

Aus der Klinik für
Radiologie und Neuroradiologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Olav Jansen)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**„Etablierung eines Verfahrens zur Untersuchung
photoakustischer Eigenschaften von Kontrastmitteln
in einem Gewebephantom
und in Abhängigkeit vom Proteingehalt“**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Alessandra Christina Malinowski

aus Hamburg

Kiel **2016**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Marcus Both
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Hoffmann
Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2017
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 31.01.2017

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Material.....	12
2.2	Methoden	12
2.2.1	Aufbau des Vevo LAZR-Systems.....	12
2.2.2	Signalstabilität des Vevo LAZR-Systems	13
2.2.3	Herstellung des 3D-Phantoms	15
2.2.4	Phantomreproduzierbarkeit.....	16
2.2.5	Tiefenabhängigkeit und Konzentrationsabhängigkeit der ICG- und MB-Spektren	17
2.2.6	Albumin-Abhängigkeit der ICG- und MB-Spektren.....	17
2.2.7	Herstellung ICG-beladener Liposomen	17
2.2.8	Aktivierung thermosensitiver Liposomen.....	18
2.2.9	Auswertung	18
3	Ergebnisse.....	19
3.1	Signalstabilität des Vevo LAZR-Systems	19
3.2	Phantomreproduzierbarkeit	21
3.3	Photoakustische Eigenschaften von ICG und MB in Abhängigkeit von Eindringtiefe, Konzentration und Albumin	22
3.3.1	ICG.....	23
3.3.2	MB	25
3.4	Photoakustische Darstellung der Aktivierung thermosensitiver Liposomen	27
4	Diskussion.....	29
5	Zusammenfassung	44
6	Anhang.....	46
7	Literaturverzeichnis.....	50
8	Danksagung	57
9	Lebenslauf.....	58

Abkürzungsverzeichnis

AUC	<i>Area-under-the Curve</i>
CT	Computertomographie
DPBS	Dulbeccos Phosphatpuffersalzlösung
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
ICG	Indocyaningrün
ICG-PCL	mit Indocyaningrün gefüllte Phosphocholinliposomen
MB	Methylenblau
MRT	Magnetresonanztomographie
MTD	maximal tolerierte Dosis
NIR	nahinfrarot
OPO	optisch parametrischer Oszillator
PCL	Phosphocholinliposomen
SLN	<i>Sentinel Lymph Node</i> (Wächterlymphknoten)
SLNB	<i>Sentinel Lymph Node Biopsie</i> (Wächterlymphknotenbiopsie)
TSL	thermosensitive Liposomen

1 Einleitung

In den letzten Jahren wurde die Photoakustik, die bisher hauptsächlich in der Mikroskopie verwendet wurde, für die *In-vivo*-Bildgebung weiterentwickelt. Sie könnte eine nützliche Erweiterung der vorhandenen Bildgebungsmodalitäten darstellen (Mehrmoammadi et al. 2013). Insbesondere die radiologische Diagnostik beruht derzeit hauptsächlich auf der Darstellung struktureller Gewebeveränderungen. Diese sind zum einen häufig nicht spezifisch für bestimmte Erkrankungen. Zum anderen treten die detektierbaren Veränderungen in der Gewebestruktur im Vergleich zu Veränderungen auf Molekülebene oft erst relativ spät im Krankheitsverlauf auf, so dass frühe Stadien nicht immer nachweisbar oder die Befunde wiederum unspezifisch sind. Dies macht oft die Kombination unterschiedlicher Bildgebungsmethoden oder Verlaufskontrollen notwendig (Fass 2008). Mittels nuklearmedizinischer Techniken ist prinzipiell die Darstellung molekularer Veränderungen möglich, allerdings sind diese Verfahren relativ aufwändig, mit Strahlenbelastung verbunden und verfügen im Vergleich mit der Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) nur über eine limitierte Ortsauflösung (Frangioni 2008, Mallidi et al. 2011).

Bei der Photoakustik handelt sich um ein nicht-invasives Verfahren, das in Echtzeit parallel eine strukturelle und funktionelle Bildgebung erlaubt (Wang et al. 2003; de la Zerda et al. 2008; Li et al. 2008). Durch die prinzipiell mögliche Ankopplung an bereits vorhandene klinische Ultraschallgeräte ist eine Translation der Photoakustik in den klinischen Alltag mittel- bis langfristig denkbar. Hierzu bedarf es jedoch einer sorgfältigen und strukturierten Evaluation der Möglichkeiten und Grenzen dieser für die *In-vivo*-Anwendung neuen Technologie. An diesem Punkt setzt die vorliegende Arbeit an.

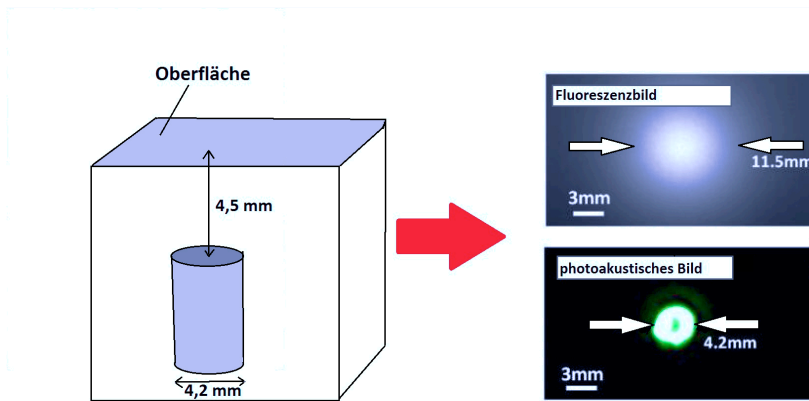
Prinzip der Photoakustik

Das Prinzip der photoakustischen Bildgebung beruht auf dem photoakustischen Effekt. Wird Laserlicht mit einer Pulsdauer von wenigen Nanosekunden in Gewebe eingestrahlt, wird diese elektromagnetische Strahlung durch geeignete Moleküle wie z.B. Hämoglobin absorbiert und teilweise in Wärme umgewandelt. Dies führt zu einer transienten thermischen Expansion des Gewebes, wodurch eine Druckwelle generiert wird. Diese kann von hochempfindlichen Ultraschallempfängern detektiert

und auf dem Monitor dargestellt werden (Yao & Wang 2011). Die photoakustische Bildgebung basiert also auf der akustischen Detektion optischer Absorption. Anders als in der Sonographie werden zwar Schallwellen gemessen, um das Bild zu generieren, jedoch werden diese durch optische Anregung vom Zielobjekt selbst produziert.

Die Signalintensität ist sowohl von der eingestrahlten Energie und der Sensitivität des benutzten Systems als auch von der Gewebedichte und -tiefe abhängig. Außerdem spielt die Konzentration sowie das Absorptionsspektrum des eingesetzten Kontrastmittels für die Signalintensität eine wichtige Rolle. Die Eindringtiefe kann auf Kosten der Auflösung durch Erniedrigung der Frequenz des Ultraschalldetektors vergrößert werden (Ntziachristos 2010; Mallidi et al. 2011). Da die Eindringtiefe von Licht im Gewebe im für den Menschen sichtbaren Bereich des Spektrums wegen der starken optischen Absorption und Streuung jedoch limitiert ist, wird für die Photoakustik Strahlung im nahinfraroten (NIR) Bereich verwendet (Kim, C. et al. 2010a). In diesem Wellenlängenbereich bleibt die optische Dämpfung im biologischen Gewebe gering und erlaubt höhere Eindringtiefen. Hierzu werden Nd:YAG-Laser verwendet in Kombination mit einem geeigneten optischen parametrischen Oszillator (OPO) und Frequenzverdoppler (Second Harmonic Generator; SHG). Der für die vorliegende Arbeit verwendete Laser (Vevo LAZR, VisualSonics Inc., Toronto, Kanada) erlaubte so das Durchstimmen der Wellenlänge in 2 nm Schritten zwischen 680 nm und 970 nm. Um keine bleibenden Schäden im Gewebe zu hinterlassen, wird die Laserenergiestärke so gewählt, dass es nur zu einer geringen lokalen Temperaturerhöhung kommt (Rajian et al. 2009).

Die Photoakustik nutzt somit die optisch-akustische Wechselwirkung, um die exzellenten optischen Absorptionskontraste mit hoher Ultraschallauflösung in höheren Tiefen bis zu mehreren Zentimetern zu kombinieren (de la Zerda et al. 2008; Mienkina 2010; Taruttis & Ntziachristos 2012; Needles et al. 2013). Um dies zu verdeutlichen, sei auf ein von Adam de la Zerda et al. konstruiertes Gewebephantom hingewiesen mit einem 4,5 mm unter der Oberfläche gelegenen fluoreszierenden und absorbierenden Einschluss, der einen Durchmesser von 4,2 mm aufwies. Das fluoreszierende Bild stellt wegen der streuenden Wirkung des Phantomgewebes den Einschluss als 11,5 mm breites Objekt dar, wohingegen das Photoakustikbild den realen Durchmesser des Einschlusses wiedergibt (de la Zerda et al. 2008) (Abbildung 1).



a)

b)

Abbildung 1: a) Eine Schemazeichnung eines Gewebephantoms mit Einschluss, welcher 4,5 mm unter der Phantomboberfläche sowohl fluoreszierendes als auch optisch absorbierendes Material enthält. b) Fluoreszenz- und Photoakustik-Bilder des Phantoms. Wegen der streuenden Wirkung des Phantomgewebes wird das 4,2 mm breite Objekt in der Fluoreszenzbildgebung als 11,5 mm breites Objekt dargestellt, wobei das Photoakustik-Bild den exakten Durchmesser des Einschlusses abbildet. Das verminderte Signal im Zentrum des Photoakustik-Bildes ist durch die fehlende Lichtdurchlässigkeit zum Zentrum des Einschlusses bedingt. Modifiziert nach de la Zerda et al. 2008.

Mögliche Anwendungen der Photoakustik *in vivo*

Die Photoakustik bietet alle Vorteile der Sonographie. Durch die Echtzeitbildgebung sind dynamische Prozesse darstellbar (Bohndiek et al. 2013; Kim, C. et al. 2010a). Außerdem verzichtet die Photoakustik-Bildgebung auf ionisierende Strahlung und die Bildakquise ist relativ günstig. Durch Koregistrierung von Photoakustik- und Ultraschall-Bildgebung können funktionelle Informationen besser morphologisch eingeordnet werden (Kim, C. et al. 2010a; Zackrisson et al. 2014). Mittels intrinsischer Kontrastmittel wie z.B. Hämoglobin und Melanin können physiologische und morphologische Informationen wie Sauerstoffsättigung des Blutes und Melanommorphologie geliefert werden (Zackrisson et al. 2014). Die multispektrale Photoakustik-Bildgebung ermöglicht es, mehrere Kontrastmittel parallel zu detektieren (Wang et al. 2006; Zhang et al. 2006). Somit können auch bei rein endogenem Kontrast unterschiedliche Gewebekomponenten auf demselben Bild dargestellt werden (Taruttis & Ntziachristos 2012). Beispielsweise kann durch die unterschiedlichen Absorptionseigenschaften von Oxy- und Desoxy-Hämoglobin zwischen Arterien und Venen unterschieden und die Sauerstoffsättigung des Gewebes ermittelt werden (Mallidi et al. 2011). Durch Wahl der geeigneten Anregungswellenlänge ist jedoch auch die Ermittlung des Gesamthämoglobins

möglich (Mallidi et al. 2011).

Sollen darüber hinaus spezifische Gewebeeigenschaften dargestellt werden, wie z.B. die Expression bestimmter Rezeptoren auf den Tumorzellen, werden exogene Kontrastmittel benötigt (Kim, C. et al. 2010a). So wurden optisch absorbierende organische Farbstoffe, Nanopartikel, Reportergene und Fluoreszenzproteine erfolgreich als Photoakustik-Kontrastmittel eingesetzt (Kim, C. et al. 2010a; Zackrisson et al. 2014). Insbesondere Nanopartikel wie z.B. Liposomen reichern sich aufgrund einer erhöhten Gefäßpermeabilität und anschließender Retention im Gewebe, dem sogenannten *Enhanced Permeability and Retention (EPR)*-Effekt, unspezifisch, aber selektiv z.B. in Tumoren oder entzündeten Geweben an (Fang et al. 2011). Zudem können Peptide oder Antikörper an diese Kontrastmittel gekoppelt werden, die spezifisch an Oberflächenmoleküle im Tumor binden (Zackrisson et al. 2014). Perspektivisch können durch Verwendung exogener Kontrastmittel damit neben strukturellen und physiologischen auch molekulare Informationen in hoher Auflösung gesammelt werden (Yang et al. 2009).

Darüber hinaus ist durch die sequentielle Verwendung verschiedener Wellenlängen mittels durchstimmbarer Laser die Aufnahme photoakustischer Spektren möglich. Hierdurch könnten eventuell Unterschiede in gesundem und kranken Gewebe sichtbar gemacht werden oder zumindest die Signale von Kontrastmitteln besser vom Hintergrundsignal getrennt werden, analog des sog. *Spectral Unmixing* in der Fluoreszenzbildgebung (Herzog et al., 2012).

Notwendige Eigenschaften photoakustischer Kontrastmittel

Da es sich bei der Photoakustik um eine relativ neue Modalität im Bereich der *In-vivo*-Bildgebung handelt, steht die Entwicklung geeigneter Kontrastmittel jedoch noch am Anfang. Hierbei spielt vor allem die Charakterisierung der Photoakustik-Eigenschaften unterschiedlicher Substanzen eine große Rolle, um geeignete Kandidaten für die weitere Entwicklung auszumachen. An dieser Stelle führt die vorliegende Arbeit erste Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe fort.

Sicherheit und Biokompatibilität sind wichtige Aspekte, die für den Gebrauch *in vivo* beachtet werden müssen (Mehrmoammadi et al. 2013; Su et al. 2010). Einige Farbstoffe wie z.B. Methylenblau (MB) und Indocyaningrün (ICG), die sich für die Photoakustik-Bildgebung eignen, sind heute schon für andere Anwendungen in der klinischen Routine zugelassen (Akers et al. 2012; Kim, C. et al. 2010b; Kraft & Ho

2014). Des Weiteren ist die schnelle und vollständige Clearance der verabreichten Agenzien für die klinische Anwendung wünschenswert (Zackrisson et al. 2014). So wird eine mögliche Belastung durch das Kontrastmittel gering gehalten. Andererseits sollte für die Bildgebung eine ausreichende Zirkulationszeit gewährleistet sein (Zackrisson et al. 2014). Im Idealfall sollten Kontrastmittel eine möglichst optimale Aufnahme, Verteilung und Retention im Zielgewebe aufweisen (Su et al. 2010).

Um die Eignung eines Kontrastmittels für *In-vivo*-Versuche abschätzen zu können, muss dieses im Vorfeld getestet werden. Grundlage für die valide Planung präklinischer *In-vivo*-Projekte sind Informationen über die Sensitivität des verwendeten Systems und über die Signaleigenschaften des Kontrastmittels. Hierzu ist eine standardisierte Bestimmung dieser Informationen notwendig. Gewebephantome ahmen wichtige Eigenschaften biologischen Gewebes nach und liefern so ein möglichst realistisches Testsystem für entsprechende Untersuchungen (Su et al. 2010). So kann z.B. die minimal detektierbare Konzentration des Kontrastmittels unter optimalen Bedingungen ermittelt werden (Cook et al. 2011). Auch die Signalintensität der maximal applizierbaren Dosis eines jeden Kontrastmittels kann bestimmt werden, um zu erfassen, ob ein bestimmtes Kontrastmittel für *In-vivo*-Untersuchungen geeignet ist. Für solche Untersuchungen ist ein robustes, zuverlässiges und stabiles Testsystem, wie z.B. ein Phantom, notwendig (Xiang et al. 2009).

Notwendige Eigenschaften des 3D-Phantoms

Das Phantom sollte eine ähnliche Streuung aufweisen wie das Gewebe, um ein möglichst realitätsnahes Messumfeld zu simulieren (Bohndiek et al. 2013; Cook et al. 2011). Es sollte selbst kein oder wenig Hintergrundsignal erzeugen, sodass die Kontrastmittelsignale schnell und einfach zu identifizieren sind und die Messregion adäquat definiert werden kann. Die Ergebnisse können auch durch die Eindringtiefe und den Winkel zum Schallkopf beeinflusst werden. Somit müssen diese konstant gehalten werden, um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu gewährleisten. Ebenso sollte das Auftreten von Luftblasen limitiert werden. Wie in der Sonographie verhindern Luftblasen in der photoakustischen Bildgebung die Weiterleitung des Schalls: An der Grenzfläche zu luftgefüllten Hohlräumen wird fast die gesamte eintreffende Energie reflektiert (Weskott 2007). Die hierbei auftretenden Artefakte verfälschen die gemessenen Signalintensitäten. Nicht zuletzt sind viele präklinische

Kontrastmittel in der Anschaffung relativ teuer oder aufwändig in der Herstellung, so dass die Messung kleiner Volumina ($< 25 \mu\text{l}$) vorteilhaft ist, um die Kosten dieser Screening-Untersuchungen gering zu halten.

Verwendete photoakustische Kontrastmittel

Wie oben erwähnt, wurden bereits Nanopartikel wie Goldnanokäfige, *Goldnanoshells*, Goldnanostäbchen und Kohlenstoffnanoröhrchen, Fluoreszenzproteine und optisch absorbierende organische Farbstoffe sind erfolgreich als Photoakustikkontrastmittel eingesetzt (Kim, C. et al. 2010a). Für die vorliegende Arbeit wurden zwei Kontrastmittel ausgewählt, die bereits für andere Anwendungen klinisch zugelassen sind: MB und ICG.

Eigenschaften und Anwendungen von MB

Bei MB handelt es sich um einen basischen Farbstoff, der in reiner Form als dunkelblaues Pulver vorliegt. MB kommt vor allem in der mikroskopischen Diagnostik zur Färbung von Mikroorganismen zum Einsatz, da es proteinhaltige Strukturen und somit Zellkerne besonders gut färbt (Hof 2014). Außerdem findet MB als Antidot bei Alinin- und Nitritvergiftungen Anwendung, da es den Abbau von Methämoglobin zu Hämoglobin durch Reduktion der Hämgruppe beschleunigt (Freissmuth et al. 2012). Es wird in der Malariatherapie (Dormoi & Pradines 2013), im Kampf gegen Alzheimer (Atamna & Kumar 2010) sowie in der photodynamischen antibakteriellen Therapie (Usacheva et al. 2001) eingesetzt. Darüber hinaus wird MB in der *Sentinel*-Lymphknoten-Biopsie (SLNB) angewendet, da es wenig Nebenwirkungen aufweist, leicht verfügbar und günstiger ist als herkömmliche SLNB-Diagnostik-Substanzen (Kim, C. et al. 2010a; Song et al. 2008).

Es absorbiert Licht im Bereich von ca. 530-700 nm, wobei das Absorptionsmaximum bei 667 nm liegt (Erpelding et al. 2010). Wie ICG kann MB auch als Fluoreszenzfarbstoff verwendet werden. Sein Emissionsmaximum liegt bei 686 nm (Tanaka et al. 2009). Die Strukturformel von MB ist in Abbildung 2 dargestellt.

