Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen und
Bestimmung optischer Parameter an *in vitro* und *ex vivo*
Modellen für die Photodynamische Inaktivierung von
Helicobacter pylori mit *Chlorin e6*

Dissertation

Carole Simon

Vom Fachbereich Physik der Technischen Universität Kaiserslautern zur Verleihung
des akademischen Grades "Doktor der Naturwissenschaften" genehmigte Dissertation

Betreuer: Prof. Dr. Volker Schünemann

Zweitgutachter: Prof. Dr. John Cullum

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 2. Juli 2015

D 386

Berichte aus der Physik

Carole Simon

**Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen
und Bestimmung optischer Parameter an
in vitro und *ex vivo* Modellen für
die Photodynamische Inaktivierung von
Helicobacter pylori mit *Chlorin e6***

Dissertation

D 386 (Diss. Technische Universität Kaiserslautern)

Shaker Verlag
Aachen 2015

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Kaiserslautern, TU, Diss., 2015

Copyright Shaker Verlag 2015

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-4036-4

ISSN 0945-0963

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Meinen Eltern

*Es ist nicht genug zu wissen - man muss es auch anwenden.
Es ist nicht genug zu wollen - man muss es auch tun.*

Johann Wolfgang von Goethe

Kurzbeschreibung

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen und Bestimmung optischer Parameter an in vitro und ex vivo Modellen für die Photodynamische Inaktivierung von *Helicobacter pylori* mit *Chlorin e6*

Einst galten Antibiotika als Wunderwaffe gegen Infektionen. Doch ihr intensiver Einsatz hat viele Erreger resistent gemacht. Bei Anwendung der klinisch etablierten antibiotischen Therapie bei dem Magenbakterium *Helicobacter pylori* (HP) ist der behandelnde Arzt ebenfalls mit einer Zunahme von Resistenzen gegen die eingesetzten Antibiotika konfrontiert. *Helicobacter pylori* ist für die Entstehung von chronischen Entzündungen und diverser Erkrankungen im Magen verantwortlich. Die Problematik der Resistenzentwicklung belegt die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer alternativer Therapieverfahren. Als vielversprechende Methode kann dabei die Photodynamische Inaktivierung (PDI) genannt werden. Grundlage der PDI von Bakterien ist das Zusammenwirken von drei Kernelementen: a) die Anreicherung von lichtempfindlichen Substanzen, den sogenannten Photosensibilisatoren (PS), b) sichtbarem Licht und c) molekularem Sauerstoff. Durch photochemische Anregung entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere Singulett-Sauerstoff, die oxidativ und toxisch gegen pathogene Keime wirken.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erarbeitung der wissenschaftlichen Grundlagen einer PDI des Magenkeims *Helicobacter pylori* mit dem PS *Chlorin e6*, sowie die ermittelten Bestrahlungsparameter und Wirkstoffkonzentrationen von der Kultur auf den Magen zu übertragen. In Zusammenarbeit mit der Laboratoriumsmedizin des Westfalz-Klinikum (Kaiserslautern) und der Pharmafirma *ApoCare Pharma* (Bielefeld) wurden in diesem interdisziplinären Projekt grundlegende Erkenntnisse für eine in vivo Therapie gewonnen:

- Ein erster wichtiger Punkt für eine in vivo Therapie ist die Bestimmung der Bestrahlungsparameter für eine vollständige Inaktivierung von HP in vitro. Nach Vorversuchen zur Bestimmung der Wachstumsrate, Ausplattungsdichte und Inkubationszeit, wurden Kontrollstämmen sowie auch Patientenzellen, die aus Gewebebiopsien klinisch gewonnen waren, in vitro untersucht. Die Aufnahme sowie die Lokalisation des Photosensibilisators spielen dabei eine entscheidende Rolle. Um diese Prozesse genauer zu analysieren und den Anteil an *Chlorin e6*, der an den Bakterien angereichert wurde, zu vermessen, wurden fluoreszenzspektroskopische Messungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei einer *Chlorin e6*-Ausgangskonzentration von 100 μM bis 1 mM nur zwischen drei und vier Prozent dieser Konzentration angereichert werden, diese Ausgangskonzentrationen aber dennoch ausreichen um *Helicobacter pylori* vollständig in Kultur abzutöten. Die Bestrahlungszeiten sind mit 30 - 90 s für ein therapeutisches Verfahren sehr kurz. Die Bestrahlungsanlage bestand aus sieben leistungsstarken Leuchtdioden ($\lambda = 660 \text{ nm}$, $P = 31 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$), aufgebaut

