

Bestimmung der Fluoreszenzkinetik von 5-Aminolävulinsäure-induziertem Protoporphyrin-IX an dreidimensionalen Organkulturen menschlicher Bronchialschleimhaut

Irmgard Maier

Aus der
Medizinischen Klinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. M. Reincke
Abteilung für Pneumologie: Leiter Prof. Dr. R. M. Huber

Bestimmung der Fluoreszenzkinetik von 5-Aminolävulinsäure-
induziertem Protoporphyrin-IX an dreidimensionalen Organkulturen
menschlicher Bronchialschleimhaut

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Irmgard Maier
aus
Rott am Inn

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R.M. Huber

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. D. Zaak
Prof. Dr. J. Behr

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. F. Gamarra

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2005

Gewidmet

meinem Mann Klaus
und unserem Sohn Elias

1. Einleitung

- 1.1. Geschichtlicher Rückblick
- 1.2. Photosensibilisatoren und deren Wirkmechanismus
- 1.3. 5-Aminolävulinsäure
- 1.4. Dreidimensionale Zellkultur des normalen humanen Bronchialepithels
- 1.5. Fragestellung

2. Material und Methodik

- 2.1. Dreidimensionale Zellkultur des humanen Bronchialepithels
 - 2.1.1. Probengewinnung
 - 2.1.2. Kultivierung der Bronchialepithelbiopsien
- 2.2. 5-Aminolävulinsäure
- 2.3. Fluoreszenzspektroskopischer Nachweis von Protoporphyrin IX
 - 2.3.1. Lichtquelle für die Anregung der Porphyrinfluoreszenz
 - 2.3.2. Detektorsystem für den Nachweis der Fluoreszenz
 - 2.3.3. Anordnung der Messapparatur
- 2.4. Messung und Auswertung
- 2.5. Versuchsdurchführung
 - 2.5.1. Versuchsgruppen
 - 2.5.1.1. Versuchsgruppe I: Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure für 5 Minuten
 - 2.5.1.2. Versuchsgruppe II: Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure für 15 Minuten
 - 2.5.1.3. Versuchsgruppe III: Dauerinkubation mit 5-Aminolävulinsäure
- 2.6. Statistik

3. Ergebnisse

- 3.1. Nachweis von Protoporphyrin-IX-spezifischer Fluoreszenz bei 635 nm

- 3.2. Kinetik der 5-Aminolävulinsäure-induzierten Porphyrinfluoreszenz in Abhängigkeit der Inkubationszeit (Versuchsgruppen I-III)
 - 3.2.1. Versuchsgruppe I: Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure für 5 Minuten
 - 3.2.2. Versuchsgruppe II: Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure für 15 Minuten
 - 3.2.3. Versuchsgruppe III: Dauerinkubation mit 5-Aminolävulinsäure
 - 3.2.4. Vergleich der Ergebnisse der Versuchsgruppen I - III

4. Diskussion

- 4.1. Diskussion der Materialien und Methoden
 - 4.1.1. Dreidimensionale Zellkulturen des humanen Bronchialepithels
 - 4.1.2. Kultivierungsmethoden
 - 4.1.3. Versuchsaufbau
 - 4.1.3.1. 5-Aminolävulinsäure
 - 4.1.3.2. Versuchskammer
 - 4.1.3.3. Lichtquelle für die Anregung der Porphyrinfluoreszenz
 - 4.1.3.4. Detektorsystem für den Nachweis der Fluoreszenz
 - 4.1.4. Versuchsdurchführung

- 4.2. Diskussion der Ergebnisse
 - 4.2.1. Protoporphyrin-IX-spezifische Fluoreszenz nach Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure
 - 4.2.2. Protoporphyrin-IX-spezifische Fluoreszenz in Abhängigkeit der Inkubationszeit

5. Zusammenfassung und Ausblick

6. Verwendete Abkürzungen

7. Literaturverzeichnis

8. Danksagung

9. Lebenslauf

1. Einleitung

Die Photodynamische Diagnose (PDD) ist ein Verfahren, bei dem Tumore durch vermehrte Anreicherung fluoreszierender Stoffe unter Lichteinwirkung sichtbar gemacht werden. Insbesondere liegt die Hoffnung der PDD darin, Tumorfrühstadien zu identifizieren, die wegen ihrer geringen Ausdehnung oder ihrer morphologischen Unauffälligkeit durch die Untersuchung mit bloßem Auge nicht nachweisbar sind.

Die Photodynamische Therapie (PDT) beruht auf einer komplexen Wechselwirkung zwischen eingestrahltm Licht, Photosensibilisator und molekularem Sauerstoff. Sie könnte im optimalen Fall zu einer selektiven Zerstörung von Tumoren unter weitgehender Schonung des umgebenden gesunden Gewebes eingesetzt werden.

Der in klinischen Studien zum Bronchialkarzinom bisher hauptsächlich verwendete Photosensibilisator Photofrin II[®] zeigte eine gute tumorselektive Anreicherung, führte aber wegen seiner extrem langen Halbwertszeit und seiner Akkumulation in der Haut zu einer Photosensibilisierung für 6 – 8 Wochen.

Deshalb gab es in der Vergangenheit intensive Anstrengungen, neue Medikamente zu entwickeln. Vielversprechend erscheint der Einsatz der natürlich vorkommenden Substanz 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), die in bestimmten Zellen zu einer Akkumulation von endogenem, photoaktivem Protoporphyrin IX (PPIX) führt (Kennedy und Pottier, 1992).

Der Behandlungserfolg von Patienten mit Lungenkarzinomen hängt hauptsächlich vom Tumorstadium bei der Erstdiagnose ab. Die inhalative Anwendung der 5-ALA zur PDD in einer klinischen Pilot-Studie mit 7 PatientInnen (Baumgartner et al., 1996) zeigt keine Nebenwirkungen und ergab eine hohe Sensitivität der Methode.

Für die Weiterentwicklung und Optimierung dieser diagnostischen Methode sind weitere Untersuchungen zur 5-ALA induzierten PPIX-Akkumulation in respiratorischem Epithel erforderlich.

Das Ziel dieser Arbeit war es, an dreidimensionalen Zellkulturen des humanen Bronchialepithels die Kinetik von 5-ALA-induzierter PPIX-Fluoreszenz nach unterschiedlich langer Exposition zu untersuchen.

Die Kenntnis der PPIX-Kinetik in Normalgewebe ist eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung der PDD und der PDT von Neoplasien.

1.1. Geschichtlicher Rückblick

Erste wissenschaftliche Untersuchungen zur Wirkung von Photosensibilisatoren stammen vom Beginn des 20. Jahrhunderts (Raab, 1900; v. Tappeiner, 1900).

Die Ära der PDD und der PDT begann 1960 (Lipson und Baldes, 1960; Schwartz et al., 1955) mit ersten klinischen Untersuchungen zur Tumorlokalisierung durch Hämatoporphyrin und der nachfolgenden synthetischen Herstellung von Hämatoporphyrin-Derivaten (HPD). HPD enthält verschiedene Porphyrine und wurde in den folgenden Jahren als Fluoreszenzmarker in der Diagnostik von Neoplasien eingesetzt (Lipson et al., 1967; Gregorie et al., 1968).

In den 70er Jahren kam es mit der Entwicklung von Lichtleitern und Lasern zu weiteren intensiven Forschungsaktivitäten im Bereich der PDD und PDT (Diamond et al., 1972; Kelly und Snell, 1976). Seit 1993 ist Photofrin II[®], eine homogenere und gereinigte Form des HPD, bestehend aus einer Mischung nicht-metallischer Porphyrinringe, in den Niederlanden, Kanada, Frankreich, Deutschland, Japan und den USA für Tumore der Lunge, des Gastrointestinaltraktes und des Genitaltraktes als Medikament zugelassen (Dougherty et al., 1998).

Ein wesentlicher Nachteil von HPD und Photofrin II® besteht in ihrer langen Halbwertszeit und der damit verbundenen Photosensibilisierung der Haut für mindestens zwei Wochen. Dieses Risiko ist der Hauptgrund dafür, dass vor allem die PDD mit Photofrin II® sich nicht durchgesetzt hat.

1990 begannen erste vielversprechende klinische Studien mit 5-ALA-induziertem endogenem PPIX (siehe Abschnitt 1.3) als Photosensibilisator an Patienten mit Basalzellkarzinomen der Haut (Kennedy et al., 1990). Es konnte gezeigt werden, dass nach topischer Gabe von 5-ALA sich PPIX in den Mitochondrien tumorselektiv anreichert und der Tumor durch Lichtexposition zerstört wird. Es wurde keine wesentliche Photosensibilisierung der gesunden Haut beobachtet. Weitere Untersuchungen mit 5-ALA-induziertem PPIX als Photosensibilisator bei der Diagnose und Therapie oberflächlicher Tumore folgten in der Gastroenterologie, der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, der Pneumologie und der Urologie. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Diagnose von Urotheldysplasien oder Blasenfrühkarzinomen durch Fluoreszenzzystoskopie nach Instillation mit 5-ALA die Sensitivität mit 96,9% signifikant höher lag als bei der Durchführung der Diagnostik mit herkömmlicher Zystoskopie (Kriegmair et al., 1996).

1.2. Photosensibilisatoren und deren Wirkmechanismus

Unter Photosensibilisatoren versteht man Substanzen, die die Lichtempfindlichkeit ihres Trägers (Zellen, Gewebe) erhöhen.

Die von ihnen absorbierte Lichtenergie kann auf andere Moleküle übertragen werden und chemische Reaktionen auslösen (Abb. 1).

Der Mechanismus der Photosensibilisierung basiert darauf, dass der Photosensibilisator S durch Absorption von Licht in den ersten angeregten Zustand $^1S_1^*$ übergeht.

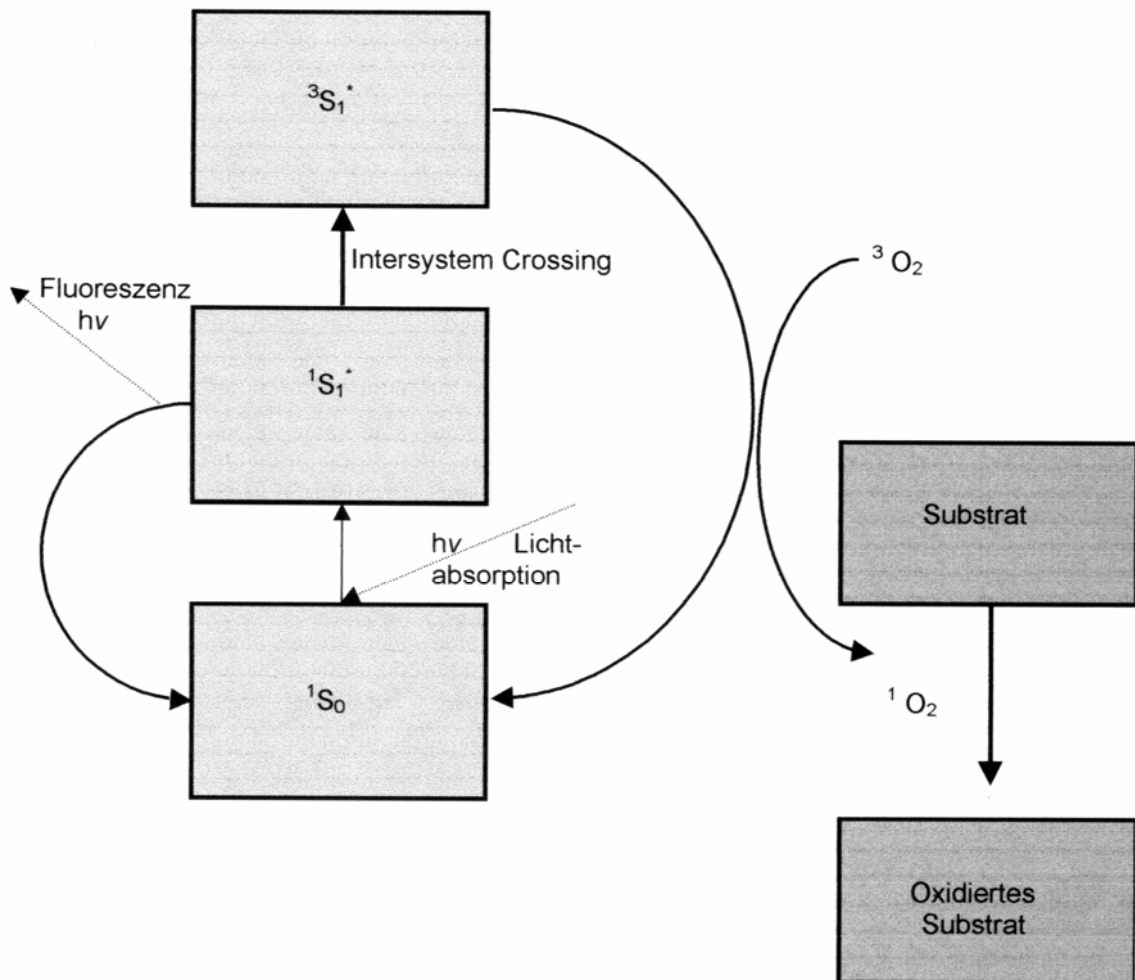
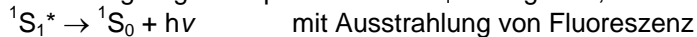


Abb. 1: Schematische Darstellung der Typ II Reaktion

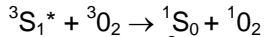


Aus diesem kurzlebigen (< 1 Mikrosekunde) Zustand kann der Photosensibilisator durch verschiedene Wechselwirkungsprozesse zurück in den Grundzustand 1S_0 gelangen oder in den ersten angeregten Triplettzustand ${}^3S_1^*$ übergehen, z.B.



${}^1S_1^* \rightarrow {}^3S_1^*$ Intersystem crossing: der metastabile (Millisekundenbereich) angeregte Energiezustand ${}^3S_1^*$ des Photosensibilisators ist Ausgangspunkt für einen Energietransfer auf molekularen Sauerstoff, der dadurch in Singulett-Sauerstoff übergeführt wird (Typ-II-Reaktion).

Der Photosensibilisator kehrt zu seinem Grundzustand zurück (Foote, 1991).



Symbole: 3O_2 =Triplett-Sauerstoff; 1O_2 =Singulett-Sauerstoff; 1S_0 =Grundzustand des Photosensibilisator S; ${}^1S_1^*$ =erster angeregter Zustand des Photosensibilisator S; ${}^3S_1^*$ =erster angeregter Triplettzustand des Photosensibilisator S; (modifiziert nach van Hillegersberg et al.; 1994)

Die Reaktion ${}^1S_1^* \rightarrow {}^1S_0 + hv$ (Fluoreszenz) wird für die PDD ausgenutzt.

Die Sauerstoffradikale der Reaktion ${}^3S_1^* + {}^3O_2 \rightarrow {}^1S_0 + {}^1O_2$ sind im wesentlichen für die zytotoxische Wirkung der Photosensibilisatoren verantwortlich (Moan, 1984; Dougherty und Marcus, 1992) und werden für die PDT ausgenutzt.

Es konnte gezeigt werden (Gomer und Razum, 1984), dass Gewebe mit niedrigen Sauerstoffkonzentrationen nur wenig auf eine PDT reagierten.

Am häufigsten werden Schäden an Plasmamembranen (Chapman et al., 1991; Girotti, 1990) und Mitochondrien, sowie ein Zusammenbruch der Tumervaskularisation beschrieben (Gomer et al., 1988).

