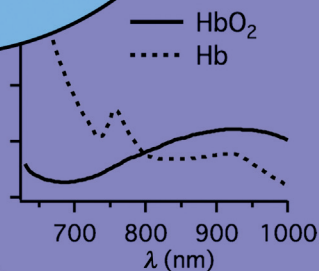
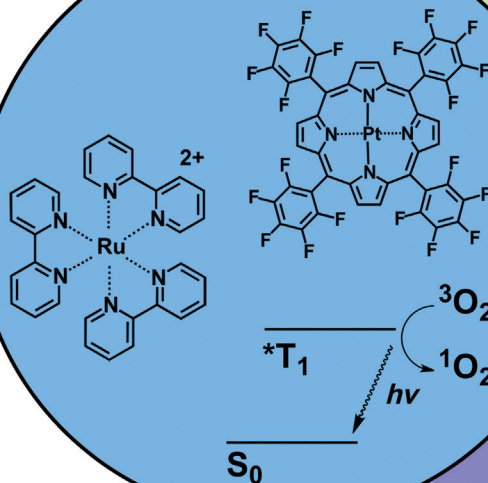
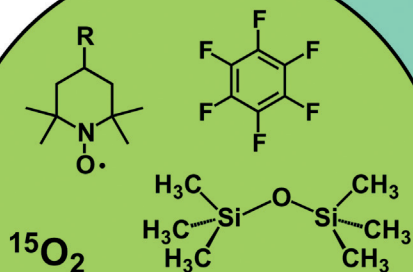
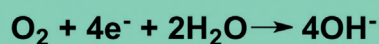


Sauerstoffmessung in der Biomedizin – von der Makro- zur Mikroebene

Emmanuel Roussakis, Zongxi Li, Alexander J. Nichols und Conor L. Evans*

Stichwörter:

Hypoxie ·
Molekulare Bildgebung ·
Sauerstoffanreicherung ·
Sauerstoffmessung ·
Phosphoreszenzlöschung



Der Messung von Sauerstoff sind wegen dessen zentraler Rolle in der Biochemie des Lebens bereits umfassende Studien gewidmet worden. Um Mechanismen unter normalen physiologischen Verhältnissen ebenso wie bei Krankheitszuständen untersuchen und verstehen zu können, ist es notwendig, die physiologische Verteilung und die Dynamik von Sauerstoff auf subzellulärer und makroskopischer Ebene in Echtzeit quantifizieren zu können. Dieser Aufsatz diskutiert die wichtigsten aktuellen Fortschritte bei der Entwicklung von Sauerstoffsensormaterialien und stellt dabei polarographische, nuklearmedizinische, Magnetresonanz-basierte und optische Techniken vor, die eine spezifische Verfolgung der Sauerstoffdynamik in Zell- und Gewebsumgebungen in Echtzeit ermöglichen. Da einige der interessantesten Fortschritte bezüglich Synthesemethoden und biomedizinischen Anwendungen auf dem Gebiet der optischen Sauerstoffsensoren zu verzeichnen sind, werden wir einen Schwerpunkt auf die Entwicklung dieser Konzepte legen.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	8459
2. Polarographische Elektroden	8461
3. Radioisotopentechniken	8462
4. Resonanztechniken	8464
5. Optische Methoden zur Hämoglobin-basierten Bestimmung der Sauerstoffsättigung	8467
6. Lumineszenzlöschungs-basierte Sauerstoff-sensorik	8468
7. Zusammenfassung und Ausblick	8477

1. Einleitung

1.1. Die Bedeutung von Sauerstoff

Als einer der wichtigsten Bestandteile der Erdatmosphäre ist molekularer Sauerstoff allgegenwärtig in lebenden Organismen und existenziell für alle höheren Lebensformen. Säugetiere haben hochkomplexe und anpassungsfähige Blutkreislaufsysteme entwickelt, die den Sauerstofftransport in allen Teilen des Körpers sicherstellen und dabei biologische Sicherungsmechanismen aufweisen, um Zellschäden infolge toxischer Sauerstoffderivate zu verhindern. Eine verminderte Sauerstoffversorgung von Geweberegionen spielt ätiologisch eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl pathologischer Zustände wie dem diabetischen Fußulkus oder der Behandlungsresistenz von Krebs.

Trotz der komplexen biologischen und klinischen Bedeutung stehen nur wenige effektive, quantitative Methoden zur zerstörungsfreien Sauerstoffmessung in physiologischem Milieu zur Verfügung. Absorptions- sowie Emissionsspektren von Sauerstoff sind kaum spezifisch und im biologischen Gewebsumfeld nur schwer zu bestimmen; zudem ist die im Gewebe am häufigsten auftretende Isotopenform nicht für kernresonanzmagnetische Analysemethoden nutzbar. Sogar der derzeitige Goldstandard zur Sauerstoffmessung, der auf der elektrochemischen Messung mit Nadelelektroden beruht, hat einige bedeutende Nachteile wie die Limitierung auf kleine Messvolumina und die generell disruptive Art der Elektrodenplatzierung sowie des Messprozesses. Da jedoch in einem einzelnen Organ oder einer granulären Struktur große Sauerstoffkonzentrationsgradienten erwartet werden, besteht die Notwendigkeit, eine Messmethode anzuwenden, die den molekularen Sauerstoff auf Gewebs-, Zell- und Subzellulärebene quantifizieren kann, um so dessen bedeutende Rolle für die Physiologie und bei Krankheitszuständen intensiver zu erforschen.

Um die Notwendigkeit von Sauerstoffmessungen unter normalen physiologischen Bedingungen sowie bei pathologischen Zuständen darzulegen, werden wir einen kurzen Überblick über den physiologischen Sauerstoffpartialdruck im Körper liefern und diskutieren, welche Rolle Sauerstoff bei Krankheiten wie Krebs spielt. Anschließend liefern wir eine Übersicht über polarographische, nuklearmedizinische, Resonanz-basierte und optische Methoden zur Messung von Sauerstoff auf Zell- und Gewebeebene.

1.2. Überblick: Verbrauch, Verwertung und Stoffwechselregulation von Sauerstoff

Will man die zellulären und organischen Auswirkungen reduzierter oder gestörter Sauerstoffversorgung verstehen, ist es notwendig, Basiswerte für die Sauerstoffanreicherung im gesunden Gewebe festzulegen. Dies geschieht unter Berücksichtigung der Heterogenität der Sauerstoffanreicherung in verschiedenen Organen. Unter normalen atmosphärischen Bedingungen (Atemluft) entspricht der Anteil des Sauerstoffs der Luft ca. 21 Vol.-%, was einem Partialsauerstoffdruck von 158 mmHg entspricht. Unter standardisierten Bedingungen in Zellkulturen ist dieser Anteil durch die zur pH-

[*] Dr. E. Roussakis, Dr. Z. Li, Dr. A. J. Nichols, Prof. Dr. C. L. Evans
Wellman Center for Photomedicine
Massachusetts General Hospital CNY 149-3210
13th Street, Charlestown, MA 02129 (USA) 18F
E-Mail: evans.conor@mgh.harvard.edu
Dr. A. J. Nichols, Prof. Dr. C. L. Evans
Harvard University Program in Biophysics
Building C2 Room 112
240 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 (USA)
Dr. A. J. Nichols
Harvard-MIT Division of Health Sciences and Technology
77 Massachusetts Avenue E25-519
Cambridge, MA 02139 (USA)

Regulierung zugefügten 5 % CO₂ häufig auf 150 mmHg reduziert. Während des Einatmungsvorgangs eines gesunden Menschen sinkt der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) in den Alveolen der Lunge, in denen der Gasaustausch stattfindet, auf ca. 100–110 mmHg.^[1] Nach der Diffusion durch das Lungenepithel trifft der Sauerstoff auf sauerstoffarmes, venöses Blut, das sich mit Sauerstoff anreichert und so der arteriellen Blutzirkulation dient. In gesunden Erwachsenen werden die pO_2 -Werte von arteriellem und venösem Blut (ca. 90 bzw. 40 mmHg) als Näherungswerte für die Sauerstoffpartialdrücke des Blutes auf beiden Seiten der pulmonalen Vaskulatur angenommen und stellen somit wichtige klinische Parameter dar.^[1]

Der arteriellen Blutzirkulation folgend, erfahren diese Sauerstoffpartialdrücke in den verschiedenen Organen deutliche Veränderungen. So erreicht der Sauerstoffpartialdruck in der weißen Hirnmasse des Frontallappens des Hirns, wo das neuronale Parenchym außerordentlich metabolisch aktiv ist und somit einen hohen Sauerstoffverbrauch aufweist, einen durchschnittlichen Wert um 40 mmHg; abweichende Werte zwischen 33 und 48 mmHg wurden beobachtet.^[2,3] Analog weist Muskelgewebe pO_2 -Werte von 25–32 mmHg in Abhängigkeit von der Tiefe, Lokalisation und Art des Muskelgewebes auf.^[2] Beobachtete pO_2 -Werte der Leber variieren je nach physiologischem Zustand. Während Transplantationsempfänger 48 h post-transplantativ erhöhte pO_2 -Werte von 60 mmHg aufwiesen, zeigten intraoperative Messungen, die mit einem anderen Verfahren ermittelt wurden, pO_2 -Werte um 31 mmHg.^[2,4] Folglich sind die Sauerstoffpartial-

drücke in Körpergeweben mit verschiedenen Aufgaben sehr heterogen verteilt.

Unter Berücksichtigung dieser Daten ist es wichtig zu erwähnen, dass solche großen Abweichungen in gemessenen pO_2 -Werten zum Teil auf das Fehlen eines allgemein anerkannten, zuverlässigen Verfahrens zur Messung der Gewebssauerstoffversorgung zurückzuführen sind. Viele dieser Messungen wurden mithilfe Punkt-basierter, elektrochemischer Methoden durchgeführt, die in festem organischem Gewebe von Natur aus limitiert und von begrenztem Nutzen sind. Es ist auch wichtig zu beachten, dass sich diese pO_2 -Werte auf Messungen in festem Gewebe beziehen und nicht auf arterielle pO_2 -Werte aus den Organ-assoziierten Gefäßen.

1.3. Gewebshypoxie

Hypoxie ist im biologischen Sinne als physiologischer Zustand definiert, bei dem der Gleichgewichts-Sauerstoffpartialdruck innerhalb eines Gewebes oder einer Zelle nicht ausreicht, um den Sauerstoffbedarf dieses Gewebes zu decken. Interessanterweise lassen jüngere Befunde darauf schließen, dass es wichtige Ausnahmen zu dieser Regel gibt, bei denen Hypoxie nicht zwangsläufig einen pathologischen Zustand kennzeichnet. Für Knochenmark wurden beispielsweise pO_2 -Werte im hypoxischen Bereich (< 20 mmHg) nachgewiesen; es wird teilweise angenommen, dass diese geringen pO_2 -Werte für die normale Blutbildung erforderlich seien.^[5–7] Zur Abschätzung der Notwendigkeit für Gewebs-



Emmanuel Roussakis promovierte 2006 in organischer Synthesechemie an der Universität von Kreta (Griechenland) bei Dr. Haralambos Katerinopoulos. 2008 wechselte er zum Department of Biochemistry and Biophysics an der University of Pennsylvania's Perelman School of Medicine in die Gruppe von Dr. Sergei Vinogradov, wo er Porphyrin-basierte Sauerstoffsonden entwickelte. Derzeit forscht er bei Conor L. Evans am Wellman Center for Photomedicine an der Entwicklung hell emittierender Sauerstoffsonden, die sich in optische Bildgebungsmethoden zur Visualisierung von Hypoxie in multizellulären Tumormodellen implementieren lassen.



Alexander J. Nichols arbeitete als Nanopartikelchemiker bei QDVision, Inc., und erhielt seinen Abschluss in Biochemie 2008 vom Oberlin College. Er promovierte in Biophysik an der Harvard University bei Dr. Conor L. Evans als Mitglied der Harvard/MIT Division of Health Sciences and Technology und arbeitete im Wellman Center for Photomedicine am Massachusetts General Hospital. Zurzeit ist er beim Biotechnologie-Unternehmen Flagship Ventures in Cambridge, Massachusetts, tätig, wo er moderne innovative Technologien in Patiententherapien überführt.



Zongxi Li erhielt 2007 ihren Bachelor in Chemie von der Peking University (China) und promovierte im Anschluss an der University of California, Los Angeles (USA) bei Jeffrey I. Zink. In ihrer Doktorarbeit entwickelte sie funktionale Nanomaterialien für den Wirkstoff-Transport. 2012 wechselte sie zum Wellman Center for Photomedicine am Massachusetts General Hospital in die Gruppe von Dr. Conor L. Evans, wo sie sich mit biokompatiblen Sensoren und Bildgebungssystemen zur Verfolgung von Sauerstoff und anderen physiologischen Parametern im Menschen beschäftigt.



Conor L. Evans erhielt seinen Bachelor of Science in physikalischer Chemie von der Brown University und promovierte in Chemie an der Harvard University bei Dr. X. Sunney Xie. Postdoktorate führten ihn zu Tayyaba Hasan (Massachusetts General Hospital) und Johannes de Boer (Massachusetts General Hospital), wo er moderne mikroskopische Methoden in der Krebsforschung anwendete. Derzeit ist er Assistant Professor im Wellman Center for Photomedicine am Massachusetts General Hospital, wo er optische mikroskopische und spektroskopische Werkzeuge entwickelt und in die Klinik überführt. Aktueller Schwerpunkt ist die Synthese hell emittierender Sauerstoffsensoren.

basierte Sauerstoffsensoren und des Messbereichs, in dem sie arbeiten müssen, ist es wichtig, Hypoxie sowohl quantitativ als auch physiologisch zu definieren, und darüber hinaus auch zu erfassen, wie und wann ein Mangel an Sauerstoff gewebeschädigend ist. Sauerstoffhomöostase in einem bestimmten Gewebe kann grundsätzlich durch zwei Parameter charakterisiert werden: Sauerstoffversorgung und -bedarf. Im Herzen wird beispielsweise der myokardiale Sauerstoffbedarf durch mehrere Faktoren, einschließlich der Herzfrequenz und der Kontraktilität eines jeden Herzschlages, bestimmt.^[8,9] Wenn ein oder mehrere regulatorische Elemente in diesem geschädigt werden (beispielsweise durch eine verringerte Koronardurchblutung, hervorgerufen durch Arteriosklerose und Gefäßverengungen), zeigen sich Veränderungen sowohl auf zellulärer als auch auf organischer Ebene. Obwohl der pO_2 -Wert, bei dem dieser Prozess eintritt, unter anderem wegen des Fehlens zuverlässiger Messtechnik unklar bleibt, wird anhand von Studien vermutet, dass der ischämische Schwellwert nahe 22 mmHg liegt, mit myokardiellen Sauerstoffpartialdrücken von 6 mmHg und sogar niedriger bei schweren hypoxischen/ischämischen Vorfällen.^[10–12]

1.4. Hypoxie und Krebs

Zusätzlich zu seiner Rolle bei Erkrankungen ischämischer Ätiologie tritt Hypoxie in Tumoren auf und ist ein wichtiger Faktor bei der Planung klinischer Krebsbehandlungen und deren Wirksamkeit. Wie in Abbildung 1 gezeigt, werden primäre, solide Tumoren hypoxisch, wenn sie über die Sauerstoffdiffusionsgrenze von ca. 200 μm zur umgebenden Vaskulatur hinauswachsen.^[13] Das Auftreten von Hypoxie trägt zur Regulierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF)-1 bei, der an der Transkription von Genen wie dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) beteiligt ist, was wiederum das Wachstum neuer Blutgefäße in der Nähe des Tumors stimuliert. Die Tumor-assoziierte Neovaskularisation ist morphologisch chaotisch und zur Leckage neigend, was dazu führt, dass Sauerstoff häufig nicht gleichmäßig über die Gesamtheit des Tumors geliefert wird, was zur Bildung von heterogenen hypoxischen Bereichen beiträgt.^[14–17] Sobald präsent, lösen hypoxische Zustände eine Vielzahl von Tumorfördernden Effekten aus, einschließlich der Suppression von Apoptose, der Elevation genomischer Instabilität durch Hypoxie-induzierte, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), einer verstärkten Invasivität, der Veränderung des Lipidstoffwechsels und der Selektion von somatischen Mutationen, die das Überleben im hypoxischen Umfeld begünstigen.^[13,18] Klinisch trägt Hypoxie zur Resistenz gegen zahlreiche Krebstherapien, darunter die Anwendung der Chemotherapeutika Etoposid, 5-Fluoruracil, Paclitaxel und Doxorubicin, sowie gegen Strahlentherapie bei.^[13,19–22] In einigen Fällen kann diese Therapieresistenz dramatisch ausfallen; so wurde beispielsweise berichtet, dass die Zelltoxizität von Paclitaxel unter hypoxischen Bedingungen um das 100-Fache abnimmt.^[23]

Es ist wichtig zu erwähnen, dass Heterogenitäten in der Sauerstoffanreicherung von Tumorgewebe auf dem Niveau der Mikroumgebung stattfinden und dass sie in einzelnen

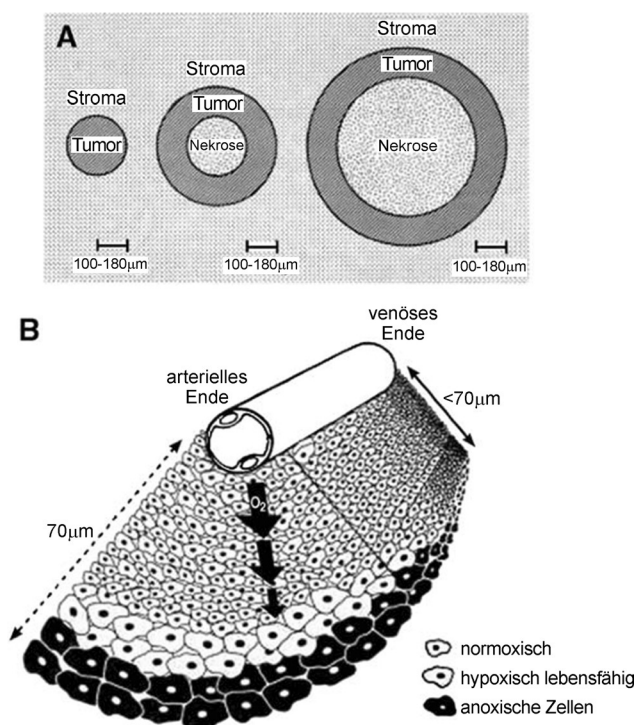


Abbildung 1. Mit steigendem Tumorwachstum steigt der Sauerstoffbedarf. A) Während des Wachstums von malignem Gewebe kann der Bedarf an Sauerstoff die Zufuhr übersteigen, was zur Entstehung von nekrotischen Bereichen führt. B) Ein Missverhältnis zwischen Angebot und Nachfrage von Sauerstoff führt zur Entstehung von hypoxischen und anoxischen Bereichen um die Blutgefäße herum. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [24].

Zellgruppen oder sogar in einzelnen Zellen variieren können. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, die Sauerstoffanreicherung in Tumoren auf allen Ebenen – von ganzen Organen, über Gewebe bis hin zu einzelnen Zellen – zu verstehen.^[19,25–27] Dieser Aufsatz stellt Methoden zur Messung von Gewebssauerstoff auf der Makro- und Mikroebene vor und zählt dabei Techniken auf, die auf polarographischen Elektroden, Radioisotopen-Kennzeichnung, Kern- und Elektronenresonanz, optischen Messmethoden und Lumineszenzlöschung beruhen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Techniken und fasst die Vorteile und Limitierungen der einzelnen Verfahren zusammen.

2. Polarographische Elektroden

Polarographische Elektroden, die in den 1950er Jahren eingeführt wurden, ermöglichten erstmals eine genaue Messung des Gewebssauerstoffs. Polarographische Sauerstoffelektroden (auch als Clark-Elektroden bezeichnet) messen den elektrischen Strom, der an einer Kathode durch Reduktion von Sauerstoff gebildet wird, wobei der erzeugte Strom direkt proportional zu pO_2 ist.^[28] Der Aufbau besteht im Allgemeinen aus einer Platinelektrode, die mit einer Kanüle aus Glas oder rostfreiem Stahl ummantelt ist. Die Spitze ist durch eine gasdurchlässige Membran von der Umgebung getrennt. Mithilfe polarographischer Elektroden durchge-

Tabelle 1: Übersicht über Methoden zur Messung des Gewebssauerstoffs.

