

Aus der
Universitätsklinik für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde
Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. J. Spitzer)
Universitätsklinikum Homburg/Saar

**Autofluoreszenzdetektion und Anreicherung von exogen
dargebotenen Fluorophoren in neoplastischen Geweben
der Mundschleimhaut**

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES
EINES DOKTORS DER ZAHNHEILKUNDE
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2008

vorgelegt

von

Stephanie Irene Aichinger
geboren am 01.09.1977 in Straubing

1. Tag der Promotion: _____

2. Dekan: _____

3. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. J. Spitzer

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1. ZUSAMMENFASSUNG	6
SUMMARY	8
2. EINLEITUNG:	10
3. MATERIAL UND METHODIK	14
3.1. HET-CAM Modell – In vivo Tierversuchsmodell.....	14
3.1.2 Zellkultivierung.....	15
3.1.3 Messapparatur – Spektrometersystem Spectra Cube	23
3.1.4 Durchführung.....	24
3.2 In vitro-Modell	26
3.2.1 Aufbau des In vitro-Modells	26
3.2.2 Zellmaterial	27
3.2.3 Durchführung.....	28
3.3 Autofluoreszenz Diagnostik	30
3.3.1 Aufbau des Faserspektrometers	30
3.3.2 Patienten.....	32
3.3.3 Durchführung.....	33
4. ERGEBNISSE	37
4.1 Ergebnisse der PDD auf der CAM.....	37
4.2 PDD In vitro Patienten und Zelllinie.....	42
4.3 PDD Ergebnisse anhand der Autofluoreszenz im Mundraum	48
5. DISKUSSION	52
5.1 Diskussion PDD CAM	52
5.2 Diskussion In vitro	54
5.3 Diskussion Autofluoreszenz	55
6. LITERATURVERZEICHNIS	57
7. DANKSAGUNG	63
8. LEBENS LAUF	65

Abkürzungsverzeichnis

ALA	5-Aminolävulinsäure
CAM	Chorioallantoismembran
CCD	Charge Coupled Device (ladungsgekoppelter Speicher)
FKS	Fetales Kälberserum
h-ALA	5-Aminolävulinsäure-Hexylester
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HET-CAM	Hühnereitest auf der Chorioallantoismembran
LED	Light Emitting Diode
MEM	Minimum Essential Medium
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDD	Photodynamische Diagnose
PDT	Photodynamische Therapie
PpIX	Protoporphyrin IX
ROI	Region of Interest

1. Zusammenfassung

Die Früherkennung von malignen Erkrankungen und deren Therapie im Anfangsstadium sind entscheidend für eine erfolgreiche Therapie. Mit Hilfe der photodynamischen Diagnostik ist es möglich durch selektive Anreicherung des Photosensibilisators in neoplastischem Gewebe tumoröses Gewebe klinisch zu erkennen. Durch die Bestrahlung mit Licht aus dem blauen Spektralbereich wird der Photosensibilisator zu Rotfluoreszenz angeregt. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen das Anreicherungsverhalten des Photosensibilisators in vivo und in vitro an Zellkulturen untersucht. Zum anderen erfolgte die klinische Untersuchung der Autofluoreszenz von Tumoren im Vergleich zu gesunder Mundhöhlenschleimhaut.

Die In vivo Untersuchungen wurden anhand eines Tierversuchersatzmodells - dem HET-CAM- Modell (Hühnereitest auf der Chorioallantoismembran) - durchgeführt. Dieses Modell ermöglicht die Beobachtung von Tumorzellen in einem physiologischen Milieu, das als Nährboden für tumoröse Zellen dient. Auf dieser Chorioallantoismembran wurden sowohl tumoröse Zelllinien als auch Tumorzellen aus histologisch gesicherten Mundhöhlenkarzinomen angezüchtet. Diese Tumorzellen wurden auf die Membran aufgepflanzt und mit der veresterten δ -Aminolävulinsäure (h-ALA) – einer Vorstufe des Protoporphyrin IX (PpIX) – sensibilisiert. Die tumorselektive Aufnahme der applizierten Fluorophore in den Tumorzellen und das Verhalten der Fluoreszenzintensität nach Einfach – und Doppelapplikation wurde gemessen und ausgewertet. Die Untersuchungen ergaben, dass sich drei Stunden nach Gabe des Photosensibilisators h-ALA ein Intensitätsmaximum zeigte. Erfolgte nach diesen drei Stunden eine zweite Applikation von h-ALA zeigte sich nochmals eine Steigerung der Fluoreszenz-Intensität um den Faktor 2,2.

Zur Untersuchung der Anreicherungskinetik des Photosensibilisators In vitro wurden ebenso wie In vivo sowohl tumoröse Zelllinien als auch Tumorzellen aus fünf histologisch gesicherten Tumoren aus der Mundhöhle verwendet. Bei den Tumoren, aus denen Zellen kultiviert worden waren, handelte es sich bei vier Proben um ein Plattenepithelkarzinom und bei einer Probe handelte es sich um ein Non-Hodgkin-Lymphom. Ziel war es, herauszufinden, ab welchem Zeitpunkt eine maximale Aufnahme des h-ALA in die Tumorzelle, und die dadurch induzierte PpIX- Fluoreszenz erreicht ist. Sobald in den verwendeten Kulturflaschen ein ausreichender Zellrasen aus Tumorzellen vorhanden war, wurden diese mit h-ALA sensibilisiert und nach unterschiedlicher Inkubationszeit abgeerntet. Die gewonnene Zellsuspension wurde mit Blaulicht angeregt und das emittierte Spektrum wurde mit Hilfe eines Faserspektrometers detektiert.

Es zeigte sich, dass bereits nach einer Einwirkzeit von ein bis fünf Minuten genug Photosensibilisator in die Tumorzellen aufgenommen worden ist, um über Stunden hinweg weiter PpIX zu bilden. Eine längere Sensibilisierung der Tumorzellen bewirkte keine vermehrte Anreicherung von h-ALA und somit auch keine vermehrte Bildung von PpIX. Der Stoffwechsel der Zellen war der limitierende Faktor.

Bei acht Patienten/- innen erfolgte nur mit Einverständnis der Patienten eine intraorale Messung des Fluoreszenzspektrums sowohl von tumorösem Gewebe als auch von gesunder Mundschleimhaut. Bei den Tumoren handelte es sich um sieben Plattenepithelkarzinome und ein Non-Hodgkin-Lymphom.

Die Messungen zeigten deutlich unterschiedliche Fluoreszenzsignale zwischen Tumor und gesunder Schleimhaut. Die Autofluoreszenz der Mundschleimhaut war intensiver als die von Tumoren. Aufgrund des hohen Kreatingehaltes der Mundschleimhaut lag das Maximum der Fluoreszenz bei 525nm. Messungen ergaben bei einer klinisch vorliegenden Leukoplakie, die histologisch bestätigt worden war, dass diese anhand ihres Fluoreszenzspektrums sowohl von einem Tumor als auch von gesundem Gewebe unterschieden werden konnte.

Summary

For a successful therapy of cancer diseases the early detection and classification of pathological tissues is essential. Spectroscopical methods with or without tumourspecific fluorescent dyes make it possible to distinguish between physiological and abnormal tissue in early stages.

The aim of the present work was the characterization of tumorous tissues concerning their autofluorescence in comparison to normal tissue and their properties of enrichment of certain photosensitizer molecules *in vitro* and *in vivo*.

The *In vivo* examinations were performed on an animal experiment substitute model, the so called HET-CAM-model (Hen's egg test on the Chorioallantoismembrane).

The HET-CAM-model allows the observation of tumourcells in a physiological and realistic surrounding with the CAM as a blood supplied substrate. For the experiments tumour cells of defined cell cultures as well as of bioptical material with histopathological determination were seeded on the membrane. Enrichment experiments were performed with 5-aminolaevulinic-acid-hexylester, an esterized derivative of aminolaevulinic acid, a precursor of Protoporphyrin IX. Tumour cells are showing an uptake of the non-fluorescent precursors, that are metabolized to the Protoporphyrin, a Porphyrin with a characteristic fluorescence spectrum in the visible spectral range. The substance, which is part of the body's own Heme-metabolism can be excited with blue light and shows a fluorescent in the red spectral range.

The tumourselectivity and pharmacokinetic of the precursor was determined in several set-ups and under single and repeated dose conditions with two-dimensionally resolved spectroscopy. The measurements showed that there is a maximum of enrichment 3 hours after application of the single dose. A further application at this point of time leads to a significantly enhancement of the enrichment.

For some basic examinations of the pharmacokinetic of the photosensitizer further measurements were performed *in vitro*. Tumour cells from cell lines of the oral cavity were compared with tumour cells from biopsies of histologically proofed samples, cultivated directly after the resection of the tumour of the oral cavity. Four samples of squamous cell carcinomas and one of a non-Hodgkin-lymphoma were taken.

The *In vitro* measurements were performed to get a quantitative impression of cellular enrichment, the diffusion times and limiting factors of the enrichment.

The samples were incubated for different periods of time and measured with a fibre optical spectrometer system.

As a result it was shown, that a longer incubation time of more than five minutes does not lead to higher enrichment of PPIX in the cells, so that the metabolism seems to be the limited factor and not the diffusion.

In another examination the autofluorescence of oral tissues was measured in a clinical trial. With the agreement of the patients, measurements with a fibre optical probe were performed in the oral cavity. With the light of a blue LED-system suspect areas were illuminated and measured spectroscopically. Seven squamous cell carcinomas, a non-Hodgkin-lymphoma and a leucoplacia were examined. The measurements showed a significant difference of tumour and normal mucosa. The fluorescence signal of normal mucosa is higher as the signal of tumorous lesions and shows a different spectral shape around 525 nm. A measured Leucoplacia showed the same spectral shape as normal mucosa, but a lower intensity of the main peak at 525nm, which results from a lower creatin concentration in this tissue.

It was shown that the fluorescence diagnostic enables to distinguish between tumour, leucoplastic and normal tissue.

2. Einleitung:

Die Anzahl der jährlich in Deutschland auftretenden malignen Neuerkrankungen im Bereich der oberen Atemwege beläuft sich gemäß den Angaben der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. [5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe; Saarbrücken 2006] bei Männern auf 7.800 und bei Frauen auf knapp 2.600. Das heißt, die Wahrscheinlichkeit an einer bösartigen Neubildung der Mundhöhle zu erkranken ist bei Männern dreimal so hoch wie bei Frauen. Damit steht das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle bei Männern an siebter Stelle aller Krebserkrankungen. Der Anteil an durch Krebserkrankung der Mundhöhle bedingte Sterbefälle beträgt jährlich 3,4%.

Das (Zigaretten-) Rauchen – Ursache für ein Drittel aller Krebstodesfälle – gehört neben dem Alkoholkonsum zu den Hauptrisikofaktoren bösartiger Neubildungen im Bereich der Mundhöhle.

Als Problem zeigt sich, dass die Diagnose eines Tumors häufig erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt wird. Im Falle einer Veränderung der Mundschleimhaut, erfolgt nach eingehender Anamnese, klinischer Untersuchung, Röntgenübersichtsaufnahme und einer Sonographie von Kopf und Hals eine Probeentnahme in Lokalanästhesie. Bestätigt die histologische Untersuchung die klinische Verdachtsdiagnose, so folgen weitere umfassendere Untersuchungen, wie die Suche nach Tumormarkern, internistische Abklärung, Pan-Endoskopie und Anfertigung eines Röntgen-Thorax zum Ausschluss eventueller Fernmetastasen. Um die Ausdehnung des Tumors bestimmen zu können, werden Computertomographieaufnahmen zur Darstellung von knöchernen Destruktionen und Magnetresonanztomographieaufnahmen zur Abbildung von Weichteilveränderungen angefertigt.

Eine Frühdiagnostik erhöht die Chancen einer kompletten Remission. Des Weiteren wäre die daraus resultierende notwendige Therapie für den Patienten weniger belastend und weniger kostenintensiv.

95% aller malignen Tumore der Mundhöhle sind Plattenepithelkarzinome. Klinisch zeigen diese im Anfangsstadium knotige, häufig schmerzlose Verdickungen, die später ulzerieren. In mehr als 50% der Fälle sind bei der Diagnosestellung bereits Lymphknotenmetastasen vorhanden [H.Hees/ F.Sinowatz Dt.Ärzteverlag: Allg.u.Spez. Pathologie].

Neben dem Plattenepithelkarzinom werden im Mund– Kiefer– und Gesichtsbereich auch Non-Hodgkin-Lymphome beobachtet.

Das Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) ist eine bösartige Erkrankung, die in 70% der Fälle das ganze lymphatische System betrifft. Das Auftreten des NHL in der Mundhöhle beträgt im Vergleich zu allen tumorösen Erkrankungen im Mundraum weniger als 5%. Klinisch zeigt sich das NHL in der Mundhöhle als weiche oder derbe Schwellung, mit einem enorm schnellen Wachstum, das bis zur Ulzeration führen kann. [George Lasarkis, Thieme Verlag, Color Atlas of oral Disease, 3rd Edition].

Neben den etablierten Methoden wie der Röntgendiagnostik, Sonographie, Magnetresonanztomographie, Computertomographie, Positronenemissions-tomographie und pathologisch-anatomischen Untersuchungen wird seit einigenzeiten auch durch die photodynamischen Diagnostik (PDD) minimalinvasiv und schnell die Möglichkeit gegeben, neoplastisches Gewebe von gesundem Gewebe zu unterscheiden [Schear, M., Neugebauer, J., Zoeller, J.E., ZM 2008 Heft Nr.8]. Durch Applikation eines Photosensibilisators – beispielsweise Protoporphyrin IX –, der sich vermehrt in entartetem Gewebe anreichert, zeigt sich mit Hilfe von Licht aus dem blauen Spektralbereich (390-440nm) die makroskopische Detektion - als Rotfluoreszenz - von klinisch noch nicht sichtbar verändertem Gewebe. Bei der photodynamischen Therapie (PDT) kommt es durch Bestrahlung des Photosensibilisators mit Licht aus dem roten Spektralbereich (635nm) zur Anregung des Photosensibilisatormoleküls. Die dadurch eingeleiteten photo-physikalischen Prozesse führen letztendlich zur Zerstörung des tumorösen Gewebes; durch das angeregte Photosensibilisatormolekül entsteht Energie, die auf molekularen Sauerstoff - sog. Singulett-Sauerstoff - übertragen wird, welcher sofort mit benachbartem neoplastischem Gewebe reagiert und zur Schädigung der tumorösen Zelle führt. Durch die Rotlichteinwirkung wird das PpIX-Molekül vom S_0 -Zustand in höhere S_N -Zustände überführt, wobei durch Innere Konversion (IC) eine strahlungslose Desaktivierung in das S_1 -Niveau stattfindet. Von diesem Schwingungszustand S_1 erreicht der Photosensibilisator über einen innermolekularen Energietransfer (ISC) einen energetisch niedrigeren aber langlebigen Triplettzustand T_1 . Von diesem Zustand aus ist entweder eine strahlungslose Relaxation in den Grundzustand möglich oder aber der angeregte Photosensibilisator überträgt seine Energie auf andere Moleküle in unmittelbarer Umgebung. Bei diesem Vorgang werden drei Mechanismen unterschieden: Typ-I- Mechanismus bedeutet Energieübertragung durch Stöße auf Sauerstoffmoleküle. Über den Typ-II-Mechanismus kann die Energie des Photosensibilisators jedoch auch direkt auf molekularen Sauerstoff

übertragen werden, der dadurch von seinem Triplett-Grundzustand in den Singulettzustand angeregt wird. Unter dem Typ-III-Mechanismus versteht man Elektronentransferprozesse vom angeregten Sensibilisatormolekül zu Substratmolekülen [Fisher et al., 1995]. Dadurch werden Radikalreaktionen in Gang gesetzt, die zur Bildung von hochreaktiven Substratmolekülen führen. Dies wiederum hat zur Folge, dass es zu Redoxreaktionen mit Zellmaterial oder Reduktion von Sauerstoff im Gewebe kommen kann ([Pass, 1993], Abbildung 1). Dieser Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ ist hochreaktiv und reagiert sofort mit benachbarten Substratmolekülen und Zellkompartimenten, was eine Zellschädigung zur Folge hat. [Wilson et al., 2002; Wu et al., 2003]

Nach dem Elektronen-Transfer ist das Photosensibilisatormolekül wieder im Grundzustand S_0 und kann erneut angeregt werden [Henderson et al., 1991].

