liegen bei 576 nm (Rh101), 556 nm (SRhB), 472 nm (DCM) und ca 488 nm (Rh123) (Abbildung 4.1). Alle Farbstoffe lassen sich sowohl mit den beim Argon-Ionenlaser zur Verfügung stehenden Wellenlängen, als auch mit der blauen Laserdiode zur Fluoreszenz anregen, wobei ihre Absorptionskoeffizienten um 400 nm um Größenordnungen unter denen der jeweiligen Absorptionsmaxima liegen. Die Maxima der Fluoreszenz liegen mit 623 nm (Rh101), 575 nm (SRhB), DCM 644 nm (DCM) und ca 533 nm (Rh123) im Bereich hoher Empfindlichkeit des Bildverstärkerkathodenmaterials.

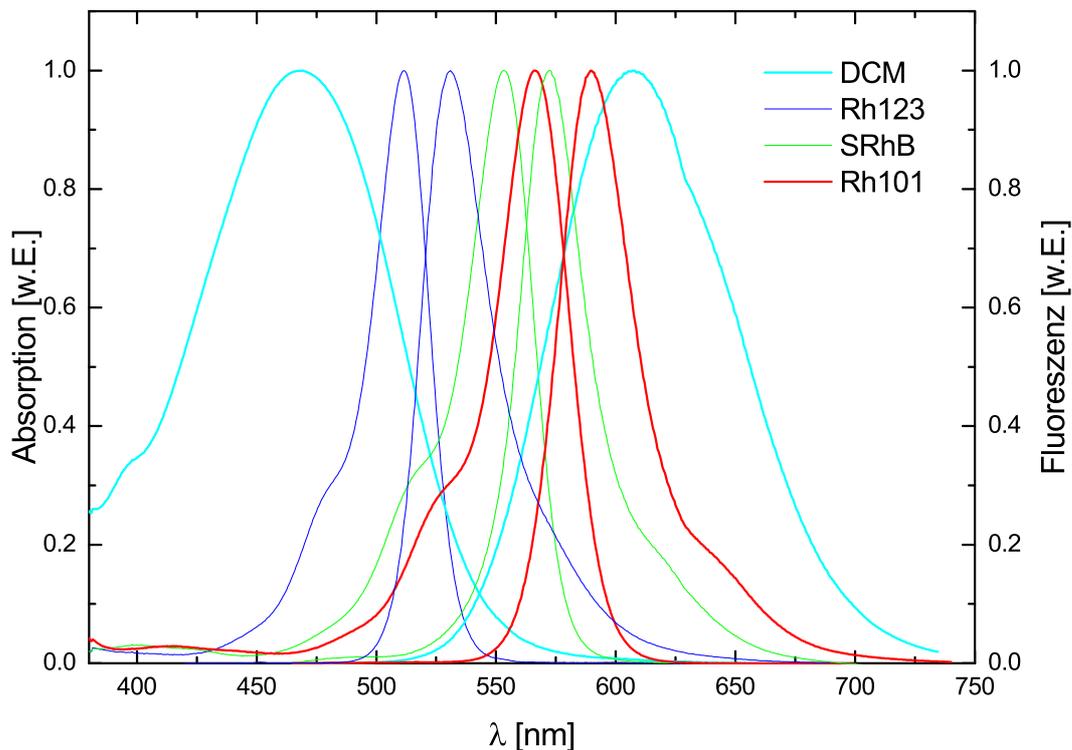


Abbildung 4.1: Absorptions- und Emissionsspektren ( $\lambda_{Ex} = 450$  nm) der homogenen Lösungen von DCM, Rh123, SRhB und Rh101 in Ethanol

Die jeweiligen Lösungen wurden für die Messungen in dünne Glaskapillare (GLW, Würzburg, Deutschland) mit einem Innendurchmesser von 0,7 mm aufgezogen und die Kapillaren an den Enden mit Lack auf einem Glasmikroskopobjektträger fixiert. Durch die Fixierung mit Lack ist gleichzeitig ein Verdunsten der Lösung während der Messungen verhindert.

Die Messungen der homogenen Lösungen von Rhodamin 101, Sulforhodamin B, DCM und Rhodamin 123 in Ethanol erfolgte mit dem System 1 mit Argonlaser und

akusto-optischen Modulatoren. Die Wellenlänge des Anregungslichts betrug 488 nm. Der dichroitische Filterblock des Mikroskops wurde so gewählt, dass er einen Teil des an der Probe rückgestreuten Anregungslichts in den Detektionszweig des Mikroskops transmittiert. Dadurch ist die Messung der Modulation und Phasenlage sowohl der Fluoreszenz, unter Verwendung eines Langpassfilters, als auch des Anregungslichts (Kurzpassfilter) ermöglicht. Von allen homogenen Lösungen wurde unter Verwendung des 16-fach Mikroskopobjektivs jeweils eine Serie von 10 Messungen mit Modulationsfrequenzen von  $f = 40$  MHz und  $f = 100$  MHz aufgenommen.

Eine weitere Messung mit den 4 homogenen Lösungen wurde mit geringerer Vergrößerung (2,5-fach Mikroskopobjektiv) durchgeführt. Sie dient der Überprüfung der Intensitätsunabhängigkeit des Messergebnisses bei homogenen Lösungen und zeigt die Möglichkeiten der Visualisierung von Fluoreszenzabklingzeitkontrasten durch die dreidimensionale Falschfarbendastellung.

### 4.1.2 Scheinbare Fluoreszenzabklingzeiten heterogener Farbstofflösungen

Den in biologischen Proben anzutreffenden Gegebenheiten mit mehreren Fluoreszenzbeiträgen unterschiedlicher Abklingzeiten entspricht als einfaches Modellsystem eine Mischung von Farbstofflösungen. Ausgehend von zwei Stammlösungen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen lässt sich der Einfluss einer Veränderung in der Stärke einzelner Fluoreszenzbeiträge auf die bei der Messung bestimmten scheinbaren Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  durch Mischung der Stammlösungen in unterschiedlichen Volumenverhältnissen modellieren. Neben dem Mischungsverhältnis bestimmen die Konzentration der Fluorophore in den Stammlösungen, ihr Absorptionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge, die Quantenausbeute und das Fluoreszenzspektrum und die spektrale Charakteristik des Bildverstärkerkathodenmaterials im detektierten Spektralbereich die Stärke des jeweiligen Beitrags zum Messsignal.

Für die Messung wurden zunächst zwei homogene Stammlösungen mit gleicher integraler Fluoreszenzintensität von Rhodamin 101 und DCM in Ethanol erstellt. Die Messung der homogenen Stammlösungen und der Mischlösungen in Volumenverhältnissen von (10:1 10:2 10:5 10:8 1:1 8:10 5:10 2:10 1:10) erfolgte entsprechend der Vorgehensweisen in 4.1.1 durch Aufziehen in Glaskapillaren und Fluoreszenzanregung mit dem System 1 bei einer Anregungslichtwellenlänge von 488 nm und einer Modulationsfrequenz von 40,164 MHz.

### 4.2 In-vitro-Messungen endogener und exogener Fluorophore

Nach Realisierung und Validierung des Messsystems bedeuten die Experimente dieses Abschnitts den Schritt hin zur Anwendung der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion. Durch Messungen an Reinsubstanzen endogener Gewebefluorophore sollen die Grundlagen für den in-vitro- und in-vivo-Einsatz der Messmethode für die Gewebediagnostik gelegt werden. Die im zweiten Teil des Abschnitts dargestellte Untersuchung eines neuen, in seinem Fluoreszenzabklingverhalten völlig unbekanntes Systems mit einem exogenen Fluorophor zeigt den Nutzen der Methode als analytisches Werkzeug für medizinisch-biologische Fragestellungen auf.

#### 4.2.1 Reinsubstanzen endogener Gewebefluorophore

Die Fluoreszenz endogener Gewebefluorophore kann in unterschiedlichsten medizinischen Fachbereichen bei der Erkennung prämaligener und maligner Gewebeveränderungen gewinnbringend genutzt werden (siehe 2.3). Aufgrund der breiten, überlappenden Emissionsbanden (siehe Abbildung 2.7) der wichtigen endogenen Gewebefluorophore zeigt die Autofluoreszenz bei konventionellen Fluoreszenzmethoden spektral keine oder kaum Feinstruktur, welche eine Bestimmung der relativen Amplituden einzelner Fluorophore zur Gesamtfluoreszenz ermöglichte. Die zeitaufgelöste Vermessung von Reinsubstanzen der Fluorophore, die bei den verwendeten Anregungswellenlängen die Gewebeautofluoreszenz dominierenden, soll durch die gewonnenene Abklingzeitinformation der Einzelfluorophore die Möglichkeit geben, bei folgenden in-vitro oder in-vivo-Messungen von Gewebeproben die Gewichtung der Beiträge zur Gesamtfluoreszenz untersuchen zu können.

Die meisten endogenen Fluorophore sind entweder in Prozessen des Zellmetabolismus beteiligt oder Bestandteile der Strukturmatrix des Gewebes ([Ric96]). Von der ersten Gruppe der Zellmetaboliten sind bei den in dieser Arbeit verwendeten Anregungswellenlängen vor allem die Flavine von Bedeutung. Die Absorption des reduzierten Nicotinamid-AdeninDinucleotid-Hydroxyen (NADH) ist oberhalb von 350 nm äusserst schwach, die Fluoreszenzemission in den verwendeten Detektionsfenstern verschwindend, so dass hier keine nennenswerte Fluoreszenzemission vorliegt. Bei der zweiten Gruppe der Strukturproteine spielen vor allem Kollagen und Elastin eine wichtige Rolle. Weitere Fluorophore, die aufgrund ihrer Absorptions- und Emissionseigenschaften zum Fluoreszenzsignal beitragen, sind Porphyrine und Lipopigmente. Aromatische Aminosäuren, die ebenso einen wichtigen Beitrag zur Gewebeautofluoreszenz liefern, scheiden im vorliegenden Fall wegen ihrer unterhalb von 300 nm liegenden Absorptionsbanden als mögliche Beiträge aus.

Für die Vermessung der Reinsubstanzen wurde der Aufbau mit Argon-Ionen-Laser und akustooptischen Modulatoren verwendet. Die Wellenlänge des Anregungslichts betrug bei allen Messungen 456,9 nm, alle Substanzen wurden mit Modulationsfre-

## 4.2 In-vitro-Messungen endogener und exogener Fluorophore

quenzen von 40 MHz sowie 100 MHz vermessen. In Tabelle 4.1 sind die vermessenen Reinsubstanzen (alle von Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und die Umgebungsbedingungen wie Lösungsmittel und pH-Wert aufgeführt. Nicht lösliche Reinsubstanzen wurden bei den Messungen direkt auf dünne Deckgläser aufgebracht, die gelösten Reinsubstanzen in Glaskapillaren aufgezogen vermessen.

Substanz	Produktbezeichnung	Lösungsmittel	pH-Wert	Bemerkung
Kollagen I	C-9879	ungel.	—	bovine achilles tendon
Kollagen II	C-8886	ungel.	—	bovine tracheal cartilage
Kollagen VIII	C7774	ungel.	—	human placenta
Elastin	E-1625	TRIS	7,2	
Riboflavin	R9504	HEPES	7,2	
FMN	F8399	HEPES	7,2	
FAD	F-8384	HEPES	7,2	
		TRIS	7,2	
		PBS	7,4	
		TRIS	8-6,8	
		HEPES	8-6,8	
$\alpha$ -Lipoprotein	L-5277	unverd.	7,4	human plasma
PPIX	P8293	Chlorophorm	—	Messungen jeweils vor und nach 30-minütiger Bestrahlung mit einer Xenon-Weißlichtquelle (D-Light, Karl Storz Tuttlingen)
		Methanol	—	

Tabelle 4.1: Die untersuchten Reinsubstanzen endogener Gewebefluorophore. Neben den Produktbezeichnungen des Herstellers sind in der Tabelle die Messbedingungen wie Lösungsmittel und pH-Wert aufgeführt.

### 4.2.2 Exogene Fluorophore: Kationische Liposomkonjugate mit Rhodamin

Liposomen, kolloidale Vesikel aus Lipiden oder Phospholipiden, werden in der Tumordiagnostik und -therapie seit den 70-er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts eingesetzt ([Las98b]). Im Unterschied zu Tumormarkern und Photosensibilisatoren wie Porphyrinen oder Phtalocyaninen sind sie selbst weder photosensibilisierend noch zytotoxisch und weisen auch keine besonderen Fluoreszenz- oder sonstigen Eigenschaften auf, über die sich ihre Lokalisation detektieren läßt. Sie lassen sich jedoch als Transporter für Tumormarker und Wirkstoffe mit solchen diagnostisch und therapeutisch relevanten Eigenschaften nutzen. Die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Liposomen sind darin begründet, dass nach dem Baukastenprinzip die Zusammensetzung der Liposomen aus Lipiden mit unterschiedlichen Eigenschaften sowie Makern und Wirkstoffen variiert werden kann. Auf diese Weise ist es möglich, die Liposomen auf die gewünschte Wirkung hin zu optimieren ([Las98a], [Jan99]):

- Eine spezifische Gewebelokalisation kann einerseits durch die Wahl der Lipidkomponenten selbst erreicht werden. Insbesondere bei kationischen Liposomen wurden derartige spezifische Bindungseigenschaften festgestellt (siehe unten). Andererseits lässt sich die spezifische Gewebelokalisation auch durch eine Ankoppelung von Liganden an die Lipide erzielen, indem Liganden mit grosser Bindungsaffinität für die Zielzellen verwendet werden.
- Liegt eine spezifische Gewebelokalisation der Liposomen vor, so kann diese mit Fluoreszenzfarbstoffen oder anderen Markern, zum Beispiel für die Magnetresonanztomographie, diagnostisch genutzt werden. Die Markermoleküle lassen sich innerhalb des Lipidvesikels einschließen oder auch direkt an die Lipide angekoppeln ([Luc02], [Mor98]).
- Bei der therapeutischen Verwendung dienen Liposomen als Transporter der an Stelle eines diagnostischen Markers eingeschlossenen oder angekoppelten Wirksubstanzen ([Gre88]). Die Freigabe des Wirkstoffes kann durch die Verschmelzung der Zielzellmembran mit der Lipidmembran erfolgen. Lipidphasenveränderungen von einer quasikristallinen zu einer eher fluiden Form der Liposomstruktur nach Bindung der Liposomen an die Zielzellen erleichtern ebenso die Wirkstofffreigabe. Auch durch Endozytose werden Liposomvesikel von Zellen aufgenommen, wodurch ein gezielter Transport in Zielzellen möglich ist.

Kationische Liposomkonjugate, die ursprünglich als Transporter für DNA-Plasmide in der Gentherapie entwickelt wurden ([Las96], [Beh94], [Por97], [McL96], [Per01]), bieten für die Tumordiagnostik und -therapie eine vielversprechende Eigenschaft: Sie binden spezifisch an angiogene Endothelzellen ([McL97], [Thu98], [McL99]). Die Neovaskularisation ist für das Tumorstadium von großer Bedeutung, da Tumore ohne die Blutversorgung durch ein eigenes Tumorgefäßsystem nicht wesentlich größer als einige Millimeter werden können ([Gim74], [Fol74]). Für die Diagnostik sind daher kationische Liposomen aufgrund der spezifischen Bindung an Zellen des bereits

zu einem frühen Zeitpunkt des Tumorwachstums entstehenden Gefäßsystems interessant. Neben dem diagnostischen Einsatz kann durch Beladung der Liposomen mit zytotoxischen Wirkstoffen durch gezielte Unterbrechung der Nährstoffversorgung das Tumorwachstum gehemmt werden. Dieser therapeutische Ansatz unterscheidet sich grundlegend von der direkten Zerstörung der Tumorzellen selbst, die in vielen Fällen durch eingeschränkten Transport von Wirkstoffen zum Tumor und Aufnahme durch Tumorzellen behindert ist ([Jai94]).

Für die Entwicklung eines in der Tumordiagnostik und -therapie einsetzbaren kationischen Liposomkonjugats wurde von Munich Biotechnology (MBT, Martinsried) eine Reihe von Liposomformulierungen synthetisiert. In unterschiedlichen Anteilen setzen sich diese Formulierungen aus dem kationischen Lipid 1,2 Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan (DOTAP), den neutralen beziehungsweise zwitterionischen Lipiden 1,2 Dioleoyl-*sn*-Glycero-Phosphoethanolamin (DOPE) oder 1,2 Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC) sowie einem DOPE entsprechenden Lipid mit an der Kopfgruppe verankertem Lissamin-Rhodamin B (N-Rh-PE) als Fluoreszenzmarker zusammen (alle Lipide von Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster AL). Die Strukturformeln der vier verwendeten Lipide sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

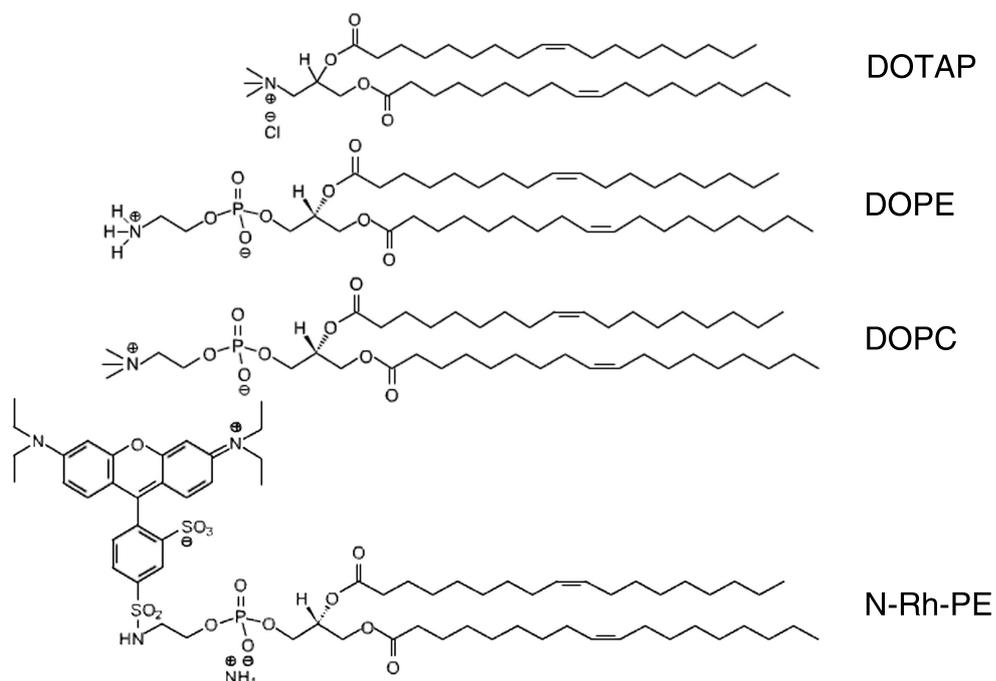


Abbildung 4.2: Strukturformeln der kationischen (DOTAP) neutralen (DOPE und DOPC) und der Lipidkomponente N-Rh-PE mit an die Kopfgruppe angekoppeltem Lissamin-Rhodamin B (nach Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster AL)

Die Liposomen mit einem Gesamtlipidgehalt von 10 mM wurden aus den Lipidkomponenten nach der Lipidfilmmethode synthetisiert und einer Folge mehrerer Extrusionszyklen unterzogen - ein Standardverfahren zur Herstellung grosser unilamellarer Vesikel ([Ols79]). Der Porendurchmesser der bei der Extrusion verwendeten Polycarbonatmembran (Osmonics, Minnetoka) von 100 nm führte zu einem mittleren Durchmesser der resultierenden großen unilamellaren Vesikel von 150 nm. Die fertigen Suspensionen wurden unter Argonatmosphäre bei 4°C gelagert, vor der Anwendung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und vorsichtig invertiert.

Mit zeitaufgelösten in-vitro-Messungen sollten die Fluoreszenzabklingeigenschaften der Liposomkonjugate bestimmt werden und Einflüsse veränderter Bedingungen, die bei einer in-vivo-Anwendung auftreten können, charakterisiert werden:

- Was sind die Fluoreszenzabklingzeiten der Liposomkonjugate? Zeigen sich Unterschiede entsprechend ihrer Zusammensetzung?
- Hat die Rhodaminkonzentration einen Einfluss?
- Verändert eine Zerstörung der Liposomstruktur die Abklingzeiten?
- Gibt es eine Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzabklingzeiten?

Acht Liposomformulierungen mit unterschiedlichen Anteilen des kationischen Lipids von 30 - 96 mol% und 4 - 6 mol% des Rhodaminlipids wurden für die Charakterisierung des Abklingverhaltens ausgewählt. Die Liposomformulierungen werden im Folgenden mit A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, E, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, G und H bezeichnet. Aufschluss über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sollte dabei die Vermessung von Suspensionen mit gleicher Liposomformulierung, jedoch aus unterschiedlichen Synthesen geben (A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> und F<sub>1</sub>/F<sub>2</sub>).

Die Fluoreszenzspektren der Formulierungen zeigen das für Rhodamin typische Profil mit einem Maximum um 610 nm, das Absorptionsmaximum liegt bei 572 nm (siehe Abbildung 4.3). Wegen der Breite der Rhodaminabsorptionsbande läßt sich die Fluoreszenz bei den Wellenlängen der Linien des Argon-Ionen-Lasers trotz des großen Abstands zum Absorptionsmaximum anregen. Wegen der hohen zur Verfügung stehenden Leistung kam bei den Messungen die Emissionlinie bei 514 nm zum Einsatz. Bei allen Messungen betrug die Modulationsfrequenz des Anregungslichts 100 MHz, die Separation der Fluoreszenz vom Anregungslicht erfolgte unter Verwendung eines Langpassfilters dessen 50%-Transmissionspunkt bei 575 nm lag (Abbildung 4.3).

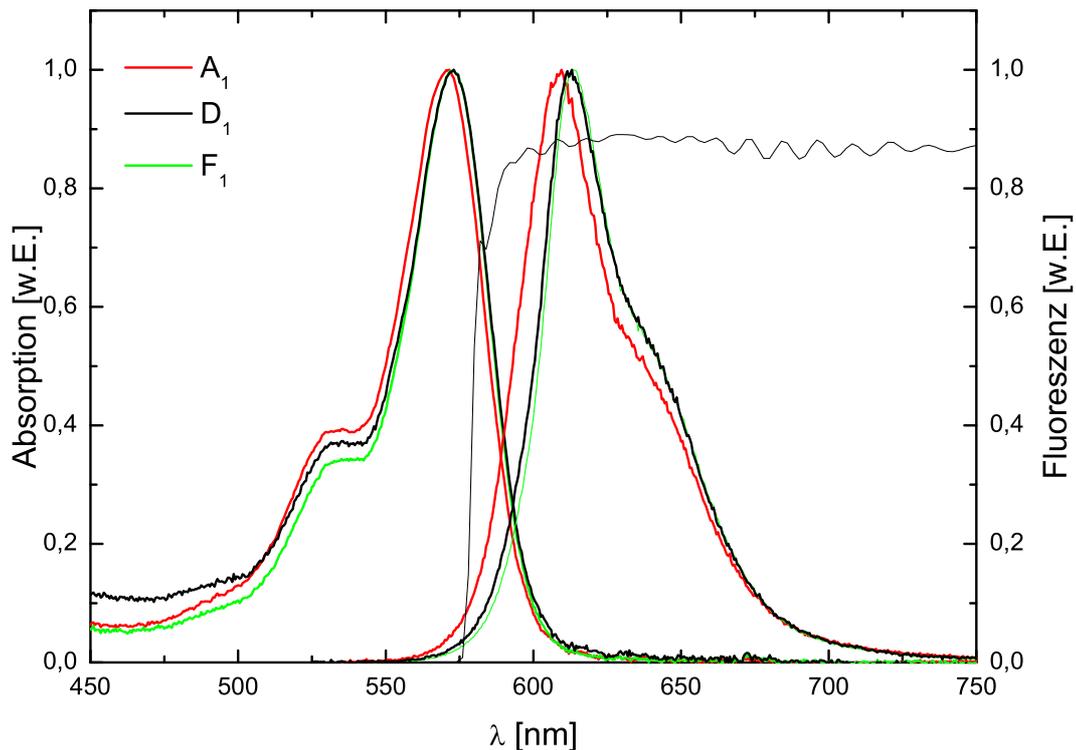


Abbildung 4.3: Absorptions- und Emissionsspektren ( $\lambda_{Ex} = 514 \text{ nm}$ ) der unverdünnten Suspensionen dreier Liposomformulierungen. Zusätzlich zu den Spektren ist die Transmissionscharakteristik des verwendeten Beobachtungsfilters angegeben.

Die Messungen wurden nach der Standardmethode in Kapillaren auf einem Objektträger durchgeführt an:

- allen Liposomformulierungen in der unverdünnten Originalsuspension mit 10 mM Gesamtlipid in 5%-iger Glukoselösung,
- der Lipidkomponente N-Rh-PE mit Rhodamin in Chlorophorm bei Konzentrationen von 0,78 mM, 0,5 mM, 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$ ,
- den Formulierungen A<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> und F<sub>1</sub> nach einer Erwärmung auf 40°C sowie nach anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur,
- den Formulierungen A<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> und F<sub>1</sub> sofort und 60 Minuten nach Beimischung von Methanol (reinst, Merck) im Volumenverhältnis von 1:1.

### 4.3 Messungen an Gefrierschnitten

Nach den grundlegenden Arbeitsschritten der Verifikation der Messmethode an einfachen Modellsystemen und der Anwendung auf endogene und exogene Fluorophore bedeutet dieser Teil der Experimente den ersten Schritt hin zur diagnostischen Anwendung der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion durch Messungen an Gefrierschnitten von Gewebebiopsien. Während der Einsatz konventioneller, nicht zeitaufgelöster Fluoreszenzmethoden heutzutage schon nahezu eine Standardmethode ist, finden sich bislang keine Veröffentlichungen über zeitaufgelöste Messungen an Gewebebiopsien in-vitro. Vor allem bei der Untersuchung der Anreicherungseigenschaften exogener oder exogen induzierter Photosensibilisatoren in dysplastischem und tumorösem Gewebe kann die Fluoreszenzmikroskopie wichtige Grundlagen für den Einsatz der Fluoreszenzdiagnostik (Photodynamische Diagnostik, PDD) in-vivo liefern, indem die Lokalisation und die spezifische Anreicherung des Sensibilisators in den Gewebestrukturen erfasst werden kann. In dieser Arbeit wurde das untersuchte Biopsiematerial so gewählt, dass neben den nativen Fluorophoren der Gewebeautofluoreszenz auch ein in der PDD wichtiger Photosensibilisator (Protoporphyrin IX, PPIX) vorliegt: Das Biopsiematerial wurde im Rahmen einer Europäischen Verbundstudie BIOMED II gewonnen, die das diagnostische Potential der Fluoreszenzdiagnostik bei der Früherkennung des Zervixkarzinoms zum Inhalt hatte.

Die Entscheidung, das Messsystem zunächst als Mikroskopsystem zu realisieren wurde durch die auf diese Weise gegebene Möglichkeit mitbestimmt, tieferen Einblick in die Verteilung von Fluoreszenzabklingzeiten endogener und exogener Fluorophore in Gewebe zu erhalten. Der zweite wichtige Aspekt dieser Vorgehensweise ist der direkte Vergleich der Fluoreszenzabklingzeitbilder der Gefrierschnitte mit Ergebnissen der histo-pathologischen Untersuchung paralleler Gewebeschnitte: Dies eröffnet die Möglichkeit, das Ausmaß einer Korrelation der Abklingzeitinformationen mit pathologischen Veränderungen auf der Basis der Gewebehistologie zu bestimmen. Ein besonderer Vorteil der Messung an Gewebeschnitten ist, dass in der Regel viele im Wesentlichen identische Parallelschnitte angefertigt werden können. So lassen sich im Labor die Untersuchungen mit veränderten Messparametern (Anregungswellenlänge, spektraler Detektionsbereich der Fluoreszenz) wiederholt durchführen - eine Möglichkeit, die bei Untersuchungen am Patienten im klinischen Alltag nur in geringem Maße gegeben ist. Aus einer einzigen Biopsie können auf diese Weise viele Informationen gewonnen werden, die für eine spätere in-vivo-Anwendung der Messmethode eine Optimierung der Messparameter ermöglichen.

**Die Zervikale intraepitheliale Neoplasie** Die Erkennung dysplastischer Veränderungen des Plattenepithels oder metaplastischen Epithels des oberflächlichen Bereichs der Zervix Uteri spielt für die Früherkennung des Zervixkarzinoms eine ausgesprochen wichtige Rolle, da ohne Therapie dieser zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) mit einer Progression zum invasiven Zervixkarzinom in bis zu 70 % der Fälle (abhängig vom Schweregrad der Dysplasie) zu rechnen ist ([Hil97]). In Bezug

auf Ätiologie und Inzidenz des Zervixkarzinoms und seiner präkanzerösen Vorstufen, sowie die diagnostischen und therapeutischen Verfahren sei hier auf andere Arbeiten verwiesen ([Hil00a], [Wei99], [And03]). Im Folgenden soll in erster Linie auf die histologischen Gegebenheiten eingegangen werden, die im Rahmen dieser Arbeit bei der Untersuchung von Gefrierschnitten eine Rolle spielen.

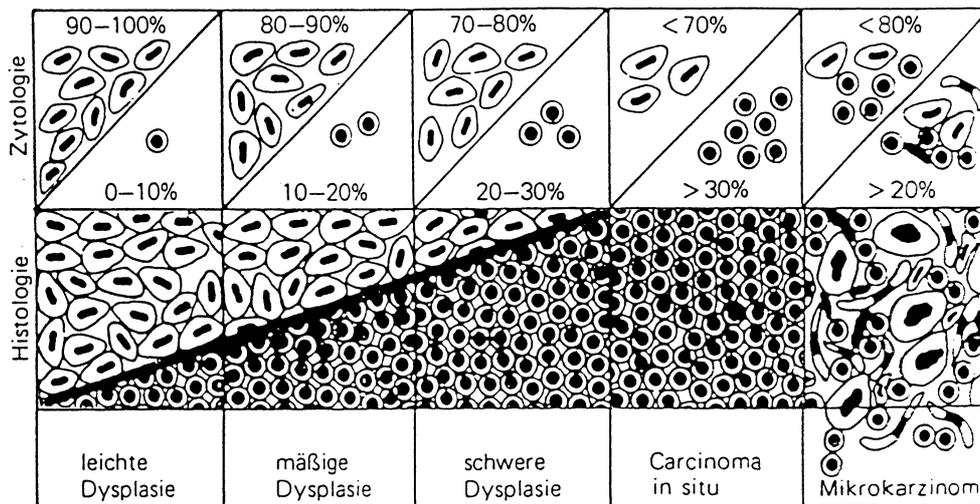


Abbildung 4.4: Das Ausmaß atypischer Veränderungen, nach denen die Einteilung in leichte (CIN1), mässige (CIN2) und schwere (CIN3) Dysplasie sowie Carcinoma in situ und Mikrokarzinom nach Richart erfolgt ([Ric76]).

Morphologisch ist die zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert als Reifungsstörung des Plattenepithels mit Kernanomalien wie Polaritätsverlust, Pleomorphie, Chromatinverklumpung, irreguläre Kernmembran und Mitosen einschließlich atypischer Formen. Die am Klinikum Großhadern verwendete Einteilung der zervikalen intraepithelialen Neoplasien nach Richart ([Ric76]) unterscheidet drei Schweregrade, die durch die Ausbreitung und Schwere der atypischen Veränderungen im Epithel definiert werden.

- **leichte Dysplasie CIN1:** Es finden sich mässiggradige vergrößerte atypische Kerne im unteren Drittel der Epithelschicht mit einzelnen Mitosen. In den oberen zwei Dritteln ist die normale Epithelschichtung erhalten.
- **mässige Dysplasie CIN2:** Kernatypien liegen in bis zu zwei Dritteln der Epithelschicht mit vermehrten Mitosen vor.
- **schwere Dysplasie CIN3:** Das atypische Plattenepithel mit aufgehobener Schichtung und vielen Mitosen erstreckt sich bis in das obere Drittel des Epithels.

Anders als beim Carcinoma in situ, das alle Merkmale eines Karzinoms aufweist, zeigen bei diesen Dysplasien die oberen Epithelschichten noch weitgehend eine Differenzierung der Zellen. Bei allen drei Schweregraden der Dysplasie und auch beim Carcinoma in situ bleibt die Basalmembran des Epithels intakt, was bei einem Mikrokarzinom nicht der Fall ist.

Gerade die unterschiedliche morphologische Begrenzung der dysplastischen Veränderungen auf Teilbereiche des Epithels ist einer der wichtigsten Aspekte bei der Untersuchung der Fluoreszenzabklingzeiten der Gefrierbiopsate. Die Anfertigung von Gefrierschnitten, die senkrecht zur Epithelschichtung orientiert sind, macht diese Schichtung und die morphologischen Unterschiede der Neoplasien unterschiedlichen Grades in der mikroskopischen Untersuchung zugänglich.

**5-Aminolävulinsäure-induziertes Protoporphyrin IX** Photodynamische Diagnostik (PDD) und Therapie (PDT) machen sich selektive Anreicherungseigenschaften geeigneter fluoreszenzierender und im Falle der Therapie phototoxische Wirkungen zeigender Farbstoffe (Photosensibilisatoren) in malignem oder prämaligmem Gewebe zu Nutze. Anders als die meisten Photosensibilisatoren ist die körpereigene 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) selbst nicht fluoreszierend oder phototoxisch. Sie wird bei Säugern im ersten Schritt der Hämbiosynthese in den Mitochondrien durch die Kondensation von Glycin mit Succinyl-CoA gebildet. Dieser Schritt der Hämbiosynthese unterliegt einer Feedbackhemmung durch das Endprodukt Häm, da die Synthese von 5-ALA von dem Enzym Aminolävulinat-Synthase katalysiert wird, dessen Bildung Häm inhibiert ([Ken90]). Auf diese Weise wird in den Zellen nur soviel 5-ALA synthetisiert, wie Häm benötigt wird. Der eigentliche Photosensibilisator, das zyklische Tetrapyrrol Protoporphyrin IX (PPIX), wird aus 5-ALA über weitere enzymatisch katalysierte Zwischenschritte gebildet, bei denen eine Kondensation zu einem Pyrrolring und Umlagerungen der Seitenketten erfolgen. Durch den enzymatisch durch Ferrochelatase katalysierten Einbau eines Eisenions in die zentrale Position des PPIX-Rings entsteht Häm.

Durch eine exogene Gabe von 5-ALA lässt sich die Feedbackhemmung bei der Bildung von 5-ALA umgehen. Erst dadurch kann eine ausreichend hohe zelluläre Konzentration von PPIX induziert und die photodynamische Diagnostik oder Therapie ermöglicht werden. Als mögliche Ursachen einer tumorselektiven Anreicherung von 5-ALA-induziertem PPIX werden neben einer erhöhten Membranpermeabilität ([Ken90], [Pen97a], [Pen97b]) oder auch aktiver 5-ALA-Aufnahme ([Abe97a], [Fri97]) vor allem veränderte Enzymaktivitäten in Tumorzellen verantwortlich gemacht. Die wichtigste Rolle wird dabei einer im Vergleich zum Normalgewebe verminderten Aktivität der Ferrochelatase und somit einer geringeren Umsetzung von PPIX in Häm zugeschrieben ([Sch87], [VH92]).

**Biopsiegewinnung und -präparation** Die untersuchten Biopsien stammen von Patientinnen, bei denen infolge einer Vorsorgeuntersuchung ein auffälliger zytologischer Befund festgestellt und eine photodynamische Diagnostik nach topischer Applikation von 5-ALA durchgeführt wurde (zum Ablauf der Applikation und der PDD siehe [Wei99]). Es wurden bei 8 Patientinnen<sup>1</sup> insgesamt 18 Biopsien (vor allem aus dem Bereich der Transformationszone) der Portio Uteri entnommen und sofort nach Entnahme, eingebettet in ein Medium (Tissue Tek, Miles Inc., Elkhart, IN, U.S.A.), mit flüssigem Stickstoff eingeforen. Bis zur Präparation der Gefrierschnitte wurden die Biopsien im Dunklen bei -23 °C gelagert. Für die mikroskopische Untersuchung wurden aus den Biopsien mehrere Serien von einem 5  $\mu\text{m}$  und drei 20  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten angefertigt. Dabei erfolgte die Schnittführung soweit möglich senkrecht zur Epitheloberfläche durch die natürliche Gewebeschichtung. Die 5  $\mu\text{m}$  dicken Schnitte auf Standardobjektträgern (...) wurden einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) für die histo-pathologische Begutachtung unterzogen. Die 20  $\mu\text{m}$  dicken Schnitte für die Fluoreszenzuntersuchungen wurden auf 0,7 mm dicken Deckgläsern aufgebracht, um bei den Messungen die durch das Glasmaterial hervorgerufene Hintergrundfluoreszenz zu minimieren. Bis zur Fluoreszenzuntersuchung mit dem Messsystem wurden die Schnitte in Dunkelheit bei -23 °C gelagert.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Gefrierschnitte wurde in zwei Messserien durchgeführt:

Bei der ersten Messserie wurde der Laser-AOM-Anregungsarm des Messsystems bei einer Anregungslichtwellenlänge von 456,9 nm und einer Modulationsfrequenz von 40 MHz verwendet. Die zweite Messserie an frischen Parallelschnitten wurde ebenfalls mit einer Modulationsfrequenz von 40 MHz mit dem Diodenlaseraufbau bei der Anregungswellenlänge von 396 nm durchgeführt. Bei den beiden Messserien wurden die 18 Gefrierschnitte von ungefähr 3-5 mm Durchmesser an 5 bis 20 Ausschnitten vermessen, um die relevanten Bereiche der Biopsien abzudecken. Bei jeder Ausschnittsmessung wurden drei Messungen mit unterschiedlichen spektralen Detektionsfenstern in Folge durchgeführt:

- $500 \text{ nm} < \lambda$  : gesamter Emissionsbereich
- $500 \text{ nm} < \lambda < 590 \text{ nm}$  : grünes Detektionsfenster
- $610 \text{ nm} < \lambda$  : rotes Detektionsfenster

---

<sup>1</sup> Alter: 22 - 54 Jahre; Mittelwert: 31; Median: 28.

### 4.4 In-vivo-Messungen mit Rhodamin-Liposomen am Hamstermodell

Ein etabliertes in-vivo-Modell für die Untersuchung der Mikrozirkulation und Neovaskularisation von Tumoren ist das Hamster-Rückenhautkammer-Modell ([End80], [Asa81], [Goe88]). In der Rückenhaut von Hamstern wird dabei durch die Inokulation von Tumorzellen ein Tumor induziert. Der Tumor und das umgebende Normalgewebe sind durch eine zweiteilige Titanklammer fixiert und können durch ein in die Klammer eingesetztes Glasfenster untersucht werden. Das Modell lässt sich ebenso für die Untersuchung der Wirksamkeit von Tumormarkern und Photosensibilisatoren einsetzen ([Abe84], [Fey91], [Del95], [Abe97b]). Dieses Tiermodell wurde am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (ICF) verwendet, um die Eignung kationischer Liposomkonjugate für die in-vivo-Tumordiagnostik zu untersuchen. In der Vielzahl der untersuchten Liposomenformulierungen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung, die auch neutrale und anionische Formulierungen umfassten, zeigten kationische Formulierungen die besten Ergebnisse hinsichtlich der Demarkierung des Tumorareals gegen das umliegende Normalgewebe ([Kra03]).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit MBT und dem ICF zeitaufgelöste Fluoreszenzuntersuchungen der in-vivo Anwendung kationischer Liposomkonjugate im Rückenhamstermodell des Hamsters durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden aus den Formulierungen des Abschnitts 4.2.2 drei Formulierungen mit minimaler ( $A_1$ ), mittlerer ( $D_1$ ) und maximaler ( $F_1$ ) Abklingzeit ausgewählt. Zwei Aspekte stehen bei diesen in-vivo-Messungen im Mittelpunkt des Interesses:

- Die Messungen sind die erste in-vivo-Anwendung des Messsystems. Anhand dieser Messungen sollten erste Erfahrungen mit der bildgebenden Messung von Fluoreszenzabklingzeiten an vitalem Gewebe gewonnen werden. Dabei spielt nicht nur der Umstand eine Rolle, dass das Fluoreszenzsignal sowohl von endogenen Fluorophoren als auch von den Liposomen herrührt, sondern auch die Messgeometrie: Anders als bei wenige  $\mu\text{m}$  dicken histologischen Präparaten, die normal zur Gewebeoberfläche angefertigt werden, rührt hier die Fluoreszenz aus solidem Gewebe mit seiner natürlichen Schichtung her.
- Der andere Aspekt der Messungen umfasst die Informationen, die anhand der Fluoreszenzabklingzeiten gewonnen werden können. Anhand grundlegender Messungen sollte eine Abschätzung geliefert werden, welche Effekte sich in den Fluoreszenzabklingzeiten zeigen: Ist eine Demarkierung der Tumorgrenzen anhand der Fluoreszenzabklingzeiten kationischer Liposomkonjugate möglich? Lassen sich in-vivo zeitabhängige Veränderungen der Fluoreszenzabklingzeiten erkennen, die auf eine Veränderung der Liposomstruktur hindeuten?

Die Präparation der Hamster wurde am Institut für Chirurgische Forschung nach einem Standardprotokoll durchgeführt (siehe [Kra03]). Männlichen syrischen Goldhamster mit 40-50 g Körpergewicht (KG) wurde unter Narkose die Rückenhautkammer aus Titan chirurgisch implantiert ([End80], [Asa81]) und darauf den Tieren eine mindestens 24-stündige Erholungsphase vom chirurgischen Eingriff gegeben. Die subkutane Inokulation mit 2  $\mu\text{l}$  einer Tumorzellsuspension ( $\approx 2 * 10^5$  Zellen) des amelanotischen Hamstermelanoms A-Mel-3 erfolgte an Präparationen, die mikroskopisch eine intakte Mikrozirkulation in der Kammer aufwiesen. Nach 6-7 Tagen Tumorstadium hatten sich bei den Hamstern Tumoren von 4-5 mm Durchmesser mit einer funktionalen Tumormikrozirkulation ausgebildet, zum Zeitpunkt der Liposomverabreichung (Tag 6-8 nach Inokulation) betrug das Tumolvolumen etwa 150  $\text{mm}^3$ . Für die intravenöse Verabreichung der Liposomen wurde 24 Stunden vor Applikation unter Narkose ein Polyethylen-Katheter in die rechte Halsvene implantiert.