Wichtige Photosensibilisatoren in der klinischen Anwendung sind die Porphyrine (Kessel et al., 1985). Dies sind farbige Verbindungen, die ubiquitär im Pflanzen- und Tierreich vorkommen. Strukturell bestehen sie aus vier Pyrrolringen, die über Methinbrücken zu einem Tetrapyrrolosystem verbunden sind. Hämatoporphyrinderivate und die aus ihnen entwickelten Medikamente zweiter Generation wie Photofrin[®] sind effektiv, haben aber eine sehr lange Halbwertszeit und akkumulieren nach systemischer Applikation in der Haut. Ein weiterer Nachteil für ihren Einsatz in der Diagnostik ist ihre relativ schwache Fluoreszenz im Vergleich zum umgebenden Gewebe (Baumgartner et al., 1992).

1.3. 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)

5-ALA ist ein Vorläufer von Protoporphyrin IX (PPIX) in der Hämbiosynthese. Bestimmte Zelltypen haben eine große Kapazität, PPIX zu synthetisieren, wenn sie adäquaten Konzentrationen von 5-ALA ausgesetzt sind. Da die Umwandlung von PPIX zu Häm relativ langsam erfolgt, akkumulieren diese Zellen photosensibilisierende Konzentrationen an PPIX (Kennedy und Pottier, 1990). Da PPIX eine hohe photodynamische Wirksamkeit zugeschrieben wird, kann durch eine exogene 5-ALA-Zufuhr diese Substanz in der PDD und PDT eingesetzt werden.

Die Strukturformel von 5-ALA ist in Abb. 2, die Strukturformel von PPIX in Abb. 3 dargestellt.

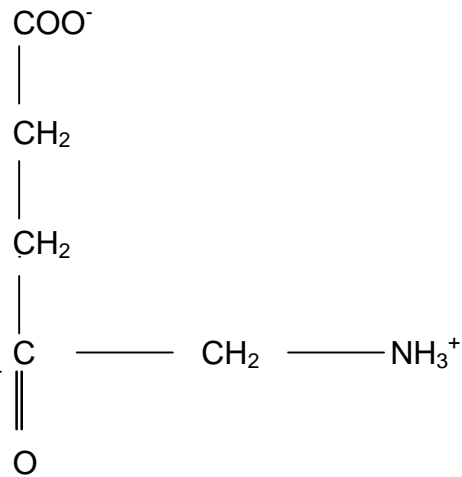


Abb. 2 : Strukturformel von 5-Aminolävulinsäure (Stryer, 1991)

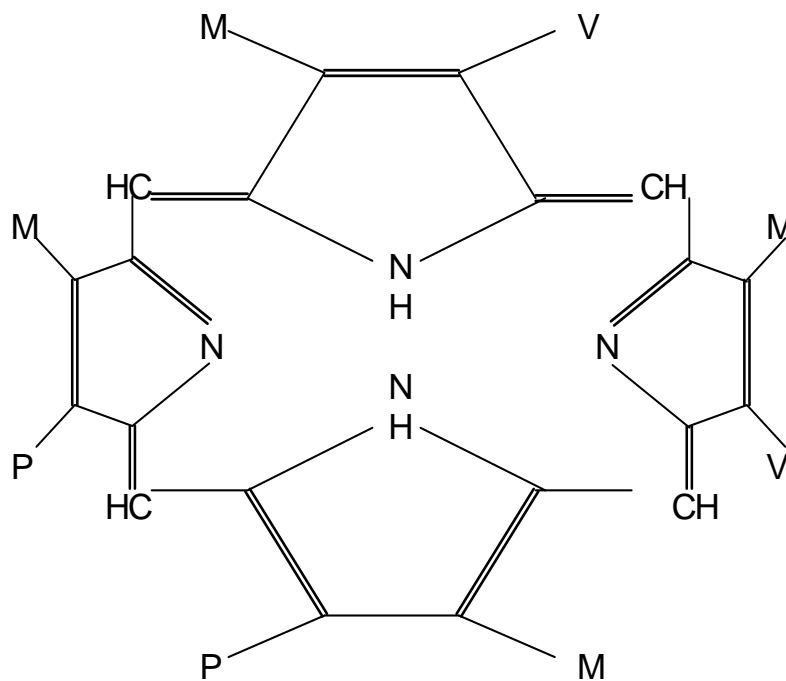


Abb. 3: Strukturformel von Protoporphyrin IX (A=Acetat; M=Methyl; P=Propionat; V=Vinyl); (Stryer, 1991)

In Abb. 4 ist das Absorptionsspektrum von PPIX dargestellt.

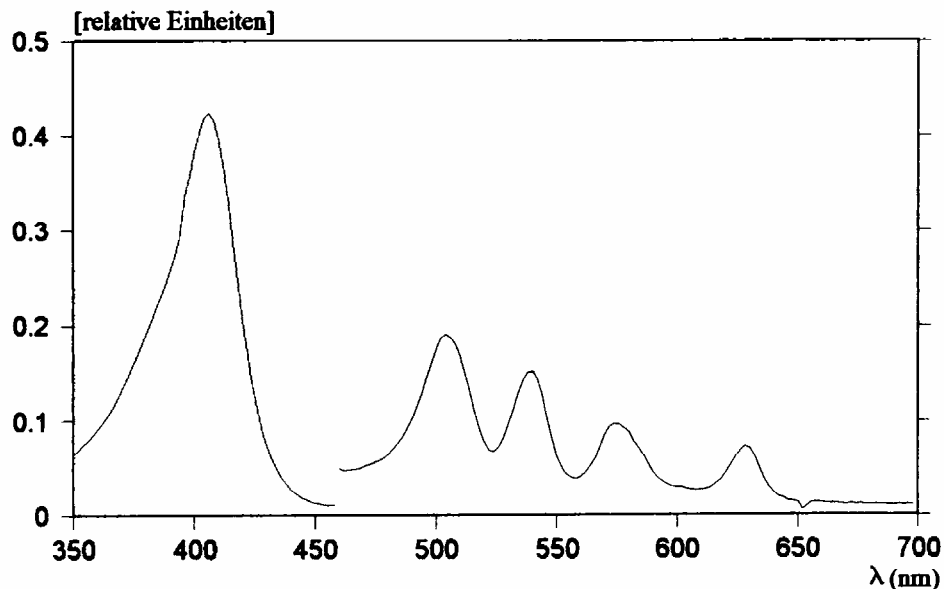


Abb. 4: Absorptionsspektrum von Protoporphyrin IX in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (ab 460 nm mit Faktor 10 multipliziert; Wessels et al., 1993)

5-ALA entsteht im ersten Schritt bei der Biosynthese des Porphyrinringes von Häm. Beim Menschen kommen die Porphyrine als Bestandteile der mitochondrialen Cytochrome in praktisch allen Zellen vor, sind aber quantitativ am bedeutendsten im Knochenmark als Ort der Hämoglobinsynthese, den Erythrozyten und der Leber vertreten.

Die Biosynthese der Porphyrine läuft - ähnlich der Harnstoffbiosynthese - partiell im Mitochondrium und partiell im Cytosol ab. Ausgehend vom Succinyl-CoA, einem Zwischenprodukt des mitochondrialen Citratzyklus, wird durch Kondensation mit der Aminosäure Glycin im Mitochondrium 5-ALA gebildet. Dieser Schritt wird durch die mitochondriale 5-ALA-Synthase katalysiert. Die 5-ALA-Synthase-Reaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Porphyrinbiosynthese, da alle folgenden Enzyme im Überschuss vorliegen.

Nach Übertritt ins Cytosol kondensieren 2 Moleküle 5-ALA zu Porphobilinogen, der Pyrrolvorstufe der Porphyrine. Diese Reaktion wird durch die 5-ALA-Dehydrase katalysiert. Anschließend kondensieren sukzessive 3 weitere Porphobilinogenmoleküle unter Abspaltung von 4 Molekülen Ammoniak zum Tetrapyrrol, das an das Enzym gebunden bleibt.

Dieses zyklisiert unter Ammoniumverlust zu Uroporphyrinogen III. Dazu werden eine Synthase und eine Cosynthase benötigt. Nachfolgend werden die Acetatgruppen aller 4 Ringe zu Methylgruppen decarboxyliert. Das entstandene Koproporphyrinogen III tritt ins Mitochondrium über. Durch Einführungen von Doppelbindungen in den Porphyrinring und Umwandlung zweier Propionatseitenketten in Vinylgruppen wird PPIX gebildet. Der nachfolgende enzymatische Einbau von Eisen vervollständigt die Biosynthese von Häm, die prosthetische Gruppe von Proteinen wie Myoglobin, Hämoglobin, Katalase, Peroxidase und Cytochrom C. Der Einbau von zweiwertigem Eisen wird durch das Enzym Ferrochelatase katalysiert.

Die 5-ALA-Synthase, die die Schrittmacherreaktion dieses Stoffwechselweges katalysiert, unterliegt ebenso wie die 5-ALA-Dehydrase und die Ferrochelatase der Feedback-Hemmung durch Häm. Ebenso wie die Aktivität wird auch die Proteinsyntheserate dieses Enzyms durch das Endprodukt Häm gehemmt. Die 5-ALA-Synthase besitzt eine Halbwertszeit von nur etwa 60 min. Dadurch kann die Häm-Syntheserate schnell gesteigert oder verringert werden. Bei der Down-Regulierung der Hämbiosynthese wird die Coproporphyrinogen-Oxidase als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym diskutiert (Woodard und Dailey, 2000).

Der Ablauf der Hämbiosynthese ist in Abb. 5 dargestellt.

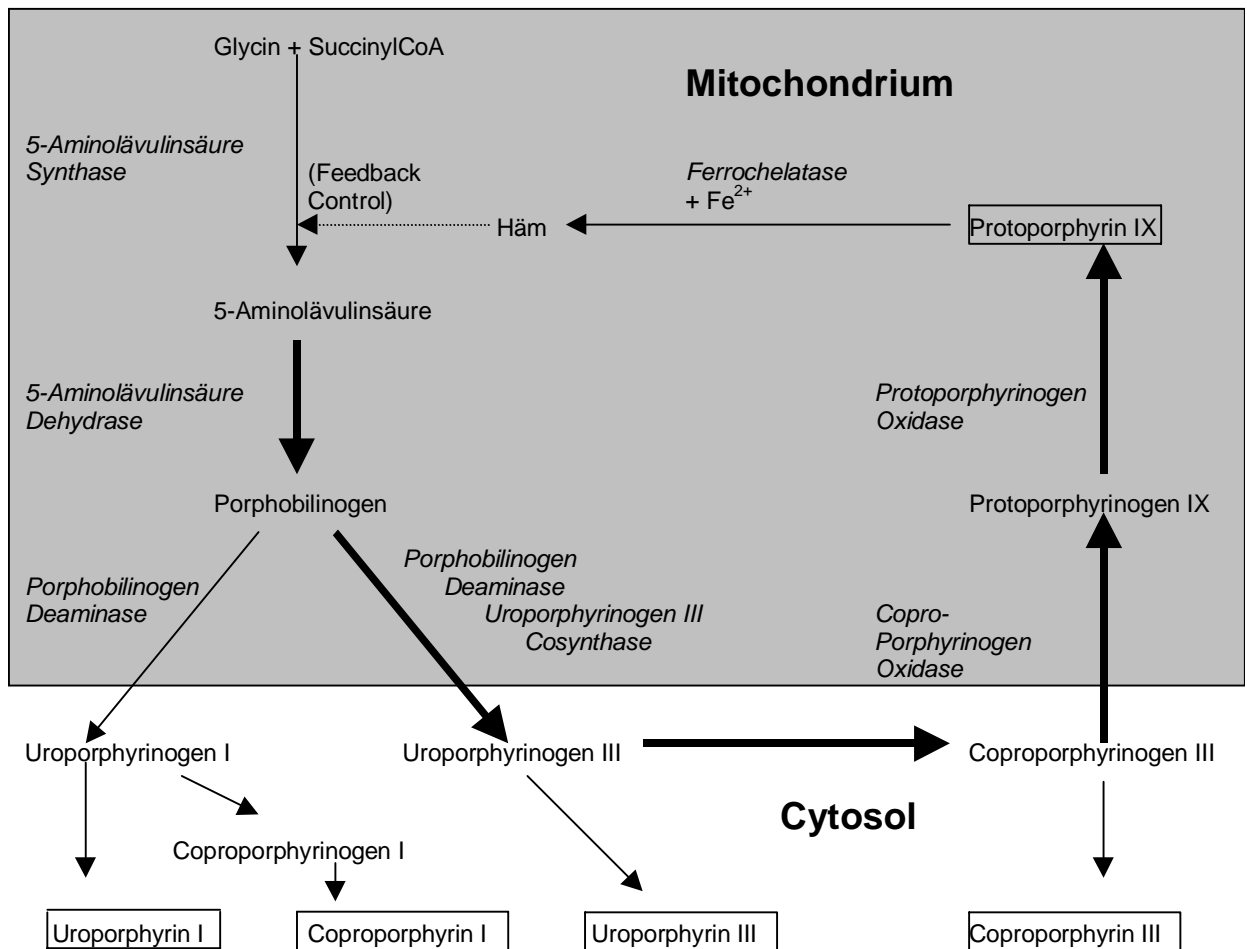


Abb. 5: Hämbiosynthese; die photoaktiven Substanzen sind umrahmt (modifiziert nach Kennedy und Pottier, 1992)

Unter physiologischen Bedingungen wird die Hämbiosynthese so geregelt, dass keine photosensibilisierenden Konzentrationen an PPIX gebildet werden.

Kennedy und Pottier (1992) konnten zeigen, dass der unter normalen Umständen wirksame Feedback-Mechanismus durch die Zufuhr von 5-ALA umgangen wird und so eine Akkumulierung von PPIX möglich wird.

1.4. Dreidimensionale Zellkultur des normalen humanen Bronchialepithels

Es sind unterschiedliche Zellkultursysteme von humanen respiratorischen Epithelien etabliert. Sie sind meist mit Veränderungen des respiratorischen Epithels verbunden.

Monolayer und Zellsuspensionskulturen weisen nicht die in-vivo vorhandene Differenzierung auf, da die Zellen aus ihrem Verband aus mehrreihigem Epithel mit Basalmembran, Flimmerepithel und Becherzellen heraus gelöst sind (Jorissen et al., 1991; de Jong et al., 1994; Jorissen und Bessems, 1995). Zell-Zell- und Zell-Stroma Interaktionen sind dabei beeinträchtigt.

Für Organkulturen ist charakteristisch, dass Gewebeverbände im Ganzen kultiviert werden. Dabei ist die Integrität des Zell-Stroma-Verbandes und die Differenzierung des respiratorischen Epithels weitgehend erhalten (Al-Batran et al., 1999).

Die dreidimensionale Zellkultur des normalen humanen Bronchialepithels verspricht deswegen, ein geeignetes In-vitro-Modell zu sein, um Applikationsmodalitäten von Photosensibilisatoren am Bronchialepithel zu untersuchen.

1.5. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Fluoreszenzkinetik von 5-ALA-induziertem PPIX an dreidimensionalen Zellkulturen von humanem Bronchialepithel zu untersuchen.

Vor dem Hintergrund eines möglichen Einsatzes der PDD in der Frühdiagnostik von Bronchialneoplasien war insbesondere die Fluoreszenzkinetik nach unterschiedlichen Expositionszeiten von 5-ALA von Interesse.

Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

Ist ein 5-minütiger Kontakt der Zellkulturen mit 5-ALA ausreichend, detektierbare Mengen an PPIX-Fluoreszenz zu induzieren?

Wann ist der Zeitpunkt der maximalen Fluoreszenz in Abhängigkeit der Inkubationsdauer?

Besteht ein Zusammenhang zwischen Inkubationszeit und Fluoreszenzintensität?

Material und Methodik

2.1. Dreidimensionale Zellkultur des humanen Bronchialepithels

2.1.1. Probengewinnung

Die Probengewinnung und die Durchführung der Versuche erfolgten nach Genehmigung durch die Ethikkommission und mit dem Einverständnis der Patienten.