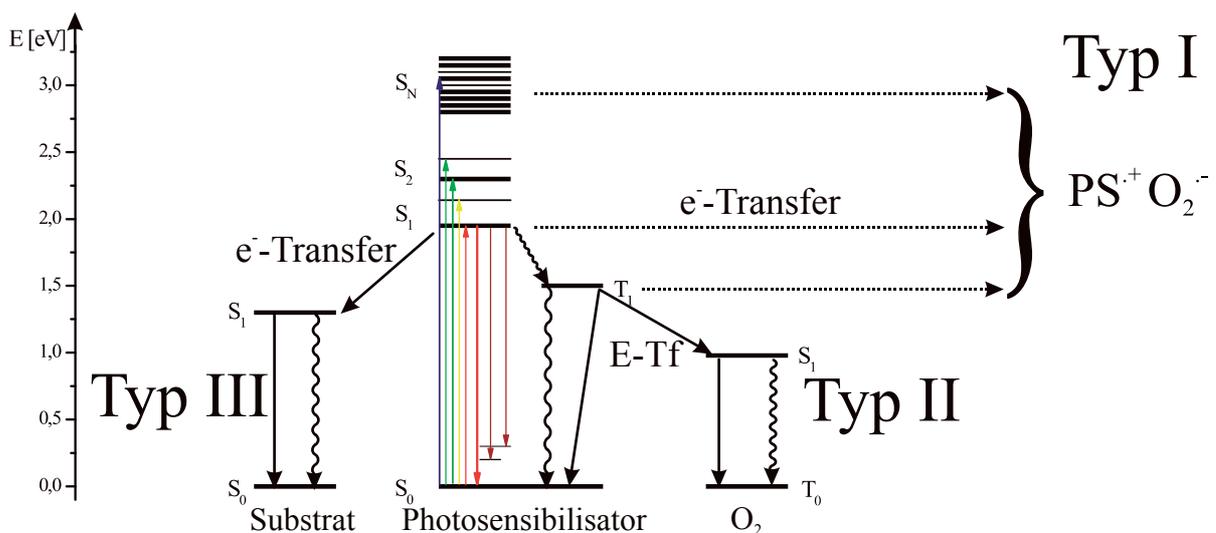


Abbildung 1: Jablonski-Diagramm. ISC: Inter System Crossing; IC: Internal conversion
 PDD: Photodynamische Diagnostik. PDT: Photodynamische Therapie [Hüttenberger, 2000]

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Verwendung der Photodynamischen Diagnostik zur möglichen Früherkennung von tumorösen Erkrankungen in der Mundhöhle zu untersuchen. Dazu wurde die Anreicherung von Photosensibilisatoren in Tumorzellen an einem In vivo-Modell - dem Hühnereitest auf Chorioallantoismembran (HET-CAM) - und In vitro an Zellkulturen untersucht. Beim HET-CAM-Modell diente die Chorioallantoismembran eines Hühnerembryos als Nährboden für Tumorzellen verschiedener Herkunft.

Des Weiteren erfolgte eine Untersuchung der Autofluoreszenz von Tumoren in der Mundhöhle selbst. Mit Hilfe eines Faserspektrometers wurden dabei sowohl von makroskopisch sichtbar veränderter Mundhöhlenschleimhaut als auch von kontralateral liegender gesunder Schleimhaut Messungen aufgenommen. Die dabei aufgenommenen Messkurven wurden anschließend untereinander verglichen und verrechnet.

3. Material und Methodik

3.1. HET-CAM Modell – In vivo - Tierversuchsmodell

Das HET-CAM –Modell (Hühnereitest auf der Chorioallantoismembran) ist ein am Institut für Laser und Medizin in Ulm von Frau Dr. Kunzi-Rapp entwickeltes Tierersatzmodell [Kunzi-Rapp, 1995]. Bei diesem In vivo-Modell kann das Verhalten von topisch applizierten neoplastischen Zelllinien sowie Biopsie-Proben beobachtet werden. Die Chorioallantoismembran (CAM) des Hühnerembryos, entwickelt sich aus der Verschmelzung der drei Keimblättern: dem Ektoderm, dem Mesoderm (mit primärer Anlage der Blutgefäße) und dem Entoderm. Während der Embryonalentwicklung falten sich vier extraembryonale Membranen vom Embryo ab: Dottersack, Allantois, Chorion und Amnion [Gottfried et al., 1995] (Abbildung 2). Die CAM ist ab dem 6. Bebrütungstag soweit ausgebildet, dass die Beimpfung mit Tumorzellen erfolgen kann. Bis zum 3. Tag nach der Zell-Applikation ist ein ausgedehntes Zellwachstum erkennbar. Bis zum 10. Tag nach der Befruchtung ist das System vollkommen schmerzempfindlich. Die CAM dient dem Embryo hauptsächlich zum Gasaustausch. Aufgrund der guten Durchblutung der Membran und der bis zum 16./ 17. Tag nach der Befruchtung ausbleibenden suffizienten Immunabwehr ist die Kultivierung von Biopsie-Proben und neoplastischen Zelllinien möglich.

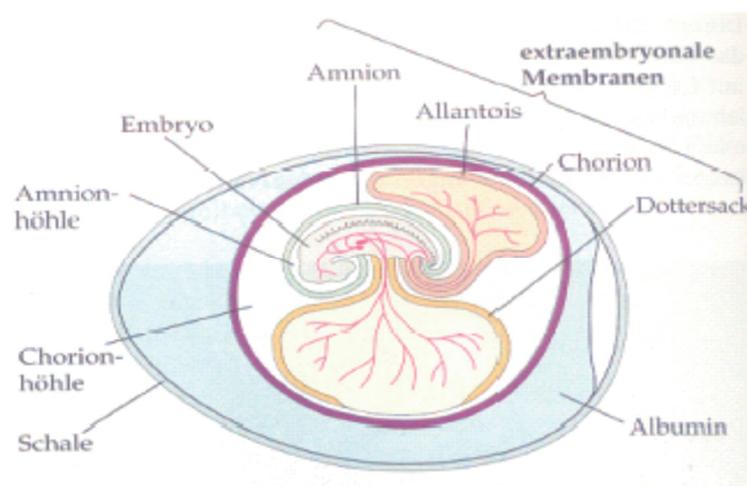


Abbildung 2 : Organisation des befruchteten Vogeleies (*Campbell, 1997*)

3.1.2 Zellkultivierung

A) Zellmaterial

Verwendete Zelllinien

Bei der photodynamischen Diagnostik am HET-CAM - Modell wurden sowohl Zelllinien verwendet, die sich nachweislich erfolgreich auf der Chorioallantoismembran (CAM) kultivieren ließen [Bruce-Micah, 2005; Ugniwenko, 2004] als auch Tumorzellen, die aus histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhlenschleimhaut gewonnen wurden.

Als Zelllinien wurden HEP-2, RPMI 2650 und CLS- Zellen verwendet, die von Cell Lines Service, Eppelheim bezogen wurden. Bei HEP-2 (ATCC: CCL-23) handelt es sich um eine humane epidermale Larynxkarzinomzelllinie, bei RPMI 2650 (ATCC: CCL-30) um eine humane Karzinomzelllinie des nasalen Septums und bei CLS-354 handelt es sich um eine humane Plattenepithelkarzinom-Zelllinie aus dem Mundraum.

Zellkulturpflege

Die oben genannten Zelllinien wurden in kommerziellen Kulturflaschen (25cm² und 75cm²) im Brutschrank bei 37C°, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Das dafür verwendete Kulturmedium bestand aus EARLE's Minimum Essential Medium (MEM) mit einem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% Amphotericin. Einmal pro Woche erfolgte ein Medienwechsel und die angesetzten Zellkulturen wurden je nach Bedarf gesplittet.

Zellpräparation zur Beimpfung der CAM

Vor Beimpfung der CAM erfolgte mit Hilfe des inversen Mikroskops die Überprüfung der Konfluenz der Zellen. Kulturflaschen, in denen die Zellen ein Flächenwachstum von 70- 85% aufwiesen, wurden verwendet. Kulturen, die bereits zu 100% konfluent waren, wurden nicht verwendet, da es hierbei zu einer so genannten Kontakthemmung gekommen ist, die zu einer Verlangsamung bis hin zum Stillstand des Zellwachstums führte.

Abernten der Zellen

Um die benötigte Zellsuspension herstellen zu können, wurde zunächst das alte Medium (EARLE's MEM) verworfen und der Zellrasen mit HBSS-Pufferlösung gespült. Die dabei gewonnene Lösung wurde in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurden die Zellen in einer mit Versene (4ml) verdünnten Trypsinlösung (1ml) für 3 Minuten bei 37C° inkubiert. Zusätzlich zur chemischen Ablösung und zur Schonung der Zellen wurde der Vorgang durch leichtes Klopfen an die Kulturflasche beschleunigt und unter dem inversen Mikroskop kontrolliert. Die somit gelösten Zellen wurden wieder im Falcon-Röhrchen gesammelt und die restlichen Zellen mit MEM aus der Kulturflasche gespült. Am Ende wurde das volle Falcon-Röhrchen bei 168g für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Um eine ausreichend hoch konzentrierte Zellsuspension erhalten zu können, wurde das gewonnene Zellpellet mit 200 µl MEM resuspendiert.

Zellzahlbestimmung

Mit Hilfe eines Häemocytometers wurde die Anzahl der Zellen bestimmt. Hierbei wurde ein Teil der Zellsuspension mit einer Trypanblaulösung (0,17% in PBS) im Verhältnis 1: 6,4 verdünnt und für 2 Minuten in einem Wasserbad bei 37C° inkubiert.

Die zum Auszählen verwendete Neubauer Zählkammer bestand aus 2 mal 4 Kammern, die sich aus jeweils 9 Quadraten mit einer Fläche von 1mm² zusammensetzten. Alle 8 Kammern wurden mit Hilfe eines Deckglases abgedeckt. Durch eine Pipette, die an die Kante der Zählkammer gesetzt wurde, erfolgte das Befüllen der 8 Kammern. Aufgrund der wirkenden Kapillarkräfte wurde die Zellsuspension in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer gesogen. Beim Auszählen der Zellen wurden nur helle, runde Zellen ausgezählt. Tote oder beschädigte Zellen nahmen aufgrund ihrer Membranschädigung den sauren Farbstoff Trypanblau auf, und waren unter dem Mikroskop als dunkle Zellen sichtbar. Gesunde Zellen konnten Trypanblau aktiv aus der Zelle pumpen, und ließen sich somit klar von den toten oder beschädigten Zellen unterscheiden.

B) Photosensibilisator

Tumorzellen zeigen eine hohe Stoffwechselaktivität und besitzen die Eigenschaft, viele Stoffe aufzunehmen. Diese Mechanismen nutzt man in der PDD und PDT mit Hilfe sog. Photosensibilisatoren. Ein Photosensibilisator kann zum einen mittels Einwirkung von Licht zur Fluoreszenz angeregt werden; zum anderen besitzt er die Fähigkeit – nach Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge – biologisches Gewebe direkt (durch Zellschädigung) oder indirekt (durch Anoxie der versorgenden Blutgefäße) zu zerstören [Kunzi-Rapp, 1995]. Der Grund für die selektive, vermehrte Anreicherung in neoplastischem Gewebe ist die starke Zellvermehrung und die massive Proliferation der Blutgefäße, die das tumoröse Gewebe versorgen. Die Basalmembran dieser Blutgefäße ist nicht vollständig ausgebildet und weist daher eine erhöhte Durchlässigkeit auf [Krammer, 2001]. Hinzu kommt die Tatsache, dass es durch die schlechte lymphatische Versorgung des neoplastischen Gewebes zu einer vermehrten Retention des Photosensibilisators kommt [Pass, 1993]. Um die Photosensibilisatoren phototherapeutisch zu nutzen, erfolgt die Anregung meist mit rotem Licht zwischen 630nm und 640nm, da dieser Bereich die größtmögliche Eindringtiefe in den meisten biologischen Geweben zulässt.

Bisher wird zwischen drei Generationen von Photosensibilisatoren unterschieden: die erste Gruppe der Photosensibilisatoren wird von den so genannten Hämatoporphyrinderivaten (HPD) gebildet. Unter dem Handelsnamen ist Photofrin® seit 1995 für nicht-kleinzellige endobronchiale Frühkarzinome bei der FDA (Food and Drug Administration) zugelassen. Seit 1997 ist dieser Photosensibilisator auch in Deutschland zugelassen. Nach systemischer Gabe dieses Photosensibilisators beim Patienten erfolgt die Anregung mit Licht der Wellenlänge von 630nm.

Die zweite Gruppe der Photosensibilisatoren wurde mit dem Ziel einer höheren Anregungswellenlänge synthetisiert. Beispiel dieser Gruppe sind Benzoporphyrinderivate (Verteoporfin®, Anregung bei 690nm, FDA - Zulassung seit 1999) und Meta-tetra-(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC, Foscan®, Anregung bei 680nm). Zudem werden diverse Pthalocyanine und Bacteriopurpurine (beide: Anregung bei ca. 700nm) in klinischen Studien überprüft.

Die dritte Gruppe der Photosensibilisatoren besitzen die Eigenschaft einer erhöhten Selektivität. Hierbei bilden körpereigene Substanzen, die im Körper abgebaut werden, als Photosensibilisatoren eine gute Voraussetzung. Dabei werden diese Stoffe in einer nicht photoreaktiven Vorstufe verabreicht, die in tumorösem oder krankhaftem Gewebe zum

eigentlichen Photosensibilisator umgebaut wird. Diese so genannten Protoporphyrin IX (PpIX)-basierten Photosensibilisatoren sind Teil der Häm-Biosynthese, womit die Abbauege im Körper vorgegeben sind. In der eigenen Untersuchung wurde die PpIX-Vorstufe in veresterter Form, das 5-Aminolävulinsäure-Hexylester (h-ALA), verwendet. Protoporphyrin IX (PpIX) gehört in die Gruppe der Porphyrine und stellt einen Zwischenschritt in der Häm-Biosynthese dar (Abbildung 3).

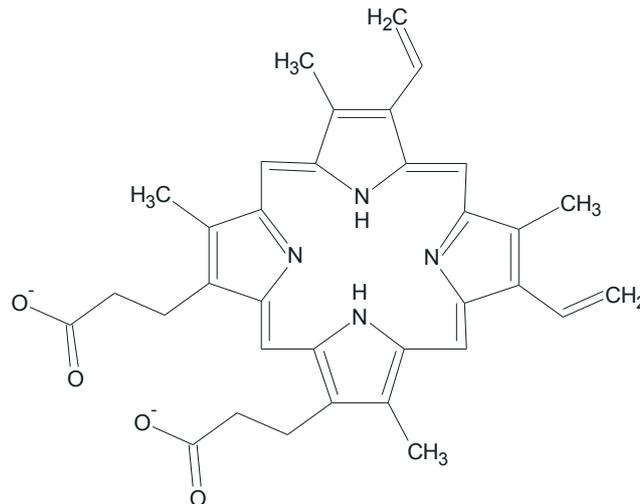


Abbildung 3: Strukturformel von Protoporphyrin IX

Für die Synthese des Häms kommt es in den Mitochondrien aus Succinyl-CoA (Produkt des Zitronensäurezyklus) und Glycin (chemisch Aminoessigsäure genannt) zur Bildung von δ -Aminolävulinsäure (ALA). Dieser erste geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Häm-Biosynthese wird durch die Menge an gebildetem Häm über einen negativen Rückkopplungsmechanismus gesteuert. Aus zwei Molekülen ALA entsteht das Molekül Porphobilinogen; aus vier Porphobilinogen - Molekülen kommt es – nach mehreren Zwischenschritten – zur Bildung eines Protoporphyrin IX-Moleküls. Mit Hilfe des Enzyms Ferrochelatase entsteht durch den Einbau eines Eisenatoms aus Protoporphyrin IX Häm [Löffler, Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 6.Auflage, 1998]. (Abbildung 4)

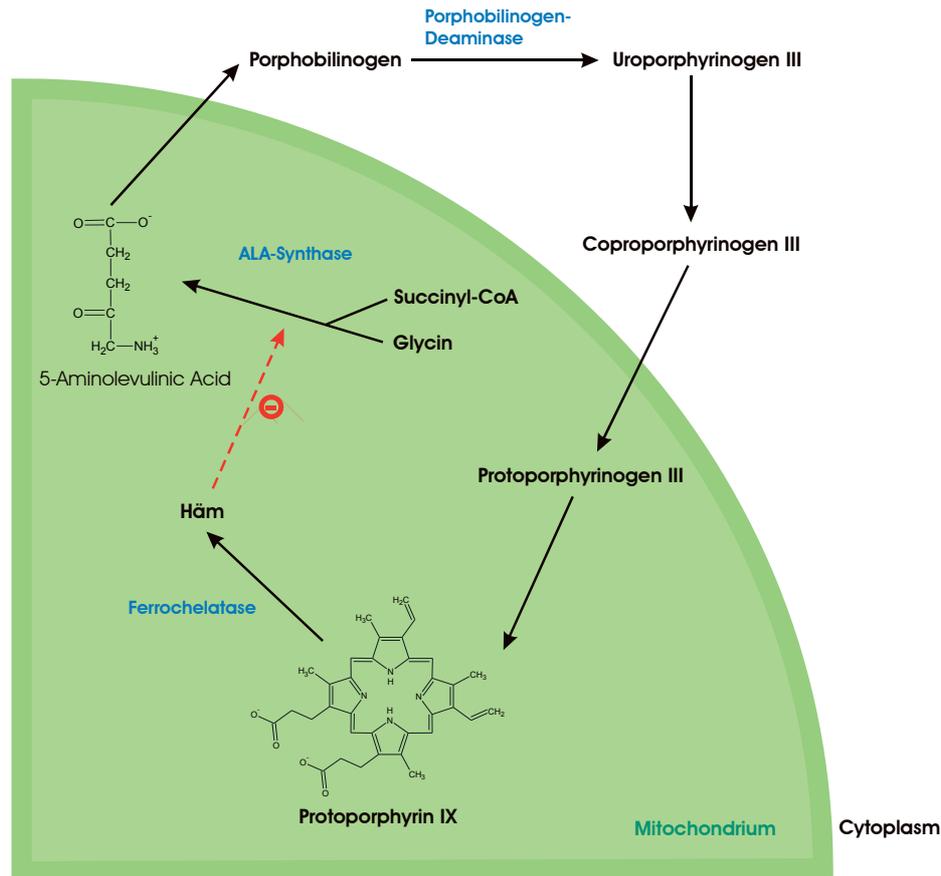


Abbildung 4: Schema der Häm-Biosynthese

Dem Patienten wird die körpereigene Substanz ALA – oder ein verestertes Derivat (z.B. ein Hexylester: h-ALA) in einer hohen Dosis verabreicht. In tumorösem Gewebe ist sowohl die Aufnahme von ALA durch die erhöhte Stoffwechselrate vermehrt als auch der Abbau durch die geringe Aktivität des Enzyms Ferrochelatase bzw. durch einen Defekt dieses Biokatalysators selbst gestört. Zudem ist die Konzentration von Eisen, einem wichtigen Baustein des Häms in Tumorzellen geringer [Oleinick et al.1998; Ackermann et al.1998] Daher reichert sich das aus ALA gebildete PpIX im Tumor stärker als in gesundem Gewebe an [Krieg et al., 2000].