über einem aus Bestrahlungskasten aus *Spectralon*. Dabei wurde der Zusammenhang zwischen Energiedosis und Wirkung mit unterschiedlichen Bestrahlungszeiten und verschiedenen Leistungsdichten für eine vollständige Inaktivierung von *Helicobacter pylori* ermittelt. Ziel dieser Untersuchungen war es, mit der minimal wirksamen Konzentration auch eine Mindest-Bestrahlungszeit für eine spätere Therapie festzulegen. Dabei reichten Energiedosen von 0,27 - 0,93 $\frac{J}{cm^2}$ aus, um HP in vitro abzutöten. Eine durch die PDI induzierte Photoresistenz konnte zudem ausgeschlossen werden.

- Basierend auf den in vitro Ergebnissen wurde eine Bestrahlungseinrichtung mittels Laser und Applikator aufgebaut um physikalische und spektroskopische ex vivo Untersuchungen an porcinen Mägen durchzuführen. Dabei wurde die Lichtdosis in verschiedenen Tiefen der Magenschleimhaut vermessen, sowie der Effekt des Ausbleichens des Photosensibilisators untersucht. Geht der PS durch zu intensive Bestrahlung in das Photoprodukt über, so ist keine effektive Therapie mehr möglich. Um die Ausleuchtung im Magen zu optimieren, wurde zum einen die Lichtausbreitung mit unterschiedlichen Streumethoden analysiert, zum anderen Simulationen mit der Raytracing-Software *ASAP* zur homogenen Bestrahlung des Magens ausgeführt. Die Wechselwirkungsprozesse von Laserlicht und Gewebe sowie die Bestimmung der Streuparameter für die Simulationen wurden experimentell am Schweinemagen durchgeführt. Es zeigte sich, dass der Hauptanteil an Licht durch die Mukosa absorbiert wird, die Streufähigkeit des Lichtes im Magen aber auch durch eine stark verdünnte Milch oder Maaloxan-Lösung verbessert werden kann.
- Ein dritter wichtiger Schritt Richtung in vivo Therapie ist, nach topischer Gabe des Wirkstoffes, die Penetration des PS in die Magenschleimhaut (Mukosa). Um die Eindringtiefe von *Chlorin e6* in die Mukosa zu untersuchen, wurden ungefärbte, sowie gefärbte Dünnschnitte fluoreszenzmikroskopisch vermessen. Um sicherzustellen, dass nach topischer Verabreichung von *Chlorin e6* keine Schädigung an der Magenschleimhaut hervorgerufen wird, wurden verschiedene Präparate aus Antrum und Korpus nach Auftragung des PS und anschließender Bestrahlung mit verschiedenen Energiedosen histopathologisch untersucht. Da bei einer HP-Infektion auch der Magenschleim mit Bakterien befallen ist, wurde zusätzlich die Lichtabsorption sowie die Penetration von *Chlorin e6* durch die Schleimschicht vermessen. Trotz geringer Diffusion von *Chlorin e6* im Schleim konnte mit höheren Energiedosen anschließend eine Inaktivierung von HP am Schleimhaut-Modell aus Muzin, *Chlorin e6* und *Helicobacter pylori* realisiert werden.

Zusammenfassend betrachtet führt die photodynamische Inaktivierung von *Helicobacter pylori* mit den ermittelten Bestrahlungsparametern zu einer signifikanten Reduktion (6-log-Reduktion) der Bakterien. Durch diese wissenschaftlichen Erkenntnisse wurde die PDI von HP konkret in Richtung klinische Anwendung geführt, wo die Projektpartner im medizinischen und pharmazeutischen Bereich die in vivo Therapie weiter entwickeln.