Patienten, die aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen bronchoskopiert wurden, wurden bei dem Eingriff bis zu drei zusätzliche Gewebeproben aus der rechten oder linken Oberlappenkarina entnommen. Dazu wurde eine herkömmliche Biopsiezange verwendet. Die Biopsien wurden in einem mit Bronchial Epithel Growth Medium (BEGM, Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) gefüllten Gefäß in das Labor zur Kultivierung gebracht. Zwischen Probengewinnung und Kultivierung lagen in der Regel ca. 60 min, jedoch nie mehr als drei Stunden.

Bronchoskopieindikationen:

- Kontrolle bei bekanntem Kleinzelligem und Nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom, Larynx-Karzinom, Tonsillenkarzinom, Mundbodenkarzinom, Lymphom, metastasierendem Colonkarzinom, metastasierendem Mammakarzinom, metastasierendem Schilddrüsenkarzinom
- Verdacht auf ein Malignom im Bronchialsystem
- Kontrolle nach entzündlichen Erkrankungen des Bronchialsystem
- Autoimmunerkrankungen: z.B. Wegener-Granulomatose, Sarkoidose

Patienten mit bekannter HIV-Infektion oder mit akuten pulmonalen Infekten wurden von der Probenentnahme ausgeschlossen.

2.1.2. Kultivierung der Bronchialepithelbiopsien

0,5 – 1 mm im Durchmesser messende Bronchialbiopsien wurden nach dreimaligem Waschen mit BEGM (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium) mikroskopisch beurteilt. Durch Bakterien oder Pilze verunreinigte Proben wurden verworfen.

Anschließend wurden die Biopsien auf agarbeschichtete (Agar Noble, DIFCO-Laboratories, Detroit, USA) 24-Loch-Multiwellplatten (Multiwell Tissue Culture Plate, 24 Well, Falcon, Lincoln Park, New Jersey, USA) gebracht. Der Kulturagar enthielt Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-Life-Technologies LTD, Paisley, Scotland) mit 10 % neugeborenen Kälberserum (NCS, Gibco-Life-Technologies LTD, Paisley, Scotland), Streptomycin (Penstrep 1,8 µl/ml, Gibco-Life-Technologies LTD, Paisley, Scotland), Amphoterecin B (Fungizone, 3,6 µl/ml, Gibco-Life-Technologies LTD, Paisley, Scotland) und nichtessentielle Aminosäuren (1,1 µl/ml, Gibco-Life-Technologies LTD, Paisley, Scotland).

Die Verwendung von agarbeschichteten Kulturplatten verhinderte eine Adhärenz der Kulturen am Boden und gewährleistete eine optimale Nährstoffversorgung. Den Biopsien wurde zusätzlich 200 µl BEGM zugegeben.

Die Kultur erfolgte bei 37 °C mit 5 % CO₂ und nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Typ B 5060 EC/CO₂, Heraeus, Hanau). Das Nährmedium wurde in zweitägigem Abstand, die Kulturplatten in wöchentlichem Abstand gewechselt.

Die Proben wurden zweitägig mikroskopisch beurteilt. Sie wurden insbesondere auf das Vorhandensein von Zilien geprüft. Bakteriell oder durch Pilze verunreinigte Zellkulturen wurden verworfen. Die Kulturzeit betrug zwischen 14 und 21 Tagen. Pro Experiment wurde jeweils eine Zellkultur verwendet.

2.2.5-Aminolävulinsäure (5-ALA)

Die 5-ALA wurde von der Firma Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Deutschland als Hydrochloridsalz bezogen und in der Konzentration 0,3 mg/ml in HEPES-gepuffertem serumfreiem Medium (DMEM) mit pH 7.2 gelöst.

Aufgrund der chemischen Instabilität von 5-ALA-Lösungen wurden die Inkubationslösungen vor jedem Experiment frisch angesetzt.

2.3. Fluoreszenzspektroskopischer Nachweis von PPIX

2.3.1. Lichtquelle für die Anregung der Porphyrinfluoreszenz

Als Lichtquelle für die Anregung der Fluoreszenz diente eine modifizierte Xenon-Hochdrucklampe (D-Light-System; Storz GmbH, Tuttlingen, Deutschland) ausgestattet mit einem speziellen Filtersystem für ein Emissionsspektrum von 375 – 440 nm. Die Bestrahlungsleistung betrug konstant 10 mW/cm². Dieses Anregungsspektrum im blau-violetten Spektralbereich ist sinnvoll, da in diesem Wellenlängenbereich auch das Absorptionsmaximum von PPIX liegt. Die Lichtemission war auf drei Sekunden pro Messung beschränkt und wurde in eine 500 µm Plastikfaser eingekoppelt.

2.3.2. Detektorsystem für den Nachweis der Fluoreszenz

Für den Nachweis der Fluoreszenz wurde das emittierte Licht der Oberfläche einer Organkultur über eine Silikonfaser zu einem System (OSMA III, SI Spectroscopy Instruments, Gilching, Deutschland) geleitet, das die angeregte Fluoreszenz spektral auflösen und quantitativ messen kann.

Eine ausreichende Blockung des Lichtes für die Anregung der Fluoreszenz wurde mit zwei speziellen Filtern (KV 450, GG 455; Schott, Mainz, Germany) erreicht.

Die Signalintensitäten im roten Spektralbereich zwischen 628 und 644 nm (entsprechend dem Maximum der PPIX-Fluoreszenz bei 635 nm) wurden integriert und auf die Autofluoreszenz des Gewebes normiert. Sie wurden als Maß für die Fluoreszenzintensität und somit für die PPIX-Konzentration im Epithel ausgewertet (Loh et al., 1993).

Abb. 6 zeigt ein PPIX-Fluoreszenzspektrum mit einem höheren Peak bei 635 nm und einem niedrigeren Peak bei 705 nm.

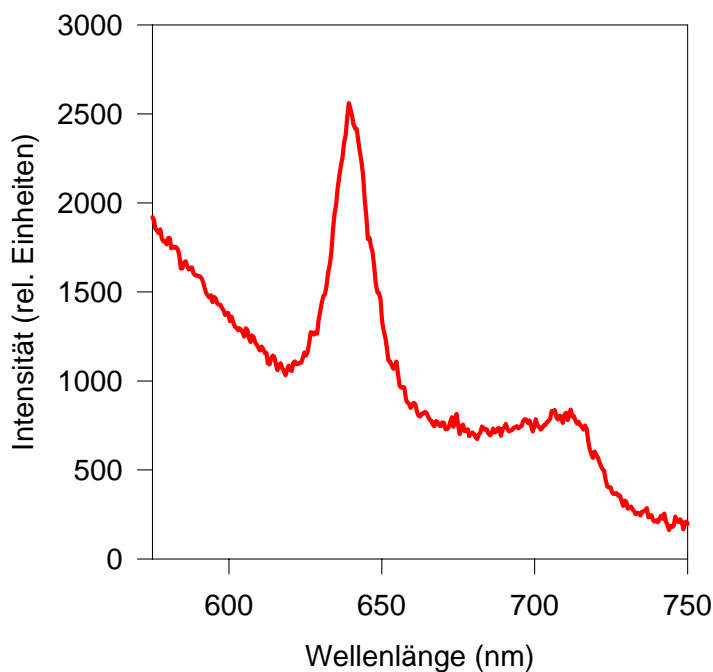


Abb.6: 5-ALA-induziertes PPIX-Fluoreszenzspektrum einer dreidimensionalen Zellkultur des normalen humanen Bronchialepithels

2.3.3. Anordnung der Messapparatur

Die Zellkultur wurde nach der Inkubation mit 5-ALA zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurde sie in eine mit 1,4 ml HEPES-gepuffertem Medium gefüllte, 4 cm im Durchmesser messende, speziell konstruierte Metallkammer (Effenberger, München, Deutschland) gebracht und abgedeckt. In der Plastikabdeckung befand sich mittig eine runde Öffnung von 0,8 cm Durchmesser zur Positionierung der Anregungs- und Detektionsfaser.

Die Versuchskammer befand sich zur Aufrechterhaltung der Temperatur von 37 °C in einem Wärmebad.

Die Anregungs- sowie die Detektionsfaser waren an der Versuchskammer so installiert, dass der Abstand und der Winkel zur Zellkultur bei jedem Versuch identisch war.

Die Abb. 7 zeigt schematisch den Versuchsaufbau.

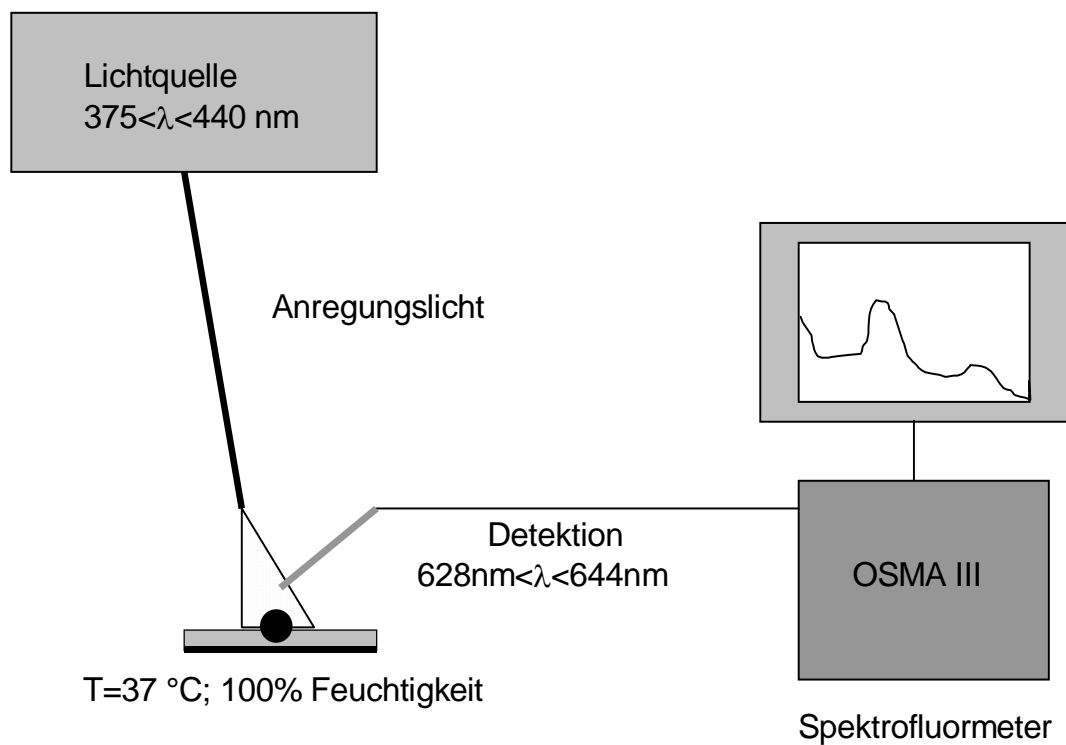


Abb. 7: schematischer Versuchsaufbau zur Messung der Fluoreszenzemission

Die Abb. 8 zeigt ein Foto der Versuchsanordnung

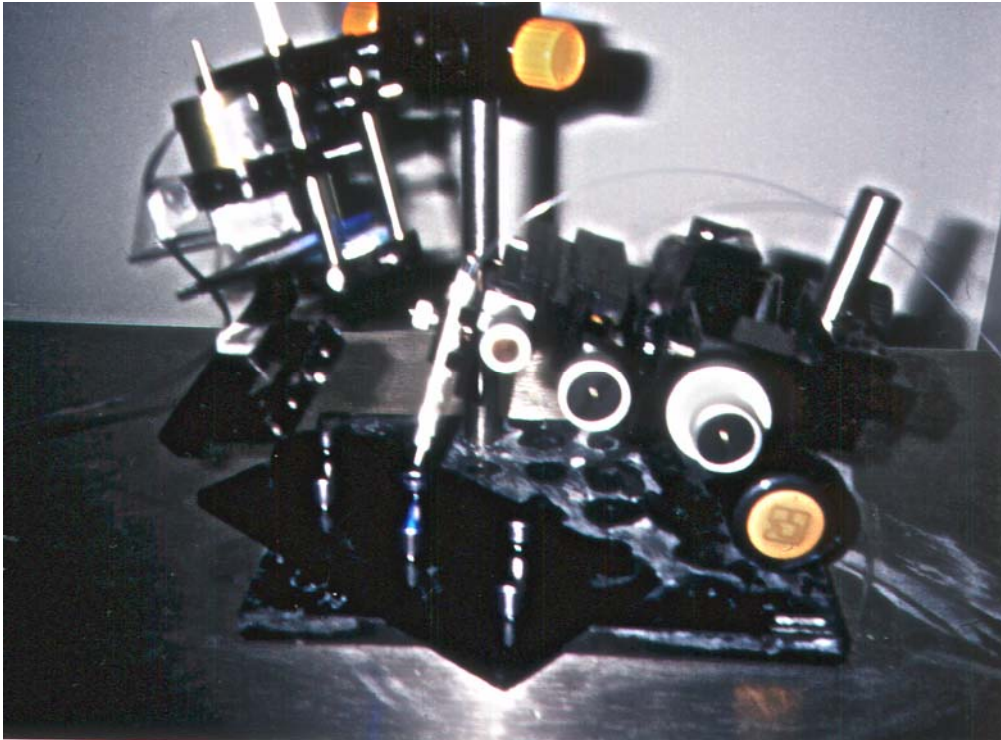


Abb. 8: Hier ist der Versuchsaufbau dargestellt.
Im Vordergrund des Bildes ist die metallische Versuchskammer sowie der festinstallierte Halteapparat für die Anregungs- und Detektionsfaser zu sehen. Zur Versuchsdurchführung befand sich der Versuchsaufbau in einem Wasserbad.

Die Versuchskammer wurde mit einer Metallfolie abgedeckt und der Versuchsaufbau befand sich in einem abgedunkelten Raum, da die PPIX-Fluoreszenz durch Lichteinstrahlung sehr rasch ausbleicht (Kennedy und Pottier, 1992).

2.4. Messung und Auswertung

Der Versuchsaufbau befand sich – wie oben bereits beschrieben - in einem abgedunkelten Raum.

Zunächst wurde das Wasserbad etwa 30 min vor Versuchsbeginn auf 37°C erwärmt.

Die 5-ALA-Lösung in der Konzentration 0,3 mg/ml wurde frisch hergestellt und auf 37°C erwärmt.

Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellkulturen per Losverfahren einer der drei Versuchsgruppen zugeordnet. Es wurden nur Zellkulturen mit > 50% ziliertem Epithel verwendet. Dies wurde durch Inversionsmikroskopie der einzelnen Kulturen festgestellt.

Sie wurden dann bei 37°C mit der 5-ALA-Lösung für die der Versuchsgruppe entsprechende Zeit inkubiert.

Die den Versuchsgruppen I und II zugeordneten Zellkulturen wurden nach 5 bzw. 15 min Inkubationszeit zweimal in serumfreiem Medium gewaschen und unmittelbar anschließend in 1,4 ml Medium mittig in der Versuchskammer positioniert. Die Kulturen der Versuchsgruppe III wurden für die Dauer des Experiments in 5-ALA-Lösung inkubiert.

Nach der Positionierung der Kultur in der Versuchskammer wurde der Deckel geschlossen und die Anregungs- sowie die Detektionsfaser eingestellt. Die spezielle Halterung der Fasern war so konstruiert, dass sie zum Positionieren der Zellkultur zurückgeschoben werden konnten. Damit war gewährleistet, dass an den Fasern keine Verunreinigungen durch Berührung oder Flüssigkeit eintraten.

Durch eine Markierung wurde sichergestellt, dass der Abstand der Fasern zur Zellkultur in jedem Experiment nahezu identisch war. Kleinste Unterschiede waren durch die leicht unterschiedliche Größe der Zellkulturen bedingt.

