

Untersuchung der Relaxation  
von Photofrin - generiertem  
Singulett - Sauerstoff in Lösungen  
und *in vitro*



**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät II –  
Physik  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Robert Kilger**  
aus Regen

Mai 2001

Promotionsgesuch eingereicht am 15.05.2001  
Kolloquium am 18.07.2001

Prüfungsausschuß

Prof. Dr. Max Maier (Erstgutachter)  
Prof. Dr. Elmar Lang (Biophysik, Zweitgutachter)  
Prof. Dr. Gustav Obermair (Vorsitzender)  
Prof. Dr. Martin Creuzburg (Weiterer Prüfer)

In Memoriam

Mama †11.05.1992

Papa †15.08.1994



## INHALTSVERZEICHNIS

1. <i>Einleitung</i> . . . . .	7
2. <i>Singulett (<math>^1\Delta_g</math>)-Sauerstoff in schwerem Wasser</i> . . . . .	10
2.1 Anregung von $^1\Delta_g$ -Sauerstoff über einen photosensibilisierenden Farbstoff . . . . .	10
2.2 Strahlende und Lösungsmittelrelaxation von $^1\Delta_g$ -Sauerstoff . . . . .	12
2.3 Der Quench-Prozeß . . . . .	14
2.4 Verwendete Substanzen . . . . .	16
2.4.1 Der Sensibilisator Photofrin . . . . .	16
2.4.2 Der Quencher Natriumazid . . . . .	18
2.4.3 Der Radikalfänger Mannitol . . . . .	19
2.4.4 Das Lösungsmittel schweres Wasser . . . . .	20
2.5 Theoretisches Modell der Singulett-Sauerstoff-Relaxation . . . . .	21
2.6 Erweiterung des Modells um chemisches Quenchen . . . . .	30
3. <i>Experimenteller Aufbau und Meßprinzip</i> . . . . .	32
3.1 Meßprinzip . . . . .	32
3.2 Schematischer Meßaufbau . . . . .	32
3.3 Herstellen der Lösungen . . . . .	33
3.4 Anregung . . . . .	35
3.5 Detektion des Lumineszenzsignals . . . . .	36
3.6 Meßwerterfassung . . . . .	36
3.7 Auswertung . . . . .	37
3.8 Schwierigkeiten und Probleme . . . . .	38
4. <i>Experimentelle Ergebnisse</i> . . . . .	39
4.1 Messung der Sauerstoffkonzentration in schwerem Wasser . . . . .	39
4.2 Variation der Anregungspulsenergie . . . . .	41
4.3 Überblick über die gewonnenen Parameter . . . . .	44
4.4 Variation der Sauerstoffkonzentration . . . . .	46
4.5 Variation der Photofrskonzentration . . . . .	51
4.6 Variation der Quencherkonzentration . . . . .	53

5.	<i>Diskussion und Interpretation</i> . . . . .	56
5.1	Vergleich der Meßwerte mit der Theorie . . . . .	56
5.2	Exemplarische Erweiterung des Modells . . . . .	57
6.	<i>Singulett (<math>^1\Delta_g</math>)-Sauerstoff in Lipidsuspension</i> . . . . .	62
6.1	Das Lipid Phosphatidylcholin in wäßriger Suspension . . . . .	62
6.2	Lumineszenzmessungen in Lipidsuspensionen . . . . .	65
7.	<i>Singulett (<math>^1\Delta_g</math>)-Sauerstoff in Zellsuspension</i> . . . . .	74
7.1	Aufbau einer typischen menschlichen Zelle . . . . .	74
7.2	Photodynamische Therapie . . . . .	76
7.3	Zellkulturen . . . . .	78
7.3.1	Der Zelltyp HT-29 . . . . .	78
7.3.2	Intrazelluläre Lokalisierung von Photofrin . . . . .	78
7.3.3	Zelluläre Aufnahme von Photofrin . . . . .	80
7.4	Qualitatives Modell der $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz in Zellsuspensionen . . . . .	83
7.5	Lumineszenzmessungen in Zellsuspensionen . . . . .	85
8.	<i>Zusammenfassung</i> . . . . .	90

## 1. EINLEITUNG

Molekularer Sauerstoff, unentbehrlich für menschliches Leben, liegt im Grundzustand als Triplettzustand  $^3\Sigma_g^-$  vor. Der erste elektronische Anregungszustand, der Singulettzustand  $^1\Delta_g$ , liegt im Vergleich zu anderen zweiatomigen Molekülen verhältnismäßig niedrig bei  $7\,882\text{ cm}^{-1}$ . Dies entspricht einer Wellenlänge für den strahlenden Übergang von  $\lambda_\Delta = 1\,270\text{ nm}$ . Dennoch reicht diese Energie aus, um die Aktivierungsenergie für zahlreiche oxidative Prozesse zu überwinden, weshalb  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff chemisch hochreaktiv ist. Trotz der Existenz eines weiteren angeregten Singulett-Zustands von Sauerstoff, nämlich  $^1\Sigma_g^+$ , wird im allgemeinen  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff als Singulett-Sauerstoff bezeichnet.

Im Rahmen der Photodynamischen Therapie (PDT) wird die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff eingesetzt, um entweder maligne, d.h. bösartige Tumore zu zerstören oder mittels Immunmodulation entzündliche Erkrankungen zu therapieren [WGD76]. In diesem Verfahren wird dem Patienten ein sensibilisierender Farbstoff verabreicht, der sich im erkrankten Gewebe selektiv anreichert. Wird nun der Tumor mit Licht bestrahlt, so absorbiert der Farbstoff die Lichtenergie und regt den im Gewebe allgegenwärtigen Sauerstoff in den  $^1\Delta_g$ -Zustand an. Je nach Dosimetrie von Licht und Konzentration von Sensibilisator und somit Singulett-Sauerstoff im Gewebe kommt es zur Modulation von Zellfunktionen (entzündliche Erkrankungen) oder zur Zelltötung (Tumorthherapie). Wegen dieser Anwendungsmöglichkeit ist  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in den vergangenen Jahrzehnten zunehmend in den Blickpunkt der Forschung gerückt [SL94]. In Deutschland ist bislang nur der Sensibilisator Photofrin als Medikament zugelassen, so daß diese Substanz in der vorliegenden Arbeit als Sensibilisator zum Einsatz kommt. Ein Nachteil von Photofrin ist die Tatsache, daß es ein Gemisch aus Hämato-porphyrinderivaten ist, also keine Reinsubstanz. Dies erschwert die theoretische Beschreibung.

Meßtechnisch bedeutet  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff eine besondere Herausforderung. Seine Lumineszenz ist im isolierten Zustand nur schwer direkt zu beobachten, einerseits wegen seiner langen strahlenden Lebensdauer von  $\tau = 72\text{ min}$  [K85], andererseits weil die Wellenlänge des Übergangs mit  $\lambda_\Delta = 1\,270\text{ nm}$  im nahen Infrarot liegt, einem der optischen Detektion vergleichsweise schwer zugänglichem Bereich. Die lange Lebensdauer bedeutet, daß nur sehr selten ein  $^1\Delta_g$ -Zustand strahlend relaxiert und deshalb das Lumineszenzsignal entsprechend schwach ist. Im Lösungsmittel kommt es durch Molekülstöße zu einer Aufweichung der quantenmechanischen Auswahlregeln, was die Anzahl der strahlenden Übergänge erhöht. Ande-

rerseits aber kommt es durch nichtstrahlenden Energieübertrag auf Schwingungszustände der Lösungsmittelmoleküle zu einer drastischen Verkürzung der Lebensdauer des  $^1\Delta_g$ -Zustands in den Mikrosekundenbereich. Wegen diesen Problemen der Detektierbarkeit kommt in dieser Arbeit erstmals ein neuartiger, im Infraroten hochempfindlicher Photomultiplier zum Einsatz, der bestmögliche Sensitivität garantiert und aufgrund seiner hervorragenden Zeitauflösung die Möglichkeit zum Einzelphotonenzählen bietet.

Über die Lumineszenz des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff werden in dieser Arbeit die physikalischen Grundlagen der PDT untersucht, d.h. die Entstehung und die Relaxation des genannten Zustands, der die letztlich wirksame Komponente der PDT ist. Es wurden Lösungen in Wasser und vor allem schwerem Wasser hergestellt mit unterschiedlichen Konzentrationen an Photofrin, Sauerstoff und Quenchern. Letzteres sind Substanzen, die die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff verkürzen. Mit ihrer Hilfe soll einerseits die Anwesenheit von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff bewiesen werden, andererseits wird die Quencherstärke der betreffenden Substanzen quantifiziert und ihre Wirkung in ein Energieübertragsratenmodell aufgenommen. Schwerem Wasser (Deuteriumoxid,  $D_2O$ ), das eigentlich unphysiologisch ist, wird in Lösungen dem „normalen“ Wasser ( $H_2O$ ) der Vorzug gegeben, da wegen der dort größeren Lebensdauer von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff, nämlich ca.  $65 \mu s$  in  $D_2O$  gegenüber ca.  $3,7 \mu s$  in  $H_2O$  [WHR95], Auswirkungen von Konzentrationsunterschieden an Sauerstoff, Sensibilisator und Quenchern auf die Lebensdauer des  $^1\Delta_g$ -Zustands besser nachweisbar sind [K98].

Die verwendeten Quencher sind Natriumazid, das besonders stark auf Singulett-Sauerstoff wirkt [B76], und Mannitol. Letzteres ist eigentlich kein Quencher von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff sondern ein Radikalfänger, d.h. eine Substanz, die reaktive Sauerstoff-Spezies wie z.B.  $O_2^-$ , das Hydroxylradikal  $OH^\cdot$  oder Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$  chemisch deaktivieren kann [GK99]. Es wird hier quasi als Negativnachweis benutzt, daß bei der PDT mit Photofrin *in vitro*  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff das entscheidende Reagens ist, da es nicht als physikalischer Quencher für  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff fungieren sollte. Die Erzeugung von Sauerstoff-Radikalen zur Tötung von Tumorzellen, die sog. Typ-I-Reaktion, ist ein anderer möglicher Wirkmechanismus bei anderen Sensibilisatoren, da sauerstoffabhängige Prozesse allgemein eine wesentliche Rolle spielen. Die Generierung und die Wirkung von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff werden als Typ-II-Reaktion bezeichnet.

Um eben jene Energieüberträge, die sich in einer Lösung mit Sensibilisator, Sauerstoff und Quenchern abspielen, zu beschreiben, wird seit Jahren ein einfaches Ratenmodell benutzt [PS84], das sich quasi als Standardmodell für das Abklingverhalten von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff etabliert hat. Hier wird der Energieübertrag vom Farbstoff-Triplettzustand auf den Sauerstoff und von diesem weiter auf Lösungsmittel und Quencher quantifiziert. Dieses simple Modell beschreibt das Abklingverhalten der Lumineszenz von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in vielen Fällen sehr gut. Jedoch berücksichtigt es nicht den möglichen Energierücktransfer vom  $^1\Delta_g$ -Zustand des Sauerstoff zum Triplett-Zustand des Sensibilisators, der immer dann



relevant wird, wenn die beiden genannten Niveaus energetisch sehr dicht beisammen liegen. Diese Kopplung führt zu einem Verhalten der zeitlichen Lumineszenz von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff, das das einfache Modell nicht vollständig beschreiben kann. Für eine hohe Quantenausbeute an  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff ist es aber notwendig, daß die genannten Niveaus energetisch vergleichbar hoch liegen. Gerade dann jedoch ist der besagte Energierückübertrag sehr wahrscheinlich. Deshalb wird das sogenannte Standardmodell hierzu um eben jenen Rücktransferterm erweitert. Der Rücktransfer bewirkt eine je nach Farbstoff mehr oder minder starke Kopplung zwischen dem Triplettzustand des Farbstoffs und dem  $^1\Delta_g$ -Zustand des Sauerstoffs. Die Kopplung hat spürbare Auswirkungen auf Anstiegs- und Abklingverhalten der  $^1\Delta_g$ -Besetzung und damit der Lumineszenzkurve über der Zeit. Ohne sie lassen sich zahlreiche experimentelle Befunde nicht erklären.

Die genaue Kenntnis der rein physikalischen Abläufe ist die Voraussetzung für das Verständnis des Verhaltens von Singulett-Sauerstoff in zellulärer Umgebung. Sensibilisatoren wie Photofrin lokalisieren in bestimmten Zellbestandteilen. Aufgrund der kurzen Lebensdauer von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff ist die Lokalisation des Sensibilisators und die des oxidativen Schadens durch  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in der Regel identisch. Neben der Lokalisation des Schadens spielt auch die Menge an erzeugtem  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff eine wesentliche Rolle. Hieraus resultieren verschiedene zelluläre Antworten auf den Schaden durch  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff von einfachem Stimulans bis hin zum Zelltod.

Leider ist man meßtechnisch weit davon entfernt,  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff optisch in lebendem Gewebe nachzuweisen. Dies liegt zum einen daran, daß die zu erwartenden Lebensdauern von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff mit  $\tau_\Delta < 0,5 \mu\text{s}$  [K90] sehr kurz sind, zum anderen an der noch geringeren Signalausbeute, verglichen mit Lösungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird deswegen versucht,  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in einem einfachen Zellsystem (Zellsuspension *in vitro*) nachzuweisen. Aufgrund der Anreicherung von Photofrin in zellulären Membranen (Lipid-Doppelschicht) wird darüber hinaus Singulett-Sauerstoff in Mischungen von Lipiden und Wasser untersucht. Da die Lebensdauer von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff einen Rückschluß auf den Ort seines Aufenthalts zuläßt, könnte somit tatsächlich die Lokalisierung von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in der Zelle bestimmt werden. Dies würde erstmalig einen Einblick in die Dynamik des primären Schadens von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in der lebenden Zelle gewähren.

## 2. SINGULETT ( $^1\Delta_g$ )-SAUERSTOFF IN SCHWEREM WASSER

### 2.1 Anregung von $^1\Delta_g$ -Sauerstoff über einen photosensibilisierenden Farbstoff

In dieser Arbeit wird der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff generiert über die optische Anregung des Farbstoffs Photofrin und Energieübertrag von diesem auf Sauerstoff im Grundzustand  $^3\Sigma_g^-$ . Zur Verdeutlichung zeigt Abb. 2.1 das Energieniveauschema eines typischen Farbstoffmoleküls. Dargestellt sind der Singulett-Grundzustand  $S_0$ , die beiden ersten angeregten Singulett-Zustände  $S_1$  und  $S_2$ , sowie die beiden ersten angeregten Triplett-Zustände  $T_1$  und  $T_2$ . Jeder dieser elektronischen Zustände besitzt Schwingungsniveaus, die durch äquidistante Linien angedeutet sind und ihrerseits aus nicht eingezeichneten, dicht nebeneinanderliegenden Rotationszuständen bestehen. Diese Rotationsniveaus sind in Lösung aber weitgehend unterdrückt.

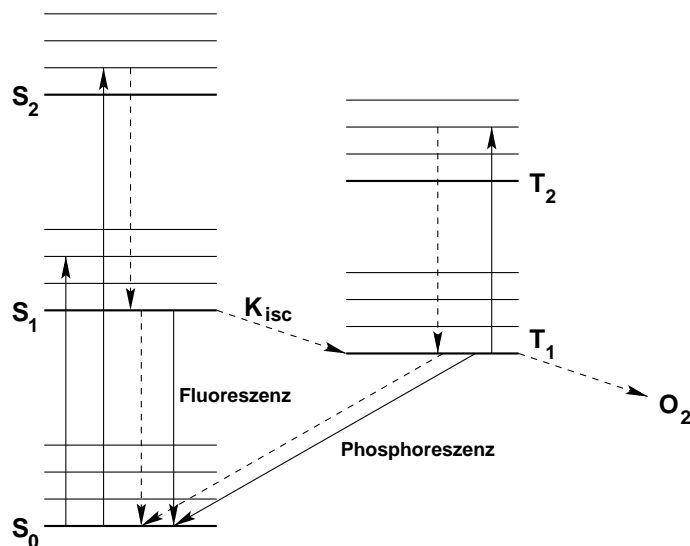


Abb. 2.1: Jablonski-Diagramm eines typischen Farbstoffmoleküls mit einigen strahlenden (durchgezogene Linien) und strahlungslosen (unterbrochene Linien) Übergängen nach [P68].

Photofrin entspricht dieser Vorstellung nicht ganz, da es als Oligomerengemisch nicht aus einer Reinsubstanz besteht und somit Energieüberträge zwischen den einzelnen Komponenten des Gemischs denkbar sind. Aber für diejenige Komponente, die für den Energieübertrag auf den Sauerstoff verantwortlich ist, kann man diese Vereinfachung als gute Näherung betrachten (vgl. Kap. 2.4.1).

Bei Zimmertemperatur befindet sich ein Großteil der Farbstoffmoleküle, hier von Photofrin, im Schwingungsgrundniveau des  $S_0$ -Zustands  $S_0(v=0)$ , von wo aus sie durch Lichtabsorption in ein Schwingungsniveau eines angeregten Singulett-Zustands übergehen können. Anregung in einen Triplett-Zustand ist spinverboten und daher sehr unwahrscheinlich.

Durch Stöße mit umgebenden Molekülen wird die Schwingungsenergie schnell wieder abgegeben. Außerdem gehen beinahe alle Substanzen, wenn sie über den  $S_1$ -Zustand hinaus angeregt werden, durch innere Konversion von einem niedrigen Schwingungsniveau des höheren elektronischen Zustands in ein höheres Schwingungsniveau des niedrigen elektronischen Zustands über. Wiederum wird nach dieser inneren Konversion die Schwingungsenergie schnell durch Stöße mit umgebenden Molekülen abgegeben.

Das Ergebnis ist, daß Moleküle, die über das niedrigste Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustands  $S_1(v=0)$  hinaus angeregt werden, mit einer Lebensdauer von etwa  $10^{-12}$  s in diesen relaxieren. Zum Vergleich, die Abklingdauer des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in Wasser liegt um sechs Größenordnungen darüber. Photochemische Reaktionen oder Lichtemission von den höher angeregten Zuständen finden im allgemeinen nicht statt, weil diese Prozesse nicht schnell genug ablaufen, um mit der inneren Konversion konkurrieren zu können.

Die Lebensdauer des  $S_1(v=0)$ -Zustands ist mit typischerweise  $10^{-9}$  s ausreichend lange, so daß die Moleküle von hier aus neben innerer Konversion auch fluoreszierend in ein Schwingungsniveau des Grundzustands  $S_0$  übergehen können. Außerdem besteht die Möglichkeit, durch Absorption eines weiteren Photons aus dem  $S_1(v=0)$ -Zustand in höhere Zustände mit anschließender innerer Konversion zu gelangen.

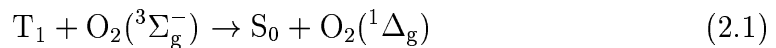
Ein Teil der Moleküle im  $S_1(v=0)$ -Zustand kann aber auch durch Interkombination in den niedrigsten Triplett-Zustand  $T_1$  übergehen, dessen Energie immer niedriger liegt als der  $S_1(v=0)$ -Zustand. Dabei befindet sich das Molekül zunächst in einem schwingungsangeregten Zustand und gibt seine Schwingungsenergie umgehend wieder durch Stöße mit dem Lösungsmittel ab.

Die Übergangsrate  $K_{isc}$  der Interkombination  $S_1 \rightarrow T_1$  ist eine der wichtigsten Parameter für die PDT und im allgemeinen etwa  $10^4$ - $10^8$  mal höher als die Rate für die Interkombination  $T_1 \rightarrow S_0$  [SG68]. Eine Rück-Interkombination  $T_1 \rightarrow S_1$  ist wegen der Energiedifferenz zwischen  $T_1$  und  $S_1$  unwahrscheinlich. Der  $T_1$ -Zustand hat somit eine ausreichende Lebensdauer im  $\mu$ s- bis ms-Bereich, so daß angeregte Triplett-Absorption  $T_1 \rightarrow T_2$  bzw. eine strahlende Relaxation in den  $S_0$ -Zustand unter Abgabe von Phosphoreszenzlicht stattfinden kann. Als Konkurrenzprozeß zur  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Erzeugung findet möglicherweise noch eine

Triplet - Triplet - Absorption statt, wie in Abb. 2.1 eingezeichnet. Die Quantenausbeute an Triplet-Farbstoff ergibt sich als

$$\Phi_T = \frac{K_{isc}}{K_S}$$

mit  $K_S$  der Gesamtrelaxationsrate des  $S_1(v=0)$ -Zustands [P68]. Die Anregung des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff durch das Farbstoffmolekül erfolgt aus dem  $T_1$ -Zustand über die Reaktion



Wenn  $K'_\Delta$  die Übertragsrate auf den Sauerstoff bezeichnet, dann ergibt sich als Quantenausbeute an  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff

$$\Phi_\Delta = \frac{K'_\Delta}{K'_T} \cdot \Phi_T$$

wobei  $K'_T$  hier in diesem Zusammenhang die Gesamtrelaxationsrate des  $T_1$ -Zustands bezeichnet [WHR95].

## 2.2 Strahlende und Lösungsmittelrelaxation von $^1\Delta_g$ -Sauerstoff

Der Zustand  $^1\Delta_g$  ist der niedrigste elektronische Anregungszustand von Sauerstoff. Aufgrund quantenmechanischer Auswahlregeln für Spin-, Symmetrie- und Drehimpulserhaltung ist ein elektromagnetischer Dipolübergang von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in den Grundzustand  $^3\Sigma_g^-$  im isolierten Molekül streng verboten. Magnetische Dipolstrahlung ist Drehimpuls-verboden. Den Beitrag von elektrischer Quadrupolstrahlung kann man ebenfalls vernachlässigen, da er nur etwa ein Tausendstel der Intensität der magnetischen Dipolstrahlung besitzt. Der genannte Übergang des freien Moleküls besitzt deshalb eine sehr lange Lebensdauer von über 72 min [K85]. Dies erklärt, warum die Lumineszenz dieses Übergangs bei  $\lambda_\Delta = 1270$  nm so ausgesprochen schwach ist: es findet nur sehr selten ein strahlender Zerfall statt.

Bei höherem Gasdruck und vor allem in Lösung werden die strengen Verbote durch geringe intermolekulare Störungen wie etwa Stöße zwischen Molekülen aufgeweicht. Quantenmechanisch bewirkt die Hinzunahme eines Wechselwirkungsoperators, wie z.B. Stöße mit Lösungsmittelmolekülen diesen Fall repräsentieren, ein Mischen der Zustände. Das heißt, als Eigenzustände treten Linearkombinationen von Molekülzuständen gleicher Spinmultiplizität auf, wobei sich bei einer sogenannten kleinen Störung die Eigenwerte kaum verschieben. Durch diese

Zustandsmischung sind nun die Übergangsmatrixelemente für elektrische Dipolstrahlung nicht mehr exakt gleich Null. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit eines strahlenden Übergangs. Außerdem verringert sich die rein strahlungsbedingte Lebensdauer durch strahlungslose Deaktivierung durch Lösungsmittelmoleküle um einige Größenordnungen in den Mikrosekundenbereich [ET76]. Dies ist die Situation, in der sich die Messungen dieser Arbeit abspielen.

Zur Unterscheidung, die beobachtete Lumineszenzlebensdauer ist der Kehrwert der Summe der einzelnen Relaxationsraten, also rein strahlend und strahlungslos zusammen, ist aber nur durch die wesentlich selteneren strahlenden Übergänge beobachtbar.

Ist Sauerstoff durch Energiezufuhr in den  $^1\Delta_g$ -Zustand gelangt, unabhängig von der Anregungsmethode, so ist das thermische Gleichgewicht gestört. Deshalb verweilt er nur begrenzte Zeit in diesem Zustand. Die Rückkehr ins Gleichgewicht nennt man Energierelaxation. Vernachlässigt man die thermische Besetzung des angeregten Zustands, und tritt keine Wechselwirkung der angeregten Moleküle untereinander auf, so ist für die Zeit  $t > 0$  nach der als instantan angenommenen Anregung die Besetzungsänderung  $dN(t)$  des  $^1\Delta_g$ -Zustands pro Zeitintervall  $dt$  proportional zur momentanen Besetzung, d.h. zur Teilchendichte  $N(t)$  der angeregten Moleküle:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -KN(t) \quad (2.2)$$

Die Konstante  $K$  heißt (Energie-) Relaxationsrate und stellt die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs pro Zeiteinheit dar. Ihr Kehrwert  $\tau = 1/K$  wird als Lebensdauer oder (Energie-) Relaxationszeit des angeregten Zustands bezeichnet.

Man muß prinzipiell zwischen den beiden Relaxationswegen, strahlend und strahlungslos, unterscheiden. Die strahlende Relaxation trägt wegen ihrer langen Lebensdauer nur unwesentlich zur Deaktivierung des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff bei. Die strahlungslose Relaxation ist dominierend. Dennoch läßt sich die momentane Besetzung  $N(t)$  der angeregten Zustände über die Messung des zeitlichen Verlaufs der Lumineszenzintensität bestimmen, da diese der momentanen Besetzung proportional ist, der strahlende Zerfall aber nur vernachlässigbar zur Entvölkerung des angeregten Zustands beiträgt.

Bei der strahlungslosen Relaxation des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in wäßrigen Lösungen spielt die langreichweitige Dipolwechselwirkung mit den Lösungsmittelmolekülen eine wichtige Rolle. Die Lebensdauer des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff ist von den meisten Eigenschaften des Lösungsmittels wie Polarität, Viskosität, Polarisierbarkeit, Ionisierungspotential und auch Sauerstofflöslichkeit unabhängig. Allerdings existiert eine starke Abhängigkeit der  $^1\Delta_g$ -Lebensdauer vom elektrischen Übergangsmatrixelement der Anregungsenergie zu den Lösungsmittelmolekülen über

die Umwandlung elektronischer Energie des Sauerstoffs in Schwingungsenergie der Lösungsmittelmoleküle [MK72].

Durch eine langreichweitige Dipolwechselwirkung des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff mit den Lösungsmittelmolekülen mit Hilfe des Modells von Förster [F48] und Dexter [D53] läßt sich die Relaxation des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in Lösungen theoretisch annähernd beschreiben [MK72]. Diese Beschreibung geht jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinaus.

In der Literatur gehen die Werte für die Lebensdauer  $\tau_\Delta$  von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in schwerem Wasser weit auseinander. Im Tabellenwerk [WHR95] sind Lebensdauern von Singulett-Sauerstoff in verschiedenen Lösungsmitteln und mit verschiedenen Sensibilisatoren zusammengetragen. Für schweres Wasser reichen die Werte von 44 bis 71  $\mu\text{s}$ , je nach Sensibilisator und Meßmethode. Als Mittelwert über die unterschiedlichen Angaben für die Lebensdauer von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in dieser Quelle läßt sich  $\bar{\tau}_\Delta = (61 \pm 8) \mu\text{s}$  berechnen.

### 2.3 Der Quench-Prozeß

Die englischen Worte „*to quench*“ und „*quencher*“ besitzen im Deutschen keine direkte Entsprechung. Sinngemäß treffen die Bezeichnungen „löschen“ und „Löschmittel“ am ehesten ihre Bedeutung. Es ist in der deutschsprachigen Literatur nicht unüblich, die eingedeutschten Begriffe „quenchen“ und „Quencher“ zu verwenden.

Der Begriff Quenchen bezeichnet im allgemeinen die Deaktivierung eines angeregten Zustands und ist unabhängig vom bewirkenden Mechanismus und dem betroffenen angeregten Zustand.

In dieser Arbeit bezieht sich der Begriff Quencher gemäß [YB76] im Wesentlichen auf Substanzen, die den angeregten Zustand  $^1\Delta_g$  von Sauerstoff deaktivieren. Wenn angeregte Sensibilisatorzustände deaktiviert werden, so wird dies im Kontext klargestellt.

Für das Quenchen des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff kommen zwei unterschiedliche Prozesse in Betracht. Chemisches Quenchen benutzt die Anregungsenergie des Sauerstoffs, um die chemische Aktivierungsenergie für die Oxidationsreaktion des Quenchers mit dem Sauerstoff zu überwinden. Nach diesem Prozeß liegt der Sauerstoff nicht mehr molekular als  $\text{O}_2$  vor, sondern bildet mit dem chemischen Quencher ein Oxid bzw. Peroxid. Dieser Vorgang ist einer der wesentlichen zelltötenden Mechanismen bei der Photodynamischen Therapie, bei der Zellbestandteile wie etwa die Lipide der Plasmamembran als chemischer Quencher fungieren, also oxidiert werden [WGD76]. Man spricht in diesem Falle von Lipidperoxidation.

Im Gegensatz dazu übernimmt ein physikalischer Quencher lediglich die Anregungsenergie des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff und läßt ihn chemisch unverändert im elektronischen Grundzustand  $^3\Sigma_g^-$  zurück. In Lösung wird die übernommene Energie vom Quencher üblicherweise durch Stöße mit den Lösungsmittelmolekülen ther-

malisiert. In Gl. (2.2) bewirkt dies ein Anwachsen des Parameters  $K$ , d.h. die Lebensdauer von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff wird verkürzt.

Der Mechanismus des physikalischen Quenchens ist vom Quencher abhängig und z.T. unbekannt. Denkbar sind Spinflip-Vorgänge aller Art, da die Spinänderung beim Übergang der Sauerstoffzustände  $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$  wegen der Spinerhaltung kompensiert werden muß.

Im folgenden bezeichnet der Begriff Quencher, sofern nicht explizit anders angegeben, stets eine Substanz, die den  $^1\Delta_g$ -Zustand von Sauerstoff physikalisch deaktiviert.

In der Praxis ist die Unterscheidung zwischen chemischem und physikalischem Quencher fließend, da Substanzen wie z.B. Histidin [B76] häufig zu beiden Vorgängen in der Lage sind. Meist überwiegt jedoch einer der beiden Abläufe stark gegenüber dem anderen. Entsprechend wird die Charakterisierung der Substanz gewählt [B76].

Man beachte, daß nach dieser Definition die Relaxation des  $^1\Delta_g$ -Zustands durch Stöße mit den Lösungsmittelmolekülen wie in Kap. 2.2 beschrieben ebenfalls einen Quench-Prozeß darstellt.

Die Stärke eines Quenchers ist gekennzeichnet durch seine Effizienz, die Relaxation von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in den Grundzustand zu beschleunigen. Dabei spielen Konzentration, Molekül- und/oder Ionenbeweglichkeit sowie der Wirkungsquerschnitt eine Rolle. Ob spezifische Eigenschaften des Lösungsmittels generell darauf Einfluß haben, ist nicht eindeutig klar [B76]. In der Tat gibt es einzelne Quencher wie z.B. das Iodid-Anion  $I^-$ , die ausschließlich in protischen bzw. aprotischen Lösungsmitteln arbeiten oder aber dort jeweils entgegengesetztes Verhalten zeigen, also chemisches Quenchen im einen, physikalisches Quenchen im anderen Lösungsmitteltyp. Ein Lösungsmittel heißt protisch, wenn seine Moleküle untereinander Wasserstoffkerne, also Protonen, austauschen können. Ausschlaggebend ist hierfür die Polarität des Stoffes. Wasser  $H_2O$ , Ethanol  $H_3C-CH_2-OH$  und im erweiterten Sinne auch schweres Wasser  $D_2O$  (Deuteronenaustausch) beispielsweise sind protische Lösungsmittel. Ist ein Lösungsmittel zu Protonenaustausch nicht in der Lage, so wird es als aprotisch bezeichnet. Hierzu zählen natürlich alle Substanzen, die keine Wasserstoffkerne im Molekül enthalten, z.B. Tetrachlorkohlenstoff  $CCl_4$ , aber auch die meisten unpolaren, wasserstoffhaltigen Lösungsmittel wie etwa Benzol  $C_6H_6$ .

Ein quantitatives Maß für die Stärke des (physikalischen) Quenchers ist die Quencher-Ratenkonstante  $k_Q$ , die definiert ist als die Anzahl von Quench-Prozessen pro Konzentration in  $[(\frac{Mol}{L})^{-1}]$  und pro Sekunde  $[s^{-1}]$ , also in  $[(\frac{Mol}{L})^{-1}s^{-1}]$ . Die Einheit  $[\frac{Mol}{L}]$  wird auch als „Molar“ bezeichnet und mit  $[M]$  abgekürzt. Die Größe  $k_Q$  ist spezifisch für jede Substanz.

Zusätzlich gibt es die Rate  $K$  in  $[s^{-1}]$ , die mit der Ratenkonstante zusammenhängt wie  $K = k_Q \cdot [Q]$  und mit der Lebensdauer  $\tau$  des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff wie  $K = 1/\tau$ . Hierbei bezeichnet  $[Q]$  die Konzentration des Quenchers in der Lösung, gemessen in  $[M]$  bzw.  $[mM]$  (milli-Molar), was im Kontext klargestellt

werden muß. Nimmt man die Raten der einzelnen Komponenten einer Lösung nach [YB76] als additiv an, so ergibt sich als Summe für die beobachtbare Gesamtrate

$$K_{\text{ges}} = K_{LM} + k_Q \cdot [Q] + K(\text{weitere Komponenten}) \quad (2.3)$$

$K_{LM}$  bezeichnet die Rate des puren Lösungsmittels. „Weitere Komponenten“ sind beispielsweise Verunreinigungen in der Lösung, oder auch Bestandteile von Mischungen von Lösungsmitteln. Beimengungen von normalen in schwerem Wasser z.B. erhöhen  $K_{\text{ges}}$  beträchtlich. Sogar der Photosensibilisator selbst kann Einfluß auf den Zerfall von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff nehmen.

Damit eine Substanz die Bezeichnung Quencher erhält, sollte sie die Wirkung des puren Lösungsmittels spürbar übertreffen. Man kann deshalb die Ungleichung

$$k_Q \cdot [Q] > K_{LM} \quad (2.4)$$

als lösungsmittelabhängige Definition für einen Quencher heranziehen [B76]. Für das rein physikalische Quenchen existiert außerdem ein oberer Grenzwert von  $k_Q^{\text{max}} = 30 (\mu\text{s mM})^{-1}$ , den [B76] ohne nähere Erläuterung durch Diffusion erklärt. Dies erscheint sinnvoll, denn Quenchen stellt einen Energieübertrag dar, und damit dieser stattfinden kann, müssen die agierenden Teilchen einen gewissen Mindestabstand unterschreiten. Somit ist die maximale Quencherrate beschränkt durch die Teilchenbeweglichkeit im Lösungsmittel. Da das Sauerstoff-Molekül i.a. deutlich beweglicher ist als die wesentlich größeren Sensibilisatormoleküle, stellt dessen Beweglichkeit den begrenzenden Faktor dar.

## 2.4 Verwendete Substanzen

### 2.4.1 Der Sensibilisator Photofrin

Photofrin (Sanofi, New York, USA) ist bislang (Stand Mai 2001) in Deutschland als einziges Medikament für die PDT zugelassen. Es ist kein chemischer Reinstoff, sondern ein Gemisch von Oligomeren, die gebildet werden aus bis zu acht Porphyrinringen, die über Ether- und Esterbrücken miteinander verbunden sind (siehe Abb. 2.2). Über die prozentualen Anteile der einzelnen Oligomeren, weder als Gewichts- noch als Teilchenzahlverhältnis, gibt es leider keine Angabe [Phf98].

Photofrin-I und die chemisch sauberer gereinigte Variante Photofrin-II (das Medikament Photofrin ist Photofrin-II) sind bestimmte Variationen des Hämatoporphyrinderivats (HpD), daß erstmals 1960 von Dr. S. Schwartz aus der Substanz Hämatoporphyrin (Hp) synthetisiert wurde [PT86]. Verschiedene Abarten des Derivats kommen durch leicht unterschiedliche Herstellungsverfahren zustande. Es wurde nachgewiesen, daß die Wirksamkeit von Photofrin bei der PDT über



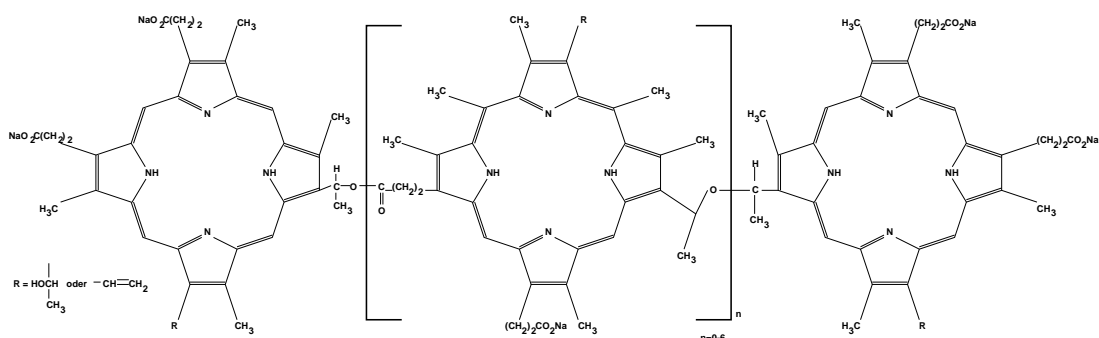


Abb. 2.2: Strukturformel des Oligomerenmischs Photofrin nach [Phf98]

die Anregung von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff (sog. Typ II- Reaktion, vgl. Kap. 7.2) läuft und nicht über die Erzeugung freier Radikale (Typ I) [K84], [PT86].

Porphyrine, von denen Photofrin ein Abkömmling ist, haben typischerweise Triplettlebensdauern ( $T_1$ ) von mehreren hundert  $\mu\text{s}$  in Wasser [RJ88]. Die Lebensdauer des  $T_1$ -Zustands von Photofrin in reinem, nahezu sauerstofffreiem  $\text{D}_2\text{O}$  wurde in dieser Arbeit zu  $\tau_{T_1} = (143 \pm 8) \mu\text{s}$  bestimmt (vgl. Kap. 4.4). Sauerstoff im Grundzustand  $^3\Sigma_g^-$  reduziert diese Lebensdauer durch einen bimolekularen Quench-Prozeß nach Gl. (2.1) so stark, daß wegen der langen intrinsischen Lebensdauer des Triplett-Zustands in luftgesättigten wäßrigen Lösungen etwa 98% der  $T_1$ -Zustände durch Sauerstoff gequench werden [RJ88].

Die Nicht-Reinheit von Photofrin im chemischen Sinne erschwert die modelltheoretische Erfassung dieses Farbstoffs. Man weiß nicht, ob alle Komponenten das Anregungslicht gleichermaßen absorbieren. Auch kann man nicht sagen, welche der Komponenten für den Energieübertrag auf den  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff zuständig ist [K84]. Möglicherweise sind es mehrere, aber mit verschiedenen Ratenkonstanten. Es ist ebenfalls denkbar, daß die absorbierte Lichtenergie erst einmal Übergänge zwischen verschiedenen Photofrinkomponenten durchlaufen muß, bevor sie den Sauerstoff erreicht.

Aufgrund dessen kann man für die Energieübertragsratenkonstante  $k_{T\Delta}$  vom  $T_1$ -Zustand auf den Sauerstoff nur einen quasi „effektiven“ Wert (siehe unten) über das bestimmbare Produkt  $k_{T\Delta}N_P$  (vgl. Kap. 2.5) angeben, da man keine präzise Teilchendichte  $N_P$  angeben kann. Man kann natürlich auch nicht entscheiden, welche der Komponenten für das Quench-Verhalten von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff durch Photofrin zuständig ist [K84]. Es ist eher wahrscheinlich, daß es ein anderes Oligomer ist als dasjenige, das bevorzugt  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff generiert. Letzteres wird hauptverantwortlich für die Kopplung der Zustände  $T_1$  von Photofrin und  $^1\Delta_g$  von Sauerstoff sein, wobei  $T_1$  denjenigen Zustand der zuständigen Komponente bezeichnet, die eben Energie auf  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff überträgt. Man müßte also strenggenommen zwischen (mindestens) zwei verschiedenen Teilchendichten  $N_P^{(1)}$  für  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Generierung und  $N_P^{(2)}$  für das Quenchen von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff

unterscheiden. Es sind aber überhaupt keine Teilchendichten für die einzelnen Komponenten bekannt, nicht einmal Verhältnisse, darum benutzt man der Einfachheit halber ein einziges  $N_P$ , das leider unbekannt bleibt, und verrechnet die verschiedenen Effektivitäten der Vorgänge stillschweigend in die Übertragsratenkonstanten  $k_{\Delta P}$  und  $k_{\Delta T}$ , da die Produkte  $k_{\Delta P}N_P$  und  $k_{\Delta T}N_P$  bestimmbar sind (siehe Kap. 2.5).