Methoden	Materialien	Vorteile	Einschränkungen	spezifische Anwendung	Lit.
polarographische Elektroden	polarographische Elektroden	hochgradig quantitativ, direkte pO_2 -Messung, unabhängig von Perfusion	invasiv, Punktmessung, ortsabhängig, verbraucht Sauerstoff	Punktmessungen, topisch oder im Gewebe	[28–30]
Radioisotop-basierte Bildgebung	PET-Scanner, ^[a] inhalierbare oder injizierbare radioaktive Marker	3D-Ganzkörperbildgebung, nichtinvasiv, Scanner für Anwendung am Menschen erhältlich	geringe räumliche Auflösung, benötigt kurzlebige radioaktive Marker, auf Perfusion angewiesen	Ganzkörperscan oder Organscan	[31–33]
Resonanz-basierte Bildgebung	MRT- oder EPR-Scanner; ^[b] injizierbare Kontrastmittel	nichtinvasiv, Marker sind stabil oder werden nicht benötigt	nicht immer quantitativ, geringe räumliche Auflösung	Ganzkörperscan oder Organscan	[33–38]
optische StO_2 -Messungen	optische Systeme (Pulsoxymeter, DOS/T, PAT, OCT usw.) ^[c]	nichtinvasiv, portable Einheit, keine exogenen Kontrastmittel	misst O_2 -Sättigung anstatt pO_2 , auf Perfusion angewiesen, limitierte Detektionstiefe	klinische Überwachung der O_2 -Sättigung (durch Pulsoxymeter)	[39–45]
Phosphoreszenzlöschung	Sensorfarbstoffe, optische Analysegeräte (Mikroskop, Phosphorimeter, Kamera usw.)	hohe räumliche Auflösung, direkte quantitative Messung des pO_2	limitierte Lichteindringtiefe, nicht für Ganzkörperbildgebung geeignet	intravaskuläre, interstitielle und intrazelluläre Sensoren	[46–50]

[a] PET: Positronenemissionstomographie. [b] MR: Magnetresonanz. EPR: Elektronenspinresonanz. [c] DOS/T: diffus-optische Spektroskopie/Tomographie, PAT: photoakustische Tomographie, OCT: Optische-Kohärenz-Tomographie.

führte pO_2 -Messungen können sehr genau sein, was das Verfahren zum Goldstandard für die Messung des Gewebssauerstoffs macht.^[51] Allerdings sind die Anwendungen am Menschen limitiert, da die invasive Probenplatzierung in den meisten klinischen Situationen nicht toleriert wird. Zusätzlich ist zu beachten, dass polarographische Elektroden für jede Umgebung kalibriert werden müssen, da Umweltfaktoren wie Temperatur und Ionenstärke die Ergebnisse beeinträchtigen. Außerdem sind Nadel-basierte Sauerstoffmessungen sehr ortsabhängig, was unter anderem durch Punktionsschädigungen an Kapillaren und kleinen Blutgefäßen bedingt und verkompliziert wird.^[30] Da die Sonde während der Punktmessung selbst Sauerstoff verbraucht, sind vergleichend-wiederholende Messungen an einer einzigen Gewebestelle eine anspruchsvolle Aufgabe.

Um polarographische Elektroden für die Messung von Gewebssauerstoff geeigneter zu machen, wurden Optimierungsansätze entwickelt. So verwendet ein Elektrodensystem von Eppendorf eine computergesteuerte Motorik, um die Position und Tiefe der Nadel im Gewebe zu steuern.^[30] Mikroelektroden mit einer innerhalb einer Isolatorhülle nach innen versetzten Spitze mit einem Durchmesser von 5–10 μm wurden entwickelt, um Schaden am Gewebe und Störungen der Mikrogefäßsysteme zu reduzieren, um somit eine schnellere Antwort und eine höhere räumliche Auflösung zu erreichen.^[29] Planare Elektroden wurden hergestellt, um transkutane Sauerstoffdruckmessungen ($TcpO_2$), durch An-

bringen der Sonden auf der Hautoberfläche zu ermöglichen.^[52] Hierbei stört jedoch die erforderliche Erhöhung der Hauttemperatur auf 44–45 °C das untersuchte Gewebe. Die oben genannten Technologien konzentrieren sich auf Punktmessungen und sind nicht in der Lage, Gradienten des Sauerstoffpartialdrucks zwischen verschiedenen Regionen des Gewebes zu erfassen. Das kürzlich von Rogers et al. vorgestellte Konzept tragbarer, biokonformer Elektronik kann diese Einschränkungen überwinden.^[53] Dehnbare, strukturierte Platten aus Siliciumschaltkreisen wurden konstruiert, um einen relativ großen Gewebebereich zu bedecken. Dies bildet die Grundlage für die Entwicklung von planaren polarographischen Elektroden, um die zweidimensionale Sauerstoffversorgung des Gewebes zu erfassen. Diese Forschungsrichtung sowie die Integration zukünftiger Methoden mit bereits vorhandenen Gewebe- und Wundversorgungsmitteln sind äußerst vielversprechend.

3. Radioisotoptechniken

Im Unterschied zu polarographischen Methoden, die oft invasiv und auf Punktmessungen begrenzt sind, bieten Radioisotoptechniken hervorragende Möglichkeiten zur dreidimensionalen, nichtinvasiven Ganzkörperbildgebung. Radioisotoptechniken beruhen auf der Detektion der Emission von kurzlebigen Radioisotopen von Elementen wie Sauerstoff,

Stickstoff und Kohlenstoff. Diese Techniken können direkt Aufschluss über Perfusionsänderungen, Veränderungen im Sauerstoffmetabolismus und über pO_2 -Werte von gesundem und erkranktem Gewebe geben.^[34] Radioaktive Marker, wie ^{18}F -Fluormisonidazol (^{18}F -MISO), ^{18}F -Fluorazomycin-Arabinosid (^{18}F -FAZA) und ^{18}F -Flortanidazol (^{18}F -HX4),^[31,32,54] wurden eigens für die Kennzeichnung von hypoxischen Gewebereichen entwickelt. Die Wirkungsweise dieser Marker beruht auf der selektiven Akkumulation von chemisch reduzierten Nitroimidazolen in Zellen unter schwerer Hypoxie. Leider zeigen diese Markierungsmethoden nur hypoxische Regionen und bieten keine Möglichkeit zur direkten, quantitativen Echtzeitmessung des Gewebssauerstoffgehalts.

3.1. Positronenemissionstomographie

Eine Ganzkörperbildgebung von Sauerstoff kann durch die Positronenemissionstomographie (PET), ein funktionelles bildgebendes Verfahren auf Basis isotonenmarkierter chemischer Substanzen, erreicht werden. (Im Unterschied zu strukturellen Bildgebungsverfahren bilden funktionelle Verfahren physiologische Aktivitäten ab.) Diese Isotope emittieren Positronen, die später in Wechselwirkung mit Elektronen Gammastrahlenpaare erzeugen; deren Detektion ermöglicht eine räumliche Lokalisierung mit Auflösung im Millimeterbereich. PET wurde bei der In-vivo-Verfolgung von Sauerstoffversorgung und -verbrauch unter Verwendung ^{15}O -markierter Tracer eingesetzt. Da ^{15}O eine kurze Halbwertszeit von 2,4 min hat, müssen diese Tracer vor Ort mit einem Zyklotron hergestellt werden. Unter Gleichgewichtskonditionen konzipierte Ansätze für die nichtinvasive Untersuchung der Hirndurchblutung und des Sauerstoffmetabolismus in vivo wurden in den frühen 1980er Jahren eingeführt und erforderten eine Dauerinhalation von $^{15}O_2$.^[55,56] Wegen der Strahlenbelastung und der schwierigen Bestimmbarkeit der Einstellung des Gleichgewichtszustandes wurden Techniken entwickelt, die auf einer kurzen $^{15}O_2$ -Inhalation mit anschließender dynamischer Messung von $^{15}O_2$ aufbauen. Diese Messmethode wird nun in der Praxis angewendet.^[57]

Diese Methoden geben quantitativen Aufschluss über Sauerstoffversorgung und -verbrauch im Gewebe durch die Bestimmung des Zuflusses von $^{15}O_2$ durch das arterielle Blut. Parameter wie das zerebrale Blutvolumen (CBV), der zerebrale Blutfluss (CBF), die Sauerstoffextraktionsfraktion (OEF) und die zerebrale Stoffwechselrate von Sauerstoff ($CMRO_2$) können auf Grundlage der Clearance-Rate von $^{15}O_2$ (Abbildung 2) berechnet werden. Diese Parameter wurden gemessen, um den Grad der zerebralen Ischämie bei der Untersuchung von Arterienverschlüssen, Schlaganfällen,^[58] Hirntumoren^[59] und traumatischen Verletzungen des Gehirns zu bestimmen.^[60–64] Darüber hinaus wurde diese Technik auch auf andere Organe wie das Herz angewendet.^[65] Denkbare klinische Indikationen reichen von der Beurteilung von chronischer Ischämie und Tumorstadien bei Krebs^[59] bis hin zur Vorhersage neurologischer Auswirkungen von akuten ischämischen Schlaganfällen.^[66]

3.2. Einzelphoton-Emissionscomputertomographie und kombinierte Techniken

Während PET die Emission von Gammastrahlenpaaren nach Positron-Elektron-Annihilation detektiert, beruht Einzelphoton-Emissionscomputertomographie (SPECT) nur auf einzeln erfassten Gammastrahlphotonen. Zwar bieten SPECT-Bilder eine geringere intrinsische Ortsauflösung als PET, sie sind jedoch viel einfacher und kostengünstiger zu generieren. Hinzu kommt, dass es eine breite Palette an verfügbaren Gammastrahlen-emittierenden Isotopen gibt. Mit dieser Technik kann beispielsweise unter Verabreichung von Technetium-99m-Hexamethylpropylenamin-Oxim (HMPAO) die regionale Gehirndurchblutung gemessen werden (Abbildung 2). Diese Methode zeigte in der Evalua-

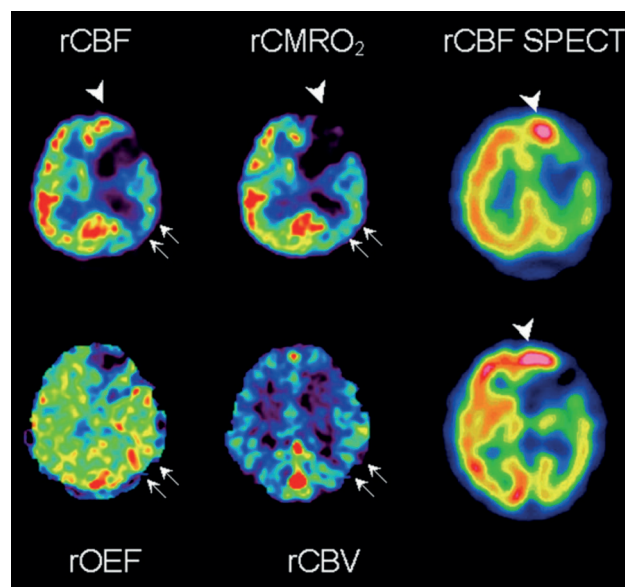


Abbildung 2. Fall eines subakuten linkshemisphärischen Schlaganfalls, hervorgerufen durch eine Okklusion der linken Arteria carotis interna (ACI). Eine ^{15}O -PET-Studie (linke und mittlere Spalte) zeigt eine deutliche Luxusperturbation im linken frontalen Kortex (Pfeilspitze). SPECT-Perfusionsbildgebung mit ^{99m}Tc -HMPAO (rechte Spalte) zeigt Hyperperfusion und Hyperfixation in der gleichen Region (Pfeilspitze). Eine insuffiziente Perfusion ist auch im linken temporo-occipitalen Bereich (kleine Pfeile) zu sehen. rCBF: regionaler zerebraler Blutfluss, rCMRO₂: regionaler zerebraler Sauerstoffverbrauch, rOEF: regionale Sauerstoffextraktionsrate, rCBV: regionales zerebrales Blutvolumen. Adaptiert mit Genehmigung aus Lit. [74].

tion einer hyperbaren Sauerstofftherapie bei Patienten mit Symptomen einer Kohlenmonoxidvergiftung nach der Behandlung eine Erhöhung des regionalen CBF.^[67] HMPAO-SPECT wurde zudem verwendet, um regionalen CBF bei Patienten mit kortikobasaler Degeneration zu untersuchen. Eine verringerte HMPAO-Aufnahme tritt hierbei in abnormalen kortikalen Regionen auf.^[68]

Bei der Untersuchung physiologischer Störungen im Zusammenhang mit der Perfusion und mit Anomalien des Sauerstoffmetabolismus wird häufig eine Kombination von komplementären Bildgebungstechniken zur Bestimmung von

Mehrparameterinformationen durchgeführt. Diese kombinierten Techniken können mit spezialisierten Multifunktionsgeräten wie SPECT/MRT- und PET/MRT-Geräten durchgeführt werden. Hierbei wird in der Regel die strukturelle MRT-Bildgebung mit den molekular spezifischen Informationen der PET oder SPECT kombiniert. Diese kombinierten Ansätze haben sich für die Messung von Sauerstoff und dem Sauerstoffmetabolismus als vorteilhaft erwiesen; anomale Regionen innerhalb von Organen können zunächst über den Magnetresonanzkontrast identifiziert werden und anschließend durch Radioisotopverfahren verfolgt werden.^[69–72] In einer Studie von 1993 von Yamauchi et al. wurden sequenzielle MRI- und PET-Messungen in Studien an Patienten mit Alzheimer durchgeführt.^[73] MRI wurde verwendet, um das Ausmaß der Atrophie des Corpus callosum (Hirnbalken) spezifisch und quantitativ zu bewerten. Die Messung wurde anschließend mit der PET-Messung des zerebralen kortikalen Sauerstoffmetabolismus korreliert.

Trotz vielversprechenden Ergebnissen hat sich die klinische Anwendung von Radioisotoptechniken als Routineverfahren für die Gewebssauerstoffbildgebung nicht durchgesetzt. Gründe hierfür sind die Komplexität der Messungen, die Strahlenexposition der Patienten, die niedrige intrinsische räumliche Auflösung und die Notwendigkeit der Vor-Ort-Herstellung bestimmter radioaktiver Tracer. Darüber hinaus können Messungen nur in durchbluteten Gewebereichen durchgeführt werden, wobei keine direkten pO_2 -Werte bestimmt werden. Trotz dieser Einschränkungen wird die PET weiterhin als Goldstandard in der klinischen Bildgebung der Hirndurchblutung angewendet. Darüber hinaus wird sie weiterhin als Referenz verwendet, um andere Sauerstoffmesstechniken zu validieren.

4. Resonanztechniken

Im Unterschied zu Techniken, die Radioisotope nutzen und Tracer mit Halbwertszeiten von Minuten bis Stunden benötigen, verwenden Resonanztechniken, die in diesem Abschnitt diskutiert werden, stabile Kontrastmittel, die synthetisierbar sind und vor der Verwendung jahrelang gelagert werden können. Resonanztechniken nutzen die nichtinvasive Natur von Magnetfeldern und verwenden Hochfrequenz- oder Mikrowellenstrahlung, um spezifische chemische Spezies in einem biologischen System zu detektieren. Die Selektivität beruht hierbei auf den unterschiedlichen Resonanzfrequenzen innerhalb eines angelegten magnetischen Feldes. Die Magnetresonanz (MR) von Atomkernen und Elektronen wurde für die Erfassung von molekularem Sauerstoff ausgewertet. Kernresonanztechniken wurden basierend auf ^{19}F - und 1H -MR entwickelt. Techniken auf Grundlage elektronischer Resonanz verwenden die Elektronenspinresonanz (EPR) und dynamische Kernpolarisation (DNP).

4.1. Kernmagnetische Resonanz

4.1.1. ^{19}F -MR

Bei der Magnetresonanzbildgebung entsteht der nach der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 gewichtete Kontrast durch Anregen von Atomkernen mithilfe eines Hochfrequenzpulses und anschließende Verfolgung der Geschwindigkeit, mit der das abgestrahlte Hochfrequenzsignal während der Rückkehr der Kerne in die Ausgangslage abklingt. Die longitudinale Komponente des Magnetisierungsvektors geht nach Auslenkung in den Gleichgewichtszustand zurück. Diese Dauer ist durch T_1 gekennzeichnet; entsprechend ergibt sich auch die Relaxationsgeschwindigkeit R_1 ($= T_1^{-1}$).^[75] ^{19}F -Oxymetrie nutzt Perfluorkohlenstoffverbindungen (PFCs) wie Hexafluorbenzol (HFB) und Perfluortributylamin (PFTB) als exogene Kontrastmittel.^[76] Da Spin-Gitter-Relaxationszeiten von ^{19}F in PFCs linear abhängig von Sauerstoffpartialdrücken sind, ermöglicht diese Methode den Zugriff auf das gesamte Spektrum der physiologischen pO_2 -Werte, einschließlich solcher unter hyperbaren Bedingungen.^[77] Ein MR-spektroskopisches Verfahren, das unter Verwendung von PFCs dynamisch den Gewebssauerstoffpartialdruck verfolgt, wurde 1991 von Mason et al. entwickelt.^[78] Diese Methoden wurden später für das bildgebende Verfahren FREDOM (FREDOM = Fluorocarbon Relaxometry using Echoplanar imaging for Dynamic Oxygen Mapping) übernommen und angewendet.^[79]

PFC-Sauerstoff-Kontrastmittel erhöhen die Diffusion des Sauerstoffs und sind dabei ungiftig. 1989 erhielt das erste PFC-basierte Präparat Fluosol eine FDA-Zulassung. Seither wurde eine Reihe anderer Mittel wie Oxygent und Oxycte in klinischen Studien verwendet. Typischerweise wird bei einem In-vivo- ^{19}F -MR-Relaxometrie-Experiment eine PFC intravenös in Form von einer Emulsion oder von Nanopartikeln mehrere Stunden bis einige Tage vor der Messung verabreicht.^[78,80] Wegen der Hydrophobie der Verbindungen können In-vitro-Referenzkurven für In-vivo-Messungen verwendet werden, was sie außerdem wenig beeinflussbar durch Ionen und Proteine im Blutstrom macht.^[81,82] Fluor-Kernspinresonanz (NMR) mit PFC erfordert typischerweise millimolare Konzentrationen von Kontrastmitteln, die um Größenordnungen größer sind als die ^{18}F -basierten Tracer für PET. Da ^{19}F nicht radioaktiv ist, ist es einfacher in der Handhabung, weil die Messungen nicht durch die 110-minütige Halbwertszeit im Falle ^{18}F -basierter Agentien beeinflusst werden.^[76] Da partikuläre PFCs zu einer extensiven Makrophagenaufnahme und Sequestration im retikuloendothelialen System führen, ist die ^{19}F -Oxymetrie in Organen wie der Leber und der Milz besonders effizient.^[76]

^{19}F -MR-Oxymetrie ist gut etabliert und liefert wichtige Beiträge zur präklinischen Forschung. Sauerstoffmessungen wurden an Tiermodellen, einschließlich Mäusen,^[83] Ratten,^[84] Kaninchen,^[85] Katzen^[86] und Schweinen durchgeführt.^[87] Bei Langzeitstudien wurde in wiederholten Messungen die Sauerstoffsättigung im Tumorgewebe über mehrere Wochen verfolgt.^[84] Zu den jüngsten Entwicklungen in der ^{19}F -Relaxometrie gehört die direkte lokale Injektion von reinen PFCs in das zu untersuchende Gewebe für eine sofortige pO_2 -Bildgebung.^[88,89] ^{19}F -MR-Oxymetrie wurde verwendet, um

pharmakodynamische Rückantworten auf Interventionen, die auf eine Änderung der Gewebedurchblutung abzielen, abschätzen zu können^[90] oder um den Sauerstoffmetabolismus^[91] zu bewerten. Kadayakkara et al. berichteten über PFC-beladene, kultivierte Stammzellen, die in ein Versuchstier implantiert wurden. Dies ermöglicht das Studieren der Stammzellmigration und -retention sowie die Messung von pO_2 -Werten.^[92] Es sei darauf hingewiesen, dass R_1 von pO_2 -Messungen feld- und temperaturabhängig ist und es deshalb erforderlich macht, das System unter experimentellen Bedingungen zu kalibrieren. Die größte Hürde auf dem Weg hin zur klinischen Umsetzung der ^{19}F -Oxymetrie bleibt jedoch der Mangel an MRT-Scannern, die für ^{19}F -Messungen geeignet sind.^[76]

4.1.2. 1H -MR

4.1.2.1. Endogener Kontrast

Eines der ersten Verfahren auf Basis von endogenem MR-Kontrast ist die Bildgebung über Blutsauerstoffgehalt-abhängigen BOLD-Kontrast (BOLD = Blood Oxygenation Level-Dependent). Diese Methode ist eine T_2^* -gewichtete 1H -MR-Messung von Wasser mit Desoxyhämoglobin (dHb) in venösem Blut als endogenem Kontrastmittel.^[93,94] Der BOLD-Effekt wurde bei hochauflösender MR-Bildgebung des Gehirns von Ratten unter Verwendung einer Pulsfolge entdeckt, welche die Magnetfeldempfindlichkeit steigerte. Während der Messung wurde festgestellt, dass der Kontrast anatomischer Details der Blutgefäße vom Sauerstoffgehalt im Blut abhängt. Wie nun bekannt ist, wird dieser Kontrast durch Unterschiede in der magnetischen Empfindlichkeit zwischen Oxyhämoglobin (Oxy-Hb) und Desoxyhämoglobin (dHb) verursacht; Eisen(II) hat vier ungepaarte Elektronen in dHb und keine in Oxy-Hb. Die Inhomogenitäten des lokalen Magnetfeldes, die durch das paramagnetische dHb verursacht werden, spiegeln sich in Änderungen der transversalen Relaxationszeit T_2^* des Wassers im venösen Blut sowie im Gewebe um die Blutgefäße wider.^[35]

Trotz der vielen Vorteile dieser nichtinvasiven, markierungsfreien Technik, die Ganzkörperaufnahmen mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung generiert, ist die BOLD-Anwendung zur Messung des Gewebssauerstoffs nicht problemlos realisierbar, vor allem wegen des Fehlens einer direkten Korrelation zwischen T_2^* und pO_2 .^[95] Darüber hinaus hängt der Betrag des BOLD-Effekts von der Gesamtmenge von dHb ab; Änderungen im Blutvolumen können dem Effekt der Änderung der Sauerstoffanreicherung im Blut entgegenwirken.^[38,96] Magnetfeldinhomogenitäten, die durch Mängel des Magneten, schlechtes Shimming, Luft-Gewebe-Grenzflächen und metallische Implantate verursacht werden, können die Messungen außerdem beeinflussen.^[35] Darüber hinaus können Änderungen des pH-Wertes des Blutes, der Temperatur und der Glukosewerte die Hämoglobindissoziationskurve verändern, was Einfluss auf den tatsächlichen, vom dHb-Gehalt abhängigen pO_2 -Wert haben kann.^[38] Nicht zuletzt sei angemerkt, dass es für eine Evaluierung des Gewebssauerstoffes per BOLD-MRT nötig ist, dass die roten Blutkörperchen in das zu untersuchende Gewebe transportiert werden. Dies ist oft nicht der Fall, z. B. in Geweben unter

ischämischen oder chronisch hypoxischen Bedingungen wie Tumoren mit fehlerhaften Gefäßsystemen.^[95]