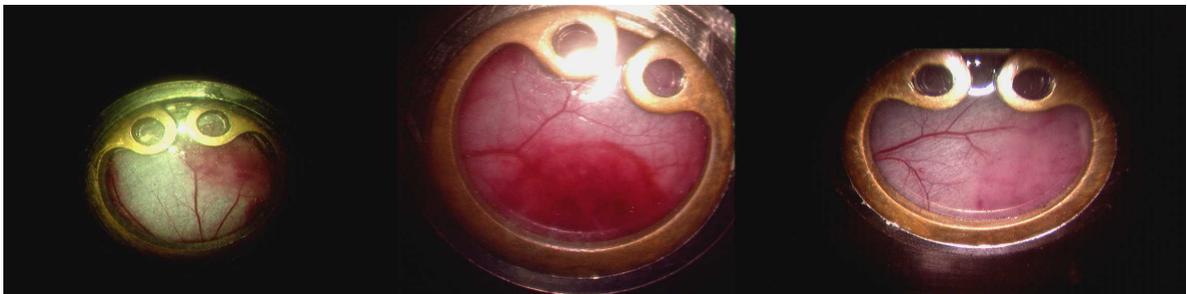


Abbildung 4.5: Weißlichtaufnahme der Rückenhautkammern der Hamster H1 (links), H3 (Mitte) und H4 (rechts). Durch das Sichtfenster der Kammern sind die sich rötlich abzeichnenden Tumoren mit ihrem Gefäßsystem sowie das umliegende hellere Normalgewebe zu erkennen.

Vier Hamstern mit induziertem Tumor wurden drei unterschiedliche Liposomformulierungen gemäß dem Standardprotokoll der Untersuchungen am ICF injiziert (langsame Perfusion über den permanenten Venenkatheter mit ungefähr 200  $\mu\text{l/s}$ ). Die verwendeten Formulierungen waren:

- $D_1$  mit  $\langle\tau\rangle = 1,16$  ns in der Standarddosierung von 5  $\mu\text{l/g}$  KG (H1 = Hamster1)
- $F_1$  mit  $\langle\tau\rangle = 1,77$  ns in der Standarddosierung von 5  $\mu\text{l/g}$  KG (H2 = Hamster2)
- $A_1$  mit  $\langle\tau\rangle = 0,75$  ns in der Standarddosierung von 5  $\mu\text{l/g}$  KG (H3 = Hamster3)
- $D_1$  mit  $\langle\tau\rangle = 1,16$  ns in Dosierung von 1,25  $\mu\text{l/g}$  KG (H4 = Hamster4)

Die Auswahl der Liposomformulierungen erklärt sich aus den Fragestellungen, welche mit diesen Messungen angegangen werden sollten: Die kationischen Liposomformulierungen sind aufgrund ihrer im Tiermodell als am besten festgestellten Demarkation des Tumorareals für den diagnostischen Einsatz am Menschen vorgesehen. Die Messungen in der Standarddosierung (H1, H2, H3) sollen einen ersten Einblick in das Zusammenspiel der Rhodaminfluoreszenz und der Autofluoreszenz in-vivo bei den Fluoreszenzabklingzeiten geben. Eine zusätzliche Messung bei geringer Dosierung (H4) dient der Abschätzung, ob auch in diesem Fall, wenn die Rhodaminfluoreszenz deutlich verringert ist, aus den Fluoreszenzabklingzeiten diagnostisch relevante Informationen gewonnen werden können. Die Messungen mit den Liposomformulierungen, welche in-vitro die kürzeste (H3), eine mittlere (H1) und die längste (H2) Fluoreszenzabklingzeit aufwiesen, sollen einen Vergleich ermöglichen, für den Fall, dass bei der in-vivo-Applikation der kationischen Liposomformulierungen eine Veränderung der Fluoreszenzabklingzeit festgestellt wird, die durch veränderte Umgebungsbedingungen des Fluorophors hervorgerufen werden könnte.

Für die Messungen wurden die Hamster in einer Plexiglasröhre immobilisiert, die über der Mikroskopmessebene fixiert wurde. Um einen möglichst großen Bereich des Tumors und des umliegenden Normalgewebes messen zu können, kam ein 1,7-fach Mikroskopobjektiv zum Einsatz. Der aufgenommene Bildbereich umfasste ungefähr zwei Drittel des Glasfensters der Hamsterkammer. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte wie bei den in-vitro-Messungen der Originalsuspensionen mit der 514 nm Linie des Argon-Ionen-Lasers und einer Modulationsfrequenz von 100 MHz. Die Fluoreszenz wurde unter Verwendung des Langpassfilters mit der in Abbildung 4.3 angegebenen Transmissionscharakteristik detektiert.

Vor der Injektion ( $t=0$  min) wurde jeweils eine Messung der Gewebeautofluoreszenz durchgeführt. Während der Injektion der Liposomkonjugate wurden die Fluoreszenzabklingzeiten über einen Zeitraum von ungefähr 5 Minuten kontinuierlich aufgezeichnet und im weiteren Verlauf bis zu 6 Stunden nach Injektion zu 6 - 10 Zeitpunkten ( $t=10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360$  min) sowie noch einmal 24 Stunden nach Injektion gemessen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 In-vitro-Messungen an Farbstofflösungen

#### 5.1.1 Fluoreszenzabklingzeiten homogener Farbstofflösungen

Aus der Folge mehrerer Einzelbilder bei unterschiedlichen relativen Phasenlagen der Modulation des Anregungslichts und der Modulation der Kathodenspannung des Bildverstärkers resultieren für jede Einzelmessung der Serien von 10 Messungen an den homogenen Farbstofflösungen 3 Dateien. In ihnen sind für jeden Bildpunkt die während der Messung mittels numerischer harmonischer Analyse (siehe 2.23) bestimmten Messparameter  $M$ ,  $\Phi$  und mittlere Fluoreszenzintensität  $I$  gespeichert. Die Berechnung der Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  mit dem Auswertnetzwerk erfolgte aus diesen Rohdaten mit den monoexponentiellen Formeln 2.26 und 2.25. Als Referenzwerte für die Berechnung der Abklingzeiten von Rhodamin 101 wurde eine Messung des Anregungslichts zur Bestimmung der Modulationstiefe und Ausgangsphasenlage des Anregungslichts verwendet. Die Abklingzeiten der anderen homogenen Farbstofflösungen wurden dann im Folgenden für jeden Bildpunkt mit den Modulations- und Phasenwerten von Rhodamin 101 und dem Literaturwert der Fluoreszenzabklingzeit von 4,34 ns berechnet.

In Abbildung 5.1 sind die Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  für die vier Farbstoffe bei den beiden Modulationsfrequenzen von  $f = 40$  MHz und  $f = 100$  MHz aufgetragen. Die Werte ergeben sich aus einer Mittelung über alle Bildpunkte des Auswertbereichs (ROI) und alle Einzelmessungen. Dabei sind die angegebenen Fehlerbalken die Standardabweichungen dieser Mittelung. Der Auswertbereich umfasste zumeist das gesamte Bild. Lediglich in dem Fall, dass in Randbereichen des Bildes die Intensität des Anregungslichtes gering war, wurde ein kleinerer Ausschnitt des Bildes gewählt. Alle Werte für die Zeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  der vier Farbstoffe liegen nahe der Winkelhalbierenden. Die Winkelhalbierende entspricht gleichen Werten für die berechneten Werte  $\tau_\Phi$  und  $\tau_M$  und gibt den theoretischen Idealfall eines streng monoexponentiellen Fluoreszenzabklingverhaltens wieder.

Ohne Berücksichtigung der bei der Mittelung sich ergebenden Standardabweichungen sind in Tabelle 5.1 die gemittelten Abklingzeiten und Standardabweichungen in Nanosekunden auf 10 ps genau angegeben. In der Diskussion (6.1.1) der Ergebnisse der Messungen an Farbstofflösungen wird auf die Genauigkeit eingegangen werden, mit welcher Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  mit dem Messsystem bestimmt werden können.

## 5 Ergebnisse

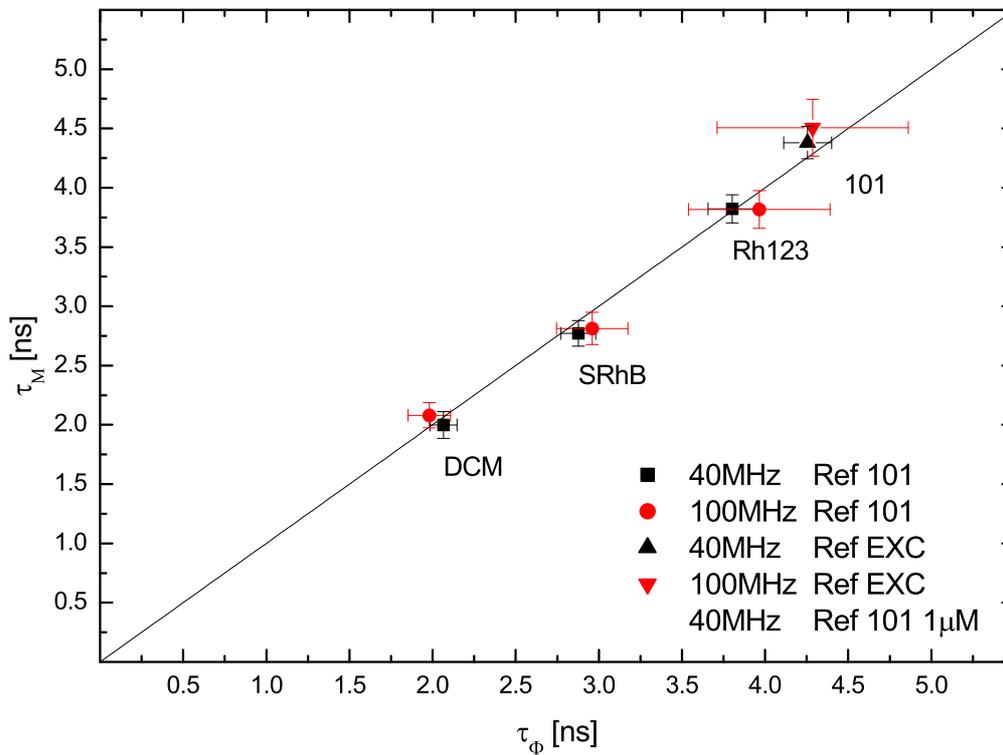


Abbildung 5.1: Unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  bestimmt mit dem Anregungslicht (EXC) oder Rhodamin 101 als Referenz. Die angegebenen Fehler sind die Standardabweichungen der Abklingzeiten in den Auswerte-ROIs über die Serien von jeweils 10 Einzelmessungen.

	$\tau_M$	$\tau_\Phi$	$\sigma(\tau_M)$	$\sigma(\tau_\Phi)$	Frequenz	Konz
Rhodamin101	4,38	4,25	0,14	0,14	40	20 $\mu$ M
	4,50	4,29	0,24	0,57	100	
Rhodamin123	3,80	3,82	0,12	0,14	40	
	3,82	3,96	0,14	0,21	100	
Sulforhodamin B	2,88	2,77	0,11	0,11	40	
	2,96	2,81	0,14	0,21	100	
DCM	2,06	2,00	0,11	0,10	40	
	1,98	2,08	0,11	0,13	100	

Tabelle 5.1: Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzabklingzeiten der vier homogenen Farbstofflösungen in den Auswerte-ROIs bei der Serie aus 10 Einzelmessungen.

**Auflösbarkeit von Fluoreszenzlebensdauerunterschieden** Zusätzlich zur Standardabweichung der Mittelwerte soll noch ein genauere Blick auf die Verteilung der Demodulations- und Phasenabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  einer Einzelmessung geworfen werden: In Abbildung 5.2 sind die Histogramme der Verteilungen der berechneten Abklingzeiten im gesamten Bild der Messung an Rhodamin 101 in 1  $\mu\text{M}$  Lösung in Ethanol bei einer Modulationsfrequenz von 40 MHz aufgetragen.

Die Werte für  $\tau_\Phi$  liegen um den Mittelwert von 4,3 ns im Bereich von circa 4,0 ns bis 4,7 ns. Eine Kurvenanpassung einer gaußförmigen Verteilungsfunktion (durchgezogene rote Linien in Abbildung 5.2) liefert als volle Halbwertsbreite der Verteilung 190 ps. Etwas enger ist die Verteilung der Abklingzeit  $\tau_M$ . Die Werte erstrecken sich von circa 4,1 ns bis 4,6 ns, die Kurvenanpassung ergibt in diesem Fall eine Halbwertsbreite von 160 ps.

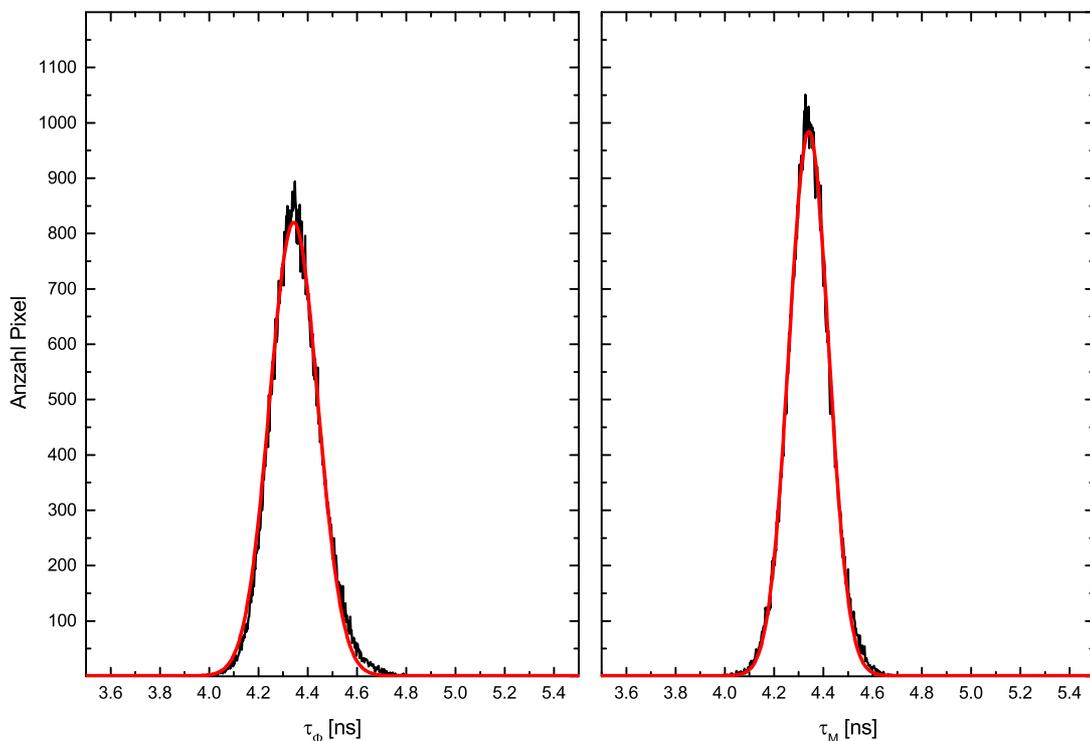


Abbildung 5.2: Histogramme der Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_\Phi$  und  $\tau_M$  einer Einzelmessung von Rhodamin 101. An die Daten wurde jeweils eine gaußförmige Verteilungsfunktion angepasst (rote Kurven). Die vollen Halbwertsbreiten dieser Verteilungen betragen 190 ps für  $\tau_\Phi$  und 160 ps für  $\tau_M$ .

**Visualisierung von Fluoreszenzlebensdauerunterschieden** Neben der Bestimmung von Mittelwerten der Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  wird mit dem Auswertemodul auch die Visualisierung der Abklingzeiten in Falschfarbendarstellung erstellt. Abbildung 5.3 zeigt die Darstellungen der gleichzeitigen Vermessung der vier Farbstofflösungen in einzelnen Glaskapillaren mit dem 2,5x-Mikroskopobjektiv. Bereiche im Bild mit Intensitätswerten unterhalb einer gesetzten Schwelle sind nicht dargestellt.

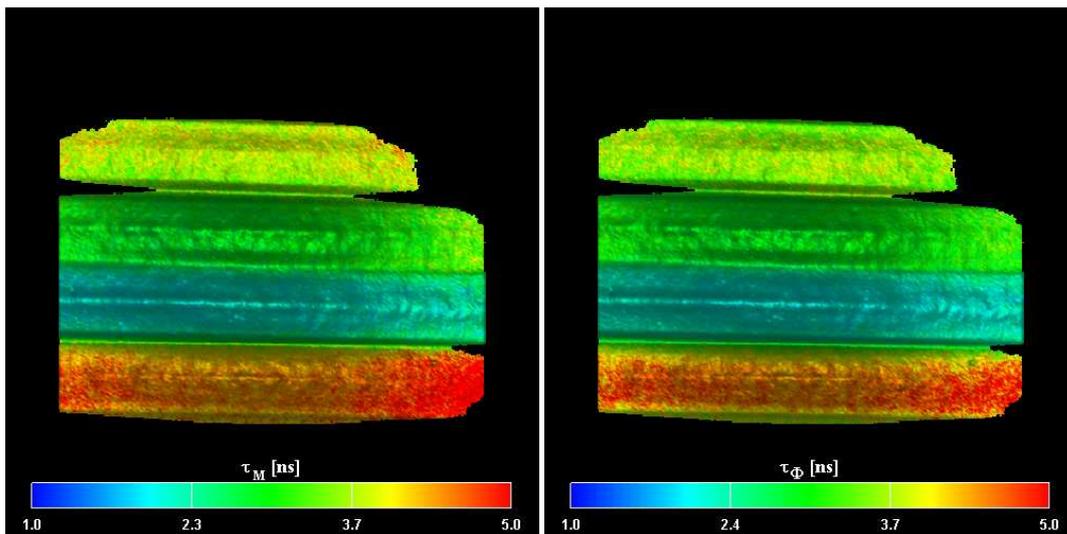


Abbildung 5.3: Dreidimensionale Falschfarbendarstellung der Abklingzeiten von Rh123 (oben), SRhB, DCM und Rh101 (unten) in 4 Glaskapillaren. Die Farbskala der Abklingzeiten geht von Blau (1 ns) bis Rot (5 ns). Durch die Darstellung als Falschfarbenhöhenprofil, bei dem die Intensität jedes Bildpunkts seine Höhe bestimmt, ist auch bei dieser Aufsicht die Intensitätsinformation erhalten.

Im Bild liegt oben Rhodamin 123, gefolgt von Sulforhodamin B, DCM sowie Rhodamin 101 als unterste Kapillare. In der Darstellung sind die Farbwerte von Blau bei 1 ns bis Rot bei 5 ns verteilt und überdecken so einen etwas weiteren Bereich, als die auftretenden Fluoreszenzabklingzeiten. Im dreidimensionalen Falschfarbendarstellung ist jede der Glaskapillaren anhand ihrer entsprechend der Abklingzeit zugeordneten Farbe von den anderen Kapillaren klar zu unterscheiden. Rhodamin 101 mit der längsten Abklingzeit von 4,34 ns erscheint rot, DCM mit der kürzesten Abklingzeit von 2,00 ns blau. Die dazwischen liegenden Abklingzeiten von Sulforhodamin B und Rhodamin 123 stellen sich in grün und einer Mischung von grün und gelb dar. Jede der vier Kapillaren erscheint insgesamt in einer homogenen Farbe, mit leichten Variationen lediglich in Bereichen geringer Intensität und somit schlechterem Signal-Rauschverhältnis.

Eine bessere Sicht auf die vorliegenden Intensitätsverhältnisse läßt sich durch eine Drehung der Reliefdarstellung im Raum erhalten, wie sie in Abbildung 5.4 dem in

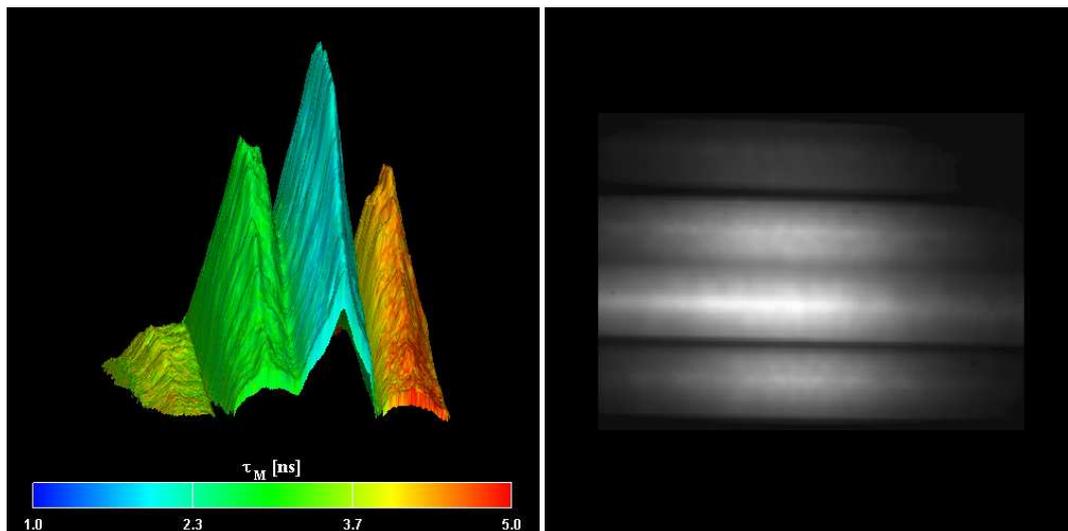


Abbildung 5.4: Durch Drehung der Aufsicht von Abbildung 5.3 lassen sich die Intensitätsverhältnisse der Messung gut darstellen (links). Zum Vergleich ist rechts das Intensitätsbild der Messung gegenübergestellt.

Grauwerten dargestellten Bild der mittleren Fluoreszenzintensität gegenübergestellt ist. Das Relief wurde für diese Darstellung so positioniert, dass die in der Aufsicht (Abbildung 5.3) links liegende Seite nun zum Betrachter hinzeigt. Die Höhe des Reliefs entspricht dem Intensitätswert des Bildpunktes, dessen Farbe durch den Wert der Abklingzeit gegeben ist. Die Intensitätsverteilung ergibt sich zum einen aus der Intensität des Anregungslichts, dessen Profil auf der Probe annähernd zentral positioniert und gaußförmig ist. Diesem Profil überlagert ist das Intensitätsprofil der einzelnen Kapillare. Es weist einen aufgrund der runden Form der Kapillaren vom Maximum in der Mitte nach außen abfallenden Verlauf aus. Das Maximum in der Mitte ist dabei noch durch auftretende Reflexe überhöht.

### 5.1.2 Scheinbare Fluoreszenzabklingzeiten heterogener Farbstofflösungen

Entsprechend der Vorgehensweise in 5.1.1 wurde auch für die heterogenen Farbstofflösungen die für jeden Bildpunkt berechneten Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  über den nahezu das gesamte Bild umfassenden Auswertebereich gemittelt. Abbildung 5.5 zeigt die Ergebnisse in Abhängigkeit des Volumenanteils von Rhodamin 101 in der Mischlösung mit DCM.

Bei den homogenen Stammlösungen mit 0 und 100 % Volumenanteil von Rhodamin 101 stimmen die beiden Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  überein. Alle Mischlösungen weisen dagegen Werte auf, die sowohl in der berechneten Abklingzeit  $\tau_M$  als auch in der Abklingzeit  $\tau_\Phi$  zwischen den Fluoreszenzabklingzeiten der reinen Lösungen liegen. Beide Abklingzeiten sind dabei umso größer, je höher der Volumenanteil von

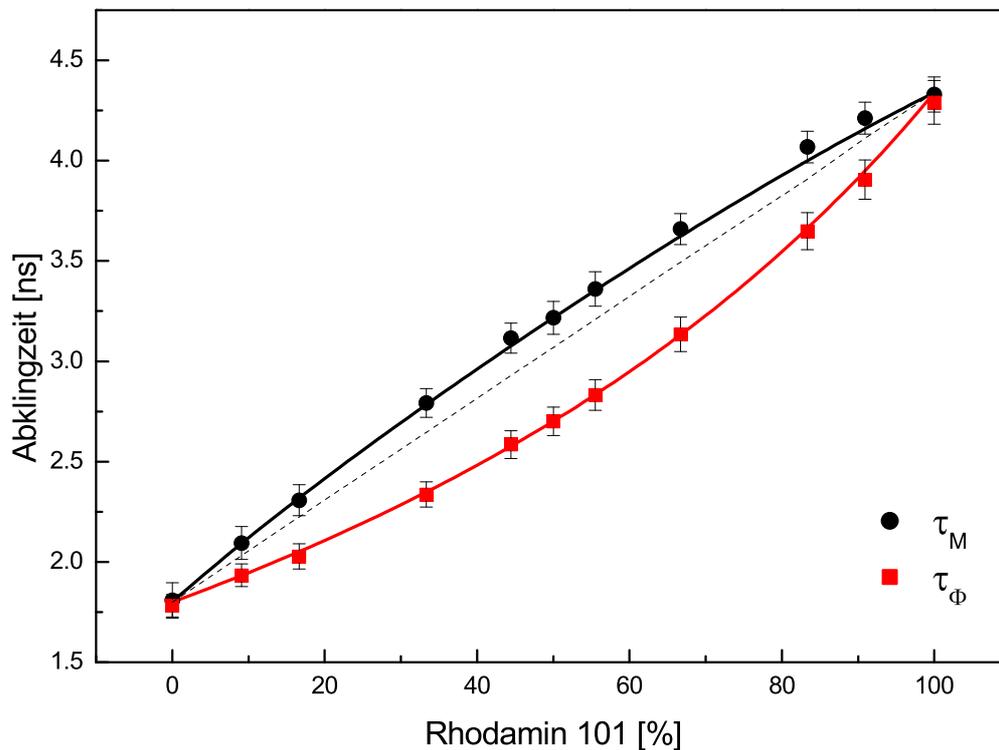


Abbildung 5.5: Durch Mischung homogener Lösungen von Rhodamin 101 und DCM in unterschiedlichen Volumenanteilen ergeben sich Unterschiede in den Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  der Mischlösung, die vom Mischungsverhältnis abhängen. Die durchgezogenen Linien sind eine Simulation der Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  einer Mischung von Lösungen mit Abklingzeiten von 4,34 ns und 1,8 ns. Die gestrichelte Linie gibt den Zusammenhang  $\tau_M = \tau_\Phi$  bei monoexponentiellem Abklingverhalten an.

Rhodamin mit der längeren Fluoreszenzabklingzeit von 4,34 ns ist. Für alle Mischungsverhältnisse ergeben sich für die aus der Demodulation berechnete Abklingzeit  $\tau_M$  größere Werte als für die aus der Phasenlage berechnete Abklingzeit  $\tau_\Phi$ . Die Unterschiede in den beiden Werten liegen im Bereich von 200 ps bei einem Volumenanteil von 9,1 % Rhodamin 101 bis zu 500 ps bei der Mischung der Stammlösungen in gleichen Volumenanteilen.

In Abbildung 5.5 ist zusätzlich zu den Mittelwerten und ihrer Standardabweichung eine an die Daten angepasste Simulationskurve eingezeichnet. Ausgehend von zwei Fluoreszenzbeiträgen mit unterschiedlichen Abklingzeiten von 4,34 ns und 1,8 ns wurden die bei einer Mischlösung zu erwartende Demodulation und Phasenverschiebung gemäß 2.16 und 2.15 berechnet. Aus diesen Werten erfolgte wie in der Auswertung der Messdaten die Bestimmung von Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  mit den monoexponentiellen Formeln 2.26 und 2.25.

## 5.2 In-vitro-Messungen endogener und exogener Fluorophore

### 5.2.1 Reinsubstanzen der endogenen Gewebefluoreszenz

Die Ergebnisse der Fluoreszenzabklingzeitmessungen von Reinsubstanzen der endogenen Gewebefluorophore sind in den Tabellen 5.2 bis 5.4 aufgeführt.

Substanz	40 MHz		100 MHz	
	$\tau_M$ [ns]	$\tau_\Phi$ [ns]	$\tau_M$ [ns]	$\tau_\Phi$ [ns]
Kollagen I	4,4	2,7	3,3	1,5
Kollagen II	4,1	2,5	3,1	1,5
Kollagen VIII	4,3	2,4	3,0	1,4
Elastin	3,8	2,7	2,9	1,8
$\alpha$ -Lipoprotein	4,1	2,0	2,9	1,1

Tabelle 5.2: Demodulations- und Phasenabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  der Strukturproteine Kollagen und Elastin, sowie des  $\alpha$ -Lipoproteins bei der Vermessung mit der Phasenbereichmethode mit Modulationsfrequenzen von 40 MHz und 100 MHz.

Die scheinbaren Abklingzeiten der endogenen Gewebefluorophore liegen im Bereich von 1,7 - 10,1 ns bei der Demodulationsabklingzeit  $\tau_M$  und 0,8 - 5,8 ns bei der Phasenabklingzeit  $\tau_\Phi$ . Bei beiden Modulationsfrequenzen weist das Lipoprotein mit die kürzesten Abklingzeiten auf, die Abklingzeiten der Strukturproteine liegen im Bereich von 3 - 6 ns, bei Protoporphyrin lassen sich mit bis zu 10,1 ns die längsten Abklingzeiten finden. Abgesehen von den Messungen der Flavine sind die scheinbaren Abklingzeiten der Reinsubstanzen bei der Modulation des Anregungslichts mit 100 MHz geringer als bei 40 MHz. Die Unterschiede betragen beim Lipoprotein und den Strukturproteinen jeweils ungefähr 1 ns, bei Protoporphyrin IX 2 ns. Starke Abhängigkeiten von den Messbedingungen (Lösungsmittel, pH-Wert) treten bei den Messungen von FAD und Protoporphyrin IX auf.

Flavin	Puffer	pH	40 MHz		100 MHz	
			$\tau_M$ [ns]	$\tau_\Phi$ [ns]	$\tau_M$ [ns]	$\tau_\Phi$ [ns]
Riboflavin	HEPES	7,2	4,5	4,3	4,4	4,5
FMN	HEPES	7,2	4,6	4,6	4,6	4,5
FAD	HEPES	7,2	1,7	1,5	1,6	1,4
FAD	TRIS	7,2	2,5	2,5	2,7	2,1
FAD	PBS	7,4	3,0	2,7	2,9	2,8
FAD	TRIS	8,0	3,6	3,3	3,5	2,6
		7,6	3,4	3,0	3,1	2,3
		7,2	2,5	2,5	2,7	2,1
		6,8	2,3	2,3	2,4	2,0
FAD	HEPES	8,0	1,4	1,3	1,6	1,3
		7,6	1,4	1,4	1,5	1,3
		7,2	1,7	1,5	1,6	1,4
		6,8	1,8	1,6	1,7	1,5

Tabelle 5.3: Demodulations- und Phasenabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  von Flavinen, gemessen mit Modulationsfrequenzen von 40 MHz und 100 MHz. Das Abklingverhalten von FAD wurde in mehreren Lösungsmitteln und bei verschiedenen pH-Werten untersucht.

Lösungsmittel	40 MHz		100 MHz	
	$\tau_M$ [ns]	$\tau_\Phi$ [ns]	$\tau_M$ [ns]	$\tau_\Phi$ [ns]
Methanol	10,1	5,8	8,7	4,0
Chlorophorm	6,1	4,6	5,7	1,7
nach Bestrahlung				
Methanol	6,6	4,4	4,1	3,8
Chlorophorm	4,6	1,5	3,3	0,8

Tabelle 5.4: Demodulations- und Phasenabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  von Protoporphyrin IX in Methanol und Chlorophorm bei Modulationsfrequenzen von 40 MHz und 100 MHz. Die oberen Werte sind die Ergebnisse der Messung an den Originallösungen. Darunter sind die Ergebnisse der Messungen nach 30-minütiger Bestrahlung mit einer Xenon-Weißlichtquelle aufgeführt.

### 5.2.2 Exogene Fluorophore: Kationische Liposomkonjugate mit Rhodamin

**Fluoreszenzabklingzeiten der Liposomkonjugate** Die Vermessung der Originalsuspensionen der Liposomkonjugate in Glaskapillaren liefert Fluoreszenzabklingzeiten, die zwischen 0,7 ns und 1,9 ns liegen. Dabei betragen die Standardabweichungen, die sich bei der Mittelwertbildung über alle Bildpunkte der Messserie ergeben, 50 - 100 ps. Bei allen Formulierungen belaufen sich die Unterschiede in den Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  auf rund 100 ps, wobei die Modulationsabklingzeit  $\tau_M$  stets die größeren Werte aufweist. Für die drei jeweils gleichen Formulierungen aus unterschiedlichen Syntheseblöcken ( $A_1/A_2$ ,  $D_1/D_2/D_3$  und  $F_1/F_2$ ) liefert die Messung Ergebnisse, die in  $\tau_M$  maximal 150 ps, in  $\tau_\Phi$  maximal 90 ps voneinander abweichen.

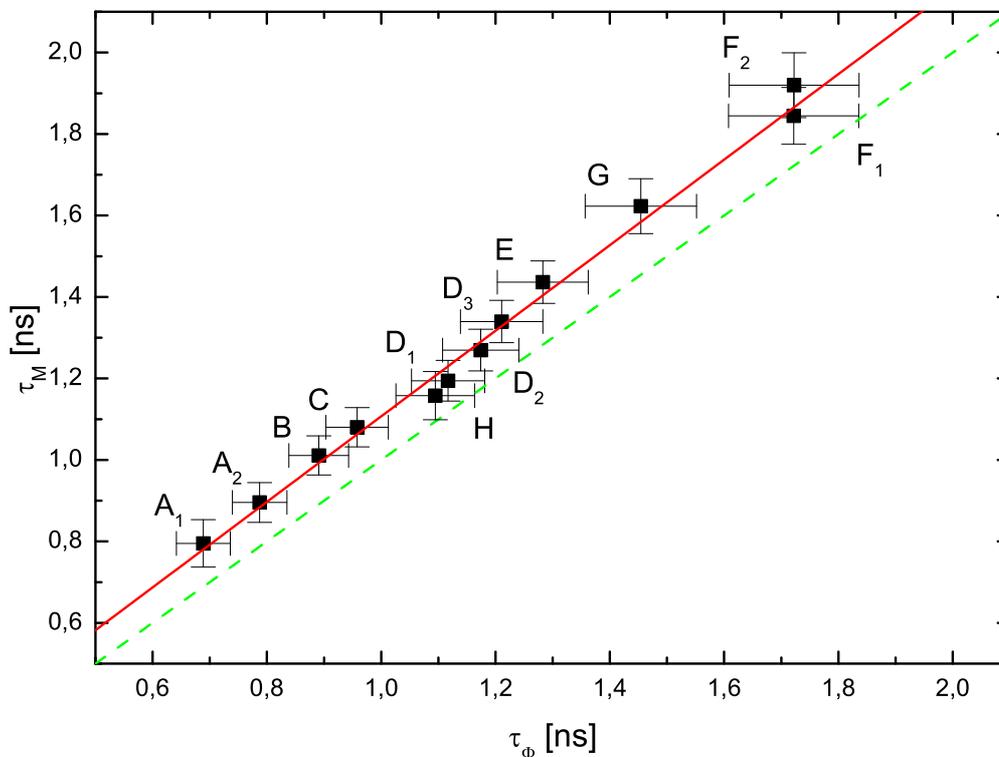


Abbildung 5.6: Fluoreszenzabklingzeiten unterschiedlicher Formulierungen kationischer Liposomkonjugate mit Lissamin-Rhodamin B. Die gestrichelte Linie gibt den bei einem streng monoexponentiellen Abklingverhalten theoretisch zu erwartenden Zusammenhang zwischen Demodulationsabklingzeit  $\tau_M$  und Phasenabklingzeit  $\tau_\Phi$  wieder. Die durchgezogene Linie ist eine Geradenanpassung an die Messdaten ( $f(x) = 0,06 + 1,05 * x$ )

Die Werte von  $\tau_M$  liegen aufgetragen gegen  $\tau_\Phi$  entlang einer Geraden die nahe der Winkelhalbierenden des Graphen verläuft, die den theoretisch zu erwartenden Zusammenhang identischer Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  bei monoexponentiellem Abklingverhalten darstellt (Abbildung 5.6). Unter Berücksichtigung einer Messgenauigkeit

des Systems von rund 200 ps sind die Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  als identisch anzusehen. Den Liposomkonjugaten ist somit ein monoexponentielles Fluoreszenzabklingverhalten zuzuschreiben. Als Fluoreszenzabklingzeit der Konjugate wird daher im Weiteren der Mittelwert  $\langle\tau\rangle = (\tau_M + \tau_\Phi)/2$  der Phasen- und Demodulationsabklingzeiten verwendet werden (Tabelle 5.5)<sup>1</sup>.

	$\tau_M$ [ns]	$\tau_\Phi$ [ns]	$\langle\tau\rangle$ [ns]
A <sub>1</sub>	0,80	0,69	0,75
A <sub>2</sub>	0,90	0,79	0,85
B	1,01	0,89	0,95
C	1,08	0,96	1,02
D <sub>1</sub>	1,19	1,12	1,16
D <sub>2</sub>	1,27	1,17	1,19
D <sub>3</sub>	1,34	1,21	1,28
E	1,44	1,28	1,36
F <sub>1</sub>	1,84	1,70	1,77
F <sub>2</sub>	1,92	1,70	1,81
G	1,62	1,50	1,56
H	1,16	1,09	1,13

Tabelle 5.5: Demodulations- und Phasenabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  der kationischen Liposomkonjugate, angegeben auf zwei Nachkommastellen. Die Abklingzeit  $\langle\tau\rangle$  ist der Mittelwert  $\langle\tau\rangle = (\tau_M + \tau_\Phi)/2$  von  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$ .

**Abhängigkeit der Abklingzeiten von der Liposomformulierung** In allen Formulierungen der Liposomkonjugate rührt die Fluoreszenz vom gleichen Fluorophor, dem Lissamin-Rhodamin B, her, das an das Phospholipid DOPE über eine Phosphatidylethanolamingruppe kovalent gebunden ist. Die Unterschiede der Liposomformulierungen liegen vor allem in den unterschiedlichen molaren Anteilen der kationischen (DOTAP) und der neutralen Lipidkomponente (DOPC beziehungsweise DOPE), während die Anteile des lipidgekoppelten Farbstoffs N-Rh-PE 4, 5 und 6 mol% betragen. Die mittleren Abklingzeiten  $\langle\tau\rangle$  der Formulierungen sind in Abbildung 5.7 gegen den molaren Anteil der neutralen Lipidkomponente der Liposomformulierung aufgetragen.

Mit steigendem Anteil der neutralen Komponenten nehmen die Fluoreszenzabklingzeiten  $\langle\tau\rangle$  der Formulierungen zu. Lediglich die Formulierung H, die mit einer Zusam-

<sup>1</sup> Die systematischen Unterschiede von ungefähr 100 ps in den Abklingzeiten (siehe Abbildung 5.6) traten allerdings reproduzierbar bei mehreren Messzyklen über einen längeren Zeitraum auf. Sie lassen sich als geringe Abweichung von einem rein monoexponentiellen Abklingverhalten interpretieren.

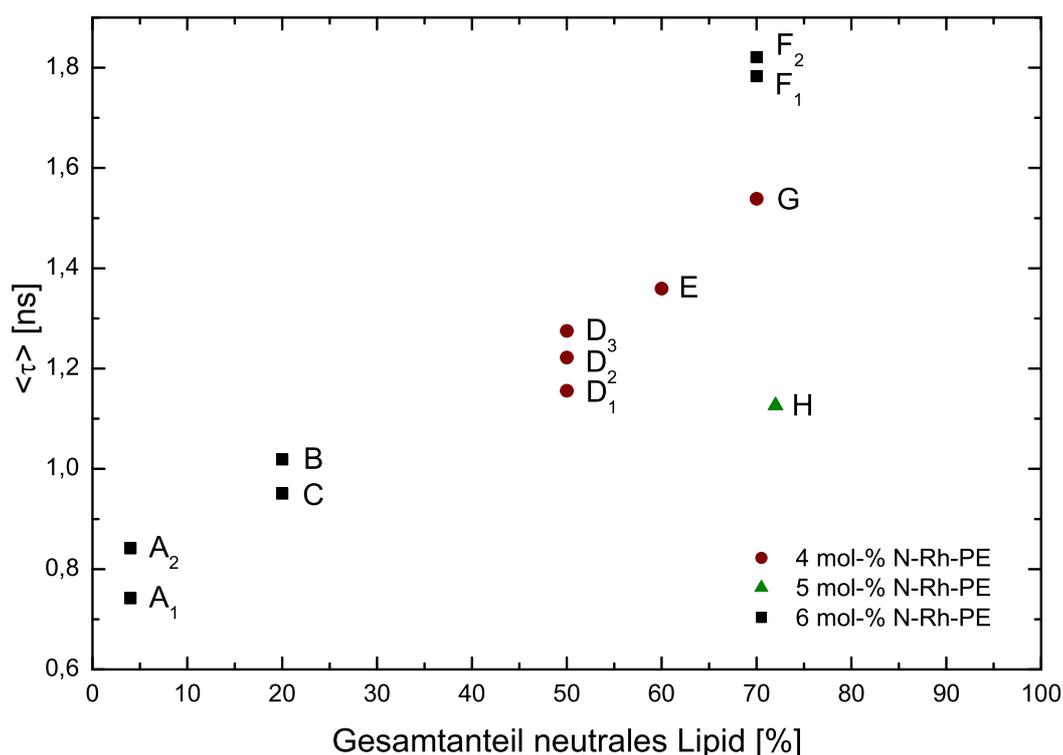


Abbildung 5.7: Abklingzeiten unterschiedlicher Formulierungen kationischer Liposomkonjugate mit Lissamin-Rhodamin B in Abhängigkeit des molaren Gesamtanteils der neutralen Lipidkomponenten DOPC (beziehungsweise DOPE) und N-Rh-PE.

mensetzung aus 30 mol% DOTAP, 64 mol% DOPC und 6 mol% N-Rh-PE einen Gesamtanteil von 70 % neutralen Lipiden hat, zeigt eine Abweichung von einem streng monotonen Anstieg der Abklingzeit mit dem neutralen Gesamtanteil. Die Abklingzeit der Formulierung H liegt mit 1,1 ns nahe den Anklingzeiten der Formulierungen mit 50 % Gesamtanteil neutraler Lipide. Der Einfluss des molaren Verhältnisses von kationischem zu neutralem Lipidanteil der Formulierungen zeigt sich (ohne Berücksichtigung der Formulierung H) in rund 100 ps längeren Abklingzeiten bei einer Erhöhung des neutralen Gesamtanteils um 10 mol%-Punkte.

Die Liposomzusammensetzung wirkt sich auf die Fluoreszenzabklingzeiten nicht nur über das Mischungsverhältnis der kationischen und neutralen Lipidkomponenten, sondern auch im absoluten Anteil der Rhodamin-Komponente N-Rh-PE aus. Bei einem identischen Anteil von 30 mol% DOTAP unterscheiden sich die Formulierungen F<sub>1</sub>/F<sub>2</sub>, G und H nur in der Zusammensetzung aus 4:66, 5:65 beziehungsweise 6:64 mol% N-Rh-PE:DOPC. Wie aus Tabelle 5.5 ersichtlich, nimmt die Abklingzeit mit zunehmendem Anteil des lipidgekoppelten Rhodamins N-Rh-PE ab. Die Abnahme der Abklingzeit beträgt bei diesen drei Formulierungen jeweils circa 300 ps bei der Veränderung von 4 auf 5 und ebenso von 5 auf 6 mol% der Liposomkomponente N-Rh-PE.

