

Sektion Physik der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Laserinduzierte Tumor-Fluoreszenzdiagnostik am Beispiel des soliden Ehrlichkarzinoms

K. König, W. Dietel

(Eingang: 24. Februar 1989)

Summary

Laser-induced fluorescence diagnostic of tumors: Solide Ehrlich carcinoma

The laser induced fluorescence of Hematoporphyrin derivative (HpD) sensitized experimental Ehrlich carcinoma on mice is investigated. The fluorescence is excited with the 364 nm argon-laser line. The tumor fluorescence spectra are recorded in the red spectral region. The HpD induced fluorescence of the tumors is superimposed on the autofluorescence of tissue. The tumor fluorescence shows a maximum 4 h after i.p. application of HpD. The fluorescence intensity is reduced by strong excitation causing bleaching of the HpD absorption. The fluorescence spectrum is also changing and the generation of a fluorescent photoproduct is observed.

Zusammenfassung

Die laserinduzierte Fluoreszenz des HpD-sensibilisierten Ehrlichkarzinoms der Maus wurde untersucht. Die Fluoreszenz wurde mit der UV-Linie 364 nm des Argonionenlasers angeregt. Tumorfluoreszenzspektren wurden im roten Spektralbereich registriert. Die HpD-induzierte Fluoreszenz der Tumoren wird durch die Autofluoreszenz des Gewebes überlagert. Die Tumorfluoreszenz zeigte 4 h nach i. p. Applikation des HpD ein Maximum. Eine Reduktion der Fluoreszenzintensität erfolgt durch Anregungsstrahlung hoher Leistungsdichte, basierend auf dem Ausbleichen der HpD-Absorption. Bei starker Anregung wird auch das Fluoreszenzspektrum modifiziert, und die Generation eines fluoreszierenden Photoproduktes läßt sich nachweisen.

Einleitung

Die bevorzugte Akkumulation des fluoreszierenden Porphyringemisches Hämatoporphyrinderivat (HpD) in Tumorgewebe gegenüber dem umgebenen Normalgewebe eröffnet die Möglichkeit der Tumordiagnostik durch Detektion der Fluoreszenzstrahlung. Die Messung der Fluoreszenz gestattet Aussagen zur Existenz, der Lokalisation und der Ausdehnung des Tumoreals (3). Bevorzugte Anregungsquellen sind Laser, deren Strahlung mit hoher Effektivität in flexible Lichtleiter eingekoppelt wird und so auch eine Diagnose im HNO-, Magen/Darm-, Bronchial- und Urogenitalbereich ermöglichen (4).

Das Fluoreszenzanregungsspektrum (Abb. 1) von HpD zeigt im violetten Bereich sein größtes Bandenmaximum. Deshalb erweist sich die Verwendung eines Kryptonionen-Lasers (407, 413 und 415 nm) (14) oder eines UV-gepumpten Farbstofflasers (1, 5, 6) als günstig. Fluoreszenz kann aber auch bei Einstrahlung in die schwach absorbierenden Banden im Bereich 500 bis ca. 630 nm (Q-Banden) des Porphyringemisches (Abb. 1 und 2) beobachtet werden (7, 15). Schwierigkeiten bei der Detektion der HpD-Fluoreszenz treten u. a. durch Verfälschung der Fluoreszenzintensität infolge störender Laseruntergrundstrahlung auf.

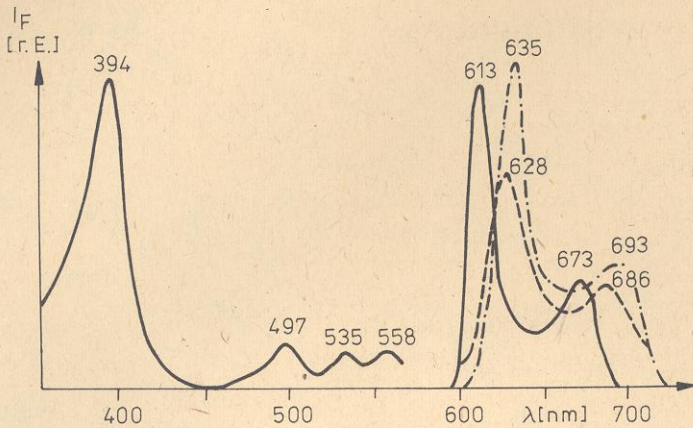


Abb. 1. Fluoreszenz- und Fluoreszenz Anregungsspektrum ($\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_F = 613 \text{ nm}$) von HpD in PBS (—), PBS + HSA, 10% (---, Kurve um Faktor 10 gestaucht) und in vitro, Gewebe (-·-·-). Die im roten Spektralbereich zwischen 600 nm und 700 nm emittierte Fluoreszenz ist am intensivsten, wenn in die kurzwelligste Bande des Anregungsspektrums eingestrahlt wird (Monomerbande um 400 nm).