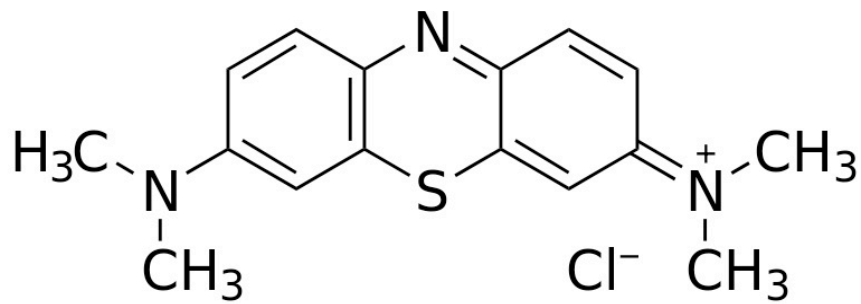


Abbildung 2: Chemische Struktur von MB.

Eigenschaften und Anwendungen von ICG

ICG ist ein wasserlöslicher, nicht-toxischer und gut verträglicher Tricarbozyaninfarbstoff (Luetkemeier & Fattor 2001). Er wird vorzugsweise bei der Herz-, Leber- und Lungen-Funktionsdiagnostik sowie der ophthalmologischen Angiographie verwendet (Cherrick et al. 1960; Luetkemeier & Fattor 2001). Experimentell wird es bei der SLNB und der Lymphgefäßdarstellung sowie in der Rheumadiagnostik mittels Fluoreszenz-Bildgebung eingesetzt (Hirche et al. 2010; Kim, C. et al. 2010b, Werner et al., 2012).

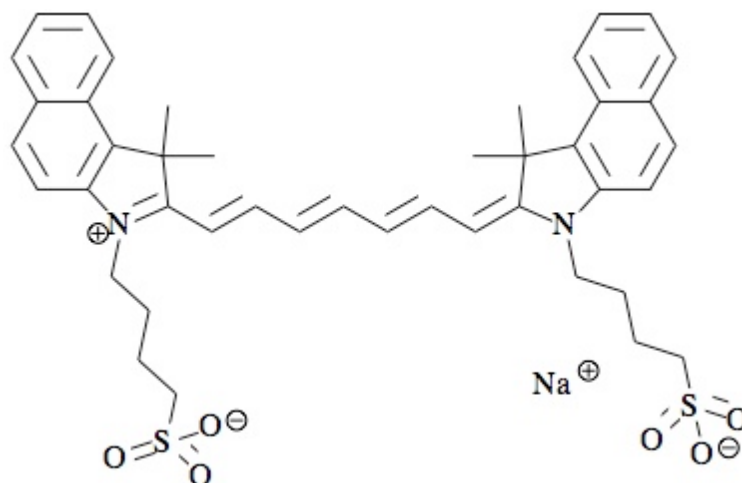


Abbildung 3: Strukturformel von ICG.

Das Absorptions- und Emissionsspektrum befindet sich im NIR-Bereich. Das Emissionsmaximum für Fluoreszenzmessungen liegt bei 830 nm, das Absorptionsmaximum im Plasma bei 780-800 nm (Cherrick et al. 1960; Gathje et al.

1970; Gurfinkel et al. 2000; Landsman et al. 1976). Wegen der Aggregation von ICG-Molekülen ist das ICG-Spektrum im Wasser sehr instabil. Die Stabilität von ICG ist abhängig von seiner Konzentration und vom Lösungsmittel (Gathje et al. 1970; Landsman et al. 1976; Sutterer et al. 1966). In humanem Serumalbumin wird ICG stabilisiert (Gathje et al. 1970). Die Strukturformel von ICG ist in Abbildung 3 dargestellt.

Thermosensitive Liposomen als Transporter

Ein Hauptproblem z.B. der onkologischen Chemotherapie besteht nach wie vor in der systemischen Bioverfügbarkeit der meisten Therapeutika. So limitieren die Nebenwirkungen, die durch die nichtselektiven systemischen Effekte der Substanzen hervorgerufen werden, die maximal tolerierte Dosis (MTD) und führen gleichzeitig zu einer deutlichen Einschränkung der Patienten. Hinzu kommt häufig eine ausgeprägte Metabolisierung der Wirkstoffe fern des eigentlichen Wirkorts, die die Plasmakonzentration des Medikaments unverhältnismäßig reduziert. Ein Lösungsansatz könnte die Verwendung von Liposomen als Trägersystem sein.

Liposomen sind sphärische Vesikel deren Wand aus einer Lipiddoppelschicht besteht. Innerhalb dieser Schicht sind die lipophilen Fettsäureketten der amphiphilen Moleküle zueinander gerichtet, sodass der hydrophile Teil eines jeden Moleküls zur wässrigen Phase innerhalb und außerhalb des Liposoms gerichtet ist (siehe Abbildung 4). Somit können Liposomen eine wässrige Phase einschließen (Schmidt 2011).

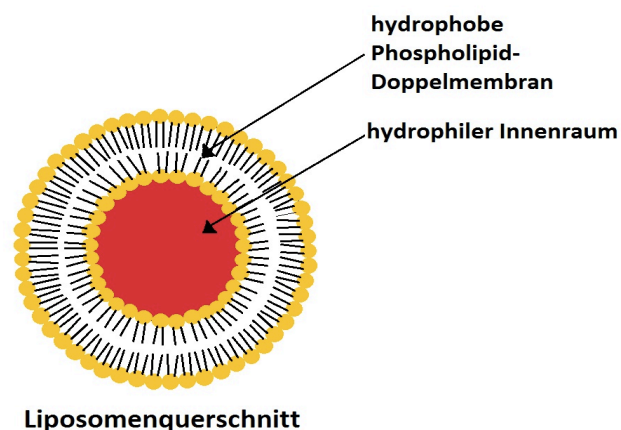


Abbildung 4: Struktur eines Liposoms. Modifiziert nach Schmidt 2011.

In der Medizin werden Liposomen als Trägersysteme verwendet. Eingeschlossene

Arzneistoffe sind nach der Applikation vor möglicher Metabolisierung geschützt oder deren Halbwertszeit ist verlängert (Schmidt 2011; Turner et al. 2012). So wird die Effizienz des Arzneimittels gesteigert (Agarwal et al. 1994) und dessen Nebenwirkungen durch Einkapselung in Vesikel minimiert. Außerdem verbessert sich durch liposomalen Einschluss die chemische und Photostabilität von Kontrastmitteln (Turner et al. 2012).

Für die Verwendung in der Tumorthherapie weisen Liposomen als Transporter verschiedenen Vorteile auf: Durch die hohe Permeabilität der Tumorgefäße akkumulieren sie bevorzugt im Tumorgewebe (Fang et al. 2011). Zusätzlich ermöglicht die Kopplung von Liganden an die Liposomenoberfläche eine spezifische Bindung an die Tumorzellen (Maruyama 2011). Der liposomale Einschluss stark lipophiler Agenzien ermöglicht deren parenterale Verabreichung. Hydrophile Arzneimittel werden von der Lipiddoppelschicht umschlossen, lipophile dagegen in die Membran eingebettet (Sattler 2012). Als besonders wirkungsvoll haben sich unilamellare Liposomen geringeren Durchmessers (< 150 nm) im Gegensatz zu denen mit großem Durchmesser (> 500 nm) oder multilamellaren Liposomen erwiesen, da Liposomen umso langsamer vom retikuloendothelialen System (RES) vor allem in Leber und Milz abgefangen werden, je kleiner sie sind (Fanciullino & Ciccolini 2009).

Die richtige Zusammensetzung der Liposomen ist auch im Hinblick auf ihre Stabilität eine Herausforderung: Die Freisetzung der Agenzien aus Liposomen mit hoher Stabilität erfolgt sehr langsam und ist nicht kontrollierbar, so dass gegebenenfalls keine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe erreicht wird. Andererseits führt eine große Permeabilität der Liposomen zu einer ungewollten Erhöhung der systemischen Dosis des Therapeutikums, die zu hohen Nebenwirkungsraten und einer starken Metabolisierung abseits des eigentlichen Zielgewebes führt.

Ein Ansatz, dieses Problem zu lösen, besteht im Einsatz aktivierbarer Systeme, wie z.B. thermosensitiver Liposomen (TSL; Kong et al. 2000). Hierbei handelt es sich um Liposomen, die bei regionaler Hyperthermie (39-42 °C) durch den Wechsel der Membranlipide vom gelartigen in den flüssigen Zustand ihren Inhalt freigeben. Somit können Wirkstoffe gezielt am Wirkort abgegeben werden, so dass die lokale Konzentration des Arzneimittels erhöht und seine Wirkung damit verstärkt wird (Kong et al. 2000; Needham et al. 2000).

Durch das natürliche Vorkommen der am häufigsten verwendeten Lipide sind die

meisten Liposomen weder toxisch noch allergen (Bikram & West 2008). Eine Herausforderung bei der Verwendung von TSL für die Chemotherapie besteht in der richtigen Taktung und Dauer der Hyperthermiebehandlung, um eine optimale Wirkstoffkonzentration im Tumor zu erzeugen. Daher gibt es verschiedene Versuche, mittels beigefügter Kontrastmittel sowohl das Anfluten der Liposomen im Zielgebiet als auch die Wirkstofffreisetzung *in vivo* zu detektieren (Fattahi et al. 2011; Tagami et al. 2011). Die herkömmlichen Bildgebungsmodalitäten weisen hierbei jedoch jeweils gewisse Einschränkungen auf. So werden für die MRT große Kontrastmittelmengen benötigt, um messbare Signalveränderungen zu erzeugen (Liu & Frank 2009). Optische Methoden wie die Fluoreszenzbildgebung weisen eine geringe räumliche Auflösung und eine stark limitierte Eindringtiefe auf (Song & Wang 2007). Nuklearmedizinische Methoden wiederum sind zwar sehr sensitiv bei der Detektion der jeweiligen Radionuklide, allerdings ist die Unterscheidung zwischen eingeschlossenen und freigesetzten Tracern in der Regel nicht möglich (Tashjian et al. 2008). Aufgrund der Echtzeitbildgebung und der parallelen Aufnahme morphologischer Daten sowie die Umgebungsabhängigkeit des Signals verschiedener Kontrastmittel könnte die Photoakustik hier neue Wege aufzeigen.

Ziele der Dissertation

Im Hinblick auf eine genaue Evaluation der Möglichkeiten und Limitationen der Photoakustik für die Anwendung *in vivo* und die Planung erster Kleintierstudien wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Ziele verfolgt:

1. Entwicklung eines 3D-*In-vitro*-Systems zur Charakterisierung von photoakustischen Kontrastmitteln und Evaluation des verwendeten Photoakustikgerätes hinsichtlich seiner Signalstabilität.
2. Charakterisierung der photoakustischen Eigenschaften von MB und ICG unter variablen Bedingungen *in vitro* (Konzentration, Eindringtiefe, Anwesenheit von Albumin).
3. Evaluation der Photoakustik hinsichtlich der Detektion von TSL und der Darstellung ihrer Aktivierung durch Hyperthermie *in vitro*.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die verwendeten Materialien sind in Tabellenform (Tabelle 3, 4 und 5) im Anhang ab S. 46 aufgelistet.

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbau des Vevo LAZR-Systems

Die Messungen wurden mit einem Vevo LAZR-System (VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Kanada) durchgeführt. Das System besteht aus einer abschirmbaren Messkammer mit integriertem Ultraschallkopf und verstellbarer Objektträgerplatte sowie einem separaten Wagen, der die optischen, kühlenden und stromgenerierenden Komponenten des Nd:YAG-Lasers (20 Hz, <10 ns Pulslänge, 680-970 nm) enthält (Abbildung 5).



a)

b)

Abbildung 5: a) Abschirmbare lichtundurchlässige Messkammer mit dem eingespannten Schallkopf und der verstellbaren Objektträgerplatte. b) Vevo LAZR-Wagen, der die optischen, kühlenden und stromgenerierenden Komponenten für die Generierung des Laserstrahls beinhaltet (© VisualSonics Inc. Toronto, Kanada).

Das Laserlicht wird über Glasfaserbündel zum Schallkopf geleitet und tritt dort über zwei Lichtleisten aus, die in einem Winkel von 30° zu beiden Seiten des mittig platzierten Ultraschall-Arrays angeordnet sind (Abbildung 6). Hierdurch wird das Laserlicht in einer Tiefe von 10 mm fokussiert. Es waren zwei Linearschallköpfe (256 Elemente) mit einer Frequenz von 13-24 MHz (LZ-250) bzw. 32-55 MHz (LZ-550) verfügbar.

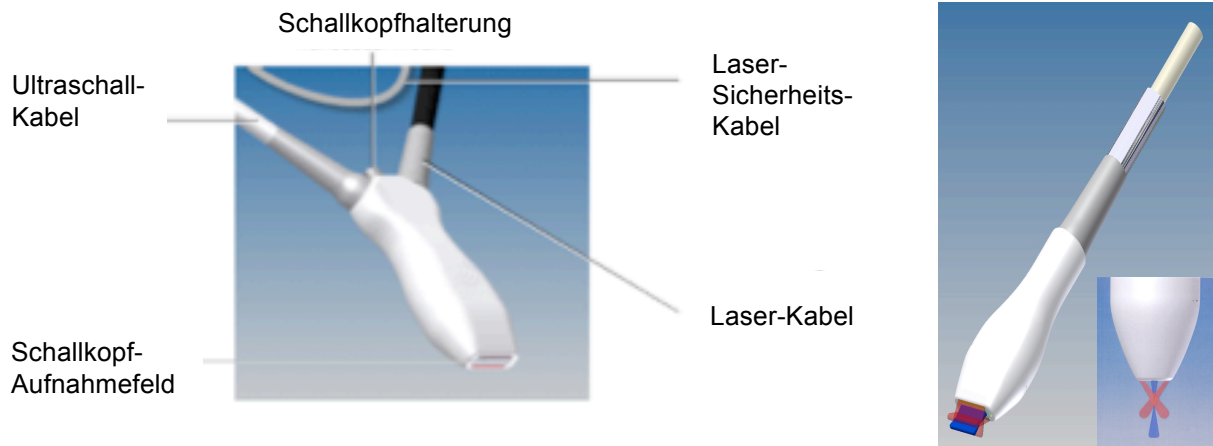


Abbildung 6: Der Ultraschallkopf nimmt Echtzeitbilder im photoakustischen Modus auf, indem er Laserlicht aussendet und gleichzeitig Ultraschallsignale detektiert (© VisualSonics Inc. Toronto, Kanada).

2.2.2 Signalstabilität des Vevo LAZR-Systems

Bei dem initial verwendeten Photoakustikgerät handelte es sich um eine relativ frühe Entwicklungsstufe der Firma VisualSonics Inc., die im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt wurde. Bei dieser zeigten sich Ungenauigkeiten in der Korrektur der Puls-zu-Puls-Variabilitäten der Laserenergie, insbesondere im Bereich der Wellenlängen < 720 nm. Da die eingestrahlte Laserenergie mit dem gemessenen Photoakustiksignal korreliert, führen Energieschwankungen zu relevanten Ungenauigkeiten der Messwerte. Als maximal tolerierbar wurden Signalschwankungen von 5 % in einem standardisierten Messsystem *in vitro* definiert.

Vor Beginn jedes Messtages wurden eine 20minütige Aufwärmphase des Lasers, eine nachfolgende Leerbildakquirierung im Photoakustik-Modus („PA-Modus“) von 15 min, sowie die Optimierung der Laserenergie durchgeführt. Außerdem wurde der Ultraschallkopf gereinigt, um eventuell vorhandene Verschmutzungen zu beseitigen.

Für die Messungen wurde ein 2D-Phantom verwendet, das bereits für frühere Arbeiten entwickelt worden war. Dieses bestand aus Plexiglas und ermöglichte die stabile Aufnahme von maximal 5 Tygon®-Schläuchen mit einem Außendurchmesser von 2,4 mm in definierter Höhe und Position. Zur Bestimmung der Signalstabilität wurden die Schläuche mit MB in einer Konzentration 0,5 mg/ml bzw. destilliertem Wasser gefüllt und die Schlauchenden mit Putty verschlossen, einem signalfreien, in der Zahnmedizin für Abformungen verwendeten Knetsilikon. Somit konnte eine Vermischung mit dem umgebenden Wasser vermieden werden. Um Blasenbildung zu vermeiden, wurde der Halter mit den beschickten und verschlossenen Schläuchen in ein Wasserbad gelegt.

Nach Darstellen des Schlauchs im B-Modus wurden die Photoakustikmessungen mit den in Tabelle 1 dargestellten Einstellungen durchgeführt. Die jeweilige Wellenlänge wurde zwölf Sekunden lang gemessen, und der „Cine Loop“ gespeichert. Der Vorgang wurde für jede der unten genannten Wellenlängen wiederholt. Um einen Probenwechsel und die Repositionierung des Schallkopfes zu simulieren, wurde zwischen den Messungen je 3 min gewartet. Während jeder Messpause kühlt der Laser etwas ab, was zu einer veränderten Energieleistung führt, die vom System automatisch detektiert und korrigiert werden muss. Eine ungenaue Gegenregulierung kann die Messwerte durch schwankende Energieleistungen beeinflussen. Um die Genauigkeit der Energiekorrektur des verwendeten Systems zu überprüfen, wurden die Experimente sowohl mit als auch ohne eine erneute Aufwärmphase vor Messung der nächsten Wellenlänge durchgeführt. Für die Messreihen wurden die beiden vorhandenen Schallköpfe eingesetzt.

Tabelle 1: Einstellungen für die Energievariabilitäts-Messung

Schlauchposition	Schlauchmitte auf 9 mm
Modus	<i>single wavelength</i>
Energiekorrektur	ein
Wellenlängen	680 nm, 690 nm, 700 nm, 710 nm

2.2.3 Herstellung des 3D-Phantoms

Um die Tiefenabhängigkeit der Signalstärken einzelner Kontrastmittel unter optimalen Bedingungen zu untersuchen, war es notwendig, die Kontrastmittel reproduzierbar in mehreren Tiefen in ein Phantom einzubringen. Es wurde Plexiglas als hitzestabiles, signalneutrales und gut zu verarbeitendes Material für die Herstellung des Phantom-Halters verwendet. Der Halter wurde mit Tygon®-Schläuchen mit einem Außendurchmesser von 2,4 mm, die kaum ein eigenes photoakustisches Signal aufwiesen, in definierter waagerechter Position zum Ultraschallkopf versehen. Diese Schläuche sollten das jeweilige Kontrastmittel in gewünschter Position halten und es vom Umgebungsmedium trennen. Die Abstände der Schläuche zueinander wurden mit 5 mm in der Horizontalen und 2 mm in der Vertikalen festgesetzt. Somit ergaben sich Bohrungstiefen von 2, 4, 6, 8 und 10 mm von der Halteroberfläche. Durch die Anfertigung von Haltern mit 10 bzw. 15 Bohrungen (Abbildung 7, 8) war es möglich, mehrere experimentelle Gruppen, wie z.B. die Kontrollen und unterschiedliche Kontrastmittel, im selben Phantom zu messen.