Es ist nachgewiesen, daß Photofrin ähnlich wie viele andere Photosensibilisatoren [TGW84] selbst  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff quencht ( $k_{\Delta P} > 0$ ), also einen physikalischen Quencher darstellt [THE88]. Von der genannten Problematik mit der Photofrin-„Teilchenzahl“  $N_P$  ist wie erwähnt auch  $k_{\Delta P}$  betroffen. So ist  $k_{\Delta P}$  mit den anderen Quencherratenkonstanten  $k_{\Delta Q}$  für z.B. Natriumazid leider nicht direkt vergleichbar.

Die Quantenausbeute an  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff von Photofrin-I ist mit  $\Phi_{\Delta} = 0,36$  in  $H_2O$  angegeben. Für Photofrin-II konnte kein Wert gefunden werden, doch dürfte er höchstens geringfügig von dem genannten abweichen. Die über alle Oligomere gemittelte molare Masse von Photofrin wird abgeschätzt zu  $\bar{M}_{Ph} > 3000 \frac{g}{Mol}$  [PT86]. Das Hämatoporphyrin, das letztlich nichts anderes ist als ein einzelner Porphyrin-Ring mit entsprechenden funktionellen Gruppen, besitzt eine molare Masse von  $M_{Hp} = 598,7 \frac{g}{Mol}$  [THE88].

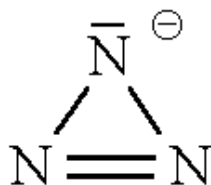
Geht man von einer mittleren molaren Masse von  $\bar{M} = 3000 \frac{g}{Mol}$  für Photofrin aus, so kann man abschätzen, daß eine Einwaage von  $200 \mu g/ml$  Photofrin in die Lösung in etwa einer Teilchendichte von etwa  $N_P = 67 \mu M$  entspricht. Rechnet man zurück auf die Lösungsmenge 1 ml, so liegt die Photofrin-Teilchenzahl in Lösung bei  $200 \mu g/ml$  bei  $0,067 \mu Mol \approx 4 \cdot 10^{16}$  Teilchen.

#### 2.4.2 Der Quencher Natriumazid

In protischen und damit insbesondere auch wäßrigen Lösungsmitteln stellt das Azid-Anion  $N_3^-$  einen physikalischen Quencher für  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff dar [B76]. Wegen seiner Effizienz, d.h. seiner großen Quencherratenkonstante wird es oft als Nachweismittel für  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff benutzt. Es ist jedoch zu beachten, daß es in Konzentrationen  $c_Q > 100$  mM außerdem die Singulett- und Triplettzustände von Photosensibilisatoren quenchen kann. Wegen seiner hohen chemischen Reaktivität ist zu erwarten, daß das Azid, gerade unter Laserbeschuß (Aktivierungsenergie), chemische Reaktionen mit dem Sensibilisator eingehen kann. Chemische Reaktionen mit dem Sauerstoff sind nicht zu erwarten [B76].

Verwendet wird es wegen der guten Löslichkeit als Natriumazid  $NaN_3$ . Wegen seiner hohen Toxizität kann es *in vitro* und *in vivo* nur in Konzentrationen bis zu 50 mM eingesetzt werden.

Die molare Masse von Natriumazid beträgt  $M = 65,01 \frac{g}{Mol}$  [FR98]. Seine Ratenkonstante für das Quenchen von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff beträgt  $k_Q = 0,58 (\mu s mM)^{-1}$  in Wasser [WR95], [K98]. Abb. 2.3 zeigt die Strukturformel des sehr einfach aufgebauten Azid-Anions.

Abb. 2.3: Strukturformel des Azid-Anions  $\text{N}_3^-$ 

### 2.4.3 Der Radikalfänger Mannitol

Mannitol (chemische Bezeichnung nach IUPAC: 1,2,3,4,5,6-Hexahydroxyl-Isoshexan) ist seit langem als sogenannter Radikalfänger bekannt, also als ein Stoff, der bevorzugt mit freien Radikalen wie z.B.  $\text{OH}^\cdot$  oder  $\text{O}_2^{\cdot-}$  reagiert und diese deaktiviert [AMB88]. Da die Radikale mit Mannitol schneller reagieren als mit den meisten anderen Substanzen, bewirkt die Anwesenheit von Mannitol einen Schutzeffekt für Materialien, die Radikalen ausgesetzt sind. Sowohl physikalische als auch chemische Reaktionen mit Singulett-Sauerstoff sind nicht bislang bekannt, folglich stellt Mannitol in Bezug auf  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff keinen Quencher dar.

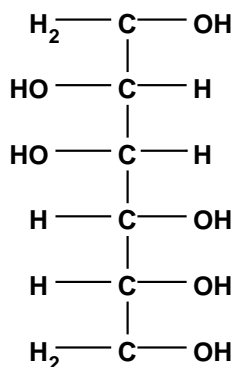


Abb. 2.4: Strukturformel von Mannitol nach [M93]

Im Rahmen der PDT ist Mannitol von Interesse, da durch alternative Verwendung *in vitro* von Mannitol und Natriumazid (vgl. Kap. 2.4.2) entschieden werden kann, ob  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff (Typ II) oder aber andere reaktive Sauerstoff-Spezies wie etwa  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Typ I) der ausschlaggebende Faktor bei der Tumorzelltötung sind (vgl. Kap. 7.2).

Zusätzlich gilt es abzuklären, ob nicht vielleicht doch, wenn auch in geringem Maße, der  $^1\Delta_g$ -Zustand von Sauerstoff gequencht wird. In der Literatur ist hierüber nichts bekannt, folglich ist seine Ratenkonstante bezüglich Quenchen von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff kleiner als diejenige von schwerem Wasser  $\text{D}_2\text{O}$ , vgl. Gl. (2.4) und [K98].

Die molare Masse von Mannitol beträgt  $M = 182,17 \frac{\text{g}}{\text{Mol}}$  [FR98]. Abb. 2.4 zeigt die Strukturformel von Mannitol.

#### 2.4.4 Das Lösungsmittel schweres Wasser

Als Lösungsmittel für die Substanzen wurde schwerem Wasser (Deuteriumoxid,  $\text{D}_2\text{O}$ , in der Literatur oft auch als  $^2\text{H}_2\text{O}$  bezeichnet) gegenüber normalem Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) der Vorzug gegeben. Dies ist für Zellen in Suspension eigentlich eine unphysiologische Umgebung, denn menschliches Gewebe enthält praktisch nur reines  $\text{H}_2\text{O}$ . Der Anteil an  $\text{D}_2\text{O}$  in natürlichem Wasser beträgt im Mittel 0,015 Mol-% [FR98]. Doch aufgrund der höheren Lebensdauer des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff von etwa  $\tau_\Delta = (61 \pm 8) \mu\text{s}$  in reinem  $\text{D}_2\text{O}$  anstelle von  $\tau_\Delta = (3,7 \pm 0,5) \mu\text{s}$  in reinem  $\text{H}_2\text{O}$  [WHR95] fiel die Entscheidung so aus. Die Hauptvorteile sind, daß man deshalb mehr Lumineszenzsignal erwarten und bei der höheren Lebensdauer die lebensdauerverkürzenden Effekte der Quencher in den verschiedenen Konzentrationen empfindlicher beobachten kann.

Zudem liegt die Lebensdauer von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in  $\text{D}_2\text{O}$  vom Zahlenwert her weiter entfernt von der Triplettlebensdauer in Lösung  $K_T \approx 2 \mu\text{s}$  je nach Lösungskomponenten (vgl. Kap. 2.5 und Kap. 4) als bei  $\text{H}_2\text{O}$ . Dies erlaubt eine klarere Zuordnung der gemessenen Phänomene.

$\text{D}_2\text{O}$  wirkt für viele Organismen und Zellkulturen auf Dauer toxisch, da aufgrund einiger veränderter physikalischer Parameter gegenüber  $\text{H}_2\text{O}$  normale chemische Reaktionsgleichgewichte des Organismus soweit verschoben werden, daß der Stoffwechsel gehemmt wird. Jedoch sind nicht alle Zelltypen hierauf empfindlich [FR98]. Die HT-29-Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden (vgl. Kap. 7.3.1 bzw. [SKS96]), kamen mit dem  $\text{D}_2\text{O}$  für die Dauer der Inkubation und der Messung gut zurecht, sie haben diese Behandlung bis zur Bestrahlung mit Licht überlebt.

Der Absorptionskoeffizient von  $\text{D}_2\text{O}$  beträgt  $\alpha_{\text{D}_2\text{O}} = 0,14 \text{ cm}^{-1}$  bei der Detektionswellenlänge  $\lambda_\Delta = 1270 \text{ nm}$  und ist deutlich geringer als der von  $\text{H}_2\text{O}$  mit  $\alpha_{\text{H}_2\text{O}} = 0,54 \text{ cm}^{-1}$ . Es wird hier also weniger Lumineszenzsignal vom Lösungsmittel selbst absorbiert, was die detektierbare Intensität des ohnehin äußerst schwachen Signals erhöht. Die genannten Werte für die Absorptionskoeffizienten wurden vor Ort mit einem Spektralphotometer (Firma Beckmann, Modell Acta IV) gemessen.

Die molare Masse von schwerem Wasser beträgt  $M = 20,03 \frac{\text{g}}{\text{Mol}}$  [FR98]. In schwerem Wasser beträgt die Lebensdauer von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff  $\tau_\Delta = (61 \pm 8) \mu\text{s}$  [WHR95], was einer Quencherrate von  $K_{LM}^{\text{D}_2\text{O}} = (0,016 \pm 0,002) \mu\text{s}^{-1}$  entspricht [vgl. Gl. (2.3)].

## 2.5 Theoretisches Modell der Singulett-Sauerstoff-Relaxation

Um die in einer Lösung von Sensibilisator und Quencher bei Laseranregung ablaufenden Vorgänge zu erklären, mußte ein Modell gefunden werden, in dem die betroffenen Niveaus der beteiligten Substanzen und die Energieüberträge zwischen ihnen in Verbindung gebracht werden. Abb. 2.5 zeigt die Vorstellung, die der Deutung der in dieser Arbeit gefundenen Meßergebnisse zugrunde liegt.

Ausgangspunkt ist ein einfaches Niveauschema, das erstmals in [PS84] beschrieben wurde und seither quasi das Standardmodell für relaxierenden  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff darstellt. Dieses Modell enthält ursprünglich nur den Energieübertrag vom Farbstofftriplett  $T_1$  zum Sauerstoff (Ratenkonstante  $k_{T\Delta}$  in Abb. 2.5). Es wurde erweitert um den Rücktransfer der Energie vom  $^1\Delta_g$ -Niveau des Sauerstoffs zum Farbstofftriplett  $T_1$  (Ratenkonstante  $k_{\Delta T}$ ). Dadurch tritt eine Kopplung dieser beiden Niveaus auf. Die Kopplung hat spürbare Auswirkungen auf das Aufbau- und Abklingverhalten des beobachtbaren Lumineszenzsignals von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff, die ohne diese Kopplung nicht erklärbar sind.

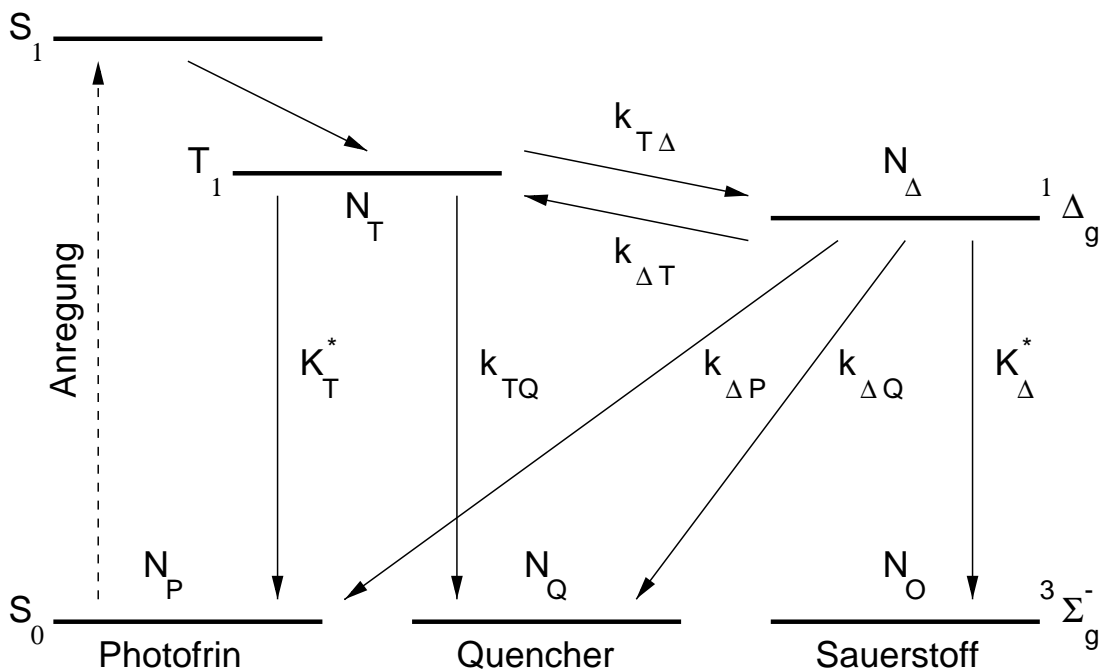


Abb. 2.5: Niveauschema der zugrundeliegenden Modellvorstellung; Erklärung siehe Text

Gelöstes Photofrin wird durch einen Laserpuls in den  $S_1$ -Zustand angeregt. Von dort gelangt gemäß Kap. 2.1 ein Teil der Energie in den  $T_1$ -Zustand. Dies sei die Ausgangssituation für die folgenden Annahmen und Überlegungen.

Die Symbole  $N$  bezeichnen Teilchendichten, die  $K^*$  Übertragsraten und die  $k$  Übertragsratenkonstanten. Die Indices  $P$ ,  $Q$  und  $O$  stehen für Photofrin, Quen-

cher und Sauerstoff, die Indices  $T$  und  $\Delta$  für den Triplett - Zustand von Photofrin und den  $^1\Delta_g$  - Zustand von Sauerstoff.

So bedeutet  $N_P$  die Teilchendichte der Photofrin-, „Moleküle“, was insofern nicht korrekt ist, als Photofrin kein Reinstoff sondern ein Oligomergemisch ist (vgl. Kap. 2.4.1). Man weiß nicht, welche seiner Komponenten für die Generierung von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff zuständig ist. Hier ist mit  $N_P$  die Teilchendichte der diesbezüglich aktiven Moleküle gemeint.  $N_T$  kennzeichnet die Teilchendichte derjenigen dieser aktiven Moleküle, die sich im angeregten  $T_1$ -Zustand befinden. Man darf in den Gleichungen, die das Modell beschreiben, die Anzahl  $N_P$  der Farbstoffmoleküle im Grundzustand mit der Gesamtzahl gleichsetzen, da stets  $N_T \ll N_P$  gilt. Dies kann man abschätzen aus der Anzahl von Photonen, die der Anregungslaserpuls enthält. Bei der in dieser Arbeit überwiegend benutzten Anregungspulsenergie von  $E_L = 24 \mu\text{J}$  (vgl. Kap. 3.4) treffen nach der Gleichung  $E_L = n \cdot \frac{hc}{\lambda}$  etwa  $n = 6,4 \cdot 10^{13}$  Photonen der Wellenlänge  $\lambda = 532 \text{ nm}$  auf die Lösung ( $h$  Planck - Konstante,  $c$  Vakuum - Lichtgeschwindigkeit). Nach Kap. 2.4.1 weiß man, daß diese Zahl um drei Größenordnungen geringer ist als die geschätzte Anzahl  $N_P$  der Farbstoffmoleküle in 1 ml Lösung, die bei einer typischen Photofrinkonzentration von  $200 \mu\text{g/ml}$  etwa  $N_P \approx 4 \cdot 10^{16}$  Teilchen beträgt. Selbst wenn also alle Photonen verlustfrei absorbiert würden und jedes angeregte Photofrinmolekül in den Triplettzustand gelangen würde (was natürlich beides nicht der Fall ist), so wäre immer noch  $N_T \ll N_P$ .

$N_O$  ist die Teilchendichte der Sauerstoff - Moleküle insgesamt,  $N_\Sigma$  die Dichte der Sauerstoffmoleküle im Grundzustand  $^3\Sigma_g^-$ , und  $N_\Delta$  die Dichte der angeregten  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff - Moleküle. Es gilt  $N_O = N_\Sigma + N_\Delta = \text{konst}$ , solange kein Vorgang beteiligt ist, der Sauerstoff verbraucht. Man nimmt an, daß die Gesamtteilchendichte an Sauerstoffmolekülen  $N_O$  stets groß ist gegenüber der Dichte der angeregten  $^1\Delta_g$ -Moleküle,  $N_\Delta \ll N_O$ . Somit kann man  $N_O = N_\Sigma$  als Konstante betrachten. Bei geringen Anregungspulsenergien ist dies gewährleistet, da sich bei einer Sauerstoffkonzentration von 100% LS, also der Luftsättigungskonzentration von Sauerstoff in Wasser bei Laborbedingungen (siehe Kap. 3.3), in 1 ml  $\text{D}_2\text{O}$  etwa  $N_O = 1,5 \cdot 10^{17}$  Teilchen befinden. Dies errechnet sich aus der Luftsättigungskonzentration von Sauerstoff in  $\text{H}_2\text{O}$  bei der Temperatur  $T = 23^\circ\text{C}$  und einen Luftdruck von  $p = 963 \text{ hPa}$ , die  $c_{\text{O}_2}^{LS} \approx 8 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$  beträgt [OS83], und der molaren Masse von Sauerstoff  $M_{\text{O}_2} = 32 \frac{\text{g}}{\text{Mol}}$  [FR98]. Die genannte Anzahl für  $N_O$  ist um vier Größenordnungen höher als die Zahl der anregenden Photonen  $n$ . Hinzu kommen Verluste durch Streuung und Absorption und Triplettausbeute von Photofrin, so daß die Anschätzung  $N_\Delta \ll N_O$  bei Luftsättigungskonzentration gut erfüllt sein dürfte.

Die beiden vorangegangenen Näherungen werden u.a. deshalb gemacht, damit die unten aufgeführten Differentialgleichungen zur Beschreibung des Modells analytisch lösbar und so leichter auswertbar werden.

$N_Q$  markiert die Teilchendichte der Quencher - Moleküle.

$K_T^*$  symbolisiert die Rate der Relaxation des  $T_1$ -Zustands des Farbstoffs

durch Lösungsmittelmoleküle und strahlend.  $K_{\Delta}^*$  bedeutet die Rate der Relaxation von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff im reinen Lösungsmittel. Die strahlende Relaxation spielt für die Deaktivierung von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff keine Rolle und wird in den Raten Gleichungen vernachlässigt.

Mit der Ratenkonstante  $k_{T\Delta}$  wird der Energieübertrag vom Farbstofftriplett-zustand zum Sauerstoff bezeichnet. Es wird zusätzlich angenommen, daß die energetische Lage der Niveaus  $T_1$  des Farbstoffs und  $^1\Delta_g$  von Sauerstoff sehr ähnlich sind. Deshalb muß man einen nennenswerten Rücktransfer an Energie von  $^1\Delta_g$ -Zustand vom Sauerstoff zum  $T_1$ -Zustand des Farbstoffs in Betracht ziehen. Dieser wird mit der Ratenkonstante  $k_{\Delta T}$  im Modell berücksichtigt. Je nach dem, wie ähnlich  $k_{T\Delta}$  und  $k_{\Delta T}$  sind, herrscht eine mehr oder weniger starke Kopplung zwischen den beiden Niveaus der zwei Substanzen. Dies ist die wesentliche Neuerung gegenüber dem Standardmodell [PS84].

Die Ratenkonstanten  $k_{\Delta Q}$  und  $k_{TQ}$  bezeichnen den Einfluß des Quenchers auf die Relaxation des jeweiligen angeregten Zustands. Sie sind quencher-spezifisch und stellen ein Maß für die Stärke des Quenchers dar (vgl. Kap. 2.3). Auch Photofrin selbst, bzw. eine oder mehrere seiner Komponenten, zeigt ein immanentes Quench-Verhalten von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff [THE88], das nichts mit dem Energierückübertrag ins Triplet zu tun hat, also von  $k_{\Delta T}$  unabhängig ist. Dies ist mit der Ratenkonstante  $k_{\Delta P}$  berücksichtigt.

Formuliert man aus diesen Gegebenheiten (Abb. 2.5) Differentialgleichungen für das zeitliche Verhalten der Besetzungen  $N_T$  und  $N_{\Delta}$ , so erhält man die beiden folgenden gekoppelten linearen Differentialgleichungen

$$\frac{dN_T}{dt} = - (K_T^* + k_{T\Delta}N_O + k_{TQ}N_Q) N_T + k_{\Delta T}N_P N_{\Delta} \quad (2.5)$$

und

$$\frac{dN_{\Delta}}{dt} = - [K_{\Delta}^* + (k_{\Delta P} + k_{\Delta T}) N_P + k_{\Delta Q}N_Q] N_{\Delta} + k_{T\Delta}N_O N_T \quad (2.6)$$

Zur Vereinfachung führt man folgende Abkürzungen ein:

$$K_T = K_T^* + k_{T\Delta}N_O + k_{TQ}N_Q \quad (2.7)$$

und

$$K_{\Delta} = K_{\Delta}^* + (k_{\Delta P} + k_{\Delta T})N_P + k_{\Delta Q}N_Q \quad (2.8)$$

$K_T$  und  $K_{\Delta}$  bezeichnen die Gesamtrelaxationsraten vom  $T_1$ -Zustand des Farbstoffs und von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff und dürfen nicht verwechselt werden mit den gestrichelten Größen  $K_T^*$  und  $K_{\Delta}^*$ , die sich im wesentlichen auf das Quenchen durch

das Lösungsmittel beziehen (siehe oben), sowie mit den Größen  $K'_T$  und  $K'_\Delta$  aus Gl. (2.1), die die Quantenausbeute  $\Phi_\Delta$  definieren.

Differenziert man Gl. (2.6) nach der Zeit  $t$ , so erhält man einen Ausdruck, in dem die Größe  $\frac{dN_T}{dt}$  auftritt. An dieser Stelle kann man Gl. (2.5) einsetzen und erhält nach einigen Umformungen die Gleichung

$$\frac{d^2 N_\Delta}{dt^2} + (K_\Delta + K_T) \frac{dN_\Delta}{dt} + (K_\Delta K_T - k_{T\Delta} N_O k_{\Delta T} N_P) N_\Delta = 0 \quad (2.9)$$

Dieser Ausdruck weist formale Äquivalenz mit der Schwingungsdifferentialgleichung des gedämpften harmonischen Oszillators auf. Dem entsprechend kann man sich an die Lösung von Gl. (2.9) machen. Mit dem Ansatz

$$N_\Delta \sim e^{-\beta t}$$

erreicht man für die „Abklingraten“  $\beta_{1,2}$  den Ausdruck

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} \left[ K_T + K_\Delta \pm \sqrt{(K_T - K_\Delta)^2 + 4 k_{T\Delta} N_O k_{\Delta T} N_P} \right] \quad (2.10)$$

Formal verhält sich die Besetzung des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff wie die Auslenkung eines stark überdämpften Oszillators. Es gibt zwei Lösungen für  $\beta$ , die der Anstiegs- und Abklingrate der Besetzung des  $^1\Delta_g$ -Zustands entsprechen. Der Term

$$k_{T\Delta} N_O k_{\Delta T} N_P =: K_{T\Delta}^2 \quad (2.11)$$

bestimmt die Kopplung zwischen dem  $T_1$ -Zustand des Photofrin und dem  $^1\Delta_g$ -Zustand von Sauerstoff. Mit dieser Abkürzung zeigt sich die Bestimmungsgleichung der Abklingraten als

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} \left[ K_T + K_\Delta \pm \sqrt{(K_T - K_\Delta)^2 + 4 K_{T\Delta}^2} \right] \quad (2.12)$$

Für die Besetzung  $N_\Delta$  des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff setzt man an

$$N_\Delta(t) = A e^{-\beta_1 t} + B e^{-\beta_2 t} \quad (2.13)$$

Die Parameter  $A$  und  $B$  folgen aus den Anfangsbedingungen

$$\begin{aligned} t_0 &= 0 \\ N_\Delta(0) &= 0 \\ N_T(0) &= N_T^0 \end{aligned}$$



Die Größe  $N_T^0$  für die Startbesetzung des Farbstoff-Triplettzustands  $T_1$  hängt von der Energie des Anregungspulses und der Absorption der Farbstofflösung ab. Als Lösungen der Differentialgleichungen (2.5) und (2.6) ergeben sich so

$$N_T(t) = \frac{N_T^0}{\beta_1 - \beta_2} [(\beta_1 - K_\Delta)e^{-\beta_1 t} + (K_\Delta - \beta_2)e^{-\beta_2 t}] \quad (2.14)$$

für die Besetzung des  $T_1$ -Zustands von Photofrin und zu

$$N_\Delta(t) = \frac{N_T^0 k_{T\Delta} N_O}{\beta_1 - \beta_2} (e^{-\beta_2 t} - e^{-\beta_1 t}) \quad (2.15)$$

für die Besetzung des  ${}^1\Delta_g$ -Zustands von Sauerstoff. Das im Experiment beobachtete Lumineszenzsignal ist proportional zu  $N_\Delta(t)$ . Abb. 2.6 zeigt exemplarisch einen realistischen Graphen für Gl. (2.15) als durchgezogene Linie.

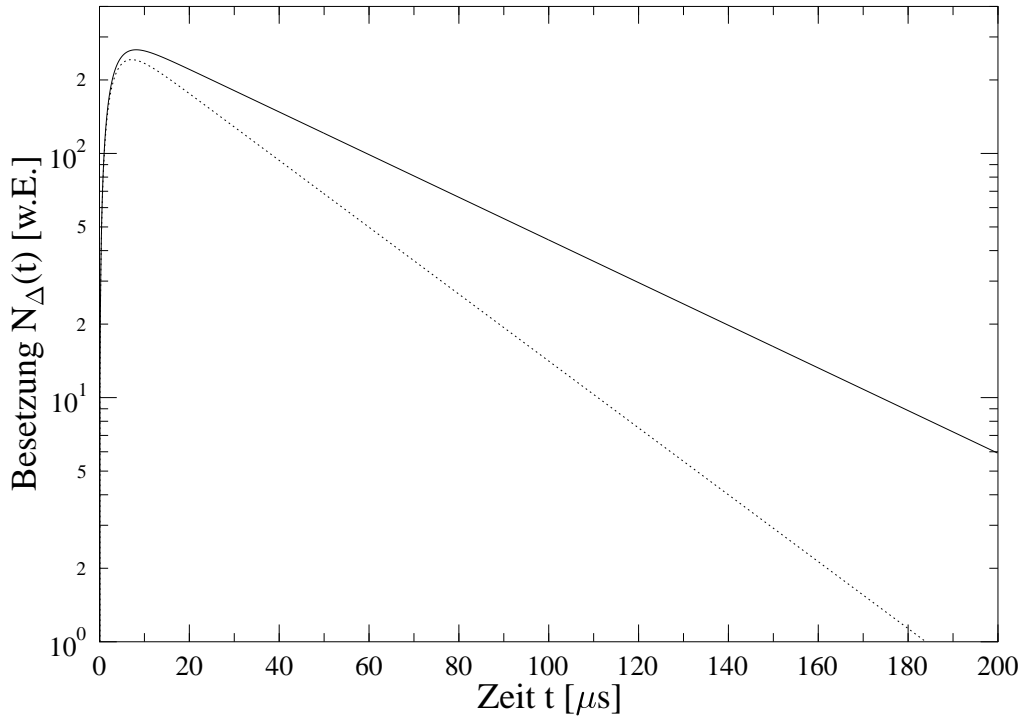


Abb. 2.6: Besetzung  $N_\Delta$  des  ${}^1\Delta_g$ -Zustands als Funktion der Zeit nach Gl. (2.15) unter Verwendung der Ratenkonstanten nach Tab. 4.1 (durchgezogene Linie), hier ohne Quencher,  $k_{\Delta Q} = 0$ . Die gepunktete Linie zeigt dieselbe Kurve, wie sie ohne Kopplung vom  ${}^1\Delta_g$ -Sauerstoff an den  $T_1$ -Zustand des Sensibilisators,  $K_{T\Delta}^2 = 0$ , verlaufen würde bei ansonsten identischen Parametern.

Für  $\beta_1 > \beta_2$  bestimmt  $\beta_1$  das Anstiegs- und  $\beta_2$  das Abklingverhalten der Meßkurve. Sie können mit einem Fitprogramm aus den experimentell gewonnenen Kurven bestimmt werden.  $\beta_2$  kann auch in guter Näherung aus dem Abklingen bei langen Zeiten ( $\beta_1 t \gg 1$ ) bestimmt werden.

Zusätzlich ist in dieser Abbildung als gestrichelte Linie mit eingezeichnet, wie sich  $N_\Delta(t)$  hypothetisch verhalten würde, wenn in Gl. (2.12)  $K_{T\Delta}^2 = 0$  wäre, d.h. wenn keine Kopplung existierte. Alle anderen Parameter blieben dabei unverändert. Man sieht, daß die Besetzung  $N_\Delta(t)$  ohne die Kopplung deutlich schneller abklingt als mit der Kopplung. Um dies zu verstehen, muß man das gekoppelte System aus  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff und  $T_1$ -Photofrin betrachten. Durch  $k_{T\Delta}$  und  $k_{\Delta T}$  kann Energie zwischen diesen beiden Zuständen hin und her übertragen werden und dem gekoppelten System entweder durch Relaxation des Sauerstoff in den Grundzustand, beschrieben durch  $K_\Delta^*$ , oder durch Relaxation des Triplettzustands von Photofrin in den Grundzustand  $S_0$ , beschrieben durch  $K_T^*$ , entzogen werden. Da aber  $K_T^* < K_\Delta^*$  ist, bedeutet die Kopplung eine effektive Verlängerung der Lebensdauer des  $^1\Delta_g$ -Zustands von Sauerstoff, da er durch den Hin- und Rücktransfer seine Energie in dem längerlebigen Triplett-Zustand des Sensibilisators quasi zwischenspeichern kann.

Die Kopplung bewirkt also eine höhere Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff und vergrößert dadurch sowohl die Ausbeute als auch die Reichweite dieser reaktiven Sauerstoffspezies. Dieser Umstand ist für die Photodynamische Therapie interessant, da hier eben diese beiden Aspekte, Ausbeute und Reichweite von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff, von essentieller Bedeutung bei der Zelltötung sind. Es bedeutet, daß Farbstoffe, deren Triplett- $T_1$ -Niveau stark an den  $^1\Delta_g$ -Zustand des Sauerstoffs koppelt, als Sensibilisator vorteilhaft sind gegenüber Farbstoffen mit schwächerer Kopplung.

Abb. 2.7 zeigt ein realistisches Beispiel für den Verlauf der beiden Raten  $\beta_1(N_O)$  und  $\beta_2(N_O)$  über der Sauerstoffkonzentration  $N_O$ . Die Sauerstoffkonzentrationsabhängigkeit der beiden  $\beta$  kommt durch  $K_T(N_O)$  nach Gl. (2.7) und  $K_{T\Delta}^2(N_O)$  nach Gl. (2.11) zustande.

Ohne die Kopplung durch  $k_{T\Delta}$  und  $k_{\Delta T}$  [ $K_{T\Delta}^2 = 0$ ] ergibt sich formal aus Gl. (2.10), daß  $\beta_1^{OK} = K_T(N_O)$  und  $\beta_2^{OK} = K_\Delta$ . Der hochgestellte Index  $OK$  bedeutet „ohne Kopplung“. Diese Größen sind in Abb. 2.7 durch gepunktete Linien dargestellt. Da aber nach Gl. (2.15) immer die kleinere Rate das Abklingverhalten des Lumineszenzsignals bestimmt, ist bis zum Schnittpunkt  $\beta_1^{OK} = \beta_2^{OK}$  die Rate  $\beta_1^{OK}$  die Abklingrate, danach  $\beta_2^{OK}$ .

Eine nichtverschwindende Kopplung  $K_{T\Delta}^2 \neq 0$  bewirkt nun, daß sich  $\beta_1$  und  $\beta_2$  nicht im Punkt  $\beta_1^{OK} = \beta_2^{OK}$  bzw.  $K_T = K_\Delta$  schneiden, sondern daß es zu einer Aufspaltung („avoided crossing“) kommt (durchgezogene Linien in Abb. 2.7). Außerdem bewirkt sie, daß sich  $\beta_2$  für eine Sauerstoffdichte, die größer als die Luftsättigungsdichte ist,  $N_O > N_O^{LS}$ , nicht  $K_\Delta$  annähert sondern einem tiefer liegenden Wert, und  $\beta_1$  nicht  $K_T$  sondern einem ebenso weit darüberliegenden Wert, der durch die Stärke der Kopplung bestimmt ist [siehe unten, Grenzfall

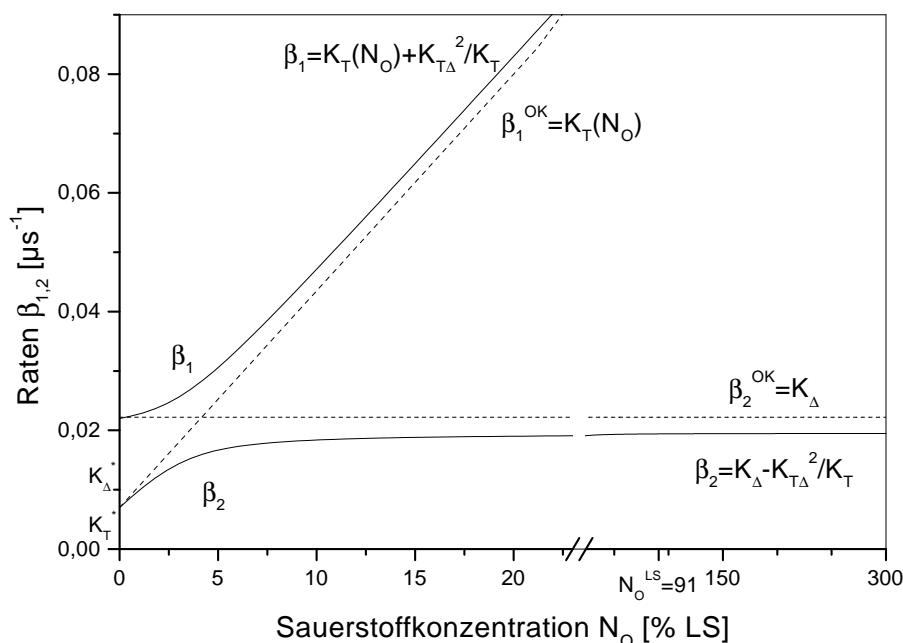


Abb. 2.7: Die meßbaren Raten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  über der Sauerstoffkonzentration  $N_O$  nach Gl. (2.10) mit realistischen Zahlenwerten (vgl. Tab. 4.1) für die eingehenden Parameter.  $N_O^{LS}$  bezeichnet den Punkt luftgesättigter Sauerstoffkonzentration (siehe Kap. 3.3). Die Quencherkonzentration ist hier  $N_Q = 0$  gesetzt. Die gepunkteten Linien bezeichnen  $K_T$  und  $K_{\Delta}$ .

unter (3)].

Für eine quantitative Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten von  $\beta_1$  und  $\beta_2$  diskutiert man folgende Näherungen und Grenzfälle, immer Eingedenk der Tatsache, daß  $\beta_1$  und  $\beta_2$  die der Messung zugänglichen Größen sind:

1. Annahme:  $k_{TQ} = 0$ , d.h. der  $T_1$ -Zustand von Photofrin wird nicht gequenchet.

In [B76] wird angegeben, daß Natriumazid bis hin zu Konzentrationen von 100 mM bevorzugt den  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff quencht, dagegen den Triplet-Zustand von Sensibilisatoren i.A. nicht quencht. Photofrin wird hierin allerdings nicht explizit erwähnt. In der vorliegenden Arbeit wurden Natriumazid-Konzentrationen lediglich bis 2 mM verwendet. Deshalb macht es Sinn, die Wirkung des Quenchers auf den  $T_1$ -Zustand von Photofrin gegenüber der Quencher-Wirkung auf  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff zu vernachlässigen. Die Messungen müssen zeigen, ob diese Annahme gerechtfertigt ist.

2. Grenzfall:  $N_O \rightarrow 0$ , siehe Abb. 2.7

Bestimmung von  $K_T^*$  und  $K_\Delta^*$ .

Betrachtet man das System im Falle verschwindender Sauerstoffkonzentration, so ergeben sich im Limes die Werte  $\beta_2 = K_T^*$  nach Gl. (2.7) und (2.10), also die Triplettrelaxationsrate ohne Sauerstoffübertrag, und  $\beta_1 = K_\Delta$  nach Gl. (2.8) und (2.10).

Man darf hier die zugrundeliegende Näherung  $N_\Delta \ll N_O$  nicht vergessen. Doch zusammen mit  $N_O \rightarrow 0$  geht natürlich auch  $N_\Delta \rightarrow 0$  und zusätzlich schwindet der Einfluß von  $N_O$  in den Gl. (2.7) und (2.10). Deshalb ist die Betrachtung  $N_O \rightarrow 0$  dennoch von Wert.

Es liegt in der Natur der Dinge, daß bei  $N_O \rightarrow 0$  das detektierbare Signal von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff ebenfalls verschwindet. Man kann allerdings aus den Meßdaten bei geringen Konzentrationen auf Null extrapolieren. Für  $N_O = 0$  kann experimentell möglicherweise die Triplett-Lumineszenz nachgewiesen werden, da  $E_{T_1} \approx E_{^1\Delta_g}$  ist, was durch die bloße Existenz der Kopplung erwiesen ist (vgl. Kap. 4).

3. Grenzfall:  $N_O \geq N_O^{LS}$ , siehe Abb. 2.7

Bestimmung von  $K_{T\Delta}^2$ .

Der Luftsättigungswert für Sauerstoff in der Lösung beträgt  $N_O^{LS} = 91\%$  LS (siehe Kap. 3.3). Unter Verwendung der in Kap. 4 bestimmten Zahlenwerte für  $K_T^*$ ,  $k_{T\Delta}$  und  $k_{\Delta T}N_O$  kann man zeigen, daß für  $N_O \geq N_O^{LS}$  gilt:  $k_{T\Delta}N_O \gg K_T^*$ ,  $K_T \gg K_\Delta$  und  $K_T \gg 2 \cdot K_{T\Delta}$ . Damit erhält man aus Gl. (2.10) näherungsweise  $\beta_1 \approx K_T + \frac{K_{T\Delta}^2}{K_T}$  und  $\beta_2 \approx K_\Delta - \frac{K_{T\Delta}^2}{K_T}$  (siehe Abb. 2.7).

Hier sieht man deutlich, daß bei hohem  $N_O$   $\beta_2 \neq K_\Delta$  ist! Vielmehr ist die Meßgröße  $\beta_2$  gegen  $K_\Delta$  um den Wert  $\frac{K_{T\Delta}^2}{K_T}$  (für  $N_O \gg N_O^{LS}$ ) zu kleineren Raten hin verschoben. Die Kopplung der genannten Niveaus bewirkt also eine größere Lumineszenz-Abklingdauer  $\tau = 1/\beta_2$  von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff.

