

Spektroskopische Untersuchungen zur Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Biomolekülen, Bakterien und Zellen



Dissertation

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

vorgelegt von
Johannes Regensburger
aus Regensburg

März 2010

Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 25.01.2010

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. W. Bäuml

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. G. Bali

1.Gutachter: Prof. Dr. W. Bäuml

2.Gutachter: Prof. Dr. A. Penzkofer

weiterer Prüfer: Prof. Dr. J. Repp

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Bedeutung und Geschichte des Singulett-Sauerstoffs	7
1.2	Aufgabenstellung	12
2	Theoretische Grundlagen	15
2.1	Farbstoff	15
2.2	Sauerstoff	19
2.3	Auswahlregeln	23
2.4	Intermolekularer Energietransfer	24
2.4.1	Strahlender intermolekularer Energietransfer	24
2.4.2	Nichtstrahlender intermolekularer Energietransfer	25
2.5	Photodynamischer Mechanismus, Typ I / Typ II -Reaktionen	28
2.6	Oxidation von Lipiden und Proteinen	29
2.7	Diffusion und Fick'sche Gesetze	34
2.8	Modell zur Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff . . .	37
2.8.1	Ohne Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} = 0$)	40

2.8.2	Mit Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} > 0$)	41
2.8.3	Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten	43
2.9	Das Quenchen von Singulett-Sauerstoff	46
3	Experimentelle Methoden und Materialien	49
3.1	Versuchsaufbau und Messgeräte	49
3.2	Auswertung der Messergebnisse	57
3.3	Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie	59
3.4	verwendete Photosensibilisatoren	61
3.4.1	TMPyP	61
3.4.2	XF73	63
3.4.3	Perinaphthenon	64
4	Singulett-Sauerstoff-Interaktion in reinen Lösungen	67
4.1	Lumineszenzsignale	68
4.2	Nachweismethoden	70
4.2.1	Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten	70
4.2.2	Spektrale Auflösung	72
4.2.3	Kombination aus zeitlich und spektral aufgelösten Messungen	73
4.2.4	Quenchen	74
4.3	Singulett-Sauerstoff in Wasser	75
4.3.1	XF73 in Wasser	75
4.3.2	TMPyP in Wasser	81
4.4	Singulett-Sauerstoff in Ethanol	84
4.4.1	TMPyP in Ethanol	85

4.4.2	Perinaphthenon in Ethanol	88
4.4.2.1	Photostabilität	88
4.4.2.2	Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten	93
4.5	Übersicht über die Ergebnisse	97
5	Singulett-Sauerstoff-Interaktion mit Biomolekülen	99
5.1	Materialien	100
5.1.1	Proteine	100
5.1.2	Fettsäuren	102
5.2	TMPyP mit Proteinen	106
5.2.1	Sauerstoffverbrauch	106
5.2.2	Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten bei Albumin-TMPyP-Gemischen	109
5.3	TMPyP mit Fettsäuren	112
5.3.1	Sauerstoffverbrauch	113
5.3.2	Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten bei Fettsäure-TMPyP-Gemischen	115
5.4	Perinaphthenon mit Fettsäuren	118
5.4.1	Sauerstoff-Verbrauch	118
5.4.2	Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten bei Fettsäure-PN-Gemischen	121
5.5	Fettsäuren unter UVA-Bestrahlung	126
5.5.1	zeitlich und spektral aufgelöste Lumineszenz	126
5.5.2	Sauerstoffverbrauch	129

5.5.3	Abhängigkeit der Absorption von der UVA-Bestrahlungszeit	130
5.5.4	Abhängigkeit der Lumineszenz von der UVA-Bestrahlungszeit	132
5.5.5	HPLC-Messungen	136
5.6	Zusammenfassung und Interpretation der Messergebnisse	137
6	Verbesserungen der Singulett-Sauerstoff-Detektion	143
6.1	Messprobleme durch den Sauerstoffverbrauch	144
6.2	Optische Filter	146
6.3	Streuexperimente	150
6.4	Rühren und Diffusion	152
6.5	Bedeutung der Raten und deren Interpretation	154
7	Singulett-Sauerstoff-Interaktion mit Zellen und Bakterien	157
7.1	Material und Methoden	159
7.1.1	Aufbau von eukaryotischen und prokaryotischen Zellen	159
7.1.2	Herstellung der Zell- und Bakteriensuspensionen für Lokalisations- und Lumineszenzmessungen	166
7.2	TMPyP in eukaryotischen Zellen	168
7.2.1	Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen	168
7.2.2	Lumineszenzmessungen	169
7.3	XF73 mit Zellen	172
7.3.1	Fluoreszenzaufnahmen	172
7.3.2	Lumineszenzmessungen	172
7.4	TMPyP und XF73 in Bakterien	175

7.4.1	Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen	175
7.4.2	Lumineszenzmessungen	176
7.5	Sauerstoffverbrauch	180
7.6	Interpretation der Messergebnisse bei Eukaryoten und Prokaryoten .	181
8	Zusammenfassung der Ergebnisse	187
	Literaturverzeichnis	191

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Bedeutung und Geschichte des Singulett-Sauerstoffs

Radikale

Radikale werden immer öfter in Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener Krankheiten, vor allem Arteriosklerose und Krebs, erwähnt. Fortwährend ist in der Presse von Radikalen in Lebensmitteln oder erzeugt durch Umwelteinflüsse, wie Zigarettenrauch oder UV-Strahlung, zu lesen. Dabei werden diese aber auch im Körper bei einer Überlastung der Stoffwechselprozesse in Mitochondrien oder von Lymphozyten zur Keimabwehr produziert [42]. Es gibt daher eine Vielzahl von möglichen Radikalen und deren Erzeugung. Radikale sind Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte (freie) Elektronen besitzen.

Sauerstoff-Radikale und Singulett-Sauerstoff

Eine Untergruppe der Radikale sind die Sauerstoff-Radikale; diese bilden zusammen mit dem Singulett-Sauerstoff die Gruppe der reaktiven Sauerstoff-Spezies (reactive oxygen species, ROS). Den ROS gilt ein besonderes Interesse, da sie im menschlichen Körper ganz natürlich während der Energieerzeugung, aber auch durch äußere Einflüsse, wie UV-Strahlung, entstehen [64].

In aeroben Organismen entstehen reaktive Sauerstoffspezies in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung, aber auch durch Immunzellen, um so Viren und Bakterien zu schädigen. Zu den ROS gehören neben Singulett-Sauerstoff auch die bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser auftretenden Zwischenprodukte, wie Hyperoxid-Anionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale. ROS (vor allem Wasserstoffperoxid und Stickstoffmonoxid) kommen auch bei der pflanzlichen Abwehr von Pathogenen zum Einsatz [19] ("oxidative burst"). Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über häufig vorkommende ROS.

Formel	Bezeichnung	Anmerkung
$O_2^- \cdot$	Hyperoxid-Anion	freies Radikal, alte Bezeichnung: Superoxid-Anion
$HO \cdot$	Hydroxyl-Radikal	freies Radikal, hochreaktiv
$HOO \cdot$	Perhydroxyl-Radikal	freies Radikal
$ROO \cdot$	Peroxyradikal	freies Radikal
$RO \cdot$	Alkoxyradikal	freies Radikal, bei Lipiden
H_2O_2	Wasserstoffperoxid	Edukt zur Bildung weiterer ROS
$ROOH$	Hydroperoxid	instabil, Edukt zur Bildung weiterer ROS
O_3	Ozon	starkes Oxidationsmittel
$NO \cdot$	Stickstoffmonoxid	freies Radikal
1O_2	Singulett-Sauerstoff	angeregtes Sauerstoffmolekül, hochreaktiv

Tabelle 1.1: Übersicht über verschiedene reaktive Sauerstoffspezies

Warum sind reaktive Sauerstoff-Spezies gefährlich?

ROS sind in der Lage eine Vielzahl zellulärer Verbindungen zu schädigen. Von besonderer Bedeutung dabei sind mögliche Schädigungen der Basen von Nucleinsäuren (v.a. Thymin und Guanin), die letztendlich die Veränderung der Chromosomen und damit des Erbguts nach sich ziehen können [73]. Auch Proteine können durch Radikale angegriffen werden. Durch eine Veränderung der Proteine z.B. in Enzyme

kann deren Aktivität drastisch reduziert werden. Während Kohlenhydratverbindungen kaum durch Sauerstoffradikale geschädigt werden, treten bei Lipiden häufig Schädigungen auf. Lipide, Hauptbestandteil von Zellmembranen, sind auf Grund ihrer Doppelbindungen bei den ungesättigten Fettsäuren leicht zu oxidierenden und daher besonders anfällig für Schädigungen durch ROS [35].

Das Sauerstoff-Molekül

Disauerstoff O_2 , das Sauerstoffmolekül, enthält zwei ungepaarte Elektronen und bildet sich im Magnetfeld als paramagnetisches Triplett ab. Trotz der formalen Bindungsordnung "zwei" lässt sich keine entsprechende korrekte Valenzstrichformel für O_2 angeben. $\langle O=O \rangle$ bringt den Doppelbindungscharakter zum Ausdruck, ignoriert aber sowohl die besetzten antibindenden Orbitale als auch den Radikalcharakter. Die Schreibweise $\cdot O-O \cdot$ wird verwendet, um die biradikalischen Eigenschaften hervorzuheben, deutet jedoch nur eine Bindungsordnung von eins an. Um die Bindungsordnung zwei und den radikalischen Charakter anzudeuten, sollte die Darstellung $\langle O \div O \rangle$ mit Radikalpunkten auf dem Bindungsstrich verwendet werden.

Allerdings ist die Reaktionsfähigkeit dieses Biradikals beschränkt, da das Prinzip von der Erhaltung des Spins bei chemischen Reaktionen in den meisten Fällen zuerst eine Anregung zu Singulett-Sauerstoff erfordert. So folgerte bereits 1928 Robert S. Mullikan, dass die Sauerstoffmoleküle einen Triplett-Grundzustand besitzen und erklärte damit den von Faraday 1848 beobachteten Paramagnetismus des Sauerstoffs.

Singulett-Sauerstoff

Des weiteren behauptete Mullikan, dass Sauerstoffmoleküle zwei relative niedrig liegende Singulett-Zustände aufweisen [57, 58]. Der höhere der beiden Zustände war zu diesem Zeitpunkt bereits bekannt, auf Grund der Beobachtung der dunkelroten Fraunhofer Linie bei 762 nm im Spektrum der Sonne. Der niedrigere Zustand wurde 1933-34 als neues Band im Absorptionsspektrum der Erdatmosphäre und von flüssigem Sauerstoff bei ca. 1270 nm entdeckt [22, 78].

Da in der Gasphase nur eine sehr schwache Intensität des Triplett-Singulett Übergangs beobachtet wurde, folgerte Michael Kasha, dass der Übergang vom Triplett- in den Singulett-Zustand quantenmechanisch verboten ist, da der Spin, die Sym-

metrie und der Bahndrehimpuls nicht erhalten werden [38]. Dies verursacht eine außerordentliche Metastabilität des Singulett-Zustands, die zu einer für chemische Reaktionen langen Lebensdauer führt.

Bereits 1931 schlug Hans Kautsky vor, dass Singulett-Sauerstoff-Moleküle durch Energietransfer von angeregten Farbstoff-Molekülen (Photosensibilisatoren) erzeugt werden kann. Außerdem stellte er fest, dass Sauerstoff sowohl die Fluoreszenz, als auch die Phosphoreszenz quenchen (verkürzen, auslöschen) kann [40, 41]. Für die Fluoreszenz konnte der quenchende Effekt nahezu vernachlässigt werden, wohingegen die Phosphoreszenz bereits durch sehr geringe Sauerstoff-Konzentrationen unterdrückt werden konnte [39]. Damit konnten erstmals die Wirkungsweise der photodynamischen Therapie (PDT) erklärt werden. Bei dieser werden Zellen mit einem Farbstoff inkubiert und mit Licht bestrahlt, so dass der Zelltod durch Oxidation der Zellbestandteile eintritt. Erstmal beobachtet wurde dieser Effekt 1905 durch Hermann von Tappeiner, der damit die praktische Photodynamik begründete. Durch Kautskys Überlegungen wurde die PDT auf physikalische Grundlagen gestellt und konnte nun effektiver angewandt werden.

Aleksander Jablonski setzte 1933-1935 voraus, dass es mindestens zwei unterschiedliche angeregte Zustände von Farbstoffmolekülen gibt, einen kurzlebigen Fluoreszenz-Zustand (S_1 -Zustand) und einen metastabilen langlebigen Phosphoreszenz-Zustand (T_1 -Zustand) [29]. Theoretisch ist daher durch ein angeregtes Farbstoffmolekül im S_1 -Zustand zweimal eine Anregung vom Sauerstoff-Grundzustand in den Singulett-Zustand möglich, einmal durch die Relaxation des Farbstoffs von S_1 - in den T_1 -Zustand, das zweite mal durch die Relaxation vom T_1 - in den S_0 -Grundzustand. Da aber die Lebensdauer des S_1 -Zustands zu kurz ist, um eine effektive Anregung zu erreichen, erfolgt die Anregung des Sauerstoffs hauptsächlich durch die Relaxation des Farbstoffs vom Triplett-Zustand in den Grundzustand [72].

Der Nachweis von Singulett-Sauerstoff kann mittels des strahlenden Übergangs in den O_2 -Grundzustand erfolgen und gilt als direkter Nachweis. Ein indirekter Nachweis ist durch den chemischen Nachweis von durch Singulett-Sauerstoff oxidierten Produkten, wie Hydroperoxiden, möglich. Der erste direkte Nachweis von gelöstem Singulett-Sauerstoff, also die Detektion der Lumineszenz bei 1270 nm im Lösungsmit-

tel, gelang Alexander A. Krasnovsky jr. 1976 unter Verwendung eines selbstgebauten Phosphorimeters und der Anregung des Sauerstoffs durch verschiedene Chlorophyll-Derivate in Tetrachlormethan. Seine Beobachtungen erfolgten knapp über der Detektionsgrenze, da sein Photomultiplier nur eine niedrige Empfindlichkeit für Strahlung längerwellig als 1100 nm besaß [32].

Durch Messungen mit gepulsten Lasern konnten zeitaufgelösten Messungen der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz mit spektralen Messungen kombiniert werden. Dies führte zu einer vermehrten Anwendung in der Photochemie und Photobiologie.

Der indirekte Nachweis von Singulett-Sauerstoff durch Reaktionsprodukte wie Hydroperoxide hat den entscheidenden Nachteil, dass das Ergebnis nicht eindeutig ist, also die Endprodukte auf andere Wege als durch die Oxidation durch Singulett-Sauerstoff entstanden sein können. Auch ist eine zeitliche Auflösung beim chemischen Nachweis von Singulett-Sauerstoff nicht möglich.

So konnten durch zeitaufgelöste Lumineszenzmessungen die Einflüsse von Quenchern und Lösungsmittel auf die Singulett-Sauerstoff-Generierung bestimmt werden, ebenso wie die Effekte von zelleigenen Substanzen. Auch wurden Unterschiede in der Singulett-Sauerstoff-Generierung entdeckt. So ist es zum Beispiel bei einem hohen Sauerstoff-Partialdruck und unpolaren Lösungsmitteln wie CCl_4 möglich durch den energetisch höheren, sehr kurzlebigen Singulett-Zustand des Farbstoffs (130 ns in CCl_4 , 6,5 ps in H_2O) Singulett-Sauerstoff zu erzeugen [33]. Sensibilisatoren für diese Art der Singulett-Sauerstoff-Erzeugung (Anregung durch den Farbstoff- S_1 -Zustand) sind diverse polyaromatische Kohlenwasserstoffe, wie Pyren oder Anthrazen, die nur in unpolaren Flüssigkeiten gelöst werden können, aber auch bestimmte Carotinoide, die in biologischen Systemen vorkommen [3, 11–13, 68, 69].

Auch eine chemische Erzeugung von Singulett-Sauerstoff als Folgeprodukt von primären Radikalen ist möglich (Typ I-Mechanismus, vgl. Kapitel 2.5). Diese läuft jedoch um einiges schneller ab (ns-Bereich) [2] als eine photophysikalische Singulett-Sauerstoff-Erzeugung und es kann somit in zeitaufgelösten Lumineszenz-Messungen eindeutig zwischen der schnelleren chemischen und der langsameren photophysikalischen Generierung von Singulett-Sauerstoff unterschieden werden.

Der direkte Nachweis des Singulett-Sauerstoffs mittels Lumineszenzspektroskopie

hat somit einige Vorteile gegenüber dem indirekten Nachweis durch Folgeprodukte, jedoch ist es schwierig die Lumineszenz bei 1270 nm nachzuweisen. In polaren Lösungsmitteln wie Wasser oder Ethanol ist die Lebensdauer der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz nur wenige Mikrosekunden und nur etwa jeder zehnmillionste Übergang eines Singulett-Sauerstoff-Moleküls ist ein strahlender Übergang. Es sind daher besonders leistungsfähige Detektoren mit einer ns-Zeitauflösung im Infrarot-Bereich notwendig. Bis zum Ende des letzten Jahrtausends standen aber nur Germanium-Detektoren mit geringer Sensitivität im Infrarot-Bereich und Messaufbauten mit einer Zeitauflösung von mehreren Mikrosekunden zur Verfügung.

Es erfolgten laufend Verbesserungen im Bereich der Detektoren bis hin zur Entwicklung von hochempfindlichen Photomultipliern auf InP/InGaAsP-Basis mit einer Zeitauflösung von unter 30 ns, des weiteren eine Optimierung der Lichtquellen, wie Laser mit kürzeren Pulsdauern und höheren Frequenzen, und immer schnelleren Zähleinrichtungen, mit einer Auflösung im ns-Bereich. Die Auflösung im ns-Bereich ist insofern wichtig, da sich in biologischen Systemen die Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer enorm verkürzen kann und die Lumineszenzsignale einen sehr kurzen Anstieg aufweisen. Für eine Interpretation der Lumineszenzsignale ist die Anstiegs- und Abklingdauer der Lumineszenz von großer Bedeutung. Erst durch all diese Verbesserungen ist es heutzutage möglich, Singulett-Sauerstoff nicht nur in einfachen Lösungsmitteln, sondern auch *in vitro*, das heißt in Zellsuspensionen lebender Zellen, und *in vivo*, also direkt aus lebendem Gewebe, wie menschlicher Haut [8], mittels zeitlich und spektral aufgelöster Lumineszenz direkt nachzuweisen.

1.2 Aufgabenstellung

Singulett-Sauerstoff spielt in der photodynamischen Tumorthherapie und in Zukunft auch bei Inaktivierung von multiresistenten Bakterien die tragende Rolle. In der Photodynamik wird Singulett-Sauerstoff durch Energietransfer von lichtangeregten Photosensibilisatoren erzeugt. Befindet sich der Photosensibilisator während der Lichtanregung in ausreichender Konzentration in Tumorzellen oder Bakterien, werden diese durch den hochreaktiven Singulett-Sauerstoff äußerst effektiv zerstört.

Zur Optimierung dieses photodynamischen Prozesses ist der Nachweis von Singulett-Sauerstoff von entscheidender Bedeutung. Trotz der geringen Quantenausbeute, ist die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff der einzige direkte Nachweis dieser reaktiven Sauerstoffspezies. Die Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in einfachen Lösungsmitteln ist inzwischen gut verstanden. Ein wesentlicher Parameter bei diesen Prozessen blieb bisher häufig unberücksichtigt: die Sauerstoff-Konzentration. Die Effizienz der Singulett-Sauerstoff-Erzeugung und damit auch die Effizienz der photodynamischen Zerstörung von Tumorzellen oder Bakterien wird aber entscheidend durch die Sauerstoff-Konzentration am Ort seiner Erzeugung beeinflusst.

In einfachen Lösungsmitteln ist die Sauerstoff-Konzentration durch den Einsatz von Mikrooptoden noch leicht bestimmbar, während dies in geschlossenen Systemen wie Zellen oder Bakterien mit einer Größe von wenigen Mikrometern derzeit unmöglich ist. Hier könnte das Lumineszenzsignal von Singulett-Sauerstoff Abhilfe schaffen. Zum einen dient es als Nachweis von Singulett-Sauerstoff, zum anderen reagiert die zeitliche Form des Signals sensitiv auf die jeweilige Sauerstoff-Konzentration. Allerdings muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass das Lumineszenzsignal auch noch durch Quencher-moleküle wie Proteine, die in Zellen und Bakterien reichlich vorhanden sind, beeinflusst wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff in Abhängigkeit der jeweiligen Sauerstoff-Konzentration zu untersuchen. Zum Einsatz kamen dabei gleichzeitig Photosensibilisatoren, die für photodynamische Inaktivierung von multiresistenten Bakterien neu entwickelt oder neu in Betracht gezogen wurden. Die Experimente wurden zunächst in einfachen Lösungen begonnen, um mit den dort erzielten Ergebnissen die komplexeren Systeme wie Zellen und Bakterien besser untersuchen zu können. Die Sauerstoff-Konzentration kann zudem durch Reaktion des erzeugten Singulett-Sauerstoffs mit zellulären Bestandteilen wie Proteinen und Fettsäuren vermindert werden. Dies wiederum beeinflusst die laufende Singulett-Sauerstoff Erzeugung. Deswegen wurden zusätzlich in die einfachen Lösungen Zellbestandteile zugegeben und die Veränderungen der Lumineszenzsignale gemessen. Für die Untersuchungen mit Fettsäuren werden aus den am häufigsten im menschlichen Organismus vorkommenden vier ungesättigte und eine gesättigte Fettsäuren

ausgewählt. Bei den zugesetzten Proteinen werden vier natürlich vorkommende ausgewählt mit möglichst unterschiedlichen Molekulargewichten.

In einem Zwischenschritte wurde es notwendig, den Messaufbau der Lumineszenzdetektion weiter zu optimieren, da die Lumineszenzsignale aus lebenden Zellen oder Bakterien als klein angenommen wurden. Nach diesem Optimierungsschritt werden dann die Untersuchungen an Zellen und Bakterien vorgestellt.

Ausgehend von den gewonnenen Erkenntnissen werden die Signale aus eukaryotischen Zellen untersucht und entsprechend ausgewertet. Dabei soll die Lokalisation verschiedener Farbstoffe in den Zellen durch fluoreszenzmikroskopische Bilder untersucht werden. Durch den Vergleich der Fluoreszenzbilder mit der von der Lokalisation abhängigen Singulett-Sauerstoff Lumineszenz sollen weitere Erkenntnisse über die Vorgänge bei der Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in Zellen erhalten werden. Auch wird erstmals bei allen *in vitro*-Experimenten die Sauerstoff-Konzentration in der Lösung mitgemessen, um den Sauerstoff-Verbrauch zu bestimmen, und gegebenenfalls verändert, um die Lumineszenzsignale eindeutig auswerten zu können.

Zusätzlich zu den eukaryotischen werden auch prokaryotische Zellen untersucht. Dabei werden die Unterschiede in der Größe und im Aufbau der Zellen betrachtet und die Veränderungen in den Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzmessungen ausgewertet. Im Gegensatz zu den bisherigen Messungen [7, 31, 45] soll die Sauerstoff-Konzentration während den Messungen protokolliert werden und die Abhängigkeit der Lumineszenz von der Sauerstoff-Konzentration ermittelt werden. Die Untersuchungen erfolgen an Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, wofür *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme ausgewählt werden. Diese werden wieder mit verschiedenen Farbstoffen inkubiert und der Einfluss der Struktur der Bakterien auf die Farbstoff-Aufnahme und die Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz untersucht.

Bei all diesen Substanzen bzw. Organismen werden die Anstiegs- und Abklingraten der Lumineszenzsignale und der Sauerstoffverbrauch bestimmt, um einen tieferen Einblick in die ablaufenden chemischen und physikalischen Prozesse zu erhalten.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

2.1 Farbstoff

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurden bei der ersten direkten Detektion von Singulett-Sauerstoff in Lösungsmitteln Chlorophyllmoleküle in Tetrachlormethan durch Licht angeregt. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl weiterer Farbstoffe gefunden, die in verschiedenen Lösungsmitteln und bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen Singulett-Sauerstoff erzeugen können. Viele dieser lichtaktiven Farbstoffmoleküle, die auch Photosensibilisatoren genannt werden, besitzen delokalisierte Elektronen in bindenden π -Orbitalen, darunter die Gruppe der Porphine, die alle ein Ringsystem mit 18 delokalisierten π -Elektronen gemeinsam haben, den in Abbildung 2.1 in zwei mesomeren Grenzstrukturen dargestellten Prophin-Ring.

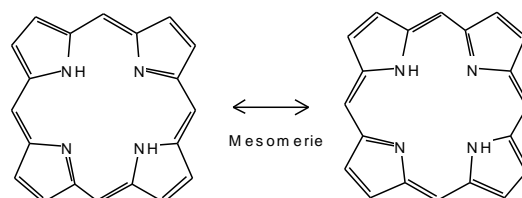


Abbildung 2.1: *Strukturformel des Porphin-Rings, dargestellt in beiden mesomeren Grenzstrukturen*

In bindenden Orbitalen liegen die Elektronen normalerweise mit antiparallelem Spin vor - eine Anordnung, die die sogenannten Singulett-Zustände charakterisiert (S_0 , S_1 , S_2). Durch die Absorption eines Photons im sichtbaren Spektralbereich geht das Farbstoffmolekül vom S_0 -Grundzustand in einen angeregten Singulett-Zustand über, häufig in den S_1 -Zustand, der zusätzlich, auf Grund des Franck-Condon-Prinzips (Abbildung 2.2), schwingungsangeregt ist.

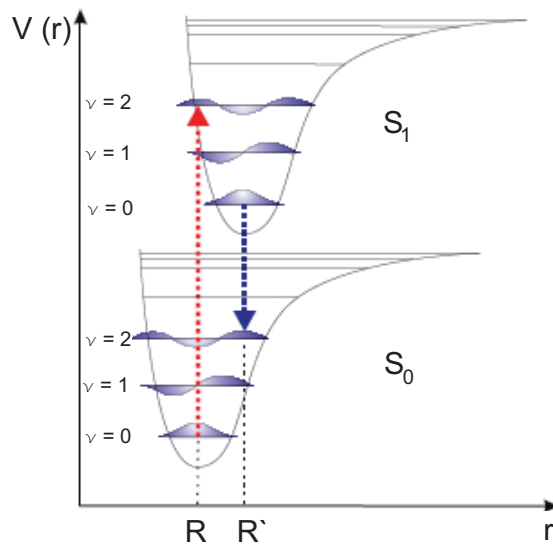


Abbildung 2.2: Anregung und Deaktivierung von Singulett-Zuständen mit unterschiedlichen Kernabständen R und R' . Sowohl bei der Anregung in den S_1 -Zustand als auch bei der Relaxation in den S_0 -Zustand entstehen schwingungsangeregte Zustände ($\nu = 2$) [70].

Innerhalb weniger Pikosekunden [10] relaxiert dieser Zustand in den S_1 -($\nu=0$)-Zustand. Durch strahlende (Fluoreszenz) oder nichtstrahlende Relaxation (Internal Conversion, IC) ist der Übergang in den S_0 -Grundzustand möglich.

Da die Fluoreszenz nur aus dem S_1 -($\nu=0$)-Zustand erfolgt (Regel von Kasha) ist das Emissionsspektrum der Fluoreszenz gegenüber dem Absorptionsspektrum rotverschoben (Stokes-Shift, Abbildung 2.3).

Wie aus der Fluoreszenz-Lebenszeit-Mikroskopie (Fluorescence lifetime imaging,

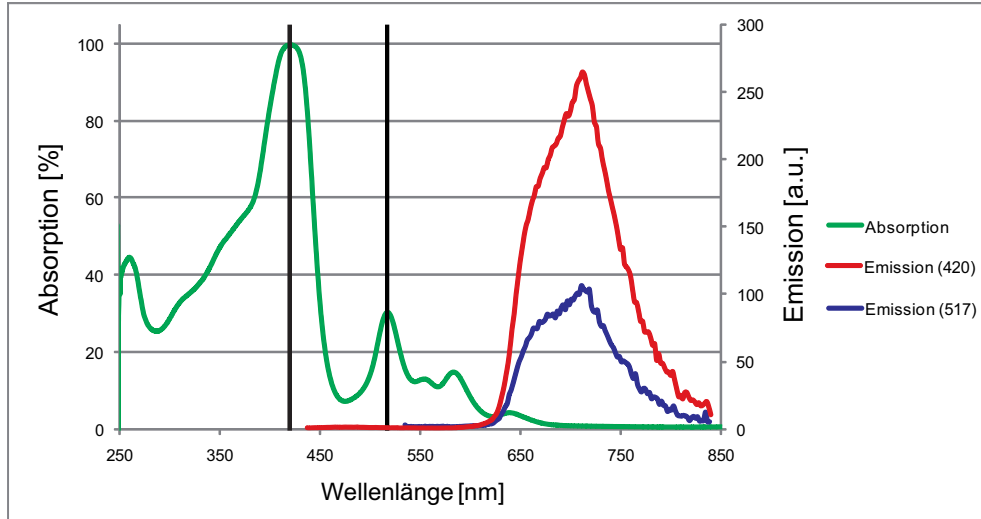


Abbildung 2.3: Spektren des Referenzfarbstoffs TMPyP. Das Absorptionsspektrum ist grün eingezeichnet, das Emissionsspektrum durch die Anregung bei 420 nm ist rot, das durch die Anregung bei 517 nm ist blau eingezeichnet. Zusätzlich sind die Anregungswellenlängen bei 420 und 517 nm als schwarze Linien angedeutet. Deutlich zu erkennen ist die Verschiebung des Maximums der emission gegenüber der Absorption (Stokes-Shift)

FLIM) [60] bekannt, beträgt die Lebensdauer des angeregten S_1 -Zustands in der Regeln nur wenige Nanosekunden. Daher ist die Wahrscheinlichkeit eines Energieübertrags von einem Farbstoffmolekül im S_1 -Zustand auf ein anderes Moleküle sehr gering [2]. Neben der strahlenden oder der nichtstrahlenden Relaxation von angeregten S_n -Zuständen in den S_0 -Grundzustand, ist durch einen Wechsel der Spin-Multiplizität, der sogenannten Interkombination (Intersystem Crossing, ISC), ein Übergang aus einem Singulett-Zustand in einen Triplett-Zustand möglich. Dieser Übergang ist zwar quantenmechanisch verboten, jedoch ermöglicht die Spin-Bahn-Kopplung, das Ausbilden von Ringströmen im Farbstoffmolekül, Stöße mit dem Lösungsmittel und der Schweratomeffekt die Aufhebung dieses Verbotes [67].

Im Allgemeinen geht das Farbstoffmolekül in einen schwingungsangeregten T_1 -Zustand über, der wiederum nichtstrahlend schnell in den T_1 -($\nu=0$)-Zustand relaxiert. Der Übergang in den S_0 -Grundzustand ist strahlend (Phosphoreszenz) oder nichtstrahlend durch Interkombination (ISC) möglich. Dieser Übergang ist wieder spinverboten, wodurch der T_1 -Zustand metastabil ist und gegenüber dem S_1 -Zustand

eine deutlich längere Lebensdauer von bis zu mehreren μs hat [30].

Eine Übersicht über die Zustände und die beteiligten Übergänge ist in Abb. 2.4, einem Jablonski-Diagramm, dargestellt.

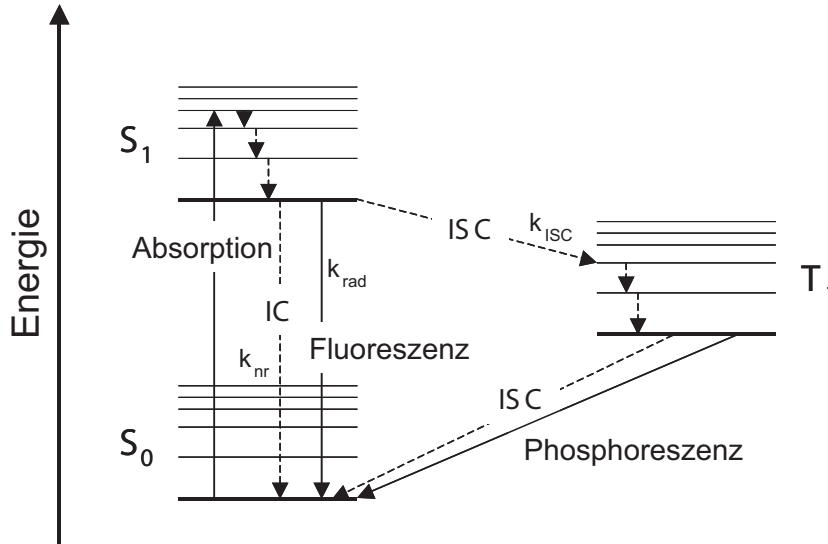


Abbildung 2.4: *Jablonski-Diagramm für die Anregung und die Relaxationswege eines Photosensibilisators. Eingetragen sind der Singulett-Grundzustand S_0 , der erste angeregte Zustand S_1 , sowie der erste angeregte Triplett-Zustand T_1 . Zu allen diesen elektronischen Zuständen existieren zusätzliche schwingungsangeregte Zustände, die durch dünne Linien angedeutet sind. Strahlungslose Übergänge wie die Relaxation zwischen den schwingungsangeregten Zuständen, interne Konversion (IC) und Interkombination (ISC) sind durch gestrichelte Pfeile, strahlende Übergänge, wie Absorption, Fluoreszenz und Phosphoreszenz sind mit durchgezogenen Pfeilen eingezeichnet. Zusätzlich sind die Raten für die Entvölkerung des S_1 -Zustands für die strahlende (k_{rad}) und die nichtstrahlende (k_{nr}) Deaktivierung und die Rate für den Übergang in den T_1 -Zustand (k_{ISC}) eingetragen. [2]*

Die Deaktivierung des S_1 -Zustands mit der Gesamtrate k ist gegeben durch: $k = k_{\text{rad}} + k_{\text{nr}} + k_{\text{ISC}}$. Dadurch lässt sich die Triplett-Ausbeute Φ_T definieren zu: $\Phi_T = k_{\text{ISC}} / (k_{\text{rad}} + k_{\text{nr}} + k_{\text{ISC}})$. Diese gibt den Anteil der angeregten Farbstoffmoleküle an, die in den T_1 -Zustand übergehen.

2.2 Sauerstoff

Die Linearkombination der Orbitale eines homonuklearer Moleküls mit zwei Atomen, wie dem Sauerstoff O_2 , hat immer die Form $\Phi = \Phi_1 \pm \Phi_2$, wobei Φ_i die Wellenfunktion des Atoms i darstellt. Für das Plus-Zeichen liegt ein bindendes Orbital, für das Minus-Zeichen ein anti-bindendes Orbital vor. Abbildung 2.5 gibt in der ersten Spalte an welche Atomorbitale der Sauerstoffatome kombiniert werden, die zweite zeigt die räumliche Struktur der Atomorbitale, in der dritten sind die durch die Linearkombination möglichen Molekülorbitale wiedergegeben und die vierte sagt etwas über die Symmetrie der entstandenen Molekülorbitale aus mit den zugehörigen Bezeichnungen der Molekülorbitale.


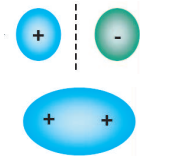

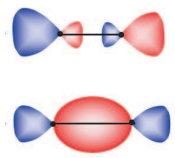
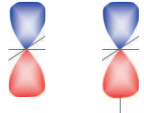
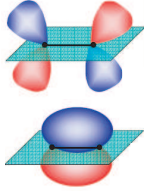
2s			$\psi_u(\sigma^* 2s) = \psi_1(2s) - \psi_2(2s)$ $\psi_g(\sigma 2s) = \psi_1(2s) + \psi_2(2s)$
$2p_x$			$\psi_u(\sigma^* 2p_x) = \psi_1(2p_x) - \psi_2(2p_x)$ $\psi_g(\sigma 2p_x) = \psi_1(2p_x) + \psi_2(2p_x)$
$2p_y, 2p_z$			$\psi_g(\pi^* 2p_y) = \psi_1(2p_y) - \psi_2(2p_y)$ $\psi_u(\pi 2p_y) = \psi_1(2p_y) + \psi_2(2p_y)$

Abbildung 2.5: Linearkombination von Atomorbitalen $2s$, $2p_x$ und $2p_y$, bzw. $2p_z$ [75]

Die Kombination der $2s$ -Orbitale führt ebenso wie die Kombination der $2p_x$ -Orbitale zu Gebilden, die rotationssymmetrisch um die Molekülachse sind. Deshalb ist der Drehimpuls um diese Achse Null. Diese Orbitale werden daher als σ -Orbitale bezeichnet, $\sigma 2s$ und $\sigma 2p_x$. Dabei gibt es bei beiden ein bindendes und ein antibindendes Orbital, letztere sind mit einem Stern gekennzeichnet. Betrachtet man noch zwei zum Mittelpunkt symmetrische Raumelemente dieser Orbitale und vergleicht den Wert der zugehörigen Wellenfunktion, so stimmen im Fall der bindenden σ -

Orbitale die Absolutbeträge überein, die Wellenfunktionen werden gerade genannt. Im Fall der antibindenden σ^* -Orbitale wechselt das Vorzeichen der Beträge und man spricht von ungeraden Wellenfunktionen (Abb. 2.6).

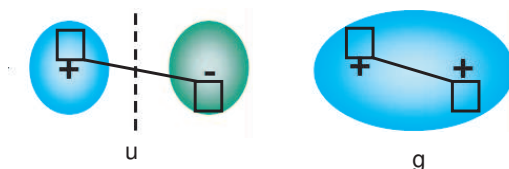


Abbildung 2.6: Gerade (g) und ungerade (u) Wellenfunktion aus der Kombination von zwei s -Orbitalen [75]

Für die Kombination der $2p_y$ - und $2p_z$ -Orbitale (unterste Zeile in Abb. 2.5) ergeben sich wiederum je ein bindendes und ein antibindendes Molekülorbital. Die Symmetrie bezüglich der Molekülachse ist vergleichbar mit der eines p -Orbitals und der Drehimpuls bezogen auf die Achse ist Eins, weshalb diese Orbitale π -Orbitale genannt werden. In diesem Fall besitzt das bindende π -Orbital eine ungerade Wellenfunktion, das antibindende eine gerade. Für das Sauerstoff-Molekül im Grundzustand sind die Orbitale mit aufsteigender Energie besetzt. Da das O_2 -Molekül paramagnetisch ist, also ein Triplett-Zustand vorliegt, muss die Elektronenkonfiguration $(\sigma 2s)^2 (\sigma^* 2s)^2 (\sigma 2p_x)^2 (\pi 2p_{y,z})^4 (\pi^* 2p_y) (\pi^* 2p_z)$ lauten. Die energetische Lage der Orbital und die Besetzung mit den Elektronen ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

Bei Molekülen werden nicht mehr wie bei Atomorbitalen die Quantenzahlen n , l , m_l , m_s verwendet, sondern n , l , λ . Dabei wird λ als kleiner griechischer Buchstabe dargestellt (σ , π , δ , φ) und entspricht der Komponente des Bahndrehimpulses in der x -Richtung (Kernverbindungsline). Die Molekülquantenzahlen werden als große griechische Buchstaben dargestellt (Σ , Λ , Ω). Σ entspricht dem Gesamtspin (bei Atomen S), Λ der Projektion des Gesamtbahndrehimpulses auf die Kernverbindungsachse (bei Atomen L) und Ω der Projektion des Gesamtdrehimpulses auf die Kernverbindungsachse (bei Atomen J), so dass das Termsymbol $^{2\Sigma+1}\Lambda_\Omega$ lautet mit $\Omega = \Lambda + \Sigma$. Bei zweiatomigen homonuklearen Molekülen, wie dem O_2 -Molekül, wird statt der

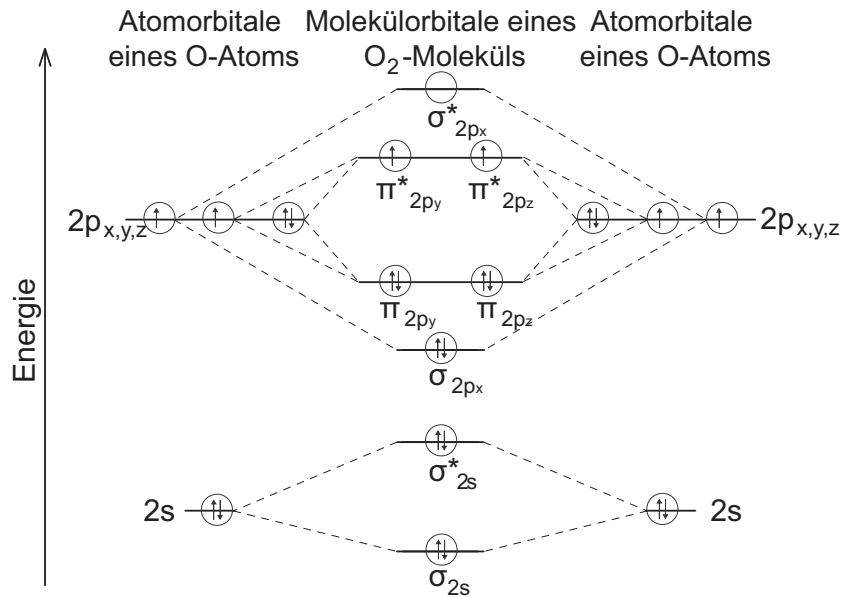


Abbildung 2.7: Die energetische Reihenfolge der Molekülorbitale des O_2 -Moleküls im Grundzustand [50]

Projektion des Gesamtdrehimpulses Ω die Parität bezüglich der Spiegelung des Moleküls beim Termsymbol mit einem + oder - angegeben.

Die Termsymbole der Moleküle werden ähnlich wie die der Atome gebildet, allerdings muss zusätzlich auf den Drehimpuls für die Rotation um die Kern-Kern Achse geachtet werden. Abgeschlossene Schalen und σ -, bzw. σ^* -Orbitale mit nur einem Elektron besitzen keinen Bahndrehimpuls ($\Lambda = 0$). Ein einzelnes π -Elektron hat bezüglich der Kern-Kern-Achse einen Bahndrehimpuls von einer Einheit ($\Lambda = 1$), deshalb erzeugt es einen Π -Term, das Analogon zum P-Term.

Wenn, wie beim O_2 , zwei π -Elektronen vorhanden sind, kann der Gesamtbahndrehimpuls Λ entweder den Wert Null haben (wenn die einzelnen Bahndrehimpulse λ_1 und λ_2 antiparallel koppeln) und wird durch ein Σ dargestellt oder den Wert Zwei haben (wenn die einzelnen Bahndrehimpulse λ_1 und λ_2 parallel koppeln) und wird durch ein Δ dargestellt. Da beim O_2 die Energie beim Σ -Term geringer ist als beim Δ -Term, liegt im Grundzustand ein Σ -Term vor. Die Komponenten in x-Richtung von λ_1 und λ_2 sind dabei antiparallel und gleich lang.

Wie bereits bekannt liegt Sauerstoff im Grundzustand als Triplett vor (Paramagnetismus). Für die Gesamtparität sind nur die halb besetzten Orbitale verantwortlich,

da dies zweimal ein π^* -Orbital mit gerader Parität ist, ergibt sich nach $g \cdot g = g$ eine gerade Parität für das Molekül. Das Termsymbol lautet also ${}^3\Sigma_g$. Rechts oberhalb des Termsymbols kann noch das Verhalten bezüglich der Spiegelung an der x-y-Ebene, die beide Kerne enthält, angebracht werden. Dabei ändert beim O_2 nur das Elektron im π_z^* -Orbital sein Vorzeichen, nicht das im π_y^* -Orbital. Der vollständige Term lautet also ${}^3\Sigma_g^-$. Die Notwendigkeit dieser genauen Bezeichnung wird bei der Beschreibung der Auswahlregeln für optische Übergänge ersichtlich.

Bei der photodynamischen Anregung des Triplett-Sauerstoffs werden hauptsächlich die zwei niedrigsten angeregten Zustände, zwei Singulett-Zustände, gebildet. Bei diesen haben die beiden antibindenden π^* -Elektronen entgegengesetzten Spin und befinden sich beim niedrigeren Zustand in einem Molekülorbital, beim höheren in beiden π^* -Orbitalen. Die energetische Lage der Zustände mit den Termsymbolen, der Elektronenkonfiguration der π^* -Orbitale und den Energieunterschieden zwischen den Zuständen ist in Abbildung 2.8 dargestellt.

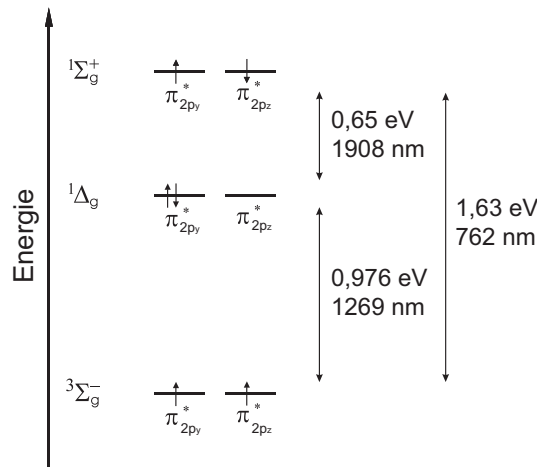


Abbildung 2.8: Konfiguration der beiden antibindenden π^* -Elektronen im Grundzustand und in den ersten beiden angeregten elektronischen Zuständen mit den Energiedifferenzen und den Termsymbolen [5]

Wie bereits oben erläutert bedeutet das Termsymbol des Grundzustandes, dass ein Triplett vorliegt, ohne einer Bahndrehimpulskomponente in Kernverbindungsrichtung mit gerader Parität und bei Spiegelung an der Kernebene einem Vertauschen der Vorzeichen. Für den ersten angeregten Zustand, ${}^1\Delta_g$, liegt ein Singulett-

Zustand vor mit einer Bahndrehimpulskomponente in Kernverbindungsrichtung mit dem Wert 2, da sich die beiden energetisch höchsten Elektronen im gleichen π^* -Orbital befinden. Die Parität ist wiederum gerade. Der zweite angeregte Zustand, $^1\Sigma_g^+$, zeichnet sich wieder durch eine Singulett-Konfiguration aus, diesmal jedoch ohne eine Bahndrehimpulskomponente in Kernverbindungsrichtung. Er besitzt eine gerade Parität bei einer Punktspiegelung und eine + Symmetrie bei Spiegelung an der Kernebene. Da der $^1\Sigma_g^+$ -Zustand sehr kurzlebig ($\tau < 1$ ns) [33] ist und schnell in den $^1\Delta_g$ -Zustand relaxiert, wird in dieser Arbeit auf Grund der Messungen mit einer zeitlichen Auflösung im μ s-Bereich nur letzterer nachgewiesen, der somit als Singulett-Sauerstoff bezeichnet wird.

2.3 Auswahlregeln

Die beobachteten Übergänge der Sauerstoff-Moleküle sind die Anregung vom Triplett-Grundzustand $^3\Sigma_g^-$ in den ersten Singulett-Zustand $^1\Delta_g$ durch photodynamische Prozesse, sowie dessen strahlende oder nichtstrahlende Rekombination. Wie bereits vorher erwähnt werden bei den Molekülen die Quantenzahlen als große griechische Buchstaben dargestellt. Für die Übergänge zwischen dem Triplett-Sauerstoff und dem Singulett-Sauerstoff beträgt die Änderung des Gesamtspins $\Delta\Sigma = \pm 1$, die Änderung des Bahndrehimpulses $\Delta\Lambda = \pm 2$ und die Änderung des Gesamtdrehimpulses $\Delta\Omega = \pm 1$. Die Parität ist sowohl beim Triplett-Zustand, als auch bei den Singulett-Zuständen gerade. Aus quantenmechanischen Berechnungen ergeben sich die folgenden erlaubten Übergänge für Multipol-Strahlungen (Tabelle 2.1).

In Zeile 1 sind die erlaubten Änderungen des Gesamtdrehimpulses Ω für die verschiedenen Multipol-Übergänge angegeben, sowie Übergänge, die diese Bedingung erfüllen und dennoch verboten sind. In Zeile 2 ist die Änderung der Parität zwischen dem Anfangs- und dem Endzustand angegeben; in Zeile 3 und 4 die Änderungen des Gesamtbahndrehimpulses Λ in Abhängigkeit von der Änderung des Gesamtspins Σ . Für jeden Multipolübergang gelten die in der Spalte unter ihm beschriebenen Bedingungen.

	elektr. Dipol (E1)	magn. Dipol (M1)	elektr. Quadrupol (E2)
1	$\Delta\Omega = 0, \pm 1$ $(\Omega = 0 \rightarrow 0 \text{ verboten})$		$\Delta\Omega = 0, \pm 1, \pm 2$ $(\Omega = 0 \rightarrow 0, 0 \rightarrow 1, \frac{1}{2} \rightarrow \frac{1}{2} \text{ verboten})$
2	$g \leftrightarrow u$	$g \leftrightarrow g, u \leftrightarrow u$	
3	Wenn $\Delta\Sigma = 0$, $\Delta\Lambda = 0, \pm 1$	Wenn $\Delta\Sigma = 0$, $\Delta\Lambda = 0$	Wenn $\Delta\Sigma = 0$, $\Delta\Lambda = 0, \pm 1, \pm 2$
4	Wenn $\Delta\Sigma = \pm 1$, $\Delta\Lambda = 0, \pm 1, \pm 2$		Wenn $\Delta\Sigma = \pm 1$, $\Delta\Lambda = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3$

Tabelle 2.1: Übersicht über Auswahlregeln für die niedrigsten Multipolübergänge bei Mehr-elektronensystemen

Vergleicht man die erlaubten Übergänge mit den tatsächlich beobachteten ($\Delta\Omega = \pm 1$, $\Delta\Lambda = \pm 2$, $\Delta\Sigma = \pm 1$, $g \leftrightarrow g$), lässt sich die Singulett-Sauerstoff Lumineszenz als ein magnetischer Dipol-, bzw. elektrischer Quadrupolübergang verstehen. Daher ist auch die geringe strahlende Ausbeute von $2 \cdot 10^{-7}$ [26] verständlich. Da der energetisch höhere $^1\Sigma_g^+$ -Zustand sehr kurzlebig ist und in den $^1\Delta_g$ -Zustand relaxiert, wird der Übergang von letzterem in den Grundzustand bevorzugt beobachtet.

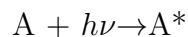
2.4 Intermolekularer Energietransfer

Im photodynamischen Fall wird Singulett-Sauerstoff durch Energietransfer von einem Photosensibilisator auf das Sauerstoffmolekül erzeugt. Unter Energietransferprozessen versteht man den Übertrag von Anregungsenergie von einem Molekül auf ein anderes (intermolekularer Energietransfer) oder innerhalb eines Moleküls von einem Chromophor zu einem anderen (intramolekularer Energietransfer).

2.4.1 Strahlender intermolekularer Energietransfer

Der einfachste Mechanismus zum Transfer von Energie stellt die Emission und Absorption von Strahlung dar. Dabei wird von einem angeregten Donator-Molekül ein

Photon emittiert und von einem Akzeptor-Molekül absorbiert.



Durch die Emission des Photons durch den Donator (D) wird die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz des Farbstoffs und die strahlende Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff beschrieben. Allerdings kann auch die Absorption von Photonen beobachtet werden bei der Anregung eines Farbstoffmoleküls, wobei das Farbstoffmolekül als Akzeptor (A) der Laserstrahlung betrachtet wird. Der strahlende Energietransfer ist für die Generierung von Singulett-Sauerstoffs nicht von Bedeutung (siehe Auswahlregeln). Bei der Absorption von Strahlung gilt das Franck-Condon-Prinzip, laut diesem sind im $E(\nu)$ -Diagramm nur senkrechte Übergänge zwischen elektronischen Zuständen erlaubt, da die Übergänge so schnell erfolgen, dass die relative Position der Kerne unverändert bleibt. Elektronenübergänge erfolgen dementsprechend mit größter Wahrscheinlichkeit zwischen den Bereichen der Schwingungsfunktion, in denen die Amplitude der Funktion am größten ist und führen somit meist zu schwingungsangeregten Zuständen. Multiplett-Übergänge, wie die Anregung vom S_0 -Grundzustand in den T_1 -Zustand des Farbstoffs oder die optische Anregung von Sauerstoff im Grundzustand in den Singulett-Zustand, sind daher äußerst unwahrscheinlich, da sich bei diesen die Kernabstände und der Gesamtspin verändern müssten (siehe Auswahlregeln für Multipolübergänge).

2.4.2 Nichtstrahlender intermolekularer Energietransfer

Der nichtstrahlende Transfer von Energie von einem Donator auf einen Akzeptor erfolgt hauptsächlich durch den Förster- und den Dexter-Mechanismus [47], die beide bereits vor über 55 Jahren beschreiben wurden.

Förster-Mechanismus

Der Förster-Mechanismus oder auch Resonanz-Energietransfer (RET) beruht auf der Wechselwirkung des Coulomb-Potentials zwischen den Molekülen. Es werden keine

Elektronen ausgetauscht, wodurch kein direkter Kontakt zwischen dem Donator- und dem Akzeptormolekül notwendig ist. Aus der Berechnung des energetischen Überlapps ergibt sich, dass nur die spektrale Überlappung der Donatorlumineszenz und der Akzeptorabsorption zum Energieübertrag beiträgt. Außerdem zeigt sich, dass die Dipol-Dipol-Wechselwirkung den dominanten Term der Austauschwechselwirkung darstellt und höhere Momente vernachlässigt werden können [65]. Für die Ratenkonstante des Coulomb-Energietransfer k_C erhielt Förster [20]:

$$k_C \sim \frac{f_D f_A}{R_{DA}^6 \cdot \tilde{\nu}} \cdot J \quad (2.1)$$

worin f_D und f_A die Oszillatorstärken der Donator- und Akzeptorübergänge, J das Überlappungsintegral und R_{DA} der Abstand zwischen Donator- und Akzeptormolekül sind. Daraus erkennt man, dass die Transferrate mit R^{-6} vom Abstand abhängt und somit eine relevante Kopplung über Entfernungen von bis zu 15 nm möglich ist.

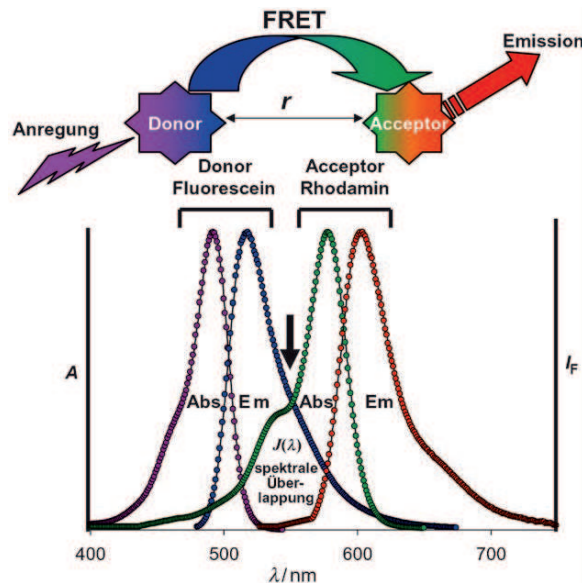


Abbildung 2.9: Schema des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET): ein angeregtes Donatormolekül überträgt seine Energie nichtstrahlend auf ein Akzeptormolekül. Die Spektren zeigen die jeweiligen Absorptions- und Emissionsprofile, hier am Beispiel Fluorescein und Rhodamin. Die spektrale Überlappung $J(\lambda)$ liegt in diesem Fall zwischen 500 und 600 nm. [66]

Beim Förster-Prozess gilt als Auswahlregel, dass sich weder beim Donator noch beim Akzeptor der Spin ändern darf, d.h. bei beiden $\Delta\Sigma = 0$. Dadurch wird der Energieübertrag vom Triplett-Farbstoff auf den Triplett-Sauerstoff, der zu einem Singulett-Zustand des Farbstoffs und des Sauerstoffs führt, quantenmechanisch verboten. Trotz des Verbotes durch die Auswahlregel ist eine Anregung möglich, da intermolekulare Störungen, wie Stöße der Sauerstoff-Moleküle untereinander oder mit dem Lösungsmittel, diese Bedingung lockern [76].

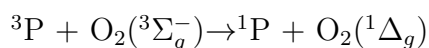
Dexter-Mechanismus

Es kann aber auch ein Austausch von Elektronen durch den Dexter-Mechanismus stattfinden, wobei in der Regel eine Kollision der Moleküle stattfinden muss (Abstand der Stoßpartner $d \leq 1,5$ nm). Im Gegensatz zum Förster-Mechanismus ist beim Dexter-Mechanismus ein Überlappen der Molekülorbitale notwendig, jedoch kein spektraler Überlapp. Wegen der exponentiellen Abnahme der Wellenfunktion mit dem Abstand r zeigt der Energietransfer über den Dexter-Mechanismus eine Abstandsabhängigkeit, die proportional zu e^{-r} ist.

Beim Dexter-Mechanismus wechselt das angeregte Elektron vom Donator in ein freies unbesetztes Orbital (Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO) des Akzeptors, der dafür ein Elektron aus einem besetzten Orbital (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO) auf den Donator überträgt.

Im Gegensatz zum Förster-Mechanismus, bei dem jegliche Spin-Änderung verboten ist, gilt für die Spins S_1 und S_2 der beiden Moleküle beim Dexter-Mechanismus nur, dass der Gesamtspin des Systems einen der Werte $|S_1+S_2|$, $|S_1+S_2-1|$, ... , $|S_1-S_2|$ besitzen muss.

Insbesondere folgt die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch einen angeregten Photosensibilisator im Triplett-Zustand 3P dieser Regel.



Jedoch steht nicht jede mögliche Spinkombination zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff zur Verfügung, da die Spins der einzelnen Moleküle und somit auch der

Gesamtspin des Systems nach dem Energieübertrag Null ist. Es müssen also vorher die Spins des Photosensibilisators und des Sauerstoffs antiparallel sein, so dass sich beim Stoß ein Übergangskomplex aus Sensibilisator und Sauerstoff bildet, der einen Singulett-Zustand darstellt. Dies ist nur in einem Neuntel aller Fälle zutreffend [18]. In biologischen Systemen und in Systemen bei denen die Moleküle, in unserem Fall Farbstoff- und Sauerstoffmoleküle, durch Lösungsmittelmoleküle voneinander getrennt sind, ist vor allem der Förster-Mechanismus von Bedeutung, insbesondere, da durch die Stöße mit den Lösungsmittelmolekülen und die lange Triplett-Lebensdauer des Farbstoffs das quantenmechanische Verbot dieser Art der Anregung gelockert wird.

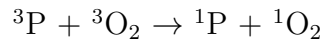
2.5 Photodynamischer Mechanismus, Typ I / Typ II -Reaktionen

In der Photodynamik unterteilt man die Reaktionen des angeregten Farbstoffs in zwei Gruppen. Dabei kann das angeregte Farbstoffmolekül seine Energie durch Elektronen-/Protonentransfer oder durch Energietransfer (siehe Kap. 2.4) auf andere Moleküle übertragen.

Bei der photodynamischen Reaktion vom Typ I handelt es sich nach B. M. Aveline [2] um eine Reaktion bei der ein Elektron oder Proton vom angeregten Farbstoff auf ein Substratmolekül übertragen wird und somit Radikale erzeugt. Das angeregte Molekül muss nicht unbedingt ein Sauerstoffmolekül sein, auch Substrat oder Lösungsmittelmoleküle können aktiviert werden. Die so erzeugten Radikale können anschließend weiterreagieren zu den in Kapitel 1 beschriebenen Radikalen. Aus diesen kann wiederum Singulett-Sauerstoff gebildet werden [25].

Anders als bei Reaktionen vom Typ I wird bei den Reaktionen vom Typ II unbedingt der direkte Kontakt zwischen Farbstoff- und Sauerstoffmolekül vorausgesetzt. Es findet dabei ein Energietransfer vom angeregten Farbstoffmolekül auf den Sauerstoff im Grundzustand statt. Dies führt zur Deaktivierung des angeregten Farbstoffs zurück

in den S_0 -Zustand und zur Anregung des Sauerstoffs in den in der Regel niedrigsten Singulett-($^1\Delta_g$)-Zustand (1O_2) [2, 21].



Grundsätzlich ist es möglich, dass beide Reaktionsmechanismen ablaufen (siehe Abbildung 2.10). Der relative Beitrag der verschiedenen Reaktionen ist allerdings von den Reaktionsbedingungen abhängig, wie Sauerstoffgehalt oder den Eigenschaften des Photosensibilisators (Lage des T_1 -Zustands, Oxidationspotential). Eine Unterscheidung auf Grund der Detektion der Photonen bei 1270 nm ist nicht möglich, da auch beim Typ I-Mechanismus über Zwischenprodukte Singulett-Sauerstoff gebildet wird. Durch den Zusatz von spezifischen Quenchern des Typ I-Mechanismuses, wie zum Beispiel Catalase oder Superoxiddismutase (SOD), ist eine Unterscheidung möglich.

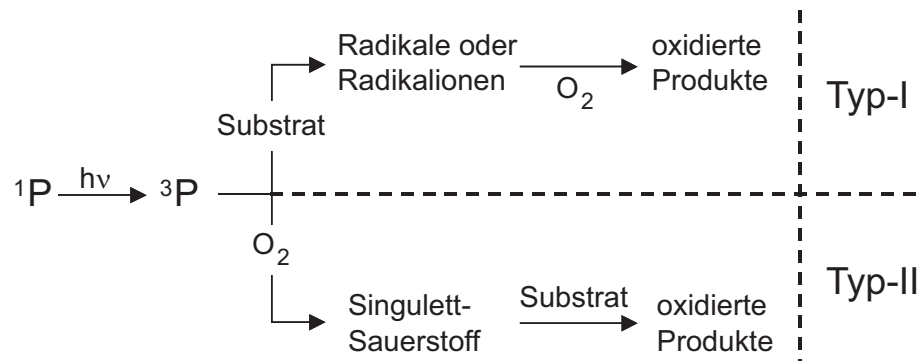


Abbildung 2.10: Übersicht über die wichtigsten Reaktionspfade bei der Photosensibilisierung [2, 21]

2.6 Oxidation von Lipiden und Proteinen

In den vorherigen Abschnitten wurde die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch einen Photosensibilisator beschrieben. Der so erzeugte Singulett-Sauerstoff kann in den Grundzustand zurückkehren und seine Energie durch Lumineszenz mit einem

Maximum bei 1268 nm (in Wasser) abstrahlen. Da der strahlende Übergang (siehe vorne) mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit auftritt, ist der häufigere Weg der Relaxation nichtstrahlend. Bei der Anwesenheit von organischen Molekülen ist der angeregte Sauerstoff allerdings auch in der Lage diese zu oxidieren. Dabei bilden sich reaktive Sauerstoffmetabolite der allgemeinen Formel R-OOH, welche in lebenden Zellen durch die Oxidation einer großen Gruppe organischer Substanzen (Glukoside, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Lipide, Nukleotide, Nukleinsäuren etc.) erzeugt werden. Hydroperoxide gelten als verlässliche Marker von oxidativem Stress und können durch UV-Strahlung oder in Gegenwart von Übergangsmetallen (z.B. Eisen oder Kupfer) in freie Radikale (Alkoxyl-, Peroxyl-Radikale) zerfallen. Damit sind sie selbst systematische Verstärker oxidativer Gewebeschäden.

Lipide

Die Oxidation von Fetten und Fettsäuren durch Sauerstoff ist hinlänglich bekannt und tritt auch bei erniedrigten Temperaturen oder im Dunkeln auf. Bekannte unerwünschte Beispiele sind das "ranzig werden" von Butter und Speiseölen oder der typische Geruch von altem Fisch. Durch das Einwirken von Licht, insbesondere von UV-Strahlung, wird dieser Prozess entscheidend beschleunigt.

Die Oxidation von Lipiden ist sowohl bei Reaktionen vom Typ I, als auch vom Typ II möglich (Abb.2.11).