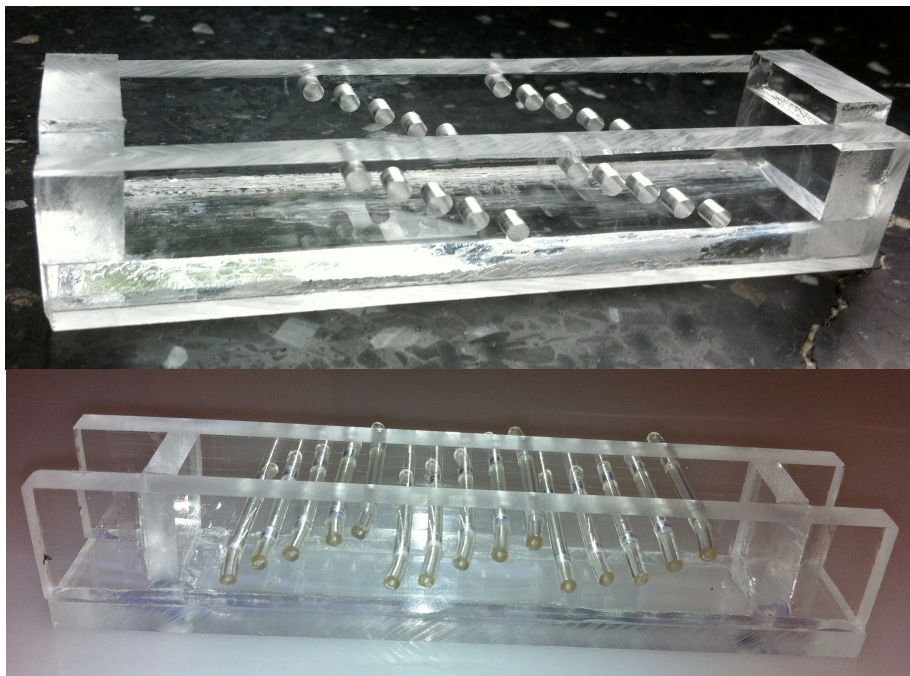


Abbildung 7: Phantomhalterprototyp mit 10 bzw. 15 Bohrungen.

Um die Streuung im menschlichen Gewebe zu simulieren, wurde der mit Schläuchen bestückte Halter im Überschuss mit 2 % Agarose gefüllt, der 4,5 % Clinoleic®

zugegeben worden waren (Siddiqi et al., 2009). Nach dem Aushärten wurde die Phantomoberfläche mit einem scharfen Skalpell horizontal entlang Halteroberfläche abgetragen, um eine reproduzierbare Phantomschichtstärke über den Schläuchen zu gewährleisten (Abbildung 8). Das Agarose-Clinoleic[®]-Gemisch wurde vor jeder Messreihe neu hergestellt, um messrelevante Materialveränderungen wie z.B. Austrocknung während der Aufbewahrung zu vermeiden.

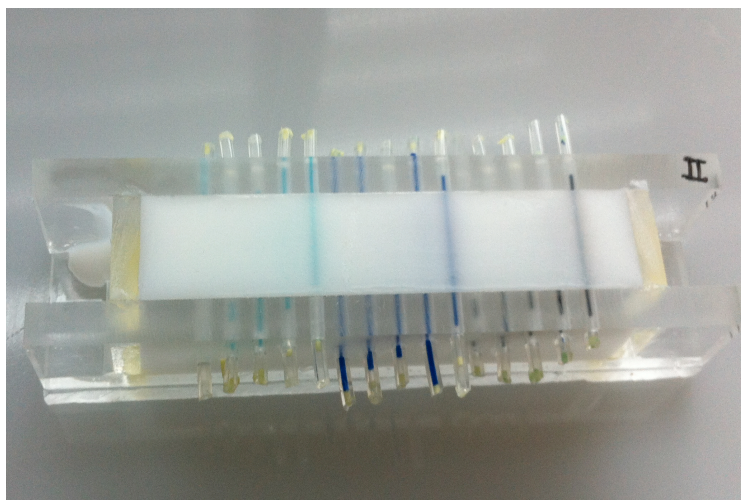


Abbildung 8: Das für die Spektrenmessungen vorbereitete Phantom. Die Tygon[®]-Schläuche sind eingefädelt und mit MB beschickt und das Agarose-Clinoleic[®]-Gemisch ist erkalte.

2.2.4 Phantomreproduzierbarkeit

Ziel dieser Messungen war es, die Reproduzierbarkeit bei der Phantomherstellung zu untersuchen. Hierzu wurden die zwei Phantomhalter mit Schläuchen nur in 4 mm Tiefe bestückt und nacheinander mit jeweils frisch angesetztem Agarose-Clinoleic[®]-Gemisch beschickt. Nach der Abkühlphase wurden die Schläuche mit MB 0,5 mg/ml befüllt und mit Putty verschlossen. Die Phantome wurden nacheinander in der Laserkammer platziert und alle Schläuche wurden mit den in Tabelle 2 aufgeführten Einstellungen vermessen.

Tabelle 2: Einstellungen zur Reproduzierbarkeitsmessung

Schlauchposition	Schlauchmitte auf 9 mm
Modus	<i>spectro</i>
Wellenlängen	700-970 nm
Energiekorrektur	ein

2.2.5 Tiefenabhängigkeit und Konzentrationsabhängigkeit der ICG- und MB-Spektren

Ziel dieser Untersuchung war es, den Einfluss von Eindringtiefe und Kontrastmittelkonzentration auf die photoakustische Signalstärke zu untersuchen. Das 3D-Phantom wurde wie oben beschrieben vorbereitet und in einem Wasserbad platziert. Nach obligatem Aufwärmen und der Kalibration des Lasers zu Beginn jedes Messtages wurde zunächst als Kontrolle destilliertes Wasser und anschließend die Kontrastmittel ICG und MB in den Konzentrationen 5 mg/ml, 0,5 mg/ml und 0,05 mg/ml jeweils in 10, 12, 14, 16 und 18 mm Tiefe mit beiden Schallköpfen gemessen. Bereits in den ersten Messungen zeigte sich eine geringere Sensitivität des LZ-550, so dass mit diesem Schallkopf nur die Schläuche in den Tiefen 10, 12 und 14 mm gemessen wurden. Die Datenerhebung erfolgte jeweils im Spektralmodus, wobei im Wellenlängenbereich 680-970 nm mit einem Abstand von 2 nm sequentiell 2D-Bilder aufgenommen und als *Cine Loop* gespeichert wurden.

2.2.6 Albumin-Abhängigkeit der ICG- und MB-Spektren

Um den Einfluss von Albumin auf die Messwerte zu ermitteln, wurde den Kontrastmitteln Albumin in einer Konzentration von 40 g/ml zugegeben. Anschließend erfolgte die Messung im Spektralmodus in den gleichen Kontrastmittelkonzentrationen und Eindringtiefen wie oben beschrieben.

2.2.7 Herstellung ICG-beladener Liposomen

Zur Herstellung von ICG-beladenen Phosphocholin-Cholesterin-Liposomen (ICG-PCL) als Kontrolle für die aktivierbaren ICG-beladenen thermosensitiven Liposomen (ICG-TSL) wurden 448 µl 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC) (25 mg/ml) und 46 µl Cholesterin (50 mg/ml) lyophilisiert. Auf den Lipidfilm wurden 150 µl ICG (ICG-Pulsion®, 5 mg/ml) in 850 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS) gegeben und bei 60 °C für 30 min im Wasserbad inkubiert. Anschließend folgte ein dreimaliger *Freeze-Thaw-Cyclus* in flüssigem Stickstoff. Danach erfolgte die Extrusion des ICG-Lipidgemisches durch eine Polycarbonmembran mit einer

Porengröße von 100 nm. Die anschließende Reinigung der Liposomen von ungebundenen Komponenten wurde mittels einer PD-10-Trennsäule durchgeführt. Die Herstellung der ICG-TSL erfolgte auf die gleiche Art und Weise wie die Herstellung der Kontrollliposomen mit dem Unterschied, dass 64 µl DSPC (25 mg/ml) und 264 µl 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPPC) (50 mg/ml) als Lipide verwendet wurden.

2.2.8 Aktivierung thermosensitiver Liposomen

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von ICG-TSL mittels Photoakustik dargestellt werden kann, wurden Messungen im oben beschriebenen 2D-Phantom durchgeführt. Die Schläuche wurden mit den zu messenden Liposomen gefüllt, ihre Enden wurden mit Putty verschlossen und das Phantom wurde in einem Wasserbad platziert. Alle Schläuche wurden auf 10 mm Tiefe eingestellt und mit dem LZ-250 Schallkopf im Spektralmodus gemessen. Anschließend wurde der Halter samt Wasserbad unter der Wärmelampe auf 42 °C erwärmt, und die Liposomen erneut im Spektralmodus gemessen. Als Kontrolle wurden ICG-PCL verwendet und nach identischem Protokoll untersucht.

2.2.9 Auswertung

Die Vevo LAZR-Daten wurden mit dem proprietären Softwarepaket von VisualSonics Inc. analysiert. Zur Auswertung wurde ein Messfeld manuell um die Region mit der visuell intensivsten Signalstärke gezogen und die Signalintensität als Funktion der Wellenlänge als Graph angezeigt. Dieses Messfeld wurde innerhalb einer Messreihe jeweils beibehalten, um die Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten. Die so gewonnenen Signalintensitäten wurden als Funktion der Wellenlänge aufgetragen. Die Position des Messfeldes wurde innerhalb einer Messreihe beibehalten. Die Kontrastmittelspektren wurden qualitativ verglichen. Für die Analyse der Aktivierung der ICG-TSL wurde als nichtparametrische Testverfahren der Wilcoxon-Signed-Rank-Test verwendet. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Signalstabilität des Vevo LAZR-Systems

In Vorversuchen fiel als Zufallsbefund auf, dass das Photoakustiksignal auch bei eigentlich stabilen Messsystemen wie dem hier verwendeten 2D-Phantom insbesondere im kurzwelligen Bereich < 720 nm schwankte. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit standardisiert untersucht.

Als maximal tolerierbar wurde eine Signalvariabilität von 5 % definiert. Um zu bestimmen, ob das verwendete Photoakustiksystem innerhalb dieser Grenze lag, wurde das Photoakustiksignal jeweils bei einer Wellenlänge von 680 nm, 690 nm, 700 nm und 710 nm über einen Zeitraum von 12 s gemessen. Die Messungen wurden nach einer initialen Aufwärmphase im Abstand von jeweils 3 min durchgeführt, um einen Probenwechsel und eine Repositionierung des Schallkopfes zu simulieren. In einer zweiten Messreihe wurde zusätzlich zu der initialen Aufwärmphase des Lasers vor jede Messung eine weitere Aufwärmphase geschaltet, bis der Laser seine maximale Leistung erreicht hat.

Es zeigte sich, dass die Signalschwankungen für 680 nm und 690 nm ohne eine erneute Aufwärmphase vor der Messung das Schwankungslimit von 5 % überschritten. Wurde der Laser direkt vor der Messung jedesmal wieder auf Temperatur gebracht, lag die Schwankungsbreite innerhalb der definierten Toleranz. Die Werte für die Wellenlängen 700 nm und 710 nm lagen für beide Messansätze innerhalb der definierten Schwankungsbreite. Für alle vier Wellenlängen zeigte sich ein kontinuierlicher Signalanstieg über die Zeit, der sich ohne erneute Aufwärmphase verstärkte (Abbildung 9).

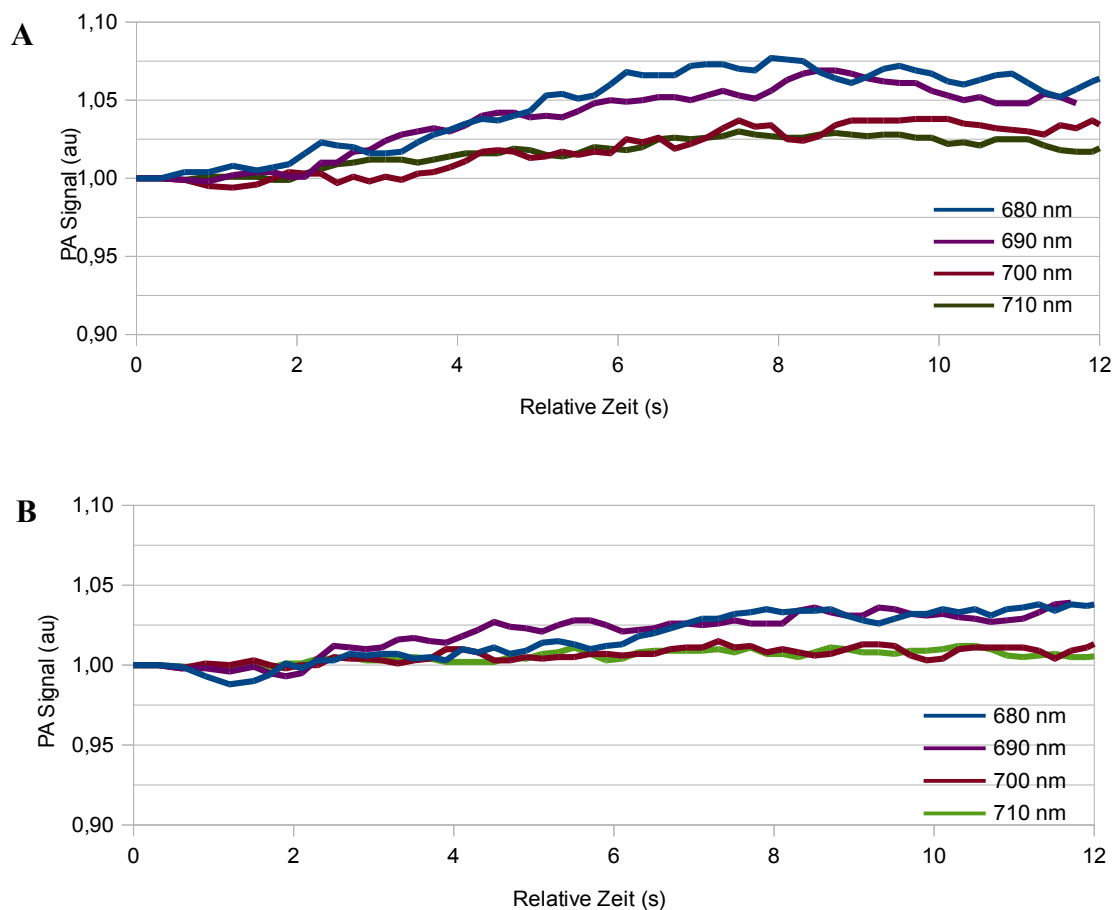


Abbildung 9: Signalveränderung von MB bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml in 4 mm Tiefe über 12 s der Wellenlängen 680 nm, 690 nm, 700 nm und 710 nm im Vergleich ohne (A) und mit (B) erneuter Aufwärmphase.

Diese Ergebnisse wurden von der Herstellerfirma zum Anlass genommen, die Energiekorrektur des Systems zu optimieren. Die neue Gerätegeneration wurde uns für weitere Tests im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Das neue Gerät zeigte zwar bei allen Wellenlängen eine insgesamt vermehrte Oszillation des Signals, die allerdings nur für die kürzeste Wellenlänge, 680 nm, mehrfach kurzzeitig über die 5 %-Marke stieg. Bei 690 nm wurde das 5 %-Limit kurzzeitig erreicht, während die Wellenlängen 700 nm und 710 nm Schwankungen um maximal 3 % erreichten. Der Signalverlauf wurde durch ein zusätzliches Aufwärmen des Lasers nicht wesentlich beeinflusst. Insbesondere zeigte sich kein Unterschied zwischen den initialen Signalintensitäten und den Werten am Ende der Messung (Abbildung 10).

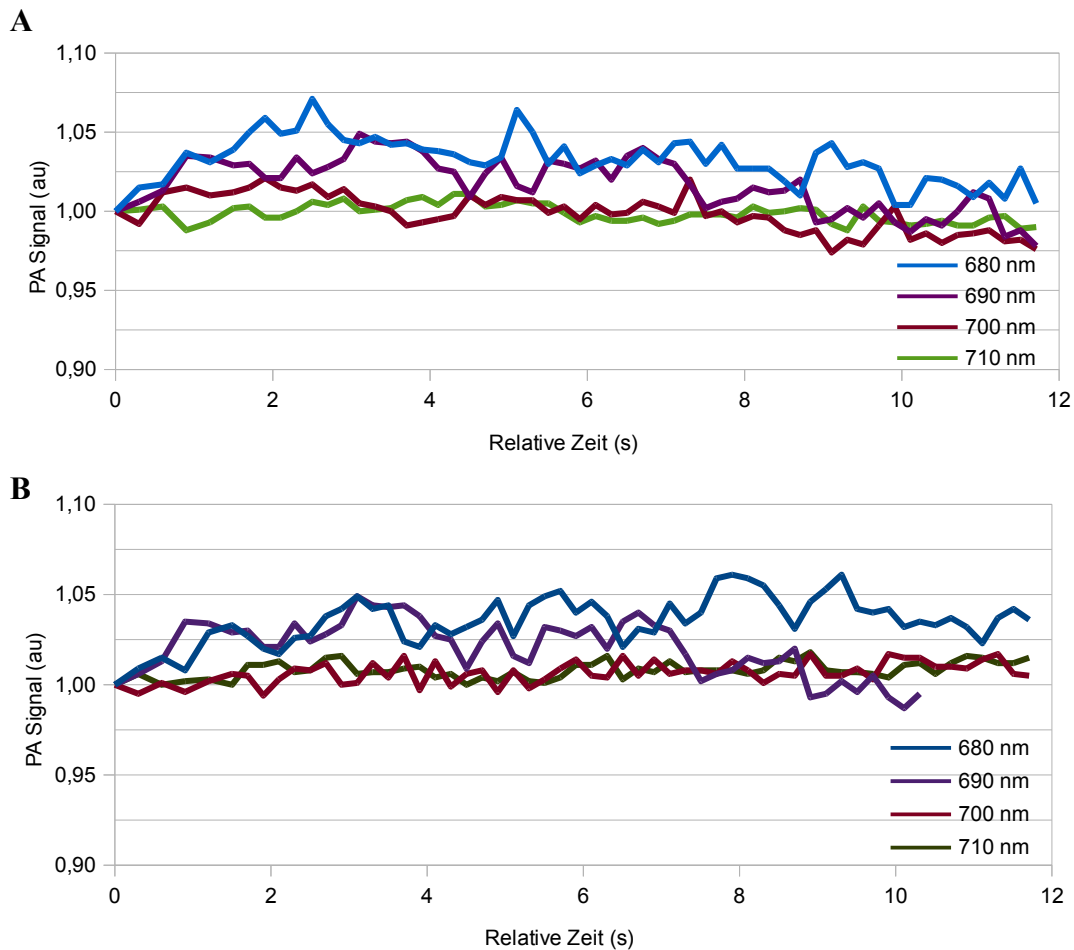


Abbildung 10: Messung mit der nächsten Generation des Vevo LAZR; Signalveränderung von MB bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml in 4 mm Tiefe über 12 s der Wellenlängen 680 nm, 690 nm, 700 nm und 710 nm im Vergleich ohne (A) und mit (B) erneuter Aufwärmphase.

3.2 Phantomreproduzierbarkeit

Neben einer stabilen Energieleistung des Lasers ist auch eine reproduzierbare Herstellung des verwendeten Phantoms essentiell für valide Messwerte. Die Messung von je drei unabhängigen MB-Spektren bei einer Konzentration von 5 mg/ml in 4 mm Tiefe in zwei separat hergestellten Phantomen ergab eine nahezu vollständige Überlagerung aller Graphen (Abbildung 11). Damit kann von einer sehr guten Reproduzierbarkeit bei der Phantomherstellung ausgegangen werden.

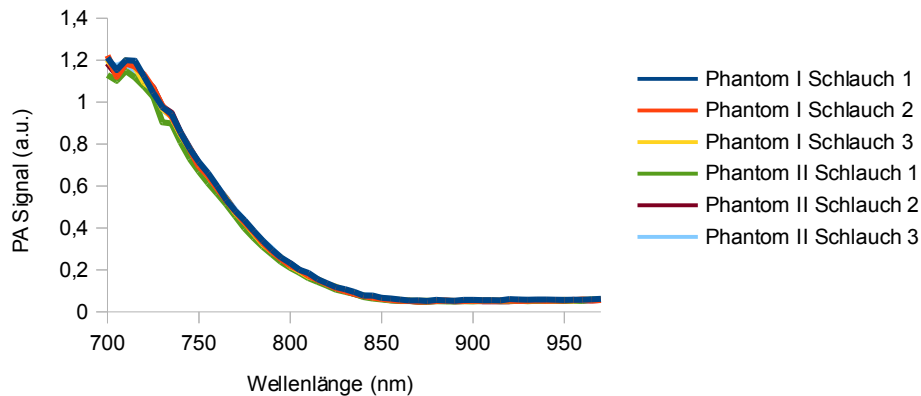


Abbildung 11: Je drei unabhängige Photoakustikspektren von MB in einer Konzentration von 5 mg/ml in zwei separat hergestellten 3D-Phantomen.