Der dabei entstehende Kontrast von angereichertem PpIX zwischen tumorösem und gesundem Gewebe kann zur Fluoreszenz-Diagnostik genutzt werden.

Seit 1999 ist ALA in der Dermatologie bei der Behandlung von aktinischen Keratosen zugelassen und wird unter dem Namen Levulan® vertrieben. Die veresterten Formen Aminolävulinsäurehexylester (h-ALA, Hexvix®) und ebenso die Aminolävulinsäuremethylester (m-ALA, Metvix®) haben für einige Anwendungen die notwendigen Studien bis zur Zulassung absolviert.

Bis jetzt wird die photodynamische Therapie vor allem bei flächigen, oberflächlichen Tumoren z.B. bei Blasen Tumoren, Basalzelltumoren oder zentralen Bronchialkarzinomen angewendet. Denn nur bei diesen Tumoren ist eine ausreichende Anreicherung des Photosensibilisators im gesamten entarteten Areal gewährleistet.

Die Aminolävulinsäure hat sich seit der erstmaligen Beschreibung als Photosensibilisator in vielen Bereichen der Medizin etabliert [Kennedy et al., 1990]. Die Gabe von ALA ist sowohl oral als auch in topischer Applikation möglich. Bei topischer Applikation jedoch zeigt sich aufgrund der hydrophilen Eigenschaften nur eine geringe Penetrationstiefe. Das Molekül ALA besitzt durch seine polare Verbindung nur eine schlechte Diffusion durch die Zellmembran. Die Zellmembran selbst besteht aus einer Doppellipidschicht; einer Anordnung von Phospholipiden, deren unpolare Kohlenwasserstoffketten (Fettsäuren) mit einer polaren Kopfregion versehen sind (Abbildung 5).

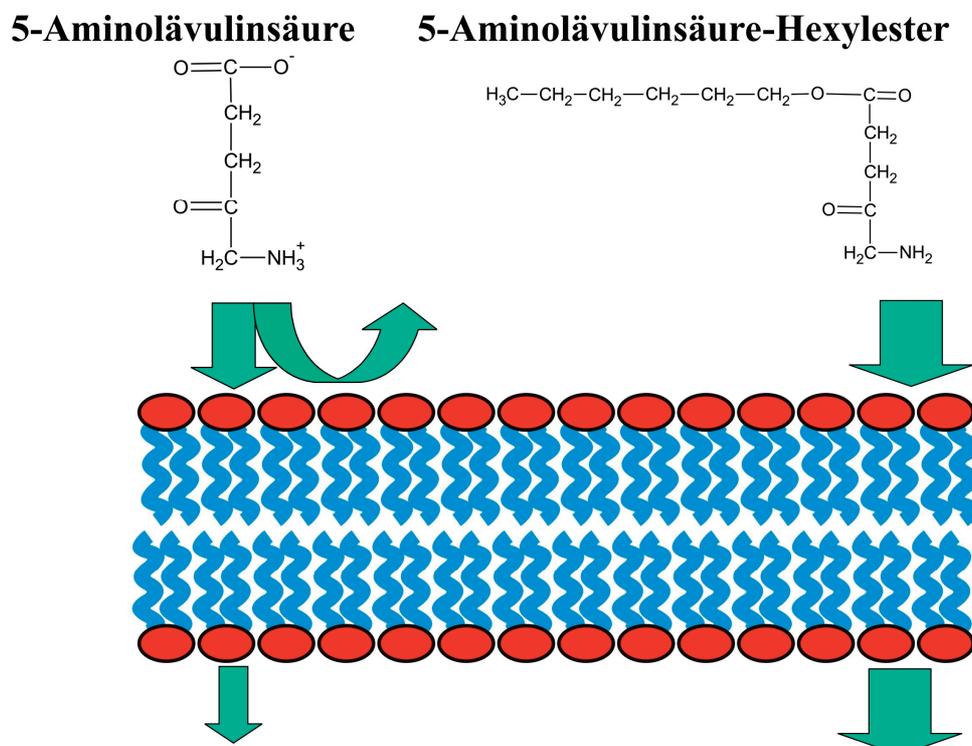


Abbildung 5: Aufnahme von Aminolävulinsäure (ALA) und Aminolävulinsäurehexylester (h-ALA) über die Zellmembran

Um die Diffusion von ALA zu ermöglichen, wird ALA mit Alkoholen verschiedener Kettenlänge versehen z.B. Aminolävulinsäure-hexylester, h-ALA (Abbildung 6).

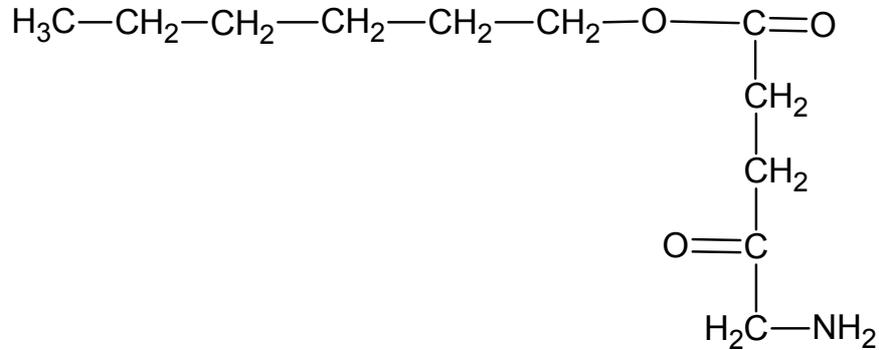


Abbildung 6: Strukturformel von Aminolävulinsäure-hexylester (h-ALA)

Die Esterreste werden in der Zelle von Esterasen wieder abgestalten, so dass ALA wieder den entsprechenden Stoffwechsel durchläuft [Lange et al, 1999].

Durch die verbesserte Permeabilität des Photosensibilisators werden eine erhöhte Penetrationstiefe sowie eine effektivere PpIX-Anreicherung erzielt [Peng et al., 1995].

C) Präparation der Eier

Für sämtliche Versuche mit dem HET-CAM-Modell wurden befruchtete Eier des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*) verwendet, die stets vom gleichen Züchter bezogen wurden.

Als erstes erfolgte die Reinigung der Eier mit warmem Wasser und einer antibakteriellen Seife. Anschließend wurden die Eier in einer Plastikhalterung mit dem spitzen Pol nach unten bei 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 70% inkubiert. In dieser Position bildete sich die Luftblase am spitzen Pol und nicht am stumpfen Pol aus. Nach 4 Tagen wurden die Eier gedreht und am spitzen Pol eröffnet. Durch die Drehung der Eier schwimmt der Embryo von unten langsam zum spitzen Pol nach oben. Dadurch kann die Verletzungsgefahr für den Embryo durch das Öffnen der Eier reduziert werden. Zum Öffnen der Eier erfolgte zunächst

die Reinigung des Präparationsbesteckes mittels Bacillol (Isoprop/ Alkohol/ Wassergemisch). Mit einer spitzen Pinzette wurde ein Loch in die Eischale gestochen, das mit Hilfe einer Präparierschere bis zu einem Durchmesser von circa 1 cm erweitert wurde. Danach wurde die Öffnung mit einer Petrischale (Durchmesser 3 cm) zum Schutz vor Austrocknung und Fremdkörpereinwirkung abgedeckt, und weiter inkubiert.

Am 6. Tag wurden die Öffnungen der Eier erweitert und auf die CAM - möglichst nicht direkt auf den Embryo - ein Silikonring platziert (Außendurchmesser: 10mm, Innendurchmesser: 8mm, Höhe: 1mm, Gewicht: ca. 40mg; hergestellt aus Schläuchen, die in der Gefäßchirurgie eingesetzt werden) (Abbildung 7). Der zuvor autoklavierte Ring diente zur lokalen Begrenzung sowohl der applizierten Zellsuspension eines definierten Volumens von 25µl MEM als auch des später pipettierten Photosensibilisators (3,8 mM h-ALA-Lösung, in 0,9 % Natriumchlorid gelöst). Wie unter 3.2.1 (Zellmaterial) beschrieben, wurde eine Zellsuspension hergestellt und davon 25 µl in den Innenraum des Silikonrings auf die CAM pipettiert. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Ei statt mit 25µl Zellsuspension mit 25µl MEM versehen. Für jede Probe wurde ein eigenes Ei verwendet. Nach der Beimpfung der Eier erfolgten nach weiteren 4 Tagen im Inkubator am 10. Tag die Anreicherungsmessungen auf der CAM.



Abbildung 7: präpariertes Ei, mit platziertem Silikonring und Tumorprobe (HEp-2 Zellen, 25µl Zellsuspension), [Hüttenberger, 2000]

3.1.3 Messapparatur – Spektrometersystem Spectra Cube

Das verwendete Spektrometersystem wurde in einen Versuchsaufbau integriert, der durch die Arbeitsgruppe Foth (Fachbereich Physik der TU Kaiserslautern) entwickelt worden war [Fercher,1999] und von Dirk Hüttenberger weiter optimiert worden ist [Hüttenberger, 2000]; dadurch war es möglich, die Anreicherungseigenschaften verschiedener Gewebe miteinander zu vergleichen.

Das Spectra Cube System (Applied Spectral Imaging Israel) besteht aus einem Sagnac-Interferometer und einer CCD-Kamera (Sony ILX 511, 2048 Pixel). Das von der jeweiligen Probe emittierte Licht wird über ein Linsensystem durch den Sagnac-Interferometer auf den Chip einer CCD-Kamera (Princeton SW-Kamera der Firma Phase, Princeton Instrument Inc. New Jersey, USA) abgebildet (Abbildung 8). Von jedem Bildpunkt des untersuchten Areals erhält man eine spektrale Information. Über einen Rechner, der mit der CCD-Kamera verbunden ist, bekommt man eine Abbildung der Zellprobe und die Speicherung der ermittelten Spektren. Mit Hilfe des Programmes SPCube (Avantes, Eerbeek, Niederlande) können die spectralen Informationen ausgelesen werden.

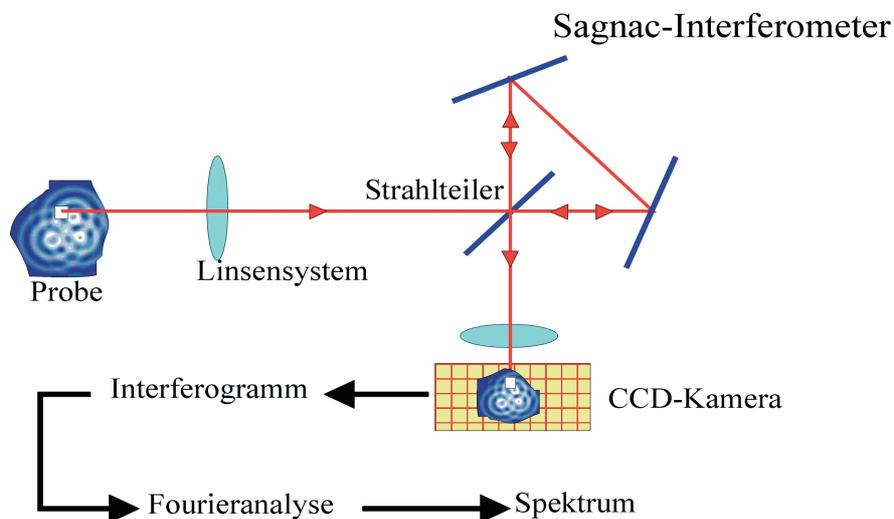


Abbildung 8 : Vereinfachtes Schema des Spectra Cube Aufnahmeverfahrens [Fercher, 1999]

3.1.4 Durchführung

Der Versuchsaufbau beim HET-CAM- Modell bestand aus einem beheizten Wasserbad mit einer Halterung für 10 Eier, einer blauen Lichtquelle und dem Spektrometersystem Spectra Cube (Applied Spectral Imaging, Israel). Das beheizte Wasserbad wurde mit Hilfe eines Thermostats konstant auf einer Temperatur von 37°C bis 38°C gehalten. Die Positionierung der Eier in einer vorgefertigten, drehbaren Halterung ermöglichte in einer Art Revolververfahren während der gesamten Messungen eine identische Ausrichtung zum Strahlengang. Zur Anregung der Fluoreszenz wurde als Lichtquelle eine High Power LED mit einer Leistung von 6mW bei 410nm verwendet, die in einem Abstand von 1cm zur Membran des CAM-Eies fixiert wurde (Abbildung 9)

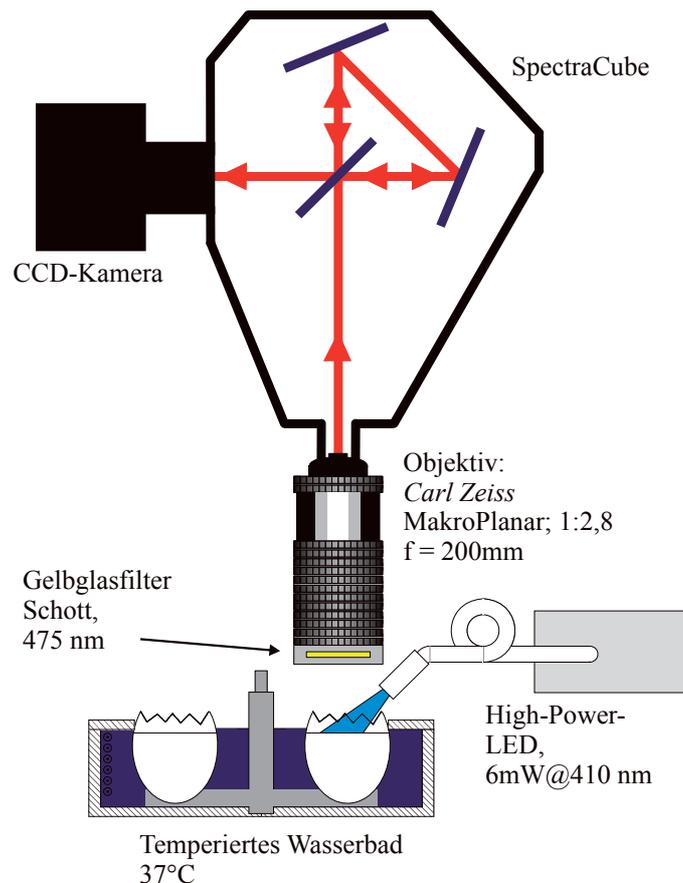


Abbildung 9: Schema des Versuchsaufbaus zur PpIX-Anreicherungsmessung

Nachdem die 10 Eier in den drehbaren Revolver so positioniert wurden, dass eine optimale Beleuchtung und Aufnahme der CAM erzielt werden konnte, wurde vor Beginn einer jeden Messreihe der zu messende Bereich mit weißem (Deckenbeleuchtung) und blauem Licht (High Power LED der Messapparatur) fotografiert. Mit Hilfe des Programmes Spectral Imaging war eine direkte Kontrolle des Zielareals möglich. Dabei wurde durch die so genannte *Region of Interest* (ROI) der Messbereich festgelegt. Die Größe und Position der ROI sollte den gesamten Silikonring, der auf die CAM platziert wird, abdecken. Dabei war es wichtig, dass die Eierschale nicht im Bereich der ROI lag, da diese PpIX-haltig ist, und somit zu verfälschten Messergebnissen geführt hätte. Mit Beginn der Messungen wurde der Messplatz in absoluter Dunkelheit gehalten. Unmittelbar vor Start der ersten Messung wurde in neun von zehn Silikonringen 20µl h-ALA (Norbert Lange, EPFL Lausanne, Schweiz; Firma *Photocure*, Norwegen) als Sensibilisator pipettiert. In den Silikonring des zehnten Eies wurde als Negativ-Kontrolle 20µl Medium (MEM) appliziert. Alle 60 Minuten erfolgte eine Aufnahme der ROI (Aufnahmedauer circa 60 Sekunden) von allen zehn Eiern, die über neun Stunden wiederholt wurden. Die zehnte Messung wurde 24 Stunden nach der Sensibilisierung durchgeführt (unter Anregung mit 410nm).