Das Wasserbad und der darin befindliche Versuchsaufbau wurden mit einer Metallfolie noch zusätzlich abgedeckt.

Die Messungen erfolgten jede 30 min ab Inkubationsbeginn.

Dazu wurden zeitgleich die Lichtquelle sowie das OSMA-System aktiviert. Durch die Aktivierung der Lichtquelle wurde die gesamte Zellkultur für je 3 sek. pro Messvorgang bestrahlt. Emissionsspektren wurden im Spektralbereich zwischen 450 und 750 nm aufgenommen.

Um die spezielle Porphyrin-IX-Fluoreszenz von der Autofluoreszenz des Gewebes zu trennen, wurde das Verhältnis der integrierten Autofluoreszenzintensitäten bei den Wellenlängen 635 ± 5 nm und 590 ± 5 nm zu Beginn der Versuche bestimmt und von jedem Spektrum subtrahiert.

2.5. Versuchsdurchführung

Nach einer durchschnittlichen Kultivierungszeit von 17 Tagen wurden die Zellkulturen den Versuchen zugeführt.

Die Experimente erfolgten in den drei im Folgenden beschriebenen Versuchsgruppen I – III.

Die Zuordnung zur jeweiligen Gruppe erfolgte durch Losverfahren.

Die Abb. 9. zeigt das Versuchsprotokoll.

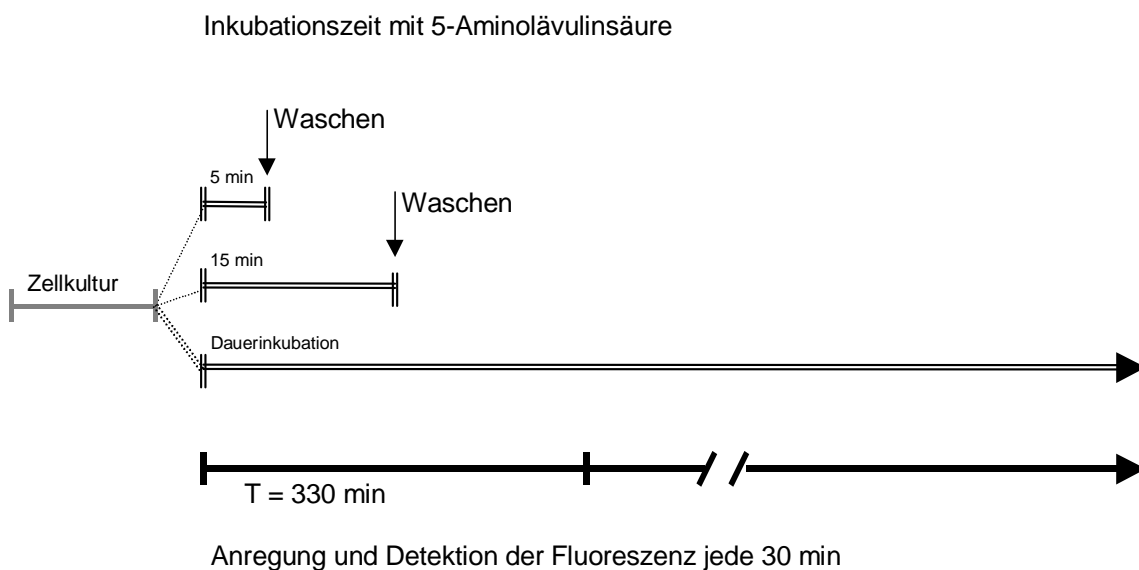


Abb. 9: Anregung und Detektion der Protoporphyrin IX-Fluoreszenz nach unterschiedlich langer Inkubationszeit der Zellkulturen mit 5-Aminolävulinsäure

2.5.1. Versuchsgruppen

2.5.1.1. Versuchsgruppe I: Inkubation mit 5-ALA für 5 Minuten (n=9)

Versuchsablauf:

- Herstellung der 5-ALA-Lösung 0,3 mg/ml bei 37°C
- Inkubation der ausgewählten Zellkultur mit der 5-ALA-Lösung für 5 min bei 37 °C
- zweimaliges Waschen der Zellkultur
- Einbringen in die Versuchskammer mit 1,4 ml Medium und Positionierung der Anregungs- sowie der Detektionsfaser
- Anregung der Fluoreszenz und Messung in Abständen von 30 min ab Kontakt mit 5-ALA für insgesamt 300 min

2.5.1.2. Versuchsgruppe II: Inkubation mit 5-ALA für 15 Minuten (n=9)

Versuchsablauf:

- Herstellung der 5-ALA-Lösung 0,3 mg/ml bei 37°C
- Inkubation der ausgewählten Zellkultur mit der 5-ALA-Lösung für 15 min bei 37 °C
- zweimaliges Waschen der Zellkultur
- Einbringen in die Versuchskammer mit 1,4 ml Medium und Positionierung der Anregungs- sowie der Detektionsfaser
- Anregung der Fluoreszenz und Messung in Abständen von 30 min ab Kontakt mit 5-Aminolävulinsäure für insgesamt 300 min

2.5.1.3. Versuchsgruppe III: Dauerinkubation mit 5-ALA (n=9)

Versuchsablauf:

- Herstellung der 5-ALA-Lösung 0,3 mg/ml bei 37°C
- Inkubation der ausgewählten Zellkultur in 1,4 ml der 5-ALA-Lösung bei 37 °C in der Versuchskammer für die Dauer des Experiments
- Positionierung der Anregungs- sowie der Detektionsfaser
- Anregung der Fluoreszenz und Messung in Abständen von 30 min ab Kontakt mit 5-ALA für insgesamt 300 min

2.6. Statistik

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels Sigma Stat for Windows Version 1.0, High Edit Professional Copyright© 1993, Micro Help, Inc. And Heiler Software GmbH.

Als Test wurde die „Kruskal-Wallis-One Way Analysis Of Variance and Multiple Comparisons Of Ranks Of Several Independent Samples“ angewendet.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis von PPIX-spezifischer Fluoreszenz bei 635 nm

Die angeregte Fluoreszenz in den Zellkulturen war mit bloßem Auge nicht sichtbar.

Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Zellkultur nach Inkubation mit 5-ALA-Lösung in Abb. 10 zeigt am Zellkulturrand deutlich eine rote Fluoreszenz.

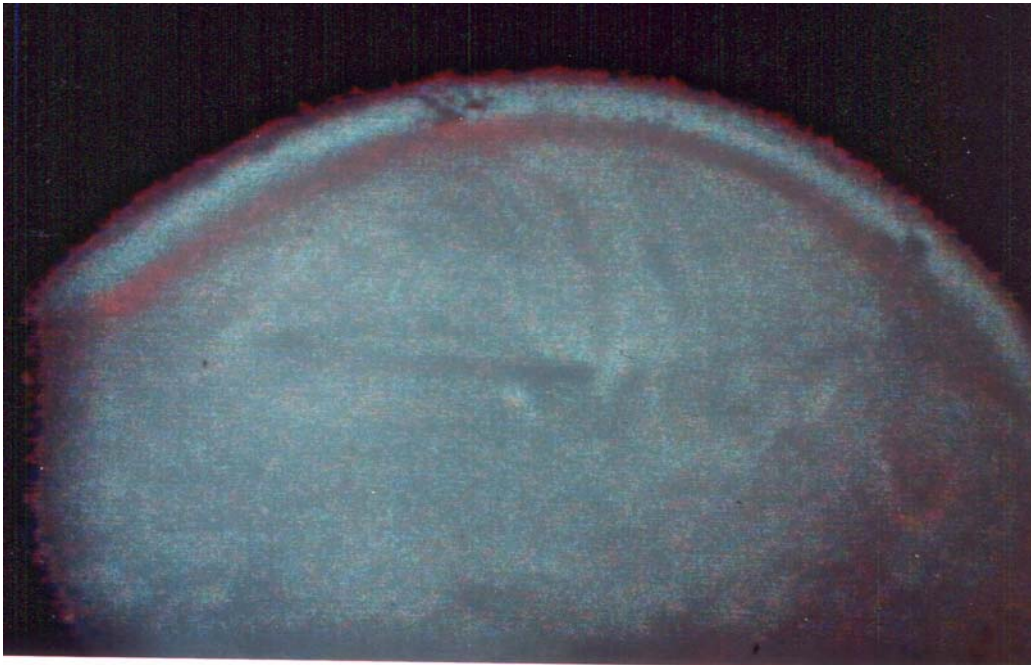


Abb. 10: Hier ist die mikroskopische Aufnahme einer Bronchialepithelkultur 180 Minuten nach Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure für 15 Minuten zu sehen (375-fache Vergrößerung)

Mit Hilfe der OSMA-Technik wurde die angeregte Fluoreszenz spektral aufgelöst und quantitativ ausgewertet.

Die Analyse der Fluoreszenzspektren zeigt Emissionsbanden bei 635 nm und 705 nm. Diese identifizieren sie eindeutig als PPIX-Fluoreszenz (Loh et al., 1993; Baumgartner et al., 1996). Damit ist der Fluoreszenzanstieg auf die 5-ALA-Inkubation zurückzuführen.

Die Signalintensität bei 635 nm wurde als Maß für die PPIX-Konzentration im Epithel ausgewertet (Loh et al., 1993).

Dabei wurde der jeweilig gemessene Fluoreszenzwert auf die Autofluoreszenz der Zellkultur normiert (Vergleiche 2.4.).

3.2. Kinetik der 5-ALA-induzierten PPIX-Fluoreszenz in Abhängigkeit der Inkubationszeit (Versuchsgruppen I-III)

3.2.1. Versuchsgruppe I: Inkubation mit 5-ALA für 5 Minuten

Im Hinblick auf den möglichen Einsatz der 5-ALA in der Diagnostik sollte durch die Versuche der Versuchsgruppe I überprüft werden, ob eine 5-minütige Kontaktzeit mit 5-ALA ausreicht, detektierbare Mengen an PPIX-Fluoreszenz in den Zellkulturen zu induzieren.

Zusätzlich sollte untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt nach 5-ALA-Kontakt die maximale Fluoreszenz erreicht wird.

Nach Inkubation der Zellkulturen mit 0,3 mg/ml 5-ALA für 5 Minuten und anschließendem sorgfältigem Waschen wurde die Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 300 Minuten gemessen.

Es wurde, wie oben beschrieben, die Signalintensität bei 635 nm als Maß für die PPIX-Konzentration im Epithel ausgewertet.

Die Abb. 11 zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Fluoreszenzintensitäten von 9 untersuchten Bronchialschleimhautkulturen im Verlauf von 300 min.

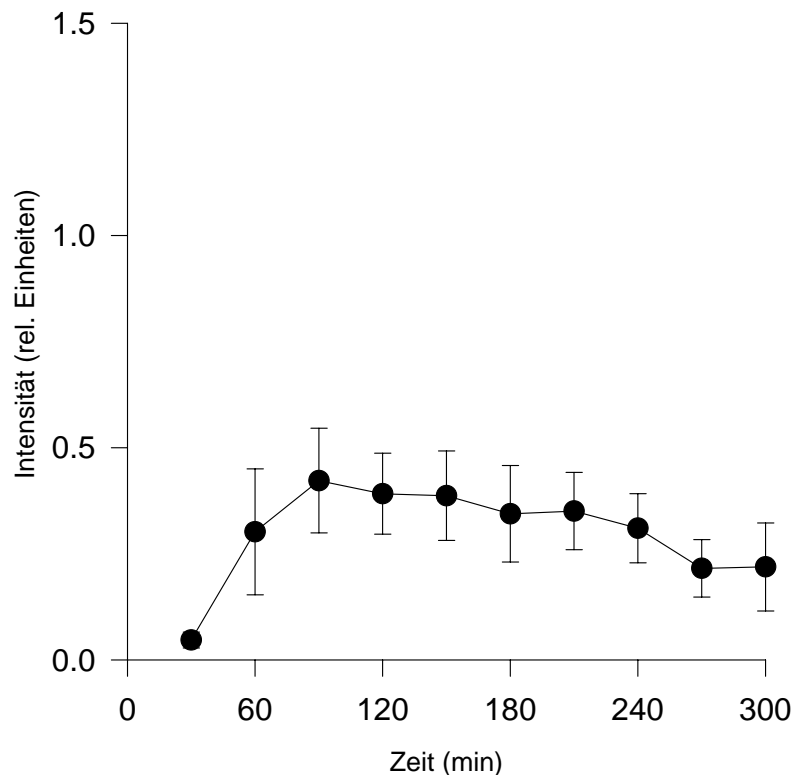


Abb. 11: Hier sind die Fluoreszenzintensitäten (rel. Einheiten; Mittelwerte \pm Standardfehler; $n=9$) von Bronchialschleimhautkulturen nach Inkubation mit 5-ALA für 5 min im Verlauf von 300 Minuten ab 5-ALA-Kontakt abgebildet.

Es konnte gezeigt werden, dass ein 5-minütiger 5-ALA-Kontakt ausreicht, um detektierbare Mengen an PPIX-Fluoreszenz zu induzieren.

Nach Entfernen der 5-ALA-Lösung steigt die endogene Fluoreszenz noch 90 Minuten ab Kontakt mit 5-ALA fast linear an.

Anschließend kommt es zu einem langsamen Fluoreszenzabfall.

Nach 126,7 Minuten \pm 36,8 Minuten wurde die maximale Fluoreszenz erreicht (Mittelwerte \pm Standardfehler).

300 Minuten ab 5-ALA-Kontakt sind noch ca. die 0,5-fache Fluoreszenz der Maximalfluoreszenz zu detektieren.

3.2.2. Versuchsgruppe II: Inkubation mit 5-ALA für 15 Minuten

In der Versuchsgruppe II sollte das Fluoreszenzverhalten der Zellkulturen nach 15-minütiger Inkubationszeit mit 5-ALA untersucht werden.

Zudem sollte untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt nach 5-ALA-Kontakt die maximale Fluoreszenz erreicht wird.

Nach Inkubation der Zellkulturen mit 0,3 mg/ml 5-ALA für 15 Minuten und anschließendem sorgfältigem Waschen wurde die Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 300 Minuten gemessen.

Es wurde ebenfalls, wie oben beschrieben, die Signalintensität bei 635 nm als Maß für die PPIX-Konzentration im Epithel im Verlauf von 300 Minuten ausgewertet.

Die Abb. 12 zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Fluoreszenzintensitäten von 9 untersuchten Bronchialschleimhautkulturen im Verlauf von 300 min.

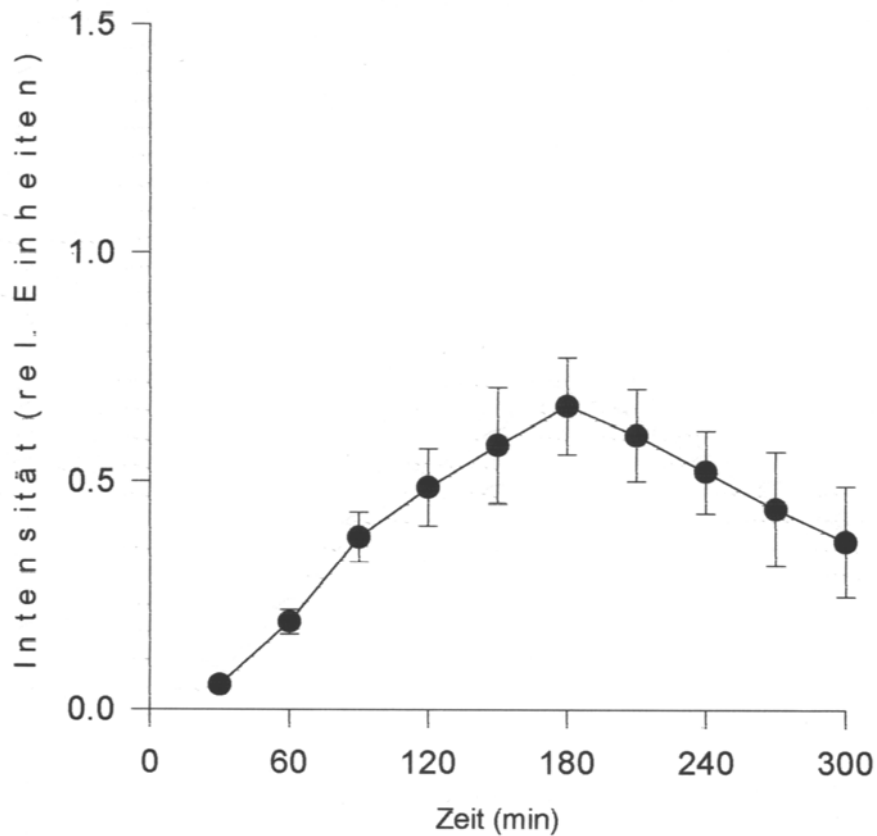


Abb. 12: Hier sind die Fluoreszenzintensitäten (rel. Einheiten; Mittelwerte \pm Standardfehler; $n=9$) von Bronchialschleimhautkulturen nach Inkubation mit 5-ALA für 15 min im Verlauf von 300 Minuten ab 5-ALA-Kontakt abgebildet.