3.3 Photoakustische Eigenschaften von ICG und MB in Abhängigkeit von Eindringtiefe, Konzentration und Albumin

Aufgrund des Schallkopfdesigns musste jeweils eine Vorlaufstrecke von 10 mm von der Schallkopfoberfläche zur Oberfläche des Phantoms eingehalten werden. Durch die Messung im Wasserbad fand keine relevante Absorption oder Streuung des Ultraschalls und des Laserlichts auf dieser Strecke statt. Daher wurde als Nullpunkt für die Bestimmung der Eindringtiefe die Oberfläche des Phantoms definiert. Zur Ermittlung des Einflusses der Messtiefe und der Kontrastmittelkonzentration auf das jeweilige photoakustische Spektrum sowie zur Bestimmung der maximalen Eindringtiefe wurden ICG und MB in Konzentrationen von 5 mg/ml, 0,5 mg/ml und 0,05 mg/ml in 2, 4, 6, 8 und 10 mm Tiefe (gemessen von der Phantomoberfläche) mit dem LZ-250-Schallkopf und in 2, 4, und 6 mm Tiefe (gemessen von der Phantomoberfläche) mit dem LZ-550-Schallkopf gemessen. Zudem wurde der Einfluss von Albumin auf die photoakustischen Eigenschaften beider Kontrastmittel untersucht. Zur besseren Übersicht werden im Folgenden für die Abbildungen zur Tiefenabhängigkeit die Messungen in einer Konzentration des entsprechenden Kontrastmittels und für die Abbildung zur Konzentrationsabhängigkeit die Messungen in nur einer Tiefe dargestellt.

3.3.1 ICG

Es zeigte sich, dass der Schallkopf LZ-550 nur eine geringe Sensitivität aufwies und jenseits von 6 mm Eindringtiefe kein Signal mehr detektiert werden konnte. Die maximale Eindringtiefe für den Schallkopf LZ-250 lag bei 8 mm. Die Signalintensität nahm logarithmisch mit zunehmender Eindringtiefe ab (Abbildung 12), wobei die Form der ICG-Spektren qualitativ gleich blieb (Abbildung 13 A und B). Im Gegensatz dazu zeigten sich Veränderungen der ICG-Spektren in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration (Abbildung 13 E und F). Beim Vergleich der Spektren zeigte sich, dass die Signalintensität im mittleren Abschnitt des Spektrums (750 - 800 nm) relativ zur Signalintensität im kürzerwelligen Abschnitt < 750 nm bei einer Konzentration von 5 mg/ml höher war als bei 0,5 mg/ml, d. h. es fand sich eine Zunahme des zweiten Peaks in Relation zum ersten bei einer Konzentrationssteigerung von 0,5 mg/ml auf 5 mg/ml. Die Zugabe von Albumin veränderte die Form der ICG-Spektren insbesondere im längerwelligen Abschnitt (Abbildung 13 C, D, G, H). Hierbei nahm die Signalintensität im längerwelligen Abschnitt des Spektrums > 800 nm im Verhältnis zur Signalintensität im kürzerwelligen Abschnitt < 800 nm relativ gesehen zu. Das so entstandene Plateau ließ sich für alle untersuchten Konzentrationen nachvollziehen, so dass die Spektren insgesamt über alle Konzentrationen eine harmonischere Form aufwiesen (Abbildung 13 G und H).

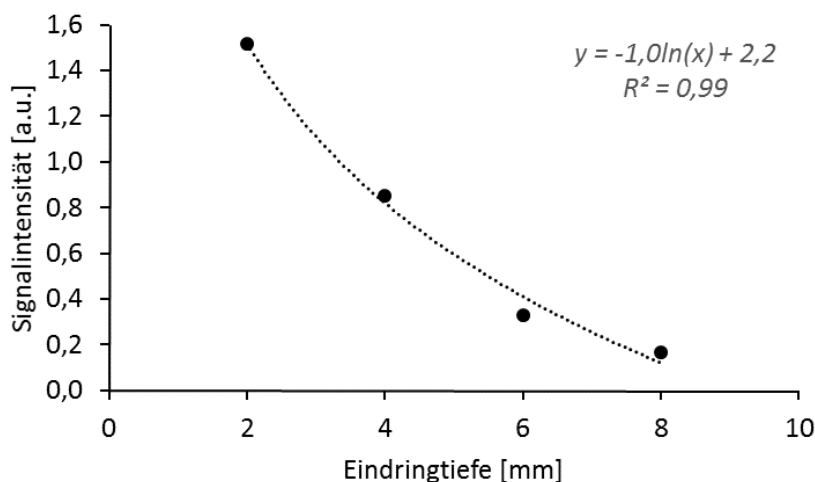


Abbildung 12: Korrelation zwischen Eindringtiefe und Signalintensität für ICG.

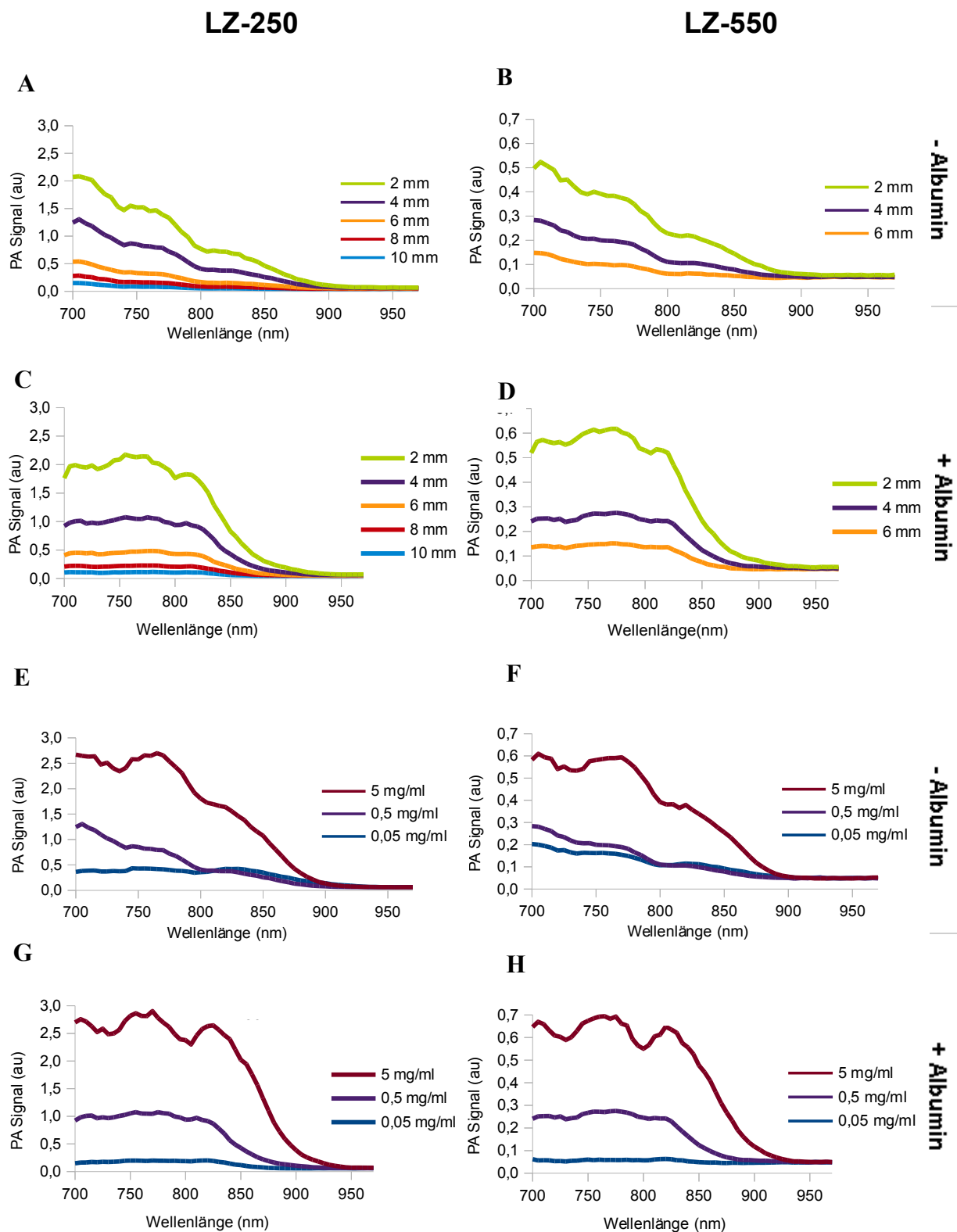


Abbildung 13: ICG-Spektren, gemessen mit dem Schallkopf LZ-250 (A, C, E, G) und LZ-550 (B, D, F, H) ohne (A, B, E, F) und mit Zugabe von Albumin (C, D, G, H).

A-D: Messung von ICG bei einer Konzentration von 0,5 mg/dl in unterschiedlichen Eindringtiefen.

E-H: Messung unterschiedlicher ICG-Konzentrationen in 4 mm Tiefe.

3.3.2 MB

Das photoakustische Signal von MB lag in allen vergleichbaren Versuchsansätzen unter dem von ICG. Unter Verwendung des Schallkopfes LZ-250 konnte jenseits von 6 mm Eindringtiefe kein Signal mehr detektiert werden, bei Verwendung des LZ-550 lag das Limit bei 4 mm. Mit beiden Schallköpfen konnte MB mit einer Konzentration unter 0,5 mg/ml nicht mehr detektiert werden. Auch für MB nahm die Signalintensität logarithmisch mit zunehmender Eindringtiefe ab (Abbildung 14) bei konstanter Form der photoakustischen Spektren (Abbildung 15 A und B). Anders als bei ICG zeigte sich keine Konzentrationsabhängigkeit der MB-Spektren-Form (Abbildung 15 E und F). Die Zugabe von Albumin veränderte die qualitative Form der MB-Spektren ebenfalls nicht (Abbildung 15 C, D, G, H), im Gegensatz zu ICG. Allerdings zeigte sich eine Verringerung der Signalstärke um etwa ein Drittel. Konsekutiv war bei Verwendung des Schallkopfes LZ-550 ein Signal nur noch bis 2 mm Eindringtiefe und einer minimalen Konzentration von 5 mg/ml nachweisbar.

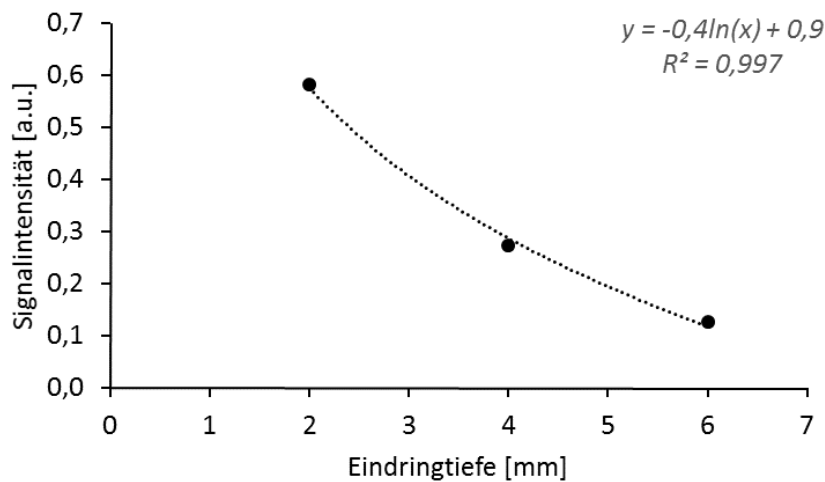


Abbildung 14: Korrelation zwischen Eindringtiefe und Signalintensität für MB.

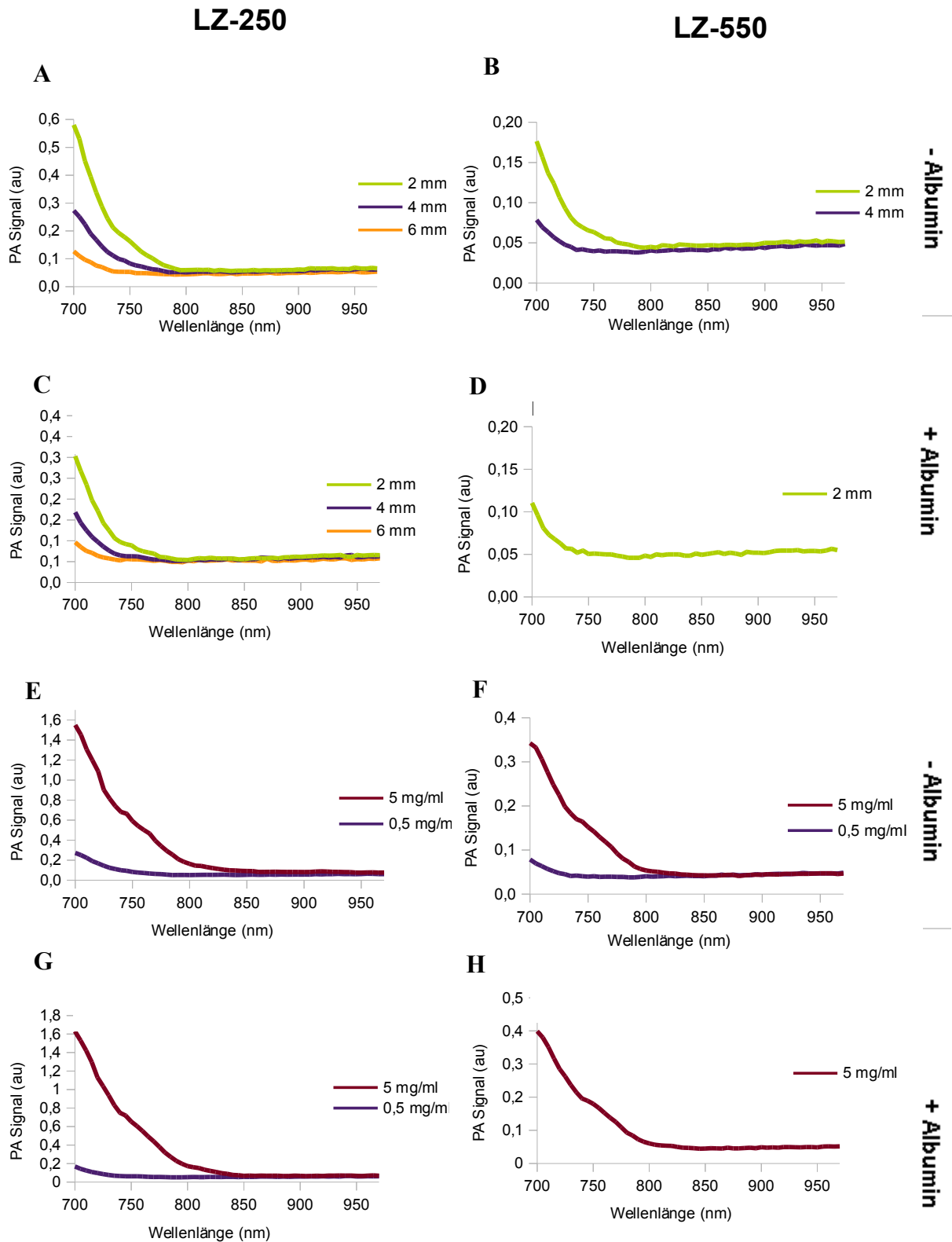


Abbildung 15: MB-Spektren, gemessen mit dem Schallkopf LZ-250 (A, C, E, G) und LZ-550 (B, D, F, H) ohne (A, B, E, F) und mit Zugabe von Albumin (C, D, G, H).

A-D: Messung von MB bei einer Konzentration von 0,5 mg/dl in unterschiedlichen Eindringtiefen.

E-H: Messung unterschiedlicher MB-Konzentrationen in 4 mm Tiefe.

3.4 Photoakustische Darstellung der Aktivierung thermosensitiver Liposomen

ICG ließ sich sowohl in die PCL als auch die TSL einschließen, wobei die Kontrollliposomen im Vergleich zu den TSL bei gleicher initial eingesetzter ICG-Menge deutlich geringere Signalintensitäten aufwiesen (Abbildung 16). Die Form der Liposomenspektren erinnerte sowohl für die ICG-PCL als auch für die ICG-TSL eher an die Spektren von ICG mit Albumin als an reines ICG. Hierbei fiel für die ICG-TSL ein Peak im längerwelligen Bereich des Spektrums um 840 nm auf im Vergleich zum Peak des reinen ICG um 720 nm.

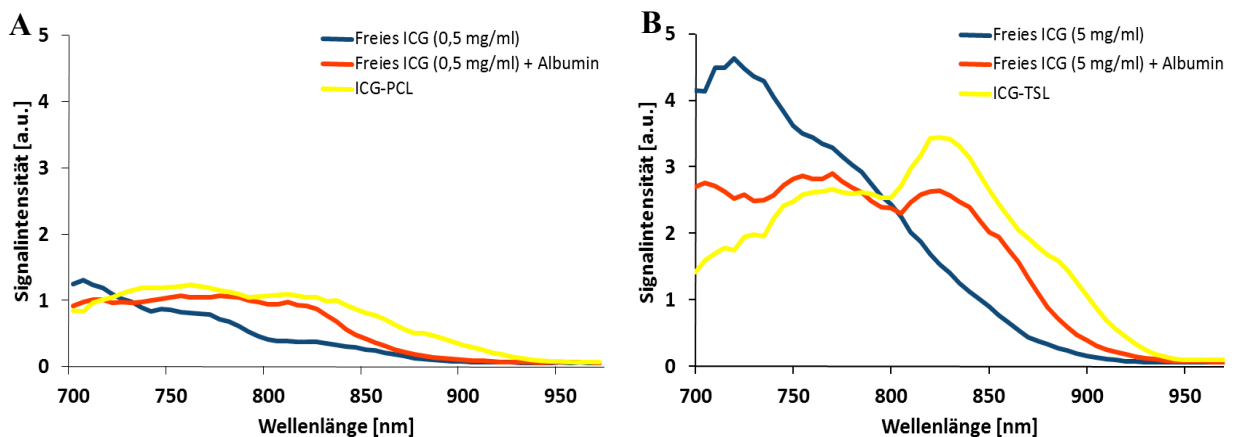


Abbildung 16: Spektren der ICG-PCL (A) und ICG-TSL (B) im Vergleich zu den Spektren von freiem ICG und ICG mit Albumin in ähnlicher Signalintensität.

Nach Erwärmung des Wasserbades auf 42 °C zeigte sich eine geringe Signalerhöhung der ICG-PCL, wobei Form des ICG-PCL-Spektrums erhalten blieb (Abbildung 17 A). Dieser Unterschied fiel jedoch nicht signifikant aus (Abbildung 17 B). Im Gegensatz dazu führte Erwärmung bei Verwendung der ICG-TSL zu einer signifikanten Zunahme der Signalintensität im kürzerwelligen Teil des Spektrums (< 800 nm) während sich Intensität und Form des längerwelligen Spektrums (> 800 nm) nicht signifikant änderten (Abbildung 17 C und D), ausgedrückt als Änderung der *Area-under-the Curve* (AUC) im Wellenlängenbereich 740-790 nm bzw. 790-840 nm bei 42 °C im Vergleich zur Raumtemperatur.