Im Anschluss an die letzte Messung wurden die untersuchten Areale auf der CAM nochmals unter Weiß- und Blaulicht fotografiert.

Abschließend erfolgte an allen Eiern ein Trypanblautest, der ebenfalls unter Weißlicht photographisch dokumentiert wurde.

Dazu wurden 20µl unverdünnte Trypanblau-Lösung in den Silikonring pipettiert, nach circa zehn Sekunden wieder abgezogen und mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Mit Hilfe dieses Trypanblautestes konnte festgestellt werden, ob Zellen der anfangs applizierten Suspension abgestorben waren (siehe auch 3.2.1 A) Zellzahlbestimmung).

3.2 In vitro-Modell

Zur Untersuchung der Anreicherungskinetik des Photosensibilisators In vitro wurde sowohl mit Tumorzellen aus Zellbanken als auch mit Zellen, die aus histologisch nachgewiesenen malignen Tumorproben gewonnen wurden, gearbeitet.

3.2.1 Aufbau des In vitro-Modells

Die mit der sensibilisierten Zellsuspension gefüllte Küvette wurde in einen geschlossenen, lichtdichten Behälter positioniert, der mit einer Lichtquelle und einer Lesefaser verbunden war. Bei der Lichtquelle handelte es sich um ein Leuchtdioden-array mit einer Leistung von 6mW und einer Wellenlänge von 410nm. Das emittierte Licht wurde dabei über eine 800µm Lesefaser, die senkrecht zur Einstrahlungsrichtung fixiert wurde, zu einem Beugungsgitter geleitet. Dort wurde das Licht innerhalb einer Ebene zerlegt und auf einer CCD-Zeile abgebildet, die wiederum mit einem Rechner verbunden war (Abbildung 10).

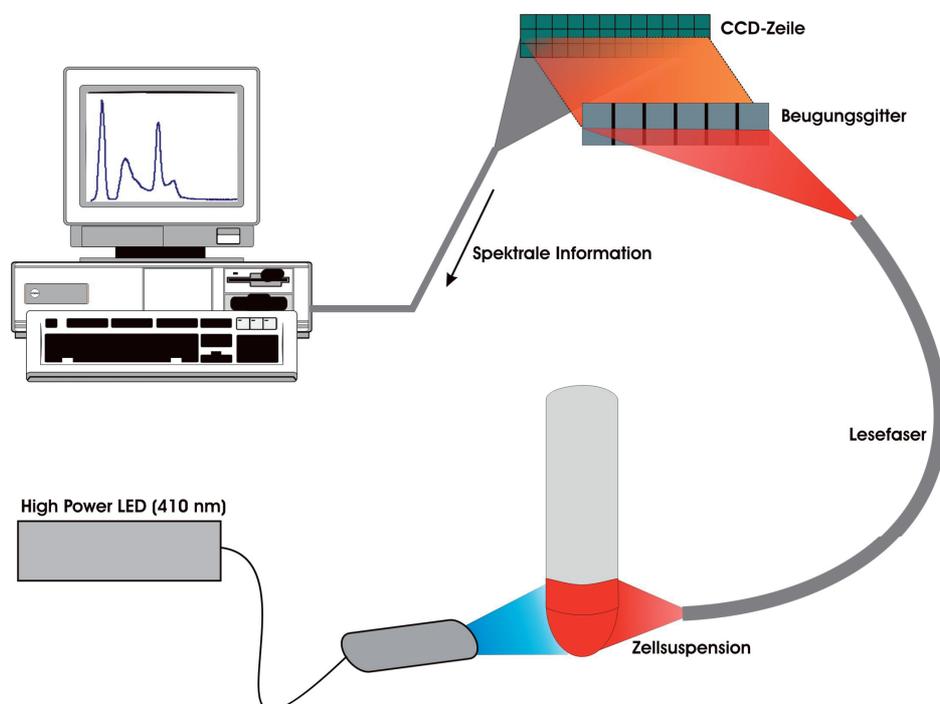


Abbildung 10: Vereinfachtes Schema des Versuchsaufbaus zur Messung des Emissionsspektrums sensibilisierter Zellen mit dem Faserspektrometer

3.2.2 Zellmaterial

Das für die Messungen verwendete Zellmaterial waren zum einen die von der Firma Cell Lines Service (Eppelheim) bezogene Zelllinie CLS-354, und zum anderen Zellen, die aus histologisch gesicherten malignen Gewebeproben gewonnen worden waren. Bei der CLS-Zelllinie handelt es sich um eine Plattenepithelkarzinom-Zelllinie. Bei den aus Gewebeproben kultivierten Zellen handelte es sich mit einer Ausnahme (M.Hodgkin-Lymphom) um Zellen aus Plattenepithelkarzinomen (Tabelle 1).

Die Einteilung in M.Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphom erfolgt nach morphologischen Kriterien, die nach der Kieler Klassifikation eingeteilt werden.

Die Zellkulturopflege wurde wie unter Abschnitt 3.1.2 durchgeführt. Die verwendete Messapparatur ist im Kapitel 3.2.1 erklärt und in Abbildung 9 vereinfacht dargestellt.

Patient	Alter	m/w	Tumorart	Lokalisation	TNM-Klassifikation	Histologischer Bericht
1	78 Jahre	m	PEC	Oberkiefer rechts	pT2,pNX,MX,G1-II	Gut differenziertes, infiltrierendes verhorntes PEC
2	76 Jahre	m	NHL	Parotis/Gaumen rechts	CD79a, CD3,CD5,CD20,Mib-1	Hochmalignes, B-zelliges Non-Hodgkin-Lymphom
3	70 Jahre	m	PEC	Mundboden links	pT1,pN0 (0/26),GII	Mittelgradig differenziertes teilweise verhorntes PEC
4	89 Jahre	w	PEC	Unterkiefer links	pT4,pN2b,Mx,GII	Hoch bis mäßig differenziertes verhorntes PEC
5	69 Jahre	m	PEC	Kinn paramedian links	pT4,pN3,pM1	Mäßig differenziertes, invasiv wachsendes, basaloïdes PEC

Tabelle 1: Kennzeichen der Tumore, aus denen Zellen gewonnen wurden

Abkürzung:

m: männlich

w: weiblich

PEC: Plattenepithelkarzinom

NHL: Non-Hodgkin-Lymphom

3.2.3 Durchführung der Messungen

Für die Messungen wurden die Zellrasen in den Kulturflaschen mit $0,1\text{mg/ml} = 0,4\text{mM}$ h-ALA-Lösung sensibilisiert und weiter bei 37C° und 5% CO_2 inkubiert. Nach der Sensibilisierung war es notwendig, die Zellen bis zur Messung im Dunkeln zu halten, da bereits kleine Lichtdosen photodynamische Effekte induzieren konnten. Zum Zeitpunkt der gewünschten Messung wurde die h-ALA-Lösung abgekippt und somit die Sensibilisierung beendet. Nach Spülen des Zellrasens mit HBSS-Pufferlösung wurden die Zellen abgeerntet (s. Abschnitt 3.1.2), und mit Hilfe der Zentrifuge wurde ein Zellpellet gewonnen, das in PBS-Puffer resuspendiert wurde. $100\mu\text{l}$ der Probe wurden in die Küvette der Apparatur pipettiert und anschließend spektroskopiert. Die Küvette wurde in den geschlossenen lichtdichten Behälter so positioniert, dass die Leuchtdiode die Probe vollständig durchleuchten konnte. Die abgestrahlte Fluoreszenz wurde mit Hilfe der Lesefaser auf der CCD-Zeile abgebildet.

Es wurden zwei Varianten des Versuchsablaufes gewählt. Zum einen erfolgte eine permanente Sensibilisierung, bei der die h-ALA-Lösung durchgehend über einen Zeitraum von 24 Stunden auf dem Zellrasen verblieb. Zum anderen erfolgte bei sensibilisierten Kulturflaschen nach unterschiedlichen Einwirkzeiten das Abkippen der h-ALA-Lösung. Anschließend wurde auf den Zellrasen normales Nährmedium gegeben. Diese Proben wurden im Anschluss daran wieder für unterschiedliche Zeiten (15 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten etc.) inkubiert und dann erst gemessen (Abbildung 11).

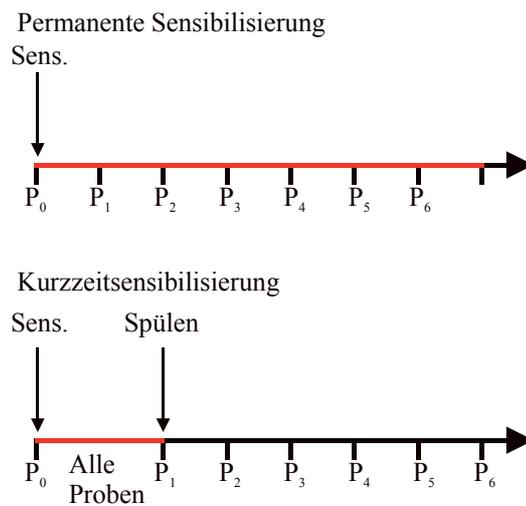


Abbildung 11: Versuchsablauf bei permanenter Sensibilisierung und Kurzzeitsensibilisierung mit h-ALA (P_i sind die Proben, die zum Zeitpunkt i gemessen wurden). Die rote Linie markiert die Dauer der Sensibilisierung.

Zur Überprüfung der linearen Abhängigkeit zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration wurde eine Messung mit verschiedenen Protoporphyrin - IX-Lösungen zum Vergleich durchgeführt. Von den Protoporphyrin - IX-Lösungen wurden Verdünnungsreihen erstellt in der Konzentration von $23\mu\text{g}$ PpIX in 1ml Dimethylsulfoxid (DMSO) sowie in den Konzentrationen $15\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$, $5\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$, $0,5\mu\text{g/ml}$, $0,25\mu\text{g/ml}$, $0,125\mu\text{g/ml}$, $0,1\mu\text{g/ml}$, $0,05\mu\text{g/ml}$. Von diesen unterschiedlichen PpIX- Konzentrationen wurden jeweils $100\mu\text{l}$ in der Messküvette spektroskopiert.

3.3 Autofluoreszenz Diagnostik

3.3.1 Aufbau des Faserspektrometers

Um die Autofluoreszenz Diagnostik in der Mundhöhle durchzuführen, wurde nach Vorgaben der Arbeitsgruppe Foth (Fachbereich Physik TU Kaiserslautern) von der Firma *Avantes* (Eerbeek, Niederlande) eine Fasersonde hergestellt, die autoklavierbar und wie ein Stift in der Mundhöhle einsetzbar war. Die Fasersonde, die in direkten Kontakt mit der Mundschleimhaut kommt, besteht aus 15 Beleuchtungsfasern und 4 Lesefasern, mit einem jeweiligen Durchmesser von 200 μm (Abbildung 12).

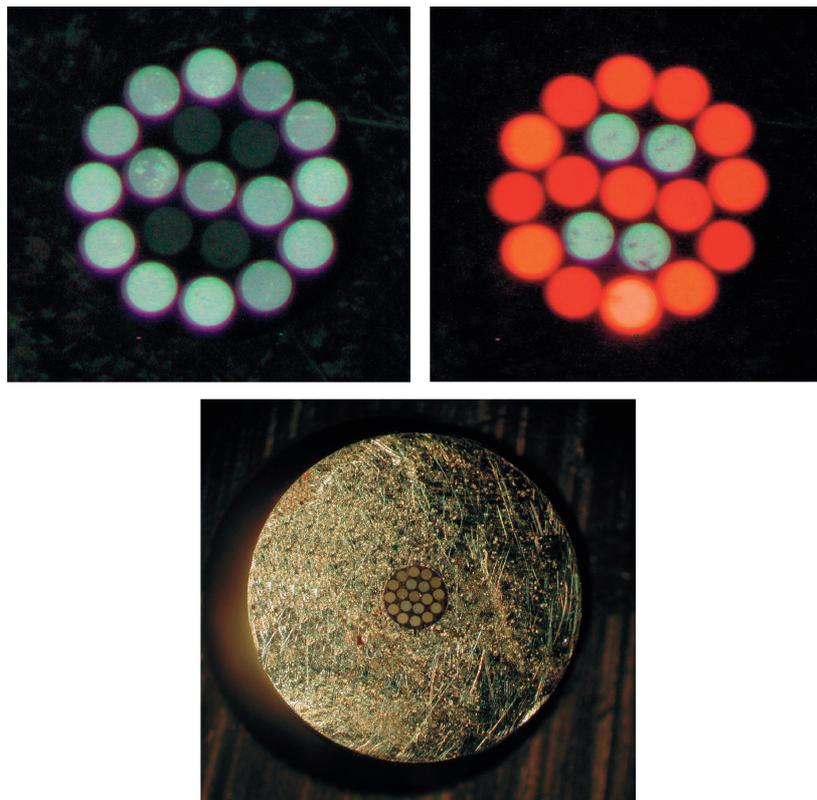


Abbildung 12: Fasersonde der Firma Avantes (Eerbeek, Niederlande). Oben links: Faseranordnung unter Weißlicht. Oben rechts: Beleuchtungsfasern mit rotem Licht ausgeleuchtet (5-fache Vergrößerung). Bild unten: Messfaser unter 2,5-facher Vergrößerung.

3.3.2 Patienten

Von Januar 2005 bis Dezember 2005 erfolgte an acht Patienten (vier Frauen, vier Männer), bei denen die pathologisch - anatomische Begutachtung der Probeexzision am Institut für allgemeine und spezielle Pathologie; Direktor: Prof. Dr. Klaus Remberger am Universitätsklinikum des Saarlandes eine maligne Erkrankung der Mundschleimhaut bestätigte, eine enorale Fluoreszenzmessung.

Die Patienten wurden über die Fluoreszenz-Diagnostik aufgeklärt, und um ihre Einverständnis zu den enoralen Messungen gebeten.

Bei den acht Patienten (Tabelle 2) handelte es sich um 4 weibliche Patienten im Alter von 51-85 Jahren (Durchschnittsalter 62,75) und 4 männliche Patienten im Alter von 49-71 Jahren (Durchschnittsalter 59,5).

Patient:	Alter:	m/w	Tumor-Art	Lokalisation	TNM-Klassifikation	Histologischer Bericht
1	48 Jahre	m	PEC	Mundboden	pT1,pN0,R0,GII	Mittelgradig differenziertes, geringgradig verhorntes PEC
2	55 Jahre	w	PEC	Retromolar rechts	pT1,pN0(9),MX,GII	Mäßig differenziertes, infiltrierendes PEC
3	70Jahre	m	PEC	Mundboden	pT1,pN0(0/26),GII	Mittelgradig differenziertes, teilweise vorhorntes PEC
4	58 Jahre	w	PEC	Unterlippe	P T1,pN0(0/19),MX, GII	Mäßig differenziertes , z.T. basaloid infiltrierendes, wenig verhorntes PEC
5	50 Jahre	w	PEC	Mundboden/Zungenrand	pT1,pN0(0/17),MX, GII-III	Mäßig bis wenig differenziertes, in filtrierend verhorntes PEC
6	54 Jahre	m	PEC	Retromolar rechts	pT1,pN2b,M0,R0, G II-III	Oberflächlich invasiv wachsendes, mäßig differenziert, nur gering verhorntes PEC
7	62 Jahre	m	NHL	Oberkiefer links	MiB1,LCA,CD20,CD 3	diffuses, großzelliges B-Zell-Non-Hodgkin- Lymphom
8	84 Jahre	w	PEC	Wange rechts/ Alveolarfortsatz rechts	pT2,pN2a,M0,G I-II	hoch bis mäßig differenziertes, mikroinvasives PEC

Tabelle 2: Kennzeichen der Patientinnen / Patienten , bei denen enorale Fluoreszenz-Messungen durchgeführt worden sind. Erklärung der Abkürzungen s. Kapitel 3.2.2

3.3.3 Durchführung

Mit Einverständnis der Patientinnen und Patienten erfolgten nach enoraler Fotodokumentation faserspektrometrische Messungen in einem völlig abgedunkelten Raum. Es wurden enoral immer zwei Messungen durchgeführt: eine Messung von der klinisch sichtbaren und histologisch bestätigten tumorösen Mundschleimhautrekrankung und kontralateral eine Messung von klinisch gesundem Gewebe (Abbildung 14 bis 21).

Die erfassten Spektren wurden in einem Graphen dargestellt und gesichert.



Abbildung 14: Histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom im anterioren Mundboden (Patient Nr.1)



Abbildung 15: Histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom retromolar rechts (Patient Nr.2)



Abbildung 16: Histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom sublingual links (Patient Nr.3)



Abbildung 17: Histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom der Unterlippe (Patient Nr.4)



Abbildung 18 : Histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom des Mundbodens und des Zungenrandes links (Patient Nr. 5).