Die Bildung von Lipidhydroperoxiden (LOOH) ist dabei sowohl durch den Typ I, als auch durch den Typ II-Mechanismus möglich, wie aus Abbildung 2.11 ersichtlich ist. Dabei wird zum einen bei der Oxidation nach Typ I durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms durch einen angeregten Photosensibilisator (3S) aus einem ungesättigten Lipid (LH) initiiert. Auf diese Weise entsteht ein Alkylradikal ($L\cdot$), das mit Sauerstoff zum Lipidhydroperoxid reagiert. Zum anderen kann Sauerstoff durch die Fenton-Reaktion oder durch ein Photosensibilisatorradikal ($S\cdot^-$) ein Hyperoxid-Anion (O_2^-) erzeugt werden, das zum Hydroxyl-Radikal ($OH\cdot$) weiter reagiert. Alternativ dazu ist die $OH\cdot$ -Entstehung durch die UV-Bestrahlung von bereits vorhandenen Lipidhydroperoxiden, die durch Autoxidation entstehen, beschrieben [28, 48]. Die Hydroxyl-Radikale reagieren mit Lipiden zu Lipidradikalen ($L\cdot$), wodurch mit Sauerstoff Peroxylradikale entsteht ($LOO\cdot$). Diese können sich entweder durch die

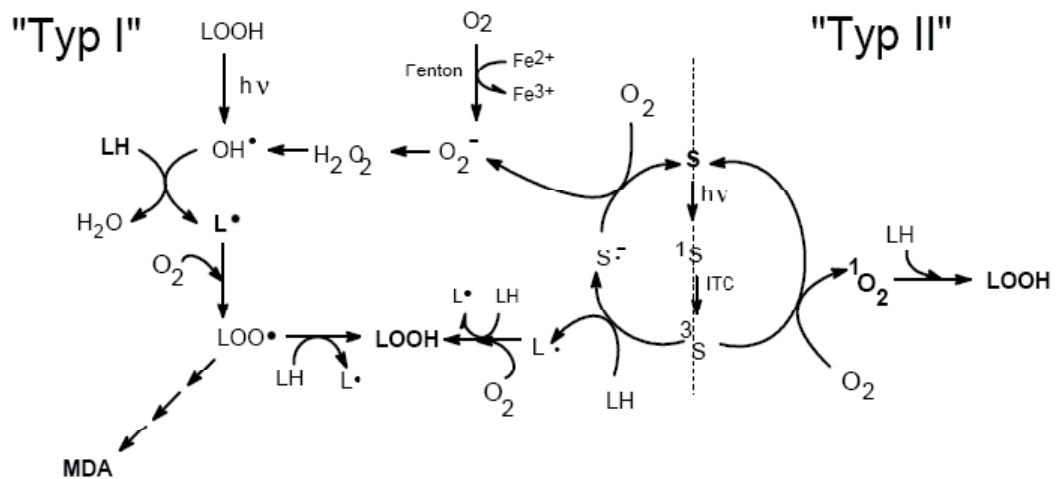


Abbildung 2.11: Reaktionsschema der photosensibilisierten Lipidperoxidation. Der Typ I Mechanismus ist am Beispiel von Protonentransfer erläutert, der Typ II Mechanismus ist durch die Oxidation von Lipiden (LH) durch ${}^1\text{O}_2$ dargestellt. [25]

Abstraktion eines Wasserstoffatoms aus einem weiteren Lipidmolekül zum Lipid-Hydroperoxiden (LOOH) oder zu zyklischen Peroxiden stabilisieren. Aus den zyklischen Peroxiden entstehen im Falle mehrfach ungesättigter Lipide Endoperoxide, aus denen Malondialdehyd (MDA) freigesetzt werden kann. MDA wird durch seine Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure (TBA) nachgewiesen, wobei ein fluoreszierendes Addukt entsteht. Der Oxidationsmechanismus nach Typ II läuft über die Bildung von Singulett-Sauerstoff ab, der direkt mit ungesättigten Lipiden reagiert, wobei ebenfalls Lipidhydroperoxide direkt entstehen [71].

Proteine

Ebenso wie bei den Lipiden ist eine Oxidation von Proteinen durch Typ I und Typ II Reaktionen möglich. Für Reaktionen vom Typ I ohne Photosensibilisator sind allerdings Wellenlängen von unter 320 nm notwendig [16]. Die Oxidation durch Singulett-Sauerstoff hängt vom Aufbau der Proteine durch die einzelnen Aminosäuren ab, da nur ein Teil der essentiellen 20 Aminosäuren durch Singulett-Sauerstoff chemisch verändert wird. Bei Proteinen ist sowohl die Oxidation der Aminosäuren-Seitenkette,

als auch des Protein-Grundgerüsts durch Singulett-Sauerstoff möglich. Tabelle 2.2 gibt einen Überblick darüber welche Aminosäuren durch Singulett-Sauerstoff oxidiert werden können und mit welchen Ratenkonstanten k_{OX} die Reaktionen ablaufen (abhängig von der Temperatur und dem pH-Wert) [15].

Wie bereits durch Michael J. Davies beschrieben, konnte gezeigt werden, dass durch die Oxidation mit Singulett-Sauerstoff verschiedene Endo- und Hydroperoxide bei Histidin, Tryptophan und Tyrosin gebildet werden. Durch Folgereaktionen der Peroxide in Dunkelreaktionen, unabhängig von der weiteren Singulett-Sauerstoff Produktion, können weitere Aminosäuren miteinander vernetzt werden. Die biologischen Konsequenzen sind noch nicht vollständig geklärt, aber es ist bekannt, dass die durch Singulett-Sauerstoff beschädigten Proteine einen weitreichenden Einfluss auf Zell- und Hautfunktionen haben [14].

Bei den zwei schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein ist eine Oxidation des Schwefelatoms möglich. Für die weiteren Aminosäuren ist bisher nur für einen Teil die Ratenkonstante für die Reaktion mit Singulett-Sauerstoff bekannt. Genauere chemische Vorgänge bei der Oxidation wurden noch nicht beschrieben.

Aminosäure	Code	Rate
Alanin	Ala	$k_{OX} = 3,0 \cdot 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; pH = 10,6; T = 310K
Arginin	Arg	$k_{OX} = 1,0 \cdot 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; pH = 7,1; T = 298K
Asparagin	Asn	_*
Asparaginsäure	Asp	_*
Cystein	Cys	$k_{OX} = 0,9 \cdot 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Glutamin	Gln	_*
Glutaminsäure	Glu	_*
Glycin	Gly	$k_{OX} \leq 1 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ Lösungsmittel: 75% D ₂ O, 25% EtOH
Histidin	His	$k_{OX} = 3,0 - 9,0 \cdot 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; pH abhängig; His Hydro-/Endoperoxide
Isoleucin	Ile	_*
Leucin	Leu	_*
Lysin	Lys	_*
Methionin	Met	$k_{OX} = 1,6 \cdot 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Phenylalanin	Phe	$k_{OX} = 7 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; T = 295K; Lösungsmittel: 75% D ₂ O, 25% EtOH
Prolin	Pro	_*
Serin	Ser	_*
Threonin	Thr	_*
Tryptophan	Trp	$k_{OX} = 2,0 - 7,0 \cdot 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; pH abhängig; Trp Hydro-/Endoperoxide
Tyrosin	Tyr	$k_{OX} = 0,8 \cdot 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; Tyr Endoperoxide
Valin	Val	_*

Tabelle 2.2: Übersicht über die Aminosäuren und ihre Ratenkonstanten für die Oxidation durch Singulett-Sauerstoff; *: Rate nicht bestimmt

2.7 Diffusion und Fick'sche Gesetze

Die durch Singulett-Sauerstoff hervorgerufene Oxidation von Biomolekülen, die den Lösungen zugesetzt werden (Kapitel 5), bzw. die in den Zellen und Bakterien vorhanden sind (Kapitel 7), verringert den Sauerstoffgehalt in den Lösungen. Diese Abnahme der Sauerstoff-Konzentration beeinflusst jede weitere Generierung von Singulett-Sauerstoff durch den Photosensibilisator und somit auch die weitere Lumineszenz, wie in Abschnitt 2.8 gezeigt wird. Je nach Stärke des Sauerstoffverbrauchs durch die Oxidation von Lipiden oder Proteinen kann dies bereits innerhalb des Messintervalls die Lumineszenzdetektion beeinflussen. Der Sauerstoffverbrauch kann durch einen externen Sensor gemessen werden, wobei beachtet werden muss, dass der Sauerstoff nur im Bereich der Laseranregung verbraucht wird, so dass sich innerhalb der Lösung ein Gradient der Sauerstoff-Konzentration einstellt, wie in Abbildung 2.12 zu sehen ist.

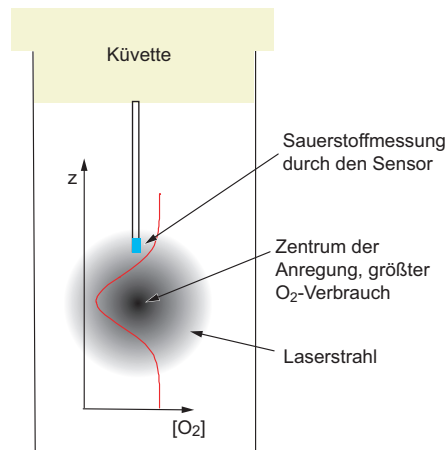


Abbildung 2.12: Ort der Detektion der Sauerstoff-Konzentration mit dem externen Sensor, zusätzlich sind der Querschnitt des Laserstrahls und die Sauerstoff-Konzentration (rote Linie) in der Küvette eingezeichnet.

Wie gezeigt, verringert sich durch die Oxidation der Moleküle die Sauerstoff-Konzentration im Zentrum der Laseranregung stärker als in den Randbereichen und ein Gradient der Sauerstoff-Konzentration bildet sich aus. Dieser Gradient verursacht eine Diffusion der Sauerstoffmoleküle.

Nach dem Ersten Fick'schen Gesetz ist die Teilchenstromdichte J ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) proportional zum Konzentrationsgradienten entgegen der Diffusionsrichtung $\partial c / \partial x$

(mol · m⁻⁴), so dass gilt:

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x}. \quad (2.2)$$

D ist der Diffusionskoeffizient und kann nach der Stokes-Einstein-Gleichung

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_0} \quad (2.3)$$

berechnet werden. Dabei sind k_B die Boltzmann-Konstante (J/K), T die Temperatur (K), η die dynamische Viskosität des Lösungsmittels (N · s · m⁻²) und R_0 der hydrodynamische Radius der diffundierenden Teilchen (m). Der Diffusionskoeffizient D (m² · s⁻¹) für Sauerstoff in Wasser bei 25°C ist: $D = 2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [7].

Die Teilchenstromdichte macht eine quantitative Aussage über die (im statistischen Mittel) gerichtete Bewegung von Teilchen, d. h. wie viele Teilchen einer Stoffmenge sich pro Zeiteinheit durch eine Flächeneinheit, die senkrecht zur Diffusionsrichtung liegt, netto bewegen. Des weiteren kann die zeitliche Änderung der Konzentration bei einem Gradienten berechnet werden. Für

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{\partial J}{\partial x} \quad (2.4)$$

ergibt sich aus dem ersten Fick'schen Gesetz die homogene Diffusionsgleichung:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}. \quad (2.5)$$

Daraus erhält man das zweite Fick'sche Gesetz für einen konstanten Diffusionskoeffizienten D.

Durch die chemischen Vorgänge, Oxidation von Molekülen, die in unserem Fall einer Reaktion nullter Ordnung folgen, erweitert sich die homogene Diffusionsgleichung zur inhomogenen. Bei dieser können auch noch weitere Kräfte berücksichtigt werden, die die Diffusion erleichtern oder aber ihr entgegen gerichtet sein können. Somit ergibt sich für die inhomogene Diffusionsgleichung:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = f(x, t) + D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}. \quad (2.6)$$

Des weiteren lässt sich der Mittelwert der Diffusionsstrecke $\sqrt{\Delta x^2}$ berechnen zu

$$\sqrt{\Delta x^2} = \sqrt{2Dt}. \quad (2.7)$$

Mit dieser Formel kann die durchschnittliche Strecke eines Sauerstoffmoleküls während einer Messdauer von 20 Sekunden zu ca. 0,3 mm berechnet werden. Erst nach über 20 Minuten kann davon ausgegangen werden, dass bei einem Strahldurchmesser von 5 mm ein Sauerstoffmolekül ins Zentrum der Anregung vorgedrungen ist.

Die mittlere Diffusionsstrecke $\sqrt{\Delta x^2}$ ist somit proportional zu $t^{\frac{1}{2}}$. In Zellen können aber auch langsamere oder schnellere Vorgänge beobachtet werden. Da in Zellen Organellen und Makromoleküle vorhanden sind, wird die Diffusion gebremst, was als Subdiffusion bezeichnet wird. Es gilt dann, dass $\sqrt{\Delta x^2}$ proportional zu $t^{\alpha \cdot \frac{1}{2}}$ ist. Wobei für die Subdiffusion gilt $0 < \alpha < 1$ [44].

Der entgegengesetzte Sonderfall der Subdiffusion ist die erleichterte Diffusion oder Permeabilität. Sie beschreibt in der Biologie die Möglichkeit für bestimmte Stoffe, eine Biomembran, wie zum Beispiel Plasmamembranen von Zellen und Bakterien, leichter zu durchdringen, als dies eigentlich aufgrund ihrer Größe, Ladung, Polarität etc. möglich wäre. Bestimmte Proteine, sogenannte Tunnelproteine, bilden einen Tunnel durch die Zellmembran, der durch seinen Durchmesser und/oder Ladungsverteilungen bestimmte Stoffe leichter passieren lässt als durch die "geschlossene" Membran. Da für den Sauerstoff allerdings keine Mechanismen bekannt sind, die die Diffusion beschleunigen wird davon ausgegangen, dass der Sauerstoff durch Subdiffusion in die Zellen gelangt.

Mit Hilfe des Graham'schen Gesetz kann die Diffusionskonstante D für Gase aus kleinen Teilchen oder Molekülen berechnet werden:

$$D = \left(\frac{k_B \cdot T}{\pi} \right)^{\frac{3}{2}} \cdot \frac{2 \cdot N_A}{a^2 \cdot p \cdot \sqrt{M}} \quad (2.8)$$

mit der Avogadro-Konstanten N_A , dem Radius des Teilchens a , dem Druck p und der Teilchenmasse M .

Aus dieser Formel kann gefolgert werden, dass bei kleinen Teilchen das Produkt aus Diffusionskonstante und der Quadratwurzel aus dem Molekulargewicht konstant ist.

$$D \cdot \sqrt{M} = konst. \quad (2.9)$$

Für große Molekulargewichte gilt allerdings die Stokes-Einstein-Relation und so folgt:

$$D \cdot \sqrt[3]{M} = konst. \quad (2.10)$$

Daraus kann für die Farbstoffe mit einem wesentlich höheren Molekulargewicht als Sauerstoff gefolgert werden, dass die Diffusion durch Biomembranen nochmal wesentlich langsamer verläuft.

2.8 Modell zur Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff

Mit Hilfe eines Lasers ist eine kontinuierliche oder eine gepulste Besetzung des T_1 -Zustands möglich. Dabei muss bei der gepulsten Anregung der Abstand der Laserpulse größer sein als die Lebensdauer des T_1 -Zustands um die Zeitabhängigkeit der angeregten Zustände zu untersuchen. Zur theoretischen Beschreibung der Zeitabhängigkeit des Farbstoff- T_1 -Zustands und des Singulett-Sauerstoff-Zustands wurde als Grundlage das Modell von Parker *et al.* [62] verwendet, das in unserer Arbeitsgruppe erweitert wurde [6].

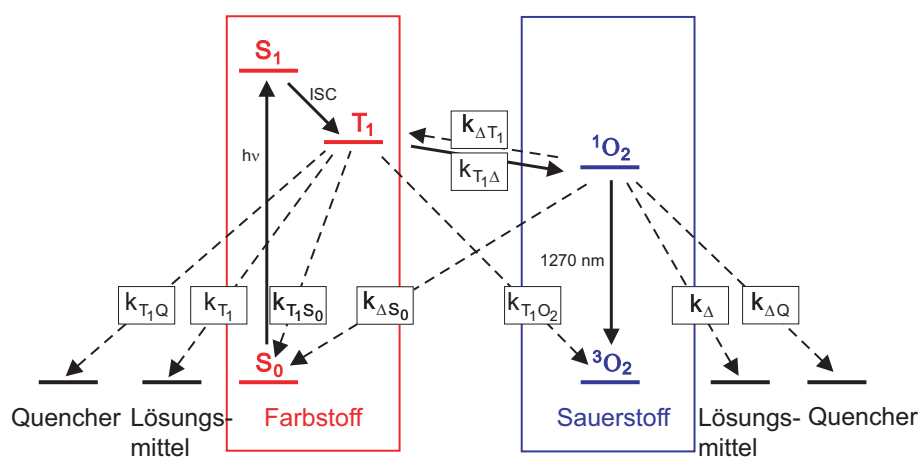


Abbildung 2.13: Schema des Ratengleichungsmodells zur Generation von Singulett-Sauerstoff 1O_2 durch Energietransfer vom Triplett-Zustand des Farbstoffs (T_1) und zur Relaxation des Singulett-Sauerstoffs und des Triplett- T_1 -Zustand des Farbstoffs in die Grundzustände [5]

Das Energieniveauschema zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch Energieübertrag vom Triplett- T_1 -Zustand des Photosensibilisators und die Deaktivierung

von Singulett-Sauerstoff und des Farbstoff- T_1 -Zustands ist schematisch in Abb. 2.13 dargestellt. Es beinhaltet den Singulett-Grundzustand des Photosensibilisators, den ersten angeregten Singulett-Zustand und den ersten angeregten Triplett-Zustand. Des weiteren enthält das Schema den Sauerstoff-Grundzustand $^3O_2(t)$ und seinen ersten angeregten Singulett-Zustand $^1O_2(t)$, außerdem die Grundzustände des Lösungsmittels und eines möglichen Quenchers.

Die Relaxationsraten und Ratenkonstanten stellen die Häufigkeit der jeweiligen Relaxation dar. Die Bedeutung der einzelnen Raten und Ratenkonstanten wird in Tabelle 4.2 kurz erklärt. Zur mathematischen Beschreibung des Energieniveauschemas durch gekoppelte Differentialgleichungen wird die zeitliche Abhängigkeit der Besetzungsdichten des angeregten Farbstoff- T_1 -Zustands und des Sauerstoff- $^1O_2(t)$ -Zustands berechnet.

Die Differentialgleichungen haben die folgende Form [5]:

$$\frac{d[T_1]}{dt} = -K_{T_1}[T_1] + k_{\Delta T_1}[P][^1O_2] \quad (2.11)$$

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = -K_{\Delta}[^1O_2] + k_{T_1\Delta}[O_2][T_1] \quad (2.12)$$

mit

$$K_{T_1} := k_{T_1} + (k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta})[O_2] + k_{T_1S_0}[P] + k_{T_1Q}[Q] \quad (2.13)$$

$$K_{\Delta} := k_{\Delta} + (k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1})[P] + k_{\Delta Q}[Q]. \quad (2.14)$$

Durch die Umrechnung in eine Differentialgleichung zweiter Ordnung und dem Ansatz $[^1O_2] \sim e^{-\beta t}$ erhält man zwei linear unabhängige Lösungen β_1 und β_2 .

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} \left[K_{T_1} + K_{\Delta} \pm \sqrt{(K_{T_1} - K_{\Delta})^2 + 4k_{T_1\Delta}[O_2] \cdot k_{\Delta T_1}[P]} \right], \quad \beta_1 > \beta_2. \quad (2.15)$$

Daraus ergibt sich für die zeitliche Entwicklung der Singulett-Sauerstoff-Konzentration

$$[^1O_2](t) = \frac{[T_1]_0 k_{T_1\Delta}[O_2]}{\beta_1 - \beta_2} (e^{-\beta_2 t} - e^{-\beta_1 t}), \quad (2.16)$$

für die des angeregten Farbstoff- T_1 -Zustands

$$[T_1](t) = \frac{[T_1]_0}{\beta_1 - \beta_2} [(\beta_1 - K_{\Delta})e^{-\beta_1 t} + (K_{\Delta} - \beta_2)e^{-\beta_2 t}]. \quad (2.17)$$

k_{T_1}	Rate der Deaktivierung des Triplett-Farbstoff-Zustands durch das Lösungsmittel
$k_{T_1 S_0}$	Ratenkonstante der Deaktivierung des Triplett-Farbstoff-Zustands durch den Farbstoff im Grundzustand
$k_{T_1 Q}$	Ratenkonstante der Deaktivierung des Triplett-Farbstoff-Zustands durch den Quencher
k_{Δ}	Rate der Deaktivierung des Singulett-Sauerstoffs durch das Lösungsmittel
$k_{\Delta Q}$	Ratenkonstante der Deaktivierung des Singulett-Sauerstoffs durch den Quencher
$k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta}$	Ratenkonstanten der Deaktivierung des Triplett-Farbstoff-Zustands durch Sauerstoff; $k_{T_1 \Delta}$ generiert Singulett-Sauerstoff, $k_{T_1 O_2}$ generiert keinen Singulett-Sauerstoff
$k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$	Ratenkonstanten der Deaktivierung des Singulett-Sauerstoffs durch den Farbstoff; $k_{\Delta T_1}$ generiert einen Farbstoff- T_1 -Zustand, $k_{\Delta S_0}$ generiert keinen Farbstoff- T_1 -Zustand
$k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$	Grad des Energierücktransfers vom Singulett-Sauerstoff auf den Farbstoff- T_1 -Zustand

Tabelle 2.3: Übersicht über die Bedeutung der Raten und Ratenkonstanten

Wobei $[T_1]_0$ der anfänglichen Besetzung des Triplett-Zustands entspricht.

β_1 und β_2 entsprechen Raten (s^{-1}) und beschreiben die Emission der Lumineszenz-

photonen des Singulett-Sauerstoffs, die durch den Photomultiplier detektiert werden können.

Gleichung 2.16 beschreibt das Lumineszenzsignal bei 1270 nm und zeigt die Abhängigkeit der Singulett-Sauerstoff-Konzentration $[^1\text{O}_2]$ von der Sauerstoff-Konzentration $[\text{O}_2]$. Ebenso kann aus Gleichung 2.13 die Abhängigkeit der Rate K_{T_1} von der Sauerstoff-Konzentration $[\text{O}_2]$ gefolgert werden.

Durch den Vergleich des detektierten Lumineszenzsignals des Singulett-Sauerstoffs mit der theoretischen Berechnung können die Raten β_1 und β_2 mit der Anstiegs- bzw. Abklingrate k_r und k_d aus dem Lumineszenzsignal gleichgesetzt werden.

2.8.1 Ohne Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} = 0$)

Für den Fall, dass kein Energieübertrag (ohne Rücktransfer, oR) vom Singulett-Sauerstoff zurück zum Triplett-Farbstoff-Zustand möglich ist, kann $k_{\Delta T_1}$ gleich Null gesetzt werden und es ergibt sich:

$$K_{T_1, oR} = K_{T_1} = k_{T_1} + (k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta})[\text{O}_2] + k_{T_1 S_0}[P] + k_{T_1 Q}[Q] \quad (2.18)$$

$$K_{\Delta, oR} = k_{\Delta} + k_{\Delta S_0}[P] + k_{\Delta Q}[Q] \quad (2.19)$$

für β_1 und β_2 folgt dann

$$\beta_1 = \begin{cases} K_{T_1} & \text{für } K_{T_1} > K_{\Delta, oR} \\ K_{\Delta, oR} & \text{für } K_{T_1} < K_{\Delta, oR} \end{cases} \quad (2.20)$$

$$\beta_2 = \begin{cases} K_{\Delta, oR} & \text{für } K_{T_1} > K_{\Delta, oR} \\ K_{T_1} & \text{für } K_{T_1} < K_{\Delta, oR} \end{cases} \quad (2.21)$$

Da β_1 immer die größere Rate darstellt, kann die Bedeutung der Anstiegsrate k_r und der Abklingrate k_d des gemessenen Lumineszenzsignals wechseln. Für $K_{T_1} > K_{\Delta, oR}$ entspricht die Abklingrate k_d des Lumineszenzsignals des Singulett-Sauerstoffs der Rate $K_{\Delta, oR}$. Für $K_{T_1} < K_{\Delta, oR}$ jedoch ist k_d die Rate der Deaktivierung des T_1 -Zustands des Sensibilisators. Letzterer Fall tritt bei niedrigen Sauerstoff- oder hohen Quencher-Konzentrationen auf, wenn also die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer kürzer ist als die Farbstoff- T_1 -Abklingdauer. Bei einer Variation der Sauerstoff- oder

Quencher-Konzentrationen kann der Fall $K_{T_1} = K_{\Delta, oR}$ eintreten und für $k_{\Delta T_1} = 0$ ergibt sich, dass $\beta_1 = \beta_2$ ist und sich die Kurven schneiden.

2.8.2 Mit Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} > 0$)

Durch den Rücktransfer der Energie auf den Triplett-Farbstoff-Zustand ($k_{\Delta T_1} > 0$) kann Gleichung 2.15 nicht vereinfacht werden, wodurch die Raten β_1 und β_2 eine kompliziertere Form annehmen.

Über Gleichung 2.14 hängt K_{Δ} mit $K_{\Delta, oR}$ zusammen und es gilt:

$$K_{\Delta} = K_{\Delta, oR} + k_{\Delta T_1}[P]. \quad (2.22)$$

Nach Gleichung 2.11 ergibt sich für die Generierung eines angeregten T_1 -Farbstoff-Zustands eine neue Möglichkeit mit

$$k_{\Delta T_1}[P][^1O_2]. \quad (2.23)$$

Der Zusatzbeitrag durch die Rückkopplung führt zu mehreren Effekten bei den Variationen der Sauerstoff-, Farbstoff und Quencher-Konzentration:

- bei der Variation der Sauerstoff-Konzentration (Abbildung 2.14 A) ist ein Aufspalten der Raten am Schnittpunkt $K_{\Delta} = K_{T_1}$ zu erkennen, mit

$$\beta_1 - \beta_2 = \sqrt{4k_{T_1\Delta}[O_2] \cdot k_{\Delta T_1}[P]}, \quad (2.24)$$

außerdem wird die Rate β_1 um den Betrag

$$\delta = \frac{k_{T_1\Delta}k_{\Delta T_1}[P]}{k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}} \quad (2.25)$$

nach oben verschoben. Aus beiden Gleichungen kann die Größe des Produkts $k_{T_1\Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$ abgeschätzt werden.

- bei der Variation der Farbstoff-Konzentration folgt aus dem Zusatzterm auf Grund der Rückkopplung, dass die Steigung von K_{Δ} um $k_{\Delta T_1}$ größer ist als von $K_{\Delta, oR}$, wie in Abbildung 2.14 B dargestellt. Für K_{T_1} folgt aus Gleichung 2.13 keine Änderung, jedoch muss beachtet werden, dass ein System mit gekoppelten Differentialgleichungen vorliegt und somit die Änderung eines Parameters sich auf beide Raten auswirkt.

- bei der Variation der Quencher-Konzentration wird die Rate β_1 wieder nach oben verschoben (Abbildung 2.14 C).

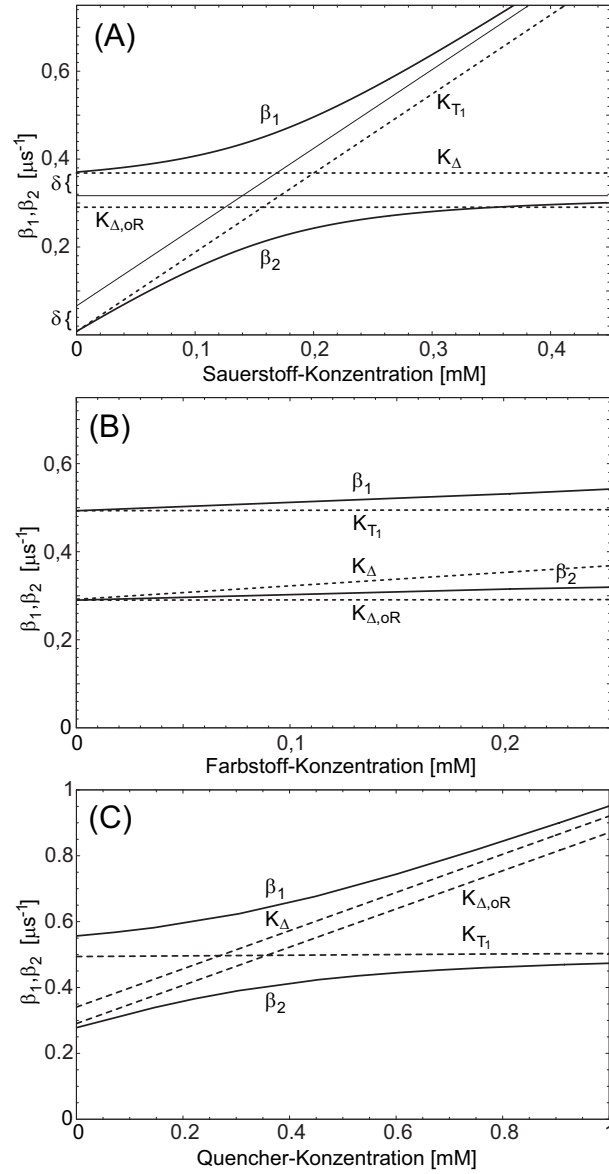


Abbildung 2.14: Verlauf der theoretisch berechneten Raten β_1 und β_2 in Abhängigkeit der Sauerstoff- (A), Farbstoff- (B) und Quencher-Konzentration (C) mit Energierücktransfer als durchgezogene Linien, sowie der Verlauf der Raten $K_{\Delta,OR}$, K_{Δ} und K_{T1} als gestrichelte Linien

Im Falle einer geringen Rückkopplung, dass also die Aufspaltung zwischen den Raten und die Verschiebung von β_1 nach oben nur sehr gering ausfallen, sind die Raten β_1 und β_2 bei Konzentrationen entfernt vom Schnittpunkt der Raten mit den Werten für $k_{\Delta T_1} = 0$ vergleichbar.

2.8.3 Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten

Durch die zeitaufgelöste Messung des Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignals stehen die Anstiegs- und Abklingraten k_r und k_d zur Verfügung, indem Gleichung 2.16 dem Messsignal angefügt wird. Um alle Raten und Ratenkonstanten zu bestimmen, sind drei Messreihen notwendig. Für verschiedene Farbstoff-, Sauerstoff- und Quencher-Konzentrationen müssen die zeitaufgelösten Lumineszenzsignale aufgenommen werden. Ein theoretisches Beispiel ist in Abbildung 2.14 dargestellt; dieses wurde berechnet für Raten und Ratenkonstanten von TMPyP in H_2O [6].

Die Variation der Sauerstoff-Konzentration wird bei einer konstanten Farbstoff-Konzentration durchgeführt ohne zusätzliche Quencher. Die entsprechenden Kurven sind in Abbildung 2.14 A dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Kurven für β_1 und β_2 nicht mehr kreuzen, dies resultiert aus dem nun möglichen Energieübertrag des Singulett-Sauerstoffs auf den Farbstoff. Des weiteren entspricht β_1 bei sehr niedrigen Sauerstoff-Konzentrationen K_Δ und bei sehr hohen K_{T_1} . Für β_2 gilt der umgekehrte Fall. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies gezeigt werden (Abb.4.2 in Kap. 4.2), wo es zur Vertauschung der Bedeutung kommt.

Aus der Steigung der β_1 -Kurve bei hohen und der β_2 -Kurve bei niedrigen Sauerstoff-Konzentrationen kann die Summe $(k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta})$ bestimmt werden. Aus den Gleichungen 2.14 und 2.22 folgt, dass die Rate K_Δ unabhängig von der Sauerstoff-Konzentration ist und dadurch $k_{\Delta S_0} + (k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1})[P]$ bestimmt werden kann.

Für die Rate β_2 folgt bei einer Sauerstoff-Konzentration von $[O_2] = 0$ aus Gleichung 2.13, dass sie der Rate $K_{T_1} = k_{T_1} + k_{T_1S_0} \cdot [P]$ entspricht. Aus der Größe der Aufspaltung der Raten bei $K_{T_1} = K_\Delta$ kann das Produkt der Ratenkonstanten $k_{T_1\Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$ bestimmt werden.

Die Variation der Farbstoff-Konzentration bei einer konstanten Sauerstoff-Konzentration und ohne dem Zusatz von quenchenden Substanzen (Abbildung 2.14 B) liefern die y-Achsenabschnitte für $[P] = 0$ der Raten folgende Raten, bzw. Ratenkonstanten: $K_{T_1} = k_{T_1} + (k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}) [O_2]$ und $K_\Delta = k_\Delta$, wodurch sich aus den vorher ermittelten Werten bei der Variation der Sauerstoff-Konzentration die Ratenkonstanten k_{T_1} , $k_{T_1S_0}$ und $k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$ ermitteln lassen.

Der Einfluss eines Quenchers ($K_{\Delta Q} > K_{T_1Q}$) auf das Lumineszenzsignal bei einer

konstanten Sauerstoff- und Farbstoff-Konzentration ist in Abbildung 2.14 C dargestellt. Bei hohen Quencher-Konzentrationen hat β_1 die Steigung $k_{\Delta Q}$ und β_2 die Steigung $k_{T_1 Q}$. Genauso wie im Fall ohne Rücktransfer tauschen die Bedeutungen von β_1 und β_2 bei niedrigen Quencher-Konzentrationen.

Ausgehend von der Bestimmung der Raten β_1 und β_2 können durch die Kombination aller Informationen aus den Variationen die Ratenkonstanten k_{T_1} , $k_{T_1 S_0}$, $k_{T_1 Q}$, k_{Δ} und $k_{\Delta Q}$ bestimmt werden. Für die restlichen können nur die Summen ($k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta}$, $k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$) oder das Produkt ($k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$) bestimmt werden. Ein Überblick über die Vorgehensweise wird in Abbildung 2.15 vorgestellt.

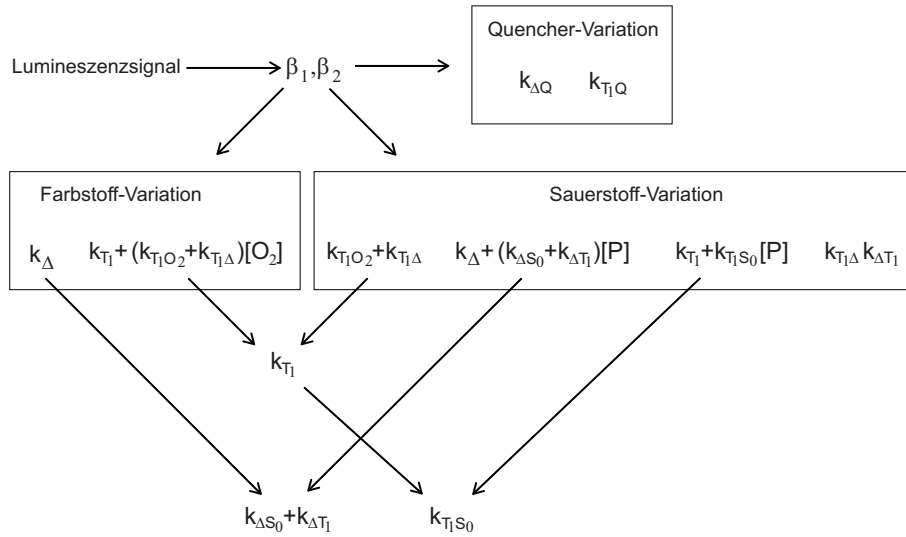


Abbildung 2.15: Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten aus den Lumineszenzsignalen bei der Variation der Sauerstoff-, Farbstoff- und Quencher-Konzentration

Über die Generation und Relaxation von Singulett-Sauerstoff können aus dem Lumineszenzsignal etliche Informationen gewonnen werden. Es ist jedoch nicht nur eine genaue Betrachtung der Raten notwendig, sondern auch die Sauerstoff- und die Quencher-Konzentration muss beachtet werden, um eine korrekte Deutung der Werte zu ermöglichen. Abbildung 2.16 A stellt theoretisch berechnete Lumineszenzsignale für verschieden hohe Sauerstoff-Konzentrationen dar.

So entspricht für hohe Sauerstoff-Konzentrationen (0,5 mmol/L) die Abklingrate der Lumineszenz dem reziproken Wert der Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer und die

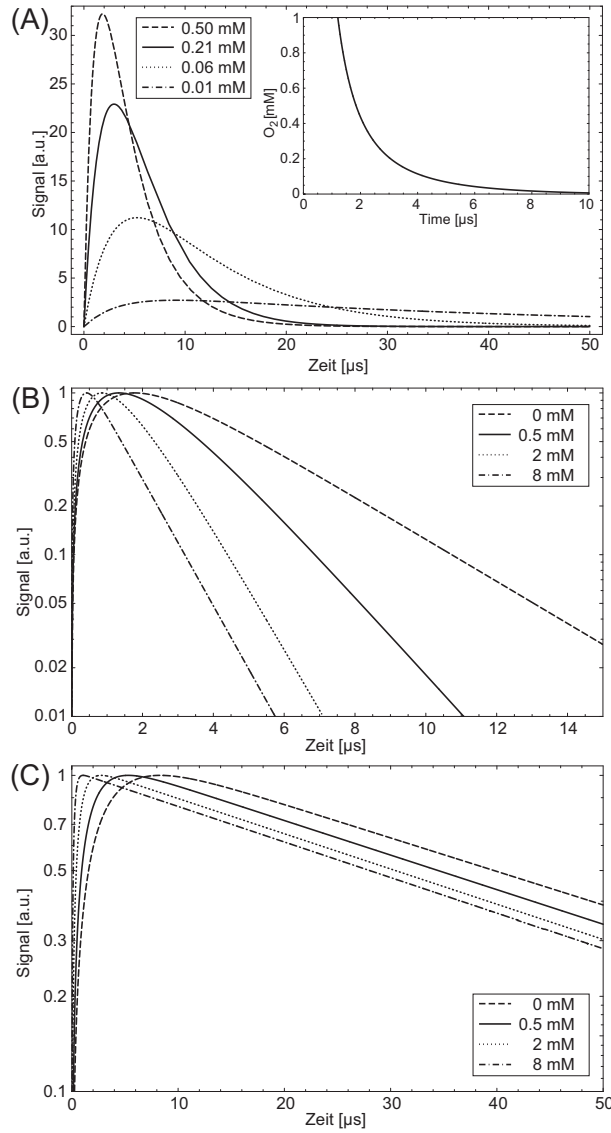


Abbildung 2.16: Änderungen des zeitlichen Verlaufs der Lumineszenz-Signale für Variationen der Sauerstoff-Konzentration (A) und der Quencher-Konzentration rechts (B) und links (C) vom Schnittpunkt der Raten K_{Δ} und K_{T_1}

Anstiegsrate dem reziproken Wert der Abklingdauer des Farbstoff- T_1 -Zustands. Mit der Abnahme der Sauerstoff-Konzentration ändert sich die Bedeutung der Raten, so dass bei niedrigen Konzentrationen (0,01 mmol/L) die Abklingzeit der Lumineszenz der Abklingdauer des Farbstoff- T_1 -Zustands entspricht und die Anstiegszeit der des Singulett-Sauerstoffs. Dabei verlängert sich die Abklingdauer des angeregten Farbstoff-Zustands signifikant mit der Abnahme der Sauerstoff-Konzentration, da immer weniger Sauerstoffmoleküle zur Deaktivierung zur Verfügung stehen. Eben-

so verschiebt sich die Zeitposition des Maximums des Lumineszenzsignal zu immer höheren Zeiten der Funktion

$$t_{max} = \frac{\ln \frac{\beta_1}{\beta_2}}{\beta_1 - \beta_2} \quad (2.26)$$

folgend, die ebenfalls in Abbildung 2.16 A dargestellt ist. Auch bei der Variation der Quencher-Konzentration muss die Sauerstoff-Konzentration beachtet werden. So verkürzt sich bei einer konstant hohen Sauerstoff-Konzentrationen (Abbildung 2.16 B) die Abklingdauer des Lumineszenzsignals mit steigender Quencher-Konzentration. Hingegen verkürzt sich bei niedrigen Sauerstoff-Konzentrationen (0,01 mmol/L) (Abbildung 2.16 C) die Anstiegszeit des Signals, die in diesem Fall der Abklingdauer des Singulett-Sauerstoffs entspricht. Die Abklingdauer des Signals wird jedoch kaum beeinflusst, da sie die Abklingdauer des Farbstoff- T_1 -Zustands darstellt, die durch den Quencher kaum beeinflusst wird [43].

2.9 Das Quenchen von Singulett-Sauerstoff

Im vorherigen Abschnitt wurden die Ratenkonstanten für die Generierung und Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff eingeführt. Dabei beschreibt k_Δ die Deaktivierung von 1O_2 im jeweiligen Lösungsmittel und bestimmt die Lebensdauer $\tau_\Delta = 1/k_\Delta$ des Singulett-Sauerstoffs. Die Ratenkonstanten $k_{\Delta S_0}$ und $k_{\Delta T_1}$ beschreiben die Deaktivierung durch den Singulett- und den Triplett-Zustand des Farbstoffs, $k_{\Delta Q}$ die Deaktivierung durch einen zusätzlichen Quencher. In dieser Arbeit wird lediglich letztere Deaktivierung durch einen zusätzlichen Quencher als "Quenchen" bezeichnet.

Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt, wird zwischen physikalischen und chemischen Quenchen unterschieden [15, 34]. Dabei beschreibt in dieser Arbeit das physikalischen Quenchen die Deaktivierung des Singulett-Sauerstoffs durch einen Energieübertrag auf den Quencher, der dann relaxiert und erneut Energie vom Singulett-Sauerstoff aufnehmen kann. Diese Art des Quenchens verkürzt die Abklingdauer des Singulett-Sauerstoffs und wird am besten durch Natriumazid gewährleistet. Das chemische Quenchen beschreibt die Deaktivierung des Singulett-Sauerstoffs durch eine chemische Veränderung des Quenchers, die irreversibel ist. Dies kann durch eine

Oxidation durch Singulett-Sauerstoff geschehen (siehe Abschnitt 2.6, Ratenkonstante k_{OX}) oder wieder durch einen Energieübertrag, der die Struktur des Quenchers erheblich verändert, aber zu keiner Oxidation führt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Quencher (Natriumazid, Fettsäuren und Proteine) quenchen nur den Singulett-Sauerstoff und nicht oder nur kaum den Triplett-Farbstoff-Zustand [43]. Es wird daher nur die Rate K_{Δ} durch die verschiedenen Quencher beeinflusst. Für Sauerstoff-Konzentrationen unter $100 \mu\text{mol/L}$ oder Natriumazid-Konzentrationen über 1mmol/L entspricht die Anstiegsrate β_1 der Singulett-Sauerstoff-Abklingrate K_{Δ} . Für eine bessere Übersicht werden die einzelnen Quenchervarianten einzeln erläutert und die Folgen für die Raten beschrieben.

Beim rein physikalischen Quenchen des Singulett-Sauerstoffs wird nur Energie vom Singulett-Sauerstoff auf den Quencher übertragen und nur die Abklingdauer $1/K_{\Delta}$ verkürzt. Da sich die Sauerstoff-Konzentration nicht ändert und der Farbstoff-Triplett-Zustand nicht gequencht wird, verändert sich die Rate K_{T_1} nicht.

Anders sieht der Fall des chemischen Quenchens aus, bei dem der Singulett-Sauerstoff den Quencher oxidiert und dadurch die quencheden Eigenschaften verändert, da der oxidierte Quencher nicht mehr in der Lage ist Singulett-Sauerstoff zu deaktivieren. Die Rate K_{Δ} steigt mit steigender Quencher-Konzentration, bei wiederholten Messungen an der gleichen Lösung, bzw. Suspension, sinkt jedoch der Einfluß des Quenchers auf K_{Δ} . Durch den Sauerstoff-Verbrauch während der Bestrahlung nimmt die Rate K_{T_1} ab, wie in Gleichung 2.13 zu erkennen ist.

Der letzte hier dargestellt Fall ist die chemische Veränderung des Quenchers, ohne dass dabei Sauerstoff verbraucht wird. Dadurch bleibt die Rate K_{T_1} konstant bei der Zugabe des Quenchers und die Rate K_{Δ} steigt mit der Quencher-Konzentration, nimmt jedoch nach wiederholten Messungen wieder ab.

Bei den meisten Molekülen überlagern sich die verschiedenen Effekte, so dass physikalisches Quenchen und Sauerstoffverbrauch nebeneinander stattfinden. Da nur ein Teil der Aminosäuren (siehe oben) und nur die ungesättigten Fettsäuren oxidiert werden können, sind die gesättigten Fettsäuren und die anderen Aminosäuren nur in der Lage physikalisch oder chemisch unter Veränderung der Molekülstruktur ohne Oxidation zu quenchen [34].

Kapitel 3

Experimentelle Methoden und Materialien

3.1 Versuchsaufbau und Messgeräte

Aufbau

Der zur Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz verwendete Versuchsaufbau ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die optische Anregung erfolgt durch einen linear polarisierten Nd:YAG-Laser (Photon Energy AWL GmbH, Ottensoos, Deutschland), der durch Frequenz-Verdoppelung bzw. -Verdreifachung zwei separate Strahlen mit den Wellenlängen 532 nm und 355 nm emittiert. Je nach erforderlicher Anregungswellenlänge kann einer der Strahlen abgeblockt werden. Die Pulsdauer des Lasers beträgt 70 ns mit einer Wiederholrate von 2,0 kHz. Die Energie, die pro Laserpuls abgegeben wird, kann je nach experimentellen Anforderungen bei 532 nm von 5 bis 125 μJ bzw. bei 355 nm von 5 bis 50 μJ variiert werden. Daraus folgt bei einer belichteten Fläche von ca. 0,2 cm^2 (Laserstrahldurchmesser: 5 mm) eine maximale durchschnittliche Intensität von 1250 mW/cm^2 bzw. 500 mW/cm^2 .

Ein Strahlteiler (ST) lenkt einen schwachen Reflex des Laserstrahls bei 532 nm auf eine schnelle Photodiode (818-BB-22, UV enhanced silicon PIN detector, Newport Spectra-Physics GmbH, Darmstadt, Deutschland). Ein Pulsgenerator (TGP110, Te-

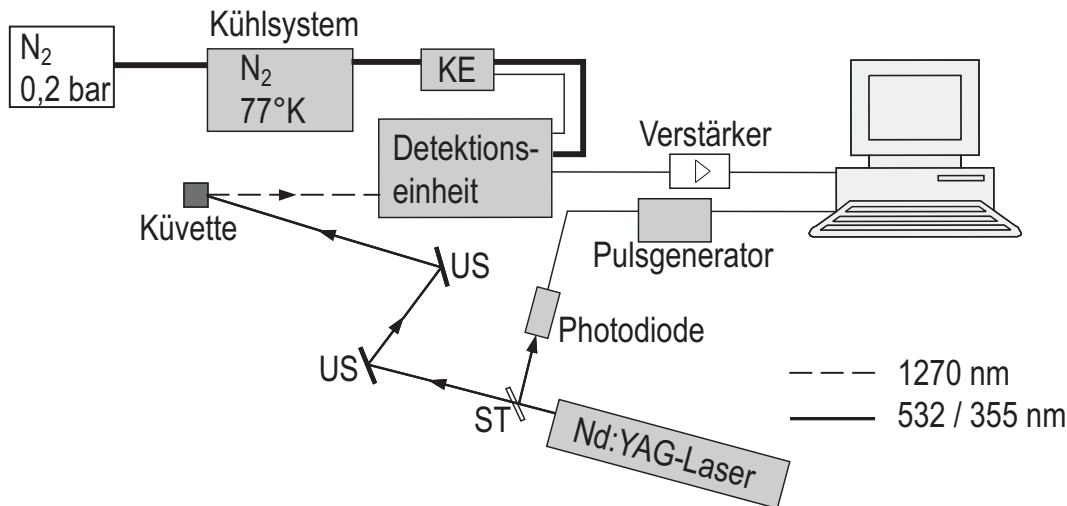


Abbildung 3.1: Versuchsaufbau zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff und zur Detektion seiner Lumineszenz. ST = Strahlteiler, US = Umlenkspiegel, KE = Kontrolleinheit zur Regelung der Temperatur des Detektors.

lemeter Electronic, Donauwörth, Deutschland) verlängert den elektrischen Puls der Diode zu einem Rechteckpuls. Die abfallende Flanke des Rechteckpulses dient einer Single-Photon-Counting-Messkarte (7886S, FAST Com Tec GmbH, Oberhaching, Deutschland) als Startsignal zur zeitaufgelösten Messung der Lumineszenzphotonen. Je zwei dielektrische Spiegel (US) lenken die Strahlen auf die zu untersuchende Probe. Die Spiegel ermöglichen neben einem kompakten Aufbau auch die exakte Justierung des Laserstrahls auf das verwendete Messobjekt. Dies kann je nach Anforderung eine Küvette aus Quarzglas sein (SUPRASIL, Typ 101-QS, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland), die zwischen 200 nm und 2500 nm eine Transmission von über 80% garantiert, eine Durchflussküvette aus Quarzglas oder Probenhalter für Untersuchungen an menschlicher und tierischer Haut (Abbildung 3.2).

Linsen bilden die Lumineszenzstrahlung des in den Proben erzeugten Singulett-Sauerstoffs auf einen Photomultiplier (R5509-42, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching) ab. Um die spektrale Bandbreite der einfallenden Strahlung möglichst nur auf die Lumineszenzstrahlung des Singulett-Sauerstoffs zu reduzieren wird ein Interferenzfilter (IF) (P-E Lambda 900, LOT-Oriel GmbH & Co. KG, Darmstadt, Deutschland) verwendet, der bei 1270,6 nm eine maximalen Trans-

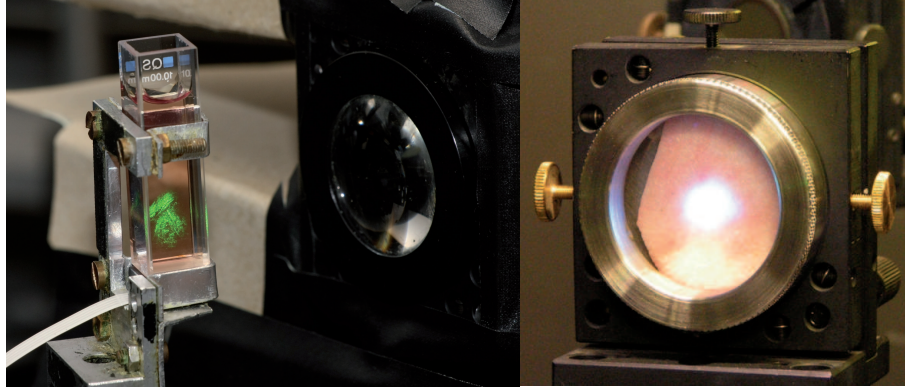


Abbildung 3.2: Bilder der Quarzglasküvette und der Halthalterung mit dem durch den Laserstrahl angeregten Bereichen

mission von 49% und eine Bandbreite von 10 nm hat. Um einen möglichst großen Anteil der erzeugten Strahlung detektieren zu können, werden drei Sammellinsen verwendet, die den einfallenden Strahl auf die $3 \times 8 \text{ mm}^2$ große aktive Fläche der InP/InGaAsP-Kathode des Photomultipliers bündeln. Der detaillierte Aufbau der Linsen mit dem Photomultiplier ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

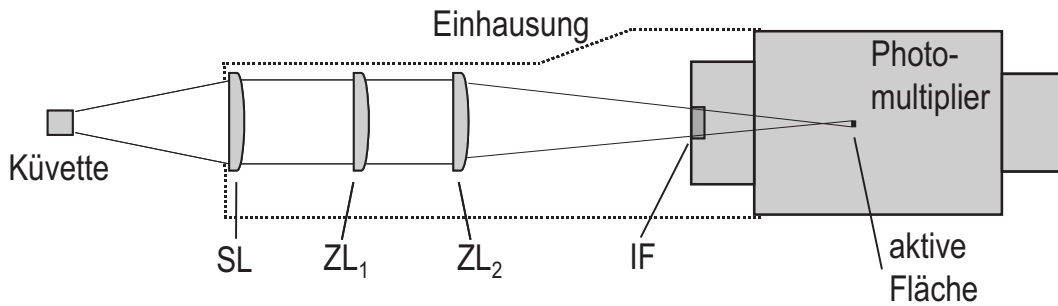


Abbildung 3.3: Darstellung der Detektionseinheit aus Abbildung 3.1: SL = Sammellinse, $ZL_{1,2}$ = Zylinderlinsen, IF = Interferenzfilter (für versch. Wellenlängen)

Um Störungen durch Streulicht zu vermeiden schirmt eine Einhausung die gesamte optische Anordnung ab. Ein Kühlsystem, das die aktive Fläche des Photomultipliers auf -80°C kühlt, verringert das thermische Rauschen, Dunkelrauschen der Halbleiterschicht. Dazu wird aus einem Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff der kalte Dampf durch Überdruck in die Kühlschlange um die Photomultiplier-Röhre gepumpt. Eine Kontrolleinheit (KE) regelt den Durchfluss und verhindert ein zu weites Abkühlen,

indem sie bei Bedarf den Überdruck entweichen lässt.

Um den zeitlichen Verlauf der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz zu erfassen, verwendet man das Verfahren des Einzelphotonenzählens (single photon counting). Dazu vervielfacht ein Verstärker (HFAC-26GHz Wide Band Amplifier with Overload Detection for PMTs or MCPs, Becker & Hickl GmbH, Berlin, Deutschland) das vom Photomultiplier detektierte Signal elektronisch und leitet es an die Messkarte im PC weiter. Die Messkarte mit einer maximalen Zeitauflösung von 1 ns misst die Zeit zwischen dem Startsignal (dem Triggersignal der Photodiode) und dem Signal des Photomultipliers. Jedes detektierte Photon erhöht abhängig vom zeitlichen Abstand zum Startsignal den Zähler des entsprechenden Kanals um eins. Die beobachtete Zeitspanne nach dem Startsignal kann durch das Produkt aus Kanalanzahl und Kanalbreite eingestellt werden. Die Anzahl der Kanäle ist gerätebedingt auf 30000 festgelegt und abhängig von der zeitlichen Länge der Lumineszenz wählt man eine Kanalbreite von 4 ns bzw. 16 ns. Die Einzelmessung wiederholt man je nach Signalstärke 10^3 bis 10^5 mal und speichert die zeitlich statistische Verteilung der gezählten Photonen zur Weiterverarbeitung in einer ASCII-Datei.

Interferenzfilter für frequenz aufgelöste Messungen

Zur einfacheren und schnelleren Durchführung frequenz aufgelöster Messungen ohne einen Monochromator können statt dem Interferenzfilter für 1270 nm auch Interferenzfilter für andere Wellenlängen in den Aufbau eingebracht werden. Eine Übersicht über die verschiedenen Filter gibt Tabelle 3.1 mit Angabe der zentralen Wellenlänge und der Halbwertsbreite der Filter, sowie deren Hersteller. Durch die verschiedenen Filter lassen sich Untergrundsignale vom Messsignal abziehen oder die Lumineszenzsignale können auf Grund der spektralen Auflösung eindeutig als Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs nachgewiesen werden, da dieser nur im Bereich von 1270 nm Strahlung emittiert. Des weiteren können mit drei Interferenzfiltern mit Halbwertsbreiten von 10 nm, 30 nm und 80 nm Lumineszenzsignale bei 1270 nm aufgenommen werden, um die Signalthöhe bei wenigen Lumineszenzphotonen zu erhöhen. Dabei muss beachtet werden, dass sowohl die Signalstärke der Lumineszenz als auch die Störphotonen, hervorgerufen durch den Laser oder durch Fluoreszenz, vermehrt detektiert werden. Des weiteren kann die Verwendung von Kantenfiltern mit einer

Absorption unterhalb von 1000 nm das Messsignal entscheidend verbessern (Kapitel 6). Die Interferenzfilter wurden von den Firmen Ealing (Ealing Catalog Inc., Rocklin, USA), LOT-Oriel (LOT-Oriel GmbH & Co. KG, Darmstadt, Deutschland) und bk Interferenzoptik Elektronik GmbH (Nabburg, Deutschland) geliefert. Um die aufgenommen Lumineszenzsignale bei verschiedenen Wellenlängen vergleichen zu können, müssen bei der Auswertung nicht nur die Transmissionskurven der Filter berücksichtigt werden, sondern auch die Empfindlichkeit des Detektors, die nicht bei allen Wellenlängen konstant ist. Es erfolgte daher eine Kalibrierung der Empfindlichkeit mit einer Halogenlampe bei den verschiedenen Wellenlängen der Filter, da durch die verschiedenen Linsen, Filter und der Empfindlichkeit des Photomultipliers eine Berechnung der Empfindlichkeit aus den Transmissionskurven und der Detektor-Gerätekurve zu aufwendig ist. Die spektrale Emissionsverteilung der breitbandigen Halogenlampe ist bekannt und entspricht nahezu der eines Schwarzen Strahlers.

zentrale Wellenlänge	Halbwertsbreite	max. Transmission	Firma
1150,1 nm	9,8 nm	45,2%	Ealing
1201,6 nm	9,5 nm	38,1%	Ealing
1249,7 nm	9,6 nm	45,1%	Ealing
1260,1 nm	9,8 nm	42,0%	LOT
1270,6 nm	10,0 nm	49,1%	LOT
1280,3 nm	10,1 nm	52,1%	LOT
1299,3 nm	10,6 nm	49,6%	Ealing
1353,6 nm	12,1 nm	45,3%	Ealing
1401,5 nm	12,7 nm	52,0%	Ealing
1272,8 nm	30,5 nm	91,0%	bk
1273,3 nm	86,6 nm	94,7%	bk

Tabelle 3.1: Übersicht über die verwendeten Interferenzfilter

Sauerstoff-Messung durch einen optischen Sensor

Zur Bestimmung der Sauerstoff-Konzentration in den verschiedenen Lösungsmitteln wird das Sauerstoff Messgerät MICROX TX 3 (Microsensor Oxygen Meter, PreSens

GmbH, Regensburg, Deutschland) verwendet. Dieses misst die O_2 -Konzentration mit Hilfe der Fluoreszenzabklingzeit immobilisierter Farbstoffe (Fluoreszenz lifetime imaging, FLIM). Es werden die Farbstoffmoleküle in der Spitze des Messensors durch Lichtimpulse angeregt und durch den bei den Farbstoffmolekülen vorhandenen Sauerstoff gequencht, dabei wird der Effekt der dynamischen Fluoreszenzlöschung (vgl. Abbildung 3.4) ausgenutzt. Bei diesem verkürzt die Möglichkeit der Deaktivierung des angeregten Farbstoffs durch einen zusätzlichen Weg, hervorgerufen durch den Quencher (hier: Sauerstoff), die Lebensdauer des angeregten Farbstoffs und verringert somit auch die Fluoreszenzintensität [49].

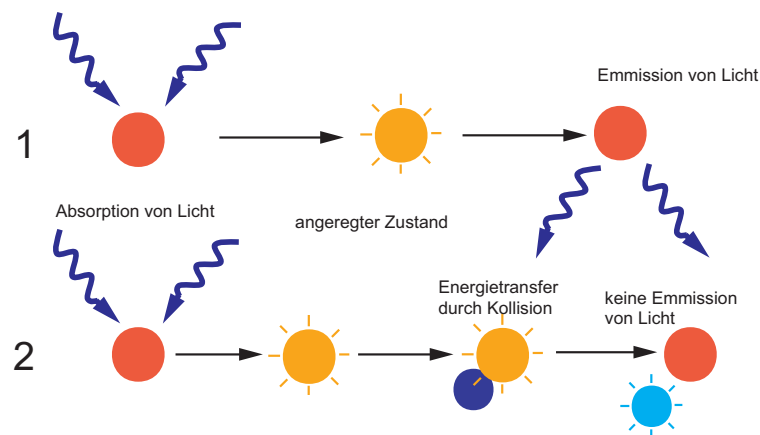


Abbildung 3.4: Prinzip der dynamischen Fluoreszenzlöschung

1. Fluoreszenz-Anregung und -Emission in Abwesenheit von Sauerstoff
2. Fluoreszenz-Anregung und dynamische Fluoreszenzlöschung in Anwesenheit von Sauerstoff

Das hier verwendete Gerät misst allerdings nicht die Intensität, da diese stark von der räumlichen Verteilung des Farbstoffs und der Homogenität der Anregung abhängt [49]. Zur Bestimmung der Konzentration des Quenchers wird der Phasenunterschied $\Delta\Phi$ zwischen dem sinusmodulierten Anregungssignal und dem Fluoreszenzsignal gemessen (vgl. Abbildung 3.5).

$\Delta\Phi$ hängt von der Fluoreszenz-Lebensdauer des Farbstoffs ab, aus der die Quencher-Konzentration bestimmt wird. Da sich bei der dynamischen Fluoreszenzlöschung ein Stoßkomplex aus dem angeregten Farbstoff- und dem Quencher-Molekül bildet, ist dieser Prozess temperaturabhängig (höhere Temperatur, stärkeres Quenchen). Da-

her muss während der Messung die Temperatur der Lösung bestimmt werden und, um Abweichungen zu vermeiden, die Temperatur möglichst konstant gehalten werden. Stimmt die Temperatur der Lösung nicht mit der durch einen externen Sensor bestimmten überein, können sich Abweichungen bei der Konzentrationsbestimmung des Sauerstoffs ergeben. Außerdem muss vor einer neuen Messung die Messsonde in dem bei der Messung verwendeten Lösungsmittel kalibriert werden. Dabei wird sowohl der Phasenunterschied als auch die Temperatur der Lösung bei Luftsättigung der Lösung mit Sauerstoff (als 100% O₂ bezeichnet) und bei kompletter Verdrängung des Sauerstoffs durch Stickstoff in der Lösung (0% O₂) bestimmt und als Vergleichswert gespeichert.

Da die Farbstoffe und Glasfasern des Sensors für den Gebrauch in Wasser bestimmt sind, tritt in anderen Lösungsmitteln eine beschleunigte Alterung der Materialien auf. So erreicht man in Alkohol als Lösungsmittel bereits nach wenigen Messungen die Detektionsgrenze als in Wasser; in unpolarenen Lösungsmitteln wie Benzol oder Cyclohexan ist gar keine Messung möglich.

Auf Grund der sehr stark lokalisierten Sauerstoff-Messung an der Spitze des Messsensors und der Tatsache, dass sich dieser nicht im Zentrum der Anregung (zu hohe

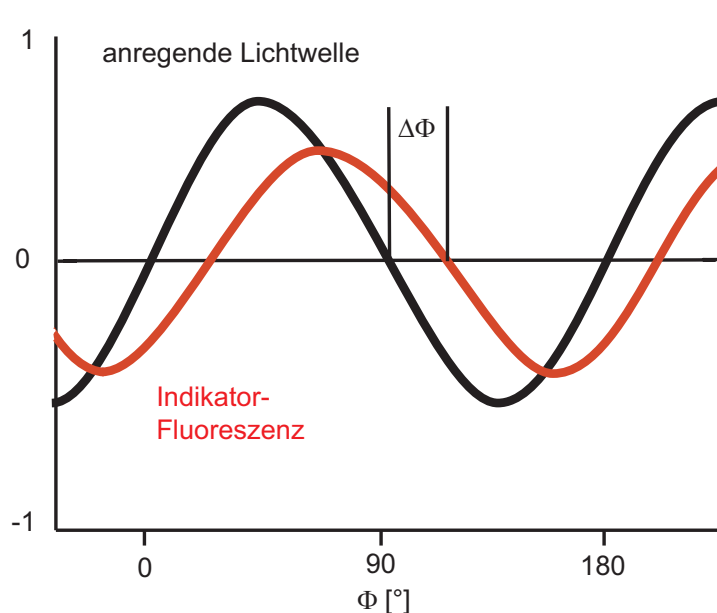


Abbildung 3.5: Messung des Phasenunterschieds $\Delta\Phi$ zwischen der anregenden Lichtwelle und der Indikator-Fluoreszenzwelle

Lichtintensitäten führen zu Störungen) befindet, muss bei den Messungen bedacht werden, dass sich ein Gradient in der Sauerstoff-Konzentration einstellt (vgl. Abb. 2.12). Dieser Effekt kann zwar durch das Rühren mit einem Magnetrührer vermindert werden, stellt aber dennoch eine starke Beeinträchtigung dar, da nicht am Ort der Singulett-Sauerstoff-Erzeugung, bzw. der Triplett-Anregung des Farbstoffs die exakte Sauerstoff-Konzentration bestimmt werden kann. Die Genauigkeit der Messungen liegt zwischen 2% und 20%, je nach O₂-Konzentration in der Lösung.