Diese Tatsache könnte die Vielzahl an Werten erklären, die die Literatur für die Lebensdauer von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in schwerem Wasser bietet [WHR95]. Soweit bekannt wurde in der Literatur immer versucht, bei direkten Nachweismethoden eine möglichst hohe Sauerstoffkonzentration (oder mindestens  $N_O \approx N_O^{LS}$ ) zur Maximierung der schwachen Lumineszenz zu erzielen. Dies stimmt mit dem hier betrachteten Grenzwert überein. Die der Messung zugängliche Größe ist danach aber  $\beta_2 = K_\Delta - \frac{K_{T\Delta}^2}{K_T}$ , nicht  $K_\Delta$  selbst. Die kopplungsbedingte Differenz  $\frac{K_{T\Delta}^2}{K_T}$  zwischen  $\beta_2$  und  $K_\Delta$  ist Substanz-spezifisch. Bei jedem Farbstoff hat der  $T_1$ -Zustand eine andere energetische Lage und damit gegenüber  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff einen anderen ener-

getischen Abstand. Somit ergibt sich je nach Farbstoff und dessen Konzentration [Quenchen von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff durch den Sensibilisator,  $k_{\Delta P}N_P$  in Gl. (2.8)] und u.U. je nach Meßmethode ein anderer Wert für die vermeintliche Abklingrate  $K_{\Delta}$ , die in Wahrheit nach dem hier beschriebenen Modell  $\beta_2$  ist. Noch komplizierter wird die Situation bei indirekten Nachweismethoden, wo zusätzlich beigemengte Indikatorsubstanzen durch weitere mögliche Kopplungen oder  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Verbrauch  $\beta_2$  und  $K_{\Delta}$  weiter gegeneinander verschieben (zu Sauerstoffverbrauch siehe auch Abschnitt 2.6).

Die Erklärung der unterschiedlichen  $^1\Delta_g$ -Lebensdauern in der Literatur durch dieses Modell geht also noch weiter als diejenige in [TGW84], wo zwar auf die Quencherwirkung des Farbstoffs selbst im Sinne eines  $k_{\Delta P}$  eingegangen wird, aber noch keine Kopplung über  $k_{T\Delta}$  und  $k_{\Delta T}$  besprochen wird.

#### 4. Variation der Farbstoffkonzentration $N_P$

Bestimmung von  $K_{\Delta}^*$  und  $k_{\Delta P}$ .

Wählt man eine konstante, genügend hohe Sauerstoffkonzentration im Sinne des Grenzfalles 3 und variiert die Farbstoffkonzentration  $N_P$  ohne Quencher, so kann man  $K_{\Delta}^*$  als Achsenabschnitt von  $\beta_2$  über  $N_P$  bestimmen, da zusammen mit  $N_P$  auch  $\frac{K_{T\Delta}^2}{K_T}$  wegen  $K_{T\Delta}^2 \sim N_P$  gegen Null geht, und damit  $\beta_2 \rightarrow K_{\Delta}^*$  (siehe Gl. (2.8) mit  $N_Q = 0$  und Annahme unter 3).

Die Steigung der Funktion  $\beta_2(N_P)$  liefert bei genügend kleinen  $N_P$  den Wert für  $k_{\Delta P}$  [und nicht  $(k_{\Delta P} + k_{\Delta T})$ ]. Dies ist auf den ersten Blick nicht einsichtig und muß im Detail aus Gl. (2.10) mit  $N_P \rightarrow 0$  berechnet werden.

#### 5. Variation der Quencherkonzentration $N_Q$

Bestimmung von  $k_{\Delta Q}$ .

In Gl. (2.6) geht die Quencherkonzentration  $N_Q$  linear ein. Somit kann man durch Variation von  $N_Q$  über die Messung von  $\beta_2$  (Abklingverhalten) bei konstantem  $N_O$  und  $N_P$  die Größe  $k_{\Delta Q}$  bestimmen aus dem linearen Anstieg von  $\beta_2$  bei geringen Quencherkonzentrationen  $N_Q < 0,25$  mM (siehe Abb. 2.8).

Zusammenfassend kann man sagen, daß sich aus den  $\beta_1$  und  $\beta_2$  unter verschiedenen Meßbedingungen die relevanten Parameter des Modells ermitteln lassen. Alle  $k$ ,  $K$  und  $K^*$  sind durch Fits von  $\beta(N_O)$ ,  $\beta(N_Q)$  und  $\beta(N_P)$  bestimmbar.

In der Praxis besteht jedoch das folgende Problem: Die Größe  $N_P$  bleibt unbekannt, da die Gemischnatur von Photofrin eine genaue Kenntnis von  $N_P$  trotz definierter Beigabe in  $\mu\text{g/ml}$  verwehrt (vgl. 2.4.1). Eine Teilchendichtenangabe von  $N_P$  in mM ist unmöglich, deshalb kann man auch  $k_{\Delta T}$  und  $k_{\Delta P}$  nur in  $[(\mu\text{s}\mu\text{g/ml})^{-1}]$  als effektive Werte mit gemessener Massenkonzentration angeben, nicht jedoch in  $[(\mu\text{s}\text{mM})^{-1}]$ , bezogen auf Teilchendichten wie bei Natriumazid und Sauerstoff.

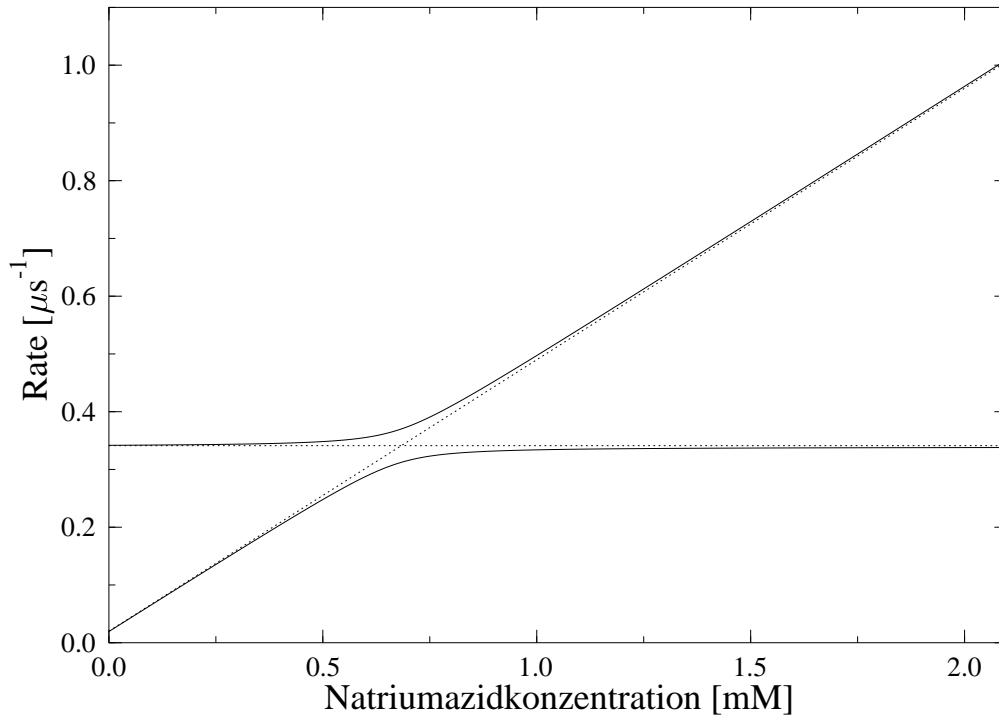


Abb. 2.8: Die meßbaren Raten  $\beta_1$  (obere durchgezogene Linie) und  $\beta_2$  (untere durchgezogene Linie) über der Quencherkonzentration nach Gl. (2.10) mit realistischen Zahlenwerten (vgl. Tab. 4.1) für die eingehenden Parameter. Die gepunkteten Linien bezeichnen  $K_T$  und  $K_\Delta$ .

## 2.6 Erweiterung des Modells um chemisches Quenchen

In Kap. 2.5 wurde das Verhalten von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in Lösungen ausführlich besprochen. Man kann mit dem dargelegten Modell alle Vorgänge beschreiben, bei denen die Gesamtzahl der Sauerstoffmoleküle, also die Summe aus Grundzustands- und angeregtem Sauerstoff, erhalten bleibt.

Sobald  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff aber in zellulärer Umgebung generiert wird, ist dies nicht mehr der Fall. Die Zellinaktivierung durch chemisch-oxidative Reaktion bedeutet zwingend einen Verbrauch an Sauerstoff. Deswegen darf man hier auch nicht stillschweigend annehmen, daß stets  $N_\Delta \ll N_O$  ist. Um auch das modelltheoretisch zu erfassen, muß man nun wieder ausdrücklich zwischen der Sauerstoffmolekülgesamtdichte  $N_O$ , der Dichte  $N_\Sigma$  von Sauerstoff im Grundzustand und der Dichte  $N_\Delta$  von Sauerstoff im  $^1\Delta_g$ -Zustand unterscheiden.

Entsprechend muß man die Gleichungen (2.5) und (2.6) modifizieren und um eine weitere Differentialgleichung erweitern, die die Abnahme der Sauerstoffmolekül-Gesamtdichte beschreibt. Zur Reduzierung der Variablen wird stets

$$N_{\Sigma} = N_O - N_{\Delta}$$

eingesetzt. Man erhält dann folgendes System aus drei gekoppelten linearen Differentialgleichungen:

$$\frac{dN_T}{dt} = - [K_T^* + k_{T\Delta}(N_O - N_{\Delta}) + k_{TQ}N_Q] N_T + k_{\Delta T}N_P N_{\Delta} \quad (2.16)$$

$$\frac{dN_{\Delta}}{dt} = - [K_{\Delta}^* + (k_{\Delta P} + k_{\Delta T})N_P + k_{\Delta Q}N_Q + K_C] N_{\Delta} + k_{T\Delta}(N_O - N_{\Delta})N_T \quad (2.17)$$

$$\frac{dN_O}{dt} = -K_C N_{\Delta} \quad (2.18)$$

Die Größe  $K_C$  in den Gleichungen (2.17) und (2.18) beschreibt die Rate derjenigen angeregten  $^1\Delta_g$ -Moleküle, die dem System durch Reaktion verloren gehen. Sie beschreibt also den Verlust an Sauerstoffmolekülen  $N_O$  insgesamt. Da aber in der Modellvorstellung nur  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff chemisch reagiert, muß  $K_C$  in Gl. (2.18) mit  $N_{\Delta}$  statt mit  $N_O$  multipliziert werden.

Gl. (2.17) läßt sich abgekürzt mit  $K_{\Delta}$  nach Gl. (2.8) schreiben als

$$\frac{dN_{\Delta}}{dt} = - (K_{\Delta} + K_C) N_{\Delta} + k_{T\Delta}(N_O - N_{\Delta})N_T \quad (2.19)$$

Anders als die Gleichungen (2.5) und (2.6) ist dieses System nicht mehr analytisch lösbar. Zieht man aber die Näherungen aus Kap. 2.5 heran, daß unter den gegebenen Meßbedingungen stets  $N_T^0 \ll N_P$  und  $N_{\Delta} \ll N_O$  ist, so wird  $N_{\Sigma} = N_O$ , und Gl. (2.19) vereinfacht sich zu

$$\frac{dN_{\Delta}}{dt} = - (K_{\Delta} + K_C) N_{\Delta} + k_{T\Delta}N_O N_T \quad (2.20)$$

und Gl. (2.16) wird zu Gl. (2.5). Gl. (2.18) wird vernachlässigbar. Man sieht anhand Gl. (2.20), daß in dieser Näherung die chemische Reaktion keinen Einfluß auf die Signalform hat und daß das chemische Quenchen äquivalent zum physikalischen Quenchen nur Einfluß auf die Abklingrate nimmt.  $K_{\Delta}$  erweitert sich durch die chemische Reaktion zu  $K_{\Delta} + K_C$ , ansonsten stimmt Gl. (2.20) mit Gl. (2.6) für den Fall ohne chemische Reaktion überein.

## 3. EXPERIMENTELLER AUFBAU UND MESSPRINZIP

### 3.1 Meßprinzip

Die Anregung eines  ${}^1\Delta_g$ -Zustands geschieht indirekt durch die Anregung eines Farbstoffmoleküls, das seine Energie auf den Sauerstoff überträgt (siehe Kap. 2.1). Aus der Absorption eines Photons durch den Farbstoff erfolgt also bei ein und derselben Messung mit einer gewissen konstanten Wahrscheinlichkeit die Bildung eines  ${}^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Moleküls. Bei einer großen Anzahl von pro Laserpuls absorbierten Photonen bei gleicher Pulsenergie führt dies zu einer statistisch immer gleichen Anfangsbesetzung des  ${}^1\Delta_g$ -Niveaus bei jedem Laserpuls.

Auch wenn der Prozeß der strahlungslosen Relaxation wegen der hohen Lebensdauer strahlender Übergänge fast ausschließlich die Abnahme der Besetzung bestimmt, kann durch die zeitaufgelöste Beobachtung des schwachen spontanen Lumineszenzlichts bei 1270 nm die Lebensdauer des  ${}^1\Delta_g$ -Sauerstoff bestimmt werden (vgl. Kap. 2.2). Die bei einem strahlenden Übergang abgestrahlte Lumineszenzleistung  $P_L(t)$  ist ein Maß für die momentane Besetzung  $N_\Delta(t)$  des angeregten Zustands, da

$$P_L(t) \sim A_{if} \cdot N_\Delta(t) \quad (3.1)$$

ist, mit  $A_{if}$  dem Einstein-Koeffizienten des Übergangs  $(i) \rightarrow (f)$  für spontane Emission. Durch die zeitaufgelöste Beobachtung dieser Lumineszenzleistung nach einem Laserpuls kann man bei Anwendung eines geeigneten Fitprogramms Aufbau- und Abklingraten von  ${}^1\Delta_g$ -Sauerstoff bestimmen.

### 3.2 Schematischer Meßaufbau

Vom Laserstrahl (linear polarisiert) wird ein kleiner Teil über ein Quarzglasplättchen  $P_1$  zu einer schnellen Photodiode  $PD$  ausgekoppelt. Diese liefert das Start-Signal für die Zählerkarte  $ZK$  im Computer  $PC$ . Man muß unbedingt Quarzglas zum Auskoppeln verwenden, da Normalglas bei der hohen Laserleistung eine geringe Fluoreszenz im Infrarotbereich des  ${}^1\Delta_g$ -Sauerstoff zeigt, die dessen Lumineszenz störend überlagert.

Der über ein weiteres Quarzglasplättchen  $P_2$  zur Anregung ausgekoppelte Teil des Laserstrahles besitzt etwa 1% der Intensität des Hauptstrahls und ist auf die



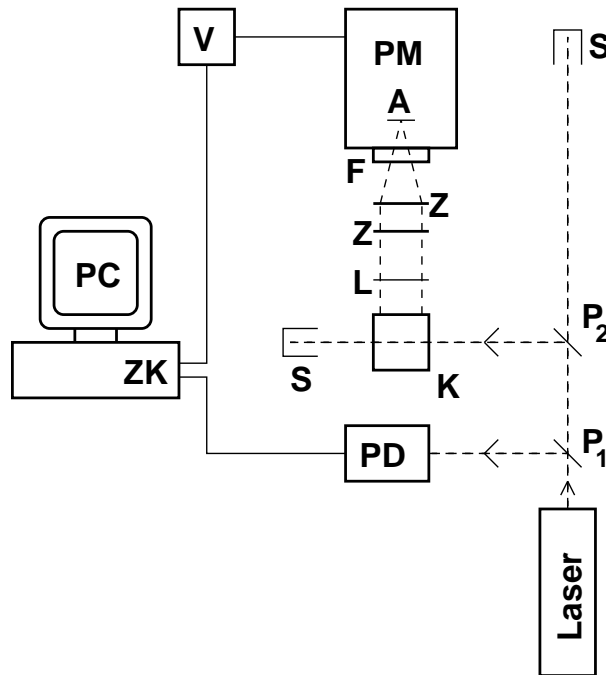


Abb. 3.1: Schematischer Meßaufbau (Aufsicht); Beschreibung siehe Text.

Küvette  $K$  mit der Meßlösung gerichtet. Das hier generierte Lumineszenzlicht wird mittels einer Sammellinse  $L$  und zweier Zylinderlinsen  $Z$  unter 90 Grad zum Anregungsstrahl auf die rechteckige aktive Fläche  $A$  des Photomultipliers  $PM$  abgebildet. Die Filterkombination  $F$  sorgt für die Selektierung der interessierenden Wellenlänge von  $\lambda_{\Delta} = 1270 \text{ nm}$ . Wird ein Lumineszenzphoton detektiert, so liefert der Multiplier über einen Vorverstärker  $V$  das Stop-Signal für die Zählerkarte  $ZK$ , die so den zeitlichen Abstand zum Start-Signal des Triggers (siehe oben) mißt.

Nicht mehr gebrauchte Strahlen werden in den Strahlstoppfern  $S$  abgefangen. Nicht eingezeichnet in Abb. 3.1 sind die Abschirmungen und Lochblenden, die störendes Streulicht des Lasers vom Detektionssystem fernhalten sollen.

Bei den Untersuchungen der Lumineszenz in Abhängigkeit von der Laserpulsenergie war das Plättchen  $P_2$  ersetzt durch einen dielektrischen Spiegel für  $\lambda = 532 \text{ nm}$  (Schott). Der direkt auf die Küvette gerichtete Strahl wurde entsprechend abgeschwächt durch ein im Strahl positioniertes Glan-Taylor-Prisma, mit dem sich durch Drehung die gewünschte Energie einstellen ließ.

### 3.3 Herstellen der Lösungen

Zur Herstellung der Lösungen werden die benötigten Substanzen, also Farbstoff und Quencher, mit einer Analysenwaage (Firma Mettler, Typ H 54 AR) abgewo-

gen und in der passenden Menge an schwerem Wasser gelöst, das mittels eines Mikropipettierers abgemessen wird. Da alle hier benutzten Substanzen in Wasser leicht löslich sind, genügt kurzes Schütteln, um vollständiges Lösen zu gewährleisten. Die so präparierten Lösungen werden mit einer Einmalspritze in die mit Aceton gereinigte Durchflußküvette aus Suprasil - Quarzglas (Firma Hellma, Typ 131-QS) mit quadratischem Querschnitt  $1 \times 1$  cm gespritzt.

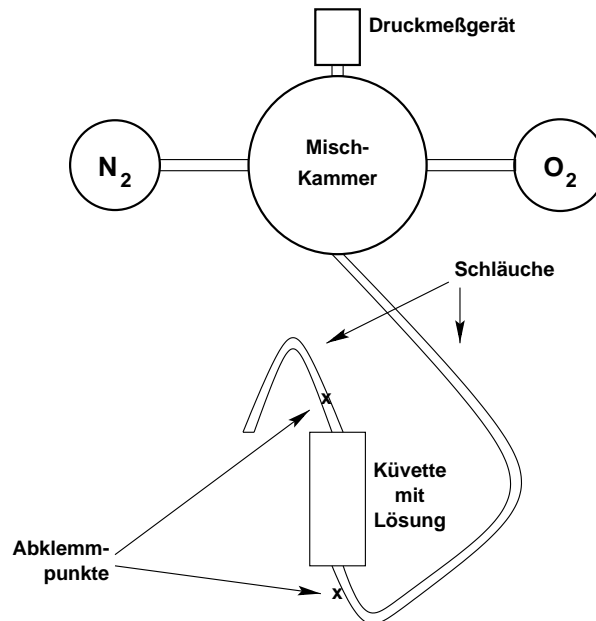


Abb. 3.2: Schematischer Aufbau zur Herstellung der Gasmischung, mit der die Meßlösungen durchflutet werden, um die Sauerstoffkonzentration einzustellen (Ansicht von vorne).

Um die gewünschte Sauerstoffkonzentration in der Lösung zu erreichen, muß zunächst in einer Gasmischkammer aus Stickstoff  $N_2$  und Sauerstoff  $O_2$  (beides Firma Linde, Reinheit 5.0) ein Gemisch mit dem gewünschten Partialdruck an Sauerstoff hergestellt werden. Anschließend wird die Lösung für 10 min mit diesem Gasgemisch durchflutet (siehe Abb. 3.2). Nach dieser Zeit hat sich in etwa derselbe Sauerstoffpartialdruck im schweren Wasser eingestellt, was durch Messen des Sauerstoffgehalts mit einem Sauerstoffkonzentrationsmeßgerät (Firma Presens, Modell Microx I) kontrolliert wird. Das Gerät liefert den Sauerstoffgehalt in [% Luftsättigung], bezogen auf die  $O_2$ -Löslichkeit in normalem Wasser  $H_2O$ , aus dem anhand einer Tabelle [OS83] bei bekannter Temperatur und bekanntem Luftdruck die tatsächliche  $O_2$ -Konzentration in  $\frac{mg}{L}$  und zusammen mit dem Molekulargewicht von Sauerstoff, welches  $M = 32 \frac{g}{Mol}$  beträgt [FR98], in mM bestimmt werden kann.

Eine Lösung ist „luftgesättigt an Sauerstoff“, wenn sie diejenige Konzentration

an Sauerstoff hat, die sich einstellt, wenn sie mit der umgebenden (atmosphärischen) Luft im Gleichgewicht ist, d.h. es herrscht in der Lösung derselbe Partialdampfdruck an Sauerstoff wie Partialdruck in der umgebenden Atmosphäre. Dieser Wert ist temperatur-, druck- und lösungsmittelabhängig. In dieser Arbeit soll die Größe  $N_O^{LS}$  die Luftsättigungsteildichte an Sauerstoff in einer Lösung in schwerem Wasser unter Laborbedingungen [ $T = (23 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,  $p = (963 \pm 5)$  hPa] bezeichnen (vgl. dazu Kap. 2.5 und 4.1).

Die so präparierte Lösung wird in der Küvette durch Abklemmen des Zu- und des Ableitungsschlauches von der umgebenden Atmosphäre getrennt, so daß Diffusion von Sauerstoff zu oder von der Lösung ausgeschlossen wird und die eingestellte Konzentration für die Dauer der Messung erhalten bleibt. Daß dies erfüllt war, wurde durch Nachmessen der Sauerstoffkonzentration nach der Lumineszenzmessung sichergestellt. Dabei zeigte sich, daß die eingestellte Sauerstoffkonzentration auf  $\pm 1\%$  genau erhalten blieb.

### 3.4 Anregung

Zur Anregung des Triplettzustands von Photofrin wird ein mit einem im Resonator befindlichen KDP - Kristall frequenzverdoppelter Nd:YAG - Laser (Firma Solar, Minsk, Weißrußland, Typ LC532 - II) bei der typischen Wellenlänge von 532 nm benutzt. Ein Laserpuls besitzt eine Pulsdauer von 150 ns bei einer variablen Repetitionsrate zwischen 1 und 10 kHz. Die Konversionsrate des Verdopplers ist  $> 99,9\%$  angegeben, so daß eventuell verbleibende Anteile der Fundamentallängewellenlänge bei  $\lambda_F = 1064$  nm durch die Filter vor dem Photomultiplier restlos abgeblockt werden können und die Messung des IR-Signales nicht stören. Der Laser erreicht in Abhängigkeit u.a. von der Repetitionsrate eine maximale mittlere Ausgangsleistung von bis zu  $P_L = 9,6$  W bei einer Repetitionsrate von 6 kHz, was eine Pulsspitzenleistung von  $P_{L,Puls}^{max} \approx 10,7$  kW bedeutet.

Mit einem Glasplättchen wird ein kleiner Teil dieser hohen Leistung ausgekoppelt und zur Anregung des Farbstoffs benutzt. Sofern im Folgenden nicht anders angegeben, wurde typischerweise eine mittlere Leistung von  $P_L = 40$  mW bei einer Repetition von 1,67 kHz zur Anregung verwendet, gemessen direkt vor der Küvette mit einem Leistungsmeßgerät (Firma Ophir, Modell dgx). Dies ergibt eine typische Einzelpulsenergie von  $E = 24 \mu\text{J}$ , was einer Pulsspitzenleistung von  $P_{L,Puls} \approx 45$  W entspricht.

Bei der gewählten Pulswiederholrate von 1,67 kHz liegen jeweils 600  $\mu\text{s}$  zwischen zwei Pulsen. So bleibt genügend Zeit für die angeregten Zustände des Farbstoffs und des Sauerstoffs, um nach einem Puls vollständig abzuklingen bevor der nächste eintrifft. Zwar liegt die Triplettlebensdauer des Farbstoffs bei etwa  $\tau_{T_1} \approx 150 \mu\text{s}$  in wäßriger Lösung, doch wird diese in Gegenwart von Sauerstoff stark verkürzt. Und in sauerstofffreien Lösungen ist die Signalintensität so gering, daß 600  $\mu\text{s}$  auch hier für vollständiges Abklingen reichen (siehe Kap. 4).

Der darauffolgende Laserpuls findet also ein System vor, daß sich vollständig im Grundzustand befindet, und keine Restbesetzungen verbleiben, die das Ergebnis verfälschen würden.

Typischerweise werden bei einer Messung 20 000 - 60 000 Pulse auf die Lösung abgegeben, so daß die Meßdauer für eine Probe bei  $t = 12 - 36$  s liegt.

### 3.5 Detektion des Lumineszenzsignals

Das Lumineszenzsignal des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff ist äußerst schwach und liegt mit einer Wellenlänge von  $\lambda_\Delta = 1\,270$  nm in einem Bereich, der schneller Detektion nur schwer zugänglich ist.

Deshalb kommt in dieser Arbeit ein neuartiger Photomultiplier (Firma Hamamatsu Photonics, Modell R5509-42) zum Einsatz, der hochempfindlich vom sichtbaren Spektralbereich bis hin zu  $\lambda = 1,35$   $\mu\text{m}$  ist und speziell für die Belange des Einzelphotonenzählens konzipiert wurde.

Das Gerät besitzt eine  $3 \times 8$  mm große aktive Fläche, bestehend aus einem Halbleiterschichtsystem aus InP/InGaAsP. Im Betrieb muß der Multiplier mit flüssigem Stickstoff auf eine Temperatur von  $T = -80^\circ\text{C}$  gekühlt werden. Die Quantenausbeute an detektierten Photonen hat bei  $\lambda_\Delta = 1\,270$  nm den Wert  $\Phi \approx 1,1\%$ . Wird ein Photon nachgewiesen, so besitzt das gelieferte Ausgangssignal bei einer Impedanz von  $R = 50$   $\Omega$  eine Anstiegszeit von 2,40 ns, eine Fallzeit von 6,36 ns, eine Pulshöhe von 8,5 mV und eine Pulsbreite von 5 ns. Das Signal-Rausch-Verhältnis beträgt je nach Messung typischerweise bis zu 1:1000.

Zur Selektion der Wellenlänge  $\lambda_\Delta$  sind vor der aktiven Fläche des Multipliers ein Rotglaskantenfilter (Firma Schott, Typ RG1000/2mm) und zwei Interferenzfilter mit  $\lambda_T = 1\,270$  nm (Firma Schott bzw. LOT Oriol) positioniert. Der eine von beiden besitzt eine Halbwertsbreite von 69 nm, der andere 17 nm. Sinn dieser Kombination aus zwei unterschiedlich breiten Interferenzfiltern ist der Ausschluß von Signal, daß durch die niedrigen Nebentransmissionsbanden eines einzelnen Filters gelangen könnte.

### 3.6 Meßwerterfassung

Die vom Photomultiplier gelieferten Pulse werden durch einen schnellen Vorverstärker (Firma Phillips Scientific, Modell 6954-B-50; Anstiegszeit 220 ps) um einen Faktor 50 verstärkt, so daß sie die Schwelle des internen Diskriminators der Vielkanalzählerkarte (Firma FAST ComTec GmbH, Modell P7886 S) überschreiten können.

Hierbei handelt es sich um eine PCI-Bus-Steckkarte, die in einem handelsüblichen PC zum Einsatz kommt. Mindestanforderung ist jedoch ein PII-Prozessor mit wenigstens 64 MB Arbeitsspeicher, um den enormen Datenfluß bei höchster

Zeitauflösung bewältigen zu können. Die mitgelieferte Steuersoftware MCDWIN erfordert Microsoft Windows 98 bzw. Microsoft Windows NT 4.0<sup>1</sup>.

In der Zählerkarte wird der Zeitabstand des Multipliersignals (Stop) zum Triggersignal des Lasers (Start) gemessen und in Zeitkanäle (*bins*) je nach gemessener Zeit hochgezählt. Die minimale Kanalbreite (*binwidth*), d.h. maximale Zeitauflösung des Gerätes beträgt  $t_{min} = 1$  ns, multiplizierbar mit einem Faktor  $2^n$ , wobei  $n = 1 \dots 14$  ist. Die Totzeit zwischen zwei Kanälen ist mit Null angegeben. Multipliziert man die Kanalbreite mit der frei wählbaren Anzahl an Meßkanälen, so erhält man die Länge des beobachteten Meßintervalls. Möchte man beispielsweise die gesamte Zeit zwischen zwei Laserpulsen bei der gewählten Repetition von 1,67 kHz (600  $\mu$ s) mit einer Zeitauflösung von  $2^7$  ns = 128 ns beobachten, so wählt man eine Anzahl von 4687 Kanälen und erhält ein Meßintervall von  $4687 \cdot 128$  ns  $\approx$  600  $\mu$ s.

Die Karte kann pro Startsignal (Laserpuls) genau ein einziges Stoppsignal (Photon) verarbeiten. Da aber aufgrund des schwachen Signals nur etwa alle 10 Pulse mit einem detektierten Photon zu rechnen ist (Erfahrungswert), sind die Voraussetzungen für Einzelphotonenzählen bestens gegeben.

Die über eine vorgegebene Zahl von Meßzyklen (*sweeps*), also Laserpulsen, aufsummierten Kanalinhalt können nach Abschluß der Messung in einem ASCII-File gespeichert und danach weiterverarbeitet werden.

### 3.7 Auswertung

Zur Darstellung und Auswertung der aufgenommenen Meßkurven wird das Programmpaket GLE Version 3.3h (GNU Open Source) unter UNIX/Linux herangezogen. Mit dem in diesem Paket enthaltenen Teilprogramm *fitls* wurde die theoretische Signalverlaufskurve nach Gl. (2.15) gefittet, um an die interessierenden Meßgrößen, nämlich die Signalanstiegs- und Abklingraten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  und die Signalthöhe gemäß Kap. 2.5 zu gelangen. Als Fitfunktion wurde

$$f(t) = A \cdot [\exp(-Bt) - \exp(-Ct)] \quad (3.2)$$

benutzt, so daß die Fitparameter  $B$  und  $C$  die Größen  $\beta_2$  und  $\beta_1$  liefern. Der Fitparameter  $A$  bedeutet nach Gl. (2.15)

$$A \sim \frac{N_T^0 k_{T\Delta} N_O}{\beta_1 - \beta_2} \quad (3.3)$$

In Gl. (3.3) steht das Proportionalitätszeichen, nicht das Gleichheitszeichen, da es unmöglich ist, alle generierten Lumineszenzphotonen meßtechnisch zu erfassen.

<sup>1</sup> Die Bezeichnungen Microsoft, Windows 98 und Windows NT 4.0 sind eingetragene Warenzeichen der Firma Microsoft, Redmond, USA

Gl. (3.3) bedeutet ebenfalls, daß mit

$$A \cdot (C - B) \sim N_T^0 k_{T\Delta} N_O \quad (3.4)$$

eine Fitgröße angegeben werden kann, die proportional zu  $N_T^0$  und somit bei genügend kleinen Anregungsenergien (vgl. Kap. 2.5) proportional zur Anregungsenergie ist.

### 3.8 Schwierigkeiten und Probleme

Das Hauptproblem bei den Lumineszenzmessungen bei  $\lambda_\Delta = 1270$  nm war das Auftreten eines optischen Störsignals in den zeitaufgelösten Kurven bei  $t = 0$  bis ca.  $t = 2 \mu\text{s}$ , manchmal ohne eindeutig erkennbare Gründe auch breiter. Die maximale Höhe des Signals betrug je nach Messung bis hin zur Anzahl der Laserpulse, d.h. jeder Laserpuls trug mit einem Photon zu diesem Störsignal bei. Bei den stark streuenden Zellsuspensionen war das Störsignal stets deutlich stärker als in den wäßrigen Lösungen.

Dieses Störsignal beeinträchtigte die Auswertung des Signalanstiegs. War der Anstieg sehr schnell, d.h. war die Anstiegsrate groß genug (je nach Situation, quasi je nach „Tagesform“ der Meßapparatur und entsprechender Störsignallebreite größer als  $0,5 \mu\text{s}^{-1}$  wie in Abb. 4.5 oder größer als  $1,0 \mu\text{s}^{-1}$  wie in Abb. 4.10), dann verschwand der Anstieg förmlich in dem Störsignal, und seine Rate war nicht mehr bestimmbar. In den Abbildungen 4.1 und 4.2 ist dieses Signal nachträglich entfernt, d.h. abgeschnitten worden.

Durch Versuche mit diversen optischen Filtern an unterschiedlichen Positionen im Meßaufbau konnte die Herkunft des Signals identifiziert werden. Der Ursprung ist das Küvettenmaterial, das bei Laserbestrahlung offenbar sehr schwach im Infraroten fluoresziert. Durch die extrem hohe Empfindlichkeit des Detektors trägt dieses Signal jedoch spürbar zu den Lumineszenzkurven bei.

Während meiner Arbeiten habe ich keine Möglichkeit gefunden, dieses Signal zu vermeiden, und besseres Küvettenmaterial als Suprasil-Quarzglas schien nicht in Sicht. Es konnten keine Datenblätter zu anderen Materialien gefunden werden, die IR-Fluoreszenz im Rahmen unserer Meßempfindlichkeit zuverlässig ausschließen konnten.

Die Breite dieses Signals bewirkte, daß keine sehr kurzen Signalanstiegszeiten bestimmt werden konnten. Lag das Maximum der Lumineszenzkurve bei einer kürzeren Zeit als  $2 \mu\text{s}$  nach dem Laserpuls, so konnte es nicht ermittelt werden. Diese Tatsache sowie Ausläufer der Störung verfälschten die Meßpunkte bei kurzen Anstiegszeiten, d.h. bei großen Anstiegsraten.

## 4. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

### 4.1 Messung der Sauerstoffkonzentration in schwerem Wasser

Nach der in Kap. 3.3 beschriebenen Methode wurde die Luftsättigungskonzentration (LSK) von Sauerstoff in schwerem Wasser ( $D_2O$ ), bezogen auf die entsprechende LSK von Sauerstoff in normalem Wasser ( $H_2O$ ) bestimmt. Die Sauerstofflöslichkeit in  $D_2O$  weicht von der in  $H_2O$  ab, es konnte aber kein expliziter Wert in der Literatur gefunden werden. Jedoch werden für andere Gase wie etwa Kohlendioxid  $CO_2$  typischerweise Werte von  $L_{D_2O} : L_{H_2O} \approx 90\%$  angegeben [LB62].

Immer zu Beginn einer neuen Meßreihe wurde zu Kalibrationszwecken die LSK von  $D_2O$  im Vergleich zu  $H_2O$  bestimmt. In insgesamt 35 Messungen bei leicht verschiedenen Raumtemperaturen ( $22-25^\circ C$ ) und einem Luftdruck von  $(963 \pm 5)$  hPa laut Barometer wurde die Sauerstofflöslichkeit in  $D_2O$  bestimmt zu

$$L_{D_2O}(O_2) = (0,91 \pm 0,01) \cdot L_{H_2O}(O_2) \quad (4.1)$$

und ist somit gut mit der Literaturangabe verträglich. Dieser Wert ist hier nur der Vollständigkeit halber angegeben. Da sich die am Meßgerät angezeigte Sauerstoffkonzentration auf den Löslichkeitswert in  $H_2O$  bezieht, und das benutzte Tabellenwerk den Wert für eben dieses beinhaltet, mußte das Verhältnis der Löslichkeiten nicht verrechnet werden, um dem Absolutwert in [mg/L] bzw. [mM] zu ermitteln.

Für das Modell bedeutet diese Meßmethode, daß der Zahlenwert der LSK

$$N_{O,D_2O}^{LS} = (0,91 \pm 0,01) \cdot N_{O,H_2O}^{LS}$$

ist. Die prinzipiellen Aussagen sind davon nicht betroffen, da die Modellvorstellung an sich unabhängig vom gewählten Lösungsmittel ist.

Im Folgenden soll sich die Angabe „% LS“ beziehen auf den prozentualen Wert der Sauerstoffkonzentration in Lösung, bezogen auf die LSK von Sauerstoff in normalem Wasser  $H_2O$ . Das bedeutet u.a., daß bei einer Sauerstoffkonzentrationsangabe von 91% LS die Lösung weder mit Gas geflutet noch geschüttelt wurde (LSK von  $D_2O$ ). Messungen zeigten auch, daß das Schütteln einer Lösung

zu einer Erhöhung der Sauerstoffkonzentration auf bis zu 115-125% LS führte, je nach Dauer und Intensität des Schüttelns.

Der Umrechnungsfaktor der Sauerstoffkonzentration  $c_O$  bzw.  $N_O$  in [mg/L] oder [mM] ist stark temperatur- und luftdruckabhängig. Bei einer Temperatur von  $T = 23^\circ\text{C}$  und  $p = 963$  hPa entsprechen 100% LS einer Sauerstoffkonzentration von  $c_O = 8,542$  mg/L oder  $N_O = 0,267$  mM Sauerstoff in wäßrigem Milieu [OS83]. Im Folgenden wird die eher ungewöhnliche Einheit % LS weiter verwendet werden, da sie ein anschaulicheres Maß darstellt als die absoluten Mengenangaben.

Gesondertes Augenmerk verdienen die Meßpunkte, die bei Sauerstoffkonzentrationen nahe oder gleich 0% LS gemacht wurden. Diese Meßkurven zeigen eine teils beträchtliche Signalausbeute bei  $\lambda_\Delta = 1270$  nm. Es stellt sich die Frage, woher dieses Signal stammt, wenn kaum oder sogar kein Sauerstoff in der Lösung vorhanden ist.

Zunächst eine Betrachtung, was 0,0% LS bedeutet. Der Sauerstoff wird experimentell durch Fluten der Lösung mit reinem Stickstoff entfernt. Der Sauerstoffpartialdruck in der Lösung gleicht sich dabei durch Ausdiffundieren von Sauerstoff dem Sauerstoffpartialdruck in den Stickstoffbläschen, nämlich  $p_{O_2} = 0$  hPa, an. Eine vollständig Sauerstoff-freie Lösung ließe sich so, wenn überhaupt, nur durch theoretisch unendlich langes Fluten mit Stickstoff erreichen. In der Praxis betragen die höchsten Flutungsdauern etwa  $t = 15$  min. Dann zeigte das Sauerstoffmeßgerät eine Konzentration von 0,0% LS an. Für die Kopplung mit dem Triplet - Zustand von Photofrin, die in Kap. 2.5 beschrieben ist, haben aber bereits geringe Sauerstoffkonzentrationen eine Bedeutung. In der Folge muß man abschätzen, wieviel Sauerstoff bei einer Anzeige von 0,0% LS noch in der Lösung verblieben sein könnte.