Abbildung 19: Histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom retromolar rechts (Patient Nr.6).

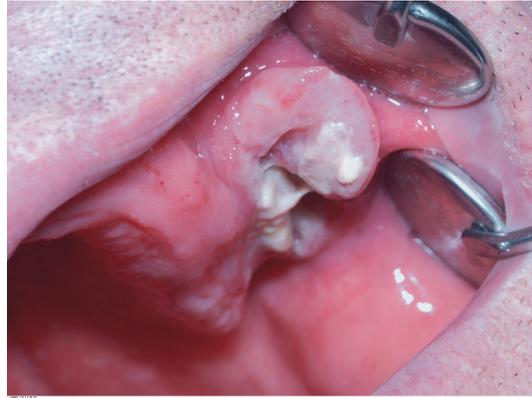


Abbildung 20: Histologisch gesichertes Non-Hodgkin-Lymphom im Oberkiefer links. (Patient Nr. 7).



Abbildung 21: Histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom der Wange und des Alveolarfortsatzes rechts (Patient Nr.8).

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Photodynamischen Diagnostik auf der CAM

Bei der PDD auf der CAM zeigte sich, dass auch in gesundem Gewebe eine Anreicherung von h-ALA stattfand, da Porphyrine in jeder Zelle – wenn auch nur in geringer Konzentration – vorkommen. Abbildung 22 zeigt links den Intensitätsverlust bei tumorösen RPMI – Zellen (humane Nasenscheidewand-karzinomzelllinie, RPMI 2650) und rechts den Intensitätsverlust bei sensibilisiertem Kulturmedium (RPMI-Medium) ohne Zusatz von Tumorzellen. Ohne Tumor (rechts) ist eindeutig eine Anreicherung sowohl nach erster Applikation von h-ALA als auch nach zweiter Applikation drei Stunden später zu erkennen; sie ist jedoch deutlich geringer als bei Tumorzellen (linkes Diagramm). Identisch bei gesunden wie bei tumorösen Zellen ist der Anstieg der Intensität nach der zweiten Gabe von h-ALA drei Stunden später. Im linken Diagramm von Abbildung 22 zeigt sich die Anreicherung von h-ALA bei tumorösen RPMI-Zellen wesentlich stärker; die Intensität liegt nach drei Stunden bei 17,5 [b.E.] nach sechs Stunden zeigt sich eine Intensität von 37,5 [b.E.]. Eine Doppelapplikation bewirkt somit eine Verdoppelung der Intensität.

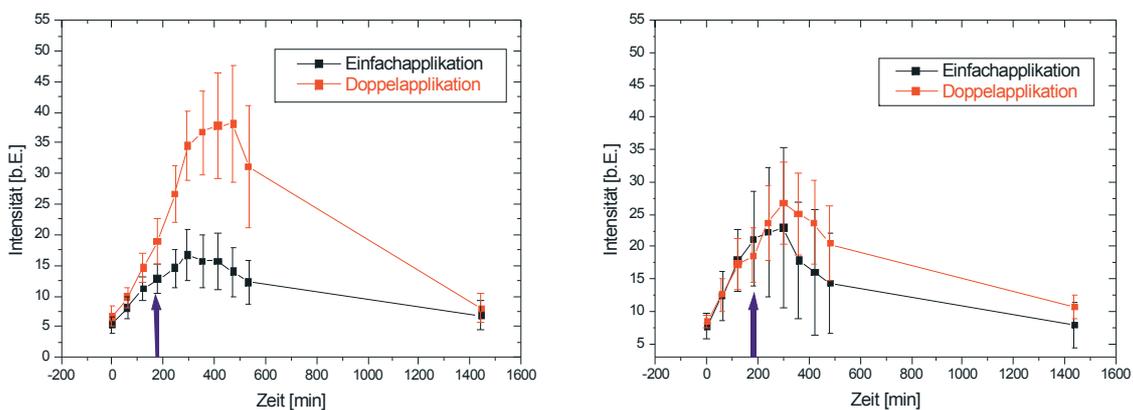


Abbildung 22: Intensitätsverlauf nach der Applikation von h-ALA auf RPMI-Zellen (humane Nasenscheidewand - karzinomzelllinie, RPMI 2650) links und rechts auf RPMI Medium (CAM). Bei beiden Messreihen erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$ die erste h-ALA-Gabe; drei Stunden später eine zweite h-ALA-Gabe (blauer Pfeil).

Erklärung [b.E.]: Das Spektrometer ist nicht auf eine bestimmte vergleichbare SI – Einheit geeicht. Die Werte, die ermittelt wurden sind aber untereinander vergleichbar und die Intensitäten können bei stets gleicher Parameterwahl in Relation gesetzt werden.

Beim Vergleich zweier Proben aus Plattenepithelkarzinomen ist auch nach der zweiten Applikation drei Stunden nach der ersten h-ALA-Gabe ein steiler Anstieg der Graphen in beiden Diagrammen klar zu erkennen (Abbildung 23).

In beiden Fällen zeigt sich drei Stunden nach der zweiten h-ALA-Applikation ein lokales Hauptmaximum, das anschließend zwei Stunden lang steil und danach flach abfällt. Es zeigt sich ebenfalls nach der doppelten h-ALA-Gabe eine Erhöhung der Intensität um den Faktor 2.

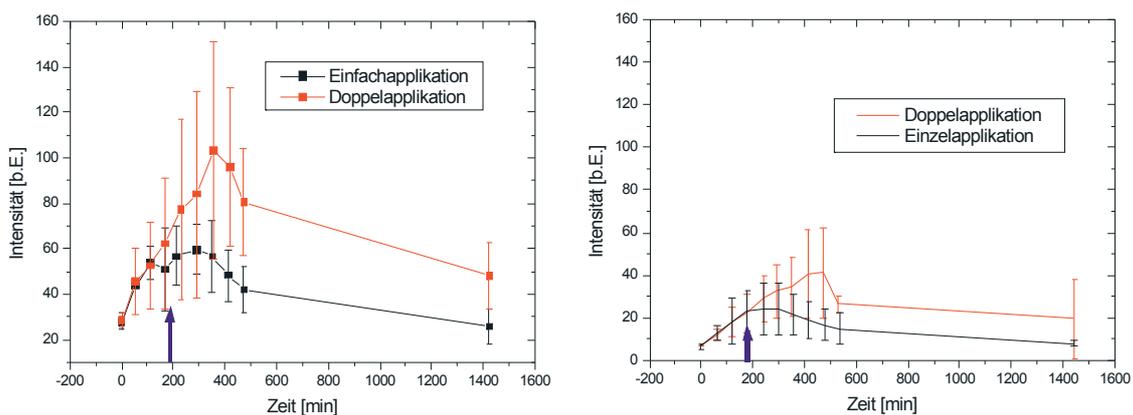


Abbildung 23: Intensitätsverlauf nach der Applikation von h-ALA auf Zellen eines Plattenepithelkarzinoms. Der schwarze Graph zeigt die Einfachapplikation, der rote Graph die Doppelapplikation. Der blaue Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der zweiten h-ALA-Gabe.

Der Graph der Einfach-Applikation zeigt in beiden Diagrammen ein relativ flaches Plateau, das nach ungefähr vier Stunden erreicht ist.

In Abbildung 24 ist dargestellt wie der Verlauf der Anreicherung in HEp-2 –Zellen im Vergleich zur Anreicherung in MEM-Medium ohne Tumorzellen ist. HEp-2 Zellen sind Zellen einer humanen epidermalen Larynxkarzinomzelllinie. Im linken Diagramm ist ein deutlicher Anstieg des Graphen nach der Applikation von h-ALA auf HEp-2-Zellen zu erkennen; nach der zweiten Gabe steigt er nochmals. Das Maximum des Anstiegs nach Einfachapplikation ist nach circa 4 Stunden erreicht. Das Maximum nach Doppelapplikation ist nach sechs Stunden zu erkennen.

Mit sensibilisiertem MEM-Medium zeigt sich zwar ein Anstieg, der aber nicht sehr ausgeprägt ist (rechtes Diagramm). Auch nach der zweiten Applikation auf dem CAM-Gewebe zeigt sich eine leicht gesteigerte Effizienz in der Anreicherung von PpIX, die jedoch innerhalb der Fehlerbreite nicht signifikant ausfällt.

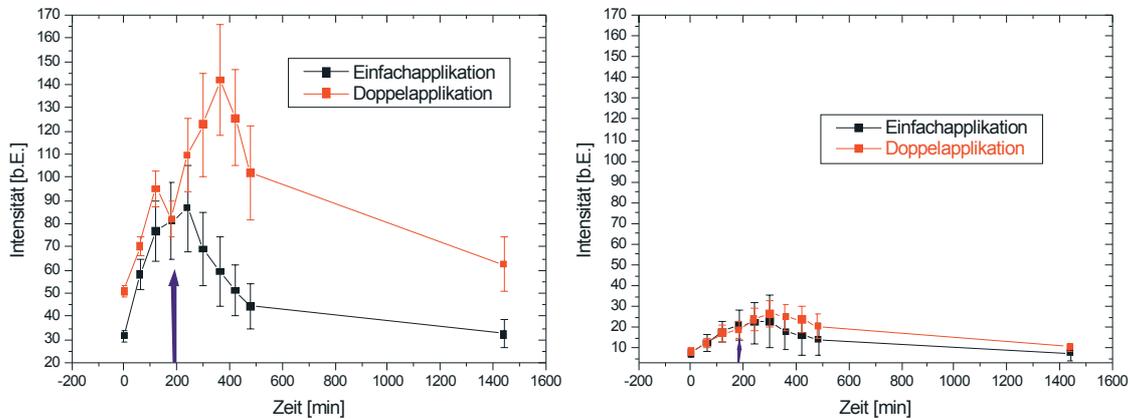


Abbildung 24: Intensitätsverlauf nach einfacher (schwarzer Graph) und doppelter (roter Graph) h-ALA-Applikation. Links wurden sensibilisierte HEP-2 Zellen verwendet. Rechts sensibilisiertes MEM-Medium (CAM) ohne Tumorzellen. Der blaue Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der h-ALA-Applikation.

Die Untersuchung der Anreicherung auf CLS-Zellen (Plattenepithelkarzinom-Zelllinie) zeigte vergleichbar zu HEP-2-Zellen von Beginn der Sensibilisierung an einen steilen Anstieg, der nach der zweiten Applikation von h-ALA über weitere drei Stunden anhielt. Das lokale Hauptmaximum der Einfachapplikation war nach ungefähr vier, das der Doppelapplikation nach circa sieben Stunden erreicht. Im Vergleich zu den anderen Tumorzellen zeigten die CLS-Zellen die höchste Intensität (Abbildung 25).

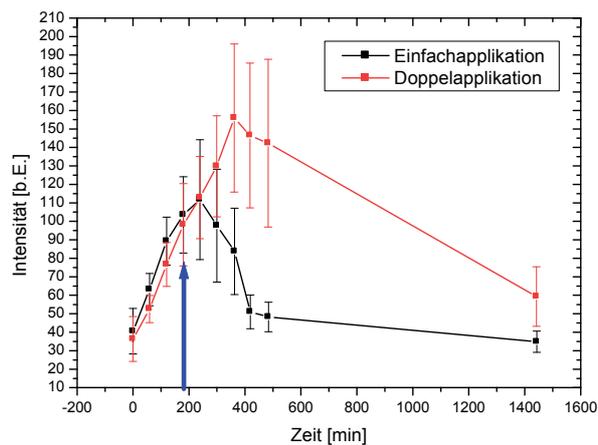


Abbildung 25: Anreicherungskurven bei der Verwendung von CLS-Zellen (Plattenepithelkarzinom-Zelllinie). Das Angebot an h-ALA wurde von CLS-Zellen effektiver umgesetzt als andere Tumorzellen. Der blaue Pfeil markiert den Zeitpunkt der zweiten h-ALA-Applikation.

In Abbildung 26 ist ein mit Tumorzellen beimpftes Ei im Wärmebad drei Stunden nach Photosensibilisator-Applikation unter Anregung mit blauem Licht zu sehen. Im Silikonring ist eine deutliche Rotfluoreszenz erkennbar.

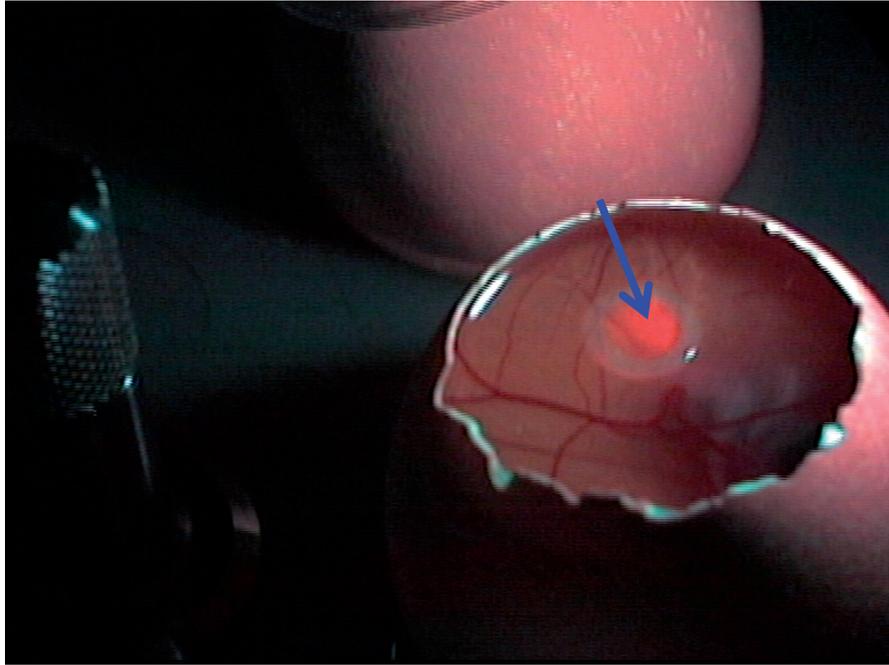


Abbildung 26: Mit Tumorzellen beimpftes Hühnerei drei Stunden nach Applikation von h-ALA Applikation (0,8mg/ml; 20 μ l) unter blauem Anregungslicht. Im Silikonring ist eine deutliche Rotfluoreszenz erkennbar (Pfeil).

Abbildung 27 zeigt eine Makroaufnahme eines Silikonrings mit Tumorzellen unter Weißlicht (links) und unter Blaulicht (rechts) im direkten Vergleich. Deutlich zu erkennen sind die Gefäße der CAM. Im rechten Bild zeigt sich eine differenzierte Rotfluoreszenz im Tumorareal. Im umgebenden Normalgewebe ist außer der Autofluoreszenz keine Anreicherung sichtbar.

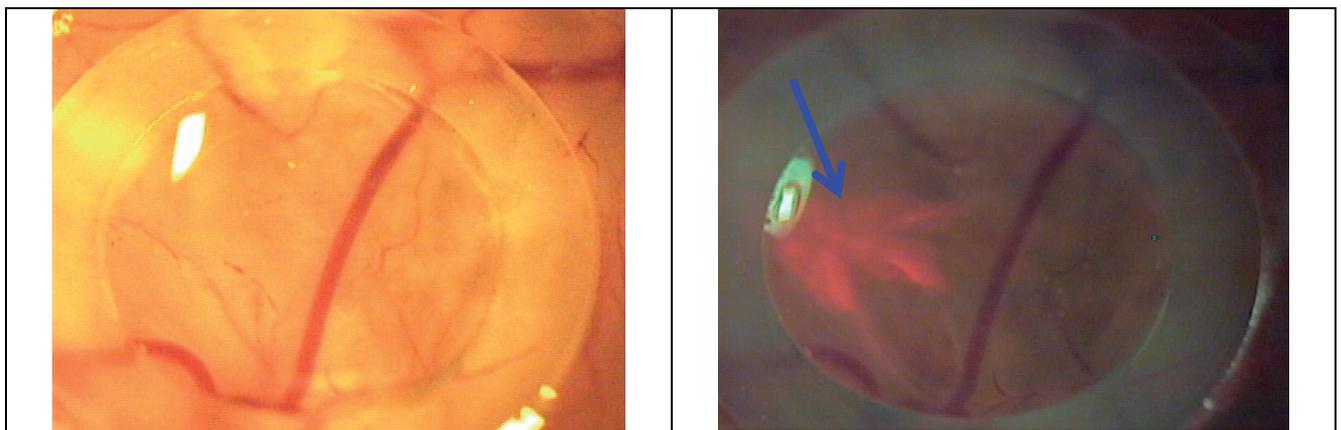


Abbildung 27: CAM mit Tumorzellen unter Weißlicht (links) - und Blaulichtaufnahme (rechts) 3 Stunden nach der Applikation von h-ALA (0,8mg/ml, 20 μ l). Rechts ist durch die Rotfluoreszenz klar die Anreicherung von h-ALA im Tumorbereich zu sehen. Links und rechts sind deutlich die Gefäße der CAM zu erkennen.