Breitbandige UVA-Bestrahlung

Um Veränderungen unter Langzeitbestrahlungen mit solarer UVA-Strahlung simulieren zu können wurde eine Hochleistungs-UVA-Quelle verwendet (OmniCure Series 2000, igb-tech GmbH, Friedelsheim, Deutschland). Geräteintern ist das Spektrum einer Quecksilberdampf Lampe mit 200 W Ausgangsleistung auf einen Wellenlängenbereich von 320 - 390 nm eingeschränkt (Spektrum siehe Abbildung 3.6). Mit einer maximalen Ausgangsleistung von 2,5 W ist somit eine Bestrahlung mit einer Dosis von 1 W/cm² einstellbar. Dabei wurde das Ende des Lichtleiters mit einem Durchmesser von 1 cm im Abstand von ca. 2 cm von der Küvette montiert. Die UVA Strahlung leuchtete dann ca. 2,5 cm² der Küvette aus.

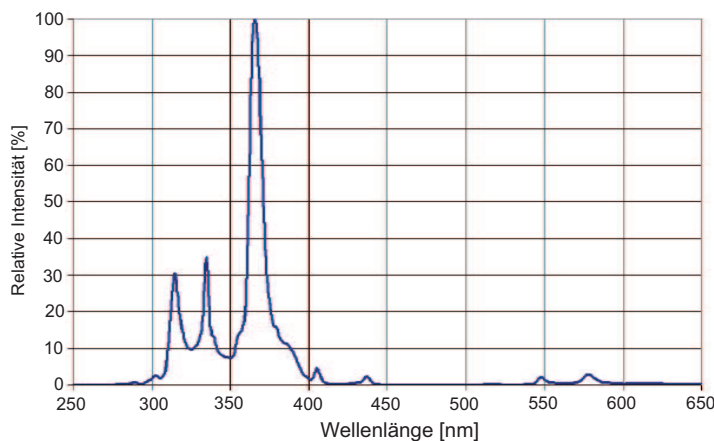


Abbildung 3.6: *Emissionsspektrum der breitbandigen UVA-Lampe OmniCure Series 2000*

3.2 Auswertung der Messergebnisse

Das Steuerungsprogramm der schnellen Messkarte speichert das durch Single-Photon-Counting aufgenommene Messsignal als ASCII-Datei ab. Somit kann das Programm Mathematica (Mathematica 5.2, Wolfram Research, Champaign, USA) das Messsignal weiterverarbeiten und auswerten. Dazu kann als erstes, je nach Qualität und Höhe des Signals, über mehrere Kanäle aufsummiert werden, so dass eine Zeitauflösung von 4 ns bis zu 256 ns möglich ist. Ein Aufsummieren über mehr als 256 ns ist nicht sinnvoll, da dann die Anstiegszeit in manchen Fällen nicht mehr bestimmt werden kann. Das Abziehen des Untergrundrauschens bringt eine weitere Verbesserung der Auswertbarkeit des Signals. Das so bereinigte Signal kann nun in einem selbst ausgewählten Bereich gefittet werden, wobei mittels der Levenberg-Marquard-Fitroutine versucht wird die Abweichungen zu minimieren. Dabei passt Mathematica die vorgegebene Funktion $N_{\Delta}(t) = A \cdot (e^{\beta_2(t-t_0)} - e^{-\beta_1(t-t_0)})$ den Messpunkten an (vgl Kapitel 2.8 Gleichung 2.16) und variiert die Fitparameter A , β_1 , β_2 und t_0 so lange, bis die mittlere quadratische Abweichung zwischen den Messpunkten und der Fitkurve minimal ist. Die Abbildung 3.7 zeigt ein typisches Messbeispiel für eine Lumineszenzmessung mit der Fitkurve. Zusätzlich ist darunter die Abweichung der Messpunkte von der Kurve dargestellt.

Anstelle der Raten β_1 und β_2 gibt das Messprogramm direkt die Zeiten $t_R = 1/\beta_1$ und $t_D = 1/\beta_2$ an, die die Anstiegs- bzw. Abklingzeit darstellen. Der Parameter t_0 verschiebt den Fit horizontal bezüglich der Messkurve, um den Start des Lumineszenzsignals möglichst genau zu bestimmen. Das über die gefittete Kurve berechnete Integral ist als Energie der Lumineszenz zu verstehen und dient dem Vergleich verschiedener Messkurven. Zu den Messwerten und der Fitkurve ist die Abweichung der aufgenommenen Messpunkte zur Fitkurve extra dargestellt. Die Symmetrie dieser Abweichungen dient zur Überprüfung, ob die Parameter der Fitkurve exakt bestimmt wurden. Die Genauigkeit der bestimmten Raten β_1 und β_2 hängt von mehreren Faktoren ab. So entscheidet als erstes die Qualität der Einzelmessung über die Ungenauigkeit. Je besser das Signal-Rauschverhältnis einer Messung ist, um so besser können die Fitparameter bestimmt werden. Ebenso kann eine ungünstige Wahl

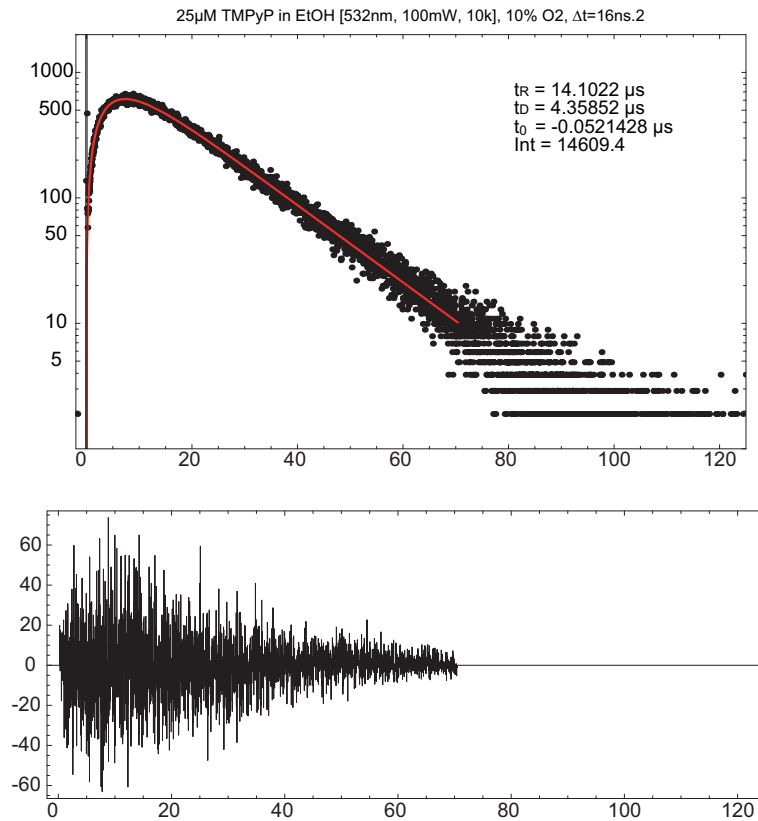


Abbildung 3.7: Messsignal von 25 μM TMPyP in EtOH bei 10% Luftsättigung. In der Überschrift ist der Dateiname, sowie die zeitliche Auflösung angegeben (16 ns \cdot 2). Ebenfalls angezeigt sind die Anstiegs- (t_R) und Abklingzeit (t_D), die zeitliche Verschiebung (t_0), sowie der Wert des Integrals (Int) über die gefittete Kurve. Unterhalb des Messsignals ist die Abweichung der Messwerte von der Fitkurve dargestellt.

des Fitbereichs die Genauigkeit verringern. So sollte der Startpunkt der Fitkurve so gewählt werden, dass die Fluoreszenz des Farbstoffs und die Störung durch den Laserpuls bereits abgeklungen sind, aber noch genügend Messpunkte zur Verfügung stehen um eine akzeptable Anstiegszeit zu erhalten. Für den Endpunkt der Fitkurve ist zu beachten, dass er nicht zu spät gesetzt wird und dadurch ein Bereich mit berechnet wird, in dem das Rauschen bereits die Lumineszenz überwiegt. Es sollten aber dennoch genügend Messpunkte zur Bestimmung der Fitkurve berücksichtigt werden. Ein weiterer zu beachtender Punkt ist, dass die angegebenen Zeiten nicht exakter bestimmt werden können, als es die Zeitauflösung der Messkarte bzw. des aufsummierten Signals zulassen. So liegt diese zwischen minimal 4 ns und maximal

256 ns. Aus all diesen möglichen Fehlerquellen ergibt sich für die ermittelten Raten eine Ungenauigkeit von 10%.

3.3 Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie

Um bei zellulären Strukturen den Ort der Lokalisation des Farbstoffs zu finden, ist es zweckmäßig, ein Fluoreszenzmikroskop einzusetzen. Dabei wird der inkubierte Farbstoff durch Licht angeregt und die dabei entstehende Fluoreszenz räumlich aufgenommen. Durchlichtaufnahmen dienen der Erkennung der Form des zu untersuchenden Objekts. Als Fluoreszenz- bzw. Durchlichtmikroskop wurde ein Zeiss Axiotech Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet, welches in Abbildung 3.8 schematisch für beide Betriebsformen dargestellt ist (optische Auflösung $1\text{ }\mu\text{m}$). Für die Durchlichtaufnahmen (Abbildung 3.8 A) wird die Probe von unten mit einer Halogenlampe durchstrahlt. Das Licht, ausgehend von der Probe, wird mit den Lin- sen L2 und L3 auf die CCD-Kamera abgebildet und mit dem PC ausgewertet.

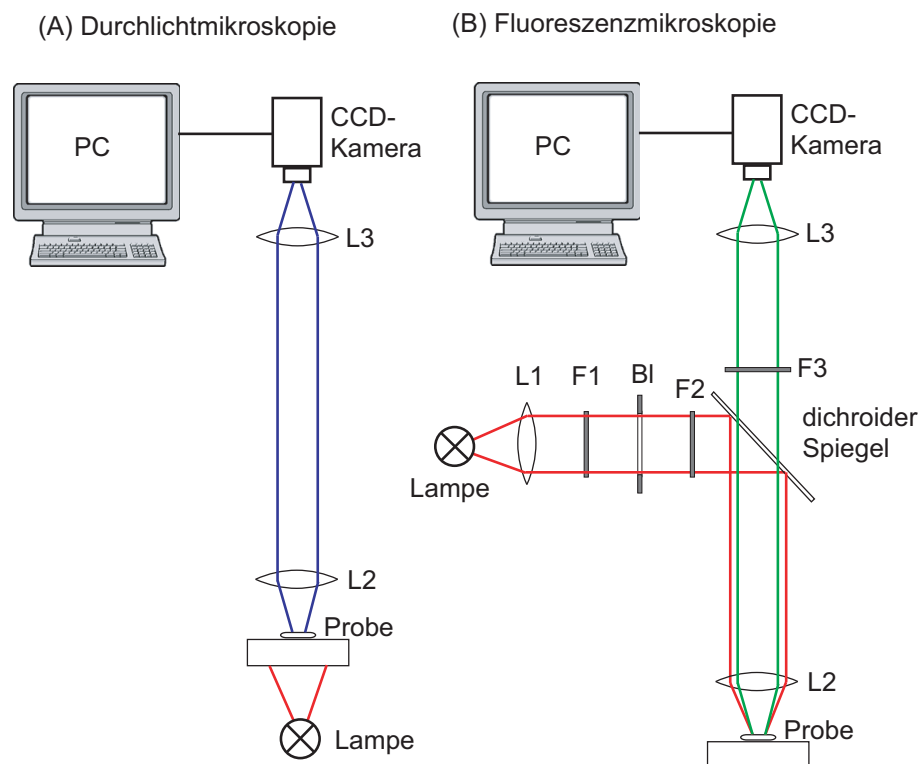


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des Strahlengangs im Durchlichtmikroskop (A) und im Fluoreszenzmikroskop (B)

Für die Fluoreszenzaufnahmen (Abbildung 3.8 (B)) steht eine Quecksilberdampf-hochdrucklampe (HBO) als Lichtquellen zur Verfügung. Im Strahlengang der HBO-Lampe befand sich ein Neutralglasfilter NG-4 (F1). Mit Hilfe der Blende (Bl) ist es möglich, den ausgeleuchteten Bildausschnitt zu verkleinern. Die Blende ist jedoch bei allen Aufnahmen ganz geöffnet. In den folgenden Filterblock (F2) sind die zu den Organellfarbstoffen (Farbstoffe, die Bestandteile der Zelle sichtbar machen) und zu TMPyP bzw. XF73 passenden Anregungsfilter eingebaut. Der Anregungsfilter besitzt seine höchste Transmission im Absorptionsbereich des Farbstoffs und ist sonst nicht transmittierend. Der dichroide Strahlteilerspiegel reflektiert das gefilterte Anregungslicht auf die Probe. Das von dort ausgehende Fluoreszenzlicht reflektiert der Strahlteilerspiegel nicht und der Emissionsfilter (F3) trennt es spektral von Resten des Anregungslichts und allem anderen, nicht zur Fluoreszenz des jeweiligen Farbstoffes gehörendem, Licht. Die so entstandenen Fluoreszenzbilder jedes Farbstoffes werden von einer CCD-Kamera (PCO, Kelheim) aufgenommen und per Bildverarbeitung mit den Durchlichtaufnahmen zusammengefügt.

Tabelle 3.2 gibt eine Liste der verwendeten Anregungs- und Emissionsfilter (Omega Optical, Brattleboro, USA) sowie der dichroiden Spiegel (Omega Optical) wieder. Die jeweilige Filterbezeichnung enthält die Zentralwellenlänge sowie die Halbwertsbreite (z.B. hat der Filter 695AF55 eine Zentralwellenlänge von 695 nm und eine Halbwertsbreite von 55 nm). Die Klammerwerte geben die Katalogbezeichnung des deutschen Vertriebs durch die Firma Photomed GmbH, Seefeld an. Der Farbstoff Hoechst 33342 ist ein Farbstoff, der sich in die DNA einlagert und somit den Zellkern anfärbt (vgl. Kapitel 7).

Farbstoff	Anregungsfilter	dichroider Spiegel	Emissionsfilter
TMPyP	405DF40 (XF1008)	415DRLP (XF2059)	695AF55 (XF3076)
XF73	405DF40 (XF1008)	415DRLP (XF2059)	695AF55 (XF3076)
Hoechst 33342	365WB50 (XF1005)	400DCLP (XF2001)	450AF58 (XF3073)

Tabelle 3.2: *Liste der für die Kolokalisationsaufnahmen verwendeten Anregungs- und Emissionsfilter, sowie der dichroiden Spiegel*

3.4 verwendete Photosensibilisatoren

In der vorliegenden Arbeit dient sowohl Wasser (H_2O), als auch Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, EtOH) als Lösungsmittel. Daher wird der hydrophile Farbstoff XF73 in Wasser untersucht, da bisher dessen Phototoxizität in Zell- und Bakterienexperimenten nachgewiesen wurden, jedoch die grundlegenden physikalischen Daten noch fehlen. Der hydrophobe Farbstoff Perinaphthenon löst sich in Ethanol und sein geringes Molekulargewicht und seine hohe Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute machen ihn zu einem geeigneten Untersuchungsobjekt für Toxizitätsversuche. Der Farbstoff TMPyP wurde bereits vielfach untersucht und dient in dieser Arbeit als Referenzfarbstoff. Mit einem Einstrahl-Spektrophotometer (DU-640, Beckmann Instruments, München) werden Transmissionsspektren der Photosensibilisatoren bei geeigneten Konzentrationen aufgenommen und zu den gezeigten Absorptionswirkungsquerschnitten umgerechnet.

3.4.1 TMPyP

Als Referenzfarbstoff wurde 5,10,15,20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridino)-porphyrin tetra-(p-toluenesulfonate) (TMPyP) verwendet (Abbildung 3.9). Dieser Farbstoff ist ein schon von verschiedenen Arbeitsgruppen untersuchter Photosensibilisator auf Porphyrin-Basis. Das Grundgerüst dieses Farbstoffs ist ein Porphin-Ring mit der Summenformel $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4$, der aus 4 Pyrrol-Ringe gebildet wird, die durch Methin-Gruppen miteinander verbunden sind. Der Porphin-Ring (Abb. 2.1 in Kapitel 2) ist ein planares, sehr stabiles Molekül mit 9 konjugierten Doppelbindungen.

An den Ring sind in 5,10,15,20-Position je ein Pyridin-Ring mit einem positiv geladenem Stickstoff-Atom kovalent gebunden. Als Reinstoff liegt das Molekül als neutrales Salz vor, da weitere 4 Toluensulfonate als Anionen angelagert sind.

TMPyP löst sich sowohl in Wasser, als auch in Ethanol und kann daher in beiden Lösungsmitteln verwendet werden. Abbildung 3.10 zeigt die Absorptionsspektren von TMPyP in beiden Lösungsmitteln. Die Spektren zeigen kaum eine Abhängigkeit vom Lösungsmittel, insbesondere bei der Anregungswellenlänge von 532 nm ist der Absorptionswirkungsquerschnitt nahezu identisch bei $(3,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$. Die

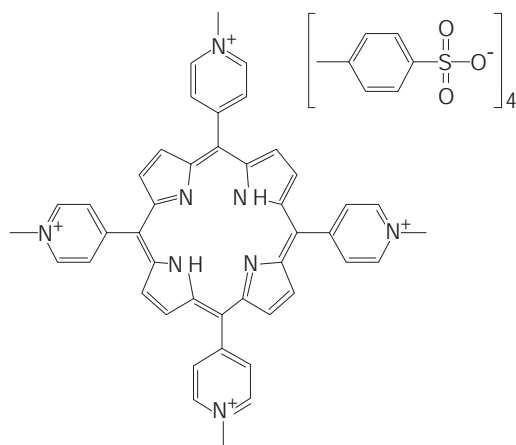


Abbildung 3.9: Strukturformel von *TMPyP*

Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} beträgt $0,77 \pm 0,04$ [9]. Der Farbstoff mit einer molaren Masse von 1363,63 g/mol wurde mit einer Reinheit von 97% von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

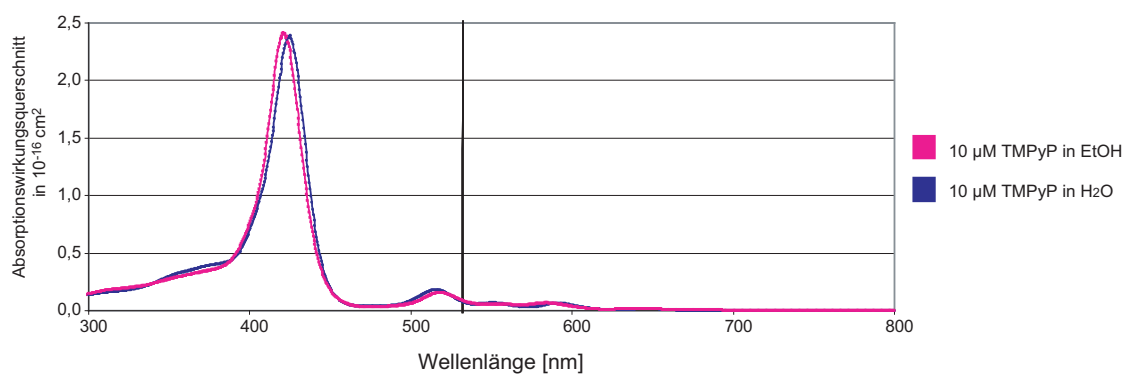


Abbildung 3.10: Absorptionswirkungsquerschnitt von *TMPyP* gelöst in Wasser und Ethanol

3.4.2 XF73

XF73 ist ein synthetischer, neu entwickelter Farbstoff, der von der Firma Destiny Pharma aus Brington, England bezogen und von Xiangdong Feng synthetisiert wurde. In unserer Arbeitsgruppe ergaben sich bereits erste Hinweise auf die Phototoxizität und die bessere Aufnahme des Farbstoffs von Bakterien und Zellen. Im Gegensatz zu TMPyP binden sich an den Porphin-Ring nur in 5,15-Position zwei identische Substituenten kovalent. Die Substituenten sind Phenyl-Propyl-Ether mit einem endständigen quartären Ammonium. Das Gegenion ist Chlorid.

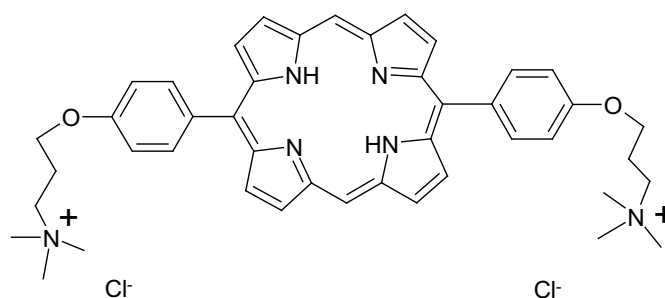


Abbildung 3.11: Strukturformel von XF73

In Abbildung 3.11 ist die Strukturformel von XF73 dargestellt. Die zwei Sauerstoffatome in den Ether-Bindungen und die positiv geladenen Stickstoffatome sorgen für eine gute Löslichkeit in Wasser. Abbildung 3.12 zeigt den Absorptionswirkungsquerschnitt von XF73 in Wasser, aufgenommen bei Farbstofflösungen mit Konzentrationen von $10 \mu\text{mol/L}$ und $500 \mu\text{mol/L}$. Zu erkennen ist die ausgeprägte Soret-Bande des Porphin-Gerüsts bei 400 nm und die schwächeren Q-Banden im sichtbaren Bereich, außerdem die Veränderungen des Absorptionswirkungsquerschnitts bei höheren Konzentrationen. Bei der Anregungswellenlänge von 532 nm besitzt XF73 einen Absorptionswirkungsquerschnitt von $2,3 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$ bei $10 \mu\text{mol/L}$ und von $1,6 \cdot 10^{-17}$ bei $500 \mu\text{mol/L}$. Die molare Masse von XF73 beträgt $694,93 \text{ g/mol}$. Die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} beträgt $0,57 \pm 0,06$.

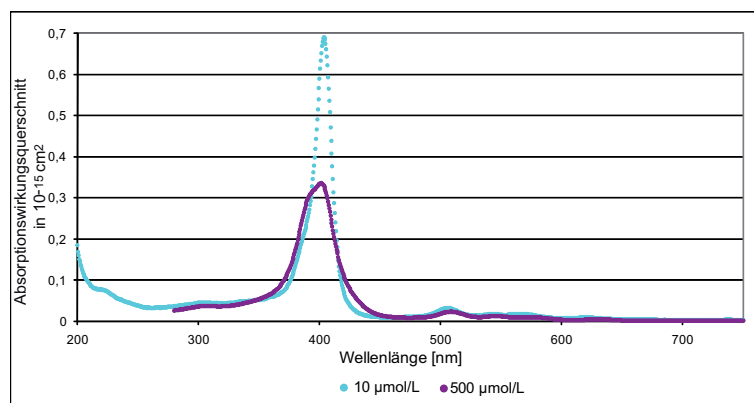


Abbildung 3.12: Absorptionswirkungsquerschnitt von XF73 in Wasser mit Konzentrationen von 10 $\mu\text{mol/L}$ und 500 $\mu\text{mol/L}$

3.4.3 Perinaphthenon

Perinaphthenon (PN) ist ein aromatisches Keton bestehend aus 3 aromatischen Ringen (Abb. 3.13). Ketone besitzen einen ersten angeregten Singulett-Zustand und darunter liegende Triplett-Zustände mit unterschiedlichen elektronischen Konfigurationen $\pi\pi^*$ oder $n\pi^*$. Auf Grund eines sehr schnellen Intersystem Crossings fluoreszieren diese Farbstoffe nicht und bevölkern das Triplett-Niveau innerhalb von Nanosekunden mit einer Effektivität von ca. 100% [59].

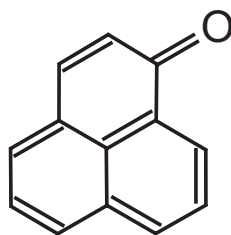


Abbildung 3.13: Strukturformel von PN

Die Effektivität des Energietransfers von einem Triplett-Zustand des Ketons auf den Grundzustand des Sauerstoffs ist stark von dem elektronischen Charakter des Triplett-Zustands abhängig. Ist der niedrigste besetzte Triplett-Zustand $\pi\pi^*$, so wird zu 90-100% Singulett-Sauerstoff erzeugt, während der Wert bei $n\pi^*$ auf 25-35% fällt. Es konnte gezeigt werden, dass der niedrigste Triplett-Zustand von PN eine $\pi\pi^*$ Elektronenkonfiguration aufweist [61]. Dies erklärt die hohe Singulett-Sauerstoff Quan-

tenausbeute Φ_{Δ} von PN in Benzol ($\Phi_{\Delta} = 0,94$) und in Methanol ($\Phi_{\Delta} = 0,97$) [59]. PN gehört somit zu den effizientesten Photosensibilisatoren bei der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff und findet daher oft als Referenzfarbstoff für andere Photosensibilisatoren Verwendung.

Wie in Abbildung 3.14 zu erkennen ist, absorbiert Perinaphthenon nur bis zu einer Wellenlänge von ca. 450 nm. Der Absorptionswirkungsquerschnitt bei 355 nm beträgt $0,45 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$. Das nahezu unpolare PN mit einer molaren Masse von 180,21 g/mol löst sich nicht in Wasser. Es wurde von Acros Organics (Belgien) mit einer Reinheit von 97% bezogen.

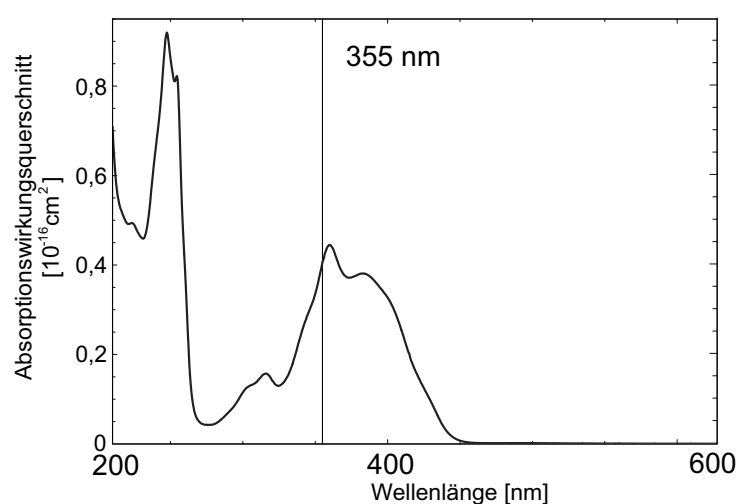


Abbildung 3.14: *Absorptionswirkungsquerschnitt von PN in Ethanol*

Kapitel 4

Singulett-Sauerstoff-Interaktion in reinen Lösungen

Zu Beginn dieser Arbeit werden nur die einfachsten Systeme bestehend aus einem Photosensibilisator in einem Lösungsmittel betrachtet. Es werden dabei drei unterschiedliche Farbstoffe untersucht. Ausgewählt wurden Perinaphthenon und XF73, da diese beiden auf Grund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften, wie Molekülgröße oder Polarität, besonders geeignet sein sollten, um als Photosensibilisator zur Inaktivierung von Bakterien eingesetzt zu werden. Als Referenzfarbstoff wurde TMPyP eingesetzt, dessen Eigenschaften schon des öfteren untersucht wurden und bisher keine negative Effekte, wie Eigenquenchen oder Ausbleichen unter Bestrahlung, beobachtet wurden [9].

Es werden die physikalischen Eigenschaften der verschiedenen Farbstoffe bestimmt und deren Verhalten beim Variieren der Farbstoff-, Sauerstoff- oder Quencher-Konzentration. Diese Messungen liefern die grundlegenden Daten und dienen als Vergleichswerte für weitere Untersuchungen, bei denen Biomoleküle oder Mikroorganismen in die Lösung eingebracht werden.

Von den drei verschiedenen Farbstoffen wurden Stammlösungen mit einer Photosensibilisator-Konzentration von 1 mmol/L hergestellt. Dazu wurden die benötigten Stoffmengen mit einer Analysenwaage (Sartorius CP 225 D) abgewogen und die notwendigen Mengen von Wasser oder Ethanol zugegeben. Um die Farbstoffe vollständig

aufzulösen wurden sie für 10 Minuten in ein Ultraschallbad (Qualilab, USR 30H) gestellt. Durch serielle Verdünnungsreihen wurden dann die gewünschten Farbstoff-Konzentrationen hergestellt. Es wurden immer reine Lösungsmittel verwendet, da die Raten und Ratenkonstanten lösungsmittelabhängig sind und daher in Ethanol-Wasser-Gemischen nur Mittelwerte von den Werten in reinen Lösungsmittel gemessen werden können. Auf Grund der Kalibrierung des Sauerstoff-Sensors bei Luftsättigung und bei 0% Sauerstoff kann in Lösungsmittelgemischen die Sauerstoff-Konzentration nicht bestimmt werden, da der Absolutgehalt an Sauerstoff (100% Sauerstoff) für Gemische nicht bekannt ist.

4.1 Lumineszenzsignale

In Abbildung 4.1 sind exemplarisch die Lumineszenzsignale von TMPyP in Wasser und Ethanol dargestellt. Die Anregung erfolgte durch einen Laserpuls bei 532 nm mit einer durchschnittlichen Leistung von 70 mW und wurde $4 \cdot 10^4$ mal mit einer Frequenz von 2,0 kHz wiederholt ($35 \mu\text{J}$ pro Puls). Die Farbstoff-Konzentration beträgt in beiden Lösungen $50 \mu\text{mol/L}$.

Abbildung 4.1 A zeigt das Lumineszenzsignal bei 1270 nm von TMPyP in Wasser und die absolute Abweichung der Messpunkte von der Fitkurve. Die Sauerstoff-Konzentration in der Lösung beträgt $270 \mu\text{mol/L}$ und entspricht 100% Luftsättigung in Wasser [5], die sich bei 1013 mbar einstellt. Das Lumineszenzsignal zeigt sowohl einen exponentiellen Anstieg, als auch ein exponentielles Abklingen. Auf Grund der logarithmischen Auftragung ergeben sich für den Anstieg und das Abklingen der Lumineszenz Geraden; durch die Summe beider Exponentialfunktionen ergibt sich ein charakteristisches Maximum der Lumineszenz [9]. Aus dem angepassten Fitkurven lassen sich mit Hilfe der Gleichung 2.16 aus Kapitel 2.8 die Anstiegs- und Abklingzeit der Lumineszenz bestimmen. Die Anstiegszeit, die in diesem Fall der Abklingdauer des T_1 -Zustands des Farbstoffes TMPyP in Wasser ohne weitere Zusätze entspricht, beträgt $\tau_R = (2,0 \pm 0,2) \mu\text{s}$. Hierbei ist die Qualität des Lumineszenzsignals äußerst massgebend für die Genauigkeit, mit der die Anstiegszeit bestimmt werden kann. Je besser das Signal/Rausch-Verhältnis und je geringer die

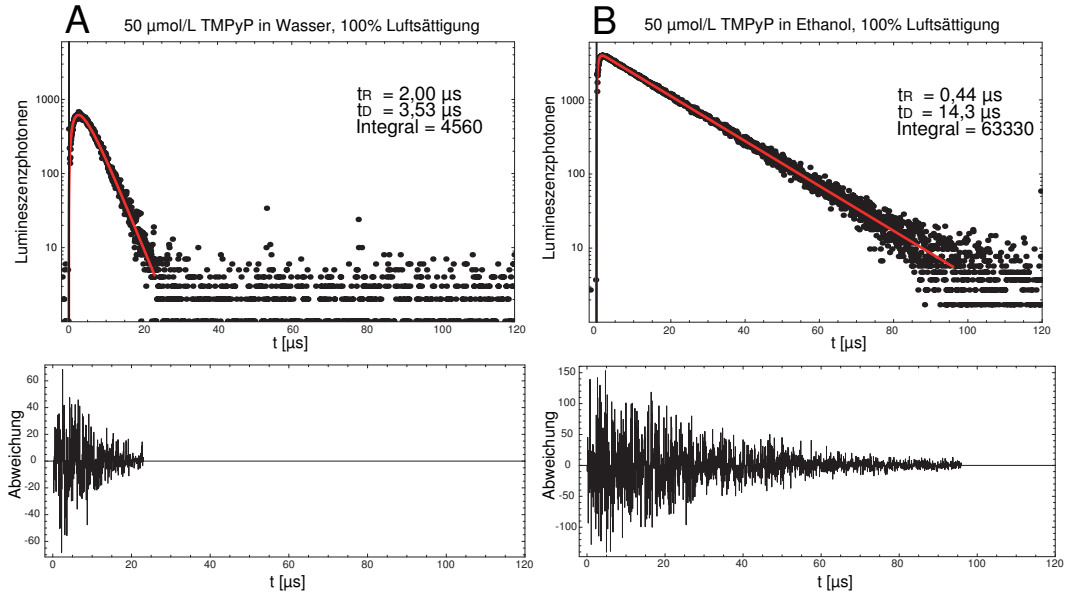


Abbildung 4.1: Lumineszenzsignal von 50 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP in Wasser (A) und Ethanol (B) mit den zugehörigen Anstiegs- (t_R) und Abklingzeiten (t_D) und dem Integral über die Fitkurve, sowie der absoluten Abweichung zwischen den Messpunkten und der Fitkurve

Störung durch Fluoreszenz oder Phosphoreszenz des Farbstoffs, desto besser kann die Anstiegszeit ermittelt werden. Die Abklingdauer $\tau_D = (3,5 \pm 0,3) \mu s$ entspricht in diesem Fall der Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer in Wasser ohne Quencher und stimmt gut mit den bekannten Literaturwerten überein ($3,1\text{--}4,2 \mu s$ [77]).

Das Lumineszenzsignal von 50 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP in Ethanol bei Luftsättigung ist in Abbildung 4.1 B zu sehen. In Ethanol beträgt der Sauerstoffgehalt bei 100% Luftsättigung 1850 $\mu\text{mol/L}$ [27]. Dieser erhöhte Sauerstoffgehalt spiegelt sich deutlich in der verkürzten Anstiegszeit des Lumineszenzsignals wieder, die bei TMPyP in Ethanol $(0,4 \pm 0,04) \mu s$ beträgt. Die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer ist stark vom Lösungsmittel abhängig und steigt in deuterierten oder unpolaren Lösungsmitteln an. So beträgt die Abklingdauer des Singulett Sauerstoffs in Abbildung 4.1 B $\tau_D = (14 \pm 1) \mu s$. Im Rahmen der Messgenauigkeit stimmt dieser Wert gut mit den vorhandenen Literaturwerten für Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten in Ethanol überein ($10\text{--}16 \mu s$ [77]).

Da beide Signale bei den gleichen Bedingungen (Anzahl der Laserpulse, Laserleistung, Farbstoff-Konzentration) aufgenommen wurden, zeigt sich, dass durch die

längere Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer und die erhöhte Sauerstoff-Löslichkeit in Ethanol die Signalhöhe um einen Faktor 5 ansteigt. Das Integral über die Gesamtzahl der detektierten Lumineszenzphotonen steigt sogar um den Faktor 14.

4.2 Nachweismethoden

Es gibt verschiedene Nachweismethoden um sicher zu gehen, dass die detektierten Signale der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz entsprechen und es sich nicht um die Phosphoreszenz des Farbstoffs oder um ein Störsignal handelt.

4.2.1 Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten

So bietet es sich bei Lumineszenzsignalen mit einem hohen Signal/Rausch-Verhältnis an, die Abklingdauer mit den bekannten Werten aus der Literatur zu vergleichen. In Tabelle 4.1 sind die Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten in verschiedenen Lösungsmitteln angegeben.

Lösungsmittel	$^1\text{O}_2$ -Abklingzeit [μs]	Zitat
H_2O	$3,5 \pm 0,5$	[5]
	3,1 - 4,5	[77]
EtOH	14 ± 2	[5]
	10 - 16	[77]
EtOD	30 ± 1	[77]
D_2O	67 ± 3	[18]
Benzol	31 ± 2	[77]
Cyclohexan	23 ± 3	[77]
Aceton	38 - 54	[77]
Methanol	10 ± 1	[77]

Tabelle 4.1: Übersicht über die Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten in verschiedenen Lösungsmitteln

Es muss allerdings darauf geachtet werden, dass die bestimmten Abklingzeiten auch tatsächlich der Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer entsprechen. Da die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer $1/K_{\Delta}$ wie bereits im theoretischen Teil dieser Arbeit beschrieben nach

$$K_{\Delta} := k_{\Delta} + (k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1})[P] + k_{\Delta Q}[Q] \quad (4.1)$$

unabhängig vom Sauerstoffgehalt der Lösung ist, muss sie bei einer Variation der Sauerstoff-Konzentration konstant bleiben. Da jedoch nach

$$K_{T_1} := k_{T_1} + (k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta})[O_2] + k_{T_1 S_0}[P] + k_{T_1 Q}[Q] \quad (4.2)$$

bei geringen Sauerstoff-Konzentrationen die Abklingdauer des Farbstoff-Triplett-Zustands $1/K_{T_1}$ länger sein kann als die Dauer der Singulett-Sauerstoff-Deaktivierung, vertauscht die Bedeutung der Raten β_1 und β_2 und die Anstiegszeit des Lumineszenzsignals entspricht der Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit. Ein Beispiel ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Hier ist das Lumineszenzsignal von 50 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP in Wasser

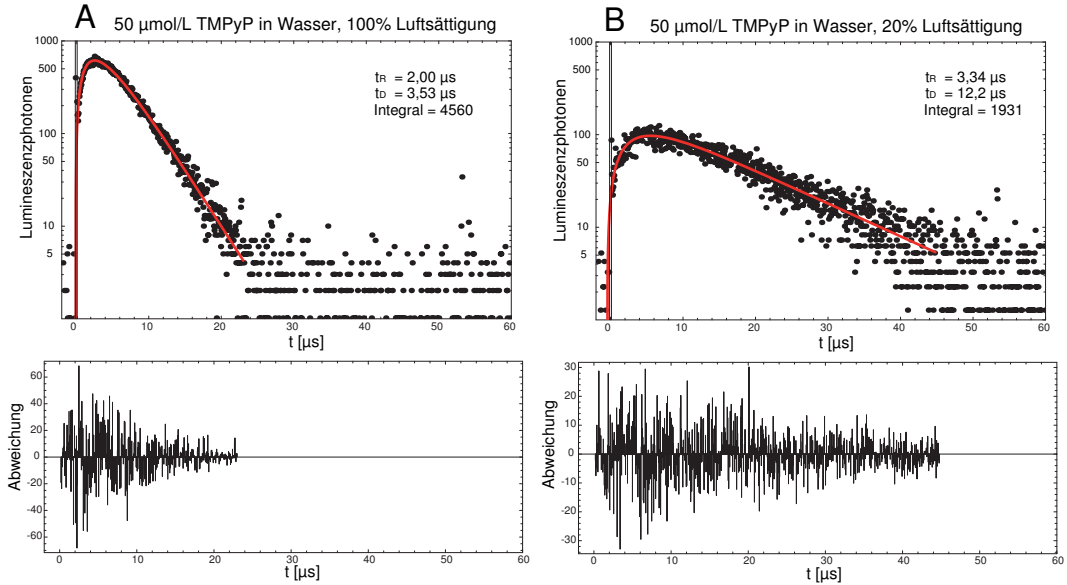


Abbildung 4.2: Lumineszenzsignal von 50 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP in Wasser bei 100% Luftsättigung und bei 20% Luftsättigung. Die Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit von ca. 3,5 μs wurde dabei einmal beim Abklingen der Lumineszenz (100% Luftsättigung, A) und einmal im Anstieg der Lumineszenz (20% Luftsättigung, B) detektiert.

bei 100% Luftsättigung und bei 20% Luftsättigung gezeigt. Die bekannte Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit von $(3,5 \pm 0,3) \mu\text{s}$ ist dabei einmal in der Abklingzeit (100% Luftsättigung, Abb. 4.2 A) und einmal in der Anstiegszeit (20% Luftsättigung, Abb. 4.2 B) wiederzufinden.

4.2.2 Spektrale Auflösung

Eine weitere Nachweismöglichkeit bietet die spektral aufgelöste Messung der zeitlich aufgelösten Lumineszenzsignale bei verschiedenen Wellenlängen („Wellenlängenscan“). Die maximale Übergangswahrscheinlichkeit zwischen $^1\Delta_g$ und $^3\Sigma_g^-$ liefert eine maximale Signalintensität der Lumineszenz für Wasser bei 1268 nm (0,98 eV) oder für Ethanol bei 1274 nm (0,975 eV), je nach Polarität des Lösungsmittels [5]. Abbildung 4.3 zeigt einen sogenannten Wellenlängenscan von 50 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP in Wasser und in Ethanol. Für die einzelnen Wellenlängen werden alle Lumineszenzphotonen, abzüglich des Laserpeaks, der zeitaufgelösten Messungen numerisch aufintegriert und gegen die Wellenlänge des verwendeten Filters aufgetragen, wobei die Werte mit einem an die Transmission des jeweiligen Interferenzfilters angepassten Faktor korrigiert werden. Anschließend wird durch eine Fitroutine eine Lorentzkurve durch die Messpunkte gelegt, wobei eine homogene Linienverbreiterung angenommen wird. Für den Fall einer detektierten Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Wasser liegt dann ein Maximum im Bereich von 1270 nm vor, wohingegen für die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in Ethanol das Maximum zwischen 1270 nm und 1280 nm liegt. Als Kontrolle dienen Untersuchungen der Lumineszenz bei Lösungen, die weniger als 0,1% Sauerstoff enthalten. Bei diesen sollte dann das vorher ausgeprägte Maximum in Abhängigkeit der O_2 -Konzentration kleiner werden oder gänzlich verschwinden.

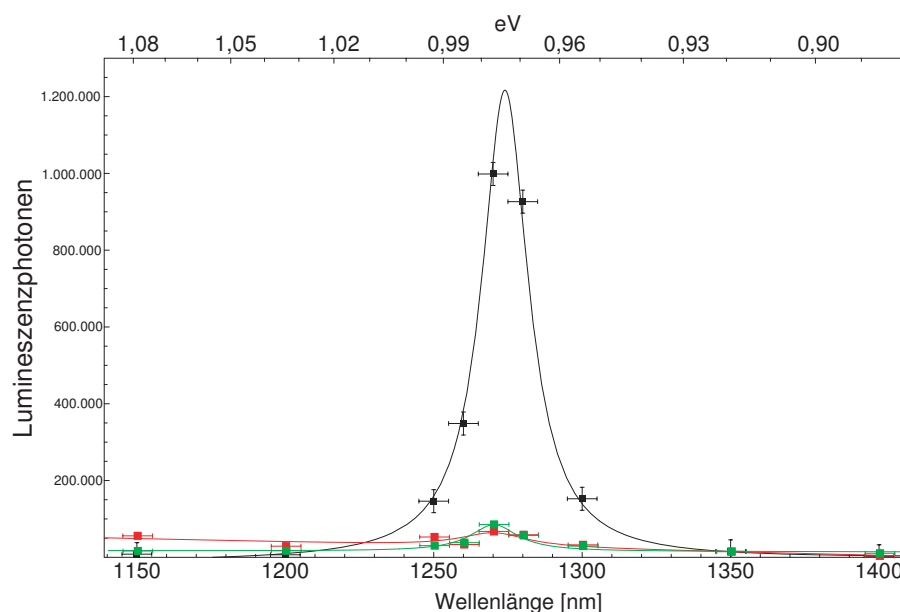


Abbildung 4.3: Wellenlängenscan von 50 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP in Ethanol (schwarz) und in Wasser (grün); rote Kurve: 50 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP in Wasser mit weniger als 0,1% Sauerstoff

4.2.3 Kombination aus zeitlich und spektral aufgelösten Messungen

In Abbildung 4.4 sind dreidimensionale Bilder aus der Kombination aus Wellenlängenscans und zeitaufgelösten Messungen gezeigt. Diese dreidimensionale Darstellung wird als sogenannter "3D-Fingerprint" bezeichnet und stellt durch die Kombination von Abklingzeit und Lumineszenzmaximum einen eindeutigen Nachweis von Singulett-Sauerstoff dar. Diese Darstellung ist insbesondere in komplexen Umgebungen von Singulett-Sauerstoff, wie in Zellen, von Bedeutung. In der Abbildung 4.4 sind die Kombinationen der Wellenlängenscans und der Abklingzeit für 50 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP in Wasser (A) in Ethanol (B) dargestellt. Deutlich ist die längere Abklingzeit zu erkennen, das höhere Lumineszenzsignal und die Verschiebung des Maximums zu längeren Wellenlängen in Abbildung B.

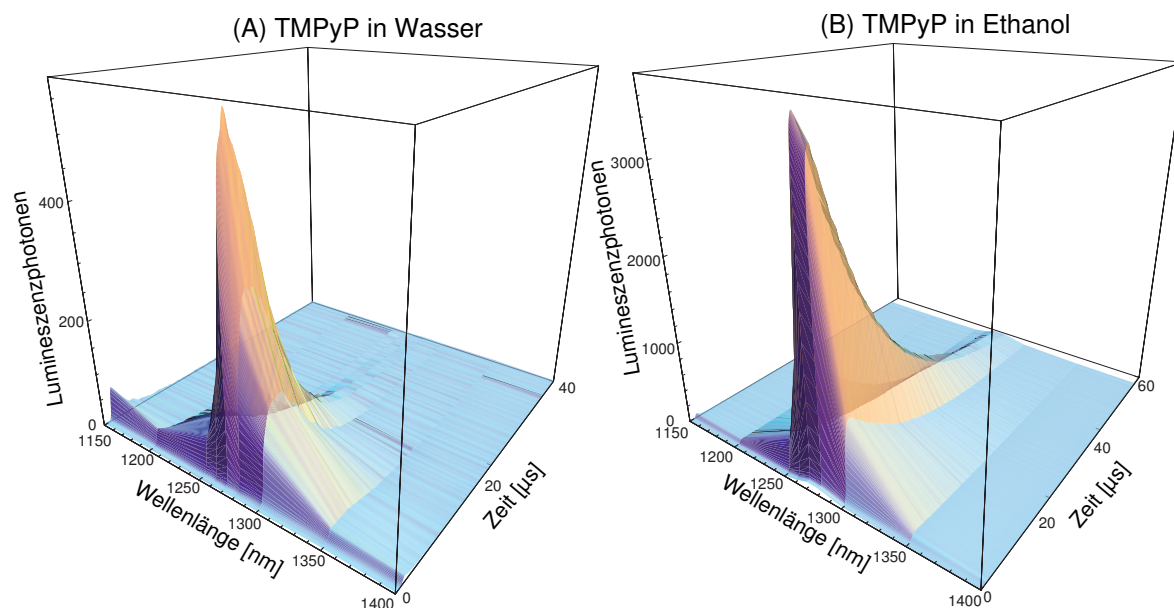


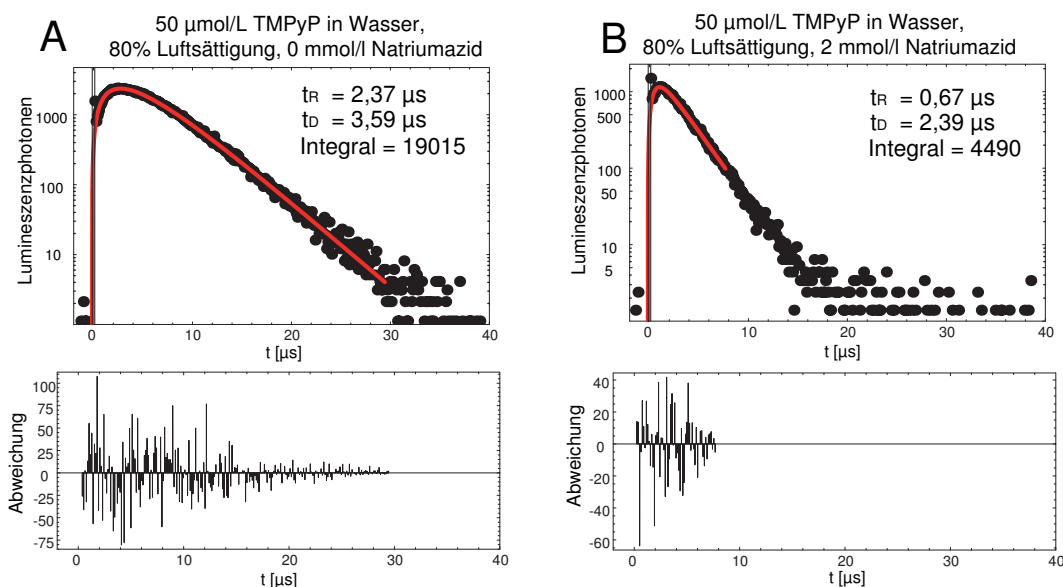
Abbildung 4.4: 3D-Fingerprint der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz generiert durch 50 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP in Wasser (A) und Ethanol (B); zu erkennen ist die Verschiebung des Lumineszenzmaximums und die längere Abklingdauer in Abb. B

4.2.4 Quenchen

Die Zugabe von verschiedenen Quenchern stellt eine weitere Möglichkeit dar die Lumineszenz dem Singulett-Sauerstoff zuzuordnen. So kann durch den Einsatz von Natriumazid NaN_3 , ein typischer Singulett-Sauerstoff-Quencher, die Lebensdauer von $^1\text{O}_2$ in Lösungen verkürzt werden [43].

In Abbildung 4.5 A ist ein Lumineszenzsignal von 50 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP in Wasser bei 80% Luftsättigung dargestellt; daneben in Abbildung 4.5 B die Lumineszenz der gleichen Lösung mit 2 mmol/L NaN_3 . Die $^1\text{O}_2$ -Abklingdauer verkürzt sich von 3,5 μs auf 0,67 μs .

Die Farbstoff-Triplett-Lebensdauer wird kaum durch Natriumazid gequenchet, so dass die Triplett-Abklingzeit konstant bei 2,4 μs bleibt. Dies zeigt einen Vorteil von NaN_3 gegenüber anderen Quenchern, da dies hauptsächlich $^1\text{O}_2$, aber kaum Triplett-Farbstoff-Zustände beeinflusst [43].



Abbildungung 4.5: Lumineszenzsignale von 50 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP bei einer Sauerstoff-Konzentration von 216 $\mu\text{mol/L}$ ohne (A) und mit (B) 2 mmol/L Natriumazid

4.3 Singulett-Sauerstoff in Wasser

Die ersten zwei untersuchten Systeme sind Farbstoff-Wasser-Gemische. Dazu wurden die beiden wasserlöslichen Porphyrine XF73 und TMPyP verwendet und ihre Raten und Ratenkonstanten bestimmt. Alle ermittelten Raten und Ratenkonstanten aus den Farbstoff-Wasser-Gemischen wurden in Abschnitt 4.5 noch einmal tabellarisch zusammengefasst und mit den weiteren ermittelten Raten aus Farbstoff-Ethanol-Gemischen verglichen.

4.3.1 XF73 in Wasser

Die Lumineszenzsignale des Singulett-Sauerstoffs, der durch XF73 generiert wurde, wurden als erstes untersucht. Es wurden dabei aus verschiedenen Einzelmessungen der Lumineszenz die Anstiegs- und Abklingraten bei unterschiedlichen Bedingungen, hervorgerufen durch Variation der Farbstoff-, Sauerstoff- oder Quencher-Konzentration, bestimmt. Diese wurden dann als Stern-Volmer-Plot aufgetragen und

mit mathematisch berechneten Kurven für β_1 und β_2 (vgl. Kapitel 2.8), deren Raten und Ratenkonstanten experimentell bestimmt wurden, verglichen. Dabei stellen die durchgezogenen Linien den Fall mit Rückkopplung vom Singulett-Sauerstoff auf den Triplett-Farbstoff-Zustand dar, die gestrichelten Linien dem Fall ohne Rückkopplung (vgl. Kapitel 2.8). Aus den Raten β_1 und β_2 lassen sich dann mit den Gleichungen 2.13 bis 2.15 die Raten K_{T_1} und K_{Δ} ermitteln, die die verschiedenen Raten und Ratenkonstanten zusammenfassen.

Die Einzelmessungen bestehen aus 40.000 Laserpulsen. Die Kanalbreite der Messkarte betrug 4 ns und es wurden immer 8 Kanäle aufsummiert, womit sich eine zeitliche Auflösung von 32 ns ergibt. Der Laser hatte eine Ausgangsleistung von 100 mW bei 532 nm und eine Wiederholfrequenz von 2,0 kHz

Variation der Sauerstoff-Konzentration

Die Einzelmessungen mit unterschiedlichen Sauerstoff-Konzentrationen wurden bei einer Farbstoff-Konzentration von konstant 50 $\mu\text{mol/L}$ XF73 ohne zusätzliche Quencher durchgeführt. Beginnend bei einer luftgesättigten Lösung mit 270 $\mu\text{mol/L}$ Sauerstoff wurde der Sauerstoff-Gehalt durch das Durchleiten von gasförmigen Stickstoff schrittweise verringert.

Durch die Variation der Sauerstoff-Konzentration konnten die sauerstoff-abhängigen Raten und Ratenkonstanten ermittelt werden. Dazu wurden bei jeder Einzelmessung die Anstiegs- und Abklingraten bestimmt und bei der entsprechenden Sauerstoff-Konzentration aufgetragen. Anschließend wurden die analytisch berechneten Raten β_1 und β_2 als Fitkurven eingezeichnet, so dass sich die in Abbildung 4.6 gezeigte Darstellung ergibt mit einem vergrößerten Ausschnitt zwischen 70 und 170 $\mu\text{mol/L}$ Sauerstoff.

Für die mit dem O_2 -Sensor gemessene Sauerstoff-Konzentration wird ein Fehler von 2% angenommen, für die Anstiegs- und Abklingraten ein Fehler von 15%. Aus der Abbildung 4.6 kann der Schnittpunkt der Raten K_{T_1} und $K_{\Delta, oR}$ bestimmt werden und liegt bei einer Sauerstoff-Konzentration von $[\text{O}_2] = (0,11 \pm 0,02) \text{ mmol/L}$.

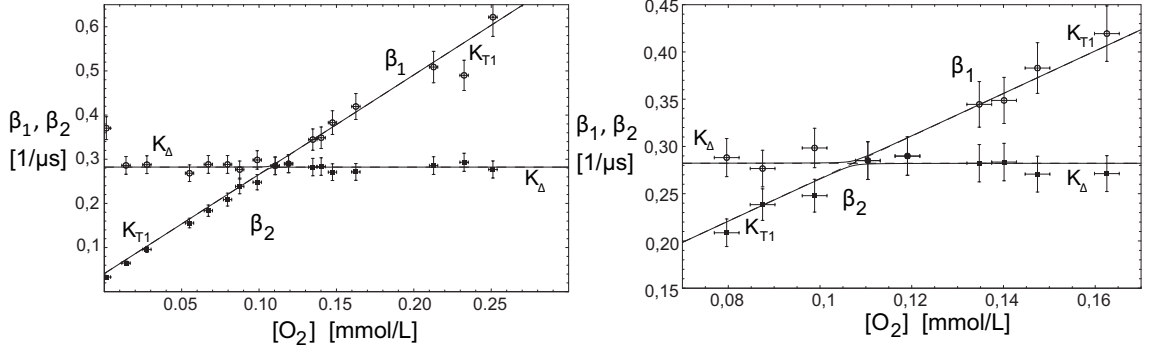


Abbildung 4.6: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Sauerstoff-Konzentration bei 50 $\mu\text{mol/L}$ XF73 in Wasser

Für die nicht von der Sauerstoff-Konzentration abhängige Rate K_Δ ergibt sich:

$$K_\Delta([O_2] = 0 \text{ mmol/L}) = k_\Delta + (k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}) \cdot 0,05 \text{ mmol/L} = 0,28 \mu\text{s}^{-1};$$

und durch die Extrapolation der Anstiegsrate β_2 auf die y-Achse (kein Sauerstoff in der Lösung) erhält man:

$$K_{T_1}([O_2] = 0 \text{ mmol/L}) = k_{T_1} + k_{T_1 S_0} \cdot 0,05 \text{ mmol/L} = 0,03 \mu\text{s}^{-1}.$$

Rechts vom Schnittpunkt, also bei hohen O_2 -Konzentrationen, lässt sich die Steigung der Rate β_1 (entspricht K_{T_1}) durch $k_{T_1 O}^\Sigma = k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta} = (2,25 \pm 0,3) \mu\text{s}^{-1} \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L}$ angeben. Die Summe der Ratenkonstanten beschreibt die Deaktivierung des Farbstoff- T_1 -Zustands durch molekularen Sauerstoff ohne und mit der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff. Bereits bei der Variation der Sauerstoff-Konzentration ist durch die geringe Aufspaltung zwischen den Raten β_1 und β_2 ersichtlich, dass auch im Rahmen der Fehlertoleranz kein oder nahezu kein Energierücktransfer von Singulett-Sauerstoff auf den Triplett-Zustand des Farbstoffs stattfindet. An dieser Stelle kann daher nur eine Obergrenze für das Produkt $k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1} < 0,002 \mu\text{s}^{-2} \cdot \text{mmol}^{-2} \cdot \text{L}^2$ angegeben werden.

Variation der Farbstoff-Konzentration

Zur Ermittlung der farbstoffabhängigen Raten und Ratenkonstanten wurden die XF73-Lösungen mit Farbstoff-Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/L}$ bis 500 $\mu\text{mol/L}$ un-

tersucht. Dabei wurden bei jeder Farbstoff-Konzentration zwei Lumineszenzsignale aufgenommen mit unterschiedlichen Sauerstoff-Konzentrationen, die so gewählt wurden, dass auf beiden Seiten des Schnittpunkts aus Abbildung 4.6 Werte gemessen wurden. Die gewählten Sauerstoff-Konzentrationen betrugen $216 \mu\text{mol/L}$ (80% Luftsättigung) und $81 \mu\text{mol/L}$ (30% Luftsättigung), zusätzliche Quencher wurden nicht hinzu gegeben.

In Abbildung 4.7 sind die Raten bei verschiedenen Farbstoff-Konzentrationen bei beiden Sauerstoff-Konzentrationen dargestellt. Dabei ist im Bereich kleiner Farbstoff-Konzentrationen die Abweichung von der theoretisch ermittelten Kurve größer, da auf Grund des niedrigeren Signal/Rausch-Verhältnisses die Lumineszenzsignale schlechter ausgewertet werden können.

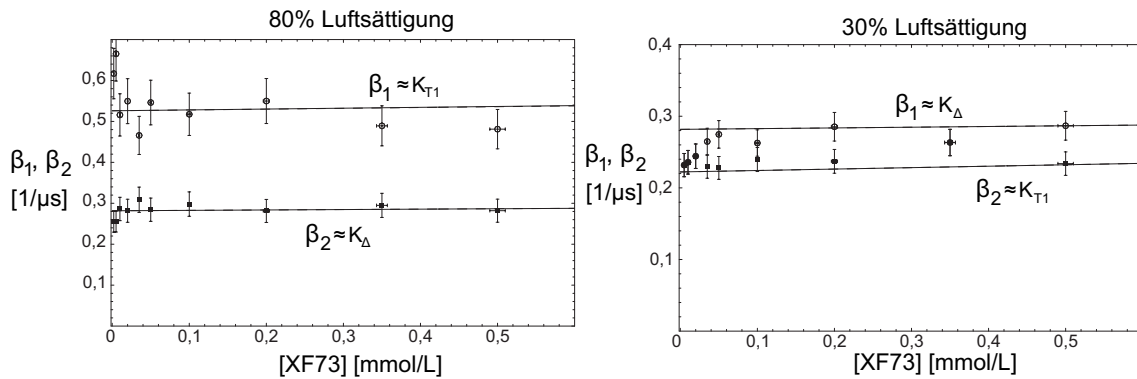


Abbildung 4.7: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der XF73-Konzentration bei 80% (A) und 30% (B) Sauerstoff-Luftsättigung in Wasser

Bei einem Sauerstoffgehalt von 80% der Luftsättigung ($216 \mu\text{M}$) lässt die Variation der Farbstoff-Konzentration erkennen, dass die Messwerte für die Anstiegs- und Abklingraten β_1 und β_2 auf einer waagrechten Geraden (Steigung $< 0,001$) zu liegen kommen. Damit sind sowohl K_{T1} , welches der Anstiegsrate β_1 entspricht, als auch K_{Δ} , das der Abklingrate β_2 entspricht, unabhängig von der Farbstoff-Konzentration. Außerdem liegen die meisten Punkte innerhalb der Fehlertoleranz auf der durchgezogenen Linie, lediglich bei geringen Farbstoff-Konzentrationen ist die Abweichung größer. Daraus lässt sich folgern, wie bereits bei der Variation der

Sauerstoff-Konzentration gezeigt, dass entweder kein oder nur ein sehr geringer Energierücktransfer stattfindet und sowohl der angeregte Farbstoff-Triplett-Zustand, als auch der Singulett-Sauerstoff-Zustand nicht durch den Farbstoff gequencht werden. Mit den ermittelten Daten ergibt sich für

$$K_{T_1}([P] = 0mM) = k_{T_1} + (k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}) \cdot 0,216mM = 0,526\mu s^{-1}$$

und für

$$K_{\Delta}([P] = 0mM) = k_{\Delta} = 0,28\mu s^{-1}.$$

Für k_{T_1} ergibt sich mit $k_{T_1O}^{\Sigma} = (2,25 \pm 0,3) \mu s^{-1} \text{ mmol}^{-1} \cdot L$ ein Wert von $(0,04 \pm 0,01) \mu s^{-1}$, was einer Lebensdauer des T_1 -Zustands von $(25 \pm 5) \mu s$ entspricht. Für die Rate der Singulett-Sauerstoff-Deaktivierung ergibt sich $k_{\Delta} = (0,28 \pm 0,01) \mu s^{-1}$ und somit eine Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer von $(3,6 \pm 0,1) \mu s$.

Ebenso wie bei 80% der Luftsättigung stellten sich bei 30% Werte für β_1 und β_2 als unabhängig von der Farbstoffkonzentration dar und für die Extrapolation auf die y-Achse folgt:

$$K_{T_1}([P] = 0mM) = k_{T_1} + (k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}) \cdot 0,081mM = 0,222\mu s^{-1}$$

wodurch wieder ein Wert von $(0,04 \pm 0,01) \mu s^{-1}$ für k_{T_1} berechnet werden kann.

Variation der Quencher-Konzentration

Durch den Einsatz von Natriumazid als Singulett-Sauerstoff-Quencher kann die Abhängigkeit der Lebensdauer des Triplett-Farbstoff-Zustands und des Singulett-Sauerstoffs von der Quencher-Konzentration ermittelt werden. Dazu wurde bei einer konstanten Farbstoff-Konzentration von $50 \mu\text{mol/L}$ XF73 die Natriumazid-Konzentration schrittweise von $0 \mu\text{mol/L}$ bis $1000 \mu\text{mol/L}$ erhöht. Ebenso wie bei der Farbstoff-Variation wurde wieder bei zwei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen gemessen, diesmal bei 216 und $54 \mu\text{mol/L}$ (Abb. 4.8).