Die Genauigkeit der Anzeige des Sauerstoffmeßgerätes ist  $\pm 0,1\%$  LS. Man kann nun zeigen, daß bei den hiesigen Laborbedingungen in 1 ml  $D_2O$  bei 0,1% LS ungefähr  $N_O \approx 1,6 \cdot 10^{14}$  Sauerstoffmoleküle gelöst sind. Dies kann als oberer Grenzwert für die tatsächliche Sauerstoffkonzentration bei der Anzeige 0,0% LS angenommen werden. Bedenkt man nun, daß in einem Laserpuls der Energie  $E = 24 \mu\text{J}$  bei  $\lambda = 532$  nm etwa  $6,4 \cdot 10^{13}$  Photonen enthalten sind (s.o.), also einen Faktor 2,5 weniger als Sauerstoffmoleküle in 1 ml Lösung, so ist es denkbar, daß trotz nominell Sauerstoff-freier Lösung die Sauerstoffkonzentration  $N_O$  und die Anfangskonzentration  $N_T^0$  des Triplet - Zustands von Photofrin in der gleichen Größenordnung liegen. Dies reicht aber dazu aus, daß der  $^1\Delta_g$ -Zustand von Sauerstoff und der  $T_1$ -Zustand der zuständigen Photofrin - Komponente (vgl. Kap. 2.4.1 und 2.5) aneinander koppeln können und das Lumineszenzverhalten beeinflussen.

Es ist bei dieser niedrigen Konzentration an Sauerstoff und der vergleichsweise hohen Signalintensität wahrscheinlich, daß ein Teil der detektierten Lumineszenzphotonen vom Photofrin und nicht vom Sauerstoff stammt. Dies ist denkbar, da das Triplet - Niveau  $T_1$  von Photofrin energetisch ähnlich hoch liegen dürfte wie



das  $^1\Delta_g$ -Niveau von Sauerstoff. Die gute Quantenausbeute an  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff legt dies nahe. Durch die Kopplung nähert sich aber das Abklingverhalten der Besetzung von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff zu niedrigen Sauerstoffkonzentrationen hin mehr und mehr dem des  $T_1$ -Zustands von Photofrin an, so daß dennoch das Abklingverhalten von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff bestimmbar ist.

## 4.2 Variation der Anregungspulsenergie

In Abb. 4.1 ist die Intensität der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz bei Bestrahlung einer typischen Lösung über der Zeit exemplarisch dargestellt. Das Lösungsmittel ist schweres Wasser ( $D_2O$ ), die Konzentration von Photofrin beträgt  $200 \mu\text{g/ml}$ , die Sauerstoffkonzentration beträgt 91% LS. Hier ist kein Quencher zugegeben.

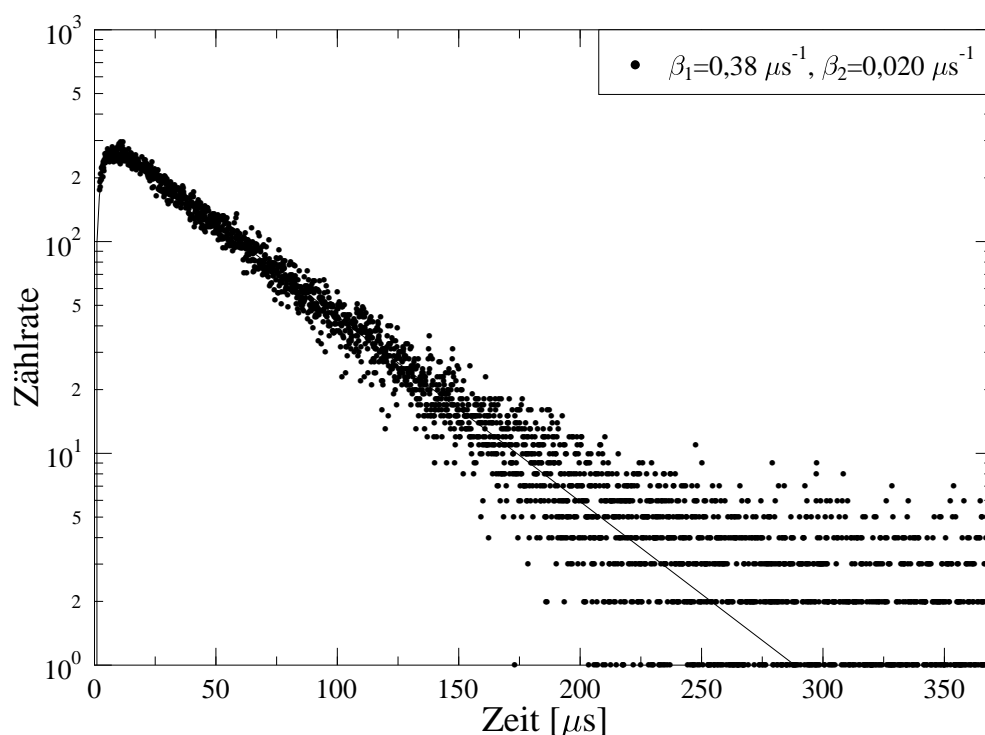


Abb. 4.1:  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenzsignal einer Lösung von Photofrin ( $200 \mu\text{g/ml}$ ) und Sauerstoff (91% LS) in schwerem Wasser  $D_2O$  bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 24 \mu\text{J}$  und 60 000 Anregungspulsen

Zur Bestrahlung wurde eine Laserpulsenergie von  $E = 24 \mu\text{J}$  bei 60 000 Anregungspulsen gewählt. In diesem Beispiel ist die Anregungsenergie gering genug, um unerwünschte Effekte (vgl. Kap. 2.1) zu vermeiden. Mit eingezeichnet ist die Fitkurve gemäß Gl. (3.2) mit den Parametern  $A = 300$ ,  $B = 0,38 \mu\text{s}^{-1}$  und

$C = 0,020 \mu\text{s}^{-1}$ . Nach der theoretischen Vorstellung [Kap. 2.5, Gl. (2.15)] ist  $B = \beta_2$  und  $C = \beta_1$ .

Zur Verdeutlichung des Einflusses der Anregungsenergie auf die Signalform ist in Abb. 4.2 eine Lumineszenzkurve mit  $E = 960 \mu\text{J}$  und nur halb soviel Laserpulsen auf eine identische Lösung dargestellt. Man sieht in Abb. 4.1 deutliche Deformationen im zeitlichen Verlauf, verglichen mit der theoretisch erwarteten Kurve und mit dem Signalverlauf bei  $E = 24 \mu\text{J}$ . Wertet man das Abklingverhalten in Abb. 4.2 bei Zeiten  $t > 60 \mu\text{s}$  aus, so zeigt sich auch hier ein steileres Abklingverhalten als nach Abb. 4.1 erwartet.

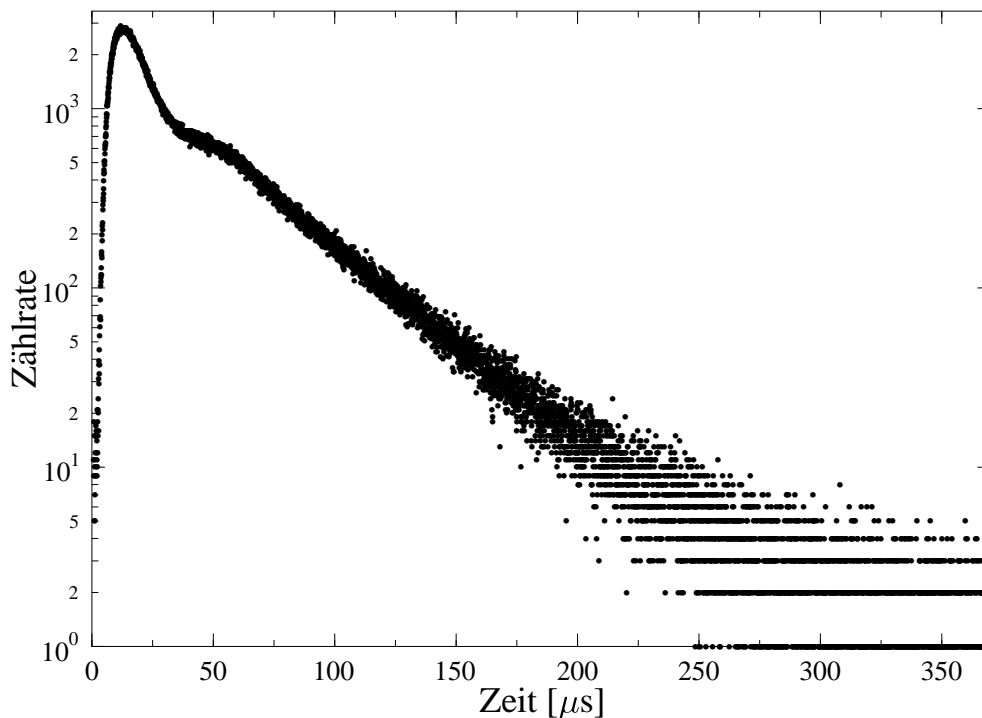


Abb. 4.2: Lumineszenzsignal einer Lösung von Photofrin ( $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Sauerstoff (91% LS) in schwerem Wasser  $\text{D}_2\text{O}$  bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 960 \mu\text{J}$  und 30 000 Anregungspulsen

Man beachte auch, daß die Zählrate im Maximum der Kurve nicht um den Faktor des Quotienten der Anregungsenergien,  $\frac{960 \cdot 30\,000 \text{ Pulse}}{24 \cdot 60\,000 \text{ Pulse}} = 20$ , mitgewachsen ist, wie man es bei linearem Verhalten (siehe unten) erwarten würde. Im Maximum stand eine Zählrate etwa 280 bei  $E = 24 \mu\text{J}$  einer Rate von 3000 bei  $E = 960 \mu\text{J}$  gegenüber, was lediglich das 10,7fache ist und nicht das 20fache wie erwartet.

Derartige Abweichungen der zeitlichen Lumineszenzkurve von der Theorie (man beachte, das Modell nach [PS84] sagt qualitativ den gleichen Kurvenver-

lauf wie Kap. 2.5 voraus, mit  $K_T$  und  $K_\Delta$  anstelle der  $\beta_1$  und  $\beta_2$ , aber ebenfalls proportional zu  $N_0^T$ ) sind auch in der Literatur zu verfolgen, wie z.B. in [OZM99], wo mit 0,5-0,8 mJ Pulsenergie bei  $\lambda = 532$  nm auf Zellghostsuspensionen, also leere Zellhüllen ohne biologischen Inhalt in Wasser, gestrahlt und eine Signalüberhöhung am Anfang der Lumineszenzkurve festgestellt wurde.

Man kann daraus folgern, daß ein „Überpumpen“ des Farbstoffs, also eine Anregung mit zuviel Energie, das Ergebnis im Hinblick auf das zeitliche Verhalten von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff verfälscht. Es ist folglich nicht ratsam, zur „Signalmaximierung“ für eine möglichst hohe Ausbeute an 1270 nm-Lumineszenz mit möglichst viel Energie in die Lösungen zu strahlen. Vielmehr sollte man mit so geringer Energie wie möglich anregen, ohne jedoch dabei eine gewisse Grenzmenge an Lumineszenzlicht zu unterschreiten, um eine sinnvolle Detektierbarkeit der zeitlichen Kurvenform zu gewährleisten. Man muß einen Kompromiß finden zwischen den beiden Randbedingungen. Es gilt zu entscheiden, bei welchen Energien noch sinnvolle Daten bei ausreichender Signalausbeute gewonnen werden können. In Anbetracht der Tatsache, daß zum Einen  $N_\Delta \sim N_T^0$  [Gl. (2.15)] ist und zum Anderen die Anzahl der anregenden Photonen zu jeder Zeit klein gegenüber der Photofrin-„Teilchendichte“ (vgl. Kap. 2.5) ist, erwartet man einen linearen Zusammenhang zwischen der Größe  $A \cdot (C - B) \sim N_T^0$  [Gl. (3.4)] und der Pulsenergie.

Abb. 4.3 zeigt, daß diese Linearität bis zu Energien von  $E \approx 25 \mu\text{J}$  gut gegeben ist. Oberhalb dieser Energie stieg der Wert für  $A \cdot (C - B)$  langsamer an als proportional zu  $N_T^0$ . Die Werte lagen tiefer, als man bei linearem Verhalten erwarten würde. Dies verdeutlicht die eingezeichnete gestrichelte Linie.

Bei Energien  $E > 150 \mu\text{J}$  zeigten die Kurvenformen der gemessenen Lumineszenz schon spürbare Abweichungen von einem Verhalten gemäß Gl. (3.2). Trotzdem wurde bis  $E = 230 \mu\text{J}$  diese Fitfunktion angewandt und die Ergebnisse in Abb. 4.3 eingetragen. Auch bei noch höheren Pulsenergien bis etwa  $E \approx 1$  mJ wurde gemessen, doch ab Energien  $E > 250 \mu\text{J}$  zeigten sich die zeitlichen Lumineszenzkurven derart stark deformiert im Vergleich zu Gl. (3.2), daß ein Fit nach dieser Funktion sinnlos wurde, vgl. Abb. 4.2.

Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Untersuchungen in Lösungen eine feste Pulsenergie von  $E = 24 \mu\text{J}$  gewählt (vgl. Kap. 3.4), zum Einen wegen der einfachen experimentellen Handhabung (Auskoppeln durch Quarzglasplättchen), zum Anderen um in Bezug auf die Verformungen der zeitlichen Lumineszenzkurven auf der sicheren Seite zu sein, zumal sich bei dieser Leistung stets eine ausreichende Signalintensität ergab. Diese Vereinheitlichung sorgt auch für eine Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten.

Ein weiterer wichtiger Grund für die Wahl dieser vergleichsweise geringen Anregungsenergie war das Ausbleichen der Meßlösungen mit Quenchern, insbesondere bei höheren Quencherkonzentrationen. Die Fluoreszenz von Photofrin veränderte sich nach Bestrahlungsdauern über 1 min (entspricht 100 000 Laserpulsen) bei Pulsenergien von  $E > 100 \mu\text{J}$  mit dem Auge deutlich sichtbar sowohl

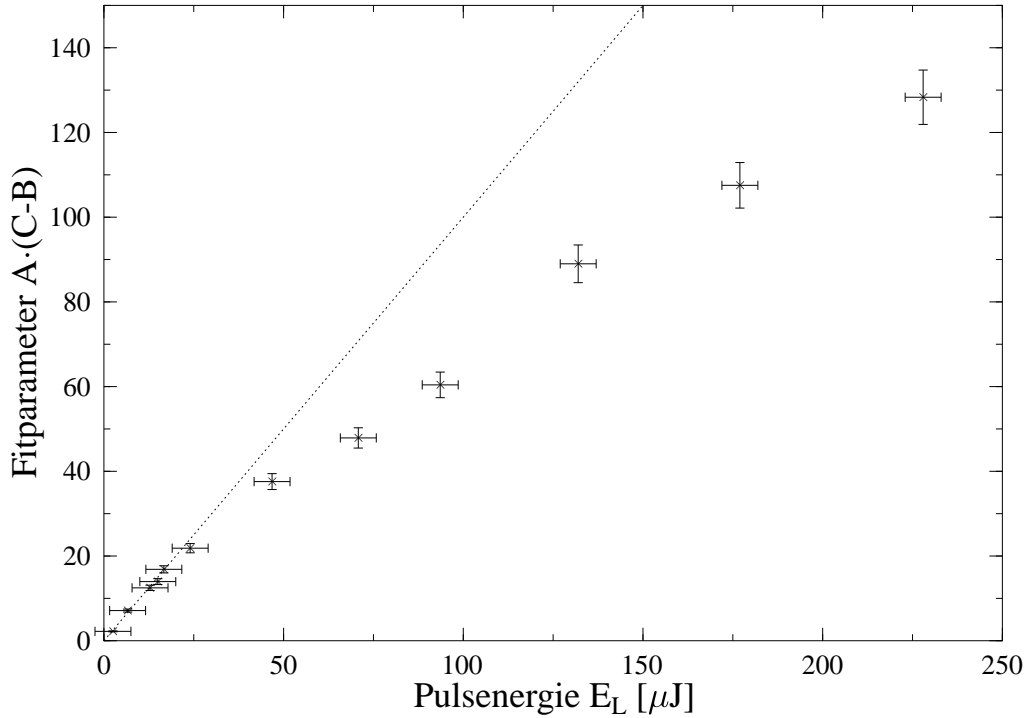


Abb. 4.3: Die Funktion der Fitparameter  $A \cdot (C - B) \sim N_T^0 k_{T\Delta} N_O$  nach Gl. (3.4), gewonnen aus Lösungen von Photofrin ( $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Sauerstoff (91% LS) in  $\text{D}_2\text{O}$ , als Maß für die Signalintensität, aufgetragen über der Laserpulsenergie bei 30 000 Pulsen je Messung. Die Fehler in der Energiemessung sind  $\pm 5 \mu\text{J}$  aufgrund der Schwankungen des Meßgerätes und  $\pm 10\%$  in  $A \cdot (C - B)$ . Die gestrichelte Linie zeigt die lineare Fortführung der Meßpunkte bei  $E_L < 25 \mu\text{J}$ .

in der Helligkeit als auch in der Farbe. Dies legt den Schluß nahe, daß die Laserenergie photochemische Reaktionen zwischen Photofrin, Quencher und möglicherweise auch Sauerstoff induziert, was die Meßbedingungen bezüglich Konzentrationen (Stoffverbrauch) und Zusammensetzung (Reaktionsprodukte, möglicherweise mit Quenchverhalten) gravierend verfälschen kann. Auch diese Vorgänge versucht man durch die geringe Anregungsenergie zu minimieren.

Die einzelnen Meßkurven, aus denen die Daten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  der folgenden Diagramme gewonnen wurden, gleichen qualitativ derjenigen in Abb. 4.1, nur die Parameter  $A$ ,  $B$  und  $C$  unterscheiden sich.

### 4.3 Überblick über die gewonnenen Parameter

In den Meßwertdiagrammen der folgenden Unterabschnitte sind bereits die theoretisch berechneten Kurven mit allen gewonnenen Parametern nach dem Modell (Kap. 2.5) eingezeichnet. Da jedoch nicht alle Parameter aus jeder einzelnen Va-

Parameter	Diese Arbeit	Literaturwert <sup>(a)</sup>
$K_{\Delta}^*$	$(147 \pm 8) \cdot 10^{-4} \mu\text{s}^{-1}$	
$\tau_{\Delta}^* = 1/K_{\Delta}^*$	$(68 \pm 4) \mu\text{s}$	$(61 \pm 8) \mu\text{s}$ (1)
$K_T^*$	$(70 \pm 4) \cdot 10^{-4} \mu\text{s}^{-1}$	
$\tau_T^* = 1/K_T^*$	$(143 \pm 8) \mu\text{s}$	mehrere 100 $\mu\text{s}$ <sup>(b)</sup> (2)
$k_{\Delta P}$	$(2, 5 \pm 0, 1) \cdot 10^{-5} (\mu\text{s } \mu\text{g/ml})^{-1}$	
$k_{\Delta T}$	$(5 \pm 3) \cdot 10^{-5} (\mu\text{s } \mu\text{g/ml})^{-1}$	
$k_{T\Delta}$	$(3, 6 \pm 0, 2) \cdot 10^{-3} (\mu\text{s } [\% \text{ LS}])^{-1}$	
	$= (1, 35 \pm 0, 07) \cdot 10^{-2} (\mu\text{s mM})^{-1}$ <sup>(c)</sup>	
$k_{\Delta Q}^{\text{Natriumazid}}$	$(0, 47 \pm 0, 02) (\mu\text{s mM})^{-1}$	$0, 58 (\mu\text{s mM})^{-1}$ (3)
$k_{TQ}^{\text{Natriumazid}}$	$< 10^{-2} (\mu\text{s mM})^{-1}$	$\ll k_{\Delta Q}^{\text{Natriumazid}}$ (4)
$k_{\Delta Q}^{\text{Mannitol}}$	$< K_{\Delta}^*$ <sup>(d)</sup>	$< K_{\Delta}^*$ <sup>(d)</sup> (5)

Tab. 4.1: Zusammenfassung der aus den Messungen gewonnenen Modellparameter nach Kap. 2.5. Die Größen beziehen sich auf die im Experiment benutzten Substanzen Photofrin in  $\mu\text{g/ml}$ , Quencher in mM, Sauerstoff in % LS bzw. mM und schweres Wasser (Deuteriumoxid,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

<sup>(a)</sup> angegeben, falls eine entsprechende Literaturstelle gefunden wurde.

<sup>(b)</sup> allgemein für Porphyrine (zu denen Photofrin gehört)

<sup>(c)</sup> bei  $T = 23^\circ\text{C}$  und  $p = 963 \text{ hPa}$ , Umrechnung nach [OS83]

<sup>(d)</sup> interpretiert nach der Quencherdefinition Gl. (2.4), siehe Text.

Quellen: (1) [WHR95], (2) [RJ88], (3) [WR95], (4) [B76], (5) [AMB88]

riation der Konzentrationen von Photofrin, Sauerstoff und Quenchern gewonnen werden können, sondern hierzu die Gesamtheit der Messungen ausgewertet werden muß, sind diese Parameter vorwegnehmend in Tab. 4.1 zusammengefaßt. So muß nicht jedesmal explizit Herkunft und Zahlenwert aller Modellgrößen angegeben werden.

Die Werte wurden entsprechend dem in Kap. 2.5 beschriebenen Vorgehen der Variation der Konzentrationen gewonnen. In den folgenden einzelnen Abschnitten wird dann im Detail darauf eingegangen, welche Parameter wie aus der jeweiligen Meßreihe gewonnen wurden. Alle Fitkurven für  $\beta_1$  und  $\beta_2$  sind mit den hier angegebenen, aus den Messungen bestimmten Parametern berechnet. Im Folgenden soll die Herkunft der Fitkurven nicht mehr gesondert beschrieben werden.

Für diejenigen Größen, für die in der Literatur Werte bekannt sind, z.B. die Quencherstärke  $k_{\Delta Q}$  von Natriumazid, sind auch diese zum Vergleich mit aufgeführt. Für die Triplettlebensdauer von Photofrin konnte kein expliziter Wert gefunden werden, nur eine grobe Angabe für Porphyrine im allgemeinen, zu denen Photofrin gehört.

Mannitol zeigte sich nicht als Quencher für  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff. Dies bestätigt die Aussagen der Literatur. Die Angaben in der Tabelle tragen dem Rechnung, interpretiert nach der Definition gemäß Gl. (2.4), die besagt, daß ein Quencher

$^1\Delta_g$ -Sauerstoff deutlich effektiver deaktivieren sollte als das Lösungsmittel, in dem er gelöst ist (hier  $D_2O$ ).

#### 4.4 Variation der Sauerstoffkonzentration

Zur Bestimmung der Triplettabklingrate  $K_T^*$  und der Transferrate  $k_{T\Delta}$  vom Farbstofftriplettzustand zum Sauerstoff wurden mehrere Meßreihen gemacht, in denen die Konzentration von Sauerstoff in einer Lösung von Photofrin (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in  $D_2O$  variiert wurde. Zusätzlich zur Meßreihe in reiner Farbstofflösung wurden Meßreihen mit 0,1 mM, 0,2 mM und 0,4 mM Natriumazid in den Probenlösungen gemacht.

Bei der Messung der Lumineszenzabklingdauer einer quasi Sauerstoff-freien Lösung von Photofrin (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), also 0% LS im Rahmen der Meßgenauigkeit (siehe hierzu auch Kap. 4.1), wurde die Triplettabklingrate von Photofrin gemessen zu  $K_T^* = (70 \pm 4) \cdot 10^{-4} \mu\text{s}^{-1}$ , was einer Triplettlebensdauer von  $\tau_T^* = 1/K_T^* = (143 \pm 8) \mu\text{s}$  entspricht. Dieser Wert paßt insoweit zu den Literaturdaten, als daß in [RJ88] die Triplettlebensdauern von Porphyrinen, zu denen Photofrin gehört, pauschal mit „mehreren hundert  $\mu\text{s}$ “ angegeben sind. Hier hingegen konnte erstmals ein präziser Wert angegeben werden.

Abb. 4.4 zeigt die gemessenen Anstiegs- und Abklingraten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz bei  $\lambda_\Delta = 1\,270 \text{ nm}$ . Man sieht, daß die Meßpunkte im Wesentlichen in guter Übereinstimmung mit den theoretischen Kurven für  $\beta_1$  und  $\beta_2$  sind. Zusätzlich als gestrichelte Linien eingezeichnet sind  $K_T$  und  $K_\Delta$ , die den erwarteten Kurvenverlauf der Raten ohne die Kopplung, also  $K_{T\Delta}^2 = 0$  in Gl. (2.12), symbolisieren. Im Bereich der Aufspaltung bei ca.  $c_O \approx 7\%$  LS sieht man den Unterschied zwischen der theoretischen Beschreibung der Meßpunkte mit und ohne Kopplung. Im kopplungsfreien Fall kommt es nicht zu einer Aufspaltung sondern zu einem Schnitt im Verlauf von  $K_T$  und  $K_\Delta$ . Ohne die Kopplung wäre der Verlauf der Raten bei Variation der Sauerstoffkonzentration nicht erklärbar.

Nicht mehr im Diagramm eingezeichnet sind die Meßwerte für Sauerstoffkonzentrationen bis hin zu 550% LS, da die Anstiegsraten aufgrund eines Störsignals am Beginn der zeitaufgelösten Lumineszenzkurven (siehe Kap. 3.8) nicht bestimmbar waren und die Abklingraten im Rahmen der Fehlerbalken bei dem erwarteten Wert von  $\beta_2 = 0,019 \mu\text{s}$  lagen.

Aus dieser Meßreihe wurde  $k_{T\Delta}$  aus der Steigung der Meßwerte  $\beta_1$  bestimmt zu  $k_{T\Delta} = (3,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-4} (\mu\text{s} [\% \text{ LS}])^{-1}$ .  $k_{\Delta T}$  wurde durch Fit der Funktion nach Gl. (2.10) an die Meßwerte mit  $k_{\Delta T}$  als Fitparameter bestimmt zu  $k_{\Delta T} = (5 \pm 3) \cdot 10^{-5} (\mu\text{s} \mu\text{g}/\text{ml})^{-1}$ . Die Triplettabklingrate  $K_T^*$  ergibt sich aus dem Achsenabschnitt der Abklingraten  $\beta_2$  bei einer Sauerstoffkonzentration von 0% LS zu  $K_T^* = (70 \pm 4) \cdot 10^{-4} \mu\text{s}^{-1}$ .

Für den quencherfreien Fall liefert das Modell gemäß Kap. 2.5 eine adäquate

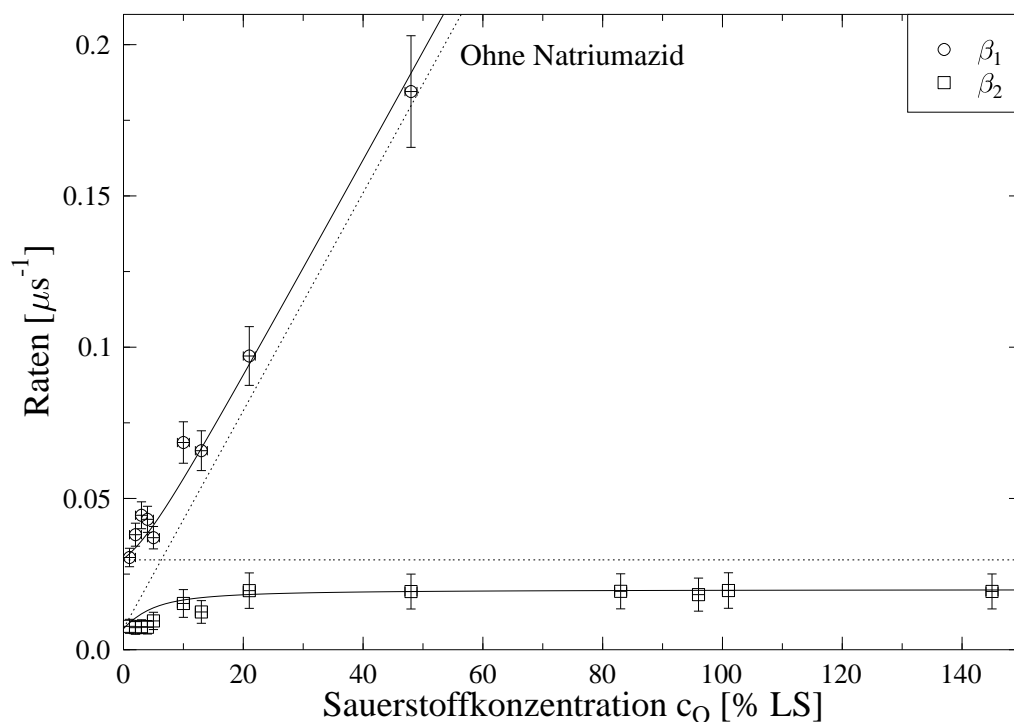


Abb. 4.4: Anstiegs- und Abklingraten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  des Lumineszenzsignals von Lösungen von Photofrin und Sauerstoff ohne Quencherzugabe in schwerem Wasser  $\text{D}_2\text{O}$  in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 24 \mu\text{J}$  und 30 000 Anregungspulsen. Die durchgezogenen Linien zeigen den theoretischen Verlauf der Raten nach Kap. 2.5, die gestrichelten Linien den Verlauf von  $K_T$  und  $K_\Delta$ .

Beschreibung der Meßpunkte. Insbesondere zeigen die Messungen die vorhergesagte Aufspaltung der Kurven für  $\beta_1$  und  $\beta_2$ . Hieraus wurde  $k_{\Delta T}$  bestimmt als Fitparameter, der so gewählt wurde, daß die theoretische Kurve möglichst gut zu den diesen Meßpunkten paßt, ebenso wie zu den Meßpunkten der Darstellungen in den folgenden Unterabschnitten zur Variation der Konzentration von Photofrin und Natriumazid.

Die Aufspaltung wird noch deutlicher, wenn man die Meßreihe mit Zugabe einer konstanten Quencherkonzentration wiederholt, da  $\beta_2$  nach Kap. 2.5 durch Quencherzugabe gemäß Gl. (2.8) und Gl. (2.10) größer wird.

Abb. 4.5 zeigt die Raten unter denselben Meßbedingungen, nur daß hier in den Lösungen Natriumazid in der Konzentration 0,1 mM zugegeben war. Für die Abklingraten  $\beta_2$  liefert das Modell auch in dieser Situation eine gute Beschreibung. Die Meßpunkte liegen auf der errechneten Kurve. Anders sieht es hier jedoch bei den Anstiegsraten  $\beta_1$  aus. Bei geringen Sauerstoffkonzentrationen bis hin zu etwa 40% LS liegen die Raten höher als erwartet. Bei höheren Konzentrationen hin-

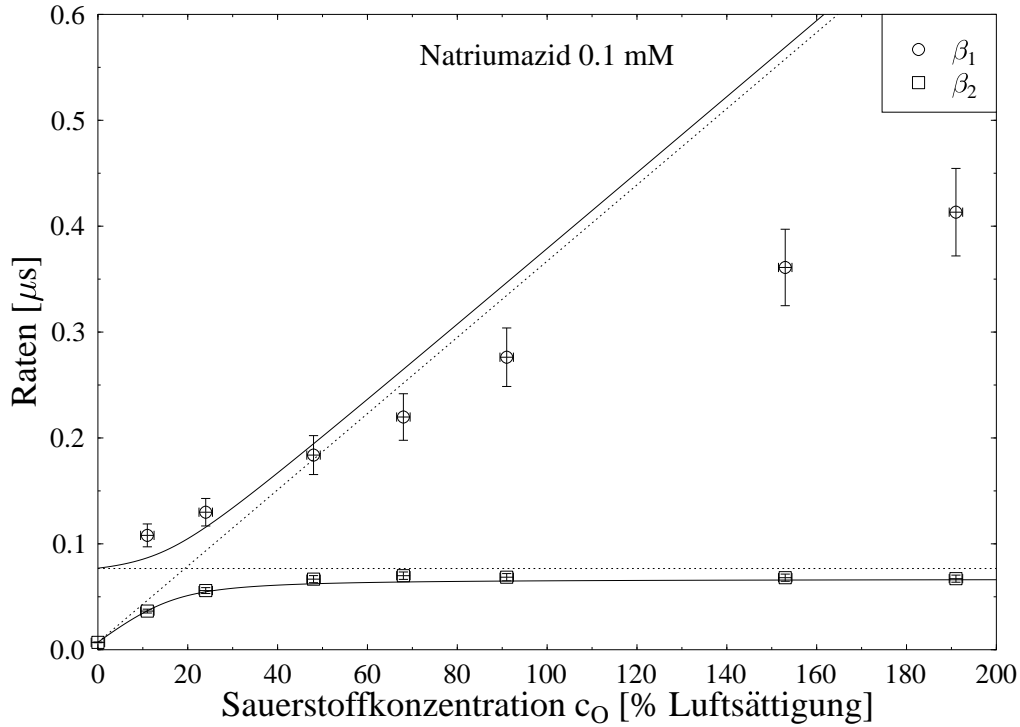


Abb. 4.5: Anstiegs- und Abklingraten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  des Lumineszenzsignals von Lösungen von Photofrin, Sauerstoff und 0,1 mM Natriumazid in schwerem Wasser  $D_2O$  in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 24 \mu\text{J}$  und 30 000 Anregungspulsen. Die durchgezogenen Linien zeigen den theoretischen Verlauf der Raten nach Kap. 2.5, die gestrichelten Linien den Verlauf von  $K_T$  und  $K_\Delta$ .

gegen liegen sie unter den theoretischen Werten und scheinen in eine Sättigung zu laufen. An dieser Stelle sei angemerkt, daß das Störsignal (Kap. 3.8) in dieser Meßreihe bereits Anstiegsraten ab  $0,35 \mu\text{s}^{-1}$  deutlich verfälschte.

Es hat den Anschein, als ob der Quencher den Energieübertrag vom  $T_1$ -Zustand von Photofrin auf den Sauerstoff auf eine Art und Weise beeinflusst, die im verwendeten Modell nicht enthalten ist. Dieser Energieübertrag ist es, der das Anstiegsverhalten ( $\beta_1$ ) der Lumineszenzkurve hauptsächlich bestimmt. Das physikalische Quenchen von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff durch Natriumazid wird korrekt beschrieben, da die berechneten Abklingraten  $\beta_2$  gut mit den entsprechenden Meßwerten übereinstimmen. Noch deutlicher als im quencherfreien Fall (Abb. 4.4) ist hier die Aufspaltung der Meßwerte für die Anstiegs- und Abklingraten bei einer Sauerstoffkonzentration von etwa  $c_O \approx 20\%$  LS zu sehen, was der theoretischen Erwartung (s.o.) entspricht.

Gibt man Natriumazid in der doppelten Konzentration, nämlich 0,2 mM, zu den Lösungen, so zeigt sich ein ähnliches Bild, siehe Abb. 4.6. Die Abklingraten



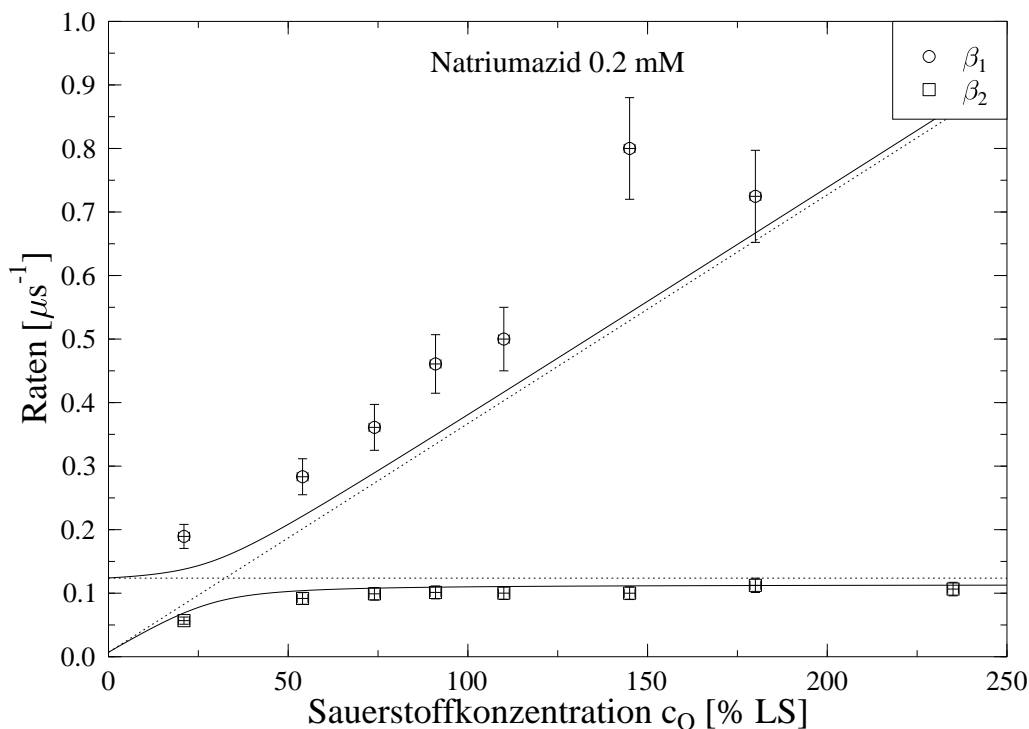


Abb. 4.6: Anstiegs- und Abklingraten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  des Lumineszenzsignals von Lösungen von Photofrin, Sauerstoff und 0,2 mM Natriumazid in schwerem Wasser  $D_2O$  in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 24 \mu J$  und 30 000 Anregungspulsen. Die durchgezogenen Linien zeigen den theoretischen Verlauf der Raten nach Kap. 2.5, die gestrichelten Linien den Verlauf von  $K_T$  und  $K_\Delta$ .

$\beta_2$  passen auch in diesem Fall gut zu der theoretischen Vorhersage, liegen jedoch minimal unter der errechneten Kurve, insbesondere im konstanten Bereich oberhalb 50% LS. Die Anstiegsraten verlaufen nahezu linear ansteigend mit derselben Steigung wie theoretisch erwartet, allerdings um einen konstanten Wert von etwa  $0,08 \mu s^{-1}$  im Mittel zu höheren Raten hin verschoben, was ein Vergleich der Meßpunkte mit der durchgezogenen Linie zeigt. Erneut ist eine Aufspaltung sichtbar, die bei  $c_O \approx 30\%$  LS liegt. Jedoch ist sie größer als theoretisch erwartet.

Erhöht man die Natriumazidkonzentration noch einmal um einen Faktor 2 auf 0,4 mM und wiederholt die Meßreihe, dann verstärkt sich dieses Verhalten. Wie man aus Abb. 4.7 erkennt, liegen die Abklingraten geringfügig tiefer als die theoretische Kurve. Die Verschiebung liegt im Sättigungsbereich oberhalb 100% LS Sauerstoff im Bereich von  $\approx 5\%$  der dortigen Meßwerte.