Es konnte gezeigt werden, dass nach Entfernung der 5-ALA-Lösung die endogene Fluoreszenz noch 180 Minuten ab 5-ALA-Kontakt fast linear ansteigt. 300 Minuten ab 5-ALA-Kontakt beträgt die Fluoreszenz noch mehr als das 0,5-fache des Maximalwertes.

Nach 193,3 Minuten \pm 37,7 Minuten wurde die maximale Fluoreszenz erreicht (Mittelwerte \pm Standardfehler).

3.2.3. Versuchsgruppe III: Dauerinkubation mit 5-ALA

In der Versuchsgruppe III sollte die Fluoreszenzkinetik der Zellkulturen während der Dauerinkubation mit 0,3 mg/ml 5-ALA untersucht werden.

Es wurde ebenfalls, wie oben beschrieben, die Signalintensität bei 635 nm als Maß für die PPIX-Konzentration im Epithel im Verlauf von 300 Minuten ausgewertet.

Die Abb. 13 zeigt die Mittelwerte \pm Standardfehler der Fluoreszenzintensitäten von 9 untersuchten Bronchialschleimhautkulturen im Verlauf von 300 min.

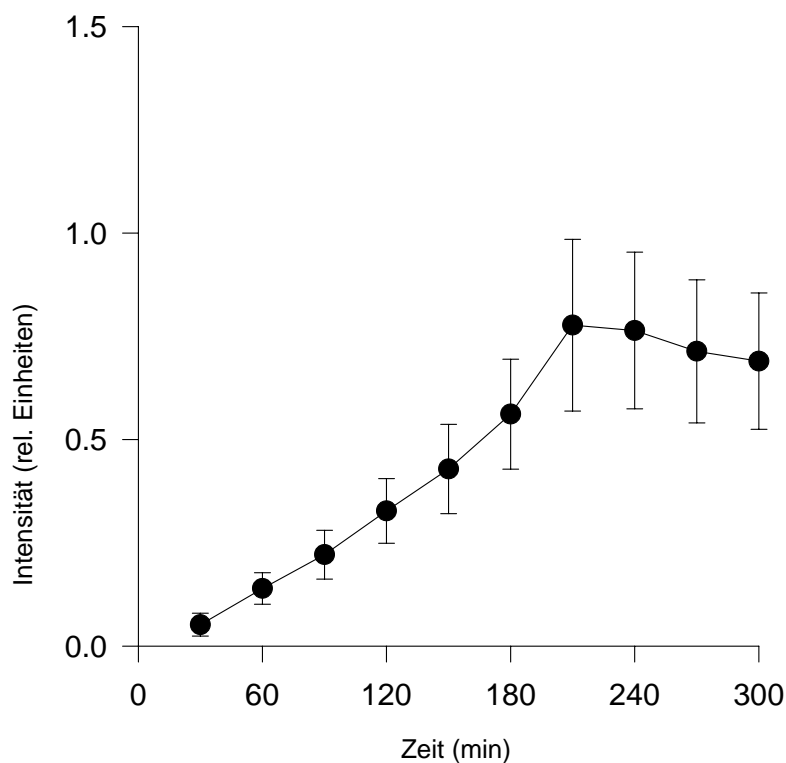


Abb. 13: Hier sind die Fluoreszenzintensitäten (rel. Einheiten; Mittelwerte \pm Standardfehler; n=9) von Bronchialschleimhautkulturen während Dauerinkubation mit 5-ALA im Verlauf von 300 Minuten abgebildet.

In dieser Versuchsgruppe konnte gezeigt werden, dass während der Dauerinkubation der Zellkulturen in 5-ALA die endogene Fluoreszenz nach zunächst fast linearem Anstieg nach 210 min ein Plateau erreicht.

Nach 236,7 Minuten \pm 51,9 Minuten wurde die maximale Fluoreszenz erreicht (Mittelwerte \pm Standardfehler).

3.2.4. Vergleich der Ergebnisse der Versuchsgruppen I – III

Die Abb. 14 zeigt die Mittelwerte \pm Standardfehler der Fluoreszenzintensitäten von 9 untersuchten Bronchialschleimhautkulturen je Versuchsgruppe im Verlauf von 300 min.

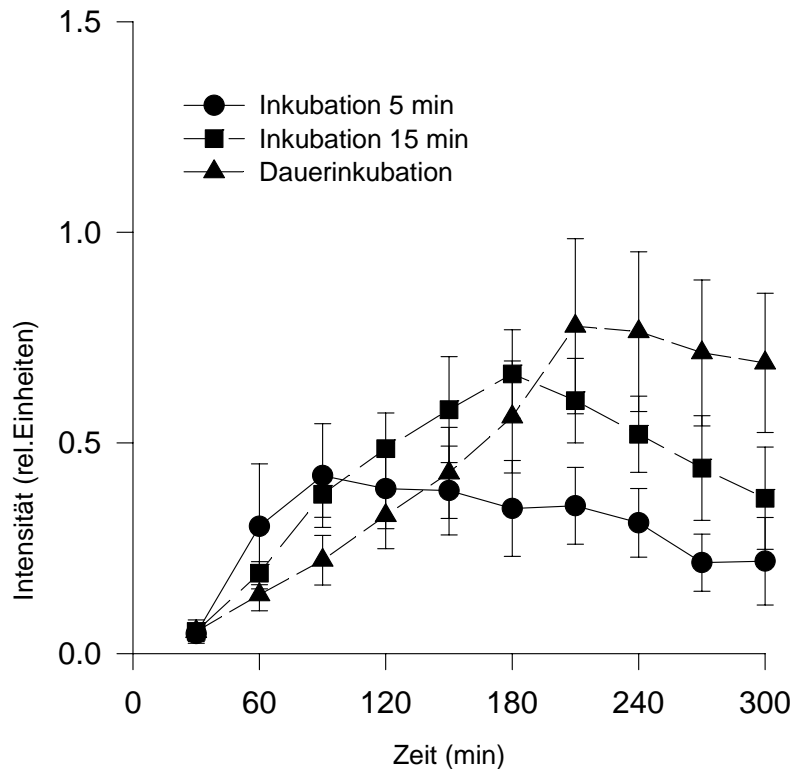


Abb. 14: Hier sind die Fluoreszenzintensitäten (rel. Einheiten; Mittelwerte \pm Standardfehler; n=9) von Bronchialschleimhautkulturen nach 5 min, 15 min und während Dauerinkubation mit 5-ALA im Verlauf von 300 Minuten ab 5-ALA-Kontakt abgebildet.

Die Zellkulturen, die für 5 oder 15 Minuten mit 5-ALA inkubiert wurden, zeigten einen nahezu linearen Anstieg der Fluoreszenzintensität über die ersten 90 beziehungsweise 180 Minuten, sowie einen späteren Abfall der Fluoreszenz.

Die Zellkulturen, welche einer Dauerinkubation mit 5-ALA unterzogen wurden, erreichten 210 Minuten ab 5-ALA-Kontakt ein Plateau der Protoporphyrin-IX-Fluoreszenz, welche für die Dauer des Experiments persistierte. Die Zeiten bis zum Erreichen der Maximalfluoreszenz betragen $126,7 \pm 36,8$, $193,3 \pm 37,7^*$ und $236,7 \pm 51,9$ Minuten (Mittelwerte \pm Standardfehler) in den Versuchsgruppen mit 5 Minuten, 15 Minuten und Dauerinkubation mit 5-ALA (* $p < 0.05$ gegenüber den anderen Gruppen, Kruskal-Wallis-Test).

Dies ist in der Abbildung 15 graphisch dargestellt.

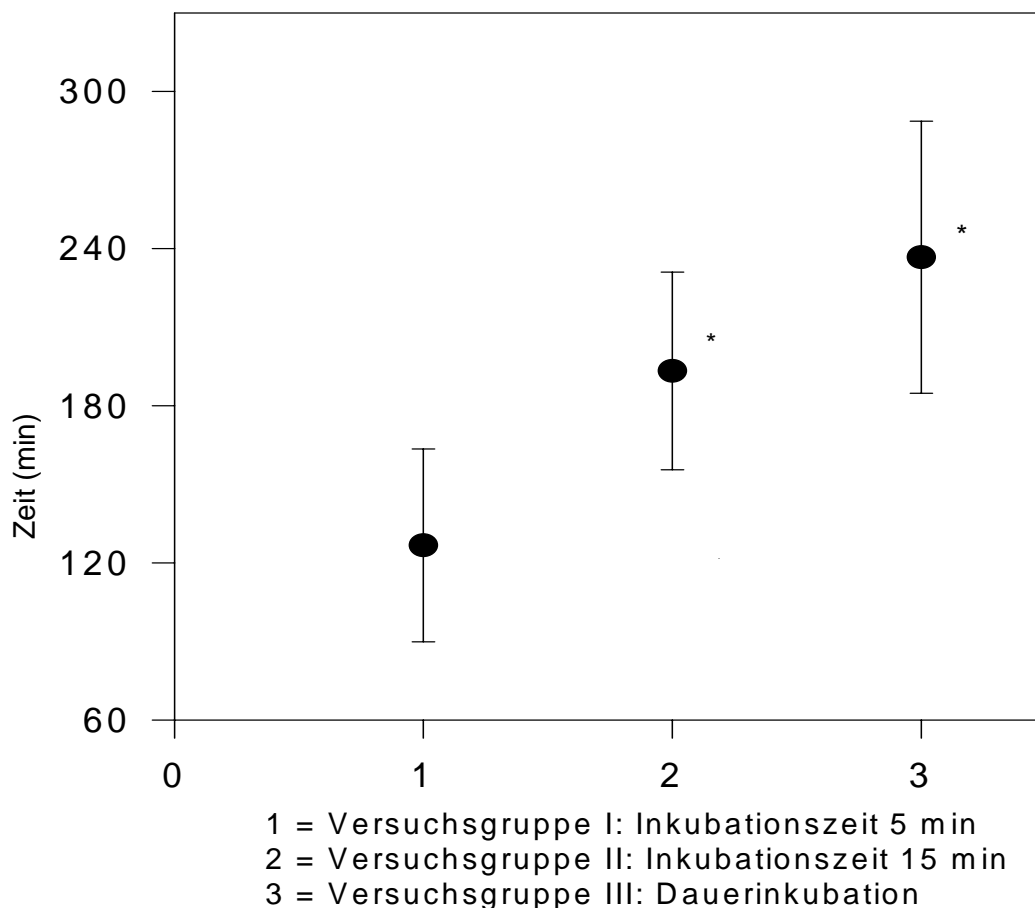


Abb. 15: Hier ist die Zeit bis zum Erreichen der Maximalfluoreszenz (min; Mittelwerte \pm Standardfehler; $n=9$ /Gruppe) von 9 untersuchten Bronchialschleimhautkulturen nach 5 min, 15 min und während Dauerinkubation mit 5-ALA dargestellt.

* mit $p < 0.05$ signifikant gegenüber Gruppe 1

Der Vergleich der Versuchsgruppen zeigt mit $p < 0.05$ einen signifikanten Unterschied der Versuchsgruppen II und III zur Versuchsgruppe I (Kruskal-Wallis-Test One Way Analysis On Ranks Sigma Stat. Soft.).

In Abb. 16 folgt die graphische Darstellung der Mittelwerte \pm Standardfehler der Maximalfluoreszenz von 9 untersuchten Schleimhautkulturen je Versuchsgruppe.

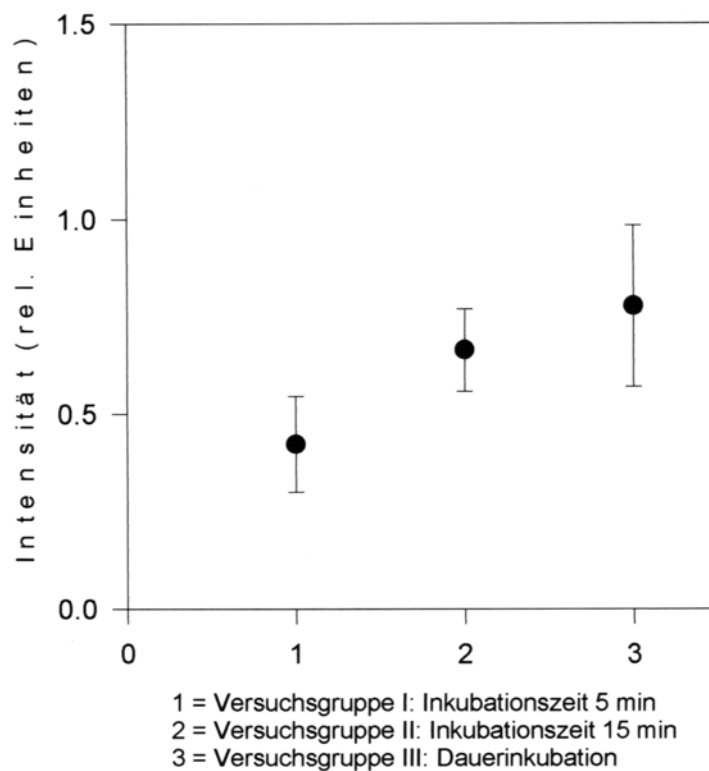


Abb. 16: Maximale Fluoreszenzintensitäten (rel. Einheiten; Mittelwerte \pm Standardfehler; $n=9$ /Gruppe) von Bronchialschleimhautkulturen nach 5 min, 15 min und während Dauerinkubation mit 5-ALA.

Der Vergleich der Versuchsgruppen zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede der Fluoreszenzkinetiken und der maximalen Fluoreszenzintensitäten (Two Way Repeated Measures Analysis Of Variances On One-Factor Balanced Design For Comparing Kinetics; Kruskal-Wallis Test For Comparing Maximal Fluorescence Intensities, Sigma Stat. Soft.)

Tendenziell nimmt die Höhe der maximalen Fluoreszenzintensität mit der Dauer der Inkubation mit 5-ALA zu.

Die Höhe der Maximalintensitäten der PPIX-Fluoreszenz in den drei Versuchsgruppen ist offensichtlich abhängig von der Inkubationsdauer mit 5-ALA. Sie betragen $0,4225 \pm 0,1233$, $0,6636 \pm 0,1050$ und $0,7769 \pm 0,2077$ rel. Einheiten (Mittelwerte \pm Standardfehler) in den Versuchsgruppen mit 5 Minuten, 15 Minuten und Dauerinkubation mit 5-ALA. Dies ist statistisch nicht signifikant.