**Konzentrationsabhängigkeit der Abklingzeiten von N-Rh-PE** Eine Entkopplung der Einflüsse der Rhodaminkonzentration von den Einflüssen des Mischungsverhältnisses von kationischen und neutralen Lipidkomponenten auf die Fluoreszenzabklingzeiten soll die Vermessung der für die Fluoreszenz verantwortlichen Lipidkomponente N-Rh-PE allein bei unterschiedlichen Konzentrationen in Chloroform geben. Die Fluoreszenzabklingzeiten der Ausgangslösung mit 1 mg N-Rh-PE auf 1 ml Chloroform (0,78 mM) und der bis zu einer Konzentration von 5  $\mu$ M verdünnten Lösungen sind in Abbildung 5.8 aufgetragen.

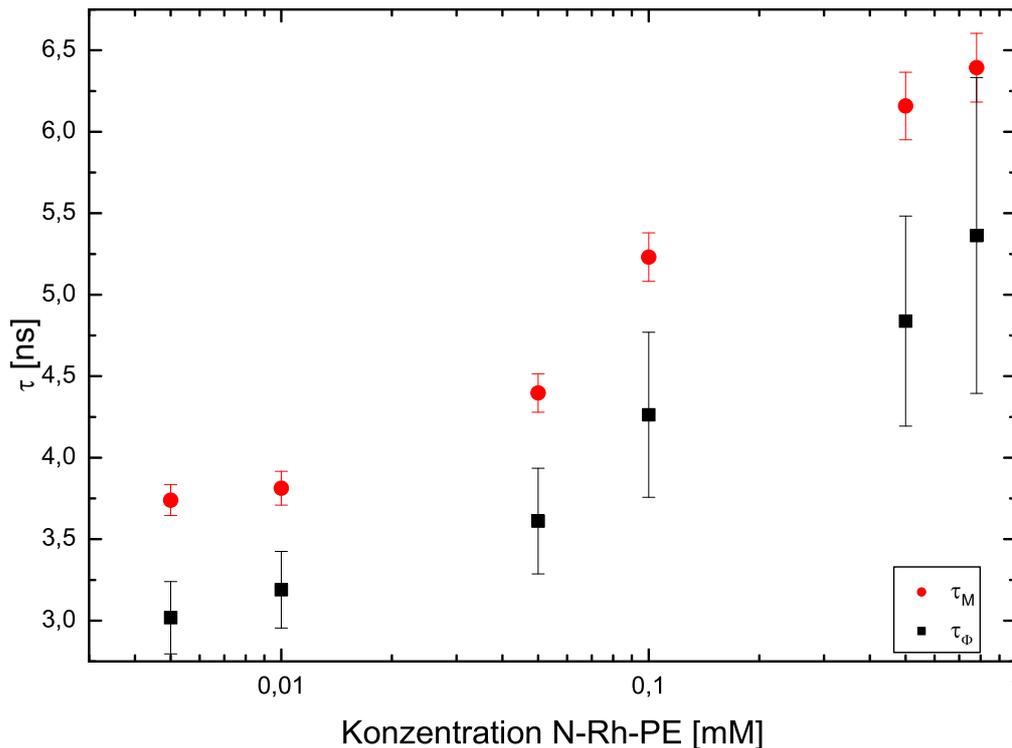


Abbildung 5.8: Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzabklingzeiten des Lipidgekoppelten Rhodamins N-Rh-PE in Chloroform.

Bei allen Konzentrationen liegen die Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  des lipidverankerten Lissamin Rhodamin B mit Werten zwischen 3 - 6 ns deutlich über den Abklingzeiten der Liposomen. Mit zunehmender Verdünnung der Ausgangslösung von 1 mg N-Rh-PE in 1 ml Chloroform nehmen die Abklingzeiten ab, ohne dabei eine Annäherung an einen Grenzwert erkennen zu lassen. Anhand der Unterschiede von 0,6 - 1,3 ns zwischen  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  zeigt sich eine deutliche Abweichung von einem monoexponentiellen Abklingverhalten. Die bei längeren Abklingzeiten grösseren Standardabweichungen der Messwerte, die bei der scheinbaren Fluoreszenzabklingzeit  $\tau_\Phi$  deutlich größer ausfallen, sind auf den in Abschnitt 2.2.3 dargelegten Effekt zurückzuführen: Die unvermeidliche Unsicherheit bei der Bestimmung von Demodulation und Phasenlage führt, abhängig vom Produkt aus Modulationsfrequenz und zu messender Abklingzeit, zu unterschiedlich grossen Fehlern in den Abklingzeiten.

**Temperaturabhängigkeit der Abklingzeit** Die bei einem in-vivo Einsatz der Liposomkonjugate auftretenden Temperaturen werden durch die Erwärmung der Suspensionen auf 40 °C annähernd nachgebildet. Die drei Formulierungen mit minimaler, mittlerer und maximaler Abklingzeit bei Raumtemperatur zeigen sowohl bei der Messung bei hoher Temperatur, als auch nach Abkühlung auf Raumtemperatur im Rahmen der Messgenauigkeit keine signifikanten Abweichungen von den bei Raumtemperatur bestimmten Abklingzeiten  $\langle \tau \rangle$  (Tabelle 5.6).

	$T_{\text{Raum}}$	$T=40^{\circ}\text{C}$		$T=20^{\circ}\text{C}$	
	$\langle \tau \rangle$ [ns]	$\tau_M$	$\tau_{\Phi}$	$\tau_M$	$\tau_{\Phi}$
$A_1$	0,75	0,70	0,54	0,75	0,60
$D_1$	1,16	1,07	0,86	1,07	0,92
$F_1$	1,77	1,94	1,67	1,94	1,63

Tabelle 5.6: Temperaturabhängigkeit: Fluoreszenzabklingzeiten dreier Liposomformulierungen mit kurzer, mittlerer und langer Abklingzeit nach Erwärmung auf 40 °C und nach Abkühlung auf Raumtemperatur

**Effekte durch Zerstörung der Liposomstruktur** Durch die Zugabe von Methanol lässt sich die ursprüngliche Liposomstruktur zerstören. Die drei Formulierungen mit minimaler, mittlerer und maximaler Abklingzeit weisen bei den Messungen sofort ( $t=0$ ) und 60 Minuten nach Zugabe von Methanol im Volumenverhältnis 1:1 von den ursprünglichen Mittelwerten  $\langle \tau \rangle$  deutlich abweichende Fluoreszenzabklingzeiten auf.

	intakt	$t = 0$		$t = 60 \text{ min}$	
	$\langle \tau \rangle$ [ns]	$\tau_M$	$\tau_{\Phi}$	$\tau_M$	$\tau_{\Phi}$
$A_1$	0,75	2,00	1,67	2,06	1,75
$D_1$	1,16	2,08	1,69	2,09	1,80
$F_1$	1,77	1,56	1,15	1,43	1,10

Tabelle 5.7: Als Folge der Zerstörung der Liposomstruktur durch Mischung mit Methanol im Volumenverhältnis von 1:1 treten deutliche Abweichungen von den Abklingzeiten der intakten Liposomen auf.

Das Ergebnis zeigt kein einheitliches Verhalten der Liposomformulierungen nach Zugabe von Methanol. Während die Formulierungen  $A_1$  und  $D_1$  mit ursprünglichen Abklingzeiten von 0,8 ns und 1,2 ns nach Zugabe eine Erhöhung auf ungefähr 2,0 ns zeigen, findet bei  $F_1$  mit der ursprünglich längsten Abklingzeit von 1,8 ns ein Absinken

auf 1,5 ns statt. Somit verhalten sich die Formulierungen mit den Extremwerten der Abklingzeiten genau entgegengesetzt. Die nach Zugabe von Methanol auftretenden Unterschiede von ungefähr 0,4 ns in  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$ , die größer als der Messfehler sind, deuten auf ein nichtmonoexponentielles Abklingen der Fluoreszenz durch Beiträge unterschiedlicher Konfiguration hin. Die zweite Messung nach einer Stunde zeigt keine weitere Veränderung der Abklingzeiten gegenüber den Werten direkt nach Methanolbeimischung.

### 5.3 Messungen an Gefrierschnitten

Vor der Darlegung der quantitativen Ergebnisse der Fluoreszenzabklingzeitmessungen an Gefrierschnitten von Portiobiopsien soll zunächst anhand einer Beispielmessung qualitativ gezeigt werden, wie sich diese Gefrierschnitte in Fluoreszenzabklingzeiten darstellen. Die Visualisierung von Fluoreszenzabklingzeiten in quasi-Echtzeit war eine der grundlegenden Motivationen, das Messsystem als bildgebendes System zu realisieren. Auf diese Weise liefert eine Messung nicht nur eine Kolonne an Zahlenwerten eines abstrakten Messparameters sondern gibt dem Anwender ein auf einen Blick erfassbares Bild, welches er mit dem direkten visuellen Eindruck des Untersuchungsobjekts unter Weißlicht oder Fluoreszenzanregung korrelieren kann.

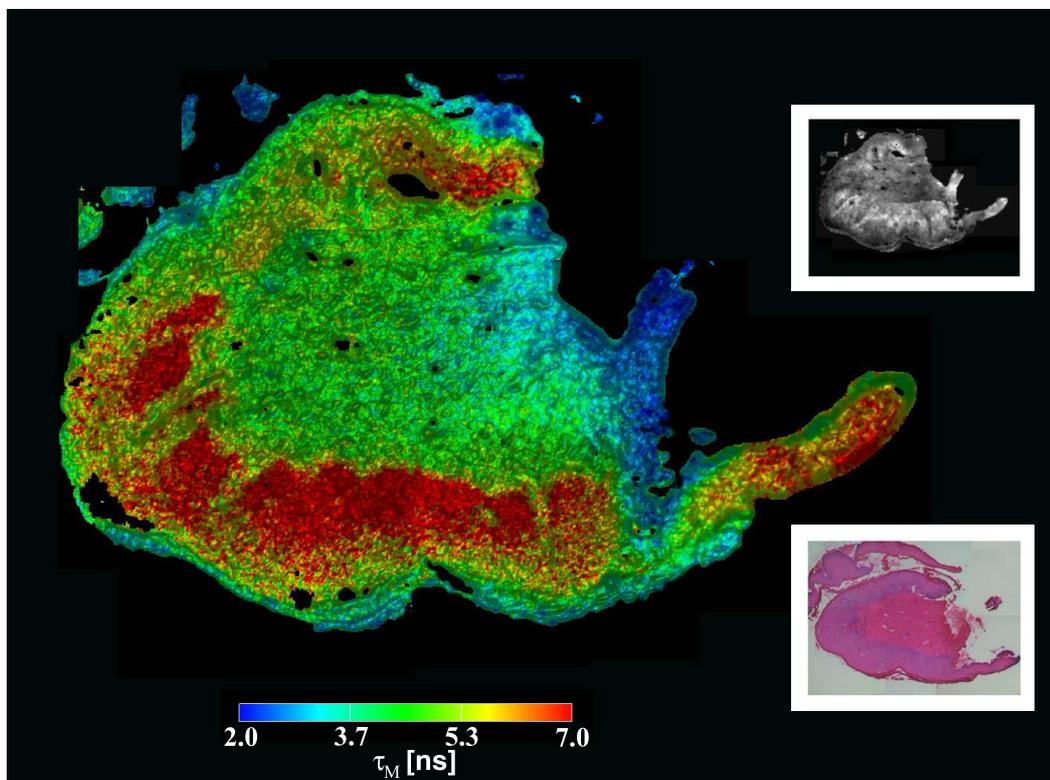


Abbildung 5.9: Falschfarbendarstellung der Fluoreszenzlebensdauerverteilung  $\tau_M$  eines Gefrierschnitts im Spektralbereich  $500 \text{ nm} < \lambda_{Em}$ . In das Bild eingefügt sind rechts oben die Grauwertdarstellung der Fluoreszenzintensität und rechts unten der korrespondierende HE-Schnitt.

In Abbildung 5.9 ist das Fluoreszenzabklingzeitbild  $\tau_M$  eines Gefrierschnitts im Gesamtemissionsbereich  $\lambda_{Em} > 500 \text{ nm}$ , zusammengesetzt aus den 15 Einzelmessungen, mit denen der Schnitt abgedeckt wurde, gezeigt. Die Fluoreszenzintensität ist dabei als Graustufenbild rechts oben in die Abbildung eingefügt. Wie im Abschnitt

5.1.1 bereits erläutert, ist die Darstellung ein dreidimensionales Falschfarbenprofil: Die Farbe jedes Bildpunktes ist durch die Fluoreszenzabklingzeit gegeben, wobei sich die lineare Farbskala von Blau für die kürzesten Abklingzeiten über Grün bis zu Rot für die längsten Abklingzeiten der Messung erstreckt. Die Intensität jedes Bildpunktes wird in der dreidimensionalen Darstellung für das Höhenprofil verwendet, so dass diese Information zusätzlich zu den Abklingzeiten visualisiert wird.

Die histologischen Gegebenheiten des Schnitts zeichnen sich, wie aus dem Vergleich mit der rechts unten eingefügten HE-Färbung ersichtlich ist, in der Falschfarbendarstellung ab: In dem Gesamtbild der Fluoreszenzabklingzeit  $\tau_M$  ist in weiten Teilen die Grenze zwischen Epithel und Stroma durch den deutlichen Unterschied der Farben erkennbar. An der Basalmembran liegt ein scharfer Übergang von längeren Abklingzeiten im Epithel (rot) zu kürzeren Abklingzeiten im Stroma (grün) vor. Ebenso zeichnet sich der Epithelrand nahezu durchgehend gegen das darunterliegende Epithel durch eine kurze Abklingzeit (blau-grün) und eine im Vergleich zum oberen Epithelbereich höhere Fluoreszenzintensität ab.

Genauere Informationen über die Lokalisation unterschiedlicher Fluorophore sollte die Vermessung der Schnitte in drei unterschiedlichen spektralen Detektionsfenstern (Gesamtbereich:  $500 \text{ nm} < \lambda_{Em}$ , Grün:  $500 \text{ nm} < \lambda_{Em} < 590 \text{ nm}$  sowie Rot:  $610 \text{ nm} < \lambda_{Em}$ ) bringen. Eine Ausschnittsvermessung des obigen Schnittes ist in Abbildung 5.10 für diese drei Spektralbereiche in Fluoreszenzintensität, Fluoreszenzabklingzeit  $\tau_M$  und Fluoreszenzabklingzeit  $\tau_\Phi$  zusammengestellt.

Die erste Reihe der Abbildung zeigt wie im Gesamtbild die Fluoreszenz im Gesamtbereich  $500 \text{ nm} < \lambda_{Em}$ . Die nächste Reihe gibt die Messung im Grünen wieder. Hier ist in den Abklingzeiten im Gegensatz zu der Messung im Gesamtbereich keine Grenze zwischen Epithel und Stroma auszumachen. In der Intensität zeigt das Stroma ein höheres Signal als das Epithel, allerdings ohne eine sich scharf abzeichnende Grenzlinie. Der Epithelrand hingegen weist eine deutlich höhere Intensität als das Epithel auf. Im Roten (dritte Reihe) zeigt die Intensität vor allem in den unteren Epithelbereichen über der Basalmembran Areale mit deutlich höherem Signal als im Stroma. Die Abklingzeitdarstellungen dagegen weisen über große Bereiche des Epithels flächig eine lange Abklingzeit auf, die über der im Stroma liegt. Aus den Intensitätsverhältnissen und Abklingzeitdarstellungen im grünen und roten Detektionsfenster ist ersichtlich, wie sich das Abklingverhalten bei der Detektion im Gesamtbereich als eine Mischung der unterschiedlichen Beiträge ergibt.

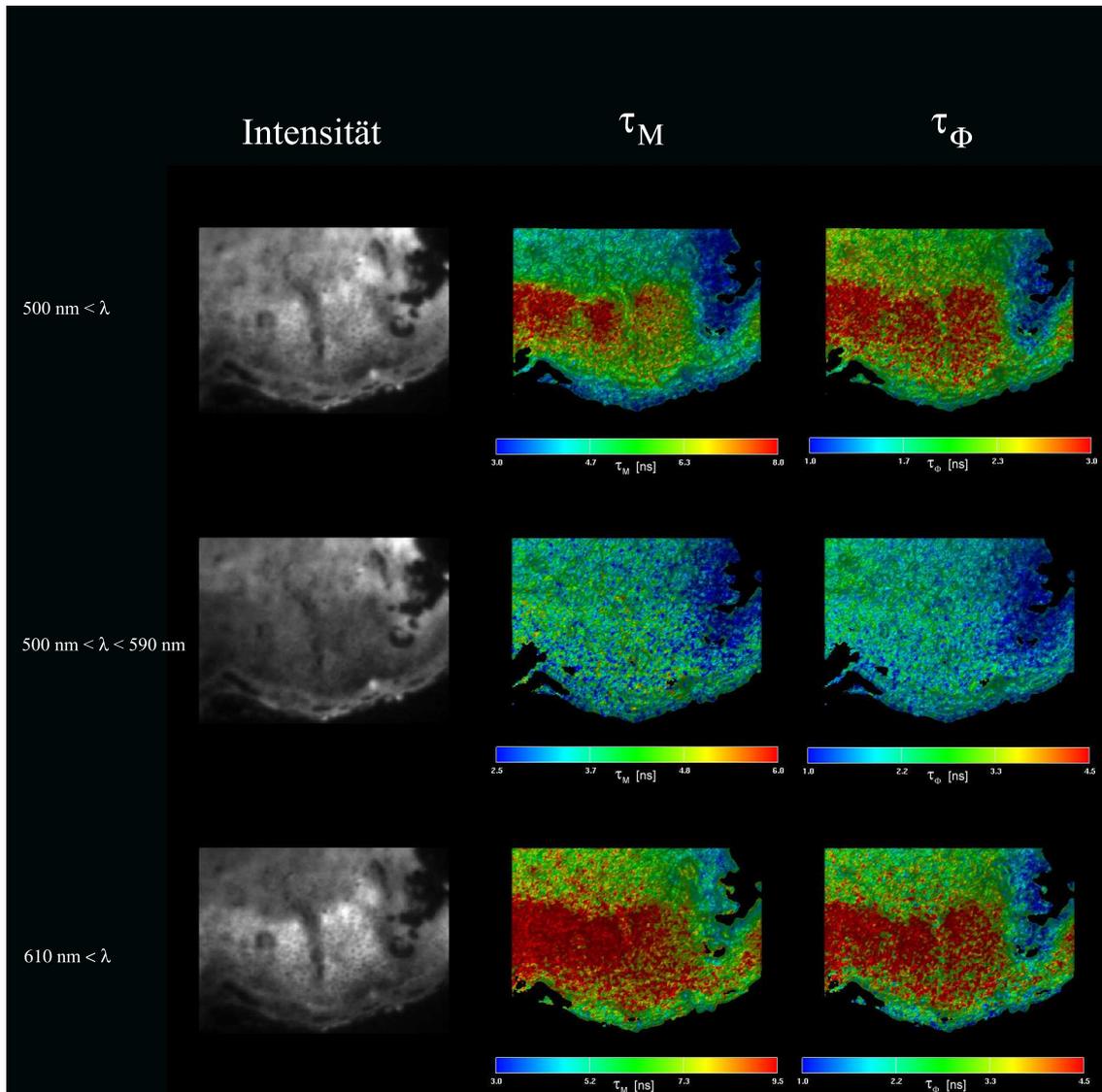


Abbildung 5.10: Falschfarbendarstellung der Fluoreszenzlebensdauerdistribution  $\tau_M$  eines Gefrierschnitts in unterschiedlichen spektralen Detektionsfenstern  $500 \text{ nm} < \lambda_{Em}$ ,  $500 \text{ nm} < \lambda_{Em} < 590 \text{ nm}$  und  $610 \text{ nm} < \lambda_{Em}$ .

### 5.3.1 Fluoreszenzabklingzeiten in Gewebearealen

Die im obigen qualitativen Überblick aufgezeigten Unterschiede zwischen Epithelrand, Epithel und Stroma wurden bei allen 18 Gefrierschnitten quantitativ ausgewertet durch die Definition von Auswertebereichen (ROI = region of interest) in der jeweiligen Messung und Mittelwertbildung über alle innerhalb der ROIs liegenden Bildpunkte. In Tabelle 5.8 sind die mittleren Abklingzeiten der Gewebeareale Epithelrand, Epithel und Stroma in der Gesamtheit der Gefrierschnitte bei den beiden Anregungswellenlängen  $\lambda_{Ex} = 456,9$  nm und  $\lambda_{Ex} = 396$  nm für die drei spektralen Detektionsfenster aufgelistet.

$\lambda_{Ex}$ [nm]	$\lambda_{Em}$ [nm]	Epithelrand		Epithel		Stroma	
		$\tau_M$ [ns]	$\tau_\Phi$ [ns]	$\tau_M$ [ns]	$\tau_\Phi$ [ns]	$\tau_M$ [ns]	$\tau_\Phi$ [ns]
456,9	500 <	3,8	2,0	4,7	2,3	4,6	2,4
	500-590	3,6	2,1	4,2	2,4	4,3	2,5
	610 <	5,3	2,0	6,9	2,3	5,9	2,1
396	500 <	3,9	2,3	4,8	2,5	4,6	2,7
	500-590	4,0	2,3	4,9	2,5	4,8	2,7
	610 <	5,8	2,1	8,2	2,2	6,0	2,1

Tabelle 5.8: Demodulationsabklingzeiten  $\tau_M$  und Phasenabklingzeiten  $\tau_\Phi$  der Gefrierschnitte in den Gewebearealen Epithelrand, Epithel und Stroma (Angaben zur Streuung der Werte sind in Abbildung 5.11 gegeben).

Die Demodulationsabklingzeiten  $\tau_M$  liegen im Epithelrand im Bereich von 3,6 - 5,8 ns, im Epithel bei 4,2 - 8,2 ns und im Stroma bei 4,3 - 6,0 ns. Bei allen Kombinationen von Anregungswellenlänge und Detektionsfenster weist der Epithelrand in  $\tau_M$  ungefähr 0,8 ns (Min 0,6 ns, Max 2,4 ns) kürzere Abklingzeiten auf als Epithel und Stroma. Die Unterschiede zwischen den Abklingzeitmittelwerten  $\tau_M$  in Epithel und Stroma liegen bei 0,1 - 0,2 ns im Gesamtbereich und im Grünen, betragen aber im Roten 1 ns bei der Anregung der Fluoreszenz mit 456,9 nm und 2,2 ns bei Anregung mit 396 nm.

Im direkten Vergleich der beiden Anregungswellenlängen zeigen die Abklingzeiten im Gesamtdetektionsfenster und im Grünen für die einzelnen Gewebeareale Epithelrand, Epithel und Stroma jeweils annähernd gleiche Werte. Im Roten dagegen lässt sich im Epithel ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Anregungswellenlängen feststellen: Bei 396 nm ist der Mittelwert von  $\tau_M$  mit 8,2 ns um 1,3 ns höher als der Mittelwert bei 456,9 nm.

Bei der Phasenabklingzeit  $\tau_\Phi$  lassen sich mit 0,3 ns geringere Unterschiede zwischen Epithelrand und Epithel beziehungsweise Stroma als bei  $\tau_M$  finden. Für alle Anregungswellenlängen und Detektionsfenster ergeben sich bei der Phasenabklingzeit  $\tau_\Phi$  Mittelwerte um 2,3 ns (Min 2,0 ns, Max 2,7 ns).

Zum Verständnis der Ergebnisse sei hier im Vorgriff auf die folgende Diskussion bereits darauf hingewiesen, dass bei den unterschiedlichen Kombinationen der Anregungswellenlängen und der Detektionsfenster zum einen primär die Autofluoreszenz ( $\lambda_{Ex} = 456,9 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{Det} = 500 - 590 \text{ nm}$ ) sowie zum anderen die PPIX-Fluoreszenz ( $\lambda_{Ex} = 396 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{Det} > 610 \text{ nm}$ ) die gemessenen Fluoreszenzabklingzeiten bestimmt.

Genauere Informationen über Unterschiede der Abklingzeiten in den Gewebearealen sind aus den Verteilungen der Werte und deren statistischer Analyse zu erhalten. In den Abbildungen 5.11 und 5.12 sind die Verteilungen der Abklingzeiten in Epithelrand, Epithel und Stroma als Boxplotgraphen mit den Quantilen und Extremwerten dargestellt.<sup>2</sup>

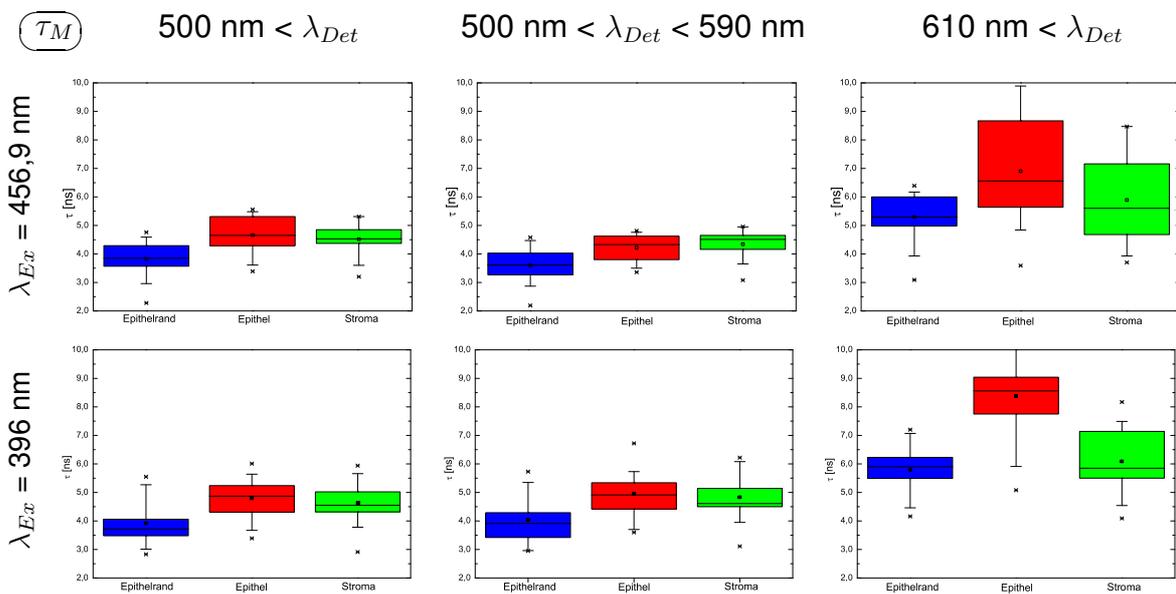


Abbildung 5.11: Boxplotdarstellungen der Modulationsabklingzeit  $\tau_M$  in den Gewebearealen Epithelrand, Epithel und Stroma der Gefrierschnitte bei den unterschiedlichen Kombinationen von Anregungswellenlängen und spektralen Detektionsfenstern.

Die bei allen Wellenlängenkombinationen im Vergleich zu Epithel und Stroma kürzeren mittleren Abklingzeiten des Epithelrands lassen sich in den Boxplotdarstellungen der Verteilungen ebenso deutlich ausmachen. Die statistische Analyse durch einen Paarvergleichstest der Abklingzeiten von Epithelrand und Epithel der einzelnen Gefrierschnitte bestätigt mit P-Werten um  $10^{-5}$  bei der Abklingzeit  $\tau_M$  und  $10^{-3}$  bei der Abklingzeit  $\tau_\Phi$  die Signifikanz.

Ein ebenso klarer Unterschied in allen Kombinationen von Anregungswellenlänge und Detektionsfenster lässt sich im Vergleich von Epithel und Stroma nicht finden. Bei

<sup>2</sup> Da bei diesen Darstellungen die Gewichtung auf der visuellen Erfassbarkeit von Unterschieden der Abklingzeitverteilungen in Epithelrand, Epithel und Stroma liegt, wurde eine andere Anordnung der Daten gewählt als in Tabelle 5.8.

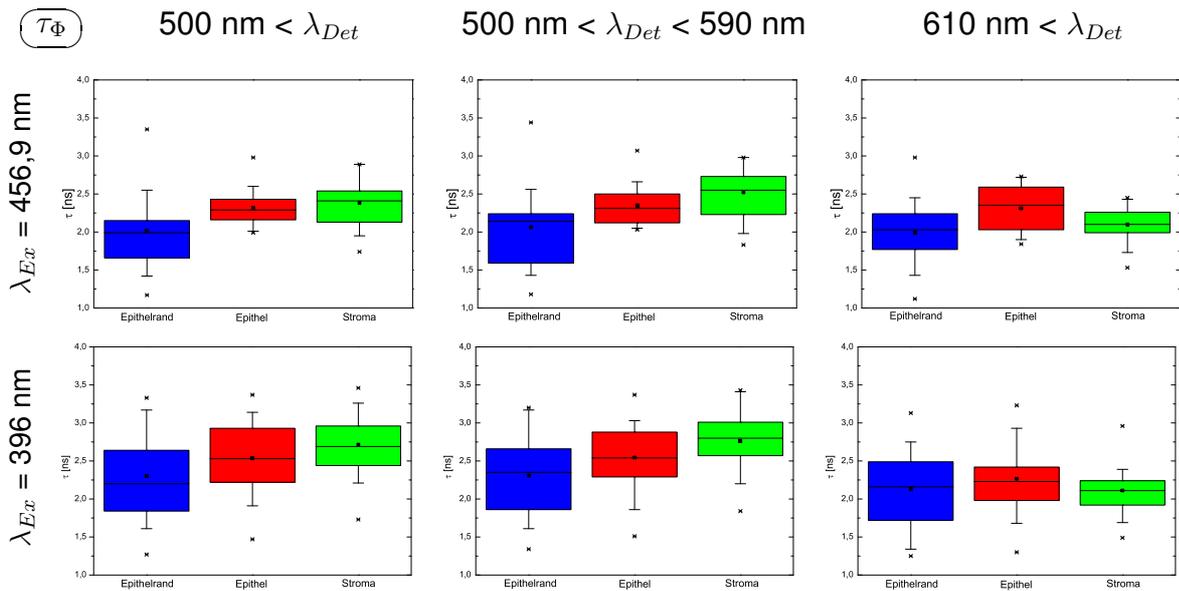


Abbildung 5.12: Boxplotdarstellungen der Phasenabklingzeit  $\tau_{\Phi}$  in den Gewebearealen Epithelrand, Epithel und Stroma der Gefrierschnitte bei den unterschiedlichen Kombinationen von Anregungswellenlängen und spektralen Detektionsfenstern.

der Abklingzeit  $\tau_M$  ergibt sich im Gesamtdetektionsbereich und im Grünen ein P-Wert von 0,1 ( $\tau_{\Phi}$ : 0,2 Gesamtbereich, 0,02 Grün). Das entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 90 %, dass kein Zufallseffekt vorliegt, übersteigt aber den zumeist als Grenzwert für eine Signifikanz angesetzt P-Wert von 0,05. Im Roten liefert der Paarvergleichstest dagegen mit einem P-Wert von 0,01 ( $\tau_{\Phi}$ : 0,004) eine statistische Signifikanz.

### 5.3.2 Dysplasiegrad und Abklingzeiten im Gesamtepithel

Als wichtigste Motivation für den Aufbau eines Messsystems zur Bestimmung von Fluoreszenzabklingzeiten lag dieser Arbeit die folgende Frage zugrunde: Ist es möglich anhand von Fluoreszenzabklingzeiten Hinweise auf histopathologische Gewebeveränderungen zu erhalten? Eine erste Abschätzung des Potentials der Methode soll im Folgenden für den Fall der Zervixbiopsien erfolgen. Während im vorigen Abschnitt die Unterschiede der Abklingzeiten im Epithel und Stroma im Vordergrund standen, das heißt die Fluorophorlokalisierung im Gewebe, werden nun die Abklingzeiten im Epithel entsprechend der pathologischen Diagnose<sup>3</sup> untersucht. Die Auswertung erfolgt zunächst über das gesamte Epithel der Schnitte - diese Vorgehensweise ist dadurch begründet, dass bei einer in-vivo-Anwendung ebenso das gesamte Epithel zum Fluoreszenzsignal beiträgt (wenn auch in abnehmender Stärke bei zunehmender Tiefe der Schichten).

<sup>3</sup> Normal: 5 Biopsien, CIN 1: 11 Biopsien, CIN 2-3: 3 Biopsien)

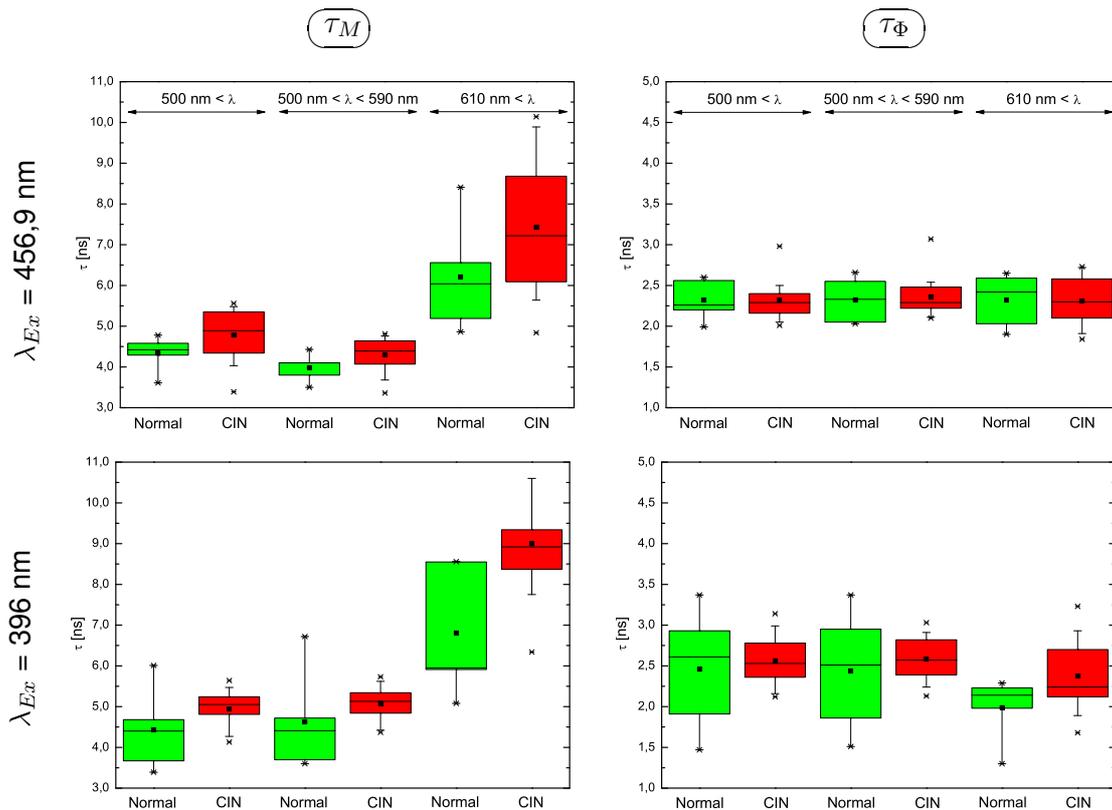


Abbildung 5.13: Boxplotdarstellungen der Abklingzeiten  $\tau_M$  (links) und  $\tau_\Phi$  (rechts) im normalen und dysplastischem (CIN) Epithel der Gefrierschnitte bei den unterschiedlichen Kombinationen von Anregungswellenlängen und spektralen Detektionsfenstern.

In Abbildung 5.13 sind die Boxplots der Abklingzeitverteilungen von normal klassifizierten Biopsien denen von dysplastischen Biopsien gegenübergestellt. Auf eine weitere Aufteilung anhand des Dysplasigrades wurde dabei verzichtet.

Betrachtet man als erstes die Mittelwerte (schwarze Quadrate in Abbildung 5.13) der Abklingzeitverteilungen  $\tau_M$ , so zeigt sich, dass sowohl bei der Anregung mit  $456,9 \text{ nm}$  als auch bei Anregung mit  $396 \text{ nm}$  in allen spektralen Detektionsfenstern die dysplastischen Biopsien im Mittel längere Abklingzeiten haben, als die normal klassifizierten Biopsien. Die Unterschiede der Mittelwerte betragen  $0,5 - 2,2 \text{ ns}$ , mit der größten Differenz bei Anregung mit  $396 \text{ nm}$  und Detektion im roten Spektralbereich. Auch bei  $\tau_\Phi$  haben die dysplastischen Biopsien im Mittel längere Abklingzeiten, wobei der Unterschied bei Anregung mit  $456,9 \text{ nm}$  minimal ausfällt ( $0,1 \text{ ns}$ ), bei Anregung mit  $396 \text{ nm}$  ungefähr  $0,3 \text{ ns}$  beträgt.

Die statistische Analyse (einseitiger t-Test mit gleichen Varianzen) liefert bei Anregung mit  $456,9 \text{ nm}$  für die Abklingzeitverteilungen  $\tau_M$  im Gesamtbereich und im Roten P-Werte um  $0,09$ , im Grünen einen P-Wert von  $0,02$ . Bei Anregung mit  $396 \text{ nm}$

sind dagegen die Verteilungen von Normalgewebe und dysplastischem Gewebe im Gesamtbereich und im Grünen grenzwertig signifikant unterschiedlich, im Roten mit einem P-Wert von 0,006 deutlich signifikant. Im grünen Detektionsfenster fällt dabei eine als Normalgewebe klassifizierte Biopsie mit Abklingzeitwerten um 6,7 ns deutlich aus dem Bereich von 3,6 - 4,7 ns in dem die anderen Biopsien von Normalgewebe liegen. Ohne Berücksichtigung dieser „abweichenden“ Biopsie liegt auch im Grünen eine hohe Signifikanz der Unterschiede vor (P-Wert 0,001). Für  $\tau_{\Phi}$  kann mit P-Werten um 0,4 keine Signifikanz der Unterschiede festgestellt werden.

### 5.3.3 Linienauswertung

Die obige Auswertung der Abklingzeiten über den gesamten Epithelbereich ist ein erster Ansatz, Normalgewebe und dysplastisches Gewebe auf Unterschiede bei den Fluoreszenzabklingzeiten hin zu untersuchen. Allerdings lässt dieser Ansatz die histopathologischen Unterscheidungskriterien der zervikalen Dysplasiegrade außer Acht: Die Klassifizierung nach Beschränkung der Anomalien auf das basale Drittel des Epithels (leichte Dysplasie, CIN1), das mittlere Drittel (mäßige Dysplasie, CIN2) sowie die Ausdehnung bis ins superfizielle Drittel beziehungsweise das gesamte Epithel (schwere Dysplasie, CIN3) legt nahe, bei der Auswertung der Abklingzeiten dieser Klassifizierung entsprechende Teilbereiche des Epithels zu vergleichen. Voraussetzung ist dabei, dass die Auswertung entlang der natürlichen Epithelschichtung von Basalmembran zur Oberfläche hin durchgeführt werden kann. Bei der Präparation der Gefrierschnitte wurde eine zur Epitheloberfläche senkrechte Schnittführung angestrebt, was nicht bei allen Biopsien gewährleistet werden konnte. Daher wurden für diese Auswertung nur die Schnitte verwendet, bei denen davon ausgegangen werden kann, dass die senkrechte Schnittführung gut erreicht wurde (15 von 18 Biopsien).

Vor allem der Vergleich zwischen unterem Epitheldrittel und den zwei oberen Epitheldritteln ist angesichts der geringen Zahl von höhergradigen Dysplasien bei den Biopsien von Interesse. Abbildung 5.14 zeigt für die Abklingzeit  $\tau_M$  die Ergebnisse der Auswertung in zwei Epithelbereichen (Längenverhältnis 1:2) entlang einer Linie von der Basalmembran zur Epitheloberfläche hin<sup>4</sup>. Entlang der Linie wurden für jeden Linienpunkt links und rechts die nächsten 5 Nachbarpunkte bei der Berechnung der Abklingzeit mitberücksichtigt.

Wie bei der Auswertung des gesamten Epithelbereichs weisen die Verteilungen der Biopsien von Normalgewebe auf kürzere Abklingzeiten als bei den dysplastischen Gewebeproben hin. Allerdings ergeben die meisten t-Tests für Unterschiede zwischen den beiden Gruppen im unteren Drittel P-Werte um 0,1 und in den oberen zwei Drittel P-Werte um 0,2. Ein statistisch signifikanter Unterschied lässt sich bei Anregung mit 456,9 nm und Detektion im Grünen für das untere Epitheldrittel feststellen (P-Wert 0,02). Hier sind wie bei den anderen Messungen die Unterschiede in den oberen zwei Drittel weniger signifikant (P-Wert 0,12).

---

<sup>4</sup> Auf eine Darstellung der Ergebnisse für die Abklingzeit  $\tau_{\Phi}$  wurde verzichtet, da wie beim Gesamtepithel nur geringe Unterschiede ohne Signifikanz zu finden sind

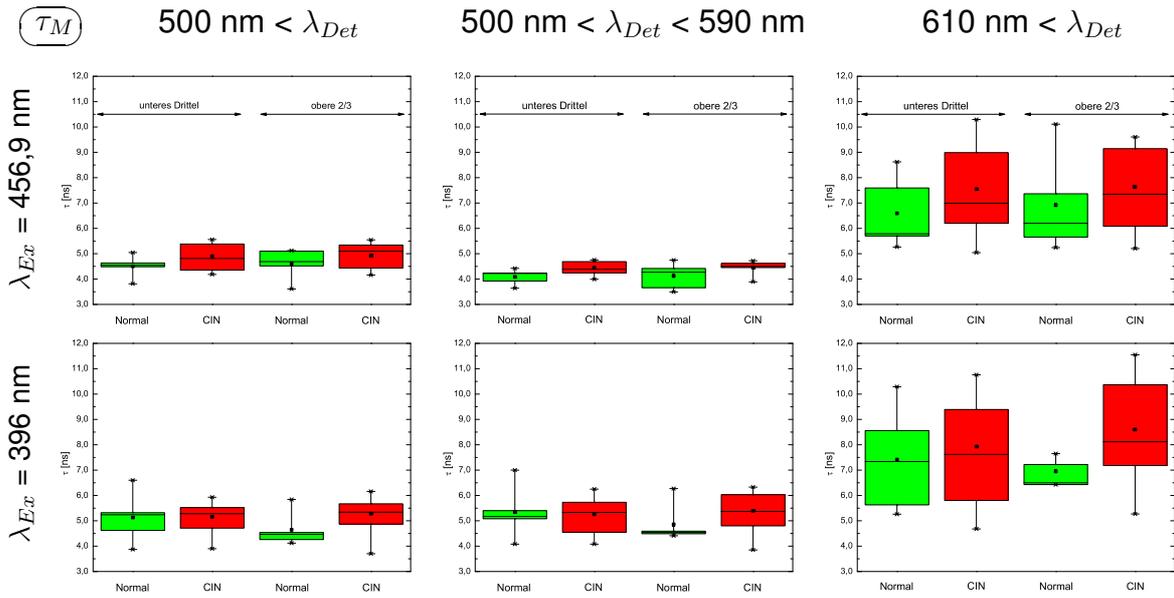


Abbildung 5.14: Boxplotdarstellungen der Abklingzeit  $\tau_M$  der Gefrierschnitte in den Epithelbereichen unteres Drittel und obere zwei Drittel bei den unterschiedlichen Kombinationen von Anregungswellenlängen und spektralen Detektionsfenstern.