Abstract

Fluorescent spectroscopic measurements and determination of optical parameters on in vitro and ex vivo models for photodynamic inactivation of *Helicobacter pylori* with *Chlorin e6*

In the past, antibiotics were regarded as the silver bullet against infections. However, because of their widespread application, many germs developed resistance. Also for the treatment of stomach bacteria *Helicobacter pylori* (HP), the attending physician is also confronted with an increase of resistance to antibiotics. *Helicobacter pylori* is responsible for chronic inflammations and various diseases in the stomach. Photodynamic inactivation of bacteria (PDI) seems to be a potential alternative for antibiotic therapies. PDI is based on the concept of three essential elements: a) the accumulation of a light-sensitive substance, called photosensitizer (PS), b) visible light and c) molecular oxygen. By photochemical excitation, reactive oxygen species (ROS), especially singlet oxygen, are produced, which have a cell toxic effect on pathogenic germs.

The aim of the present work was the development of the scientific basis of photodynamic inactivation of *Helicobacter pylori* using *Chlorin e6* and the transfer of the determined irradiation conditions and therapeutic drug concentration from the culture on to the stomach. In cooperation with the department of Laboratory Medicine (Westpfalz-Klinikum, Kaiserslautern) and the pharmaceutical company *ApoCare Pharma* (Bielefeld) fundamental knowledge were obtained for in vivo therapy:

- A first important point for a future therapy in vivo is the determination of the irradiation parameters, leading in the first place to a complete inactivation of *Helicobacter pylori* in vitro. After preliminary tests of the growth rate, plating thickness and incubation time, control strains as well as patient strains, obtained from clinical tissue biopsies, were studied in vitro. A key component of the PDI is the uptake and localisation of the photosensitizer in the cells respectively membranes. Analyzing these processes in more detail, the proportion of accumulated *Chlorin e6* was determined by fluorescence spectroscopic measurements. It was found that, for an initial *Chlorin e6* concentration of 100 μM - 1 mM, only three to four percent of this concentration were enriched in bacteria, however, these concentrations are still sufficient for a complete inactivation of *Helicobacter pylori* in vitro. The irradiation times varied from 30 - 90 s, which is very short for therapeutic procedure. The radiation equipment consisted in part of the irradiation box of Spectralon and an irradiation unit of seven high power light emitting diodes ($\lambda = 660 \text{ nm}$, $P = 31 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$). The dose-response relation was determined with different exposure times and various power densities. The aim of this study was the determination of the minimum irradiation time for future therapy using minimum effective concentrations. To achieve a complete inactivation of bacteria in

vitro, the energy doses ranged from 0,27 to 0,93 $\frac{J}{cm^2}$. Furthermore, photoresistance, induced by PDI, could be excluded.

- Based on the in vitro results, an irradiation facility was established using laser and optical fibres for physical and spectroscopic ex vivo studies on porcine stomachs. First, the light dose was measured in different depths in gastric mucosa. Furthermore the effect of bleaching of the photosensitizer was examined in closer detail. If the irradiation dose is too intensive, the chemical decomposition of the photosensibilator proceeds too fast, so that an effective therapy is no longer possible. For a homogenous illumination in the stomach, the light propagation was analyzed with different scattering media. Simultaneously, simulations with the ray-tracing software *ASAP* were performed in order to optimize the illumination. The interaction processes of laser light and tissue as well as the determination of the scattering parameters were experimentally carried out on pig's stomach. It was found that the largest amount of light is absorbed by the mucosa. The homogeneity of irradiation can be improved by high diluted milk or *Maaloxan*-solutions in the stomach.
- A third important step towards in vivo therapy is the penetration of the PS in the mucosa after topical application of the drug. For the measurement of the penetration depth of *Chlorin e6* in mucosa, undyed and dyed thin sections were examined by fluorescence microscopy. To ensure a save and undamaged mucosa after topical application of *Chlorin e6*, various preparations of antrum and corpus were analyzed histopathologically after subsequent irradiation with different doses. When an infection of *Helicobacter pylori* occurs, the stomach mucus is also affected by bacteria. Therefore the light absorption and the penetration of *Chlorin e6* in mucus layers were measured additively. Despite the low diffusion of *Chlorin e6* in mucus, a complete inactivation of *Helicobacter pylori* was realized on a mucosal model of mucin, *Chlorin e6* and *Helicobacter pylori* using a higher fluence rate.