Die menschliche zerebrale Blutsauerstoffversorgung wurde in großem Stil mittels BOLD-MRT untersucht.^[35,97] Wegen der Empfindlichkeit bei der Detektion von pO_2 -Schwankungen bildet der BOLD-Kontrast die Basis für die funktionelle MRT (fMRT), die allgemein auf dem Gebiet der kognitiven Neurowissenschaften verwendet wird. Durch die Anwendung des BOLD-MRI-Signals auf Hämodynamik und Stoffwechsel des Gehirns kann man die Sauerstoffextraktionsfraktion (OEF) und den zerebralen Sauerstoffverbrauch ($CMRO_2$) evaluieren.^[98,99] Das Verfahren wurde auch für die Untersuchung der Mikroumgebung von Tumoren angewendet,^[100,101] und es wurde gezeigt, dass es am empfindlichsten für Sauerstoffniveaus um Blutgefäße ist.^[95]

Ein kürzlich entwickeltes MR-Oximetrieverfahren nutzt den Gewebssauerstoffgehalt-abhängigen TOLD-Kontrast (TOLD = Tissue Oxygen Level Dependent), der aus einer Verringerung des T_1 -Wertes von Gewebewasser durch den molekularen Sauerstoff entsteht. Matsumoto et al. zeigten, dass T_1 -Signale durch hyperbare Behandlungen in Tumoren beeinflusst werden.^[102] Die Sauerstoffversorgung hängt stark vom Blutfluss ab, und dieser kann durch quantitative T_1 - und T_2 -Messungen und per Diffusions-MRT detektiert werden. Es wurde gezeigt, dass diese Parameter mögliche Marker für Gewebshypoxie sind.^[103] Bei aktuellen Untersuchungen am Menschen werden unter anderem multiparametrische Abbildungen mithilfe endogener Kontrastmittel für die Bewertung der Sauerstoffanreicherung in Tumoren angefertigt.^[104]

4.1.2.2. Exogener Kontrast

Das Protonen-basierte Gegenstück zur ^{19}F -Relaxometrie ist die 1H -Oximetrie, die im letzten Jahrzehnt entwickelt wurde und allgemein verfügbare MRT-Scanner verwendet. Das von der Gruppe um Mason entwickelte PISTOL (Proton Imaging of Siloxanes to map Tissue Oxygenation Levels)^[105] nutzt Siloxane als Kontrastmittel und basiert auf Funktionen, die auf dem linearen Zusammenhang zwischen der Spingitter-Relaxationszeit R_1 ($= T_1^{-1}$) der Protonen in Siloxan und dem lokalen pO_2 -Wert beruhen. Das am häufigsten verwendete Siloxan ist hierbei Hexamethyldisiloxan (HMDSO), wenngleich ähnliche Verbindungen ebenfalls untersucht wurden.^[106,107] HMDSO wurde als optimales PISTOL-Kontrastmittel ausgewählt, was vor allem auf seine Ähnlichkeit zum bekannten, in der ^{19}F -Relaxometrie verwendeten HFB zurückzuführen ist. Die Molekülsymmetrie von Siloxan und die niedrigere Elektronegativität von Silicium generieren ein einziges NMR-Signal, das spektral klar vom Signal des Gewebes getrennt werden kann. Dies ermöglicht eine leichte Identifizierung von HMDSO bei gleichzeitiger Unterdrückung von Signalen, die von Wasser oder Fett generiert wurden. HMDSO hat einen physiologischen sauerstoffsensitiven Dynamikbereich bei Körpertemperatur und wird als reaktionsträge und untoxisch beschrieben.^[108]

Diese Technik wurde auch angewendet, um die Sauerstoffversorgung von Gewebe in Nagetiermodellen zu verfolgen. Gulaka et al. beschrieben einen spektroskopischen Bildgebungsansatz und berichteten über die pO_2 -Messung in

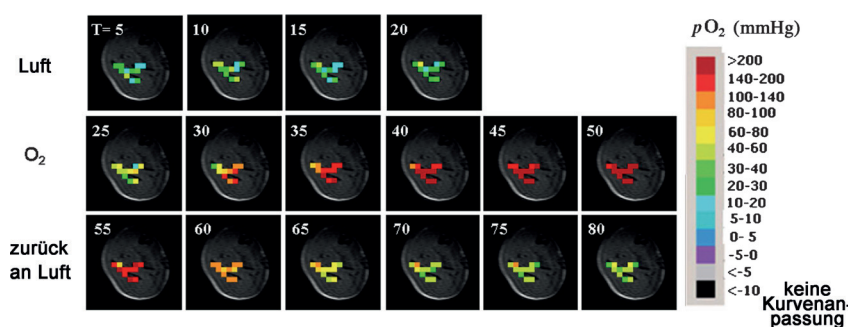


Abbildung 3. Das Darstellen von Veränderungen in der Sauerstoffversorgung in vivo gegenüber Sauerstoffprovokation mit HMDSO-Nanosonden. Spin-Echo-Bilder eines repräsentativen Oberschenkelmuskels einer Fisher-344-Ratte mit Überlagerung der PISTOL- pO_2 -Kartierung über die Zeit (oben: Ausgangslage bei Luftatmung für 20 min.; Mitte: 30 min Sauerstoffatmung; unten: 30 min Rückkehr zur Luftatmung), zeigen die Effekte einer hyperoxischen Gasvariation. Die Akquisition für die erste pO_2 -Kartierung startet bei $T = 1.5$ min, das Ende der Aufnahmezeit (in Minuten) ist auf den Bildern angegeben. Adaptiert mit Genehmigung aus Lit. [106].

Oberschenkelmuskeln von Fisher-344-Ratten in Reaktion auf einen Sauerstoff-Provokationstest (Abbildung 3).^[106] Einschränkungen für diese Technik resultieren vor allem aus der Nutzung von exogenen Kontrastmitteln, der Kontrastmittelabbau-bedingten Abweichung, der Notwendigkeit von wiederholten Injektionen für die Langzeitüberwachung und der unerwünschten Biodistribution des Kontrastmittels. Jüngste Entwicklungen in PISTOL konzentrieren sich auf die Gestaltung von optimalen Vehikeln für den Transport der Siloxane. Liu et al. zum Beispiel zeigten kürzlich, dass eingebettete Kontrastmittel, die chemisch gesteuert Organe adressieren, eine längere Retentionszeit aufweisen, was sich für eine longitudinale Verfolgung der Sauerstoffanreicherung im Gewebe besonders eignet.^[107]

4.2. Elektronenresonanztechniken

Eine Magnetresonanztechnik zur Detektion der Resonanz von ungepaarten Elektronen ist die Elektronenspinresonanz (EPR). Diese ist in der Lage, paramagnetische chemische Spezies, einschließlich Triplett-Molekülen und Radikalen, zu detektieren. Molekularer Sauerstoff ist in seinem Grundzustand ein Triplett-Molekül, das grundsätzlich paramagnetisch ist. Eine direkte Detektion von Sauerstoff in biologischen Systemen ist wegen der verbreiterten Spektrallinien nicht möglich;^[38] daher erfordern EPR-Messungen von Sauerstoff exogene paramagnetische Substanzen.^[109] Da die In-vivo-Konzentrationen anderer endogener paramagnetischer Spezies, wie Metallionen und freier Radikale, im Allgemeinen zu niedrig ist, um interferierende Hintergrund-EPR-Signale zu erzeugen, wird auf exogene EPR-Kontrastmittel zurückgegriffen, die eine hohe Empfindlichkeit und ein hohes Signal/Rausch-Verhältnis bei der Sauerstoffmessung aufweisen. Allerdings muss die Biokompatibilität derartiger EPR-Kontrastmittel sorgfältig überprüft werden. Bei der EPR-Oximetrie kommen zwei Klassen von paramagnetischen Materialien am häufigsten zum Einsatz: lösliche Ma-

terialien (beispielsweise Nitroxide, Triarylmethylradikale) und unlösliche partikuläre Materialien (z. B. Lithiumphthalocyanin, Kohlen, Tuschen, Tinten und Pigmentruße).^[38]

Nitroxide werden entweder allein oder an Trägermoleküle gebunden verabreicht, um Selektivität in Zellen und Organen zu erreichen. Sie haben den Nachteil, dass sie im biologischen Milieu instabil sind und schnell in diamagnetische Hydroxylamine umgewandelt werden. Vorteilhafterweise ist dieser Stoffwechselprozess Sauerstoffabhängig und kann daher genutzt werden, um den Redoxstatus, sowohl in vitro als auch in vivo, zu verfolgen.^[109] Die Entwicklung der partikulären, paramagnetischen Kontrastmittel hatte einen starken Einfluss auf die In-vivo-Anwendungen der EPR-Oximetrie. Gegenüber löslichen, freien Radikalen haben unlösliche, teil-

chenförmige, paramagnetische Materialien eine wesentlich höhere Spindichte, die in einigen Fällen zu einer bis zu 1000-mal höheren Empfindlichkeit für Sauerstoff führt.^[36] Diese Materialien sind auch über eine breite Spanne von pH-Werten und Redoxbedingungen stabil, wodurch wiederholte pO_2 -Messungen an der gleichen Stelle durchgeführt werden können. Die ersten EPR-oxymetrischen Experimente am Menschen wurden mit India Ink ausgeführt. Diese Tusche besteht aus einer Suspension von Rußteilchen und wurde vor Tausenden von Jahren im China der Jungsteinzeit entdeckt.^[36]

EPR-Oximetrie wurde verwendet, um die Sauerstoffversorgung im Gehirn von Mäusen,^[101,110] am Herzen,^[111] im Gastrointestinaltrakt,^[112] in der Skelettmuskulatur,^[113] in der Leber,^[114] in Nieren^[115] an der Haut^[116] sowie bei pathophysiologischen Zuständen wie Krebs zu messen.^[101,117] Die Methode zeigt eine hohe Empfindlichkeit für geringe pO_2 -Werte, und es können wiederholte Messungen an der gleichen Stelle für die langfristige Gewebeüberwachung durchgeführt werden (Abbildung 4).^[118,119] Sie wurde auch verwendet, um die Sauerstoffanreicherung in Tumoren nach Anwendung der photodynamischen Therapie zu messen. Dabei zeigten sich zeitabhängige Änderungen im pO_2 -Wert, die durch Gefäßokklusionen hervorgerufen wurden.^[120] Um die EPR-Oximetrie jedoch weiter in den klinischen Alltag zu überführen, muss die Biokompatibilität der partikulären Sauerstoffsensoren genauer untersucht werden. Frühe klinische Studien beruhten entweder auf vorhandenen Ruß-basierten Tattoos, der Anwendung von paramagnetischen Materialien auf der Oberfläche der Haut oder der Injektion von India Ink in spezifische Regionen.^[36] Darüber hinaus müssen für sensorische Sauerstoffanwendungen die Instrumente, die bei niedriger Frequenz ($\nu < 300$ MHz) arbeiten, in ihrer Eindringtiefe für die Anwendungen in menschlicher Haut optimiert werden.

Als Alternative zu EPR detektiert die dynamische Kernpolarisation (Dynamic Nuclear Polarization, DNP) freie Radikale in biologischen Geweben durch die Aufnahme von Kernspinresonanzsequenzen bei simultaner Bestrahlung mit

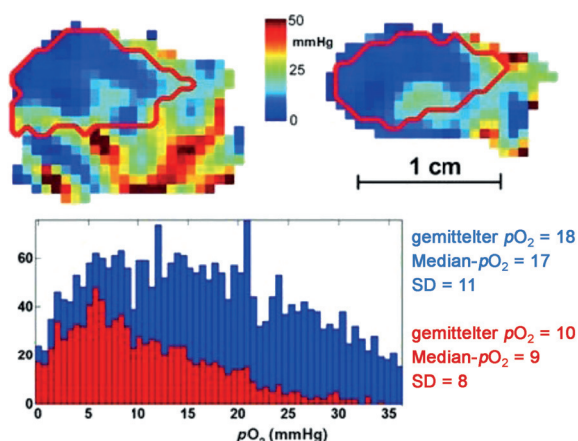


Abbildung 4. EPR-Sauerstoffbildgebung des Beins einer Maus mit einem MCA4-Tumor. Sagittale (links) und koronale Schichten (rechts) sind dargestellt, mit Tumorumriss, generiert per MRI (rot). Der Farbskalierung repräsentiert die pO_2 -Skala im Bereich 0–50 mmHg. Das Histogramm zeigt pO_2 -Werte aus dem gesamten Bild (blau) und aus dem Tumorumriss (rot). Die maximalen pO_2 -Werte entsprechen ca. 50 mmHg in etwa 10 Voxeln im Bein und ca. 35 mmHg in einzelnen Voxeln im Tumor. Adaptiert mit Genehmigung aus Lit. [118].

spezifischen EPR-Resonanzen. Der Transfer der Polarisation von Elektronen zu Protonen führt zu einer Verstärkung des beobachteten NMR-Signals über den Overhauser-Effekt.^[121] Es wurde gefunden, dass der Overhauser-Verstärkungsfaktor von der Linienbreite der paramagnetischen Materialien abhängt und daher umgekehrt proportional zu pO_2 ist.^[122] Krishna et al. demonstrierten dieses Prinzip, um in einem Mausmodell mithilfe von Oxo63,^[121] einem Tritylradikal, eine Bildgebung der Sauerstoffanreicherung zu erreichen. Bei „angeschaltetem“ EPR stieg der T_2 -Kontrast wegen der Ansammlung von Oxo63 in Tumorebenen signifikant an, und gleichzeitig wurden pO_2 -Änderungen nach Carbogengasinhaltung demonstriert (Carbogen = Gasgemisch aus 95 Vol.-% CO_2 und 5-Vol.-% O_2).

In den vergangenen Jahrzehnten entwickelte nuklearmedizinische und Resonanztechniken ermöglichen eine nicht-

invasive 3D-Ganzkörperbildgebung für eine Reihe physiologisch relevanter Parameter und haben dadurch das Verständnis der Sauerstoffverteilung auf der Ebene von Geweben und Organen verbessert (Tabelle 2).^[33,34,38] Wegen Voxeldimensionen im Bereich von Millimetern bis Zentimetern können diese Techniken keine mikroskopischen Gewebauflösungen erreichen. So sind z. B. die MR-Techniken sehr gut in der Lage, makroskopische Tumormassen während eines Ganzkörperscans zu lokalisieren, können hierbei jedoch keine Informationen über Tumorerogenitäten in submillimetergroßen Läsionen liefern. Zusätzlich sind Resonanztechniken für eine topische Bildgebung wegen der Signalstörung an der Gewebe-Luft-Grenze ungeeignet. Daher können sie nicht ohne weiteres verwendet werden, um Wundsauerstoffanreicherung und das Heilungspotenzial zu beurteilen. Diese Verfahren beruhen außerdem auf hochentwickelten Instrumenten, die groß und teuer sind, was ihre Verwendung in einer Reihe von klinischen und Notfallszenarien erschwert. Das Messen des Gewebssauerstoffs mit optischen Methoden ist in vielerlei Hinsicht eine sinnvolle Ergänzung zu den oben genannten Methoden – mit der Möglichkeit zur mikroskopischen Auflösung und Auslesegeräten, die so transportabel gebaut werden können, dass sie am Patientenbett Anwendung finden.

5. Optische Methoden zur Hämoglobin-basierten Bestimmung der Sauerstoffsättigung

Die Mehrzahl der optischen Verfahren zur Sauerstoffmessung basiert auf zwei fundamentalen Ansätzen: Absorptionskontrast durch Hämoglobin-Sauerstoff-Bindung und Lumineszenzlöschung (Quenching) durch Sauerstoff. Beide Methoden messen den Sauerstoffgehalt, beruhen aber auf zwei wichtigen, jedoch verschiedenen Messgrößen der Sauerstoffanreicherung. Absorptionskontrastverfahren nutzen die Tatsache, dass Oxyhämoglobin und Desoxyhämoglobin unterschiedliche Absorptionsspektren haben, zur Berechnung der Gewebssauerstoffsättigung (StO_2); Lumineszenzbasierte Methoden, die auf Quenching der Emission durch

Tabelle 2: Resonanzverfahren zur Messung von Sauerstoff in Gewebe.

	Methoden	Kontrastmittel	Merkmale	Einschränkungen	Lit.
Kernresonanz	^{19}F -Relaxometrie	Perfluorkohlenstoffverbindungen (PFCs)/ T_1	hohe Empfindlichkeit, kein Gewebegrundergrundsignal	Mangel an geeigneten klinischen ^{19}F -MRT-Scannern	[37,75–92]
	BOLD/TOLD	endogenes dHb/ T_2^* oder T_1	nichtinvasiv, keine Injektion von Kontrastmitteln erforderlich	nicht direkt quantitativ	[35,38,93–104]
	1H -Relaxometrie	Siloxane/ T_1	Anwendung mit Proton-MRT-Scannern möglich	hochentwickelte Kontrastmittel benötigt	[105–108]
Elektronenresonanz	EPR	paramagnetische Materialien/ T_2 -bezogen	empfindlicher für Sauerstoff als NMR bei niedrigem pO_2	Mangel an klinischen EPR-Scannern	[36,38,109–120]
	dynamische Kernpolarisation	paramagnetische Radikale/EPR-verstärkte NMR	NMR-Signale durch Elektronenresonanz verstärkt	benötigt Instrumentierung mit kleinem Strahlungsfeld	[121,122]

Wechselwirkung mit molekularem Sauerstoff beruhen, messen hingegen die absolute direkte Sauerstoffkonzentration.

StO₂ ist eine wichtige klinische Messgröße der Blutsauerstoffanreicherung, die über mehrere Absorptionsmethoden, einschließlich der Pulsoximetrie,^[39] diffus-optischen Spektroskopie und Tomographie (DOS/T),^[123,124] photoakustischen Tomographie^[42] und optischen Kohärenztomographie (OCT) detektiert werden kann.^[125] Da der Absorptionskontrast von Hämoglobin keine Zugabe von Farbstoffen oder Markern erfordert, sind diese Methoden von großem klinischem Nutzen. Die bekannteste dieser Methoden ist die Pulsoximetrie, die auf der Messung der Absorptionsdifferenz zweier verschiedenen transmittierter Lichtwellenlängen basiert. Die typischerweise verwendeten Wellenlängen betragen $\lambda = 660\text{--}940\text{ nm}$ und werden durch dünne Gewebe, wie einen Finger oder ein Ohrläppchen, transmittiert. Licht von $\lambda = 660\text{ nm}$ erfährt eine größere Absorption durch Desoxyhämoglobin, während Licht bei $\lambda = 940\text{ nm}$ stärker von Oxyhämoglobin absorbiert wird. Durch Messung der periodischen Modulation dieser differentiellen Absorption in gepulstem Blut trägt nur die Sauerstoffsättigung von arteriellem Blut zur Messung der Sauerstoffsättigung bei, ohne dabei Beiträge von anderen absorbierenden Spezies, wie venösem Blut, zu analysieren. Details zur Entwicklung der Pulsoximetrie und ihren vielen Anwendungen können in mehreren ausgezeichneten Übersichtsartikeln gefunden werden.^[39,126,127]

Diffus-optische Spektroskopie und Tomographie (DOS/T) ermöglichen durch Absorptions-basierten Kontrast auch Messungen von StO₂; diese sind komplex, bieten jedoch einen wesentlich größeren Nutzen. In DOS/T durchdringen verschiedene Lichtwellenlängen das Gewebe, wo sie dann absorbiert oder in der trüben Gewebeumgebung gestreut werden. Einige der gestreuten Photonen können zu Detektoren hin abgeleitet werden; abhängig von der Art des DOS/T-Systems können die Detektoren entweder im Durchleuchtungs- oder Reflexionsmodus betrieben werden. Das Spektrum der gestreuten Photonen, die an jedem Detektor ankommen, kann in unterschiedlichen Abständen und Positionen von der Lichtquelle gemessen werden, um hierbei die Lichtabsorption an spezifischen Orten und Tiefen innerhalb des Gewebes zu bestimmen. Durch die Verwendung von Emitter- sowie Detektorarrays können bei der DOT Tomogramme von Gewebeparametern wie der Sauerstoffsättigung in 3D erzeugt werden.^[128] Durchlichtkonfigurationen wurden bei der Messung der StO₂ bei Brustkrebs als nützlich befunden.^[129] Eine der bekanntesten Anwendungen der DOT ist eine nichtinvasive Messung der Sauerstoffanreicherung im Gehirn, eingeführt von Chance. In einer Reihe von Studien waren Chance und seine Mitarbeiter in der Lage, nicht nur statische StO₂ zu messen,^[124] sondern auch dynamische Veränderungen, die durch mentale Aktivität in den verschiedenen Regionen des Gehirns verursacht wurden. Umfassende Übersichtsartikel über Entwicklung und Anwendungen der diffus-optischen Spektroskopie, Tomographie und Bildgebung sind verfügbar.^[40,41,130]

Die Lichtabsorption durch Hämoglobin kann auch direkt durch die Nutzung von photothermischen Effekten nachgewiesen werden. Wenn ein Molekül Licht absorbiert, kann die

Energie durch lokalisierendes Erwärmen in die Umgebung verteilt werden. Wird eine geeignete Anzahl an Photonen in einem kurzen Puls appliziert, kann die thermische Beaufschlagung eine rasche Volumenexpansion in der Umgebung der Moleküle bewirken, was zur Bildung einer Ultraschallwelle führt, die anschließend detektiert werden kann. Dies ist das zugrundeliegende Prinzip der kürzlich entwickelten photoakustischen Tomographie (PAT), die die dreidimensionale Lage von Molekülen im Gewebe durch Absorptionskontrast darstellen kann. PAT zeichnet sich durch eine Differentialabsorptionsmessung aus, wie sie auch bei der Pulsoximetrie und DOS zur Messung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins verwendet wird. Da der Kontrast optisch erzeugt, aber mittels Ultraschall gemessen wird, bietet PAT hochauflösende Bildgebung der Gefäße millimetertief im Gewebe.^[42,43]

Die optische Kohärenztomographie (OCT) ist eine optische Technologie analog zum Ultraschall: Mithilfe der Low-Kohärenz-Interferometrie (LCI) ist OCT in der Lage, schnell hochaufgelöste ($<1\text{ }\mu\text{m}$) Tomogramme von Gewebe mit mehreren Millimetern Eindringtiefe zu erstellen. Spectral Domain OCT (SD-OCT) macht Gebrauch von breitbandigem Nahinfrarotlicht und spektraler Detektion, sodass es möglich ist, die im spektralen Interferogramm codierten Absorptionsinformationen zu nutzen, um daraus Informationen über die Sauerstoffsättigung im Gewebe abzuleiten. Dieser Ansatz wird als spektroskopische OCT beschrieben und zeigt vielversprechende Eigenschaften bei der Detektion des Status der Sauerstoffanreicherung im Blut.^[45,131] Unter Nutzung der gleichen photothermischen Effekte wie bei der photoakustischen Bildgebung wurde in letzter Zeit an der Entwicklung photothermischer OCT-Verfahren gearbeitet. Durch Alternieren der Lichtexposition von Gewebe gegenüber zwei Nah-Infrarot(NIR)-Frequenzen erreicht man in der bichromatischen, photothermischen OCT (dual wavelength photothermal OCT, DWP-OCT) eine selektive Detektion der Hämoglobinabsorptions-induzierten Phasenänderung des Blutes zur Berechnung der Sauerstoffsättigung in vivo im Gewebe.^[44,132]

6. Lumineszenzlöschungs-basierte Sauerstoff-sensorik

Die Erfassung der Gewebssauerstoffsättigung ist ein hilfreicher Ansatz zur Messung des im Blut enthaltenen Sauerstoffs und beruht auf der Existenz der Perfusion, liefert jedoch keine Informationen über die Konzentration an gelöstem Sauerstoff innerhalb von Gewebe und Zellen. Eine Kenntnis des Gewebssauerstoffpartialdrucks ist entscheidend für die Erkennung und Untersuchung von Hypoxie und Ischämie, die selbst in vermeintlich gut durchbluteten Regionen mit hohen StO₂-Niveaus auftreten können. Optische Bildgebung auf Basis von Lumineszenzlöschung ermöglicht eine direkte Messung und Quantifizierung von Sauerstoffkonzentrationen in Gewebe, selbst in Abwesenheit von Blut. Da Lumineszenzsensoren ein intensiv untersuchtes Studienfeld in den Bereichen Chemie, Biophysik und Medizin sind, wird sich der Rest dieses Abschnitts auf die jüngsten Ent-

wicklungen von Verfahren auf Basis der Lumineszenzlöschung konzentrieren.