Die Anstiegsraten aber, soweit sie aufgrund des Störsignals (Kap. 3.8) bestimmbar waren, liegen um etwa  $0,2 \mu s^{-1}$  verschoben deutlich oberhalb der theoretischen Erwartung. Dieser Effekt, die Verschiebung der Anstiegsraten zu höher-

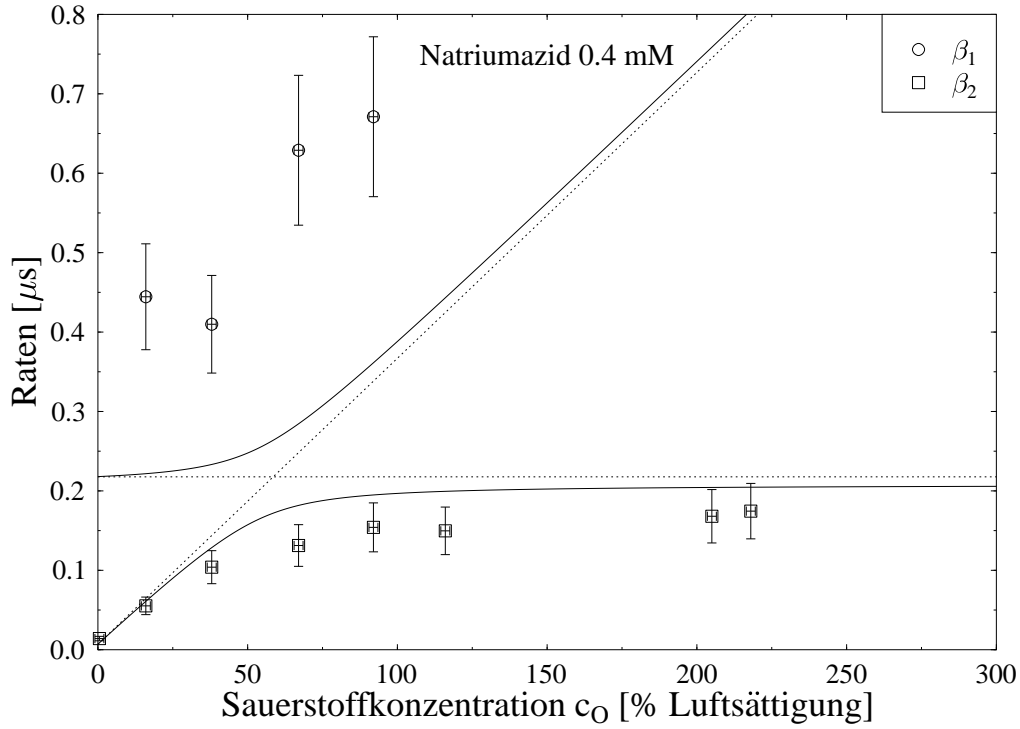


Abb. 4.7: Anstiegs- und Abklingraten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  des Lumineszenzsignals von Lösungen von Photofrin, Sauerstoff und 0,4 mM Natriumazid in schwerem Wasser  $\text{D}_2\text{O}$  in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 24 \mu\text{J}$  und 30 000 Anregungspulsen. Die durchgezogenen Linien zeigen den theoretischen Verlauf der Raten nach Kap. 2.5, die gestrichelten Linien den Verlauf von  $K_T$  und  $K_\Delta$ .

en Werten, ist hier somit deutlich stärker als bei einer Natriumazidkonzentration von 0,2 mM, wo die Verschiebung  $0,08 \mu\text{s}^{-1}$  betrug. Auch hier ist die Aufspaltung deutlich sichtbar, die bei einer Sauerstoffkonzentration von etwa  $c_O \approx 60\%$  LS liegt.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen bei Variation der Sauerstoffkonzentration die Existenz der Kopplung zwischen  $T_1$ -Triplettniveau von Photofrin und  $^1\Delta_g$ -Niveau von Sauerstoff. Bei steigender Natriumazidkonzentration jedoch zeigt sich eine zunehmende Abweichung der gemessenen Anstiegsraten  $\beta_1$  von der Modellvorstellung nach Kap. 2.5. Die Meßwerte  $\beta_2$  für das Abklingverhalten hingegen können bis auf geringfügige Abweichungen gut beschrieben werden.

In quencherfreien Lösungen kann sowohl die Anstiegsrate  $\beta_1$  als auch die Abklingrate  $\beta_2$  hinreichend gut beschrieben werden. Die Ursache der Abweichung der Anstiegsrate  $\beta_1$  bei Zugabe von Natriumazid wird in Kap. 5 diskutiert.

### 4.5 Variation der Photofrinkonzentration

In dieser Meßreihe wurden Lösungen von Photofrin in  $D_2O$  mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen ohne Quencher bei einer gleichbleibenden Sauerstoffkonzentration von  $120 \pm 5\%$  LS auf die Lumineszenz bei  $\lambda_\Delta = 1270$  nm untersucht. Diese Sauerstoffkonzentration ergab sich, da die Lösungen geschüttelt wurden (vgl. Kap. 4.1).

Abb. 4.8 zeigt die gemäß Gl. (3.2) bestimmten Anstiegs- und Abklingraten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  der Lumineszenz in Abhängigkeit von der gewählten Photofrinkonzentration  $c_P$ . Mit eingezeichnet sind die theoretisch berechneten Kurven von  $\beta_1$  und  $\beta_2$  nach Kap. 2.5 als durchgezogene Linien, sowie der Werte von  $K_T$  und  $K_\Delta$  als gestrichelte Linien, die die Situation „ohne Kopplung“, d.h. den hypothetischen Fall  $K_{T\Delta}^2 = 0$  in Gl. (2.12) veranschaulichen.

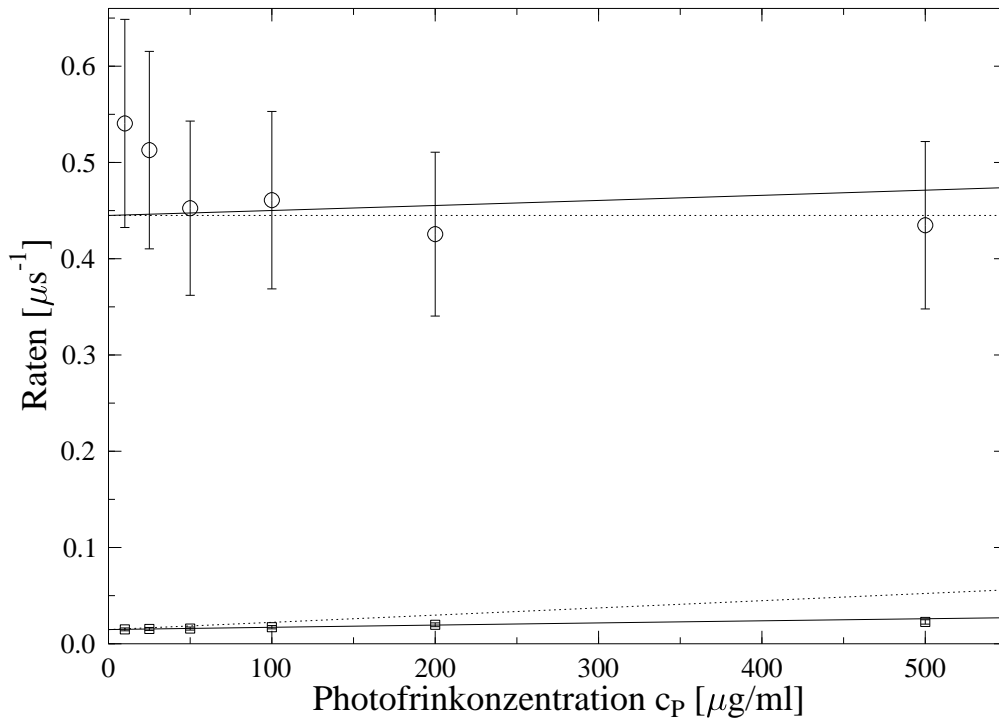


Abb. 4.8: Anstiegs- und Abklingraten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  des Lumineszenzsignals einer Lösung von Photofrin und Sauerstoff ( $120 \pm 5\%$  LS) in schwerem Wasser  $D_2O$  in Abhängigkeit von der Photofrinkonzentration  $c_P$  bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 24 \mu\text{J}$  und 50 000 Anregungspulsen. Die durchgezogenen Linien zeigen den theoretischen Verlauf der Raten nach Kap. 2.5, die gestrichelten Linien den Verlauf von  $K_T$  und  $K_\Delta$ .

Im Rahmen der Fehlerbalken liegen die Anstiegsraten  $\beta_1$  auf der theoretisch erwarteten Kurve, ebenso wie auf der Geraden, die  $K_T$  symbolisiert. Anhand die-

ser Werte ist die Existenz einer Kopplung nicht zu entscheiden. Die Abklingraten  $\beta_2$  jedoch liegen auf der erwarteten Kurve nach Kap. 2.5 und deutlich unterhalb des Verlaufs von  $K_\Delta$ . Abb. 4.9 zeigt diese Meßpunkte noch einmal vergrößert.

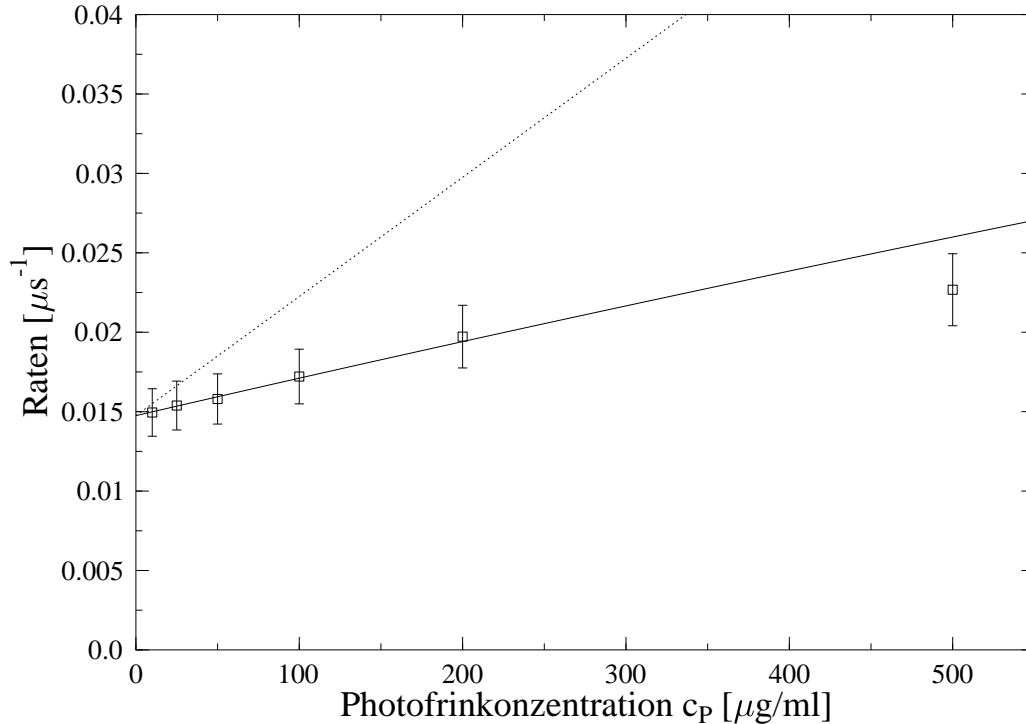


Abb. 4.9: Abklingraten  $\beta_2$  des Lumineszenzsignals einer Lösung von Photofrin und Sauerstoff ( $120 \pm 5\%$  LS) in schwerem Wasser  $\text{D}_2\text{O}$  in Abhängigkeit von der Photofrinkonzentration  $c_P$  bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 24 \mu\text{J}$  und 50 000 Anregungspulsen. Die durchgezogene Linie zeigt den theoretischen Verlauf der Raten nach Kap. 2.5, die gestrichelte Linie den Verlauf von  $K_T$  und  $K_\Delta$ .

Mit den gefundenen Daten läßt sich aus der Steigung der Fitgeraden durch die Abklingraten  $\beta_2$  im näherungsweise linearen Teil der Kurve (Stern-Vollmer-Plot), nämlich zwischen 0 und 200  $\mu\text{g/ml}$  Photofrinkonzentration, nach Kap. 2.5 der Parameter  $k_{\Delta P}$ , also die Ratenkonstante für das Quenchen von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff durch Photofrin, bestimmen zu  $k_{\Delta P} = (2,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-5} (\mu\text{s} \mu\text{g/ml})^{-1}$ .

Der Achsenabschnitt der Fitgeraden bei 0  $\mu\text{g/ml}$  Photofrinkonzentration liefert die Abklingrate von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in purem  $\text{D}_2\text{O}$ , was im Modell durch  $K_\Delta^*$  beschrieben ist. Als Zahlenwert wird hierfür  $K_\Delta^* = (147 \pm 8) \cdot 10^{-4} \mu\text{s}^{-1}$  ermittelt, was einer Lebensdauer von  $\tau_\Delta^* = 1/K_\Delta^* = (68 \pm 4) \mu\text{s}$  für das reine Lösungsmittel  $\text{D}_2\text{O}$  entspricht. Dieser Wert paßt zu den gefundenen Literaturdaten, die im Kompendium [WHR95] von 44 - 70  $\mu\text{s}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  reichen.

Es zeigt sich insgesamt eine gute Übereinstimmung der Vorhersagen des Modells nach Kap. 2.5 mit Zahlenwerten, die der Literatur entnommen wurden.

#### 4.6 Variation der Quencherkonzentration

In dieser Meßreihe wurden Lösungen von Photofrin (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Sauerstoff (91% LS) untersucht, die mit den Quenchern Natriumazid bzw. Mannitol in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt waren.

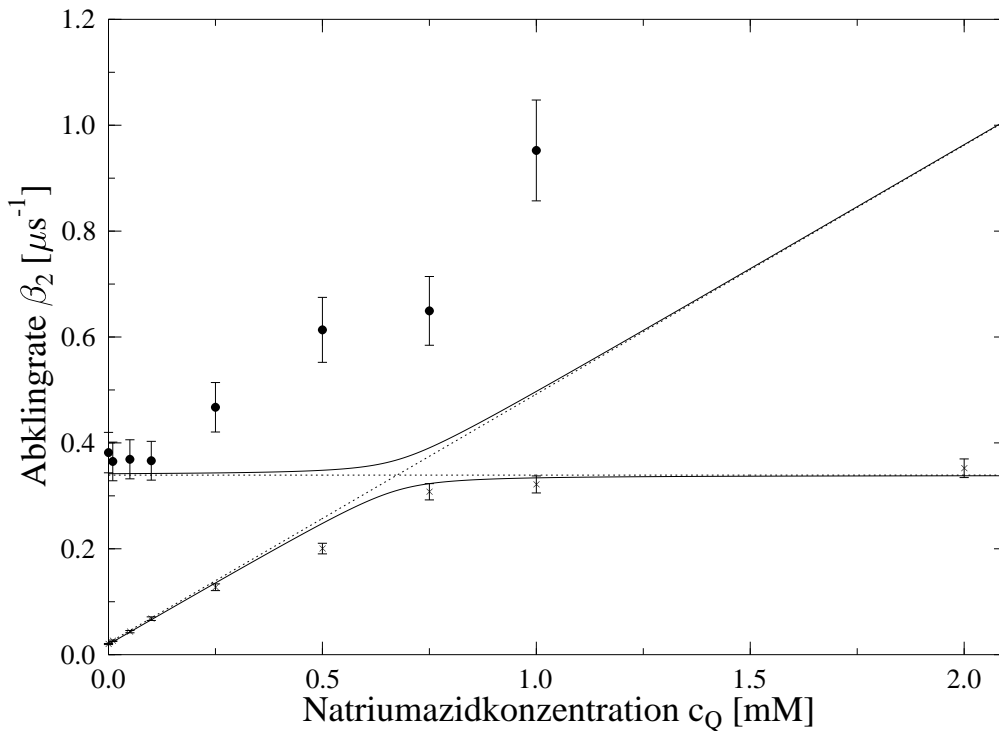


Abb. 4.10: Anstiegs- und Abklingraten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  des Lumineszenzsignals von Lösung von Photofrin (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Sauerstoff (91% LS) mit Natriumazid als Quencher in schwerem Wasser  $\text{D}_2\text{O}$  in Abhängigkeit von der Natriumazidkonzentration  $c_Q \sim N_Q$  bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 24 \mu\text{J}$  und 20 000 Anregungspulsen. Die durchgezogenen Linien zeigen den theoretischen Verlauf der Raten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  nach Kap. 2.5, die gestrichelten Linien den Verlauf von  $K_T$  und  $K_\Delta$ .

Abb. 4.10 zeigt die Lumineszenzanstiegs- und Abfallraten von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff, die in Lösungen von Photofrin, Sauerstoff und Natriumazid in schwerem Wasser  $\text{D}_2\text{O}$  in Abhängigkeit von der Natriumazidkonzentration  $c_Q$  von 0 bis 2 mM bestimmt wurden. Auch hier bedeuten die durchgezogene Linie den nach Kap. 2.5 erwarteten Verlauf der Raten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  und die gestrichelten Linien den Verlauf von  $K_T$  und  $K_\Delta$ .

Es zeigt sich erneut die kopplungsbedingte Aufspaltung der Raten  $\beta_1$  und  $\beta_2$ . Auffällig ist, daß die Abklingraten  $\beta_2$  gut mit der berechneten Kurve übereinstimmen. Hier liefert die Modellvorstellung eine gute Beschreibung der Daten. Nicht so jedoch im Falle der Anstiegsraten  $\beta_1$ , was nach den Erfahrungen aus Kap. 4.4 aber zu erwarten war. Bei Konzentrationen  $c_Q < 0,1$  mM liegen sie noch auf der entsprechenden Kurve, steigen dann jedoch schneller an als theoretisch erwartet. Auf dieses Phänomen soll in der Diskussion der experimentellen Ergebnisse in Lösungen (Kap. 5) näher eingegangen werden.

Nach Gl. (2.7) und (2.10) ist  $\beta_2$  abhängig von der Ratenkonstante  $k_{TQ}$ , mit der der Triplett-Zustand von Photofrin durch Natriumazid gequenchet wird. Ein  $k_{TQ} \neq 0$  würde ein lineares Ansteigen von  $K_T$  bewirken. So kann man durch die Lage der Meßpunkte für  $c_Q > 0,75$  mM einen oberen Grenzwert für  $k_{TQ}$  abschätzen zu  $k_{TQ} = 10^{-2} (\mu\text{s mM})^{-1}$ .

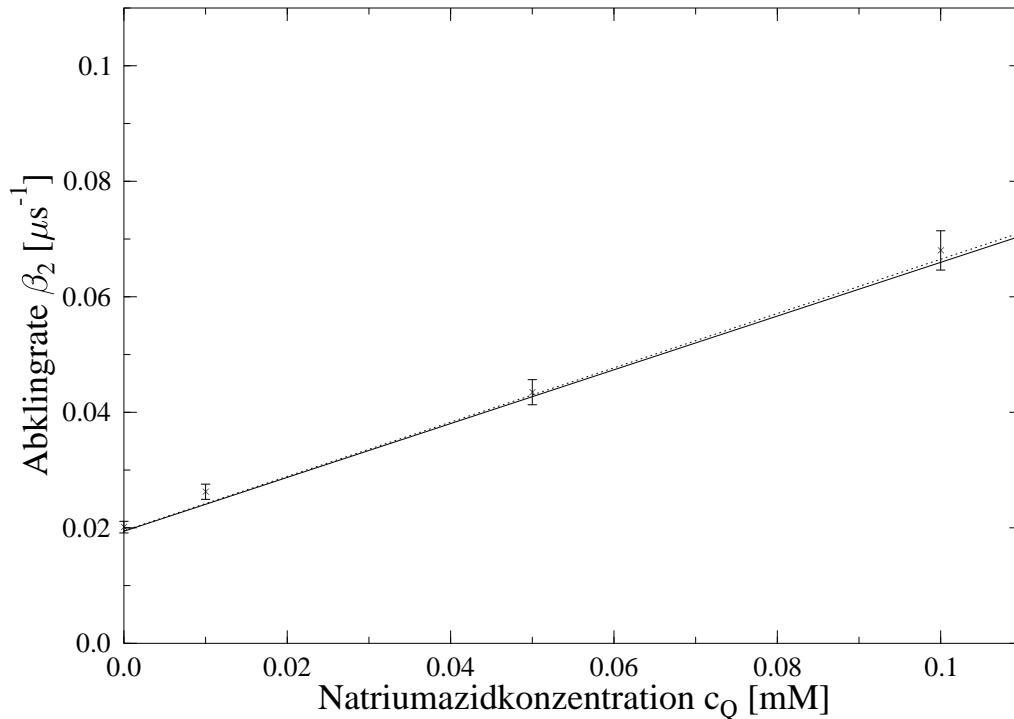


Abb. 4.11: Abklingraten  $\beta_2$  des Lumineszenzsignals von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff von Lösungen von Photofrin (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Sauerstoff (91% LS) mit Natriumazid als Quencher in schwerem Wasser  $\text{D}_2\text{O}$  in Abhängigkeit von der Natriumazidkonzentration  $c_Q \sim N_Q$  bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 24 \mu\text{J}$  und 20 000 Anregungspulsen.

Zur Bestimmung der Quencherratenkonstante  $k_{\Delta Q}$  von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff durch von Natriumazid wurde der lineare Bereich der Abklingraten von 0 bis 0,1 mM Quencherkonzentration herangezogen. Dies zeigt Abb. 4.11, bei der der hierfür

---

interessierende Teil von Abb. 4.10 vergrößert und mit Fitgerade dargestellt ist. Die Steigung dieser Geraden liefert nach der Modellvorstellung (Kap. 2.5) den Zahlenwert für die Quencherratenkonstante,  $k_{\Delta Q} = (0,47 \pm 0,02) (\mu\text{s mM})^{-1}$ .

Wie bereits eingangs erwähnt zeigte eine Zugabe von Mannitol in Konzentrationen  $c_Q$  von 0 bis hin zu 100 mM, also weit höher als bei Natriumazid, keine nennenswerten Veränderungen im zeitlichen Verhalten der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenzkurven bei  $\lambda_{\Delta} = 1270$  nm. Dies stimmt mit der Erwartung nach [AMB88] überein, daß Mannitol kein physikalischer Quencher für  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff ist.

## 5. DISKUSSION UND INTERPRETATION

### 5.1 Vergleich der Meßwerte mit der Theorie

Betrachtet man die Ergebnisse der zeitlichen Lumineszenz von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff mit Photofrin und Quencher in Lösung im Überblick, so sieht man, daß das Modell nach Kap. 2.5 das Abklingverhalten von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff unter Variation aller freien Parameter, d.h. der Konzentrationen von Sauerstoff, Photofrin und Quencher, gut beschreiben kann. Die Existenz einer Kopplung zwischen dem  $T_1$ -Zustand des Farbstoffs und dem  $^1\Delta_g$ -Zustand von Sauerstoff kann nachgewiesen und im quencherfreien Fall theoretisch gut beschrieben werden. Dies stellt die entscheidende Erweiterung des Modells nach [PS84] dar, das ein derartiges Verhalten nicht enthält und somit die Meßdaten nicht beschreiben kann.

Das Anstiegsverhalten kann bei Variation von Sauerstoff- und Photofrinkonzentration gut beschrieben werden. Bei Quencherzugabe tritt jedoch mit steigender Quencherkonzentration eine zunehmende Verschiebung der Anstiegsrate hin zu höheren Werten als erwartet auf. Als Folge ist die Aufspaltung zwischen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  bei Variation der Sauerstoffkonzentration in Gegenwart des Quenchers größer als vom Modell vorhergesagt, und umso größer, je mehr Quencher sich in Lösung befindet.

Nach  $\beta_1 = K_T + \frac{K_T^2 \Delta}{K_T}$  bei  $N_O > N_O^{LS}$  sollte sich der Quencher aber nicht auf die Anstiegsrate auswirken, da die genannte Verschiebung zu höheren Raten nicht im Modell [Gl. (2.11)] enthalten ist, während die gemessenen Abklingraten  $\beta_2$  gut mit dem Modell gemäß  $\beta_2 = K_T - \frac{K_T^2 \Delta}{K_T}$  übereinstimmen.

Da das Abklingverhalten in allen Meßsituationen im Wesentlichen gut beschrieben wird, der Anstieg unter Quencherzugabe aber verkürzt wird, wäre eine Möglichkeit der Deutung, daß die Triplet - Lebensdauer von Photofrin durch den Quencher verkürzt wird. Die Folge davon wäre aber auch, wie die Modellrechnungen zeigen, ein Anstieg der Abklingrate  $\beta_2$  mit  $c_Q$ . Dies wurde nicht beobachtet (siehe Abb. 4.10). Deshalb muß man eine andere Erklärungsmöglichkeit finden, die im bisherigen Modell nicht enthalten ist.

Es wird ein Modell gesucht, bei dem im Bereich  $c_Q > c_{QS}$  die Anstiegsrate  $\beta_1$  vom Quencher verkürzt und die Abklingrate  $\beta_2$  nicht beeinflusst wird. Bisher wurde Photofrin stillschweigend als Reinsubstanz behandelt, was es nicht ist. Es bietet sich also die Hinzunahme einer weiteren Photofrinkomponente an.

Im folgenden Abschnitt wird exemplarisch der Versuch einer Erweiterung um



eine solche zusätzliche Komponente unternommen, um zu zeigen, daß die Hinzunahme einer oder mehrerer weiterer Photofrin-Komponenten in das Modell die Meßergebnisse prinzipiell beschreiben kann. Eine qualitative Beschreibung der Meßwerte ist dadurch gangbar, eine quantitative erweist sich in der Praxis als möglich aber zeitaufwendig.

## 5.2 Exemplarische Erweiterung des Modells

Die erste und einfachste Erweiterung des Modells stellt die Hinzunahme einer zweiten Photofrin-Komponente zu dem bestehenden System dar. Sie verfüge über ein eigenes, von der ersten Photofrin-Komponente leicht abweichendes Singulett-Triplett-System und kann in Energieüberträge mit allen anderen Bestandteilen des Systems verwickelt sein. Man kann zeigen, daß nicht alle möglichen Energieüberträge in diesem System, wie z.B. eine Kopplung der beiden Triplett-Niveaus der beiden Photofrin-Komponenten, nötig sind, um die Meßdaten qualitativ zu beschreiben. Diese Situation ist im Niveauschema in Abb. 5.1 dargestellt.

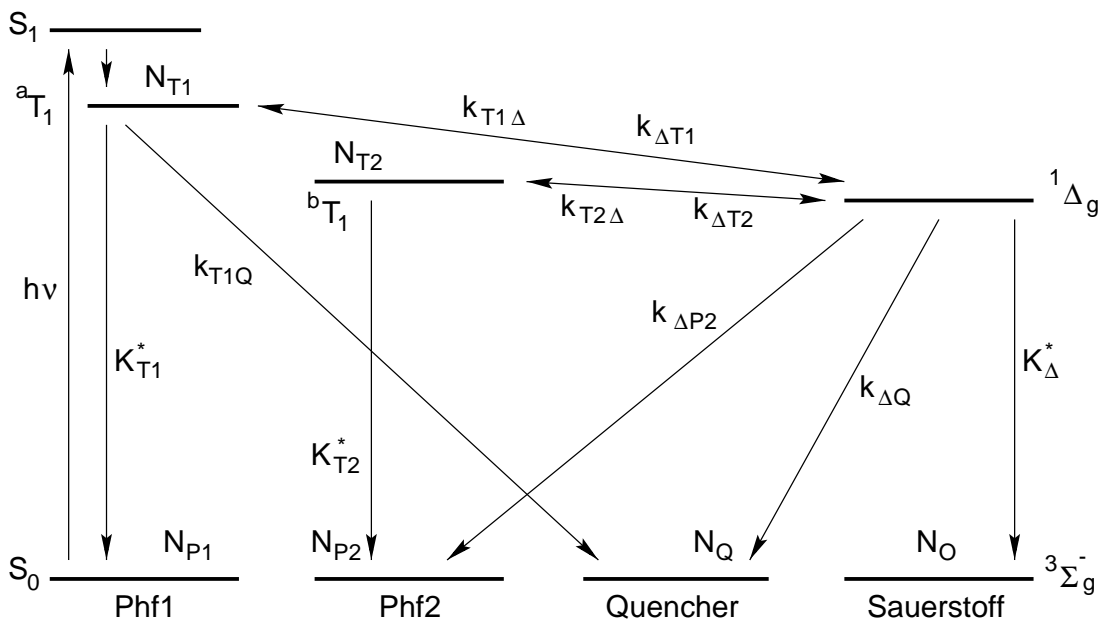


Abb. 5.1: Erweitertes Niveauschema mit zwei verschiedenen Komponenten des Stoffgemischs Photofrin. Beschreibung siehe Text.

Phf1 und Phf2 bezeichnen hier die beiden Komponenten des Photofrin-Gemisches, die an der Erzeugung von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff beteiligt sind, und  $N_{P_1}$  und  $N_{P_2}$  deren Teilchendichten.  $a_{T_1}$  ist hier der erste Triplett-Zustand von Phf1,  $b_{T_1}$  derjenige von Phf2. Die Raten  $K_{T_1}^*$  und  $K_{T_2}^*$  bezeichnen die Eigenrelaxationsraten der beiden  $T_1$ -Zustände analog zu dem bisher bekannten  $K_T^*$ .

Zur Vereinfachung soll allein Phf1 die Anregungsenergie des Lasers absorbieren. Es kann dann seine Triplet - Energie auf den Sauerstoff übertragen. Da die Niveaus  ${}^aT_1$  von Phf1 und  ${}^bT_1$  von Phf2 dem  ${}^1\Delta_g$  - Zustand von Sauerstoff energetisch nahe liegen, können die beiden Triplettniveaus an diesen koppeln, äquivalent zu der Beschreibung in Kap. 2.5. Dies ist durch die entsprechenden Hin- und Rücktransfer - Ratenkonstanten  $k_{T_1\Delta}$  und  $k_{\Delta T_1}$  und  $k_{\Delta T_2}$  und  $k_{T_2\Delta}$  berücksichtigt.  ${}^aT_1$  und  ${}^bT_1$  selbst sollen aber nicht aneinander koppeln. Die Ratenkonstante  $k_{T_1Q}$  beschreibt den Einfluß des Quenchers auf die Photofrin - Komponente Phf1. Die andere Komponente Phf2 soll vom Quencher unbeeinträchtigt sein. Die anderen Größen entsprechen denjenigen in Kap. 2.5.

Man erhält eine weitere Differentialgleichung für die Besetzung des zusätzlichen Triplet - Niveaus  ${}^bT_1$  und zusätzliche Terme in den bestehenden Gleichungen nach Kap. 2.5 und entsprechend eine dritte Rate  $\beta_3$ . Zur Vereinfachung werden folgende Abkürzungen eingeführt:

$$K_{T_1} = K_{T_1}^* + k_{T_1Q}N_Q + k_{T_1\Delta}N_O \quad (5.1)$$

$$K_{T_2} = K_{T_2}^* + k_{T_2\Delta}N_O \quad (5.2)$$

$$K_{\Delta} = K_{\Delta}^* + k_{\Delta T_1}N_{P_1} + k_{\Delta T_2}N_{P_2} + k_{\Delta P_2}N_{P_2} + k_{\Delta Q}N_Q \quad (5.3)$$

Analog zu Kap. 2.5 bedeuten  $K_{T_1}$ ,  $K_{T_2}$  und  $K_{\Delta}$  die Gesamtrelexationsraten der Zustände  ${}^aT_1$  von Phf1,  ${}^bT_1$  von Phf2 und  ${}^1\Delta_g$  von Sauerstoff. Somit erhält man die folgenden drei gekoppelten linearen Differentialgleichungen

$$\frac{dN_{T_1}}{dt} = -K_{T_1}N_{T_1} + k_{\Delta T_1}N_{P_1}N_{\Delta} \quad (5.4)$$

$$\frac{dN_{T_2}}{dt} = -K_{T_2}N_{T_2} + k_{\Delta T_2}N_{P_2}N_{\Delta} \quad (5.5)$$

$$\frac{dN_{\Delta}}{dt} = k_{T_1\Delta}N_O N_{T_1} + k_{T_2\Delta}N_O N_{T_2} - K_{\Delta}N_{\Delta} \quad (5.6)$$

Auch für dieses Gleichungssystem kann man eine analytische Lösung finden. Für  $N_{\Delta}$  ist sie von der Form

$$N_{\Delta} = A_{\Delta}e^{-\beta_1 t} + B_{\Delta}e^{-\beta_2 t} + C_{\Delta}e^{-\beta_3 t} \quad (5.7)$$

Die Größen  $A_\Delta$ ,  $B_\Delta$  und  $C_\Delta$  hierin sind komplizierte Funktionen der eingehenden Parameter und der  $\beta_{1,2,3}$ , die die drei Exponentialfunktionen gegeneinander gewichten. Man sieht insbesondere, daß nun drei Raten  $\beta$  auftreten, von denen im Experiment jedoch nur zwei sichtbar werden, nämlich die Anstiegs- und die Abklingrate der zeitlichen Lumineszenzkurve. Es ist nicht auf den ersten Blick ersichtlich, wie die gemessenen Raten mit den  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  zusammenhängen.

Man kann nun als qualitativen Lösungsvorschlag die verschiedenen Parameter des Modells so wählen, daß sich ein Bild wie in Abb. 5.2 zeigt. Hier ist aufgetragen, wie sich  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  des erweiterten Modells bei Variation der Quencherkonzentration theoretisch verhalten können.

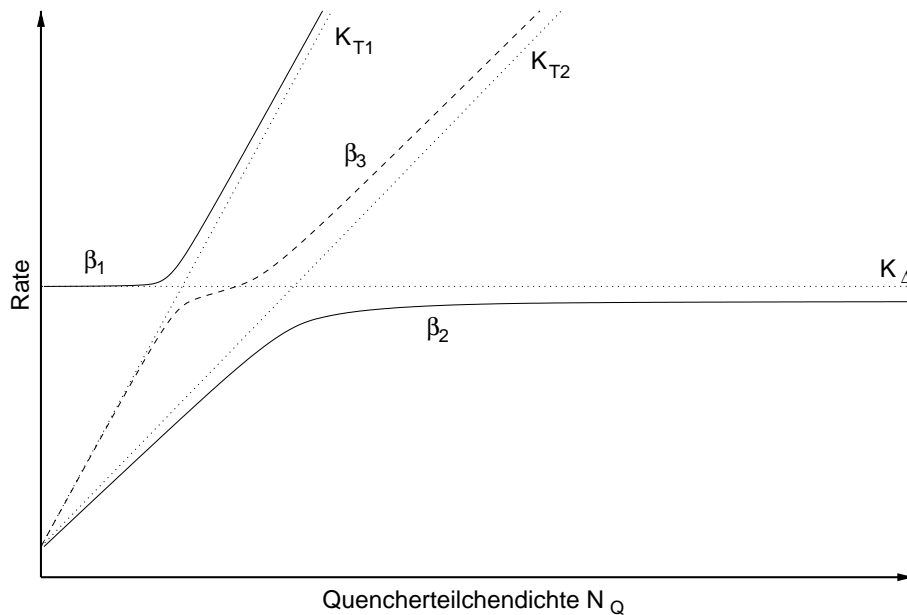


Abb. 5.2: Exemplarischer Graph der Lösungen  $\beta_1(N_Q)$ ,  $\beta_2(N_Q)$  und  $\beta_3(N_Q)$  des erweiterten Modells über der Quencherkonzentration. Erklärung siehe Text.

Man sieht, daß die Lösung für  $\beta_2$  ähnlich verläuft wie diejenige Lösung  $\beta_2^{1K}$  des einfacheren Modells mit einer Komponente, vgl. Abb. 2.7.  $\beta_1$  verläuft bei geringen Quencherkonzentrationen  $N_Q$  wie das Pendant des einfachen Modells  $\beta_1^{1K}$  zunächst konstant über  $N_Q$ , steigt jedoch dann wegen der Kopplung an die zweite Photofrunkomponente Phf2 steiler an, verglichen mit der einfachen Variante des Modells. Dazwischen liegt die u.a. quencherabhängige Lösung für  $\beta_3$ , die zwischen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  verläuft. Man erkennt die doppelte Aufspaltung zwischen  $\beta_1$  und  $\beta_3$  einerseits und  $\beta_2$  und  $\beta_3$  andererseits, bedingt durch die zwei Kopplungen der beiden Triplett-Zustände an den  $^1\Delta_g$ -Zustand des Sauerstoffs. Man kann nun wiederum plausibel annehmen, daß der Anstieg der Meßkurve der zeitlichen Lumineszenz nach Gl. (5.7) bestimmt ist durch das Größte der drei  $\beta$ , und das Abklingverhalten durch das Kleinste.

Das bedeutet also, daß der Anstieg durch  $\beta_1$  bestimmt ist, welches steiler verläuft als  $\beta_1^{1K}$ , konform mit den Meßdaten (siehe Abb. 4.10), und daß das Abklingverhalten durch  $\beta_2$ , daß mit  $\beta_2^{1K}$  nach dieser Betrachtungsweise übereinstimmt. So wird mit diesem erweiterten Modell, welches auf zwei unterschiedlichen Komponenten des Derivats Photofrin basiert, qualitativ erklärbar, weshalb die gemessenen Anstiegsraten über der Quencherkonzentration schneller steigen als nach dem Modell in Kap. 2.5 erwarten. Die dritte Rate  $\beta_3$ , die von der Größe her zwischen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  liegt, würde nach dieser Vorstellung in der Messung nicht sichtbar, was ebenfalls zu den Meßkurven paßt.

Leider ist bei jener Parameterwahl der Vorfaktor  $B_\Delta(\beta_1, \beta_2, \beta_3)$  der Exponentialfunktion, die  $\beta_2$  enthält, so klein, daß diese Rate im Graphen der Funktion nach Gl. (5.7) nicht auftritt sondern nur  $\beta_1$  und  $\beta_3$ . Folglich kann dieser Parametersatz die Meßkurven nicht in allen Abhängigkeiten nicht beschreiben.

Die Wahl der Parameter in diesem Beispiel ist nicht zwingend und soll nur zeigen, daß eine Deutung der Meßdaten mit dem Modell einer weiteren Photofrin-Komponente prinzipiell möglich ist. Es gestaltet sich als zu aufwendig, alle Einzelmessungen dezidiert nach drei  $\beta$ s auszuwerten, wenn man nur zwei davon wirklich bestimmen kann, und zuzuordnen, welche gemessene Rate  $B$  oder  $C$  der Fitfunktion für die Meßkurven nach Gl. (3.2) nun welchem  $\beta$  entspricht. Es erscheint möglich, doch sehr aufwendig, einen geschlossenen Satz an Parametern zu finden, der die Abhängigkeit der zeitlichen Lumineszenz von den Konzentrationen an Quencher, Sauerstoff und Farbstoff beschreiben kann. Jedoch rechtfertigt der Aufwand nicht den möglichen Gewinn, zudem und eben weil nicht alle drei Raten experimentell bestimmt werden können.

Für eine quantitative Beschreibung der Daten müßte man möglicherweise sogar noch weitere Photofrin-Komponenten mit entsprechenden Wechselwirkungen und Kopplungen in Betracht ziehen und in das Ratengleichungssystem einbinden, samt unterschiedlichen Quenchereinfluß auf jede der Komponenten. Man kann damit aber die qualitative Wirkung weiterer Kopplungen aufzeigen.

Setzt man in diesem ersten erweiterten Modell diejenigen Parameter gleich Null, die die Komponente Phf1 involvieren, und nimmt weiterhin an, daß Phf2 durch den Laser angeregt wird, so geht es in das Modell gemäß Kap. 2.5 über, wobei Phf1 dieses Modells zum „Photofrin“ der einfacheren Variante wird.

Weiterhin ist das eben beschriebene erweiterte Modell nur eine erste denkbare Erweiterung von vielen. Photofrin besteht aus wesentlich mehr Komponenten als nur aus zwei. Im Prinzip sind noch erheblich mehr Interaktionen von Komponenten denkbar, von denen vermutlich alle mehr oder weniger Laserenergie absorbieren werden bzw. untereinander Kopplungen eingehen können. Ein ganzes System von Wechselwirkungen, beliebig komplex, scheint möglich, ja wahrscheinlich zu sein. Es ist dabei nicht zu entscheiden, wieviele dieser Interaktionen im Modell zu berücksichtigen sind, um eine passende Beschreibung der Meßwerte zu finden. Eine analytische Lösung dürfte in den seltensten Fällen möglich sein.

Wegen der Komplexität bereits dieses ersten erweiterten Modells, und da

---

es unmöglich scheint, aus einer Einzelmessung die gegeneinander gewichteten Größen  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  durch Fit zu bestimmen, wurden die Messungen durch das einfachere Modell beschrieben und die komplizierteren Varianten hier nur quasi am Rande erwähnt. Immerhin ist Photofrin als Gemisch eher die Ausnahme für einen  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-generierenden Farbstoff. Es wurde vor allem wegen seiner klinischen Bedeutung als bislang einzig zugelassenes Medikament für diese Untersuchungen ausgewählt, nicht wegen besonderer photophysikalischer Eigenschaften. Für eine Reinsubstanz als Sensibilisator dürfte das Modell nach Kap. 2.5 für eine vollständige Beschreibung der Lumineszenzkurven unter verschiedenen Konzentrationsbedingungen genügen, sofern nicht andere Dinge wie beispielsweise chemische Reaktionen ins Spiel kommen, deren Reaktionsprodukte durch Quencherverhalten das Bild verfälschen könnten. Diese Annahme wäre jedoch noch zu beweisen.