Für das Quenchen des Farbstoff- T_1 -Zustands ist die Ratenkonstante k_{T_1Q} und für das Quenchen von Singulett-Sauerstoff ist $k_{\Delta Q}$ verantwortlich. Für die Deaktivierungsrate des T_1 -Zustands gilt

$$K_{T_1} = k_{T_1} + (k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}) \cdot 0,0216mM + k_{T_1S_0} \cdot 0,05mM + k_{T_1Q}[Q]$$

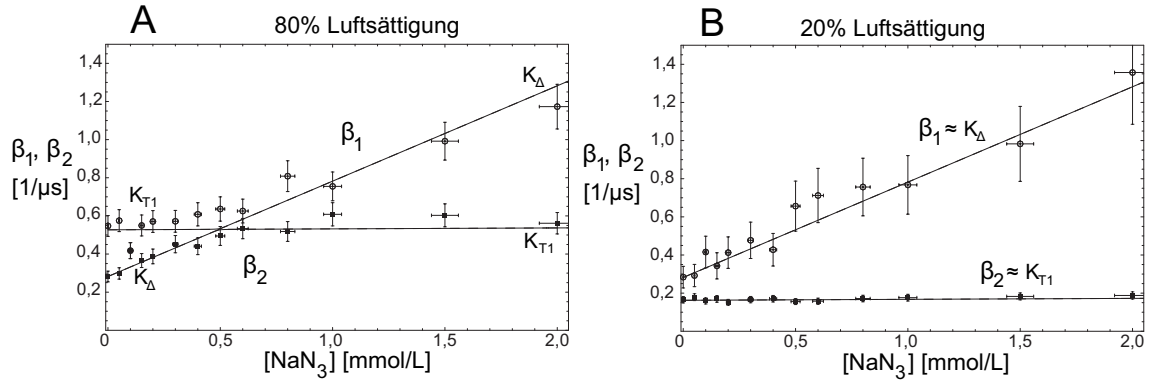


Abbildung 4.8: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Natriumazid-Konzentration bei 50 $\mu\text{mol/L}$ XF73 bei 80% (A) und 20% (B) Sauerstoff-Luftsättigung in Wasser

und für die Deaktivierung des Singulett-Sauerstoffs lässt sich die Rate zu

$$K_{\Delta} = k_{\Delta} + (k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}) \cdot 0,05 \text{ mM} + k_{\Delta Q} [Q]$$

bestimmen. Bei der höheren Sauerstoff-Konzentration entspricht im Bereich hoher NaN_3 -Konzentrationen die Rate β_1 der Rate K_{Δ} , die eine Steigung von $k_{\Delta Q}$ hat. β_2 entspricht der Rate K_{T_1} und hat eine Steigung von $k_{T_1 Q}$. Aus den Fitkurven in den Abbildungen 4.8 A und B lässt sich auch hier erkennen, dass kein Energietransfer von dem Triplett- T_1 -Zustand des Farbstoffs auf den Quencher stattfindet. Somit folgt, dass $k_{T_1 Q} = 0$ ist und dadurch K_{T_1} unabhängig von der Quencher-Konzentration ist. Bei K_{Δ} findet sich die erwartete Abhängigkeit von der Quencher-Konzentration und die quencherabhängige Ratenkonstante lässt sich bestimmen zu $k_{\Delta Q} = (0,5 \pm 0,1) \mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$ (Literatur: $0,58 \pm 0,03$ [23]). Eine Erhöhung der Quencher-Konzentration wirkt sich insofern auf K_{Δ} aus, dass sich die Abklingdauer von $^1\text{O}_2$ mit zunehmender Quencher-Konzentration verkürzt, da der $^1\text{O}_2$ -Zustand schneller deaktiviert wird. Wie bei der Variation der Sauerstoff-Konzentration klar ersichtlich, lässt sich bei der Variation der Quencher-Konzentration zumindest vermuten, dass kein Energierücktransfer vorliegt. Jedoch sind auf Grund des Quenchens durch NaN_3 die Lumineszenzsignale schwächer und damit schlechter auszuwerten. Außerdem bilden die Variationen der Farbstoff-, Sauerstoff- und Quencher-Konzentration ein gekoppeltes System, weswegen die Messpunkte zum Teil von den gefitteten Mess-

kurven abweichen. Bei der Auswertung muss abgewogen werden, welche Fitparameter man wählt, um möglichst alle Datenpunkte aus den Lumineszenzmessungen mit dem Graphen der analytischen Lösung des Verlaufs der Raten K_{T_1} und K_{Δ} (siehe Gln. 2.13 und 2.14) innerhalb der Fehlertoleranz zu erreichen. Aus diesem Grund liegt die gemessene Abklingrate K_{Δ} bei der Variation der Quencher-Konzentration bei $[O_2] = 216 \mu\text{M}$ oberhalb der theoretisch berechneten Kurve. Eine Änderung der Fitparameter beeinflusst ebenso die berechneten Kurven bei der Variation der Sauerstoff- und Farbstoff-Konzentration. Eine Zusammenfassung aller Raten und Ratenkonstanten des Photosensibilisators XF73 in Wasser findet sich in Abschnitt 4.5.

4.3.2 TMPyP in Wasser

Da bei den weiterführenden Messungen der Einfluss des Farbstoffs auf die physikalischen und biologischen Eigenschaften, wie Sauerstoffverbrauch und Toxizität, ermittelt wurde, wurden hier die Ergebnisse aus den Lumineszenzmessungen mit einem Referenzfarbstoff dargestellt. Deshalb wurden die gleichen Messungen wie bei XF73 mit dem wasserlöslichen Farbstoff TMPyP durchgeführt. Im Unterschied zu XF73 ist der Wirkungsquerschnitt von TMPyP konzentrationsunabhängig und die positiven Ladungen befinden sich an anderen Stellen als bei XF73. Wie bei XF73 wurde kein Ausbleichen des Farbstoffes festgestellt. Die Auswertung der Raten und Ratenkonstanten erfolgt nach den selben Gleichungen wie bei XF73.

Variation der Sauerstoff-Konzentration

Die Variation der Sauerstoff-Konzentration zwischen 0 und $270 \mu\text{mol/L}$ erfolgt wieder durch das Durchleiten von Stickstoff durch die Lösung. Die Einzelmessungen wurden bei einer Farbstoff-Konzentration von $25 \mu\text{mol/L}$ TMPyP durchgeführt. Der Farbstoff TMPyP wurde mit 100.000 Laserpulsen bei einer Laserleistung von 100 mW angeregt. Die ermittelten Raten β_1 und β_2 sind wieder wie bei XF73 aufgetragen (Abb. 4.9).

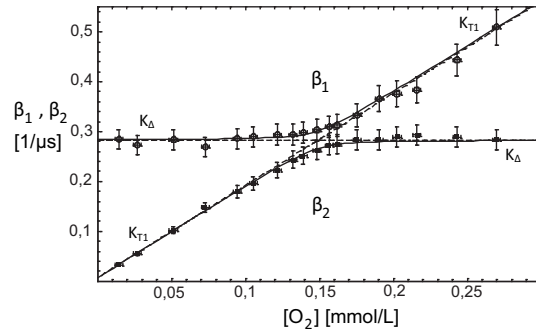


Abbildung 4.9: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Sauerstoff-Konzentration bei $25 \mu\text{mol/L}$ TMPyP in Wasser

Aus den in Abbildung 4.9 dargestellten Werten und den zugehörigen Fitkurven lässt sich folgern:

- im Rahmen der Fehlertoleranzen kann nicht entschieden werden, ob ein Energierücktransfer von Singulett-Zustand des Sauerstoffs auf den Triplett-Zustand des Farbstoffs erfolgt. Es ergibt sich eine Obergrenze für $(k_{T_1\Delta} \cdot k_{\Delta T_1}) < 0,08 \mu\text{s}^{-2} \cdot \text{mmol}^{-2} \cdot \text{L}^2$
- aus der Steigung von K_{T_1} ergibt sich

$$k_{T_1O}^\Sigma = (k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}) = (1,9 \pm 0,1) \mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$$
- die Extrapolation auf die Sauerstoff-Konzentration $[\text{O}_2] = 0$ ergibt

$$k_{T_1} + k_{T_1S_0} \cdot 25 \mu\text{mol/L} = (0,007 \pm 0,001) \mu\text{s}^{-1} \text{ und}$$

$$k_{\Delta} + (k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}) \cdot 25 \mu\text{mol/L} = (0,28 \pm 0,01) \mu\text{s}^{-1}.$$

Variation der Farbstoff-Konzentration

Die Lumineszenzmessung wurden bei einer Sauerstoff-Konzentration von $54 \mu\text{mol/L}$ und $216 \mu\text{mol/L}$ durchgeführt und die Farbstoff-Konzentration wurde zwischen $1 \mu\text{mol/L}$ und $1000 \mu\text{mol/L}$ TMPyP variiert. Es wurden je Einzelmessung 40.000 Laserpulse bei einer Leistung von 100 mW aufsummiert. Abbildung 4.10 stellt die gemessenen Raten β_1 und β_2 , sowie die analytischen Berechnungen für beide Sauerstoff-Konzentrationen dar. Es zeigte sich, dass bei geringen Farbstoff-Konzentrationen wieder Abweichungen von den Fitgeraden auftreten.

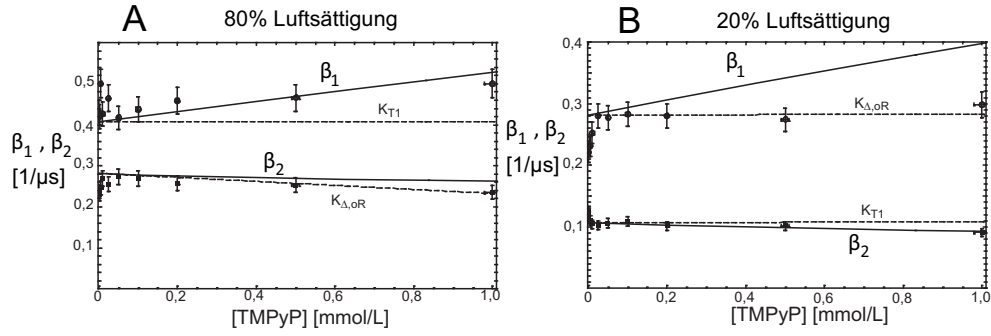


Abbildung 4.10: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der TMPyP-Konzentration bei 80% (A) und 20% (B) Sauerstoff-Luftsättigung in Wasser

Aus den Berechnungen für Abbildung 4.10 folgt

- mit dem Wert der Summe von $(k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}) = (1,9 \pm 0,1) \mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$ aus der Variation der Sauerstoff-Konzentration eine Obergrenze für $k_{T_1} < 0,006 \mu s^{-1}$ und somit eine Farbstoff-Triplett-Lebensdauer von mindestens $165 \mu s$.
- mit k_{T_1} die Obergrenze für die Ratenkonstante, die das Eigenquenchen des Farbstoffs beschreibt: $k_{T_1S_0} < 0,001 \mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
- durch die Extrapolation der Rate β_2 in Abbildung 4.10 A und der Rate β_2 in Abbildung 4.10 B auf verschwindende Farbstoff-Konzentration $[P] = 0$: $k_{\Delta} = (0,28 \pm 0,01) \mu s^{-1}$
- mit k_{Δ} die Obergrenze für die Summe der Ratenkonstanten, die das Quenchen von Singulett-Sauerstoff durch den Singulett- und Triplett-Zustand des Farbstoffs beschreibt: $k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1} < 0,1 \mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$

Variation der Quencher-Konzentration

Die Natriumazid-Konzentration wurde zwischen 0 und $1000 \mu \text{mol/L}$ variiert. Die Farbstoff-Konzentration wurde bei $[P] = 25 \mu \text{mol/L}$ gehalten, ebenso wie die Sauerstoff-Konzentration bei $[O_2] = 216 \mu \text{mol/L}$ (80% Luftsättigung) bzw. $[O_2] = 54 \mu \text{mol/L}$ (20% Luftsättigung). Die Abbildung 4.11 zeigt die erhaltenen Messwerte für die

Anstiegs- und Abklingraten bei der höheren Sauerstoff-Konzentration von $216 \mu\text{mol/L}$.

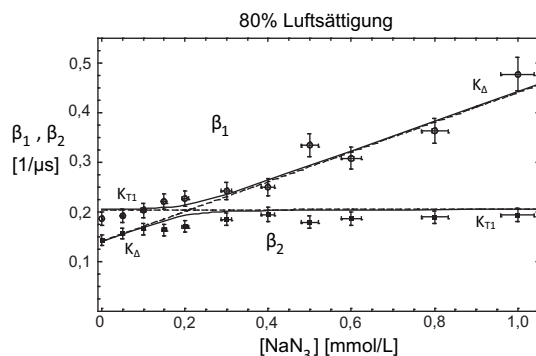


Abbildung 4.11: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Natriumazid-Konzentration bei $50 \mu\text{mol/L}$ TMPyP bei 80% Sauerstoff-Luftsättigung in Wasser

Aus den Messungen bei den verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen können die beiden quencherabhängigen Ratenkonstanten bestimmt werden zu $k_{T1Q} < 0,005 \mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$ und $k_{\Delta Q} = (0,6 \pm 0,05) \mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$. Diese Werte entsprechen im Rahmen der Fehler denen aus [23] mit $k_{\Delta Q} = (0,58 \pm 0,03) \mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$ und $k_{T1Q} < 0,02 \mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$.

Eine Übersicht der ermittelten Raten und Ratenkonstanten für die Farbstoff-Lösungsmittel Kombination TMPyP-H₂O sind in Abschnitt 4.5 zu finden.

4.4 Singulett-Sauerstoff in Ethanol

Da nicht alle Biomoleküle in Wasser löslich sind, wurde als unpolareres Lösungsmittel Ethanol gewählt. Die Raten und Ratenkonstanten hängen nicht nur von den Farbstoffen, sondern auch vom Lösungsmittel ab, insbesondere die Singulett-Sauerstoff-Abklingrate k_{Δ} . Es wurden daher in Ethanol weitere Lumineszenzuntersuchungen notwendig. Als Farbstoffe wurden in diesem Fall wieder als Referenzfarbstoff TMPyP, das sowohl in Wasser, als auch in Ethanol löslich ist und Perinaphthenon ausgewählt. Die Anregung von TMPyP erfolgte wieder bei 532 nm, wohingegen der zweite Farbstoff Perinaphthenon, der unlöslich in Wasser, aber gut löslich in Ethanol ist, nur

bei Wellenlängen unterhalb von 450 nm absorbiert und daher im UVA-Bereich bei 355 nm angeregt wurde. Dies stellt nun die Möglichkeit dar, nicht nur verschiedene Farbstoffe und Lösungsmittel zu vergleichen, sondern auch den Einfluss verschiedener Anregungswellenlängen zu untersuchen.

4.4.1 TMPyP in Ethanol

Durch die längere Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer in Ethanol erhöht sich auch die Signalstärke der Lumineszenz, so dass für die Einzelmessungen bei der Variation der Sauerstoff- und Farbstoff-Konzentration nur 20.000 Laserpulse bei 100 mW zur Anregung bei 532 nm verwendet wurden. Bei der Variation der Natriumazid-Konzentration wurden 60.000 Laserpulse benötigt wegen der Verringerung der Signalstärke durch das Quenchen.

In allen Darstellungen sind wieder die gemessenen und analytisch berechneten Raten β_1 und β_2 gegen die jeweilig variierte Konzentration aufgetragen. Die Raten und Ratenkonstanten sind wieder aus den analytisch berechneten Raten β_1 und β_2 aus allen drei Variationen bestimmt.

Die Variation der Sauerstoff-Konzentration wurde bei einer konstanten TMPyP-Konzentration von $[P] = 25 \mu\text{mol/L}$ und ohne Zugabe zusätzlicher Quencher durchgeführt. Es wurde eine maximale Konzentration von Sauerstoff in Ethanol von $[\text{O}_2] = 1850 \mu\text{mol/L}$ bei 100% Luftsättigung angenommen. Der Sauerstoff-Partialdruck in der Lösung wurde wieder durch das Durchleiten von Stickstoff eingestellt.

Die Variation der TMPyP-Konzentration in Ethanol erfolgte in einem Bereich von $1 \mu\text{mol/L}$ bis $1000 \mu\text{mol/L}$, ebenfalls ohne Zugabe eines zusätzlichen Quenchers. Es wurden zwei Messreihen bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen durchgeführt. Um dabei auf beiden Seiten des Schnittpunkts ($K_{T_1} = K_{\Delta}$) aus der Variation der Sauerstoff-Konzentration Werte zu erhalten, wurden die Messungen bei O_2 -Konzentrationen von 10% und nahezu 0% Luftsättigung durchgeführt. Dies entspricht im Rahmen der Genauigkeit des Sauerstoff-Messgeräts $[\text{O}_2] = (0,19 \pm 0,02) \text{ mmol/L}$ bei 10% bzw. maximal $[\text{O}_2] = 0,01 \text{ mmol/L}$ bei 0%.

Die Konzentration von Natriumazid wurde zwischen 100 $\mu\text{mol/L}$ und 6 mmol/L variiert. Die Konzentration des Farbstoffs betrug $[P] = 25 \mu\text{mol/L}$. Die Messungen in diesen Lösungen erfolgten bei einer Sauerstoff-Konzentration von $[\text{O}_2] \approx 0,2 \text{ mmol/L}$, dies entspricht etwa 10% der Sauerstoff-Luftsättigung in Ethanol.

In den Abbildungen 4.12 bis 4.14 sind die gemessenen Werte der Anstiegs- und Abklingzeiten dargestellt, wobei in der ersten Abbildung der Ausschnitt von $[\text{O}_2] < 200 \mu\text{mol/L}$ vergrößert gezeigt ist.

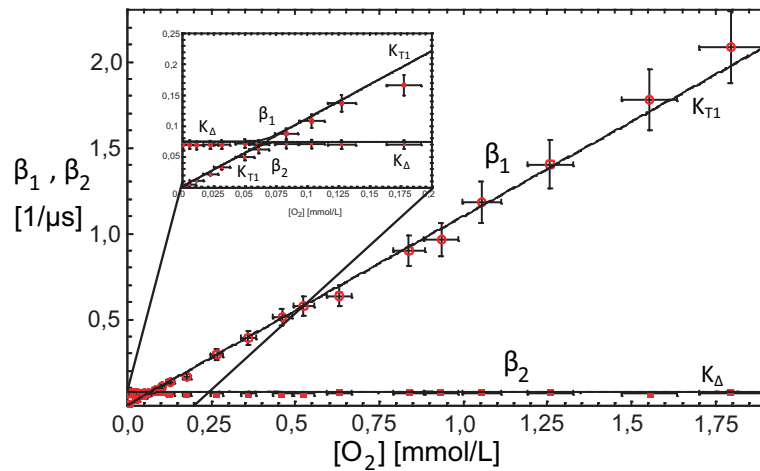


Abbildung 4.12: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Sauerstoff-Konzentration bei 25 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP in Ethanol, der Bereich bis 0,2 mmol/L Sauerstoff ist vergrößert dargestellt.

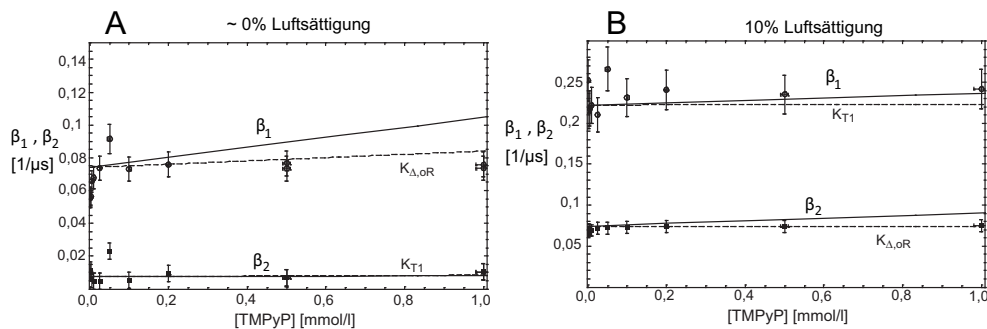


Abbildung 4.13: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der TMPyP-Konzentration in Ethanol, bei nahezu keinem Sauerstoff in der Lösung (A) und bei 10% Luftsättigung (B)

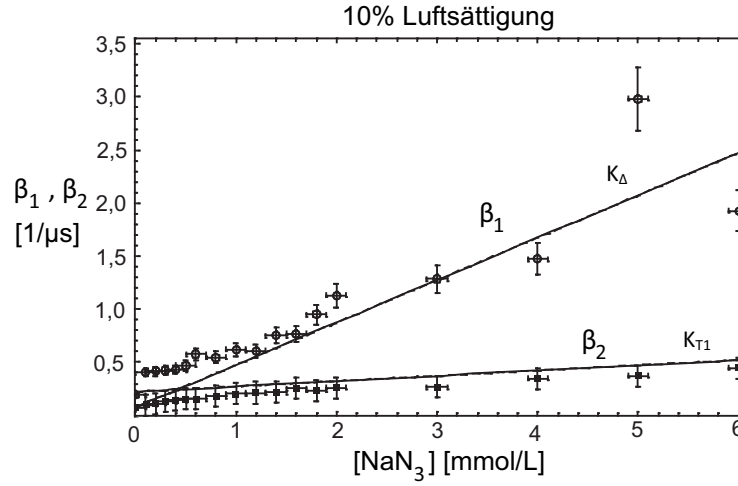


Abbildung 4.14: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Natriumazid-Konzentration bei $25 \mu\text{mol/L}$ TMPyP in Ethanol bei 10% Sauerstoff-Luftsättigung

Für die Raten und Ratenkonstanten ergeben sich folgende Werte:

- $k_{\Delta} = (0,07 \pm 0,005) \mu\text{s}^{-1}$
- $k_{T_1} < 0,005 \mu\text{s}^{-1}$
- $k_{T_1 O}^{\Sigma} = k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta} = (1,1 \pm 0,1) \mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
- $k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1} < 0,03 \mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
- $k_{T_1 S_0} < 0,002 \mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
- $k_{\Delta Q} = (0,4 \pm 0,1) \mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
- $k_{T_1 Q} = (0,05 \pm 0,02) \mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
- $(k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}) < 0,01 \mu\text{s}^{-2} \cdot \text{mmol}^{-2} \cdot \text{L}^2$
- für die Lebensdauern ergeben sich somit: $\tau_{\Delta} = (14 \pm 1) \mu\text{s}$ und $\tau_{T_1} > 200 \mu\text{s}$

Die Ursache für die großen Abweichungen der Fitkurve von den Messpunkten bei der Variation der Quencher-Konzentration könnten am Natriumazid liegen, dessen

polares Azidion sich nur ungenügend im Ethanol löst. Außer dem Problem, dass damit die gelöste Menge des Natriumazids ungenau zu bestimmen ist, kommt hinzu, dass das Signal-Rausch-Verhältnis der Messung abnimmt. Dadurch führt das Fluoreszenzsignal des TMPyP's, das durch die Bestrahlung mit dem Laser erzeugt wurde und in den ersten Messpunkten registriert wurde, zu erhöhten Fehlern bei der Bestimmung der Anstiegszeiten der Messsignale. Um dennoch auswertbare Messkurven zu erhalten, wurden die Lumineszenzsignale bei 1150 nm und 1400 nm aufgenommen und deren Mittelwert vom Lumineszenzsignal, detektiert bei 1270 nm, abgezogen. Dies führte jedoch zu ungenaueren, tendenziell zu kurzen Anstiegszeiten.

Eine Übersicht der ermittelten Raten und Ratenkonstanten für die Farbstoff-Lösungsmittel Kombination TMPyP-Ethanol, sowie ein Vergleich mit den Werten bei H₂O sind in Abschnitt 4.5 zu finden.

4.4.2 Perinaphthenon in Ethanol

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit dem wasserunlöslichen Perinaphthenon (PN), das als weiterer Farbstoff für Messungen in Ethanol verwendet wurde. Im Gegensatz zu TMPyP erfolgte die Anregung diesmal im UVA-Bereich bei 355 nm. Da PN im Unterschied zu TMPyP nicht photostabil ist, wurden die Absorptionsspektren und Lumineszenzsignale in Abhängigkeit von der Bestrahlungsenergie bestimmt. Die Messbedingungen für die Variation der Farbstoff-, Sauerstoff- und Quencher-Konzentration wurden auf Grund der erhaltenen Ergebnissen dem Ausbleichverhalten angepasst.

4.4.2.1 Photostabilität

Zur Bestimmung des Verhaltens von Perinaphthenon bei Langzeit-Bestrahlungen wurden 100 $\mu\text{mol/L}$ PN in EtOH gelöst und mit dem Nd:YAG Laser bei einer Wellenlänge von 355 nm und einer Leistung vom 100 mW angeregt. Es wurde der Absorptionswirkungsquerschnitt σ der PN-EtOH-Lösung nach verschiedenen Bestrahlungszeiten in Abhängigkeit von der Wellenlänge in einem Wellenlängenbereich zwischen 300 und 600 nm bestimmt. Für jede Bestrahlungszeit wurde eine neue Lösung

verwendet. Die Küvettendicke betrug für PN in EtOH 5 mm. In Abb. 4.15 sind die Ergebnisse der Absorptionsmessungen von PN in EtOH gezeigt.

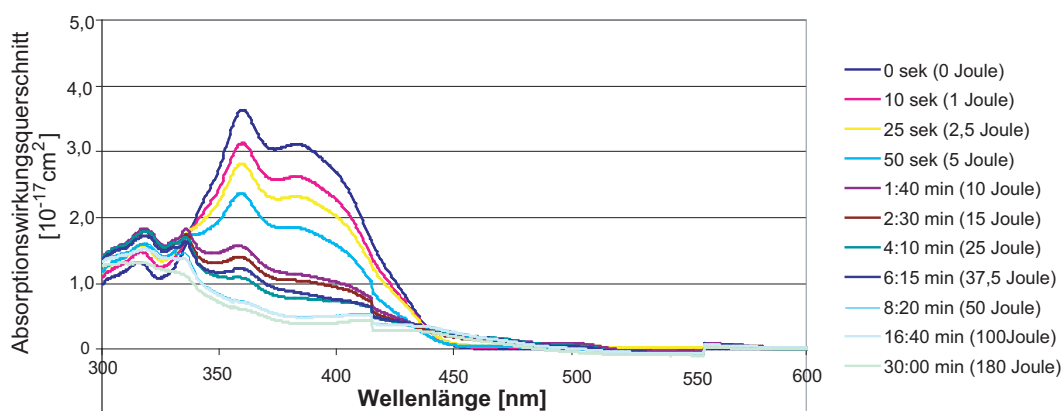


Abbildung 4.15: Absorptionswirkungsquerschnitt von PN in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit und der Energie

Auf der rechten Seite der Abbildungen ist die Bestrahlungsenergie für die jeweiligen Messungen angegeben. 1 Joule entspricht einer Bestrahlungsdauer von 10 s. Man sieht deutlich, dass Perinaphthenon photoinstabil ist. Der Absorptionswirkungsquerschnitt nimmt mit zunehmender Bestrahlungszeit ab.

Für PN in EtOH ist $\sigma_{355nm} = (3,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$ ohne Bestrahlung. Nach einer Bestrahlungsdauer von 30 min (dies entspricht 180 Joule in der Abbildung 4.15) sinkt σ_{355nm} auf $(0,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$. Diese Tatsache ist besonders bei Langzeitexperimenten zu berücksichtigen. Auch die Generierung von Singulett-Sauerstoff wird dadurch erheblich beeinflusst. Je weniger Energie vom Farbstoff absorbiert werden kann, desto weniger wird auf den molekularen Sauerstoff zur Bildung von Singulett-Sauerstoff transferiert.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden über 60 Minuten in drei Minuten Abständen Lumineszenzsignale von Singulett-Sauerstoff von einer PN-EtOH-Lösung aufgenommen. Pro Einzelmessung summiert man nur 20.000 Laserpulse auf, um die Photodegradation während der Messung zu minimieren. Die PN-Konzentration betrug wie oben $100 \mu\text{mol/L}$ und die Sauerstoff-Konzentration wurde konstant auf 100% Luftsättigung gehalten. Die Laserleistung wurde auf 100 mW eingestellt. Die

Werte der durchgeführten Messung sind in Abbildung 4.16 zu sehen, sowie ein Vergleich der absorbierten Energie mit dem Integral des Lumineszenzsignals.

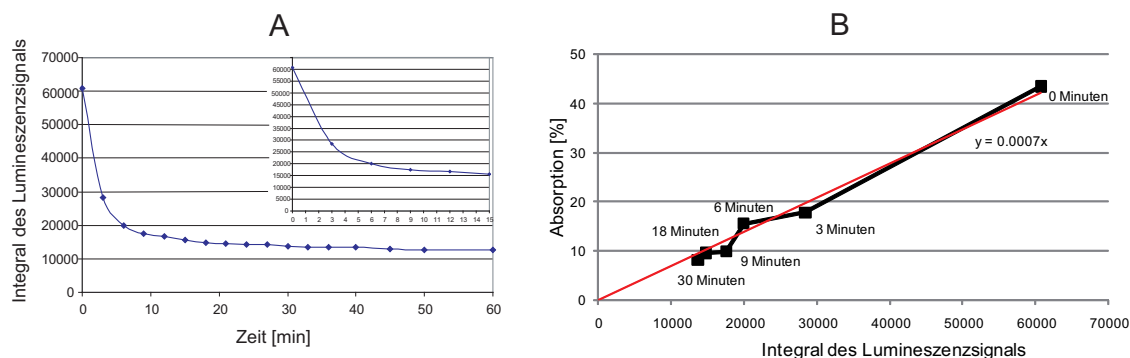


Abbildung 4.16: (A) Das Integral über die Lumineszenzsignale (10 Sekunden) von PN in Abhängigkeit von der zuvor eingestrahlten Energie; (B) Vergleich zwischen der absorbierten Energie und dem Integral über die Lumineszenzsignale

Hier sind die einzelnen Messungen ausgewertet und die errechneten Integrale der Lumineszenzsignale gegen die Bestrahlungszeit aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff mit der Bestrahlungszeit abnimmt und dann einen konstanten Wert erreicht. Bereits nach 6 Minuten ($\hat{=}$ 36 Joule) wurde nur noch ein Drittel der ursprünglichen Lumineszenzenergie generiert. Allerdings korrelierte die absorbierte Energie mit dem Integral über das Lumineszenzsignal, so dass davon ausgegangen werden kann, dass nur die verringerte Absorption den Rückgang der Lumineszenz verursacht.

Um ein besseres Verständnis für dieses Verhalten von PN in EtOH zu erhalten, wurde im nächsten Teil die chemische Zusammensetzung von PN nach einer kontinuierlichen Bestrahlung mit Hilfe einer analytischen HPLC-Messung untersucht.

Für eine HPLC-Analyse von PN in EtOH stellte man 3 Proben mit einer Farbstoffkonzentration von $100 \mu\text{mol/L}$ her. Eine Lösung wurde unbestrahlt als Referenzprobe verwendet. Die zweite Probe wurde 8 min und 20 s ($=$ 50 Joule) und die dritte 30 min ($=$ 180 Joule) mit einer Laserleistung von 100 mW bei einer Wellenlänge von 355 nm bestrahlt. Die HPLC-Messungen wurden am Institut für Organische Chemie der

Universität Regensburg durchgeführt. In der nachfolgenden Abbildung 4.17 sind die Ergebnisse für unterschiedliche Bestrahlungszeiten dokumentiert. Hierbei sind die Absorptionseinheiten (mAU = milli absorption units) gegen die Retentionszeit aufgetragen. Es zeigt sich, dass Perinaphthenon in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit Zwischenprodukte bildet und nach 30 Minuten vollkommen verschwunden ist. Nach einer Bestrahlungsdauer von 8:20 Minuten können neben dem ursprünglichen PN zwölf weitere Photoproducte festgestellt werden. Nach 30 Minuten ist PN vollkommen zerfallen, die 12 Produkte bleiben vorhanden. Durch Aufnahme der UV-Spektren der einzelnen Fraktionen (hier nicht gezeigt) wurde nachgewiesen, dass diese Produkte ebenfalls in der Lage sind, bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm zu absorbieren.

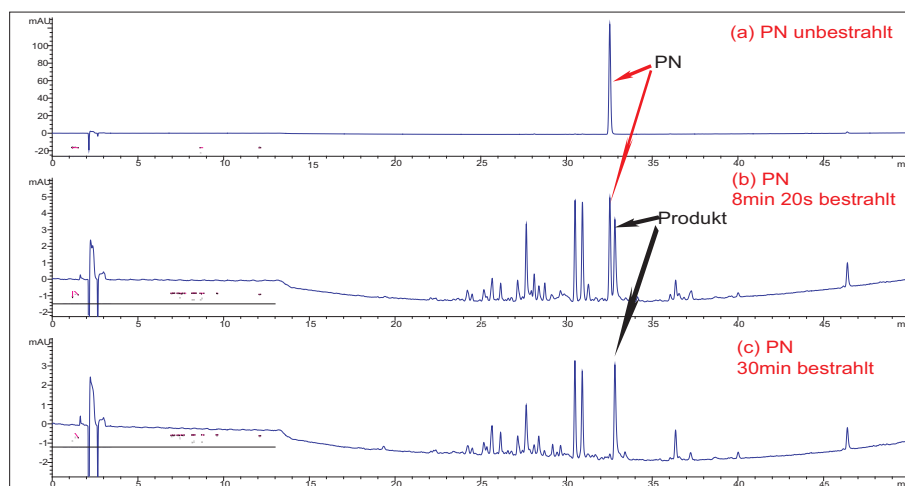


Abbildung 4.17: HPLC-Analyse einer (a) unbestrahlten Referenzprobe von $100\ \mu\text{mol/L}$ PN in EtOH, (b) einer 8 Minuten 20 Sekunden bestrahlten Probe und einer (c) 30 Minuten bestrahlter Probe.

Kuznetsova *et al.* konnten bereits 1987 mit Photolyse-Experimenten zeigen, dass sich acht Photoproducte durch Bestrahlung von Perinaphthenon in luftgesättigtem EtOH bilden [46]. Mit Hilfe eines chromatographischen Trennverfahrens konnte nachgewiesen werden, dass vier davon monosubstituierte Derivate von PN sind. Als Substituent konnte an der 3., 4., 6. und 7. Stelle des Phenalens eine $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ -Gruppe nachgewiesen werden. Diese Verbindungen wurden als isomerische α -Hydro-

xyethyl-Derivate von PN identifiziert. Drei weitere Verbindungen waren an der 2., 4. und 6. Stelle des Phenalens durch eine OH-Gruppe substituiert. PN wurde hier zu Hydroxyphenalenon oxidiert. Des weiteren wurde als 8. Verbindung wie in diesem Fall das ursprüngliche PN gefunden. Die Bildung dieser Derivate von PN kann mit Hilfe des in Abb. 4.18 dargestellten Schemas erklärt werden.

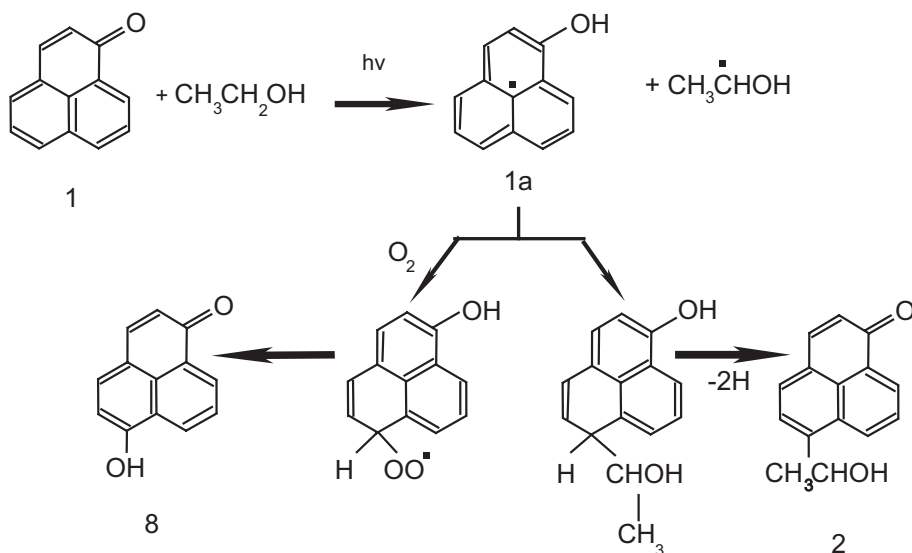


Abbildung 4.18: Schema zur Photoreduktion von PN [46]

Bei Bestrahlung von PN (1) in luftgesättigtem EtOH kommt es zur Abspaltung eines H-Atoms des EtOH-Moleküls. Es entsteht das Radikal $\text{CH}_3\dot{\text{C}}\text{HOH}$. Das angeregte PN nimmt dieses H-Atom auf und wird dadurch zu einem Ketylradikal (1a) reduziert. Durch Reaktion mit dem in der Lösung befindlichen O_2 kommt es zur Bildung der Hydroxyphenalenone (8). Je weniger Sauerstoff zur Verfügung steht, umso ausschlaggebender wird die Bildung der α -Hydroxyethyl-Derivate (2). Hier wird das Produkt, das durch die Addition des α -Hydroxyethyl-Radikals ($\text{CH}_3\dot{\text{C}}\text{HOH}$) mit dem Ketylradikal (1a) entsteht, reduziert, wodurch die α -Hydroxyethyl-Derivate von PN gebildet werden. Diese stellen bei niedrigen Sauerstoff-Konzentrationen die Hauptprodukte dar. Das PN-Radikal wechselwirkt somit effektiv mit den Alkoholradikalen oder den O_2 -Molekülen, je nach vorliegender Sauerstoff-Konzentration. Dieses Reaktionsschema ist für weitere Experimente, bei denen Ethanol als Lösungsmittel für PN benutzt wird, zu berücksichtigen. Warum bei der HPLC-Analyse 12 Pro-

dukte nachgewiesen wurden, könnte mit der Bestrahlungsdauer zusammenhängen. Die Produkte wurden allerdings nicht identifiziert. Da man jedoch zeigen konnte, dass diese Produkte ein ähnliches Absorptionsspektrum wie PN aufweisen, kann man davon ausgehen, dass es sich auch in diesem Fall um Derivate von PN handelt, die nach dem in Abb. 4.18 dargestellten Schema entstehen.

Abschließend kann man zusammenfassen, dass PN in H-absplattendenden Lösungsmitteln, wie Ethanol, bei kontinuierlicher Bestrahlung photoinstabil ist. Dies wird durch das abnehmende Absorptionsvermögen mit zunehmender Bestrahlungszeit und der analytischen HPLC-Messung bestätigt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass mit zunehmender Bestrahlungszeit das Integral des Lumineszenzsignals, also die Generierung von Singulett-Sauerstoff, zunächst abnimmt und dann einen konstanten Wert erreicht. Auf Grund der HPLC-Analysen kann man daraus schließen, dass die gebildeten Zwischenprodukte ebenfalls Singulett-Sauerstoff erzeugen, da das ursprüngliche PN nach einer bestimmten Zeit vollkommen degradiert ist.

Im nächsten Schritt ist nun zu prüfen, inwieweit sich diese Photoinstabilität des PN auf die Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten auswirkt.

4.4.2.2 Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten

Die Variation der Sauerstoff-Konzentration wurde auf Grund der Photoinstabilität des PNs zweimal ausgeführt, mit und ohne einem Auswechseln der Proben, um zu untersuchen, ob das Ausbleichen des Farbstoffs, innerhalb des Messintervalls, eine Auswirkung auf die Raten und Ratenkonstanten hat. Die Sauerstoff-Konzentration wurde in beiden Fällen bei einer konstanten Farbstoff-Konzentration von 25 $\mu\text{mol/L}$ und ohne zusätzlichen Quencher in einem Bereich von 0 $\mu\text{mol/L}$ bis 1850 $\mu\text{mol/L}$ variiert. Es wurde wieder angenommen, dass bei Luftsättigung die Sauerstoff-Konzentration in EtOH 1850 $\mu\text{mol/L}$ beträgt. Eine Verringerung des Sauerstoffgehalts wurde auch hier durch Durchleiten von Stickstoff durch die Quarzglasküvette erreicht. Abbildung 4.19 zeigt die gemessenen Raten bei zwei verschiedenen Messmethoden wobei wieder der Bereich mit weniger als 0,2 mmol/L Sauerstoff vergrößert dargestellt ist.

Die erste Probe wurde durchgehend bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen

vermessen. Bei jeder Einzelmessung wurden 40.000 Laserpulse aufsummiert. PN wurde somit 20 mal für 20 Sekunden bestrahlt mit einer Leistung von 100 mW (insgesamt ca. 40 Joule). Damit wurde die Konzentration an lichtaktiven PN-Molekülen bereits nach der ersten Messung um etwa $5 \mu\text{mol/L}$ (dies entspricht einer Abnahme von etwa 20% der Ausgangskonzentration) reduziert. Die hiermit erhaltenen Werte sind als rote Kreise und Dreiecke in der Abbildung 4.19 dargestellt. Bei der zweiten Messreihe wurde jede Probe nach zwei Einzelmessungen gewechselt und es wurden nur 20.000 Laserpulse pro Messung addiert. Die Probe wurde also pro Messung nur 10 Sekunden ($\hat{=}$ 0,1 Joule) angeregt, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern (gesamte Bestrahlungsenergie 0,2 Joule). Die Konzentration der lichtaktiven PN-Moleküle wurde hier nach der ersten Messung um etwa $3 \mu\text{mol/L}$ (dies entspricht einer Abnahme von etwa 10% der Ausgangskonzentration) reduziert. Die erhaltenen Werte sind als schwarze Kreise und Dreiecke in der Abbildung 4.19 dargestellt.

Die Variation der Farbstoff-Konzentration erfolgte ohne Zugabe von Quenchern bei einer Sauerstoff-Konzentration von 20% Luftsättigung, dies entspricht einer Konzentration von $370 \mu\text{mol/L}$ in EtOH. Da sich der Schnittpunkt der beiden Raten K_{T_1} und $K_{\Delta, oR}$ bei einer sehr kleinen Sauerstoff-Konzentration von etwa 1,4% Luftsättigung befindet, wurde die Farbstoff-Konzentration in einem Bereich zwischen $1 \mu\text{mol/L}$ und $1000 \mu\text{mol/L}$ nur rechts vom Schnittpunkt aus der Variation der Sauerstoff-Konzentration variiert. Unterhalb von einem Prozent Luftsättigung sind die Lumineszenzsignale schwer zu interpretieren, da zu wenig Singulett-Sauerstoff generiert wurde, vor allem bei geringen Farbstoff-Konzentrationen. Außerdem ist der Fehler bei der Sauerstoff-Bestimmung durch den Messsensor zu groß, so dass man bei diesen Sauerstoff-Konzentrationen keine genauen Werte angeben kann. Die gemessenen Werte sowie die theoretischen Kurven sind in Abb. 4.20 gezeigt. In Abb. 4.20 A ist der gesamte Verlauf und in B der Verlauf für kleine PN-Konzentrationen in einem Bereich zwischen $1 \mu\text{mol/L}$ und $100 \mu\text{mol/L}$ vergrößert dargestellt.

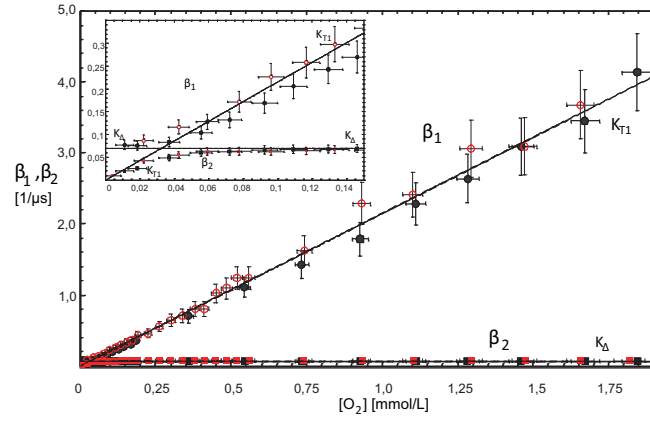


Abbildung 4.19: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Sauerstoff-Konzentration bei 20 $\mu\text{mol/L}$ PN. Rote Messpunkte: ohne Wechsel der Lösung zwischen den Einzelmessungen; schwarze Messpunkte: Wechsel der Lösung nach zwei Einzelmessungen. Der Bereich mit dem Schnittpunkt ($K_\Delta = K_{T1}$) bis zu einer Sauerstoff-Konzentration von 0,15 mmol/L ist vergrößert dargestellt.

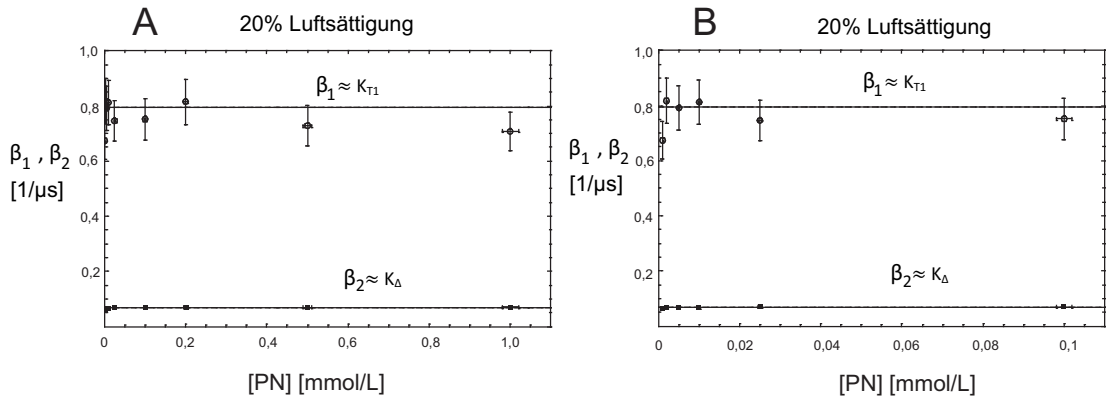


Abbildung 4.20: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der PN-Konzentration in Ethanol bei 20% Sauerstoff-Luftsättigung. Abb. A zeigt den ganzen Verlauf, Abb. B den Bereich für kleine PN-Konzentrationen bis 100 $\mu\text{mol/L}$ vergrößert.

Wie man in Abbildung 4.19 erkennen kann, können für beide Messreihen gleiche Fitparameter gefunden werden. Daraus folgt, dass die Photoinstabilität des PNs unter der angegebenen Messdauer keinen Einfluss auf die Ratenbestimmung hat. Die Anstiegs- und Abklingzeiten bleiben trotz der Umwandlung des Farbstoffs gleich. Ein Wechsel der Proben ist deshalb für spätere Messungen bei Einhaltung der angegebenen Messbedingungen nicht notwendig.

Für die Raten und Ratenkonstanten ergeben sich aus den Abbildungen und den zugehörigen Fitkurven folgende Werte:

- $k_{\Delta} = (0,07 \pm 0,01) \mu s^{-1}$
- $k_{T_1} < 0,01 \mu s^{-1}$
- $k_{T_1 O}^{\Sigma} = k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta} = (2,0 \pm 0,1) \mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
- $k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1} < 0,1 \mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
- $k_{T_1 S_0} < 0,01 \mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
- $(k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}) < 0,1 \mu s^{-2} \cdot \text{mmol}^{-2} \cdot \text{L}^2$
- für die Lebensdauern ergeben sich somit: $\tau_{\Delta} = (14 \pm 1) \mu s$ und $\tau_{T_1} > 100 \mu s$

Der Abbildung ist ebenfalls zu entnehmen, dass der Schnittpunkt der beiden Raten $K_{\Delta, oR}$ und K_{T_1} bei einer sehr geringen O_2 -Konzentration von etwa 1,4% Luftsättigung ($\cong 25 \mu\text{mol/L}$ Sauerstoff) liegt.

4.5 Übersicht über die Ergebnisse

Wie in diesem Kapitel gezeigt wurde, ist es möglich Singulett-Sauerstoff durch seine Lumineszenz eindeutig nachzuweisen. Dies kann durch die Bestimmung der Lebensdauer τ_{Δ} von Singulett-Sauerstoff, durch die Bestimmung des Lumineszenzmaximums bei 1268 nm oder 1274 nm, je nach Lösungsmittel, oder durch das Quenchen der Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer erfolgen. Für drei verschiedene Farbstoffe wurden in zwei unterschiedlichen Lösungsmitteln die Raten und Ratenkonstanten ermittelt. In Tabelle 4.2 sind alle erhaltenen Werte zusammengefasst. Für einige Werte konnten nur die Obergrenzen abgeschätzt werden, da im Rahmen der Fehler-toleranzen nur ihre Maximalwerte bestimmbar waren.

Rate/Raten- konstante	XF73 in Wasser	TMPyP in Wasser	TMPyP in EtOH	PN in EtOH	Einheit
k_{Δ}	$0,28 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,005$	$0,07 \pm 0,01$	μs^{-1}
k_{T_1}	$0,04 \pm 0,01$	$<0,006$	$<0,005$	$<0,01$	μs^{-1}
$k_{T_1 O}^{\Sigma}$	$2,3 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$	$<0,001$	$<0,1$	$<0,03$	$<0,1$	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 S_0}$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,002$	$<0,01$	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$	$<0,002$	$<0,08$	$<0,01$	$<0,1$	$\mu s^{-2} \cdot \text{mmol}^{-2} \cdot \text{L}^2$
$k_{\Delta Q}$	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,05$	$0,4 \pm 0,1$		$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 Q}$	0	$<0,005$	$0,05 \pm 0,02$		$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$

Tabelle 4.2: Übersicht über die Raten und Ratenkonstanten verschiedener Farbstoffe in Wasser bzw. Ethanol

Die Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer konnte in Wasser zu $\tau_{\Delta H_2O} = 1/k_{\Delta H_2O} = (3,5 \pm 0,2) \mu s$ und in Ethanol zu $\tau_{\Delta EtOH} = 1/k_{\Delta EtOH} = (14 \pm 2) \mu s$ bestimmt werden und liegen somit bei den aus der Literatur bekannten Werten [7, 77].

Zusammenfassend kann nach diesem Kapitel gesagt werden, dass bei den untersuchten Farbstoffen die Rate K_{Δ} vom Lösungsmittel und der Quencher-Konzentration abhängt, die Rate K_{T_1} vom Lösungsmittel und der Sauerstoff-Konzentration. Somit

können die Anstiegs- und die Abklingzeit der Lumineszenz eindeutig den entsprechenden Raten zugeordnet werden,

- wenn bei jeder Lumineszenzmessung das gleiche Lösungsmittel verwendet wird und
- wenn durch die Variation der Sauerstoff- bzw. der Quencher-Konzentration die jeweils sich verändernde Rate bestimmt wurde.

Auf Grund dieser Erkenntnis kann durch die Variation der Sauerstoff-Konzentration die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer in nahezu jedem Gemisch (vorausgesetzt die Sauerstoff-Konzentration kann durch den Sensor bestimmt werden) ermittelt werden. Außerdem zeigt sich, dass die Verwendung von Natriumazid als Singulett-Sauerstoff-Quencher in Ethanol eher ungeeignet ist, da es sich nur mäßig löst und somit keine exakten Abhängigkeiten von der Konzentration bestimmt werden können.

Kapitel 5

Singulett-Sauerstoff-Interaktion mit Biomolekülen

Da bereits aus vorherigen Untersuchungen bekannt ist, dass nahezu jede Art von zugesetzten Substanzen die Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz verändert, wird in diesem Kapitel der Einfluss von verschiedenen Biomolekülen auf die Generierung und die Relaxation von Singulett-Sauerstoff untersucht. Ausgehend von den aus dem vorherigen Kapitel erhaltenen Ergebnissen (O_2 -Abhängigkeit der Triplett-Farbstoff-Lebensdauer, Quencherabhängigkeit des Singulett-Sauerstoffs) wurden jetzt die Signale aus komplexeren Lösungen untersucht. Um sich an die Verhältnisse in lebenden Zellen anzunähern, wurden die häufig vorkommenden Proteine und die für den Aufbau von Zellmembranen verantwortlichen Fettsäuren näher untersucht. Dabei erfolgt die Zugabe von vier verschiedenen Proteinen, die sich stark in ihrer molekularen Größe unterscheiden, und von fünf Fettsäuren, bei denen die Anzahl der Doppelbindungen ansteigt.

Die Messungen erfolgen in klaren Lösungen, um störende Effekte durch Streuung zu vermeiden, daher wurden die Proteine in Wasser gelöst, die Fettsäuren in Ethanol. Da diese Messungen erstmals unter Berücksichtigung der Sauerstoff-Konzentration und der Konzentration der Proteine und Fettsäuren durchgeführt wurden, wurde der Referenzfarbstoff TMPyP als Photosensibilisator bei der Anregungswellenlänge von 532 nm verwendet. Für die Anregung im Ultravioletten bei 355 nm wurde Pe-

rinaphthenon verwendet. Abschließende Messungen im UVA-Bereich bei Fettsäuren erfolgen ohne weitere Photosensibilisatoren. Bei den verschiedenen Untersuchungen wurde auch der Sauerstoff-Verbrauch durch eine Oxidation der Biomoleküle betrachtet. Außerdem wurden wieder Lumineszenzsignale bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen verglichen und die Abhängigkeit der Raten und Ratenkonstanten von der Protein-, bzw. Fettsäure-Konzentration ermittelt.

5.1 Materialien

5.1.1 Proteine

Es wurden Untersuchungen an vier verschiedenen, wasserlöslichen Proteinen/Peptiden vorgenommen, die sich wesentlich in der Anzahl der Aminosäuren unterscheiden (Albumin, Trypsin-Inhibitor, Insulin (Peptid), Angiotensin (Peptid)). Alle vier Proteine, bzw. Peptide sind in Abbildung 5.1 dargestellt. Die Proteine nehmen in den hier untersuchten Systemen die Rolle des Quenchers in Ratengleichungsmodell (vgl. Kapitel 2.8) ein. Die Ratenkonstanten k_{T_1Q} und $k_{\Delta Q}$ beschreiben also hier die Fähigkeit des jeweiligen Proteins zum Quenchen des Singulett-Sauerstoffs. Es muss allerdings beachtet werden, dass die Proteine sowohl physikalisch als auch chemisch quenchen können, indem sie durch Singulett-Sauerstoff oxidiert werden und dadurch Sauerstoff verbraucht wird.

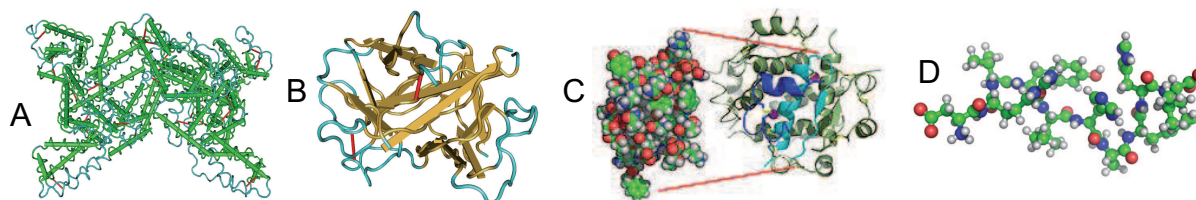


Abbildung 5.1: *drei-dimensionale Molekülstruktur von (A) Albumin, (B) Trypsin-Inhibitor, (C) Insulin und (D) Angiotensin*

Albumin ($m_M \approx 66.000$ Da) sorgt im menschlichen Organismus vor allem für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks, indem es in den Blutgefäßen Wasser an sich bindet und dessen Austritt in das Gewebe verhindert. Die Bindungskapazität für Wasser beträgt ca. 18 ml/g. Durchschnittlich besitzt ein gesunder Mensch 3,5 bis 4,5 Gramm Albumin pro Kilogramm Körpergewicht. Mit 50 - 60% bildet es den Hauptbestandteil der Serumproteine. Weitere biologische Aufgaben des Albumins sind der Transport von wasserunlöslichen Substanzen, wie Fettsäuren oder Vitamine, und die Stabilisierung des pH-Wertes im Blut.

In dieser Arbeit wurde kein humanes Serumalbumin (HSA), sondern Serumalbumin von Rindern (bovines Serumalbumin, BSA) verwendet. Es besteht aus 583 Aminosäuren mit einem hohen Anteil an Cystein. Der Anteil an oxidierbaren Aminosäuren (vgl. Kapitel 2.6 Tabelle 2.2) in Albumin beträgt ca. 28%. Die Substanz wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) mit einer Reinheit von über 98% bezogen.

Als **Trypsin-Inhibitoren** ($m_M = 20.000$ Da) werden allgemein Polypeptide mit Hemmwirkung auf die Trypsin-Aktivität bezeichnet. Trypsin ist ein bei der Eiweißverdauung beteiligtes Enzym. Der hier verwendete Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen und besitzt einen Anteil an oxidierbaren Aminosäuren von ca. 17%. Die Substanz wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) mit einer Reinheit von über 90% bezogen.

Insulin ($m_M = 5733$ Da) ist ein für Menschen und Tiere lebenswichtiges Peptidhormon, das in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet wird. Es ist für die Senkung des Blutzuckerspiegels vor allem nach der Aufnahme von kohlehydratreicher Nahrung verantwortlich. Das Insulinmolekül besteht aus zwei Peptidkette, der A-Kette mit 21 Aminosäuren und der B-Kette mit 30 Aminosäuren. Diese zwei Ketten sind durch zwei Disulfidbrücken kovalent verbunden. Der Anteil an oxidierbaren Aminosäuren in Insulin beträgt ca. 27%. Insulin wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) mit einer Reinheit von über 90% bezogen.

Angiotensin I ($m_M = 1296$ Da) ist ein Dekapeptid und Prohormon. Die Primärstruktur besteht aus zehn Aminosäuren ($\text{H}_2\text{N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His}$

LeuCOOH). Angiotensin I selbst ist weitgehend inaktiv, wird jedoch durch das Angiotensin Converting Enzym in das Oktopeptid Angiotensin II gespalten, das für die blutgefäßkontrahierende Wirkung verantwortlich ist. Der Anteil an oxidierbaren Aminosäuren in Angiotensin beträgt ca. 40%. Das Peptid wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) mit einer Reinheit von über 90% bezogen.

5.1.2 Fettsäuren

In Tabelle 5.1 sind die für menschlichen Organismus wichtigsten Fettsäuren gezeigt, wobei sie in gesättigte (keine Doppelbindungen) und ungesättigte (mindestens eine Doppelbindung) unterschieden werden.

gesättigte Fettsäuren	ungesättigte Fettsäuren
Myristinsäure 14:0	Ölsäure 18:1
Palmitinsäure 16:0	Linolsäure 18:2
Stearinsäure 18:0	Linolensäure 18:3
Arachinsäure 20:0	Arachidonsäure 20:4

Tabelle 5.1: *die für den Menschen wichtigen Fettsäuren, unterteilt in gesättigte und ungesättigte; hinter den Fettsäuren ist immer die Anzahl der Kohlenstoffatome in Relation zu den Doppelbindungen angegeben.*

Für die Untersuchungen wurden fünf unterschiedliche Fettsäuren ausgewählt. Diese sollten sich dabei nur in der Anzahl der isolierten Doppelbindungen unterscheiden, die Kettenlänge sollte gleich bleiben. Für die Fettsäuren von null bis drei Doppelbindungen konnten die entsprechenden Eigenschaften gefunden werden bei Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1), Linolsäure (18:2) und Linolensäure (18:3). Lediglich für die Fettsäure mit vier Doppelbindungen musste eine längere verwendet werden, Arachidonsäure (20:4). Die Strukturmodelle der fünf Fettsäuren sind in Abbildung 5.2 gezeigt. Die verschiedenen Fettsäuren wurden hinsichtlich ihrer Oxidierbarkeit, ihrem Einfluß auf das Ratensystem und ihrem Verhalten unter UVA-Bestrahlung untersucht. Alle wurden von Sigma-Aldrich bezogen mit einer Reinheit von über 98%.

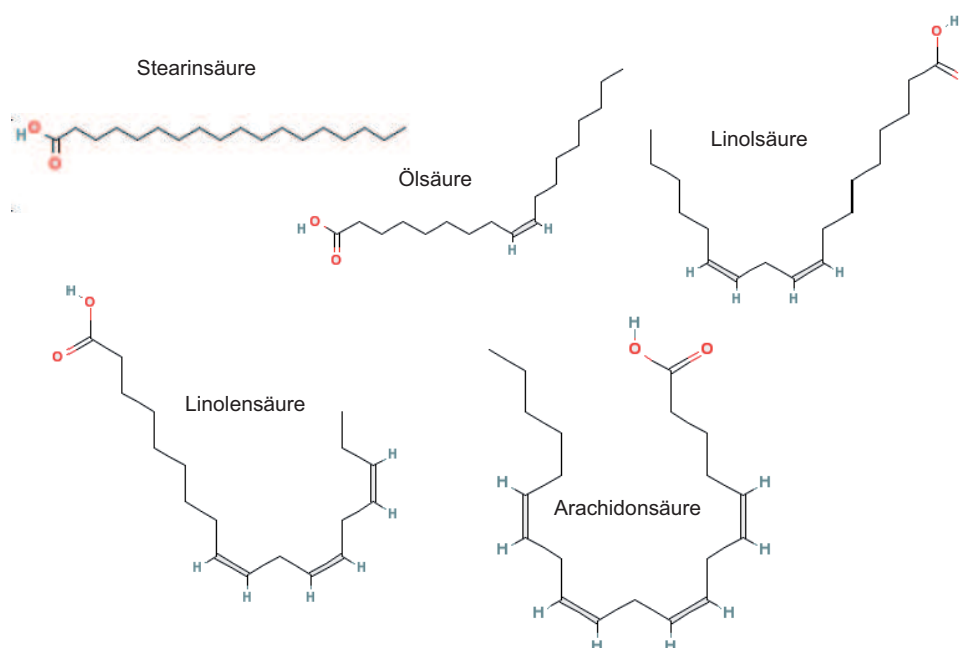


Abbildung 5.2: Molekülstruktur der verwendeten Fettsäuren

Stearinsäure oder Octadecansäure $\langle \text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOH} \rangle$ ($m_M = 284,48 \text{ g/mol}$) ist eine gesättigte Fettsäure, deren Salze Stearate heißen. Diese werden häufig in der Kosmetikindustrie verwendet und finden sich in nahezu allen Hautcremes. In der Form von Glycerinstearaten, einer Untergruppe der Lipide, tritt die Säure in nahezu allen pflanzlichen und tierischen Fetten und Ölen auf. Stearinsäure liegt unter Normalbedingungen als weiße, fettige Plättchen vor, die in Wasser fast unlöslich sind, sich in Ethanol aber gut lösen.

Die **Ölsäure** oder *cis*-9-Octadecensäure $\langle \text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH} \rangle$ ($m_M = 282,46 \text{ g/mol}$) ist der wichtigste Vertreter der einfach ungesättigten Fettsäuren und liegt in der natürlichen Form in der *cis*-Konfiguration vor mit einer Doppelbindung zwischen dem neunten und zehnten Kohlenstoffatom. Ebenso wie die Stearate werden die Oleate häufig in Kosmetika verwendet. Als Triglycerid kommt es in fast allen natürlichen Ölen vor (in Sonnenblumenöl bis zu 93%). Die Ölsäure ist unlöslich in Wasser und unter Normalbedingungen eine farblose, ölige und fast geruchslose Flüssigkeit, die nur langsam an der Luft unter Gelbfärbung oxidiert.

Linolsäure oder (*cis,cis*)-Octadeca-9,12-diensäure $\langle \text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{COOH} \rangle$ ($m_M = 280,45$ g/mol) ist ein essentieller Nährstoff, den der menschliche Körper über die Nahrung aufnehmen muss. Linolsäure ist ein regelmäßiger Bestandteil der menschlichen Haut, speziell der Epidermis. Sie ist in vielen pflanzlichen Ölen, wie Sojaöl und Sonnenblumenöl, enthalten. Ebenso wie die Ölsäure ist sie unter Normalbedingungen eine farblose, ölige und fast geruchlose Flüssigkeit, die oxidationsempfindlich ist und an Luft unter Gelbfärbung altert. Sie löst sich nur sehr schlecht in Wasser (139 mg/L), aber gut in vielen organischen Lösungsmitteln, wie Ethanol oder Chloroform.