Für ausführliche Hintergrundinformationen empfehlen wir dem Leser eine Reihe detaillierter Übersichtsartikel neueren Datums, welche die vielen für die optische Sauerstoffsensoren entwickelten Materialien und deren Design-Prinzipien sowie Messtechniken und Anwendungen vorstellen.^[46–50] Optische Sauerstoffsensoren auf Basis von Lumineszenzlöschung beruhen auf der Energieübertragung zwischen einem Luminophor im angeregten Zustand und dem molekularen Sauerstoff, wobei die Emission des Luminophors gelöscht wird. Der Quenching-Effekt auf die Lumineszenzintensität und Lebensdauer eines Sensors wird durch die Stern-Volmer-Gleichung [Gl. (1)] beschrieben, wobei I_0

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 pO_2 \quad (1)$$

und τ_0 die Phosphoreszenzintensität und Lebensdauer repräsentieren; im Falle der Abwesenheit von Sauerstoff sind I und τ die zugehörigen Parameter zu einem bestimmten Sauerstoffpartialdruck pO_2 ; k_q ist die Löschungskonstante, die auf die Diffusionsgeschwindigkeit von Sauerstoff und dem Luminophor bezogen ist.^[133] Intensitäts- und Lebensdauer-messungen wurden jeweils mit verschiedenen Systemen wie Spektrometern, Kameras und Mikroskopen realisiert, was Messungen auf unterschiedlichen räumlichen und zeitlichen Skalen ermöglicht.^[50]

Methoden, die auf der Messung der Lumineszenzintensität basieren, sind vorteilhaft wegen ihrer Einfachheit und können leicht in bestehende Abbildungssysteme eingefügt werden. Zum Beispiel wurden kommerziell erhältliche CCD- und CMOS-Kameras verwendet, um die Intensitätsverteilung der Phosphoreszenz zu erfassen und um Sauerstoff in zweidimensionalen Oberflächen zu quantifizieren.^[133,134] Da das Verfahren durch eine inhomogene Beleuchtung und eine ungleichmäßige Verteilung der Sensormoleküle limitiert sein kann, können zum Sensorleuchtstoff colokalisierte, Sauerstoff-unabhängige Referenzfarbstoffe verwendet werden. Digitale Farbkameras, die getrennte RGB-Kanäle verwenden, wurden eingesetzt, um das Verhältnis dieser Signale zu messen.^[135] Hochauflösende, Intensitäts-basierte Sauerstoffbildgebung auf zellulären und subzellulären Ebenen wurde auch mit Laserscanning-Mikroskopen erreicht.^[136]

Im Unterschied dazu sind Lebenszeit-basierte Ansätze vorteilhafterweise unabhängig von der Anregungsintensität, der Detektorempfindlichkeit und der Konzentration der Messproben; in diesem Zusammenhang kamen Methoden in der Frequenz- oder Zeitdomäne zum Einsatz. Zeitdomänen-messungen umfassen das Anregen der Sonden-moleküle mit einem kurzen Lichtimpuls und die Aufzeichnung des Zerfallsprofils, wobei in der Regel Methoden wie die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (Time-correlated Single-Photon Counting) angewendet werden. Die schnelle Methode zur Bestimmung der Lebensdauer von Woods et al.^[137] ermöglicht die Berechnung der Phosphoreszenzlebensdauer über die an zwei gesonderten Zeitfenstern entlang der Zerfallskurve erfassten Intensitäten. Lebensdauer-basierte Bildgebung wurde auch mit zeitgesteuerten CCD-Kameras

durchgeführt.^[48,138–140] Frequenzdomänenmessungen hängen von den Sonden-moleküle mit moduliertem Licht an und bestimmen die Lebensdauern durch Messen der Phasenverschiebung zwischen den Anregungs- und Emissionssignalen.^[141,142] Bei der Verwendung von Sonden mit einer langen Lebensdauer ($> 1 \mu s$) wird die Hintergrundfluoreszenz durch eine zeitlich gesteuerte Bildakquisition unterdrückt.^[143]

Diese Methoden lieferten die Grundlage für viele Studien, wie die Messung des intravaskulären pO_2 -Niveaus in verschiedenen Gewebetypen, einschließlich Tumoren im Gehirn, der Netzhaut und im Herzen.^[144–147] Zusätzlich zu den am häufigsten eingesetzten Intensitäts- und Lebensdauer-basierten Sauerstoffauslesesystemen wurden auch viele andere Ansätze, wie die Fluoreszenzanisotropiemessung,^[148] der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)^[149] und die Zweiphotonenanregung,^[7,147,150] für die Sauerstoffsensoren angepasst, um mit ihren einzigartigen Eigenschaften spezifische Anwendungsanforderungen zu erfüllen.

6.1. Sondendesign

Die Einführung der Sauerstoff-abhängigen Phosphoreszenzlöschung^[133,134] führte zu einem Schub bei der Entwicklung und Herstellung von Sauerstoffsensoren. Wegen des Wunsches nach einer Abkehr von früher verwendeten, einfachen Ruthenium(II)- und Iridium(II)-Komplexen wurden Prinzipien der Synthesechemie implementiert, um weiter fortgeschrittene, Porphyrin-basierte Sonden mit hochabstimmbaren strukturellen und spektralen Eigenschaften zu entwickeln, die sich für die Verwendung in biologischen Umgebungen eignen.

6.1.1. Ru^{II} - und Ir^{III} -Komplexe

Frühe Anwendungen physiologischer Sauerstoffsensoren umfassten die Verwendung einfacher Komplexe, die entweder kommerziell erhältlich waren oder durch einfache Verfahren hergestellt werden konnten. Rutheniumkomplexe wie $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ^[151–153] ($bpy = 2,2'$ -Bipyridin) und $[Ru(phen)_3]^{2+}$ ^[152,154] ($phen = 1,10$ -Phenanthrolin) wurden verwendet, um intrazellulären Sauerstoff in murinen und humanen Zelllinien darzustellen (Tabelle 3). Ihre Limitierungen bestanden in schlechter Membranpermeabilität und heterogener intrazellulärer Verteilung. Die letztgenannten Hürden können durch Bildgebungsansätze wie die Lebenszeitmessung überwunden werden.^[151,153] Verbesserte zelluläre Aufnahme wurde durch Modifikation der Rutheniumliganden erreicht. $[Ru(bpy-pyr)(bpy)_2]^{2+}$ ^[155] ($bpy-pyr = 4-(1''\text{-Pyrenyl})-2,2'$ -bipyridin) und $[Ru-Py]^{2+}$ ($[(bpy)_2Ru(N-(pyren-1-ylmethyl)-1,10-phenanthrolin-5-amin)]^{2+}Cl^-$; $Py = N-(Pyren-1-ylmethyl)-1,10-phenanthrolin-5-amin$),^[156] beide mit angelagerten lipophilen Substituenten an den Liganden, wiesen erhöhte Zellmembranpermeabilitäten auf und zeigen auch eine Reaktion auf Veränderungen der intrazellulären Sauerstoffniveaus. $[Ru-Py]$ erwies sich zudem wirksam, eine Ischämie im Bein von Nacktmäusen aufgrund des verringerten Blutflusses infolge einer Ligatur zu erkennen.^[156]

Tabelle 3: Lumineszierende, sauerstofffassende Ru^{II}- und Ir^{III}-Komplexe und ihre Verwendung.

Sonde	experimentelles System	Anmerkung	Lit.
[Ru(bpy) ₃] ²⁺	J774-Makrophagen	Lebenszeitbildung; ungleichmäßige Intensität, konstante Lebenszeit	[151]
	humane Fibroblasten	keine Penetration durch intakte Membranen	[152]
	BEAS-2B _{NNK} -Epithelzellen	Messungen der Lebensdauer; konzentrationsunabhängig	[153]
[Ru(phen) ₃] ²⁺	J144-Makrophagen	hohe Konzentration und lange Inkubation benötigt	[152]
	J774-Makrophagen	hohe Konzentration benötigt	[154]
[Ru(bpy-pyr)(bpy) ₂]	J774-Makrophagen	passive Penetration der Membran	[155]
[Ru-Py]	humane Adenokarzinomzellen (A549) der Lunge	verstärkte Zellpermeabilität; In-vivo-Ischämiebildung	[156]
BTP	orale Plattenepithelkarzinom-SCC-7-Zellen der Maus	subkutane In-vivo-Tumorsauerstoffanreicherung	[158]
BTPHSA	SCC-7-Zellen	im NIR emittierend; In-vivo-Bildgebung in größerer Tiefe	[158]
C343-Pro ₄ -BTP	HeLa-Zellen	begrenzte Aufnahme, FRET-anregbar, ratiometrisch	[149]

Gegenüber Rutheniumkomplexen bieten Iridiumsensoren eine bessere Möglichkeit der Farbabstimmung, sodass die Synthese von im nahen Infrarot (NIR) emittierenden Sonden für tiefe Gewebssauerstoffsensitivität möglich wird (Tabelle 3).^[157] NIR ermöglicht eine erhöhte Lichtpenetration gegenüber sichtbaren Wellenlängen, da es im trüben Gewebe weniger gestreut wird. Die präparative Abstimmbarkeit wird durch Acetylacetonat(acac)-Liganden des BTP-Komplexes [Ir(BTP)₂(acac)] (BTP = Bis(2-(2'-benzothienyl)pyridinato-N,C^{3'})iridium(acetylacetonat)), gewährleistet, und Iridiumkomplexe wurden genutzt, um funktionalisierte Sauerstoffsonden zu synthetisieren, die für die Visualisierung der subkutanen Tumorsauerstoffanreicherung in Nacktmäusen verwendet wurden.^[158] BTPHSA, ein Carbonsäurederivat von BTP, das entwickelt wurde, um bei längeren Wellenlängen zu absorbieren und zu phosphoreszieren, erlaubt die Visualisierung von Tumoren in größeren Tiefen als BTP, sodass eine Sauerstoffbildung des ganzen Tieres in mehreren Millimetern Tiefe durchgeführt werden konnte.^[158] Die Funktionalisierung des Acetylacetonatliganden an BTP mit einem Triphenylphosphoniumkation führte zu BTP-Mito, dem ersten Mitochondrien-spezifischen Iridiumkomplex für die Sauerstoffsensitivität.^[159] Yoshihara et al. berichteten kürzlich von C343-Pro₄-BTP,^[149] einem ratiometrischen, FRET-anregbaren Sensor, der aus einem kovalenten Konjugat von BTP und Cumarin 343 (C343) besteht, verbunden über ein lineares Porlintetramer. Die Sonde veranschaulichte die Sauerstoff-abhängige Phosphoreszenzemission in lebenden HeLa-Zellen (Abbildung 5).

6.1.2. Porphyrin-basierte Sensoren

Ru- und Ir-Komplexe bildeten zwar die Grundlage für den Aufbau von derivatisierten Sauerstoffsensoren, allerdings

sind die Anzahl und Art der Liganden, die an das Zentralmetall koordinieren können, beschränkt. Die Metalloporphyrinklassen, die in den letzten Jahrzehnten entwickelt

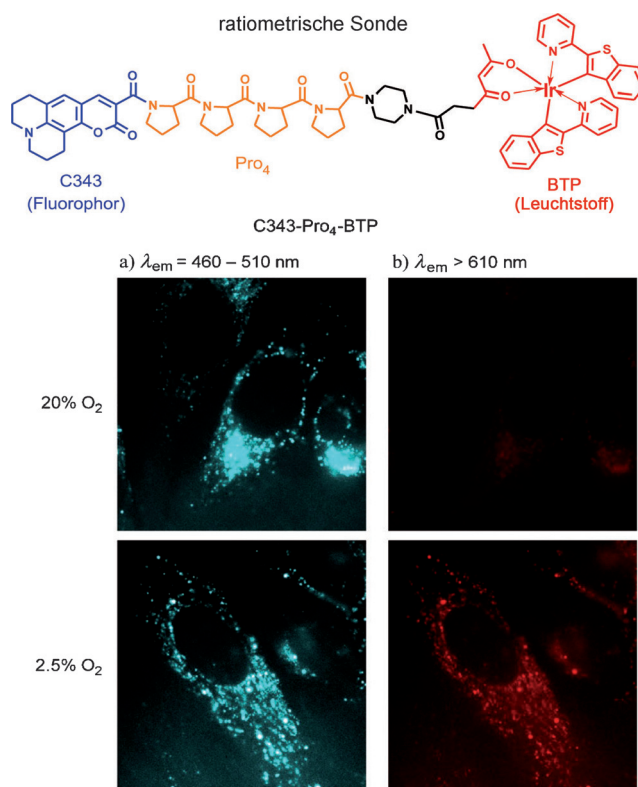


Abbildung 5. Oben: Struktur des ratiometrischen Sensors C343-Pro₄-BTP. Unten: Lumineszenzbilder (λ_{ex} = 400–410 nm) von HeLa-Zellen, die unter 20% und 2.5% O₂ inkubiert wurden und bei λ_{em} = 460–510 nm (a) und bei über 610 nm (b) aufgenommen wurden. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [149].

wurden, enthalten dagegen eine Vielzahl peripherer Gruppen, die leicht funktionalisiert werden können. Zusätzlich haben Platin- und Palladium-Porphyrin-Komplexe optimierte photophysikalische Eigenschaften für sauerstoffsensorische Anwendungen, z.B. eine deutlich höhere Phosphoreszenzquantenausbeute bei Raumtemperatur und längere Lebensdauern als Ru- und Ir-Sensoren.

Unmodifizierte Platin- und Palladium-Porphyrin-Komplexe wurden in frühen Studien unter Verwendung von Phosphoreszenzlöschtechniken dazu genutzt, physiologische Sauerstoffänderungen im Gewebe unter verschiedenen Bedingungen zu identifizieren. Die Wilson-Gruppe maß *ex vivo* die Sauerstoffverteilung in isolierten Rattenlebern, die durch die Pfortader mit Pd-Coproporphyrin-haltigem Medium durchströmt wurden.^[133] *meso*-Tetra(4-carboxyphenyl)porphyrinypalladium (PdTCPP) wurde bei der Messung der Sauerstoffdruckverteilungen im Gehirn von narkotisierten Tieren bei experimentell induzierter Hypoxie und Reperfusion^[160] eingesetzt und weiter für die Erstellung von pO_2 -Kartierungen in Retinae in Tiermodellen verwendet.^[146,161] Ein Mikroskop-basiertes Abbildungssystem, das von Shonat und Kight für die Messung von Phosphoreszenzlebenszeiten entwickelt wurde,^[146] nutzt PdTCPP-basierte Sonden unter Injektion in choroidale und retinale Blutgefäße von Mäusen. Sauerstoffpartialdrücke bei verschiedenen systemischen Sauerstoffniveaus wurden kartiert, um Unterschiede zwischen arteriellen, venösen und kapillären Bereichen der Netzhaut aufzuzeigen (Abbildung 6).

Eine präparative Erweiterung der π -Struktur der Pt- und Pd-Porphyrine führt zu einer Rotverschiebung der Absorptionsspektren. Die sich daraus ergebenden, im Roten und NIR absorbierenden Leuchtstoffe ermöglichen eine tiefere Lichtpenetration und eine verbesserte Abbildungstiefe. Green 2W, ein wasserlösliches Analogon von *meso*-Tetraphenyltetrabenzoporphyrinypalladium (PdTBP), ermöglicht die nichtinvasive In-vivo-Bildgebung des Gefäßsystems von Mäusen mit subkutanen Tumoren.^[162] Zusätzlich sind sauerstoffempfindliche Porphyrine mit Emissionswellenlängen im roten und NIR-Bereich sowie mit einer längeren Lebensdauer leicht von Fluorophoren zu unterscheiden und können so zur Entwicklung von dualen Abbildungsansätzen verwendet werden. Zum Beispiel wurde von Barlow et al. ein Fluoreszenz/Phosphoreszenz-System entwickelt, das NADH-Fluoreszenzbildgebung mit einer Verfolgung der Sauerstoffkonzentration kombiniert,^[163] dies geschieht unter Verwendung von *meso*-Tetra(*p*-sulfonatophenyl)porphyrinypalladium(II) (PdTSPP) als Sauerstoffsensor.

Ungeachtet des Erfolgs dieser frühen, unmodifizierten Metalloporphyrine zur intravaskulären pO_2 -Messung sind ihre Anwendungen oft wegen der geringen Löslichkeit in wässrigen Medien und wegen der ausgeprägten Wechselwirkungen mit den in biologischen Umgebungen vorliegenden Makromolekülen eingeschränkt. Um diese Hürde zu überwinden, wurden Porphyrinmoleküle mit mehreren funktionellen Oberflächengruppen synthetisiert, um den Aufbau von Dendrimeren und makromolekularen Sensoren (in Tabelle 4 zusammengefasst) zu ermöglichen. Diese Konstrukte können sich durch eine verbesserte Löslichkeit und Biokompatibilität gegenüber „nackten“ Porphyrinen auszeichnen und können

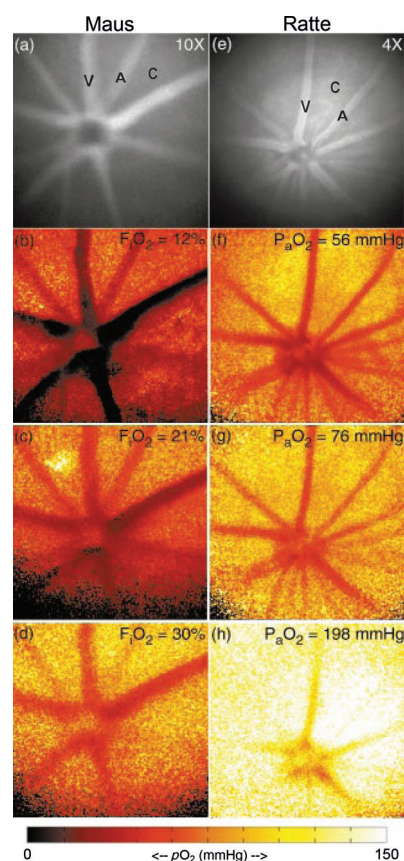


Abbildung 6. Intensitätsbilder der Phosphoreszenz (a und e) und kolorierte 2D-Karten in der Retina einer Maus und einer Ratte. Die Karten zeigen inspiratorische Sauerstoffanteile (F_iO_2) und arterielle Blutgas-sauerstoffpartialdrücke (P_aO_2) für die Maus bzw. die Ratte. Die rechten oberen Ecke der Bilder (a) und (e) zeigen die verwendeten Mikroskopobjektive. Arterielle (A), venöse (V) und kapilläre (K) Regionen sind auf den Bildern (a) und (e) gekennzeichnet. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [146].

über eine Kombination mit Targeting-Einheiten für eine verbesserte Bioverteilung sorgen.