Dies alles ist jedoch eine Eigenart von Photofrin als Sensibilisator, nicht von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff als solchem. Bereits die einfachste Version des Modells mit der Annahme von Photofrin als Reinsubstanz liefert eine gute Beschreibung der Vorgänge mit Ausnahme der Anstiegsraten bei Quencherzugabe. Für die Beschreibung des Abklingverhaltens ist eine Verkomplizierung nicht nötig, da es bereits durch eine berücksichtigte Komponente von Photofrin hinreichend beschrieben wird.

## 6. SINGULETT ( $^1\Delta_g$ )-SAUERSTOFF IN LIPIDSUSPENSION

### 6.1 *Das Lipid Phosphatidylcholin in wässriger Suspension*

Der Schritt von der Messung der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz in Lösungen zur Messung dieser Lumineszenz in Zellsuspensionen (siehe Kap. 7) ist immens. Man springt vom einfachsten System zu einem sehr komplexen (siehe Kap. 7.3.3), das auf den ersten Blick zahlreiche unüberschaubare Beiträge zur  $^1\Delta_g$ -Lumineszenz liefert. Zum Verständnis dieses Signals geht man über den Zwischenschritt der Lipidsuspension, da das Grundgerüst der Plasmamembran der Zellen, in der das lipophile Photofrin in diesen Untersuchungen lokalisiert ist, aus einer Lipiddoppelschicht besteht (siehe Kap. 7.3.2 und 7.3.3). Um annäherungsweise Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wählt man aus der Vielzahl möglicher Lipide dasjenige aus, das den Hauptbestandteil der Membran der verwendeten HT-29-Zellen (vgl. Kap. 7.3.1) ausmacht, das Phosphatidylcholin [HLM78]. Abb. 6.1 zeigt die chemische Struktur dieses Lipids.

Das Molekül besitzt zwei lange aliphatische Kohlenwasserstoffketten, die den unpolaren Anteil des Moleküls ausmachen, und eine polare Cholin-Kopfgruppe. Die Länge der aliphatischen Ketten variiert von Molekül zu Molekül typischerweise im Bereich von 12 bis 22. Entsprechend kann man für die molare Masse von Phosphatidylcholin nur einen Mittelwert annehmen, der  $\bar{M} = 768 \frac{\text{g}}{\text{Mol}}$  beträgt [S01]. Die Quencherratenkonstante von Phosphatidylcholin beträgt  $k_L \approx 3 \cdot 10^{-4} (\mu\text{mM})^{-1}$  [KKM83]. Diese Größe soll mit  $k_L$  bezeichnet werden und nicht  $k_{\Delta Q}$ , da in der genannten Literaturstelle nicht geklärt ist, ob es sich dabei um physikalisches oder chemisches Quenchen handelt.

Die Grundstruktur der zellulären Membranen wird gebildet aus zwei Schichten dieser und vergleichbarer Moleküle. In jeder Schicht stehen diese Moleküle eng beisammen, jeweils gleich ausgerichtet nach ihrer Polarität, und die beiden Schichten berühren sich an ihrer unpolaren, d.h. lipophilen Seite. Die polaren Kopfgruppen stehen nach außen [P98]. Dies zeigt Abb. 7.2 auf S. 76.

Das Lipid Phosphatidylcholin ist wasserunlöslich und bildet in  $\text{D}_2\text{O}$  eine Suspension von zahlreichen Partikeln und Tröpfchen mit Größen von wenigen nm bis hin zu wenigen  $\mu\text{m}$  [LRD83]. Lichtmikroskop-Aufnahmen von Suspensionen von 15 mg/ml Phosphatidylcholin in  $\text{D}_2\text{O}$ , hergestellt an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg, bestätigen dies, zumindest bis hin zu Grenze der Auflösung bei ca. 1  $\mu\text{m}$ .

Man darf somit das Lipid nicht als gelösten Bestandteil der Lösung betrach-

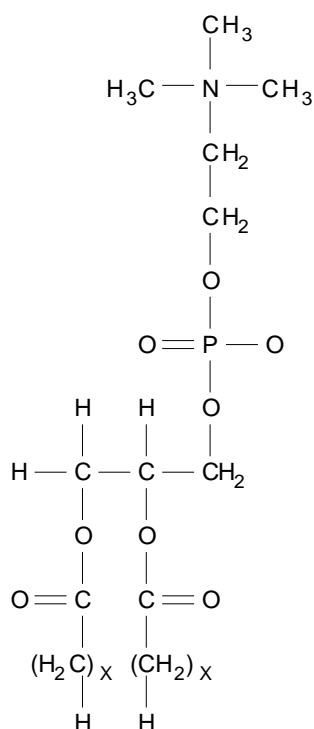


Abb. 6.1: Chemische Struktur des Lipids Phosphatidylcholin [HLM78]. Das x in der Strukturformel hat typischerweise einen Wert von 12 bis 22.

ten. Vielmehr muß man unterscheiden zwischen zwei Phasen der Lösung, in denen unterschiedlich viel Photofrin und Sauerstoff gelöst ist, der Lipidphase und der wäßrigen  $\text{D}_2\text{O}$ -Phase. Deshalb ist das Modell nach Kap. 2.5 hier nicht mehr anwendbar, da sich das Lumineszenzsignal additiv zusammensetzt aus Lumineszenzsignal von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff, der im Lipid zerfällt und solchem, der im  $\text{D}_2\text{O}$  zerfällt.

Wir nehmen an, daß in der Lipidphase und in der wäßrigen Phase voneinander unabhängig über die jeweils dort gelösten Photofrinmoleküle  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff generiert wird. Der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff kann nun in der Phase verweilen, in der er erzeugt wurde, und dort nach Gesetzen, die dem Modell in Kap. 2.5 folgen, deaktiviert werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß  $^1\Delta_g$ -Sauerstoffmoleküle durch Diffusion die Phase, in der sie erzeugt wurden, verlassen und in der jeweils anderen Phase zerfallen. Diese beiden Fälle spielen bei der Beschreibung des Verhaltens der Lumineszenz von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in Lipidsuspensionen eine Rolle, das sich additiv aus der Lumineszenz von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff aus der Lipid- und der  $\text{D}_2\text{O}$ -Phase zusammensetzt.

Desweiteren ist Photofrin lipophil, d.h. daß sich der Farbstoff im Lipid stärker löst als in Wasser. Hierzu nimmt man vereinfachend an, daß sich bei steigender Photofrinzugabe diese Substanz zunächst nur im suspendierten Lipid anreichert,

solange bis die Konzentration  $c_P$  die Löslichkeitsgrenze  $c_P^G$  erreicht, die in der Modellvorstellung und insbesondere in Abb. 6.2 als Teilchenzahldichte  $N_{P,max}^L$  bezeichnet ist. Erst bei weiter steigender Photofrinzugabe geht der Farbstoff in der wäßrigen Phase in Lösung. Dies veranschaulicht die genannte Abb. 6.2. Ein vergleichbares Modell benutzt auch [EAF98].

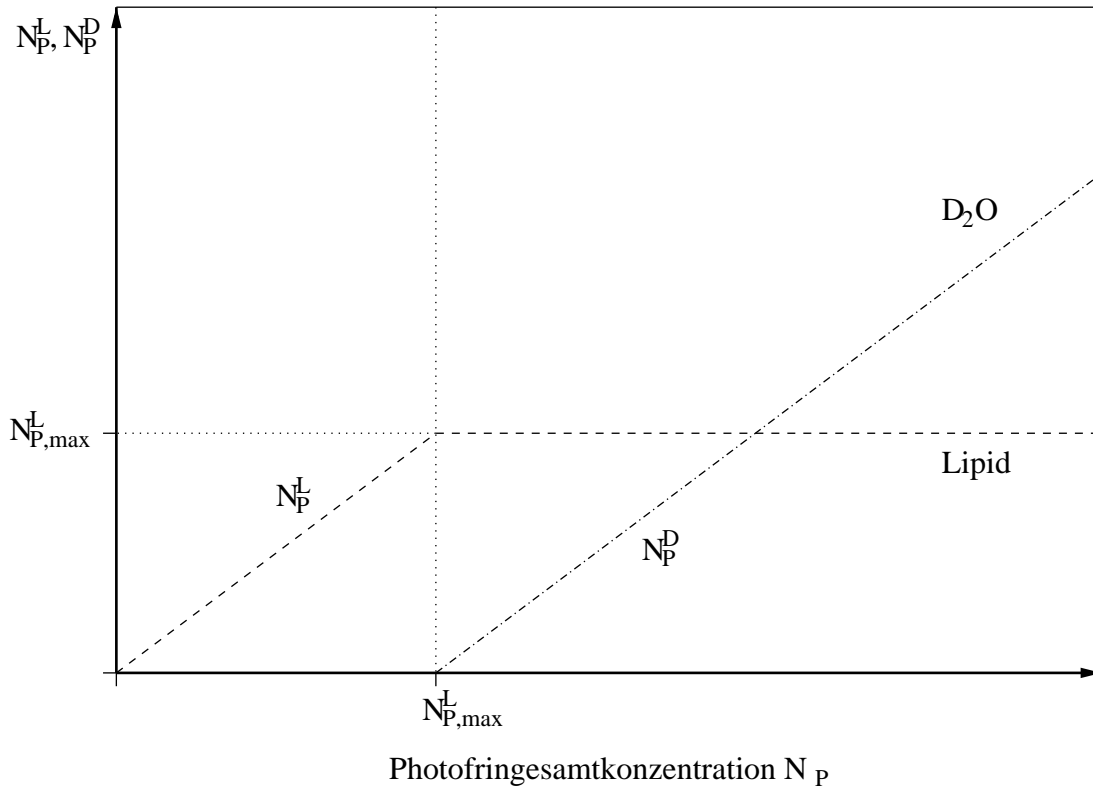


Abb. 6.2: Vereinfachtes Modell der Photofrin-Konzentration in Lipid und schwerem Wasser bei in  $D_2O$  suspendierten Lipidtröpfchen als Funktion der Photofringesamt-Konzentration. Erklärung siehe Text. Die Teilchenzahldichte  $N_{P,max}^L$  entspricht der Grenzkonzentration an Photofrin  $c_P^G$ , die sich maximal im Lipid lösen kann.

Man muß also zwei Fälle unterscheiden. Bei Photofrin-Konzentrationen  $c_P < c_P^G$  wird der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff ausschließlich im Lipid erzeugt. Hier kann er zerfallen oder durch Diffusion in die  $D_2O$ -Phase gelangen. Diese Diffusion ist der einzige Weg, daß  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff ins  $D_2O$  gelangt und dort luminesziert, da alles Photofrin im Lipid sitzt. Erst bei Photofrin-Konzentrationen  $c_P > c_P^G$  wird  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff direkt durch Photofrin in der wäßrigen Phase erzeugt. Prinzipiell ist es jedem  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Molekül möglich, innerhalb seiner Lebensdauer durch Diffusion die Phase beliebig zu wechseln.

Weiterhin nimmt man an, daß sich  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff von Sauerstoff im Grund-



zustand  $^3\Sigma_g^-$  so wenig unterscheidet, daß der osmotische Druck von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff vernachlässigt werden kann und die Bewegungen der Moleküle einfach der Statistik der Brownschen Molekularbewegung folgen.

## 6.2 Lumineszenzmessungen in Lipidsuspensionen

Es wurden Suspensionen des Lipids Phosphatidylcholin in  $D_2O$  hergestellt, denen zusätzlich definierte Mengen an Photofrin beigemischt wurden. Durch kurzes Aufschütteln wurde dafür gesorgt, daß eine für das Auge gleichmäßige Suspension entstand. Das Lipid löst sich jedoch nicht sondern bildet nach Kap. 6.1 verschiedene große Tröpfchen. Die Sauerstoffkonzentrationen konnten mit dem vorhandenen Meßgerät nicht bestimmt werden, da die Meßspitze in Lipid-Umgebung zerstört wird. Keine der Meßproben wurde mit Gas geblubbert, so daß man von der Luftsättigungskonzentration an Sauerstoff ausgehen darf.

Diese Suspensionen wurden wie die Lösungen mit dem Laser bestrahlt und die zeitliche Lumineszenzkurve bei  $\lambda_\Delta = 1270$  nm bestimmt. Als Beispiel hierfür zeigt Abb. 6.3 die Messung der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz in einer Lösung von Photofrin (50  $\mu\text{g/ml}$ ), Phosphatidylcholin (15 mg/ml) und Sauerstoff (luft-gesättigt) in schwerem Wasser  $D_2O$ .

Deutlich erkennbar ist der Knick im zeitlichen Abklingverhalten der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz bei  $t \approx 40$   $\mu\text{s}$ .

Man sieht einen Signalanstieg, der mit einer Rate von  $\beta_1 = 0,3764$   $\mu\text{s}^{-1}$  verläuft. Dies entspricht einer Anstiegszeit von  $\tau_{Anstieg} = 1/\beta_1 = 2,66$   $\mu\text{s}$ . Nach dem Maximum klingt die Lumineszenz zuerst mit einer schnelleren Rate von  $\beta_2^L = 0,091 \pm 0,008$   $\mu\text{s}^{-1}$  ab, was einer Lumineszenzlebensdauer von  $\tau_L = 1/\beta_2^L = (11 \pm 1)$   $\mu\text{s}$  entspricht. In der Literatur wurde ein extrapolierter Wert von  $\tau_L^{\text{lec}} = 12,2$   $\mu\text{s}$  für die Lebensdauer von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in Phosphatidylcholin gefunden [EAF98]. Diesen Anteil des Signals ordnet man deshalb dem  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff aus dem Lipidanteil der Suspension zu. Nachdem dieser schnellere Anteil des Signals abgeklungen ist, macht die Lumineszenzkurve einen Knick und klingt mit einer langsameren Rate von  $\beta_2^D = (0,017 \pm 0,001)$   $\mu\text{s}^{-1}$  ab, was einer Lumineszenzlebensdauer von  $\tau_D = 1/\beta_2^D = (60 \pm 3)$   $\mu\text{s}$  entspricht. Diese Zeit ist etwas kürzer als der Wert, den man mit  $\tau_{\Delta, D_2O} = (68 \pm 4)$  für reines  $D_2O$  erwarten würde, siehe Kap. 4.5. Dies ist vermutlich begründet durch das chemische und physikalische Quenchen von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff durch das Lipid Phosphatidylcholin. Da das Lipid kein gelöster Bestandteil der Suspension ist, handelt es sich hierbei um einen Oberflächeneffekt der Lipidtröpfchen.

Um den theoretischen Kurvenverlauf an die Meßdaten zu fitten, verwendet man die Fitfunktion

$$f(t) = Ae^{-K_T t} + Be^{-\beta_2^L t} + Ce^{-\beta_2^D t} + D \quad (6.1)$$

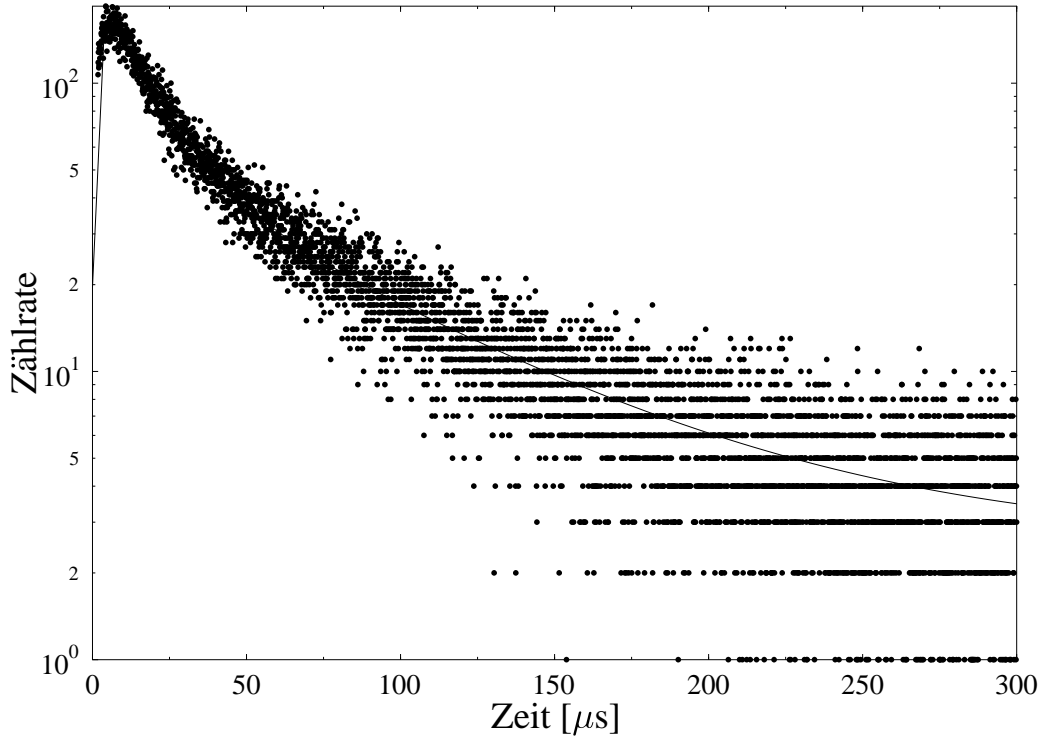


Abb. 6.3:  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenzsignal einer Lösung von Photofrin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Phosphatidylcholin (15  $\text{mg}/\text{ml}$ ) und Sauerstoff (luftgesättigt) in schwerem Wasser  $\text{D}_2\text{O}$  bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 66 \mu\text{J}$  und 20 000 Anregungspulsen.

Die Wahl dieser Funktion begründet sich durch die Form des Gesamtsignals, daß sich additiv zusammensetzt aus zwei monoexponentiellen Kurven gem. Gl. (2.15), je einer aus der Lipid- und der  $\text{D}_2\text{O}$ -Phase. Somit enthält das Lumineszenzsignal aus der Suspension strenggenommen jeweils zwei Anstiegs- und zwei Abklingbeiträge. Die Anstiegsraten für die beiden Signalaufbauten können fittechnisch nicht getrennt werden. Deshalb wird beim Fit nur ein einziges Anstiegsverhalten berücksichtigt durch den Term  $Ae^{-K_T t}$ . Die beiden Abklingzeiten sind mit  $\beta_2^L \approx 11 \mu\text{s}$  und  $\beta_2^D \approx 60 \mu\text{s}$  verschieden genug, um durch den Fitalgorithmus sauber getrennt werden zu können. Deshalb können beide Abklingverhalten berücksichtigt durch die Terme  $Be^{-\beta_2^L t}$  für den Lipidanteil und  $Ce^{-\beta_2^D t}$  für den  $\text{D}_2\text{O}$ -Anteil des Abklingverhaltens. Die Größen  $A$ ,  $B$  und  $C$  sind hierbei Gewichtungsfaktoren dieser Anteile. Insbesondere hängt das Verhältnis von  $B$  zu  $C$  ab von den relativen Volumenanteilen von Phosphatidylcholin gegenüber  $\text{D}_2\text{O}$  ab, durch den Term  $\frac{N_T^O k_{T\Delta} N_O}{\beta_1 - \beta_2}$  in Gl. (2.15) aber auch von  $\beta_1^D$ ,  $\beta_1^L$ ,  $\beta_2^D$  und  $\beta_2^L$ , von den Sauerstoffteilchendichten  $N_O^D$  und  $N_O^L$ , den Photofrinteilchendichten  $N_P^D$  und  $N_P^L$

und den Übertragsraten  $k_{T\Delta}^D$  und  $k_{T\Delta}^L$ . Weiterhin spielt die Diffusion von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff eine Rolle, vor allem im Bereich der Photofrskonzentration  $c_P < c_P^G$ , in dem sich das gesamte Photofrin im Lipid aufhält und nur hier  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff generiert wird, also bei  $N_T^{D0} = 0$ .

Die Fitgröße  $D$  berücksichtigt das mittlere statistische Rauschen und wird nicht weiter verwendet. Für die Verwendung dieser Fitfunktion mußte gewährleistet sein, daß das Meßintervall lang genug war, so daß die Lumineszenz vollständig abgeklungen war, um das mittlere Rauschen sehen und fitten zu können. In den Abbildungen zu Lipidkonzentrationen von 15 und 25 mg/ml sind die genannten Modellparameter nach diesem Verfahren gemäß Gl. (6.1) gewonnen worden. Bei den Messungen an Suspensionen mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Phosphatidylcholin in  $\text{D}_2\text{O}$  wurde wie die lipidfreien Lösungen nach Gl. (3.2) gefittet, da im Wesentlichen stets ein einfach exponentielles Abklingverhalten beobachtet wurde und ein Fit nach Gl. (6.1) keine eindeutigen Ergebnisse für  $B$  lieferte.

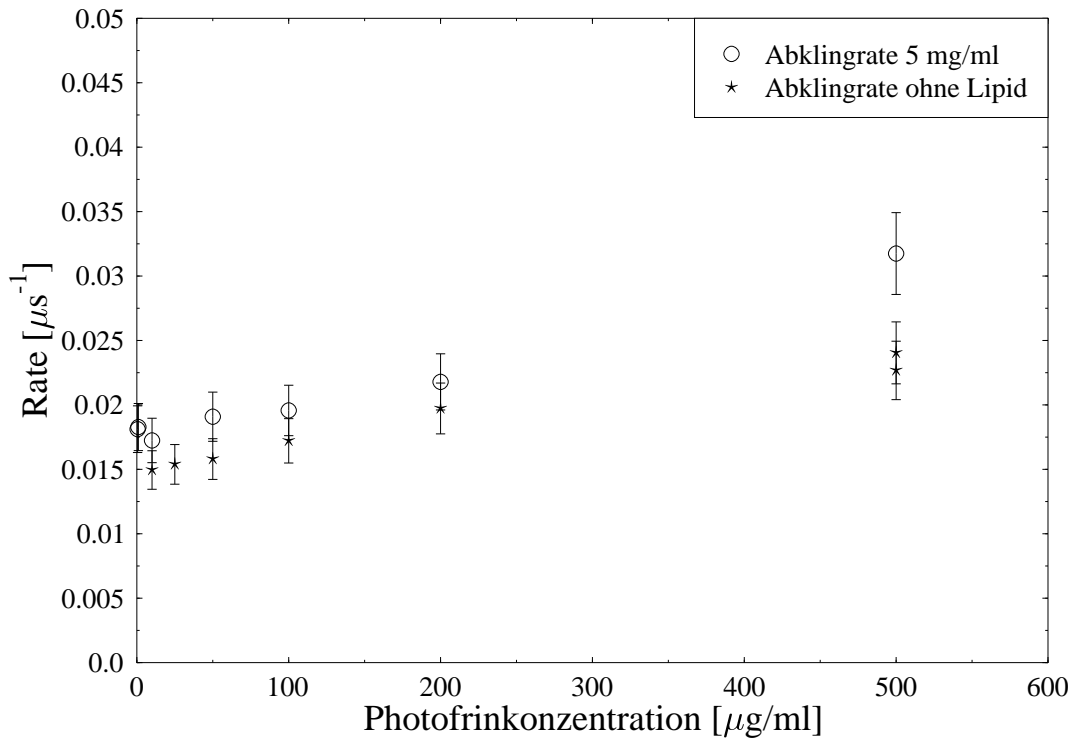


Abb. 6.4: Abklingraten  $\beta_2^D$  des Lumineszenzsignals von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff einer Lösung von Photofrin und Sauerstoff (91% LS) in schwerem Wasser  $\text{D}_2\text{O}$  ohne Lipid und mit Lipid (5 mg/ml) in Abhängigkeit von der Photofrskonzentration  $c_P$  bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 24 \mu\text{J}$  und 20 000 Anregungspulsen

Abb. 6.4 zeigt die Abklingraten  $\beta_2^D$  der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz in Photofrinlösungen in  $\text{D}_2\text{O}$  mit 5 mg/ml Phosphatidylcholin und ohne. In diesen Sus-

pensionen war für Photofrskonzentrationen  $c_P > 50 \mu\text{g/ml}$  nur ein einziges Abklingverhalten zu sehen, mit einem Kurvenverlauf, der sich hervorragend nach Gl. (3.2) fitten ließ. Offenbar ist hier der Signalanteil der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz aus dem Lipid so gering, daß er gegenüber dem erheblich höheren Anteil aus dem  $\text{D}_2\text{O}$  keine Rolle spielt. Lediglich bei den Photofrskonzentrationen  $c_P < 10 \mu\text{g/ml}$  zeigt sich am Anfang der Meßkurve eine Abweichung von der üblichen Signalverlaufskurve nach Gl. (2.15) dergestalt, daß das Kurvenmaximum der Meßpunkte spitzer verläuft als die Kurve nach Gl. (2.15). Man interpretiert das dahingehend, daß bei den höheren Photofrskonzentrationen ein Großteil des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in das  $\text{D}_2\text{O}$  diffundiert und das Lumineszenzsignal von dort dasjenige aus dem Lipid weitgehend überdeckt. Möglicherweise wird bei den höheren Konzentrationen  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff sogar auch im  $\text{D}_2\text{O}$  erzeugt durch im dort befindliches Photofrin, denn die strikte Verteilung des Photofrins nach Abb. 6.2 stellt nur eine Näherung dar. Eine geringe Menge Photofrin dürfte sich bereits im  $\text{D}_2\text{O}$  befinden, wenn das Lipid noch nicht ganz an Farbstoff gesättigt ist. Bei den kleinen Photofrskonzentrationen schließlich wird weniger  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff erzeugt, also ist dadurch die Anzahl der durch Diffusion das Lipid verlassenden  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Moleküle geringer, und es deuten sich Signalverformungen an, die auf einen Signalbeitrag aus dem Lipid schließen lassen.

Es wurde auch versucht, bei Photofrskonzentrationen  $c_P < 1 \mu\text{g/ml}$  in der Suspension zu messen, doch war hier das Lumineszenzsignal zu schwach, als daß man es hätte sinnvoll auswerten können.

Man sieht weiterhin, daß die Abklingraten  $\beta_2^D$  bei Lipidzugabe von  $5 \text{ mg/ml}$  um einen nahezu konstanten Wert von  $\delta K = 2,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{s}^{-1}$  hin zu höheren Raten verschoben sind. Diesen Versatz kann man allgemein durch Quenchen (chemisch und physikalisch) des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff durch das Lipid erklären (vgl. Kap. 2.6). Die entsprechende Quencherrate von Phosphatidylcholin ist dann  $k_L = 4,8 \cdot 10^{-4} (\mu\text{s mg/ml})^{-1}$ . Leider darf man trotz bekanntem Molekulgewicht von Phosphatidylcholin [S01] nicht auf eine Ratenkonstante  $K_C$  in der Einheit  $[(\mu\text{s mM})^{-1}]$  umrechnen. Grund dafür ist, daß das Lipid nicht als Bestandteil einer homogenen Lösung in  $\text{D}_2\text{O}$  aufgefaßt werden kann. Vielmehr spielt die Oberfläche der Tröpfchen eine Rolle, da hier das Quenchen des im  $\text{D}_2\text{O}$  befindlichen  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff stattfindet. Die Gesamtoberfläche aller Tröpfchen wiederum hängt u.a. ab von der Verteilung der Tröpfchengrößen. Man hat also nicht die nötigen Voraussetzungen, um wirklich von einer Ratenkonstante zu sprechen. Man kann lediglich die genannte Rate  $k_L$  angeben, die strenggenommen auch nur für diese Art von Suspension gültig ist und nicht für Phosphatidylcholin im allgemeinen.

Zusätzlich zu den Lösungen und Suspensionen wurden auch trockene Aufstriche von Phosphatidylcholin auf Quarzglasobjektträgern untersucht, das mit der entsprechenden Menge an Photofrin versetzt war. Diese Objektträger wurden anstelle der Küvette für die Meßproben in den Versuchsaufbau eingesetzt. Die Lipidschicht auf den Proben war einige  $100 \mu\text{m}$  dick. Auch hier konnte ein Lumineszenzsignal bei  $\lambda_\Delta = 1270 \text{ nm}$  beobachtet werden. Qualitativ gleichen die

hier gefundenen Meßkurven in ihrem zeitlichen Verlauf denjenigen bei den Lösungen. Auf einen schnellen Anstieg und ein Maximum folgt ein monoexponentielles Abklingen des Lumineszenzsignals. Es wurden Photofrinks Konzentrationen von 10, 20 und 50  $\mu\text{g/ml}$  Photofrin im Lipid untersucht. Die Abklingraten für den Lipidaufstrich liegen bei  $\beta_2^A = (0,091 \pm 0,005) \mu\text{s}^{-1}$ . Dieser Wert ist im untersuchten Bereich von 10 bis 50  $\mu\text{g/ml}$  von der beigegebenen Menge an Photofrin nahezu unabhängig. Er bedeutet somit die Abklingrate von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in reinem Phosphatidylcholin als Lösungsmittel bzw. eine Lumineszenzlebensdauer von  $\tau_L = 1/\beta_2^A = (11,0 \pm 0,4) \mu\text{s}$  von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in Phosphatidylcholin. Er entspricht in etwa dem Literaturwert der Lebensdauer von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in diesem Lipid,  $\tau_\Delta = 12,2 \mu\text{s}$  [EAF98].

Bei Zugabe von 15 und 25  $\text{mg/ml}$  Phosphatidylcholin in  $\text{D}_2\text{O}$  konnten bei den Messungen der Lumineszenz wie exemplarisch in Abb. 6.3 dargestellt jeweils zwei Abklingraten  $\beta_2^L$  und  $\beta_2^D$  bestimmt werden, sowie die Gewichtungsfaktoren  $B$  und  $C$ .

Alle gemessenen Abklingraten  $\beta_2$  der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz in reinem Lösungsmittel, Suspensionen mit Phosphatidylcholin in den Konzentrationen 5, 15 und 25  $\text{mg/ml}$  und im Aufstrich zeigt zusammenfassend Abb. 6.5.

Am höchsten liegen die Lumineszenzraten aus den Suspensionen in  $\text{H}_2\text{O}$  mit etwa  $\beta_2^H \approx 0,13 \mu\text{s}^{-1}$ , dann folgen die Lumineszenzraten, die am Aufstrich gemessen wurden mit  $\beta_2^A \approx 0,091 \mu\text{s}^{-1}$ , und am tiefsten liegen die Werte  $\beta_2$  für das  $\text{D}_2\text{O}$ , zusammen mit den längeren Komponenten des Abklingverhaltens in den Proben mit Phosphatidylcholin in  $\text{D}_2\text{O}$ -Suspension  $\beta_2^D$ , die jeweils bei etwa  $0,018 \mu\text{s}^{-1}$  liegen. Diese Werte sind innerhalb der Fehlergrenzen nahezu gleich. Daraus kann man schließen, daß die langsamer abklingende Komponente in der doppelt exponentiellen Signalkurve der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz aus der wäßrigen Phase der Suspension stammt. Diesen Ausschnitt von Abb. 6.5 zeigt Abb. 6.6. Ab einer Photofrinks Konzentration von ungefähr  $c_P \approx 100 \mu\text{g/ml}$  Photofrin ergibt sich eine näherungsweise lineare Zunahme der  $\beta_2^D$ , die im physikalischen Quenchen von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff durch Photofrin begründet ist.

Bis zu Konzentrationen von 5  $\mu\text{g/ml}$  Photofrin in den Suspensionen mit 15  $\text{mg/ml}$  Phosphatidylcholin sind die schnelleren Abklingraten  $\beta_2^L$  (vgl. Abb. 6.5) innerhalb der Fehlergrenzen gleich den Abklingraten  $\beta_2^A$  der Lumineszenz, die bei den Lipidaufstrichen gemessen wurden. Dies ist ein Indiz dafür, daß dieser Anteil des Lumineszenzsignals aus der Lipid-Phase stammt, also auf  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff hinweist, der im Lipid generiert wurde und auch dort strahlend relaxierte. Bei Konzentrationen über 5  $\mu\text{g/ml}$  in diesen Suspensionen liegen die schnelleren Abklingraten  $\beta_2^L$  tiefer als die Lumineszenzabklingraten  $\beta_2^A$  im Aufstrich und damit auch tiefer als der erwartete Wert von  $\beta_2^L \approx 0,091 \mu\text{s}^{-1}$ .

Dies kann erklärt werden durch eine Rückdiffusion von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in die Lipidphase.  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff, der im Lipid generiert worden ist, kann dieses verlassen, sich eine gewisse Zeit im  $\text{D}_2\text{O}$  aufhalten, wo seine Lebensdauer gegenüber dem Lipid deutlich verlängert ist, und vor seiner Relaxation wieder in das Lipid

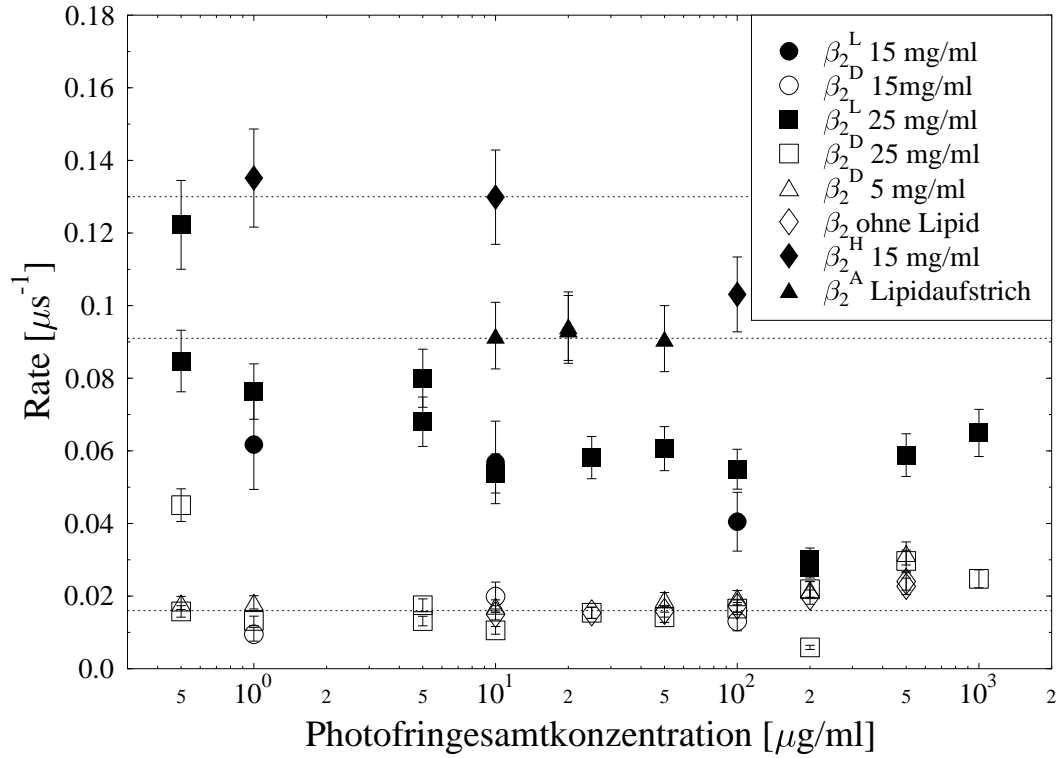


Abb. 6.5: Abklingraten des Lumineszenzsignals einer Lösung von Photofrin und Sauerstoff (91% LS) in Wasser  $\text{H}_2\text{O}$ , schwerem Wasser  $\text{D}_2\text{O}$  ohne Lipid und mit Lipid in Abhängigkeit von der PhotofrinKonzentration  $c_P$  und der Lipidkonzentration bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 66 \mu\text{J}$  und 20 000 Anregungspulsen. Die gestrichelten Linien sind Hilfslinien bei  $0,018 \mu\text{s}$ ,  $0,091 \mu\text{s}$  und  $0,13 \mu\text{s}$ , vgl. Text.

hinein diffundieren, wo er dann zerfällt. Durch seinen „Ausflug“ in das  $\text{D}_2\text{O}$ , wo er nicht nachgewiesen wurde, da er dort nicht zerfallen ist, scheint die lipidbedingte Lebensdauer vergrößert. Insbesondere wird das beschriebene Phänomen immer wichtiger bei höheren PhotofrinKonzentrationen, da hier mehr  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff generiert wird und sich der ins  $\text{D}_2\text{O}$  diffundierte Singulett-Sauerstoff erst einmal lokal in der Nähe der Grenzschicht Lipid- $\text{D}_2\text{O}$  aufhält und dort anreichert. Bei noch weiter steigender PhotofrinKonzentration wird dann auch die Sättigungskonzentration von Photofrin  $c_P^G$  im Lipid (siehe Abb. 6.2) überschritten, und im  $\text{D}_2\text{O}$  selbst wird  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff erzeugt, der seinerseits in die Lipidphase diffundieren kann. Jedoch sorgt die direkte Generierung von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff durch Photofrin im  $\text{D}_2\text{O}$  für eine räumlich homogenere Verteilung von Singulett-Sauerstoff als dessen Diffusion aus dem Lipid heraus.

In  $\text{H}_2\text{O}$  liegen die Raten  $\beta_2^H$  bei 1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  Photofrinzugabe etwas höher als für das reine Lipid erwartet, siehe Abb. 6.5. Erst bei einer PhotofrinKonzentration

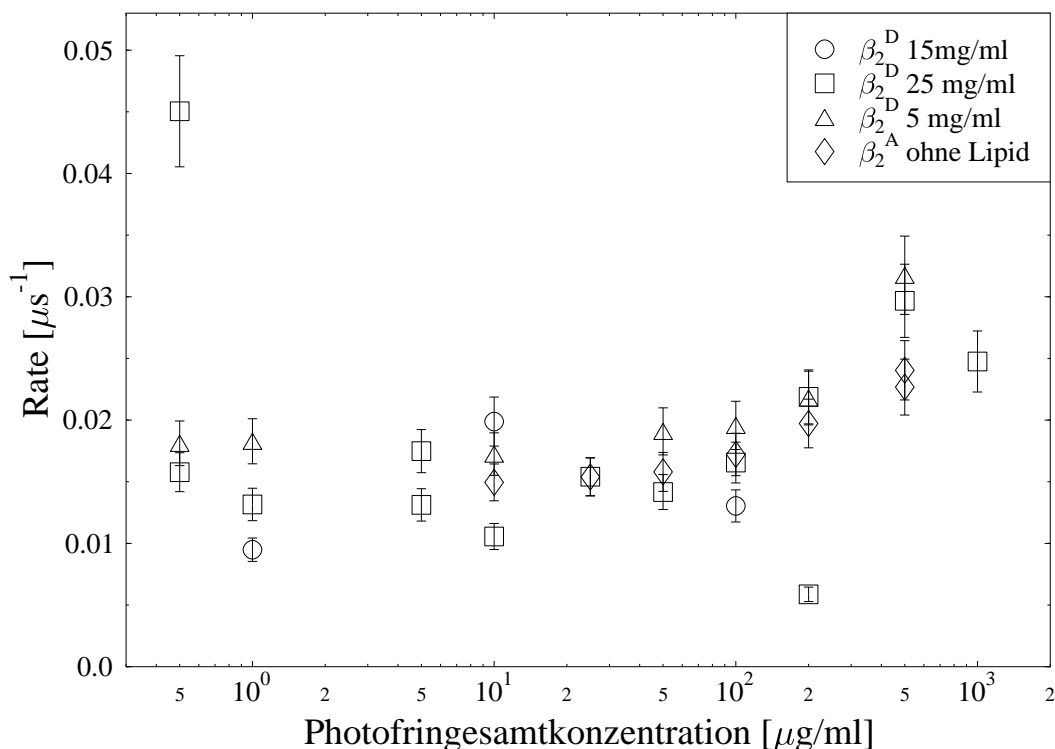


Abb. 6.6: Ausschnitt aus Abb. 6.5: Abklingraten des Lumineszenzsignals einer Lösung von Photofrin und Sauerstoff (91% LS) in schwerem Wasser  $D_2O$  ohne Lipid und mit Lipid in Abhängigkeit von der Photofrinkonzentration  $c_P$  und der Lipidkonzentration bei einer Anregungspulsenergie von  $E = 24 \mu J$  und 20 000 Anregungspulsen

tration von  $100 \mu g/ml$  verkürzt sich die Rate signifikant und nähert sich dem Wert der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Abklingrate  $\beta_2^A$  im Lipidaufstrich. Offenbar besitzt die  $H_2O$ -Umgebung, die mit  $\beta_2^H \approx 0,25 \mu s^{-1}$  [K98], [WHR95] die höchste Rate besitzt, bei geringeren  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Konzentrationen stärkeren Einfluß auf das Abklingverhalten als bei hohen, während dies in  $D_2O$ -Umgebung umgekehrt der Fall ist. Dieser Effekt könnte aber auch durch Streuung der Meßwerte innerhalb der Fehlerbalken begründet liegen, da hier nur drei Meßpunkte aufgezeichnet wurden.