4.Diskussion

4.1. Diskussion der Materialien und Methoden

4.1.1. Dreidimensionale Zellkulturen des humanen Bronchialepithels

Die Dreidimensionale Zellkultur stellt eine in-vivo-nahe, nicht adhärente Form der Kultivierung respiratorischer Epithelien dar.

Erstmals 1985 und 1986 berichtete Steinsvag über Organkulturen fetaler Rattenhirnhemisphären (Steinsvag und Laerum, 1985; Steinsvag, 1986) sowie 1991 über Organkulturen humaner Tonsillenschleimhaut (Steinsvag et al., 1991).

Eine modifizierte Methode zur Kultivierung dreidimensionaler Organkulturen menschlichen respiratorischen Epithels wurde 1993 an der Medizinischen Klinik, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität etabliert (Gamarra et al., 1993; Al-Batran et al., 1999; Bals et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Bronchialbiopsien, die im Ganzen kultiviert werden, nach zwei bis drei Tagen eine rundliche Form annehmen und vollständig epithelialisiert sind. Im Gegensatz zu Monolayerkulturen (Jorissen et al., 1991) bleibt bei diesen dreidimensionalen Zellkulturen die Integrität des Zell-Stroma-Verbandes und die Differenzierung des respiratorischen Epithels weitgehend erhalten. Insbesondere besteht die Möglichkeit der Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen. Anhand von histologischen Schnitten konnte nachgewiesen werden, dass das mehrreihige, respiratorische Epithel mit Basalmembran, Basalzellen, teilweise zilierten Epithelzellen sowie Becherzellen bis zu 21 Kulturtage konstant erhalten bleibt. Bei etwa 80% der Kulturen war koordinierter Zilienschlag beobachtbar. Morphologisch unterscheiden sich die dreidimensionalen Zellkulturen nicht von respiratorischem Epithel in vivo. Diese Untersuchungsergebnisse wurden 1996 von Fjellbirkeland (Fjellbirkeland et al., 1996) bestätigt. Die dreidimensionalen Zellkulturen erscheinen deshalb geeignet zu sein, Vorgänge am Epithel in vitro zu simulieren.

1993 konnte Gamarra zeigen, dass es sich bei den dreidimensionalen Zellkulturen des humanen Bronchialepithels um ein geeignetes Modell zur Aufnahme von Photosensibilisatoren handelt (Gamarra et al., 1993; Grundler et al., 1993; Gamarra et al., 1995). 2001 wurden von Lange et al. Organkulturen aus den Sinus paranasales des Schafes oder aus der Blase des Schweines als Routine-Modell zur Untersuchung von Photosensibilisatoren, zur PDD und PDT vorgeschlagen (Lange et al., 2001).

Die Ausprägung und der Verlauf der PPIX-Fluoreszenz im Bronchialepithel ist von der Verteilung des PPIX in den unterschiedlichen Zellarten sowie von der Gewebearchitektur sowie von der dreidimensionalen Fluoreszenzstreuung abhängig. Diese Charakteristika sind in dreidimensionalen Zellkulturen besser repräsentiert als in Monolayerkulturen.

Die Biopsien der Bronchialschleimhaut wurden im Rahmen von diagnostischen und therapeutischen Bronchoskopien aus optisch gesunden Schleimhautarealen gewonnen. Die Indikationen waren meist Bronchialkarzinome, Metastasen anderer Karzinome u.s.w. (Vergleiche 2.1.1.). Es ist unbekannt, inwieweit Eigenschaften des Spenderepithels hinsichtlich entzündlicher oder degenerativer Veränderungen während der Kulturzeit bestehen bleiben und Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse nehmen.

Die Zellkulturen sind mit einem Durchmesser von 0,5 – 1 mm unterschiedlich groß. Es variiert die Zellzahl, der Anteil des zilierten Epithels sowie die Verteilung der verschiedenen Zelltypen. Dadurch ist die Durchführung quantitativer Messungen erschwert. Es ist möglich, dass dadurch das Aufnahmeverhalten für 5-Aminolävulinsäure sowie die Menge des gebildeten Protoporphyrin IX beeinflusst wird. Dies spiegelt sich in den relativ hohen Standardabweichungen der Fluoreszenzmessungen wider. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität dürfte jedoch von den unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften der Zellkulturen nicht beeinflusst werden.

Im Gegensatz zu Monolayerkulturen, in denen Epithelzellen rasch dedifferenzieren, bleiben die Differenzierung der verschiedenen Zelltypen und der mehrreihige Aufbau in Organkulturen mindestens vier Wochen erhalten. Die Zellen wachsen auf ihrer eigenen Matrix und bilden ihre eigene Basalmembran.

Insgesamt steht mit dreidimensionalen Organkulturen von humanem respiratorischen Epithel eine alternative, in-vivo-nahe Kulturform zur Verfügung. Da es wahrscheinlich ist, dass die PPIX-Fluoreszenz vom Zelltyp sowie von der dreidimensionalen Zusammensetzung des Gewebes abhängt, ist es sinnvoll für Untersuchungen zur PDD und PDT Organkulturen zu verwenden (Lange et al., 2001).

Darüberhinaus ist es möglich, Kokulturen zwischen Bronchialepithel und Tumorzelllinien zu bilden. Dies bietet die Möglichkeit, die Fluoreszenz von Tumor- und Normalgewebe direkt zu vergleichen.

4.1.2. Kultivierungsmethoden

Die Biopsien wurden gewaschen und zur Kultivierung auf agarbeschichtete Multiwellplatten pipettiert. Bei diesem Pipettiervorgang, beim Wechsel des Kulturmediums sowie der Platten war trotz eines umsichtigen Vorgehens eine mechanische Schädigung der Zellkulturen nicht auszuschließen.

Für sämtliche Versuche wurden nur lichtmikroskopisch unauffällige Zellkulturen verwendet. Um eine Adhäsion der Zellkultur an die Multiwellplatten zu verhindern, wurde deren Boden mit Agar beschichtet und zusätzlich 200 µl serumfreies Kulturmedium hinzupipettiert.

BEGM-Medium ist ein serumfreies Medium. Da dem Medium lediglich ein von der Herstellerfirma mitgeliefertes Supplement Pack (Antibiotika, Antimykotika, Aminosäuren, Wachstumsfaktoren, Hormone) zugegeben werden muss, ist die Herstellung der Kulturlösung einfach und schnell durchzuführen (Promo Cell, 1998). Das Kulturmedium wurde jeden zweiten Tag ausgetauscht, um eine Beeinflussung der Zellkulturen durch Veränderungen des pH-Wertes, der Osmolarität sowie eines möglichen Nährstoffmangels gering zu halten.

Um Verunreinigungen der Zellkulturen mit Pilzen oder Bakterien zu vermeiden, wurde konsequent steril gearbeitet sowie einmal wöchentlich ein Wechsel der Kulturplatten durchgeführt.

4.1.3. Versuchsaufbau

4.1.3.1. 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)

Im Hinblick auf die mögliche Anwendung der Photodynamischen Diagnose in der Frühdiagnostik von Bronchialkarzinomen wurde für die durchgeführten Versuche die photosensibilisierende Substanz 5-ALA ausgewählt.

Bei systemischer Anwendung von Hämatoporphyrin-Derivaten wie zum Beispiel Photophrin[®] reichert sich diese Substanz auch in der Leber, Milz, den Nieren und der Haut an (Kessel, 1984). Photophrin[®] ist nur systemisch anwendbar und aufgrund der langen Halbwertszeit ist eine Photosensibilisierung der Haut über Wochen und Monate die Folge (Dougherty et al., 1990). Dies stellt den Hauptnachteil von Photophrin[®] dar.

Der wesentliche Vorteil von 5-ALA, einer natürlich vorkommenden Substanz, besteht in ihrer Anwendbarkeit zur lokalen Applikation (Kennedy et al., 1992; Svanberg et al., 1992; Cairnduff et al., 1994; Kriegmair, 1994; Orth et al., 1994; Szeimies et al., 1994; Baumgartner et al., 1996; Gossner et al., 1998) ohne schwerwiegende systemische Nebenwirkungen, insbesondere ohne langdauernde Photosensibilisierung der Haut. So konnten Kennedy et al. nachweisen, dass 5-ALA induziertes PPIX 24 Stunden nach systemischer, topischer oder intradermaler Applikation nicht mehr nachweisbar ist (Kennedy et al., 1992).

In einer Studie von Rick et al. wurde die Fluoreszenzkinetik von 5-ALA-induziertem PPIX in der Haut und im Blut untersucht (Rick et al., 1997). Nach oraler Applikation zeigten sich maximale Fluoreszenzintensitäten in der Haut zwischen 6,5 und 9,8 Stunden in Abhängigkeit der Lokalisation. 40 Stunden nach 5-ALA-Kontakt wurde nur noch 5% der maximalen Fluoreszenz detektiert. Nach Inhalation von 5-ALA wurde im Plasma nach 4,1 Stunden die maximale Fluoreszenz gemessen (Baumgartner et al., 1996).

Nach intravesikaler Instillation wurde die maximale PPIX-Fluoreszenz im Plasma 2,9 Stunden nach Applikation erreicht. Dieser Wert entspricht der Zeitspanne bis zum Auftreten maximaler Fluoreszenz nach 15minütiger 5-ALA-Inkubation in der vorliegenden Untersuchung. Die vorliegende Kinetik ist daher mit der topischen Anwendung von 5-ALA zu vergleichen.

Bei lokaler Anwendung in der Blase wird weniger als 1% der 5-ALA-Konzentration in den Körperkreislauf aufgenommen (Dalton et al., 2002). PDT mit topischer Anwendung von 5-ALA wird bereits als Therapie der Wahl für Aktinische Keratosen und oberflächliche Basalzellkarzinome in der Dermatologie diskutiert (Lang et al., 2001).

Es wäre denkbar, 5-Aminolävulinsäure inhalativ (Baumgartner et al., 1996) zur Verbesserung der Sensitivität der diagnostischen Bronchoskopie einzusetzen.

Bei der inhalativen Anwendung können nur sehr geringe Mengen PPIX im Blut der Probanden nachgewiesen werden, so dass systemische Nebenwirkungen unwahrscheinlich sind (Baumgartner et al., 1996; Rick et al., 1997).

In unseren Versuchen wurde 5-ALA als Hydrochloridsalz in der Konzentration 0,3 mg/ml in HEPES-gepuffertem serumfreien Medium mit pH 7.2 gelöst.

Diese Konzentration verwendeten Kriegmair et al. für eine Untersuchung an 68 Patienten mit Urothelcarcinomen. 5-ALA in dieser Dosierung wurde intravesikal appliziert und war ausreichend, um cystoskopisch identifizierbare Mengen an PPIX-Fluoreszenz zu induzieren (Kriegmair et al., 1994). Diese Situation ist vergleichbar mit der Anwendung in den Bronchien. Die Substanz soll topisch anwendbar sein und endoskopisch identifizierbare Mengen an PPIX-Fluoreszenz induzieren.

Die Aufnahme von 5-ALA in die Zelle wird durch ihre hydrophile Struktur limitiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch chemische Modifizierung von 5-ALA in lipophile Ester die PPIX-Fluoreszenz gesteigert werden kann (Endlicher et al., 2001).

4.1.3.2. Versuchskammer

Die im Wasserbad befindliche, metallische Versuchskammer wurde mit einem Plastikdeckel abgedeckt, der nur eine 0,8 cm im Durchmesser messende Öffnung für die Anregungs- und Detektionsfaser besaß.

Durch diese Maßnahme wurde das Medium weitgehend gegen Verdunstung und damit einhergehende Änderungen der Osmolarität und des pH-Wertes geschützt, so dass eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse dadurch weitgehend ausscheidet. Dies ist von Bedeutung, da eine pH-Abhängigkeit der 5-Aminolävulinsäure-induzierten Porphyrinfluoreszenz bei Versuchen mit Fibrosarkomzellen beschrieben wurde (Fuchs et al., 1997).

Die Abnahme der Porphyrinfluoreszenz von Geweben durch die Einstrahlung von Licht ist als Photobleaching beschrieben (Moan, 1986; Kennedy und Pottier, 1992; Bezdetsnaya et al., 1996). Dadurch entstehen Photoprodukte, die phototoxisch wirken können (König et al., 1993), und es können neue Emissionsbanden ausgebildet werden.

Um eine Beeinflussung der Messergebnisse durch diesen Effekt auszuschließen, wurden die Versuche in einem abgedunkelten Raum durchgeführt und zusätzlich die Versuchskammer mit einer Metallfolie abgedeckt.

Die im Wasserbad mit 37 °C positionierte wärmeleitende Versuchskammer aus Metall gewährleistete eine konstante Temperatur über den Versuchszeitraum. Dies ist von Bedeutung, da die Aufnahme von 5-Aminolävulinsäure in die Zelle temperaturabhängig erfolgt (Fuchs et al., 1994).

4.1.3.3. Lichtquelle für die Anregung der Porphyrinfluoreszenz

Zur Anregung der 5-Aminolävulinsäure-induzierten Protoporphyrin-IX-Fluoreszenz wurde eine Xenon-Hochdrucklampe mit einem speziellen Filtersystem für ein Emissionsspektrum im violett-blauen Spektralbereich (375 – 440 nm) und einer konstanten Bestrahlungsstärke von 10 mW/cm² verwendet.

Dieses Anregungsspektrum ist sinnvoll, da das Absorptionsmaximum von Protoporphyrin IX bei 408 nm (Soret-Bande) liegt. Ebenso ist es empfehlenswert, zur Vermeidung von Streulicht die Emissions-Bandbreite zu minimieren. Dabei handelt es sich um ein einfach zu bedienendes, erprobtes Lampensystem, welches auch an ein Bronchoskop angeschlossen werden kann (Baumgartner et al., 1996; Betz et al., 2002).

4.1.3.4. Detektorsystem für den Nachweis der Fluoreszenz

Für den Nachweis der Fluoreszenz wurde ein System verwendet, das die angeregte Fluoreszenz spektral auflösen und quantitativ messen kann.

Eine ausreichende Blockung des Lichtes für die Anregung der Fluoreszenz wurde mit zwei speziellen Filtern erreicht.

Dabei handelt es sich für die Erfassung, Identifizierung und Quantifizierung von PPIX-Fluoreszenzintensitäten geeignetes System (Schneckenburger et al., 1992; König et al., 1993; Orth et al., 1994; Baumgartner et al., 1996).

4.1.4. Versuchsdurchführung

Als Kultivierungszeit vor der Durchführung der Versuche wurde 14 – 21 Tage gewählt. In diesem Zeitraum sind die Umbauprozesse der Kulturen abgeschlossen und histologisch noch keine Alterungsprozesse nachzuweisen (Bals et al., 1998).

Als Problem bei der Versuchsdurchführung erwies sich die exakt mittige Platzierung der Zellkultur in der mit Medium gefüllten Versuchskammer. Dies war jedoch die Voraussetzung dafür, dass die Abstände der Anregungs- und Detektionsfaser zur jeweilig untersuchenden Zellkultur in jedem der Versuche gleich groß waren. Ebenso war die genaue Platzierung der Zellkultur die Voraussetzung dafür, dass die Oberfläche der Zellkultur komplett bestrahlt werden konnte. Exaktes Arbeiten war dringend erforderlich, da bei dieser Art der Versuchsanordnung die Intensität des detektierten Signals von der Entfernung zwischen Anregungs- bzw. Detektionsfaser und Gewebeoberfläche sowie von der Größe des bestrahlten Areals abhängt (Wagnières et al., 1998).

Durch die Normierung der Fluoreszenzspektren jeder Zellkultur auf ihre Autofluoreszenz kann diesem möglichen Fehler entgegen gewirkt werden (Vergleiche 2.4.).