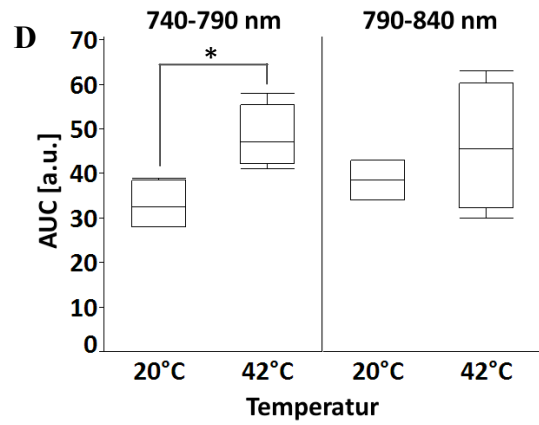
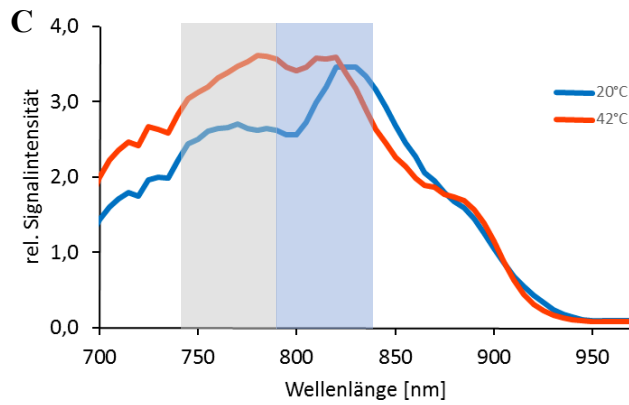
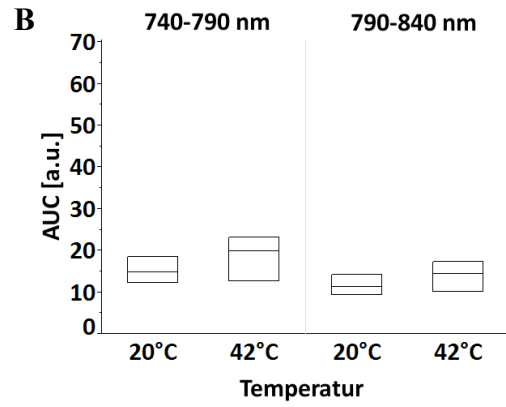
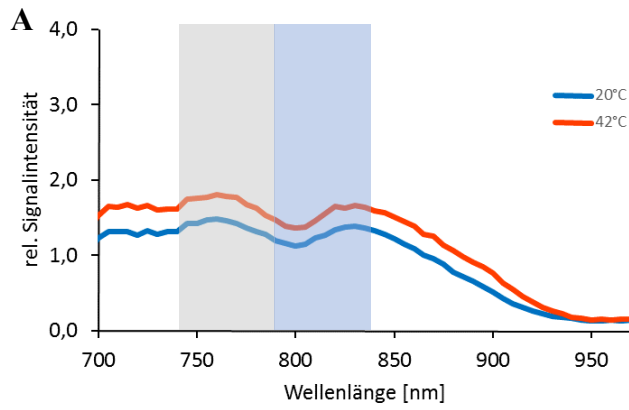


Abbildung 17: Spektren der ICG-PCL (A) und ICG-TSL (C) vor und nach Erwärmung sowie ein Vergleich der AUC im kürzerwelligen (740 – 790 nm) und längerwelligen Bereich (790-840 nm) der Spektren für ICG-PCL (B) und ICG-TSL (D). * = $p < 0,05$

4 Diskussion

Potentielle Anwendungen der Photoakustik *in vivo*

Die Photoakustik stellt eine vielversprechende neue Modalität für die *In-vivo*-Bildgebung dar. So lassen sich dynamische Prozesse wie z.B. die Freisetzung eines Wirkstoffs in Echtzeit verfolgen. Durch die gute räumliche Auflösung (50 – 100 µm) bietet sie Vorteile sowohl gegenüber der optischen als auch der nuklearmedizinischen Bildgebung. Die Einordnung der Signale wird maßgeblich durch eine parallele Koregistrierung mit regulären sonographischen B-Bildern erleichtert und zum Teil erst ermöglicht (Mallidi et al. 2011; Needles et al. 2013). Auch das schnelle Umschalten zu anderen sonographischen Modalitäten wie z.B. der Duplexsonographie vereinfacht die Interpretation der Photoakustik-Signale maßgeblich, z.B. bei der Visualisierung der Sauerstoffsättigung im Gewebe. Darüber hinaus bietet sich die Photoakustik als Erweiterung zu bereits vorhandenen Ultraschallgeräten an, was die Implementierung in der Klinik erleichtern sollte. Allerdings müssen hierfür natürlich die Richtlinien zum Betrieb von Lasereinrichtungen beachtet werden. Dies beinhaltet z.B. eine besondere Kennzeichnung des Untersuchungsraumes, das Tragen von Laserschutzbrillen für alle im Raum Anwesenden, sowie eine Zutrittsbeschränkung zum Untersuchungsraum während der Inbetriebnahme des Lasers. Insbesondere letzteres ist jedoch in jeder radiologischen Klinik Alltag beim Betrieb von Röntgenanlagen und sollte daher keine größere Herausforderung für eine klinische Translation der Photoakustik darstellen.

Grundsätzlich können Photoakustik-Signale aus einer Gewebetiefe von einigen Zentimetern nachgewiesen werden (Yao & Wang 2011). Für eine direkte Translation in die Klinik kommen daher derzeit vor allem oberflächennahe Messungen in Frage. So werden Versuche unternommen, die Aktivität einer rheumatoiden Arthritis mittels Photoakustik zu bestimmen (Xu et al. 2013). Hiermit können bereits frühe Stadien der Erkrankung identifiziert werden. Eine Strategie besteht hierbei in der Darstellung der vermehrten Vaskularisation der entzündeten Synovia, indem man sich die photoakustisch mögliche Detektion von Hämoglobin zunutze macht (van Es et al. 2014). Eine andere Strategie fokussiert auf Photoakustik-Kontrastmittel wie ICG, das

bereits für die Detektion und Aktivitätsbestimmung der rheumatoiden Arthritis mittels optischer Bildgebung getestet (Meier et al. 2014; Mohajerani et al. 2013, Werner et al., 2012) und auch für Photoakustik-Studien sowohl präklinisch als auch klinisch-experimentell bereits eingesetzt wird (Beziere et al. 2015; Lutzweiler et al. 2014).

Eine weitere derzeit denkbare Anwendung ist die SLNB. Wie in der Einleitung beschrieben, wird z.B. MB verwendet, um die erste Lymphknotenstation zu visualisieren, die die Lymphe aus der Tumorregion drainiert (Erpelding et al. 2010). Weisen diese Metastasen des Primärtumors auf, wird eine erweiterte Lymphadenektomie durchgeführt, um einer weiteren lymphatischen Streuung des Tumors entgegenzuwirken (Akers et al. 2012; Erpelding et al. 2010). Song et al. (2008) zeigten, dass sich MB *in vivo* als Kontrastmittel auch in der nichtinvasiven photoakustischen Identifizierung von *Sentinel*-Lymphknoten (SLN) eignet. Hierbei konnten Messtiefen von 18 mm bei einer Laserfluenz von 3,4 mJ/cm² an der Ratte erreicht werden (Song et al. 2008). Auch ICG eignet sich für die SLNB und weist gegenüber anderen in der SLNB verwendeten Kontrastmitteln Vorteile auf. Die für die SLNB häufig eingesetzten Radionuklide sind im Hinblick auf Anwendung und Entsorgung relativ aufwendig, was bei der Verwendung von ICG minimiert wird. Im Gegensatz zu Goldnanopartikeln ist ICG bereits für die oben genannten Anwendungen genehmigt, so dass es sich bei den experimentellen Ansätzen um einen *Off-Label-Use* handelt. Anders als MB weist es zudem noch seltener Nebenwirkungen auf und hat ein geringeres Potential für Lichtschäden (Kim, C. et al. 2010b). Weiterer Vorteil von ICG ist die Lage seiner Absorptions- und Emissionsmaxima im NIR-Spektrum (Schingale 2013), das wegen der geringen Lichtstreuung und der schwachen Absorption von Hämoglobin in diesem Bereich eine hohe Eindringtiefe für die Bildgebung ermöglicht (Kim, C. et al. 2010a). Generell lässt sich intraoperativ mit ICG fluoreszenzoptisch eine hohe Sensitivitäts- und Detektionsrate erzielen (Murawa et al. 2009; Hirche et al. 2010), wobei hierfür spezielle Detektionssysteme notwendig sind.

Mittels Photoakustik wäre es prinzipiell denkbar, bei oberflächlich gelegenen Lymphabflusswegen wie beim Mamma-Karzinom, Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs oder dem malignen Melanom präoperativ die SLN zu bestimmen und diese zu markieren, so dass intraoperativ ein schnelleres Vorgehen möglich wäre. Dies wurde präklinisch bereits getestet (Kim, C. et al. 2010b; Koo et al. 2012).

Die photoakustische Bildgebung könnte langfristig in das standardmäßig erfolgende sonographische *Staging* der Lymphknotenstationen präoperativ integriert werden. Eine klinische Translation würde aufwändigere zusätzliche Apparaturen und Prozeduren im Operationssaal, wie für die Fluoreszenzbildgebung (Verdunklung, Fluoreszenzkameras) und radioaktive Marker (Arbeit nach Strahlenschutzverordnung, Notwendigkeit einer Gammakamera), überflüssig machen.

Für eine breite Anwendung der Photoakustik wären jedoch Entwicklungen wünschenswert, die die Eindringtiefe weiter verbessern. Zwar können mit der richtigen Technik Signale aus mehreren Zentimetern Tiefe detektiert werden (Yao & Wang 2011), für die abdominale Bildgebung im Menschen ist dies jedoch weiterhin nicht ausreichend. Von Geräteseite wäre hierfür eine höhere Sensitivität der Ultraschallköpfe zur Detektion der geringen Signale hilfreich. Auch über die verwendeten Laserwellenlängen und Schallfrequenzen kann die Eindringtiefe verbessert werden, wobei ein Kompromiss zwischen Eindringtiefe und Auflösung gefunden werden muss.

Sollten alle diese Ansätze nicht zu einer signifikanten Steigerung der Eindringtiefe führen und die Photoakustik auf relativ oberflächliche Strukturen beschränkt bleiben, so kann sie für tiefer gelegene Organe zumindest in der Kleintierbildgebung als vielseitige und schnelle Methode verwendet werden, um in Echtzeit funktionelle und morphologische Informationen in der Grundlagen- und der anwendungsnahen Forschung zu erhalten.

Optimierung der Energiekorrektur als Voraussetzung für Signalstabilität

Unabhängig von der avisierten Anwendung wird als Grundvoraussetzung für valide Daten eine stabile Laserleistung benötigt. Eine Abweichung der Photoakustik-Signale *in vitro* von > 5 % wurden in der vorliegenden Arbeit als nicht akzeptabel definiert, da vor allem *in vivo* keine aussagekräftigen Studien möglich gewesen wären. Dies gilt insbesondere für vergleichende Studien, da die Signalintensität mit der eingestrahlten Laserenergie korreliert (Yao & Wang 2011). Aus diesem Grund konzentriert sich der erste Teil der vorliegenden Arbeit auf die Energievariabilitäten des zur Verfügung stehenden Photoakustik-Systems (Vevo LAZR, VisualSonics Inc., Toronto, Kanada). Hierbei zeigte sich, dass die erste System-Generation zwar eine

relativ geringe Puls-zu-Puls-Variabilität aufwies, die Signalintensität jedoch vor allem am kurzwelligen Rand des Spektrums (Wellenlängen 680 nm und 690 nm) in den ersten 10 Sekunden um mehr als 5 % schwankte. Dieser Effekt verstärkte sich, wenn der Laser nicht vor jeder neuen Messung erneut aufgewärmt wurde, wobei die Zeit zwischen den Messungen mit einer Pause von 3 min jeweils vergleichsweise kurz gewählt wurde, um einen Probenwechsel zu simulieren. Zudem zeigte sich ein kontinuierlicher Signalanstieg über die Zeit. Auf Basis dieser Daten wurde die Energiekorrektur des Lasers durch die Herstellerfirma optimiert. Die zweite Gerätegeneration zeigte zwar stärkere Puls-zu-Puls-Variabilitäten, jedoch stiegen diese nur bei der kürzestmöglichen Wellenlänge, 680 nm, kurzzeitig über den Grenzwert von 5 %. Außerdem ließ sich der vorher beobachtete Signalanstieg über die Zeit nicht mehr nachweisen.

Hieraus wurden unterschiedliche Konsequenzen gezogen: Auf unserer Seite wurden für die folgenden Messungen die Werte bei 680 nm und 690 nm aus der Analyse ausgeschlossen, da eine gewisse Instabilität eines Lasers in den Randbereichen seines Spektrums nicht ungewöhnlich ist, während die Signalschwankungen der Wellenlängen 700 nm und 710 nm mit maximal 3 % tolerabel erschienen. Auf Herstellerseite wurde die interne Energiekorrektur des Gerätes durch zusätzliche Energiemessgeräte vor Einkoppeln des Laserlichts in die Glasfasern zum Schallkopf weiter optimiert. Ein Gerät der dritten Generation stand vor Abschluss dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung, ist mittlerweile jedoch in Kiel einsatzbereit. Zusätzlich zur optimierten internen Energiekorrektur wird mittlerweile zusätzlich am Beginn jedes Messtages eine externe Kalibrierung durchgeführt. Hierzu wird mittels eines externen Messgerätes die Energie detektiert, die die einzelnen Laserwellenlängen nach Austritt aus dem Schallkopf aufweisen. Dies ist hilfreich, da auf dem Weg vom Laser zum Schallkopf beim Einkoppeln in die Glasfasern und wieder beim Auskoppeln am Schallkopf Energie durch Reflexion verloren geht (Schinzel 2002). Dieser Vorgang ist je nach Beschaffenheit der Verbindungen und des wellenlängenabhängigen Brechungsindex bei einigen Wellenlängen stärker ausgeprägt als in anderen (Bäuerle 2012). Durch Abgleich der intern und extern gemessenen Energiewerte kann dieser Effekt ausgeglichen werden, so dass die Energiekorrektur insgesamt verbessert wird. Damit wurden die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten direkt zum Anstoß für eine Verbesserung des bestehenden Systems verwendet.

Entwicklung eines 3D-Phantoms zur Kontrastmittelcharakterisierung

Um die Photoakustik sinnvoll sowohl präklinisch als auch mittelfristig klinisch einsetzen zu können, ist ebenfalls die Entwicklung und Charakterisierung signalstarker Kontrastmittel notwendig. Hierzu ist es vorteilhaft, potentielle Kontrastmittel vorab *in vitro* zu testen, um den Tierverbrauch gering zu halten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher das bereits verfügbare 2D-Phantom für die photoakustische Kontrastmittelcharakterisierung erweitert, so dass nun die optische Streuung im Gewebe nachgeahmt und Messungen in unterschiedlichen Tiefen durchgeführt werden können. Die wichtigsten Eigenschaften dieses Phantoms sind sein geringes Hintergrundsignal, die konstante Ausrichtung der Messvorrichtung in Bezug auf den Schallkopf, seine robuste und reproduzierbare Herstellung und die geringen Kontrastmittelmengen, die für die Messungen benötigt werden.

Voraussetzung für die Entwicklung eines robusten *In-vitro*-Systems für reproduzierbare Messungen ist eine hohe Widerstandsfähigkeit des verwendeten Materials. Außerdem sollte es gut zu bearbeiten sein, um das System mit größtmöglicher Präzision zu konstruieren. Nur so können Messungen in konstanter Tiefe und Stellung zum Schallkopf durchgeführt werden. Für die Herstellung eines wiederverwendbaren Phantomgerüsts wurde daher ein Halter aus Plexiglas gebaut. Plexiglas ist ein hitzebeständiges, robustes Material, welches schon in älteren Photoakustik-Studien für Gewebephantome verwendet wurde (Kaiser 2011; Bohndiek et al. 2013). Als Kontrastmittel-Reservoir dienten Tygon[®]-Schläuche (Saint Gobain SA, La Défence, Courbevoie, Frankreich). Diese eignen sich, wenn geringe Volumina pro Messung benötigt werden und sind bereits erfolgreich in photoakustischen Studien zum Einsatz gekommen (Yang et al. 2007; Ashkenazi 2014). Tygon[®]-Schläuche sind durchsichtig, hitzestabil bis 74 °C und widerstandsfähig gegen die meisten Chemikalien. Durch diese Materialien wies der Halter eine hohe Widerstandsfähigkeit und gute Reinigbarkeit auf und war somit für Hochdurchsatzmessungen *in vitro* geeignet.

Um die Gewebestreuung zu simulieren, wurden analog zu publizierten Studien Agarose und eine Fettemulsion (Clinoleic[®]) verwendet (Cook et al. 2011; Shahzad et al. 2008; Siddiqi 2009; Xiang et al. 2009). Die Agarose wirkte als festigende Komponente und verlieh dem Phantom seine mechanische Stabilität (Siddiqi 2009). Durch das verwendete Clinoleic[®] erzeugte das Phantom eine gewebeähnliche

Streuung des Laserlichts (Siddiqi 2009). Um Ungenauigkeiten durch unterschiedliche Mengen Agarmasse über den Schläuchen möglichst gering zu halten, wurden diverse Halter hergestellt und vermessen, bis eine Lagegenauigkeit der Schlauchposition von $\pm 0,02$ mm bei einem Schlauchabstand von 2 mm erreicht wurde. Diese wurde als tolerabel angesehen. Zudem wurde überschüssige Agarmasse nach Herstellung und Abkühlphase mittels Skalpell sorgfältig entlang der Halteroberkante abgetragen, um die Dicke der Agarschicht über den Schläuchen möglichst konstant zu halten.

Die in den meisten Studien zusätzlich verwendete Tinte (Cook et al. 2011; Shahzad et al. 2008; Siddiqi 2009) weist eine signifikante Absorption nur bei Wellenlängen unter 700 nm auf. Da sich die Messungen in der vorliegenden Arbeit auf die Wellenlängen von 700-970 nm beschränkten, wurde auf die Tinte verzichtet, insbesondere da sich die Absorption - im Gegensatz zur Streuung - weniger signifikant auf die Abschwächung des optischen Signals auswirkt (Cook et al. 2011). Im Gewebe absorbiert hauptsächlich Hämoglobin NIR-Licht. Im Bereich von 700-900 nm erreicht seine Absorption zwar ihr Minimum (Ku & Wang 2005; Mallidi et al. 2011), ist jedoch trotzdem noch so stark ausgeprägt, dass sie zur Messung der Sauerstoffsättigung im Gewebe und zur Detektion von Blutgefäßen durch Bestimmung des Gesamthämoglobins herangezogen werden kann. Aufgrund der fehlenden optischen Absorption des Phantoms in diesem Wellenlängenbereich muss *in vivo* im Vergleich zu den Phantommessungen mit einem höheren Hintergrundsignal gerechnet werden, das zudem inhomogen im Gewebe verteilt ist. Da die Phantommessungen Hinweise auf die maximal mögliche Signalintensität einzelner Kontrastmittel geben sollten, wurde dies in Kauf genommen.

Sowohl innerhalb eines Phantoms als auch im Vergleich zwischen zwei separat auf dieselbe Art und Weise an unterschiedlichen Tagen hergestellten Phantomen überlagerten sich die gemessenen MB-Spektren nahezu perfekt (Abbildung 11). Dies spricht dafür, dass das Phantom prinzipiell reproduzierbare Daten liefert und damit für standardisierte Messungen geeignet ist.