Anzumerken ist, dass bei dieser Auswertung die Streuung der Werte insbesondere im roten Detektionsbereich deutlich über der Auswertung im gesamten Epithelbereich liegt. Dies ist in erster Linie auf die zwangsläufig deutlich geringere Anzahl an Messpunkten zurückzuführen die für die Berechnung der Abklingzeit herangezogen wurden.

### 5.4 In-vivo-Messungen mit Rhodamin-Liposomen am Hamstermodell

Die Untersuchung, wie sich die Fluoreszenzabklingzeiten von intravenös verabreichten Liposomkonjugaten in-vivo bei dem Hamsterrückenkammermodell verhalten, stellt eine komplexe Messsituation dar, die wesentlich mehr Parameter umfasst, als Messungen der Liposomsuspensionen allein. Über den ganzen Zeitverlauf sollen hier die Fluoreszenzeigenschaften im Tumoreal und im umgebenden Normalgewebe unterschieden werden, um einen quantitativen Vergleich und damit Aussagen über die Qualität einer Tumordemarkation anhand der Messwerte zu ermöglichen. Dabei ist das gemessene Fluoreszenzsignal eine Überlagerung der Rhodaminfluoreszenz mit der Autofluoreszenz des Gewebes, welche selbst von einer Vielzahl an Fluorophoren herrührt. Die Überlagerung der unterschiedlichen Fluoreszenzbeiträge ist darüber hinaus einer zeitlichen Dynamik unterworfen, die durch die Kinetik der Rhodamin-Fluoreszenz nach der Perfusion bestimmt ist.

Diese zeitliche Dynamik soll hier zunächst anhand des Verlaufs der Gesamtfluoreszenzintensität bei der Messung mit der Formulierung  $D_1$  in der Standarddosierung (H1) qualitativ umrissen werden: Bereits wenige Sekunden nach Beginn der Injektion ( $t=0$ ) zeichnen sich in der Fluoreszenzintensität zunächst die Blutgefäße gegen das umgebende Gewebe ab. Während der ersten fünf Minuten stellt sich auch im Gewebe ein Anfluten der Fluoreszenz ein. Zu diesem Zeitpunkt ist die Fluoreszenz hier aber noch geringer als in den Gefäßen. Erst ungefähr 30 Minuten nach Injektion haben sich die Intensitätsverhältnisse umgekehrt. Das Maximum der Fluoreszenz wird zwischen 5 und 60 Minuten nach Injektion erreicht, es lag im Tumor bei dem 10 - 12-fachen der initialen Autofluoreszenzintensität des Normalgewebes. Die grössten Unterschiede der Fluoreszenzintensität zwischen Tumor und Normalgewebe zeigen sich zwischen 180 und 240 Minuten. Im Tumor ist im Zeitraum 180 bis 240 Minuten nach Injektion im Mittel eine gegenüber dem Normalgewebe um den Faktor 2 höhere Intensität zu finden. 24 Stunden nach Injektion ist die Fluoreszenzintensität deutlich abgesunken, liegt aber im Tumor noch rund 40 % über der Autofluoreszenzintensität.

#### 5.4.1 Rohwerte der Abklingzeiten $\tau_M$ und $\tau_\Phi$

Der zeitliche Verlauf der Messungen lässt sich in drei Phasen unterteilen: das Anfluten der Rhodaminfluoreszenz, die Anreicherung im Gewebe sowie der folgende Abbau. Für diese drei Phasen sind die zu untersuchenden Fragestellungen:

- Wie verändern sich die gemessenen Abklingzeiten direkt (5 Minuten) nach Injektion der Liposomkonjugate gegenüber den Messungen der Autofluoreszenz ( $t = 0$  min)?
- Gibt es im zeitlichen Verlauf bis 360 Minuten nach Injektion weitere Veränderungen der Abklingzeiten?

- Wie ist die Langzeitentwicklung der Abklingzeiten, sofern nach 24 Stunden noch Rhodaminfluoreszenz festzustellen ist?

Anhand der so gewonnenen Ergebnisse lassen sich für diese drei Phasen im Folgenden die zentralen Fragen klären:

- Gibt es im Vergleich der Abklingzeiten signifikante Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe?
- Kann aus Veränderungen der Abklingzeiten im Verlauf der Messung auf eine Veränderung der Liposomstruktur geschlossen werden?

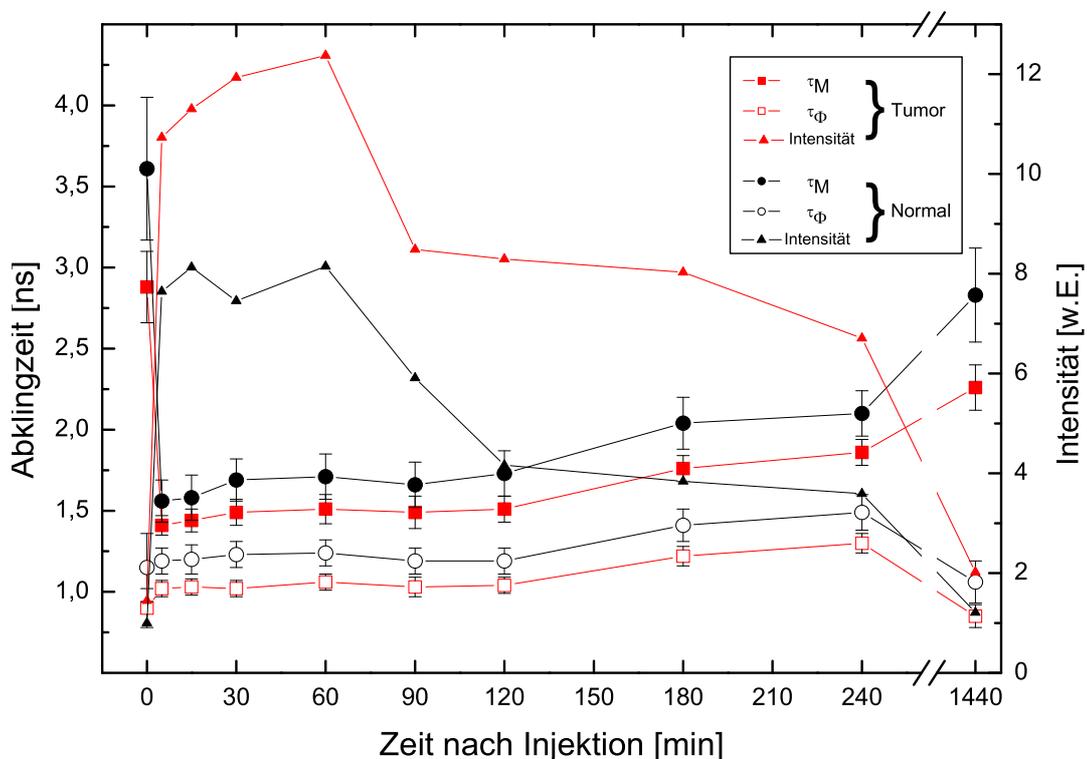


Abbildung 5.15: Zeitlicher Verlauf der scheinbaren Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  in Tumor und Normalgewebe nach Gabe der Formulierung  $D_1$  in der Standarddosierung (H1)

Bei der Messung mit der Formulierung  $D_1$  in der Standarddosierung (H1) geht das Ansteigen der Fluoreszenzintensität nach Injektion der Liposomen mit einem deutlichen Absinken in der Abklingzeit  $\tau_M$  berechnet aus der Demodulation vom Wert der Autofluoreszenzmessung einher (Abbildung 5.15). Von  $\tau_M \approx 3,3$  ns sinkt sie um rund 1,7 ns auf 1,5 ns. Bereits nach 5 Minuten wird ein Minimum erreicht. Im weiteren Verlauf bis 120 Minuten verharrt die Abklingzeit  $\tau_M$  im Mittel bei einem Wert von 1,5 ns, danach ist ein Wiederanstieg bis auf 2,0 ns festzustellen. Bei der Messung nach 24 Stunden ist die Abklingzeit weiter angestiegen, liegt aber noch rund 0,7 ns

## 5 Ergebnisse

unter dem Autofluoreszenzwert vor der Injektion. Zu allen Zeiten liegen die Werte der Abklingzeit  $\tau_M$  im Tumor unter denen im Normalgewebe, die Unterschiede betragen stets rund 200 ns.

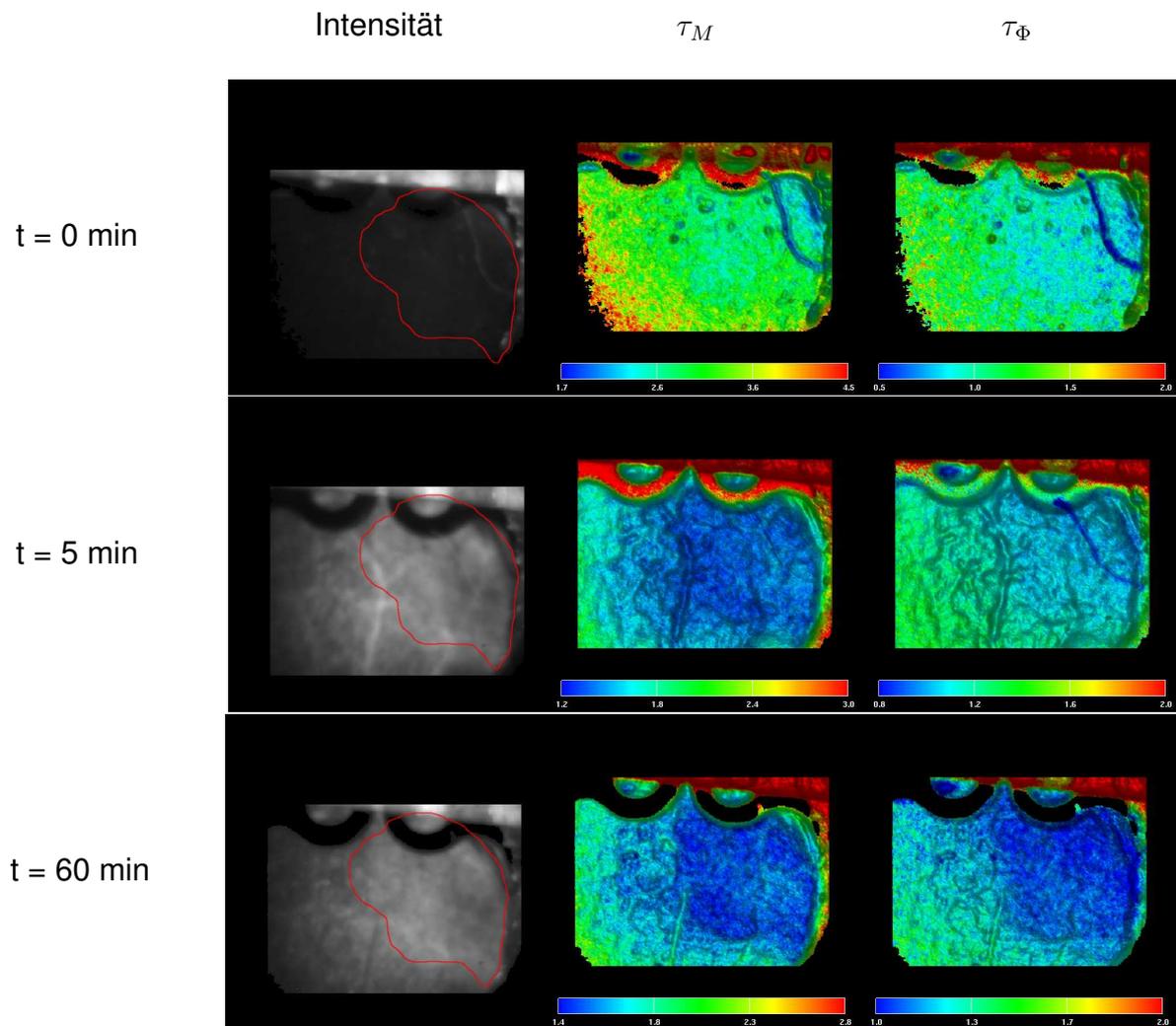


Abbildung 5.16: Intensität (links) und Abklingzeiten  $\tau_M$  (Mitte) und  $\tau_\Phi$  (rechts) vor der Injektion, 5 Minuten und 60 Minuten nach Injektion der Formulierung  $D_1$  in der Standarddosierung von  $5 \mu\text{l/g KG}$ . Der rot umrandete Bereich in den Intensitätsbildern zeigt das Tumorareal.

Anders als bei der Abklingzeit  $\tau_M$ , ist in der Abklingzeit  $\tau_\Phi$ , berechnet aus der Phasenverschiebung, nach der Injektion kein ebenso ausgeprägter Effekt festzustellen. Die Werte liegen zwar bis 240 Minuten nach der Injektion der Liposomensuspension stets über dem Autofluoreszenzwert von circa 1 ns, mit Unterschieden von rund 200 ps bleiben sie aber die ganze Zeit im Bereich der Messunsicherheit des Autofluoreszenzwertes. Es ist hier aber ebenso, wie bei der Abklingzeit  $\tau_M$  im ganzen Zeitver-

lauf der Messung ein Unterschied zwischen Tumor und Normalgewebe festzustellen. In Abbildung 5.16 sind die Fluoreszenzintensität sowie die Falschfarbendarstellungen der scheinbaren Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  vor Injektion der Liposomensuspension und 5 Minuten sowie 60 Minuten nach Injektion gegenübergestellt.

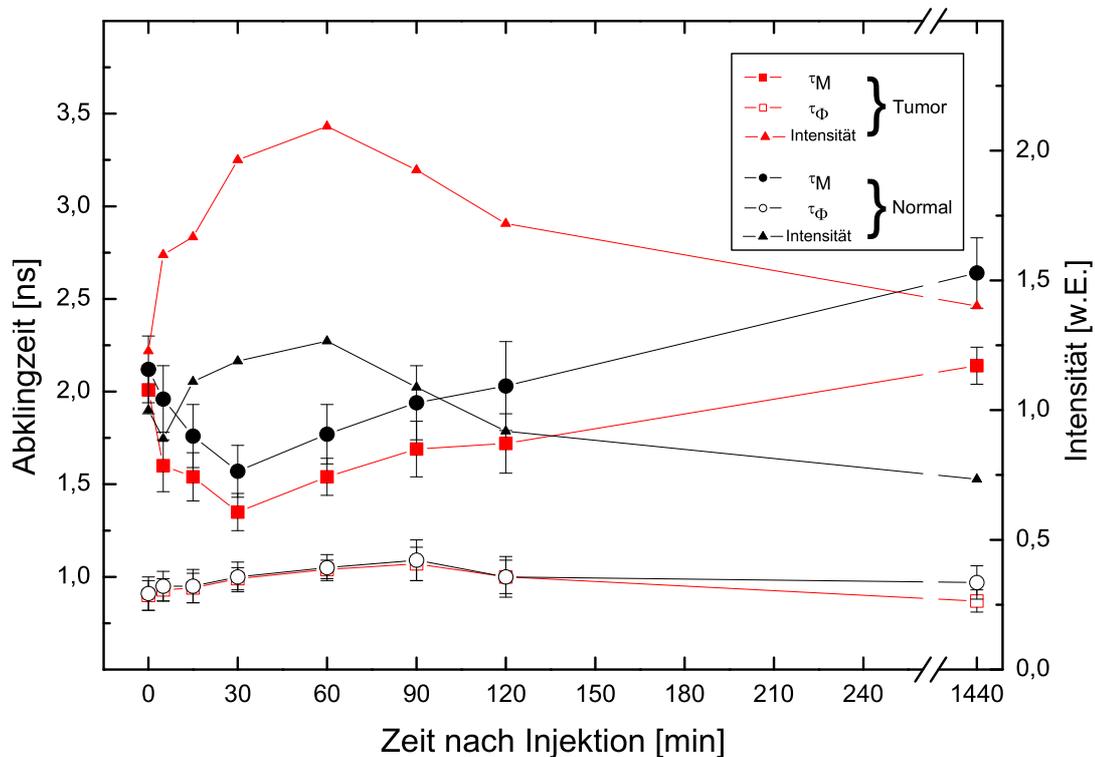


Abbildung 5.17: Zeitlicher Verlauf der scheinbaren Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_\Phi$  und  $\tau_M$  nach Gabe der Formulierung  $D_1$  in verminderter Dosierung (H4).

Die Messung mit der auf ein Viertel reduzierten Dosierung der Formulierung  $D_1$  ist in Abbildung 5.17 dargestellt. Die niedrigere Dosierung führt hier wegen der reduzierten Fluoreszenzintensität zu deutlich größeren Fehlern in den bestimmten Abklingzeiten. Da nach 130 Minuten die Intensität des Fluoreszenzsignals wieder in der Größenordnung der Autofluoreszenz lag, wurden außer der Messung 24 Stunden nach Injektion keine weiteren Messpunkte aufgenommen. Die Injektion der Liposomformulierung äussert sich bei der niedrigen Dosierung ebenso in einer Verringerung der Fluoreszenzabklingzeiten, die allerdings geringer ausfällt als bei der Standarddosierung. Wie bei dieser liegt dabei das Minimum der Abklingzeiten nahe 1,5 ns. Die Fluoreszenzabklingzeit steigt im Zeitraum zwischen 30 und 135 Minuten kontinuierlich wieder an und erreicht fast wieder die Ausgangswerte der Autofluoreszenz. Die Unterschiede zwischen Tumor und Normalgewebe liegen bei dieser Messung bei ungefähr 200 ps, wobei auch hier im Tumorgewebe die kürzeren Abklingzeiten zu finden sind. Abbildung 5.18 zeigt die Intensitätsverhältnisse und die Abklingzeit  $\tau_M$  90 Minuten nach Injektion.

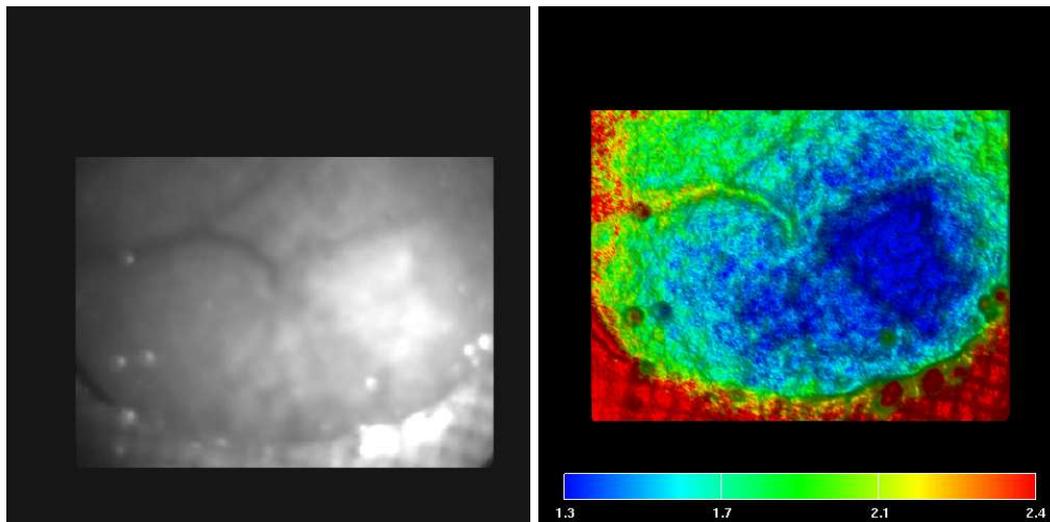


Abbildung 5.18: Fluoreszenzintensität und scheinbare Fluoreszenzabklingzeit  $\tau_M$  90 Minuten nach Gabe der Formulierung  $D_1$  in verminderter Dosierung (H4).

Bei den Messungen mit den Formulierungen  $F_1$  (H2) und  $A_1$  (H3) ist der qualitative Verlauf der Fluoreszenz und der Abklingzeiten entsprechend dem bei der Formulierung  $D_1$ . Auch bei diesen Formulierungen geht mit dem Anfluten der Fluoreszenz ein Absinken der Abklingzeit  $\tau_M$  unter den Autofluoreszenzwert einher. Mit circa 0,6 ns fällt der Unterschied zur Autofluoreszenz bei der Formulierung  $A_1$  geringer, bei  $F_1$  mit 2 ns grösser als bei der Formulierung  $D_1$  aus. Der weitere Verlauf der Abklingzeit nach dem Minimum bei 30 Minuten ( $F_1$ ) beziehungsweise 5 Minuten ( $A_1$ ) ist insgesamt auch durch einen Wiederanstieg gekennzeichnet. Die Werte von  $\tau_M$  liegen dabei bis 360 Minuten nach Injektion im Mittel um 1,6 ns ( $A_1$ ) und 1,9 ns ( $F_1$ ). Auch nach 24 Stunden liegen die Abklingzeiten noch unter den Werten der Autofluoreszenz.

Der Vergleich zwischen Tumor und Normalgewebe zeigt bei  $A_1$  (H3) im Tumor rund 200 ps geringere Werte, als im Normalgewebe. Bei dieser Messung konnte nur in einem Teil des Tumors Fluoreszenz festgestellt werden. Die Intensität der Tumorfluoreszenz lag unter der des Normalgewebes. Für die Auswertung wurde nur der Teil des Tumors herangezogen, der sich durch Fluoreszenz abzeichnete. Bei der Formulierung  $F_1$  (H2) liegt anders als bei der Formulierung  $A_1$  die Abklingzeit im Tumor stets um circa 100 ps über den Werten im Normalgewebe.

## 5.4 In-vivo-Messungen mit Rhodamin-Liposomen am Hamstermodell

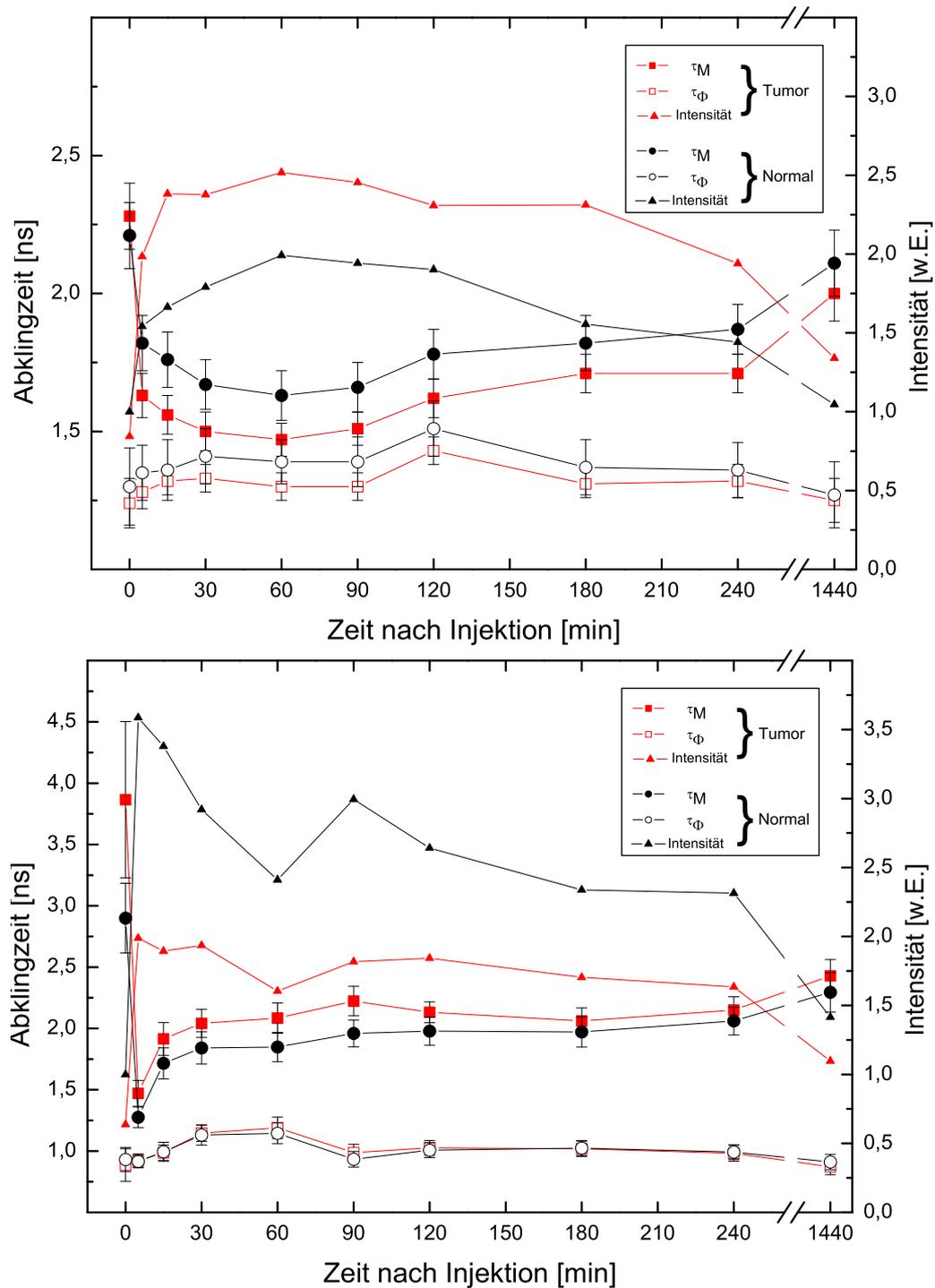


Abbildung 5.19: Zeitlicher Verlauf der scheinbaren Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  nach Gabe der Liposomformulierungen mit der längsten ( $\tau = 1,75$  ns, H2, oben) und der kürzesten ( $\tau = 0,75$  ns, H3, unten) Fluoreszenzabklingzeit der in vitro vermessenen Liposomformulierungen.

### 5.4.2 Extraktion der Rhodamin-Kinetik und Rhodaminabklingzeiten

Genauere Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Rhodamin-Fluoreszenz erfordern eine Entkoppelung der im Messsignal gemischten Beiträge Autofluoreszenz und Rhodaminfluoreszenz. Die Kinetik der Rhodaminfluoreszenz bewirkt, dass bei den Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion die relative Amplituden der Fluoreszenzbeiträge des Rhodamin und der Autofluoreszenz unterschiedlich sind. Mögliche Veränderungen in der Abklingzeit der Rhodaminfluoreszenz ist in der Abklingzeit des Gesamtsignals daher nicht auszumachen. Die Darstellung der Rhodaminkinetik und des Tumor-Normalverhältnisses der Rhodaminfluoreszenz sei hier auf die Formulierung  $D_1$  in der Standarddosierung beschränkt. Die anderen Liposomformulierungen sind vor allem für den nächsten Abschnitt von Interesse.

**Rhodaminkinetik und Tumor/Normal-Verhältnis** Für die Untersuchung der Rhodaminkinetik und des Tumor/Normal-Verhältnisses muss zunächst die von den Liposomen hervorgerufene Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Die Extraktion des Fluoreszenzbeitrags, der von den Liposomen herrührt, lässt sich auf einfache Weise durchführen. Die Messung der Autofluoreszenz zum Zeitpunkt  $t = 0$  vor der Injektion liefert dafür die nötigen Informationen unter der Annahme, dass sich der Beitrag der Autofluoreszenz zeitlich nicht ändert. Um den Dynamikbereich der Kamera möglichst gut zu nutzen, wurden die einzelnen Messungen bei unterschiedlichen, der jeweiligen Fluoreszenzintensität angepassten Verstärkungseinstellungen des Bildverstärkers gemacht. Für die Berechnung des Beitrags der Rhodaminfluoreszenz muss daher die Autofluoreszenzintensität zum Zeitpunkt  $t = 0$  mit der jeweiligen Verstärkungskorrektur vom Gesamtsignal zum Zeitpunkt  $t > 0$  abgezogen werden.

Bei der Formulierung  $D_1$  in der Standarddosierung wird das Maximum der Fluoreszenzintensität 15 Minuten nach Injektion erreicht (Abbildung 5.20). Im weiteren Verlauf sinkt die Fluoreszenzintensität im Tumor und im Normalgewebe bis sie nach 24 Stunden ungefähr 50 % der Autofluoreszenzintensität erreicht. Aus dem Verlauf der Intensitäten ergibt sich das Tumor/Normal-Verhältnis der Rhodaminfluoreszenz. Bereits 5 Minuten nach Gabe der Liposomsuspension ist die Rhodaminfluoreszenz im Tumor höher als im Normalgewebe. Im Normalgewebe nimmt die Fluoreszenz im weiteren Verlauf schneller ab als im Tumor. Das Maximum im Zeitraum bis 240 Minuten nach Injektion liegt bei 180 Minuten mit einem Tumor/Normal-Verhältnis der Rhodaminintensität von rund 2,3. Der maximale Wert des Intensitätsverhältnisses wird nach 24 Stunden erreicht.

**Extraktion der Rhodamin-Abklingzeiten** Von wesentlich grösserem Interesse, als die Bestimmung einer Kinetik, ist bei den zeitaufgelösten in-vivo-Messungen der Liposomformulierungen die Fragestellung, ob eine Veränderung der Rhodaminabklingzeit zu beobachten ist. Bei den Abklingzeiten führt das Vorhandensein mehrerer Fluoreszenzbeiträge mit unterschiedlichen Abklingzeiten bei der für die Messungen verwendeten Frequency-domain-Methode nicht zu einer Summe oder einem einfa-

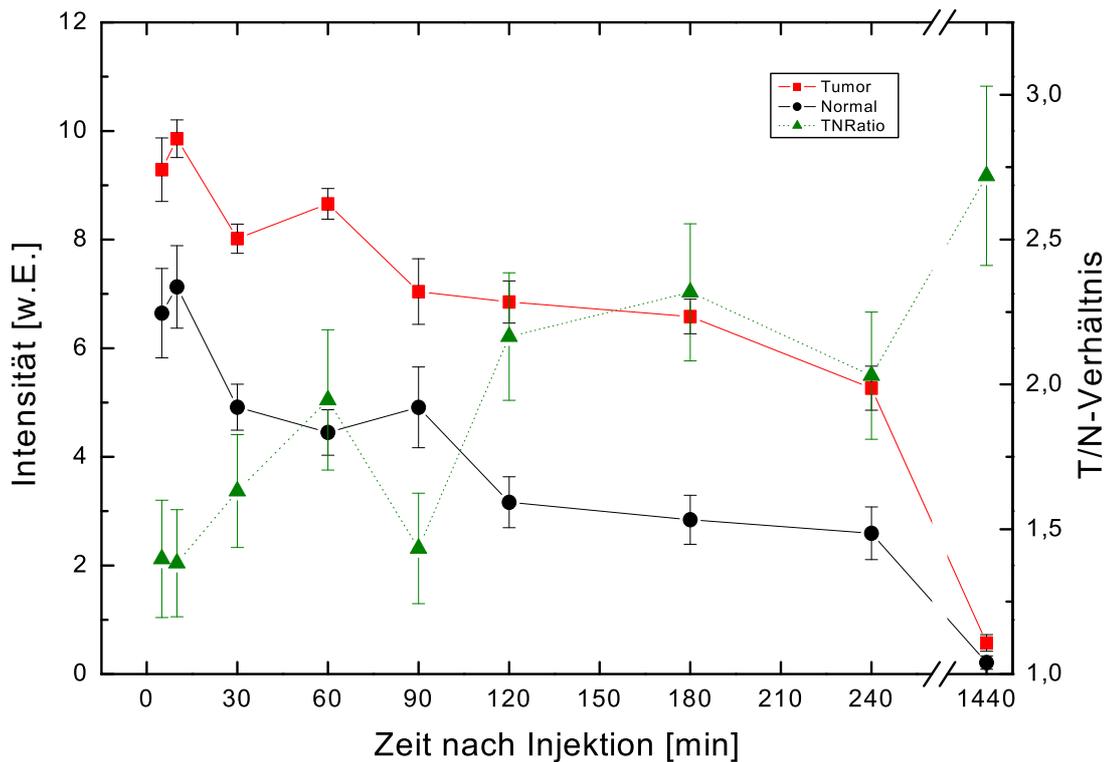


Abbildung 5.20: Kinetik und Tumor/Normal-Verhältnis der Rhodaminfluoreszenz nach Gabe der Formulierung  $D_1$  in der Standarddosierung. Die Intensitätswerte in der Darstellung der Kinetik sind auf die Autofluoreszenz im Normalgewebe normiert.

chen Mittelwert der einzelnen Beiträge, wie dies bei der Intensität der Fall ist. Die Gesamtphasenverschiebung und Gesamtdemodulation, aus denen die scheinbaren Abklingzeiten berechnet werden, ergeben sich aus den Abklingzeiten  $\tau_i$  und relativen Amplituden  $\alpha_i$  der Fluoreszenzbeiträge sowie der Modulationsfrequenz  $\omega = 2\pi f$  nach den in Kapitel 1 angegebenen Formeln 2.16 und 2.15.

Allerdings sind hier die genauen Mischungsverhältnisse und Abklingzeiten der Fluoreszenzbeiträge nicht bekannt. Die Autofluoreszenzmessung vor der Injektion der Liposomen ( $t=0$ ) liefert Abklingzeiten  $\tau_M^0$  und  $\tau_\Phi^0$ , die selbst ebenso scheinbare mittlere Abklingzeiten sind, da die Autofluoreszenz sich aus Beiträgen mit unterschiedlichen Abklingzeiten zusammensetzt. Diese scheinbaren Fluoreszenzabklingzeiten lassen sich in einem Modellansatz verwenden: Die Gesamtdemodulation setzt sich aus einem Beitrag mit der Abklingzeit  $\tau_M^0$  und dem Rhodaminbeitrag ( $\tau_M^{Rh}$ ), dessen Abklingzeit hier errechnet werden soll, zusammen. Entsprechend ergibt sich die Gesamtphasenverschiebung aus einem Fluoreszenzbeitrag mit der Abklingzeit  $\tau_\Phi^0$  und dem Rhodaminbeitrag  $\tau_\Phi^{Rh}$ . Für die Berechnung der Rhodaminabklingzeiten lassen sich auf diese Weise die obigen Gleichungen (mit  $i = 1$ : Autofluoreszenz zum Zeitpunkt  $t = 0$ ,  $i = 2$ : Rhodamin) nach dem zweiten Beitrag auflösen. Die relativen

Amplituden der Beiträge nach Injektion liegen dabei aus der oben durchgeführten Berechnung der Rhodaminkinetik vor.<sup>5</sup> Diese Berechnung sei hier auf die scheinbaren Abklingzeiten  $\tau_M^{Rh}$  des Rhodamin beschränkt, da sich in den Phasenabklingzeiten keine signifikanten Veränderungen durch die Liposominjektion feststellen ließen. Ebenfalls ausgeschlossen werden soll die Messung nach 24 Stunden, da dort das geringe Fluoreszenzsignal zu einem deutlich schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis führt. In der Berechnung potenzieren sich die Fehler, so dass aus den Werten nach 24 Stunden keine zuverlässigen Aussagen zu gewinnen sind.

Durch die Berechnung der Abklingzeiten  $\tau_M^{Rh}$  und  $\tau_\Phi^{Rh}$  soll geklärt werden, ob die Liposomen in-vivo die gleichen Abklingzeiten zeigen wie bei den in-vitro-Messungen und ob Veränderungen Hinweise auf eine Strukturveränderung der Liposomen geben. Bei der Formulierung D<sub>1</sub> in der Standarddosierung entspricht der berechnete Wert von rund 1,25 ns für die Rhodaminabklingzeit  $\tau_M^{Rh}$  5 min nach Injektion im Rahmen der Fehler dem Wert der in-vitro-Messung (Abbildung 5.21 oben). Bis zu zwei Stunden nach der Injektion bleibt dieser Wert mit Schwankungen sowohl im Tumor, als auch im Normalgewebe erhalten. Zu längeren Zeiten (3, 4 Stunden) ergibt sich ein Anstieg auf eine Abklingzeit, die etwa 0,4 ns über dem Wert der in-vitro-Messung liegt.

Für die Messung H2 nach Gabe der Liposomformulierung mit der längsten Abklingzeit von 1,8 ns in-vitro (Abbildung 5.21 mitte) findet sich eine Rhodaminabklingzeit direkt nach Injektion, die mit 1,1 ns dem Wert der Formulierung D<sub>1</sub> nahe kommt. Im zeitlichen Verlauf bis zu vier Stunden nach Injektion zeigen sich Schwankungen im errechneten Wert der Rhodaminabklingzeit, aber ohne signifikante Tendenz eines Anstiegs oder Abfalls. Mit einer Rhodaminabklingzeit von rund 1,0 ns 5 Minuten nach Injektion der Liposomen liegt bei der Messung H3 (in-vitro: 0,8 ns) die niedrigste errechnete Rhodaminabklingzeit vor (Abbildung 5.21 unten). Hier ist auch der stärkste Anstieg im zeitlichen Verlauf festzustellen: Zwischen 90 Minuten und vier Stunden nach Injektion ergibt sich ein mittlerer Wert der Rhodaminabklingzeit von 1,5 ns.

Für alle drei Messungen zeigen die errechneten Rhodaminabklingzeiten im Rahmen der Fehler keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor und Normalgewebe.

---

<sup>5</sup> Dieser Ansatz liefert kein mathematisch exaktes Ergebnis für einzelne Abklingzeiten in mehrkomponentigen Mischungen. Allerdings liegen die Abweichungen bei den hier vorliegenden Verhältnissen in der Grössenordnung der Fehler der Messwerte selbst, wie anhand von Simulationen überprüft wurde.

## 5.4 In-vivo-Messungen mit Rhodamin-Liposomen am Hamstermodell

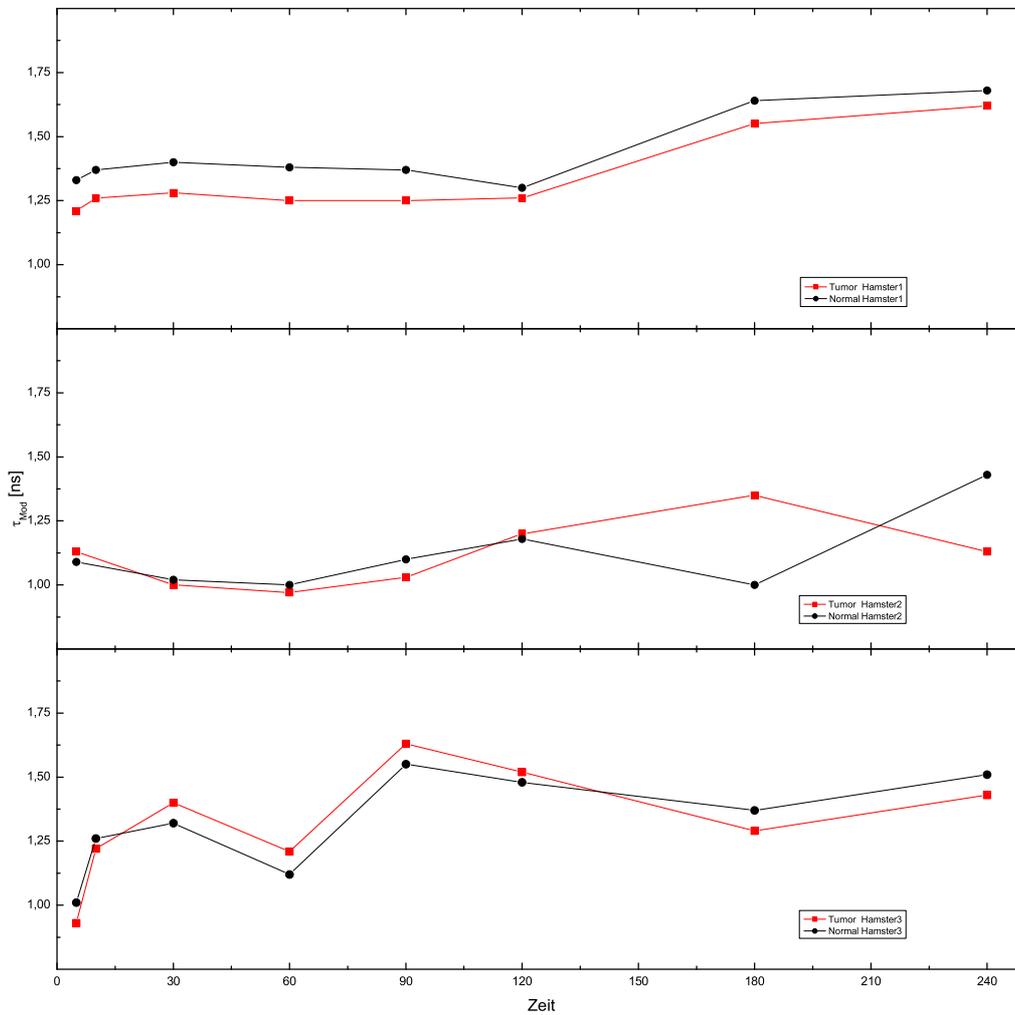


Abbildung 5.21: Aus den Gesamtabklingzeiten extrahierte Fluoreszenzabklingzeit  $\tau_M^{Rh}$  der Rhodaminfluoreszenz nach Injektion der Liposomsuspensionen (H1 - oben, H2 - mitte, H3 - unten). Auf die Angabe eines mathematisch nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung errechneten Fehlers wurde verzichtet. Statt dessen wurde die Berechnung auch nach Addition der Standardabweichung der Messwerte sowie nach ihrer Subtraktion durchgeführt. Daraus lässt sich der Fehler der Berechnungen zu rund 200 ps abschätzen.



## 6 Diskussion

### 6.1 In-vitro-Messungen an Farbstofflösungen

Neben der Diskussion der Ergebnisse der Messungen an Farbstofflösungen hinsichtlich Messgenauigkeit des Systems und Auflösbarkeit von Lebensdauerkontrasten wird im Folgenden besonderer Wert auf die Darstellung der Anwendung des Messsystems gelegt. Die wichtigsten Aspekte im Messablauf und in der Datenauswertung sowie Dateninterpretation werden anhand dieser Messungen erläutert.

#### 6.1.1 Fluoreszenzabklingzeiten homogener Farbstofflösungen

Die Eichung des Systems anhand der Modulation und Phasenlage des Anregungslichts als Referenzwerte liefert für Rhodamin 101 sowohl bei 40 MHz als auch bei 100 MHz dem Literaturwert von  $\tau = 4,34$  ns [Sch97c] entsprechende Ergebnisse. Die Abweichungen davon betragen 100 - 200 ps.