In-vivo könnte die Berührung der Detektionsfaser mit der Gewebeoberfläche zu einer Verzerrung des Fluoreszenzspektrums durch die Veränderung des Blutgehaltes führen. Es wurde bei der Versuchsplanung darauf geachtet, eine konstante Entfernung der Anregungs- bzw. der Detektionsfaser zu wählen, bei der es unabhängig von der Größe der Zellkultur zu keiner Berührung mit der Oberfläche kam.

Bei allen durchgeführten Versuchen befand sich die gesamte Zellkultur im Lichtkegel der Anregungsfaser, so dass Inhomogenitäten im Gewebe möglicherweise zu Unterschieden in der Absorption führten.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Protoporphyrin-IX-spezifische Fluoreszenz nach Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure

Lokale und systemische Applikation von 5-ALA führt unter Umgehung des biologischen Regulationsmechanismus zur intrazellulären Akkumulation von PPIX (vergleiche 1.4.), dessen Fluoreszenz mit geeigneten Instrumenten erfasst werden kann (Kennedy et al., 1990).

Die Analyse der Fluoreszenzspektren (vergleiche Abb. 6) zeigt Emissionsbanden bei 635 nm und 705 nm. Diese identifizieren sie eindeutig als PPIX-Fluoreszenz (Loh et al., 1993; Baumgartner et al., 1996). Damit ist der Fluoreszenzanstieg in den vorliegenden Versuchen auf die Inkubation mit 5-ALA zurückzuführen.

Die Signalintensität bei 635 nm kann als Maß für die PPIX-Konzentration im Epithel ausgewertet werden (Loh et al., 1993).

4.2.2. Protoporphyrin-IX-spezifische Fluoreszenz in Abhängigkeit der Inkubationszeit

In der Versuchsgruppe I konnte gezeigt werden, dass ein 5-minütiger Kontakt mit 5-ALA in der Konzentration 0,3 mg/ml ausreicht, um detektierbare Mengen an PPIX-Fluoreszenz in Zellkulturen des normalen humanen Bronchialepithels zu induzieren. Bei der Höhe der Maximalfluoreszenz gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe I mit 5minütiger, der Gruppe II mit 15minütiger Inkubation und der Gruppe III mit Dauerinkubation der Zellkulturen in 5-ALA. Trotzdem war eine tendenzielle Zunahme der Maximalfluoreszenz nach längerer Inkubationszeit mit 5-ALA zu beobachten. Diese könnte möglicherweise auf die damit insgesamt größere Expositionsmenge an 5-ALA zurückzuführen sein (vergleiche Abb. 13 und 14). In den Versuchsgruppen I und II konnte jeweils nach Entfernen der 5-ALA-Lösung noch ein zeitlich begrenzter Anstieg der PPIX-Fluoreszenz beobachtet werden. Dies könnte auf eine verzögerte PPIX-Synthese aus zeitabhängig akkumuliertem 5-ALA, z.B. aus einem intrazellulären „Speicher“ hindeuten, der während der kurzen Exposition mit einer größeren Menge an 5-ALA gefüllt wurde.

Die Zeit bis zum Erreichen der Maximalfluoreszenz war zwischen den Gruppen II und III zur Gruppe I signifikant unterschiedlich. Dies unterstützt die Annahme, dass die PPIX-Fluoreszenzkinetik von der Expositionszeit mit 5-ALA abhängig ist.

Die Maximalintensität der 5-ALA-induzierten PPIX-Fluoreszenz und die Zeit bis zum Erreichen der Maximalfluoreszenz ist in verschiedenen malignen und nichtmalignen Geweben von der Konzentration der 5-ALA-Lösung abhängig (Loh et al., 1992; Leveckies et al., 1994; van der Veen et al., 1994; Kleemann et al., 1996; de Blois et al., 2001).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die PPIX-Fluoreszenzkinetik zusätzlich von der Expositionszeit der Bronchialschleimhautkulturen mit 5-ALA abhängig sein könnte. Dies entspricht mehreren In-vitro- und In-vivo-Studien zur Zeitabhängigkeit der 5-ALA-induzierten Porphyrin-Synthese (Loh et al., 1993).

Kriegmair et al. fanden 1994 in einer klinischen Studie mit 68 Patienten mit Blasenkarzinom keinen Zusammenhang zwischen der PPIX-Fluoreszenzintensität bzw. der Zeit bis zum Erreichen der Maximalfluoreszenz und der Kontaktzeit mit 5-ALA (15 - 360 min). Möglicherweise sinkt der Einfluss der 5-ALA-Kontaktzeit auf die Höhe der Maximalfluoreszenz mit zunehmender Dauer der Exposition.

Die mit 5-ALA dauerinkubierten Zellkulturen der Versuchgruppe III zeigten nach zunächst linearem Anstieg eine Sättigung der Fluoreszenz nach $236,7 \pm 51,9$ Minuten (Mittelwert \pm Standardfehler). Dieses Plateau deutet auf ein Gleichgewicht zwischen Ausschleusung der endogenen Porphyrine und Bildung von Porphyrinen aus einem 5-ALA-Pool hin. In einer Studie von Star et al. wurde ein mathematisches Modell erarbeitet, mit dessen Hilfe sich die Diffusionsmenge von 5-ALA in der Haut in vivo, ihre Aufnahme in die Zelle und ihre Umwandlung zu PPIX und anschließend zu Haem quantitativ bestimmen lässt. Dabei wurde das bisher verwendete 3-Kompartiment-Modell erweitert und je ein weiteres Kompartiment im Zytoplasma sowie im Mitochondrium postuliert. Die Umwandlung von 5-ALA im Zytoplasma in eine intermediäre Verbindung im Mitochondrium wird dabei als Gleichung vom Michaelis-Menten-Typ (Kinetik mit Sättigungscharakter) beschrieben. Die Umwandlung zu PPIX und weiter zu Haem werden als Kinetik erster Ordnung beschrieben. Dabei werden nur 2,5% - 3,5% der 5-ALA-Menge, welche über das Stratum corneum der Haut gelangt, zu PPIX synthetisiert (Star et al., 2002). Das Ausschleusen der Porphyrine wird einerseits durch Diffusion, andererseits durch Bindung von Porphyrinringen an Proteine erklärt (Fukuda et al., 1993; Iinuma et al., 1994).

Die ausgeschleusten Porphyrine sind im Überstand photometrisch identifizierbar, aber nicht quantitativ messbar (Fuchs et al., 1994). Da in den vorliegenden Versuchen die Zellkulturen in serumfreiem Medium inkubiert wurden, ist hier das Ausschleusen von PPIX durch Diffusion wahrscheinlich. Das Schema der PPIX-Fluoreszenz nach 5-ALA-Exposition erscheint vergleichbar mit denen der Magen- und Dickdarmschleimhaut (Loh et al., 1993).

Darüber hinaus ist die Art der 5-ALA-Applikation von Bedeutung (Orth et al., 1994; de Blois et al., 2001; Thissen et al., 2002). Dabei wurden nach topischer Anwendung der 5-ALA im Vergleich zur intravenösen oder intrakutanen Anwendung geringere maximale Fluoreszenzintensitäten gemessen.

Die hier dargestellten Ergebnisse sind am ehesten auf die Situation der lokalen Anwendung der 5-ALA übertragbar. Dies ist sinnvoll, da eine inhalative Anwendung von 5-ALA denkbar ist (Baumgartner et al., 1996). Daraus und aus den Ergebnissen der Versuchsgruppe I mit 5minütiger 5-ALA-Inkubation kann man schlussfolgern, dass eine kurze, inhalative Exposition mit 5-ALA eine detektierbare Menge PPIX in normalem Bronchialepithel induziert.

Eine der Einschränkungen der vorliegenden Ergebnisse sind die relativ hohen Standardabweichungen der gemessenen Fluoreszenz. Dies kann (vergleiche 4.1.1.) durch das Modell der dreidimensionalen Zellkultur erklärt werden. Die durch 5-ALA induzierte PPIX-Fluoreszenz steigt mit steigender Zelldichte (Steinbach et al., 1995). Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität dürfte jedoch von den unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften der Zellkulturen nicht beeinflusst werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Fluoreszenzkinetik von 5-ALA-induziertem PPIX an dreidimensionalen Zellkulturen von humanem Bronchialepithel zu untersuchen.

Es sollten Kenntnisse über den zeitlichen Verlauf der PPIX-Fluoreszenz in Normalgewebe nach unterschiedlich langer Expositionszeit mit 5-ALA erlangt werden.

Dreidimensionale Organkulturen bestehen aus einem bindegewebigen Kern, welcher von respiratorischem Epithel umgeben ist. Morphologisch ist das kultivierte Epithel nicht von dem in vivo zu unterscheiden. Dreidimensionale Organkulturen stellen eine in-vivo-nahe Kulturform dar.

5-ALA ist eine natürlich vorkommende Substanz, aus der das fluoreszierende PPIX synthetisiert wird. Wenn 5-ALA in großen Mengen angeboten wird, synthetisieren Zellen in Normal- und Tumorgewebe PPIX.

5-ALA wurde wegen der kurzen Halbwertszeit und der Möglichkeit der topischen Anwendung für die PDD vorgeschlagen.

Da die Prognose von Patienten mit Bronchialkarzinomen in erster Linie vom Tumorstadium bei Diagnosestellung abhängig ist, ist es notwendig die Frühdiagnostik zu verbessern.

Denkbar ist eine inhalative Anwendung von 5-ALA mit nachfolgender diagnostischer Bronchoskopie.

Voraussetzung für diese Anwendung am Patienten und für weiterführende Untersuchungen sind Kenntnisse über die erforderliche 5-ALA-Kontaktzeit und Kenntnisse über den zeitlichen Verlauf der 5-ALA-induzierten PPIX-Fluoreszenz von Normalgewebe.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Ein 5-minütiger Kontakt mit 5-ALA ist ausreichend, um in normalem humanen Bronchialepithel detektierbare Mengen an PPIX-Fluoreszenz zu induzieren.
2. Zellkulturen, die 5 oder 15 Minuten mit 5-ALA inkubiert werden, zeigen einen fast linearen Anstieg der Fluoreszenzintensität während der ersten 90 beziehungsweise 180 Minuten. Dies ist mit bereits vorliegenden Ergebnissen an Zellkulturen des Gastrointestinaltraktes vergleichbar. Die Bildung von 5-ALA-induziertem PPIX erfolgt also in Abhängigkeit der 5-ALA-Kontaktzeit.
3. In den mit 5-ALA dauerinkubierten Zellkulturen zeigt sich ein Plateau der PPIX-Fluoreszenz nach 210 Minuten. Dies deutet auf ein Gleichgewicht zwischen Ausschleusung der endogenen Porphyrine und Bildung neuer Porphyrine hin.
4. Die Höhe der Maximalintensität von 5-ALA-induzierter PPIX-Fluoreszenz ist ebenfalls von der 5-ALA-Kontaktzeit abhängig.

Die Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

Das Modell der dreidimensionalen Organkultur des humanen Bronchialepithels ist geeignet, um die 5-ALA-induzierte PPIX-Fluoreszenz zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass die 5-ALA-induzierte PPIX-Fluoreszenzkinetik in Kulturen des normalen humanen Bronchialepithels von der 5-ALA-Kontaktzeit abhängig ist.

Die Resultate vorliegender Experimente sind am ehesten auf die Situation der topischen Anwendung (z.B. Inhalation) von 5-ALA übertragbar, da in diesem Modell kein intaktes Gefäßsystem zur Verfügung steht.

Eine lokale Applikation für 5 oder 15 Minuten, die unter klinischen Bedingungen realisierbar wäre, ist nach den vorliegenden Ergebnissen für die PDD ausreichend.

Ausblicke auf künftige Fragestellungen sind:

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an Kokulturen aus Bronchialepithel und Tumorzelllinien haben bereits gezeigt, dass die Fluoreszenzkinetik in Tumor- und Normalgewebe ähnlich ist (Gamarra et al., 2002). Unterschiede zeigten sich hinsichtlich der maximalen Fluoreszenzintensitäten sowie der Zeit bis zum Auftreten der maximalen Fluoreszenz. Höhere Fluoreszenzintensitäten der Tumorzelllinien lassen den Schluss zu, dass die PDD für die Frühdiagnostik des Bronchialkarzinoms eingesetzt werden könnte. Weitere Experimente sollen zeigen ob dies auch für andere Bronchialtumore reproduzierbar ist.

Jedoch sind bronchoskopische Messungen an Patienten nötig, um diese Ergebnisse zu bestätigen.

Interessant wäre, ob sich Vorstufen von Bronchialcarcinomen mittels PDD identifizieren lassen.

Eine weitere Hoffnung besteht in der Photodynamischen Therapie von kleinen Bronchialcarcinomen durch Erzeugung phototoxischer Schäden in Tumorzellen.

Weitere Untersuchungen an Organkulturen sowie an Kokulturen des humanen Bronchialepithels mit Tumorzelllinien bieten sich zur Klärung dieser Fragen an.

6. Verwendete Abkürzungen

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
BEGM	Bronchial Epithelial Cell Growth Medium
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
HPD	Hämatoporphyrin-Derivat
n	Anzahl
nm	Nanometer
OSMA	Optical multichannel analyzer
PDD	Photodynamische Diagnose
PDT	Photodynamische Therapie
PPIX	Protoporphyrin IX

7. Literaturverzeichnis

- 1 Al-Batran, S.E., Astner, S.T., Supthut, M., Gamarra, F., Brückner, K., Welsch, U., Knüchel, R. und Huber, R.M. (1999): Three-dimensional in vitro cocultivation of lung carcinoma cells with human bronchial organ culture as a model for bronchial carcinoma. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 21/2: 200-208
- 2 Bals, R., Gamarra, F., Kaps, A., Grundler, S., Huber, R.M. und Welsch, U. (1998): Sekretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ-culture system. *Cell-and-tissue-research*, 293: 573–577
- 3 Baumgartner, R., Fuchs, N., Jocham, D., Stepp, H. und Unsöld, E. (1992): Photokinetiks of fluorescent Polyporphyrin Photofrin II in normal rat tissue and rat bladder tumor. *Photochem.Photobiol.*55 569–574
- 4 Baumgartner, R., Huber, R.M., Schulz, H., Stepp, H., Rick, K., Gamarra, F., Leberig, A. und Roth, C. (1996): Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer. *Photochem.Photobiol.B: Biology* 36: 169–174
- 5 Betz, C.S., Stepp, H., Janda, P., Arbogast, S., Grevers, G., Baumgartner, R. und Leunig, A. (2002): A comparative study of normal inspection, autofluorescence and 5-ALA-induced PPIX fluorescence for oral cancer diagnosis. *Int. J. Cancer*, 97(2): 245-252
- 6 Bezdetsnaya, L., Zeghari, N., Belitchenko, I., Barberi-Heyob, M., Merlin, J.L., Potapenko, A. und Guillemin, F. (1996): Spectroscopic and Biological Testing of Photobleaching of Porphyrins in Solutions. *Photochem.Photobiol.*, 64(2): 382-386

- 7 Blois (de), A.W., Thissen, M.R., de Bruijn, H.S., Grouls, R.J., Dutrieux, R.P., Robinson, D.J. und Neumann, H.A. (2001): In vivo pharmacokinetics of protoporphyrin IX accumulation following intracutaneous injection of 5-aminolevulinic acid. *J.Photochem.Photobiol.B.* 61(1-2):21-29
- 8 Cairnduff, F., Stringer, M.R., Hudson, E.J., Ash, D.V. und Brown, S.B. (1994): Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer. *Br.J.Cancer* 69: 605–608
- 9 Chapman, J.D., Stobbe, C.C. und Arnfield, M.R. (1991): Oxygen dependency of tumor cell killing in vitro by light-activated Photofrin® II. *Radiat.Res.*, 126: 73–79
- 10 Dalton, J.T., Yates, C.R., Yin, D., Straughn, A., Marcus, S.L., Golub, A.L. und Meyer, M.C. (2002): Clinical pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid in healthy volunteers and patients at high risk for recurrent bladder cancer. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 301(2): 597-512
- 11 Dougherty, T.J., Cooper, M.T. und Mang, T.S. (1990): Cutaneous phototoxic occurrence in patients receiving photofrin. *LasersSurg.Med.* 10: 485-488
- 12 Diamond, I., Granelli, S.G., McDonagh, A.F., Nielsen, S., Wilson, C.B. und Jaenicke, R. (1972): Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet*, 2: 1175–1177
- 13 Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korblik, M., Moan, J. und Peng, Q. (1998) Photodynamic therapy. *J.Nat.Cancer Inst.*, 90: 889–905