In Abb. 6.7 sind die durch Fit nach Gl. (6.1) bestimmten Gewichtungsgroßen  $B$  und  $C$  für die Suspensionen mit 15 und 25 mg/ml Phosphatidylcholin in  $D_2O$  eingezeichnet. Sie stellen ein Maß dar für die relative Signalintensität aus den beiden Phasen.

Für die Meßwerte in den Suspensionen mit 15 mg/ml Phosphatidylcholin sieht man bis zu einer Photofrinkonzentration von  $200 \mu g/ml$  einen Anstieg des Gewichtungsparameters  $C$  für den  $D_2O$ -Anteil, während derjenige für den Lipidanteil,  $B$ , weitgehend konstant bleibt. Dies bedeutet, daß die Lumineszenzintensität

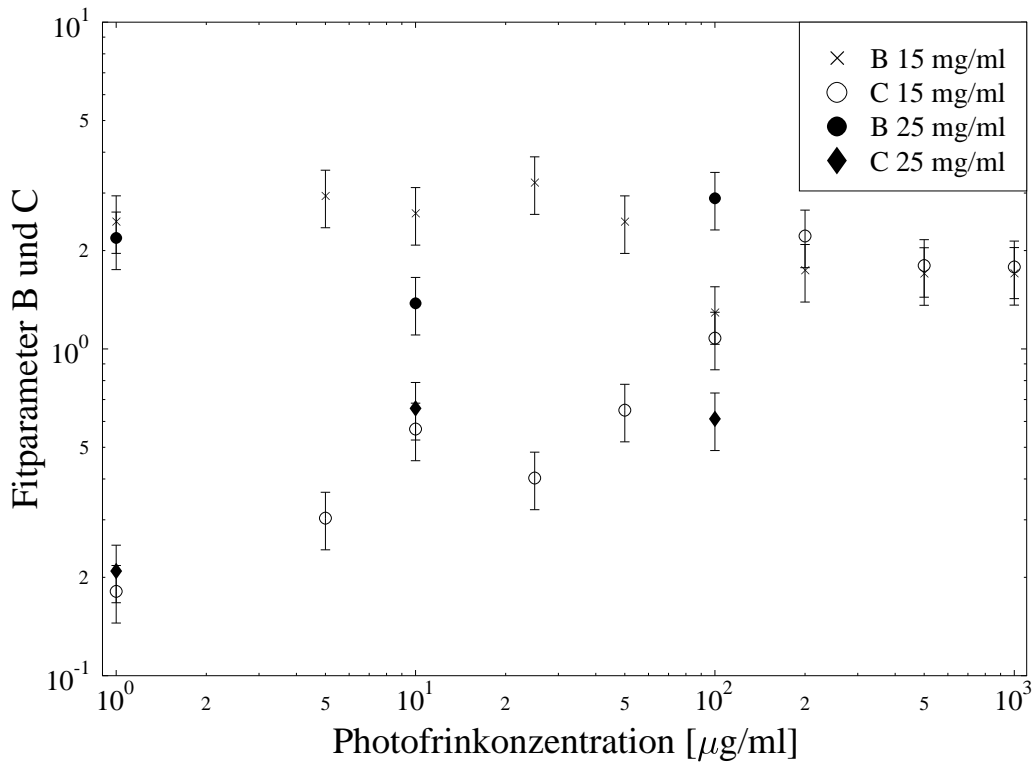


Abb. 6.7: Fitparameter  $B$  und  $C$  nach Gl. (6.1), bestimmt aus dem zeitlichen Verhalten der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz von Lösungen von Photofrin in  $\text{D}_2\text{O}$  mit 15 und 25 mg/ml Phosphatidylcholin in Suspension, in doppeltlogarithmischer Auftragung.

aus dem  $\text{D}_2\text{O}$  mit steigender Photofrskonzentration gegenüber dem Anteil aus dem Lipid zunimmt, welcher im Wesentlichen unverändert bleibt. Stellt man sich vor, daß in diesem Bereich der Photofrskonzentration alles Photofrin im Lipid gelöst ist, so bedeutet dies eine stärkere Diffusion von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff, der umso mehr generiert wird, je mehr Photofrin im Lipid ist, aus dem Lipid heraus in das  $\text{D}_2\text{O}$ . Bei einer Photofrskonzentration von  $c_P = 200 \mu\text{g/ml}$  treffen sich die Werte für  $B$  und  $C$  und bleiben gemeinsam konstant bis zur höchsten vermessenen Konzentration an Photofrin von  $c_P = 1000 \mu\text{g/ml}$ . Der Schnittpunkt von  $B$  und  $C$  bezeichnet möglicherweise die Photofrinlöslichkeitsgrenze in Phosphatidylcholin, so daß man aus Abb. 6.7  $c_P^G \approx 200 \mu\text{g}/15 \text{ mg} = 13,3 \mu\text{g}$  Photofrin pro mg Phosphatidylcholin schätzen kann. Dieser Wert liegt eine Größenordnung unter dem Wert der Löslichkeit von Photofrin in Phosphatidylcholin, den [EAF98] zu  $c = 110 \mu\text{g/ml}$  Lipid bestimmte. Jedoch wurden in der genannten Arbeit die Lipidtröpfchen zuvor im Ultraschallbad zu kleinsten Partikeln zerstäubt, so daß die Werte nicht direkt vergleichbar sind. Da für  $c_P > c_P^G$  auch  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in der wäßrigen Phase durch das dort gelöste Photofrin erzeugt wird, und von dort auch



die Lipidphase hineindiffundieren kann, kommen die beiden Vorgänge (Diffusion aus dem Lipid heraus und in dieses hinein) in ein Gleichgewicht, das durch die Teilchendichten von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff im Lipid und im  $D_2O$ ,  $N_{\Delta}^L$  und  $N_{\Delta}^D$ , sowie durch die Größe der Lipid- $D_2O$ -Grenzfläche bestimmt ist. Dieses Gleichgewicht bedingt möglicherweise  $B \approx C$  für  $c_P > c_P^G$ , da der Partialdruck von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in Lipid und  $D_2O$  durch die wechselseitige Diffusion dieser Moleküle gleich groß ist und sich die Gewichtung der Signalbeiträge somit nicht mehr ändert.

Eine andere Erklärungsvariante, daß die Sättigungskonzentration von Photofrin in Phosphatidylcholin  $c_P^G < 1 \mu\text{g}/\text{mg}$  sein könnte, und das Ansteigen von  $C$  über  $c_P$  bereits bei den geringsten Photofrinkonzentrationen  $c_P$  ein Anzeichen steigender Photofrinkonzentration im  $D_2O$  wäre, läßt sich durch die hohe Löslichkeit von Photofrin in Phosphatidylcholin praktisch ausschließen. Diese Möglichkeit würde nämlich bedeuten, daß sich weniger als  $\frac{1}{15} \mu\text{g}/\text{mg}$  Photofrin in Phosphatidylcholin lösen würde. Dieser Wert kommt zustande durch die Photofrineinwaage von  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  und der Phosphatidylcholin-Einwaage von  $15 \text{mg}/\text{ml}$  in  $D_2O$ . Er erscheint bei weitem zu gering, er widerspricht Angaben für die Photofrinlöslichkeit in Phosphatidylcholin in der Literatur, wo ein Wert von umgerechnet  $c = 110 \mu\text{g}/\text{ml}$  bestimmt wurde [EAF98]. Zudem kann diese Variante nicht erklären, weshalb für die Werte von  $C$  eine Sättigung eintritt, sobald sie sich mit den Werten für  $B$  schneiden.

Die drei Werte von  $B$  bzw.  $C$  für die Phosphatidylcholin-Konzentration  $25 \text{mg}/\text{ml}$  streuen zwar stark, zeigen aber dieselbe Tendenz wie bei einer Konzentration von  $15 \text{mg}/\text{ml}$  Phosphatidylcholin in  $D_2O$ . Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß bei dieser Menge an Phosphatidylcholin in  $D_2O$  die Grenze der Suspendierbarkeit von etwa  $40 \text{mg}/\text{ml}$  bald erreicht ist, oberhalb der sich bei den Experimenten dieser Arbeit das Lipid nicht mehr in Suspension ging sondern lediglich eine Schicht bildete, die auf dem  $H_2O$  bzw.  $D_2O$  schwamm. Die Lipidtröpfchen werden sehr groß und verklumpen, das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen des Lipids wird sehr klein, streut aber stark von Probe zu Probe, da das Verklumpen nicht jedesmal zu exakt gleich großen Klumpen führt. Dies könnte die Streuung in den Gewichtungsfaktoren der beiden Phasen erklären.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das zeitliche Verhalten der Lumineszenz von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in Lipidsuspensionen wesentlich durch die Diffusion von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff zwischen den beiden Phasen Lipid und  $D_2O$  beeinflußt wird.

Die in Lipidsuspensionen gewonnenen Erkenntnisse stellen ein wichtiges Werkzeug bei der Interpretation der Messungen der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz an Zellsuspensionen *in vitro* dar, worauf im folgenden Kapitel eingegangen wird.

## 7. SINGULETT ( $^1\Delta_g$ )-SAUERSTOFF IN ZELLSUSPENSION

### 7.1 Aufbau einer typischen menschlichen Zelle

Die Zelle ist die kleinste Einheit des Lebendigen, d.h. die Zelle (und keine kleinere Einheit) ist in der Lage, die Grundfunktionen des Organismus, also Stoffwechsel, Wachstum, Bewegung, Vermehrung und Vererbung zu erfüllen [SD91].

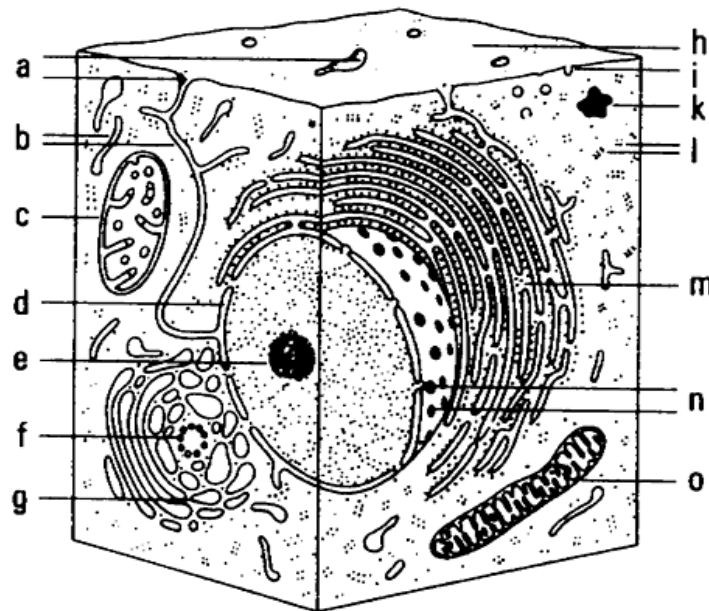


Abb. 7.1: Schematischer Aufbau einer typischen menschlichen Zelle nach [P98]. Feinstruktur: a: Einstülpungen der Plasmamembran ins Zellinnere; b: Kanalsystem des glatten endoplasmatischen Retikulums; c: Mitochondrium vom Tubulus-Typ; d: die beiden Membranen der Kernhülle; e: Nukleolus; f: Zentralkörperchen; g: Golgi-Komplex; h: Zelloberfläche; i: Pinozytosebläschen; k: Liposomen; l: Ribosomen; m: granuläres endoplasmatisches Retikulum; n: Poren der Kernhülle; o: Mitochondrium vom Crista-Typ. Zur näheren Erläuterung siehe [P98].

Zellen sind nach außen abgegrenzt durch die Plasmamembran, die das Zytoplasma, also das Zellwasser, und die darin eingebetteten zellulären Substrukturi-

ren mit eigener Membranbegrenzung, die Zellorganellen, umhüllt. Diese sind in Abb. 7.1 schematisch dargestellt. Die Organellen, quasi die „Organe“ der Zelle, sind hochspezialisiert. Das genetische Material z.B. ist im Nukleus, dem Zellkern, konzentriert. Im endoplasmatischen Retikulum werden u.a. Proteine und Lipide zur Membranbildung synthetisiert, und die oxidative Adenosintriphosphat(ATP) - Produktion, also die Energiegewinnung, findet in den Mitochondrien statt, um hier nur einige zu nennen.

Die Plasmamembran stellt gleichsam die Haut der Zelle dar, die sie umgibt und zusammenhält. Je nach Zelltypus variiert ihre Zusammensetzung, doch besteht sie im Wesentlichen zu 50% bis 60% aus Proteinen und zu 40% bis 50% aus Lipiden, die sich wiederum hauptsächlich in Cholesterol, Phosphoglyceride, zu denen auch Phosphatidylcholin gehört, und Sphingomyelinen unterteilen lassen [HLM78]. Aufgrund der Lokalisation von Photofrin in zellulären Membranen verursacht der erzeugte Singulett - Sauerstoff oxidative Schäden v.a. an den Lipiden. Da also die Plasmamembran das oxidative Ziel bei der Zellzerstörung dieser Arbeit darstellt (siehe Kap. 7.3.2), soll hier etwas ausführlicher auf sie eingegangen werden. Abb. 7.2 beschreibt ihren typischen Aufbau.

Sie ist die in sich geschlossene, selektiv durchlässige äußere Begrenzung der tierischen und damit auch menschlichen Zellen [P98]. Sie gewährleistet den Kontakt zu anderen Zellen zum Stoffaustausch und zur Reizbeantwortung, außerdem die Oberflächenspannung und die Zellbeweglichkeit. Sie ist ca. 8 nm dick und besteht aus zwei Lipidmolekülschichten, der Proteine mit unterschiedlicher Struktur eingefügt oder aufgelagert sind. Die meisten Proteine besitzen eine sehr große physikalische Quencherstärke, die die Quencherstärke der Lipide um typischerweise bis zu 4 Größenordnungen übertrifft [K91].

Zu den Funktionen der Membran gehört der zelluläre Stoffwechsel durch aktiven Transport von Ionen und kleinen Molekülen durch sie hindurch unter Verbrauch von ATP. Große Moleküle und Partikel können in Flüssigkeitsbläschen durch sie hindurchgeschleust werden. Sie bewerkstelligt so kontrollierten (Osmose) und unkontrollierten (Diffusion) Austausch von Stoffen.

Durch ihre Struktur sorgt die Membran für die Spezifität der unterschiedlichen Zellen. Durch Glykoproteine und -lipide auf der Außenschicht erkennen sich gleichartig spezifizierten Zellen und haben so die Voraussetzung für Gewebeformung und Hemmung von unkontrolliertem Zellwachstum. Ebenso ist sie der Träger der Antigeneigenschaften der Zelle wie von Zellrezeptoren.

Wird die Membran zerstört, wie es bei den Untersuchungen in dieser Arbeit im Rahmen der Photodynamischen Therapie geschieht, so führt dies unweigerlich zum Tod der Zelle. In Abhängigkeit der Lokalisation des Sensibilisators und der Menge an generiertem Singulett - Sauerstoff wird die Zelle durch Membranschäden entweder aktiviert oder zerstört.

Weiterführende Einzelheiten zum Thema Zelle, Zellaufbau und -funktion bietet neben vielen anderen Werken vor allem [P98].

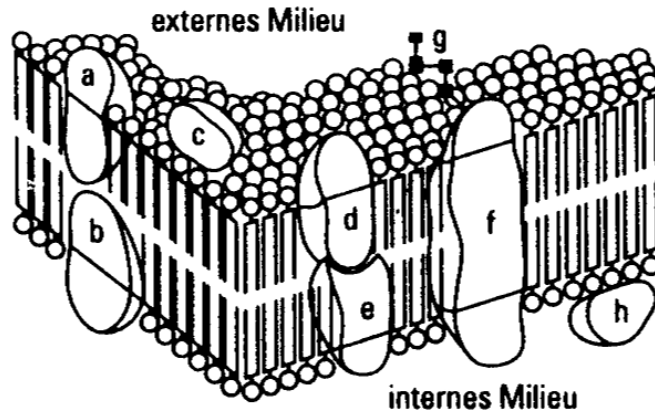


Abb. 7.2: Schematischer Aufbau der äußeren Membran einer typischen menschlichen Zelle nach [P98]. Modellvorstellung über die Plasmamembran im Querschnitt: a: extern orientiertes intrinsisches Membranprotein; b: intern lokalisiertes Membranprotein; c: extern extrinsisches Membranprotein; d,e: die Membran durchdringende Proteine mit hydrophoben Wechselwirkungen im Inneren der Membran; f: die Membran durchspannendes Glykoprotein mit Zuckerresten (g); h: intern lokalisiertes extrinsisches Membranprotein. Intrinsisch bedeutet, daß das Protein in die Membran eingelagert ist, während extrinsisch ein aufgelagertes Protein kennzeichnet. Intern bezeichnet das Zellinnere, extern das Zelläußere. Gut zu erkennen sind hier die langgestreckten Lipidmoleküle, die nebeneinander in einer Doppelschicht das Grundgerüst der Membran bilden. Zur näheren Erläuterung siehe [P98].

## 7.2 Photodynamische Therapie

Neben Herz-Kreislaufkrankungen stellt Krebs in seinen verschiedenen Variationen die Haupttodesursache der modernen Industrielwelt dar. Unter dem Oberbegriff „Krebs“ fassen sich an die 1000 verschiedenen Krankheitsformen zusammen, die sich v.a. durch eine Gemeinsamkeit auszeichnen: dem unkontrollierten Wachstum von Gewebe [SL94]. Wegen den teilweise erheblichen Nebenwirkungen und Belastungen der etablierten Krebstherapieformen wie Chemotherapie oder operativer Entfernung für den Patienten ist die Medizin auf der Suche nach Alternativen, die für den Erkrankten eine geringere Belastung darstellen.

Die Photodynamische Therapie (PDT) ist eine der verschiedenen Alternativen, die in der jüngeren Vergangenheit bei der Behandlung von Präkanzerosen (Krebsfrühstadien) und Tumoren in der Speiseröhre, dem Bronchialsystem oder auch der Haut an Bedeutung gewonnen hat. Hier werden zwei essentielle Eigenschaften von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) ausgenutzt. Zum einen ist dies die Existenz eines niedrig liegenden ersten elektronischen Anregungszustands,  $^1\Delta_g$ , zum

anderen die Allgegenwärtigkeit im menschlichen Organismus [WGD76]. Abb. 7.3 zeigt den schematischen Ablauf der PDT.

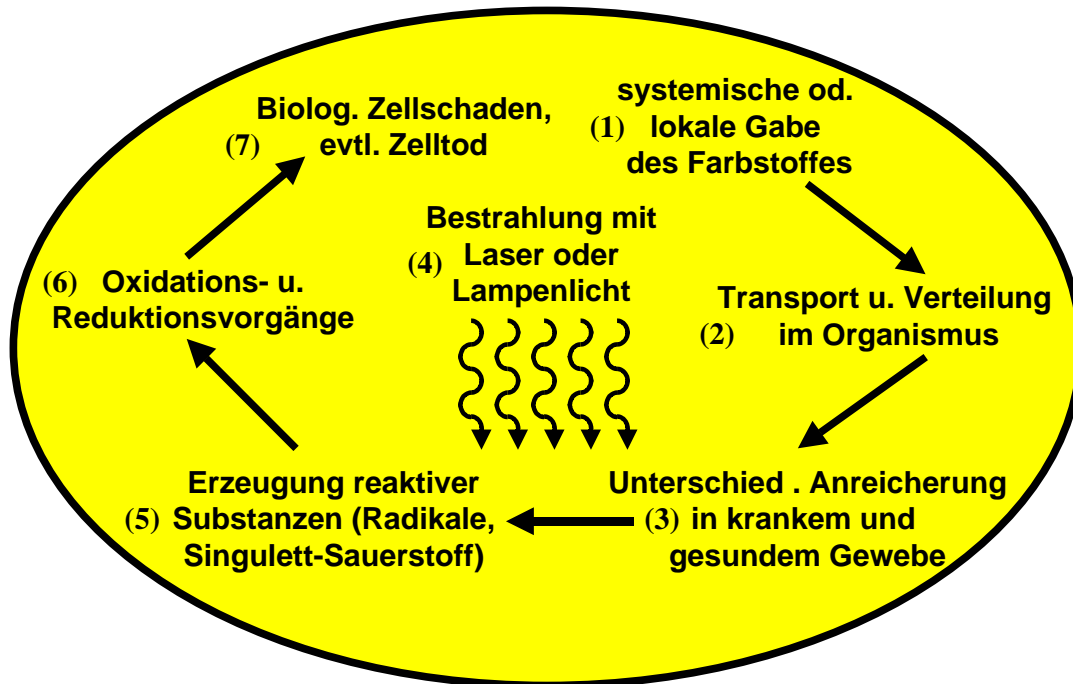


Abb. 7.3: Schematischer Ablauf der Photodynamischen Therapie nach [SL94]

Dem Patienten wird ein sensibilisierender Farbstoff verabreicht, der sich aufgrund physiko-chemischer Eigenschaften von Tumor- und Normalgewebe selektiv in Tumoren anreichert. Durch Bestrahlung mit Laser- oder Lampenlicht wird der Farbstoff aus dem Singulett-Grundzustand  $S_0$  in den Singulett-Zustand  $S_1$  angeregt. Durch Interkombination gelangt ein möglichst großer Teil der Energie in den Triplettzustand  $T_1$ . Von dort wird die Energie auf den allgegenwärtigen Sauerstoff übertragen (vgl. Kap. 2.5). Der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff kann dann auf reaktivem Wege wichtige Zellbestandteile innerhalb seiner Reichweite zerstören und so den Zelltod herbeiführen [SL94]. Dieser Mechanismus wird in der PDT als Typ II-Reaktion bezeichnet. Typ I bezeichnet die von einem Sensibilisator photophysikalisch induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen wie z.B.  $O^{\cdot}$  oder  $O_2^{\cdot}$ . Durch Experimente *in vitro* kann ein möglicher Einfluß, der gegenüber der Rolle von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff von Bedeutung wäre, durch Tests mit dem Quencher Mannitol (vgl. Kap. 2.4.3) ausgeschlossen werden (siehe Kap. 4).

Dies stellt klare Anforderungen an den Sensibilisator. Erstens sollte er selbst

untoxisch sein, zweitens wird eine hohe Quantenausbeute an  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff verlangt. Er sollte eine hohe Anreicherung in Tumoren erzielen und nach der Behandlung möglichst schnell vom Körper wieder abgebaut oder ausgeschieden werden. Angeregt werden soll die Substanz mit einer Wellenlänge, die möglichst tief ins Gewebe eindringen kann, also im Bereich von etwa 600 - 850 nm.

In Deutschland ist für die PDT bislang (Stand Mai 2001) nur eine einzige Substanz zur medizinischen Therapie zugelassen, nämlich das Hämatoporphyrinderivategemisch Photofrin. Diese Substanz entspricht leider nicht ganz den idealen Ansprüchen. Die Selektivität von Photofrin, also eine erhöhte Anreicherung im erkrankten Gewebe gegenüber dem gesunden, ist gering. Es resultiert nach systematischer Gabe eine kutane Lichtsensibilisierung von ca. 6-8 Wochen.

Hervorragend hingegen ist die Quantenausbeute von Photofrin an  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff von  $\Phi_\Delta = 0,36$  [PT86]. Die medizinisch gebräuchliche Anregungswellenlänge von Photofrin liegt bei  $\lambda = 630$  nm, was noch im gewünschten Bereich liegt.

Die Forschung geht natürlich in diejenige Richtung, bessere sensibilisierende Substanzen zu finden, als Photofrin es ist. Erste Erfolge im Rahmen von klinischen Zulassungsstudien werden mit Porphyrin-Isomeren, sog. Porphycenen wie z.B. ATMPn [SKS96] erzielt. Dabei handelt es sich um chemische Reinsubstanzen, die bei etwa 640 nm absorbieren, schneller metabolisiert, d.h. durch den Stoffwechsel abgebaut, werden und vergleichsweise gute photophysikalische Eigenschaften haben.

## 7.3 Zellkulturen

### 7.3.1 Der Zelltyp HT-29

Der Zelltyp HT-29 ist ein immortalisierter, standardisierter Zellstamm, der sich vom menschlichen Darmkrebs ableitet. Da diese Erkrankung eine mögliche Indikation für die Anwendung der PDT mit Photofrin als Sensibilisator ist, d.h. da diese Art von Tumor ein potentiell Einsatzgebiet von Photofrin darstellt, wurde dieser Zelltyp für die *in vitro*-Untersuchungen der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz aus Zellsuspensionen ausgewählt. Zucht und Handhabung dieser Zellen ist ein Standardverfahren, daß in zahlreichen medizinischen Publikationen wie z.B. [SKS96] hinlänglich beschrieben ist.

### 7.3.2 Intrazelluläre Lokalisierung von Photofrin

Um die oxidativen Vorgänge präzise zu erfassen, die bei der PDT den Zelltod bewirken, muß man Kenntnis von der Lokalisierung der Sensibilisators haben. Dort, wo dieser sitzt, wird der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff generiert. Darum wird an dieser Stelle, innerhalb der Lebensdauer und Reichweite des angeregten Sauerstoffs, der zelluläre Schaden angerichtet.

Meßtechnisch ist es momentan noch nicht möglich,  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in lebendem Gewebe *in vivo* optisch direkt nachzuweisen. Man kann aber mit Photofrin inkubierte Zellen *in vitro* ebenso wie Photofrin-Lösungen in die Meßküvette des Versuchsaufbaus nach Abb. 3.1 geben und nach Anregung von Photofrin das Lumineszenzsignal bei  $\lambda_{\Delta} = 1\,270\text{ nm}$  beobachten.

Nun muß man auch bei Zellen *in vitro* nach der Lokalisierung des Farbstoffs fragen. Es zeigte sich, daß dies stark davon abhängt, wie lange man Photofrin in die Zellen inkubiert, d.h. wie lange man ihnen Zeit läßt, die Substanz aufzunehmen [WO97]. Die genannte Untersuchung zeigt, daß nach einer Inkubationsdauer von 1,5 h der Sensibilisator fast ausschließlich in der Plasmamembran angesammelt ist. Erst nach deutlich längerer Inkubation dringt er tiefer in die Zelle ein. Aufnahmen der für die Untersuchungen dieser Arbeit verwendeten menschlichen HT-29-Zellen an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg bestätigen dies gut. Hierbei wurden HT-29-Zellen auf einen Objektträger aufgewachsen und für 1,5 h mit Photofrin inkubiert. Der Objektträger mit den Zellen wurde unter einem Mikroskop (Firma Zeiss, Axiotec, Oberkochen) positioniert, um mit einer CCD-Kamera (Firma PCO, Kelheim, Deutschland) eine Durchleuchtungsaufnahme mit Weißlicht anzufertigen. Diese zeigt Abb. 7.4.

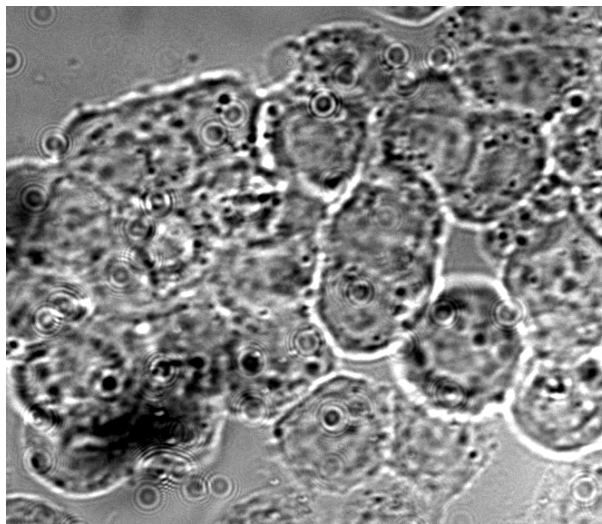


Abb. 7.4: Weißlichtmikroskopaufnahme von photofrin-inkubierten HT-29-Zellen, wie sie in den *in vitro*-Untersuchungen dieser Arbeit benutzt werden.

Danach wurde die Fluoreszenz von Photofrin mit blauem Licht angeregt. Die intrazellulär generierte Fluoreszenz wurde im roten Teil des sichtbaren Spektrums durch einen Kantenfilter (Firma Omega Optical, Typ 600EFLP) beobachtet, um das Anregungslicht von der Fluoreszenz zu trennen. Diese Aufnahme zeigt Abb. 7.5. Photofrin ist überwiegend in der Membran angereichert. Die hellen Stellen markieren das bei blauer Anregung rötlich fluoreszierende Photofrin, das

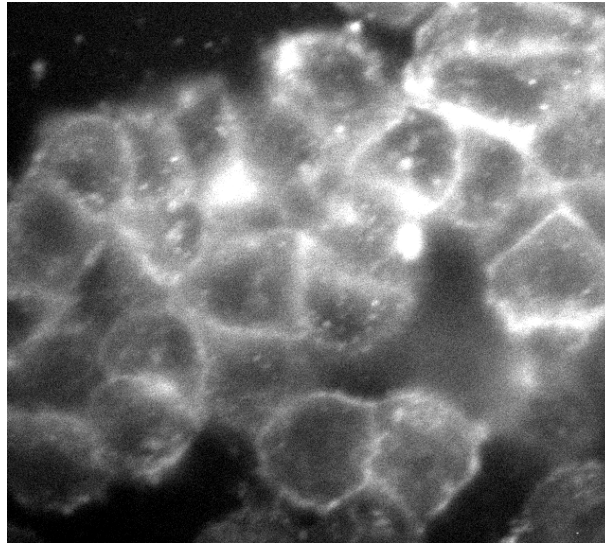


Abb. 7.5: Zu Abb. 7.4 korrespondierende Fluoreszenzmikroskopaufnahme von photofrin-inkubierten HT-29-Zellen, wie sie in den *in vitro*-Untersuchungen dieser Arbeit benutzt werden.

Anregungslicht ist abgeblockt.

Genau diese Zellinkubationsdauer von 1,5 h wählt man, um für die Modellfindung zur  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Bildung *in vitro* ein überschaubares Szenario zu haben. Der bei Laserbestrahlung in der Plasmamembran generierte  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff reagiert mit deren Lipiden durch Lipidperoxidation und wird so chemisch dem Gesamtsystem entzogen (vgl. Kap. 2.6).

### 7.3.3 Zelluläre Aufnahme von Photofrin

Ausgehend von den Erkenntnissen in Kap. 7.3.2 kann man ein sehr simples Modell einer Zelle konstruieren, um das Geschehen zu erfassen. Dieses Modell zeigt Abb. 7.6.

Der interessierende Bestandteil der inkubierten Zellen, nämlich die Plasmamembran mit dem näherungsweise ausschließlich dort angereicherten Sensibilisator Photofrin, läßt sich in erster Näherung als Kugelschale beschreiben. Aus Abb. 7.5 und weiteren vergleichbaren Aufnahmen kann man einen mittleren Zelldurchmesser von  $D_Z = (12,6 \pm 0,1) \mu\text{m}$  bestimmen. Die Dicke der Membran wurde zu  $d_M = (9 \pm 1) \text{nm}$  abgeschätzt. So kann man das Volumen der Membran einer Zelle abschätzen. Mit diesen Zahlen erhält man ein mittleres Membranvolumen von  $V_L = (4,1 \pm 0,4) \mu\text{m}^3$  pro Zelle.

Es wurden Konzentrationen bis zu  $50 \mu\text{g/ml}$  Photofrin im Überstand inkubiert. Bei noch höheren Konzentrationen begann das Photofrin dunkeltoxisch, d.h. giftig auch ohne Lichteinstrahlung auf die Zellen zu wirken.



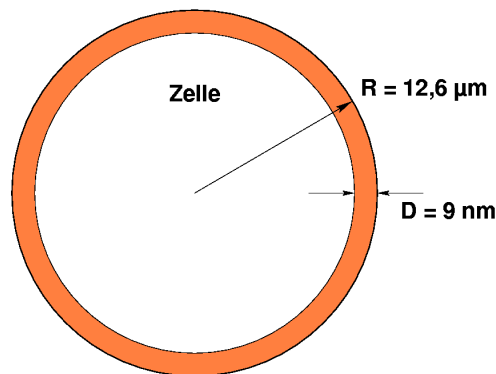


Abb. 7.6: Stark vereinfachte Modellvorstellung einer Zelle; Erklärung siehe Text.

Die Konzentration  $c_P^M$  von Photofrin in der Membran erhält man, indem man durch Messung der Transmission des Überstands der Inkubationslösung im Spektralphotometer vor und nach der Inkubation die Konzentrationen  $c_v^u$  und  $c_n^u$  von Photofrin bestimmt. Diese ist nach der Inkubation im Überstand verringert um die Menge Farbstoff, die die Zellen aufgenommen haben [FSB97].

Bei einer Photofrininkubationskonzentration von  $20 \mu\text{g/ml}$  im Überstand wurde nach diesem Verfahren die zelluläre Aufnahme an Photofrin, der sog. *uptake*, bestimmt zu  $M_U = (24 \pm 5) \frac{\text{ng}}{10^6 \text{ Zellen}}$ . Bei einer Konzentration von  $7,5 \text{ mio/ml}$  Zellen ergibt dies eine Gesamtkonzentration von  $(180 \pm 40) \text{ ng/ml}$  Photofrin in der Zellsuspension. Rechnet man dies jedoch zurück auf des reine Volumen an Membranlipid  $V_L^{\text{ges}} = V_L \cdot 7,5 \cdot 10^6 = 31 \text{ nl}$  in  $1 \text{ ml}$  Suspension, so erhält man eine lokale Photofrinkonzentration von  $c_P^M = (6 \pm 1) \text{ mg/ml}$  in der Membran. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die inkubierte Menge an Photofrin bei konstanter Inkubationsdauer linear mit der Konzentration an Photofrin im Überstand ansteigt, was auch in der Literatur berichtet wurde [LSP94].

Man sieht, daß einerseits die Gesamtmenge an Photofrin in der gereinigten (siehe unten) Suspension deutlich geringer ist als in den reinen Lösungsmittelproben, die typischerweise  $200 \mu\text{g/ml}$  betrug. Andererseits wird lokal in der Membran diese Konzentration deutlich übertroffen. Die Zellkonzentration betrug typischerweise  $5$  oder  $7,5 \cdot 10^6/\text{ml}$ . Diese Anzahl ist unter dem Lichtmikroskop sehr genau bestimmbar.

Die Sauerstofflöslichkeit in Lipiden ist etwa um einen Faktor  $10$  höher als in Wasser [LB62], deshalb kann bei luftgesättigten Suspensionen mit einer hinlänglich großen Menge an Sauerstoff in der Membran gerechnet werden.

Nach der Inkubationszeit von  $1,5 \text{ h}$  wird der Überstand, also die Photofrinlösung, entfernt, die Zellen werden gereinigt und in Suspension mit  $\text{H}_2\text{O}$  oder  $\text{D}_2\text{O}$  gebracht. Man kann nach dieser Prozedur zunächst praktisch ausschließen, daß sich Photofrin in der Lösung selbst befindet. Also sitzt der Sensibilisator nur

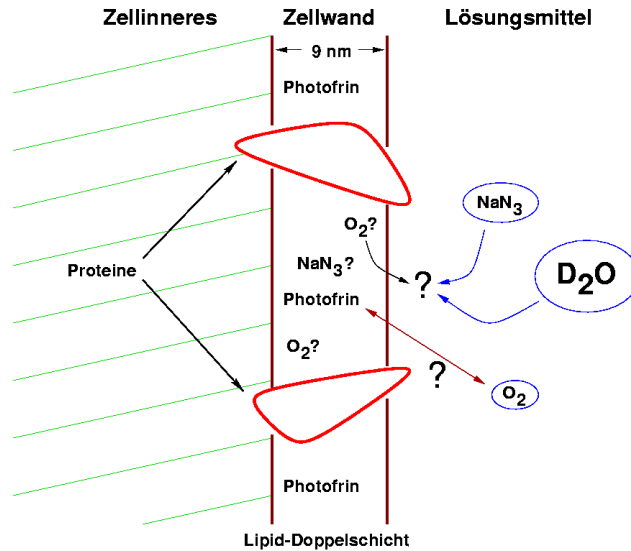


Abb. 7.7: Vereinfachte Modellvorstellung der Plasmamembran. Die eingezeichneten Pfeile und Fragezeichen auf der Lösungsmittelseite der Membran symbolisieren mögliche Diffusionen von Sauerstoff,  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff und Natriumazid in die bzw. aus der Zellwand.

in der Plasmamembran, und ausschließlich hier wird  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff generiert.

Der angeregte Sauerstoff kann nun in der Membran verweilen, dort von Lipiden oder Proteinen sowohl chemisch als auch physikalisch deaktiviert werden, oder aber er kann die Membran durch Diffusion verlassen und in das umgebende Lösungsmittel gelangen. Bei Diffusion ins Zellinnere findet der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff innerhalb seiner Reichweite im Wesentlichen ebenfalls nur Lösungsmittel, d.h.  $\text{H}_2\text{O}$  oder  $\text{D}_2\text{O}$  je nach Meßprobe vor. Diese Situation ist in Abb. 7.7 skizziert.

Die Membran besteht vereinfacht betrachtet aus Lipiden und Proteinen, umgeben von Wasser. Wie oben erwähnt ist Photofrin im Wesentlichen lipophil, d.h. es löst sich bevorzugt im Lipid anstatt im Wasser. Bei hohen Photofrin-konzentrationen in der Membran ist es dennoch denkbar, daß mit der Zeit auch der Sensibilisator in geringem Maße in das umgebende Lösungsmittel diffundiert. Weiterhin haben Untersuchungen gezeigt, daß Photofrin in die Plasmamembran von Zellen aufgenommen wird und sich folglich zunächst dort anreichert. Das bedeutet, daß sich bei steigender Konzentration an inkubiertem Photofrin der Farbstoff zuerst in den Proteinen der Membran anreichert, dann im Lipidteil der Membran, und zuletzt erst im umgebenden Lösungsmittel (nach Entfernen des Überstands).

## 7.4 Qualitatives Modell der $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz in Zellsuspensionen

Aufbauend auf diese Informationen kann man qualitativ überlegen, welches Verhalten des Lumineszenzsignals von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff man in Zellsuspensionen bei Variation der inkubierten Photofrinkskonzentration erwarten würde.

In der einfachsten Form erwartet man eine Erweiterung der Vorstellung getrennter Phasen, wie sie bereits bei den Lipid-Suspensionen diskutiert wurden. Bei den Zellsuspensionen zieht man zusätzlich die Proteine als drittes Kompartiment in Betracht. Von ihnen wird das Photofrin aktiv aufgenommen und gebunden und reichert sich hier deshalb noch stärker an als in den Lipiden der Plasmamembran. Anknüpfend daran und an Kap. 6.1 bzw. Kap. 6.2 kann man qualitativ ein vergleichbares Modell für die Zellsuspensionen konstruieren.