α -Linolensäure oder (all-*cis*)-Octadeca-9,12,15-triensäure $\langle \text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{COOH} \rangle$ ($m_M = 278,43$ g/mol) ist wiederum ein essentieller Nährstoff und spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen und wirkt dabei entzündungshemmend. Mit den höchsten Gehalt von bis zu 65% an Linolensäure besitzt Chiaöl, das aus der salbeiähnlichen Chia-Pflanze gewonnen wird. Reine Linolensäure ist unter Normalbedingungen farblos, ölig und fast geruchlos, sie ist aber sehr oxidationsempfindlich und altert an Luft rasch unter Gelbfärbung. Sie ist unlöslich in Wasser, löst sich aber in vielen organischen Lösungsmitteln.

Arachidonsäure oder (all-*cis*)-Eicosa-5,8,11,14-tetraensäure $\langle \text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{COOH} \rangle$ ($m_M = 304,47$ g/mol) ist eine vierfach ungesättigte Fettsäure, die nicht in Pflanzen vorkommt. Sie wird in jedem tierischen oder menschlichen Körper aus Linolsäure gebildet oder über die Nahrung aufgenommen. Der Arachidonsäure-Metabolismus stellt einen der Hauptsignalübertragungswege bei der Entstehung von Schmerz und Entzündungen dar. In ihrer veresterten (physiologisch inaktiven) Form ist sie vor allem in Zellmembranen lokalisiert und kann durch die Phospholipase A_2 freigesetzt werden. Die farblose, ölige und fast geruchlose Arachidonsäure oxidiert an Luft rasch zu einer gelblichen, ranzig riechenden Flüssigkeit. Sie löst sich gut in unpolaren Lösungsmitteln und ist praktisch unlöslich in Wasser.

Transmissionsspektren

Als Ausgangsbasis für weitere Untersuchungen wurden die Transmissionsspektren der fünf Fettsäuren gemessen. Es wurde darauf geachtet, dass die Messungen bei frischen, also kaum durch Autooxidation verunreinigten, Lösungen erfolgt. Es wurde

bei jeder Fettsäure eine Konzentration von 50 mmol/L verwendet und die Transmission im Wellenlängenbereich von 200 nm bis 400 nm in einer 1 cm Quarzglas-Küvette von Hellma (Müllheim, Deutschland) mit dem Spektrophotometer (Beckman DU 640) aufgenommen.

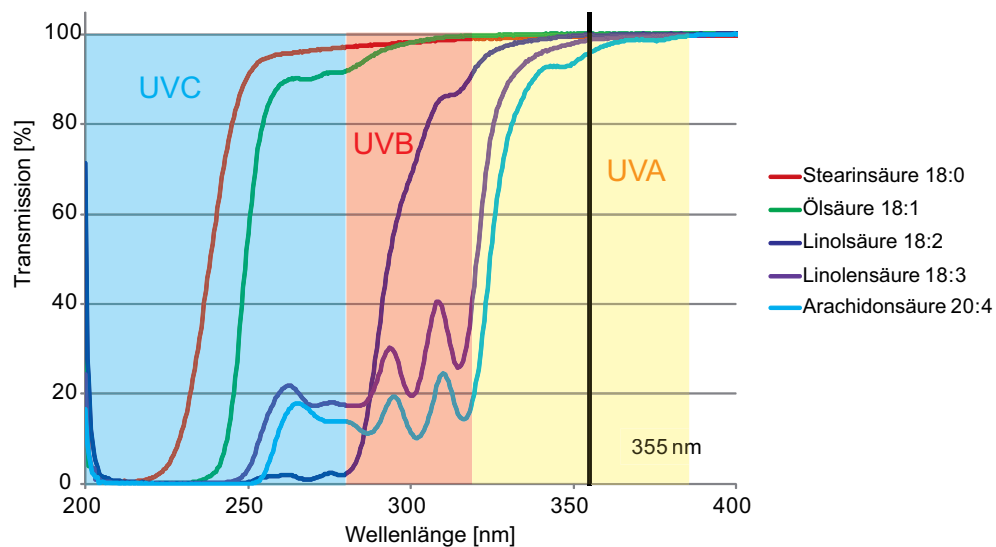


Abbildung 5.3: Absorptionsspektren der fünf Fettsäuren, mit eingezeichnet sind die verschiedenen UV-Bereiche und die Laserwellenlänge bei 355 nm

Wie in Abbildung 5.3 zu sehen ist, absorbieren alle Fettsäuren sehr gut im UVC-Bereich, bis auf die Stearinsäure tritt auch noch Absorption im UVB-Bereich auf. UVA-Strahlung wird hingegen nur noch von Linol-, Linolen- und Arachidonsäure absorbiert. Bei einer Laserstrahlung von 355 nm absorbiert Arachidonsäure noch etwa 5% der eingestahlten Energie. Auf eine Darstellung der Transmissionspektren der verschiedenen Proteine ist verzichtet worden, da diese nicht im Bereich der Anregungswellenlänge von 355 nm, bzw. 532 nm absorbieren.

5.2 TMPyP mit Proteinen

Als erstes wurde der Einfluss von Proteinen auf die Singulett-Sauerstoff-Generierung und dessen Relaxation in Wasser untersucht. Als Photosensibilisator wurde das photostabile TMPyP verwendet, so dass die Anregung mit Laserstrahlung bei 532 nm stattfindet. Da nun für den erzeugten Singulett-Sauerstoff in den Lösungen die Möglichkeit bestand die Proteine zu oxidieren, wurden die vier Proteine hinsichtlich des Sauerstoffverbrauchs geprüft. Dieses Verhalten ist für eine weitere Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten von großer Bedeutung.

5.2.1 Sauerstoffverbrauch

Um den Einfluss des Sauerstoffverbrauchs der Proteine während den folgenden Lumineszenz-Messungen bestimmen zu können, wurde von jedem Protein eine Protein-TMPyP-Lösung erstellt. Die Farbstoff-Konzentration betrug dabei bei allen vier Lösungen 50 $\mu\text{mol/L}$. Die Proteine wurden einzeln mit einer Konzentration von 2 mg/ml in dem Farbstoff-Wasser-Gemisch gelöst. Bei jeder Messung wurden 3 ml des Farbstoff-Protein-Wasser-Gemisches in eine Quarzglasküvette gefüllt, die mit einem Teflon-Stopfen verschlossen, mit Parafilm abgedichtet und mit einem Magnetrührer durchmischt wurde. Anschließend wurde das Gemisch durchgehend mit dem Laser (532 nm, 2 kHz, 50 mW) bestrahlt. Mit dem in den Teflon-Stopfen integrierten Nadel-Sensor wurde die Sauerstoff-Konzentration in der Lösung gemessen.

Abbildung 5.4 zeigt, dass bei gleichen Massenkonzentrationen der Proteine die Geschwindigkeit der Oxidation stark von der Molekülgröße abhängt, aber auch der Anteil der oxidierbaren Aminosäuren kann eine Rolle bei der Oxidationsgeschwindigkeit spielen.

Bei der Oxidation der Aminosäuren bestimmt nur die Menge an gebildetem Singulett-Sauerstoff die Reaktionsgeschwindigkeit, da die Menge der Aminosäuren (ca. 20 mmol/L) im Vergleich zu der des Singulett-Sauerstoffs (gesamter Sauerstoff: 0,27 mmol/L) im Überschuss vorhanden ist. Da aber die Menge des Singulett-Sauerstoffs nahezu unabhängig von der Sauerstoff-Konzentration ist (Φ_{Δ} ist konstant über einen großen Bereich der Sauerstoff-Konzentration [5]) und nur von der durch den Pho-

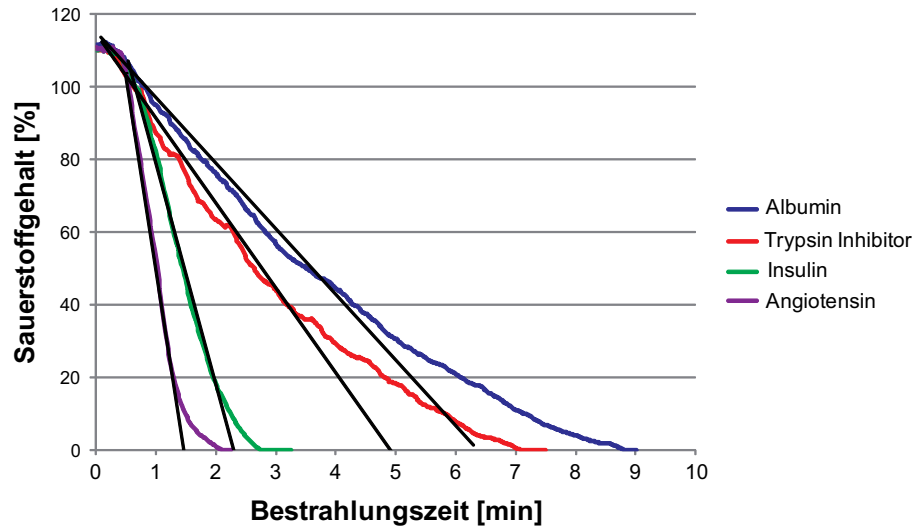


Abbildung 5.4: Der Sauerstoffgehalt der Proteinlösungen mit $50 \mu\text{mol/L}$ TMPyP gegen die Bestrahlungszeit; dazu die Geraden mit einem angenommenen konstanten Sauerstoffverbrauch

tosensibilisator absorbierten Lichtenergie abhängt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von der Konzentration der Reaktionspartner und die zeitabhängige Konzentration des Sauerstoffs kann beschrieben werden mit einer Reaktion nullter Ordnung: $[\text{O}_2(t)] = [\text{O}_2]_0 - k \cdot t$.

Die Dimension von k ist $[\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$.

Diese Annahme gilt jedoch nur für photostabile Farbstoffe, hohe Aminosäuren-Konzentrationen (über 1 mmol/L) und in einem Bereich, in dem sich die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute nicht ändert. Diese Einschränkung ist bereits in Abbildung 5.4 zu erkennen, da die Reaktionsgeschwindigkeit bei Sauerstoff-Konzentrationen unter 10% der Luftsättigung (ca. $30 \mu\text{mol/L}$) abnimmt.

In Abbildung 5.4 sind die Geschwindigkeitskoeffizienten durch lineare Fitgeraden bestimmt, die an die Messwerte bis zu einer Sauerstoff-Konzentration von $30 \mu\text{mol}$ angepasst werden. Bei der vorliegenden Messung ergeben sich die in Tabelle 5.2 angegebenen Geschwindigkeitskoeffizienten mit einem Fehler von 10%.

Bei Angiotensin nimmt die Sauerstoff-Konzentration während einer typischen Messdauer von 10 Sekunden um bis zu $47 \mu\text{mol}$ ab. Dies führt dazu, dass sich die Rate K_{T_1} während der Messung ändert, nach

$$K_{T_1} := k_{T_1} + (k_{T_1\text{O}_2} + k_{T_1\Delta})[\text{O}_2] + k_{T_1\text{S}_0}[\text{P}] + k_{T_1\text{Q}}[\text{Q}]. \quad (5.1)$$

Protein/Peptid	Geschwindigkeitskoeffizient
Albumin	$0,8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Trypsin Inhibitor	$1,1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Insulin	$2,7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Angiotensin	$4,7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Tabelle 5.2: *Geschwindigkeitskoeffizient des Sauerstoffverbrauches verschiedener Proteine/Peptide (2 mg/mL) in TMPyP-Wasser-Gemischen (TMPyP-Konzentration = 50 $\mu\text{mol/L}$) bei 50 mW eingestrahelter Leistung*

Somit können nur noch Mittelwerte zwischen der Anfangs- und Endkonzentration des Sauerstoffs bestimmt werden, aus denen wiederum nur Abschätzungen der Rate K_{T_1} bei bestimmten Sauerstoff-Konzentrationen möglich sind.

Wie bereits früher gezeigt [50], wurden bei einer Laserleistung von 100 mW ohne Einsatz eines Magnetührers etwa 40 Joule benötigt, um den Sauerstoff in einer Lösung mit 2 mg/ml Albumin und 50 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP unter das Detektionsminimum zu senken. In dieser Messung bei 50 mW mit einem Magnetührer wurden hingegen nur etwa 30 Joule benötigt, um den gleichen Effekt zu erzielen.

Dies zeigt, dass der Sauerstoffverbrauch nicht nur von der eingestrahnten Energie abhängt, sondern auch von der lokalen Konzentration des Sauerstoffs und der oxidierbaren Proteine. Das soll heißen, dass bei einer niedrigeren Leistung und dem ständigen Durchmischen der Probe die Reaktion von Singulett-Sauerstoff und Proteinen wahrscheinlicher wird als wenn der Ausgleich der Sauerstoff-Konzentration nur durch Diffusion erfolgt. Es ist somit mit Magnetührer weniger Gesamtenergie für den Verbrauch des gesamten Sauerstoffs notwendig, da immer genügend Sauerstoff zur Oxidation im Anregungszentrum zur Verfügung steht. Des weiteren kann aus diesen Messungen gefolgert werden, dass sich für Albumin die Messbedingungen am langsamsten ändern und sich für eine Einzelmessung von 10 Sekunden ($\hat{=}$ 0,5 Joule bei einer Leistung von 50 mW) die Sauerstoff-Konzentration nur um etwa 3% ($\hat{=}$ 8 $\mu\text{mol/L}$) ändert. Im Vergleich dazu tritt die gleiche Veränderung der Sauerstoff-Konzentration bei Angiotensin in nur 1,7 Sekunden auf.

5.2.2 Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten bei Albumin-TMPyP-Gemischen

Die Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten erfolgte im weiteren Verlauf nur bei Albumin-TMPyP-Lösungen, da bei diesen der Sauerstoffverbrauch während der Bestrahlung am geringsten (Tab. 5.2) und somit die Messbedingungen am stabilsten sind.

Die Variation der Sauerstoff-Konzentration erfolgt bei einer Farbstoff-Konzentration von $[P] = 100 \mu\text{mol/L}$ und einer Albumin-Konzentration von $[Q] = 2 \text{ mg/ml} = 30 \mu\text{mol/L}$. In Abbildung 5.5 sind die Raten β_1 und β_2 in Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration aufgetragen.

Die Variation der Farbstoff-Konzentration wurde bei 20% und 80% Sauerstoffsättigung (54 und $216 \mu\text{mol/L}$) durchgeführt, um wie in Abbildung 5.5 ersichtlich links und rechts des Schnittpunkts ($K_\Delta = K_{T_1}$) zu messen. Die Albumin-Konzentration beträgt in beiden Fällen wieder $30 \mu\text{mol/L}$. Die TMPyP-Konzentration wurde zwischen $[P] = 10 \mu\text{mol/L}$ und $[P] = 500 \mu\text{mol/L}$ variiert. Abbildung 5.6 zeigt die Raten in Abhängigkeit von der Farbstoff-Konzentration bei $54 \mu\text{mol/L}$ Sauerstoff ($K_\Delta > K_{T_1}$) (A) und bei $216 \mu\text{mol/L}$ Sauerstoff ($K_\Delta < K_{T_1}$) (B).

Die Variation der Protein-Konzentration erfolgt bei einer Farbstoff-Konzentration von $[P] = 100 \mu\text{mol/L}$ und einer Sauerstoff-Konzentration von $[O_2] = 54 \mu\text{mol/L}$. Die Protein-Konzentration wurde zwischen $[Q] = 7,5 \mu\text{mol/L}$ und $[Q] = 750 \mu\text{mol/L}$ variiert. Wie in Abbildung 5.7 ersichtlich schneiden sich die Raten β_1 und β_2 nicht, so dass $\beta_1 \approx K_\Delta$ und $\beta_2 \approx K_{T_1}$ gilt.

Bei allen Messungen wurde die Lösung mit einem Magnetrührer durchmischt, um den Sauerstoff-Gradienten im Bereich der Laseranregung möglichst gering zu halten. Für die Bestimmung der Raten wurden nur die Signale von 2000 Laserpulsen (100 mW Leistung) aufsummiert, um so wenig Sauerstoff wie möglich zu verbrauchen. Es muss aber berücksichtigt werden, dass die Sauerstoff-Konzentration während der Messung immer noch um ca. $1,5 \mu\text{mol/L}$ abnimmt.

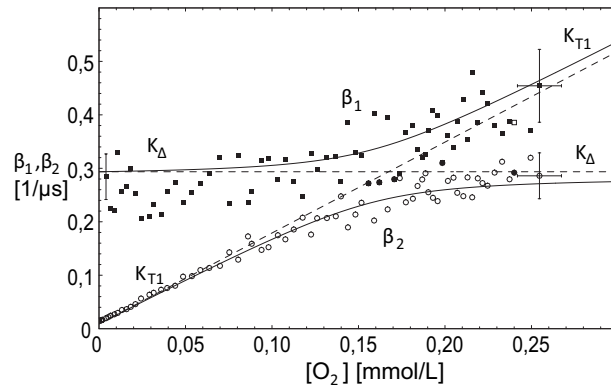


Abbildung 5.5: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Sauerstoff-Konzentration in einer TMPyP-Albumin-Lösung (Farbstoff-Konzentration: $100 \mu\text{mol/L}$, Albumin-Konzentration: $2 \text{ mg/ml} = 30 \mu\text{mol/L}$); die Fehlerbalken sind der Übersicht halber nur einmal für die größten Werte eingezeichnet.

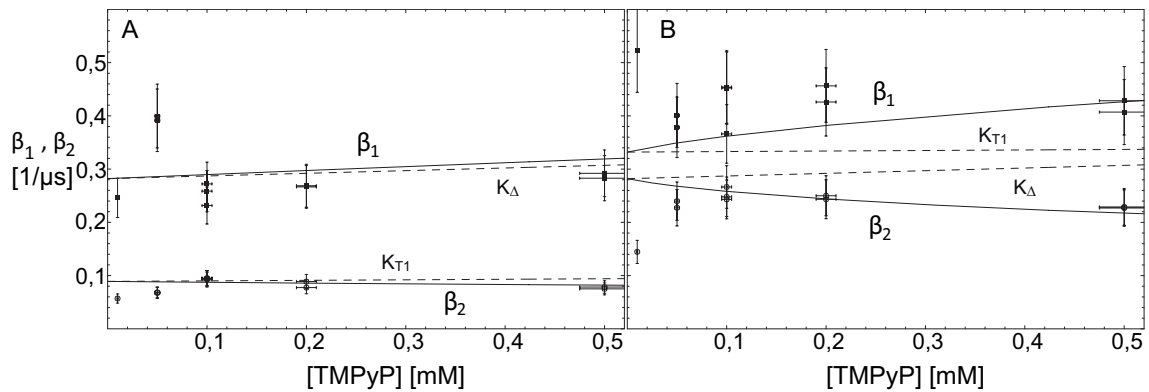


Abbildung 5.6: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Farbstoff-Konzentration in einer TMPyP-Albumin-Lösung (Sauerstoff-Konzentration: $54 \mu\text{mol/L}$ (A) und $216 \mu\text{mol/L}$ (B), Albumin-Konzentration: $2 \text{ mg/ml} = 30 \mu\text{mol/L}$)

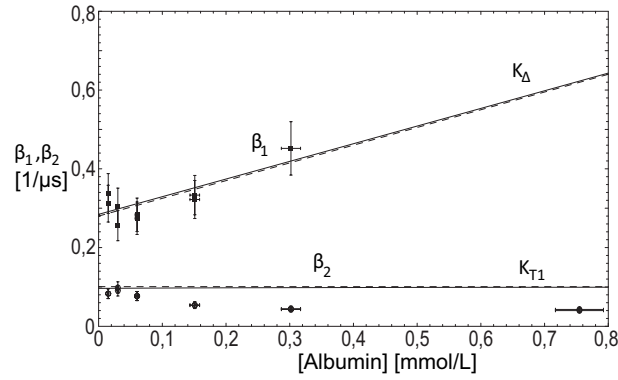


Abbildung 5.7: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Albumin-Konzentration in einer TMPyP-Albumin-Lösung (Farbstoff-Konzentration: $100 \mu\text{mol/L}$, Sauerstoff-Konzentration: $54 \mu\text{mol/L}$)

Die aus den verschiedenen Variationen der Konzentrationen ermittelten Raten, sowie die Raten ohne Albumin aus Kapitel 4 und die bekannten Literaturwerte sind in Tabelle 5.3 angegeben.

Rate/ Ratenkonstante	TMPyP mit Albumin	TMPyP ohne Albumin	TMPyP Literaturwerte	Einheit
k_Δ	$0,27 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,02$	μs^{-1}
k_{T_1}	$<0,011$	$<0,006$	$0,007 \pm 0,001$	μs^{-1}
$k_{T_1O}^\Sigma$	$1,7 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	$\mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$	$<0,08$	$<0,1$		$\mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 S_0}$	$<0,03$	$<0,001$		$\mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$	$<0,2$	$<0,08$		$\mu\text{s}^{-2} \cdot \text{mmol}^{-2} \cdot \text{L}^2$
$k_{\Delta Q}$	$0,45 \pm 0,10$	$0,6 \pm 0,05 (\text{NaN}_3)$	$(0,45 \pm 0,03)^a$	$\mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 Q}$	n.b.	$<0,005 (\text{NaN}_3)$		$\mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$

Tabelle 5.3: Übersicht über die Raten und Ratenkonstanten von TMPyP in Wasser mit und ohne Albumin und den vorhandenen Literaturwerten ohne Albumin (^a mit Albumin) [9]

Bei der Variation der Protein-Konzentration (Abb. 5.7) bei einer Sauerstoff-Konzentration von $54 \mu\text{mol/L}$ entspricht die Rate β_2 der Farbstoff-Triplett-Abklingrate

K_{T_1} . Bei einem quenchenden Effekt des Albumins müsste die Rate β_2 mit steigender Albumin-Konzentrationen ansteigen (wie bei Natriumazid als Quencher beschrieben). Durch den lokalen Verbrauch von Sauerstoff zeigt sich allerdings die Sauerstoff-Abhängigkeit der Rate K_{T_1} (siehe oben), deren Wert mit sinkendem Sauerstoff-Gehalt ebenfalls sinkt. Daher überlagert dieser Effekt die quenchenden Eigenschaften des Albumins und die Ratenkonstante würde einen negativen Wert annehmen, der nicht mit der Theorie übereinstimmt. Des weiteren kann die Bindung von Proteinen an den Farbstoff [9] den Farbstoff-Triplett-Zustand beeinflussen. Dies legt auch die Veränderung der Raten- und Ratenkonstanten nahe, die sich auf den Farbstoff- T_1 -Zustand beziehen. So vergrößern sich k_{T_1} , $k_{T_1S_0}$ und das Produkt $k_{T_1\Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$, was auf eine insgesamt schneller Deaktivierung des Farbstoff- T_1 -Zustands durch das Lösungsmittel und den Farbstoff selbst schließen lässt.

Die Abbildungen zeigen, dass aus den Messergebnissen nicht mit Sicherheit entschieden werden kann, ob ein Energierücktransfer vom Singulett-Sauerstoff auf den Triplett-Zustand von TMPyP erfolgt. Die Größe des Fehlers bei der Ratenbestimmung lässt sowohl eine Zuordnung zu den analytisch ermittelten Kurven mit (durchgezogene Linien) als auch ohne (gestrichelte Linien) Energierücktransfer zu.

Ein Überblick über die hier ermittelten Raten und Ratenkonstanten und ein Vergleich mit denen mit Fettsäuren erfolgt in Abschnitt 5.6.

5.3 TMPyP mit Fettsäuren

Nach den Proteinen wurde in diesem Abschnitt die Beeinflussung der Raten und Ratenkonstanten durch die Anwesenheit von Fettsäuren, wie sie auch in zellulären Membranen vorkommen, untersucht. Zur Generierung von Singulett-Sauerstoff wurde wieder TMPyP verwendet; diesmal wurde der Farbstoff jedoch in Ethanol gelöst, um die Löslichkeit der Fettsäuren zu berücksichtigen. Die Möglichkeit der Oxidierung der Fettsäuren wurde bei Stearin-, Öl-, Linol- und Linolensäure untersucht. Die verschiedenen Raten und Ratenkonstanten wurden bei Stearin- und Linolensäure-Lösungen bestimmt, um einen Vertreter ohne Doppelbindungen und einen Vertreter mit Doppelbindungen zu untersuchen.

5.3.1 Sauerstoffverbrauch

Für die Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate der verschiedenen Fettsäuren wurden diese mit einer Konzentration von 50 mmol/L in einer Ethanol-TMPyP-Lösung aufgelöst. Die Farbstoff-Konzentration beträgt dabei in allen vier Lösungen 25 $\mu\text{mol/L}$. Die Durchführung erfolgt mit einer Laserleistung von 250 mW bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm. Die Sauerstoff-Konzentration in den Ethanol-Gemischen wurde wieder mit dem Nadelsensor bestimmt, der vorher in einer reinen Ethanol-Lösung kalibriert wurde.

Ohne Bestrahlung wird von einer maximalen Sauerstoff-Konzentration von 1850 $\mu\text{mol/L}$ in Ethanol ausgegangen. Das Verhältnis von den Lipidmolekülen zu den Ethanolmolekülen entspricht etwa 1:500, so dass ein Einfluss der gelösten Lipide auf die Sauerstoff-Konzentration vernachlässigt werden kann. Die Quarzglas-Küvette wurde bei allen Messungen bis oben hin gefüllt (Füllmenge $\sim 3,2$ ml).

Um definierte Bedingungen zu haben, wurde die Küvette durch einen Teflonstopfen luftdicht verschlossen, wodurch eine Diffusion von O_2 von Außen während der Messung vermieden wurde. In der Küvette sorgt ein Magnetrührer für eine Durchmischung der Lösung.

Wie in Abbildung 5.8 zu erkennen erfolgt unter Laserbestrahlung die schnellste Abnahme der Sauerstoff-Konzentration bei Linolensäure, der dreifach ungesättigten Fettsäure. Bei den Fettsäuren mit nur einer oder zwei Doppelbindungen, Öl- und Linolsäure, ist der Sauerstoffverbrauch deutlich langsamer. Die gesättigte Stearinsäure zeigt so gut wie keinen Sauerstoff-Verbrauch. Ebenso wie beim Sauerstoffverbrauch durch die Oxidation von Proteinen wird wieder von einer Reaktion nullter Ordnung ausgegangen und die entsprechenden Geschwindigkeitskoeffizienten (siehe Tabelle 5.4) wurden wieder durch das Anpassen von linearen Fitkurven ermittelt.

Der Fehler der ermittelten Werte liegt wieder bei 10%. Im Vergleich zu Albumin mit einer über 1000 mal geringeren Konzentration entspricht der Sauerstoffverbrauch der verschiedenen Fettsäuren bei einer 5 mal höheren Laserleistung in etwa dem der Proteine in Wasser. Dadurch können für die nachfolgenden Messungen zur Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten mit bis zu 20.000 Laserpulse bei einer Leistung von 50 mW erfolgen ohne die Sauerstoff-Konzentration maßgeblich zu verändern.

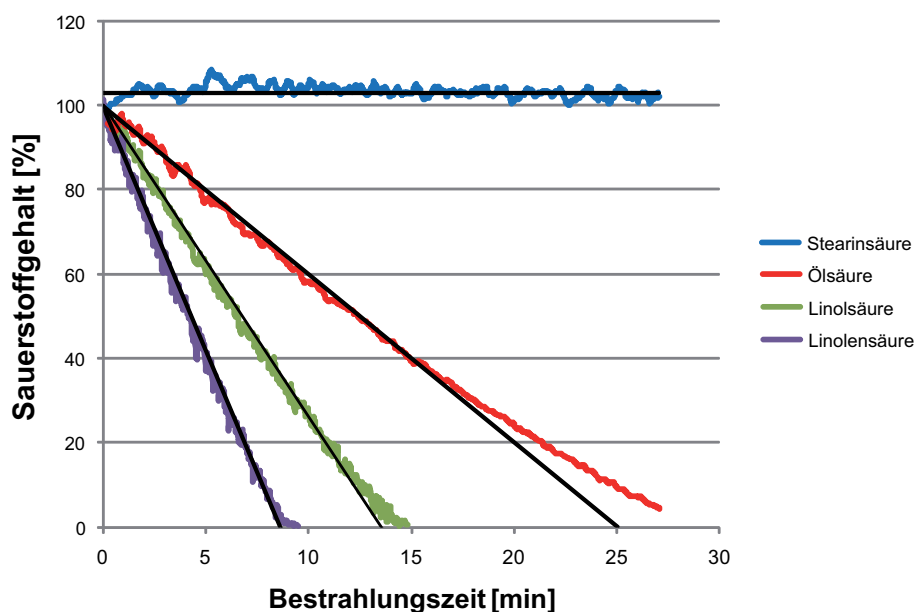


Abbildung 5.8: Der Sauerstoffgehalt der Fettsäurelösungen mit $25 \mu\text{mol/L}$ TMPyP gegen die Bestrahlungszeit; dazu die Geraden für einem angenommenen konstanten Sauerstoffverbrauch

Fettsäure	Geschwindigkeitskoeffizient
Stearinsäure	$0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Ölsäure	$1,2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Linolsäure	$2,3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Linolensäure	$3,5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Tabelle 5.4: Geschwindigkeitskoeffizient des Sauerstoffverbrauchs verschiedener Fettsäuren (Konzentration = 50 mmol/L) in TMPyP-EtOH-Gemischen bei 250 mW eingestrahelter Leistung und einer $25 \mu\text{mol/L}$ TMPyP-Lösung

5.3.2 Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten bei Fettsäure-TMPyP-Gemischen

Um den Einfluss der Fettsäuren, bzw. Doppelbindungen der Fettsäuren auf das gesamte System zu untersuchen, wurden Stearinsäure und Linolsäure in Ethanol mit dem Farbstoff TMPyP gelöst und die Raten und Ratenkonstanten der Lösungen bestimmt. Für beide Lösungen wurden immer die gleichen Bedingungen (Farbstoff- und Sauerstoff-Konzentration, Laserleistung, etc.) gewählt, um vergleichbare Werte zu erhalten.

Die Variation der Sauerstoff-Konzentration erfolgt jeweils bei einer Farbstoff-Konzentration von $[P] = 50 \mu\text{mol/L}$ und einer Fettsäure-Konzentration von $[Q] = 50 \text{ mmol/L}$. In Abbildung 5.9 sind die Raten β_1 und β_2 in Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration aufgetragen ($A \hat{=}$ Stearinsäure, $B \hat{=}$ Linolsäure).

Die Variation der Farbstoff-Konzentration wurde bei 20% Sauerstoffsättigung ($370 \mu\text{mol/L}$) durchgeführt. In Abbildung 5.10 sind die Raten β_1 und β_2 in Abhängigkeit von der Farbstoff-Konzentration dargestellt. Die Ausschnitte mit der Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer sind noch einmal vergrößert gezeigt. Die Fettsäure-Konzentration beträgt in beiden Fällen wieder 50 mmol/L . Die TMPyP-Konzentration wurde zwischen $[P] = 1 \mu\text{mol/L}$ und $[P] = 500 \mu\text{mol/L}$ variiert.

Die Variation der Fettsäure-Konzentration erfolgt bei einer Farbstoff-Konzentration von $[P] = 50 \mu\text{mol/L}$ und einer Sauerstoff-Konzentration von $[O_2] = 370 \mu\text{mol/L}$ und $[O_2] = 20 \mu\text{mol/L}$. Die Fettsäure-Konzentration wurde zwischen $[Q] = 1 \text{ mmol/L}$ und $[Q] = 100 \text{ mmol/L}$ variiert. In Abbildung 5.11 sind die Messwerte für die Variation bei $20 \mu\text{mol/L}$ Sauerstoff gezeigt.

Bei allen Messungen wurde die Lösung mit einem Magnetrührer durchmischt, um den Sauerstoff-Gradienten möglichst gering zu halten. Für die Bestimmung der Raten wurden die Signale von 20.000 Laserpulsen (50 mW Leistung) aufsummiert.

Aus den erhaltenen Werten lassen sich bei beiden Fettsäure-TMPyP-Gemischen die Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer zu $(14 \pm 2) \mu\text{s}$ bestimmen. Die Triplett-Lebensdauer von TMPyP liegt zwischen $50 \mu\text{s}$ bei Linolsäure und $200 \mu\text{s}$ bei Stearinsäure und liegt damit in etwa bei dem Wert aus Kapitel 4.4. Die Abweichung der Rate k_{T_1} bei

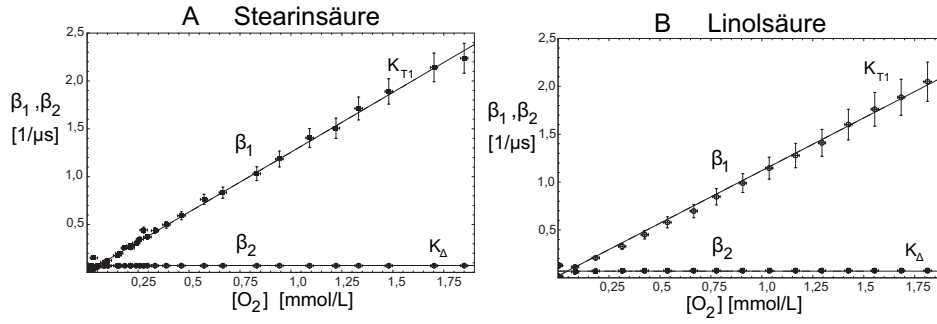


Abbildung 5.9: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Sauerstoff-Konzentration bei Fettsäure-TMPyP-Lösungen (Farbstoff-Konzentration: 50 μ mol/L, Fettsäure-Konzentration: 50 mmol/L); Abbildung A: Stearinsäure, Abbildung B: Linolsäure

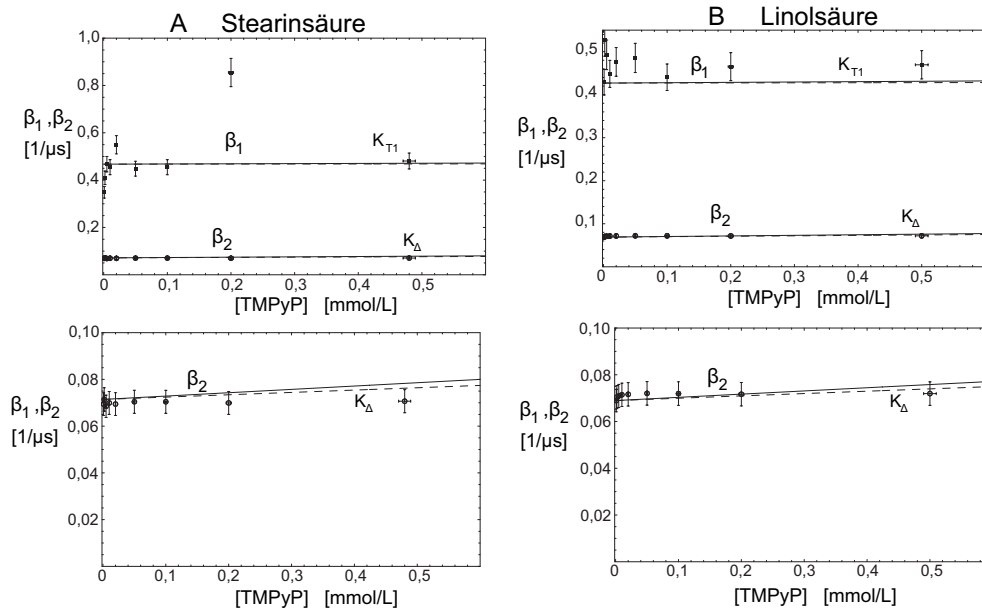


Abbildung 5.10: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der TMPyP-Konzentration bei Fettsäure-TMPyP-Lösungen (Sauerstoff-Konzentration: 370 μ mol/L, Fettsäure-Konzentration: 50 mmol/L); Abbildung A: Stearinsäure, Abbildung B: Linolsäure; darunter die vergrößerten Ausschnitte für die Abklingrate β_2 , die hier der Singulett-Sauerstoff-Abklingrate entspricht

Linolsäure kann durch eventuelle Bindungen der Linolsäure an TMPyP erklärt werden, was eine schnellere Deaktivierung zur Folge hat. Bei der Singulett-Sauerstoff-

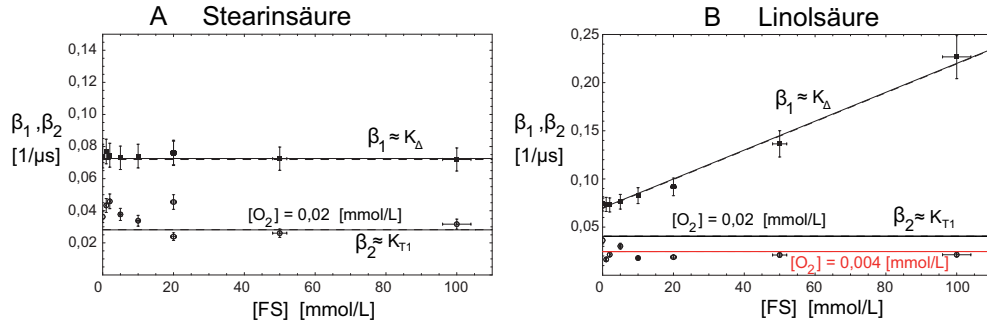


Abbildung 5.11: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Fettsäure-Konzentration bei Fettsäure-TMPyP-Lösungen (Farbstoff-Konzentration: $50 \mu\text{mol/L}$, Sauerstoff-Konzentration: $20 \mu\text{mol/L}$); Abbildung A: Stearinsäure, Abbildung B: Linolsäure; Die rote Linie in Abbildung B zeigt die Rate β_2 , die in diesem Fall der Farbstoff- T_1 -Abklingrate entspricht, bei einer angenommenen Sauerstoff-Konzentration von $4 \mu\text{mol/L}$

Rate/ Ratenkonstante	TMPyP mit Stearinsäure	TMPyP mit Linolsäure	TMPyP ohne Fettsäuren	Einheit
k_Δ	$0,07 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,005$	μs^{-1}
k_{T_1}	$0,005 \pm 0,002$	$0,02 \pm 0,005$	$<0,002$	μs^{-1}
$k_{T_1 O}^\Sigma$	$1,25 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot L$
$k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$	$<0,05$	$<0,05$	$<0,03$	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot L$
$k_{T_1 S_0}$	$<0,003$	$<0,003$	$<0,002$	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot L$
$k_{\Delta Q}$	0	$<0,0015$	$0,4 \pm 0,1$ (NaN_3)	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot L$
$k_{T_1 Q}$	0	0	$0,05 \pm 0,02$	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot L$
$(k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1})$	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$	$\mu s^{-2} \cdot \text{mmol}^{-2} \cdot L^2$

Tabelle 5.5: Raten und Ratenkonstanten bei verschiedenen Fettsäuren in TMPyP-Ethanol-Gemischen

Deaktivierung durch eventuelle Quencher ($k_{\Delta Q}$) zeigt sich, dass nur die ungesättigte Linolsäure Singulett-Sauerstoff quencht, jedoch wesentlich geringer als Natriumazid. Bei der Variation der Stearin- und Linolsäure-Konzentration zeigt sich, dass die Abklingrate β_2 , die bei der Sauerstoff-Konzentration von $20 \mu\text{mol/L}$ der Abklingrate des Farbstoff-Triplett-Zustands entspricht, mit zunehmender Fettsäure-Konzentration

abnimmt. Dieser Effekt lässt sich durch den Sauerstoffverbrauch auf Grund der Oxidation der Fettsäuren erklären und kann bei Stearinsäure noch vernachlässigt werden, tritt aber bei Linolsäure verstärkt auf, wodurch es möglich wurde eine weitere Kurve für β_2 einzufügen, allerdings bei einer niedrigeren Sauerstoff-Konzentration von ca. 4 $\mu\text{mol/L}$.

Die Abweichungen der anderen Ratenkonstanten von den Werte bei TMPyP-EtOH-Lösungen ohne zusätzlichen Fettsäuren liegt im Rahmen der Fehlertoleranzen von 15%.

5.4 Perinaphthenon mit Fettsäuren

Um auch die Veränderungen der Raten und Ratenkonstanten durch den Zusatz von Fettsäuren bei Bestrahlung im UVA-Bereich untersuchen zu können, wurde in diesem Abschnitt Perinaphthenon als Photosensibilisator verwendet. Als Fettsäuren wurden die gesättigte Stearinsäure (18:0) und die ungesättigten Fettsäuren, Linol (18:2) und Arachidonsäure (20:4) untersucht.

Bei den Einzelmessungen wurde versucht, mit so wenig Laserpulsen wie möglich auszukommen, da sowohl der Sauerstoffverbrauch durch die ungesättigten Fettsäuren (bereits bei TMPyP beobachtet), als auch die Zersetzung des Farbstoffs PN unter UVA-Bestrahlung (vgl. Kapitel 4.4.2) möglichst gering gehalten werden sollten. Pro Messung wurden daher nur 10.000 Laserpulse aufsummiert. Die Sauerstoff-Konzentration änderte sich vor allem bei hohen Sauerstoff-Konzentrationen drastisch. Für die Bestimmung der Sauerstoff-Konzentration wurde abhängig von der verwendeten Fettsäure ein Fehler von mindestens 2,5% angenommen.

5.4.1 Sauerstoff-Verbrauch

Der bereits bei den Proteinen und den Fettsäuren mit TMPyP beobachtete Sauerstoffverbrauch wurde nun noch einmal mit einem UV-absorbierenden Farbstoff untersucht. Dadurch wurde es möglich die Beeinflussung der Raten und Ratenkonstanten durch den Sauerstoffverbrauch besser zu quantifizieren und einen eventu-

ellen Einfluss der Fettsäuren bei Bestrahlung im UVA-Bereich zu erkennen. Neben den verschiedenen Fettsäuren wurde PN als exogener Photosensibilisator in die Lösung eingebracht und auch dessen Einfluss untersucht. Alle Komponenten wurden in Ethanol gelöst.

Linolsäure (18:2) und Arachidonsäure (20:4) wurden jeweils in Konzentrationen von 50 mmol/L verwendet; die gesättigte Stearinsäure mit einer Konzentration von 20 mmol/L, da hier kein Sauerstoffverbrauch erwartet wurde (vgl. Abschnitt 5.3).

Ohne Bestrahlung wurde wieder von einer maximalen Sauerstoff-Konzentration von 1850 $\mu\text{mol/L}$ in Ethanol ausgegangen. Die Küvette wurde wieder durch einen Teflonstopfen luftdicht verschlossen und mit einem Magnetrührer durchmischt.

Die Verbrauchsmessungen an den verschiedenen Fettsäuren wurden bei einer Laserleistung von 100 mW und einer PN-Konzentration von 200 $\mu\text{mol/L}$ durchgeführt.

Der gemessene Sauerstoffgehalt mit den entsprechend angepassten Fitkurven ist in Abbildung 5.12 gegen die Zeit aufgetragen.

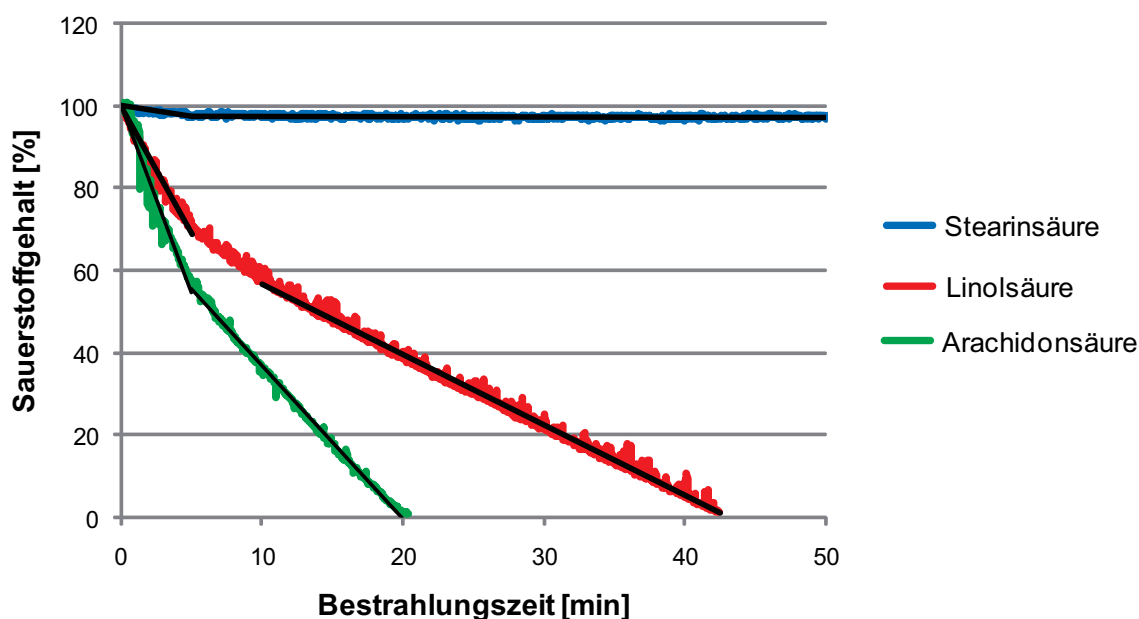


Abbildung 5.12: Abnahme der Sauerstoff-Konzentration bei verschiedenen Fettsäuren gegen die Zeit mit einer PN-Konzentration von 200 $\mu\text{mol/L}$ mit den entsprechenden Fitgeraden.

Aus der Abbildung ist zu entnehmen, dass wieder nur die ungesättigten Fettsäuren einen Sauerstoffverbrauch verursachen. Betrachtet man die Anzahl der Doppelbin-

dungen der verschiedenen Fettsäuren (Linolsäure 2, Arachidonsäure 4), so kann im Rahmen der Fehlertoleranzen von einer direkten Proportionalität zwischen der Anzahl der Doppelbindungen einer Fettsäure und dem Zeitverhalten des Sauerstoffverbrauchs ausgegangen werden.

Bei einer genaueren Betrachtung des Sauerstoffverbrauchs, stellt man zu Beginn der Bestrahlungen einen stärkeren Verbrauch fest. Aus den vorherigen Ergebnissen zur Stabilität des PNs lässt sich dieser Verlauf erklären. So ist das unbestrahlte PN noch in der Lage viel Singulett-Sauerstoff zu erzeugen, wohingegen mit der Dauer der Bestrahlung die PN-Konzentration und somit auch die Singulett-Sauerstoff-Ausbeute zurück geht und somit auch weniger Sauerstoff verbraucht wird. Dies bedeutet, dass es unterschiedliche Geschwindigkeitskoeffizienten k_i ($i=I,II$) gibt. k_I ist die Verbrauchskonstante zu Beginn der Bestrahlung, k_{II} beschreibt die Verbrauchskonstante des anschließenden Sauerstoffverbrauchs, wobei $k_I > k_{II}$ gilt.

Aus den eingezeichneten Geraden, die an die Messkurven angepasst sind, ergeben sich für die verschiedenen Lösungen die in Tabelle 5.6 dargestellten Werte. Es wird wieder von einem Fehler von 10 % ausgegangen.

Fettsäure	Verbrauchskonstante I	Verbrauchskonstante II
Stearinsäure (0)	$0,2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Linolsäure (2)	$1,9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Arachidonsäure (4)	$2,8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$1,1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Tabelle 5.6: Übersicht über die O_2 -Verbrauchskonstante I und II verschiedener Fettsäuren.

In den Klammern steht die Anzahl der Doppelbindungen der jeweiligen Fettsäure.

Da die Sauerstoffverbrauchskonstanten selbst zu Beginn der Messung geringer sind, als beim Einsatz von TMPyP als Photosensibilisator (Linolsäure: $2,3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, Linolensäure: $3,5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), wurde die Anzahl der Laserpulse nur dem Ausbleichverhalten von PN angepasst, so dass im folgenden Abschnitt 10.000 Laserpulse bei 100 mW verwendet wurden.

5.4.2 Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten bei Fettsäure-PN-Gemischen

Zur Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten wurde wie in den vorherigen Kapiteln eine Variation der Sauerstoff-, Farbstoff- und Fettsäure-Konzentration vorgenommen. Bei der Variation der O_2 -Konzentration wurde für alle drei Fettsäuren eine PN-Konzentration von $25 \mu\text{mol/L}$ und eine Fettsäuren-Konzentration von 20 mmol/L gewählt. Auf Grund der verringerten Konzentrationen des Farbstoffs und der Fettsäuren wurde der beobachtete Sauerstoffverbrauch verringert. Dadurch wurde es möglich auf einen Magnetprüher während der Bestrahlung der Lösungen zu verzichten. Dennoch wurde bei den Messungen mit Arachidonsäure einmal ein Magnetprüher eingesetzt und die erhaltenen Werte mit denen ohne Magnetprüher verglichen.

In der Abbildung 5.13 sind die erhaltenen Anstiegs- und Abklingraten gegen die Sauerstoff-Konzentration für die verschiedenen Fettsäuren aufgetragen.

Betrachtet man zunächst in Abbildung 5.13 A-C den Bereich bei hohen O_2 -Konzentrationen, so kann man deutlich erkennen, dass sich Abweichungen für die Anstiegsraten β_1 (rote Kreise) von der Fitgeraden ergeben.

Ein Grund für die starken Abweichungen der Raten β_1 ist der Sauerstoffverbrauch der ungesättigten Fettsäuren, der insbesondere bei hohen O_2 -Konzentrationen ins Gewicht fällt. Da sich durch den O_2 -Verbrauch sowohl die Rate K_{T_1} (Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration) als auch die Signalhöhe verringern, lassen sich die Anstiegszeiten der Lumineszenzsignale, die in diesem Fall dem reziproken Wert von K_{T_1} entsprechen, nicht mehr exakt ermitteln und wurden eher als zu kurz bestimmt (\Rightarrow zu großes β_1). Da die Rate $K_{\Delta, oR}$ unabhängig von der O_2 -Konzentration ist, werden die ermittelten Raten β_2 nicht durch das chemische Quenchen (Sauerstoffverbrauch) beeinflusst.

Wie in Abbildung 5.13 C zu erkennen ist, kann durch den Einsatz eines Magnetprühers der Einfluss des Sauerstoffverbrauchs deutlich reduziert werden und die Fitgeraden können besser an die gemessenen Raten angepasst werden. Dies zeigt,

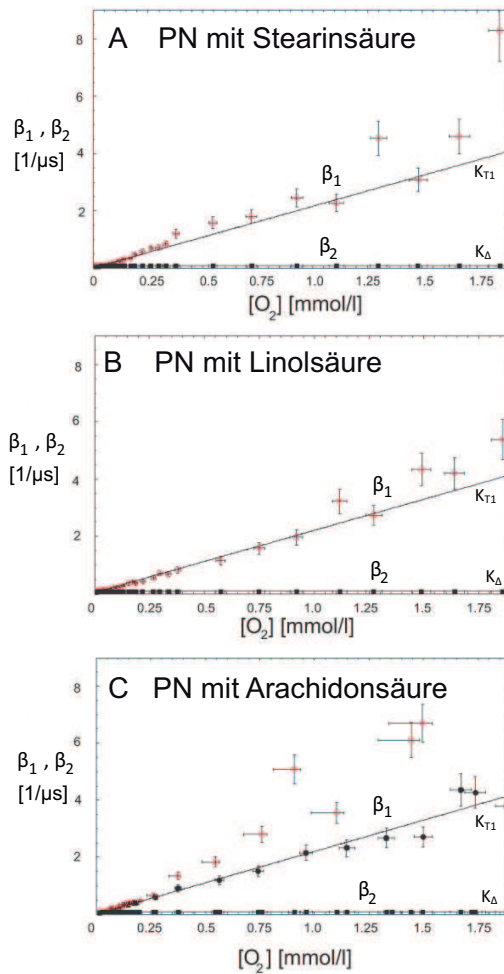


Abbildung 5.13: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Sauerstoff-Konzentration bei Fettsäure-PN-Lösungen (Farbstoff-Konzentration: $25 \mu\text{mol/L}$, Fettsäure-Konzentration: 20 mmol/L); Abbildung A: Stearinsäure, Abbildung B: Linolsäure, Abbildung C: Arachidonsäure; die gemessenen Anstiegsraten β_1 ohne dem Einsatz eines Magnetrührers sind als rote Kreise dargestellt, zusätzlich sind in Abbildung 5.13 C einige der Raten β_1 als schwarze Kreise gezeigt, bei denen die Lösung mit einem Magnetrührer durchmischt wurde. Die Abklingraten β_2 sind als schwarze Rechtecke wiedergegeben, hier sind die Unterschiede vernachlässigbar.

dass durch ein ständiges Durchmischen die Beschränkungen durch die diffusionsbeschränkten Prozesse (Deaktivierung des Triplett-Farbstoff-Zustands durch Sauerstoff) vermindert werden können.

Um die Abhängigkeit der Raten und Ratenkonstanten vom Farbstoff PN zu bestimmen, wurden verschiedenen PN-Fettsäure-EtOH-Lösungen mit PN-Konzentrationen

von 1 $\mu\text{mol/L}$ bis 500 $\mu\text{mol/L}$ vermessen. Die Fettsäuren-Konzentration beträgt in allen drei Fällen 20 mmol/L. Als Sauerstoff-Konzentration wählt man bei der Stearinsäure 10% Luftsättigung ($[\text{O}_2] = 185 \mu\text{mol/L}$) und für die beiden ungesättigten Fettsäuren jeweils 20% Luftsättigung ($[\text{O}_2] = 370 \mu\text{mol/L}$). Die gemessenen Werte der Raten β_1 und β_2 sind für die PN-Lösungen mit Linol- und Arachidonsäure in Abb. 5.14 in Abhängigkeit von der PN-Konzentration gezeigt. Die Anstiegsrate β_1 entspricht hier der Rate K_{T_1} und die Abklingrate β_2 der Rate $K_{\Delta, oR}$.

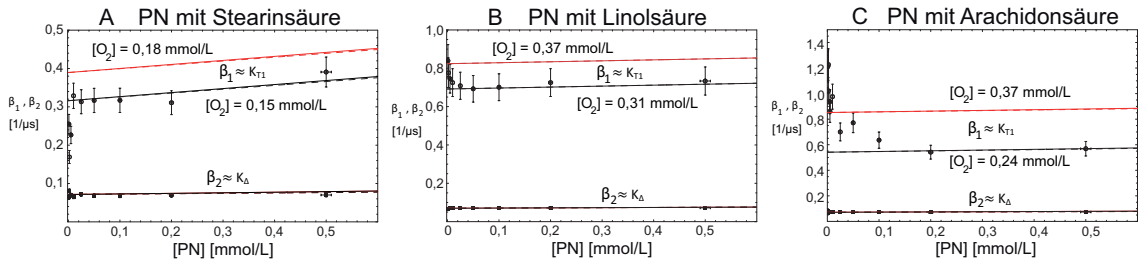


Abbildung 5.14: Verlauf der Raten β_1 und β_2 in Abhängigkeit von der PN-Konzentration bei Fettsäure-Konzentrationen von 20 mmol/L bei Stearinsäure (A), Linsäure (B) und Arachidonsäure (C). Zum Vergleich wurde die theoretisch erwartete Kurve von K_{T_1} rot und die experimentell ermittelte Kurve von K_{T_1} schwarz eingezeichnet. Die entsprechenden Sauerstoff-Konzentrationen sind in der Abbildung eingetragen.

Aus der Abb. 5.14 ist zu entnehmen, dass die ermittelten Werte für β_1 nicht mit den theoretisch erwarteten Geraden (rote Linie) übereinstimmen. Stattdessen erhält man mit zunehmender Farbstoff-Konzentration längere Anstiegszeiten, also ein kleineres β_1 . Die gemessenen Werte lassen sich wieder mit dem Verbrauch des Sauerstoffs in der Lösung erklären. Dazu wurden die Fitgeraden für eine niedrigere Sauerstoff-Konzentration zusätzlich in die Abbildungen eingefügt (schwarze Linien). Wie sich zeigt, hängt die Abweichung der Messpunkte von der schwarzen Fitgeraden von der Farbstoff-Konzentration ab. Erklärt wird das durch die gesteigerte Generierung von Singulett-Sauerstoff bei höheren Farbstoff-Konzentrationen und dem damit verbundenen höheren Sauerstoffverbrauch.

Da der T_1 -Zustand des Farbstoffs durch O_2 gequencht wird, hängt die Rate K_{T_1} von der lokalen Sauerstoff-Konzentration am Ort des angeregten Farbstoffs ab, daher

kann die Rate K_{T_1} als $[O_2]$ -Sensor betrachtet werden, da sich die $[O_2]$ -Abnahme auf die Raten β_1 (rechts vom Schnittpunkt: $\beta_1 \approx K_{T_1}$) auswirkt.

Vergleicht man die theoretisch erwartete Gerade von β_1 (schwarze Linie) mit den experimentell erhaltenen, so kann man in der PN-Linolsäure-EtOH-Lösung mit einer Abnahme der O_2 -Konzentration von etwa 60 $\mu\text{mol/L}$ am Ort der Bestrahlung rechnen. Für die PN-Arachidonsäure-EtOH-Lösung ergibt sich ein Wert von etwa 135 $\mu\text{mol/L}$. Der Wert entspricht in etwa dem doppelten Wert der PN-Linolsäure-EtOH-Lösung, so dass man davon ausgehen kann, dass es eine direkte Proportionalität zwischen Anzahl der Doppelbindungen einer ungesättigten Fettsäure und dem Sauerstoffverbrauch gibt.

Bei der dritten Messreihe wurden die Konzentrationen der Stearin- und der Linolsäure in einem Bereich zwischen 1 mmol/L und 100 mmol/L variiert um die Abhängigkeit der Raten und Ratenkonstanten von der Fettsäuren-Konzentration zu messen. Dabei ist die Farbstoff-Konzentration konstant bei 25 $\mu\text{mol/L}$ und die O_2 -Konzentration in der PN-Stearinsäure-EtOH-Lösung bei 185 $\mu\text{mol/L}$ bzw. bei 370 $\mu\text{mol/L}$ in der PN-Linolsäure-EtOH-Lösung. Abbildung 5.15 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten β_1 und β_2 aus der Variation der Linolsäure-Konzentration.

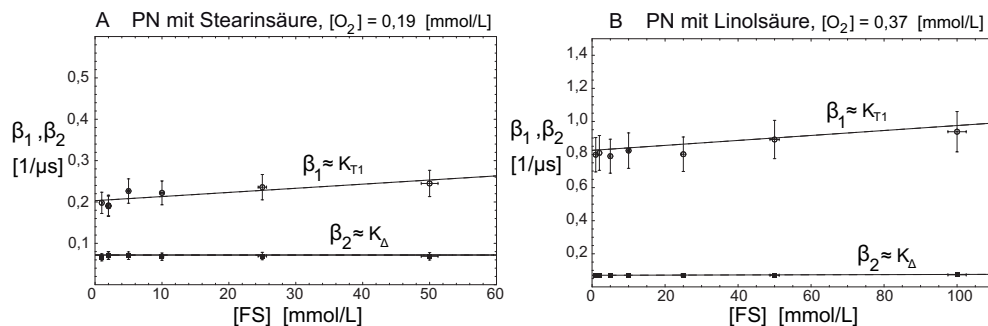


Abbildung 5.15: Verlauf der Raten β_1 und β_2 in Abhängigkeit von der Stearin- und Linolsäure-Konzentration bei $[O_2] = 190$ bzw. 370 $\mu\text{mol/L}$ und einer PN-Konzentration von 25 $\mu\text{mol/L}$.

Zu Beginn jeder Einzelmessung beträgt $[O_2]$ in der Lösung 370 $\mu\text{mol/L}$. Die Rate β_1 entspricht hier der Rate K_{T_1} und β_2 der Rate $K_{\Delta,OR}$.

Im Rahmen der Messgenauigkeit lassen sich nur geringe quenchenden Effekte der Fettsäuren, sowohl der gesättigten als auch der ungesättigten, auf den Singulett-

Sauerstoff nachweisen, da sich in beiden Fällen die Werte für β_2 nur geringfügig mit der Fettsäuren-Konzentration ändern.

Bei β_1 ist in beiden Fällen ein leichter Anstieg mit zunehmender Fettsäuren-Konzentration erkennbar. Dies zeigt, dass die Farbstoff-Triplett-Abklingdauer durch Fettsäuremoleküle verkürzt wird.

Mit den aus allen drei Variationen erhaltenen Raten und den angepassten Fitkurven lassen sich die in Tabelle 5.7 gezeigten Raten und Ratenkonstanten für die verschiedenen Fettsäure-PN-Ethanol-Gemische bestimmen.

Rate, Ratenkonstante	PN mit Stearinsäure	PN mit Linolsäure	PN mit Arachidonsäure	Einheit Einheit
k_{Δ}	$0,07 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$	μs^{-1}
k_{T_1}	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$	μs^{-1}
$k_{T_1O}^{\Sigma} = k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}$	$2,1 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$	$\mu s^{-1} \cdot mmol^{-1} \cdot L$
$k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$	$<0,05$	$<0,05$	$<0,05$	$\mu s^{-1} \cdot mmol^{-1} \cdot L$
$k_{T_1 S_0}$	$0,1 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$\mu s^{-1} \cdot mmol^{-1} \cdot L$
$k_{\Delta Q}$	0,0	$<0,00005$	n.b.	$\mu s^{-1} \cdot mmol^{-1} \cdot L$
$k_{T_1 Q}$	$<0,001$	$<0,0015$	n.b.	$\mu s^{-1} \cdot mmol^{-1} \cdot L$
$k_{T_1\Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$	$\mu s^{-2} \cdot mmol^{-2} \cdot L^2$

Tabelle 5.7: Raten und Ratenkonstanten bei verschiedenen Fettsäuren in PN-Ethanol-Gemischen

Mit den erhaltenen Werten lässt sich bei allen drei Fettsäure-PN-Gemischen die Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer zu $(14 \pm 2) \mu s$ bestimmen. Die Triplett-Lebensdauer von PN liegt über $100 \mu s$ und bestätigt damit den Wert aus Kapitel 4.4.2. Die Abweichungen der anderen Ratenkonstanten von den Werte bei PN-EtOH-Lösungen ohne zusätzlichen Fettsäuren kann durch die quenchenden Einflüsse der verschiedenen Fettsäuren erklärt werden.

5.5 Fettsäuren unter UVA-Bestrahlung

Im Rahmen der vorherigen Messungen mit Perinaphthenon und Fettsäuren wurde überraschenderweise bei Kontrollmessungen an reinen Fettsäuren ohne PN eine Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs und eine Abnahme der Sauerstoff-Konzentration in der Lösung beobachtet. Um diese Beobachtung erklären zu können, wurden verschiedene Fettsäuren unter UVA-Bestrahlung ohne Zusatz eines Photosensibilisators untersucht. Dazu wurden als erstes die Lumineszenzsignale detektiert, dann der Sauerstoff-Verbrauch untersucht. Um den Einfluss der UVA-Strahlung auf die Absorption und auf die Lumineszenz, die spektral und zeitlich aufgelöst wurde, genauer untersuchen zu können, wurde eine breitbandige UVA-Quelle mit einer wesentlich höheren Leistung als der Laser bei 355 nm eingesetzt, so dass die beobachteten Effekte schneller eintraten. Um die Vorgänge in den Lösungen besser verstehen zu können, wurden abschließend noch exemplarisch HPLC-Analysen einer Arachidonsäure-Ethanol-Lösung durchgeführt.

5.5.1 zeitlich und spektral aufgelöste Lumineszenz

Wie bereits in Abschnitt 5.1.2.6 gezeigt, absorbieren die Fettsäuren ultraviolette Strahlung. Dabei sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Lage, im UVA-Bereich (320 - 380 nm) zu absorbieren. Da alle fünf ausgewählten Fettsäuren zumindest einen Bruchteil der Strahlung bei 355 nm absorbieren können, wurde untersucht, ob die Fettsäuren in der Lage sind, die aufgenommene Energie zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff ohne zusätzliche Photosensibilisatoren zu nutzen. Es wurden daher die Lumineszenzsignale der fünf Fettsäuren bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm untersucht. Wie in Abbildung 5.16 A-E zu sehen, kann für alle fünf Fettsäuren ein Lumineszenzsignal bei 1270 nm mit einer Abklingdauer τ_D zwischen 13 und 14 μs nachgewiesen werden. Für Stearinsäure und Ölsäure konnten nur schwache Lumineszenzsignale gemessen werden, da bei 1270 nm nur 7.700, bzw. 11.000 Lumineszenzphotonen durch den Photomultiplier detektiert werden. Die Bestrahlung der frischen Linolsäure (29.000 Lumineszenzphotonen), Linolensäure (126.000

Lumineszenzphotonen) und Arachidonsäure (46.000 Lumineszenzphotonen) führt zu einem einfach exponentiell abfallendem Lumineszenzsignal bei 1270 nm.