- 14 Dougherty, T.J. und Marcus, S.L. (1992): Photodynamic Therapy. Eur.J.Cancer 10: 1734–1742
- 15 Endlicher, E., Rummele, P., Hausmann, F., Krieg, R., Knüchel, R., Rath, H.C., Schölmerich, J. und Messman, H. (2001): Protoporphyrin IX distribution following local application of 5-aminolevulinic acid and its esterified derivatives in the tissue layers of the normal rat colon. Br.J.Cancer 85(10): 1572-1576
- 16 Fjellbirkeland, L., Bjerkvig, R., Steinsvag, S.K. und Laerum O.D. (1996): Nonadhesive stationary organ cultures of human bronchial mucosa. Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol. 15(2): 197-206
- 17 Foote, C.S. (1991): Definition of type I and type II photosensitized oxidation. Photochem.Photobiol., 54: 659
- 18 Fuchs, C., Siegert, J. und Wessels, J.M. (1994): In vitro studies on the uptake and the retention of Protoporphyrin IX. Abstractband, 5TH International Photodynamic Association Biennial Meeting, Florida, USA
- 19 Fuchs, C., Riesenberg, R., Siegert, J. und Baumgartner, R. (1997): H-dependent formation of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX in fibrosarcoma cells. J.Photochem.Photobiol.B 40 (1): 49-54
- 20 Fukuda, H., Battle, A.M.C. und Riley P.A. (1993): Kinetics of porphyrin accumulation in cultured epithelial cells exposed to ALA. Int.J.Biochem. 25: 1407-1410
- 21 Gamarra, F., Baretton, G., Grundler, S., Christ, M., Wehling, M. und Huber, R.M. (1993): A new technique to culture human bronchial epithelial cells as mini-organ system in vitro. Eur.Respir.J.Suppl.17, 6: 182s (Abstract)

- 22 Gamarra, F., Wagner, S., Al-Batran, S., Maier, I., Castro, M., Hautmann, H., Bergner, A., Baumgartner, R. und Huber, R.M. (2002): Kinetics of 5-Aminolevulinic Acid-Induced Fluorescence in Organ Cultures of Bronchial Epithelium and Tumor. *Respiration*, 69: 445-450
- 23 Gamarra, F., Grundler, S., Baretton, G., Wehling, M., Goetz, A.E. und Huber, R.M. (1993): Ein neues Modell zur In.vitro Untersuchung der Aufnahme von Photosensibilisatoren in humanen Bronchialepithel. *Lasermedizin*, 9: 138–141
- 24 Gamarra, F., Grundler, S., Heil, P., Ziesenis, A., Baretton, G., Bals, R. und Huber, R.M. (1995): Etablierung einer Miniorgankultur des Bronchialepithels: Morphologie, ziliäre Schlagfrequenz und Protoporphyrin-IX-Bildung nach Exposition mit 5-Aminolävulinsäure. *Med.Klin.*, 90: 143 (Abstract)
- 25 Girotti, A.W. (1990): Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem.Photobiol.*,51: 497–509
- 26 Gomer, C.J. und Razum, N.J. (1984): Acute skin response in albino mice following porphyrin photosensitization under oxic and anoxic conditions. *Photochem.Photobiol.*,40: 435–439
- 27 Gomer, C.J., Ferrario, A. und Hayashi, N. (1988): Molecular cellular and tissue responses following photodynamic therapy. *LasersSurg.Med.*, 8: 450–463
- 28 Gossner, L., Stolte, M., Sroka, R., Rick, K., May, A., Hahn, E.G. und Ell, C. (1998): Photodynamic Ablation of High-Grade-Dysplasia and Early Cancer in Barrett`s Esophagus by Means of 5-Aminolevulinic Acid. *Gastroenterology*, 114: 448–455

- 29 Gregorie, H.B., Horger, E.O., Ward, J.L., Green, J.F., Richards, T., Robertson, H.C. und Stevenson, T.B. (1968): Hematoporphyrin-derivative fluorescence in malignant neoplasms. *Ann.Sur.*, 167: 820–828
- 30 Grundler, S., Heil, P., Gamarra, F. und Huber, R.M. (1994): Aufnahme von ALA und Bildung von Protoporphyrin IX an einer Mini-Organ-Kultur des humanen Bronchialepithels. *Lasermedizin*, 10: 105 (Abstract)
- 31 Hillegersberg (van), R., Kort, W.J. und Wilson, J.H.P. (1994): Current Status of Photodynamic Therapy in Onkology. *Drugs* 48 (4): 510-527
- 32 Iinuma, S., Farshi, S.S., Ortel, B. und Hasan, T. (1994): A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *Br.J.Cancer* 70: 21-28
- 33 Jong (de), P.M., van Sterkenburg, M.A., Kempenaar, J.A. und Mulder, A.A. (1994): Ciliogenesis in human bronchial epithelial cells cultured at the air-liquid interface. *Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.*, 10 (3): 271–277
- 34 Jorissen, M., van Schueren, B., van Berghe, H. und Cassiman, J. (1991): Contribution of in-vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract. *Eur.Respir.J.*, 4 (2): 210–217
- 35 Jorissen, M und Bessems, A. (1995): Normal ciliary beat frequency after ciliogenesis in nasal epithelial cells cultured sequentially as monolayer and in suspension. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 115 (1): 66–70
- 36 Kelly, J.F. und Snell, M.E. (1976): Hematoporphyrin derivate: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J.Urol.*, 115: 150–151

- 37 Kennedy, J.C., Pottier, R.H. und Pross, D.C. (1990): Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience, *J.Photochem.Photobiol.*,6: 143–148
- 38 Kennedy, J.C. und Pottier, R.H. (1992): Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J.Photochem.Photobiol.*, 14: 275-292
- 39 Kessel, D. (1984): Chemical und biochemical determinants of porphyrin localization, *Prog.Clin.Biol.Res.*,170: 405-418
- 40 Kessel, D., Chang, C.K. und Musselmann, B (1985): Chemical, biological, and biophysical studies on hematoporphyrinderivate, In: *Methods in Porphyrin Photosensitization*. Kessel, D. (ed), Plenum Press, New York, 213–227
- 41 Kleemann, D., MacRobert, A.J., Mentzel, T., Speight, P.M. und Bown, S.G. (1996): Photodynamic therapy on the normal rabbit larynx with phthalocyanine and 5-aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX photosensitisation. *Br.J.Cancer* 74: 49-58
- 42 König, K., Schneckenburger, H., Rück, A. und Steiner, R. (1993): In vivo photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous Porphyrins. *J.Photochem.Photobiol. B: Biol.*, 18: 287–290
- 43 Kriegmair, M., Baumgartner, R., Stocker, S., Riesenberger, R., Hofstetter, A., Knüchel, R. und Steinbach, P. (1994): Photodynamic therapy of urothelial cancer following intravesical application of 5-aminolaevulinic acid in a rat bladder tumormodel. *J.Urology*, 151: 518 A

- 44 Kriegmair, M., Baumgartner, R., Knüchel, R., Steinbach, P., Ehsan, A., Lumper, W., Hofstädter, F., und Hofstetter, A. (1994): Fluorescence Photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *Urology*, 44(6): 836-841
- 45 Kriegmair, M., Baumgartner, R., Knüchel, R., Stepp, H., Hofstädter, F. und Hofstetter A. (1996): Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence. *J. Urol.*, 155 (1): 105–110
- 46 Lang, K., Lehmann, P., Bolsen, K., Ruzicka, T. und Fritsch, C. (2001): Aminolevulinic acid: pharmacological profile and clinical indication. *Expert Opin Investig Drugs* 10(6): 1139-1156
- 47 Lange, N., Vaucher, L., Marti, A., Etter, A.L., Gerber, P., van Den Bergh, H., Jichlinski, P. und Kucera, P. (2001): Routine experimental system for defining conditions used in photodynamic therapy and fluorescence photodetektion of (non-) neoplastic epithelia. *J.Biome.Opt.* 6 (2): 151-159
- 48 Leveckis, J., Burn, J.L., Brown, N.J. und Reed M.W.R. (1994): Kinetics of endogenous protoporphyrin IX induction by aminolevulinic acid: preliminary studies in the bladder. *J.Urolog.* 152: 550-553
- 49 Lipson, R.L. und Baldes, E.J. (1960): The photodynamic properties of a particulas hematoporphyrin derivate. *Arch.Dermatol.*, 82: 508–516
- 50 Lipson, R.L., Baldes, E.J., und Gray, M.J. (1967): Hematoporphyrin derivate for detection and management of cancer. *Cancer*, 20: 2255–2257

- 51 Loh, C.S., Bedwell, J. und MacRobert, A.J. (1992): The kinetics of 5-aminolaevulinic acid photosensitisation in the normal rat stomach. *Gut*, 33: S71
- 52 Loh, C.S., MacRobert, A.J., Bedwell, J., Regula, J., Krasner, N. und Bown, S.G. (1993): Oral versus intravenous administration of 5-aminolävlinic acid for photodynamic therapy. *Br.J.Cancer*, 68: 41–51
- 53 Loh, C.S., Vernon, D., MacRobert, A.J., Bedwell, J., Brown, S.G. und Brown, S.B. (1993): Endogenous porphyrin distribution induced by 5-Aminolevulinic acid in the tissue layers of the gastrointestinal tract. *J.Photochem.Photobiol. B.* 20: 47-54
- 54 Moan, J. (1984): The photochemical yield of singlet oxygen from porphyrins in different states of aggregation. *Photochem.Photobiol.*, 39: 445–449
- 55 Moan, J. (1986): Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during photodynamic therapy. *CancerLett.* 44: 45–53
- 56 Orth, K., König, K., Genze, F. und Rück, A. (1994): Photodynamic therapy of experimental colonic tumours with 5-aminolevulinic-acid-induced endogenous porphyrins. *J.CancerRes.Clin.Oncol.* 120: 657–661
- 57 Promo-Cell: Bronchial Epithelial Cell Growth Medium. Customer Services. Promo-Cell bioscience alive GmbH. 1998 Heidelberg
- 58 Raab, O. (1900): Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Zeitschr.f.Biol.*, 39: 524–546

- 59 Rick, K., Sroka, R., Stepp, H., Kriegmair, M., Huber, R.M., Jacob, K. und Baumgartner, R. (1997): Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood. *J.Photochem.Photobiol.B.* 40(3): 313-319
- 60 Schwartz, S., Absolon, K. und Vermund, H., (1955): Some relationships of porphyrins, x-rays, and tumors. *Univ.MinnesotaMed.Bull.*, 7: 7–13
- 61 Star, W.M., Aalders, M.C., Sac, A. und Sterenborg, H.J. (2002): Quantitative Model Calculation of the Time-dependent Protoporphyrin IX Concentration in Normal Human Epidermis After Delivery of ALA by Passive Topical Applikation or Iontophoresis. *Photochem. Photobiol.*, 74 (4): 424-432
- 62 Steinbach, P., Weingandt, H., Baumgartner, R., Kriegmair, M., Hofstädter, F. und Knüchel, R. (1995): Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem.Photobiol.* 62 (5): 887-895
- 63 Steinsvag, S.K. und Laerum, O.D. (1985): Fetal rat brain hemisphere tissue in nonadherent stationary organ culture. *Experientia*, 41: 1517–1524
- 64 Steinsvag, S.K. (1986): Ultrastructural investigation of fetal rat brain hemisphere tissue in nonadherent stationar organ culture. *Experientia*, 42: 798–803
- 65 Steinsvag, S.K., Strand, M., Berg, O., Miaguchi, M. und Olofsson, J. (1991): Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope*, 101: 1323–1331

- 66 Stryer, L. (1991): Biosynthese der Aminosäuren und des Häm. In: Biochemie. Stryer, L. (ed), Spektrum Akademischer Verlag, GmbH, Heidelberg, Berlin, New York, 601
- 67 Svanberg, K., Andersson, T. und Killander, D. (1992): Photodynamic Therapy of Human Skin Malignancies and Laser-Induced Fluorescence Diagnostics Utilizing Photofrin and δ -Amino Levulinic Acid. *PhotodynTherBiomedLasers*: 436–440
- 68 Szeimies, R.M., Sassy, T. und Landthaler, M. (1994) Penetration potency of topical applied δ -aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. *Photochem.Photobiol.*, 59: 73–76
- 69 Tappeiner, H.v. und Jesionek, A. (1903): Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münch.Med.Wochenschr.*, 47: 2042–2044
- 70 Thissen, M.R., de Blois, M.W., Robinson, D.J., de Bruijn, H.S., Dutrieux, R.P., Star, W.M. und Neumann, H.A. (2002): PpIX fluorescence kinetics and increased skin damage after intracutaneous injection of 5-aminolevulinic acid and repeated illumination. *J.Invest.Dermatol.* 118(2):239-245
- 71 Veen (van der), N., van Leengoed, H.L.L.M. und Star, W.M. (1994): In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin: increased damage after multiple irradiations. *Br.J.Cancer* 70: 867-872
- 72 Wagnières, G.A., Star, W.M. und Wilson, B.C. (1998): In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications. *Photochem.Photobiol.* 68(5): 603-632

- 73 Wessels, J.M., Sroka, R., Heil, P. und Seidlitz, H.K. (1993):
Photodegradation of protoporphyrin-dimethylester in solution and
organized environments. *Int.J.Radiat.Biol.* 64: 475-484
- 74 Woodard, S.I. und Dailey, H.A. (2000): Multiple regulatory steps in
erythroid heme biosynthesis. *Arch.Biochem.Biophys.* 384 (2): 375-378

8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. R. M. Huber, Leiter der Pneumologischen Abteilung der Medizinischen Klinik Innenstadt für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das zur Verfügung gestellte Thema.

Des weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Dr. F. Gamarra für die Betreuung und seine Unterstützung bei Fragen und Problemen sowie der kritischen Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Ein weiteres Dankeschön gilt dem Forscherteam des Laserforschungslabors an Klinik für Urologie im Klinikum Großhadern, insbesondere Herrn Dr. R. Baumgartner und Herrn Dr. H. Stepp für die Beratung und Unterstützung.

9. Lebenslauf

Zur Person	Irmgard Maier, geboren am 29.05.1967 in Wasserburg am Inn Aemilian-Öttlinger-Straße 14, 83543 Rott am Inn, verheiratet, 1 Sohn
Schule	1973 – 1977 Grundschule Rott am Inn 1977 – 1986 Luitpoldgymnasium in Wasserburg am Inn
Berufsausbildung	10/1986 – 3/1987 Krankenpflegepraktikum am Kreiskrankenhaus Wasserburg am Inn 4/1987 – 3/1990 Berufsfachschule für Krankenpflege in Wasserburg am Inn
Berufstätigkeit	4/1990 – 10/1991 Berufstätigkeit als examinierte Krankenschwester am Kreiskrankenhaus Wasserburg am Inn
Studium	11/1991 – 4/1998 Medizinstudium an der Ludwig- Maximilians-Universität München
Berufstätigkeit	5/1998 – 10/1999 Ärztin im Praktikum an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum Rosenheim, Chefarzt Prof. Dr. Th. Beck seit 11/1999 Assistenzärztin an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum Rosenheim, Chefarzt Prof. Dr. Th. Beck (davon ein Jahr Elternzeit)