Zu den ersten Porphyrindendrimeren für die Sauerstoffsensorik gehören Oxyphor R2 und G2, zwei wasserlösliche, polyglutamische Pd-Porphyrindendrimere der 2. Generation mit Kernen aus PdTCPP und PdTBP.^[164–166] Die Kalibrierungskonstanten dieser frühen intravaskulären Sonden wurden zur Messung von physiologischen Sauerstoffpartialdrücken verwendet und wurden wegen der Bildung an Albumin als geeignet befunden. Sie wurden für die Messung von Sauerstoffdrücken in tierischen Geweben^[167–169] und subkutanen Tumoren eingesetzt.^[142,145,166] Die Vorteile, das Design und die Eigenschaften dieser in eine dendritische Schicht eingekapselten Porphyrinkerne werden ausführlich in einem Buchkapitel von Vinogradov und Wilson diskutiert.^[48] Aktuelle Fortschritte wurden durch die Entwicklung von Leuchtstoffen gemacht, die unabhängig von Albumin sind; dies wurde mit dem Zusatz einer Oberflächenschicht aus Polyethylenglycol (PEG) erreicht. Unter den Sonden, die synthetisiert wurden, um in In-vivo-Studien die Sauerstoffsättigung von Gewebe zu untersuchen, sind Oxyphor G3^[170–172] sowie Oxyphor R4 und G4.^[173]

Tabelle 4: Sauerstoffdetektierende Porphyrindendrimere und ihre Anwendungen

Sonde	Anwendung	Anmerkungen	Lit.
Oxyphor R2	tierische Gewebe		[167–169]
Oxyphor G2	subkutane Tumoren	NIR-anregbar; erhöhte Eindringtiefe	[142, 145, 166]
Oxyphor G3	pO_2 in Skelettmuskel; interstitieller pO_2 in Tumoren; myokardiale Sauerstoffanreicherung	NIR-anregbar; PEG-ummantelt; von Albumin unbeeinflusst	[170] [171] [172]
Oxyphor G4	Gewebesauerstoffanreicherung in tumor-erkrankten Mäusen		[173]
G3-CAOS	einzellagige Kulturen aus Ovarialkarzinom und multizelluläre 3D-Sphäroide	NIR-anregbar; polykationisch und zellgän- gig	[136]
PtP-C343		Zweiphotonen-anregbar und FRET-aktiviert	[7, 147, 150, 176– 179]
PtTCHP-C307	In-vivo- pO_2 -Karten in zerebralem Gefäßsystem und Knochenmark	Zweiphotonen-anregbar und erhöhte FRET-Effizienz	[180]

Die bislang diskutierten Porphyrindendrimere wurden für die intravaskuläre Sauerstoffbildgebung entwickelt und sind nicht in der Lage, Zellmembranen zu penetrieren. Wegen der Notwendigkeit, die Zellpenetration von Sauerstoffsensoren durch mehrere Zellschichten in festem Gewebe zu erhöhen, entwickelten Nichols et al. kürzlich ein zellpermeables, polykationisches Porphyrindendrimer. Dieses besteht aus einem Azido-funktionalisierten Analogon von PtTBP, das von Poly(amidoamin)(PAMAM)-ähnlichen dendritischen Untereinheiten umgeben ist (Abbildung 7).^[136] Zum Aufbau der Dendron-Untereinheiten wurde ein sequenzielles Syntheschema entwickelt, das eine schnelle Anordnung durch Klick-Chemie ermöglicht. Konfokale Mikroskopie der Phosphoreszenz im NIR belegte die Fähigkeit des neuen Sensors, G3-CAOS (Click-Assembled Oxygen Sensing probe), Hunderte von Mikrometern in mehrzelligen Sphäroiden zu durchdringen, und zeigte seine Empfindlichkeit gegenüber induzierten Sauerstoffveränderungen (Abbildung 7). Unseres Wissens ist dies das erste Porphyrindendrimer für eine Sauerstoffsensoren, das außer einschichtigen Zellmembranen auch mehrere Zellschichten spontan durchdringt, ohne dabei auf eine erleichterte Aufnahme, Transportvesikel oder zellpenetrierende Peptide angewiesen zu sein.

Ein weiteres Problem Lumineszenz-basierter Sauerstoffsensoren ist die inhärente Tiefenbegrenzung bei Anregung mit sichtbarem Licht. Um eine tiefe pO_2 -Bildgebung zu erreichen, entwickelte die Gruppe um Vinogradov eine neue Klasse von dendritischen Sensoren, die die Phosphoreszenzlösung mit der Zweiphotonenmikroskopie kombiniert.^[174–177] Hierbei wird NIR-Anregungslicht verwendet, was die Abbildungstiefe steigert, ohne dabei Abstriche bei der Bildauflösung zu machen. Diese neuen Sonden enthalten dendritische Oberflächen, die mit Zweiphotonen-absorbierenden „Empfangschromophoren“, die wiederum mit einer zusätzlichen PEG-Schicht überzogen wurden, angereichert sind. Die durch die Zweiphotonenanregung der Empfangschromophore absorbierte Energie kann an das zentrale Porphyrin

mittels FRET übertragen werden. Der erste synthetisierte Zweiphotonensensor, PtP-C343,^[176] in Kombination mit Zweiphotonen-Phosphoreszenzlebensdauer-Mikroskopie wurde bei In-vivo-Studien verwendet, um die erste nichtinvasive 3D-Messung der Sauerstoffverteilung in Regionen des Gehirns^[147, 150, 178, 179] und im Knochenmark^[7] bei lebenden Tieren mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung durchzuführen. Kürzlich wurde von der Entwicklung einer neuen Zweiphotonen-anregbaren Empfänger-Kern-Sauerstoffsonde, PtTCHP-C307, berichtet, die sich durch deutlich erhöhte Phosphoreszenz-Quantenausbeuten, erhöhte FRET-Effizienzen (durch minimiertes Quenching mittels Elektronentransfer) und erhöhte Dynamikbereiche des Signals auszeichnet.^[180] PtTCHP-C307 wurde im Rahmen von In-vivo-Messungen des intravaskulären Sauerstoffpartialdrucks im Knochenmark einer lebenden Maus durch den intakten Schädel hindurch getestet (Abbildung 8). Das Ergebnis war in vollem Einklang mit den jüngsten Beobachtungen mittels PtP-C343.^[7] Der neue Lebensdauerdynamikbereich des Sensors wurde als optimal für pO_2 -Messungen unter den meisten physiologischen Bedingungen (0–60 mmHg) befunden, während er bei höheren Sauerstoffgehalten stark gelöscht wird.

6.2. Formulierung und Transport

Die Anwendung von „nackten“ Porphyrinkernen als eigenständige molekulare Sensoren wird durch ihre schlechte Löslichkeit, ineffiziente Zellpermeabilität und nicht-trivialen Wechselwirkungen mit Biomolekülen behindert. Außer den speziellen endogenen Generierungsmethoden, vorgestellt von Mik et al.,^[181–183] gibt es kaum noch weitere Ansätze, eine zuverlässige Sensorzufuhr zu gewährleisten. Eine Möglichkeit bieten hier Dendrimere; außerdem konzentrierte man sich auf die Entwicklung von Konjugaten von niedermolekularen Sauerstoffsensoren mit makromolekularen Trägern oder zellgängigen Peptiden. Die Verkapselung von sauer-

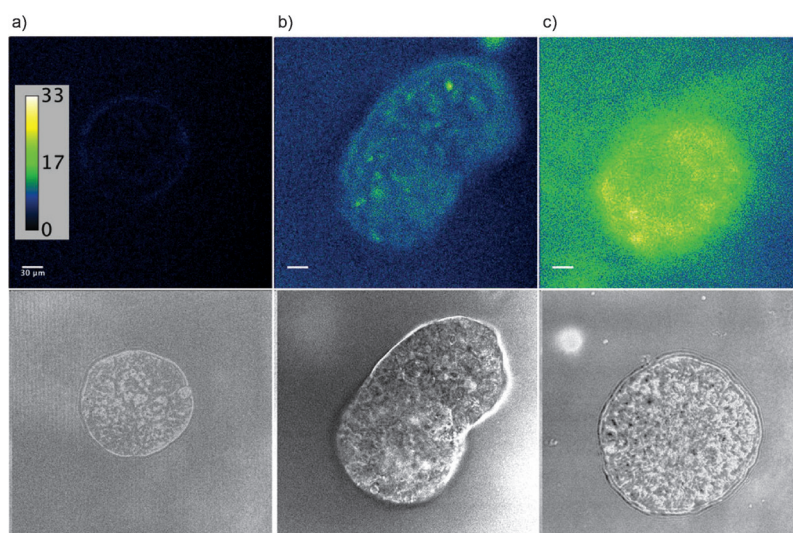
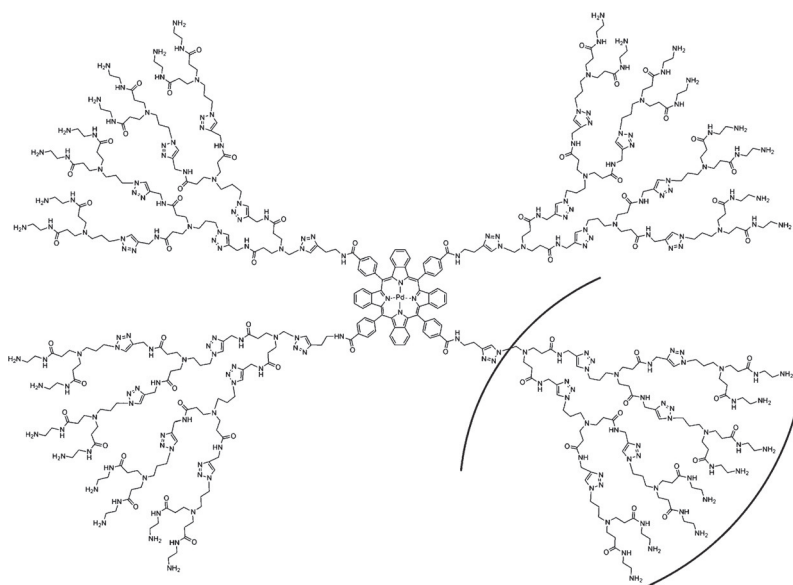


Abbildung 7. Oben: Struktur des G3-CAOS-Sensors. Unten: Bilder der konfokalen Phosphoreszenzmikroskopie von 3D-Sphäroiden aus Eierstockkrebszellen (untere Reihe: Transillumination). a) Unbehandelte Kontrolle; 4 h mit $2\ \mu\text{M}$ G3-CAOS behandelte Sphäroide b) an Luft und c) nach N_2 -Spülung. Die Farbskala oben in (a) repräsentiert die Anzahl der detektierten Photonen. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [136].

stoffdetektierenden Molekülen in Nanomaterialien hat sich zu einem aktiven Forschungsgebiet entwickelt, wobei einige der Einschränkungen bei der Verwendung zellpenetrierender Konjugate überwunden werden sollen. Sauerstoffdetektierende Filme und Folien, die auf Gewebeoberflächen aufgetragen werden können, wurden als nichtinvasive Technik für die Verfolgung der Sauerstoffsättigung eingesetzt.

6.2.1. Konjugat-basierte Transportmethoden

Eine Konjugation mit makromolekularen Trägern, wie Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin, BSA) oder PEG, kann dazu beitragen, die Hämostatilität der Porphyrinsonden zu erhöhen.

Eine Gruppe von sauerstoffdetektierenden Konjugaten, die aus Porphyrinen und BSA oder PEG bestehen, wurde von der Forschungsgruppe um Papkovsky^[184,185] veröffentlicht. Pt-Coproporphyrin-BSA (PtCP-BSA) und PtCP-PEG-Konjugate wurden eingesetzt, um die Sauerstoffaufnahme in *E.-coli*-Bakterienzellen zu verfolgen. Die kovalenten Konjugate von PtCPs, Platin-Coproporphyrin-Keton (PtCPK) und Palladium-Coproporphyrin-Keton (PdCPK) mit BSA,^[186] ermöglichten Messungen der transienten Änderung des intrazellulären Sauerstoffgehalts in A549, in Jurkat-Zellen und in HeLa-Zellen. Die Untersuchung dieser Proben ergab, dass der intrazelluläre Transport von makromolekularen Konjugaten in einigen Fällen (besonders in Säugerzelllinien) zusätzliche Techniken, wie die Beigabe von Transfektionsreagentien, nötig macht.^[186]

Der nächste logische Schritt zur Verbesserung des Transports war das Design von Sauerstoffsonden, die an zellpenetrierende Peptide gekoppelt werden können. Hierbei wurde beispielsweise die TAT-Sequenz genutzt, die dafür bekannt ist, die Zellaufnahme ohne Transfektionsreagentien oder andere Hilfsmittel zu verstärken. Diese Klasse von Sauerstoffsensoren hat eine Reihe von Porphyrinen und Peptiden hervorgebracht,^[187,188] darunter mono- oder tetrasubstituierte PtCP-Derivate mit argininreichen Peptiden,^[189] kovalent an unterschiedliche Oligopeptide gebundenes Octaethylporphyrinyliridium (Ir-OEP)^[190] sowie an Monosaccharide und an kurze Aminosäureträger konjugiertes Tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrinylplatin (PtPFPP).^[191] Letztere Gruppe von kleinen molekularen Sensoren erzielte eine hochauflösende 3D-Kartierung der Sauerstoffanreicherung in mehrzelligen, sphäroiden Kulturen und in Gehirngewebsschnitten. Die Mehrzahl der intrazellulären Sauerstoffsensoren beruht auf metallierten Porphyrinen, es sind aber auch Ru-Komplexe verwendet worden.^[192] Die in

diesem Abschnitt vorgestellten Konjugate sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

6.2.2. Nanomaterial-basierte Transportmethoden

Die Verkapselung innerhalb nanometergroßer Partikel stellt eine physikalische Barriere zwischen der lumineszierenden Sensorkomponente und der Umgebung her. Gleichzeitig führt sie zu einer Erhöhung der Beladungskapazität gegenüber der von einzelnen, eigenständigen Sensoren. Nanomaterial-basierte Sensoren können mit verschiedenen Porositäten synthetisiert werden. Dies ermöglicht es dem Sauerstoff, leichter in die Umgebung zu diffundieren und dort ein Gleichgewicht herzustellen. Darüber hinaus können sie so

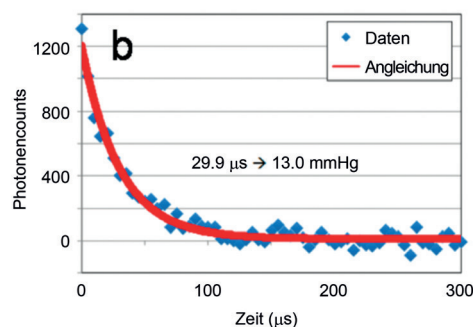
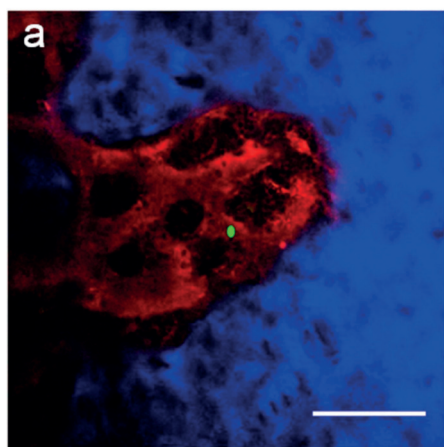
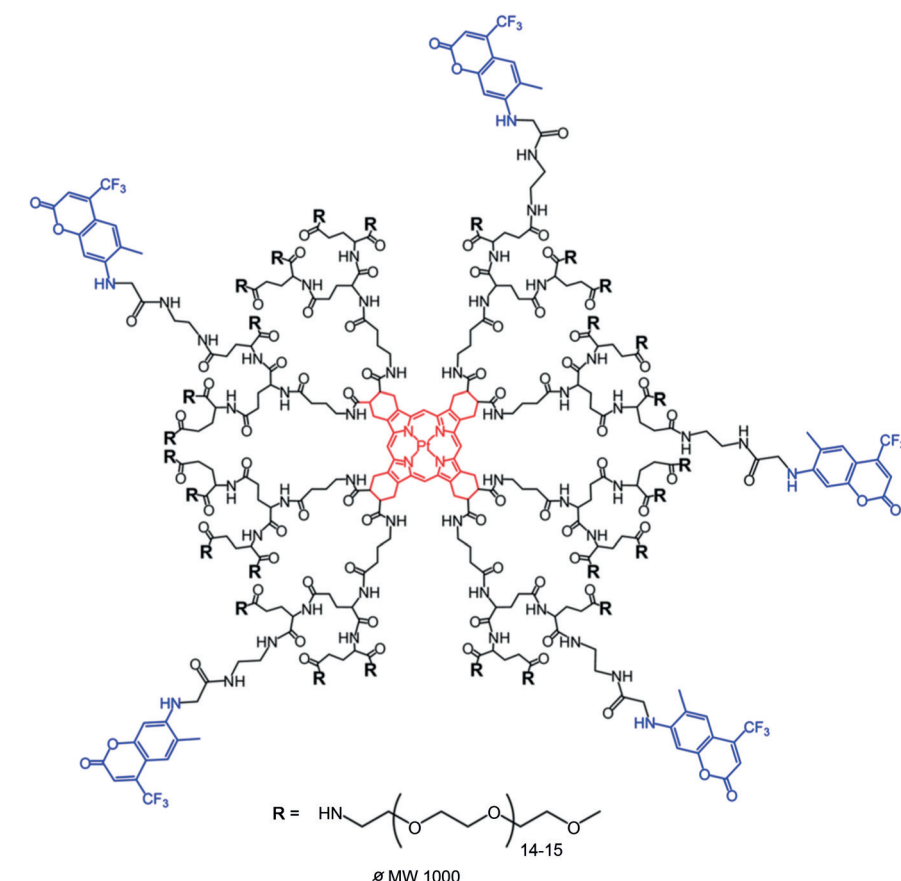


Abbildung 8. Oben: Struktur von PtTCHP-C307. Unten: a) Aufnahme der Knochenmarkblutgefäße. Die Stelle, wo die Lebensdauermessung der Phosphoreszenz durchgeführt wurde, ist als grüner Punkt dargestellt. Blauer Kontrast repräsentiert das Signal der Frequenzverdoppelung aus dem Knochengewebe, während der rote Kontrast von Rhodamin-Dextran stammt, das in den Blutgefäßen zirkuliert. Maßstabsbalken: 100 μm . b) Eine Ausgleichsrechnung mit einer monoexponentiellen e-Funktion ergibt einen $p\text{O}_2$ -Wert von 13 mmHg. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [180].

strukturiert werden, dass sie über eine hohe Dichte an funktionellen Gruppen auf der Oberfläche verfügen, die zur Konjugation mit Targeting-Einheiten verwendet werden können. Eine Zusammenfassung der sauerstoffempfindlichen Nanomaterialien wird in Tabelle 6 gegeben. Die Entwicklung spezifischer Arten von Nanosensoren für bildgebende Anwendungen, wie Siliciumoxidnanopartikel und Hydrogelna-

nosensoren, war Gegenstand von umfassenden neueren Übersichtsartikeln.^[193,194]

Untersuchungen der Aufnahme von Sauerstoffsensor-beladenen Nanopartikeln aus verschiedenen Polymermaterialien in Zellen ergaben, dass es bei Fehlen einer Targeting-Schicht auf der Oberfläche zu einer ineffizienten Zellinternalisierung oder zu gesteigerter Toxizität kommen kann. Dies geschieht, obwohl der Kern der Nanopartikel einen ausreichenden Schutz vor exzessivem Sauerstoff-Quenching bietet.^[195,196] Zur Verbesserung der Zellaufnahme beschrieben Koo Lee et al. kürzlich die gemeinsame Einbettung von Oxyphor G2 und einem sauerstoffunempfindlichen Farbstoff (Alexa-647-Dextran oder HiLyte 680 SE) in Polyacrylamid-Hydrogel-Nanopartikel, welche mit verschiedenen Targeting-Peptiden angelagert wurden.^[197] Die resultierenden Nanopartikel waren nicht-toxische, membran-permeable und tumorspezifische ratiometrische Nanosensoren.

Die Papkovsky-Gruppe entwickelte zudem unterschiedliche Typen von zellpenetrierenden Nanopartikelsensoren;^[198–200] dies geschah unter Verwendung von *meso*-Tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrinylplatin(II) (PtTFPP) als Sauerstoffsensor, eingebettet in Methylmethacrylat- und Methacrylsäure-basierten Copolymeren (Polymethylmethacrylat-*co*-Methacrylsäure (PMMA-MA) und Eudragit RL-100). Die entwickelten Sensoren (Tabelle 6) wurden bei der dynamischen Verfolgung des intrazellulären Sauerstoffniveaus eingesetzt. Das gleiche Porphyrin, PtTFPP, wurde vor kurzem von der Gruppe um Wolfbeis verwendet, um drei verschiedene

phosphoreszierende Nanopartikel zu formulieren. Diese verwenden jeweils den gleichen Polystyrol(PS)/Dodecyltrimethoxysilan(DTS)-Hybridkern, jedoch unterschiedliche Oberflächenschichten, woraus eine Familie von Nanosensoren resultiert, die mitochondriale Dysfunktionen über die Auswertung der extrazellulären, intrazellulären und intramitochondrialen Sauerstoffversorgung evaluieren

Tabelle 5: Konjugierte Sauerstoffsonden und ihre Anwendungen

Sonde	experimentelles System	Anmerkungen	Lit.
PtCP-BSA	humane FL5.12-Lymphoblasten		[184, 186]
PtCP-PEG	<i>E. coli</i> -Bakterienzellen	erleichteter Transport benötigt	[185]
PtCPK-BSA PdCPK-BSA	A549-, Jurkat-, HeLa-Säugerzellen		[186]
PtCP-Oligopeptide	Säuger- und Mauszellen ^[a]	verstärkte zelluläre Aufnahme	[187]
PtCP- Bactenicin 7			[188]
PtCP-Arginin- reiche Peptide	Säuger- und Mauszellen; ^[a, b] MEF-Zellen	unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen	[189]
IrOEP-Oligopeptide			[190]
PtPFPP-Monosaccharide oder kurze Aminosäuren	multizelluläre PC12-Sphäroide; Scheiben von Gehirngewebe der Ratte	3D-Bildgebung der Sauerstoffanreicherung	[191]
Ru-Ahx-R8	Myelomzellen; humane Blutplättchen	Akkumulierung in subzellulären Organellen	[192]

[a] A549: humane Epithelzellen des Adenokarzinoms der Lunge; Jurkat: humane T-Zellen; HeLa: human zervikales epitheliales Karzinom; Lymphoblast-ähnlich; PC12: Phäochromozytom der Ratte; HCT116: humaner Darmkrebs; HepG2: humanes hepatozelluläres Leberkarzinom; SH-SY5Y: humanes Neuroblastom. [b] MEF: embryonale Fibroblasten der Maus.