In conclusion, PDI of *Helicobacter pylori* using *Chlorin e6* shows an efficient and desired elimination rate. Through this scientific knowledge, PDI of HP has directly led towards clinical application, where medical and pharmaceutical partners are following a strategy for an in vivo therapy.

Liste der Publikationen

Zeitschriften

- C. Simon, C. Mohrbacher, D. Hüttenberger, I. Bauer-Marschall, C. Krickhahn, A. Stachon, H.-J. Foth:
In vitro studies of chlorin e6-assisted photodynamic inactivation of *Helicobacter pylori*
Proceedings of SPIE, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXIII, 8931 (2014).
- C. Simon, G. Wolf, M. Walther, K. Winkler, M. Finke, D. Hüttenberger, M. Bischoff, B. Seitz, J. Cullum, H.-J. Foth:
Photodynamic inactivation of pathogens causing infectious keratitis
Proceedings of SPIE, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXIII, 8931 (2014).
- C. Simon, C. Mohrbacher, D. Hüttenberger, I. Bauer-Marschall, C. Krickhahn, A. Stachon, H.-J. Foth:
In vitro studies of different irradiation conditions for Photodynamic inactivation of *Helicobacter pylori*
Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology, Vol.141, 113-118 (2014).

Internationale Tagungen

- C. Simon, G. Wolf, D. Hüttenberger, B. Seitz, H.-J. Foth:
Penetration of the photosensitizer *Chlorin e6* into cornea for Photodynamic Inactivation in infectious keratitis
Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2012, Fort Lauderdale, Florida, USA [1099/A135]
- C. Simon, G. Wolf, D. Hüttenberger, B. Seitz, H.-J. Foth:
Penetration of the photosensitizer *Chlorin e6* into cornea for Photodynamic Inactivation in infectious keratitis
9th International Symposium of the Photodynamic Therapy and Photodiagnosis in Clinical Practice 2012, Brixen/Bressanone, Italy
- C. Simon, C. Mohrbacher, D. Hüttenberger, I. Bauer-Marschall, C. Krickhahn, A. Stachon, H.-J. Foth:
In vitro studies of *chlorin e6*-assisted photodynamic inactivation of *Helicobacter pylori*
Conference on Biomedical Optics 2014, SPIE Photonics West, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy, San Francisco, California, USA
- C. Simon, G. Wolf, M. Walther, K. Winkler, M. Finke, D. Hüttenberger, M. Bischoff, B. Seitz, J. Cullum, H.-J. Foth:
Photodynamic inactivation of pathogens causing infectious keratitis
Conference on Biomedical Optics 2014, SPIE Photonics West, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy, San Francisco, California, USA
- C. Simon, C. Mohrbacher, N. Betz, D. Hüttenberger, I. Bauer-Marschall, A. Stachon, H.-J. Foth:
Photodynamic Inactivation of *Helicobacter pylori* - In vitro studies of different irradiation conditions inducing an efficient elimination rate
International Symposium *Molecular Sciences Facing Up to Major Challenges* 2014, Nancy, France

- C. Simon, G. Wolf, D. Hüttenberger, B. Seitz, H.-J. Foth:
Penetration of the photosensitizer *Chlorin e6* into cornea for Photodynamic Inactivation in infectious keratitis
9th International Symposium of the Photodynamic Therapy and Photodiagnosis in Clinical Practice 2014, Brixen/Bressanone, Italy