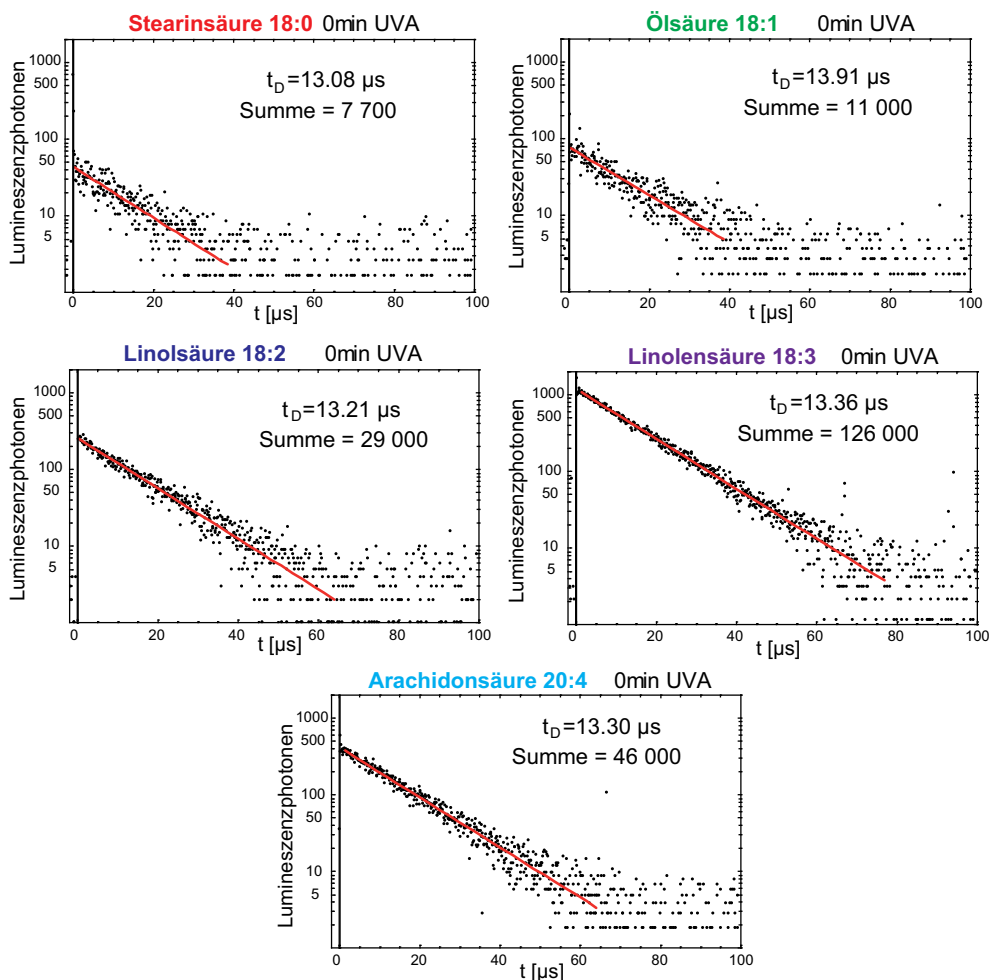


Abbildung 5.16: Lumineszenzsignale der Fettsäuren (50 mmol/L) detektiert bei 1270 nm bei einer Bestrahlung mit 355 nm vor einer Bestrahlung mit der breitbandigen UV-Lampe; alle Abklingzeiten liegen zwischen 13 und 14 μs

Um eindeutig nachzuweisen, dass die Lumineszenz vom Singulett-Sauerstoff stammt, wurde bei allen Fettsäuren ein Wellenlängenscan mit den Filtern zwischen 1150 und 1400 nm durchgeführt. Die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in Ethanol ist zentriert um 1274 nm, was einer Energie von 0,975 eV entspricht. Wie in den Abbildungen 5.17 A-E gezeigt, ist für alle fünf ein eindeutiges Maximum zwischen 1270 und 1280 nm zu erkennen. Diese Maxima und die Abklingdauer von 13-14 μs sind ein eindeutiger Beweis für die Bildung von Singulett-Sauerstoff durch die Bestrahlung von Fettsäuren mit UVA-Strahlung. Da kein Photosensibilisator einge-

gesetzt wurde ist zunächst unklar wie der Singulett-Sauerstoff generiert wird, da nicht davon ausgegangen wird, dass die Fettsäuren in der Lage sind über einen Triplett-Zustand Energie auf den Sauerstoff zu übertragen. Dass das Lumineszenzsignal noch während des Laserpulses auf sein Maximum ansteigt und daher keine Anstiegszeit für das Lumineszenzsignal ermittelt werden kann, spricht ebenfalls gegen die Ausbildung eines langlebigen Triplett-Zustands.

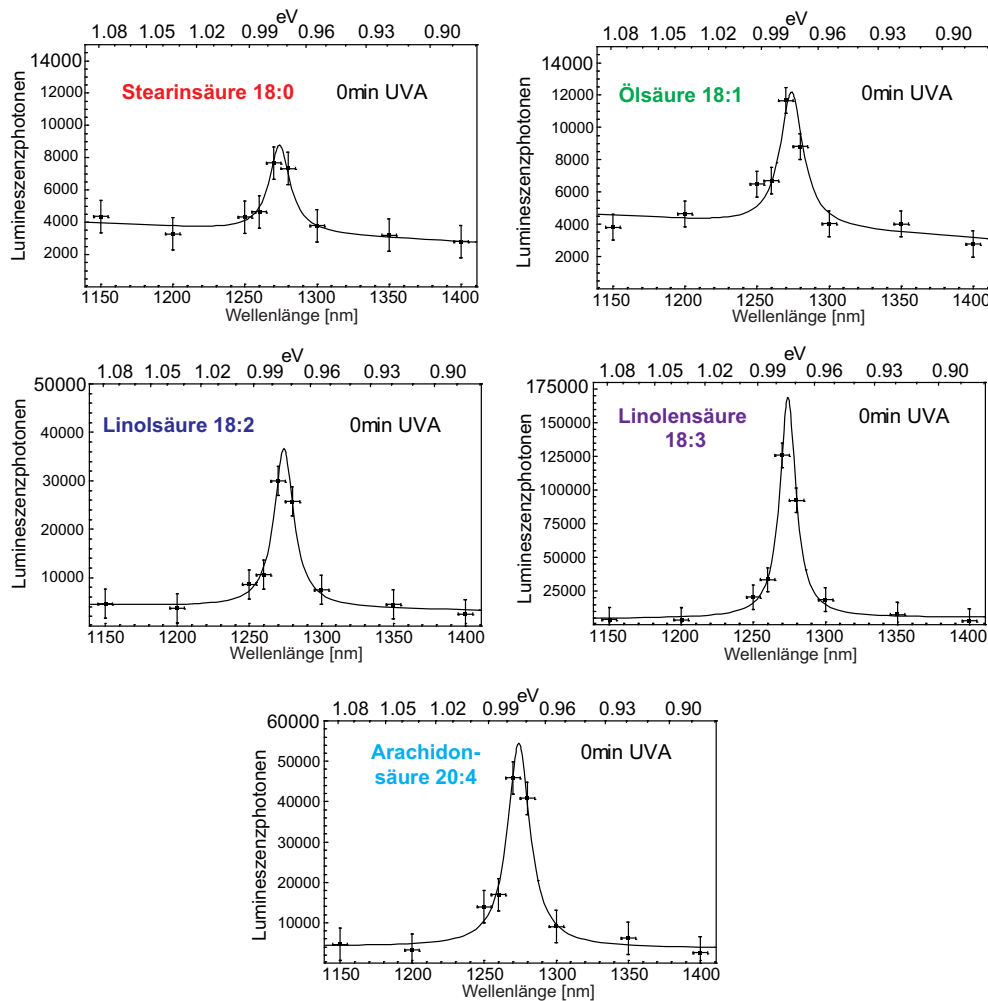


Abbildung 5.17: Wellenlängenscans aller Fettsäuren (50 mmol/L) bei einer Bestrahlung mit 355 nm vor einer Bestrahlung mit der breitbandigen UV-Lampe; es zeigen sich eindeutige Maxima zwischen 1270 und 1280 nm

5.5.2 Sauerstoffverbrauch

Als nächstes wurde der bereits bei den Lumineszenzmessungen beobachtete Sauerstoff-Verbrauch bei UVA-Strahlung untersucht. Es wurde dazu eine breitbandige UVA-Quelle (Beschreibung siehe Kap. 3.1) mit einer maximalen Strahlungsleistung bei 365 nm zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs verwendet. Die fünf Fettsäuren wurden mit einer Konzentration von 50 mmol/L in Ethanol gelöst und $(3,2 \pm 0,1)$ ml der Lösung in eine Küvette gefüllt, die mit einem Teflonstopfen verschlossen wurde. Die Lösung wurde magnetisch gerührt und mit ca. 1,5 W breitbandiger UVA-Strahlung bestrahlt.

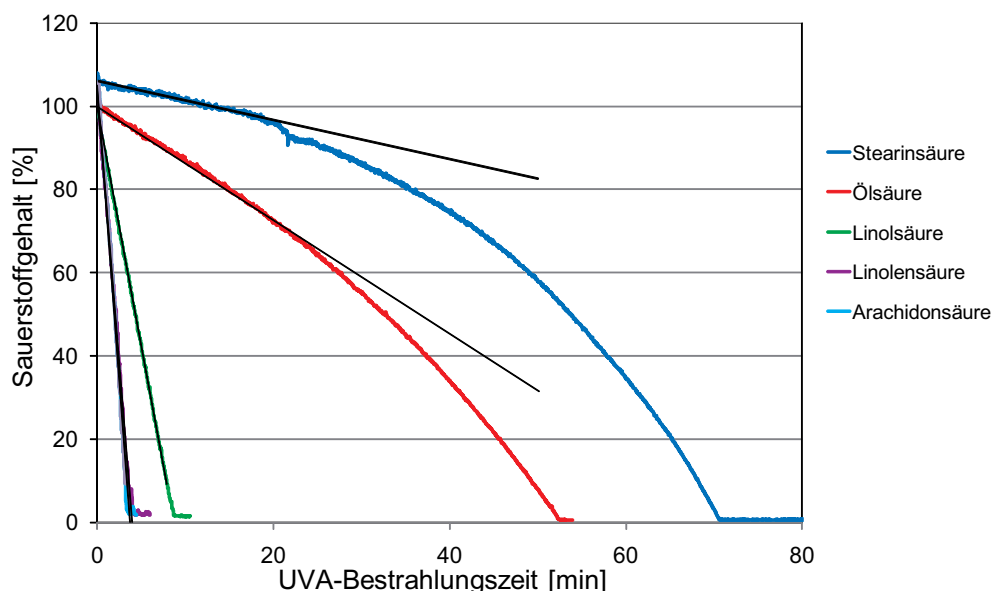


Abbildung 5.18: *Der Sauerstoffgehalt aller Fettsäuren gegen die Bestrahlungszeit mit der breitbandigen UVA-Lampe; dazu die Fitgeraden für einen angenommenen konstanten Sauerstoffverbrauch*

Abbildung 5.18 zeigt die mit dem Sauerstoff-Sensor aufgenommenen Sauerstoff-Konzentrationen gegen die Bestrahlungszeit. Bei einer angenommenen Startkonzentration von $1850 \mu\text{mol/L}$ Sauerstoff (100% luftgesättigt) in den Lösungen ergeben sich Sauerstoff-Verbrauchsraten von $0,15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bis zu $8,7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Erstaunlich ist der Sauerstoff-Verbrauch bei Stearinsäure, der vermutlich auf Verunreinigungen der Ausgangssubstanz zurückzuführen ist.

Es zeigte sich, dass für Linol-, Linolen- und Arachidonsäure der Sauerstoffverbrauch

nahezu konstant erfolgt; für Öl- und Stearinsäure beschleunigte sich der Verbrauch sichtlich nach einer ca. 20 minütigen Bestrahlung. Die kann nicht mit einer Reaktion nullter Ordnung und einem konstanten Absorptionskoeffizienten erklärt werden; auch Reaktionen höherer Ordnung erklären dieses Verhalten nicht.

5.5.3 Abhängigkeit der Absorption von der UVA-Bestrahlungszeit

Da der Sauerstoffverbrauch konstant ist, oder während der Bestrahlung sogar anstieg (siehe oben), wurde die Transmission der verschiedenen Fettsäuren in Abhängigkeit von der Zeit der breitbandigen Bestrahlung untersucht. Wie bereits bei den Transmissionsmessungen der frischen Fettsäuren wurde eine Konzentration von 50 mmol/L verwendet. Während der Bestrahlung wurde durch die Lösungen ständig Sauerstoff geleitet, um den bereits beobachteten O_2 -Verbrauch zu kompensieren.

In den Abbildungen 5.19 A-D sind die Transmissionskurven der verschiedenen ungesättigten Fettsäuren zu verschiedenen Bestrahlungszeiten gezeigt; die Transmissionskurven von Stearinsäure ist nicht gezeigt, da deren Transmission sich nicht mit der Bestrahlungszeit ändert. Ebenso ist die Anregungswellenlänge des Lasers bei 355 nm und der Bereich der breitbandigen UVA-Lampe eingezeichnet.

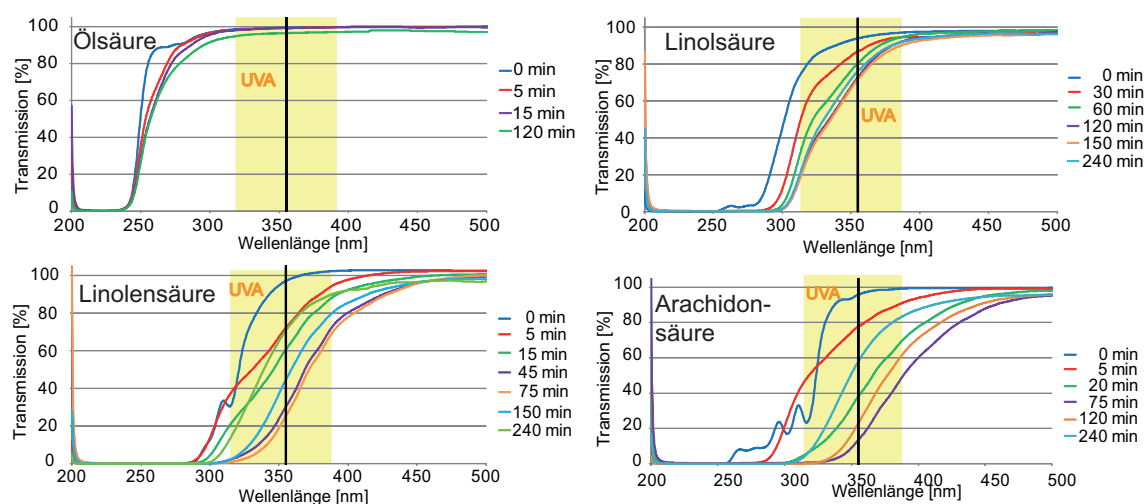


Abbildung 5.19: *Transmissionspektren der ungesättigten Fettsäuren nach verschiedenen Bestrahlungszeiten mit der breitbandigen UVA-Lampe*

In den vier Teilbildern ist zu erkennen, dass bei allen ungesättigten Fettsäuren die Transmission im UVA-Bereich durch die Bestrahlung abnimmt. Bei Ölsäure wird nach 120 Minuten ein Minimum der Transmission erreicht, wohingegen bei Linol-, Linolen- und Arachidonsäure nach einem Minimum die Transmissionskurven mit weiterer Bestrahlung wieder ansteigen. Um diesen Effekt besser erkennen zu können, wird die Transmission bei 355 nm, der Anregungswellenlänge des Lasers, gesondert betrachtet.

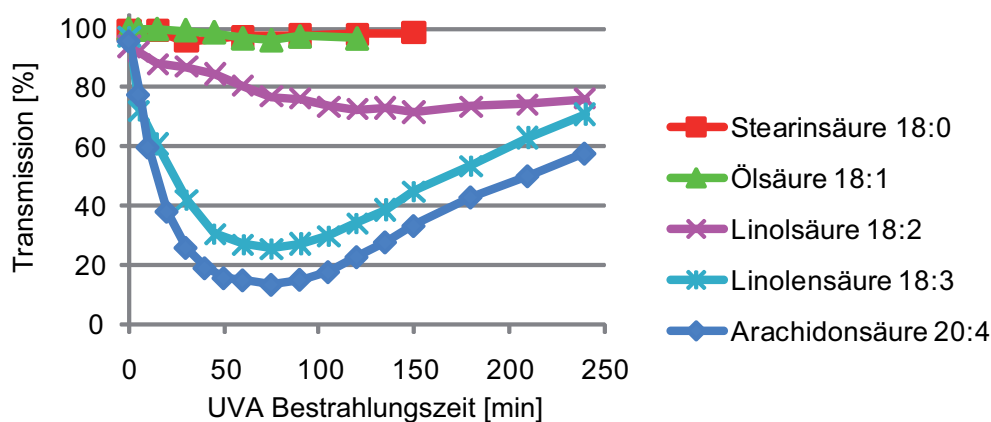


Abbildung 5.20: *Transmission aller untersuchten Fettsäuren bei 355 nm nach verschiedenen Bestrahlungszeiten mit der breitbandigen UVA-Lampe*

Abbildung 5.20 zeigt die Transmission der fünf Fettsäuren bei 355 nm aufgetragen gegen die UVA-Bestrahlungszeit. Es zeigt sich deutlich, dass die Transmission für Stearin- und Ölsäure über 95 % bleibt. Für die anderen drei ist eine Abnahme der Transmission zu erkennen. Bei Arachidonsäure beträgt die minimale Transmission 13% der eingestrahltten Energie bei 355 nm (Linolensäure min. 25%, Linolsäure min. 72%). Nach dem Minimum steigt bei allen drei Fettsäuren die Transmission wieder an.

Aus den vorliegenden Messungen kann gefolgert werden, dass die gesättigte Stearinsäure nicht nachweislich durch UVA-Bestrahlung verändert wird. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da sie erst unterhalb einer Wellenlänge von 250 nm zu absorbieren beginnt. Bei den ungesättigten Fettsäuren zeigt die Ölsäure so gut wie keine Veränderungen im UVA-Bereich; dies kann wieder mit der geringen Absorption zwi-

schen 320 und 380 nm der Fettsäure mit nur einer Doppelbindung erklärt werden. Die restlichen drei Fettsäuren zeigen bis auf den Zeitpunkt der minimalen Transmission ein ähnliches Verhalten. So sinkt die Transmission bis zu einem minimalen Wert, nach welchem sie wieder zu steigen beginnt. Die Abnahme der Transmission kann mit einer Zunahme von absorbierenden Substanzen erklärt werden, die durch die Oxidation der ungesättigten Fettsäuren entstehen. Die Erzeugung von oxidierten Produkten wird auch durch den Sauerstoffverbrauch bestätigt. Bei den Sauerstoffverbrauchsmessungen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist zu erkennen, dass pro Minute zwischen 200 $\mu\text{mol/L}$ und 520 $\mu\text{mol/L}$ Sauerstoff verbraucht wird. Da aber bei den Transmissionsmessungen der Sauerstoffgehalt konstant bei Luftsättigung gehalten wurde, kann davon ausgegangen werden, dass nach 70 Minuten, dem Zeitpunkt der minimalen Transmission, ein Großteil der Fettsäuren (50 mmol/L) oxidiert ist. Nach dem Minimum der Transmission führt eine weitere UVA-Bestrahlung zu einer Zunahme der Transmission, so dass von einer Zersetzung der primären Oxidationsprodukte ausgegangen werden kann.

5.5.4 Abhängigkeit der Lumineszenz von der UVA-Bestrahlungszeit

Da bereits nachgewiesen wurde, dass die Fettsäuren UVA-Strahlung absorbieren können, dadurch auch Singulett-Sauerstoff generieren und die Absorption mit der Bestrahlungszeit bis zu einem Maximalwert zunimmt, wurden die Lumineszenzsignale bei 1270 nm nach verschiedenen UVA-Bestrahlungszeiten aufgenommen, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen Absorption und Singulett-Sauerstoff-Ausbeute zu erhalten. In Abbildung 5.21 ist als Beispiel das Lumineszenzsignal von 50 mmol/L Arachidonsäure vor und nach 50 Minuten breitbandiger UVA-Bestrahlung gezeigt. Die Abklingdauer nimmt etwas ab, liegt aber immer noch im Bereich von (14 ± 2) μs , für die Anstiegszeit ist wiederum kein Wert bestimmbar. Die Anzahl der detektierten Photonen ist nach 50 Minuten um mehr als einen Faktor 10 höher als zu Beginn der Bestrahlung. Parallel dazu hat die Absorption um etwa einen Faktor 20 zugenommen.

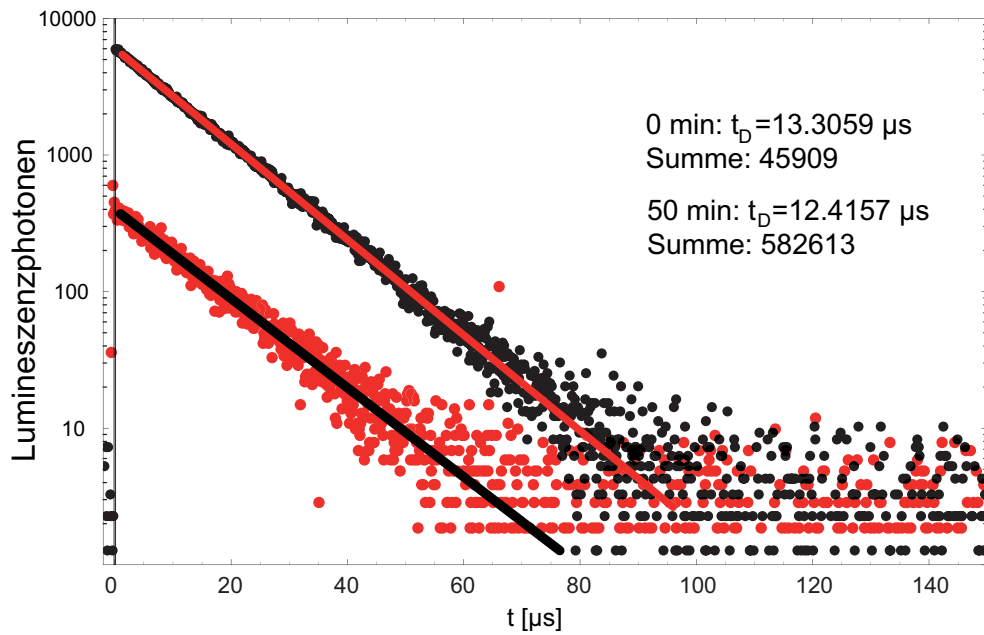


Abbildung 5.21: *Lumineszenz von Arachidonsäure vor Bestrahlung und nach 50 Minuten Bestrahlung mit der breitbandigen UVA-Lampe*

Die weiteren Lumineszenzsignale, sowie die der anderen Fettsäuren, sind hier nicht gezeigt. Um aber alle aufgenommenen Signale vergleichen zu können, sind in Abbildung 5.22 die Integrale der Lumineszenzsignale bei 1270 nm gegen die UVA-Bestrahlungszeit aufgetragen. Dabei sind die Integrale aller fünf Fettsäuren in Abbildung A und noch einmal gesondert für Stearin- und Ölsäure in Abbildung B gezeigt. Zu beachten ist, dass die Skalierung in Abbildung B um einen Faktor 40 kleiner ist als in Abbildung A.

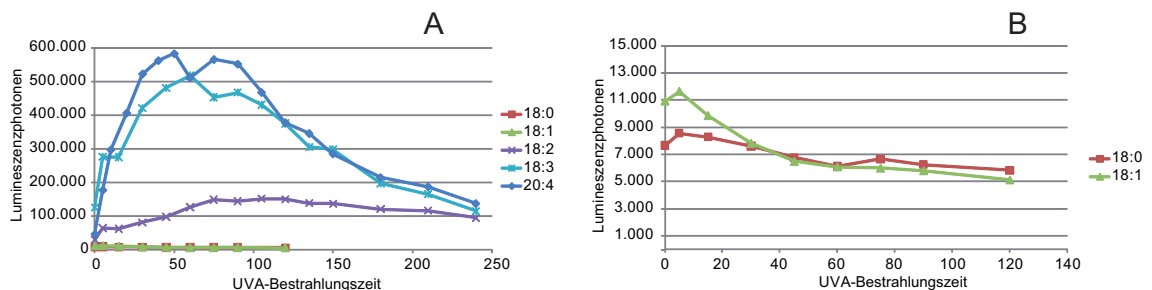


Abbildung 5.22: *Anzahl der Lumineszenzphotonen detektiert bei 1270 nm gegen die Bestrahlungszeit mit der breitbandigen UVA-Lampe für alle fünf Fettsäuren (A) und vergrößert für Stearin- und Ölsäure (B)*

Für Linol-, Linolen- und Arachidonsäure ist ein Anstieg der Lumineszenz zu erkennen. Nach längeren Bestrahlungszeiten nimmt die Anzahl der Lumineszenzphotonen jedoch wieder ab. Für Stearin- und Ölsäure ist das Lumineszenzsignal für kurze Bestrahlungszeiten am höchsten und nimmt nach 5 Minuten kontinuierlich ab. Der zeitliche Verlauf der Absorption bei 355 nm (Abschnitt 5.5.3) und der Lumineszenz bei 1270 nm korrelieren, jedoch steigt die Absorption wesentlich stärker an..

Um zu zeigen, dass die beobachtete Lumineszenz während der gesamten Bestrahlungszeit eindeutig vom Singulett-Sauerstoff stammt, wurden zu verschiedenen Zeiten Wellenlängenscans aufgenommen. So kann ein zeit- und wellenlängenaufgelöstes dreidimensionales Bild der Lumineszenz generiert werden. Abbildungen 5.23 A-E zeigen die dreidimensionalen Darstellungen für die verschiedenen Fettsäuren.

Für Stearinsäure kann zu Beginn der Bestrahlung ein sehr schwaches Signal aufgenommen werden, dieses verschwindet nach 120 Minuten im Hintergrundrauschen. Für Ölsäure kann ein eindeutiges Maximum bei 0 und 5 Minuten detektiert werden, nach diesem nimmt die Lumineszenz bei allen Wellenlängen ab, so dass nach 120 Minuten nur noch das Hintergrundrauschen detektiert werden kann. Für die drei mehrfach ungesättigten Fettsäuren kann nach einem schnellen Anstieg der Lumineszenz ein eindeutiges Lumineszenz-Maximum bei 1270 nm nachgewiesen werden. Nach diesem nimmt die Lumineszenz bei allen Wellenlängen ab. Das Hintergrundrauschen bei 1150 nm und 1400 nm ist nahezu konstant über die ganze Messdauer. Ein Unterschied zeigt sich lediglich an der Höhe der Lumineszenz und der zeitlichen Lage des Maximums. So kann für Arachidonsäure nach 50 Minuten Bestrahlungszeit eine maximale Anzahl von 583.000 Lumineszenzphotonen nachgewiesen werden, für Linolensäure nach 60 Minuten 517.000 Photonen und für Linolsäure nach 105 Minuten 152.000 Photonen.

In Tabelle 5.8 sind die Anzahl der Lumineszenzphotonen bei 1270 nm der verschiedenen Fettsäuren zu Beginn, beim Maximum und am Ende der jeweiligen Bestrahlung gezeigt.

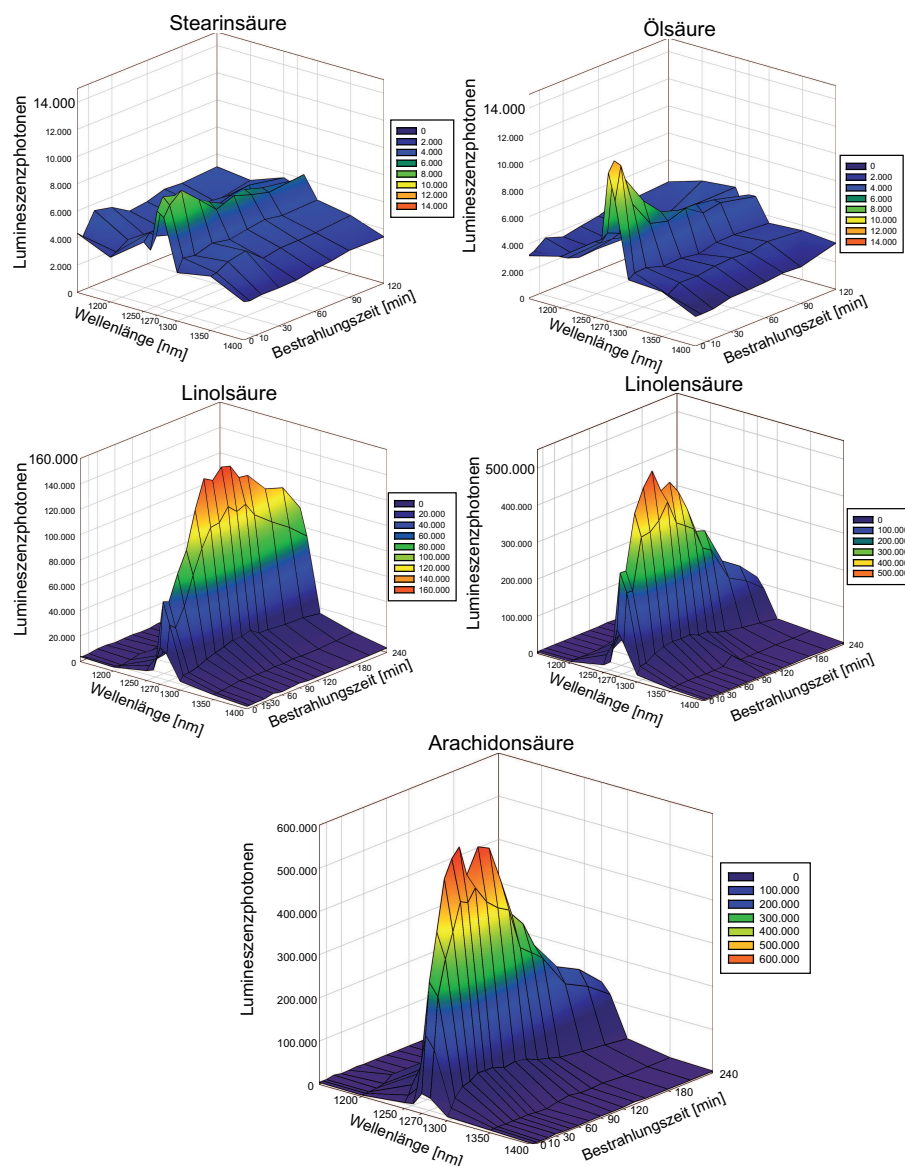


Abbildung 5.23: drei-dimensionale Darstellung der Anzahl der detektierten Lumineszenzphotonen gegen die Wellenlänge des Interferenzfilters und die Bestrahlungszeit mit der breitbandigen UVA-Lampe

	Lumineszenzphotonen zu Beginn der Bestrahlung	Maximalzahl der Lumineszenzphotonen (Zeit)	Lumineszenzphotonen am Ende der Bestrahlung (Zeit)
Stearinsäure	7700	8600 (5 min)	5800 (120 min)
Ölsäure	11000	11600 (5 min)	5100 (120 min)
Linolsäure	29000	152 000 (105 min)	94 500 (240 min)
Linolensäure	126000	517 000 (60 min)	114 000 (240 min)
Arachidonsäure	46000	583 000 (50 min)	137 000 (240 min)

Tabelle 5.8: Anzahl der bei 1270 nm detektierten Lumineszenzphotonen zu Beginn der Bestrahlung, bei der Maximalzahl und dem Ende der Bestrahlungsdauer

5.5.5 HPLC-Messungen

Zur Bestätigung der Veränderungen der chemischen Zusammensetzung wurde exemplarisch Arachidonsäure nach verschiedenen Bestrahlungszeiten mittels ESI-MS untersucht. Es können Lipidhydroperoxide mit 32 Dalton mehr an Masse nachgewiesen werden, aber auch Moleküle bei denen nach der Oxidation Wasser abgespalten wurde ($32 - 16 = 14$ Dalton mehr). Die Menge an Arachidonsäure nimmt mit der Bestrahlungszeit ab, wohingegen die Menge an Lipidhydroperoxiden die ersten 60 Minuten ansteigt und nach diesem Maximum wieder abnimmt. Nach 240 Minuten Bestrahlungszeit kann nahezu keine Arachidonsäure mehr nachgewiesen werden, ebenso werden keine Lipidhydroperoxide mehr gefunden, aber viele mehrfach oxidierte Produkte.

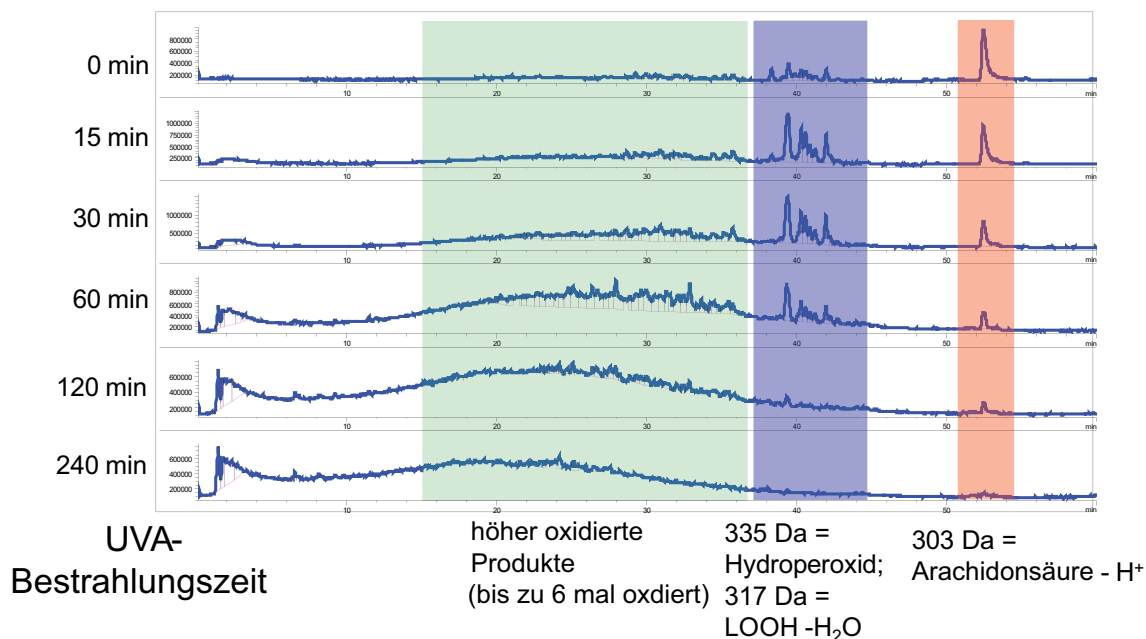


Abbildung 5.24: HPLC-Analyse von Arachidonsäure nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten mit der UVA-Lampe

5.6 Zusammenfassung und Interpretation der Messergebnisse

Sauerstoffverbrauch

Für den Sauerstoffverbrauch in allen in diesem Kapitel untersuchten Lösungen mit Photosensibilisatoren (TMPyP-H₂O-Proteine, TMPyP-EtOH-Fettsäuren, PN-EtOH-Fettsäuren) wurde eine konstante Reaktionsgeschwindigkeit, also eine Reaktion nullter Ordnung angenommen. Dies setzt allerdings eine konstante Erzeugung von Singulett-Sauerstoff voraus, also ein von der Sauerstoff-Konzentration unabhängiges Φ_{Δ} . Für hohe Sauerstoff-Konzentrationen ist dies der Fall [5], sinkt jedoch die Sauerstoff-Konzentration nimmt auch die Menge an Singulett-Sauerstoff ab. Es werden daher die Verbrauchskonstanten nur für die Bereiche mit konstantem Φ_{Δ} ermittelt.

Bei dem stabilen Photosensibilisator TMPyP bleibt die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs sowohl bei Proteinen in Wasser, als auch bei Fettsäuren in Ethanol nahezu konstant. Dagegen tritt bei Perinaphthenon auf Grund des lichtinduzierten Zerfalls des Farbstoffs eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit auf und eine weitere Reaktionskonstante kann bestimmt werden.

In Tabelle 5.9 sind alle ermittelten Verbrauchskonstanten auf den Messungen mit TMPyP und Perinaphthenon aufgelistet. Dabei muss beachtet werden, dass die verschiedenen Werte bei unterschiedlichen Laserleistungen, Farbstoff- und Biomolekül-Konzentrationen erstellt wurden. Auch muss die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} und die absorbierte Energie berücksichtigt werden, um die Werte quantitativ vergleichen zu können. Die hier aufgeführten Werte dienen lediglich zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs während den verschiedenen Lumineszenzmessungen und ermöglichen es, die Laserleistung und Molekül-Konzentrationen so zu wählen, dass während den Lumineszenzmessungen möglichst wenig Veränderungen der Sauerstoff-Konzentration stattfinden.

Biomolekül	TMPyP	PN
Stearinsäure	$0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{ (a)}$	$0 - 0,2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{ (b)}$
Ölsäure	$1,2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{ (a)}$	
Linolsäure	$2,3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{ (a)}$	$0,5 - 1,9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{ (b)}$
Linolensäure	$3,5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{ (a)}$	
Arachidonsäure		$1,1 - 2,8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{ (b)}$
Albumin	$0,8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{ (c)}$	
Trypsin-Inhibitor	$1,1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{ (c)}$	
Insulin	$2,7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{ (c)}$	
Angiotensin	$4,7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{ (c)}$	

Tabelle 5.9: Übersicht über die O_2 -Verbrauchskonstanten der Farbstoffe TMPyP und PN bei verschiedenen Biomolekülen; ^(a): TMPyP-Konzentration = $25 \mu\text{mol/L}$, Laserleistung = 250 mW , Fettsäure-Konzentration = 50 mmol/L ; ^(b): PN-Konzentration = $200 \mu\text{mol/L}$, Laserleistung = 100 mW , Fettsäure-Konzentration = $20 - 50 \text{ mmol/L}$; ^(c): TMPyP-Konzentration = $50 \mu\text{mol/L}$, Laserleistung = 50 mW , Protein-Konzentration = 2 mg/mL ;

Raten- und Ratenkonstanten

Im Hinblick auf die Zugabe von Zellen und Bakterien wurden in diesem Kapitel die Raten und Ratenkonstanten in Lösungen von TMPyP und PN mit verschiedenen Biomolekülen bestimmt. In Tabelle 5.12 sind alle erhaltenen Werte gezeigt. Um die Tabelle übersichtlicher zu gestalten sind die Fehler nicht extra angegeben.

Rate / Ratenkonstante	TMPyP mit Albumin	TMPyP in Wasser	Einheit
k_{Δ}	0,27	0,28	μs^{-1}
k_{T_1}	<0,011	<0,006	μs^{-1}
$k_{T_1O}^{\Sigma}$	1,7	1,9	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$	<0,08	<0,1	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 S_0}$	<0,03	<0,001	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$	<0,2	<0,08	$\mu s^{-2} \cdot \text{mmol}^{-2} \cdot \text{L}^2$
$k_{\Delta Q}$	0,45	0,6 (NaN ₃)	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 Q}$	n.b.	<0,005	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$

Tabelle 5.10: Übersicht über die Raten und Ratenkonstanten von TMPyP in Wasser mit und ohne Albumin

Aus den vorliegenden Daten lässt sich erkennen, dass bis auf Stearinsäure alle zugesetzten Biomoleküle in der Lage sind Singulett-Sauerstoff zu quenchen, teilweise wird auch noch der Triplett-Zustands des Farbstoffs gequencht. Allerdings sind sehr hohe Fettsäure-Konzentrationen (50 mmol/L) notwendig im Vergleich zur Farbstoff-Konzentration (25 - 100 $\mu\text{mol/L}$). Wie jedoch in Kapitel 7 gezeigt wird, bestehen die Membranen von Zellen und Bakterien fast ausschließlich aus Fettsäuren und Proteinen, so dass im Fall einer Singulett-Sauerstoff-Erzeugung an oder in den Membranen die erforderlichen Konzentrationen der Fettsäuren erreicht werden können. Die anderen angegebenen Raten und Ratenkonstanten stimmen im Rahmen der Fehlertoleranzen mit den Werten aus den Messungen ohne Zusatzstoffe (vgl. Kapitel 4) überein. Die Messungen bei unterschiedlichen Konzentrationen der ungesättigten Fettsäuren, bzw. der Proteine zeigte, dass die sauerstoffabhängige Rate K_{T_1} nicht

Rate / Raten-konstante	TMPyP mit Stearinsäure	TMPyP mit Linolsäure	TMPyP in EtOH	Einheit
k_{Δ}	0,07	0,07	0,07	μs^{-1}
k_{T_1}	0,005	0,02	<0,005	μs^{-1}
$k_{T_1 O}^{\Sigma}$	1,25	1,1	1,1	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$	<0,05	<0,05	<0,03	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 S_0}$	<0,003	<0,003	<0,002	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$	<0,01	<0,01	<0,01	$\mu s^{-2} \cdot \text{mmol}^{-2} \cdot \text{L}^2$
$k_{\Delta Q}$	0	<0,0015	0,4 (NaN ₃)	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 Q}$	0	0	0,05 (NaN ₃)	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$

Tabelle 5.11: Übersicht über die Raten und Ratenkonstanten von TMPyP in Ethanol mit verschiedenen Fettsäuren und ohne Fettsäuren

Rate / Raten-konstante	PN mit Stearinsäure	PN mit Linolsäure	PN mit Arachidonsäure	PN in EtOH	Einheit
k_{Δ}	0,07	0,07	0,07	0,07	μs^{-1}
k_{T_1}	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	μs^{-1}
$k_{T_1 O}^{\Sigma}$	2,1	2,2	2,3	2,0	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$	<0,05	<0,05	<0,05	<0,1	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 S_0}$	0,1	0,05	0,05	<0,01	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$	<0,01	<0,01	<0,01	<0,1	$\mu s^{-2} \cdot \text{mmol}^{-2} \cdot \text{L}^2$
$k_{\Delta Q}$	0	<0,0015	n.b.	n.b.	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$
$k_{T_1 Q}$	0	0	n.b.	n.b.	$\mu s^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}$

Tabelle 5.12: Übersicht über die Raten und Ratenkonstanten von PN in Ethanol mit verschiedenen Fettsäuren und ohne Fettsäuren

mehr den Werten entspricht, die auf Grund des extern gemessenen Sauerstoffgehalts erwartet werden. Durch ein anpassen der Fitkurven an die Werte aus den Lumineszenzmessungen konnten niedrigere Sauerstoff-Konzentrationen bestimmt werden, die denen entsprechen, die am Ort der Farbstoff-Anregung vorliegen.

Singulett-Sauerstoff-Erzeugung durch Fettsäuren

In dieser Arbeit konnte erstmals die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch ungesättigte Fettsäuren unter UVA-Bestrahlung direkt nachgewiesen werden. Dabei wurde ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Bestrahlungszeit, der Anzahl der Doppelbindung der Fettsäuren und der Singulett-Sauerstoff-Ausbeute festgestellt. Da bereits nachgewiesen wurde, dass Fettsäuren durch Singulett-Sauerstoff oxidiert werden können (Abschnitt 5.3 und 5.4) kann somit auch der beobachtete Sauerstoffverbrauch ohne dem Zusatz von Photosensibilisatoren erklärt werden. Bei den zeitlich aufgelösten Lumineszenzsignalen ist kein Anstieg zu beobachten. Dies legt nahe, dass kein Triplett-Zustand gebildet werden kann, der die Energie auf den Sauerstoff übertragen kann. Somit erfolgt aller Wahrscheinlichkeit nach eine Anregung des Sauerstoffs auf chemischen Wegen (Typ I-Mechanismus).

In der HPLC konnte ebenfalls die Erzeugung von Lipidhydroperoxiden bestätigt werden. Abbildung 5.25 zeigt einen möglichen Mechanismus der zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff führt.

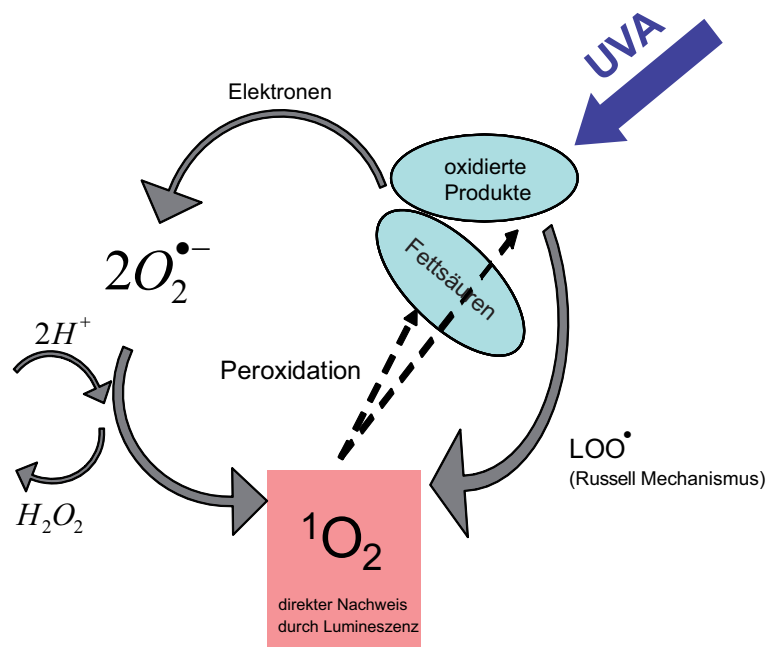


Abbildung 5.25: Mechanismus zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch die Bestrahlung von Fettsäuren mit UVA-Strahlung

In der Abbildung ist ein möglicher Mechanismus zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch UVA-Bestrahlung von Lipiden und Fettsäuren dargestellt. Dabei wird die UVA-Strahlung von Fettsäuren und teilweise oxidierten Produkten absorbiert. Dies kann zu einer Abspaltung von Elektronen führen, was zur Erzeugung von Hyperoxid-Anionen führt. Dieses Radikal generiert schließlich Singulett-Sauerstoff. Zum anderen kann Singulett-Sauerstoff auch durch den Russel-Mechanismus [56] erzeugt werden, bei dem zwei Peroxyl-Radikale ($\text{LOO}\cdot$) ein lineares Tetraoxid bilden, das zerfällt zu einem Alkohol, Keton und Singulett-Sauerstoff zerfällt. Durch die Oxidation der Fettsäuren durch den erzeugten Singulett-Sauerstoff werden weitere Hydroperoxide erzeugt und der Kreislauf wird verstärkt. Erst wenn nahezu keine unoxidierten Fettsäuren mehr zur Verfügung stehen, nimmt die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff ab (vgl. Lumineszenz-Abnahme nach ca. 60 Minuten bei Arachidonsäure).

Diese Art der Singulett-Sauerstoff-Erzeugung (Typ I), ohne einen Triplett-Zustand, der seine Energie auf den Sauerstoff überträgt, erklärt auch den nicht messbaren Anstieg des Lumineszenzsignals. Es erfolgt also sofort mit dem Einsetzen der Bestrahlung eine Singulett-Sauerstoff-Generierung.

Kapitel 6

Verbesserungen der Singulett-Sauerstoff-Detektion

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln gezeigt wurde, ist es schwierig, die Lumineszenzsignale bei niedrigen Sauerstoff- und Farbstoff-Konzentrationen korrekt auszuwerten. Ein weiteres Problem, das bei *in vitro* Messungen hinzu kommt, ist, dass die Zell- und Bakteriensuspensionen keine klaren Lösungen darstellen und das Anregungslicht in der Küvette gestreut wird. Auch muss der natürliche Sauerstoffverbrauch der lebenden Organismen berücksichtigt werden, der zusätzlich zum Verbrauch durch die Oxidation der Bestandteile, wie Lipide oder Proteine (vgl. Kapitel 5), auftritt. All diese Aspekte erschweren die Singulett-Sauerstoff-Detektion und die Interpretation der Daten.

Der wohl problematischste Sachverhalt bei *in vitro* Messungen liegt jedoch in der Lokalisation der Farbstoff-Moleküle. Dies bedeutet, dass die durchschnittliche Farbstoff-Konzentration in der Suspension relativ gering ist, aber lokal sehr hohe Farbstoff-Konzentrationen in den Zellen oder Bakterien erreicht werden können. Des weiteren ist der Farbstoff nach der Aufnahme durch Zellen und Bakterien von Proteinen und Fettsäuren umgeben. Dies führt zu einem erhöhten Quenchen des Singulett-Sauerstoffs und einem lokal erhöhten Sauerstoff-Verbrauch. Daher kann sowohl die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer (Quenchen durch Proteine und Fettsäuren), als auch die Farbstoff-Triplett-Abklingdauer (erniedrigte Sauerstoff-Konzentration) ge-

genüber eine reinen Farbstoff-Lösung gravierend verändert werden.

Um trotz all dieser Beeinträchtigungen auswertbare Signale zu erhalten, wird in diesem Kapitel die Problematik des Sauerstoffverbrauchs näher erläutert. Des weiteren werden mögliche Verbesserungen der Messempfindlichkeit durch optische Filter mit höheren Halbwertsbreiten bei klaren Lösungen und bei streuenden Suspensionen untersucht, sowie der Einsatz von Magnetrührern, die bereits bei den vorherigen Messungen verwendet wurden. Zum Abschluss wird die Bedeutung der verschiedenen Anstiegs- und Abklingraten in Abhängigkeit der vorhandenen Bedingungen in der Lösung (Sauerstoff- und Quencher-Konzentration) diskutiert.

6.1 Messprobleme durch den Sauerstoffverbrauch

Singulett-Sauerstoff kann, wie bereits gezeigt, Proteine und Lipide, die in lebenden Organismen vorkommen oxidieren. Dadurch nimmt der Sauerstoffgehalt in Lösungen mit Biomolekülen während der Generierung von Singulett-Sauerstoff kontinuierlich ab. Die Veränderung der Raten während den Messungen durch die Abnahme des Sauerstoff-Gehalts führte bereits bei den vorherigen Versuchen zu Problemen bei der Detektion, dabei waren in den bisher untersuchten Lösungen die Farbstoffmoleküle, die Singulett-Sauerstoff erzeugen können und die zu oxidierenden Substanzen homogen in der Lösung verteilt. Diese homogen Verteilung ändert sich aber bei Zellen und Bakterien, da bei diesen die Farbstoffe im Zytoplasma oder den Plasmamembranen lokalisiert sind. Dadurch sind die beiden Reaktionspartner, Singulett-Sauerstoff und zu oxidierendes Molekül, viel näher beieinander und die Reaktionen laufen schneller und lokal begrenzter ab.

Wie bereits durch Marcinek *et al.* beschrieben, beträgt die Sauerstoff-Konzentration in Herzmuskelzellen *in vivo* etwa 30 $\mu\text{mol/L}$ [53], etwa einem Zehntel der Sauerstoff-Konzentration einer luftgesättigten Lösung. In Zellsuspensionen ist mit dem Sauerstoff-Sensor nur die Bestimmung des Sauerstoff-Gehalts außerhalb der Zellen, im Lösungsmittel, möglich. Dieser Wert ist höher als der Sauerstoff-Gehalt in der Umgebung der Farbstoffmoleküle nach der Aufnahme durch Zellen oder Bakterien.

Durch eine Verringerung der Sauerstoff-Konzentration im Lösungsmittel (Durch-

leiten von Stickstoff) kann die Sauerstoff-Konzentration in den Zellen [24] gesenkt werden, da in den Zellen weiter Sauerstoff durch den Stoffwechsel verbraucht wird, aber die Diffusion verlangsamt wird. Es kann aber auch die Sauerstoff-Konzentration außerhalb der Zellen durch den Sauerstoffverbrauch der Zellen ohne einem Zutun von Außen gesenkt werden. Unabhängig von der Ursache der Sauerstoff-Depletion sinkt somit die Sauerstoff-Konzentration innerhalb und außerhalb der Zellen.

Bei der Bestrahlung von farbstoffinkubierte Zellen mit Licht kommt es zu einer weiteren Beschleunigung des Sauerstoffverbrauchs. Der Sauerstoffverbrauch setzt sich damit aus einem intrinsischen Sauerstoffverbrauch durch den Stoffwechsel und einem extrinsischen Sauerstoffverbrauch durch die Oxidation durch Singulett-Sauerstoff zusammen.

Diesen Unterschied zeigt deutlich Abbildung 6.1, die den Sauerstoff-Gehalt gegen die Zeit anzeigt.

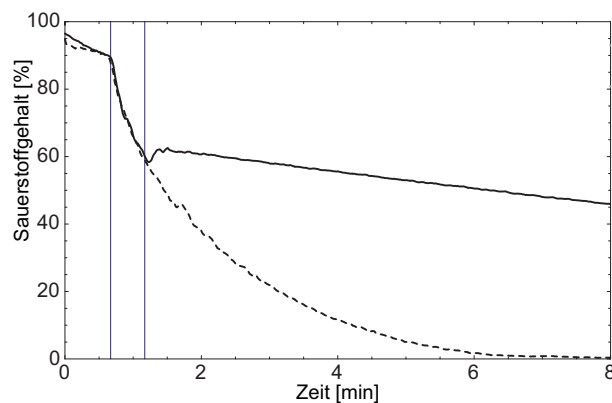


Abbildung 6.1: *Abnahme der Sauerstoff-Konzentration bei inklubierte Bakterien in Suspension durch Stoffwechsel und Bestrahlung [51]*

Es wurde die Sauerstoff-Konzentration in Bakterien-Suspensionen mit einer Proteinkonzentration von 1,5 mg/ml gegen die Messdauer aufgetragen. Die Bakterien wurden 90 Minuten mit Photofrin inkubiert. Die ersten 40 Sekunden erfolgte keine Bestrahlung, dann wurde die Suspension entweder für 30 Sekunden (durchgezogene Linien) oder durchgehend für über 7 Minuten bestrahlt (gestrichelte Linien). Für die durchgezogenen Linien zeigte sich der intrinsische Sauerstoffverbrauch durch die Bakterien auf Grund des Stoffwechsels vor und nach der Bestrahlung [51].

In den ersten 40 Sekunden nahm die Sauerstoff-Konzentration in der Bakterien-Suspension von ca. 94% auf 90% ab. Durch die Bestrahlung für 30 Sekunden (typische Messdauer für eine Lumineszenzdetektion) bei 532 nm sank die Sauerstoff-Konzentration um weitere 30%. Im ersten Experiment nahm die Sauerstoff-Konzentration in der Suspension mit 1,5 mg/ml Protein-Konzentration nach der Bestrahlung durch den intrinsischen Verbrauch von ca. 64% auf 46% innerhalb der nächsten 7 Minuten ab.

In einem weiteren Experiment wurden die Suspensionen durchgehend bestrahlt. In diesem Fall konnte nach 8 Minuten kein Sauerstoff mehr in der Suspension festgestellt werden (unter 0,05%).

Da bereits durch eine 30 Sekunden dauernde Bestrahlung 30% der Sauerstoff-Konzentration in einer Küvette mit ca. 3,2 ml Inhalt verbraucht werden, zeigen diese Experimente, dass bei hohen Proteine-Konzentrationen, wie sie im Inneren von Zellen und Bakterien vorliegen (vgl. Kapitel 7), die Sauerstoff-Konzentration sehr schnell abnimmt. Es sollten daher die Bestrahlungszeiten so kurz wie möglich gehalten werden, um die Messbedingungen in den Zell- und Bakteriensuspensionen während den Messungen nicht zu sehr zu verändern. Auch muss vor jeder Messung die Sauerstoff-Konzentration in den Suspensionen bestimmt werden, da durch den Stoffwechsel der Zellen oder Bakterien bereits Sauerstoff verbraucht worden sein kann. Die Konsequenzen des lokale Sauerstoff-Verbrauchs und der Zellatmung auf die Raten und Ratenkonstanten wurden in Abschnitt 6.5 genauer erläutert.

6.2 Optische Filter

Die Lumineszenz des Übergangs vom Singulett-Sauerstoff in den Grundzustand liegt zwischen 1268 nm in Wasser und 1274 nm in Ethanol. Die bisherigen Messungen des Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz erfolgten daher mit einem Interferenzfilter mit einer maximalen Transmission von 49% bei 1270 nm und mit einer Halbwertsbreite (HWB) von 10,0 nm. Die niedrige Transmission und die kleine spektrale Breite der Transmission stellten bei den Untersuchungen in Lösungen kein Problem dar, da die Lumineszenzsignale ausreichend hoch waren. Bei den Untersuchungen mit Zellen und

Bakterien ist auf Grund der starken Quencherwirkung und des hohen O_2 -Verbrauchs mit einem geringern Lumineszenzsignal zu rechnen. Auf Grund der spektralen Breite des Übergangs von Singulett-Sauerstoff in den Grundzustand, muss der Interferenzfilter mit Transmission bei 1270 nm angepasst werden, um erstens so viele Lumineszenzphotonen wie möglich und zweitens so wenig Störphotonen wie möglich zu detektieren. Um mehr Lumineszenzphotonen detektieren zu können, wurden daher Interferenzfilter mit größeren Halbwertsbreiten und einer höheren Transmission verwendet. Beide Filter wurden von der Firma bk Interferenzoptik Elektronik GmbH (Nabburg, Deutschland) bezogen mit Halbwertsbreiten von 30,5 nm ($T = 91\%$) und 86,6 nm ($T = 95\%$). Zur Minimierung der Störphotonen wurde ein Kantenfilter bei 950 nm verwendet.

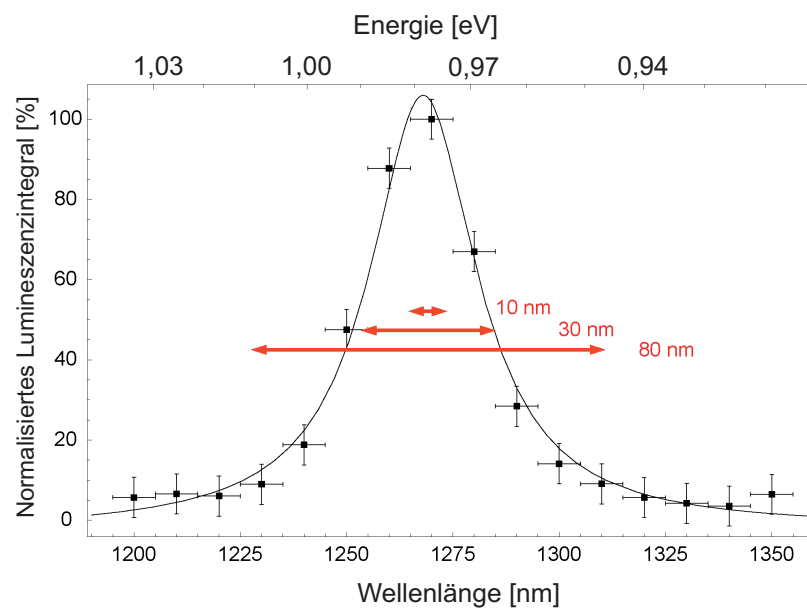


Abbildung 6.2: Die Halbwertsbreite der verschiedenen Interferenzfilter mit Transmission bei 1270 nm, verglichen mit einem Wellenlängenscan durchgeführt mit einem Monochromator einer TMPyP-Wasser-Lösung

In Abbildung 6.2 sind die Halbwertsbreiten der verschiedenen Filter mit dem Wellenlängenscan von TMPyP in Wasser verglichen. Dabei wurde das Integral der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz zwischen 1200 und 1350 nm in Abständen von 10

nm durch einen Monochromator spektral aufgelöst gemessen und eine Lorentz-Kurve (homogene Linienverbreiterung) mit einem Maximum bei 1268 nm an die erhaltenen Integralwerte angepasst. Die roten Doppelpfeile beschreiben die Halbwertsbreite der verwendeten Interferenzfilter, die vor dem Photomultiplier aufgestellt sind. Es ist deutlich zu erkennen, dass durch den Interferenzfilter mit einer Halbwertsbreite von 10 nm nur der Bereich um das Maximum zum Signal beiträgt, wohingegen der Filter mit einer HWB von 30 nm nahezu den gesamten spektralen Bereich der Lumineszenz detektiert. Der Filter mit einer HWB von 80 nm deckt einen noch weiteren Spektralbereich ab, wodurch jedoch auch mehr Störphotonen detektiert werden können. Abbildung 6.3 zeigt die aufgenommenen Lumineszenzsignale einer $5 \mu\text{mol/L}$ TMPyP-Wasser-Lösung mit Filtern unterschiedlicher Halbwertsbreiten und die nach Gleichung 2.16 berechneten Fitgeraden (rote Linie).

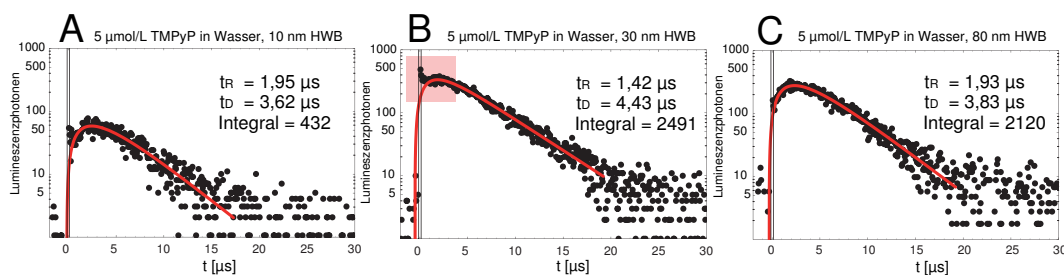


Abbildung 6.3: Die detektierten Lumineszenzsignale einer $5 \mu\text{mol/L}$ TMPyP-Wasser-Lösung, aufgenommen mit Interferenzfiltern mit 10 nm HWB (A), 30 nm HWB (B) und 80 nm HWB (C)

Anhand des Integrals über die Fitkurve können die drei Signale miteinander verglichen werden. Für den schmalbandigsten Filter ergibt sich ein Integral von 472 und eine Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit von $3,6 \mu\text{s}$ (Abb. 6.3 A). Sowohl die Anstiegszeit, als auch die Abklingzeit können eindeutig bestimmt werden und entsprechen den Literaturwerten. Beim Einsatz des Filters mit einer Halbwertsbreite von 30 nm ergibt sich eine Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit von $4,4 \mu\text{s}$ und ein integriertes Signal von 2491. Jedoch zeigt sich in den ersten Mikrosekunden ein zusätzliches Signal, das das Aussehen des Lumineszenzsignals stark verändert. Es ist somit zwar möglich eine Fitkurve durch die Messpunkte zu legen, jedoch sind die Anstiegs- und

die Abklingzeit mit einem großen Fehler behaftet, da das zusätzliche Signal beide Zeiten verfälscht. Der Einsatz des 80 nm HWB-Filters zeigt keine Vergrößerung des Integrals (2120), jedoch verringert sich die Störung in den ersten Mikrosekunden deutlich, die Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit lässt sich somit zu $3,8 \mu\text{s}$ bestimmen und auch die Anstiegszeit kann wieder gut ermittelt werden.

Die Störungen der Signale können sowohl durch Fluoreszenzphotonen des Photosensibilisators, als auch durch 1064 nm Photonen des Nd:YAG-Lasers verursacht werden. Obwohl die verwendeten Interferenzfilter diese Störsignale blockieren sollten, können doch einige Photonen die Filter passieren, da diese nur eine begrenzte Blockier-Kapazität außerhalb der spezifizierten Transmissionsweite haben. Der Einsatz eines zusätzlichen Kantenfilters bei 950 nm vor den Interferenzfiltern kann die Störung der Lumineszenzsignale bei allen Filtern verringern (Abbildung 6.4).