4.2 Photodynamische Diagnostik In vitro an Tumorzellen

Die Messungen zur Linearität der Fluorophorkonzentration und Fluoreszenzintensität an verschiedenen Protoporphyrin IX-DMSO - Lösungen (s. Kapitel 3.2.4) ergaben verschiedene Fluoreszenzspektren. Abbildung 28 zeigt links die Zelllinie CLS, die eine Minute mit Protoporphyrin IX sensibilisiert wurde. Im Vergleich dazu ist im rechten Graphen reines Protoporphyrin IX in DMSO gelöst. 180 min. nach der Sensibilisierung wurde sowohl von Protoporphyrin IX in DMSO als auch von CLS Messungen erstellt.

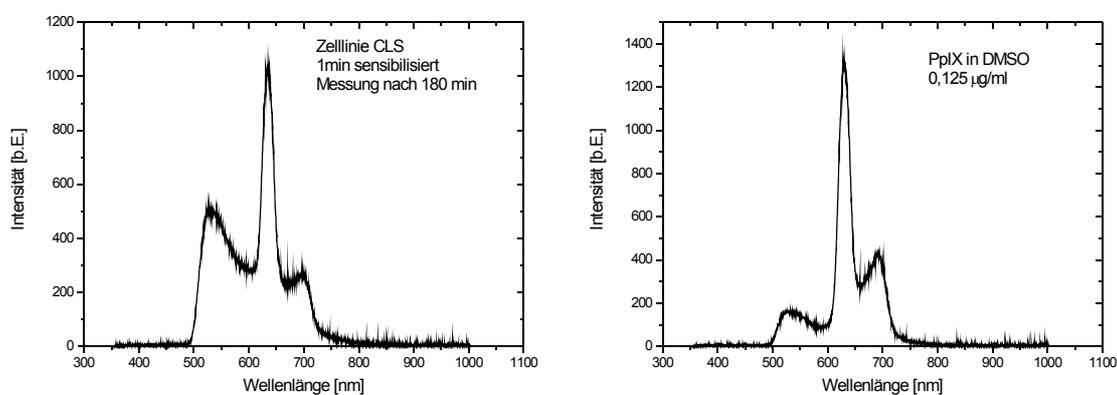


Abbildung 28: Fluoreszenzspektrum von Protoporphyrin IX angereichert in der Zelllinie CLS (links) nach h-ALA Gabe und in DMSO gelöst (rechts).

Auffällig bei den beiden Graphen ist, dass die Hauptmaxima circa 4 nm gegeneinander verschoben sind. Dieses Phänomen ist bei vielen Fluorophoren zu sehen, und hängt stark vom verwendeten Lösungsmittel ab. Die Messungen der unterschiedlichen PpIX-Lösungen sind daher nur als Abschätzung zu sehen. Eindeutig ist bei 635 nm ein Hauptmaximum zu erkennen; bei 540 nm (der Autofluoreszenz) und circa 700 nm (Fluoreszenz von PpIX) treten schwächere Nebenpeaks auf. Bei den intrazellulären Messungen (CLS-Zellen) ist im grünen Spektralbereich das PpIX-Signal von der Autofluoreszenz der Zellen überlagert.

Die Messungen erfolgten im linearen Bereich, in dem die Konzentration von Protoporphyrin IX annähernd proportional zur Intensität ist (Abbildung 29).

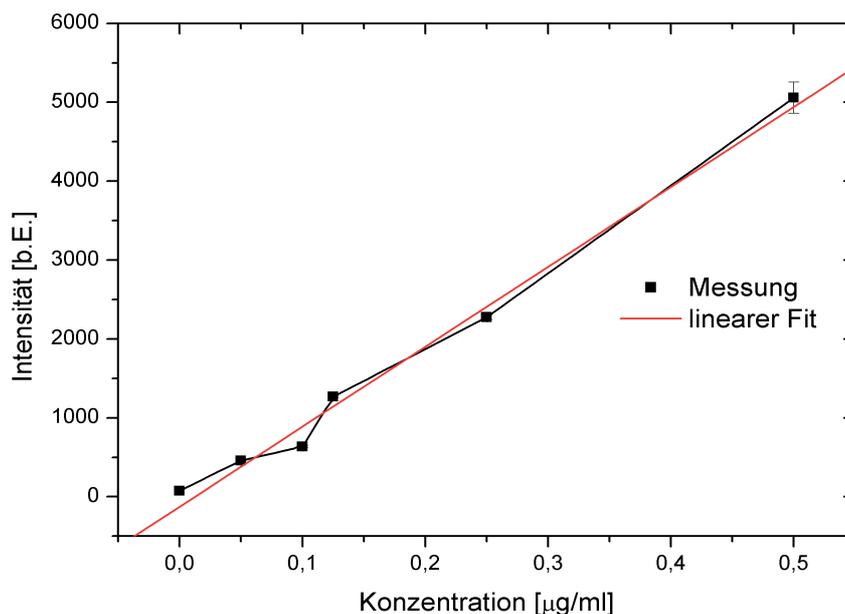


Abbildung 29: Die Konzentration von Protoporphyrin IX hängt linear mit der Intensität zusammen.

Da die Zellzahlen Z im bekannten Messvolumen V ($V = 0,1$ ml) bei jeder Messung bestimmt wurden, kann die Zahl N der PpIX-Moleküle pro Zelle abgeschätzt werden. Diese Anzahl an PpIX-Molekülen ergibt sich aus der Formel:

$$N = \frac{(I_{\text{gemessen}} + 124) \cdot V}{1,013 \cdot 10^{10} \frac{\text{ml}}{\text{g}} \cdot Z \cdot M_G} \cdot N_A$$

Die gemessene Intensität (I_{gemessen}), das Molekulargewicht von Protoporphyrin IX ($M_G = 606$ g/mol) und der Avogadro-Zahl (N_A) werden in die Formel eingesetzt und die Graphen auf die äquivalenten Konzentrationswerte kalibriert. In den erstellten Graphen sind Messungen zum Vergleich aufgetragen (Abbildung 30). Proben, die über den gesamten Messzeitraum sensibilisiert wurden, zeigten einen leichten Abfall nach 24 Stunden. Auffällig war, dass sich nach bereits einminütiger Einwirkzeit ein zwar verzögerter Anstieg zeigte, aber etwas später ein Maximum zu etwa gleich hohen Werten erreicht wurde. Bei einer Einwirkzeit von fünf Minuten zeigte sich ein deutlich höherer Wert als bei der permanenten Anreicherung.

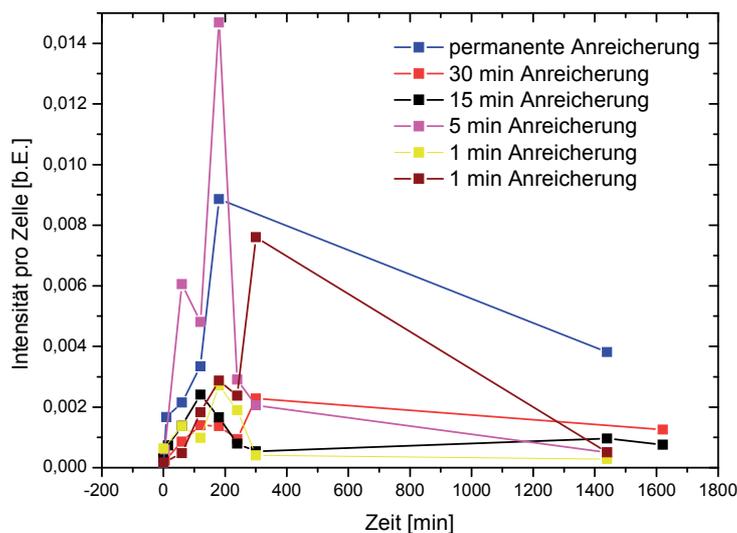


Abbildung 30 : Intensitätsverlauf pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit. Es erfolgte eine Anreicherung mit einminütiger, fünfminütiger, 15-minütiger und 30-minütiger Einwirkzeit und permanenter Anreicherung. Diese Messungen erfolgten mit der Zelllinie *CLS 354* und einer Konzentration von 0,4 mM h-ALA.

Das Molekulargewicht von kristallinem Hydrochlorid – h-ALA beträgt $M_G = 252$ g/mol. Daraus ergibt sich eine Molarität von 0,4 mM. Im vorgegebenen Volumen von 0,1 ml werden den Zellen also 40 nmol h-ALA bereitgestellt. Aus acht mol ALA wird ein mol PpIX gebildet [Voet D., Voet J.G., 1992] Das bedeutet, dass in der gesamten gemessenen Zellsuspension theoretisch 5 nmol PpIX entstehen. Die Anzahl der PpIX-Moleküle pro Zelle kann mit der Formel bestimmt werden:

$$N_{\max} = \frac{c \cdot V}{8} \cdot N_A$$

Zellzahl

Beim Vergleich der Umwandlung von h-ALA zu PpIX zeigte sich, dass lediglich 18 Promille der theoretisch zu erwartenden Menge an PpIX umgesetzt wurden. Es war deutlich zu sehen, dass sowohl bei permanenter Anreicherung als auch bei einer Sensibilisierung von 30 Minuten die Effizienz erst nach 24 Stunden erreicht wurde (Abbildung 31).

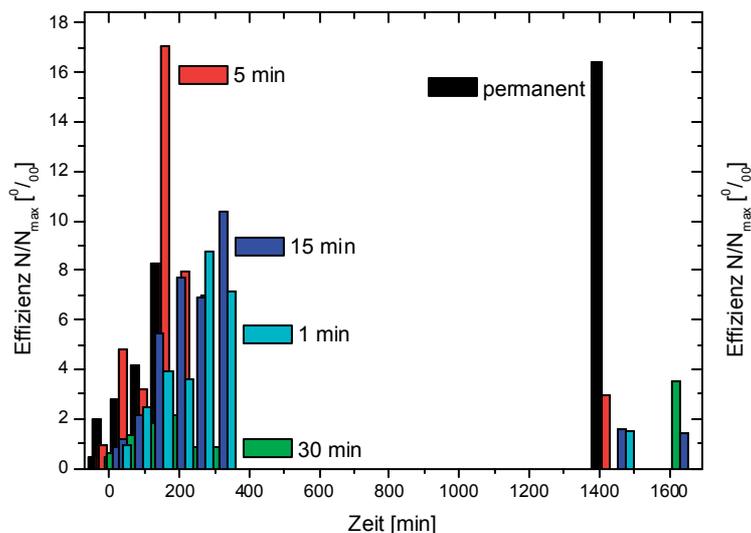


Abbildung 31: Errechnete Effizienz aus der Anzahl an gebildeten PpIX Molekülen und theoretisch möglicher Zahl N_{\max} bei unterschiedlicher Sensibilisierungszeit (eine Minute, fünf Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten und permanent/ durchgehend). Nach der jeweiligen Sensibilisierung wurde zum Zeitpunkt null, nach 15 Minuten, nach 30 Minuten, nach 60 Minuten, nach 120 Minuten, nach 180 Minuten, nach 240 Minuten, nach 300 Minuten, nach 360 Minuten sowie nach 1440 Minuten mit Hilfe der gebildeten Anzahl an PpIX-Moleküle die Effizienz errechnet.

Wie für die CLS-Zellen konnten die entsprechenden Formeln auch für die Zellen, die aus Gewebeproben gewonnen worden waren, angewendet werden.

An Patient Nummer 3 konnte die Autofluoreszenz – Messung durchgeführt werden; auch konnten aus der Gewebeprobe gewonnene Zellen zur In vitro - Messung verwendet werden.

Es wurde eine Tabelle (Tabelle 3) mit genauen Daten zu jedem Zeitpunkt der Messung (zum Zeitpunkt Null, nach 15 Minuten, einer Stunde, zwei Stunden, drei Stunden, vier Stunden sowie nach 24 Stunden) erstellt (Abbildung 32).

Tabelle 3: Anhand von Patient Nummer 3 eine Darstellung der Zeitangabe und dazu die Intensität bei 635nm, die zu diesem Zeitpunkt gewonnene Zellzahl, die Intensität pro Zelle, die Anzahl an gebildetem PpIX-Molekülen, die rechnerisch mögliche Anzahl an PpIX-Molekülen und die errechnete Effizienz in [%].

Zeit	Intensität bei 635nm	Zellzahl	Intensität/Zelle	PpIX-Mol./Zelle	Mögl PpIX/Zelle	Effizienz [%]
0	464	7375	0,06	$7,79 \cdot 10^8$	$4,03 \cdot 10^{11}$	1,93
15	590,7	12500	0,05	$5,59 \cdot 10^8$	$2,38 \cdot 10^{11}$	2,35
60	642	8625	0,07	$8,68 \cdot 10^8$	$3,44 \cdot 10^{11}$	2,52
120	954,4	8250	0,12	$1,28 \cdot 10^9$	$3,60 \cdot 10^{11}$	3,55
180	747,9	12625	0,06	$6,75 \cdot 10^8$	$2,35 \cdot 10^{11}$	2,87
240	1125,3	9250	0,12	$1,32 \cdot 10^9$	$3,21 \cdot 10^{11}$	4,11
1440	1413	6375	0,22	$2,36 \cdot 10^9$	$4,66 \cdot 10^{11}$	5,06

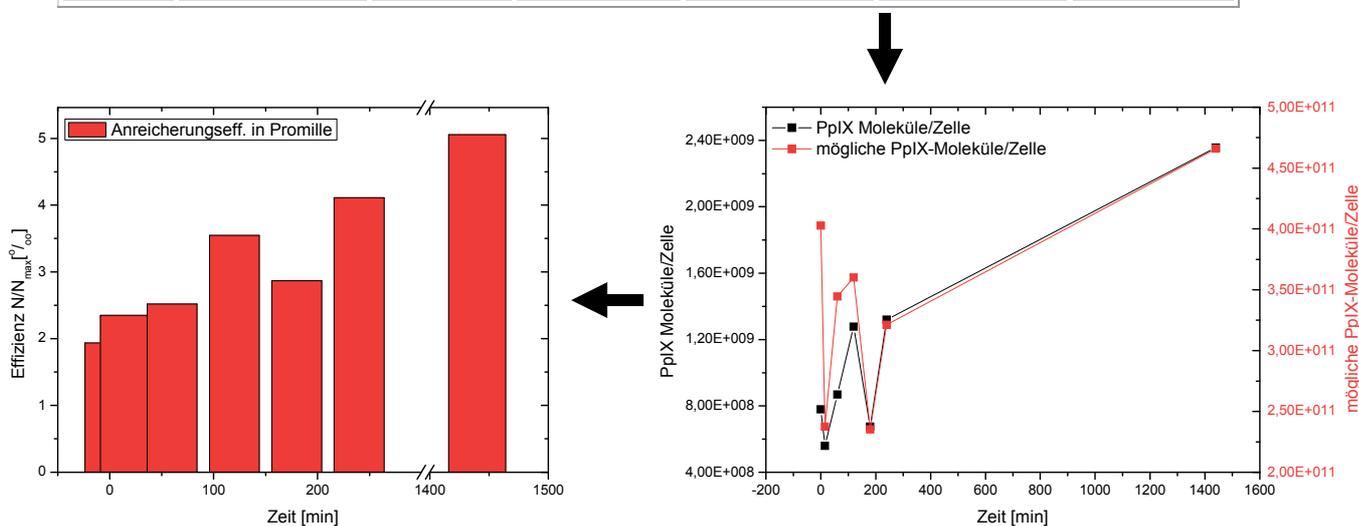


Abbildung 32: Darstellung von Intensität, Zellzahl, Intensität pro Zelle, die PpIX-Moleküle pro Zelle, die möglichen PpIX-Moleküle pro Zelle, sowie die Effizienz in Promille zu jedem gemessenen Zeitpunkt. Bei Patient Nummer 3 sind auf der rechten Seite die gebildeten PpIX-Moleküle pro Zelle (schwarz) und die möglichen PpIX-Moleküle pro Zelle (rot) gezeigt. Auf der linken Seite ist die Anreicherungs-effizienz dargestellt. Es zeigt sich, dass mit Ausnahme zur Messung nach 180 Minuten eine klare Zunahme der Anreicherungs-effizienz vom Zeitpunkt Null bis zur Messung nach 1440 Minuten zu erkennen ist.

In einer Tabelle wurde die errechnete Anzahl an gebildeten PpIX-Molekülen pro Zelle dargestellt (Tabelle 33). Es sind die errechnete Zellzahl und die Anreicherungs-effizienz in Promille ersichtlich. Die letzte Spalte gibt den Zeitpunkt der Messung (in Minuten) an.