Nationale Tagungen

- C. Simon, G. Wolf, D. Hüttenberger, H.-J. Foth:
**Penetrationsverhalten von *Chlorin e6* in Kornea;
Voruntersuchungen für die photodynamische Inaktivierung von Keimen bei Keratitis**
109. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) 2011, Berlin.
- C. Südfeld, C. Simon, C. Mohrbacher, D. Hüttenberger, H.-J. Foth, I. Bauer-Marschall, C. Krickhahn, A. Stachon:
Photodynamische Inaktivierung von *Helicobacter pylori* mit dem Photosensibilisator *Chlorin e6*
64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) 2012, Hamburg.
- C. Mohrbacher, C. Simon, D. Hüttenberger, I. Bauer-Marschall, C. Krickhahn, H.-J. Foth, A. Stachon:
Photodynamic Inactivation of *Helicobacter pylori* - In vitro studies of different irradiation conditions inducing an efficient elimination rate
65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) 2013, Rostock.
- C. Mohrbacher, C. Simon, D. Hüttenberger, I. Bauer-Marschall, C. Krickhahn, H.-J. Foth, A. Stachon:
Photodynamic Inactivation of *Helicobacter pylori* - In vitro studies of different irradiation conditions inducing an efficient elimination rate
58. Jahrestagung der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft (SPIG) 2014, Neustadt an der Weinstraße.

- C. Mohrbacher, C. Simon, D. Hüttenberger, I. Bauer-Marschall, C. Krickhahn, H.-J. Foth, A. Stachon:
Photodynamic inactivation of *Helicobacter pylori*: In vitro studies of lab and patient strains using *Chlorin e6*
66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) 2014, Dresden.

- N. Betz, C. Simon, C. Mohrbacher, D. Hüttenberger, I. Bauer-Marschall, C. Krickhahn, H.-J. Foth, A. Stachon:
Photodynamic inactivation of *Helicobacter pylori* - In vitro studies of lab and patient strains using *Chlorin e6*
59. Jahrestagung der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft (SPIG) 2015, Neustadt an der Weinstraße.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	7
2.1	Photodynamische Therapie	7
2.1.1	Mechanismus und Wirkungsweise der Photodynamischen Therapie	8
2.1.2	Photosensibilisatoren	10
2.2	Photodynamische Inaktivierung von Bakterien	12
2.2.1	Allgemeine Bakteriologie	13
2.2.2	<i>Helicobacter pylori</i>	14
2.3	Anatomie und Physiologie des Magens	17
2.3.1	Feinbau der Magenwand und Magenschleimhaut	18
2.4	Wechselwirkung von Strahlung mit Materie	20
2.4.1	Radiometrische und photometrische Größen der Lichtstreuung	20
2.4.2	Lichtausbreitung in biologischem Gewebe	22
2.4.3	Optiksimulation - Das Raytracing-Verfahren	26
2.4.4	Laser-Gewebe-Wechselwirkungen	29
2.5	Fluoreszenzspektroskopie	31
2.5.1	Photophysikalische Grundlagen	31
2.5.2	Spektroskopische Messverfahren	32
3	Photodynamische Inaktivierung von <i>Helicobacter pylori</i> in vitro	37
3.1	Mikrobiologische Methoden	37
3.1.1	Bakterienstamm, Kultivierung und Kryokonservierung	37
3.1.2	Herstellung der Bakteriensuspension	38
3.1.3	Keimzahlbestimmung	38
3.1.4	Wachstumsrate und Überlebensdauer	40
3.2	Vorversuche für eine optimale Durchführung der PDI von <i>Helicobacter pylori</i>	43
3.2.1	Ausplattierungsdichte	43