In der Praxis praktikabler als eine Eichung auf das Anregungslicht ist die Verwendung einer Probe mit bekannter Fluoreszenzabklingzeit. Auf diese Weise ist keine Reduktion der Intensität des Anregungslichts durch zusätzliche Filter oder optische Komponenten wie Strahlteiler im Lichtweg erforderlich. Die im Vergleich zur Intensität des Anregungslichts um Größenordnungen geringere Intensität von fluoreszierenden Proben vermindert darüberhinaus die Gefahr einer Zerstörung des Bildverstärkers durch zu hohe Lichtintensitäten, die bei einer Messung des Anregungslichts mit nicht ausreichenden Filtern leichter auftreten können. Rhodamin 101 lässt sich aufgrund seiner temperaturunabhängigen Abklingzeit und seiner spektralen Eigenschaften für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen gut als Referenzprobe verwenden.

Die mit Rhodamin 101 als Referenz bestimmten Fluoreszenzabklingzeiten der anderen homogenen Lösungen liegen ebenso im Einklang mit Angaben verschiedener Autoren:

- Für DCM wird in [Ham79] für eine 24  $\mu$ M Lösung in Ethanol eine Abklingzeit von  $\tau = 1,9$  ns angegeben. Der Unterschied zu dem in dieser Arbeit gemessenen Wert liegt bei 100 ps.
- Sulforhodamin B entspricht in seiner Ringstruktur und seinen Eigenschaften als Laserfarbstoff Rhodamin B. Die Angaben für die Fluoreszenzabklingzeit von Rhodamin B liegen bei  $\tau = 2,85$  ns ([Lam83] und [Koe78]) beziehungsweise  $\tau =$

2,88 ns ([Har77]) bei einer 10  $\mu\text{M}$  Lösung in Ethanol. Diese Werte decken sich ebenso im Bereich von 100 ps mit dem hier gemessenen Wert für Sulforhodamin B.

- Direkte Vergleichswerte liegen für Rhodamin 123 in Ethanol nicht vor. In Phosphatpufferlösung (PBS) bestimmte [Sch97a] die Fluoreszenzabklingzeit in Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  zu  $\tau = 4,5 - 5,5$  ns.

Insgesamt lässt sich aus dem Vergleich der gemessenen Abklingzeiten mit den Literaturwerten sowie der Streuung der gemessenen Werte  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  um den jeweiligen Mittelwert die absolute Genauigkeit mit welcher Fluoreszenzabklingzeiten mit dem System bestimmt werden können, zu circa 200 ps ansetzen. Voraussetzung dafür ist eine zuverlässige Referenzzeichnung. Die Mittelung über viele Bildpunkte und eine Serie von mehreren Messungen reduziert die statistische Unsicherheit des Messwerts durch die Reduzierung der Standardabweichung. Die in Tabelle 5.1 aufgelisteten Werte sind aufgrund der Anzahl von 80688 Bildpunkten und einer Serie von 10 Messungen als Mittelwerte aus annähernd  $10^6$  Einzelmessungen anzusehen.

**Auflösbarkeit von Fluoreszenzlebensdauerunterschieden** Üblicherweise wird als Kriterium für die Trennbarkeit zweier Verteilungen eine Differenz ihrer Mittenwerte von mindestens der vollen Halbwertsbreite der Verteilungen gefordert. Die Histogramme der Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  weisen bei Anpassung einer gaußförmigen Verteilung eine volle Halbwertsbreite von circa 180 ns auf. Entsprechend sind rund 200 ps als mit dem Messsystem auflösbare Abklingzeitunterschiede anzusetzen.

Man muss sich jedoch dessen bewusst sein, dass eine entsprechende Auflösung nicht pauschal für alle Messungen an beliebigen Proben und mit beliebigen Modulationsfrequenzen erwartet werden kann. Die hohe Quantenausbeute eines Laserfarbstoffs, wie er für diese Messung verwendet wurde, führt zu Fluoreszenzintensitäten, die in den meisten biologischen Proben nicht vorliegen. Längere Integrationszeiten für die Einzelaufnahmen der Phasenserie lassen zwar das Signal-Rauschverhältnis bei geringer Fluoreszenzintensität der Probe besser werden, allerdings sind durch Ausbleicheffekte, die die Messergebnisse verfälschen können, dafür meist Grenzen gesetzt. Ein höheres Signal auf dem Kamerachip und somit bessere Digitalisierung lässt sich dann nur durch höhere Verstärkung am Bildverstärker oder der CCD-Kamera erreichen, wodurch allerdings das elektronische Rauschen bei der Verstärkung erhöht wird. Insgesamt ist bei biologischen Proben von breiteren Verteilungen auszugehen und somit etwas geringerem Auflösungsvermögen von Fluoreszenzlebensdauerunterschieden.

Darüberhinaus kann für den Fall mehrerer Fluoreszenzbeiträge in der Probe mit stark differierenden Fluoreszenzabklingzeiten nicht für alle Beiträge die gleiche Genauigkeit erreicht werden. Das Hauptaugenmerk der jeweiligen Untersuchung bestimmt, welche Modulationsfrequenz gewählt wird. Dadurch lassen sich für Abklingzeiten, deren Produkt mit der Kreisfrequenz  $\omega$  der Modulation nicht nahe 1 liegt, Unterschiede

wesentlich schlechter auflösen ([Gra84b] [Alc87]). Bei den vorliegenden Messungen ist dies in den Standardabweichungen der Abklingzeit von Rhodamin 101 ersichtlich: Bei der Modulationsfrequenz von 100 MHz ( $\omega\tau_{Rh101} = 2,7$ ) sind die Standardabweichungen ungefähr um einen Faktor drei größer als bei 40 MHz ( $\omega\tau_{Rh101} = 1,1$ ).

**Visualisierung von Fluoreszenzlebensdauerunterschieden** Die simultane Messung der vier homogenen Farbstofflösungen in jeweils einer Glaskapillare dient hauptsächlich der Veranschaulichung, wie mit dem Messsystem lokale Unterschiede von Fluoreszenzabklingzeiten gemessen und visualisiert werden können. Die vier Kapillare stellen dabei ein einfaches Modellsystem für klar getrennte Areale einer Probe mit unterschiedlichen Fluoreszenzabklingzeiten dar.

Sehr gut ist bei dieser Messung die vollständige Unabhängigkeit der Fluoreszenzabklingzeiten von den lokalen Intensitätsverhältnissen zu erkennen. Trotz des ausgeprägten Intensitätsprofils des Anregungslichts und der über den Querschnitt der Kapillare nach außen hin abnehmenden Höhe der Flüssigkeitsmenge, sind die Werte für die Abklingzeit jeweils über die ganze Kapillare homogen. Lediglich in Bereichen niedrigen Signals variieren die Werte aufgrund des schlechteren Signal-Rauschverhältnisses in einem weiteren Bereich um den Mittelwert.

Die Intensitätsunabhängigkeit der Abklingzeitmessung ist ein besonders günstiger Aspekt der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion: Die Fluoreszenzabklingzeit, durch welche das Fluorophor charakterisiert ist, kann unabhängig von der Signalintensität und somit auch der Fluorophorkonzentration gemessen werden<sup>1</sup>. Gerade die Abhängigkeit des Signals von der Fluorophorkonzentration und Einflüsse wie zum Beispiel die Absorption durch Blut stellen bei nichtzeitaufgelösten Messmethoden oftmals erhebliche Probleme dar. Insgesamt zeigt diese Messung den Informationsgewinn der Identifizierung von Fluorophoren anhand ihrer Fluoreszenzabklingzeit, welcher durch die zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz zusätzlich zu der Information ihrer Lokalisation gewonnen wird.

### 6.1.2 Scheinbare Fluoreszenzabklingzeiten heterogener Farbstofflösungen

Wie in der Darstellung der Phasenbereichmethode für die Messung von Fluoreszenzabklingzeiten dargelegt (Abschnitt 2.2.3.2), ergibt die Berechnung von Abklingzeiten mit den für ein monoexponentielles Abklingverhalten geltenden Formeln 2.26 und 2.25 bei Anwendung auf eine heterogene Mischung nicht die wahren Abklingzeiten. Die auf diesem Wege berechneten Werte  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  sind als „scheinbare“ Abklingzeiten zu verstehen, ähnlich einer mittleren Abklingzeit. Sie geben dabei allerdings nicht direkt die mittlere Intensitätsabklingzeit  $\langle\tau\rangle = \sum a_i\tau_i^2 / \sum a_i\tau_i$  wieder, die sich aus den Abklingzeiten  $\tau_i$  und relativen Amplituden  $a_i$  berechnet ([Sil98]). Wie im Abschnitt

---

<sup>1</sup> Die Konzentrationsunabhängigkeit gilt allerdings nur, sofern die Abklingzeit selbst nicht konzentrationsabhängig ist und bei mehreren Fluoreszenzbeiträgen bei unterschiedlichen Konzentrationen die gleichen relativen Amplituden der Fluoreszenzbeiträge vorliegen.

2.2.3.2 aufgezeigt, müsste bei Unterschieden der Abklingzeiten stets die Bezeichnung „scheinbare Abklingzeiten“ verwendet werden, um den Unterschied zu verdeutlichen. Darauf wird jedoch im weiteren Verlauf der Arbeit auch verzichtet, da diese Interpretation der Werte von  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  im Folgenden als selbstverständlich angesehen werden kann.

Anhand der Simulation ist zu erkennen, dass die gewonnenen Werte genau dem theoretischen Verlauf einer zweikomponentigen Mischung mit Fluoreszenzabklingzeiten von 4,34 ns und 1,8 ns entsprechen. Der Wert von 1,8 ns liegt in Hinblick auf den in Abschnitt 5.1.1 bestimmten Wert der Fluoreszenzabklingzeit von DCM ( $\tau = 2,0$  ns) im Bereich der oben angegebenen Genauigkeit. Die Differenz in den Werten von  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  lässt, wie durch diese Messung demonstriert, bei der Phasenbereichsmethode sofort die Heterogenität der Probe erkennen.

Aus den Abweichungen in  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  ließe sich hier für die Mischlösungen das jeweilige Mischungsverhältnis berechnen. Dies ist möglich, da durch die Messung der homogenen Stammlösungen zwei der Parameter in den Gleichungen 2.15 und 2.16, nämlich die Fluoreszenzabklingzeiten der beiden Beiträge, bekannt sind. In entsprechenden Fällen in biologischen Proben lassen sich durch die scheinbaren Abklingzeiten dementsprechend quantitative Aussagen über Konzentrationsverhältnisse verschiedener Fluorophore gewinnen. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass dabei reine Konzentrationseffekte vorliegen und nicht eine Heterogenität der Mikroumgebung zu Veränderungen in den Fluoreszenzabklingzeiten führt.

Auch ohne genauere Kenntnis der Ursachen der Heterogenität und quantitative Auswertung von Mischungsverhältnissen können die Unterschiede in den scheinbaren Abklingzeiten wertvolle Informationen liefern: Konzentrationsverschiebungen und Veränderungen in der Mikroumgebung der Fluorophore zeigen sich in heterogenen Proben in entsprechend größerer oder kleinerer Differenz der scheinbaren Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$ . Diese Veränderungen der Abklingzeitunterschiede können somit ausreichend sein, Areale einer Probe mit differierenden Gegebenheiten gegeneinander abzugrenzen.

## 6.2 In-vitro-Messungen endogener und exogener Fluorophore

### 6.2.1 Reinsubstanzen der endogenen Gewebefluoreszenz

Die vorliegenden Messungen des Abklingverhaltens von Reinsubstanzen der endogenen Gewebefluoreszenz dienen in erster Linie dazu, für folgende Messungen von biologischem Gewebe in-vitro und in-vivo das grundlegende Wissen zu erhalten, wie sich die Fluoreszenz dieser Fluorophore bei der Phasenbereichsmethode darstellt. Auf diese Weise ist die Handhabe gegeben, diese Fluorophore in dem komplexen Umfeld von biologischem Gewebe zu identifizieren und zu lokalisieren. Im Folgenden steht die Frage im Vordergrund, wie die gemessenen Abklingzeiten mit den Eigenschaften der Fluorophore zusammenhängen und inwieweit die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse mit den Veröffentlichungen anderer Autoren in Einklang stehen.

**Kollagen und Elastin** Die Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  der Kollagene und von Elastin (siehe Tabelle 5.2) zeigen deutliche Abweichungen von einem monoexponentiellen Abklingverhalten. Die Modulationsabklingzeiten der Strukturproteine sind mit 3,8 - 4,4 ns bei der Modulationsfrequenz von 40 MHz ungefähr 1,5 ns größer als die Phasenabklingzeiten. Bei 100 MHz ergeben sich entsprechende Unterschiede, wobei rund 1 ns geringere Abklingzeiten vorliegen als bei 40 MHz. Die unterschiedlichen Kollagene zeigen nur geringe Unterschiede, die maximal 300 ps betragen. Elastin liegt in seinen Abklingzeitwerten insgesamt leicht unter den Werten der Kollagene.

Veröffentlichte Daten über Fluoreszenzabklingzeiten der Strukturproteine liegen nur von einigen wenigen Arbeitsgruppen vor. Bei diesen Arbeiten wurde die Fluoreszenz der Strukturproteine im ultravioletten Spektralbereich mit einem Stickstofflaser bei 337 nm angeregt und die Datenerfassung mit der Zeitbereichsmethode durchgeführt. Unterschiede zwischen den Arbeiten liegen vor allem in der Art der Anpassung von ein- zwei- sowie drei-komponentigen Abklingmodellen an die Messdaten (siehe Tabelle 6.1).

Für **Kollagen** (Typ I) wird im Bereich des Fluoreszenzmaximums um 385 nm (Anregungswellenlänge 337 nm) in [AE91a] ein Abklingverhalten mit drei exponentiellen Beiträgen bestimmt. Ein Beitrag zum Abklingverhalten mit 5 ns Abklingzeit hat eine Amplitude von knapp 50 %, während ein Beitrag mit 9,9 ns 30 % und ein kurzlebiger Beitrag mit 0,78 ns 25 % beisteuern. Nahezu identische Werte wie die Abklingzeiten der beiden kurzlebigen Beiträge in [AE91a] bestimmen Mycek und Koautoren ([Myc00]). Das von ihnen gefundene Abklingverhalten ist somit deutlich schneller, da der bei [AE91a] langlebigste Beitrag mit 9,94 ns und einer Amplitude von 30 % vollkommen wegfällt. Die ausführlichsten Untersuchungen des Abklingverhaltens wurden von der Arbeitsgruppe um Warren S. Grundfest veröffentlicht ([Mar00], [Maa00a]). Durch die Bestimmung der Fluoreszenzabklingkurve bei 29 diskreten Wellenlängen im Bereich zwischen 370 bis 510 nm gibt [Maa00a] detaillierte Informationen über das spektral deutlich variierende Abklingverhalten. Die Analyse der Daten mit einer einzi-

$\lambda_{Ex}$	$\lambda_{Em}$	$\tau_1$	$(\alpha_1)$	$\tau_2$	$(\alpha_2)$	$\tau_3$	$(\alpha_3)$	Quelle
[nm]	[nm]	[ns]	([%])	[ns]	([%])	[ns]	([%])	
Kollagen I								
337	380	0,78	(24,8)	4,99	(45,5)	9,94	(29,7)	[AE91a]
337	—	0,71	(41)	5,02	(59)	—	—	[Myc00]
337	390	4,3		—	—	—	—	[Maa00a]
337	390	2,7	(59)	8,4	(41)	—	—	[Maa00a]
337	510	0,7	(40)	7,0	(60)	—	—	[Maa00a]
335	398	1,4	(19)	5,5	(45)	13,5	(36)	[Kle99]
432	550	1,4	(45)	5,5	(45)	13,5	(10)	[Kle99]
Elastin								
337	380	0,5	(54,8)	2,65	(36,1)	7,83	(9,2)	[AE91a]
337	—	1,12	(27)	6,2	(73)	—	—	[Myc00]
337	390	2,3		—	—	—	—	[Maa00a]
337	390	1,3	(63)	5,7	(37)	—	—	[Maa00a]
337	510	1,3	(65)	6,2	(35)	—	—	[Maa00a]
335	418	2,2	(37)	6,6	(54)	15,8	(9)	[Kle99]
468	514	2,2	(57)	6,6	(40)	15,8	(3)	[Kle99]

Tabelle 6.1: Veröffentlichungen über Abklingzeiten von Kollagen und Elastin. Die Messungen sind von den Autoren mit der Zeitbereichsmethode bei den angegebenen Anregungs- und Emissionswellenlängen durchgeführt und mit ein- zwei- oder drei-komponentigen Abklingmodellen analysiert worden. Fehlende Angaben sind durch — bezeichnet.

gen Abklingzeit ergibt für gelöstes Kollagen im Maximum von 390 nm einen Wert von 4,3 ns, der im Bereich zwischen 370 bis 430 nm nahezu konstant bleibt. Bis 510 nm sinkt dieser Wert kontinuierlich ab bis auf 1,5 ns. Ähnliches spektrales Verhalten fanden die Autoren auch bei der Analyse mit einem biexponentiellen Ansatz, der bei 390 nm Werte von 2,7 ns und 8,4 ns bei einem Amplitudenverhältnis von 59:41 lieferte. Die Werte bei 510 nm sind wie beim monoexponentiellen Ansatz mit 0,7 ns und 7 ns deutlich geringer als im Maximum der Fluoreszenz bei 390 nm, so dass trotz des Amplitudenverhältnisses von 40:60 eine schnellere Kinetik im langwelligen

Emissionsbereich vorliegt. Eine Untersuchung des Abklingverhaltens von Kollagen durch Kleinman ([Kle99]) ist angesichts der bei [Maa00a] aufgezeigten spektralen Abhängigkeit der Abklingzeiten von besonderem Interesse, da in ihr der spektrale Bereich der Fluoreszenzemission weiter zum Langwelligen hin ausgedehnt ist, als bei den oben genannten Veröffentlichungen. Kleinman verwendet ein triexponentielles Modell und findet dabei für Kollagen II bei 398 nm Abklingzeiten von 1,4 ns, 5,5 ns und 13,5 ns mit einem Amplitudenverhältnis von 19:45:36. Das Amplitudenverhältnis verschiebt sich zu 45:45:10 bei der Anregung mit 432 nm und Detektion bei 550 nm.

Das Abklingverhalten von **Elastin** wird in allen genannten Arbeiten ebenso untersucht und wie bei Kollagen mit ein- zwei- sowie drei-komponentigen Abklingmodellen beschrieben. Wie aus Tabelle 6.1 ersichtlich ist, unterscheiden sich die Ergebnisse der Arbeiten bei Elastin sehr viel mehr als bei Kollagen. In [AE91a] und [Maa00a] wird bei Elastin ein deutlich schnelleres Abklingverhalten als bei Kollagen gefunden. Mit einer Abklingzeit von 2,3 ns in einem monoexponentiellen Modell (4,3 ns bei Kollagen) ermittelt [Maa00a] somit eine Abklingrate für Elastin die annähernd doppelt so groß ist wie bei Kollagen. Bei [Myc00] und [Kle99] hingegen liegen alle Abklingzeiten von Elastin über denen von Kollagen. Die Gewichtung der zwei oder drei Beiträge des Abklingmodells ist darüberhinaus stärker von den langlebigen Beiträgen dominiert als bei Kollagen. Wie für Kollagen wird in [Maa00a] und [Kle99] auch für Elastin auf eine spektrale Abhängigkeit des Abklingverhaltens hingewiesen. Das Ausmaß ist allerdings wesentlich geringer als bei Kollagen. In beiden Veröffentlichungen klingt die Fluoreszenz im Langwelligen etwas schneller ab, als im kurwelligen Emissionsbereich.

Der Vergleich der in dieser Arbeit gewonnenen scheinbaren Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  der Strukturproteine Kollagen und Elastin mit den veröffentlichten Daten ist wegen der unterschiedlichen Messmethoden von Zeitbereich- und Phasenbereichmessung nicht direkt möglich. Dies erfordert eine Berechnung, welche scheinbaren Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  eine bi- oder triexponentielle Fluorophormischung mit den in den Veröffentlichungen angegebenen Werten bei einer Phasenbereichmessung zeigen würde. Dafür wurden mit den Abklingzeiten  $\tau_i$  und den Amplituden  $\alpha_i$  der Veröffentlichungen nach den Formeln 2.15 und 2.16 die resultierende Gesamtdemodulation und Gesamtphasenverschiebung bestimmt und daraus mit den monoexponentiellen Formeln 2.13 und 2.14 scheinbare Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  berechnet. In Tabelle 6.2 sind die Daten dieser Arbeit Simulationsrechnungen mit den Daten aus den angegebenen Veröffentlichungen gegenübergestellt.

Die teilweise deutlichen Unterschiede der Abklingzeiten in den Veröffentlichungen schlagen sich in den Simulationen entsprechend nieder. Die Simulationen für **Kollagen** mit Werten, die bei einer Emissionswellenlänge um 390 nm gefunden wurden, zeigen insgesamt eine tendenzielle Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gewonnenen Werten. Sie liegen aber mit bis zu 1 - 2 ns Unterschied weiter von den Werten dieser Arbeit weg, als die bei den Simulationen mit den Abklingzeiten bei Emissionswellenlängen über 500 nm. Wegen der spektralen Abhängigkeit des Ab-

Herkunft	$\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$ [nm] / [nm]	40 MHz		100 MHz	
		$\tau_M$ [ns]	$\tau_\Phi$ [ns]	$\tau_M$ [ns]	$\tau_\Phi$ [ns]
Kollagen					
diese Arbeit	457 >500	4,3	2,5	3,1	1,5
[AE91a]	335 / 380	5,5	3,2	4,0	1,8
[Myc00]	335	3,8	2,3	2,7	1,3
[Maa00a]	335 / 390	4,7	3,2	4,0	3,2
[Kle99]	335 / 398	6,7	4,2	5,2	2,8
[Maa00a]	335 / 510	5,0	2,4	3,1	1,1
[Kle99]	432 / 550	4,3	2,7	3,1	1,9
Elastin					
diese Arbeit	457 >500	3,8	2,7	2,9	1,8
[AE91a]	335 / 380	2,4	1,3	1,7	0,9
[Myc00]	335	5,4	3,5	4,0	2,1
[Maa00a]	335 / 390	4,3	3,0	3,3	2,1
[Kle99]	335 / 418	5,3	3,8	4,3	3,1
[Maa00a]	335 / 510	3,3	2,0	2,3	1,6
[Kle99]	432 / 550	4,2	3,1	3,4	2,7

Tabelle 6.2: Vergleich der in dieser Arbeit gemessenen scheinbaren Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  von Kollagen (Mittelwert der Werte von Kollagen I, II und VIII) und Simulationsrechnungen anhand der in Tabelle 6.1 angegebenen Literaturwerte. Für die Simulationsrechnungen wurden die angegebenen Abklingzeiten und ihre Amplitudenverhältnisse verwendet, um die scheinbaren Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  zu berechnen, die sich bei einer Messung mit der Phasenbereichmethode ergeben würden.

klingsverhalten von Kollagen, wie sie in den Arbeiten ([Kle99]) und [Maa00a] aufgezeigt ist, sind vor allem die Daten dieser Arbeiten mit Emissionswellenlängen über 500 nm für den Vergleich heranzuziehen. Die Unterschiede der Simulationen zu den in dieser Arbeit gemessenen scheinbaren Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  sind in den meisten Werten minimal, so dass die vorliegenden Messungen und die veröffentlichten Daten in konsistentem Zusammenhang stehen. Bei **Elastin** fällt der Vergleich mit den Simulationen entsprechend den Simulationen bei Kollagen aus. Bei den Simulationen mit Daten der Fluoreszenzemission über 500 nm ist die Übereinstimmung ähnlich wie bei Kollagen, wenn auch etwas schwächer ausgeprägt.

Die zum Teil recht unterschiedlichen Ergebnisse, die verschiedene Autoren bei der Analyse der Strukturproteine gefunden haben, weisen auf die komplexen Gegebenheiten beim Abklingverhalten hin. Anders als bei Messungen an Fluorophoren mit monoexponentiellem Abklingverhalten oder an Mischungen mit zwei oder drei in ihren Abklingzeiten klar unterschiedenen Fluorophoren sind die Anpassungen von Exponentialfunktionen an das Abklingverhalten der Strukturproteine eher als mathematische Beschreibung der Abklingkurve denn als Aufteilung in einzelne distinkte Fluoreszenzbeiträge zu sehen. Der Aufbau der Strukturproteine aus drei helikalen Polypeptidketten und ihre makromolekulare Aggregation über Aminosäuren-crosslinks hat Fluoreszenzbeiträge von deutlich mehr als nur zwei oder drei unterschiedlichen Fluorophoren zur Folge ([Maa00a], [Kle99]). In [Lee01] wird darüberhinaus eine kontinuierliche Verteilung von Abklingzeiten bei den Strukturproteinen durch die lokale chemische Umgebung diskutiert, wie sie auch entsprechend bei Tryptophan in Proteinen gefunden wurde ([Alc94]).

**Lipoprotein** Anders als für die anderen endogenen Gewebefluorophore liegen für das  $\alpha$ -Lipoprotein wie auch für andere Lipoproteine keine veröffentlichten Daten über Fluoreszenzabklingzeiten vor. Aus den Unterschieden der Modulations- und Phasenabklingzeiten lässt sich lediglich schließen, dass auch hier unterschiedliche Fluoreszenzbeiträge vorliegen, die zu einem nichtmonoexponentiellen Abklingverhalten des Lipoproteins führen.

**Flavine** Die Messungen an Lösungen verschiedener Flavine deuten bei Riboflavin und FMN mit nahezu gleichen Werten der Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  auf ein monoexponentielles Abklingverhalten hin. Die Abklingzeiten dieser beiden Flavine unterscheiden sich nicht signifikant, was aufgrund der im Wesentlichen gleichen Struktur (nur eine zusätzliche Phosphatgruppe beim Riboflavin) zu erwarten ist. Die in dieser Arbeit gemessenen Werte der Abklingzeiten liegen im Bereich der Werte anderer Arbeitsgruppen. Für Riboflavin werden in unterschiedlichen Pufferlösungen und Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  - 1 mM Werte zwischen 4,1 - 4,7 ns angegeben ([Aar72], [Lak73a], [Höh95], [Ber96b]), bei FMN liegen die Werte zwischen 4,2 - 4,9 ns ([Wah74], [Höh95], [Ber96b]).

Wesentlich komplexer als bei FMN und Riboflavin ist die Situation bei den Messungen von FAD. Die scheinbaren Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  von FAD zeigen in unterschiedlichen Pufferlösungen bei (nahezu) gleichem pH-Wert mit 1,6 - 3,0 ns deutliche Unterschiede zu den anderen Flavinen und einen erheblichen Einfluss der Pufferlösung auf die Abklingzeit. Während in HEPES keine Auswirkung des pH-Werts auf die Abklingzeiten vorliegt, tritt ein solcher Effekt bei TRIS auf: Je geringer der pH-Wert ist, umso kürzer ist die mittlere Abklingzeit. Bei diesen Messungen konnte überdies mit einem zunehmenden Ausbleichen der Fluoreszenz eine Verschiebung zu längeren Abklingzeiten hin festgestellt werden. Dieser Effekt nahm mit dem pH-Wert zu, wobei mit bis zu 4,5 ns die längsten Abklingzeiten bei einem pH-Wert von 8 auftraten. Eine Erklärung lässt sich in der Struktur des FAD-Moleküls finden, das neben dem Isoal-

Isoalloxazinring, der in FMN und Riboflavin vorliegt, zusätzlich über ein Adeninringsystem verfügt. Fluoreszenzbeiträge mit langen Abklingzeiten um 4,5 ns sind auf eine offene Konformation der beiden Ringsysteme des FAD zurückzuführen, in der die für die Fluoreszenz der Flavine verantwortliche Isoalloxazinring vom Adeninringsystem minimal beeinflusst wird, so dass die Abklingzeit der von FMN entspricht. Beiträge mit kürzerer Abklingzeit ( $\approx 1,5$  ns) lassen sich entsprechend durch eine Veränderung zu einer gestapelten, coplanaren Anordnung der Ringsysteme erklären, da dabei durch  $\pi - \pi$  Interaktionen der Ringsysteme am stärksten gequenchet werden kann ([Bas93], [Fee02] und dort zitierte Arbeiten). In HEPES scheint die offene Konformation des FAD nicht beziehungsweise kaum aufzutreten: Im Verlauf der Messungen tritt keine Veränderung der Abklingzeit von 1,6 ns auf, es ist lediglich ein Ausbleichen der Fluoreszenz festzustellen. In TRIS hingegen liegen bei unterschiedlichen pH-Werten die Abklingzeiten zwischen dieser kurzen Abklingzeit von 1,5 ns und der Abklingzeit von FMN. Der ebenso festgestellte Effekt der Verschiebung zu langen Abklingzeiten mit zunehmendem Ausbleichen der Fluoreszenz deutet darauf hin, dass die coplanare Konformation aus dem Fluoreszenzsignal verschwindet und abhängig vom pH-Wert in zunehmendem Maße der Beitrag einer offenen Konformation des FAD die Fluoreszenz dominiert.

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen wird in [Ber02] und [Fee02] die zeitaufgelöste Fluoreszenz des FAD auf unterschiedliche Konformationen und dynamische Veränderungen der Konformation zurückgeführt. Die Autoren identifizieren dabei im heterogenen Abklingverhalten neben Beiträgen im Pikosekundenbereich unter anderem Beiträge um 2,7 ns und 4,6 ns (ungequenchtes Flavin in offener Konformation). Von anderen Autoren werden entsprechend Beiträge um 1,8 - 2,5 ns sowie 4,3 - 5,0 ns gefunden ([Höh95], [Pfe91], [Ber96b], [Sch02]).

**PPIX** Weit von den Abklingzeiten der anderen endogenen Gewebefluorophore hebt sich Protoporphyrin IX mit Abklingzeiten bis zu 10,1 ns ab. Die deutlichen Unterschiede von bis zu 4,7 ns zwischen Modulations- und Phasenabklingzeit zeigen deutlich ein nichtmonoexponentielles Abklingverhalten. Anders als bei FAD ist das Auftreten mehrerer Beiträge im Fluoreszenzsignal hier nicht auf unterschiedliche Konformationen, sondern auf Aggregationen des Protoporphyrin zu Dimeren oder auch größeren Aggregaten zurückzuführen. In den Veröffentlichungen über das Fluoreszenzabklingverhalten von Protoporphyrin (alle Messungen im Zeitbereich mit Einzelphotonenzählung) werden mehrere Beiträge angegeben, die auf unterschiedliche Aggregationsformen des Protoporphyrin beziehungsweise Photoproducte zurückgeführt werden (Tabelle 6.3).

Die in dieser Arbeit gemessenen Modulationsabklingzeiten von 10,1 ns bei 40 MHz und 8,7 ns bei 100 MHz zeigen, dass das Fluoreszenzsignal von der Monomerfluoreszenz dominiert ist. Eine grobe Abschätzung der Beiträge zum Fluoreszenzsignal lässt sich unter Verwendung der Mittelwerte der Literaturangaben für die Abklingzeiten des Monomers mit 12 ns, der Dimere mit 2 ns und der höheren Aggregate mit 0,15 ns durchführen. Die in dieser Arbeit gemessenen Werte der Modulations-

$\lambda_{Ex}$	$\lambda_{Em}$	$\tau_1 (\alpha_1)$	$\tau_2 (\alpha_2)$	$\tau_3 (\alpha_3)$	Quelle
[nm]	[nm]	[ns]([%])	[ns]([%])	[ns]([%])	
Monomer		10 - 14			[Sch88], [And82]
Dimer		1,5 - 3			[Sch88], [And82]
Aggregate		0,1 - 0,2			[Yam84], [Sch88]
Photoprodukt		ca 5			[Kön93]
Methanol		3,95 (5)	11,8 (95)		[Wes93]
Chloroform		4,28 (8)	10,0 (92)		[Wes93]

Tabelle 6.3: Veröffentlichungen über Abklingzeiten von Protoporphyrin IX. Alle Daten wurden mit der Zeitbereichsmethode gewonnen. In der Arbeit von [Wes93] wurden 0,35  $\mu$ -molare Lösungen von Protoporphyrin IX-Dimethylester verwendet, die anderen Ergebnisse sind zum Teil aus Zellexperimenten abgeleitet.

und Phasenabklingzeiten bei beiden Modulationsfrequenzen ergeben sich in Simulationen wie bei den Strukturproteinen bei einem Mischungsverhältnis von 85:10:5 von Monomeren, Dimeren und Aggregaten (mittlere Abweichung: 0,6 ns). Auch die Werte nach Bestrahlung der Lösung mit einer Xenon-Weißlichtquelle sind mit den Literaturangaben konsistent. Durch die lange Bestrahlungszeit ist ein verschwindender Beitrag durch Monomere zu erwarten, da deren Fluoreszenz ausgebleicht ist. Mit Werten von 3,8 - 6,6 ns liegen die gemessenen Abklingzeiten nahe der in [Kön93] für die Photoprodukte angegebenen Abklingzeit von ungefähr 5 ns.

Bei diesen eher analytischen Untersuchungen des Abklingverhaltens von Reinsubstanzen der endogenen Gewebefluoreszenz sollte jedoch nicht vergessen werden, welcher diagnostische Nutzen aus dem Abklingverhalten dieser Fluorophore bei der Erkennung von Gewebeveränderungen gezogen werden kann: Von den Autoren, die das Abklingverhalten der Strukturproteine untersucht haben, wurden Unterschiede der Abklingzeiten normaler und atherosklerotischer Arterienwand, ebenso wie bei dysplastischen Gewebeveränderungen, auf Veränderungen im Verhältnis der Kollagen- und Elastinfluoreszenz zurückgeführt ([Mar98], [Maa00b], [Mar01], [AE90a], [AE90b], [AE91b], [AE91a], [Pfe03]). Die Veränderungen der Fluoreszenzeigenschaften des Gewebes bei dysplastischen Veränderungen im Epithel der Zervix und des Esophagus werden in [Geo02] neben einer verstärkten NADH-Fluoreszenz vor allem einer verminderten Kollagenfluoreszenz im dysplastischen Epithel zugeschrieben. Die Fluoreszenz der Flavine ist diagnostisch von besonderem Interesse, da sich in ihr

Stoffwechselveränderungen niederschlagen können. Von [Höh95] und [Miz98] werden Konzentrationsveränderungen der Dinukleotide bei Veränderungen des Zellstoffwechsels angegeben. Die unterschiedlichen Abklingzeiten der Di- und Mononukleotide kann so eine Erkennung dieser Störungen ermöglichen. Auf den Redoxzustand der Flavine wird von [Sch04] eine Veränderung der Fluoreszenzabklingzeiten am Fundus des Auges nach Sauerstoffprovokation zurückgeführt. Die intrinsische Gewebefluoreszenz von Protoporphyrin IX spielt diagnostisch keine wesentliche Rolle. Durch die exogene Gabe eines Vorläuferstoffes lässt sich jedoch eine erhöhte Konzentration von PPIX im Gewebe induzieren. Auf dieses äußerst wichtige Anwendungsgebiet der Photodynamischen Diagnostik mit PPIX wird im Abschnitt 4.3 näher eingegangen werden.

### 6.2.2 Exogene Fluorophore: Kationische Liposomkonjugate mit Rhodamin

Die kationischen Liposomkonjugate mit Lissamin-Rhodamin B als Fluoreszenzfarbstoff sind ein exzellentes Beispiel für die Auswirkung der Mikroumgebung auf Fluoreszenzabklingzeiten. Sie zeigen wie ein Fluorophor als Mikrosonde Information über seine Umgebungsbedingungen geben kann. Die Fluoreszenz aller Liposomformulierungen rührt vom gleichen Fluorophor Lissamin-Rhodamin B her, das kovalent an die Kopfgruppe des neutralen Lipids DOPE gebunden ist. Die Unterschiede zwischen den Formulierungen liegen in den Mischungsverhältnissen der kationischen (DOTAP), neutralen (DOPC bzw DOPE) und neutralen Lipidkomponente mit Fluoreszenzfarbstoff (N-Rh-PE). In diesen unterschiedlichen Lipidmischungen ergeben sich für Lissamin-Rhodamin Fluoreszenzabklingzeiten zwischen 0,8 und 1,8 ns (5.6), wobei Lissamin-Rhodamin B in H<sub>2</sub>O eine Abklingzeit von 2,13 ns hat ([Bri95]).

Dass die Unterschiede der Fluoreszenzabklingzeiten in irgendeiner Weise mit den unterschiedlichen Mischungsverhältnissen der drei Lipidkomponenten in den Formulierungen zusammenhängen ist in der Graphik 5.6 direkt ersichtlich: Lipidformulierungen mit hohem neutralem Lipidanteil, somit geringem Anteil an kationischem DOTAP, weisen längere Abklingzeiten auf als die Formulierungen mit geringem kationischem Lipidanteil. Diese Korrelation liefert allerdings noch keine Erklärung für den *Mechanismus*, der zu kürzeren Abklingzeiten in Formulierungen mit hohem kationischen Lipidanteil führt. Wie in Kapitel 1 dargestellt, kommen als Ursache für unterschiedliche Fluoreszenzabklingzeiten eines Fluorophors in unterschiedlichen Umgebungen sowohl Einflüsse auf die Lage der Energieniveaus in Frage, als auch eine Vielzahl an Wechselwirkungen mit Umgebungsmolekülen, die zu einer nichtstrahlenden Energieabgabe führen.

Auf den prinzipiellen Aufbau der Liposomen, die die Mikroumgebung des Fluoreszenzfarbstoffs Lissamin-Rhodamin darstellen, muss zunächst kurz eingegangen werden, um mögliche strukturelle Eigenschaften zu diskutieren, welche die Ursache der beobachteten Lebensdauerunterschiede sein können. Der amphiphile Charakter der Lipide mit ihren hydrophilen Kopfgruppen und hydrophoben Fettsäureresten führt zu einem Zusammenspiel verschiedener anziehender und abstossender Kräfte: van der Waals-Wechselwirkung, elektrostatische Wechselwirkung sowie abstoßende und anziehende Solvatationskräfte ([Isr85]). Die treibende Kraft bei der Zusammenlagerung der Lipide ist eine Minimierung der freien Energie, die bei einer Abschirmung der hydrophoben Molekülstrukturen vom Wasser resultiert. Bei der hier vorliegenden Vesikelstruktur einer Doppelmembran kommen so die polaren Kopfgruppen zur wässrigen Phase hin und die hydrophoben Fettsäurereste der beiden Lipidschichten im Inneren der Membran zueinander orientiert zu liegen.

Anhand der Strukturformeln der Lipide lässt sich unter der Annahme einer mittleren Bindungslänge von 150 pm (154 pm für eine C-C Einfachbindung) die Dicke der Doppelmembran zu rund 8 nm abschätzen. Die Kopfgruppen von DOTAP und DOPC mit ihren tetraedisch angeordneten Cholingruppen haben einen Durchmesser von rund

300 pm, was in etwa dem Durchmesser der Fettsäureketten entspricht. Dagegen ist bei N-RH-PE die gesamte Kopfgruppe einschließlich Rhodamin mit rund 700 pm deutlich grösser, allerdings planar angeordnet. Die Anzahl an Lipidmolekülen in den Vesikeln von durchschnittlich 150 nm Durchmesser kann unter der Annahme, dass ein Lipid auf der Membranoberfläche  $300 \times 300 \text{ pm}^2$  einnimmt, zu 750 000 Molekülen auf der Aussenmembran und zu 600 000 Molekülen auf der Innenmembran abgeschätzt werden. Dieser Ansatz berücksichtigt nur der Anzahl der Bindungen, ohne auf die Tertiärstruktur der Lipide und ihre stereometrische Zusammenlagerung einzugehen. Er liefert eine grobe Abschätzung der Grössenordnung. Mit der Abschätzung eines lateralen Abstands von 300 pm ist bei einer vollkommen homogenen Verteilung der drei unterschiedlichen Lipide der Abstand zweier Rhodaminmoleküle 7000- 5000 pm bei den molaren Konzentrationen im Bereich von 4 mol% bis 6 mol%.

Die Lipiddoppelschichten sind allerdings nicht als starre Gebilde anzusehen. Im physiologisch relevanten Temperaturbereich ist bei den Liposomformulierungen von einer fluiden Phase wie in den Membranen von Organismen auszugehen, in der die einzelnen Lipide beweglich sind und laterale Diffusion sehr schnell stattfindet. Die Angaben für Diffusionskonstanten von Phospholipiden in Membranen liegen in der Größenordnung von  $10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  ([Sch96]) während einerseits für kleine Moleküle in Wasser  $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , für Proteine in Wasser  $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  andererseits für Proteine in Membranen Werte um  $10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  angegeben werden ([Wei96]). Die Beweglichkeit der Lipide hängt dabei sowohl von den Fettsäuren als auch von den polaren Gruppen ab: stärker ungesättigte Fettsäuren ebenso wie kürzere Fettsäureketten begünstigen die Beweglichkeit der Lipide, PC-Kopfgruppen erhöhen, PE-Kopfgruppen reduzieren die Fluidität der Membran ([Leh00]).

Für die hier vermessenen Liposomformulierungen unterschiedlicher Zusammensetzung bieten zu erwartende Unterschiede der elektrostatischen Verhältnisse im Bereich der Grenzschicht Liposom - wässriges Medium einen ersten naheliegenden Erklärungsansatz für die festgestellten Abklingzeitunterschiede. Die Zusammensetzung aus zwitterionischen Lipiden DOPC und DOPE sowie kationischem Lipid DOTAP in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen ergibt neben lokalen Unterschieden der Ladungsverteilung vor allem eine verbleibende Gesamtladung an der Membranoberfläche, was anhand des sogenannten  $\zeta$ -Potenzials quantifiziert werden kann. Es resultiert hier eine positive Nettoladung, die umso größer ist, je höher der Anteil an kationischem DOTAP in den Liposomen ist. Genau diese positive Nettoladung der Membran von kationischen Lipidformulierungen wird als Ursache für die besondere Eignung kationischer Liposomen bei der Transfektion verantwortlich gemacht, dem Einsatzgebiet, in dem diese Liposomen ihre ersten wichtigen Anwendungen fanden. Bei der Effizienz der Gentherapie mit kationischen Liposomen spielt die Ladung eine dreifache Rolle (die dabei auch durch die Beimischung von Helferlipiden wie DOPC, DOPE oder Cholesterol günstig verstärkt wird): erstens bei der Bildung von Lipoplexen aus Liposomen und Polynukleotiden ([Was99]), zweitens für die elektrostatische Stabilisierung der Lipoplexe ([Las96]) sowie drittens bei der Anhaftung der Lipoplexe an anionische Zellmembranen, wodurch die folgenden Schritte der Einbringung des Genmaterials in die Zielzelle initiiert werden ([Li96]).