Patienten-probe	PpIX-Moleküle/Zelle	Zellzahl	Anreicherungs-effizienz [‰]	Zeitpunkt max. Anreicherung [min]
Patient 1.1	$2,7 \cdot 10^8$	118500	11	90
Patient 1.2	$5,4 \cdot 10^8$	19200	4	30
Patient 1.3	$2,6 \cdot 10^8$	72000	6	120
Patient 2	$1,5 \cdot 10^9$	10125	5	180
Patient 3.1	$1,3 \cdot 10^9$	9250	4	240 (nach15)
Patient 3.2	$1,2 \cdot 10^9$	11875	5	240 (nach15)
Patient 4.1	$2,1 \cdot 10^8$	40000	3	360
Patient 4.2	$6,8 \cdot 10^8$	19000	4	360 (nach240)
Patient 4.3	$1,5 \cdot 10^9$	12000	6	45
Patient 5.1	$7,2 \cdot 10^8$	37125	9	300 (nach180)
Patient 5.2	$2,9 \cdot 10^8$	77000	8	120 (nach30)
Patient 5.3	$4,8 \cdot 10^7$	360000	4	180
Patient 5.4	$8,6 \cdot 10^7$	304000	9	180

Tabelle 33: Auflistung von PpIX-Molekülen pro Zelle, Zellzahl, Anreicherungs-effizienz und Zeitpunkt maximaler Anreicherung bei Patient Nummer 1 bis 5 . Wobei von Patient 1 drei Messungen von Patient 2 nur eine Messung, von Patient 3 zwei Messungen, Patient 4 drei Messungen und Patient 5 vier Messungen durchgeführt wurden. Bei den Zeitangaben bedeutet die in Klammer gesetzte Zeit, dass zu diesem Zeitpunkt der Photosensibilisator von den Zellen „abgekippt“ wurde.

4.3 Ergebnisse der Photodynamischen Diagnostik anhand der Autofluoreszenz im Mundraum

Die in der Mundhöhle der Patienten aufgenommenen Spektren wurden untereinander verglichen und verrechnet. Zwei der Messungen gingen nicht in die Mittelung der Spektren ein, da der eine Patient auf dem gesamten Areal eine starke Fluoreszenz bei 632 nm aufwies, was kein typisches Signal darstellt; der andere Patient zeigte klinisch neben der tumorösen Mundschleimhautveränderung eine Leukoplakie. Auffällig bei dem Patienten mit der starken Fluoreszenz bei 632 nm war, dass bei ihm ein gesichertes Non-Hodkin-Lymphom vorlag. Da bei allen anderen Patienten ein Mundhöhlenschleimhautkarzinom vorlag, ist diese Besonderheit nicht signifikant. Möglicherweise handelte es sich bei der starken Fluoreszenzintensität entweder um den Tumor selbst oder aber um eine bakterielle Besiedelung auf dem Tumor. Bei jedem Tumor wurde aus insgesamt 10 Messpunkten bei 7 Patienten ein mittleres Spektrum ermittelt. Bei physiologischem Gewebe wurden 13 Messpunkte bei allen 8 Patienten ausgewertet. Abbildung 34 zeigt die Spektren von gesundem Gewebe im Vergleich zu tumorösem Gewebe in absoluter Darstellung (linker Graph) und auf die höchste Signalintensität normierte Darstellung (rechter Graph).

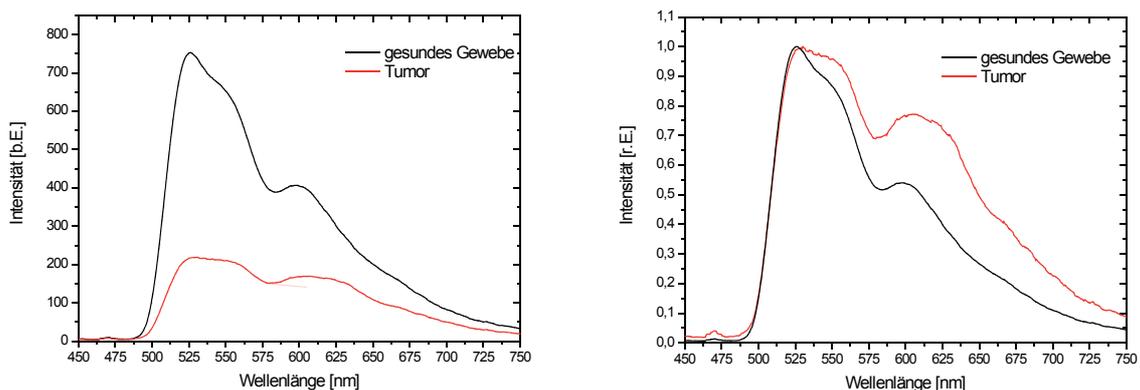


Abbildung 34: Fluoreszenzintensitäten in der Mundhöhle von gesundem Gewebe (schwarze Kurve) und von Tumoren (rote Kurve); es handelt sich um gemittelte Werte über 7 Patienten. Auf der linken Seite sind die Absolutwerte und auf der rechten Seite die normierten Spektren dargestellt.

Alle Messkurven wurden anschließend geglättet, um die auftretenden Messartefakte des CCD-Chips herausfiltern zu können. Beim Vergleich der Spektren jedes einzelnen Patienten von gesunder Mundhöhlenschleimhaut mit tumorösem Gewebe, zeigte sich ganz deutlich ein Intensitätsunterschied. Bei der Bildung von Mittelwerten über die gesamte Patientengruppe konnte dies nicht eindeutig dargestellt werden. Daher wurden die Intensitäten der Fluoreszenz der einzelnen Patienten verglichen. Zeigte sich bei einer Messung von tumorösem Gewebe im Vergleich zu anderen Patienten eine extrem hohe Intensität, so war auch eine erhöhte Intensität bei der Messung von gesundem Gewebe beim selben Patienten erkennbar. Es wurde bei jedem Patienten der Intensitätsunterschied zwischen tumoröser und gesunder Mundschleimhaut errechnet und dann jeweils über alle Patientenmessungen der Mittelwert gebildet. Der Vergleich der Messdaten zeigte bei 525 nm bei gesunder Mundschleimhaut eine um $3,2 \pm 1,4$ -fach erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zu tumorösem Gewebe (Tabelle 4).

Patient	$I_{FL}(\text{gesund})$	$I_{FL}(\text{Tumor})$	Kontrast $\frac{I_{FL}(\text{gesund})}{I_{FL}(\text{Tumor})}$
1	1470	833	2
2	487	149	3
3	966	206	5
4	1344	587	2
5	896	147	6
6	288	107	3
6	288	149	2
6	288	167	2
7	306	75	4
7	306	127	2
7	391	92	4

Tabelle 4: Kontrast der Fluoreszenz bei 525 nm; Die Tabelle zeigt von jedem Patienten Intensitätsmessung von gesunder Mundhöhlenschleimhaut und von tumorösem Gewebe. In der letzten Spalte ist der Quotient aus den Intensitäten von gesunder zu tumoröser Mundhöhlenschleimhaut gebildet.

Gesundes Gewebe zeigte bei 525 nm ein Hauptmaximum. Ein Sattelpunkt lag bei 540 nm. Bei 580 nm ging die Kurve in ein lokales Minimum über, auf welches ein lokales Maximum bei 605 nm folgte. Dagegen zeigte sich bei Tumoren ein breites Plateau von 525 nm bis 555 nm. Bei 580 nm lag das lokale Minimum, das sich wiederholte und bei 595 nm – 630 nm in ein lokales Maximum überging. Im Vergleich von tumoröser mit gesunder Mundschleimhaut war bei den Tumoren ein deutlich höherer und flacher abfallender Rotanteil zu erkennen. Dagegen war bei dem Patienten mit dem Non-Hodgkin-Lymphom ein lokales Maximum bei

632 nm zu erkennen; dies entsprach einem typischen Porphyrin-Spektrum. Da der Patient zuvor niemals photodynamisch therapiert worden war, lag der Grund für die enorm hohe Intensität der Fluoreszenz entweder in der Eigenschaft von tumorösem Gewebe, Stoffe, in diesem Fall Porphyrine, die sehr gut anzureichern, oder aber in einer möglichen bakteriellen Besiedelung des Tumors. Die oberflächliche Struktur eines Tumors und die reduzierte Immunabwehr können einen bakteriellen Befall der Tumore begünstigen (Abbildung 35).

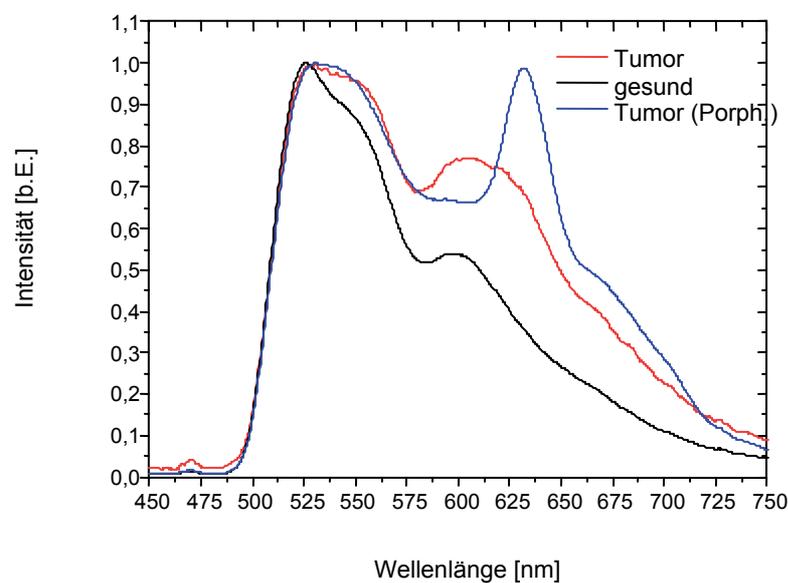


Abbildung 35: Vergleich zwischen Tumor, gesunder Mundschleimhaut, und Tumor mit enormer Porphyrinanreicherung. Klar erkennbar ist die enorme Anreicherung der Porphyrine in der blauen Kurve (Patient Nummer 7); ein bakterieller Befall des tumorösen Gewebes könnte der mögliche Grund für die enorme Intensität sein.

Die spektroskopische Untersuchung der Leukoplakie ergab im Vergleich zum Normalgewebe und zum Tumor, in absoluter und in normalisierter Darstellung, folgendes Ergebnis. Die Intensität des Hauptmaximums von gesunder Mundschleimhaut lag sowohl über der der Leukoplakie als auch über der des Tumors. Wurden die Intensitäten auf das Maximum bei 525 nm normiert, so zeigte sich, dass die Fluoreszenz der Leukoplakie annähernd das gleiche Spektrum aufwies wie die von gesunder Mundschleimhaut. Der Tumor hingegen zeigte ein deutlich anderes Spektrum. (Abbildung 36).

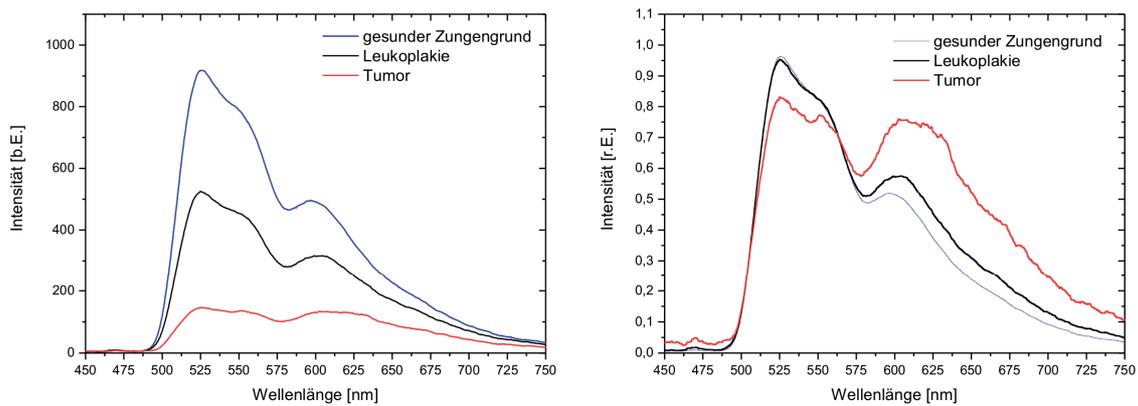


Abbildung 36: Vergleich der Intensitäten von gesunder Mundhöhlenschleimhaut (blaue Kurve), Leukoplakie (schwarze Kurve) und Tumor (rote Kurve); die blauen und roten Kurven sind gemittelte Werte aller Patienten. Links in absoluter Darstellung und rechts in normalisierter.

Da in der vorliegenden Untersuchung nur ein Patient mit einer histologisch gesicherten Leukoplakie untersucht wurde, und die gemessenen Werte nicht repräsentativ sind, ist die Aussage nicht signifikant.

Grundsätzlich zeigten die Messungen, dass eine Unterscheidung zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe aufgrund des spektralen Verlaufs möglich ist. Die Leukoplakie zeigt ebenfalls ein vom Tumor abgrenzbares Spektrum, das sich nur in der Intensität vom normalen Gewebe unterscheidet.

5. Diskussion

5.1 Diskussion zur Photodynamischen Diagnostik auf der CAM

Anhand des Hühnereimodells ist es möglich, das Anreicherungsverhalten des Photosensibilisators h-ALA sowohl nach Einfach- als auch nach Doppelapplikation auf gesundem Gewebe und auf tumorösen Zellen zu untersuchen. Jedoch besitzt das HET-CAM-Modell einige Schwächen. Die Fehlerquellen, die im Rahmen der Untersuchung und in vorherigen Arbeiten [Ugniwenko, 2004; Hüttenberger, 2000] auftraten, wie die Kontamination der Membran, die Austrocknung der CAM trotz Abdeckung des Präparationszuganges durch Petri-Schalen und Folgen mechanischer Reizung durch Applikation des Silikonringes auf die CAM-Oberfläche, ermöglichten nur eingeschränkt die Anreicherung des Sensibilisators. Durch die Applikation des Silikonringes wurde die CAM mechanisch gereizt, und daher wird vermutlich die Proliferation der CAM-Zellen und der Epithelzellen der Blutgefäße auf der CAM angeregt. Demzufolge erfolgt auch in diesen Zellen durch den erhöhten Stoffwechsel nach der Sensibilisierung eine PpIX-Anreicherung [Krammer, 2001; Schneckenburger et al., 1993]. Dies zeigte sich auch in der eigenen Untersuchung. Eine Untersuchung, ob und wie die Tumorzellen auf der CAM angewachsen sind wurde von Ugniwenko [2004] durch die Erstellung von Gefrierschnitten durchgeführt. Dabei zeigte das Anfärben und Mikroskopieren der Gefrierschnitte, dass lediglich am Rand der Silikonringe Tumorzellen gefunden werden konnten. Wirkliches Tumorgewebe konnte in keinem der Präparate nachgewiesen werden.

Um das Problem der Austrocknung der CAM zu vermeiden, erfolgte in den Untersuchungen von Bruce-Micah [2005] das Öffnen und Beimpfen der Eier am selben Tag. Die dabei aufpipettierte Tumorzellen zeigten eine deutlich niedrigere und langsamere PpIX-Anreicherung. Die CAM ist vermutlich mit der Stresssituation überfordert, so dass die Versorgung der Tumorzellen vernachlässigt wird.

Auffällig in dieser Untersuchung ist, dass Tumorzellen aus Zell-Linien im Vergleich zu Tumorzellen aus Gewebeproben enorme Unterschiede in der Intensität aufwiesen. Ein möglicher Grund dafür ist die so genannte Mischkultur. Beim Ansetzen von Gewebeproben erhält man keine „reine“ Zell-Linie. Neben entarteten Zellen werden auch gesunde Zellen kultiviert und führen so zu einer „Mischung“ der Zellkultur. Des Weiteren könnte das Alter der Kultur eine Rolle spielen. Durch den Prozess des Splittens/ Passagierens der Zellen steigt das Alter der Zellen und kongruent dazu sinkt möglicherweise die Intensität. Ebenso kann

nicht exakt die wirkliche Zellzahl auf der CAM bestimmt werden. Ein Grund hierfür ist die fehlende Genauigkeit, wie viele lebende Zellen tatsächlich auf der CAM „schwimmen“. Die CAM, die gut durchblutet ist, könnte auch eine Fehlerquelle darstellen. Das applizierte h-ALA könnte über die Blutgefäße direkt in das „Innere“ des Eies gelangen, und nicht, wie gewünscht, in die aufpipetierten Tumorzellen. Ein weiteres Problem könnte die Aufnahme der veresterten Aminolävulinsäure in die Zellen darstellen. Erst durch Abspaltung des Alkylrestes mit Hilfe von Esterasen kann die Verbindung in die Häm biosynthese eintreten [Lange et al., 1999]. Eventuell arbeiten die Enzyme in den einzelnen Zellen unterschiedlich schnell. Ebenso spielt der Transport von h-ALA in die Mitochondrien eine wichtige Rolle, wobei Transporter gefunden wurden, die die 5 - Aminolävulinsäure - Hexylester über die Zellmembran transportieren [Rud et al., 2000]. Erfolgt die Aufnahme von h-ALA über den Weg der Diffusion, so könnte der unterschiedliche pH-Wert zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Raum, von dem die Diffusion von h-ALA in die Zelle anhängig ist, zwischen Tumorzellen und gesunden Zellen ein Grund für die abweichenden Intensitäts-Werte sein. Daher ist eine sichere Aussage über das Verhalten der Tumorzellen anhand dieses Modells nicht möglich.