Tabelle 6: Nanopartikelformulierungen und ihre Anwendungen

Sonde	experimentelles System	Anmerkungen	Lit.
[Ru(dpp(SO ₃ Na) ₂) ₃]Cl ₂ / Polyacrylamid	Hefezellen; humane Adenosarkomzellen MCF-7	verbesserte Aufnahme durch Elektroporation	[195]
Oxyphor R2/Polysaccharid	Chorioallantoismembran von Küken	Toxizität verringert die Viabilität des Embryos	[196]
Oxyphor R2, Alexa647 oder HiLyte 680 SE/ Polyacrylamid-Hydrogel	A549, C6-Gliom- und MCF-7-Zellen	ratiometrisch, mit Targeting-Peptiden umhüllt	[197]
PtTFPP/Eudragit RL-100 (NanO2)	Säuger- und Mauszellen ^[a, b]	kationisch, nichtspezifische Endozytose	[198]
PtTFPP/PFO, Eudragit RL-100 (MM2)	MEF-Zellen; Kulturen aus embryonalen Neurosphären der Ratte	Zweiphotonen-angeregt; FRET-aktiviert; mehrere Detektionsmodalitäten	[199]
PtTFPP/PFO, PMMA-MA (PA2)	MEF-, PC12-Zellen; 3D-Scheiben von Rattenhirnen	anionisch; ratiometrisch, Zweiphotonen-angeregt	[200]
PtOEP/PFO, PDHF	J774A1-Mauszellen	FRET-aktiviert; hell emittierend	[205]
[Ru(dpp) ₃] ²⁺ /lanthanoiddotierte UCNPs	humane U87MG-Glioblastomzellen; Zebrafischembryos	NIR-absorbierend; durch Aufkonvertierung von Licht aktiviert	[206]
BF ₂ dbm(l)/PLA	Brustkrebs-4T1-Mammarkarzinom	ratiometrisch; durchstimmbare Fluoreszenz-/ Phosphoreszenz-Emission	[207]
PdTPTBP/Polystyrol	humane Karzinomzellen ^[c]	NIR-emittierend; mit PEG umhüllt, Antikörper für selektives Targeting	[204]

[a] PC12: Phäochromozytom der Ratte; HCT116: humanes Kolonkarzinom; HepG2: humanes, hepatozelluläres Leberkarzinom, HeLa: humanes Epithelkarzinom, SH-SY5Y: humanes Neuroblastom. [b] MEF: embryonale Fibroblasten der Maus. [c] SK-BR-3: humanes Mammarkarzinom; AsPC1: humane pankreatische Adenokarzinomzellen.

können.^[201] Unter Verwendung verschiedener Kombinationen von Sauerstoffsensoren und Polymermatrices hat Wolfbeis' Gruppe neue Ansätze zur Herstellung von Sensor-dotierten Nanopartikeln entwickelt.^[202,203]

Napp et al. synthetisierten Polystyrolnanopartikel (PS-NPs) mit angehängten monoklonalen Antikörpern, die mit einem NIR-emittierenden PdTBP-Sensor und einem Referenzfarbstoff dotiert wurden.^[204] Diese wurden in der ratiometrischen Zweiwellenlängen- und der Lebensdauer-basierten Sauerstoffsensorik sowohl in vitro an humanen Mammakarzinomzellen als auch in vivo in tumortragenden Mäusen eingesetzt. Neuartige Nanopartikeldesigns ergeben nicht nur verbesserte Targeting-Möglichkeiten, sondern wurden auch dafür entwickelt, Konzepte wie FRET und Aufkonvertierung von Licht für eine vermittelte Lichtaktivierung verkapselter Sauerstoffsensorkomponenten anzuwenden. Wu et al. berichteten über eine Nanopartikelarchitektur, die aus π -konjugierten Polymermolekülen besteht, die mit dem Sauerstoffsensor Octaethylporphyrinylplatin(II) (PtOEP) dotiert sind.^[205] Hierbei überträgt das Polymer seine Anregungsenergie auf den Porphyrinfarbstoff, was zu einer sauerstoffabhängigen Phosphoreszenzemission führt. Sensoraktivierung mittels Aufkonvertierung von Licht gelang bei der Entwicklung von $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$ -beladenen (dpp = 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin), sauerstoffempfindlichen Nanopartikeln durch Liu et al.^[206] Eine aufkonvertierende Nanopartikel-, „Antenne“ absorbiert NIR-Licht und emittiert blaue Photonen, die wiederum $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$ anregen können (Abbildung 9). Diese NIR-absorbierenden Nanosensoren fanden Anwendung für die Bildgebung der Sauerstoffanreicherung in lebenden Zellen bei verschiedenen Sauerstoffgehalten und außerdem für die Erkennung von induzierter, zerebraler Anoxie in lebenden Zebrafischembryos.

Kürzlich wurde von Zhang et al. ein Anregungskonzept vorgestellt, bei dem die Fluoreszenz- und Phosphoreszenzintensitäten bei Raumtemperatur in einem Iodid-substituierten Bordifluorid-Dibenzoylmethan($\text{BF}_2\text{dbm}(\text{I})$)-Analogon abgestimmt werden.^[207] Die Kupplung von Polymilchsäure (PLA) verschiedener Kettenlängen mit dem Borkomplex führte zu Polymeren, deren Fluoreszenz/Phosphoreszenz-Verhältnis durch die Veränderungen des Molekulargewichts moduliert wird. Aus demjenigen Polymer, dessen Fluoreszenz- und Phosphoreszenzintensitäten ausgewogen waren, wurden Nanopartikel hergestellt, die als ratiometrisches Kontrastmittel für eine In-vivo-Quantifizierung der Hypoxie in einer Tumorregion des Mammakarzinoms in einem Mausmodell fungierten.

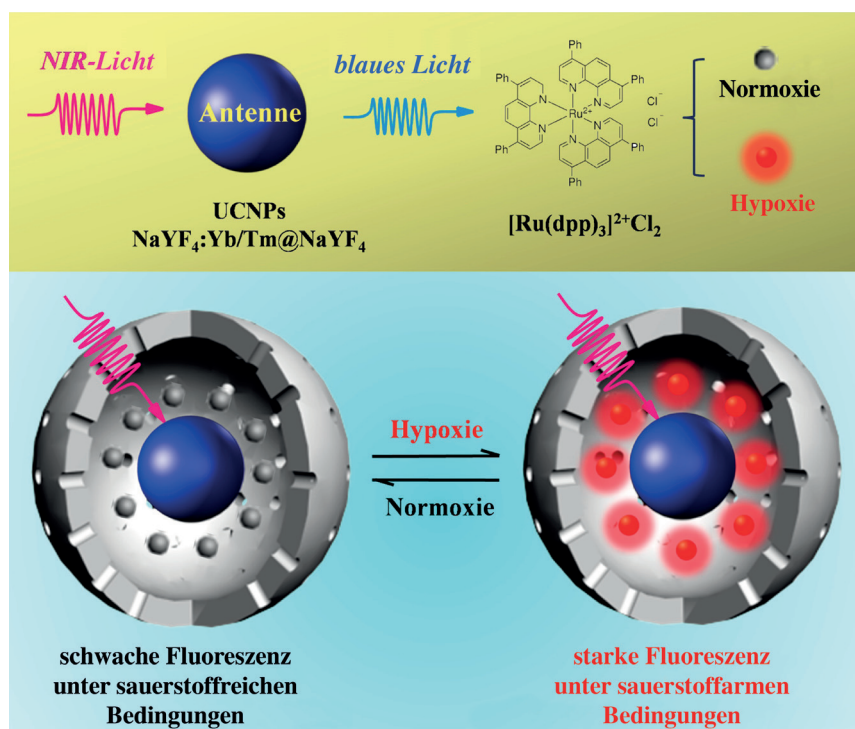


Abbildung 9. Lichtaktivierung der Nanosensoren, ihre Struktur und ihre reversible, sauerstoffabhängige Änderung der Lumineszenzemission. UCNPs = aufkonvertierende Nanopartikel. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [206].

6.2.3. Faseroptik, Sensorfilme und Sensorfolien

Faseroptische Sauerstoffsensoren enthalten lumineszierende Materialien auf dem distalen Faserende und nutzen Lumineszenzlöschung. Sie teilen mit den Clark-Elektroden das Merkmal der dünnen Form, sind dabei aber klein und flexibel und können so in einer Vielzahl von Umgebungen verwendet werden. Ein Beispiel ist OxyLite, ein kommerziell erhältliches Gerät zur faseroptischen Sauerstoffaufnahme, das sich mit modernen Elektroden, z.B. der Firma Eppendorf, vergleichen lässt. Ein Artikel von Griffiths und Robinson präsentiert einen detaillierten Vergleich von OxyLite und Eppendorf-Sonden zur Messung der Gewebssauerstoffversorgung.^[208] Ähnliche Produkte von Ocean Optics und Pre-Sens bieten Glasfasersonden für eine Vielzahl von sauerstoffsensorischen Anwendungen. Zwei aktuelle Übersichtsartikel liefern einen noch deutlich detaillierteren Überblick über Glasfasersauerstoffsensoren und ihre Anwendungen in biologischen Systemen.^[209,210]

Andere Arten von Sensorformulierungen verwenden mit Sauerstoffsensoren imprägnierte Filme und Folien. Sie wurden bei nichtinvasiven Versuchen einer In-vivo-Bildgebung der Gewebesauerstoffanreicherung zur Beurteilung der Viabilität bei Verletzungen und Erkrankungen sowie zur Verfolgung der Fortschritte von therapeutischen Maßnahmen genutzt. Optische Sensorfolien zur Sauerstoffbildgebung am Gewebe wurden von Wolfbeis et al. entwickelt^[211] und erstmals zur Verfolgung des Sauerstoffgradienten in künstlich gezüchtetem Gewebe eingesetzt. Für die ersten In-vivo-Anwendungen wurden transparente, planare Sensoren durch

Einbettung von PtOEP in eine Polystyrolmatrix hergestellt, um die Oberflächen- pO_2 -Werte in Bereichen über tumorösem und normalem Gewebe auf der Haut von Hamstern mit dem Rückenhautkammermodell zu messen.^[212] Transkutane pO_2 -Bildgebung wurde zusätzlich in gesunden Probanden durchgeführt, um eine durch Abbinden induzierte Ischämie am Unterarm zu beobachten. Die transparente Sensorfolie wurde weiterentwickelt, indem PdTBP als Sauerstoffsensor in Polystyrol-co-Acrylnitril-Teilchen integriert wurde, die anschließend in eine biokompatible Hydrogelmatrix eingebettet wurden. Diese verbesserte Sensorfolie wurde evaluiert, indem die Wundheilung an Spalthautentnahmestellen, die als Wundmodell fungierten, durch Oberflächen- pO_2 -Messungen verfolgt wurde.^[213] In-vivo-2D-Bildgebung mithilfe selbstklebender, ratiometrischer Sensorfolien wurde für die Verfolgung der Sauerstoffversorgung von Mäusepfoten verwendet, um die Anwendbarkeit dieser Technik auf die Detektion systemischer Hypoxie zu demonstrieren.^[214] Des Weiteren wurde sie genutzt, um die Hypothese zu prüfen, dass ein geringer Gewebssauerstoffgehalt bei Hautveränderungen im Zuge der Leishmaniose charakteristisch sei.^[215] Kürzlich präsentierten Lehner et al. eine Gruppe von hochempfindlichen optischen Sauerstoffsensoren, einschließlich Bordifluoridchelate und Aluminiumkomplexe, die in Polymermatrices eingebettet und auf Glasobjektträger aufgetragen wurden, um auf diese Weise zu sehr dünnen, getrockneten Schichten zu gelangen.^[216] Diese Sensoren zeigten eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit bei der Quantifizierung von Sauerstoff, mit Nachweisgrenzen bis zu 7 pM in Lösung; sie wurden jedoch noch nicht in biologischen Systemen getestet.

Das Konzept der Verwendung optischer Sensorfolien wurde durch Wolfbeis' Gruppe vorangetrieben, indem sie ein simultanes Zweiparameter-Bildgebungsverfahren entwickelten, um pH- und pO_2 -Werte ausgehend von einem Bild, das von einer herkömmlichen RGB-Digitalkamera aufgenommen worden war, zu messen.^[217] Drei Chromophore wurden in Überlappung mit dem RGB-Farbraum ausgewählt: der rote Sauerstoffsensor PtTFPP, der grüne pH-Sensor Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und der blaue Referenzfarbstoff Diphenylantracen (DPA). Diese Farbstoffe wurden in Polymermikropartikel formuliert und nachfolgend in ein biokompatibles Hydrogel eingeführt. Das Potenzial dieser Methode wurde bei der 2D-Bildgebung von Sauerstoff und pH-Wert in heterogenen, chronischen Wunden demonstriert. Hier ließen die Befunde auf die Detektion einer anhaltenden Entzündungsphase schließen (Abbildung 10). Unter Verwendung des gleichen Zweiparameter-Bildgebungskonzepts wurden der Sauerstoffsensor PdTBP, der pH-Sensor FITC und der Referenzfarbstoff $[Ru(dpp)_3]^{2+}$ unabhängig voneinander in Mikropartikel und anschließend in eine biokompatible Hydrogelschicht aus Polyurethan auf transparenten Folien aus Polyvinylidenchlorid eingebettet.^[218]

Eine transparente, kolorimetrische, auftragbare Bandage wurde kürzlich von Li et al. publiziert.^[143] Die flüssige Bandage wurde mit der Esterform von Oxyphor R2 und mit dem

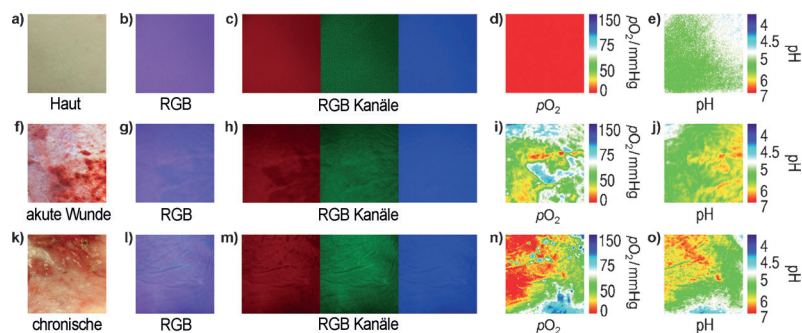


Abbildung 10. In-vivo-Anwendung des dualen pO_2 - und pH-Sensors auf der ebenen Hautoberfläche des inneren (vularen) Unterarms (a–e), eine Hautentnahmestelle (postoperativ, Tag 5) als Modell für eine akute Wundheilung (f–j) und eine chronische Wunde (k–o). Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [217].

Referenzfarbstoff Cumarin 500 in einer Nitrocellulosematrix eingebettet, um damit eine 2D-Abbildung des Gewebssauerstoffs in der Haut bei Verbrennungen und Hauttransplantationen erstellen zu können. Die Sensorbandage wurde in vivo an einem Rattenmodell mit einer ischämischen Extremität sowie in einem Schweinemodell zur Untersuchung von Brandverletzungen (Abbildung 11) und Hauttransplantaten getestet. Diese Machbarkeitsstudie ist der erste Schritt hin zur Entwicklung eines quantitativen, einfach zu bedienenden, klinischen Diagnosewerkzeugs für die Kartierung und Quantifizierung von pO_2 -Werten und dem Sauerstoffverbrauch in Wunden.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Forschung auf dem Gebiet der Sauerstoffsensorik hat eine Reihe von Sonden und Methoden hervorgebracht, die eine Messung der Sauerstoffkonzentration sowohl in Organen und Körperteilen als auch auf subzellulärer Ebene ermöglichen. Von der MRT bis zur PET, von Sensorfolien bis zu Nanomaterialien – auf all diesen Ebenen haben die Synthese und das Design der Sauerstoffsensoren die Ansprüche von Forschung und Klinik erfüllt. Bildgebungstechniken mit hoher räumlicher Auflösung können nun die Sauerstoffverteilung im Menschen visualisieren und so einen detaillierten Einblick in Krankheitsmechanismen sowie das Ansprechen auf eine bestimmte Behandlung liefern. Auf der Mikroebene haben Sauerstoffsensoren es Forschern ermöglicht, zelluläre und subzelluläre Sauerstoffgradienten bei physiologischen Störungen und Krankheiten zu visualisieren und zu quantifizieren. Künftige Entwicklungen in der Sauerstoffsensortechnologie werden in zwei Richtungen erfolgen: bei der Weiterentwicklung von Materialien und Methoden, um Anforderungen der Forschung zu erfüllen, und bei der Überführung von aktuellen Techniken in den klinischen Alltag („from bench to bedside“).

Um die nächste Generation von Sauerstoffsensorsystemen für die biomedizinische Forschung zu entwickeln, sollte bei einer größeren Zahl von Forschern das Interesse geweckt werden, zur Herstellung von Sonden und Verfahren beizu-

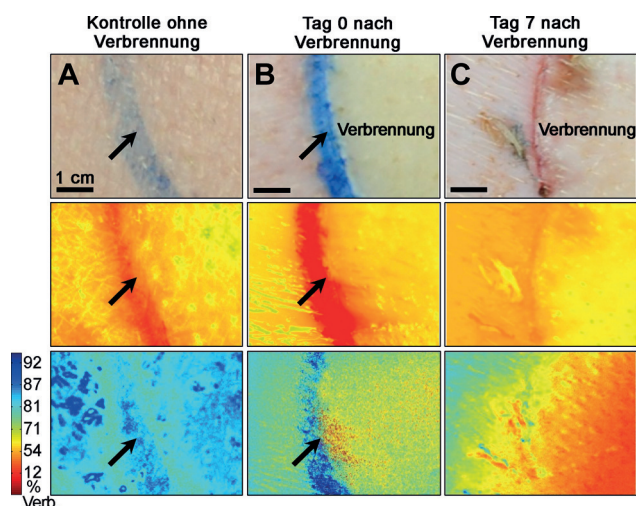


Abbildung 11. Verlauf einer Verbrennung dritten Grades (Epidermis und Dermis betroffen) an einem Schweinemodell, verfolgt durch Sauerstoffsensorik mit der auftragbaren Bandage. A) Unbehandelte Kontrolle, B) unmittelbar nach der Verbrennung, C) sieben Tage nach der Verbrennung. Obere Reihe: normale Fotografien; mittlere Reihe: Emission der Autofluoreszenz der Haut bei $\lambda = 700$ nm; untere Reihe: prozentualer, kartierter Sauerstoffverbrauch (%) nach Eliminierung der Autofluoreszenz. Hoher Sauerstoffverbrauch (Verb.) des Gewebes ist blau codiert, niedriger rot. Die Pfeile weisen auf die Tintenmarkierungen, die zur Unterscheidung von verbrannter und umgebender Haut aufgetragen wurden. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [143].

tragen, die unabhängig von Porphyrinen, Dendrimeren oder der Nanopartikelchemie eingesetzt werden können. Die bisherigen Forschungstätigkeiten waren sehr erfolgreich darin, eine Vielzahl von Parametern der Instrumentierung und des Sondendesigns zu ermitteln – das angesammelte Wissen muss nun auf spezifische Anwendungen fokussiert werden. So ist es in der Krebsforschung, Hirnforschung, Kardiologie und Pulmologie nötig, nicht nur die Gefäßsauerstoffversorgung, sondern auch die Sauerstoffversorgung in festen Geweben zu verstehen. Ischämische Verletzungen, hypoxische Tumorbereiche sowie Schlaganfälle sind alles Bedingungen, unter denen eine präzise räumliche und zeitliche Kenntnis der Sauerstoffsättigung des Gewebes erforderlich ist. Forschungen zu MRT- und PET-Scannern haben unser Verständnis von Sauerstoffverbrauch und -versorgung deutlich verbessert, allerdings konzentriert sich die große Mehrzahl der MR- und PET-Sauerstoffsensoren nur auf das vaskuläre System. Weitere Informationen werden benötigt, um die Folgen solcher Bedingungen besser zu verstehen und um bessere Behandlungen zu entwickeln. Unser Wissen in diesem Bereich würde sich durch gewebe penetrierende Sauerstoffsensoren verbessern, die entweder passiv oder über Targeting-Mechanismen aufgenommen werden könnten. Chemische Toolkits, die einen Sensortransport über die Blutbahn bis hin zu einem ausgewählten Ziel ermöglichen würden, wären höchst vorteilhaft und befinden sich derzeit in der Entwicklung. Dies ist besonders in ischämischen Geweberegionen und in malignem Gewebe eine anspruchsvolle Aufgabe, da hier die hypoxischen Regionen viele Zellschichten entfernt von der eigent-

lichen Blutversorgung liegen können. Bei ischämischen Verletzungen kann es schwierig sein, exogene Wirkstoffe durch beschädigte Blutgefäße hindurch zu transportieren. Ebenso können hypoxische Zellpopulationen in Tumorregionen vorkommen, die durch die anomalen und undichten Tumor-assoziierten Gefäße nur schlecht versorgt werden. Es werden Strategien benötigt, die es ermöglichen, Sauerstoffsensoren aktiv von den Gefäßen aus in entzündetes, beschädigtes und dichtes Gewebe zu transportieren.