Photofrin bindet sich also bei steigender Zugabe zuerst in bzw. an den Proteinen. (Die Formulierung „in oder an“ bezieht sich darauf, daß ein Protein ein einzelnes, jedoch im Vergleich zu Sauerstoff oder auch Photofrin riesengroßes Molekül ist, wobei man nicht genau definiert sagen kann, was es bedeutet, wenn Sauerstoff in einem einzelnen solchen Molekül „gelöst“ ist. Deshalb wird die Formulierung „in oder an“ gewählt.) Sind die Proteine gesättigt, so löst sich das Photofrin im Lipid der Membran, und sobald auch diese gesättigt ist, löst sich der Farbstoff erst im Lösungsmittel, also  $H_2O$  oder  $D_2O$ . Im getrockneten Zellrasen entfällt der letzte Punkt natürlich, und auch in Lösungen muß dieser Fall nur eingeschränkt betrachtet werden, da die Suspensionen nach der Inkubation gereinigt werden und der Überstand mit darin gelöstem Photofrin entfernt wird, d.h. daß das Lösungsmittel in jedem Falle frei von Photofrin ist.

Das bedeutet folglich, daß bei sehr geringen Photofrininkubationskonzentrationen der Sensibilisator ausschließlich in oder an den Proteinen akkumuliert ist und folglich nur dort  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff generiert wird. Der angeregte Sauerstoff, der im Bereich des Proteins verweilt, spürt dessen starke Quencherwirkung und wird sehr effektiv deaktiviert [K90], [K91]. Nach Kap. 2.5, Gl. (2.15) weiß man aber, daß keine kürzeren Abklingraten als die Energieübertragsrate vom Farbstoff-Triplett-Zustand auf den Sauerstoff beobachtet werden kann, da die Bedeutung der Raten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  für das Verhalten der zeitlichen Lumineszenzkurve vertauscht, sobald  $\beta_2 > \beta_1$  wird. Folglich wird man von den Proteinen ein sehr schwaches Lumineszenzsignal mit einer Abklingrate von etwa  $\beta_1^P \approx 0,4 \mu s^{-1}$  erwarten, was der geschätzten Energieübertragsrate  $k_{T\Delta}N_O$  entspricht.

Steigert man die inkubierte Photofrinkskonzentration über die Sättigungskonzentration in den Proteinen hinaus an, so sammelt sich auch im Lipid Photofrin an, und somit wird auch hier  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff erzeugt. Zu erwarten ist ein Beitrag zum Lumineszenzsignal mit einer Abklingrate von  $\beta_2^L \approx 0,091 \mu s^{-1}$ , der sich zum Beitrag der Proteinumgebung addiert und sie überdecken dürfte wegen der geringeren Quencherwirkung, die eine größere Lebensdauer und ein potentiell

stärkeres Lumineszenzsignal bewirkt. Da der Überstand nach Inkubation entfernt wird, ist zu keiner Zeit Photofrin im Lösungsmittel. Steigende Photofrskonzentration im Lipid bedeutet jedoch steigende Generation von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff, und das wiederum bedeutet vermehrte Diffusion von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in das umgebende Lösungsmittel. Aufgrund dessen bekommt man einen zunehmenden Beitrag aus dem Lösungsmittel, obwohl dort selbst kein  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff generiert wird mangels Photofrin. Für den Zellrasen sind die Überlegungen betreffend dem umgebenden Lösungsmittel selbstverständlich ungültig, da es hier kein umgebendes Lösungsmittel gibt.

In  $H_2O$  und  $D_2O$  aber muß man zusätzlich bei langsam steigender Photofrskonzentration die Diffusion von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff ins Lösungsmittel mit berücksichtigen. In beiden Fällen –  $H_2O$  und  $D_2O$  – wird man einen Beitrag des Verhaltens im Lösungsmittel bekommen. Dieser wird im  $H_2O$  durch die Abklingrate von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff  $\beta_2^H \approx 0,3 \mu s^{-1}$  [WHR95] im Rahmen von Meßgenauigkeit und Fehlerbalken nicht von der Rate  $\beta_1^P$  aus dem Proteinbereich zu unterscheiden sein, lediglich von der Rate  $\beta_2^L$  aus dem Lipidbereich. Nicht so bei  $D_2O$ , da hier die Rate mit  $\beta_2^D \approx 0,0147 \mu s^{-1}$  deutlich kleiner ist als in bzw. an den Proteinen und im Lipid. Hier sollte ein merklicher Beitrag aus dem  $D_2O$  zum Lumineszenzsignal vom Beitrag aus der Protein- und der Lipid-Umgebung durch die gemessene Rate unterscheidbar sein, sobald er hoch genug gegenüber diesem wird.

Hier muß man wieder unterscheiden zwischen  $H_2O$ , dessen Abklingrate für  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff größer ist als die im Lipid, während diejenige in  $D_2O$  deutlich kleiner ist als diese. Fraglich sind dabei allerdings die Gewichtungen der drei Signalbeiträge aus Protein-, Lipid und Lösungsmittelumgebung. Diese Gewichtung hängt ab von der Menge an generiertem bzw. diffundiertem Sauerstoff und von den jeweiligen Raten  $\beta_1^P$ ,  $\beta_1^D$ ,  $\beta_2^P$  und  $\beta_2^D$ , die im Nenner des Vorfaktors in Gl. (2.15) auftreten. Folglich ist es nicht zwingend notwendig, ein Lumineszenzgesamtsignal zu erwarten, daß einen Knick im zeitlichen Verlauf aufweist. Das unterstreichen auch die Messungen in Lipidsuspensionen, bei denen in Suspensionen mit 15 mg/ml Phosphatidylcholin in  $D_2O$  ein Knick gefunden wurde, nicht jedoch in Suspensionen mit 5 mg/ml Phosphatidylcholin in  $D_2O$ , vgl Kap. 6.2. Nun kann man in Zellsuspensionen die Gewichtungen der verschiedenen Kompartimente Protein, Lipid und Lösungsmittel nicht gezielt variieren so wie z.B. die Lipidkonzentration in Suspension, was eine Interpretation der gemessenen zeitlichen Lumineszenzkurven erschwert.

Man muß auch beachten, daß  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff, der nach seiner Erzeugung in einem Membranbestandteil in  $D_2O$  diffundiert, dort eine deutlich längere Lebensdauer besitzt als in der Membran und es denkbar ist, daß er durch statistische Bewegung wieder zur Membran zurückkehrt und dort rasch deaktiviert wird. Dies sorgt lösungsmittelbedingt zu einer scheinbaren Verlängerung der Lebensdauer in der Membran, wenn der Anteil an  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff, der diesen Weg nimmt, groß genug ist. Ein vergleichbarer Effekt in  $H_2O$  ist insofern denkbar, als die Lipid-Umgebung der Membran eine scheinbare Verlängerung der Lebensdauer in  $H_2O$

bewirken kann. Dies alles bedeutet, daß quasi „Mischzeiten“ auftreten können, d.h. Lumineszenzabklingkurven, die innerhalb der statistischen Schwankungen im Bereich des meßbaren Signals als monoexponentiell erscheinen, und deren Abklingzeit zwischen derjenigen von  $\text{H}_2\text{O}$  und Lipid bzw. Lipid und  $\text{D}_2\text{O}$  liegen kann.

### 7.5 Lumineszenzmessungen in Zellsuspensionen

Die Messungen der Lumineszenz von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff an Zellsuspensionen wurden mit demselben Aufbau durchgeführt wie die reinen Lösungsproben und die Lipidmessungen. Um die geringe Gesamtmenge von einigen ng Photofrin in der Suspension zu kompensieren, mußte die Dichte der anregenden Photonen, also die mittlere Leistung, erhöht werden auf  $P_L = 1,5 \text{ W}$ . Die Meßdauer mußte auf 100 000 Pulse pro Messung, also auf eine Meßdauer von  $t = 1 \text{ min}$ , erhöht werden, um genügend Signal zu sammeln.

Die Zellen in der Suspension streuten das Anregungslicht sehr stark und verschärften die Problematik des Störsignals am zeitlichen Anfang der Meßkurve (vgl. Kap. 3.8). Das Störignal war um mehrere Größenordnungen höher als bei Lösungsmittelproben. Eine zusätzliche zeitliche Verbreiterung des Störsignals wurde jedoch nicht beobachtet.

Es wurden Meßreihen mit variierender Photofrininkubationskonzentration gemacht bei Zellkonzentrationen von 5 mio/ml in  $\text{D}_2\text{O}$ , 7,5 mio/ml in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$ , und bei Zellrasen, d.h. an Zellen, die in einer Schicht auf einen Quarzglasobjektträger aufgewachsen und durch Trocknen wasserfrei gemacht wurden.

Bei keiner einzigen der Messungen konnte der Anstieg des Lumineszenzsignals bestimmt werden. Jedesmal war sofort nach dem  $2 \mu\text{s}$  breiten Störsignal am Anfang ein Abklingverhalten zu sehen. Man kann daraus als Obergrenze für die Anstiegsrate grob einen Wert von  $\beta_1^{\text{max}} = 1/2 \mu\text{s}^{-1}$  abschätzen. Das Abklingverhalten wurde durch Fit des fallenden Teils der Kurve mit einer simplen Exponentialfunktion gemäß

$$f(t) = Ae^{-\beta t} + B \quad (7.1)$$

bestimmt.  $B$  dient wie die Größe  $D$  in Gl. (6.1) der Berücksichtigung des statistischen Rauschens. Die ermittelten Werte für  $B$  werden im Folgenden nicht weiter verwendet. Die ermittelten Werte  $\beta$  für die Abklingraten sind in Abb. 7.8 eingezeichnet, aufgetragen über der Photofrininkubationskonzentration, also derjenigen Farbstoffkonzentration, die vor der Inkubation in den Zellüberstand gegeben wurde.

Die Datenpunkte bei der niedrigsten Photofrininkubationskonzentration sind aufgrund der äußerst geringen detektierten Lumineszenzintensität mit Vorsicht zu genießen. Das Maximum des verwerteten Signals lag lediglich um einen Faktor

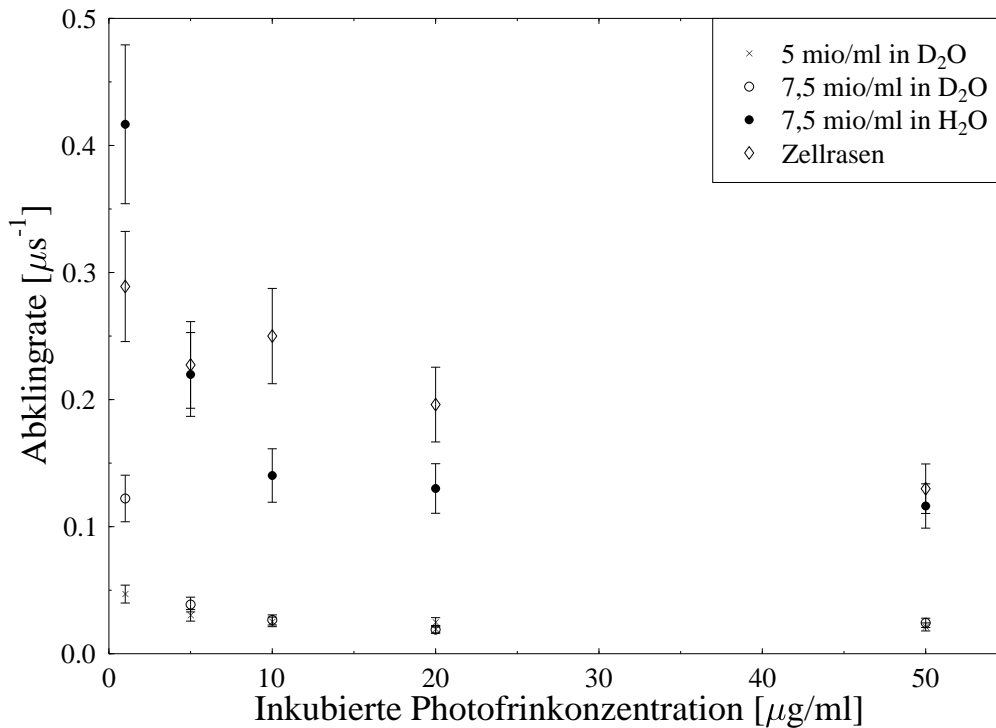


Abb. 7.8: Abklingrate  $\beta$  der Lumineszenz von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in luftgesättigten HT-29-Zellsuspensionen bei Variation der inkubierten Photofrskonzentration und einer Anregungspulsenergie von  $E = 900$  mJ und 100 000 Laserpulsen.

3-4 über dem mittleren Rauschen. Insbesondere die Punkte bei einer Inkubationskonzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  Photofrin im Überstand sind eigentlich nur der Vollständigkeit halber in Abb. 7.8 aufgenommen worden.

Man erkennt, daß die Meßwerte für 5 mio/ml Zellen und 7,5 mio/ml Zellen in  $\text{D}_2\text{O}$  innerhalb der Fehlergrenzen identisch sind. Die Anzahl der Zellen in Suspension spielt also keine Rolle im Bezug auf das Abklingverhalten, was zu erwarten war. Die Signalausbeute bei der höheren der beiden Zellkonzentrationen war geringfügig besser, was ebenfalls einleuchtend ist.

Auffällig ist, daß bei allen Meßreihen die Abklingrate  $\beta$  mit wachsender Photofrininkubationskonzentration abfällt, d.h. daß die Abklingdauer der Lumineszenz zunimmt.

Im Zellrasen mißt man deutlich höhere Werte der Abklingrate der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz als in  $\text{D}_2\text{O}$ -Suspension (siehe Abb. 6.5), und erklärt dies gemäß Kap. 7.4 folgendermaßen:  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff, der in oder an den Proteinen generiert wird, spürt die starke Quencherwirkung der Proteine. Nach Kap. 2.5 weiß man, daß die Rate des Abklingverhaltens die Übertragsrate vom Farbstoff-triplett zum Sauerstoff,  $k_{T\Delta}N_O$ , nicht überschreiten kann. Im  $\text{D}_2\text{O}$  wurde die Ratekonstante  $k_{T\Delta}$  bestimmt zu  $3,65 \cdot 10^{-3} [\mu\text{s} \% \text{LS}]^{-1}$ . Nimmt man pauschal eine

Luftsättigung von 100% LS im Protein an, so erwartet man eine Abklingrate von  $\beta \approx 0,365 \mu\text{s}^{-1}$ . Dieser Wert ist eine grobe Schätzung, da man nicht weiß, wieviel Sauerstoff in der Proteinumgebung der Membran *in vitro* gelöst ist. Er entspricht jedoch in etwa der gemessenen Abklingrate im Zellrasen bei der geringsten Photofrininkubationskonzentration. Mit steigender Photofrininkubationskonzentration sinkt der Wert der Rate ab auf bis zu  $0,13 \mu\text{s}^{-1}$  bei  $50 \mu\text{g/ml}$  Photofrininkubationskonzentration. Dies entspricht in etwa den ca.  $0,1 \mu\text{s}^{-1}$ , die für das Lipid Phosphatidylcholin bestimmt wurden, siehe Kap. 6.2. Man kann sich also vorstellen, daß die Proteine nun an Photofrin gesättigt sind, und sich der Farbstoff zunehmend im Lipid der Membran anreichert und die dortige Quencherumgebung spürt. Die Entsprechung kann selbstverständlich nicht perfekt sein, da das Lipid der Membran noch zahlreiche weitere Komponenten enthält, doch in erster Näherung paßt die qualitative Vorstellung hier.

In  $\text{D}_2\text{O}$  paßt das Verhalten der Abklingrate prinzipiell ebenfalls zu den Vorhersagen des Modells nach Kap. 7.4. Hier zeigt das Abklingverhalten jedoch bereits bei der niedrigsten Photofrininkubationskonzentration (siehe Abb. 6.5) in etwa die Rate der Lipide, sogar eine etwas größere. Man sieht nicht die kurze Rate, die man im Zellrasen als Abklingrate von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in den Proteinen vermutet hatte. Dies liegt vermutlich daran, daß das durch Quencherwirkung und Volumenanteil der Proteine sowie durch die geringe Lebensdauer von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in deren Umgebung sehr schwache Signal durch das verhältnismäßig starke Lumineszenzsignal von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff aus  $\text{D}_2\text{O}$  bereits bei dieser geringen Inkubationsmenge von Photofrin überdeckt wird. Offenbar diffundiert bereits hier schon soviel  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in das Lösungsmittel, daß die schnelle Abklingrate in der Umgebung der Proteine überdeckt wird von dem längerlebigen Signal aus dem wäßrigen  $\text{D}_2\text{O}$ -Milieu.

Bei weiter zunehmender Diffusion von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in das umgebende Lösungsmittel wird das schnell abklingende Lumineszenzsignal aus Lipid und Proteinen mehr und mehr vom Signal des  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff aus dem  $\text{D}_2\text{O}$  überdeckt, dessen Konzentration mit steigender Photofrininkubationskonzentration ebenfalls zunimmt, da mit steigender  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Konzentration auch mehr  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff diffundiert. Die gemessene Abklingrate nähert sich mit steigender Photofrininkubationskonzentration mehr und mehr der geringeren Rate in  $\text{D}_2\text{O}$  von  $K_{\Delta}^* = 0,0147 \mu\text{s}^{-1}$  an, es überwiegt zunehmend die langsamere Abklingrate von schwerem Wasser. Der gemessene Wert ist stets höher als im reinen Lösungsmittel, da der diffundierende  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in der Nähe der Membran von deren physikalischer und chemischer Quencherwirkung nachwievor beeinflusst wird durch zufällige Diffusion wieder zu den Proteinen oder zum Lipid zurück. Dieser Effekt tritt jedoch bei einer wachsenden Menge an  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in den Hintergrund, da immer mehr  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff weit genug von der Membran wegdiffundiert, um von ihr nicht mehr beeinflusst zu werden. Der Anteil, der statistisch zufällig auf die Membran zurücktrifft und dort stärker gequencht wird als im  $\text{D}_2\text{O}$ , bewirkt die Vergrößerung der Rate gegenüber  $K_{\Delta, \text{D}_2\text{O}}^* = 0,0147 \mu\text{s}^{-1}$ .

In  $\text{H}_2\text{O}$  zeigt sich hingegen ein von Kap. 7.4 auf den ersten Blick abweichendes Bild, siehe Abb. 6.5. Anders als man nach den Messungen in  $\text{D}_2\text{O}$  erwarten würde, steigt die Rate über der Photofrininkubationskonzentration nicht von der Rate der Lipide an hin zur lösungsmittelbedingten Abklingrate von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in  $\text{H}_2\text{O}$ . Stattdessen zeigt sich ein umgekehrtes Verhalten. Bei wenig inkubiertem Photofrin ( $c_P < 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) ist die Abklingrate mit  $\beta_2^H \approx 0,25 \mu\text{s}^{-1}$  hoch, im Bereich der Abklingrate von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in  $\text{H}_2\text{O}$  oder aber vielleicht sogar der Proteine, dann sinkt die Rate mit steigender Photofrinkonzentration in den Bereich der Abklingrate von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in Phosphatidylcholin  $\beta_2^H \approx 0,1 \mu\text{s}^{-1}$ . Dies steht im Widerspruch zu der Annahme, daß bei wachsender Photofrinkonzentration immer mehr  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff entsteht und somit auch in das Lösungsmittel diffundiert, was bedeutete, daß das Lumineszenzsignal bei wachsender Photofrinkonzentration mehr und mehr lösungsmittelkontrolliert wäre. Vielleicht ist dieser Schluß jedoch zu kurz gedacht, da in der einfachen qualitativen Vorstellung die u.a. ratenabhängigen Gewichtungsfaktoren [vgl. Gl. (2.15)] der Signalbeiträge nicht berücksichtigt sind. Zudem muß man berücksichtigen, daß das Lumineszenzsignal aus den Zellsuspensionen sehr schwach war. Womöglich wäre ein Knick im Abklingverhalten sichtbar geworden, wenn das Detektionssystem noch sensibler wäre bzw. wenn nicht der starke Störpeak am zeitlichen Anfang der Meßkurven das Signal verfälscht hätte.

Auch lehrt das oben besprochene Beispiel der Lipidsuspensionen mit 5 mg/ml Phosphatidylcholin in  $\text{D}_2\text{O}$ , die keinen Knick im zeitlichen Lumineszenzverhalten sondern nur den  $\text{D}_2\text{O}$ -Beitrag zum Lumineszenzsignal zeigten, und denen mit 15 mg/ml Phosphatidylcholin in  $\text{D}_2\text{O}$ , wo ein deutlicher und gut auswertbarer Knick gefunden wurde, daß solch einfache Modellvorstellungen, wie sie in Kap. 7.4 vorgestellt wurden, nicht als pauschal gültig betrachtet werden dürfen. Man muß jedoch erwähnen, daß sich in den Lipidsuspensionen mit 15 mg/ml Phosphatidylcholin in  $\text{H}_2\text{O}$  tendenziell ein qualitativ ähnliches Verhalten zeigte, das der Modellvorstellung und dem Verhalten der Suspension in  $\text{D}_2\text{O}$  entgegengesetzt war.

Qualitativ lassen sich die gefundenen Meßdaten im Prinzip erklären. Eine Quantifizierung dieser Aussagen gestaltet sich aus mehreren Gründen schwierig. Die Membran einer Zelle ist ein komplexes Gebilde mit Strukturen, durchsetzt von zahlreichen biologischen Makromolekülen, vor allem den Proteinen. Es ist nicht eine einzelne Art von Proteinen, sondern es sind mehrere Hundert oder gar Tausend verschiedene, vermutlich alle mit unterschiedlichem Quench-Vermögen. Der Vergleich von Abklingraten aus diesem heterogenen Objekt mit denen von simplen, klar definierten Reinsubstanzen muß zwangsläufig stark qualitativ ausfallen. Das detektierte Lumineszenzlicht aus den Zellsuspensionen war zudem sehr schwach, so daß große Fehlerbalken das Bild zusätzlich undeutlich machen.

Die Kernaussage dieser Messungen besteht jedoch eindeutig darin, daß es mit dem hier benutzten Photomultiplier möglich ist,  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in der Plasmamembran direkt über seine Lumineszenz bei  $\lambda_\Delta = 1270 \text{ nm}$  nachzuweisen,



---

ohne daß die Meßkurven eine umständliche Nachbearbeitung wie beispielsweise in [OZM99] erforderten. Zur Auswertung wurden die rohen, unbearbeiteten Meßdaten und Fitkurven benutzt.

## 8. ZUSAMMENFASSUNG

Durch den Einsatz eines hochempfindlichen IR-Photomultipliers wurde das Verhalten von Photofrin-generiertem  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff in Deuteriumoxid( $D_2O$ )-Lösungen, in Phosphatidylcholin-Suspensionen in normalem Wasser  $H_2O$  und  $D_2O$  und in HT-29-Zellsuspensionen in  $H_2O$  und  $D_2O$  untersucht. Photofrin wurde gewählt, weil es zum gegenwärtigen Zeitpunkt (Mai 2001) der einzige in Deutschland medizinisch zugelassene Photosensibilisator ist.

Bei den Messungen der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz bei  $\lambda_{\Delta} = 1270$  nm in Photofrinlösungen in  $D_2O$  konnte durch die Variation der Konzentration von Sensibilisator, Sauerstoff und des Quenchers Natriumazid eine Kopplung des Triplett- $T_1$ -Zustands von Photofrin mit dem  $^1\Delta_g$ -Zustand von Sauerstoff nachgewiesen und weitgehend quantifiziert werden. Erstmals konnte auch der Anstieg der zeitlichen Lumineszenzkurven gemessen und ausgewertet werden. Trägt man die Anstiegs- und Abklingraten der  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff-Lumineszenz gegen die Sauerstoff- oder die Quencherkonzentration auf, so zeigt sich das für eine Kopplung typische Phänomen der „vermiedenen Kreuzung“ (*avoided crossing*) der Kurven. Diese Kopplung der genannten Zustände ist für die Photodynamische Tumorthherapie von Belang, da sie die Lebensdauer und somit die Reichweite von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff erhöht, was auch zu einer höheren Ausbeute dieser reaktiven Sauerstoffspezies führt.

Es wurde ein Ratengleichungssystem aufgestellt, das gegenüber dem üblicherweise für die Relaxation von  $^1\Delta_g$ -Sauerstoff verwendeten Schema [PS84] um einen Energierücktransferterm vom angeregten Sauerstoff zum Photofrin erweitert wurde. Dieses Modell beschreibt Anstiegs- und Abklingverhalten der Lumineszenz unter Variation von Photofrin- und Sauerstoffkonzentration sowie das Abklingverhalten der Meßkurven bei Zugabe von Natriumazid als Quencher. Es gelang, alle relevanten Ratenkonstanten des Modells quantitativ zu bestimmen. Lediglich beim Anstiegsverhalten unter Natriumazidzugabe versagt das Modell, das Photofrin näherungsweise als Reinsubstanz betrachtet, was es nicht ist. Eine exakte Quantifizierung dieser Kopplung erweist sich wegen der Derivatnatur von Photofrin als prinzipiell möglich, in der Praxis aber nur schwer umsetzbar. Hierzu müßte man die Triplett- $T_1$ -Zustände mehrerer dieser Derivatkomponenten geeignet berücksichtigen, was qualitativ einfach, quantitativ aber recht unpraktikabel ist. Es ließ sich aber im Prinzip zeigen, daß durch die Hinzunahme einer weiteren Komponente des Derivats Photofrin auch der Signalanstieg des zeitlichen Lumineszenzverhaltens bei Quencherzugabe beschreibbar ist.

Durch Messungen des zeitlichen Lumineszenzverhaltens von Singulett - Sauerstoff an Suspensionen des Lipids Phosphatidylcholin in  $H_2O$  und  $D_2O$ , die mit unterschiedlichen Konzentrationen an Photofrin versetzt waren, konnte gezeigt werden, daß sich aus einer Suspension Signalbeiträge aus beiden Phasen, den Phosphatidylcholin - Tröpfchen und dem Lösungsmittel, anhand ihrer Abklingraten in einem biexponentiellen Zerfall identifizieren lassen. Die zeitliche Lumineszenzkurve zeigte zwei überlagerte Abklingverhalten, von denen eines die schnellere Abklingrate in Phosphatidylcholin widerspiegelte und das zweite die langsamere Abklingrate in  $D_2O$ . Voraussetzung dafür war ein geeignet gewähltes Mengenverhältnis von Phosphatidylcholin zu  $D_2O$  in Suspension. Bei geringer Lipidzugabe blieb der Signalbeitrag aus dem Lipid unsichtbar, weil er zu klein gegenüber dem Beitrag aus dem  $D_2O$  war. Es konnte auch gezeigt werden, daß Diffusion von  $^1\Delta_g$  - Sauerstoff zwischen den beiden Phasen eine entscheidende Rolle spielt. Selbst wenn in der wäßrigen Phase kein  $^1\Delta_g$  - Sauerstoff erzeugt wird, so kann man dennoch anhand der umgebungscharakteristischen Zahlenwerte der Raten ein Abklingverhalten von Singulett - Sauerstoff in wäßriger Umgebung identifizieren. Dieses Signal wird bewirkt durch den Zerfall von  $^1\Delta_g$  - Sauerstoff, der zwar in der Lipid - Phase erzeugt worden ist, danach aber durch Diffusion in die  $D_2O$  - Phase gelangt ist. Zusätzlich wurden auch getrocknete Suspensionen, also wasserfreies Phosphatidylcholin mit Photofrin versetzt, untersucht. Die Lebensdauer von  $^1\Delta_g$  - Sauerstoff in Phosphatidylcholin wurde so zu  $\tau_L = 1/\beta_2^L = 11,0 \pm 0,4 \mu s$  bestimmt.

Es gelang auch erstmals, das zeitliche Lumineszenzverhalten von  $^1\Delta_g$  - Sauerstoff in HT-29 - Zellsuspensionen *in vitro* auf direktem optischem Wege nachzuweisen, ohne die Meßkurven aufwendig nachzubearbeiten und so das Risiko einer Verfälschung der Meßdaten einzugehen zu müssen. Aufbauend auf die Erkenntnisse, die in den Lipidsuspensionen gewonnen wurden, konnten bei den Zellsuspensionen Signalbeiträge aus dem Lipid der Plasmamembran, der wäßrigen Umgebung und möglicherweise sogar aus der Umgebung der Membranproteine identifiziert werden. Hier wurde dafür gesorgt, daß der Überstand, d.h. die wäßrige Umgebung der Zellen frei von Photofrin war, so daß  $^1\Delta_g$  - Sauerstoff nur durch Diffusion aus der Plasmamembran in die wäßrige Phase ( $H_2O$  bzw.  $D_2O$ ) gelangen konnte. Nach meinem Wissen ist dies das erste Mal, daß ein derartiger Nachweis gelungen ist.

Zu unterstreichen ist nochmals die hohe Infrarotempfindlichkeit bei kleinen Signalen und hervorragende Zeitaufösung des Photomultipliers Hamamatsu R5509-42 im Bereich der Lumineszenzwellenlänge  $\lambda_\Delta = 1270 \text{ nm}$  von  $^1\Delta_g$  - Sauerstoff, ohne dessen Leistungsfähigkeit die Ergebnisse dieser Arbeit, insbesondere in zellulärer Umgebung *in vitro*, nicht möglich gewesen wären.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [AMB88] M. Ahtar, H. Mukhtar, D. R. Bickers, *Differential role of reactive oxygen intermediates in photofrin-I- and photofrin-II- mediated photoenhancement of lipid peroxidation in epidermal microsomal membranes*, J. Invest. Derm., 90, 5, 1988
- [B76] D. Belluš, *Quenchers of singlet oxygen – a critical review*, erschienen in [RR78], 61-107, 1976
- [D53] D. L. Dexter, *A theory of sensitized luminescence in solids*, J. Chem. Phys. 21, 836, 1953
- [EAF98] B. Ehrenberg, J. L. Anderson, C. S. Foote, *Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by Hypericin in organic and biological media*, Photochem., Photobiol., 68(2), 135-140, 1998
- [EJM96] B. Ehrenberg, G. Jori, J. Moan (Editors), *Photochemotherapy: photodynamic therapy and other modalities*, SPIE, Washington, 1996
- [ET76] D. F. Evans, J. N. Tucker, *Reactivity of the  $(^1\Delta_g)_2$  and  $^1\Delta_g$  states of oxygen produced by direct laser excitation*, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2 72, 1661, 1976
- [F48] T. Förster, Phys. Chem. 2, 55, 1948
- [F85] A. A. Frimer (Herausgeber), *Singlet O<sub>2</sub>, I-IV*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida/USA 1985
- [FR98] J. Falbe, M. Reitz (Herausgeber), *Römpps Lexikon der Chemie, 10. Aufl.*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 3086, 1998
- [FSB97] S. Fickweiler, R. M. Szeimies, W. Bäuml, P. Steinbach, S. Karrer, A. E. Goetz, C. Abels, F. Hofstädter, M. Landthaler, *Indocyanine green: intracellular uptake and phototherapeutic effects in vitro*, J. Photochem., Photobiol., 38, 178-183, 1997
- [GK99] I. A. Gamaley, I. V. Klyubin, *Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions*, International Review of Cytology, 188, 203-255, 1999

- [HLM78] W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler (Herausgeber), *Biophysik, Ein Lehrbuch*, Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978
- [K84] D. Kessel, *Hematoporphyrin and HpD: photophysics, photochemistry and phototherapy (yearly review)*, Photochem., Photobiol, 39, 6, 851-859, 1984
- [K85] M. Kasha, *Singlet oxygen electronic structure and energy transfer*, erschienen in [F85], 1, 1985
- [K90] J. R. Kanofsky, *Quenching of singlet oxygen by human plasma*, Photochem., Photobiol., 51, 3, 299-303, 1990
- [K91] J. R. Kanofsky, *Quenching of singlet oxygen by human red cell ghosts*, Photochem., Photobiol., 53, 1, 93-99, 1991
- [K98] R. Kilger, *Lumineszenzspektroskopische Untersuchungen an Singulett-Sauerstoff in Lösungen*, Diplomarbeit, Universität Regensburg, 1998
- [KKM83] A. A. Krasnovsky jr, V. E. Kagan, A. A. Minin, *Quenching of singlet oxygen by fatty acids and lipids*, Febs. Letters, 155, 2, 1983
- [LB62] Landolt-Börnstein, *Zahlenwerte und Funktionen aus der Physik, II. Band, Eigenschaften der Materie in ihren Aggregatzuständen, 2. Teil Gleichgewichte aus Schmelzgleichgewichten, Bandteil b Lösungsgleichgewichte I*, Springer Verlag, Berlin, 1-20, 1-27, 1-33, 1-75, 1962
- [LRD83] D. Lichtenberg, R. J. Robson, E. A. Dennis, *Solubilization of phospholipids by detergents*, Biochimica et Biophysica Acta, 737, 285-304, 1983
- [LSP94] A. Leunig, F. Staub, J. Peters, A. Heimann, C. Csapo, O. Kempfski, A. E. Goetz, *Relation of early Photofrin uptake to photodynamically induced phototoxicity and changes of cell volume in different cell lines*, European Journal of Cancer, 30, 78-83, 1994
- [M93] Mager (Herausgeber), *Trivialnamen - Lexikon, Bd. 2 I-Z*, VCH Verlagsgesellschaft Berlin, Weinheim, 1282, 1993
- [MK72] P. B. Merkel, D. R. Kearns, *Radiationless decay of singlet oxygen in solution*, J. Am. Chem. Soc. 94, 7244, 1972
- [NMK72] R. Niesson, P. B. Merkel, D. R. Kearns, *Unambiguous evidence for the participation of singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) in photodynamic oxydation of amino acids*, Photochem., Photobiol. 16, 117, 1972
- [OS83] F. Oehme, P. Schuler, *ABC der Meß- und Analysetechnik, Gelöst-Sauerstoff-Messung*, Dr. Alfred Hüthig Verlag GmbH Heidelberg, 1983

- [OZM99] S. Oelckers, T. Ziegler, I. Michler, B. Röder, *Time-resolved detection of singlet oxygen luminescence in red-cell ghost suspensions: concerning a signal component that can be attributed to  $^1\text{O}_2$  luminescence from the inside of a native membrane*, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 53, 121-127, 1999
- [P68] C. A. Parker, *Photoluminescence in solutions*, Elsevier, Amsterdam, 1-2, 1968
- [P98] Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, 258. Auflage, 1712ff, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York, 1998
- [Phf98] Sanofi Pharmaceuticals, Inc., *Photofrin (porfimer sodium)*, Medikamentenpackungsbeilage, 1998
- [PS84] J. G. Parker, W. D. Stanbro, *Dependence of photosensitized singlet oxygen production of porphyrin structure and solvent*, Porphyrin localization and treatment of tumors, 259-284, Alan R. Liss, Inc., 1984
- [PT86] R. Pottier, T. G. Truscott, *The photochemistry of haematoporphyrin and related systems*, Int. J. Radiat. Biol., 50, 3, 421-452, 1986
- [RJ88] E. Reddi, G. Jori, *Steady-state and time-resolved spectroscopic studies of photodynamic sensitizers: porphyrins and phthalocyanines*, Rev. Chem. Interm., 10, 241-268, 1988
- [RR78] R. Rånby, R. Rabek, *Singlet oxygen, reactions with organic compounds and polymers*, Wiley & Sons, Chichester, 1978
- [S01] Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Telefonische Anfrage, Produktname L-alpha-Phosphatidylcholine, Produkt Nr. P3556, Steinheim, 2001
- [SD91] S. Silbernagl, A. Despopoulos, *Taschenbuch der Physiologie, 4. überarbeitete Auflage*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1991
- [SL94] R. M. Szeimies, M. Landthaler, *Mit Licht gegen Krebs*, Blick in die Wissenschaft, 5, 22, 1994
- [SKS96] R. M. Szeimies, S. Karrer, P. Steinbach, H. Messmann, M. Landthaler, *9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-( $\beta$ -methoxyethyl)-porphycene (ATMPn), a novel photosensitizer for photodynamic therapy – intracellular uptake and distribution in vitro*, in [EJM96], 1996
- [SG68] B. I. Stepanov, V. P. Gribkovskii, *Theory of Luminescence*, Iliffe Books (Engl. Ed.), 447, 1968
- [TGW84] C. Tanielian, L. Golder, C. Wolff, *Production and quenching of singlet oxygen by the sensitizer in dye-sensitized photo-oxygenations*, J. Photochem., 25, 117-125, 1984

- [THE88] C. Tanielian, G. Heinrich, A. Entezami, *Quenching of singlet oxygen by haematoporphyrin derivative (and haematoporphyrin) and its consequences on the efficiency of photodynamic cancer therapy*, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1197f, 1988
- [V90] K. P. C. Vollhardt, *Organische Chemie*, p. 1267, VCH Verlag, 2<sup>nd</sup> Edition, Weinheim, 1990
- [WGD76] K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, T. J. Dougherty, *Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor*, Cancer Research 36, 2326-2329, 1976
- [WHR95] F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross, *Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation*, J. Phys. Ref. Data, 24, 2, 1995
- [WO97] B. C. Wilson, M. Olivo, *Subcellular localization of Photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to Photofrin-mediated photodynamic therapy*, Photochem., Photobiol. 65, 166-176, 1997
- [WR95] J. M. Wessels, M. A. J. Rodgers, *Detection of the  $O_2(^1\Delta_g) \rightarrow O_2(^3\Sigma_g^-)$  transition in aqueous environments: a Fourier-transform near-infrared luminescence study*, J. Phys. Chem., 99, 15725-15727, 1995
- [YB76] R. H. Young, D. R. Brewer, *The mechanism of quenching of singlet oxygen*, erschienen in [RR78], 6-47, 1976





## GE – DANK! – EN

Folgenden Personen möchte ich meinen persönlichen Dank aussprechen, ohne die diese Arbeit nicht so verlaufen wäre wie sie ist:

Herrn Prof. Dr. Max Maier für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl, dafür, daß er mir die Möglichkeit gab, zu promovieren, und für die entgegenkommende, doch stets kritische Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Bäumler von der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg, für stundenlange ergiebige Diskussionen fachlicher und gelegentlich auch anderer Art. Ihm sei stellvertretend für die Klinik ebenso gedankt für die Bereitstellung der erforderlichen Substanzen.

Herrn Dipl. Phys. Roland Engl, der mir in der täglichen Laborarbeit mehrmals mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhls für ihre freund(schaft)liche und sachkundige Unterstützung bei den verschiedensten Fragestellungen.

Den Teilnehmern unserer mittäglichen Schafkopfrunde in der Cafeteria, die reichlich Farbe in das Alltagsgrau brachte, und die mithilfe, immer wieder den nötigen Abstand zu gewinnen.

All meinen Freunden, denen ich zu vielerlei Dank verpflichtet bin. Hier möchte ich insbesondere Herrn Markus Zollner hervorheben, der mir fernab der Universität in wesentlichen Fragen des Lebens brüderlich zur Seite stand.

Mein größter Dank jedoch gilt meiner Ehefrau Helene Kilger, die alle Entbehrungen mit mir teilte, für ihre Geduld und ihr Verständnis, wenn vor lauter Promovieren wieder einmal zu wenig Zeit für die Familie blieb, und für ihre Liebe und Stärke, mit der sie mich aufrecht hielt und mir den Weg nach vorne zeigte. Hier möchte ich auch an meine vierjährige Tochter Regina denken, die die Zeit und Aufmerksamkeit ihres Papas nur höchst ungern mit Lasern, Computern und dem ganzen unverständlichen Kram teilte. Was ihr an der Universität am besten gefiel war im Sommer der Teich bei der Bibliothek mit den Enten, die wir gemeinsam fütterten. Ihr soll das abschließende Wort dieser Arbeit gehören:

„Ich will aber nicht, daß du heute zur Uni gehst, Papa!“