In den untersuchten Liposomformulierungen sind die Rhodaminmoleküle durch die Ankoppelung an die polare Kopfgruppe der Lipide im Bereich der Membranaußenflächen lokalisiert. So ist als Ursache der unterschiedlichen Fluoreszenzabklingzeiten der Einfluss der unterschiedlichen Ladungsverhältnisse denen das Rhodamin in den Formulierungen ausgesetzt ist in Betracht zu ziehen. Dieser Erklärungsansatz basiert somit auf dem Einfluss der Umgebung auf die Energiedifferenzen zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand des Fluorophors entsprechend den Effekten die für Fluorophore in polaren Lösungsmitteln mit unterschiedlich großen Dipolmomenten festgestellt werden können. Diese Solvatationseffekte beruhen vor allem auf der Reorientierung der Dipolmomente der polaren Lösungsmittelmoleküle und der Anpassung ihrer Elektronenverteilung an das durch die Absorption quasi instantan veränderte (in der Regel größer gewordene) Dipolmoment des Fluorophors. Wenn diese Relaxation des Lösungsmittels schnell genug während der Lebensdauer des angeregten Zustands erfolgt, hat dies ebenso Auswirkung auf die energetische Lage des relaxierten angeregten Zustands aus dem heraus die Fluoreszenzemission erfolgt. Als Konsequenz dessen äußert sich die Lösungsmittelrelaxation auch in einer spektralen Verschiebung des Fluoreszenzmaximums. Diese spektrale Verschiebung der Fluoreszenz eines Fluorophors in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität kann über hundert 100 nm betragen, wie zum Beispiel Untersuchungen an PRODAN zeigen ([Web79]).

Eine weitergehende Modellierung und Diskussion auf welche Weise in den vorliegenden Liposomsystemen im Zusammenspiel aus den Kopfgruppen der unterschiedlichen Lipide einerseits und dem umgebenden wässrigen Medium andererseits ein entsprechender energetischer Effekt erfolgen kann, soll hier unterbleiben, da zwei Aspekte der Liposomeigenschaften diesem Erklärungsansatz entgegenstehen: Die maximalen Unterschiede in der Lage der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima betragen jeweils nur 3 nm, was eine Erklärung des ausgeprägten Effekts der Fluoreszenzabklingzeitveränderung rein durch energetische Effekte nicht plausibel erscheinen lässt. Ebenso lässt sich so der Umstand nicht erklären, dass bei festem Anteil an DOTAP von 30 mol% durch eine Erhöhung des N-Rh-PE Anteils von 4 mol% auf 6 mol% eine ungefähr gleich grosse Verkürzung der Fluoreszenzabklingzeit resultiert wie durch die Erhöhung des DOTAP-Anteils von 30 mol% auf 50 mol% bei festem Anteil von N-Rh-PE von 5 mol%. Will man die Lebensdauerunterschiede auf die durch das kationische DOTAP bestimmten Ladungsverhältnisse zurückführen, so muss dem insgesamt neutralen DOPC eine abschirmende Wirkung der positiven DOTAP-Ladung zugeschrieben werden. Geht man von einer vollkommen homogenen Verteilung der Lipide aus, so bewirkt die Steigerung der Rhodaminkonzentration von 4 mol% auf 6 mol% zwar eine Erhöhung der effektiv vom einem Rhodaminmolekül wahrgenommenen DOTAP-Ladung, allerdings nur um rund 6 %, wohingegen im anderen Fall des größeren DOTAP-Anteils in der Formulierung eine Erhöhung auf ungefähr das zweieinhalbfache vorliegt.

Auch wenn die Ladungsunterschiede zunächst das auffälligste Unterscheidungsmerkmal der Liposomformulierungen sind, können damit die festgestellten Abklingzeit-

unterschiede nicht befriedigend erklärt werden. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Ursache der unterschiedlichen Abklingzeiten in einem Wechselwirkungsprozess mit Umgebungsmolekülen liegt, der die angeregten Rhodaminmoleküle durch strahlungslose Abgabe der Anregungsenergie in den Grundzustand zurückführt.

Gerade solche Wechselwirkungsprozesse bilden die Grundlage für die zahlreichen Anwendungen, die Fluorophore bei der Untersuchung von Membraneigenschaften und besonders der dynamischen Veränderung der Eigenschaften gewonnen haben. Ein breiter Überblick über diesen Einsatz von Fluorophoren als Sensormoleküle in Lipidmembranen wird in [Mai02] gegeben. Den Weg zur Erklärung des in den vorliegenden kationischen Liposomformulierungen festgestellten Effekts weisen Untersuchungen der Fusion, vor allem von natürlichen, viralen Membranen mit synthetisierten, fluoreszenzmarkierten Lipidvesikeln. N-Rh-PE spielt bei vielen dieser Untersuchungen eine wichtige Rolle als Bestandteil eines Donor-Akzeptor-Paares dessen Fluoreszenzresonanzenergietransferrate die strukturellen Veränderungen der Membranen bei Fusionsprozessen widerspiegelt. So nutzte die Arbeitsgruppe von MacDonald die Fluoreszenz eines FRET-Donor-Akzeptor-Paares für die Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Fusionseffizienz von Sendai-Viren mit Lipidvesikeln aus Phosphatidylserin oder Phosphatidylcholin ([Mac87]). Die Lipidvesikel wurden dabei mit 1 mol% N-Rh-PE sowie 1 mol% N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-phosphatidylethanolamin (N-NBD-PE) versehen. Der spektrale Überlapp des Emissionsspektrums von N-NBD-PE, das der Donor des FRET-Paares ist, mit dem Absorptionsspektrum von N-Rh-PE führt zu einem Quenchen der N-NBD-PE-Fluoreszenz beim strahlungslosen Energieübertrag vom Donor auf den Akzeptor N-Rh-PE. Da die Effizienz des Resonanzenergietransfers auch von der Akzeptorkonzentration abhängig ist, spiegelt sich der Verdünnungseffekt, der sich bei der Verschmelzung der beide Fluorophore enthaltenden Vesikelmembran mit der Virusmembran ergibt, in einer zunehmenden Donor-Fluoreszenz wieder. Der Fluoreszenzresonanzenergietransfer dieses Donor-Akzeptor-Paares N-NBD-PE und N-Rh-PE, das ebenso von einer Vielzahl anderer Autoren bei ähnlichen Untersuchungen verwendet wurde ([Str81], [Lou01], [Mal01], [NC02]), erfolgt allerdings zwischen unterschiedlichen Fluorophoren.

Die Situation, dass nur eine Fluorophorspezies vorliegt, bei der aber ein dem FRET entsprechendes Quenchen der Fluoreszenz auftritt, findet sich ebenso in einer Vielzahl von Veröffentlichungen ([Hoe84], [Arb94], [Sch95b], [Ohk98], [Dom01]). Das gängigste Fluorophor in der Untersuchung von Lipidmischungsvorgängen ist dabei Octadecylrhodamin B Chlorid (R18), das ursprünglich in der Arbeitsgruppe von Keller für die Untersuchung von Zellfusionsvorgängen entwickelt wurde ([Kel77]). Es ist durch die Verbindung des Rhodamin mit einer Fettsäurekette lipophil und hat gegenüber den Phospholipiden mit an der Kopfgruppe verankerten Fluorophoren den Vorteil, dass es leichter auch in existierende natürliche Membrane eingebracht werden kann. Blumenthal zeigt in einem Übersichtsartikel die zahlreichen Anwendungen dieses fluoreszierenden Lipidmischungssensors bei viralen Fusionsprozessen auf ([Blu02]). Die Methode nutzt dabei den beobachteten Effekt, dass die Fluoreszenz

des Fluorophors in den natürlichen Membranen oder Liposomen bei Konzentrationen von einigen mol% deutlich vermindert ist, es liegt „self-quenching“ vor. Ist nur einer der Fusionspartner mit dem Fluorophor markiert, dann führt die Fusion der Membranen zu einer Diffusion des Fluorophors auch in die unmarkierten Membranbereiche. Dabei nimmt die Fluoreszenzintensität zu, es findet „de-quenching“ statt.

In mehreren Arbeiten wird der Effekt des self-quenching nicht nur als Werkzeug eingesetzt, sondern es werden auch die Ursachen, auf die er zurückzuführen ist, diskutiert, indem das self-quenching in Liposomen variierender Zusammensetzung und bei unterschiedlichen Fluorophorkonzentrationen untersucht wird. In diesem Zusammenhang sind die Arbeiten von Massari ([Mas88]) und MacDonald ([Mac90]) von besonderem Interesse, da dort auch das self-quenching von lipidkonjugiertem Lissamin-Rhodamin untersucht wird. MacDonald verwendet neben R18 auch N-Rh-PE bei seinen Untersuchungen, während Massari das sich davon in den Fettsäureketten unterscheidende N-(Lissamin Rhodamin B sulfonyl) dipalmitoylphosphatidylethanolamin (N-Rh-DPPE) einsetzt. Beide Autoren stellen eine verminderte Fluoreszenzintensität aufgrund erhöhten self-quenchings fest, wenn die Konzentration des lipidkonjugierten Rhodamins in den Liposomen erhöht wird. Massari gibt als Konzentrationsschwelle, ab der der Effekt in den unterschiedlich zusammengesetzten Liposomen festzustellen ist, 0,1 - 0,2 mol% N-Rh-DPPE an. Über diesem Schwellenwert werden, nach seinen Angaben, weitere N-Rh-DPPE-Moleküle in aggregierter Form eingebaut, wobei die Oberflächendichte des freien N-Rh-DPPE konstant bleibt. Darüber hinaus stellt er auch einen Effekt des pH-Werts fest und schreibt die stärkere Aggregation bei niedrigerem pH einer verminderten elektrostatischen Abstoßung der geladenen Gruppen des N-Rh-DPPE zu. In der Diskussion der Ursache des self-quenching-Effekts wird in beiden Arbeiten auf die Möglichkeit eines dynamischen Quencheffekts durch Stoßprozesse eingegangen. Massari gibt eine Abschätzung, dass während der Lebensdauer des angeregten Zustands von 2 ns bei einem lateralen Diffusionskoeffizienten von  $5 * 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  lediglich eine Diffusion über 1,4 Å auftreten kann und daher dynamische Stoßprozesse mangels Häufigkeit, wenn überhaupt dann nur eine unwesentliche Rolle spielen. Auch MacDonald führt das Gegenargument einer zu geringen lateralen Diffusion in seiner Diskussion ins Feld und kommt, ebenso wie Massari, zu dem Schluss, dass ein Resonanzenergieübertrag vom angeregten Rhodamin auf nichtfluoreszierende Dimere als Ursache des self-quenching gesehen werden muss. Als Beweis für das Vorliegen von Dimeren in den Liposomen führt er die Höhe der Schulter bei 528 nm im Absorptionsspektrum auf, die zu einem gewissen Teil von Dimeren herrührt, und bezieht sich dabei auch auf Arbeiten von Plant ([Pla86]) sowie Chen und Knutson ([Che88]), in denen gleichartige Quencheffekte mit anderen Fluorophoren untersucht werden. So wie in diesen letztgenannten Arbeiten, beziehen auch Massari und MacDonald die in ihren Experimenten festgestellte Fluoreszenzabklingzeitverkürzung bei stärkerem self-quenching in ihre Argumentation für einen Energieübertrag auf nichtfluoreszierende Dimere mit ein: Finden Energieübertragprozesse mit nachfolgender Emission eines Fluoreszenzphotons statt, so kann als Folge die Fluoreszenzabklingzeit nur grösser werden, während die experimentellen

Daten den gegenteiligen Effekt aufweisen. Exakt dieser Effekt wurde im Rahmen dieser Arbeit bei der Messserie des lipidgekoppelten Rhodamins N-Rh-PE allein in unterschiedlichen molaren Konzentrationen in Chlorophorm festgestellt. Hier zeigen sich Fluoreszenzabklingzeiten, die deutlich über den Abklingzeiten in den Liposomen liegen und mit zunehmender molarer Konzentration ansteigen. Dies ist der bei Fluorophoren, deren Absorptions- und Emissionsspektren nahe beieinanderliegen bekannte Effekt der Reabsorption beziehungsweise Selbstabsorption.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen an kationischen Liposomkonjugaten unterschiedlicher Zusammensetzung ist angesichts der Ergebnisse von Massari und MacDonald ebenfalls ein self-quenching durch Resonanzenergieübertrag auf nichtfluoreszierende Dimere als Ursache des festgestellten Fluoreszenzabklingzeiteffekts naheliegend. Wie in den erwähnten Arbeiten nimmt hier die Fluoreszenzabklingzeit mit höherer Konzentration des lipidkonjugierten Rhodamins deutlich ab. Vergleicht man die Fluoreszenzintensitäten der unterschiedlichen Liposomformulierungen, so zeigt sich ebenfalls eine der kürzeren Abklingzeit der Formulierungen entsprechende geringere Intensität, wie es bei einem Prozess, der die angeregten Moleküle strahlungslos in den Grundzustand zurückführt zu erwarten ist. Auch der Beleg, dass in den Liposomen tatsächlich unterschiedliche Konzentrationen an Dimeren vorliegen, kann anhand der Absorptionsspektren gefunden werden. Es zeigt sich dabei, dass je stärker die Absorption an der Schulter um 530 nm im Vergleich zum Absorptionsmaximum um 573 nm ist, das heisst je größer der Dimeranteil in den Liposomen ist, umso kürzere Abklingzeiten gemessen werden (siehe Abbildung 4.3). Alle Effekte, die von Massari und MacDonald in ihren Arbeiten gefunden wurden, liegen also auch in den kationischen Liposomformulierungen vor. Der Mechanismus, der zu der festgestellten Abklingzeitverkürzung führt, ist somit das self-quenching durch Resonanzenergieübertrag auf nichtfluoreszierende Dimere, wobei die unterschiedlichen Mischungsverhältnisse der Lipide das Ausmaß der Aggregation des N-Rh-PE zu Dimeren bestimmen, ähnlich der pH-Abhängigkeit der Aggregatbildung, wie sie von Massari gefunden wurde.

Neben der grundsätzlichen Frage, welche Fluoreszenzabklingzeiten die Liposomformulierungen haben und wie diese mit der Liposomzusammensetzung korrelieren, sollten an Hand der in-vitro-Messungen Effekte, die bei einem in-vivo-Einsatz Einfluss auf die Abklingzeiten haben können, untersucht werden.

Wie aus den Ergebnissen der Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen ersichtlich, ist beim in-vivo-Einsatz der Liposomen in einem Tiermodell oder bei Verabreichung der Formulierung an Patienten durch die über den Laborbedingungen liegende Körpertemperatur kein Effekt in den Abklingzeiten der Rhodaminfluoreszenz zu erwarten. Die Struktur der Liposomen scheint sich in diesem Temperaturbereich nicht zu verändern. Massari zeigt in seiner Arbeit auch Temperaturabhängigkeiten auf, die sich bei einer Grenztemperatur ergeben, wenn die Lipide der Liposomen aus der Gel-Phase in die weniger geordnete fluid-kristalline Phase übergehen. Mordon macht sich genau diesen Phasenübergang zu Nutze, um 5,6-Carboxyfluorescein,

einen Fluoreszenzmarker der ebenfalls self-quenching-Effekte zeigt, durch gezielte Temperaturerhöhung aus der wässrigen Phase von Liposomen freizusetzen ([Mor98]). Wegen der hohen Konzentration des Farbstoffs in der wässrigen Phase der bei Temperaturen bis 40 °C in der Gel-Phase vorliegenden Liposomen zeigen diese zunächst keine Fluoreszenz. Die Freisetzung des Fluorophors wird erst durch die Erwärmung über die Phasenübergangstemperatur mittels Laserbestrahlung induziert, wodurch eine weniger dichte Lipidpackung der Membran vorliegt.

Anders als bei der Temperatur, zeigt sich nach Zugabe von Methanol ein deutlicher Effekt. Durch die Beimischung lässt sich die Liposomstruktur zerstören. Welche Fragmente dabei entstehen und ob sie in der Methanolumgebung homogen verteilt sind oder eventuell lokal wieder zusammenlagern, wenn auch nicht in Liposomstruktur mit Doppelmembran, ist nicht bekannt. Die bei diesen Messungen aufgetretenen Unterschiede zwischen den Modulationsabklingzeiten  $\tau_M$  und Phasenabklingzeiten  $\tau_\Phi$  nach der Zugabe von Methanol sprechen für heterogene Umgebungsbedingungen. Zwei der Formulierungen zeigen nach Methanolbeimischung Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_M$ , die nahe der Abklingzeit von Lissamin-Rhodamin in H<sub>2</sub>O liegen. Dies legt nahe, dass Rhodamin hier ähnlichen Bedingungen wie in H<sub>2</sub>O ausgesetzt ist und der in der Liposomstruktur auftretende Resonanzenergietransfer auf Dimere keine Rolle mehr spielt. Warum die Formulierung F<sub>1</sub> mit der ursprünglich längsten Abklingzeit nach Zugabe von Methanol ein anderes Verhalten zeigt, lässt sich nicht aus der abweichenden Zusammensetzung erklären. In Anbetracht der festgestellten Abhängigkeit der Fluoreszenzabklingzeit von der Dimerkonzentration, kann eine Zusammenlagerung nach Methanolzugabe vermutet werden, die eine Aggregatbildung begünstigt und so die Fluoreszenzabklingzeit verkürzt. Alle drei Formulierungen weisen jedoch Fluoreszenzabklingzeiten auf, welche von denen der intakten Liposomen abweichen. Sollte in-vivo ein Aufbrechen der Liposomstruktur - zum Beispiel nach Ankopplung an angiogenes Endothel - stattfinden, so steht zu erwarten, dass sich dies in einer Veränderung der beobachteten Fluoreszenzabklingzeiten widerspiegelt.

Aus den an den Liposomformulierungen in-vitro durchgeführten Messungen lassen sich, in Verbindung mit den spezifischen Bindungseigenschaften der kationischen Liposomen an angiogenes Epithel, interessante Ergebnisse zeitaufgelöster Messungen dieses neuen Tumormarkers in-vivo erwarten: Aufgrund der kurzen Abklingzeiten der Liposomen, die deutlich unter den Abklingzeiten der meisten endogenen Gewebefluorophore liegen, sollte bei einer spezifischen Anreicherung ein starker Fluoreszenzabklingzeitkontrast festzustellen sein. Anhand der Veränderungen der Abklingzeit bei der Zerstörung der Liposomstruktur können sich in-vivo Hinweise ergeben, ob die Liposomen nach der Bindung an die Endothelzellen ihre Struktur verändern, was die Freigabe von Wirkstoffen begünstigen würde.

### 6.3 Messungen an Gefrierschnitten

Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen an Gefrierschnitten von Gewebebiopsien sollten die grundlegenden Vorarbeiten für den Einsatz der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung als Diagnosewerkzeug durchgeführt werden. Zwei Hauptaspekte stehen dabei im Mittelpunkt des Interesses:

- **Fluorophorlokalisierung** Lassen sich anhand der Fluoreszenzabklingzeitmessungen Aussagen über die Lokalisation endogener und exogener (oder exogen induzierter) Fluorophore in Gewebe treffen?
- **Diagnostisches Potenzial** Zeigen die Fluoreszenzabklingzeiten in Normalgewebe andere Werte als in kanzerösem oder präkanzerösem Gewebe?

Ausgangspunkt für die Untersuchung des ersten Aspektes, der **Fluorophorlokalisierung**, ist das in Grundzügen bekannte Vorkommen von Fluorophoren in dem untersuchten Zervixgewebe. Wie im Abschnitt 4.2.1 der Reinsubstanzmessungen dargelegt, ist die Fluoreszenz bei den verwendeten Anregungswellenlängen vor allem auf Flavine und die Strukturproteine Kollagen und Elastin sowie Porphyrine und Lipopigmente zurückzuführen. Im vorliegenden Fall ist durch die Applikation von 5-ALA ein höherer Anteil an Protoporphyrin IX als in nativem Gewebe zu erwarten.

Der schon wegen der Vielzahl unterschiedlicher Fluorophore komplexen Fluoreszenzcharakteristik wird bei der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion noch das Abklingverhalten der Fluorophore überlagert. Wie im Abschnitt 6.2 dargelegt, zeigen alle wichtigen Fluorophore, die zur Fluoreszenzemission der Gefrierschnitte beitragen, ein multiexponentielles oder umgebungsabhängiges Abklingverhalten. Bei den Strukturproteinen liegen bei einer Modulationsfrequenz von 40 MHz die Modulationsabklingzeiten  $\tau_M$  um 4 ns, die Phasenabklingzeiten  $\tau_\Phi$  um 2,5 ns. Ähnliches Verhalten zeigt das Lipoprotein. Bei den Flavinen ist das Abklingverhalten stark von der Umgebung abhängig, die Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  nehmen je nach Pufferlösung Werte im Bereich von 1,7 - 4,6 ns an. Die Ergebnisse bei Protoporphyrin IX sind stark vom Mischungsverhältnis der Aggregatformen und Photoprodukte bestimmt. Mit Modulationsabklingzeiten  $\tau_M$  um 10 ns ( $\tau_\Phi$ : 6 ns) bei einer hohen Monomerkonzentration lassen sich bei Protoporphyrin IX Werte finden, die sich deutlich von den Abklingzeiten der anderen Gewebefluorophore absetzen. Die langen Abklingzeiten des Protoporphyrinmonomers bieten für die zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion ähnlich günstige Voraussetzungen, Aussagen über die Lokalisation von PPIX zu gewinnen, wie bei der konventionellen Detektion der spektrale Unterschied zwischen der roten Porphyrinfluoreszenz und der im Wesentlichen im Grünen liegenden Fluoreszenz der meisten anderen Gewebefluorophore.

Betrachtet man die Gegenüberstellung der Abklingzeitverteilungen (Abbildung 5.11) im Epithel und Stroma der Gefrierschnitte, so fällt vor allem der deutliche (und signifikante) Unterschied zwischen Epithel und Stroma im roten Detektionsfenster auf.

Mit mittleren Abklingzeiten  $\tau_M$  von 6,9 ns bei Anregung mit 456,9 nm und 8,2 ns bei Anregung mit 396 nm liegen im Epithel deutlich längere Abklingzeiten vor als im Stroma. Nur bei den Reinsubstanzmessungen an Protoporphyrin IX wurden ähnlich lange Abklingzeiten gefunden. Noch deutlicher ist der Unterschied zu den Messungen im grünen Detektionsfenster und im gesamten Emissionsbereich über 500 nm. Dort liegen die Modulationsabklingzeiten  $\tau_M$  von Epithel und Stroma um 4,7 ns, die Phasenabklingzeiten  $\tau_\Phi$  um 2,5 ns. Diese Werte entsprechen recht gut den in Abschnitt 5.2.1 gefundenen Werten von Kollagen und Elastin. Auch bei den Flavinen wurden dort Abklingzeiten gefunden, die in diesem Bereich liegen. Die Schlussfolgerung die aus all diesen Informationen gezogen werden muss ist, dass die langen Abklingzeiten im Epithel bei der Detektion im roten Spektralfenster auf den Beitrag von Protoporphyrinmonomeren zurückzuführen ist. Im Stroma dagegen muss wegen der kürzeren Abklingzeiten der relative Beitrag der Protoporphyrinmonomere zur Fluoreszenz deutlich geringer als im Epithel sein, wenn nicht gar verschwindend. Eben dieses Verhalten haben nichtzeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie und Spektromessungen an Gefrierschnitten mit 5-ALA induziertem Protoporphyrin IX gezeigt, bei denen die rote Porphyrinfluoreszenz vor allem auf das Epithel beschränkt gefunden wurde ([Ste94], [Hüt96], [Lie01]). Die Zuordnung der langen Abklingzeiten im Epithel zu einem hohen Protoporphyrinmonomeranteil wird weiter untermauert durch den Umstand, dass bei der Anregung mit 396 nm längere Abklingzeiten gemessen werden als bei Anregung mit 456,9 nm. Ausser Porphyrinen können beim Epithel im roten Detektionsfenster nur Flavine nennenswerte Beiträge zum Fluoreszenzsignal liefern. Während die Absorption der Flavine bei beiden Anregungswellenlängen annähernd gleich ist, liegt bei den Porphyrinen ein erheblicher Unterschied vor: Um 400 nm liegt die Soretbande der Porphyrine, bei der die maximale Absorption des Anregungslichts vorliegt. Die Absorption der Porphyrine um 450 nm ist dagegen über eine Größenordnung geringer als im Maximum der Soretbande. Aus diesen Gründen ist der relative Beitrag der Porphyrinfluoreszenz zum Gesamtsignal bei Anregung mit 396 nm deutlich größer als bei Anregung mit 456,9 nm. Aus dem größeren Beitrag der Porphyrine zum Gesamtfluoreszenzsignal folgt die längere Abklingzeit bei Anregung mit 396 nm durch den Monomeranteil mit langer Abklingzeit.

Diese Betrachtung zeigt, wie sich Fluorophore in biologischem Gewebe mit den äußerst komplexen Fluoreszenzeigenschaften anhand ihrer Fluoreszenzabklingzeiten *identifizieren* und *lokalisieren* lassen. Die Wahl der Anregungswellenlängen und der spektralen Detektionsfenster spielt dabei eine wichtige Rolle. Die im roten Detektionsfenster festgestellten Unterschiede zwischen Epithel und Stroma sind in den beiden anderen Detektionsfenstern nicht ebenso zu finden. Im Grünen wird die Fluoreszenz der Gefrierschnitte von Flavinen sowie Kollagen und Elastin dominiert. Wegen der ähnlichen Abklingzeiten lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Dass dies ebenso im gesamten Detektionsbereich der Fall ist, ist auf den geringen Beitrag, den die Porphyrine hier zum Gesamtsignal liefern, zurückzuführen. Die Fluoreszenz von Gewebepreparaten ist bei den hier verwendeten Wellenlängen von der grünen Autofluoreszenz dominiert, die Fluoreszenz im Roten ist deutlich geringer.

Dieser Umstand wird durch die Eigenschaften des Bildverstärkers noch verstärkt: Trotz über dem Durchschnitt liegender spektraler Charakteristik im roten Spektralbereich ist die Elektronenauslösewahrscheinlichkeit an der Photokathode für Photonen des roten Spektralbereichs wesentlich geringer als für Photonen des grünen Spektralbereichs. Das Gesamtsignal wird daher von der grünen Autofluoreszenz mit annähernd gleichen Abklingzeiten in Epithel und Stroma so stark bestimmt, dass die Abklingzeiten kaum von der Messung im grünen Detektionsfenster abweichen<sup>2</sup>.

Eine Zurückführung der im Epithelrand festgestellten kurzen Abklingzeiten auf ein bestimmtes Fluorophor wie im Fall der langen Abklingzeiten im Epithel auf Protoporphyrin IX lässt sich nicht mit gleicher Sicherheit durchführen. Einen Hinweis auf die Ursachen der kürzeren Abklingzeiten gibt der in Abbildung 5.9 rechts mittig liegende Bereich des Schnitts mit deutlich kurzen Abklingzeiten (blau). Bei der histopathologischen Begutachtung des zugehörigen HE-Schnitts wurde in diesem Bereich eine Proteinausschwemmung festgestellt. Es ist naheliegend, dass an der Epitheloberfläche der Zervixbiopsate noch Reste des Zervikalschleims zu finden sind. Die im Vergleich zum Epithel kürzeren Abklingzeiten des Epithelrands ließen sich so durch Beiträge von Proteinen mit kurzen Abklingzeiten (vgl. Reinsubstanzmessungen 5.2) erklären. Darüberhinaus ist nicht auszuschließen, dass durch den klinischen Ablauf der diagnostischen Untersuchung vor Biopsieentnahme (Essigsäuretest, topische Applikation von 5-ALA, Reinigung) die oberste Epithelschicht Veränderungen unterworfen war. Wie in Abschnitt 5.2.1 gezeigt, kann die Mikroumgebung - in diesem Fall bei FAD der pH-Wert - großen Einfluss auf die Fluoreszenzabklingzeit haben. Auf diese Weise kann im Epithelrand auch bei gleichen Fluorophorbeiträgen wie im darunterliegenden Epithel eine Verschiebung zu kürzeren Abklingzeiten hin verursacht werden.

Der zweite Aspekt, dem das Hauptinteresse der vorliegenden Messungen an Gefrierschnitten gilt, ist das **diagnostische Potenzial** der zeitaufgelösten Messmethode. Die Gegenüberstellung der Abklingzeiten in dysplastischem Epithel und in normalem Epithel zeigte bei allen Kombinationen von Anregungswellenlänge und spektralem Detektionsfenster im Mittel längere Abklingzeiten bei den dysplastischen Biopsien. Am ausgeprägtesten und mit der deutlichsten statistischen Signifikanz fällt der Unterschied im roten Detektionsfenster bei Anregung mit 396 nm aus. Bei diesen Messbedingungen zeigen dysplastische Proben im Mittel 2,2 ns längere Abklingzeiten  $\tau_M$  als Normalgewebe. Auch bei Anregung mit 456,9 nm liegt mit 1,2 ns ein deutlicher Unterschied vor. Wegen der oben diskutierten schlechteren Anregungsbedingungen für PPIX ist hier der Effekt geringer. Die im vorigen Abschnitt begründete Zurückführung der längeren Abklingzeiten im Epithel im Vergleich zum Stroma auf den Beitrag von Protoporphyrinmonomeren zur Fluoreszenz kann entsprechend für diesen Unterschied zwischen dysplastischem Epithel und Normalepithel herangezogen werden. Das bedeutet, dass in dysplastischem Epithel nach (topischer) Applikation von

---

<sup>2</sup> Im Mittel zeigen die Abklingzeiten und Intensitäten der Schnitte eine weniger deutliche Unterscheidung zwischen Epithel und Stroma als in Abbildung 5.10.

5-ALA ein höherer Anteil an PPIX und somit längere Fluoreszenzabklingzeiten zu finden sind, als in normalem Epithel. Diese selektive Anreicherung ist die Grundlage der photodynamischen Diagnostik mit 5-ALA und wurde bislang in einer Vielzahl an Veröffentlichungen ebenso für Präkanzerosen und Tumoren der Harnblase, im Mund/Rachenraum, in der Lunge, im Gehirn und im Ösophagus gezeigt ([Kri94], [Sta99] [Leu00], [Stu98], [Hin98]).

Für die diagnostische Anwendung der zeitaufgelösten Messmethode *in-vivo* bedeutet dieser signifikante Unterschied in den Abklingzeiten  $\tau_M$  im Epithel nach topischer Applikation von 5-ALA, dass eine Auffindung dysplastisch veränderten Gewebes anhand des Fluoreszenzabklingzeitkontrastes möglich ist. Der Effekt der langen Abklingzeiten im dysplastischem Epithel kann dabei durch den Fluoreszenzbeitrag des darunterliegenden Stroma noch verstärkt werden: Die dysplastischen Veränderungen gehen typischerweise mit einer Verdickung des Epithels einher ([Bau99]). Bei Normalgewebe sollte so *in-vivo* der Beitrag des Stroma mit kurzen Abklingzeiten größer sein als bei verdicktem dysplastischem Gewebe. Dadurch ist ein noch größerer Unterschied und somit besserer Kontrast in den Fluoreszenzabklingzeiten zu erwarten.

Auch im grünen Detektionsfenster wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen Normalgewebe und dysplastischem Gewebe gefunden. Da in diesem Detektionsfenster das Fluoreszenzsignal nicht vom exogen induzierten Protoporphyrin IX dominiert wird sondern ausschließlich von der nativen Autofluoreszenz des Gewebes herrührt, ist dieser Unterschied von besonderem Interesse: Nach der exogenen Gabe von 5-ALA ist eine Wartezeit von über einer Stunde erforderlich, bis eine optimale PPIX-Anreicherung für die photodynamische Diagnostik erreicht ist. Im klinischen Alltag bedeutet dies einen hohen Zeit- und Logistikaufwand, der dem Einsatz der PDD mit 5-ALA oftmals entgegensteht. Eine Messmethode bei der die Veränderungen direkt ohne zusätzliche Vorbereitungen festgestellt werden können verspricht daher besonders großes Potenzial bei der Früherkennung präkanzeröser Gewebeveränderungen.

Signifikante Unterschiede zwischen Normalgewebe und dysplastisch verändertem Gewebe wurden nur bei der Demodulationsabklingzeit  $\tau_M$  festgestellt. In der Phasenabklingzeit  $\tau_\Phi$  lagen zwar bei allen Kombinationen von Anregungswellenlänge und spektralem Detektionsfenster Unterschiede in den mittleren Abklingzeiten vor, denen jedoch mit P-Werten um 0,4 keine Signifikanz zugeschrieben werden kann. Als Ursache dafür, dass in der Gesamtheit der Schnitte die Phasenabklingzeiten stets nahezu gleiche Werte zeigen, kann ein systematischer Fehler im Messsystem oder bei der Auswertung ausgeschlossen werden. Die Messungen wurden über einen längeren Zeitraum hinweg durchgeführt, wobei zwischen den Messungen wiederholt Farbstofflösungen sowie die Liposomkonjugate vermessen wurden. Dabei ergaben sich stets die „richtigen“ Ergebnisse für die Abklingzeiten  $\tau_M$  und  $\tau_\Phi$  homogener und heterogener Lösungen. In Abschnitt 2.2.3.2 wurde die „Bevorzugung“ von Fluoreszenzbeiträgen mit kurzer Abklingzeit bei der Phasenabklingzeit  $\tau_\Phi$  erläutert. Diese Bevorzugung

hat zur Folge, dass die Abklingzeiten  $\tau_{\Phi}$  der Gewebeschnitte stets kleinere Werte aufweisen als die Werte von  $\tau_M$ . Die Reinsubstanzmessungen der endogenen Fluorophore (Abschnitt 5.2.1) haben für die Phasenabklingzeiten Werte ergeben, die fast alle nahe 2,5 ns liegen. Die geringen Unterschiede bei den Fluorophoren selbst schlagen sich entsprechend in den Fluoreszenzabklingzeiten des Gewebes nieder. Eine weitere Verstärkung dieses Umstands kommt möglicherweise auch von Beiträgen zum Fluoreszenzsignal mit extrem kurzen Abklingzeiten. In den Veröffentlichungen über die Abklingzeiten endogener Fluorophore werden von mehreren Autoren Abklingzeiten unter einer Nanosekunde mit teilweise erheblicher Amplitude (25 - 55 %) angegeben (siehe 6.2.1). Derart kurze Abklingzeiten sind bei einer Modulationsfrequenz von 40 MHz, die für die „wichtigen“ Fluoreszenzbeiträge mit Abklingzeiten von wenigen Nanosekunden optimal ist, schlecht auflösbar.

Diese erste Untersuchung anhand einer geringen Anzahl von Biopsien kann noch keine Aussagen über Sensitivität und Spezifität der Methode geben. Als Entscheidungskriterium für die Frage, ob das untersuchte Gewebe verdächtige Abweichungen zeigt, muss ein Schwellwert gesetzt werden, der normales von dysplastischem Gewebe abgrenzt. Die Findung eines solchen Schwellwertes erfordert eine größere Anzahl an Proben und sollte darüberhinaus sinnigerweise in vivo durchgeführt werden. Die Unterschiede, die in dieser Arbeit bei den Abklingzeiten von Normalgewebe und dysplastischem Gewebe sowohl basierend auf der 5-ALA-induzierten Porphyrinfluoreszenz als auch in der Autofluoreszenz gefunden wurden, lassen hoffen, dass die Methode in-vivo diagnostisch gewinnbringend eingesetzt werden kann. Aus der Kombination der aus Autofluoreszenz und Protoporphyrinfluoreszenz gewonnenen Abklingzeitinformationen könnte dabei auch die Spezifität der photodynamischen Diagnostik mit 5-ALA verbessert werden: In Veröffentlichungen wird ein teilweise erheblicher Anteil als falsch positiv zu wertender Befunde angegeben ([Kri96], [Jic97], [Rie99], [Fri01]). Die Spezifität der photodynamischen Diagnostik mit 5-ALA liegt in diesen Veröffentlichungen im Bereich von ungefähr 50 - 70 %. Bei der in-vivo-Diagnostik der zervikalen intraepithelialen Neoplasie basierend auf einem visuellen Kontrast der Protoporphyrinfluoreszenz beträgt die Sensitivität je nach Art der Durchführung sogar nur 25 % bzw 47 % ([Wei99], [Hil00b])<sup>3</sup>. So wäre es möglich, dass die Abklingzeitinformation der Protoporphyrin- oder der Autofluoreszenz bei fluoreszenzpositiven Befunden die Präkanzerosen von falsch positiven Befunden diskriminieren lassen, und so die Spezifität verbessern.

Die in 5.3.3 durchgeführte Gegenüberstellung der Fluoreszenzabklingzeiten des basalen Drittels des Epithels und der oberen zwei Drittel sollte in erster Linie eine Abschätzung liefern, ob sich die histologischen Gegebenheiten der abhängig vom Grad der Dysplasie auf einen Teil des Epithels beschränkten Veränderungen entsprechend in den Fluoreszenzabklingzeiten widerspiegeln. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den dysplastischen Gewebeproben und Normalgewebe wurde bei

---

<sup>3</sup> Die Patientinnen, von denen die Biopsien der vorliegenden Arbeit entstammen, sind Teil des Patientenkollektivs dieser beiden Veröffentlichungen.

der Detektion im grünen Spektralfenster im basalen Epitheldrittel gefunden. Für den restlichen Bereich des Epithels konnte dagegen mit einem P-Wert von 0,1 kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In den Abklingzeiten der Autofluoreszenz, die hier vor allem auf Flavine zurückzuführen sind, scheinen sich somit die histopathologischen Gegebenheiten der zervikalen intraepithelialen Neoplasie wiederzuspiegeln: Im basalen Drittel, auf das bei der leichten Dysplasie die atypischen Zellveränderungen mit gesteigerter Proliferation, individueller Zellpolymorphie und Verlust der Richtungsorientierung der Zellen hauptsächlich beschränkt ist, zeigt sich ein Unterschied zum Normalgewebe. Im restlichen Epithel, in dem sich nur wenige atypische Zellen finden, liegt ein solcher Unterschied in den Abklingzeiten der Autofluoreszenz dagegen nicht vor.

Dass sich entsprechende Unterschiede im roten Detektionsfenster bei den Abklingzeiten des Porphyrins nicht feststellen ließen, deckt sich mit konventionellen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Protoporphyrinverteilung in zervikalem Epithel und Stroma nach topischer Applikation von 5-ALA ([Pah98]): Die Autoren fanden im gesamten Epithel 5-ALA induzierte Porphyrinfluoreszenz mit einem Maximum nahe der Mitte des Epithels. Normales Epithel zeigte bei dieser Untersuchung ebenfalls deutliche Porphyrinfluoreszenz, deren Intensität etwa 1/4 der Intensität bei schweren Dysplasien betrug. Auch in der Mucosa der Harnblase lässt sich Protoporphyrin IX nach topischer Applikation von 5-ALA (Instillation) im gesamten Epithel finden, mit einem Maximum der Fluoreszenz bei den superfiziellen Zellen ([Mar99]).

Die Zielvorstellung aller die konventionelle Weißlichtuntersuchung erweiternden in-vivo-Fluoreszenzmethoden ist das Prinzip der „optical biopsies“: Das Fluoreszenzsignal des Gewebes soll als Entscheidungskriterium dienen, ob die untersuchte Stelle als verdächtig auffällt und daher zur histo-pathologischen Absicherung eine Biopsie entnommen werden sollte. Für diese Art der Fluoreszenzdiagnostik ist die Korrelation von histo-pathologischen Anomalien mit Unterschieden im Fluoreszenzsignal erforderlich. Es gibt eine Anzahl an Arbeiten, in denen nichtzeitaufgelöste Fluoreszenzmethoden für die Erkennung der zervikalen intraepithelialen Neoplasie verwendet werden. Auf die Ergebnisse des visuellen Intensitätskontrastes durch 5-ALA induziertes Protoporphyrin IX wurde oben bereits eingegangen ([Wei99], [Hil00b]). Die Autoren konnten bei Verwendung einer spektroskopischen Quantifizierung der Porphyrinfluoreszenz und der Autofluoreszenz deutlich bessere Ergebnisse (Spezifität ungefähr 70 %) erreichen, als bei der reinen Fluoreszenzbildgebung. Ein anderes Verfahren zur quantitativen Auswertung der 5-ALA induzierten PPIX-Fluoreszenz wird in [Aal02] verwendet. Die Autoren führen ihre Messgröße, die sie durch ein Doppel-ratio-Verfahren mit zwei Anregungswellenlängen und zwei Detektionswellenlängen erhalten, allein auf die Konzentration des Photosensibilisators im Gewebe zurück. Eine Null-Phasenevaluierung der Messmethode in-vivo zeigte eine statistisch signifikante Korrelation des Doppel-ratio-Signals mit dem Grad der neoplastischen Gewebeveränderungen.

Intensiv hat sich die Arbeitsgruppe um Richards-Kortum der Erkennung zervikaler Neoplasien durch die spektrale Analyse der Autofluoreszenz gewidmet. Erste Untersuchungen wurden mit einem Stickstofflaser bei einer Anregungswellenlänge von 337 nm durchgeführt ([Ram94]). Unter Verwendung eines Auswertalgorithmus, bei dem die spektrale Charakteristik der Fluoreszenzemission um 420 - 440 nm und die Fluoreszenzintensität im Maximum eingehen, konnten die Autoren neoplastische und präneoplastische Befunde von histologisch normalen Befunden mit einer Sensitivität von 87 % und einer Spezifität von 73 % diskriminieren. Aus dem Vergleich mit Reinsubstanzmessungen führten sie die spektralen Veränderungen von Normalgewebe hin zu höhergradigen Gewebeanomalien auf einen verminderten Kollagenbeitrag, eine erhöhte Absorption durch Oxyhemoglobin und einen erhöhten Beitrag durch NADH in reduzierter Form zurück. In weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe wurden die Untersuchungen auf andere Anregungswellenlängen und Auswertalgorithmen sowie Remissionsdetektion ausgedehnt ([Ram96a], [Ram96b], [Dre01], [Cha02b], [Mir02]). Dabei wurden auch wichtige Erkenntnisse über die Einflüsse des Menstruationszyklus, Zervikalmucus und Essigsäuretest auf die Fluoreszenzemission gefunden ([Agr99], [Cha02a], [Cox03], [Bro03]).

Im Gegensatz zu den konventionellen Fluoreszenzmethoden, liegen keine Veröffentlichungen über in-vivo-Untersuchungen der zeitaufgelösten Detektionsmethode bei der zervikalen intraepithelialen Neoplasie vor. Die Frage ob das in dieser Arbeit festgestellte diagnostische Potential in-vivo erhärtet oder andererseits einzuschränken ist, bleibt somit zukünftigen Arbeiten vorbehalten. Beachtenswert ist der Umstand, dass die festgestellten signifikanten Unterschiede bei der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion Normalgewebe und (fast ausschließlich) geringgradig präkanzeröse Anomalien des zervikalen Epithels unterscheiden lassen. So ist zu hoffen, wenn nicht gar zu erwarten, dass entsprechendes diagnostisches Potenzial der Methode auch bei Präkanzerosen anderer Organe zu finden ist, und bei den Kanzerosen wegen der umfassenderen Gewebeveränderungen mindestens ebenso stark ausfällt.