Ein weiteres Hindernis, das es für eine routinemäßige Sauerstoffdetektion in anspruchsvollen biologischen Forschungsanwendungen zu überwinden gilt, ist die Empfindlichkeit der Sauerstoffsensoren selbst. Im Bereich der optischen Sensoren sind zahlreiche Lumineszenzsensoren entwickelt worden, von denen viele jedoch nur eine schlechte Quantenausbeute aufweisen, was ihre Emission dunkel und schwer zu detektieren macht. Dies zwingt Forscher dazu, spezielle hochempfindliche und meist teure Detektoren zu verwenden, mit hohen Sensorkonzentrationen, welche die Zellen und das Gewebe stören können, zu arbeiten oder schlicht das niedrige Signal/Rausch-Verhältnis zu akzeptieren. Sauerstoffsensoren mit weit größerer Quanteneffizienz werden für eine in der Forschung breiter anwendbare Sauerstoffquantifizierung benötigt. Dies wird die zur Visualisierung der emittierten Sondensignale erforderliche Instrumentierung vereinfachen und somit zu kostengünstigeren, weniger spezialisierten und einfacher zugänglicheren Toolkits für die weitere Forschung führen.

Dies könnte auch die Möglichkeit kombinierter Ansätze mit Bildgebung auf der Makro- wie auch auf der Mikroebene zu eröffnen. Zukünftige Forschungen würden von multiplexen Sauerstoffsensoren profitieren – so könnten beispielsweise PET-Messungen und optische Detektion kombiniert werden, um zuerst makroskopische Untersuchungen und anschließend eine mikroskopische, intravitale Bildgebung durchzuführen. Solche kombinierten Plattformen wären nicht nur für die Forschung wertvoll – auch in der klinischen Praxis wären Informationen über die Sauerstoffanreicherung auf Gewebs- und Zellebene äußerst nützlich. Beispielsweise werden multimodale Bildgebungs- und Erfassungsmechanismen in der Krebsforschung und in der klinischen Versorgung immer wichtiger und sind somit ein mögliches Ziel für die erste Kombination von Methoden zur Sauerstoffdetektion und Bildgebungsmethoden für eine genaue Lokalisation. Eine Translation solcher Verfahren ist wahrscheinlich schwierig, denn regulatorische Hürden verhindern derzeit die Verwendung von Sauerstoff-Bildgebungssensoren am Patienten. So sind beispielsweise die Siloxansonden, welche die Protonen-basierte MRT-Sensorik der Gefäßsauerstoffversorgung ermöglichen, trotz ihrer Wirksamkeit immer noch nicht von der FDA zugelassen worden. Der einzige derzeit FDA-zugelassene molekulare optische Sauerstoffsensor ist PpIX, der ein relativ niedriges Signal-Rausch-Verhältnis hat und zu einer unerwünschten Photosensibilisierung von Gewebe führen kann.

Die Hürden für eine klinische Anwendung der Oberflächen-Sauerstoffsensorik dürften niedriger sein. Beispielsweise wird die Entwicklung planarer Arrays aus Sauerstoffelektroden für eine 2D-Sauerstoffkartierung der Haut wahr-

scheinlich einfacher genehmigt werden. Sensorfolien und Bandagen für die optische Sauerstoffsensoren könnten ebenfalls niedrigere Zulassungshürden haben, da sie eine leicht auszulesende Sauerstoffkartierung auf der Hautoberfläche ermöglichen. Die Entwicklung von helleren optischen Sauerstoffsensoren würde diese Bemühungen deutlich unterstützen und könnte außerdem Bandagen ermöglichen, deren Informationen mit bloßem Auge, einfach unter Umgebungslicht ausgelesen werden könnten. Durch die Kombination mit tragbaren, kompakten Auslesegeräten wie Smartphones oder mit Wearables wie Google Glass ergeben sich sauerstoffsensorische Werkzeuge, die nicht nur in der klinischen Umgebung, sondern auch in der häuslichen Krankenpflege oder sogar in Situationen fernab von jeder Infrastruktur angewendet werden können.

Wir danken Dr. Lauren A. Austin, Nicholas Nowell, Michael J. Murphy und dem Rest des Evans-Teams für ihre Hilfe bei der Bearbeitung dieses Manuskripts.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8340–8362
Angew. Chem. **2015**, *127*, 8458–8483

- [1] B. M. Koeppen, B. A. Stanton, *Berne & Levy Physiology*, 6. Aufl., Mosby Elsevier, Philadelphia, **2008**.
- [2] A. Carreau, B. El Hafny-Rabhi, A. Matejuk, C. Grillon, C. Kieda, *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, *15*, 1239–1253.
- [3] V. Dhawan, M. DeGeorgia, *J. Neurointerv. Surg.* **2012**, *4*, 407–413.
- [4] A. J. Brooks, J. S. Hammond, K. Girling, I. J. Beckingham, *J. Surg. Res.* **2007**, *141*, 247–251.
- [5] G. H. Danet, *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 126–135.
- [6] K. Parmar, P. Mauch, J.-A. Vergilio, R. Sackstein, J. D. Down, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5431–5436.
- [7] J. A. Spencer, F. Ferraro, E. Roussakis, A. Klein, J. Wu, J. M. Runnels, W. Zaher, L. J. Mortensen, C. Alt, R. Turcotte, R. Yusuf, D. Cote, S. A. Vinogradov, D. T. Scadden, C. P. Lin, *Nature* **2014**, *508*, 269–273.
- [8] J. Yu, W. Cui, D. Zhao, R. P. Mason in *Fluorine and Health* (Hrsg.: A. Tressaud), Elsevier, Amsterdam, **2008**, S. 197–276.
- [9] L. S. Lilly, H. M. School, *Pathophysiology of Heart Disease: A Collaborative Project of Medical Students and Faculty*, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, **2011**.
- [10] M. Carrier, S. Trudelle, P. Thai, L. Pelletier, *J. Cardiovasc. Surg.* **1998**, *39*, 593–597.
- [11] B. R. Soller, C. Hsi, J. Favreau, N. Cingo, R. A. Lancey, O. N. Okike, T. J. Vander Salm, *J. Cardiovasc. Surg.* **2004**, *19*, 167–174.
- [12] S. r. E. Pischke, C. Tronstad, L. Holhjem, P. S. Halvorsen, T. I. Tønnessen, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **2012**, *42*, 157–163.
- [13] W. R. Wilson, M. P. Hay, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 393–410.
- [14] D. Hanahan, R. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- [15] J. Folkman, *Annu. Rev. Med.* **2006**, *57*, 1–18.
- [16] J. Folkman, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 273–286.
- [17] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- [18] D. Ackerman, M. C. Simon, *Trends Cell Biol.* **2014**, *24*, 472–478.
- [19] R.-h. Xu, H. Pelicano, Y. Zhou, J. S. Carew, L. Feng, K. N. Bhalla, M. J. Keating, P. Huang, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 613–621.
- [20] X. Song, X. Liu, W. Chi, Y. Liu, L. Wei, X. Wang, J. Yu, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58*, 776–784.
- [21] J. M. Brown, *Methods Enzymol.* **2007**, *435*, 297–321.
- [22] N. Rohwer, T. Cramer, *Drug Resist. Updates* **2011**, *14*, 191–201.
- [23] S. Koch, F. Mayer, F. Honecker, M. Schittenhelm, C. Boke-meyer, *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 2133–2139.
- [24] J. G. Rajendran, K. A. Krohn, *Radiol. Clin. North Am.* **2005**, *43*, 169–187.
- [25] J. P. Celli, I. Rizvi, C. L. Evans, A. O. Abu-Yousif, T. Hasan, *J. Biomed. Opt.* **2010**, *15*, 051603.
- [26] C. L. Evans, A. O. Abu-Yousif, Y. J. Park, O. J. Klein, J. P. Celli, I. Rizvi, X. Zheng, T. Hasan, *PLoS One* **2011**, *6*, e23434.
- [27] O. J. Klein, B. Bhayana, Y. J. Park, C. L. Evans, *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 3171–3182.
- [28] L. C. Clark, R. Wolf, D. Granger, Z. Taylor, *J. Appl. Physiol.* **1953**, *6*, 189–193.
- [29] D. G. Buerk, *Methods Enzymol.* **2004**, *381*, 665–690.
- [30] M. Nozue, I. Lee, F. Yuan, B. A. Teicher, D. M. Brizel, M. W. Dewhirst, C. G. Milross, L. Milas, C. W. Song, C. D. Thomas, M. Guichard, S. M. Evans, C. J. Koch, E. M. Lord, R. K. Jain, H. D. Suit, *J. Surg. Oncol.* **1997**, *66*, 30–38.
- [31] G. Mees, R. Dierckx, C. Vangestel, C. Van de Wiele, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2009**, *36*, 1674–1686.
- [32] A. Baskin, F. Buchegger, Y. Seimbille, O. Ratib, V. Garibotto, *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2015**, *13*, 209–217.
- [33] J. L. Tatum, G. J. Kellogg, R. J. Gillies, J. M. Arbeit, J. M. Brown, K. S. Chao, J. D. Chapman, W. C. Eckelman, A. W. Fyles, A. J. Giaccia, R. P. Hill, C. J. Koch, M. C. Krishna, K. A. Krohn, J. S. Lewis, R. P. Mason, G. Melillo, A. R. Padhani, G. Powis, J. G. Rajendran, R. Reba, S. P. Robinson, G. L. Semenza, H. M. Swartz, P. Vaupel, D. Yang, B. Croft, J. Hoffman, G. Liu, H. Stone, D. Sullivan, *Int. J. Radiat. Biol.* **2006**, *82*, 699–757.
- [34] K. A. Krohn, J. M. Link, R. P. Mason, *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 129S–148S.
- [35] T. Christen, D. S. Bolar, G. Zaharchuk, *Am. J. Neuroradiol.* **2013**, *34*, 1113–1123.
- [36] H. M. Swartz, N. Khan, J. Buckey, R. Comi, L. Gould, O. Grinberg, A. Hartford, H. Hopf, H. Hou, E. Hug, A. Iwasaki, P. Lesniewski, I. Salikhov, T. Walczak, *NMR Biomed.* **2004**, *17*, 335–351.
- [37] R. J. Gillies, N. Raghunand, G. S. Karczmar, Z. M. Bhujwala, *J. Magn. Reson. Imaging* **2002**, *16*, 430–450.
- [38] B. Gallez, C. Baudelet, B. F. Jordan, *NMR Biomed.* **2004**, *17*, 240–262.
- [39] J. E. Sinex, *Am. J. Emerg. Med.* **1999**, *17*, 59–66.
- [40] D. Boas, D. Brooks, E. Miller, C. DiMarzio, M. Kilmer, R. Gaudette, Q. Zhang, *IEEE Signal Process. Mag.* **2001**, *18*, 57–75.
- [41] B. J. Tromberg, B. W. Pogue, K. D. Paulsen, A. G. Yodh, D. A. Boas, A. E. Cerussi, *Med. Phys.* **2008**, *35*, 2443–2451.
- [42] L. V. Wang, *Med. Phys.* **2008**, *35*, 5758–5767.
- [43] L. V. Wang, S. Hu, *Science* **2012**, *335*, 1458–1462.
- [44] R. V. Kuranov, S. Kazmi, A. B. McElroy, J. W. Kiel, A. K. Dunn, T. E. Milner, T. Q. Duong, *Opt. Express* **2011**, *19*, 23831–23844.
- [45] D. J. Faber, E. G. Mik, M. C. Aalders, T. G. van Leeuwen, *Opt. Lett.* **2005**, *30*, 1015–1017.
- [46] R. I. Dmitriev, D. B. Papkovsky, *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 2025–2039.
- [47] M. Quaranta, S. Borisov, I. Klimant, *Bioanal. Rev.* **2012**, *4*, 115–157.
- [48] S. A. Vinogradov, D. F. Wilson in *Designing Dendrimers*, 1. Aufl. (Hrsg.: S. Campagna, P. Ceroni, F. Puntoriero), Wiley, Hoboken, **2012**, Kap. 12, S. 463–503.
- [49] D. B. Papkovsky, R. I. Dmitriev, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8700–8732.
- [50] X.-d. Wang, O. S. Wolfbeis, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3666–3761.
- [51] M. W. Dewhirst, B. Klitzman, R. D. Braun, D. M. Brizel, Z. A. Haroon, T. W. Secomb, *Int. J. Cancer* **2000**, *90*, 237–255.

- [52] W. L. Yip, *Int. Wound J.* **2014**, DOI: 10.1111/iwj.12356 [Epub ahead of print].
- [53] K. I. Jang, S. Y. Han, S. Xu, K. E. Mathewson, Y. Zhang, J. W. Jeong, G. T. Kim, R. C. Webb, J. W. Lee, T. J. Dawidczyk, R. H. Kim, Y. M. Song, W. H. Yeo, S. Kim, H. Cheng, S. I. Rhee, J. Chung, B. Kim, H. U. Chung, D. Lee, Y. Yang, M. Cho, J. G. Gaspar, R. Carbonari, M. Fabiani, G. Gratton, Y. Huang, J. A. Rogers, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4779.
- [54] D. S. Vikram, J. L. Zweier, P. Kuppusamy, *Antioxid. Redox Signaling* **2007**, *9*, 1745–1756.
- [55] J. C. Baron, M. G. Boussier, D. Comar, F. Soussaline, P. Castaigne, *Eur. Neurol.* **1981**, *20*, 273–284.
- [56] J. C. Baron, M. G. Boussier, A. Rey, A. Guillard, D. Comar, P. Castaigne, *Stroke* **1981**, *12*, 454–459.
- [57] Y. Magata, T. Temma, H. Iida, M. Ogawa, T. Mukai, Y. Iida, T. Morimoto, J. Konishi, H. Saji, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2003**, *23*, 671–676.
- [58] G. Sette, J. C. Baron, B. Mazoyer, M. Levasseur, S. Pappata, C. Crouzel, *Brain* **1989**, *112*, 931–951.
- [59] A. Hino, Y. Imahori, H. Tenjin, N. Mizukawa, S. Ueda, K. Hirakawa, H. Nakahashi, *Neurosurgery* **1990**, *26*, 615–621.
- [60] H. Tenjin, S. Ueda, N. Mizukawa, Y. Imahori, A. Hino, T. Yamaki, T. Kuboyama, T. Ebisu, K. Hirakawa, M. Yamashita, H. Nakahashi, *Neurosurgery* **1990**, *26*, 971–979.
- [61] P. Vespa, M. Bergsneider, N. Hattori, H.-M. Wu, S.-C. Huang, N. A. Martin, T. C. Glenn, D. L. McArthur, D. A. Hovda, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2005**, *25*, 763–774.
- [62] J. P. Coles, T. D. Fryer, M. R. Coleman, P. Smielewski, A. K. Gupta, P. S. Minhas, F. Aigbirhio, D. A. Chatfield, G. B. Williams, S. Boniface, T. A. Carpenter, J. C. Clark, J. D. Pickard, D. K. Menon, *Crit. Care Med.* **2007**, *35*, 568–578.
- [63] D. K. Menon, J. P. Coles, A. K. Gupta, T. D. Fryer, P. Smielewski, D. A. Chatfield, F. Aigbirhio, J. N. Skepper, P. S. Minhas, P. J. Hutchinson, T. A. Carpenter, J. C. Clark, J. D. Pickard, *Crit. Care Med.* **2004**, *32*, 1384–1390.
- [64] M. G. Abate, M. Trivedi, T. D. Fryer, P. Smielewski, D. A. Chatfield, G. B. Williams, F. Aigbirhio, T. A. Carpenter, J. D. Pickard, D. K. Menon, J. P. Coles, *Neurocrit. Care* **2008**, *9*, 319–325.
- [65] M. Lubberink, Y. Y. Wong, P. G. Raijmakers, R. C. Schuit, G. Luurtsema, R. Boellaard, P. Knaapen, A. Vonk-Noordegraaf, A. A. Lammertsma, *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 60–66.
- [66] G. Marchal, C. Serrati, P. Rioux, M. C. Petit-Taboue, F. Viader, V. Delasayette, F. Ledoze, P. Lochon, J. M. Derlon, J. M. Orgogozo, J. C. Baron, *Lancet* **1993**, *341*, 925–927.
- [67] Y. Maeda, Y. Kawasaki, I. Jibiki, N. Yamaguchi, H. Matsuda, K. Hisada, *Eur. Neurol.* **1991**, *31*, 380–383.
- [68] H. S. Markus, A. J. Lees, G. Lennox, C. D. Marsden, D. C. Costa, *Mov. Disord.* **1995**, *10*, 179–187.
- [69] T. Suzuki, K. Ogasawara, H. Kuroda, K. Chida, K. Aso, M. Kobayashi, S. Fujiwara, K. Yoshida, K. Terasaki, A. Ogawa, *Nucl. Med. Commun.* **2012**, *33*, 171–178.
- [70] R. J. Derick in *Hevener's Ocular Pharmacology*, 6. Aufl., CV Mosby Co, St. Louis, **1994**, S. 78–99.
- [71] K. Ogasawara, N. Tomitsuka, M. Kobayashi, N. Komoribayashi, T. Kukuda, H. Saitoh, T. Inoue, A. Ogawa, *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **2006**, *46*, 161–163.
- [72] H. Saito, K. Ogasawara, T. Suzuki, H. Kuroda, M. Kobayashi, K. Yoshida, Y. Kubo, A. Ogawa, *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **2011**, *51*, 479–483.
- [73] H. Yamauchi, H. Fukuyama, K. Harada, H. Nabatame, M. Ogawa, Y. Ouchi, J. Kimura, J. Konishi, *Arch. Neurol.* **1993**, *50*, 1070–1074.
- [74] N. Oku, T. Kashiwagi, J. Hatazawa, *Ann. Nucl. Med.* **2010**, *24*, 629–638.
- [75] V. D. Kodibagkar, X. Wang, R. P. Mason, *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 1371–1384.
- [76] J. X. Yu, R. R. Hallac, S. Chiguru, R. P. Mason, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *70*, 25–49.
- [77] J.-J. Delpuecha, M. A. Hamza, G. Serratrice, M.-J. Stébé, *J. Chem. Phys.* **1979**, *70*, 2680–2687.
- [78] R. P. Mason, R. L. Nunnally, P. P. Antich, *Magn. Reson. Med.* **1991**, *18*, 71–79.
- [79] D. Zhao, S. Ran, A. Constantinescu, E. W. Hahn, R. P. Mason, *Neoplasia* **2003**, *5*, 308–318.
- [80] S. A. Wickline, R. P. Mason, S. D. Caruthers, J. Chen, P. M. Winter, M. S. Hughes, G. M. Lanza, *Fluorocarbon Agents for Quantitative Multimodal Molecular Imaging and Targeted Therapeutics* (Hrsg.: R. Weissleder, S. S. Gambhir, B. D. Ross, A. Rehemtulla), BC Decker Inc., Hamilton, **2010**, S. 542–573.
- [81] S. R. Thomas, R. G. Pratt, R. W. Millard, R. C. Samarasingha, Y. Shiferaw, L. C. Clark, R. E. Hoffmann, *J. Magn. Reson. Imaging* **1994**, *4*, 631–635.
- [82] C.-S. Lai, S. J. Stair, H. Mizioro, J. S. Hyde, *J. Magn. Reson.* **1969**, *57*, 447–452.
- [83] B. P. van der Sanden, A. Heerschap, A. W. Simonetti, P. F. Rijken, H. P. Peters, G. Stüben, A. J. van der Kogel, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1999**, *44*, 649–658.
- [84] R. P. Mason, P. P. Antich, E. E. Babcock, A. Constantinescu, P. Peschke, E. W. Hahn, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1994**, *29*, 95–103.
- [85] H. T. Tran, Q. Guo, D. J. Schumacher, R. B. Buxton, R. F. Mattrey, *Acad. Radiol.* **1995**, *2*, 756–761.
- [86] D. Eidelberg, G. Johnson, D. Barnes, P. S. Tofts, D. Delpy, D. Plummer, W. I. McDonald, *Magn. Reson. Med.* **1988**, *6*, 344–352.
- [87] S. R. Thomas, R. G. Pratt, R. W. Millard, R. C. Samarasingha, Y. Shiferaw, A. J. McGoron, K. K. Tan, *Magn. Reson. Imaging* **1996**, *14*, 103–114.
- [88] B. F. Jordan, G. O. Cron, B. Gallez, *Magn. Reson. Med.* **2009**, *61*, 634–638.
- [89] S. Liu, S. J. Shah, L. J. Wilmes, J. Feiner, V. D. Kodibagkar, M. F. Wendland, R. P. Mason, N. Hylton, H. W. Hopf, M. D. Rollins, *Magn. Reson. Med.* **2011**, *66*, 1722–1730.
- [90] D. Zhao, L. Jiang, E. W. Hahn, R. P. Mason, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2005**, *62*, 872–880.
- [91] C. Diepart, O. Karroum, J. Magat, O. Feron, J. Verrax, P. B. Calderon, V. Grégoire, P. Leveque, J. Stockis, N. Dague, B. F. Jordan, B. Gallez, *Cancer Res.* **2012**, *72*, 482–490.
- [92] D. K. Kadayakkara, J. M. Janjic, L. K. Pusateri, W. B. Young, E. T. Ahrens, *Magn. Reson. Med.* **2010**, *64*, 1252–1259.
- [93] S. Ogawa, T. M. Lee, A. R. Kay, D. W. Tank, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9868–9872.
- [94] S. Ogawa, T. M. Lee, A. S. Nayak, P. Glynn, *Magn. Reson. Med.* **1990**, *14*, 68–78.
- [95] A. R. Padhani, K. A. Krohn, J. S. Lewis, M. Alber, *Eur. Radiol.* **2007**, *17*, 861–872.
- [96] F. A. Howe, S. P. Robinson, D. J. McIntyre, M. Stubbs, J. R. Griffiths, *NMR Biomed.* **2001**, *14*, 497–506.
- [97] H. An, W. Lin, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2000**, *20*, 1225–1236.
- [98] D. A. Yablonskiy, A. L. Sukstanskii, X. He, *NMR Biomed.* **2013**, *26*, 963–986.
- [99] N. P. Blockley, V. E. Griffeth, A. B. Simon, R. B. Buxton, *NMR Biomed.* **2013**, *26*, 987–1003.
- [100] C. Baudelet, B. Gallez, *Curr. Med. Imaging Rev.* **2005**, *1*, 229–243.
- [101] J. F. Dunn, J. A. O'Hara, Y. Zaim-Wadghiri, H. Lei, M. E. Meyerand, O. Y. Grinberg, H. Hou, P. J. Hoopes, E. Demidenko, H. M. Swartz, *J. Magn. Reson. Imaging* **2002**, *16*, 511–521.
- [102] K. Matsumoto, M. Bernardo, S. Subramanian, P. Choyke, J. B. Mitchell, M. C. Krishna, M. J. Lizak, *Magn. Reson. Med.* **2006**, *56*, 240–246.