Photoakustische Eigenschaften von ICG und MB

Beim Vergleich der beiden verfügbaren Schallköpfe, LZ-250 (20 MHz) und LZ-550 (40 MHz), zeigte sich, dass der höherfrequente Schallkopf unter gleichen

Messbedingungen nur ein Viertel bis ein Fünftel der Signalintensität lieferte, verglichen mit dem niederfrequenten Schallkopf. So war die Eindringtiefe des LZ-550 selbst unter optimalen Phantombedingungen auf 6 mm begrenzt. Damit erscheint dieser Schallkopf für eine Anwendung *in vivo* nicht sensitiv genug, was insbesondere aufgrund seiner besseren Auflösung verglichen mit dem LZ-250 unbefriedigend ist.

Von beiden getesteten Kontrastmitteln weist ICG grundsätzlich signifikant höhere Signalintensitäten als MB auf. Damit erscheint ICG bezüglich der reinen Signalintensität für eine *In-vivo*-Anwendung besser geeignet als MB.

Sowohl ICG als auch MB zeigen einen logarithmischen Signalabfall mit zunehmender Tiefe. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen anderer Studien, in denen ebenfalls von einer nichtlinearen Korrelation zwischen Signalintensität und Objektiefe berichtet wird (Ku & Wang 2005; Razansky et al. 2009; Bohndiek et al. 2013). Die Verminderung der Signalintensität in der Tiefe ist dabei am ehesten durch die nichtlineare Lichtschwächung durch Absorption und Streuung und die resultierende Schallschwächung bedingt (Razansky et al. 2009; Ntziachristos 2010; Mehrmohammadi et al. 2013).

Bei der Beurteilung der MB-Spektren ist relevant, dass durch die hier verwendeten Wellenlängen (700 – 970 nm) das Absorptionsmaximum von MB nicht erfasst wird. So zeigten Ghanadzadeh et al. (2008), dass das Absorptionsspektrum von MB in wässriger Lösung ein Wellenlängenmaximum bei 665 nm und eine Schulter bei 608 nm aufwies, wobei sich die Signalintensitäten bei 608 nm und 665 nm konzentrationsabhängig relativ zueinander veränderten. Es wurde spekuliert, dass dies mit einer zunehmenden Aggregation von MB-Molekülen bei steigender Konzentration zusammenhängen könnte (Patil et al. 2000). Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Wellenlängen > 700 nm führte eine solche mögliche Aggregatbildung nicht zu einer Formänderung der photoakustischen Spektren im untersuchten Wellenlängenbereich.

Nach Albuminzugabe fand sich in Bezug auf MB verglichen mit den Messungen ohne Albumin die gleiche Form des Photoakustikspektrums bei insgesamt niedrigerer Signalintensität. Die Interaktion zwischen MB und humanem Serumalbumin ist auf elektrostatische Kräfte zurückzuführen (Hu et al. 2006). Song et al. konnten zeigen, dass sich im ultravioletten Spektrum die Signalintensität der Absorption von MB mit

Zunahme der Albuminkonzentration signifikant erhöhte, passend zu einer Komplexbildung (Song, S. et al. 2009). Da in dieser Studie keine Messungen im Bereich des ultravioletten Spektrums durchgeführt wurden, ist ein Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen nicht möglich. Dennoch könnte die von Song et al. beschriebene Erhöhung der Absorption im ultravioletten Wellenlängenbereich aufgrund der Komplexbildung zwischen Albumin und MB eine reduzierte Absorption im Spektrum > 700 nm bedingen mit konsekutiv verminderten Photoakustiksignalen.

Im Gegensatz zu MB zeigt das photoakustische Spektrum von ICG ohne Zugabe von Albumin konzentrationsabhängige Unterschiede im verwendeten Wellenlängenbereich. Prinzipiell fanden sich Peaks bei 700 nm und bei 770 nm sowie eine Schulter bei 830 nm. Neben einer Steigerung des Gesamtsignals mit steigender Konzentration änderten insbesondere die beiden Peaks bei 700 nm und 770 nm ihre relativen Signalintensitäten mit einer Zunahme des zweiten Peaks in Relation zum ersten bei einer Konzentrationssteigerung von 0,5 mg/ml auf 5 mg/ml (Abbildung 13 E,F). Die Erklärung für die konzentrationsabhängige Änderung des photoakustischen Spektrums in unserer Untersuchung könnte in der Aggregation von ICG bei höheren Konzentrationen liegen. So sind bei niedrigeren Konzentrationen (0,005 mg/ml) vorrangig Monomere vorhanden, bei hohen Konzentrationen (0,5-1 mg/ml) jedoch treten durch Aggregatbildung mehr Oligomere auf. Bereits von Baker (1966) wurde bei einer Konzentrationssteigerung von ICG eine Veränderung des optisch bestimmten Absorptionsspektrums durch verstärkte Aggregatbildung beschrieben. Landsman et al. (1976) fanden ebenfalls eine Abhängigkeit des ICG-Absorptionsspektrums von der Kontrastmittelkonzentration, welche später unter anderem von Urbanska (2001) bestätigt wurde.

Für die Durchführung von photoakustischen Studien unter Verwendung von ICG ergeben sich hierdurch mögliche Schwierigkeiten, die bei der Planung berücksichtigt werden müssen. So erscheint das übliche Verfahren problematisch, Messwerte nur bei einigen wenigen, definierten Wellenlängen aufzunehmen. Dieses beruht auf der Annahme, dass es eine feste, im Idealfall lineare Beziehung gibt zwischen Signalintensität und Kontrastmittelkonzentration, so dass von einem Parameter auf den anderen geschlossen werden kann. Es gilt, dass von jedem Kontrastmittelmolekül ein Signal bestimmter Amplitude erzeugt wird, deren Summe

dann das detektierte Signal ergibt. Ändert sich jedoch das von jedem einzelnen Kontrastmittelmolekül erzeugte Signal zum Beispiel durch Aggregatbildung bei höheren Konzentrationen, ändert sich auch die zugrundeliegende Korrelation zwischen Signalintensität und Kontrastmittelkonzentration. Ohne Kenntnis des Zustands der einzelnen Kontrastmittelmoleküle kann damit nicht mehr einfach von einer bestimmten Signalintensität auf eine bestimmte Konzentration geschlossen werden. Dies ist insbesondere für die *In-vivo*-Bildgebung ein Problem, bei der ja gerade aus der Signalintensität die Anreicherung von Kontrastmitteln bestimmt werden soll, um Rückschlüsse auf bestimmte Krankheitsvorgänge ziehen zu können. Wird die sich konzentrationsabhängig ändernde Referenz nicht beachtet, können Konzentrationsunterschiede verzerrt werden, so dass untersuchte Effekte über- oder unterschätzt werden. Im Extremfall kann dies zu einer Missinterpretation der zugrundeliegenden biologischen Prozesse führen.

Einen Ausweg könnte hier die spektrale Bildanalyse bieten, da ein vollständiges Spektrum deutlich mehr Informationen beinhaltet als die Signalstärke bei einigen wenigen Wellenlängen. Insbesondere wenn vor Injektion des Kontrastmittels ein photoakustisches Spektrum des nativen Gewebes aufgenommen wird und die Spektren der Kontrastmittel und ihrer Kontrollen *in vitro* bekannt sind, lassen sich die gewonnenen Messwerte durch Vergleich der jeweiligen Kurven sicherer einordnen. So lassen sich z.B. Rot- oder Blauverschiebungen der Spektren genauso detektieren wie das Neuauftreten oder Verschwinden von Peaks oder Schultern. Auch ist die Analyse und der Vergleich von verschiedenen Wellenlängenbereichen über die AUC möglich. Nicht zuletzt lassen sich aus den Spektren geeignete Wellenlängen extrahieren, auf die die Messungen in Folgeversuchen ggf. beschränkt werden können. Es ist natürlich zu beachten, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Unterschiede in der ICG-Konzentration sehr groß sind und in dieser Extremform *in vivo* nicht auftreten werden. Es kann daher sein, dass der Konzentrationsbereich, der *in vivo* relevant ist, so schmal ist, dass das photoakustische Spektrum von ICG für diesen Bereich näherungsweise als konstant angesehen werden kann. Bis dies jedoch für ein gewähltes experimentelles System, bestehend aus Tiermodell und verwendeten Kontrastmitteln, gezeigt ist, sollte der spektralen Bildaufnahme und -analyse trotz der längeren Messzeit der Vorzug gegeben werden.

Durch Zugabe von Albumin verändert sich das Spektrum von ICG ebenfalls mit nun etwa gleich hohen Peaks bei 700 nm, 770 nm und 830 nm. Diese Spektralform bleibt in Anwesenheit von Albumin auch bei einer Veränderung der ICG-Konzentration konstant. Dieser könnte auf einer nicht-kovalenten Bindung zwischen ICG und Albumin beruhen (Moody et al. 1999). Da ICG amphiphil ist, kann es sowohl mit lipophilen als auch mit hydrophilen Molekülen interagieren. Im Fall von Albumin bindet es an dessen hydrophoben Kern (Zhou et al. 1994). Da die Bindung an Plasmaproteine mit der Aggregation der ICG-Moleküle konkurriert, stehen weniger ICG-Moleküle für eine Aggregatbildung zur Verfügung. Wie beschrieben, beeinflusst das Ausmaß der Aggregatbildung die Form des optisch bestimmten Absorptionsspektrums (Landsman et al. 1976; Desmettre et al. 2000). Es liegt nahe zu spekulieren, dass auch die Veränderung der photoakustischen Spektren auf diesem Prozess beruht. Auch hier erscheint damit die spektrale Bildaufnahme und -analyse sinnvoll im Vergleich zur Messung einzelner Wellenlängen, um möglichst viele Informationen zur Beurteilung der Messwerte zu erhalten.

Photoakustische Eigenschaften von ICG-PCL und ICG-TSL

Bedingt durch den Herstellungsprozess von ICG-beladenen Liposomen kommt es zu einer Verdünnung des ICG. Aufgrund der oben beschriebenen Problematik ist ein einfacher Vergleich der Signalintensität mit einer Konzentrationseichkurve nicht möglich. Die Signalintensität der wie unter 2.2.7 beschrieben hergestellten ICG-PCL entspricht jedoch in etwa der Signalintensität von freiem ICG bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml. Beispielsweise konnten Toyota et al. (2014) zeigen, dass ICG-Liposomen fluorezenzoptisch eine nur leicht verminderte Signalintensität aufwiesen verglichen mit freiem ICG. Die Kurvenform der Fluoreszenzspektren von freiem und liposomalem ICG ähnelt sich stark. Dies beschreibt auch die Arbeit von Proulx et al. (2010), die eine Zunahme der fluorezenzoptischen Signalintensität bei gleichbleibender Kurvenform durch Einschluss von ICG in Liposomen beschreiben. In der vorliegenden Arbeit ähnelt die Form des ICG-PCL-Spektrums jedoch eher der des Spektrums von ICG in Anwesenheit von Albumin als reinem ICG. Hierbei muss beachtet werden, dass Fluoreszenz- und Photoakustikspektren auf unterschiedlichen Entstehungsmechanismen beruhen: Während bei der Fluoreszenz Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbiert und in Licht längerer Wellenlänge umgewandelt wird, wird bei der Photoakustik Licht in Wärme und damit letztlich in Ultraschall transformiert. Ausgangspunkt für beide Vorgänge ist die Absorption von Licht einer

bestimmten Wellenlänge durch geeignete Moleküle. Mit welcher Effizienz dieses Licht jedoch in längerwelliges Licht und/oder in Wärme umgewandelt wird, gehört zu den grundlegenden Eigenschaften dieses Moleküls. Damit können zwar prinzipiell gewisse Informationen aus dem Vergleich von photoakustischen Daten mit Absorptions- und Fluoreszenzspektren gewonnen werden, eine direkte Übertragung erscheint jedoch nicht zulässig.

Darüberhinaus wurden die Liposomen in der beschriebenen Literatur mit Komponenten hergestellt, die nicht mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lipiden übereinstimmen. Die ungleiche Zusammensetzung der Liposomen kann einen Einfluss auf das photoakustische Spektrum haben. Dies zeigt sich beim Vergleich der ICG-PCL mit den ICG-TSL. Letztere weisen eine Rotverschiebung des Spektrums auf, die erstere in dieser Form nicht zeigen. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen von Proulx et al. (2010) sowie Toyota et al. (2014). Die Einkapselung von ICG in Liposomen führte auch hier zu einer Verschiebung der optischen Absorptionsmaxima in den höheren Wellenlängenbereich. Zudem weisen die von uns hergestellten ICG-TSL im Vergleich zu den ICG-PCL eine höhere Signalintensität auf, die eher im Bereich der Signalintensitäten von freiem ICG mit einer Konzentration von 5 mg/ml liegt, wobei die Kurvenform auch der ICG-TSL-Spektren eher der des Spektrums von ICG in Anwesenheit von Albumin als derjenigen von reinem ICG entspricht.

Werden die ICG-TSL erwärmt, erhöht sich die Signalintensität im kürzerwelligen Abschnitt des Spektrums mit einer signifikanten Steigerung der AUC im Bereich 740 – 790 nm im Vergleich zu ICG-TSL bei Raumtemperatur. Im Spektralbereich 790 – 840 nm finden sich keine signifikanten Veränderungen der AUC. Da auch freies ICG hohe Signalintensitäten im Bereich 740 – 790 nm und vergleichsweise geringe Signalintensitäten im Bereich 790 – 840 nm aufweist, könnte spekuliert werden, dass die spektralen Veränderungen der ICG-TSL nach Erwärmung auf eine Wärmeinduzierte Freisetzung von ICG aus den ICG-TSL hindeuten. Dies wird gestützt durch die Tatsache, dass sich keine signifikante Signalerhöhung bei Erwärmung der nicht-thermosensitiven ICG-PCL findet.

Auch wenn die Robustheit einer Unterscheidung liposomalen und freien ICGs *in vivo* limitiert sein sollte, könnte dennoch ein Vergleich der kurzwelligeren Signalstärken

vor und nach Aktivierung der TSL eine Bestimmung der ICG-Freisetzung auch *in vivo* erlauben. Das Prinzip wäre folgendes: Die Akkumulation von ICG-TSL im Tumor erzeugt ein photoakustisches Signal bestimmter Intensität. Nach Erwärmung des Gewebes auf ca. 42 °C und konsekutiver Freisetzung von ICG aus den Liposomen ist mit einem Anstieg dieses Signals zu rechnen, da freies ICG bei Wellenlängen < 790 nm ein höheres Photoakustiksignal erzeugt als liposomales ICG bei gleicher Konzentration (s.o.). Freies ICG aggregiert und degradiert schnell in wässriger Lösung, wodurch die Signalintensität wieder abnimmt (Kim, T. H. et al. 2010), vermutlich sogar unter den Ausgangswert, da ein Teil der ICG-TSL durch die Erwärmung zerstört wurde. Weisen die ICG-TSL eine ausreichend lange Zirkulationszeit auf, könnte eine erneute Akkumulation stattfinden, was sich durch ein erneutes Ansteigen des Signals kenntlich machen würde, so dass der Aktivierungsschritt wiederholt werden könnte.

Hierbei weist die Photoakustik deutliche Vorteile gegenüber bereits etablierten Bildgebungsverfahren auf. So führt die Freisetzung von Gadolinium-Chelaten aus Liposomen zwar zu einer mittels MRT detektierbaren Relaxivitätsänderung. Allerdings werden große Kontrastmittelmengen benötigt, um messbare Veränderungen zu erzeugen (Liu & Frank 2009). Außerdem diffundiert das freigesetzte Kontrastmittel relativ langsam aus den Tumoren. Häufig sind 24 h nach Aktivierung noch Signaländerungen vorhanden (Schwendener 1994; Wen et al. 2004). Insofern ist es schwierig, mit dieser Methode eine erneute Akkumulation lang zirkulierender Liposomen zu visualisieren.

Eine Alternative sind optische Methoden. Allerdings ist die räumliche Auflösung optischer Verfahren *in vivo* sehr gering und somit oftmals unzureichend. Ein limitierender Faktor ist zudem die Lage des Tumors, weil durch Absorption und Streuung die maximal mögliche Eindringtiefe des Lichts limitiert wird (Kim, C. et al. 2010a). Außerdem werden intraabdominelle Tumore in der Maus häufig durch das Signal aus Leber und Nieren überstrahlt, die maßgeblich für die Elimination optischer Kontrastmittel verantwortlich zeichnen (Longmire et al. 2008).

Nuklearmedizinische Methoden wiederum sind zwar extrem sensitiv, was die Detektion radioaktiv markierter Liposomen in Tumoren angeht. Allerdings ist die Unterscheidung in der Regel schwer zu treffen, ob sich der radioaktiv markierte

Wirkstoff innerhalb oder außerhalb der Liposomen befindet bzw. ob die radioaktiv markierten Lipide noch Bestandteil intakter Liposomen sind (Tashjian et al. 2008). Insofern wurde die Aktivierungseffizienz bisher häufig nachträglich indirekt über die therapeutische Wirksamkeit bzw. den histologischen Nachweis gleichzeitig freigesetzter Marker bestimmt.

Somit hat die Photoakustik das Potential, mit guter Auflösung die Anflutung, Aktivierung und erneute Anflutung der TSL darzustellen, was mittels MRT, nuklearmedizinischen Methoden und optischer Bildgebung in dieser Form nicht möglich ist. Dies ist insbesondere interessant, da sich bei der konkreten Durchführung von Therapiestudien mit aktivierbaren Liposomen zwei Hauptprobleme ergeben: Zum einen stellt sich die Frage nach dem richtigen Zeitpunkt für die initiale Aktivierung der TSL und nach dem Intervall für eine eventuelle erneute Aktivierung. Zum anderen ist die nichtinvasive Bestimmung der Aktivierungseffizienz schwierig. Beides könnte sich mittels Photoakustik klären und zumindest in präklinischen Studien, langfristig ggf. auch klinisch, nutzen lassen.

Spectral Unmixing in der Photoakustik

Diese Veränderungen des photoakustischen Spektrums der ICG-TSL eröffnen neue Möglichkeiten für die Detektion der Liposomen *in vivo* und die Visualisierung der Freisetzung von ICG. So können aus der Fluoreszenzbildgebung sog. *Spectral-Unmixing*-Algorithmen adaptiert werden (Mayes et al. 2008). Hierzu müssen die Fluoreszenz-Spektren der verwendeten Fluorophore und der Autofluoreszenz des Gewebes bekannt sein. Mittels Fourier-Transformation kann dann Pixel für Pixel die relative Intensität der einzelnen Fluorophore und der Autofluoreszenz aus dem Gesamtspektrum separiert und als Falschfarbenbild dargestellt werden (Zimmermann 2005; Zimmermann et al. 2014). Dies erlaubt die genauere Detektion und Unterscheidung von Fluorophoren in histologischen Proben, jedoch auch in der Kleintierbildgebung (Mansfield et al. 2005). Diese Verfahren können auf die photoakustische Spektroskopie übertragen werden (Herzog et al. 2012), was im Rahmen einer Kooperation mit der Firma VisualSonics Inc. mittlerweile geschehen ist. Da es sich um einen *Post-Processing*-Algorithmus handelt, wird die Bildaufnahme nicht verzögert. Mittlerweile steht dieses *Tool* in Kiel nicht nur für Messungen in 2D zur Verfügung, sondern auch für 3D-Datensätze. Dies ist insbesondere für die onkologische Bildgebung von Interesse, da Tumore bekanntermaßen heterogen

zusammengesetzt sind (Heppner & Miller 1983; Marusyk & Polyak 2010).