## 6.4 In-vivo-Messungen mit Rhodamin-Liposomen am Hamstermodell

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten in-vivo-Messungen am Hamsterrücken-kammermodell sind in erster Linie als eine Machbarkeitsstudie zu sehen, in welcher erste Erfahrungen mit dieser Art der in-vivo-Messung gesammelt werden sollte. Darüber hinaus war es das Ziel, eine Abschätzung zu erhalten, ob nach der Gabe von fluoreszenzmarkierten Liposomen anhand von Fluoreszenzabklingzeiten eine Tumordemarkation möglich ist und ob der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzabklingzeiten Einblick in dynamische Prozesse im Verlauf der Messung geben kann.

Für die Durchführung dieser ersten in-vivo-Anwendung der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion war gerade die Verwendung des Hamster-Rücken-kammermodells vorteilhaft. Die Rücken-kammer bietet gute Messbedingungen, da durch die Art der Präparation sowohl Tumor als auch umgebendes Normalgewebe gut zugänglich sind. Ebenso von Vorteil sind die definierten Arbeitsbedingungen, da für unterschiedliche Messungen gleichartige Tumorstadien zur Verfügung stehen und so Einflüsse individueller Unterschiede minimiert werden können. Der Umstand, dass für die Messungen mit dem Rücken-kammermodell der bestehende Messaufbau ohne tiefgreifende, zeitaufwendige Veränderungen verwendet werden konnte, ermöglichte die schnelle Realisierung der Messungen. Lediglich eine Halterung für die Fixierung der Plastikröhre, in welcher die Hamster während der Messungen immobilisiert waren, musste für den Mikroskopaufbau erstellt werden.

Für die Messungen stand als Anregungslichtquelle für die Liposomfluoreszenz nur ein Argon-Ionen-Laser zur Verfügung. Die deswegen verwendete Anregungswellenlänge von 514 nm bietet dabei für die Anregung der Liposomformulierungen mit dem Absorptionsmaximum bei 573 nm keine optimalen Bedingungen. Im Hinblick auf ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis sollte es normalerweise das Ziel sein, als Anregungswellenlänge das Maximum der Absorptionsbande zu verwenden. Dies lässt sich bei nichtzeitaufgelösten Messungen in der Regel ohne Probleme realisieren, da eine spektral breitbandige Lichtquelle verwendet werden kann, wobei mit optischen Filtern die Anregungswellenlänge variabel den jeweiligen Untersuchungsbedingungen angepasst wird. Eine prinzipielle Möglichkeit, eine höhere Fluoreszenzintensität auch bei geringem Absorptionskoeffizienten zu erreichen, liegt in der Erhöhung der Anregungsintensität. Dies war im Rahmen dieser Messungen allerdings nur in engen Grenzen möglich. Der optische Aufbau des Anregungs-zweiges des Messsystems mit einer Vielzahl an Spiegeln, die Modulation des Laserlichts mit dem akusto-optischen Modulator sowie vor allem die Einkoppelung in eine Monomodefaser bedingen grosse Verluste der Ausgangsleistung des Lasers. Für die Messungen stand so eine maximale Leistung des Anregungslichts von 50 mW zur Verfügung, wobei die auszu-leuchtende Fläche für eine gute Darstellung des Tumors und des Normalgewebes auf einen Durchmesser von rund 1 Zentimeter festgelegt war. Die Messungen konnten trotz dieser nichtoptimalen Ausgangsbedingungen durchgeführt werden, wobei gerade die Messungen der Autofluoreszenz vor Injektion der Liposomen deutlich grössere

Standardabweichungen aufweisen, was auch auf die geringe Signalintensität zurückzuführen ist.

Betrachtet man im Hinblick auf die Unterscheidung von Tumor- und Normalgewebe anhand von Fluoreszenzabklingzeiten zunächst die Autofluoreszenzmessungen vor Injektion der Liposomen, so zeigt sich bei den vier Messungen ein uneinheitliches Bild. Die quantitative Bestimmung der Abklingzeitmittelwerte liefert bei den Messungen H1 und H3 signifikante Unterschiede von rund 1 ns zwischen Tumor und Normalgewebe, während sich bei den anderen beiden Messungen die Unterschiede im Bereich von 100 ps bewegen. Der Umstand, dass bei letzteren beiden Messungen die mittleren Abklingzeiten  $\tau_M$  mit etwa 2,2 ns um 1-2 ns unter den Abklingzeiten der Messungen mit einem Unterschied zwischen Tumor und Normalgewebe liegen, mag ein Hinweis sein, dass hier grundlegende Unterschiede vorliegen. Eine Klärung dieses Punkts bedarf einer systematischen Untersuchung, aus der die Bandbreite der Autofluoreszenzabklingzeiten bestimmt und eventuelle Gründe für Unterschiede untersucht werden können. Vor allem Vergleichsmessungen mit anderen Anregungswellenlängen, sollten dabei einen besseren Einblick in die Eigenschaften der Autofluoreszenz geben. Die Anregungswellenlänge von 514 nm, auf die bei im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Rückenkammermessungen zurückgegriffen werden musste, schränkt die Fluoreszenzbeiträge zur Autofluoreszenz in erster Linie auf Flavine und Porphyrine ein.

Lässt sich zwar bei zwei der Autofluoreszenzmessungen quantitativ im Mittelwert der scheinbaren Abklingzeit  $\tau_M$  ein Unterschied zwischen Tumor und Normalgewebe feststellen, so zeigen jedoch die Falschfarbendarstellungen (Abbildung 5.16 oben) wie dieser Unterschied aufgrund der großen Streuung der Werte kaum zur visuellen, qualitativen Tumordemarkation herangezogen werden kann. Ganz anders liegen jedoch die Verhältnisse nach Injektion der Liposomen (Abbildung 5.16 unten und Abbildung 5.18). Hier lassen sich bereits anhand des visuellen Eindrucks der Falschfarbendarstellung Bereiche unterschiedlicher Fluoreszenzabklingzeiten ausmachen. Sowohl bei der Messung mit der Standarddosierung der Formulierung D<sub>1</sub> (H1), als auch bei der Messung mit einer auf ein Viertel reduzierten Dosierung (H4), liefert auch die quantitative Auswertung Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe. Die Differenz der scheinbaren Abklingzeit  $\tau_M$  in den beiden Arealen liegt bei ungefähr 200 ps. Wie im Einführungskapitel dargestellt, wird die Messunsicherheit vom Produkt der zu messenden Abklingzeit und der Modulationsfrequenz mitbestimmt. Anhand der Standardabweichungen bei den in-vitro-Messungen der Liposomsuspensionen ist bei den hier vorliegenden Gegebenheiten für Abklingzeiten um 1,5 ns eine Messunsicherheit im Bereich von 50 - 100 ns anzusetzen, womit diesen Unterschieden von 200 ps zwischen Tumor und Normalgewebe eine Signifikanz zugeschrieben werden kann. Auch für die Messungen mit den anderen Liposomformulierungen finden sich entsprechende Unterschiede.

Prinzipiell lassen sich zwei verschiedene Mechanismen als Ursache für die festgestellten Abklingzeitunterschiede ansetzen: Wie aus den in-vitro-Messungen ersicht-

lich, hat die Zusammensetzung der Liposomen und somit die Umgebungsbedingungen für das Fluorophor Rhodamin eine Auswirkung auf die Fluoreszenzabklingzeit. Daher wäre das Vorliegen unterschiedlicher Umgebungsbedingungen in Tumor und Normalgewebe eine mögliche Erklärung. Allerdings umfasst das Fluoreszenzsignal neben der Rhodaminfluoreszenz auch Beiträge der Autofluoreszenz. Die andere mögliche Erklärung sind daher unterschiedliche Mischungsverhältnisse dieser Beiträge in Tumor und im Normalgewebe. Die in der Darstellung der Ergebnisse aufgezeigte Extraktion der Rhodaminkinetik und der Rhodaminabklingzeit  $\tau_M^{Rh}$  zeigt, dass die festgestellten Unterschiede auf letztere Möglichkeit zurückzuführen sind: Für die Rhodaminabklingzeit  $\tau_M^{Rh}$  ließen sich in allen Formulierungen keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor und Normalgewebe feststellen (Abbildung 5.21). Die Kinetik der Rhodaminfluoreszenz hingegen zeigt deutliche Unterschiede mit einem Tumor-Normal-Verhältnis von über 2 nach Injektion der Formulierung D<sub>1</sub> in der Standarddosierung. So ist der Anteil der Rhodaminfluoreszenz der Formulierung mit einer Abklingzeit von ungefähr 1,2 ns im Tumor höher, was sich im Gesamtsignal in der kürzeren scheinbaren Abklingzeit äußert. Das gleiche Bild zeigt sich bei den anderen Formulierungen (H2, H3), wobei bei der Messung H2 das Intensitätsverhältnis zugunsten des Normalgewebes umgekehrt ist. In diesem Fall werden die kürzeren Abklingzeiten im Normalgewebe gefunden.

Das Tumor-Normalverhältnis der Rhodaminfluoreszenz, das hier für die Unterscheidung von Tumor und Normalgewebe ausschlaggebend ist, ist der einzige Aspekt der Messungen, für den Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen vorliegen. Krasnici und Koautoren zeigen in ihrer Veröffentlichung ([Kra03]) die Ergebnisse, die sie mit Dauerstrich-Fluoreszenzuntersuchungen unterschiedlicher Liposomformulierungen in diesem Tiermodell erzielten. Bei diesen Messungen wurden keine Fluoreszenzabklingzeiten bestimmt, sondern die Intensität der Fluoreszenz mit einer verstärkten Videokamera (C2400-08, Hamamatsu) detektiert. Die kontinuierliche Anregung der Fluoreszenz erfolgte dabei mit einer Quecksilberlampe mit einem Bandpassfilter ( $\lambda = 530 - 560$  nm). Die Untersuchung umfasste dabei neben kationischen auch neutrale und anionische Formulierungen. Während für die neutralen und anionischen Formulierungen eine annähernd homogene Verteilung der Fluoreszenzintensität über den ganzen Bereich der Hamsterrückenkammer gefunden wurde, zeigten in dieser Untersuchung kationische Formulierungen eine deutliche erhöhte Anreicherung im Tumor mit einem maximalen Tumor-Normal-Verhältnis von 3,0. Krasnici und Koautoren berichten, dass die Tumorfluoreszenz der kationischen Liposomen auch nach 6 Stunden zu detektieren war, wohingegen bei den anderen Formulierungen nach 180 Minuten (anionisch) beziehungsweise 360 Minuten (neutral) keine signifikante Fluoreszenz verblieben war. Zur Untersuchung der Ursachen für dieses unterschiedliche Verhalten wurden histologische Präparate angefertigt, wobei eine zusätzliche Markierung des Tumorgefäßsystems durch die Gabe von FITC-markiertem Lektin durchgeführt wurde. Die histologischen Ergebnisse von 20 Minuten nach Injektion der Liposomen genommenen Präparate ergab dabei, dass bei den kationischen Liposomformulierungen die Rhodaminfluoreszenz von den Gefäßwänden der Tumormikrogefäße her-

rührte. Zu diesem Zeitpunkt war keine extravaskuläre Fluoreszenz festzustellen. Dieses Ergebnis, dass kationische Liposomen eine spezifisch Anreicherung in angiogenem Endothel zeigen, steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ([McL97]), [Thu98]).

Ein Fragenkomplex, der mit konventionellen Untersuchungen der Fluoreszenzintensität nicht angegangen werden kann, sind Vorgänge die zu einem Aufbrechen der Liposomstruktur nach systemischer Applikation führen. Es zeigen zwar die Formulierungen unterschiedlicher Mischungsverhältnisse der Lipide auch unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten, ein Effekt ließe sich aber aus der Intensität allein nicht belegen, da keine Entkoppelung von der Kinetik durchführbar ist. Die große Bedeutung dieses Fragenkomplexes liegt dabei darin, dass es nahe liegt Liposomen nicht nur diagnostisch einzusetzen, sondern gerade ihre spezifische Anreicherung im angiogenen Tumorendothel auch therapeutisch zu nutzen. Die spezifische Anreicherung am Zielort bedeutet dabei nur den ersten, wenn auch äußerst wichtigen Schritt. Erst wenn ein Wirkstoff von einem Transporter freigesetzt wird und in die Zielzellen gelangt, die hier die Endothelzellen des Tumorgefäßsystems sind, kann er dort seine Wirkung entfalten. Die denkbare therapeutische Anwendung der kationischen Liposomen ist so die Zerstörung der Tumormikrozirkulation, wodurch sich die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen hemmen ließe.

Die Extraktion der Rhodaminabklingzeit  $\tau_M^{Rh}$  aus den Abklingzeiten des Gesamtsignals ist durch die Fragestellung motiviert, ob sich eine Veränderung der Liposomen feststellen lässt. Die Ergebnisse der Extraktion (siehe Abbildung 5.21) zeigen für die Formulierung D<sub>1</sub> und die Formulierung A<sub>1</sub> mit der kürzesten Abklingzeit einen prinzipiell gleichen Verlauf. Direkt nach der Injektion der Liposomen werden Werte für  $\tau_M^{Rh}$  gefunden, die bei 1,25 ns und 1,0 ns nahe den in-vitro-Werten liegen. Am Ende der Messdauer sind die Werte um rund 0,5 ns angestiegen. Wie in der Darstellung der Ergebnisse darauf hingewiesen wurde, ergibt sich bei dieser Extraktion eine Unsicherheit der Werte, die größer ist, als der Messfehler von ungefähr 100 ps. Anhand der zusätzlichen Berechnungen unter Verwendung der Standardabweichung der Messdaten ( $\tau \pm \sigma$ ) konnte die Zuverlässigkeit der Werte überprüft werden. So sind die Ergebnisse dieser Rhodaminabklingzeiten  $\tau_M^{Rh}$  ein Hinweis, dass ungefähr 2 - 4 Stunden nach Injektion der Liposomen eine Veränderung stattgefunden hat. Der Umstand, dass eine Tendenz zu längeren Abklingzeiten vorliegt, lässt sich durch eine Verminderung der Rhodamin- beziehungsweise N-Rh-PE-Konzentration erklären. Wenn der Absolutgehalt an Monomeren und Dimeren nicht geändert wird, so hat eine Verdünnung wegen des grösseren Abstands von Donor und Akzeptor eine Verminderung der Transfereffizienz zur Folge. Das Resultat wäre eine längere Fluoreszenzabklingzeit, da weniger angeregte Moleküle strahlungslos in den Grundzustand zurückkehren. Als Ursache, die zu einer verminderten Konzentration führt, ist eine Verschmelzung der Lipidmembran mit Zellmembranen naheliegend. Dass dies tatsächlich aufgetreten ist, kann nicht mit Sicherheit aus den Ergebnissen gefolgert werden, die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin.

Aus dem Rahmen des zu Erwartenden fallen die Ergebnisse der Messung mit der Liposomformulierung, die in-vitro die längste Abklingzeit von 1,8 ns aufwies. Bei einem den anderen Formulierungen entsprechendem Verhalten sollte nach Injektion der Liposomen zunächst eine Abklingzeit  $\tau_M^{Rh} \approx 1,8$  ns auftreten. Dass stattdessen 1,1 ns errechnet wurden, ist auf den ersten Blick nicht zu erklären. Allerdings zeigte diese Formulierung auch nach Zugabe von Methanol ein anderes Verhalten, als die beiden anderen Formulierungen, indem bei dieser Messung nach der Zerstörung der Liposomstruktur eine Veränderung zu kürzeren Abklingzeiten hin festgestellt wurde. Somit ist es denkbar, dass in-vivo die Struktur der Liposomen bereits bei der Perfusion zerstört wird, was sich in kürzeren Abklingzeiten  $\tau_M^{Rh}$  niederschlägt. Eine Unterstützung für diese Erklärung ist der Umstand, dass diese Formulierung den geringsten Anteil an kationischem Lipid DOTAP enthält. Einer Nettoladung der Membranoberfläche werden stabilisierende Auswirkungen zugeschrieben, da die elektrostatische Abstoßung die Aggregation von Liposomen vermindert ([Las98b], [Koz00]). Ausser der Nettoladung anionischer und kationischer Liposomen gibt es auch andere Ansatzpunkte, die Stabilität von Liposomen zu erhöhen. Die wichtigste Rolle spielen dabei sterisch stabilisierte Liposomen. Durch die kovalente Koppelung von inerten Polymeren (zumeist Polyethylenglykol) an die Kopfgruppe von Phospholipiden lässt sich eine erhöhte Stabilität und längere Verweildauer im Organismus nach systemischer Gabe erreichen ([Nee92], [Las99]). Da diese sterisch stabilisierten Liposomen auch eine erhöhte Serumstabilität dank der geringen Interaktion mit Blutkomponenten wie den Immunglobulinen haben sowie vom retikuloendothelialen System nur in geringem Masse als körperfremd erkannt werden, werden sie auch als „Stealth-Liposomen“ bezeichnet.

Abschliessend seien noch einmal die zentralen Ergebnisse aufgeführt, die sich aus den durchgeführten in-vivo-Messungen Rhodamin-markierter Liposomen beim Hamster-Rückenkammermodell mit dem realisierten zeitaufgelösten Messsystem gewinnen ließen:

- Die Demarkierung des Tumorareals anhand eines Fluoreszenzlebenszeitkontrastes zeigte sich deutlich in den Falschfarbendarstellungen und wurde entsprechend in der quantitativen Auswertung bestätigt.
- Aus dem Vergleich der Rhodaminabklingzeiten  $\tau_M^{Rh}$  in-vivo mit den in-vitro gewonnenen Daten intakter sowie strukturell veränderter Liposomen konnte auf eine Veränderung der Liposomen nach Bindung an das Endothel des Tumorgefäßsystems geschlossen werden.



## 7 Zusammenfassung

Das zentrale Ziel dieser Arbeit bestand im Aufbau und in ersten Anwendungen eines Messsystems, mit welchem Fluoreszenzabklingzeiten von ausgedehnten Proben zu erfassen und zu visualisieren sein sollte. Unter den herausstechendsten Merkmalen des realisierten Systems ist als erstes die bildgebende Messung der Fluoreszenzabklingzeiten zu nennen: Sehr viel einfacher als in reinen Zahlenkolonnen lassen sich die gewonnenen Informationen in der bildlichen Darstellung erfassen. Die Falschfarbendarstellung von Fluoreszenzabklingzeiten ermöglicht es, auf einen Blick lokale Unterschiede in den Fluoreszenzabklingzeiten der untersuchten Probe anhand des Farbkontrastes in der Darstellung zu erkennen. Dass die Messung nicht nur an einer einzigen Stelle durchgeführt wird, wie dies bei Faser-gestützten Messungen der Fall ist, sondern die Probe flächig untersucht wird und ein Abbild der Probe resultiert, erleichtert die Zuordnung der Fluoreszenzabklingzeitinformationen zur Morphologie des Untersuchungsobjekts. Die Korrelation der Verteilung der (an sich rein abstrakten) Abklingzeitwerte zu den visuell direkt erfaßbaren Gegebenheiten ist auf diese Weise sofort gegeben. Neben der visuellen (qualitativen) Erfassung der Messergebnisse stehen durch die entwickelten Auswertehilfsmittel alle nötigen Werkzeuge zur Verfügung, um „harte“ quantitative Informationen über das Fluoreszenzabklingverhalten des Untersuchungsobjekts zu erhalten. Dies erst gibt die Möglichkeit, systematisch die Messergebnisse zu analysieren und zum Beispiel nach Korrelationen zwischen Abklingzeitunterschieden und malignen oder prä-malignen Veränderungen zu suchen. Im Hinblick auf einen in-vivo-Einsatz des Systems in der Gewebediagnostik ist die Geschwindigkeit, in der die Messungen durchführbar sind von besonderer Wichtigkeit: Die Möglichkeit, Fluoreszenzabklingzeitinformationen des untersuchten Objekts in Echtzeit ohne langwierige nachfolgende Datenverarbeitungsprozeduren zu erhalten, eröffnet für die klinische Anwendung außerhalb des Labors günstige Voraussetzungen. Das Auffinden „interessanter“ Untersuchungsareale kann, obwohl es sich um eine Messung von Prozessen auf einer Nanosekundenzeitskala handelt, wie bei normalen visuellen Untersuchungsmethoden durchgeführt werden. Der letzte besonders hervorzuhebende Aspekt ist die Modularität des Aufbaus. Die Auftrennung von Anregungs- und Detektionszweig gibt die Möglichkeit auf einfache Weise das Messsystem an die Untersuchungsziele und -gegebenheiten anzupassen. Sowohl unterschiedliche Anregungslichtquellen (Laser-AOM-Aufbau, modulierbare Laserdiode), wie auch verschiedenste Detektionsoptiken (Mikroskop, Kameraoptik, Endoskop) können verwendet werden. Vor allem mit modulierbaren Laserdioden (deren Ausgangsleistung in Zukunft wohl auch im blauen Spektralbereich noch weiter steigen wird) ist dank der einfachen Handhabung und des kompakten Aufbaus eine Umsetzung des hier noch experimentellen Messsystems zu einem flexiblen, kompakten und einfach einsetzbaren Diagnosewerkzeug möglich.

In den Anwendungen des Messsystems auf endogene und exogene Fluorophore sowie auf Gefrierbiopsien und am Rückenhammermodell des Hamsters konnte das breite Anwendungsspektrum der Methode abgesteckt werden. Die Messungen an Reinsubstanzen der endogenen Gewebefluoreszenz lieferten mit den Informationen, wie sich diese Fluorophore in der Phasenbereichsmethode darstellen, die Vorarbeiten für die folgenden Messungen an biologischem Gewebe. Die Fluoreszenzabklingzeiten der Fluorophore standen alle im Einklang mit Ergebnissen, die von anderen Arbeitsgruppen mit der Zeitbereichsmethode gewonnen wurden. Die Untersuchung rhodamin-gelabelter kationischer Liposomkonjugate stellte die erste Anwendung auf einen neuen, in seinen Eigenschaften unbekanntem Tumormarker dar. Die Rückführung der Fluoreszenzabklingzeitunterschiede unterschiedlicher Liposomkonjugate mit variierender Zusammensetzung aus neutralen und kationischen Lipiden auf eine Dimerisation der Rhodamin-gelabelten Komponente zeigt einen weiteren wichtigen Aspekt dieser Messmethode auf: Die zeitaufgelöste Fluoreszenzdiagnostik stellt auch ein mächtiges Analysewerkzeug dar. Sowohl bei der Entwicklung neuer Tumormarker wie in diesem Fall, wie auch bei vielen biologischen und medizinischen Fragestellungen kann die Methode wertvolle Informationen liefern, die auf anderem Wege nicht zugänglich sind. Gerade durch die Sensitivität der Fluoreszenzabklingzeit auf Bindungs-, Faltungs- und Aggregationsprozesse können mit Fluorophoren als Mikrosonden derartige Prozesse erkannt und untersucht werden.

Eine erste Abschätzung des Potenzials der Methode bei der Erkennung maligner und prämaligener Gewebeveränderungen wurde anhand der Messungen an Gefrierbiopsien der zervikalen intraepithelialen Dysplasie durchgeführt. Nach den Vorarbeiten der Reinsubstanzmessungen ließen sich die gefundenen Abklingzeitverteilungen der Biopsien auf Fluoreszenzbeiträge der endogenen Fluorophore sowie des exogen induzierten Protoporphyrin IX zurückführen. Bemerkenswert sind die signifikanten Unterschiede der Fluoreszenzabklingzeiten zwischen Normalgewebe und dysplastisch verändertem Gewebe, die sowohl im grünen Spektralbereich (Autofluoreszenz) als auch im roten Spektralbereich (PPIX) gefunden wurden. Bei den dysplastischen Gewebeveränderungen handelte es sich fast ausschließlich um leichte Dysplasien (CIN1), so dass die Hoffnung, mit Hilfe der zeitaufgelösten Fluoreszenzdiagnostik maligne und prämaligene Gewebeveränderungen diagnostizieren zu können durchaus begründet ist. In den abschließenden in-vivo-Messungen am Rückenhammermodell des Hamsters nach Injektion der Rhodamin-gelabelten Liposomkonjugate zeigen sich alle wichtigen Aspekte der zeitaufgelösten Fluoreszenzdiagnostik vereint: Die klare visuelle Demarkation der Tumorareale aufgrund des starken Fluoreszenzabklingzeitkontrastes ist sehr leicht zu erkennen. Bei der konventionellen, nichtzeitaufgelösten Untersuchung ist die Lokalisation wegen der im Roten liegenden Emission des Rhodamin in erster Linie auf einen Intensitätskontrast beschränkt (der in den zeitaufgelösten Messungen ebenso zu sehen ist). Die quantitative Auswertung der Daten bestätigte die Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe.

Eine Verbindung des analytischen und des diagnostischen Nutzens der Methode tritt in der Extraktion der Fluoreszenzabklingzeit des Rhodamin aus dem Gesamtsignal zu Tage: Die Ergebnisse lassen sich als ein Hinweis auf eine Veränderung der Rhodaminabklingzeit im Verlauf der Messung verstehen. Dies müsste nach den Untersu-

---

chungen der reinen Liposomkonjugate auf eine Veränderung der Struktur der Liposomen zurückgeführt werden. Eine derartige Veränderung der Liposomen, insbesondere das Aufbrechen der Liposomen, stellte den Idealfall eines Tumormarkers dar, der nicht nur tumorselektive Anreicherung zeigt, sondern am Ort des Tumors Wirkstoffe zur Zerstörung freisetzen kann.

Durch die in dieser Arbeit geschaffenen Grundlagen ist der weitere Weg hin zur Nutzung der zeitaufgelösten Diagnostik vorgezeichnet: Im Bereich der Laboruntersuchungen sind eine Vielzahl an weiteren Untersuchungsobjekten denkbar. Nicht nur Gewebeproben und Tumormarker können am Mikroskop untersucht werden, auch aus Zellexperimenten lassen sich viele wichtige Informationen ableiten. Ein Beispiel ist die Frage in welchen Zellkompartimenten eine besondere Anreicherung des therapeutisch wichtigen PPIX-Monomers (lange Abklingzeit) vorliegt. Systematische Untersuchungen bei malignen und prämaligen Gewebeeränderungen verschiedenster Organe werden zeigen müssen, inwieweit sich das aufgezeigte diagnostische Potenzial erfolgreich umsetzen läßt. Die Zielvorstellung dabei ist der Einsatz der Methode am Patienten. Die vielseitigsten Anwendungsmöglichkeiten stehen dafür mit einer Endoskopankoppelung des Messsystems zur Verfügung. Vorarbeiten für diese endoskopische Umsetzung der zeitaufgelösten Fluoreszenzdiagnostik wurden im Rahmen der Arbeit durchgeführt. Zum Abschluss dieser Arbeit soll eine Beispielmessung dieser Vorarbeiten, die Vermessung eines Gewebephantoms durch ein flexibles Endoskop, den Ausblick geben in eine kommende *Zeit*.

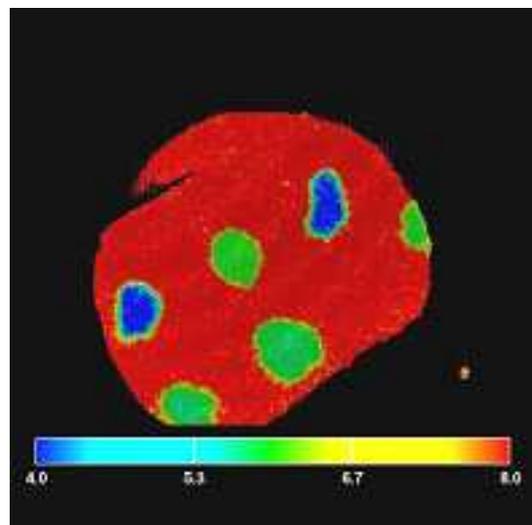
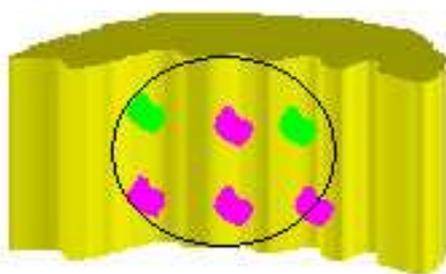


Abbildung 7.1: Endoskopische Fluoreszenzabklingzeitvermessung eines Gewebephantoms durch ein flexibles Bronchoskop (rechts) und Schemazeichnung des Phantoms mit unebener Oberflächenstruktur und Arealen unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe (links).



## Literaturverzeichnis

- [Aal02] Aalders, A. Bogaards A.D M.C., C.C. Zeyl, S. de Blok, C. Dannecker, P. Hillemanns, H. Stepp und H.J. Sterenborg: *Localization and staging of cervical intraepithelial neoplasia using double ratio fluorescence imaging*. J. Biomed. Opt., 7(2):215–220, 2002.
- [Aar72] Aaron, J.-J. und J.D. Winefordner: *Fluorimetric and phosphorimetric characteristics of several vitamins*. Talanta, 19:21–29, 1972.
- [Abe84] Abels, C., P. Heil, M. Dellian, G.E.H. Kuhnle, R. Baumgartner und A.E. Goetz: *In vivo fluorescence kinetics and spectra of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in an amelanotic melanoma of the hamster*. Br. J. Cancer, 70:826–833, 1984.
- [Abe97a] Abels, C., C. Fritsch, K. Bolsen, R.-M. Szeimies, T. Ruzicka, G. Goerz und A.E. Goetz: *Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins of an amelanotic melanoma in vivo*. J. Photochem. Photobiol. B, 40:76–83, 1997.
- [Abe97b] Abels, C., R.-M. Szeimies, P. Steinbach, C. Richert und A.E. Goetz: *Targeting of the tumor microcirculation by photodynamic therapy with a synthetic porphycene*. J. Photochem. Photobiol. B, 40:305–312, 1997.
- [AE90a] Andersson-Engels, S., J. Johansson, U. Stenram, K. Svanberg und S. Svanberg: *Malignant tumor and atherosclerotic plaque diagnosis using laser-induced fluorescence*. IEEE J. Quant. Electr., 26:2207–2217, 1990.
- [AE90b] Andersson-Engels, S., J. Johansson und K. Svanberg: *The use of time-resolved fluorescence for diagnosis of atherosclerotic plaque and malignant tumors*. Spectrochim. Acta, 45A:1203–1210, 1990.
- [AE91a] Andersson-Engels, S., L. Baert, R. Berg, M. A. D'Hallewin, J. Johansson, U. Stenram, K. Svanberg und S. Svanberg: *Fluorescence characteristics of atherosclerotic plaque and malignant tumors*. SPIE Proc., 1426:31–43, 1991.
- [AE91b] Andersson-Engels, S., J. Johansson, K. Svanberg und S. Svanberg: *Fluorescence imaging and ponit measurements of tissue: Application to the demarcation of malignant tumors and atherosclerotic lesions from normal tissue*. Photochem. Photobiol., 53:807–814, 1991.

- [AE00] Andersson-Engels, S., G. Canti, R. Cubeddu, C. Eker, C. Af Klinteberg, A. Pifferi, K. Svanberg, S. Svanberg, P. Taroni, G. Valentini und I. Wang: *Preliminary evaluation of two fluorescence imaging methods for the detection and delineation of basal cell carcinomas of the skin*. *Lasers Surg. Med.*, 26:76–82, 2000.
- [Agr99] Agrawal, A., U. Utzinger, C. Brookner, C. Pitris, M.F. Mitchell und R. Richards-Kortum: *Fluorescence spectroscopy of the cervix: Influence of acetic acid, cervical mucus, and vVaginal medications*. *Lasers Surg. Med.*, 25(3):237–249, 1999.
- [Alc87] Alcalá, J.R., E. Gratton und F.G. Prendergast: *Resolvability of fluorescence lifetime distributions using phase fluorometry*. *Biophys. J.*, 51(4):587–596, 1987.
- [Alc94] Alcalá, J.R.: *The effect of harmonic conformational trajectories on protein fluorescence and lifetime distribution*. *J. Chem. Phys.*, 101:4578–4584, 1994.
- [And82] Andreoni, A., R. Cubeddu, S. de Silvestri, P. Laporta, G. Jori und E. Reddi: *Hematoporphyrin derivative: Experimental evidence for aggregated species*. *Chem. Phys. Letts.*, 88:33–36, 1982.
- [And03] Andikyan, V.: *Pharmakokinetische, fluoreszenzmikroskopische Studie zur Gewebeaufnahme und Verteilung von 5-Aminolävulinsäure aus 5-ALA-Thermogel bei zervikaler intraepithelialer Neoplasie (CIN 1-3)*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2003.
- [Arb94] Arbuzova, A., T. Korte, P. Müller und A. Herrmann: *On the validity of lipid dequenching assay for estimating virus fusion kinetics*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1190(2):360–366, 1994.
- [Asa81] Asaishi, K., B. Endrich, A.E. Goetz und K. Messmer: *Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanome A-Mel-3*. *Cancer Res.*, 44:1898–1904, 1981.
- [Bai53] Bailey, E.A. und G.K. Rollefson: *The determination of fluorescence lifetimes of dissolved substances by a phase shift method*. *J. Chem. Phys.*, 21(8):1315–1322, 1953.
- [Bam95] Bambot, S.B., G. Rao, M. Romauld, G.M. Carter, J. Sipior, E. Terpetchnig und J.R. Lakowicz: *Sensing oxygen through skin using a red diode laser and fluorescence lifetimes*. *Biosens. Bioelectron.*, 10(6-7):643–652, 1995.
- [Bar90] Barbieri, B., F. De Piccoli, M. VandeVen und E. Gratton: *What determines the uncertainty of phase and modulation measurements in frequency domain fluorometry*. *SPIE Proc.*, 1204:158–170, 1990.

- [Bas93] Bastiaens, P. und A.J.W.G. Visser: *Dynamics and geometry in dimeric Flavoproteins from fluorescence relaxation spectroscopy*. Springer Verlag, Berlin, Fluorescence Spectroscopy - New methods and applications, O. S. Wolfbeis Auflage, 1993.
- [Bau99] Baumgartner, R., M. Kriegmair und A. Hostetter: *Fluoreszenzdiagnostik des Harnblasenkarzinoms*. Endo-Press, Tuttlingen, 1999.
- [Beh94] Behr, J.P.: *Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: Prospect for gene therapy*. Biocong. Chem., 5:382–389, 1994.
- [Ber90] Berndt, K.W., I. Gryczynski und J.R. Lakowicz: *Phase-modulation fluorometry using a frequency-doubled pulsed laser diode light source*. SPIE Proc., 1204:253–261, 1990.
- [Ber92] Berndt, K.W. und J.R. Lakowicz: *Electroluminescent lamp-based phase fluorometer and oxygen sensor*. Anal. Biochem., 201(2):319–325, 1992.
- [Ber96a] Bernarding, J., A. Napiwotzki und H.-D.Kronfeldt: *Zeitaufgelöste Fluoreszenz endogener Metabolite als Nachweismethode zur Tumorfrüherkennung. Teil 1: NADH und NADPH*. Lasermedizin, 12:27–33, 1996.
- [Ber96b] Bernarding, J., A. Napiwotzki und H.-D. Kronfeldt: *Zeitaufgelöste Fluoreszenz endogener Metabolite als Nachweismethode zur Tumorfrüherkennung. Teil 2: Flavine und Mischungen von Flavinen und Dinukleotiden*. Lasermedizin, 12:94–100, 1996.
- [Ber02] Berg, P A.W. Van Den, K.A. Feenstra, A. Mark, H. Berendsen und A.J.W. Visser: *Dynamic conformation of Flavin Adenine Dinucleotide: Simulated molecular dynamics of the Flavin cofactor related to the time-resolved fluorescence characteristics*. J. Phys. Chem. B, 106:8858–8869, 2002.
- [Blu02] Blumenthal, R, S.A. Gallo, Y. Viard, M.and Raviv und A. Puri: *Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion*. Chem. Phys. Lipids, 116:39–55, 2002.
- [Bri95] Brismar, H., O. Trepte und B. Ulfhake: *Spectra and fluorescence lifetimes of lissamine rhodamine, tetramethylrhodamine isothiocyanate, texas red and cyanine 3.18 fluorophores: Influences of some environmental factors recorded with a confocal laser scanning microscope*. J. Histochem.Cytochem., 43(7):699–707, 1995.
- [Bro03] Brookner, C., U. Utzinger, M. Follen, R.R. Richards-Kortum, D. Cox und E.N. Atkinson: *Effects of biographical variables on cervical fluorescence emission spectra*. J. Biomed. Opt., 8(3):479–483, 2003.

- [Buc88] Bucci, E., H. Malak, C. Fronticelli, I. Gryczynski, G. Laczko und J.R. Lakowicz: *Time-resolved emission spectra of hemoglobin on the picosecond time scale*. Biophys. Chem., 32(2-3):187–198, 1988.
- [Buc90] Bucci, E., Z. Gryczynski, C. Fronticelli, G. Laczko, H. Malak und J.R. Lakowicz: *Frequency domain lifetimes of liganded and unliganded hemoglobin measured with a 10 GHz instrument using front face geometry on a free liquid surface*. SPIE Proc., 1204:813–819, 1990.
- [Cas98] Castellano, F.N. und J.R. Lakowicz: *A water-soluble luminiscence oxygen sensor*. Photochem. Photobiol., 67(2):179–183, 1998.
- [Cha02a] Chang, S.K., M.Y. Dawood, G. Staerkel, U. Utzinger, E.N. Atkinson, R.R. Richards-Kortum und M. Follen: *Fluorescence spectroscopy for cervical precancer dDetection: Is there variance across the menstrual cycle?* J. Biomed. Opt., 7(4):595–602, 2002.
- [Cha02b] Chang, S.K., M. Follen, A. Malpica, U. Utzinger, G. Staerkel, D. Cox, E.N. Atkinson, C. MacAulay und R. Richards-Kortum: *Optimal excitation wavelengths for discrimination of cervical neoplasia*. IEEE Trans. Biomed. Eng., 49(10):1102–1111, 2002.
- [Che88] Chen, R.F. und J.R. Knutson: *Mechanism of fluorescence concentration-quenching of Carboxyfluorescein in Liposomes: Energy Transfer to non-fluorescent dimers*. Anal. Biochem., 172(1):61–77, 1988.
- [Cho83] Chong, P.L., A.R. Cossins und G. Weber: *A differential polarized phase fluorometric study of the effects of high hydrostatic pressure upon the fluidity of cellular membranes*. Biochemistry, 22(2):409–415, 1983.
- [Cle92] Clegg, R.M., B. Feddersen, E. Gratton und T.M. Jovin: *Time resolved imaging fluorescence microscopy*. SPIE Proc., 1640:448–460, 1992.
- [Cle96] Clegg, R.M. und P.C. Schneider: *Fluorescence lifetime-resolved imaging microscopy: A general description of lifetime-resolved imaging measurements*. Plenum Press, New York, 1996.
- [Cox03] Cox, D.D., S.K. Chang, M.Y. Dawood, G. Staerkel, U. Utzinger, R.R. Richards-Kortum und M. Follen: *Detecting the signal of the menstrual cycle in fluorescence spectroscopy of the cervix*. Appl. Spectrosc., 57(1):67–72, 2003.
- [Cub91] Cubeddu, R., R. Ramponi, P. Taroni und G. Canti: *Time-gated fluorescence spectroscopy of porphyrin derivatives and aluminium phthalocyanine incorporated in vivo in a murine ascitic tumour model*. J. Photochem. Photobiol. B, 11(3-4):319–328, 1991.

- [Cub92] Cubeddu, R., P. Taroni, G. Valentini und G. Canti: *Use of time-gated fluorescence imaging for diagnosis in biomedicine*. J. Photochem. Photobiol. B, 12(1):109–113, 1992.
- [Cub93] Cubeddu, R., G. Canti, P. Taroni und G. Valentini: *Time-gated fluorescence imaging for the diagnosis of tumors in a murine model*. Photochem. Photobiol., 57(3):480–485, 1993.
- [Cub95] Cubeddu, R., G. Canti, P. Taroni und G. Valentini: *Decay time images of HpD fluorescence for tumor detection in mice*. SPIE Proc., 2627:138–144, 1995.
- [Cub97a] Cubeddu, R., G. Canti, A. Pifferi, P. Taroni, A. Torricelli und G. Valentini: *Study of the Absorption Properties of Sulfonated Aluminium Phthalocyanine IN VIVO and EX VIVO in Murine Tumor Models*. J. Biomed. Opt., 2(1):131–139, 1997.
- [Cub97b] Cubeddu, R., G. Canti, A. Pifferi, P. Taroni und G. Valentini: *Fluorescence Lifetime Imaging of experimental tumors in hematoporphyrin derivative-sensitized mice*. Photochem. Photobiol., 66(2):229–236, 1997.
- [Cub97c] Cubeddu, R., G. Canti, P. Taroni und G. Valentini: *Tumour visualization in a murine model by time-delayed fluorescence of sulphonated aluminium phthalocyanine*. Lasers Med. Sci., 12:200–208, 1997.
- [Del95] Dellian, M., C. Abels, G.E.H. Kuhnle und A.E. Goetz: *Effects of photodynamic therapy on leucocyte-endothelium interaction: Differences between normal and tumour tissue*. Br. J. Cancer, 72:1125–1130, 1995.
- [Dom01] Domecq, A., E.A. Disalvo, D.L. Bernik, F. Florenzano und M.J. Politi: *A stability test of liposome preparations using steady-state fluorescent measurements*. Drug Deliv., 8(3):155–160, 2001.
- [Dre01] Drezek, R., K. Sokolov, U. Utzinger, I. Boiko, A. Malpica, M. Follen und R. Richards-Kortum: *Understanding the contributions of NADH and Collagen to cervical tissue fluorescence spectra: Modeling, measurements and implications*. J. Biomed. Optics, 6(4):385–396, 2001.
- [End80] Endrich, B., K. Asaishi, A.E. Goetz und K. Messmer: *A new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters*. Res. Exp. Med., 177:125–134, 1980.
- [Fed89] Feddersen, B.A., D.W. Piston und E. Gratton: *Digital parallel acquisition in frequency domain fluorometry*. Rev. Sci. Instrum., 60:2929–2936, 1989.
- [Fee02] Feenstra, K.A.: *Long term dynamics of proteins and peptides*. Doktorarbeit, Rijksuniversiteit Groningen, 2002.