- [103] Z. Zhang, R. R. Hallac, P. Peschke, R. P. Mason, *Magn. Reson. Med.* **2014**, *71*, 561–569.
- [104] J. P. O'Connor, J. H. Naish, A. Jackson, J. C. Waterton, Y. Watson, S. Cheung, D. L. Buckley, D. M. McGrath, G. A. Buonaccorsi, S. J. Mills, C. Roberts, G. C. Jayson, G. J. Parker, *Magn. Reson. Med.* **2009**, *61*, 75–83.
- [105] V. D. Kodibagkar, X. Wang, J. Pacheco-Torres, P. Gulaka, R. P. Mason, *NMR Biomed.* **2008**, *21*, 899–907.
- [106] P. K. Gulaka, U. Rastogi, M. A. McKay, X. Wang, R. P. Mason, V. D. Kodibagkar, *NMR Biomed.* **2011**, *24*, 1226–1234.
- [107] V. H. Liu, C. C. Vassiliou, S. M. Imaad, M. J. Cima, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 6588–6593.
- [108] V. D. Kodibagkar, W. Cui, M. E. Merritt, R. P. Mason, *Magn. Reson. Med.* **2006**, *55*, 743–748.
- [109] B. Gallez, K. Mader, *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *29*, 1078–1084.
- [110] H. Hou, O. Y. Grinberg, S. Taie, S. Leichtweis, M. Miyake, S. Grinberg, H. Xie, M. Csete, H. M. Swartz, *Anesth. Analg.* **2003**, *96*, 1467–1472.
- [111] P. Kuppusamy, M. Chzhan, K. Vij, M. Shteynbuk, D. J. Lefer, E. Giannella, J. L. Zweier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3388–3392.
- [112] G. He, R. A. Shankar, M. Chzhan, A. Samouilov, P. Kuppusamy, J. L. Zweier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4586–4591.
- [113] K. J. Liu, P. Gast, M. Moussavi, S. W. Norby, N. Vahidi, T. Walczak, M. Wu, H. M. Swartz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5438–5442.
- [114] T. Nakashima, F. Goda, J. Jiang, T. Shima, H. M. Swartz, *Magn. Reson. Med.* **1995**, *34*, 888–892.
- [115] P. E. James, G. Bacic, O. Y. Grinberg, F. Goda, J. F. Dunn, S. K. Jackson, H. M. Swartz, *Free Radical Biol. Med.* **1996**, *21*, 25–34.
- [116] M. Krzic, M. Sentjurc, J. Kristl, *J. Controlled Release* **2001**, *70*, 203–211.
- [117] H. J. Halpern, C. Yu, M. Peric, E. Barth, D. J. Grdina, B. A. Teicher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 13047–13051.
- [118] M. Elas, J. M. Magwood, B. Butler, C. Li, R. Wardak, R. DeVries, E. D. Barth, B. Epel, S. Rubinstein, C. A. Pelizzari, R. R. Weichselbaum, H. J. Halpern, *Cancer Res.* **2013**, *73*, 5328–5335.
- [119] N. Khan, B. B. Williams, H. Hou, H. Li, H. M. Swartz, *Antioxid. Redox Signaling* **2007**, *9*, 1169–1182.
- [120] B. Chen, B. W. Pogue, I. A. Goodwin, J. A. O'Hara, C. M. Wilmot, J. E. Hutchins, P. J. Hoopes, T. Hasan, *Radiat. Res.* **2003**, *160*, 452–459.
- [121] M. C. Krishna, S. English, K. Yamada, J. Yoo, R. Murugesan, N. Devasahayam, J. A. Cook, K. Golman, J. H. Ardenkjaer-Larsen, S. Subramanian, J. B. Mitchell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 2216–2221.
- [122] D. Grucker, J. Chambron, *Magn. Reson. Imaging* **1993**, *11*, 691–696.
- [123] T. Durduran, R. Choe, W. Baker, A. Yodh, *Rep. Prog. Phys.* **2010**, *73*, 076701.
- [124] A. Villringer, B. Chance, *Trends Neurosci.* **1997**, *20*, 435–442.
- [125] J. Yi, Q. Wei, W. Liu, V. Backman, H. F. Zhang, *Opt. Lett.* **2013**, *38*, 1796–1798.
- [126] Y. Mendelson, *Clin. Chem.* **1992**, *38*, 1601–1607.
- [127] W. A. Bowes III, Jr., B. C. Corke, J. Hulka, *Obstet. Gynecol.* **1989**, *74*, 541–546.
- [128] R. Choe in *Engineering in Medicine and Biology Society*, 2009. EMBC 2009. Annual International Conference of the IEEE, S. 6335–6337.
- [129] M. Simick, L. Lilge, *Br. J. Radiol.* **2014**, *78*, 1009–1017.
- [130] B. W. Pogue, S. C. Davis, X. Song, B. A. Brooksby, H. Dehghani, K. D. Paulsen, *J. Biomed. Opt.* **2006**, *11*, 033001.
- [131] C.-W. Lu, C.-K. Lee, M.-T. Tsai, Y.-M. Wang, C. Yang, *Opt. Lett.* **2008**, *33*, 416–418.
- [132] R. V. Kuranov, J. Qiu, A. B. McElroy, A. Estrada, A. Salvaggio, J. Kiel, A. K. Dunn, T. Q. Duong, T. E. Milner, *Biomed. Opt. Express* **2011**, *2*, 491–504.
- [133] W. L. Rumsey, J. M. Vanderkooi, D. F. Wilson, *Science* **1988**, *241*, 1649–1651.
- [134] J. M. Vanderkooi, G. Maniara, T. J. Green, D. F. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5476–5482.
- [135] X. D. Wang, R. J. Meier, M. Link, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4907–4909; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5027–5029.
- [136] A. J. Nichols, E. Roussakis, O. J. Klein, C. L. Evans, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3671–3674; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3745–3748.
- [137] R. J. Woods, S. Scypinski, L. J. C. Love, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1395–1400.
- [138] R. M. Ballew, J. N. Demas, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 30–33.
- [139] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [140] M. I. J. Stich, L. H. Fischer, O. S. Wolfbeis, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3102–3114.
- [141] S. A. Vinogradov, M. A. Fernandez-Searra, B. W. Dugan, D. F. Wilson, *Rev. Sci. Instrum.* **2001**, *72*, 3396.
- [142] D. F. Wilson, S. A. Vinogradov, B. W. Dugan, D. Biruski, L. Waldron, S. A. Evans, *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **2002**, *132*, 153–159.
- [143] Z. Li, E. Roussakis, P. G. L. Koolen, A. M. S. Ibrahim, K. Kim, L. F. Rose, J. Wu, A. J. Nichols, Y. Baek, R. Birngruber, G. Apiou-Sbirlea, R. Matyal, T. Huang, R. Chan, S. J. Lin, C. L. Evans, *Biomed. Opt. Express* **2014**, *5*, 3748–3764.
- [144] M. Ranji, D. L. Jaggard, S. V. Apreleva, S. A. Vinogradov, B. Chance, *Opt. Lett.* **2006**, *31*, 2995–2997.
- [145] L. S. Ziemer, W. M. F. Lee, S. A. Vinogradov, C. Sehgal, D. F. Wilson, *J. Appl. Physiol.* **2005**, *98*, 1503–1510.
- [146] R. Shonat, A. Kight, *Ann. Biomed. Eng.* **2003**, *31*, 1084–1096.
- [147] S. Sakadzic, E. Roussakis, M. A. Yaseen, E. T. Mandeville, V. J. Srinivasan, K. Arai, S. Ruvinskaya, A. Devor, E. H. Lo, S. A. Vinogradov, D. A. Boas, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 755–759.
- [148] I. Gryczynski, Z. Gryczynski, G. Rao, J. R. Lakowicz, *Analyst* **1999**, *124*, 1041–1044.
- [149] T. Yoshihara, Y. Yamaguchi, M. Hosaka, T. Takeuchi, S. Tobita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4148–4151; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4224–4227.
- [150] J. Lecoq, A. Parpaleix, E. Roussakis, M. Ducros, Y. G. Houssen, S. A. Vinogradov, S. Charpak, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 893–898.
- [151] H. C. Gerritsen, R. Sanders, A. Draaijer, C. Ince, Y. K. Levine, *J. Fluoresc.* **1997**, *7*, 11–15.
- [152] J. W. Dobrucki, *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, *65*, 136–144.
- [153] Z. Wei, U. Paul, M. Mary-Ann, *J. Phys. D Appl. Phys.* **2003**, *36*, 1689–1695.
- [154] J. K. Asiedu, J. Ji, M. Nguyen, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, *J. Biomed. Opt.* **2001**, *6*, 116–121.
- [155] J. Ji, N. Rosenzweig, I. Jones, Z. Rosenzweig, *J. Biomed. Opt.* **2002**, *7*, 404–409.
- [156] H. Komatsu, K. Yoshihara, H. Yamada, Y. Kimura, A. Son, S.-i. Nishimoto, K. Tanabe, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1971–1977.
- [157] M. S. Lowry, S. Bernhard, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7970–7977.
- [158] S. J. Zhang, M. Hosaka, T. Yoshihara, K. Negishi, Y. Iida, S. Tobita, T. Takeuchi, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4490–4498.
- [159] T. Murase, T. Yoshihara, S. Tobita, *Chem. Lett.* **2012**, *41*, 262–263.
- [160] D. F. Wilson, S. Gomi, A. Pastuszko, J. H. Greenberg, *J. Appl. Physiol.* **1993**, *74*, 580–589.
- [161] T. K. Stepinac, S. R. Chamot, E. Rungger-Brandle, P. Ferrez, J.-L. Munoz, H. van den Bergh, C. E. Riva, C. J. Pournaras, G. A. Wagnieres, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2005**, *46*, 956–966.
- [162] S. A. Vinogradov, L. W. Lo, W. T. Jenkins, S. M. Evans, C. Koch, D. F. Wilson, *Biophys. J.* **1996**, *70*, 1609–1617.

- [163] C. Barlow, D. Rorvik, J. Kelly, *Ann. Biomed. Eng.* **1998**, 26, 76–85.
- [164] S. A. Vinogradov, L.-W. Lo, D. F. Wilson, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1338–1347.
- [165] S. A. Vinogradov, E. Kim, D. F. Wilson, *Proc. SPIE* **2002**, 4626, 193–200.
- [166] I. Dunphy, S. A. Vinogradov, D. F. Wilson, *Anal. Biochem.* **2002**, 310, 191–198.
- [167] B. J. Behnke, C. A. Kindig, T. I. Musch, S. Koga, D. C. Poole, *Respir. Physiol.* **2001**, 126, 53–63.
- [168] C. M. Geer, B. J. Behnke, P. McDonough, D. C. Poole, *J. Appl. Physiol.* **2002**, 93, 227–232.
- [169] D. C. Poole, B. J. Behnke, P. McDonough, R. M. McAllister, D. F. Wilson, *Microcirculation* **2004**, 11, 317–326.
- [170] D. F. Wilson, W. M. F. Lee, S. Makonnen, O. Finikova, S. Apreleva, S. A. Vinogradov, *J. Appl. Physiol.* **2006**, 101, 1648–1656.
- [171] D. F. Wilson, W. M. F. Lee, S. Makonnen, S. Apreleva, S. A. Vinogradov, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, 614, 53–62.
- [172] W. Hiesinger, S. A. Vinogradov, P. Atluri, r. Fitzpatrick, J. Raymond, J. R. Frederick, R. D. Levit, R. C. McCormick, J. R. Muenzer, E. C. Yang, N. A. Marotta, J. W. MacArthur, D. F. Wilson, Y. J. Woo, *J. Appl. Physiol.* **2011**, 110, 1460–5.
- [173] T. V. Esipova, A. Karagodov, J. Miller, D. F. Wilson, T. M. Busch, S. A. Vinogradov, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 8756–8765.
- [174] R. P. Brinas, T. Troxler, R. M. Hochstrasser, S. A. Vinogradov, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11851–11862.
- [175] O. S. Finikova, P. Chen, Z. P. Ou, K. M. Kadish, S. A. Vinogradov, *J. Photochem. Photobiol. A* **2008**, 198, 75–84.
- [176] O. S. Finikova, A. Y. Lebedev, A. Aprelev, T. Troxler, F. Gao, C. Garnacho, S. Muro, R. M. Hochstrasser, S. A. Vinogradov, *ChemPhysChem* **2008**, 9, 1673–1679.
- [177] A. Y. Lebedev, T. Troxler, S. A. Vinogradov, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2008**, 12, 1261–1269.
- [178] A. Devor, S. Sakadzic, P. A. Saisan, M. A. Yaseen, E. Roussakis, V. J. Srinivasan, S. A. Vinogradov, B. R. Rosen, R. B. Buxton, A. M. Dale, D. A. Boas, *J. Neurosci.* **2011**, 31, 13676–13681.
- [179] S. M. S. Kazmi, A. J. Salvaggio, A. D. Estrada, M. A. Hemati, N. K. Shaydyuk, E. Roussakis, T. A. Jones, S. A. Vinogradov, A. K. Dunn, *Biomed. Opt. Express* **2013**, 4, 1061–1073.
- [180] E. Roussakis, J. A. Spencer, C. P. Lin, S. A. Vinogradov, *Anal. Chem.* **2014**, 86, 5937–5945.
- [181] E. G. Mik, J. Stap, M. Sinaasappel, J. F. Beek, J. A. Aten, T. G. van Leeuwen, C. Ince, *Nat. Methods* **2006**, 3, 939–945.
- [182] E. G. Mik, T. Johannes, C. J. Zuurbier, A. Heinen, J. H. P. M. Houben-Weerts, G. M. Balestra, J. Stap, J. F. Beek, C. Ince, *Biophys. J.* **2008**, 95, 3977–3990.
- [183] S. I. A. Bodmer, G. M. Balestra, F. A. Harms, T. Johannes, N. J. H. Raat, R. J. Stolker, E. G. Mik, *J. Biophotonics* **2012**, 5, 140–151.
- [184] J. Hynes, S. Floyd, A. E. Soini, R. O'Connor, D. B. Papkovsky, *J. Biomol. Screening* **2003**, 8, 264–272.
- [185] C. O'Donovan, J. Hynes, D. Yashunski, D. B. Papkovsky, *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 2946–2951.
- [186] T. C. O'Riordan, K. Fitzgerald, G. V. Ponomarev, J. Mackrill, J. Hynes, C. Taylor, D. B. Papkovsky, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, 292, R1613–R1620.
- [187] R. I. Dmitriev, A. V. Zhdanov, G. V. Ponomarev, D. V. Yashunski, D. B. Papkovsky, *Anal. Biochem.* **2010**, 398, 24–33.
- [188] R. I. Dmitriev, H. M. Ropiak, D. V. Yashunsky, G. V. Ponomarev, A. V. Zhdanov, D. B. Papkovsky, *FEBS J.* **2010**, 277, 4651–4661.
- [189] R. I. Dmitriev, H. M. Ropiak, G. V. Ponomarev, D. V. Yashunsky, D. B. Papkovsky, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 2507–2518.
- [190] K. Koren, R. I. Dmitriev, S. M. Borisov, D. B. Papkovsky, I. Klimant, *ChemBioChem* **2012**, 13, 1184–1190.
- [191] R. I. Dmitriev, A. V. Kondrashina, K. Koren, I. Klimant, A. V. Zhdanov, J. M. P. Pakan, K. W. McDermott, D. B. Papkovsky, *Biomater. Sci.* **2014**, 2, 853–866.
- [192] U. Neugebauer, Y. Pellegrin, M. Devocelle, R. J. Forster, W. Signac, N. Moran, T. E. Keyes, *Chem. Commun.* **2008**, 5307–5309.
- [193] B. Korzeniowska, R. Nooney, D. Wencel, C. McDonagh, *Nanotechnology* **2013**, 24, 442002.
- [194] A. Ray, R. Kopelman, *Nanomedicine* **2013**, 8, 1829–1838.
- [195] M. P. Coogan, J. B. Court, V. L. Gray, A. J. Hayes, S. H. Lloyd, C. O. Millet, S. J. A. Pope, D. Lloyd, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, 9, 103–109.
- [196] P. Nowak-Sliwinska, E. Forte, H. van den Bergh, G. Wagnieres in *Photodynamic Therapy: Back to the Future*, SPIE, Seattle, **2009**, S. 73806N.
- [197] Y.-E. K. Lee, E. E. Ulbrich, G. Kim, H. Hah, C. Strollo, W. Fan, R. Gurjar, S. Koo, R. Kopelman, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 8446–8455.
- [198] A. Fercher, S. M. Borisov, A. V. Zhdanov, I. Klimant, D. B. Papkovsky, *ACS Nano* **2011**, 5, 5499–5508.
- [199] A. V. Kondrashina, R. I. Dmitriev, S. M. Borisov, I. Klimant, I. O'Brien, Y. M. Nolan, A. V. Zhdanov, D. B. Papkovsky, *Adv. Funct. Mater.* **2012**, 22, 4931–4939.
- [200] R. I. Dmitriev, S. M. Borisov, A. V. Kondrashina, J. M. P. Pakan, U. Anilkumar, J. H. M. Prehn, A. V. Zhdanov, K. W. McDermott, I. Klimant, D. B. Papkovsky, *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, 72, 367–381.
- [201] X.-H. Wang, H.-S. Peng, L. Yang, F.-T. You, F. Teng, L.-L. Hou, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 12471–12475; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 12679–12683.
- [202] X.-D. Wang, J. A. Stolwijk, M. Sperber, R. J. Meier, J. Wegener, O. S. Wolfbeis, *Methods Appl. Fluoresc.* **2013**, 1, 035002.
- [203] X.-D. Wang, D. E. Achatz, C. Hupf, M. Sperber, J. Wegener, S. Bange, J. M. Lupton, O. S. Wolfbeis, *Sens. Actuators B* **2013**, 188, 257–262.
- [204] J. Napp, T. Behnke, L. Fischer, C. Wrth, M. Wottawa, D. M. Katschinski, F. Alves, U. Resch-Genger, M. Schäferling, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 9039–9046.
- [205] C. F. Wu, B. Bull, K. Christensen, J. McNeill, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 2741–2745; *Angew. Chem.* **2009**, 121, 2779–2783.
- [206] J. Liu, Y. Liu, W. Bu, J. Bu, Y. Sun, J. Du, J. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 9701–9709.
- [207] G. Q. Zhang, G. M. Palmer, M. Dewhirst, C. L. Fraser, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 747–751.
- [208] J. R. Griffiths, S. P. Robinson, *Br. J. Radiol.* **1999**, 72, 627–630.
- [209] X.-D. Wang, O. S. Wolfbeis, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 487–508.
- [210] X.-D. Wang, H.-x. Chen, Y. Zhao, X. Chen, X.-r. Wang, X. Chen, *Trends Anal. Chem.* **2010**, 29, 319–338.
- [211] K. Kellner, G. Liebsch, I. Klimant, O. S. Wolfbeis, T. Blunk, M. B. Schulz, A. Gopferich, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, 80, 73–83.
- [212] P. Babilas, G. Liebsch, V. Schacht, I. Klimant, O. S. Wolfbeis, R.-M. Szeimies, C. Abels, *Microcirculation* **2005**, 12, 477–487.
- [213] S. Schreml, R. J. Meier, O. S. Wolfbeis, T. Maisch, R.-M. Szeimies, M. Landthaler, J. Regensburg, F. Santarelli, I. Klimant, P. Babilas, *Exp. Dermatol.* **2011**, 20, 550–554.
- [214] J. Hofmann, R. J. Meier, A. Mahnke, V. Schatz, F. Brackmann, R. Trollmann, C. Bogdan, G. Liebsch, X.-D. Wang, O. S. Wolfbeis, J. Jantsch, *Methods Appl. Fluoresc.* **2013**, 1, 045002.
- [215] A. Mahnke, R. J. Meier, V. Schatz, J. Hofmann, K. Castiglione, U. Schleicher, O. S. Wolfbeis, C. Bogdan, J. Jantsch, *J. Invest. Dermatol.* **2014**, 134, 2339–2346.
- [216] P. Lehner, C. Staudinger, S. M. Borisov, I. Klimant, *Nat. Commun.* **2014**, 5, 4460.
- [217] R. J. Meier, S. Schreml, X.-d. Wang, M. Landthaler, P. Babilas, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 10893–10896; *Angew. Chem.* **2011**, 123, 11085–11088.

[218] S. Schreml, R. J. Meier, M. Kirschbaum, S. C. Kong, S. Gehmert, O. Felthaus, S. Kuechler, J. R. Sharpe, K. Woeltje, K. T. Weib, M. Albert, U. Seidl, J. Schroeder, C. Morszeck, L. Prantl, C. Duschl, S. F. Pedersen, M. Gosau, M. Berneburg,

O. S. Wolfbeis, M. Landthaler, P. Babilas, *Theranostics* **2014**, 4, 721–735.

Eingegangen am 31. Oktober 2014,
veränderte Fassung am 8. Januar 2015
Online veröffentlicht am 17. Juni 2015
Übersetzt von Joachim Pruessner, Lübeck