5.2 Diskussion zu den In - vitro – Untersuchungen

In Übereinstimmung mit den eigenen Untersuchungen, wird in den Veröffentlichungen, bei denen ebenfalls die Anreicherung von ALA oder ALA-Derivaten in Zellkulturen untersucht worden ist, eine gute Aufnahme der Stoffe in die Zellen bestätigt [J.Moan et al, 1998]. Entscheidend ist, dass sowohl in den Anreicherungsmessungen der eigenen Arbeit als auch in anderen Untersuchungen [Uehlinger et al, 2000; G.Di Venosa et al, 2006] gezeigt wird, dass bei permanenter Anwesenheit eines Sensibilisators kein Abfall der Konzentration zu sehen ist. Es zeigte sich, dass bereits einige wenige Minuten ausreichen, um die Zellen über Stunden Protoporphyrin IX bilden zu lassen, ohne dass im Vergleich zu permanent sensibilisierten Zellen ein Unterschied zu erkennen ist. Bereits nach wenigen Minuten (eher nach geschätzten zwei Sekunden) ist die passive Diffusion „gesättigt“. Im Anschluss findet keine weitere Diffusion in die Zelle mehr statt, da die Konzentration ausgeglichen ist. Diesbezügliche Rechenmodelle und Berechnungen werden eingehend in der Arbeitsgruppe von Hüttenberger [2006] vorgestellt. Nicht die Diffusion, sondern enzymatische Umwandlungsprozesse können möglicherweise den limitierenden Faktor bei der photodynamischen Diagnose und Therapie mit ALA induziertem PpIX darstellen. Dies zeigt sich auch in der Untersuchung von Di Venosa [Di Venosa et al. 2006]. Dabei wurden Konzentrationen der Porphyrinsynthese über chromatographische Verfahren quantifiziert und entscheidende Enzyme durch spezielle Inhibitoren deaktiviert. Die Ergebnisse zeigten, dass lediglich 18 Promille der h-ALA-Moleküle effizient zu PpIX umgewandelt wurden. Bei den Ergebnissen muss allerdings die Quantenausbeute von circa 30 % vernachlässigt werden, was bedeutet, dass nur etwa jedes dritte Photon ein Fluoreszenzquant erzeugt. Somit liegt die Größenordnung der Umwandlungseffizienz im Bereich weniger Promille.

5.3 Diskussion zur Autofluoreszenz

Zusammenfassend ist zu sagen, dass ein einfach zu handhabendes set-up aufgebaut werden konnte, welches eine nicht invasive Messung im Mundraum ermöglicht. Zu diesem Ergebnis kamen auch von de Veld et al [2004]. Wichtig ist dabei immer patientenbezogen die Intensitäten von gesunder Mundschleimhaut und tumoröser Mundschleimhaut zu vergleichen, da die Unterscheidung patientenübergreifend ein Überlappen der Intensitäten von Tumorgewebe und gesunder Mundschleimhaut ergab. Die Messungen ergaben bei der Leukoplakie und bei gesunder Mundschleimhaut einen annähernd gleichen spektralen Verlauf und ließen sich in der vorliegenden Untersuchung durch eine geringere Intensität der Fluoreszenz von Tumorgewebe klar unterscheiden. Da jedoch nicht ausreichend genügend Areale mit leukoplaker Mundschleimhautveränderung untersucht wurden, ist keine signifikante Aussage möglich. Sollte sich in weiteren Messungen dieses Ergebnis bestätigen, wäre dies eine nicht-invasive Methode zur Unterscheidung von tumoröser und leukoplaker Mundschleimhaut. Eine Probeexzision wäre nicht notwendig. Tumoröse Mundschleimhautveränderungen zeigten eine verminderte Intensität bei 525 nm, dem Hauptmaximum der Fluoreszenz auf gesunder Mundschleimhaut. Es ist anzunehmen, dass zur Bildung des spektralen Verlaufes weitere Fluorophore (z.B. Keratin) beitragen, die in den Geweben des Mundraumes nachgewiesen sind. [Skala et. al., 2006; König et al., 2006; König, 2005, Mittermayer, 1993]. Im roten Spektralbereich ist das Profil der Kurve breiter. Grund dafür ist in diesem Bereich das Vorkommen von Porphyrinen und Vorstufen aus dem Häm-Zyklus. Dieses Phänomen war auch deutlich bei der Messung des Non-Hodgkin-Lymphoms zu erkennen. Sattelpunkte (bei 540 nm) und lokale Minima (bei 580 nm) sind lokalen Absorptionsmaxima von Oxyhämoglobin zuzuordnen. Aus den erfolgten Messungen konnte keine definitive Aussage getroffen werden, unter welchem Intensitätswert die Diagnose „Tumor“ gestellt werden kann. Tumore im Mundraum zeigen nicht nur eine geringere Fluoreszenzintensität sondern auch einen vollkommen anderes Fluoreszenzspektrum. Die Gründe für dieses Phänomen sind nicht bekannt. Die Vergleiche zwischen gesunder Mundschleimhaut, Leukoplakie und tumoröser Mundschleimhaut ergaben sowohl eine Unterscheidung zwischen verändertem Gewebe untereinander als auch zu gesundem Gewebe. Die durchgeführten Messungen am Patienten konnten mit nur geringem finanziellem Aufwand (kostengünstige LED-Lampe sowie Fasersonde) praktisch durchgeführt werden. Für eine signifikante Aussage ist die Anzahl an untersuchten Patienten jedoch zu gering. Ganz

klar ermöglicht das Verfahren die Unterscheidung von suspekten Arealen in der Mundhöhle zu gesunder Mundschleimhaut.

6. Literaturverzeichnis:

Ackermann G., Abels C., Bäuml W., Langer S., Landthaler M., Lang E., Szeimies R. (1998) Simulations on the selectivity of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescences in vivo. *Photochemistry Photobiology* 47:121-128

Adam G., Läger P., Stark G. (2003): *Physikalische Chemie und Biophysik*, 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Applied Spectral Imaging (1998) *Method and Apparatus for Spectral Analysis of Images*. Patent WO 98/ 44314

Bing Tan I., Oppelaar H., Ruevekamp M.C., Veenhuizen R.B., Timmers A., Steward F.A., (1999) The importance of in situ light dosimetry for photodynamic therapy of oral cavity tumors. *Head Neck*, 21, 434-441

Bruce-Micah R.B., (2005): *Untersuchungen zu PDT-Effekten auf der Hühnerei-Chorioallantoismembran und Messungen zur Anreicherungskinetik von PpIX-basierten Photosensibilisatoren bei Tumorzellen und Mikroorganismen*, Diplomarbeit

De Veld D.C.G., Skurichina M., Witjes M.J.H., Duin R.P.W., Sterenborg H.J.C., Roodenburg J.L.N. (2004) Clinical study for classification of benign, dysplastic and malignant oral lesions using autofluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 9(5), 940-950

Dold, U., Hermanek P., Höffken K., Sack H. (eds) (1993): *Praktische Tumorthherapie*, Thieme Verlag

Fercher H.G. (1999) *Photodynamische Therapie mit gepulsten Lasern: Aufbau eines theoretischen Modells, Berechnungen zu verschiedenen Laserparametern und Entwicklung spektroskopischer Nachweismethoden für PDT-induzierte Nekrose*. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern

Fisher A.M.R., Murphree A.L., Gomer C.J., (1995) Clinical and preclinical Photodynamic Therapy. *Lasers in Surgery and Medicine* 17:2-31

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.(2006) Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends, 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken

Di Venosa G., Fukuda H., Batlle A., MacRobert A., Casas A.(2006) Photodynamic therapy: regulation of porphyrin synthesis and hydrolysis from ALA esters. *Journal of photochemistry and photobiology, B: Biology*, 83, 129-136

Gottfried V., Davidi R., Averbuj C., Kimel S. (1995) In vivo damage to chorioallantoic membrane blood vessels by porphycene-induced photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 30:115-121

Hees H., Sinowatz L. Allgemeine und spezielle Pathologie Deutscher Ärzteverlag, 3. Auflage

Henderson B.W., Dougherty T.J. (eds)(1991) How does photodynamic therapy work? *Photochemical and Photobiological Sciences* 55: 145-157

Hoppenheit C. (2006) In vivo Untersuchungen der Pharmakokinetik von aminolävulinsäure- und aminolävulinsäurehexylester-induziertem Protoporphyrin IX in Tumoren des Mund-Kiefer- und Gesichtsbereiches. Dissertation, Universität des Saarlandes, Homburg

Hoppenheit C., Hüttenberger D., Foth H.J., Reichert T.E., Spitzer W.J., Müller-Richter U.D.A. (2006) Pharmacokinetics of the photosensitizers Aminolevulinic acid and Aminolevulinic acid hexylester in oro-facial tumours embedded on the Chorioallantois membrane of hen's egg. Accepted by *cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, Vol.21, No.6

Hüttenberger D. (2000) Photometrische und spektroskopische Messungen zur Optimierung der Photodynamischen Diagnose (PDD) und Therapie (PDT). Universität Kaiserslautern, Staatsexamensarbeit

Hüttenberger D. (2006) Spektroskopische Untersuchungen zu Autofluoreszenz, Protoporphyrin IX induzierter Fluoreszenz und photochemischen Effekten an humanen Tumoren in vitro, in verschiedenen in vivo Modellen und in situ. Dissertation, Universität Kaiserslautern

Journal of Biomedical Optics, 9(5), 2004

Kennedy J.C., Pottier R.H., Pross D.C. (1990) Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 6, 143-148

König K. (2005) Skript: Laser in der Medizin. Universität Jena

König K., Ehlers A., Stracke F., Riemann I. (2006) In vivo drug screening in human skin using femtosecond laser multiphoton tomography. *Skin Pharmacol Physiol*, 19(2), 78-88

Krammer B., (2001) Vascular effects of Photodynamic Therapy. *Anticancer Research* 21:4271-4278

Krieg R., Fickweiler S., Wofbeis O., Knüchel R. (2000) Cell-type Specific Protoporphyrin IX Metabolism in Human Bladder Cancer in vitro. *Photochemistry und Photobiology* 72: 226-233

Kunzi-Rapp K.(1995) Die Chorioallantoismembran des befruchteten Hühnereies – ein in-vivo Modell in der photodynamischen Therapie. Universität Ulm, Disseratationsarbeit

Lange N., Jichlinski P., Zellweger M., Forrer M., Marti A., Guillou L., Kucera P., Wagnieres G., van den Bergh H. (1999) Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study *British Journal of Cancer* 80:185-193

Lasarkis, G.(ed) Color Atlas of oral Disesease, 3rd Edition, Thieme Verlag, ISBN 3-13-717003-6

Löffler, Petrides Biochemie

Lohr F., Wenz F.(eds) (2003) Strahlentherapie kompakt, Urban & Fischer

Mittermayer C. (ed) (1993) Oralpathologie: Erkrankungen der Mundregion. Lehrbuch für Zahnmedizin, Mund- und Kieferheilkunde. Schattauer Verlag

Moan J., Peng Q., Evensen F., Berg K., Western A., Rimington C (1987) Photosensitizing efficiencies, tumor- and cellular uptake of different photosensitizing drugs relevant for photodynamic therapy of cancer. Photochemistry and Photobiology Vol. 46 No. 5:713-721

Oberholzer M.J. (ed) (2001) Pathologie verstehen. Molekulare Grundlagen der allgemeinen Pathologie, Thieme Verlag

Oleinick N.L., Evans H.H., et al. (1998) The Photobiology of Photodynamic Therapy: Cellular Targets and Mechanisms. Radiation Research Society 150:146-156

Pass H.I., (1993) Photodynamic Therapy in oncology: Mechanisms and clinical use. Journal of the National Cancer Institute 85:443-454

Peng Q., Warloe J., Moan J., Heyerdahl H., Steen H., Nesland J., Giercksky K. (1995) Distribution of 5-Aminolaevulinic acid – induced porphyrins in noduloulcerative basal cell carcinoma. Photochemistry and Photobiology 62:906-913

Penzlin H. (ed) (1991), Lehrbuch der Tierphysiologie, 5.Auflage, G.Fischer Verlag, Jena

Sandritter W., Beneke G. (eds) (1975) Allgemeine Pathologie. Schattauer Verlag, Stuttgart

Schneckenburger H., König H., Kunzi-Rapp K., Westphal-Frösch C., Rück A. (1993) Time-resolved in-vivo fluorescence of photosensitizing porphyrins. Journal Photochemistry and Photobiology. B:Bio., 21,143-147

Skala M.C., Squirell J.M, Vrotsos K.M., Eickhoff J.C., Gendron-Fitzpatrick A., Eliceiri K.W., Ramanujam N. (2006) Multiphoton Microscopy of endogenous fluorescence differentiates normal, precancerous and cancerous squamous epithelial tissues. *Cancer Research*, 65:(4), 1180-1186

Uehlinger P., Zellweger M., Wagnières G., Jiullerat L., van den Bergh H., Lange N. (2000) 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *Journal of photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 54(1), 72-80

Ugniwenko T.(2004) Untersuchung des Tumorzellwachstums und der PpIX-Anreicherungskinetik auf der Chorioallantoismembran befruchteter Hühnereier mittels fluoreszenzgestützter Methoden. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern

Vervoorts A. (1997) Prüfung von Tumormedikamenten in einem schmerzfreien System, „The Hen´s Egg Story“. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf

Voet D., Voet J.G., (1992) Biochemie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Von Tappeiner H., (1904) Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. *Deutsches Archiv der klinischen Medizin*, 80, 427-487

Wilson B., (2002) Photodynamic therapy for cancer: Principles. *Can. J Gastroenterol* 2002; 16 (16): 393-396

Wegmeyer H.(1998) Kultivierung von Tumorgewebe auf der Chorioallantoismembran von Hühnereiern im Rahmen von Untersuchungen zur Photodynamischen Therapie. Staatsexamensarbeit, Universität Kaiserslautern

Wu S., Ren Q., Zhou M., Wei Y, Chen J (2003). Photodynamic Effects of 5-Aminolevulinic Acid and its Hexylester on Several Cell Lines. ISSN 0582-9879 *acta biochimica et biophysica sinica*

Zellweger M., (2000) Fluorescence spectroscopy of exogenous, exogenously-induced and endogenous fluorophores for the photodetection and photodynamic therapy of cancer. Thèse No.2126 de l'école polytechnique fédéral de lausanne, Lausanne

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. W. J. Spitzer, Direktor der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes, danke ich für die Überlassung der Arbeit.

Dankbar bin ich Herrn Dr. Dr. Urs Müller – Richter, der den Kontakt zum Fachbereich Physik der Technischen Universität Kaiserslautern hergestellt hat.

Ich danke Herrn Dr. H.-J. Foth, vom Fachbereich Physik der Technischen Universität Kaiserslautern, der für eine reibungslose Zusammenarbeit gesorgt hat.

Ganz besonderer Dank geht an meinen Betreuer Herrn Dr. Dirk Hüttenberger, durch dessen Unterstützung und Hilfe ich nie den roten Faden in dieser Arbeit verloren habe.

Großer Dank geht an Frau Dr. Regina Bruce-Micah, die mir bei allen biologischen Fragestellungen mit Rat und Tat zu Seite stand.

Ich danke Frau Dr. Tanja Neumann, mit deren Hilfe die gemeinsame „Betreuung“ der Hühnereier komplikationslos organisiert werden konnte.

Frau Vera Fritzing vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern bin ich für die problemlose Belieferung der Hühnereier dankbar.

Großer Dank geht an Frau Beatrice Ulbricht, die sich jahrelang mein Klagen über verpilzte Zellkulturen und unbefruchtete Hühnereier angehört hat.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Dr. Michael Hofmann und Herrn Florian Aichinger für ihre Unterstützung.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern, Dr. Irene und Dr. Klaus Aichinger, die mir mein Studium ermöglicht haben.

8. Lebenslauf

Name, Vorname: Aichinger, Stephanie Irene

Anschrift: Am Haselbusch 18
63785 Obernburg a. Main

Geburtsdatum: 01.09.1977

Geburtsort: Straubing

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Mutter: Dr. Irene Aichinger, Zahnärztin

Vater: Dr. Klaus Aichinger, Zahnarzt

Schulbildung: 1984 – 1988 Grundschule Seligenthal, Landshut
1988 – 1997 Hans – Carossa – Gymnasium, Landshut

Studium: 10/ 1997 Studium der Zahnheilkunde an der
Universität des Saarlandes in
Homburg/ Saar
10/ 1999 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
10/ 2000 Zahnärztliche Vorprüfung
07/ 2004 Approbation zur Zahnärztin

Berufspraxis: 08/ 2004 – 12/ 2005 Assistenz-Zahnärztin in der Klinik
für Mund – Kiefer- und Gesichts-
Chirurgie der Universitätskliniken
des Saarlandes
01/2006 – 01/ 2008 Weiterbildungs-Assistentin für
Oralchirurgie bei Herrn
Dr. Dr. V. Tröltzsch, Ansbach
seit 02/2008 Weiterbildungs-Assistentin für
Oralchirurgie bei Frau PD Dr. Dr.
E. Reinhart, Obernburg a. M.