- [Fey91] Feyh, J., A.E. Goetz, A. Heimann, R. Königsberger und E. Kastenbauer: *Mikrozirkulatorische Effekte der Photodynamischen Therapie mit Hämatoporphyrin-Derivat*. Laryn. Rhin. Otol., 70:99–101, 1991.
- [Fio87] Fiorini, R., M. Valentino, S. Wang, M. Glaser und E. Gratton: *Fluorescence lifetime distributions of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene in phospholipid vesicles*. Biochemistry, 26:3864–3870, 1987.
- [Fol74] Folkman, J.: *Tumor angiogenesis*. Adv. Cancer Res., 19:331–358, 1974.
- [Fri97] Fritsch, C., C. Abels, A.E. Goetz, W. Stahl, K. Bolsen, T. Ruzicka, G. Goerz und H. Sies: *Porphyryns preferentially accumulate in a melanoma following intravenous injection of 5-aminolevulinic acid*. Biol. Chem., 378:51–57, 1997.
- [Fri01] Frimberger, D., D. Zaak, H. Stepp, R. Knüchel, R. Baumgartner, P. Schneede, N. Schmeller und A. Hofstetter: *Autofluorescence imaging to optimize 5-ALA-induced fluorescence endoscopy of bladder carcinoma*. Urology, 58(3):372–375, 2001.
- [Gad93] Gadella, T.W.J. Jr., T.M. Jovin und R.M. Clegg: *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM): Spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale*. Biophys. Chem., 48:221–239, 1993.
- [Gav26a] Gaviola, E.: *Die Abklingzeiten der Fluoreszenz von Farbstofflösungen*. Zeitschrift für Physik, 35:748–756, 1926.
- [Gav26b] Gaviola, E.: *Die Abklingzeiten der Fluoreszenz von Farbstofflösungen*. Annalen der Physik, 81:681–710, 1926.
- [Geo02] Georgakoudi, I., B.C. Jacobson, M.G. Müller, E.E. Sheets, K. Badizadegan, D. L. Carr-Locke, C. P. Crum, C.W. Boone, R.R. Dasari, J. Van Dam und M.S. Feld: *NAD(P)H and Collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes*. Cancer Res., 62:682–687, 2002.
- [Ger97] Gerritsen, H.C., R. Sanders, A. Draaijer, C. Ince und Y.K. Levine: *Fluorescence lifetime imaging of oxygen in living cells*. J. of Fluorescence, 7(1):11–15, 1997.
- [Gim74] Gimbrone, M., R. Cotran, S. Leapman und J. Folkman: *Tumor growth and neovascularisation - an experimental model using the rabbit cornea*. J. Nat. Cancer Inst., 52:413–427, 1974.
- [Gla94] Glassmann, W.S., M. Steinberg und R.R. Alfano: *Time resolved and steady state fluorescence spectroscopy from normal and malignant cultured human breast cell lines*. Lasers Life Sci., 6(2):91–98, 1994.

- [Gla01] Glanzmann, T.M., P. Uehlinger, J.-P. Ballini, A. Radu, T. Gabrecht, P. Monnier, H. Van Den Bergh und G. Wagnères: *Time-resolved autofluorescence spectroscopy of the bronchial mucosa for the detection of early cancer: Clinical results*. SPIE proc., 4432:199–209, 2001.
- [Goe88] Goetz, A.E.: *Quantitative Mikrozirkulationsanalyse im amelanotischen Hamstermelanom A-Mel-3*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1988.
- [Gra83] Gratton, E. und M. Limkeman: *A continuously variable frequency cross-correlation phase fluorometer with picosecond resolution*. Biophys. J., 44(3):315–324, 1983.
- [Gra84a] Gratton, E., D.M. Jameson und R.D. Hall: *Multifrequency phase and modulation fluorometry*. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 13::105–124, 1984.
- [Gra84b] Gratton, E., M. Limkeman, J.R. Lakowicz, B.P. Maliwal, H. Cherek und G. Laczko: *Resolution of mixtures of fluorophores using variable-frequency phase and modulation data*. Biophys. J., 46(4):479–486, 1984.
- [Gra90] Gratton, E., B. Feddersen und M. VandeVen: *Parallel acquisition of fluorescence decay using array detectors*. SPIE Proc., 1204:21–25, 1990.
- [Gra95] Gratton, E. und T. Parasassi: *Fluorescence lifetime distributions in membrane systems*. J. Fluorescence, 5(1):51–57, 1995.
- [Gre88] Gregoriadis, G. (Herausgeber): *Liposomes as drug carrier*. J.Wiley, 1988.
- [Gry97] Gryczynski, I., S. Beretta, J. Lubkowski, A. Razynska, I. Gryczynski und E. Bucci: *Time-resolved fluorescence of hemoglobin species*. Biophys. Chem., 64:81–91, 1997.
- [Gsc96] Gschwend, M.H., W.S.L. Strauss, H. Brinkmeier, R. Rüdell, R. Steiner und H. Schneckenburger: *Microscopic energy transfer spectroscopy to determine mitochondrial malfunction in human myotubes*. SPIE Proc., 2926:122–130, 1996.
- [Ham79] Hammond, P.R.: *Laser dye DCM, its spectral properties, synthesis and comparison with other dyes in the red*. Optics Comm., 29(3):331–333, 1979.
- [Har77] Harris, J.M. und F.E. Lytle: *Measurement of subnanosecond fluorescence decays by sampled single-photon detection*. Rev. Sci. Instrum., 48(11):1469–1476, 1977.
- [Hil97] Hillemanns, P., C. Thaler und R. Kimmig: *Epidemiologie und Diagnostik der zervikalen intraepithelialen Neoplasie: Ist das derzeitige Konzept von Screening und Diagnostik noch aktuell?* Gynäkol. Gebursh. Rundschau, 37:179–190, 1997.

- [Hil00a] Hillemanns, P.: *Neue Ansätze in Diagnostik und Therapie der intraepithelialen Neoplasien des unteren Genitaltrakts*. Habilitationsschrift Ludwig-Maximilians-Universität München, 2000.
- [Hil00b] Hillemanns, P., H. Weingandt, R. Baumgartner, J. Diebold, W. Xiang und H. Stepp: *Photodetection of cervical intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence*. *Cancer*, 88(10):2275–2282, 2000.
- [Hin98] Hinnen, P., F.W. de Rooij, M.L. Van Velthuisen, A. Edixhoven, R. Van Hillebergersberg, H.W. Tilanus, J.H. Wilson und P.D. Siersema: *Biochemical basis of 5-aminolaevulinic acid-induced Protoporphyrin IX accumulation: A study in patients with (pre)malignant lesions of the oesophagus*. *Br. J. Cancer*, 78(5):679–682, 1998.
- [Hoe84] Hoekstra, D., T. De Boer, K. Klappe und J. Wildschut: *Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes*. *Biochemistry*, 23:5675–5681, 1984.
- [Höh95] Höhne, W., W. Schramm, M. Nittka und H.-D. Kronfeldt: *Characterization of endogenous fluorophores by psec laser fluorescence spectroscopy*. *SPIE Proc.*, 2324:300–303, 1995.
- [Hol96] Holavanahali, R., M. Romauld, G.M. Carter, G. Rao, J. Sipiior, J.R. Lakowicz und J.D. Bierlein: *Directly modulated diode laser frequency doubled in a KTP waveguide as an excitation source for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> phase fluorometric sensors*. *J. Biomed. Opt.*, 1(1):124–130, 1996.
- [Hol97] Holst, G., M. Kühn, I. Klimant, G. Liebsch und O. Kohls: *Characterization and application of temperature microoptodes for use in aquatic biology*. *SPIE proc.*, 2980:164–170, 1997.
- [Hüt96] Hüttmann, G., W. Achtelik, M. Löning, K. Sommer und H. Diddens: *Fluorescence microscopy studies on ALA sensitized tissues*. *SPIE proc.*, 2926:24–31, 1996.
- [Isr85] Israelachvili, J. N.: *Thermodynamic and geometric aspects of amphiphile aggregation into micelles, vesicles, and bilayers, and the interaction between them*. In: Degorgio, V. und M. Corti (Herausgeber): *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions*, Band 90, Seiten 24–58. 1985.
- [Jai94] Jain, R.K.: *Barriers to drug delivery in solid tumors*. *Sci. Am.*, 271(1):58–65, 1994.
- [Jan99] Janoff, A.S. (Herausgeber): *Liposomes: Rational design*. Marcel Dekker, N. Y., 1999.

- [Jic97] Jichlinski, P., M. Forrer, J. Mizeret, T. Glanzmann, D. Braicotte, G. Wagnières, G. Zimmer, L. Guillot, F. Schmidlin, P. Graber, H. Van Den Bergh und H. J. Leisinger: *Clinical evaluation for detecting superficial transition cell carcinoma of the bladder by light-induced fluorescence of Protoporphyrin IX following topical application of 5-aminolevulinic acid: Preliminary results*. Lasers Surg. Med., 20:402–408, 1997.
- [Kel77] Keller, P.M., S. Person und W. Snipes: *A fluorescence enhancement assay of cell fusion*. J. Cell Sci., 28:167–177, 1977.
- [Ken90] Kennedy, J.C., B.H. Pottier und D.C. Pross: *Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: Basic principles and present clinical experience*. J. Photochem. Photobiol. B, 6:143–148, 1990.
- [Kle99] Kleinman, M.: *The Photochemistry(?) and Photophysics of Collagen*. Turro group meetings, Department of Chemistry Columbia University Online <http://turmac13.chem.columbia.edu/wwwnjt/meetings/kleinman/gm-Nov-02-99.ppt>, Stand August 2003, 1999.
- [Kli96] Klimant, I., M. Köhl, R.N. Glud und G. Holst: *Optical measurement of oxygen and temperature in microscale: Strategies and biological applications*. Sensors Actua. B, B30(1-3), 1996.
- [Koe78] Koester, V.J. und R.M. Dowben: *Subnanosecond single photon counting fluorescence spectroscopy using synchronously pumped tunable dye laser excitation*. Rev. Sci. Instrum., 49(8):1186–1191, 1978.
- [Kön93] König, K., H. Schneckenburger, A. Rück und R. Steiner: *In vivo photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins*. J. Photochem. Photobiol. B, 18(2-3):287–290, 1993.
- [Kön94] König, K., H. Schneckenburger, J. Hemmer, B. Tromberg und R. Steiner: *In-vivo fluorescence detection and imaging of porphyrin-producing bacteria in the human skin and in the oral cavity for diagnosis of acne vulgaris, caries and squamous cell carcinoma*. SPIE proc., 2135:129–138, 1994.
- [Kön96] König, K., P.T.C. So, W.W. Mantulin, B.J. Tromberg und E. Gratton: *Two-photon excited Lifetime Imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress*. J. Microscopy, 183(3):197–204, 1996.
- [Koz00] Kozubek, A., J. Gubernator, E. Przeworska und M. Stasiuk: *Liposomal drug delivery, a novel approach: PLARosomes*. Acta Biochim. Pol., 47(3):639–649, 2000.
- [Kra03] Krasnici, S., A. Werner, M.E. Eichhorn, M. Schmitt-Sody, S.A. Pahernik, B. Sauer, B. Schulze, M. Teifel, U. Michaelis, K. Naujoks und M. Dellian: *Effect of surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels*. Int. J. Cancer, 105:561–567, 2003.

- [Kri94] Kriegmair, M., R. Baumgartner, R. Küchel, P. Steinbach, A. Ehsan, W. Lumper, F. Hofstädter und A. Hofstetter: *Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid*. *Urology*, 44(6):836–841, 1994.
- [Kri96] Kriegmair, M., R. Baumgartner, R. Knüchel, H. Stepp, F. Hofstädter und A. Hofstetter: *Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence*. *J. Urol.*, 155:105–110, 1996.
- [Lac90] Laczko, G., I. Gryczynski, Z. Gryczynski, W. Wiczak, H. Malak und J.R. Lakowicz: *A 10-GHz Frequency-Domain Fluorometer*. *Rev. Sci. Instrum.*, 61(9):2331–2337, 1990.
- [Lak73a] Lakowicz, J.R. und G. Weber: *Quenching of fluorescence by oxygen. probe for structural fluctuations in macromolecules*. *Biochemistry*, 12(21):4161–4170, 1973.
- [Lak73b] Lakowicz, J.R. und G. Weber: *Quenching of protein fluorescence by oxygen. Detection of structural fluctuations in proteins on the nanosecond time scale*. *Biochemistry*, 12(21):4171–4179, 1973.
- [Lak81] Lakowicz, J.R. und H. Cherek: *Resolution of heterogeneous fluorescence from proteins and aromatic amino acids by phase-sensitive detection of fluorescence*. *J. Biol. Chem.*, 256(12):6348–6353, 1981.
- [Lak83] Lakowicz, J.R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York, 1983.
- [Lak85] Lakowicz, J.R. und B.P. Maliwal: *Construction and performance of a variable-frequency phase-modulation fluorometer*. *Biophys. Chem.*, 21(1):61–78, 1985.
- [Lak86] Lakowicz, J.R., G. Laczko und I. Gryczynski: *A 2-GHz Frequency-Domain Fluorometer*. *Rev. Sci. Instrum.*, 57(10):2499–2506, 1986.
- [Lak91] Lakowicz, J.R. und K.W. Berndt: *Lifetime-selective fluorescence imaging using an rf phase-sensitive camera*. *Rev. Sci. Instrum.*, 62(7):1727–1734, 1991.
- [Lak92a] Lakowicz, J.R., H. Szmazinski, K. Nowaczyk, K.W. Berndt und M. Johnson: *Fluorescence lifetime imaging*. *Anal. Biochem.*, 202(2):316–330, 1992.
- [Lak92b] Lakowicz, J.R., H. Szmazinski, K. Nowaczyk und M.L. Johnson: *Fluorescence Lifetime Imaging of Free and Protein-Bound NADH*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89(6):1271–1275, 1992.

- [Lak92c] Lakowicz, J.R., K. Szmacinski, K. Nowaczyk und M.L. Johnson: *Fluorescence Lifetime Imaging of Calcium Using Quin-2*. Cell Calcium, 13(3):131–147, 1992.
- [Lak93] Lakowicz, J.R., H. Szmacinski und M. Karakelle: *Optical sensing of pH and pCO<sub>2</sub> using phase-modulation fluorimetry and resonance energy transfer*. Anal. Chim. Acta, 272:179–186, 1993.
- [Lak94] Lakowicz, J.R., H. Szmacinski, K. Nowaczyk, W.J. Lederer, M.S. Kirby und M.L. Johnson: *Fluorescence Lifetime Imaging of Intracellular Calcium in COS Cells Using Quin-2*. Cell Calcium, 15(1):7–27, 1994.
- [Lam83] Lambert, R.A., L.A. Chewter, D. Phillips, D.J. O’Conner, A.J. Roberts und S.R. Meech: *Standards for nanosecond fluorescence decay time measurements*. Anal. Biochem., 55:68–73, 1983.
- [Las96] Lasic, D.D. und N.S. Templeton: *Liposomes in gene therapy*. Adv. Drug Del. Rev., 20:221–266, 1996.
- [Las98a] Lasic, D. und D. Papahadjopoulos (Herausgeber): *Medical applications of Liposomes*. Elsevier, 1998.
- [Las98b] Lasic, D.D.: *Novel applications of liposomes*. Trends Biotechnol., 16(7):307–321, 1998.
- [Las99] Lasic, D.D., J.J. Vallner und P.K. Working: *Sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery*. Curr. Opin. Mol. Ther., 1(2):177–185, 1999.
- [Lee93] Leenders, R., M. Kooijman, A. Van Hoek, C. Veeger und A. J. Visser: *Flavin dynamics in reduced flavodoxins - a time-resolved polarized fluorescence study*. E. J. Biochem., 211:37–45, 1993.
- [Lee01] Lee, K.C.B., J. Siegel, S.E.D. Webb, S. L  v  que-Fort, M.J. Cole, R. Jones, K. Dowling, M.J. Lever und P.M.W. French: *Application of the stretched exponential function to Fluorescence Lifetime Imaging*. Biophys. J., 81:1265–1274, 2001.
- [Leh00] *Lehninger Principles of Biochemistry*. Nelson and Cox, 3. Auflage, 2000.
- [Leu00] Leunig, A., C. Betz, M. Mehlmann, H. Stepp, S. Arbogast, G. Grevers und R. Baumgartner: *Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5-aminolevulinic acid induced Protoporphyrin IX fluorescence*. Laryngoscope, 110(1):78–83, 2000.
- [Li96] Li, S. und L. Huang: *Lipidic supramolecular assemblies for Gene Transfer*. J. Liposome Res., 6:589–608, 1996.

- [Lie01] Ließmann, F., H. Stepp, P. Hillemanns und M. Hillemanns: *Fluorescence microscopy study on cervical intraepithelial neoplasia after topical application of 5-ALA*. In: (CLEO Europe'01) *Technical Digest*, 2001.
- [Lil99] Liljeborg, A., K. Carlsson und R.M. Andersson: *Fluorescence Lifetime Imaging of multiple fluorophores implemented in confocal microscopy*. SPIE proc., 3568:82–88, 1999.
- [Lou01] Loura, L., A. Fedorov und M. Prieto: *Fluid-fluid membrane microheterogeneity: A fluorescence resonance energy transfer study*. Biophys. J., 80:776–788, 2001.
- [Luc02] Lucas, S.: *Anreicherungsverhalten von Kontrastmittel und Zytostatika enthaltenden Liposomen in der Leber von WAG/Rij-Ratten*. Doktorarbeit, Freie Universität Berlin, 2002.
- [Maa97] Maarek, J.-M.I., W.J. Snyder und W.S. Grundfest: *Time-resolved laser-induced fluorescence of arterial wall constituents: Deconvolution algorithm and spectro-temporal characteristics*. SPIE proc., 2980:278–285, 1997.
- [Maa00a] Maarek, J.-M., L. Marcu, W.-J. Snyder und W.-S. Grundfest: *Time-resolved fluorescence spectra of arterial fluorescent cCompounds: Reconstruction with the Laguerre expansion technique*. Photochem. Photobiol., 71(2):178–187, 2000.
- [Maa00b] Maarek, J.-M.I., L. Marcu, M. Fishbein und W.S. Grundfest: *Time-resolved fluorescence of human aortic wall: Use for improved identification of atherosclerotic lesions*. Lasers Surg. Med., 27:241–254, 2000.
- [Mac87] MacDonald, R.: *Energy transfer measurements of fusion between sendai virus and vesicles corrected for decreased absorption of acceptor probe*. J. Biol. Chem., 262(21):10392–10397, 1987.
- [Mac90] MacDonald, R.I.: *Characteristics of self-quenching of the fluorescence of lipid-conjugated rhodamine in membranes*. J. Biol. Chem., 265(23):13533–13539, 1990.
- [Mai02] Maier, O., V. Oberle und D. Hoekstra: *Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review)*. Chem. Phys. Lipids, 116:3–18, 2002.
- [Mal01] Malinin, V.S., E. Haque und B.R. Lentz: *The rate of lipid transfer during fusion depends on the structure of fluorescent lipid probes: A new chain-labeled lipid transfer probe pair*. Biochemistry, 40:8292–8299, 2001.
- [Man93] Mantulin, W.W., T. French und E. Gratton: *Optical Imaging in the Frequency Domain*. SPIE Proc., 1892:158–166, 1993.

- [Mar98] Marcu, L., J.M. Maarek und W.S. Grundfest: *Time-resolved laser induced fluorescence of lipids involved in development of atherosclerotic lesion lipid-rich core*. SPIE Proc., 3250:158–167, 1998.
- [Mar99] Marti, A., N. Lange, H. Van Den Bergh, D. Sedmera, P. Jichlinski und P. Kucera: *Optimisation of the formation and distribution of Protoporphyrin IX in the urothelium: An in vitro approach*. J. Urol., 162(2):546–552, 1999.
- [Mar00] Marcu, L. und W.S. Grundfest: *Mammalian Collagens: Characterisation by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy*. 28th Ann. Am. Soc. Photobiol. Meeting, 2000.
- [Mar01] Marcu, L., M.C. Fishbein, J.-M.I. Maarek und W.S. Grundfest: *Discrimination of human coronary artery atherosclerotic lipid-rich lesions by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 21:1244–1250, 2001.
- [Mas88] Massari, S. und E. Colonna, R. and Folena: *Interaction of the fluorescent probe N-(Lissamine Rhodamine B Sulfonyl)Dipalmitoylphosphatidylethanolamine with Phosphatidylcholine bilayers*. Biochim. Biophys. Acta, 940:149–157, 1988.
- [McG84] McGown, L.B. und F.V. Brixht: *Phase-Resolved Fluorescence Spectroscopy*. Anal. Chem., 56(13):1402A–1410A, 1984.
- [McI98] McIlroy, B.W., A. Curnow, G. Buonaccorsi, M.A. Scott, S.G. Brown und A.J. MacRobert: *Spatial measurement of oxygen levels during photodynamic therapy using time-resolved optical spectroscopy*. J. Photochem. Photobiol. B, 43:47–55, 1998.
- [McL96] McLachlan, G., L.-P. Ho, H. Davidson-Smith, J. Samways, H. Davidson, B.J. Stevenson, A.D. Carothers, E.W.F.W. Alton, P.G. Middleton, S.N. Smith, G. Kallmeyer, U. Michaelis, S. Seeber, K. Naujoks, A.P. Greening, J.A. Innes, J.R. Dorin und D.J. Porteous: *Laboratory and clinical studies in support of cystic fibrosis gene therapy using pCMV-CFTR-DOTAP*. Gene Therapy, 3:1113–1123, 1996.
- [McL97] McLean, J.W., E.A. Fox, P. Baluk, P.B. Bolton, A. Haskell, R. Pearlman, G. Thurston, E.Y. Umemoto und D.M. McDonald: *Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice*. Am. J. Physiol., 273:H387–H404, 1997.
- [McL99] McLean, J.W., G. Thurston und D.M. McDonald: *Nonviral vectors for gene therapy*, Kapitel Sites of Uptake and Expression of Cationic Liposome/DNA Complexes Injected Intravenously, Seiten 119–135. Academic Press, 1999.

- [Mil77] Milkovsky, A.L. und H.A. Larody. *Arch. Biochem. Biophys.*, 181:270, 1977.
- [Mir02] Mirabal, Y.N., S.K. Chang, E.N. Atkinson, A. Malpica, M. Follen und R. Richards-Kortum: *Reflectance spectroscopy for in vivo detection of cervical precancer*. *J. Biomed. Opt.*, 7(4):587–594, 2002.
- [Miz95] Mizeret, J., G. Wagnières, A. Studzinski, C. Shangguan und H. Van Den Bergh: *Endoscopic tissue fluorescence life-time imaging by frequency domain light induced fluorescence*. *SPIE Proc.*, 2627:47–47, 1995.
- [Miz98] Mizeret, J.: *Cancer detection by endoscopic frequency-domain fluorescence lifetime imaging*. Doktorarbeit, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, 1998.
- [Mor98] Mordon, S., J.M. Devoisselle, S. Begu und T. Desmettre: *Laser-induced release of liposome-encapsulated dye: A new diagnostic tool*. *Lasers Med.Sci.*, 13:181–188, 1998.
- [Mur97] Murtaza, Z., Q. Chang, G. Rao, H. Lin und J.R. Lakowicz: *Long-lifetime metal-ligand pH probe*. *Anal. Biochem.*, 247(2):216–222., 1997.
- [Myc00] Mycek, M.A., K. Vishwanath, K.T. Schomacker und N.S. Nishioka: *Fluorescence spectroscopy for in vivo discrimination of premalignant colonic lesions*. *Biomedical Topical Meetings OSA Technical Digest*, Seiten 11–13, 2000.
- [NC02] Nunes-Correia, I., A. Eulalio, S. Nir, N. Düzgünes, J. Ramalho-Santos und M. Pedroso de Lima: *Fluorescent probes for monitoring virus fusion Kinetics: Comparative evaluation of reliability*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1561:65–75, 2002.
- [Nee92] Needham, D., T.J. McIntosh und D.D. Lasic: *Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1108(1):40–48, 1992.
- [Ohk98] Ohki, S. and Flanagan, T.D. und D. Hoekstra: *Probe transfer with and without membrane fusion in a fluorescence fusion assay*. *Biochemistry*, 37:7496–7503, 1998.
- [Ols79] Olson, F., C.A. Hunt, F.C. Szoka, W.J. Vail und D. Papahadjopoulos: *Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 557:2–3, 1979.
- [Pah98] Pahernik, S.A., A. Botzlar, P. Hillemanns, M. Dellian, M. Kirschstein, C. Abels, M. Korell, J. Müller-Höcker, M. Untch und A.E. Goetz: *Pharmacokinetics and selectivity of aminolevulinic acid-induced porphyrin synthesis in patients with cervical intra-epithelial neoplasia*. *Int. J. Cancer*, 78(3):310–314, 1998.

- [Pau96] Paul, R.J. und H. Schneckenburger: *Oxygen concentration and the oxidation-reduction state of yeast: Determination of free/bound NADH and flavins by time-resolved spectroscopy*. Z. Naturwissenschaften, 83:32–35, 1996.
- [Pen97a] Peng, Q., K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug und J. M. Nesland: *5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: Principles and experimental research*. J. Photochem. Photobiol., 65(2):235–251, 1997.
- [Pen97b] Peng, Q., T. Warloe, K. Berg, J. Moan, M. Kongshaus, K. E. Giercksky und J. M. Nesland: *5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: Clinical research and future challenges*. Cancer, 79(12):2282–2308, 1997.
- [Per92] Periasamy, N. und A.S. Verkman: *Subtraction of background fluorescence in multiharmonic frequency-domain fluorimetry*. Anal. Biochem., 201(1):107–113, 1992.
- [Per01] Perrie, Y., P.M. Frederik und G. Gregoriadis: *Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition*. Vaccine, 19:3301–3310, 2001.
- [Pfe91] Pfeifer, L., K. Schmalzigaug, R. Paul, J. Lichey, K. Kemnitz und F. Hink: *Time-resolved autofluorescence measurements for the differentiation of lung-tissue states*. SPIE Proc., 2627:129–135, 1991.
- [Pfe03] Pfeifer, T.J., D.Y. Paithankar, J.M. Ponerros, K.T. Schomacker und N.S. Nishioka: *Temporally and spectrally resolved fluorescence spectroscopy for the detection of high grade dysplasia in Barrett's Esophagus*. Lasers Surg. Med., 32:10–16, 2003.
- [Pla86] Plant, A.L.: *Mechanism of concentration quenching of a xanthene dye encapsulated in phospholipid vesicles*. Photochem. Photobiol., 44(4):453–459, 1986.
- [Por97] Porteous, D.J., J.R. Dorin, G. McLachlan, H. Davidson-Smith, H. Davidson, B.J. Stevenson, A.D. Carothers, W.A.H. Wallace, S. Moralee, C. Hoenes, G. Kallmeyer, U. Michaelis, K. Naujoks, L.-P. Ho, J.M. Samways, M. Imrie, A.P. Greening und J.A. Innes: *Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis*. Gene Therapy, 4:210–218, 1997.
- [Pra95] Pradhan, A., P. Pal, G. Durocher, L. Villeneuve, A. Balassy, F. Babai, L. Gaborou und L. Blanchard: *Steady state and time-resolved fluorescence properties of metastatic and non-metastatic malignant cells from different species*. J. Photochem. Photobiol. B, 31:101–112, 1995.

- [Ram94] Ramanujam, N., M.L. Mitchell, A. Mahadevan, S. Warren, S. Thomsen, E. Silva und R. Richards Kortum: *In vivo diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence*. Proc. Ntl. Acad. Sci. U.S.A., 91(21):10193–10197, 1994.
- [Ram96a] Ramanujam, N., M.F. Mitchell, A. Mahadevan, S. Thomsen, A. Malpica, T. Wright, N. Atkinson und R. Richards-Kortum: *Spectroscopic diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) in vivo using Laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths*. Lasers Surg. Med., 19(1):63–74, 1996.
- [Ram96b] Ramanujam, N., M.F. Mitchell, A. Mahadevan-Jansen, S.L. Thomsen, G. Staerckel, A. Malpica, T. Wright, N. Atkinson und R. Richards-Kortum: *Cervical precancer detection using a multivariate statistical algorithm based on laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths*. Photochem. Photobiol., 64(4):720–735, 1996.
- [Ric76] Richart, R.M.: *Natural History of Cervical Intreepithelial Neoplasia*. Gynecol. Obstet. Invest., 10:748–751, 1976.
- [Ric95] Ricchelli, F.: *Photophysical properties of porphyrins in biological mMembranes*. J. Photochem. Photobiol. B, 29:109–118, 1995.
- [Ric96] Richards Kortum, R. und E. Sevick Muraca: *Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis*. Innu. Rev. Phys. Chem., 77::455–606, 1996.
- [Rie99] Riedl, C., E. Plas und H. Pfluger: *Fluorescence detection of bladder tumors with 5-aminolevulinic acid*. J. Endourol, 13(10):755–759, 1999.
- [RK96] Richards-Kortum, R. und E. Sevick-Muraca: *Quantitative Optical Spectroscopy for Tissue Diagnosis*. Annu. Rev. Phys. Chem, 47:555–606, 1996.
- [San95] Sanders, R., A. Draaijer, H.C. Gerritsen, P.M. Houpt und Y.K. Levine: *Quantitative pH imaging in cells using confocal fluorescence lifetime imaging microscopy*. Anal. Biochem., 227(2):302–308, 4995.
- [Sch87] Schoenfeld, N., R. Mamet, O. Epstein, M. Lahav, Y. Lurie und A. Atssmon: *The heme biosynthetic pathway in the regenerating rat liver. The relation of heme synthesis and growth*. Eur. J. Biochem., 166(3):663–666, 1987.
- [Sch88] Schneckenburger, H., H.K. Seidlitz und J. Eberz: *Time-resolved fluorescence in photobiology*. J. Photochem. Photobiol. B, 2:1–19, 1988.
- [Sch93] Schneckenburger, H., K. König, K. Kunzi Rapp, C. Westphal Frosch und A. Rück: *Time-resolved in-vivo fluorescerce of photosensitizing porphyrins*. J. Photochem. Photobiol. B, 21(2-3):143–147, 1993.

- [Sch94] Schneckenburger, H., K. König, T. Dienersberger und R. Hahn: *Time-gated microscopic imaging and spectroscopy*. SPIE Proc., 2083:124–130, 1994.
- [Sch95a] Schneckenburger, H., M.H. Gschwend, R.-J. Paul, H. Stepp, K. Rick, V. Betz und W. Strauss: *Time-gated spectroscopy of intrinsic fluorophores in cells and tissues*. SPIE Proc., 2324:187–195, 1995.
- [Sch95b] Schwarz, G. und A. Arbuzova: *Pore kinetics reflected in the dequenching of a lipid vesicle entrapped fluorescent dye*. Biochim. Biophys. Acta, 1239(1):51–57, 1995.
- [Sch96] Schmidt, T., G.J. Schütz, W. Baumgartner, H.J. Gruber und H. Schindler: *Imaging of single molecule diffusion*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93:2926–2929, 1996.
- [Sch97a] Schneckenburger, H., M.H. Gschwend, W.S.L. Strauss, R. Sailer, M. Kron, U. Steeb und R. Steiner: *Energy transfer spectroscopy for measuring mitochondrial metabolism in living cells*. Photochem. Photobiol., 66(1):34–41, 1997.
- [Sch97b] Schneckenburger, H., M.H. Gschwend, W.S.L. Strauss, R. Sailer und R. Steiner: *Time-gated microscopic energy transfer measurements for probing mitochondrial metabolism*. J. of Fluorescence, 7(1):3–9, 1997.
- [Sch97c] Schneider, P.: *Schnelle bildgebende Messung von Fluoreszenzlebensdauern im Phasenbereich*. Doktorarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen, 1997.
- [Sch97d] Schneider, P.C. und R.M. Clegg: *Rapid acquisition, analysis and display of fluorescence lifetime-resolved images for real-time applications*. Rev. Sci. Instrum., 68(11):4107–4119, 1997.
- [Sch99a] Schneckenburger, H., M.H. Gschwend, R. Sailer, W.S.L. Strauss, L. Schoch, A. Schuh, K. Stock, R. Steiner und P. Zipfl: *Selective detection of mitochondrial malfunction in situ by energy transfer spectroscopy*. SPIE proc., 3568:141–146, 1999.
- [Sch99b] Schouffeten, L., P. Denjean, G. Joliff-Botrel, C. Bernard und D. Pansu an R.B. Pansu: *Development of intracellular calcium measurement by time-resolved photon-counting fluorescence*. Photochem. Photobiol., 70(5):701–709, 1999.
- [Sch02] Schweitzer, D., A. Kolb, M. Hammer und R. Anders: *Zeitaufgelöste Messung der Autofluoreszenz. Ein Werkzeug zur Erfassung von Stoffwechselfvorgängen am Augenhintergrund*. Ophthalmologie, 10:774–779, 2002.

- [Sch04] Schweitzer, D., M. Hammer, R. Anders, T. Doebbecke und S. Schenke: *Veränderungen der Autofluoreszenzlebensdauer am Fundus nach Sauerstoffprovokation*. Ophthalmologie, 101(1):66–72, 2004.
- [Sil98] Sillen, A. und Y. Engelsborghs: *The correct use of "average" fluorescence parameters*. Photochem. Photobiol., 67(5):475–486, 1998.
- [Sin94] Sinaasappel, M., C. Ince, J.P. Van der Kluijs und H.A. Bruining: *New phosphorimeter for the measurement of oxygen pressures using Pd-porphine phosphorescence*. Adv. Exp. Med. Biol., 361:75–81, 1294.
- [Sip95] Sipior, J., S. Bambot, M. Romauld, G.M. Carter, J.R. Lakowicz und G. Rao: *A lifetime-based optical CO<sub>2</sub> gas sensor with blue or red excitation and stokes or anti-sStokes detection*. Anal. Biochem., 227(2):309–318, 1995.
- [So95] So, P.T.C., T. French, W.M. Yu, K.M. Berland, C.Y. Dong und E. Gratton: *Time-resolved fluorescence microscopy using two-photon excitation*. Bioimaging, 3:49–63, 1995.
- [Spe69] Spencer, R.D. und G. Weber: *Measurements of subnanosecond fluorescence lifetimes with a cross-correlation phase fluorometer*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 158:361–376, 1969.
- [Spi96] Spizziri, P.G., J.S. Hill, S.B. Kahl und K.P. Ghiggino: *Time-resolved confocal fluorescence microscopy of porphyrins for phototherapy*. Lasers Med. Sci., 11:237–246, 1996.
- [Squ00] Squire, A., P.-J. Verveer und P.-I. Bastiaens: *Multiple frequency fluorescence lifetime imaging microscopy*. J. of Microscopy, 197(2):136–149, 2000.
- [Sri97] Srivastava, A. und G. Krishnamoorthy: *Cell type and spatial dependence of cytoplasmic viscosity measured by time-resolved fluorescence microscopy*. Arch. Biochem. Biophys., 340(2):159–167, 1997.
- [Sta99] Stanzel, F., K. Häußinger, W. Sauer und J. Pichler: *Abstracts Zum 40. Kongreß der Deutschen Gesellschaft Für Pneumologie.*, Kapitel V36 Fluoreszenzbronchoskopie - ALA-Induzierte Fluoreszenz Vs. Autofluoreszenz. Georg Thieme Verlag, 1999.
- [Ste94] Steinbach, P., M. Kriegmair, R. Baumgartner, F. Hofstädter und R. Knüchel: *Intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid: The fluorescence metabolite is limited to urothelial cells*. Urology, 44(5):676–681, 1994.
- [Ste97] Steinkamp, J.A., H.A. Crissman, B.E. Lehnert, N.M. Lehnert und C. De-ka: *Frequency-domain flow cytometry: Fluorescence lifetime-based sensing technology for analyzing cells and chromosomes labeled with fluorescence probes*. SPIE proc., 2980:96–106, 1997.

- [Str81] Struck, D.K., D. Hoekstra und R.E. Pagano: *Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion*. *Biochemistry*, 20:4093–4099, 1981.
- [Stu98] Stummer, W., S. Stocker, A. Novotny, A. Heimann, O. Sauer, O. Kempfski, N. Plesnila, J. Wietzorrek und H.J. Reulen: *In vitro and in vivo Porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid*. *J Photochem. Photobiol. B*, 45(2-3):160–169, 1998.
- [Szm93] Szmacinski, H. und J.R. Lakowicz: *Optical measurements of pH using fluorescence lifetimes and phase-modulation fluorometry*. *Anal. Chem.*, 65(13):1668–1674, 1993.
- [Szm95] Szmacinski, H. und J.R. Lakowicz: *Possibility of simultaneously measuring low and high calcium concentrations using Fura-2 and lifetime-based sensing*. *Cell Calcium*, 18(1):64–75, 1995.
- [Thu98] Thurston, G., J.W. McLean, M. Rizen, P. Baluk, A.Haskell, T.J. Murphy und D. Hanahan und D.M. McDonald: *Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice*. *J. Clin. Invest*, 101(7):1401–1413, 1998.
- [Tor93] Torres Filho, I.P. und M. Intaglietta: *Microvessel pO<sub>2</sub> measurements by phosphorescence decay method*. *Am. J. Physiol.*, 265(4/2):H1434–H1438, 1993.
- [VH92] Van Hillegersberger, R., J.W. Van Den Berg, W.J. Kort, O.T. Terpstra und J.H. Wilson: *Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats*. *Gastroenterology*, 103(2):647–651, 1992.
- [Vin94] Vinogradov, S.A. und D.F. Wilson: *Recovery of oxygen distributions in tissue from phosphorescence decay data*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 361:67–73, 1994.
- [Wag97a] Wagnières, G., J. Mizeret, A. Studzinski und H. Van Den Bergh: *Frequency-Domain fluorescence lifetime imaging for endoscopic clinical cancer photodetection: Apparatus design and preliminary results*. *J. of Fluorescence*, 7(1):75–83, 1997.
- [Wag97b] Wagnières, G., A. Studzinski und H. Van Den Bergh: *An endoscopic fluorescence imaging system for simultaneous visual examination and photodetection of cancers*. *Rev. Sci. Instrum.*, 68(1):203–212, 1997.
- [Wag98] Wagnières, G.A., W.M. Star und B.C. Wilson: *In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications*. *Photochem. Photobiol.*, 68(5):603–632, 1998.

- [Wah74] Wahl, P., J.C. Auchet, A.J. Visser und F. Müller: *Time resolved fluorescence of Flavin Adenine Dinucleotide*. FEBS Letters, 44(1):67–70, 1974.
- [Wak95] Wakita, M., G. Nishmura und M. Tamura: *Some characteristics of the fluorescence lifetime of reduced pyridin-nucleotides in isolated mitochondria, isolated hepatocytes and perfused-rat-liver in-situ*. J. Biochemistry, 118(6):1151–1160, 1995.
- [Was99] Wasan, E.K., P. Harvie, K. Edwards, G. Karlsson und M.B. Bally: *A multi-step lipid mixing assay to model structural changes in cationic lipoplexes used for in vitro transfection*. Biochim. Biophys. Acta, 1461:27–46, 1999.
- [Web52] Weber, G.: *Polarization of the fluorescence of macromolecules. I. Theory and experimental method*. Biochem. J., 51(2):155–167, 1952.
- [Web72] Weber, G.: *Uses of fluorescence in biophysics: some recent developments*. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 247(3):680–685, 1972.
- [Web79] Weber, G. und F.J. Farris: *Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-Propionyl-2-(Dimethylamino) Naphthalene*. Biochemistry, 18:3075–3078, 1979.
- [Wei96] Weiss, T.F.: *Cellular Biophysics*. MIT Press, 1996.
- [Wei99] Weingandt, H.: *Photodynamische Diagnostik der Zervikalen Intraepithelialen Neoplasie*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1999.
- [Wes93] Wessels, J.M.: *Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Aufnahmekinetik und Lokalisation von Photosensibilisatoren in vitro*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1993.
- [Yam84] Yamashita, M., M. Nomura, S. Kobayashi, T. Sato und K. Aizawa: *Pico-second time-resolved fluorescence spectroscopy of hematoporphyrin derivative*. IEEE J. Quant. Electr., 20:1363–1369, 1984.
- [Zha93] Zhang, Z., K.T.V. Grattan und A.W. Palmer: *Phase-locked detection of fluorescence lifetime and its thermometric applications*. SPIE proc., 1885:228–239, 1993.

## Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. mult. A. Hofstetter möchte ich mich für die Übertragung der Arbeit bedanken und für die Möglichkeit, im Laser-Forschungslabor der Urologischen Klinik an der Schnittstelle zwischen Physik, Medizin und Biologie wichtige Erfahrungen sammeln zu können.

Herrn Dr. Herbert Stepp gebührt besonderer Dank, nicht nur für die Korrektur der Arbeit, sondern auch für den Wegweisenden Vorschlag, Liposomkonjugate zeitaufgelöst zu vermessen, aus dem wichtige Impulse für die Arbeit resultierten.

Allen Mitarbeitern des Laser-Forschungslabors sei für die entspannte Atmosphäre gedankt, Herrn T. Pongratz auch besonders für die Unterstützung in Fragen der Faseroptik und Elektronik.

Herrn Prof. Dr. P. Hillemanns und Herrn Dr. H. Weingandt danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Untersuchung der zervikalen Dysplasien, sowie Frau Dr. M. Hillemanns für die histo-pathologische Beurteilung der Biopsien.

Danken möchte ich Frau Dr. B. Sauer, Herrn Dr. K. Naujoks und Herrn Dr. U. Michaelis von MBT sowie Herrn Dr. S. Krasnici und Herrn Dr. M. Schmitt-Sody vom Institut für chirurgische Forschung für die Ermöglichung der Messungen an Liposomkonjugaten.

An Frau Dipl.-Biol. Ulrike Dives geht ein herzlicher Dank, nicht nur für zahlreiche Diskussionen über die biologischen und chemischen Aspekte der Arbeit, sowie die Mitwirkung bei den Messungen an Reinsubstanzen, sondern auch insbesondere für die allgemeine moralische Unterstützung.

Ganz besonders innig möchte ich meiner Familie danken. In der ganzen Zeit konnte ich mir stets ihrer Unterstützung sicher sein. Dabei standen sie mir nicht nur moralisch, sondern auch tatkräftig durch Korrekturarbeiten zur Seite.

Zu guter Letzt danke ich auch meinen Freunden vom Abaco-Orchester. Die gemeinsam in Proben und Konzerten verbrachten Stunden waren einen überaus wichtiger Ausgleich zur Arbeit, aus dem ich oftmals neue Kraft schöpfen konnte.



# Lebenslauf

## persönliche Daten

Frank Ließmann

geboren am 24. Juli 1969 in Stuttgart

## Schulbildung

Volksschule Krailling

1975 - 1979

Otto-von-Taube-Gymnasium Gauting

1979 - 1988

Abitur im Juni 1988 mit der Note 1,6

## Zivildienst

Stiftung der Pfennigparade, München

Sept 1988 - April 1990

Betreuung von schwerst Körperbehinderten

## Studium

Philosophie, LMU München

SS 1990

Physik (Grundstudium), Universität Regensburg

WS 1990/1991 - SS 1992

Physik (Hauptstudium), LMU München

WS 1992/1993 - SS 1996

Diplom im Mai 1996 mit der Gesamtnote „sehr gut“

Ägyptologie, LMU München

WS 1996/1997

## Berufstätigkeit

wissenschaftlicher Angestellter am

März 1997 - Januar 2002

Laser-Forschungslabor der Urologischen Klinik,  
Klinikum Großhadern

Technovision GmbH, Feldkirchen bei München

Februar 2002 - Februar 2004

Projektleiter Forschung&Entwicklung