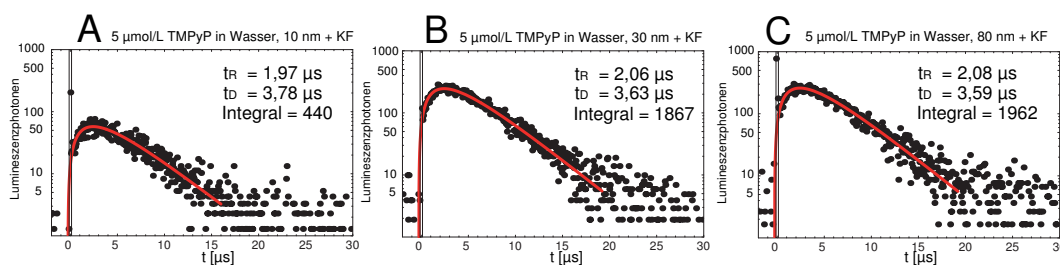


Abbildung 6.4: Die detektierten Lumineszenzsignale einer $5 \mu\text{mol/L}$ TMPyP-Wasser-Lösung, aufgenommen mit Interferenzfiltern mit 10 nm HWB (A), 30 nm HWB (B) und 80 nm HWB (C) mit einem zusätzlichen Kantenfilter bei 950 nm

Alle drei Signale konnten nun besser gefittet werden und die ermittelten Abklingzeiten sind mit denen aus der Literatur vergleichbar. Die ermittelten Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten liegen mit dem Einsatz des Kantenfilters zwischen $3,6$ und $3,8 \mu\text{s}$. Die Höhe des Integrals nahm bei allen drei Interferenzfiltern nur gering ab. Es ist somit durch die Wahl geeigneter Filter-Kombinationen möglich, die Signalthöhe der Lumineszenz um einen Faktor 5 zu erhöhen, ohne die Störungen ebenfalls zu verstärken.

6.3 Streuexperimente

Im Gegensatz zu klaren Lösungen (Kapitel 4 und 5) streuen Bakteriensuspensionen das Anregungslicht. Dadurch verändert sich die Strahlgeometrie des Anregungslichts in der Küvette erheblich. Die unterschiedlich großen Streukörper (Bakterien, Organellen) verursachen homogene oder inhomogene Streuung. Das Anregungslicht und die Fluoreszenz des Photosensibilisators können durch die Streuung verstärkt durch die Sammellinsen vor dem Photomultiplier auf dessen Photokathode abgebildet werden. Jedes Photon, ob Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs oder Störphoton, löst beim Single Photon Counting ein Signal aus.

Um mögliche Störeinflüsse durch Streuprozesse nachzuahmen, wurde einer $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ TMPyP-Wasser-Lösung $0,05\text{ mg/ml}$ Titandioxid zugesetzt. Die Trübung der Lösung wurde mit einem Trübungsindexstandard (McFarland-Standard) bestimmt und entspricht der einer Bakterienlösung mit 10^8 Zellen pro Milliliter.

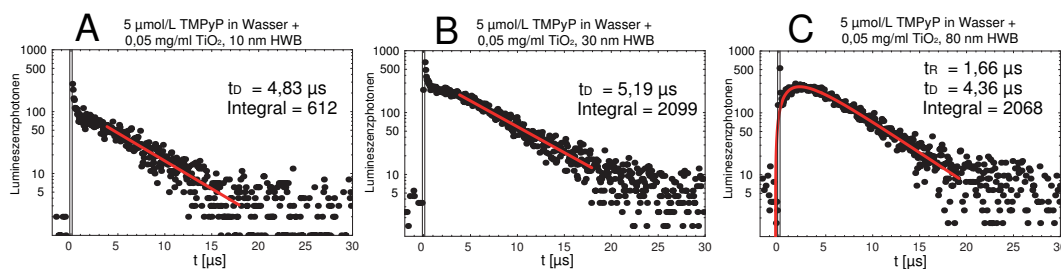


Abbildung 6.5: Die detektierten Lumineszenzsignale einer $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ TMPyP-Wasser-Lösung mit Titanoxid als Streukörper, aufgenommen mit Interferenzfiltern mit 10 nm HWB (A), 30 nm HWB (B) und 80 nm HWB (C)

Abbildung 6.5 zeigt die Lumineszenzsignale der drei 1270 nm -Filter mit den Halbwertsbreiten 10 nm , 30 nm und 80 nm ohne einem zusätzlichen Kantenfilter. Bei allen Signalen sind Störungen auf Grund der Streuung zu erkennen. So ist es für die Filter mit 10 nm und 30 nm HWB nicht möglich einen Fit nach Gleichung 2.16 anzupassen. Nur die Abklingdauer der Lumineszenz kann bestimmt werden. Lediglich bei 80 nm HWB (Abb. 6.5 C) funktioniert die Berechnung nach Gleichung 2.16. Die Abklingzeiten für die Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz liegen aber bei allen drei Si-

gnalen im Bereich von 4,3 bis 5,2 μs . Diese ist eindeutig länger als in reinem Wasser und ist entweder durch den Zusatz von Titanoxid oder durch die Verfälschung durch Störsignale verursacht. Verwendet man zusätzlich zu den verschiedenen Interferenzfiltern den Kantenfilter bei 950 nm, zeigen die Signale wieder nahezu die gleiche Form wie beim Einsatz eines Photosensibilisators ohne Titandioxid (Abb. 6.6).

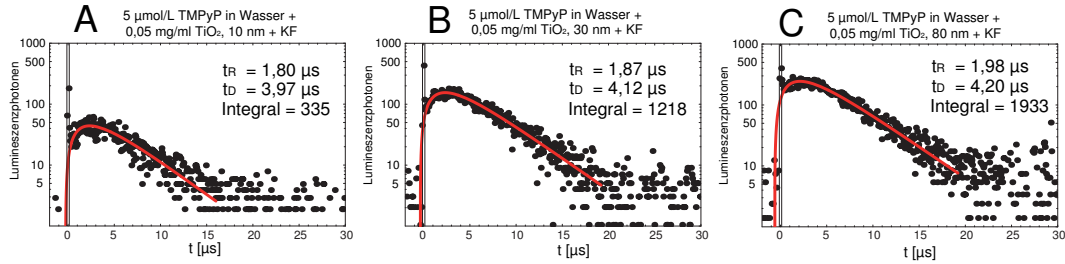


Abbildung 6.6: Die detektierten Lumineszenzsignale einer 5 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP-Wasser-Lösung mit Titanoxid als Streukörper, aufgenommen mit Interferenzfiltern mit 10 nm HWB (A), 30 nm HWB (B) und 80 nm HWB (C) mit einem zusätzlichen Kantenfilter bei 950 nm

Die gefitteten Abklingzeiten sind etwas länger (4,0 bis 4,2 μs) als die von Singulett-Sauerstoff in reinem Wasser (3,6 μs), liegen aber noch im Rahmen des Messgenauigkeit unserer Experimente ($\pm 15\%$).

Es zeigt sich, dass durch Streuung von Photonen schwache Lumineszenzsignale des Singulett-Sauerstoff entscheidend gestört werden können. Abhilfe gegen die vermehrten Störphotonen schafft aber der Einsatz von Interferenzfiltern mit größeren Halbwertsbreiten (größere Signale) und von Kantenfiltern (weniger Störungen) auf Grund des dadurch verbesserten Signal-Rausch-Verhältnisses. Für den weiteren Einsatz bei Messungen an Zell- und Bakteriensuspensionen wurde der Interferenzfilter mit 30 nm HWB und der Kantenfilter bei 950 nm verwendet, da diese Kombination ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis aufweist als der 10 nm HWB-Filter und außerdem die Anstiegszeit der Lumineszenz besser und genauer bestimmt werden kann, als bei Filter-Kombinationen mit dem 80 nm HWB-Filter.

6.4 Rühren und Diffusion

Abbildung 6.7 zeigt noch einmal die angenommene Sauerstoff-Konzentration in der Küvette während der Bestrahlung durch den Laser. Wie bereits in Kapitel 2 beschrieben, kann die Spitze des Messensors wegen der hohen Lichtintensität nicht im Anregungszentrum platziert werden. Somit benötigt ein Sauerstoff-Molekül auf Grund der Diffusion etwa 20 Minuten, um die ca. 5 mm zwischen Spitze des Sensors und Zentrum des Laserstrahls zurückzulegen. Die Reichweite eines Singulett-Sauerstoff-Moleküls innerhalb seiner durchschnittlichen Lebensdauer in Wasser von $3,5 \mu\text{s}$ beträgt ca. $0,13 \mu\text{m}$.

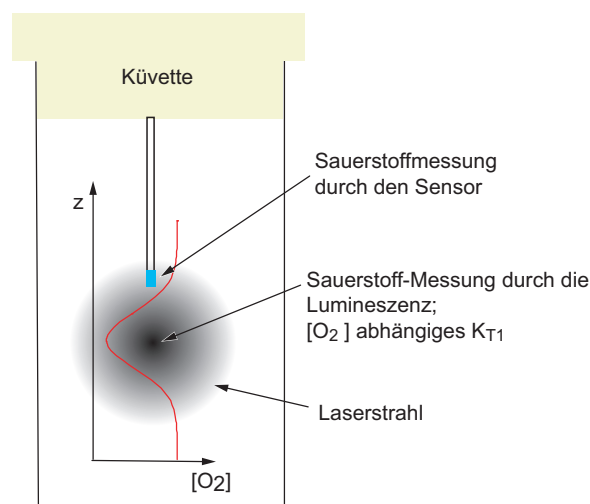


Abbildung 6.7: Ort der Bestimmung der Sauerstoff-Konzentration mit dem externen Sensor und durch die Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz, zusätzlich sind der Querschnitt des Laserstrahls und die Sauerstoff-Konzentration (rote Linie) in der Küvette eingezeichnet.

Nimmt man an, dass bei einer Bestrahlung von Lösungen mit hohen Protein- oder Lipid-Konzentrationen der Sauerstoff im Zentrum der Anregung nahezu vollständig verbraucht wird und am Rand der Bestrahlung die Sauerstoff-Konzentration die gleiche bleibt wie in der unbestrahlten Lösung, ergeben sich zum Beispiel für TMPyP nach der Gleichung 2.13 für die Abklingdauer des Farbstoff-Triplett-Zustands Zeiten zwischen $2 \mu\text{s}$ am Rand und ca. $170 \mu\text{s}$ im Zentrum. Die Singulett-Sauerstoff-

Konzentration (Gleichung 2.16) im Zentrum sinkt ebenfalls. Dabei zeigt der Sauerstoff-Sensor, der außerhalb der Laseranregung die Sauerstoff-Konzentration misst, immer noch an, dass in der Lösung $270 \mu\text{mol/L}$ Sauerstoff vorhanden sind.

Durch den Einsatz des Magnetrührers können die Sauerstoff-Gradienten minimiert werden, vor allem in Lösungen mit und ohne Biomolekülen. Ein Beispiele für die Unterschiede bei der Lumineszenz liefern die Messungen bei Perinaphthenon mit Arachidonsäure in Ethanol (Abbildung 6.8). Es wurde zweimal das Lumineszenzsignal bei einer luftgesättigten Ethanol-Perinaphthenon-Arachidonsäure-Lösung gemessen (vgl. Kapitel 5). Die Farbstoff-Konzentration betrug in beiden Fällen $25 \mu\text{mol/L}$, die Sauerstoff-Konzentration $1850 \mu\text{mol/L}$, die Arachidonsäure-Konzentration 20 mmol/L , die Laserleistung 100 mW und die Pulszahl 10.000 .

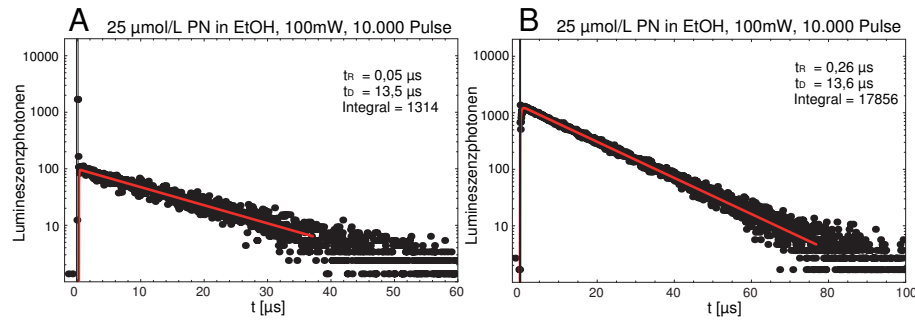


Abbildung 6.8: Veränderung des Lumineszenzsignals einer PN-Arachidonsäure-Lösung durch das Durchmischen mit einem Magnetrührer; Abbildung A: Ausgleich der Sauerstoff-Konzentration nur durch Diffusion; Abbildung B: beschleunigter Ausgleich der Sauerstoff-Konzentration durch einen Magnetrührer

Diese Messung zeigt, dass die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff diffusions-kontrolliert ist und die Diffusion den lokalen Sauerstoffverbrauch stark beeinflusst. Diese Effekte, dass sich die Anstiegszeiten mit und ohne Magnetrührer unterscheiden, wurde auch bei niedrigeren Sauerstoff-Konzentrationen beobachtet, wie in der Abbildung 5.13 C bereits gezeigt wurde.

Ein weiterer Aspekt für das Rühren kommt bei der Bestrahlung von mit Farbstoffen inkubierten Zellen und Bakterien (Kapitel 7) zu tragen. Dabei erfolgt nur eine Singulett-Sauerstoff-Erzeugung, wenn die drei wesentlichen Bedingungen, Licht,

Farbstoff und Sauerstoff, an einem Ort gleichzeitig vorhanden sind. Das heißt, dass sich die mit Farbstoff inkubierten, ausreichend mit Sauerstoff gesättigten Zellen innerhalb des vom Laser ausgeleuchteten Volumens befinden müssen. Durch die Generierung von Singulett-Sauerstoff tritt dann allerdings sofort die Oxidation von zellulären Molekülen ein und die Sauerstoff-Konzentration in den belichteten Zellen sinkt. Da bei diesen Messungen jedoch nur ein Bruchteil der gesamten Küvette bestrahlt wird, können durch den Einsatz eines Magnetrührers wieder “frische“, nicht oxidierte Zellen in das ausgeleuchtete Volumen gelangen und von neuem Singulett-Sauerstoff generieren.

Es ist somit möglich durch das Rühren nahezu alle Organismen gleich stark zu bestrahlen und mehr Lumineszenzphotonen zu erhalten. Ohne Rühren, wo nur ein Bruchteil der Organismen bestrahlt wird, bis lokal kein Sauerstoff mehr vorhanden ist, würden erheblich weniger Lumineszenzphotonen detektiert. Der Magnetrührer schafft somit vergleichbare, während der Lumineszenzmessung definierte Bedingungen.

6.5 Bedeutung der Raten und deren Interpretation

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, können für die Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit (je nach Sauerstoff-Konzentration die Anstiegs- oder Abklingzeit der Lumineszenz) in Wasser nahezu alle Zeiten zwischen $4\ \mu\text{s}$ und $0\ \mu\text{s}$ erreicht werden, je nach Konzentration der Quencher oder anderer Zusätze (vgl. TiO_2). Dahin gegen kann durch die Veränderung der Sauerstoff-Konzentration in einer Lösung oder Suspension die Triplett-Abklingdauer des Farbstoffs zwischen ca. $0,5\ \mu\text{s}$ und über $100\ \mu\text{s}$ variiert werden, je nach Sauerstoff-Konzentration oder verwendeten Photosensibilisator. In Abbildung 6.9 sind zwei Signale mit nahezu gleichen Anstiegs- und Abklingzeiten dargestellt.

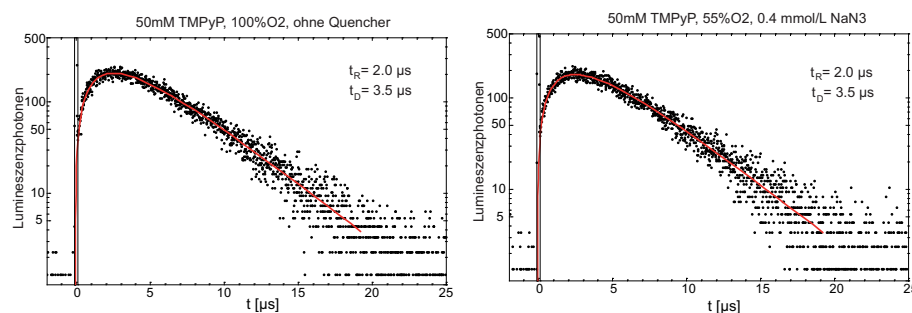


Abbildung 6.9: Lumineszenzsignal einer 50 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP-Wasser-Lösung bei Sauerstoff-Luftsättigung ohne zusätzlicher Quencher (A) und bei 55% Sauerstoff-Luftsättigung mit 0,4 mmol/L Natriumazid

Es muss beachtet werden, dass das Lumineszenzsignal in Abb. 6.9 A bei einer Sauerstoff-Konzentration von 270 $\mu\text{mol/L}$ und ohne einem Zusatz von weiteren Quenchern in Wasser aufgenommen wurde und die erwartete Abklingzeit von etwa 3,5 μs besitzt. In diesem Fall entspricht die Anstiegsrate $1/\tau_R = K_{T_1}$ und es kann die Farbstoff- T_1 -Lebensdauer zu 2,0 μs bestimmt werden. Aus der Abklingrate $1/\tau_D = K_\Delta$ kann die Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer zu 3,5 μs berechnet werden (die benötigten Ratenkonstanten stammen aus Kapitel 4). In Abbildung 6.9 B ist ein ähnliches Lumineszenzsignal wie in Abbildung 6.9 A dargestellt. Die Anstiegsdauer entspricht wieder 2,0 μs , die Abklingdauer wieder 3,5 μs . Allerdings beträgt die Sauerstoff-Konzentration nur noch 55% der Luftsättigung (ca. 150 $\mu\text{mol/L}$) und Natriumazid ist in einer Konzentration von 0,4 mmol/L hinzugefügt. Aus der Einzelmessung, die in Abbildung 6.9 B dargestellt ist, ist es nicht möglich den Anstiegs- und Abklingzeiten eine Bedeutung zuzuordnen. Erst durch den Vergleich der Signale mit denen aus Kapitel 4 ergibt sich, dass die Anstiegsrate $1/\tau_R$ der Singulett-Sauerstoff-Abklingrate K_Δ entspricht und die Abklingrate $1/\tau_D$ der Farbstoff-Triplett-Abklingrate K_{T_1} . Für die Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer ergeben sich daher 2,0 μs und für die Farbstoff- T_1 -Lebensdauer 3,5 μs . Die Bedeutung der aus dem Lumineszenzsignal bestimmbareren Raten hat also getauscht, man befindet sich also auf der anderen Seite der Schnittpunkts der Raten (vgl. Abbildung 2.14).

Um bei den durchgeführten Lumineszenzmessungen Informationen über den Singulett-Sauerstoff oder den Farbstoff-Triplett-Zustand zu erhalten, muss man den Anstiegs-

und Abklingraten der Lumineszenzsignale die entsprechenden Raten des Farbstoffs oder des Singulett-Sauerstoffs richtig zuzuordnen. Wie bereits bei diesem einfachen Beispiel zu erkennen ist, kann dies nicht immer sofort geschehen. Es müssen erst die Bedingungen in der Lösung, der Suspension oder am besten am Ort des Farbstoffmoleküls bekannt sein, um aus einer Einzelmessung Schlussfolgerungen ziehen zu können. Da dies jedoch in den seltensten Fällen möglich ist – die Quencher- und Sauerstoff-Konzentration in Zellen und Bakterien kann nur abgeschätzt werden – kann die Zuordnung der entsprechenden Zeiten auf Grund von verschiedenen Variationen erfolgen. So ändert sich bei einer Variation der Sauerstoff-Konzentration in der Suspension nur die Farbstoff- T_1 -Lebensdauer, es kann daher aus Messungen bei verschiedenen O_2 -Konzentrationen die Bedeutung der Raten, bzw. Zeiten ermittelt werden.

Da in den Zellen viele quenchende Moleküle, wie Proteine, vorhanden sind, und die Sauerstoff-Konzentration wesentlich niedriger sein kann, als in gesättigten Lösungen, ist die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer kürzer als die Triplett-Abklingdauer. Es entspricht daher die Anstiegszeit des Lumineszenzsignals der Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer. Um daher nicht durch Störungen durch den Laserpuls oder Streuung verfälscht zu werden (siehe oben), sollten die Anstiegszeiten der Lumineszenzsignale länger als $0,5 \mu s$ sein, um wie bisher ausgewertet werden zu können und um Informationen über die vorhandene Quencher-Konzentration zu liefern.

Die Abklingzeit der Lumineszenz, die somit der Farbstoff-Triplett-Abklingdauer entspricht, liefert auf Grund der Sauerstoffabhängigkeit des Farbstoff-Triplett-Zustands Informationen über den Sauerstoff-Gehalt am Ort des Farbstoffs. Dadurch können mit verschiedenen Farbstoffen, die sich an unterschiedlichen Stellen in den Zellen lokalisieren, die Sauerstoff-Konzentrationen in verschiedenen Zellbestandteilen bestimmt werden.

Kapitel 7

Singulett-Sauerstoff-Interaktion mit Zellen und Bakterien

Die Lumineszenzdetektion von Singulett-Sauerstoff in lebenden Zellen und Bakterien ist eine wichtige Methode, um die Mechanismen der Abtötung von Zellen besser zu verstehen. Bisher war es kaum möglich, dieses Lumineszenzsignal mit ausreichender Genauigkeit und Sensitivität zu detektieren [31, 45, 51]. Durch die vorher beschriebenen Verbesserung der Detektion der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz und den Ergebnissen aus den Untersuchungen der Lumineszenz in Biomolekülen, sowie die Auswahl geeigneter Farbstoffe für Zell- und Bakterienexperimente, ist es möglich die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff bei inkubierten Zellen und Bakterien nicht nur zu detektieren, sondern auch genauer zu untersuchen und die Abhängigkeit insbesondere von der Sauerstoff-Konzentration zu bestimmen. Dadurch ergeben sich neue Erkenntnisse für die antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT), bei der Möglichkeiten untersucht werden, resistente Bakterien oder Pilze durch den Einsatz von Licht und einem speziellen Farbstoff, der bevorzugt von den Bakterien oder Pilzen aufgenommen wird, abzutöten ohne das umliegende Gewebe zu schädigen. Zu den bekanntesten resistenten Keimen gehört der in nahezu jedem Krankenhaus vorhandene Gram-positive MRSA (Methicilin resistenter *Staphylococcus aureus*), dessen nicht-resistente Variante im Folgenden verwendet wird. Um auch einen Vertreter der Gram-negativen Bakterien zu untersuchen, wurden bei den hier durchgeführten Ex-

perimenten *Staphylococcus aureus*- und *Escherichia coli*-Suspensionen verwendet. Um einen eventuellen Unterschied in der Wirkungsweise der Photosensibilisatoren und des Singulett-Sauerstoffs zwischen Bakterien und Zellen nachzuweisen, wurden zunächst Darmkrebszellen (HT29-Zellen) und Keratinozyten (NHEK-Zellen) genauer untersucht. Dadurch könnte auch ein therapeutisches Fenster bestimmt werden, also Bedingungen bei denen die Bakterien bereits abgetötet werden, die Zellen aber noch überleben. Dies soll zeigen, dass Bakterien im Rahmen einer Infektion abgetötet werden können, ohne umliegende Zellen des menschlichen Gewebes zu schädigen.

Aufbauend auf den bereits bekannten Ergebnissen mit Photofrin in HT29-Zellen [5] wurden diese und die Keratinozyten in den folgenden Experimenten mit XF73 und TMPyP inkubiert, da diese Farbstoffe besser von den Zellen aufgenommen werden und eine höhere Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute haben als Photofrin. Es erfolgte daher die Anregung der Farbstoffe bei 532 nm, als Lösungsmittel für die Suspensionen wurde phosphatgepuffertes Wasser (PBS) verwendet. Eine Anregung mit 355 nm und PN als Photosensibilisator wurde hier nicht untersucht, da wie bereits gezeigt wurde (Kapitel 5.5) unter UVA-Bestrahlung eigenständige Signale ohne Photosensibilisatoren von den Zellbestandteilen generiert werden können. Außerdem besitzt UVA-Strahlung eine mutagene Wirkung und wird daher nicht für therapeutische Zwecke verwendet.

Da PBS bei diesen Experimenten keinen Einfluss auf die Anstiegs- und Abklingzeiten hat, wurden in dieser Arbeit erstmals die Raten der Lumineszenz bei Zell- und Bakteriensuspensionen in Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration in der PBS-Suspension bestimmt. Außerdem kann durch die Triplett-Abklingdauer des Farbstoffs die lokale Sauerstoff-Konzentration in den Zellen abgeschätzt werden, da die Messung durch einen externen Sauerstoff-Sensor in Zellen nicht möglich ist (Durchmesser des Sensors mind. 50 μm).

7.1 Material und Methoden

Hier ist der Aufbau von Zellen und Bakterien genauer betrachtet, sowie der Prozess der Herstellung der Zell- und Bakteriensuspensionen und der Probenerstellung für die Lokalisation der Farbstoffe in den Zellen und Bakterien. Die in diesem Kapitel verwendeten Farbstoffe wurden bereits in den vorherigen Kapitel beschrieben.

7.1.1 Aufbau von eukaryotischen und prokaryotischen Zellen

In der Natur existieren zwei grundverschiedene Zellgruppen, die sich auf Grund ihrer Größe und internen Struktur unterscheiden: prokaryotische (griechisch: *pro* = *bevor*, *karyon* = *Kern*) und eukaryotische (griechisch: *eu* = *echt*, *karyon* = *Kern*) Zellen. Zu den von der Struktur her einfachen prokaryotischen Zellen gehören die Bakterien, während Pilze, Pflanzen und Tiere strukturell komplexe eukaryotische Zellen besitzen.

Für die Gruppe der eukaryotischen Zellen wurden in diesem Kapitel zwei Zelltypen untersucht: humane kolorektale Adenokarzinom-Zellen (HT29-Zellen), Darmkrebszellen, die in der Zellmembran eine geringe Protein-Konzentration aufweisen [4], sowie native humane epidermale Keratinozyten (NHEK-Zellen), Keratinozyten, die den Hauptbestandteil der menschlichen Haut darstellen. Aus der Gruppe der Prokaryoten wurden der Gram-positive *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), der fast überall in der Natur vorkommt, und das Gram-negative Colibakterium (*Escherichia coli*, *E. Coli*), das weltweit mit am besten untersucht Bakterium, ausgewählt.

Die **eukaryotische Zelle** bildet die grundlegende, strukturelle und funktionelle Einheit aller höheren Lebewesen, wohingegen Prokaryoten immer Einzeller sind. Die verschiedenen Zelltypen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Größe (Prokaryoten: 0,5 - 5 μm , Eukaryoten: 5 - 100 μm) [1], sondern auch in ihrem Zellaufbau. So besitzen Eukaryoten einen Zellkern, der von einer Kernmembran umgeben ist. Außerdem sind die eukaryotische Zellen mittels Zellorganellen strukturiert, um ein reibungslo-

ses Funktionieren der zellulären Abläufe über größere Entfernungen innerhalb der Zelle zu ermöglichen. Die in dieser Arbeit wichtigen Zellorganellen sind die Plasmamembran, das Zytoplasma, der Zellkern und verschiedene Vesikel.

Die Zellwand (Plasmamembran, Abbildung 7.1) umgibt die Zelle und trennt das Innere der Zelle von der Umgebung. Sie besteht, ebenso wie die Membranhüllen einiger Zellorganellen, aus einer Lipiddoppelschicht und ist mit einer Stärke von etwa 6–10 nm lichtmikroskopisch auf Grund von Beugungseffekten höchstens als vage Linie erkennbar. Um die Lipiddoppelschicht flexibel zu halten werden ungesättigte Fettsäuren in die Membranen eingelagert.

Jede Zelle identifiziert sich mit Hilfe ihrer peripheren Proteine nach außen hin. Diese Membranproteine liegen oder “schwimmen“ auf oder in der Membran. Zusätzlich dazu hängen zur Markierung an der Außenseite der Zellmembran oft kurzkettige, teilweise bäumchenartig verzweigte Kohlenhydratverbindungen an den Proteinen und den Lipiden. Man spricht dann von Glykoproteinen bzw. Glykolipiden. Die meisten Zellen besitzen ein Membranpotential zwischen Innen und Außen. Es entsteht durch unterschiedliche Stoff- und Ladungsverteilung ein elektrochemischer Gradient.

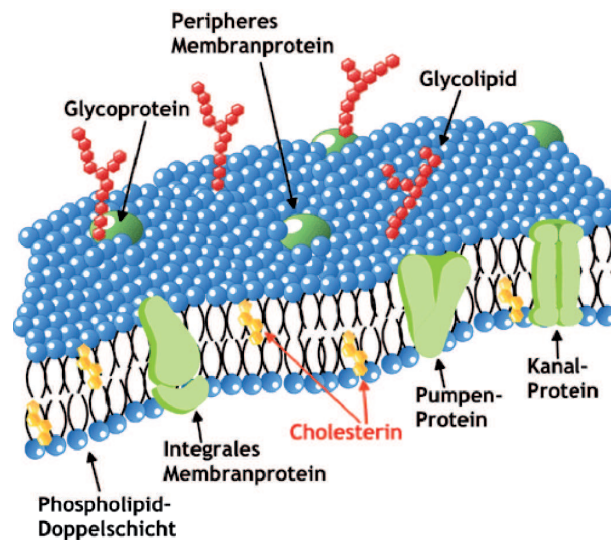


Abbildung 7.1: Die schematische Struktur einer Plasmamembran einer eukaryotischen Zelle

Als Zytoplasma wird der die Zelle ausfüllende Inhalt bezeichnet, der aus dem Zytosol (Zellmedium) besteht und dem Zytoskelett und die Organellen enthält. Es ist von der Plasmamembran eingeschlossen, wodurch die Zellen voneinander abgegrenzt Stoffwechselprozesse durchführen können. Das Zytosol besteht aus Wasser und darin gelösten Ionen, kleinen Molekülen (Aminosäuren) und größeren wasserlöslichen Molekülen, wie zum Beispiel Proteinen. Der Proteinanteil des Zytosols liegt bei 20–30%. Je nach Zelltyp befinden sich 25–50% der Gesamtproteinmenge im Zytosol.

Der Zellkern, welcher bei Säugern typischerweise einen Durchmesser von 5 bis 16 μm hat, ist das im Mikroskop am leichtesten zu erkennende Organell der Zelle. Er ist durch die Kernhülle, bestehend aus zwei biologischen Membranen, der inneren und äußeren Kernmembran, begrenzt. Zellkerne können durch Anfärben der DNA lichtmikroskopisch hervorgehoben werden, z. B. durch die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Hoechst 33342.

Je nach Art der in ihnen nachweisbaren Enzyme unterscheidet man verschiedene Typen von Vesikeln: Lysosome, Peroxisome und Mikrosome. Lysosome sind enzymhaltige Vesikel (Bläschen mit einem Durchmesser unter 100 nm [36]), die von einer Membran (einfache Lipiddoppelschicht) umschlossen sind. Meistens entstammen sie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) oder dem Golgi-Apparat (primäre Lysosomen) und dienen dem Proteintransport sowie dem Abbau von aufgenommenen Stoffen (sekundäre Lysosomen). Des weiteren gibt es sogenannte Autolysosomen, die zell eigenes Material und ganze Zellorganellen abbauen, was zur ständigen Erneuerung der Organellen und der Beseitigung überflüssiger Strukturen beiträgt. Peroxisomen sind evolutionär sehr alte Zellorganellen und gelten als die ersten Entgiftungsapparate, die mit dem Auftreten einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre erforderlich wurden. Es handelt sich um kleine (0,5 μm Durchmesser), membranumhüllte Vesikel, die sich im Zytoplasma einer Zelle befinden. In diesen räumlich abgetrennten Bereichen (Kompartimenten) können, durch die Membran geschützt, Reaktionen ablaufen, die für den Organismus, gefährlich wären, würden sie im Zytoplasma erfolgen, zum Beispiel Zerstörung von Bakterien durch Erniedrigung des pH-Wertes. Mikrosomen sind kleine (ca. 100 nm im Durchmesser) membran-begrenzte Vesikel innerhalb von Zellen. Es handelt sich um Fragmente des glatten bzw. rauen endoplasmatischen

Retikulums (ER), die z. B. auch bei der Homogenisierung von Gewebe entstehen. Die weiteren Organellen sind in Abbildung 7.2 zu sehen und sind hier nicht näher erläutert.

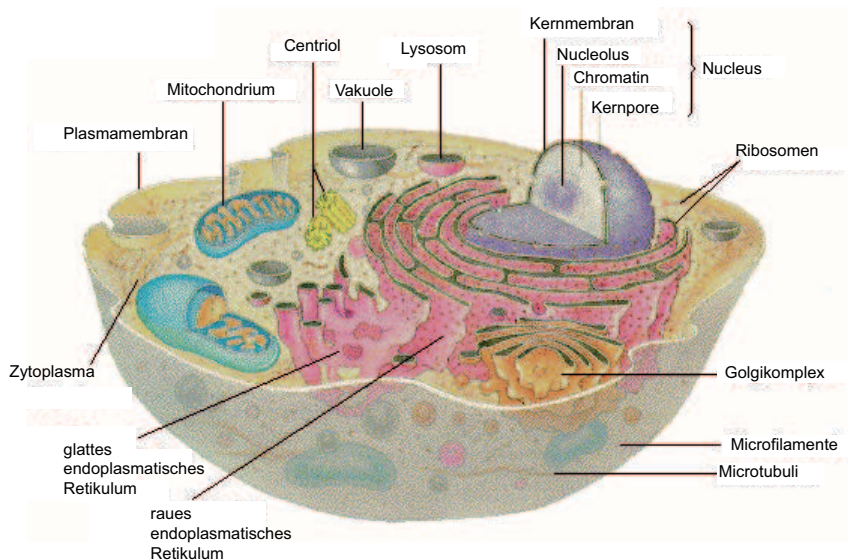


Abbildung 7.2: Struktur einer eukaryotischen, tierischen Zelle; nicht maßstabsgetreu

Lipophile und kleine, ungeladene aber polare Moleküle, wie beispielsweise Wassermoleküle, können durch Diffusion in die Zelle gelangen oder diese verlassen. Dabei folgen sie immer dem Konzentrationsgefälle, mit dem Bestreben dieses auszugleichen. Größere Moleküle wie Ionen, Zucker oder Aminosäuren, für die die Lipiddoppelschicht ohne Proteine unüberwindlich wäre, können mit Hilfe von Membrantransportproteinen aktiv oder passiv vom Inneren der Zelle nach Außen oder umgekehrt transportiert werden. Der passive Transport erfolgt dabei ohne jegliche Zuführung von Energie in die Richtung eines Konzentrations- oder Potentialgefälles.

Beim aktiven Transport können Stoffe auch gegen ein Konzentrationsgefälle durch die Membran transportiert werden, verbrauchen dann aber Energie. Die Größe der Moleküle ist dabei unwichtig. Beim primär aktiven Transport wird ein Ion durch eine sogenannte Ionenpumpe von der Seite der niedrigeren auf die Seite der höheren Konzentration gepumpt. Der sekundär aktive Transport befördert ein Ion passiv ent-

lang seines Konzentrationsgradienten und nutzt dabei die potentielle Energie dieses Gradienten aus, um ein zweites Substrat gegen dessen Konzentrationsgradienten in gleicher Richtung (Symport) bzw. in entgegengesetzter Richtung (Antiport) zu transportieren.

Die Aufnahme von Farbstoffen erfolgt bei den Zellen passiv auf Grund der Diffusion und funktioniert daher um so besser, je kleiner das Molekulargewicht des Farbstoffs ist (vgl. Kapitel 2.7) [37]. Auch die Polarität der Farbstoffmoleküle oder eine positive Ladung beschleunigen die Aufnahme der Farbstoffe. Es ist jedoch auch möglich, dass sich die Farbstoffe an Proteine binden [9] und dadurch die physikalischen Eigenschaften verändert werden, zum Beispiel eine Verringerung der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute.

Die **prokaryotischen Zellen**, zu denen die Bakterien gehören, besitzen im Gegensatz zu den eukaryotischen einen wesentlich einfacheren Aufbau. So enthalten Bakterien keinen Zellkern mit einer Kernmembran, sondern die DNA befindet sich frei im Zytoplasma als Kernäquivalent oder auch Nucleoid. Des weiteren sind prokaryotische Zellen nicht kompartimentiert und enthalten keine Organellen außer Ribosomen (Abbildung 7.3).

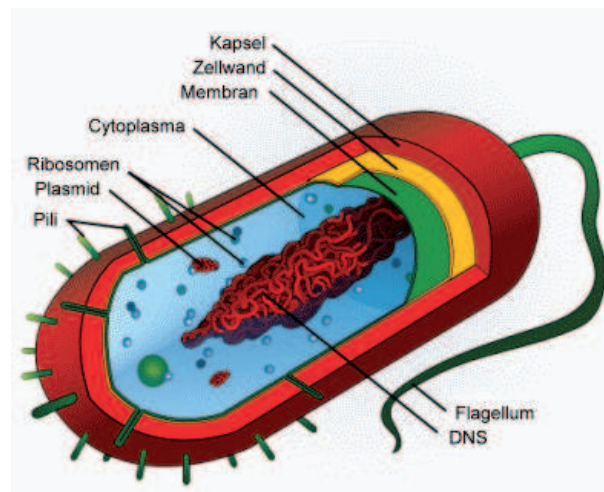


Abbildung 7.3: *Struktur einer prokaryotischen Zelle (hier: Bakterium)*

Die Plasmamembran ist ähnlich aufgebaut wie die der eukaryotischen Zellen und fungiert auch hier als selektiv-permeable Trennwand zwischen der lebenden und der

unbelebten Welt. Die Bakterien können zusätzlich noch von einer starren Zellwand umgeben sein. Weiter kann eine Kapsel als zusätzlicher Schutz vorhanden sein. Ihre Dicke kann je nach Stamm variieren und kann bei allen Gram-positiven sowie Gram-negativen Bakterien vorkommen. Man kann daher bei dünneren Schichten von einer Schleimhülle und bei dickeren Schichten von einer Kapsel sprechen. Oft sind diese Schichten sogar dicker als das Bakterium selbst.

Die Gram-Färbung ist eine Methode zur Einfärbung der Zellwand von Bakterien, so dass diese unter dem Mikroskop differenziert erscheinen. Die Gram-Färbung ist nach dem dänischen Arzt und Bakteriologen Hans Christian Gram benannt, der sie ca. Ende des 19. Jahrhunderts entwickelte. Verschiedene Bakterien reagieren auf diese Färbung unterschiedlich. Daraus folgt eine Einteilung in sog. Gram-positive Bakterien, die violett/blau erscheinen, und Gram-negative Bakterien, die eine rote Färbung zeigen. Dies ist ein wichtiges Kriterium für die Unterscheidung verschiedener Bakterien, z.B. bei der Diagnostik von Infektionskrankheiten. Gram-positive und Gram-negative Bakterien reagieren unterschiedlich auf Antibiotika. Mit dieser schnellen diagnostischen Methode kann man in kurzer Zeit (ca. 5 Minuten) anhand eines Abstrichs das Gram-Verhalten der Bakterien bestimmen. Damit hat man die Möglichkeit, sofort mit einer antibiotischen Therapie zu beginnen, bevor das Ergebnis der, oft mehrere Tage dauernden definitiven Keimbestimmung vorliegt.

In dieser Arbeit wurden sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien untersucht. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sind kugelförmige, Gram-positive Bakterien, die häufig in Trauben angeordnet sind. Sie sind unbeweglich und bilden keine Sporen. Die Größe des Bakteriums liegt üblicherweise zwischen 0,8 und 1,2 μm . *Staphylococcus aureus* zählt zu den häufigsten Erregern im Krankenhaus erworbener Infektionen. Der Erreger ist äußerst widerstandsfähig gegen Einflüsse wie Austrocknung und kann eine Reihe von Resistenzen gegen über Antibiotika aufweisen.

In Abbildung 7.4 A ist die umgebende Membran der Gram-positiven Bakterien schematisch dargestellt. Als Basis dient, wie bei den eukaryotischen Zellen, die Plasmamembran aus einer Lipiddoppelschicht, die das Zytoplasma einschließt. In dieser inneren Membran werden Proteine ein- und angelagert, die unterschiedlich weit in sie hinein- oder sogar durch sie hindurch reichen. Gram-positive Bakterien besitzen

zusätzlich eine etwa 15 - 80 nm dicke Zellwand, bestehend aus bis zu 100 Schichten von Peptidoglykanen (Zucker-Eiweiß-Moleküle), in welche Teichonsäuren, mit und ohne Lipidanteil, vernetzt sind. Proteine sind mit in die Peptidoglykanschichten eingebettet.

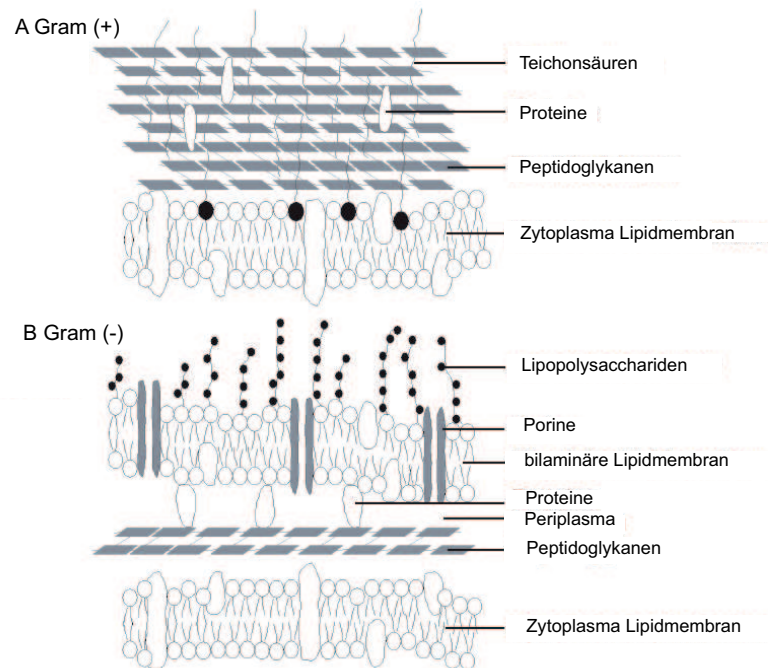


Abbildung 7.4: Schematischer Aufbau der Bakterien umgebenden Zellwand von (A) Gram-positiven und (B) Gram-negativen Bakterien [52]

Escherichia coli ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges und begeißeltes Bakterium, das im menschlichen und tierischen Darm vorkommt und wichtige Funktionen im Immunsystem hat. Es gehört zur Familie der Enterobacteriaceae (lat. enteron: Darm). Weiter gehört es zu den fakultativ anaeroben Mikroorganismen und besitzt daher die Fähigkeit, Energie sowohl durch Atmung als auch durch gemischte Säuregärung zu gewinnen. Es dient als Indikator für fäkale Verunreinigungen, beispielsweise von Wasser. Es verursacht ein dauerndes Training des Mukosa-Immunsystems und fördert die Produktion von sekretorischem Immunglobulin A. Weiterhin produziert es Vitamin K. In Abbildung 7.4 B ist die umgebende Membran der Gram-negativen Bakterien schematisch dargestellt. Neben der Plasmamembran

besitzen diese Bakterien auch eine Zellwand, welche hier zwischen 10 und 15 nm dick ist. *E. coli* besitzt eine dünne, innere Zellwand bestehend aus 2 - 3 Schichten von Peptidoglykanen, einem periplasmatischen Raum und eine äußere bilaminäre Lipidmembran. Die äußere Doppelmembran besteht auf der Innenseite aus Phospholipiden, die über Lipoproteine mit der angrenzenden bilaminären Lipidmembran verbunden sind. Die Außenseite besteht aus Lipopolysacchariden und Porinen (Tunnelproteine).

In Tabelle 7.1 sind noch einmal die wichtigsten Unterschiede der vier verschiedenen Zelltypen dargestellt.

	Prokaryoten		Eukaryoten	
	<i>S. Aureus</i>	<i>E. Coli</i>	HT29	NHEK
Größe	1 μm	3 μm	20-30 μm	
Eigenschaften	Gram-positiv	Gram-negativ	proteinarmer Membran	
Gene	2334	4288	ca. 30.000	
Vielzelligkeit	-		+	
Kern	-		+	
Organellen	-		+	

Tabelle 7.1: Übersicht über die Eigenschaften der verschiedenen Zelltypen

7.1.2 Herstellung der Zell- und Bakteriensuspensionen für Lokalisations- und Lumineszenzmessungen

Zur Herstellung von Zellsuspensionen wurden immortalisierte Kolonkarzinom-Zellen (HT29, Tumor des Dickdarms [63]) und Normale Humane Epidermale Keratinozyten (NHEK) verwendet. Zum einen werden Kolonkarzinome unter Verwendung von Photofrin als Photosensibilisator mit Hilfe der PDT behandelt, zum anderen weisen HT29-Zellen, verglichen mit anderen Zellstämmen, eine relativ niedrige Protein-Konzentration in den Membranen auf. Die Keratinozyten wurden untersucht, da die am häufigsten durch die PDT behandelten Erkrankungen karzinogene

Veränderungen der Haut (Keratinozyten) sind.

Die verwendeten HT29- und NHEK-Zellen wurden in Gewebekulturschalen (Falcon, Franklinlakes, USA) unter Standardkulturbedingungen (37°C, 5% CO₂ in H₂O-gesättigter Atmosphäre) in sterilen Brutschränken gezüchtet [4].

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von XF73 und TMPyP in HT29-Zellen und Keratinozyten wurden Kolokalisationsaufnahmen der Fluoreszenz von XF73, TMPyP und eines weiteren Organellfarbstoffs unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops (siehe Abbildung 3.8) gemacht. Dazu wurden die Zellen in Kulturschalen unter Standardkulturbedingungen (siehe vorher) auf Mikroskop-Objektträgern gezüchtet. Für die Inkubation der HT29-Zellen mit Organellfarbstoffen wurde eine Lösung des jeweiligen Farbstoffs in Medium hergestellt und für die jeweilige Inkubationsdauer auf den Zellen belassen. Da für den verwendeten Organellfarbstoff und für die Photosensibilisator TMPyP bzw. XF73 Inkubationszeiten zwischen 10 und 60 Minuten verwendet wurden, musste der Startpunkt der Inkubation so gewählt werden, dass die Inkubationszeiten zum gleichen Zeitpunkt endeten. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde der Überstand des Mediums abgesaugt und die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen. Zum Einfärben des Zellkerns wurde Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet. Bei ihm handelt es sich um einen weit verbreiteten Farbstoff, der sehr leicht in lebende Zellen eindringt und nach Bindung an die DNA blau fluoresziert. Die Inkubationszeit betrug zehn Minuten mit einer Inkubationskonzentration von 2 μ M.

Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurden *S. aureus* (ATCC 25923, Gram-positive Bakterien) und *E. coli* (ATCC 25922, Gram-negative Bakterien) in gleicher Weise behandelt, unter Verwendung von TMPyP und XF73 als Photosensibilisator. Die Bakterienstämme wuchsen aerob bei 37°C über Nacht in einem Schikanekolben. Nachdem die Bakterien die stationäre Phase (kein weiteres Wachstum) erreichten, wurde die Bakteriensuspension in eine Zentrifuge eingebracht. Bei 200 g für 15 Minuten setzten sich die Bakterien ab und der Überstand wurde abgesaugt. Mit einer 10 mM phosphatgepufferten, physiologischen Salzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 7,4, wurden die Bakterien gespült. Anschließend wurden die Bakterien in PBS suspendiert bis die optische Dichte etwa eine Anzahl von 10⁸ Bakterien pro Milliliter

entsprach (McFarland-Standard).

Um ein reproduzierbares Maß für die Anzahl der Bakterien pro Milliliter zu erhalten, wurde bei den Proben für die Lumineszenzmessungen die BCA-Methode zur Konzentrationsbestimmung gewählt. Dabei handelt es sich um einen sehr empfindlichen Proteinnachweis. Um sicher zu stellen, dass neben dem Farbstoff keine andere Substanz Singulett-Sauerstoff generiert, wurden Kontroll-Messungen an Zellen und Bakterien ohne Photosensibilisator durchgeführt. Erwartungsgemäß erzeugten diese Kontroll-Messungen bei der Anregungswellenlänge von 532 nm kein Lumineszenzsignal.

7.2 TMPyP in eukaryotischen Zellen

7.2.1 Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen

Bereits in früheren Arbeiten [5] wurde die Lokalisation des Farbstoffs Photofrin in HT29-Zellen bestimmt. In dieser Arbeit wurden nun weitere Farbstoffe wie TMPyP und XF73 bezüglich ihrer Anreicherung in HT29-Zellen und Keratinozyten untersucht. Dabei wurden für die neu untersuchten Farbstoffe kürzere Inkubationszeiten verwendet (max. 60 Minuten) als beim Photofrin (90 Minuten und 24 Stunden).

Die Lokalisation des Farbstoffs TMPyP ist in diesem Abschnitt in Falschfarbendarstellung gezeigt. Dabei wurde zusätzlich zu TMPyP zur bessern Orientierung innerhalb der Zelle der Farbstoff Hoechst 33342 zugesetzt, der sich im Zellkern lokalisiert und in allen folgenden Abbildungen blau dargestellt ist. Die Farbe Rot zeigt die Fluoreszenz von TMPyP und damit die subzelluläre Lokalisation dessen an. Die Falschfarbenbilder entstehen durch die Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzbilder von TMPyP und Hoechst 33342 und einer Durchlichtaufnahme. Sie zeigen die Lokalisation der unterschiedlichen Farbstoffe und kleinere Strukturen innerhalb der Zellen, die auf Grund der begrenzten Auflösung von ca. 1 μm nicht weiter analysiert werden können.

In Abbildung 7.5 A sind die kombinierten Aufnahmen von HT29-Zellen und in Abbildung 7.5 B die von Keratinozyten zu sehen, die mit 250 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP für 60

Minuten inkubiert wurden. TMPyP befindet sich sowohl bei HT29-Zellen, als auch bei den Keratinozyten im Zytoplasma der Zellen und ist teilweise in nicht näher analysierten Vesikeln konzentriert. Eine Anreicherung in der Plasmamembran oder im Zellkern kann ausgeschlossen werden, da keine Fluoreszenz aus dem Zellkern oder den Membranen beobachtet wurde. Eine längere Inkubation oder höhere Konzentrationen der Inkubationslösung zeigen keine Veränderung in der Lokalisation.

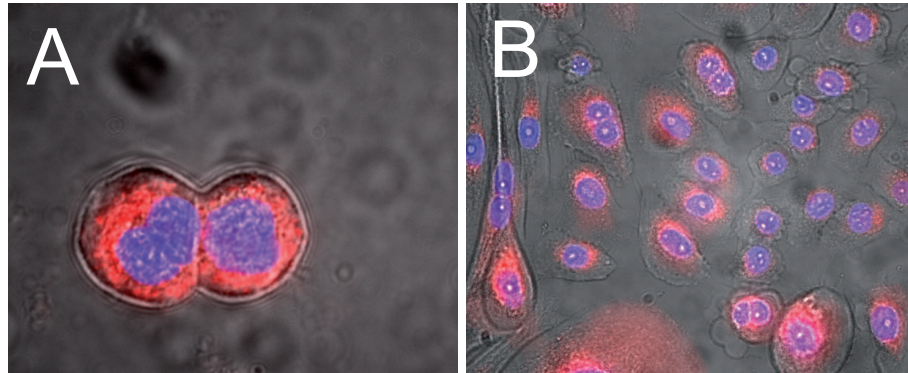


Abbildung 7.5: Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von HT29-Zellen (A) und Keratinozyten (B) nach 60 Minuten TMPyP-Inkubation; als Marker wurde zusätzlich Hoechst 33342 verwendet, um die Zellkerne anzufärben.

7.2.2 Lumineszenzmessungen

Für die Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz wurde eine HT29-Zellsuspension, die für 60 Minuten mit TMPyP inkubiert wurde, in eine Quarzglasküvette gefüllt, die dann in den Aufbau aus Kapitel 3 gestellt wurde. Die Laserleistung zur optischen Anregung von TMPyP in Zellsuspension betrug 100 mW, bei einer Wellenlänge von 532 nm und einer Wiederholfrequenz von 2 kHz. Für die Einzelmessungen wurden zwischen 40.000 und 60.000 Laserpulse benötigt.

Zusätzlich zur Aufnahme der Lumineszenz wurde erstmals bei Messungen dieser Art die Sauerstoff-Konzentration in der Suspension vor und während der Bestrahlung gemessen. Abbildung 7.6 zeigt zwei Lumineszenzsignale von Suspensionen mit ca. $4 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen.

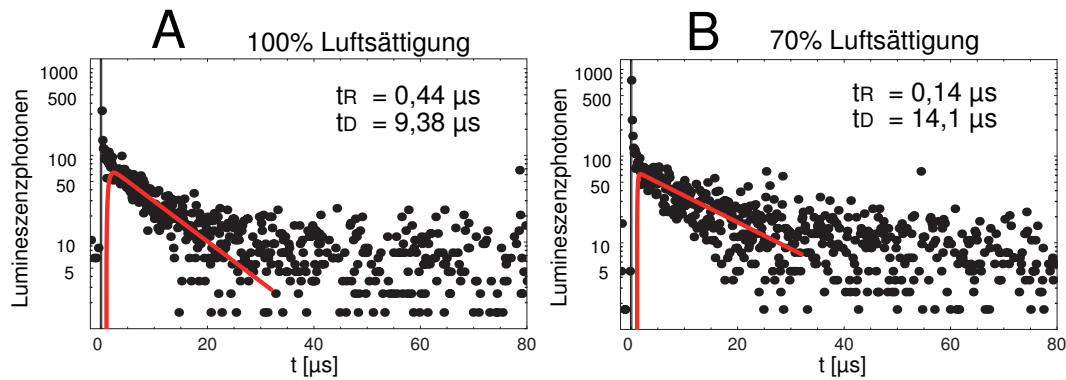


Abbildung 7.6: Lumineszenzsignale aus HT29-Zellen inkubiert für 60 Minuten mit TMPyP bei 100% Sauerstoff-Luftsättigung (A) und 70% Sauerstoff-Luftsättigung

Im linken Bild beträgt die Sauerstoff-Konzentration außerhalb der Zellen 100% der Luftsättigung, im rechten Bild nur 70% der Luftsättigung. Angesichts des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses kann nur die Abklingdauer des Signals eindeutig bestimmt werden und beträgt bei 100% Luftsättigung $(9,4 \pm 0,9) \mu\text{s}$ und bei 70% $(14 \pm 1) \mu\text{s}$. Da TMPyP im Zytoplasma lokalisiert ist, das überwiegend aus Wasser und Proteinen (Quencher) besteht, wird davon ausgegangen, dass die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer kürzer als die in reinem Wasser ist, also unter $3,5 \mu\text{s}$ und somit $K_{\Delta} > K_{T_1}$ gilt und man sich weit links vom Schnittpunkt ($K_{\Delta} = K_{T_1}$) (vgl. Kapitel 4.3) befindet. Damit ist eine eindeutige Zuordnung der Raten β_1 und β_2 möglich und es gilt:

$$\beta_2 = K_{T_1} = k_{T_1} + (k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta})[O_2] + k_{T_1 S_0}[P] + k_{T_1 Q}[Q] \quad (7.1)$$

$$\beta_1 = K_{\Delta} = k_{\Delta} + (k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1})[P] + k_{\Delta Q}[Q]. \quad (7.2)$$

Die Abklingdauer des Lumineszenzsignals entspricht somit der Farbstoff- T_1 -Abklingdauer, was durch die Abhängigkeit der Lumineszenz-Abklingdauer von der Sauerstoff-Konzentration bestätigt wird. Für die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer kann kein Wert angegeben werden, da keine verlässliche Anstiegszeit in den Lumineszenzsignalen ermittelt werden kann. Abschätzungsweise liegt sie aber unter $0,5 \mu\text{s}$.

Die geringe Signalintensität führt dazu, dass die Lumineszenzsignale bei noch niedrigeren Sauerstoff-Konzentrationen in der Suspension auf Grund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses nicht ausgewertet werden können. Dies kann mehrere Ursachen haben:

1. Die HT29-Zellen haben zu wenig TMPyP aufgenommen und es wurde somit zu wenig Signal während der Bestrahlung generiert;
2. die Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz wurde durch eine zu hohe Protein-Konzentration gequenchet;
3. die Sauerstoff-Konzentration in den Zellen nimmt zu schnell ab, um ein ausreichend hohes Lumineszenzsignal zu generieren.

Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen jedoch, dass der Farbstoff TMPyP in die Zellen aufgenommen wurde und in diesen im Zytoplasma lokalisiert ist. Diese Aufnahmen werden durch die detektierten Lumineszenzsignale bestätigt, da durch die Proteine im Zytoplasma und den dadurch resultierenden Sauerstoffverbrauch bei Singulett-Sauerstoff-Erzeugung, die Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz nur sehr gering sein sollte. Außerdem ist die Sauerstoff-Diffusion ins Innere der Zelle zu langsam, um den Verbrauch während der Bestrahlung auszugleichen. Somit wird wohl Singulett-Sauerstoff zu stark gequenchet und die Sauerstoff-Konzentration nimmt zu schnell ab, um ein ausreichend hohes Signal zu erhalten.

Eine weitere Variation der Sauerstoff-Konzentration oder die Zugabe von Singulett-Sauerstoff-Quenchern wurde in dieser Messreihe daher nicht durchgeführt, da keine besseren Signale zu erwarten waren, die eine genauere Bestimmung der Raten zulassen würden.

7.3 XF73 mit Zellen

7.3.1 Fluoreszenzaufnahmen

Bei der Inkubation von HT29- und NHEK-Zellen mit XF73 zeigte sich wie bei TMPyP eine Aufnahme in das Zytoplasma, es wurde jedoch ebenfalls die Zellmembran gefärbt. Dies ist deutlich zu erkennen in den reinen Fluoreszenzaufnahmen (ohne Durchlichtaufnahmen) von HT29-Zellen und NHEK-Zellen mit XF (Abbildung 7.7).

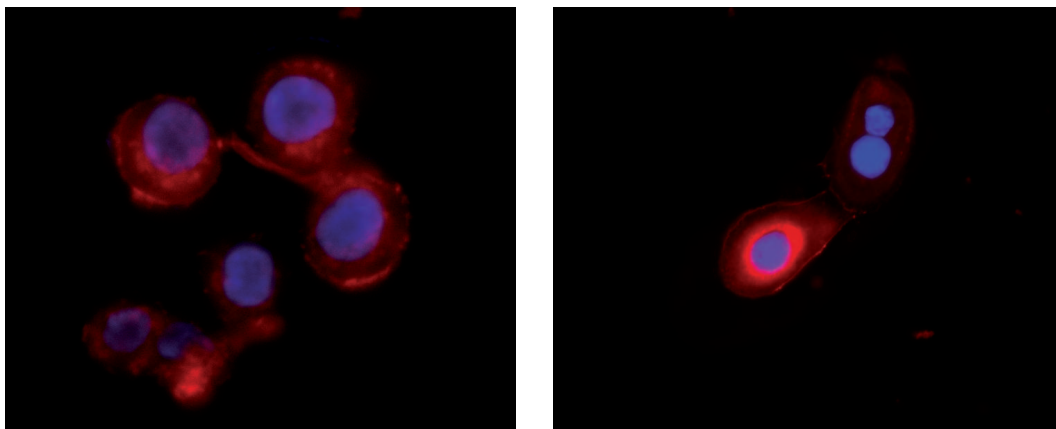


Abbildung 7.7: *Fluoreszenzaufnahme von HT29-Zellen (A) und Keratinozyten (B) nach 15 Minuten XF73-Inkubation; eine Anfärbung der Plasmamembran ist festzustellen; es wurde wiederum der Zellkern durch Hoechst 33342 angefärbt (blau)*

7.3.2 Lumineszenzmessungen

Zur Bestimmung der Anstiegs- und Abklingraten in einer HT29-XF73-Suspension wurden die Lumineszenzsignale bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen aufgenommen. Dazu wurde die Suspension bei 532 nm mit 100 mW für 10 Sekunden (20.000 Laserpulse) bestrahlt. Abbildung 7.8 zeigt fünf Lumineszenzsignale bei unterschiedlichen Sauerstoff-Konzentrationen außerhalb der Zellen.

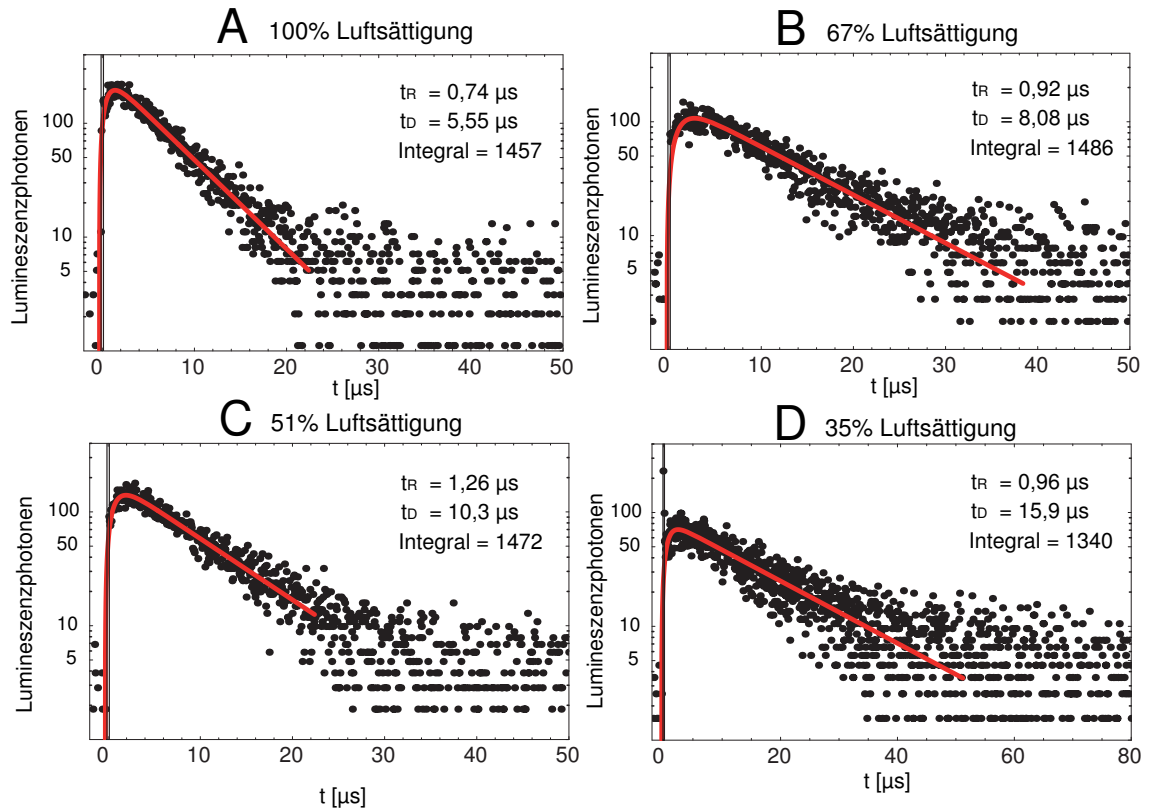


Abbildung 7.8: Lumineszenzsignale aus HT29-Zellen inkubiert für 15 Minuten mit XF bei 100% (A), 67% (B), 51% und 35% Sauerstoff-Luftsättigung

Wie bereits bei den Fluoreszenzaufnahmen zu sehen war, lagert sich XF73 nicht nur im Zytoplasma der HT29-Zellen ein, wie TMPyP, sondern auch in der Zellmembran. Dadurch wurde insgesamt mehr Farbstoff aufgenommen und auch an Stellen, an denen die Protein-Konzentration nicht so groß ist wie im Plasma. Somit konnten wesentlich bessere Signale – das Integral über alle Lumineszenzphotonen steigt von ca. 500 bei TMPyP auf ca. 1500 bei XF73 – in einer kürzeren Zeit – nur noch 10 Sekunden statt 20 – aufgenommen werden. Durch die kürzere Bestrahlungszeit, wurde auch weniger Sauerstoff verbraucht, wodurch die Veränderungen der Raten während der Messung geringer wurden. Somit ist es bei diesen Aufnahmen möglich auch die Anstiegszeit bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen zu bestimmen. In Abbildung 7.8 ist wie bei der Verwendung von TMPyP eine Zunahme der Abklingdauer der Lumineszenz bei sinkender Sauerstoff-Konzentration in der Suspension zu erkennen. Die Anstiegsdauer bleibt bei allen Messungen in etwa gleich und kann als

unabhängig von der Sauerstoff-Konzentration betrachtet werden. Für eine genauere Betrachtung sind alle aufgenommenen Raten von HT29-XF-Suspensionen gegen die gemessene Sauerstoff-Konzentration in Abbildung 7.9 aufgetragen.