3.2.2	Aufnahme und Lokalisation des Photosensibilisators	44
3.2.3	Optimale Inkubationszeit von <i>Chlorin e6</i>	54
3.3	Bestahlungsmessungen	55
3.3.1	Aufbau der Bestaltungsanlage	55
3.3.2	Versuchsdurchföhrung	57
3.3.3	„Proof of Principle“	58
3.3.4	Wirkstoffkonzentration	59
3.3.5	Zeitreihen	61
3.3.6	Energie und Leistungsdichte	62
3.3.7	PDI bei Anregung mit höherer Photonenenergie	63
3.3.8	Zusammenfassung und Fehleranalyse	66
3.4	Transportmechanismen von <i>Chlorin e6</i> in Bakterien	67
3.4.1	Aktive und passive Transportvorgänge an Biomembranen	67
3.4.2	Effekt von Protonenpumpenhemmer auf die Anreicherungsmessung von <i>Chlorin e6</i> an <i>Helicobacter pylori</i>	68
3.4.3	Bestahlungsmessung mit Pantoprazol	71
3.5	Photodynamische Inaktivierung von antherapierten HP - Patientenstämmen	72
3.5.1	Probengewinnung, Registrierung und Untersuchungsmethoden	72
3.5.2	Anreicherung von <i>Chlorin e6</i>	74
3.5.3	Bestahlungsmessungen und Dosis-Wirkungs-Beziehung	75
3.5.4	Einfluss der Vortherapie und der entsprechenden Antibiotika auf die PDI	79
3.6	Photoresistenztestung bei Labor- sowie Patientenstämmen	80
3.6.1	Durchföhrung	80
3.6.2	Ergebnisse und Diskussion	81
4	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen am Schweinemagen	85
4.1	Vorbereitungen für die Durchföhrung ex vivo Versuche an der Magenschleimhaut	85
4.1.1	Unterschied des menschlichen und porcinen Magens	85
4.1.2	Aufbereitung der Schweinemägen	86
4.1.3	Unterschiedliche Morphologie der Mageninnenwand	88
4.2	Penetrationsverhalten von Ce6 in der Magenschleimhaut	89
4.2.1	Präparation und Datenerfassung	90
4.2.2	Ergebnisse für Antrum und Korpus	93
4.2.3	Diffusionsprozesse in Antrum und Korpus	96
4.2.4	Diskussion und mögliche Fehlerquellen	100
5	Laserlicht-Gewebe-Wechselwirkungen im Magen	105
5.1	Aufbau einer Bestaltungseinrichtung für den Schweinemagen	105
5.1.1	Diodenlaser	105

5.1.2	Lichtleitfaser und Zylinderapplikator	107
5.1.3	Thermische Effekte und Sicherheitsmaßnahmen	108
5.2	Experimentelle Messungen zur Wechselwirkung von Licht im Magen	112
5.2.1	Absorption, Reflexion und Streuung an der Magenschleimhaut	112
5.2.2	Absorption in Abhängigkeit der Schichtdicke der Magenschleimhaut	118
5.2.3	<i>Ex vivo</i> -Versuche zur Steuerung der Bestrahlungsdosis	121
5.2.4	Lichtleistung im Magen	123
5.2.5	Optimierung der Ausleuchtung durch Streumaterialien	125
5.3	Lichtsimulation der Lichtstreuung im Magen	130
5.3.1	ASAP	130
5.3.2	Definition der Eingabeparameter für die Simulation am Magen	132
5.3.3	Lichtsimulation im Magen mit verschiedenen Applikatoren	136
6	PDI von <i>Helicobacter pylori</i> in künstlichem Mukus - Vorversuche für die PDI in vivo	145
6.1	Muzin	145
6.2	Absorption von Laserlicht in Muzin	146
6.3	Diffusion von Ce6 in Muzin	149
6.4	Durchführung der PDI an Membransystem von Ce6, Muzin und Bakterien	152
6.4.1	Bestrahlung von HP auf der Agarplatte	152
6.4.2	Schichtmodell mit Muzin	154
6.5	Ergebnisse und Diskussion	155
7	Zusammenfassung und Diskussion	159
	Literaturverzeichnis	163
A	Anhang	179
A.1	Datenblatt der Hochleistungsleuchtdiode 670 nm	179
A.2	Datenblatt der Hochleistungsleuchtdiode 405 nm	180
A.3	Datenblatt von Pantoprazol	181
A.4	HPLC Messung von <i>Chlorin e6</i> und Pantoprazol	183
A.5	Datenblatt der Membranfilter	184
A.6	Literaturwerte der Gewebeparameter von Mukosa	185
A.7	ASAP-Skripte	187