Durch *Spectral Unmixing* lässt sich nicht nur das relativ hohe Hintergrundsignal durch das Hämoglobin reduzieren, sondern theoretisch auch die Detektion von Photoakustik-Kontrastmitteln *in vivo* verbessern. Darüber hinaus können pathologische Gewebeveränderungen zu Änderungen der photoakustischen Spektren führen, so dass die photoakustische Spektroskopie bereits zur Detektion von Prostatakarzinomen in einem Mausmodell eingesetzt wurde (Patterson et al. 2014). Mittels photoakustischer Spektroskopie konnten Wilson et al. sogar Unterschiede in der Sauerstoffsättigung, dem Gesamthämoglobin und dem Fettgehalt von normalem und hyperplastischem Brustdrüsengewebe, duktalem Carcinoma in situ und invasiven Mammakarzinomen in einem transgenen Mausmodell detektieren (Wilson et al. 2014).

Zusammenfassung und Ausblick

Insgesamt konnte das vorhandene *In-vitro*-System zur Charakterisierung von photoakustischen Kontrastmitteln im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiterentwickelt werden, so dass nun die optische Streuung im Gewebe nachgeahmt und Messungen in unterschiedlichen Tiefen durchgeführt werden können. Damit ist eine ausreichende Charakterisierung potentieller photoakustischer Kontrastmittel *in vitro* möglich, um geeignete Kandidaten für eine *In-vivo*-Anwendung zu identifizieren und den Einfluss von veränderten Umgebungsvariablen, wie z.B. die Zugabe von Albumin, auf die photoakustischen Charakteristika zu untersuchen. Dies wurde am Beispiel von ICG und MB gezeigt. Die hierbei festgestellte Konzentrationsabhängigkeit der photoakustischen ICG-Spektren impliziert die Notwendigkeit der spektralen Bildaufnahme und -analyse zumindest solange, bis das jeweilige verwendete experimentelle System (Tiermodell + Kontrastmittel) gut genug charakterisiert ist, um Verzerrungen der Ergebnisse bei der Messung einzelner Wellenlängen ausschließen zu können.

Darüber hinaus deuten die hier erhobenen *In-vitro*-Daten darauf hin, dass sich die Freisetzung von ICG aus ICG-TSL photoakustisch darstellen lässt. Dies könnte für die Planung und Durchführung von Therapiestudien mit aktivierbaren Liposomen entscheidende Vorteile bieten, weil nicht nur der optimale Zeitpunkt für eine Aktivierung detektiert werden könnte, sondern ggf. auch als Surrogatmarker für das

Ausmaß der Wirkstofffreisetzung dienen könnte.

Für eine klinische Translation bieten sich aufgrund der noch limitierten Eindringtiefe derzeit vor allem oberflächliche Prozesse an, wie die Beurteilung einer rheumatoiden Arthritis, die SLNB oder die Beurteilung oberflächlicher Tumore wie Plattenepithelkarzinome im HNO-Bereich. Bei der weiteren Methodenentwicklung sollte vor allem eine Verbesserung der Signalintensität in der Tiefe des Gewebes im Fokus stehen.

Als besonders spannendes Feld könnte sich die photoakustische Spektroskopie herausstellen. Diese könnte nicht nur die spektrale Trennung des hauptsächlich durch Hämoglobin verursachten Hintergrundsignals und der spezifischen Photoakustiksignale extrinsischer Kontrastmittel ermöglichen. Vielmehr könnten auch pathologische Veränderungen der Gewebeeigenschaften zu einer Änderung der Photoakustik-Spektren führen, wobei eine Anwendung aufgrund der limitierten Eindringtiefe zum Teil auf die Präklinik beschränkt bleiben wird. Jedoch könnten ggf. weitere Informationen im Rahmen des Therapiemonitorings z.B. bei der Leberzirrhose oder beim Vergleich gesunden Pankreasgewebes zu Pankreaskarzinomen erhalten werden. Dies soll ebenfalls in weiterführenden Studien untersucht werden.

Insgesamt hat die vorliegende Arbeit damit maßgebliche Impulse für die Planung und Durchführung zukünftiger photoakustischer Studien gesetzt und Grundlagen geschaffen für die Entwicklung weiterer, signalstarker Photoakustik-Kontrastmittel und die Darstellung aktivierbarer therapeutischer Trägersysteme.

5 Zusammenfassung

Seit kurzem ist eine neue experimentelle Modalität für die *In-vivo*-Bildgebung verfügbar: die Photoakustik. Bei dieser handelt es sich um eine Kombination aus optischer und Ultraschallbildgebung, mittels derer geeignete Kontrastmittel hochaufgelöst in Echtzeit detektiert werden können. Eine standardisierte Charakterisierung verschiedener photoakustischer Kontrastmittel und die Bestimmung der Sensitivität der verwendeten Geräte stellt die Grundlage für die valide Planung präklinischer Projekte mit dieser neuen Technik dar. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, inwiefern die photoakustischen Signaleigenschaften zweier Standardkontrastmittel, Indocyaningrün (ICG) und Methyleneblau (MB), von Konzentration, Eindringtiefe und Albumin beeinflusst werden. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein bereits vorhandenes Phantom weiterentwickelt, um optische Streuung im Gewebe zu simulieren und Messungen in unterschiedlichen Tiefen durchzuführen. Zudem wurde untersucht, inwiefern sich die Hitze-Aktivierung ICG-beladener thermosensitiver Liposomen (ICG-TSL) photoakustisch *in vitro* darstellen lässt.

Verwendet wurde ein hochauflösendes Kleintierultraschallgerät mit Photoakustikerweiterung (Vevo LAZR, VisualSonics Inc., Toronto, Kanada). Dieses erlaubt die Aufnahme photoakustischer Spektren im Wellenlängenbereich 680 – 970 nm. Um die photoakustischen Eigenschaften der Kontrastmittel in Abhängigkeit von den gewählten Untersuchungsbedingungen möglichst vollständig zu erfassen, wurden jeweils photoakustische Spektren im Wellenlängenbereich 700 – 970 nm aufgenommen. Für beide Kontrastmittel zeigte sich ein logarithmischer Abfall des photoakustischen Signals mit zunehmender Eindringtiefe. ICG und MB unterschieden sich in der Form ihrer photoakustischen Spektren, wobei ICG grundsätzlich höhere photoakustische Signalintensitäten als MB zeigte. MB wies im verwendeten Wellenlängenbereich ein konzentrationsunabhängiges Spektrum auf, das in seiner Form auch nicht durch die Zugabe von Albumin verändert wurde. Das Spektrum von ICG änderte sich in Abhängigkeit von der gewählten ICG-Konzentration sowie durch Zugabe von Albumin im untersuchten Wellenlängenbereich. Dies könnte durch eine Aggregatbildung der ICG-Moleküle sowie die Proteinbindung des ICG erklärt werden. Insbesondere im Hinblick auf einen Einsatz *in vivo* sind diese Ergebnisse essentiell. Wird das Photoakustiksignal

aus messökonomischen Gründen nur bei einzelnen Wellenlängen bestimmt, können die eigentlichen Konzentrationsunterschiede durch Änderungen im zugrundeliegenden Spektrum verzerrt werden, so dass beim Gruppenvergleich die untersuchten Effekte über- oder unterschätzt werden. Wie groß diese Verzerrung bei *in vivo* relevanten Konzentrationen ist, muss in weiteren Versuchen untersucht werden. Bis dahin erscheint eine spektrale Bildaufnahme und -analyse zumindest bei Verwendung von ICG obligat.

Die photoakustischen Spektren von liposomalem ICG ähnelten den Spektren von freiem ICG in Anwesenheit von Albumin, wobei die thermosensitiven Liposomen (ICG-TSL) höhere Signalintensitäten aufwiesen als die nicht-thermosensitiven Kontrollliposomen (ICG-PCL). Nach Erwärmung der ICG-TSL fand sich eine signifikante Erhöhung der Signalintensitäten im kürzerwelligen Anteil des Spektrums (< 800 nm), die bei Verwendung von ICG-PCL nicht nachweisbar war. Dies könnte auf eine Freisetzung von ICG aus den Liposomen hindeuten, das einen Signalpeak im kürzerwelligen Spektrum aufweist. Der längerwellige Anteil des Spektrums (> 800 nm) zeigte bei beiden Liposomentypen keine signifikanten Signalveränderungen durch Erwärmung.

Zusammengefasst ermöglichte das weiterentwickelte *In-vitro*-System Hochdurchsatzmessungen photoakustischer Kontrastmittel unter standardisierten Bedingungen. Als Konsequenz ergab sich für die geplanten weiteren Versuche insbesondere die Notwendigkeit der spektralen Bildanalyse, um valide Daten zu erhalten. Damit hat die vorliegende Arbeit einen signifikanten Einfluss auf alle folgenden Photoakustikstudien der Gruppe und ihrer Kooperationspartner. Zudem hat sie die Basis geschaffen für die weitere Entwicklung von Strategien zur photoakustischen Darstellung der gezielten Aktivierung thermosensitiver Liposomen als therapeutische Trägersysteme.

6 Anhang

Materialien

Geräte

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte

Kleintierultraschallgerät „Vevo 2100“ mit dem Zusatzgerät „Vevo LAZR“ für Photoakustische Messungen (VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Kanada)	
Schallkopf LZ-250 (20 MHz) Breitbandfrequenz: 13-24 MHz. Bildweite: 23 mm, Bildtiefe: 30 mm. Axiale Bildauflösung: 75 µm	VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Kanada
Schallkopf LZ-550: Breitbandfrequenz: 32-55 MHz. Bildweite: 14,1 mm, Bildtiefe: 15 mm. Axiale Bildauflösung: 44 µm	VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Kanada
Nd:YAG Laser (680-970 nm)	OPTOTEC Inc. Carlsbad, CA, USA

Laborwaage Typ 1212	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Eppendorf Pipetten (Größe 10-100 µl, 100-500 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Laborthermometer, 0 bis +250 °C, 35 cm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnetrührer IKA-Kombimag RCT	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Reagenzglasschüttler Reax Top, 0-2400 U/min	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Mikrowelle Superior Exclusiv	Handelsmarken GmbH, Offenburg, Deutschland

Arbeitsutensilien

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Arbeitsutensilien

Plexiglas®	Acryl-Design, Kiel, Deutschland
UHU® Alleskleber Super	UHU GmbH & Co. KG, Bühl, Deutschland
Tygon®-Schläuche R 3603	Norton, Saint-Gobain, Frankreich
Optosil® Comfort® Putty	Haraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland
Hamilton®-Spritze, 100 µl Fassungsvermögen	Hamilton Medical AG, Bonaduz, Schweiz
PD-10 Trennsäulen	GE Healthcare®, Buckinghamshire, UK
Parafilm®	Bemis Company Inc., Neenah, WI, Vereinigte Staaten
Filtersupports	Avanti® Polar Lipids, Alabama, USA
Nuclepore-Filter, Whatman®	GE Healthcare®, Buckinghamshire, UK
Bechergläser aus Duran® (Größen: 100 ml, 400 ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Messzylinder (Größe: 100 ml)	Schott AG, Mitterteich, Deutschland
Magnetrührstäbe	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Filterpapierscheiben 595 S&S ø 90 mm	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere® (Größen 2-100 µl, 1000 µl)	Starstedt AG & Co., Nuembrecht, Deutschland
Kanülen, BD Microlance™ 3 , 0,3 mm x 13 mm	BD, Drogheda, Irland
Spritzen, BD Discardit II, 5 ml und 10 ml	BD, Drogheda, Irland

Einfacher Schlauchhalter aus zwei verbundenen Plexiglasstangen mit jeweils fünf Bohrungen versehen (siehe Abbildung 18).

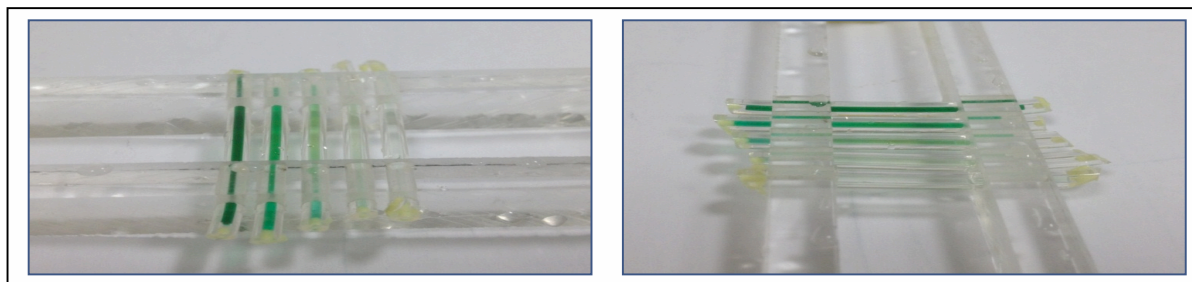


Abbildung 18: Einfacher Schlauchhalter mit fünf ICG-befüllten Tygon®-Schläuchen bestückt.

Chemikalien

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Human Albumin 200 g/l IMMUNO, Infusionslösung 50 ml	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
ClinOleic 20%	Baxter Healthcare, Wien, Österreich
Agarose: NEEO Ultra-Qualität, Roti®agarose für die DNA/RNA-Elektrophorese	Carl-Roth GmbH+CoKG, Karlsruhe, Deutschland, Charge: 492194681
Destilliertes Wasser: Ampuwa® Spüllösung 1000 ml Plastipur®, steril und endotoxinfrei	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Indocyaningrün (ICG): ICG-PULSION® 5 mg/ml, 25 g Indocyaningrün, Mononatriumsalz	PULSION Medical >Systems SE, München, Germany. Ch.-B.: 02DE250193511
Methylenblau: METHYLENBLAU (C.I. 52015), 5 mg/ml Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Doxorubicin: Doxo Cell	Cell Pharm GmbH, 61118 Bad Vilbel, Deutschland
Phosphatpuffersalzlösung, DPBS GIBCO®	Life Technologies TM, Carlsbad, Kalifornien
Lipide, die mit Chloroform angesetzt wurden:	
DSPC, 500 mg, 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-	Avanti® Polar Lipids Alabaster,

phosphocholin (25 mg/ml)	Alabama
DPPC, 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (25 mg/ml)	Avanti® Polar Lipids, Alabaster, Alabama
Cholesterol (50 mg/ml)	Avanti® Polar Lipids, Alabaster, Alabama

7 Literaturverzeichnis

- Agarwal, A., Kandpal, H., Gupta, H. P., Singh, N. B., Gupta, C. M. (1994): Tuftsin-bearing liposomes as rifampin vehicles in treatment of tuberculosis in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(3), 588–593
- Akers, W.J., Edwards, W. B., Kim, C., Xu, B., Erpelding, T. N., Wang, L. V., Achilefu, S. (2012): Multimodal sentinel lymph node mapping with single-photon emission computed tomography (SPECT)/computed tomography (CT) and photoacoustic tomography. *Transl Res*, 159(3), 175–181
- Atamna, H., Kumar, R. (2010): Protective role of methylene blue in alzheimer's disease via mitochondria and cytochrome c oxidase. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2, S439–S452
- Ashkenazi, S. (2014): Photoacoustic lifetime imaging of dissolved oxygen using methylene blue. *J Biomed Opt*, 15(4), 040501
- Baker, K. J. (1966): Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium and indocyanine green (ICG) by plasma alpha-1 lipoproteins. *Proc Soc Exp Biol Med*, 122(4), 957–963
- Bäuerle, D. (2012): *Laser: Grundlagen und Anwendungen in Photonik, Technik, Medizin und Kunst*, 1. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim
- Beziere, N., Lozano, N., Nunes, A., Salichs, J., Queiros, D., Kostarelos, K., Ntziachritos, V. (2015): Dynamic imaging of PEGylated indocyanine green (ICG) liposomes within the tumor microenvironment using multi-spectral optoacoustic tomography (MSOT). *Biomaterials*, 37, 415–424
- Bikram, M., West, J. L. (2008): Thermo-responsive systems for controlled drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 5(10), 1077–1091
- Bohndiek, S. E., Bodapati, D., Van De Sompel, D., Kothapalli, S.-R., Gambhir, S. S. (2013): Development and application of stable phantoms for the evaluation of photoacoustic imaging instruments. *PLoS One*, 8(9), e75533
- Cherrick, G. R., Stein, S. W., Leevy, C. M., Davidson, C. S. (1960): Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest*, 39, 592–600
- Cook, J. R., Bouchard, R. R., Emelianov, S. Y. (2011): Tissue-mimicking phantoms for photoacoustic and ultrasonic imaging. *Biomed Opt Express*, 2(11), 3193–3206
- Desmettre, T., Devoisselle, J. M., Mordon, S. (2000): Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography. *Surv Ophthalmol*, 45(1), 15-27
- Dormoi, J., Pradines, B. (2013): Dose responses of proveblue methylene blue in an experimental murine cerebral malaria model. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(8), 4080–4081
- Erpelding, T. N., Kim, C., Pramanik, M., Jankovic, L., Maslov, K., Guo, Z., Margenthaler, J. A., Pashley, M. D., Wang, L. V. (2010): Sentinel lymph nodes in the rat: noninvasive photoacoustic and US imaging with a clinical US system.

Radiology, 256(1), 102–110

- Van Es, P., Biswas, S. K., Bernelot Moens, H. J., Steenbergen, W., Manohar, S. (2014): Initial results of finger imaging using photoacoustic computed tomography. *J Biomed Opt*, 19(6), 060501
- Fanciullino R, Ciccolini J. (2009): Liposome-encapsulated anticancer drugs: still waiting for the magic bullet? *Curr Med Chem*, 16(33), 4361-4371
- Fang, J., Nakamura, H., Maeda, H. (2011): The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev*, 63(3), 136–151
- Fass, L. (2008): Imaging and cancer: a review. *Mol Oncol*, 2(2), 115–152
- Fattahi, H., Laurent, S., Liu, F., Arsalani, N., Vander Elst, L., Muller, R. N. (2011): Magnetoliposomes as multimodal contrast agents for molecular imaging and cancer nanotheragnostics. *Nanomedicine*, 6(3), 529-544
- Frangioni, J. V. (2008): New technologies for human cancer imaging. *J Clin Oncol*, 26(24), 4012–4021
- Freissmuth, M., Offermanns, S., Böhm, S. (2012): *Pharmakologie & Toxikologie*, Springer, Berlin, Heidelberg
- Gathje, J., Steuer, R. R., Nicholes, K. R. (1970): Stability studies on indocyanine green dye. *J Appl Physiol*, 29(2), 181-185
- Ghanadzadeh, A., Zeini, A., Kashef, A., Moghadam, M. (2008): Concentration effect on the absorption spectra of oxazine1 and methylene blue in aqueous and alcoholic solutions. *J of Mol Liq*, 138(1-3), 100–106
- Gurfinkel, M., Thompson, A. B., Ralston, W., Troy, T. L., Moore, A. L., Moore, T. A., Gust, J. D., Tatman, D., Reynolds, J. S., Muggenburg, B., Nikula, K., Pandey, R., Mayer, R., H., Hawrysz, D., J., Sevick-Muraca, E. M. (2000): Pharmacokinetics of ICG and HPPH-car for the detection of normal and tumor tissue using fluorescence, near-infrared reflectance imaging: a case study. *Photochem Photobiol*, 72(1), 94–102
- Heppner, G.H., Miller, B.E. (1983): Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metastasis Rev*, 2(1), 5–23
- Herzog, E., Taruttis, A., Beziere, N., Lutich, A. A., Razansky, D., Ntziachristos, V. (2012): Optical imaging of cancer heterogeneity with multispectral optoacoustic tomography. *Radiology*, 263(2), 461–468
- Hirche, C., Murawa, D., Mohr, Z., Knelf, S., Hünerbein, M. (2010): *ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy for axillary nodal staging in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 121(2), 373-378
- Hof, H. (2014): Grundlagen. Diagnostik. Mikrobiologische Diagnostik. Analytik. In: Hof, H., Dörries, R. (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie*, 5. Aufl., S. 34, Thieme, Stuttgart
- Hu, Y.-J., Liu, Y., Zhao, R. M., Dong, J. X., Qu, S. S. (2006): Spectroscopic studies on the interaction between methylene blue and bovine serum albumin. *J Photochem Photobiol A*, 179(3), 324–329
- Kaiser, W. (2011): *Kunststoffchemie für Ingenieure*. Carl Hanser Verlag GmbH & Co.