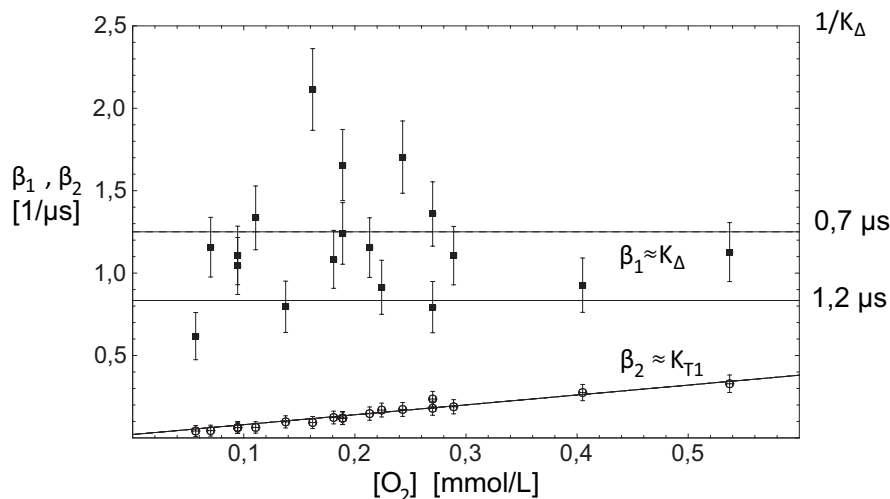


Abbildung 7.9: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Sauerstoff-Konzentration bei HT29-Zellen für 15 Minuten mit XF73 inkubiert; zusätzlich werden die Abklingzeiten des Singulett-Sauerstoff angegeben

Im weiteren Verlauf wurden die Messungen bei Sauerstoff-Konzentrationen bis zum doppelten Wert der Luftsättigung in der Suspension durchgeführt, um auch in den Zellen einen erhöhten Sauerstoff-Partialdruck zu erhalten und um über einen größeren Bereich messen zu können. Dazu wurde statt Stickstoff Sauerstoff durch die Suspension geleitet.

Auf Grund der verbesserten Detektion und dem Einsatz eines neuen Farbstoffs gelingt es nun erstmals die Anstiegs- und Abklingdauer von Lumineszenzsignalen aus Zellen in Abhängigkeit von der umgebenden Sauerstoff-Konzentration in einem Stern-Volmer-Plot aufzutragen. Dabei zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Rate β_2 und der Sauerstoff-Konzentration außerhalb der Zellen, wohingegen die Rate β_1 der verschiedenen Messungen zwar schwankt, aber unabhängig von der Sauerstoff-Konzentration scheint. Dies ermöglicht eine Zuordnung der Raten wie bei TMPyP, nur dass diesmal die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer besser bestimmt werden kann. Die Rate β_1 entspricht wieder der Abklingrate des Singulett-Sauerstoffs

K_{Δ} und ermöglicht die Abschätzung der Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer in Zellen von $(1,0 \pm 0,2) \mu\text{s}$. Dies legt wieder eine hohe Fettsäure- bzw. Protein-Konzentration nahe, wodurch die Abklingdauer des Singulett-Sauerstoffs stark verkürzt wird. Der Rate β_2 kann die Abklingrate des Farbstoff-Triplett-Niveaus K_{T_1} zugeordnet werden, was durch die Sauerstoffabhängigkeit (vgl. Gleichung 2.13) bestätigt wird.

7.4 TMPyP und XF73 in Bakterien

7.4.1 Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen

Im Gegensatz zu den Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen bei den Zellen war es bei Bakterien auf Grund des begrenzten Auflösungsvermögens optischer Mikroskope nicht möglich Strukturen in den Bakterien zu erkennen, da die Bakterien selbst nur etwa 1-3 μm groß sind, was dem Auflösungsvermögen optische Mikroskope entspricht. Eine Aufnahme des Farbstoffs ließ sich allerdings feststellen. Hierfür wurden Suspensionen von *S. aureus* und *E. coli* mit 10^8 Bakterien pro Milliliter mit 250 $\mu\text{mol/L}$ TMPyP für 60 Minuten inkubiert. Nach einem Waschgang, um den nicht gebundenen Farbstoff zu entfernen, wurden die Bakterien in PBS resuspendiert. Anschließend wurde jeweils ein Tropfen auf einen Objektträger aufgebracht und unter dem Mikroskop betrachtet.

In Abbildung 7.10 sind die Aufnahmen von *S. aureus* und *E. coli* mit TMPyP gezeigt. Bei *S. aureus* sind einzelne Bakterien zu erkennen, sowie die Fluoreszenz von TMPyP (rot). Bei *E. coli* sind Zusammenballungen von Bakterien zu sehen, die ebenfalls TMPyP aufnehmen und daher die Fluoreszenz in Falschfarbendarstellung gezeigt werden kann.

Ebenso wie bei den Aufnahmen bei TMPyP-inkubierten Bakterien wurden die gleichen Bakterienstämme nun mit nur 10 $\mu\text{mol/L}$ XF73 für 15 Minuten inkubiert, gewaschen und anschließend in PBS resuspendiert.

Abbildung 7.11 zeigt die Aufnahmen von *S. aureus* und *E. coli* mit XF73. Es ist zu erkennen, dass beide Bakterienstämme den Farbstoff XF73 aufnehmen können, das Gram-negative *E. coli*-Bakterium jedoch deutlich schlechter.

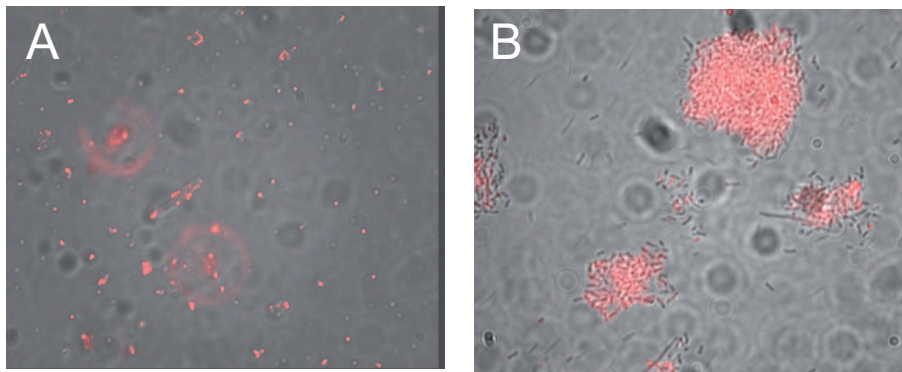


Abbildung 7.10: *Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von *S. aureus* (A) und *E. coli* (B) nach 60 Minuten TMPyP-Inkubation*

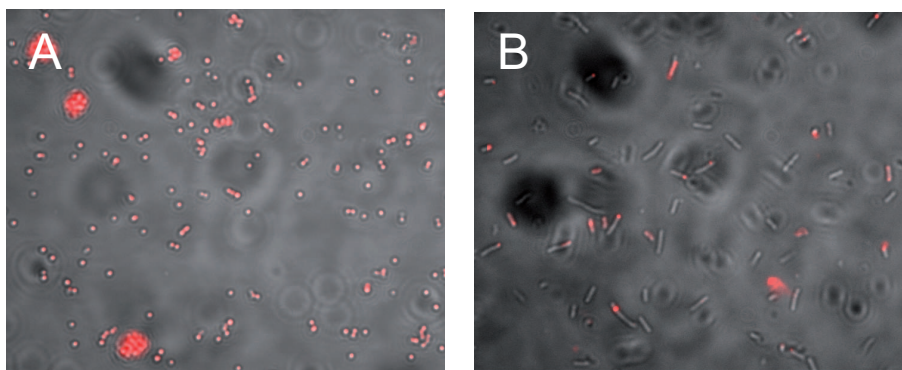


Abbildung 7.11: *Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von *S. aureus* (A) und *E. coli* (B) nach 15 Minuten XF73-Inkubation*

7.4.2 Lumineszenzmessungen

Es wurden Lumineszenzmessungen an Suspensionen mit je einem Bakterienstamm (*S. aureus* oder *E. coli*) und je einem Farbstoff (XF73 oder TMPyP) untersucht. Es ergaben sich daher vier mögliche Kombinationen, deren verschiedene Lumineszenzsignale bei Luftsättigung in der Abbildung 7.12 abgebildet sind. Dabei wurden je Suspension 10^8 Bakterien pro Milliliter eingesetzt, die vorher für 60 Minuten mit TMPyP, bzw. für 15 Minuten mit XF73 inkubiert wurden. Die Suspensionen wurden mit einem Magnetrührer durchmischt und bei 532 nm mit 70 mW für 20 Sekunden (40.000 Laserpulse) bestrahlt.

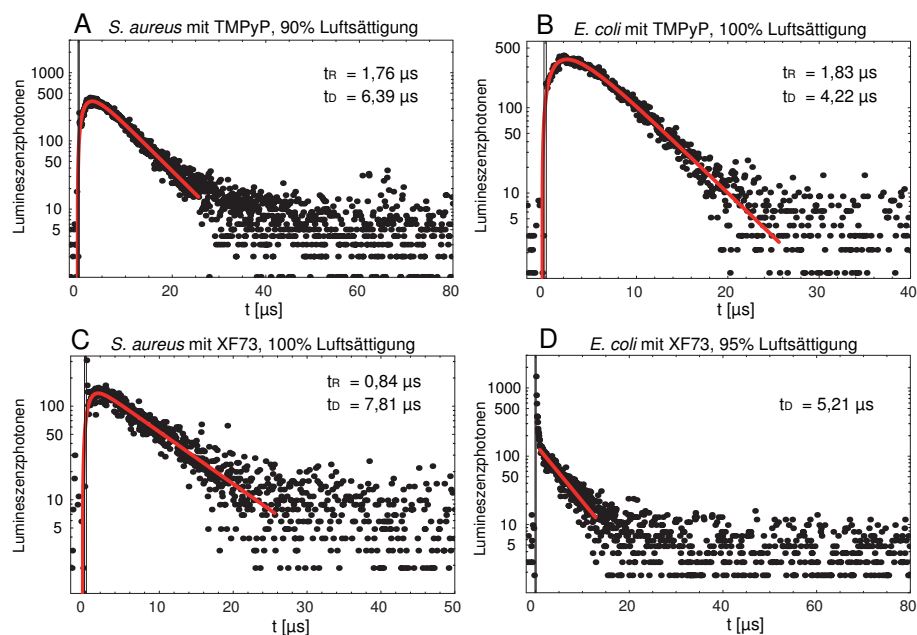


Abbildung 7.12: Lumineszenzsignale aus *S. aureus* (A) und *E. coli* (B) nach 60 Minuten TMPyP-Inkubation bei 90%, bzw. 100% Sauerstoff-Luftsättigung und aus *S. aureus* (C) und *E. coli* (D) nach 15 Minuten XF73-Inkubation bei 100%, bzw. 95% Sauerstoff-Luftsättigung

Alle Abbildungen stellen Einzelmessungen dar und repräsentieren nur einen Teil der aufgenommenen Signale. Da alle Suspensionen nach der ersten Lumineszenzmessung weiter bestrahlt wurden, nahm der Sauerstoff-Gehalt in der Lösung kontinuierlich ab, so dass Lumineszenzsignale bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen aufgenommen werden konnten. Zusätzlich zu den Lumineszenzsignalen wurde während der gesamten Bestrahlungsdauer die Sauerstoff-Konzentration außerhalb der Bakterien erfasst.

Im Gegensatz zu den Experimenten mit Eukaryoten kann bei den Bakterien keine Information über die Farbstoff-Lokalisation durch die Fluoreszenzmikroskopie erhalten werden, nur aus den Unterschieden bei den Lumineszenzsignalen können eventuelle Unterschiede in der Lokalisation festgestellt werden. Bei den Bakterien-Farbstoff-Kombinationen *S. aureus*-TMPyP, *E. coli*-TMPyP und *S. aureus*-XF73 können die Anstiegs- und Abklingraten bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen gut bestimmt werden, lediglich bei der Kombination XF73 mit *E. coli*-Bakterien lässt sich nur die Abklingdauer der Lumineszenz feststellen. Da nun die Lumineszenzmessun-

gen auch bei TMPyP auswertbare Signale liefern, lässt vermuten, dass der Farbstoff nicht mehr im Zytoplasma lokalisiert ist (vgl. Abb. 7.6) oder dass die Sauerstoff-Konzentration am Ort des Farbstoffs höher ist und dadurch mehr Singulett-Sauerstoff generiert wird.

Ein Vergleich aller detektierten Lumineszenzsignale erfolgt in Abbildung 7.13. In den vier Stern-Volmer-Plots ist die Abhängigkeit der Anstiegs- und Abklingraten von der Sauerstoff-Konzentration dargestellt, soweit die Lumineszenzsignale auswertbare Ergebnisse lieferten.

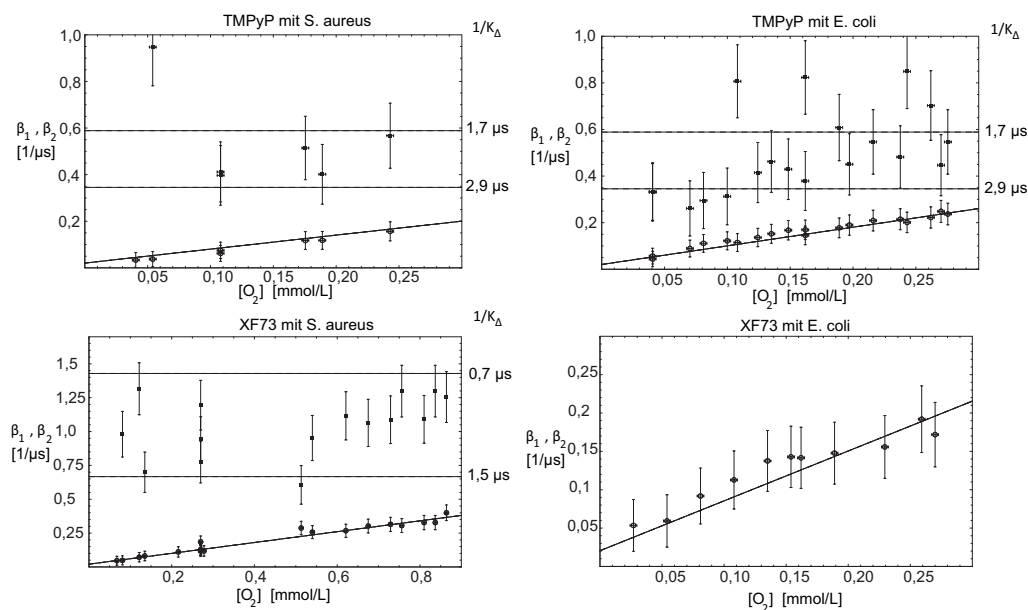


Abbildung 7.13: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) aus der Variation der Sauerstoff-Konzentration bei *S. aureus* (A) und *E. coli* (B) nach 60 Minuten TMPyP-Inkubation und bei *S. aureus* (C) und *E. coli* (D) nach 15 Minuten XF73-Inkubation; zusätzlich werden die Abklingzeiten von Singulett-Sauerstoff angegeben

Bei den mit TMPyP inkubierten Bakterien *S. aureus* und *E. coli* zeigt sich bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen eine in etwa gleichbleibende Rate β_1 , der K_Δ zugeordnet werden kann. Es ergibt sich daraus eine Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer zwischen 1,7 und 2,9 μs , die wieder auf das Vorhandensein von Quenchern hinweist, da sie unter der Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer in Wasser (3,5 μs) liegt.

Für die Abklingdauer der Lumineszenz kann eine eindeutige Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration nachgewiesen werden, so dass die Rate β_2 der Rate K_{T_1} entspricht.

Bei den mit XF73 inkubierten Bakterien konnte nur für *S. Aureus* eine Anstiegszeit der Lumineszenz bestimmt werden, die wieder unabhängig von der Sauerstoff-Konzentration ist und der Rate K_Δ entspricht. Für die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer ergeben sich Werte zwischen 0,7 und 1,5 μs . Diese Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer ist noch kürzer als die beim Einsatz von TMPyP bei *S. aureus*. Da die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer unabhängig von der Sauerstoff-Konzentration in den Bakterien ist, hängt sie nur von der Quencher-Konzentration ab. Die Unterschiede in der Abklingdauer weisen daher auf eine unterschiedliche Lokalisation hin; XF73 ist dabei an Stellen lokalisiert, an denen der Singulett-Sauerstoff besser durch zelleigene Substanzen, wie Proteine und Fettsäuren, gequencht wird.

Bei den Messungen mit *S. aureus* wurde durch die Suspension zusätzlich Sauerstoff geleitet, so dass sich Konzentrationen bis zum dreifachen Wert der Luftsättigung ergeben. Selbst bei diesen hohen Konzentrationen beträgt die Abklingdauer der Lumineszenz immer noch mehr als 3,5 μs , so dass ein Vertauschen der Bedeutung der Raten während der Variation der Sauerstoff-Konzentration ausgeschlossen werden kann und der Rate β_2 die Rate K_{T_1} zugeordnet wird.

Für die *E. coli*-XF73-Suspensionen können keine Anstiegszeiten bestimmt werden, da diese zu stark durch den Laserpuls überlagert werden. Eine Bestimmung der Abklingdauer der Lumineszenz ist allerdings möglich, wobei diese wieder eine Sauerstoffabhängigkeit zeigt, wie in Abbildung 7.13 D zu sehen ist. Auf Grund der Sauerstoffabhängigkeit ist der Abklingrate der Lumineszenz β_2 wieder die Farbstoff-Triplett-Abklingrate K_{T_1} zugeordnet. Somit kann durch den fehlenden Anstieg angenommen werden, dass der Erzeugte Singulett-Sauerstoff sehr stark gequencht wird, also am Ort der Sauerstoff-Farbstoff-Interaktion sehr hohe Protein-Konzentrationen vorliegen. Ein Vergleich mit den Signalen von TMPyP in *E. coli* legt nahe, dass XF73 an anderen Orten lokalisiert ist, da der Singulett-Sauerstoff wesentlich stärker gequencht wird.

7.5 Sauerstoffverbrauch

Zusätzlich zu den Lumineszenzsignalen wurde bei allen Bestrahlungen die Sauerstoffkonzentration in den Suspensionen mitgemessen. Da eine kontinuierliche Bestrahlung erfolgte, sollte auch die Sauerstoff-Konzentration stetig abnehmen. Es wurden bei beiden Bakterienstämmen die Sauerstoff-Konzentrationen ohne Bestrahlung und ohne Inkubation aufgenommen, um feststellen zu können wie viel Sauerstoff nur durch die Zellatmung der Bakterien verbraucht wird. In Abbildung 7.14 ist der Sauerstoff-Gehalt in den verschiedenen Kombinationen aus Farbstoff und Bakterien-Suspensionen dargestellt.

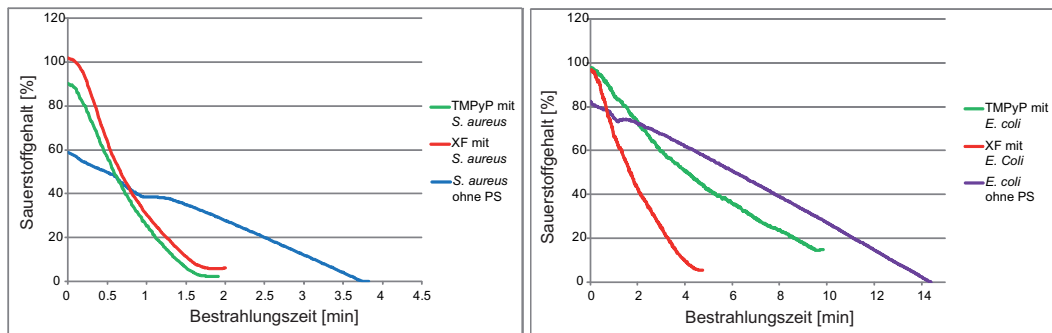


Abbildung 7.14: Der Sauerstoffverbrauch von *S. aureus* (A) und *E. coli* (B) mit TMPyP und XF73 inkubiert unter Bestrahlung bei 532 nm und der Sauerstoffverbrauch von nicht inkubierten Bakterien als Kontrolle

Es zeigt sich in der linken Abbildung, dass sowohl bei TMPyP, als auch bei XF73 inkubierten *S. aureus* der Sauerstoffverbrauch während der Bestrahlung gegenüber dem reinen Verbrauch durch aerobes Wachstum (Stoffwechselaktivität) beschleunigt ist. Beide Verbrauchskurven haben in etwa den gleichen Verlauf, so dass ein nahezu gleicher Verbrauch angenommen werden kann. Bei *E. coli* (rechts) zeigt sich auch bei beiden Stämmen ein beschleunigter Verbrauch gegenüber dem aeroben Wachstum, jedoch unterscheiden sich die Geschwindigkeiten bei den Farbstoffen. So ist der Verbrauch bei XF73 in etwa doppelt so hoch wie bei TMPyP, obwohl gleiche Mengen an Farbstoff in der Inkubationslösung vorhanden waren und TMPyP sogar viermal länger inkubiert wurde. Somit wird XF73 entweder schneller und besser von den

Bakterien aufgenommen oder die Singulett-Sauerstoff-Generierung läuft wesentlich besser ab.

Auch bei Experimenten zur Bestimmung der Toxizität der Farbstoffe konnte mit XF73 eine signifikant bessere Keimabtötung erreicht werden, als mit TMPyP (Daten nicht gezeigt).

7.6 Interpretation der Messergebnisse bei Eukaryoten und Prokaryoten

Erstmals wurde in dieser Arbeit die Sauerstoff-Konzentration in Zell- und Bakterien-Suspensionen bestimmt und die Abhängigkeit des Lumineszenzsignals von dieser. Dies zeigt einen Zusammenhang zwischen der Sauerstoff-Konzentration außerhalb der Zellen und dem Abklingverhalten der Lumineszenz, das durch die Sauerstoff-Konzentration in den Zellen beeinflusst wird.

Aus den Abklingzeiten der verschiedenen Lumineszenzsignale kann wieder auf die lokale Sauerstoff-Konzentration in den Bakterien geschlossen werden. In Tabelle 7.2 sind die Abklingzeiten der Lumineszenz bei 100% Luftsättigung, die reziproken Werte dieser und die daraus folgende Sauerstoff-Konzentration der verschiedenen Farbstoff-Bakterien-Kombinationen dargestellt, zusätzlich die Werte aus den Kombinationen mit den Zellen und die jeweiligen Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten.

Bei HT29-Zellen, die mit TMPyP inkubiert wurden, konnte keine Anstiegszeit gemessen werden, da sie von einem Störsignal durch den Laserpeak überlagert wird. Abschätzungsweise liegt sie aber unter $0,5 \mu\text{s}$ und lässt daher auf eine hohe Konzentration von zelleigenen Quenchern oder Proteinen schließen. Dies legt nahe, dass Singulett-Sauerstoff in den Zellen erzeugt wird und auch in diesen wieder schnell gequenchet wird. Bei den mit XF73 inkubierten HT29-Zellen konnten über einen weiten Bereich der Sauerstoff-Konzentration die Anstiegszeiten der Lumineszenz bestimmt werden und es konnten Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten zwischen $0,8$ und $1,2 \mu\text{s}$ bestimmt werden. Dies zeigt wieder, dass der Singulett-Sauerstoff stark

	τ_D	$1/\tau_D$	angenommene O ₂ -Konzentration	τ_Δ
TMPyP + <i>S. Aureus</i>	6,4 μ s	0,16 1/ μ s	80 μ mol/L	1,7 - 2,9 μ s
TMPyP + <i>E. Coli</i>	4,2 μ s	0,24 1/ μ s	130 μ mol/L	1,7 - 2,9 μ s
XF73 + <i>S. Aureus</i>	7,8 μ s	0,13 1/ μ s	50 μ mol/L	0,7 - 1,5 μ s
XF73 + <i>E. Coli</i>	5,2 μ s	0,19 1/ μ s	70 μ mol/L	< 0,5 μ s
TMPyP + HT29	9,4 μ s	0,11 1/ μ s	60 μ mol/L	< 0,5 μ s
XF73 + HT29	5,6 μ s	0,18 1/ μ s	60 μ mol/L	0,8 - 1,2 μ s

Tabelle 7.2: Farbstoff- T_1 -Abklingzeiten, die reziproken Werte und die daraus folgende Sauerstoff-Konzentration aus den verschiedenen Farbstoff-Bakterien-Kombinationen und den Zellexperimenten, dazu die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer

gequencht wird gegenüber den reinen Lösungen aus Kapitel 5. Es wird somit sowohl bei TMPyP, als auch bei XF73 davon ausgegangen, dass die Farbstoffe, wie auch auf den Fluoreszenzbildern zu sehen in den Zellen lokalisiert sind und den lokalen Bedingungen (Protein- und Sauerstoff-Konzentration) unterworfen sind.

Da, wie in den vorherigen Kapiteln gezeigt, die Proteine und Lipide kaum einen Einfluss auf die Triplett-Abklingdauer des Farbstoffs haben, sondern nur die lokale Sauerstoff-Konzentration, kann aus den Abklingzeiten der Lumineszenz die Sauerstoff-Konzentration in den Zellen abgeschätzt werden. So beträgt die Abklingdauer der Lumineszenz in mit TMPyP inkubierten HT29-Zellen etwa 9,4 μ s bei einer luftgesättigten Suspension, bei HT29-Zellen mit XF73 inkubierten etwa 5,6 μ s. Dies entspricht eine Sauerstoff-Konzentration am Ort beider Farbstoffe von ca. 60 μ mol/L (berechnet aus der Sauerstoff-Variation bei reinen Farbstoff-Lösungen, Kapitel 5), dies entspricht ca. 20% der luftgesättigten Lösung. Die Abklingzeiten aus den Suspensionen mit niedrigeren Sauerstoff-Konzentrationen ergeben ebenfalls, dass die Sauerstoff-Konzentration in den Zellen etwa nur ein Fünftel der Konzentration ausserhalb beträgt.

Um sich die Bedingungen innerhalb und außerhalb der Zellen genauer vorstellen zu können, werden kurze Abschätzungen der verschiedenen Konzentrationen (O₂,

Protein) und der Größenverhältnisse durchgeführt. Wie bereits beschrieben liegen die Durchmesser der eukaryotischen Zellen im Bereich von 20-30 μm , die der prokaryotischen zwischen 1-3 μm . Dabei besitzen die Eukaryoten noch einen Zellkern mit etwa 5 μm Durchmesser. Um die Protein-Konzentration innerhalb der Zellen abschätzen zu können, wird davon ausgegangen, dass eine lebende Bakterie etwa 10^{-12} g wiegt [17] und insgesamt etwa $156 \cdot 10^{-15}$ g Proteine enthält. Mit einem angenommenen Radius von 2 μm ergibt sich ein Volumen von $4,19 \cdot 10^{-12}$ cm^3 , so dass eine durchschnittliche Protein-Konzentration von ca. 37 mg/ml folgt. Dies ist nur eine grobe Abschätzung, da Bakterien als homogene Kugeln betrachtet werden, zeigt aber, dass die Protein-Konzentration bei einem Wert liegt, der die Rate K_{T_1} auf Grund des Sauerstoffverbrauchs bereits merklich beeinflusst (vgl. Kapitel 5.2.2). Für die Sauerstoff-Konzentration in Herzmuskel-Zellen *in vivo* wird ein Wert von 30 $\mu\text{mol/L}$ angegeben [53]. Da sich die hier untersuchten Zellen allerdings in einer Suspension befinden (*in vitro*), wird davon ausgegangen, dass die Sauerstoff-Konzentration bei höheren Werten liegt, da die Zellen in den Suspensionen von luftgesättigten Wasser umgeben sind. So beträgt die Sauerstoff-Konzentration außerhalb der Zellen 270 $\mu\text{mol/L}$ in luftgesättigten Suspensionen und sinkt dann im Inneren der Zelle auf die abgeschätzten 60 $\mu\text{mol/L}$ ab, da wegen der Stoffwechselvorgänge in den Zellen Sauerstoff verbraucht wird und sich somit ein Gradient der Sauerstoff-Konzentration ausbildet. Wird von einem ähnlichen Gradienten der Sauerstoff-Konzentration bei Eukaryoten und Prokaryoten ausgegangen, müsste die Konzentration des Sauerstoffs im Zentrum der Eukaryoten niedriger sein als die im Zentrum von Prokaryoten, da die Diffusion des Sauerstoffs über die etwa 10-fache Strecke erfolgen muss (Abbildung 7.15). Durch eine Inkubation mit Farbstoffen und eine anschließende Bestrahlung wird wegen der Oxidation durch Singulett-Sauerstoff der Gradient der Sauerstoff-Konzentration noch erhöht.

Die Annahme einer höheren Sauerstoff-Konzentration in Bakterien wird auch durch die Werte aus den Lumineszenzmessungen für TMPyP-inkubierte Bakterien bestätigt (vgl. Tab. 7.2). Es ist zu erkennen, dass die angenommene Sauerstoff-Konzentration bei XF73-inkubierten Bakterien niedriger ist als bei TMPyP-inkubierten, was dar-

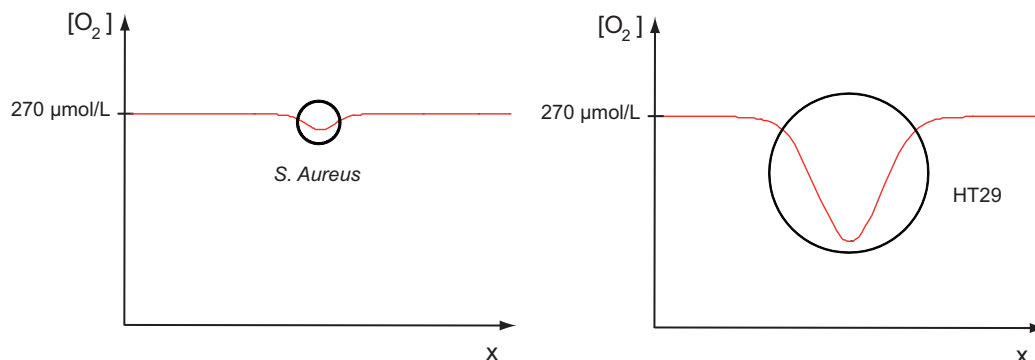


Abbildung 7.15: angenommene Verteilung der Sauerstoff-Konzentration in Zellen und Bakterien (nicht maßstabsgetreu)

auf schließen lässt, dass bei XF73 ein höherer Sauerstoffverbrauch innerhalb der Bakterien stattfindet. Dies bestätigte auch die Messung des Sauerstoffverbrauchs in den Suspensionen, insbesondere bei *E. coli* (vgl. Abb. 7.14).

Es kann also gefolgert werden, dass XF73 besser von den Bakterien aufgenommen wird und in diesen schneller die intrazellulären Bestandteile oxidiert als TMPyP. Dies wird auch durch Toxizitätstest bestätigt, bei denen eine höhere Wirksamkeit von XF73 nachgewiesen wurde im Vergleich zu TMPyP [54, 55, 74].

Aus den verschiedenen Anstiegs- und Abklingzeiten der detektierten Lumineszenzsignale können Rückschlüsse auf die Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit und die Abklingzeit des Triplett-Zustands des Farbstoffs gezogen werden. Wie bereits in Kapitel 5 beschrieben, hängt die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer nicht von der Sauerstoffkonzentration in der Lösung, Suspension oder Zelle ab. Bei allen in diesem Kapitel gezeigten Signalen wird daher die Anstiegszeit der Lumineszenz der Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer zugeordnet.

Da in den Bakterien nur die Aufnahme des Farbstoffs durch die Fluoreszenzmessungen bestimmt werden, nicht der Ort der Lokalisation, können nur die Lumineszenzsignale aus den verschiedenen Bakterienstämmen zur Bestimmung der Lokalisation ausgewertet werden. Dabei lassen sich bei beiden TMPyP-inkubierten Stämmen Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten zwischen $1,7$ und $2,9 \mu\text{s}$ bestimmen. Mit XF73 kann nur bei *S. aureus* die Anstiegszeit der Lumineszenz ermittelt werden, so dass sich eine Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer zwischen $0,7$ und $1,5 \mu\text{s}$ ergibt. Bei *E.*

coli mit XF73 kann die Anstiegszeit nicht bestimmt werden und wird daher auf unter $0,5 \mu\text{s}$ abgeschätzt.

Der Vergleich der beiden Farbstoffe bei beiden Bakterien-Stämmen lässt folgern, dass der Singulett-Sauerstoff, der durch XF73 erzeugt wurde besser gequencht wird oder weiter im Inneren der Bakterien erzeugt wurde. Somit kann eine bessere Aufnahme von XF73 gefolgert werden. Insbesondere, da bei *E. coli* eine Aufnahme von XF73 nachgewiesen wurde und auch ein erhöhter Sauerstoffverbrauch gegenüber TMPyP beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass der erzeugte Singulett-Sauerstoff sehr stark gequencht wird und daher die Anstiegszeit der Lumineszenz nicht beobachtet werden kann.

Insgesamt ergibt sich das in Abbildung 7.16 dargestellte Bild, mit den angegebenen Sauerstoff- und Protein-Konzentrationen und den Anlagerungsorten der Farbstoffe, wobei nur die Ergebnisse für HT29-Zellen und *S. aureus* dargestellt sind.

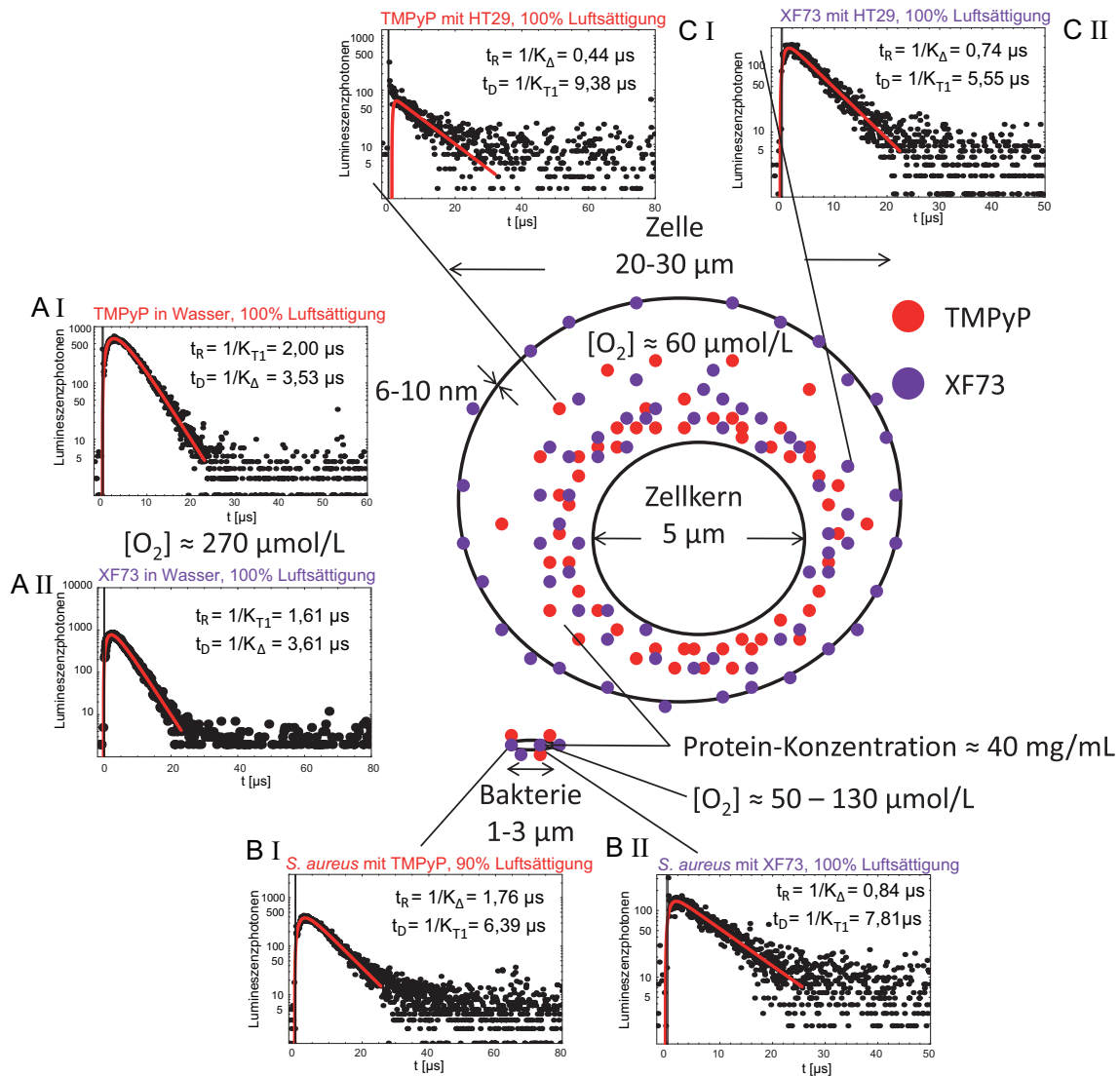


Abbildung 7.16: Vergleich der Bedingungen (O_2 - und Protein-Konzentration und Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz) in Wasser, in Bakterien und in Zellen. Es sind die Verhältnisse in der Suspension dargestellt mit einer gemessenen O_2 -Konzentration von $270 \mu mol/L$ (100% Luftsättigung) außerhalb der Zellen und einer abgeschätzten Protein-Konzentration in Zellen und Bakterien von ca. $40 mg/mL$. Die Lumineszenzsignale zeigen die Anstiegs- und Abklingzeiten bei einer O_2 -Luftsättigung in der Suspension von 100% (A) außerhalb der Zellen, (B) in den *S. aureus*-Bakterien und (C) in HT29-Zellen. Es sind immer die Signale von TMPyP (I) und von XF73 (II) dargestellt. Aus den vorherigen Messungen bei versch. Konzentrationen ist eine Zuordnung der Zeiten möglich, die als reziproke Werte der Raten mitangegeben sind ($1/K_{\Delta}$ = Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer, $1/K_{T1}$ = Farbstoff- T_1 -Abklingdauer); aus der Farbstoff- T_1 -Abklingdauer lassen sich die angegebenen O_2 -Konzentrationen in der Zelle ($60 \mu mol/L$) und der Bakterie ($50 - 130 \mu mol/L$) berechnen.

Kapitel 8

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die photodynamische Therapie (PDT), wie sie seit über 100 Jahren angewandt wird, basiert auf der Wechselwirkung von Licht, Farbstoff und Sauerstoff. Die Wirkung der PDT beruht auf der Zerstörung von Zellen durch Oxidation, hauptsächlich durch Singulett-Sauerstoff. Die PDT wird zur Behandlung maligner und prämaligener Gewebeveränderungen eingesetzt. Ein neuer Bereich für die Anwendung ist die antimikrobielle photodynamische Therapie (aPDT), bei der Mikroorganismen, wie Bakterien oder Pilze, auf die gleiche Weise wie bei der PDT, abgetötet werden sollen. Dafür ist allerdings zuerst ein besseres Verständnis der Interaktionen von Singulett-Sauerstoff, den verwendeten Farbstoffen und den Mikroorganismen notwendig. Des weiteren ist für die Anwendung von Photosensibilisatoren in der aPDT eine wichtige Voraussetzung, dass die Inkubationszeit der Farbstoffe kürzer ist, als die Zeit, die die Zellen und Bakterien benötigen, um sich zu teilen. Außerdem muss ein therapeutisches Fenster gefunden werden, also Bedingungen, bei denen die Bakterien bereits sterben, die Körperzellen jedoch noch überleben. Aus all diesen Gründen müssen die Bedingungen am Ort der Wechselwirkung zwischen Singulett-Sauerstoff und den Mikroorganismen näher betrachtet werden.

Dazu wurden die bereits bekannten theoretischen Modelle für die Generierung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff verwendet, wobei die Sauerstoffabhängigkeit der verschiedenen Prozesse besonders betrachtet wurde. Zusätzlich wurde auf oxidative Prozesse an zelleigenen Materialien und die Diffusion von Sauerstoff eingegangen.

Zentrale Aufgabe im Rahmen der vorliegenden Arbeit war der direkte Nachweis von Singulett-Sauerstoff mittels zeitlich und spektral aufgelöster Detektion seiner Lumineszenz im Infrarot-Bereich. Auf Grund der extrem schwachen Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff kam ein hochempfindlicher Infrarot-Photomultiplier zum Einsatz, der in Kombination mit einer schnellen Zähleinrichtung eine Zeitauflösung von etwa 100 ns ermöglichte. Durch weitere Verbesserungen im Bereich der verwendeten Interferenzfilter und der Sauerstoff-Detektion durch einen externen Sensor, konnte das Verhalten von Singulett-Sauerstoff in komplexer werdenden Umgebungen betrachtet werden.

In einfachen Farbstoff-Lösungsmittel-Gemischen wurden die Farbstoffe XF73 in Wasser und Perinaphthenon in Ethanol, als mögliche Photosensibilisatoren für die aPDT, untersucht. Dabei diente TMPyP sowohl in Wasser, als auch in Ethanol als Referenzfarbstoff. Durch die Variation der Sauerstoff-, Farbstoff- und Quencher-Konzentration konnten die relevanten Raten und Ratenkonstanten für die Generierung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in einfachen Lösungen bestimmt werden. Es zeigt sich, dass die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer im wesentlichen vom Lösungsmittel und der Quencher-Konzentration abhängt. Wohingegen sich die Farbstoff-Triplett-Abklingdauer hauptsächlich nach der Sauerstoff-Konzentration am Ort des angeregten Farbstoffs richtet.

Um sich den Verhältnissen in Zellen anzunähern, wurden zunächst die Erzeugung und Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff in Lösungen untersucht, die Fettsäuren oder Proteine enthielten. Dabei zeigte sich, dass durch die Oxidation der Biomoleküle die Lumineszenzsignale sich bereits innerhalb der Detektionsintervalle ändern können, so dass eine Anpassung der Parameter (kürzere Messdauern, Einsatz eines Magnetrührers) notwendig wurde, um die Raten und Ratenkonstanten von Singulett-Sauerstoff unter definierten Bedingungen zu bestimmen. Die Proteine und die ungesättigten Fettsäuren waren in der Lage Singulett-Sauerstoff physikalisch und chemisch zu quenchen, wobei der Sauerstoffverbrauch durch das chemische Quenchen beobachtet werden konnte. Dieser wurde in Abhängigkeit von der Molekülgröße bei Proteinen, bzw. der Anzahl der Doppelbindungen bei Fettsäuren bestimmt. Dabei zeigte sich, dass je kleiner die Proteine, bei gleichbleibender Gesamtmas-

se, oder je ungesättigter die Fettsäuren waren, desto mehr Sauerstoff verbraucht wurde. Der Einfluß des Sauerstoffverbrauchs zeigte sich am deutlichsten bei der Bestimmung der Farbstoff-Triplett-Abklingdauer, die sehr empfindlich auf die Abnahme der Sauerstoff-Konzentration reagierte und eine Abschätzung der Sauerstoff-Konzentration am Ort der Laseranregung zu ließ, da diese nicht durch den Sauerstoffsensor bestimmbar war. Auch konnte der quenchende Einfluß der Proteine und der ungesättigten Fettsäuren auf die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer abgeschätzt werden.

Im Rahmen der Untersuchungen zu Fettsäuren hat sich ergeben, dass Singulett-Sauerstoff durch Anregung mit UVA-Strahlung auch ohne einem Photosensibilisator erzeugt werden kann. Dabei wurde festgestellt, dass nur die mehrfach ungesättigten In der Lage waren über einen längeren Zeitraum Singulett-Sauerstoff in messbaren Mengen zu generieren. Entscheidend dabei war die Menge der oxidierten Fettsäuren, die, wie am Beispiel der Arachidonsäure durch HPLC-Analysen gezeigt, mit der Menge an erzeugtem Singulett-Sauerstoff korreliert. Durch den Russel-Mechanismus wurde auch noch eine möglicher Weg zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff aus den nachgewiesenen Lipidhydroperoxiden vorgestellt.

Erstmals war es möglich die Lumineszenzsignale von Photosensibilisatoren aus Zellen und Bakterien unter verschiedenen Bedingungen (O_2 -Konzentration, Zelltyp) zu detektieren und auszuwerten. Dabei zeigte sich, dass der Sauerstoffverbrauch bei den Gram-positiven *S. aureus*-Bakterien unabhängig vom verwendeten Farbstoff ist, bei den Gram-negativen *E. coli* jedoch im Vergleich zu TMPyP ein stärkerer Verbrauch bei XF73 festgestellt werden konnte. Aus den Lumineszenzsignalen konnten die Anstiegs- und Abklingzeiten eindeutig der Farbstoff- T_1 -Abklingdauer und der Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer zugeordnet werden. Durch die ermittelten Farbstoff- T_1 -Abklingzeiten bei Zellen und Bakterien konnten die Sauerstoff-Konzentrationen in der Umgebung der verwendeten Farbstoffe abgeschätzt werden und somit, ebenso wie aus den Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten, die Veränderungen in der Lokalisation der Farbstoffe, wie sie in den Fluoreszenzbildern beobachtet wurden, zumindest bei den Zellen bestätigt werden. Bei den XF73-inkubierten Bakterien lag die Sauerstoff-Konzentration und die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer bei nied-

rigeren Werten als bei TMPyP-inkubierten. Diese Beobachtungen lassen sich mit einer besseren Aufnahme des neuen Farbstoffs XF73 gegenüber dem Referenzfarbstoffs TMPyP erklären. Auch konnte bei den Gram-positiven *S. aureus*-Bakterien ein höherer Sauerstoffverbrauch als bei *E. coli*-Bakterien beobachtet werden, so dass von einer besseren Wirksamkeit der Farbstoffe bei Gram-positiven als bei Gram-negativen Bakterien ausgegangen werden kann.

Durch die somit erhaltenen Ergebnisse wurden aber auch neue Fragen aufgeworfen. So muss für weiterführende Messungen die Lokalisation der Farbstoffe in Bakterien durch chemische Analysen bestimmt werden, ebenso wie die Abhängigkeit der Lumineszenz und der Zelltoxizität von der Menge des aufgenommenen Farbstoffs. Dazu kann gegebenenfalls auch die Entwicklung neuer Farbstoffe notwendig sein, die besser von Zellen oder Bakterien aufgenommen werden.

In dieser Arbeit konnte erstmals die Generierung von Singulett-Sauerstoff durch Fettsäuren ohne Sensibilisator unter UVA-Bestrahlung festgestellt werden, jedoch sind noch weitere Experimente mit effektiven Quenchern notwendig, um den Mechanismus der Singulett-Sauerstoff-Generierung vollständig zu klären. Für weitere Untersuchungen von endogenen Photosensibilisatoren, wie Fettsäuren oder Proteinen, bieten sich Untersuchungen im nahen UVB-Bereich an, da dort die Moleküle höhere Absorptionswirkungsquerschnitte besitzen, wodurch wegen der verstärkten Absorption bessere Signale erzeugt werden können. Auch können somit weitere körpereigene Moleküle, wie Urocaninsäure oder L- α -Phosphatidylcholin, auf Singulett-Sauerstoff-Generierung getestet werden.

Literaturverzeichnis

- [1] B. Alberts, A. Johnson, P. Walter, J. Lewis, M. Raff, and K. Roberts. *Molecular biology of the cell*. Taylor and Francis Ltd., 5 edition, 2008.
- [2] B. M. Aveline. *Primary processes in photosensitization mechanism*, In: P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies, B. Ortel, *Photodynamic therapy and fluorescence diagnosis in dermatology*, Kap. 2. Elsevier Amsterdam, 2001.
- [3] S. M. Bachilo, I. N. Nichiporovich, and A. P. Losev. Detection of the oxygen absorption in solutions. *Zh. Prikl. Spekt.*, 65:811–814, 1998.
- [4] W. Baeumler, C. Abels, S. Karrer and T. Weiss, H. Messmann, M. Landthaler, and R.-M. Szeimies. Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light. *British Journal of Cancer*, 80(3-4):360–363, 1999.
- [5] J. Baier. *Lumineszenz-Untersuchungen zur Generation und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in zellulärer Umgebung*. PhD thesis, Universität Regensburg, 2005.
- [6] J. Baier, T. Fuss, C. Poellmann, C. Wiesmann, K. Pindl, R. Engl, D. Baumer, M. Maier, M. Landthaler, and W. Baeumler. Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B*, 87, 2007.
- [7] J. Baier, M. Maier, R. Engl, M. Landthaler, and W. Baeumler. Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine,

- and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or ht29 cells. *J. Phys. Chem. B*, 109(7):3041–3046, 2005.
- [8] J. Baier, T. Maisch, M. Maier, M. Landthaler, and W. Baeumler. Direct detection of singlet oxygen generated by uva irradiation in human cells and skin. *J Invest Dermatol.*, 127(6):1498–1506, 2007.
- [9] J. Baier, T. Maisch, J. Regensburger, M. Loibl, V. Vasold, and W. Baeumler. Time dependence of singlet oxygen luminescence provides an indication of oxygen concentration during oxygen consumption. *Journal of Biomedical Optics*, 12(6), 2007.
- [10] R. V. Bensasson, E. J. Land, and T. G. Truscott. *Excited states and free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokio, 1993.
- [11] M. Bodesheim and R. J. Schmidt. Chemical reactivity of sigma singlet oxygen. *J. Phys. Chem.*, 101:5672–5677, 1997.
- [12] P. T. Chou, G.-T. Wei, C.-H. Lin, C.-Y. Wei, and C.-H. Chang. Direct spectroscopic evidence of photosensitized o₂ 765 nm and o₂ dimol 634 and 703 nm vibronic emission in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(12):3031–3032, 1996.
- [13] J. Davidson and E. A. Ogryzlo. *Chemiluminescence and Bioluminescence*. Plenum Press, New York, 1973.
- [14] M. J. Davies. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, (3):17–25, 2001.
- [15] M. J. Davies. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and biophysical Research Communications*, (305):761–770, 2003.
- [16] M. J. Davies and R. J. W. Truscott. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *Photochem.Photobiol.Sci.*, 63(1-3):114–125, 2004.
- [17] Davis, Dulbecco, Eisen, and Ginsberg. *Bacterial Physiology: Microbiology*. Harper and Row, Maryland, 1973.

- [18] R. Engl. *Die Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in homogenen Loesungen sowie Lipid- und Zellsuspensionen*. PhD thesis, Universitaet Regensburg, 2003.
- [19] C. Flors and S. Nonell. Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: Phototoxic phenalenone phytoalexins. *Accounts of Chemical Research*, 39(5):293–300, 2006.
- [20] T. Foerster. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann. Phys.* 2, pages 55–75, 1948.
- [21] C. S. Foote. Definition of type i and type ii photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.*, 54:659, 1991.
- [22] J. Fraunhofer. Bestimmung des brechungs- und farbenzerstreuungs-vermoegens verschiedener glasarten. *Denkschriften der Muenchner Akademie*, 5:193–226, 1814-1815.
- [23] T. Fuss. Untersuchung der lumineszenz von singulett-sauerstoff in waessrigen loesungen und suspensionen. Master’s thesis, Universitaet Regensburg, 2005.
- [24] R. W. Gerard. Oxygen diffusion into cells. *Biological Bulletin*, (60):245–268, 1931.
- [25] A. W. Girotti. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem. Photobiol.*, 4(51):497–509, 1989.
- [26] A. A. Gorman and M. A. J. Rodgers. Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 14:159–176, 1992.
- [27] R. Broenstein H. Landolt. *Landolt-Broenstein Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik und Technik. II.Band. Eigenschaften der Materie in ihren Aggregatzustaenden. 2.Teil. Gleichgewichte ausser Schmelzgleichgewichten. Bandteil b. Loesungsgleichgewichte I*. Springer Verlag, Berlin, 6.Auflage, 1962.

- [28] A. I. Ismolv, O. A. Azizova, G. G. Odinkova, D. I. Roshupkin, A. N. Remizov, and Y. A. Vladimirov. Free radicals formed under uv-irradiation of oxidized phosphatidyl choline. *Biofizika*, 24:403–407, 1977.
- [29] A. Jablonski. Ueber den mechanismus der photolumineszenz von farbstoffphosphoren. *Zeitschrift fuer Physik*, 94:38–46, 1935.
- [30] H.-F. Ji and L. Shen. Triplet excited state characters and photosensitization mechanisms of alpha-terthienyl: A theoretical study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 94(1):51–53, 2009.
- [31] A. Jimenez-Banzo, M. L. Sagrista, M. Mora, and S. Nonell. Kinetics of singlet oxygen photosensitization in human skin fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(11):1926–1934, 2008.
- [32] A. A. Krasnovsky jr. Photosensitized luminescence of singlet oxygen in solutions. *Biofizika*, 21:748–749, 1976.
- [33] A. A. Krasnovsky jr. *Advances in Science and Technology. Modern Problems of Laser Physics*, volume 3. VINITI, Moskau, 1990.
- [34] A. A. Krasnovsky jr., V. E. Kagan, and A. A. Minin. Quenching of singlet oxygen luminescence by fatty acids and lipids. *Federation of European Biochemical Societies*, 155(2):233–236, 1983.
- [35] J. R. Kanofsky. Singlet oxygen production by biological systems. *Chemico-biological Interactions*, 70(1-2):1–28, 1989.
- [36] G. Karp. *Molekulare Zellbiologie, 1. Auflage*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Kapitel 1 und 4, 2005.
- [37] S. Karrer, C. Abels, R.-M. Szeimies, W. Baeumler, U. Hohenleutner, A. E. Goetz, and M. Landthaler. Topical application of a novel porphycene dye for photodynamic therapy - penetration studies in human perilesional skin and basal cell carcinoma. photochemotherapy: Photodynamic therapy and other modalities. *Proc SPIE*, 2625:278–280, 1996.

- [38] M. Kasha. *Singlet O₂*, volume 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985.
- [39] H. Kautsky. Quenching of luminescence by oxygen. *Trans. Faraday Soc.*, 35:216–219, 1939.
- [40] H. Kautsky and H. de Bruin. Die aufklaerung der photoluminescenztilgung fluorescierender systeme durch sauerstoff: Die bildung aktiver, diffusionsfaehiger sauerstoffmolekuele durch sensibitisierung. *Naturwissenschaften*, 19:1043, 1931.
- [41] H. Kautsky, H. de Bruin, R. Neuwirtch, and W. Baumeister. Photosensibilisierte oxydation als wirkung eines aktiven, metastabilen zustands des sauerstoff-molekuels. *Chem. Institut d. Universitaet Heidelberg*, 66:1588–1600, 1933.
- [42] K. P. Kessel and J. Verhoef. A view to a kill: cytotoxic mechanisms of human polymorphonuclear leukocytes compared with monocytes and natural killer cells. *Pathobiology*, 58(5):249–264, 1990.
- [43] R. Kilger, M. Maier, R.-M. Szeimies, and W. Baeumler. Bidirectional energy transfer between the triplet t₁ state of photofrin and singlet oxygen in deuterium oxide. *Chemical Physics Letters*, 343, 2001.
- [44] S.C. Kou and X. Sunney Xie. Generalized langevin equation with fractional gaussian noise: Subdiffusion within a single protein molecule. *Physical Review Letters*, 93, 2004.
- [45] M. K. Kuimova, G. Yahioglu, and P. R. Ogilby. Singlet oxygen in a cell: spatially dependent lifetimes and quenching rate constants. *J Am Chem Soc.*, 131(1):332–340, 2009.
- [46] N. A. Kuznetsova and S. L. Solodar. Products from photolysis of phenalenone in alcohol media. *Journal of organic chemistry of the USSR*, (23):348–351, 1987.
- [47] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, New York, 3 edition, 2006.

- [48] J. Lasch, U. Schoenfelder, M. Walke, S. Zellmer, and D. Beckert. Oxidative damage of human skin lipids. dependence of lipid peroxidation on sterol concentration. *Biochim Biophys Acta*, 1349:171–181, 1997.
- [49] G. Liebsch. *Time-resolved luminescence lifetime imaging with optical chemical sensors*. PhD thesis, Universitaet Regensburg, 2000.
- [50] M. Loibl. Messung der lumineszenz von singulett-sauerstoff in makromolekuelen, 2006.
- [51] T. Maisch, J. Baier, B. Franz, M. Maier, M. Landthaler, R..M. Szeimies, and W. Baeumler. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *PNAS*, 104(17):7223–7228, 2007.
- [52] T. Maisch, R..M. Szeimies, G. Jori, and C. Abels. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3:907–917, 2004.
- [53] D.J. Marcinek, W. A. Ciesielski, K. E. Conley, and K. A. Schenkman. Oxygen regulation and limitation to cellular respiration in mouse skeletal muscle in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, (285):1900–1908, 2003.
- [54] M. Merchat, G. Bertolini, P. Giacomini, A. Villanueva, and G. Jori. Meso-substituted cationic porphyrines as efficient photosensitizers ao gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol B*, 32:153–157, 1996.
- [55] M. Merchat, J. D. Spikes, G. Bertolini, and G. Jori. Studies on the mechanism of bacteria photosensitation by meso-substituted catonic porphyrins. *J. Photochem. Photobiol. B*, 35:149–157, 1996.
- [56] S. Miyamoto, G. R. Martinez, M. H. Medeiros, and P. DiMascio. Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the russell mechanism: studies using 18(o)-labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. *J Am Chem Soc*, 125:6172–6179, 2003.
- [57] R. S. Mullikan. The assignment of quantum numbers for electrons in molecules. *Phys. Rev.*, 32:880–887, 1928.

- [58] R. S. Mullikan. Interpretation of the atmospheric oxygen bands; electronic level of the oxygen molecule. *Nature*, 122:505, 1928.
- [59] S. Nonell, M. Gonzalez, and F. R. Trull. 1h-phenalen-1-one-2-sulfonic acid: an extremely efficient singlet oxygen sensitizer for aqueous media. *Afnidad L.*, 448:445–450, 1993.
- [60] T. Oida, Y. Sako, and A. Kusumi. Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy). methodology development and application to studies of endosome fusion in single cells. *Biophysical Journal*, 64(3):676–685, 1993.
- [61] E. Oliveros, P. Suardi-Murasecco, T. Aminian-Saghafi, A. M. Braun, and H.-J. Hansen. 1h-phenalen-1-one: Photophysical properties and singlet-oxygen production. *Helvetica Chimica Acta*, 74:79–90, 1991.
- [62] J. G. Parker and W. D. Stanbro. Dependence of photosensitized singlet oxygen production on porphine structure and solvent. *Prod. Clin. Biol. Res.*, (170):259–284, 1984.
- [63] W. Pschyrembel. *Klinisches Woerterbuch*, 257. Auflage. Nikol Verlagsgesellschaft mbH Hamburg, 1994.
- [64] A. J. Ridley¹, J. R. Whiteside, T. J. McMillan, and S. L. Allinson. Cellular and sub-cellular responses to uva in relation to carcinogenesis. *International Journal of Radiation Biology*, 85(3):177–195, 2009.
- [65] B. Roeder. *Einfuehrung in die molekulare Photophysik*. Teubner, Stuttgart, Leipzig, 1999.
- [66] K. E. Sapsford, L. Berti, and I. L. Medintz. Materialien fuer den resonanten fluoreszenzenenergietransfer (fret): jenseits klassischer donor-acceptorkombinationen. *Angewandte Chemie*, 118:4676–4704, 2006.
- [67] F. P. Schaefer. *Dye Lasers*, 3. auflage. Springer-Verlag, Berlin, 1990.
- [68] R. Schmidt and M. Bodeshein. Time resolved measurement of singlet oxygen (sigma) in solution. phosphorescence from an upper excited state. *Journal of Phys. Chem.*, 98:2874–2876, 1994.

- [69] R. D. Scurlock, B. Wang, and P. R. Ogilby. The chemical reactivity of singlet sigma oxygen in solution. *J. Am chem. Soc*, 118:388–392, 1996.
- [70] D. Secker. *Dynamisches Verhalten beim Ladungstransport durch organische Molekuele*. PhD thesis, Friedrich-Alexander-Universitaet Erlangen-Nuernberg, 2008.
- [71] A. Streitwieser and C.H. Heathcock. *Organische Chemie*. Verlag Chemie, Weinheim, Deefield Beach, Basel, 1980.
- [72] A. N. Terenin. Photochemical process in aromatic compounds. *Acta Phisicochim. (USSR)*, 18:210–241, 1943.
- [73] K. Ueda. Effect of environmental chemicals on genes and the expression. *Yakugaku Zasshi*, 129(12):1501–1506, 2009.
- [74] G. Valduga, B. Breda, G. M. Giacometti, G. Jori, and E. Reddi. Photosensitization of wild and mutant strains of escherichia coli by meso-tetra(n-methyl-4-pyridyl)porphine. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 256:84–88, 1999.
- [75] G. Wedler. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie, 3.Auflage*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1987.
- [76] F. Wilkinson. *Advances in Photochemistry, Electronic Energy Transfer Between Organic Molecules in Solution*. John Wiley and Sons, Inc., 3 edition, 1964.
- [77] F. Wilkinson, W. P. Helman, and A. B. Ross. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited single state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 24:663–1021, 1995.
- [78] W. H. Wollaston. A method of examining refractive and dispersive powers, by prismatic reflection. *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, 92:365–380, 1802.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen und Abteilungen bedanken, die mir bei meiner Dissertation zu Seite standen und die mich in den letzten drei Jahren unterstützt haben:

- bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Bäumler für die Betreuung meiner Arbeit und für die in vielen fachlichen Diskussionen und Anregungen, die die Grundlage dieser Arbeit bildeten;
- bei Herrn PD Dr. Tim Maisch für die Hilfe bei biologischen Fragen, insbesondere bei der Auswahl der relevanten biologischen Organismen, sowie für das heitere Klima im Büro;
- bei Herrn Prof. Dr. Michael Landthaler für die freundliche Aufnahme in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie;
- bei meinen Diplomandinnen Anita Gollmer, Ariane Felgenträger und Alena Knak für die Unterstützung bei den durchgeführten Messungen;
- bei Petra Unger und Francesco Santarelli für die sehr gute Probenpräparation und die Unternehmungen außerhalb der Arbeitszeit;
- den Mitarbeitern der dermatologischen Abteilung im H4 für die fachliche Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre;
- den Mitarbeitern des Forschungslabors der Anästhesie unter der Leitung von Dr. Michael Gruber für die Erklärung der chemischen Vorgänge in Organismen;
- dem Institut für organische Chemie für die vorgenommenen HPLC-Analysen;

- bei meinen Eltern, die mir durch ihre finanzielle und moralische Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben;
- und ganz besonders bei meiner Frau Daniela für die Geduld und das Verständnis während meiner Dissertation und dafür, dass sie meinen Blick immer wieder auf die wesentlichen Dinge im Leben gerichtet hat.