KG., München

- Kim, C., Favazza, C., Wang, L. V. (2010a): In vivo photoacoustic tomography of chemicals: high-resolution functional and molecular optical imaging at new depths. *Chem Rev*, 110(5), 2756–2782
- Kim, C., Song, K. H., Gao, F., Wang, L. V. (2010b): Sentinel lymph nodes and lymphatic vessels: noninvasive dual-modality in vivo mapping by using indocyanine green in rats - volumetric spectroscopic photoacoustic imaging and planar fluorescence imaging. *Radiology*, 255(2), 442–450
- Kim, T. H., Chen, Y., Mount, C. W., Gombotz, W. R., Li, X., Pun, S. H. (2010): Evaluation of temperature-sensitive, indocyanine green-encapsulating micelles for noninvasive near-infrared tumor imaging. *Pharm Res*, 27(9), 1900–1913
- Kong, G., Anyarambhatla, G., Petros, W. P., Braun, R. D., Colvin, O. M., Needham, D., Dewhirst, M. W. (2000): Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release. *Cancer Res*, 60(24), 6950–6957
- Koo, J., Jeon, M., Oh, Y., Kang, H. W., Kim, J., Kim, C., Oh, J. (2012): In vivo non-ionizing photoacoustic mapping of sentinel lymph nodes and bladders with ICG-enhanced carbon nanotubes. *Phy Med Biol*, 57(23), 7853–7862.
- Kraft, J., Ho, R. (2014): Interactions of indocyanine green and lipid in enhancing near-infrared fluorescence properties: the basis for near-infrared imaging in vivo. *Biochemistry*, 53(8), 1275–1283
- Ku, G., Wang, L. V. (2005): Deeply penetrating photoacoustic tomography in biological tissues enhanced with an optical contrast agent. *Opt Lett*, 30(5), 507–509
- de la Zerda, A., Zavaleta, C., Keren, S., Vaithlingam, S., Bodapati, S., Liu, Z., Levi, J., Smith, B. R., Ma, T.-J., Oralkan, O., Cheng, Z., Chen, X., Dai, H., Khuri-Yakub, B. T., Gambhir, S. S. (2008): Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice. *Nat Nanotechnol*, 3(9), 557–562
- Landsman, M. L., Kwant, G., Mook, G. A., Zijlstra, W. G. (1976): Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *J Appl Physiol*, 40(4), 575–583
- Li, L., Zhang H. F., Zemp R. J., Maslov K., Wang, L. (2008): Simultaneous imaging of a lacZ-marked tumor and microvasculature morphology in vivo by dual-wavelength photoacoustic microscopy. *J Innov Opt Health Sci*, 1(2), 207–215
- Liu, W., Frank, J. A. (2009): Detection and quantification of magnetically labeled cells by cellular MRI. *Eur J Radiol*, 70(2), 258–264
- Longmire, M., Choyke, P., Kobayashi, H. (2008): Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond)*, 3(5), 703–717
- Luetkemeier, M. J., Fattor, J. A. (2001): Measurement of indocyanine green dye is improved by use of polyethylene glycol to reduce plasma turbidity. *Clin Chem*, 47(10), 1843–1845
- Lutzweiler, C., Meier, R., Rummeny, E., Ntziachristos, V., Razansky, D. (2014): Real-

- time optoacoustic tomography of indocyanine green perfusion and oxygenation parameters in human finger vasculature. *Opt Lett*, 39(14), 4061–4064
- Mallidi, S., Luke, G. P., Emelianov, S. (2011): Photoacoustic imaging in cancer detection, diagnosis, and treatment guidance. *Trends Biotechnol*, 29(5), 213–221
- Mansfield, J. R., Gossage, K. W., Hoyt, C. C., Levenson, R. M. (2005): Autofluorescence removal, multiplexing, and automated analysis methods for in-vivo fluorescence imaging. *J Biomed Opt*, 10(4), 41207
- Marusyk, A., Polyak, K. (2010): Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*, 1805(1), 105–117
- Maruyama, K. (2011): Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv Drug Deliv Rev*, 63(3), 161–169
- Mayes, P., Dicker, D., Liu, Y., El-Deiry, W. (2008): Noninvasive vascular imaging in fluorescent tumors using multispectral unmixing. *Biotechniques*, 45(4), 459–460, 461–464
- Mehrmohammadi, M., Yoon, S. J., Yeager, D., Emelianov, S. Y. (2013): Photoacoustic Imaging for Cancer Detection and Staging. *Curr Mol Imaging*, 2(1), 89–105
- Meier, R., Thuermel, K., Noël, P. B., Moog, P., Sievert, M., Ahari, C., Nasirudin, R. A., Golovko, D., Haller, B., Ganter, C., Wildgruber, M., Schaeffeler, C., Waldt, S., Rummeny, E. J. (2014): Synovitis in patients with early inflammatory arthritis monitored with quantitative analysis of dynamic contrast-enhanced optical imaging and MR imaging. *Radiology*, 270(1), 176–185
- Mienkina, M. (2010): *Kodierte Anregung in der photoakustischen Bildgebung*. Med. Diss., Bochum
- Mohajerani, P., Meier, R., Noël, P. B., Rummeny, E. J., Ntziachristos, V. (2013): Spatiotemporal analysis for indocyanine green-aided imaging of rheumatoid arthritis in hand joints. *J Biomed Opt*, 18(9), 097004
- Moody, E. D., Viskari, P. J., Colyer, C. L. (1999): Non-covalent labeling of human serum albumin with indocyanine green: a study by capillary electrophoresis with diode laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 729(1-2), 55–64
- Murawa, D., Hirche, C., Dresel, S., Hünerbein, M. (2009): Sentinel lymph node biopsy in breast cancer guided by indocyanine green fluorescence. *Br J Surg*, 96(11), 1289–1294
- Needham, D., Anyarambhatla, G., Kong, G., Dewhirst, M. W. (2000): A New temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia : characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res*, 60(5), 1197–1201
- Needles, A., Heinmiller, A., Sun, J., Theodoropoulos, C., Bates, D., Hirson, D., Yin, M., Foster, F. S. (2013): Development and initial application of a fully integrated photoacoustic micro-ultrasound system. *IEEE Trans Ultrason, Ferroelect Freq Control*, 60(5), 888–897

- Ntziachristos, V. (2010): Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nat Methods*, 7(8), 603–614
- Patil, K., Pawar, R., Talap, P. (2000): Self-aggregation of methylene blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu 4 NBr and urea. *Phys Chem Chem Phys*, 2(19), 4313-4317
- Patterson, M. P., Riley, C. B., Kolios, M. C., Whelan, W. M. (2014): Optoacoustic characterization of prostate cancer in an in vivo transgenic murine model. *J Biomed Opt*, 19(5), 056008
- Proulx, S.T., Luciani, P., Derzsi, S., Rinderknecht, M., Mumprecht, V., Leroux, J-C., Detmar, M. (2010): Quantitative imaging of lymphatic function with liposomal indocyanine green. *Cancer Res*, 70(18), 7053–7062
- Rajian, J. R., Carson, P. L., Wang, X. (2009): Quantitative photoacoustic measurement of tissue optical absorption spectrum aided by an optical contrast agent. *Opt Express*, 17(6), 4879–4889
- Razansky, D., Baeten, J., Ntziachristos, V. (2009): Sensitivity of molecular target detection by multispectral optoacoustic tomography (MSOT). *Med Phys*, 36(3), 939-945
- Sattler, L. (2012): *Herstellung und Charakterisierung eines liposomalen Carriersystems für die inhalative Applikation von Sildenafil*. Med. Diss., Gießen
- Schingale, F.-J. (2013): Fluoreszenz-Lymphographie. *Phlebologie*, 42(3), 149-151
- Schinzel, C.M. (2002): *Nd:YAG-Laserstrahlschweißen von Aluminiumwerkstoffen für Anwendungen im Automobilbau*. Herbert Utz, München
- Schmidt, R. (2011): Neuartige thermosensitive Liposomen zur zielgerichteten Therapie solider Tumoren - Charakterisierung in vitro und in vivo. Med. Diss., München
- Schwendener, R. A. (1994): Liposomes as carriers for paramagnetic gadolinium chelates as organ specific contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI). *J Liposome Res*, 4(2), 837-855
- Shahzad, K., Jankovic, L., Wang, Y. (2008): Photoacoustic studies of tissue-like phantoms with scattering and absorbing properties. In: Oraevsky, A. A., Wang, L. V. (Eds.), *Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2008: The Ninth Conference on Biological Thermoacoustics, Optoacoustics, and Acousto-optics*. Vol. 6856, S. 685624, SPIE, Bellingham, Washington, USA
- Siddiqi, A. (2009): Development of tissue-equivalent heat-sensitive gel for the experimental verification of near infrared (NIR) laser-mediated cancer detection and therapy. Med. Diss., Georgia
- Song, K. H., Wang, L. V. (2007): Deep reflection-mode photoacoustic imaging of biological tissue. *J Biomed Opt*, 12(6), 060503
- Song, K. H., Stein, E. W., Margenthaler, J. A., Wang, L. V. (2008): Noninvasive photoacoustic identification of sentinel lymph nodes containing methylene blue in vivo in a rat model. *J Biomed Opt*, 13(5), 054033
- Song, S., Hou, X. L., Wu, Y. B., Shuang, S. M., Yang, C., Inoue, Y., Dong, C. (2009):

- Study on the interaction between methyl blue and human serum albumin by fluorescence spectrometry. *J Lumin*, 129(3), 169–175
- Su, J. L., Wang, B., Wilson, K. E., Bayer, C. L., Chen, Y.-S., Kim, S., Homan, K. A., Emelianov, S. Y. (2010): Advances in Clinical and Biomedical Applications of Photoacoustic Imaging. *Expert Opin Med Diagn*, 4(6), 497–510
- Sutterer, W. F., Hardin, S. E., Benson, R. W., Krovetz, L., J., Schiebler, G., L. (1966): Optical behavior of indocyanine green dye in blood and in aqueous solution. *Am Heart J*, 72(3), 345–350
- Tagami, T., Foltz, W. D., Ernsting, M. J., Lee, C. M., Tannock, I. F., May, J. P., Li, S. D.(2011): MRI monitoring of intratumoral drug-delivery and prediction of the therapeutic effect with a multifunctional thermosensitive liposome. *Biomaterials*, 32(27), 6570-6578
- Tanaka, E., Chen, F. Y., Flaumenhaft, R., Graham, G. J., Laurence, R. G., Frangioni, J. V. (2009): Real-time assessment of cardiac perfusion, coronary angiography, and acute intravascular thrombi using dual-channel near-infrared fluorescence imaging. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 138(1), 133–140
- Taruttis, A., Ntziachristos, V. (2012): Translational optical imaging. *AJR Am J Roentgenol*, 199(2), 263–271
- Tashjian, J., Dewhirst, M. W., Needham, D., Viglianti, B. L. (2008): Rationale for and measurement of liposomal drug delivery with hyperthermia using non-invasive imaging techniques. *Int J Hyperthermia*, 24(1), 79–90
- Toyota, T., Fujito H., Suganami, A., Ouchi, T., Ooishi, A., Aoki A., Onoue K., Muraki, Y., Madono, T., Fujinami, M., Tamura, Y., Hayashi, H. (2014): Near-Infrared-fluorescence imaging of lymph nodes by using liposomally formulated indocyanine green derivatives. *Bioorg Med Chem*, 22(2), 721-727
- Turner, D. C., Moshkelani, D., Shemesh, C. S., Luc, D., Zhang, H. (2012): Near-infrared image-guided delivery and controlled release using optimized thermosensitive liposomes. *Pharm Res*, 29(8), 2092–2103
- Urbanska, K. Romanowska-Dixon, B., Matuszak, Z., Oszejca, J., Nowak-Sliwinska, P., Stochel, G (2001): Indocyanine green as a prospective sensitizer for photodynamic therapy of melanomas. *Acta Biochim Pol*, 49(2), 387–391
- Usacheva, M. N., Teichert, M. C., Biel, M. A. (2001): Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*, 29(2), 165–173
- Wang, X., Pang, Y., Ku, G., Xie, X., Stoica, G., Wang, L. V. (2003): Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain. *Nat Biotechnol*, 21(7), 803–806
- Wang, X., Xie, X., Ku, G., Wang, L. V., Stoica, G. (2006): Noninvasive imaging of hemoglobin concentration and oxygenation in the rat brain using high-resolution photoacoustic tomography. *J Biomed Opt*, 11(2), 024015
- Wen, X., Jackson, E. F., Price, R., E., Kim, E. E., Wu, Q., Wallace, S., Charnsangavej, C., Gelovani, J. G., Li, C. (2004): Synthesis and characterization of poly (L-glutamic acid) gadolinium chelate: a new biodegradable MRI contrast agent. *Bioconjug Chem*, 15(6), 1408–1415

- Werner, S. G., Langer, H. E., Ohrndorf, S., Bahner, M., Schott, P., Schwenke, C., Schirner, M., Bastian, H., Lind-Albrecht, G., Kurtz, B., Burmester, G. R., Backhaus, M., (2012): Inflammation assessment in patients with arthritis using a novel in vivo fluorescence optical imaging technology. *Ann Rheum Dis.*, 71(4), 504-510
- Weskott, H.-P., (2007): Physikalische Grundlagen und biologische Effekte. In: Gross, M. (Hrsg.), *Sonographie: Schritt für Schritt zur Diagnose*, Aufl. 1., S. 19-20, Urban&Fischer, München
- Wilson, K. E., Bachawal, S. V., Tian, L., Willmann, J. K. (2014): Multiparametric spectroscopic photoacoustic imaging of breast cancer development in a transgenic mouse model. *Theranostics*, 4(11), 1062–1071
- Xiang, L., Yuan, Y. Xing, D., Ou, Z., Yang, S., Zhou, F. (2009): Photoacoustic molecular imaging with antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes for early diagnosis of tumor. *J Biomed Opt*, 14(2), 021008
- Xu, G., Rajian, J. R., Girish, G., Kaplan, M. J., Fowlkes, J. B., Carson, P. L., Wang, X. (2013): Photoacoustic and ultrasound dual-modality imaging of human peripheral joints. *J Biomed Opt*, 18(1), 10502
- Yang, X., Skrabalak, S. E., Li, Z. Y., Xia, Y., Wang, L. V. (2007): Photoacoustic tomography of a rat cerebral cortex in vivo with Au nanocages as an optical contrast agent. *Nano Lett*, 7(12), 3798-3802
- Yang, X., Stein, E. W., Ashkenazi, S., Wang, L., V. (2009): Nanoparticles for photoacoustic imaging. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 1(4), 360-368
- Yao, J., Wang, L. V. (2011): Photoacoustic tomography: fundamentals, advances and prospects. *Contrast Media Mol Imaging*, 6(5), 332–345
- Zackrisson, S., van de Ven, S. M., Gambhir, S. S. (2014): Light in and sound out: emerging translational strategies for photoacoustic imaging. *Cancer Res*, 74(4), 979–1004
- Zhang, H. F., Maslov, K., Stoica, G., Wang, L. V. (2006): Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nat Biotechnol*, 24(7), 848–851
- Zhou, J. F., Chin, M. P., Schafer, S. A. (1994): Aggregation and degradation of indocyanine green. In: Anderson, R. R., Katzir, A. (Eds.), *Laser surgery: advanced characterisation, therapeutics and systems IV*, Vol. 2128, S. 495–505, SPIE, Bellingham, Washington, USA
- Zimmermann, T. (2005): Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 95, 245-265
- Zimmermann, T., Marrison, J., Hogg, K., O'Toole, P. (2014): Clearing up the signal: spectral imaging and linear unmixing in fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol*, 1075, 129–148

8 Danksagung

Frau Dr. Carola Heneweer danke ich herzlich für die Vergabe des Themas und die fachliche Beratung und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Marcus Both, stellvertretender Direktor der Klinik für Radiologie und Neuroradiologie, für die Betreuung meiner Dissertation.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Olav Jansen, Direktor der Klinik für Radiologie und Neuroradiologie, für die Überlassung dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Ayah Açil aus der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie danke ich für die anfängliche offizielle Betreuung meiner Doktorarbeit.

Herrn Rüdiger Möller aus der Feinmechanik der Zahnklinik spreche ich einen großen Dank für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Herstellung des Phantomhalters aus.

Ebenso danke ich Herrn PD Ph.D. Oula Peñate Medina, aus der Sektion biomedizinische Bildgebung, und Frau Susan Jünger, MTA der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, für die Herstellung der Liposomen. Frau Susan Jünger danke ich ebenfalls für die Unterstützung bei der Messung der thermosensitiven Liposomen.

Frau Gabriele Neßenius und Frau Gisela Refrath möchte ich für die Bereitstellung der Geräte in der wissenschaftlichen Abteilung der Zahnklinik danken.

Mein großer Dank geht auch an meine Mutter sowie an Florian Heinze für ihre emotionale Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden für die kleinen, aber wichtigen Hinweise bedanken. Vielen Dank: Sinja, Mareike, Till und Janna.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Alessandra Christina Malinowski
Anschrift: Lindenweg 31, 22949 Ammersbek
Geburtstag: 05.03.1987
Geburtsort: Hamburg

Schulbildung

1993-1997 Grundschule Barsbüttel
1997-2006 Emil-von-Behring-Gymnasium Großhansdorf
2006 Allgemeine Hochschulreife

Studium:

2006-2011 Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Dezember 2011 Staatsexamen im Fach Zahnmedizin, Verleihung der Approbation als Zahnärztin
01.01.2012-31.08.2012 Assistenz Zahnärztin in Düsseldorf
01.04.2013-30.09.2014 Assistenz Zahnärztin in Ahrensburg
seit 01.10.2014 Angestellte Zahnärztin in Ahrensburg

Wissenschaft:

seit 2012 Promotionsarbeit an der Klinik für Radiologie und Neuroradiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Publikationen:

2012 Purcz, N. M., Baltz, L., Malinowski, A., Wiltfang, J., Heller, M., & Heneweer, C. (2012): Etablierung eines in vitro-Systems zur standardisierten Bestimmung der Eigenschaften unterschiedlicher photoakustische Kontrastmittel. In *RöFo-*

Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren (Vol. 184, No. 12, S. A27).

- 2013 Heneweer, C., Penate Medina, O., Malinowski, A., Baltz, L., Heller, M., Jansen, O. (2013): Monitoring of thermosensitive liposomes and their activation by photoacoustic imaging. *Nanotechnologies in Cancer, Diagnosis, Therapy, and Prevention*, New York
- 2014 Purcz, Nicolai M.; Heneweer, Carola; Penate Medina, Oula; Malinowski, Alessandra; Purcz, Larissa; Acil, Yahya; Jansen, Olav; Wiltfang, Jörg (2014): Etablierung von thermosensitiven Liposomen zur gezielten Freisetzung von Wirkstoffen in Mundbodenkarzinomen. 64. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie, 35. Jahrestagung des Arbeitskreises für Oralpathologie und Oralmedizin, Bad Homburg