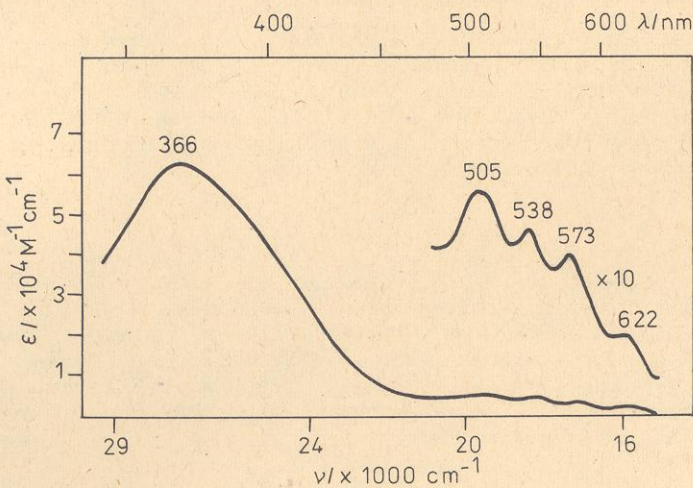


Abb. 2. Absorptionsspektrum von HpD in PBS. Neben der für die Fluoreszenz wesentlichen Monomerabsorption (vgl. Abb. 1.) tritt eine starke Absorption durch die HpD-Aggregate auf, so daß sich das Absorptionsmaximum um ca. 30 nm in den UV-Bereich verschiebt. Für die Photochemotherapie ist die Absorption im roten Spektralbereich (Bande in vivo bei ca. 630 nm) von Interesse.

Die Fluoreszenz von HpD wird hauptsächlich durch die Monomerbestandteile hervorgerufen, vergleiche Abb. 1 und 2. Die kaum fluoreszierenden Aggregatbestandteile sind jedoch für den Prozeß der tumorselektiven Anlagerung wesentlich (4). Das Absorptionsmaximum der Aggregate liegt bei etwa 365 nm (Abb. 2).

In dieser Arbeit werden Untersuchungen zur In-vivo-Fluoreszenz von HpD-inkubiertem Tumorgewebe bei Anregung mit Laserstrahlung der Wellenlänge 364 nm vorgestellt. Dabei wird die Untergrundstrahlung des Gasentladungsrohres des Lasers selektiert, da sie sich sonst der Gewebefluoreszenz überlagert und diese verfälscht (2, 7). Untersuchungsobjekt ist das solide Ehrlichkarzinom der Maus.

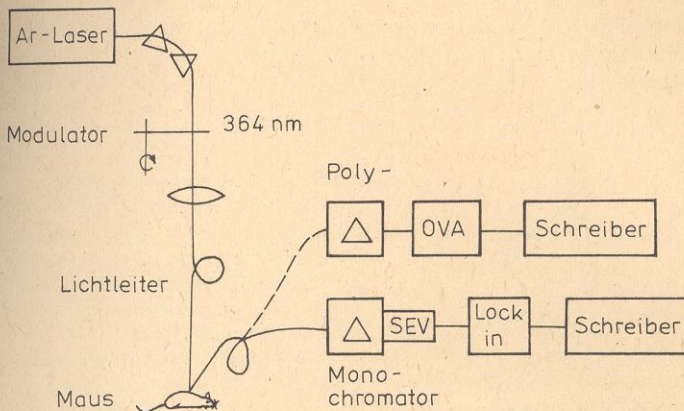


Abb. 3. Experimenteller Aufbau zum Nachweis der Tumorfluoreszenz. Die Argonlaserstrahlung der Wellenlänge 364 nm wird über Prismen von der spontanen Untergrundstrahlung des Lasers abgetrennt, moduliert und in eine Lichtleitfaser eingekoppelt. Die Fluoreszenzstrahlung des Tumors wird über ein Lichtleitbündel aufgefangen und einer geeigneten Registriereinrichtung zugeleitet.

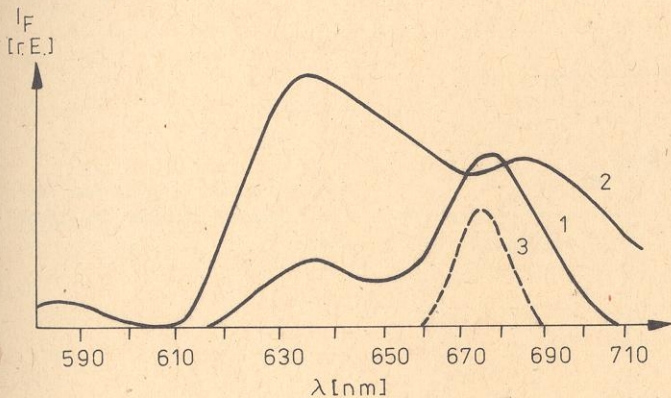


Abb. 4. In-vivo-Fluoreszenzspektrum von HpD-inkubiertem Gewebe.
 1) Subcutaner Tumor mit darüberliegender Hautschicht
 2) Obere Hautschicht entfernt
 3) Epidermis-Autofluoreszenz (Eigenfluoreszenz)

Material und Methoden

Tiere, Tumor, Narkose: Weiblichen ICR-Mäusen wird subkutan durch Injektion einer Ehrlich-Aszites-Zellsuspension (6 Mio Zellen/ml) ein solides Karzinom induziert. Nach Narkose (Rampoon, Ursotamin, Heparin) wird der Tumor und das benachbarte Normalgewebe durch Resektion der oberen Hautpartie freigelegt.

Laseranordnung: Ein Argonionenlaser (ILA 120, CZ Jena) mit der UV-Emission bei 351 und 364 nm dient als Lichtquelle. Mittels eines speziellen Fasereinkopplungsgerätes (2, 7) wird die störende Untergrundstrahlung des Lasers räumlich von der 364-nm-Anregungsstrahlung getrennt und letztere nach Intensitätsmodulation in eine Quarzfaser geringer Apertur eingekoppelt. Das andere Faserende wird auf die zu untersuchende Gewebepartie gerichtet, der Abstand kann variiert werden.

Die Fluoreszenz wird mit einem Lichtleiterbündel aufgefangen und über einen Monochromator, Sekundärelektronenvervielfacher, lock-in und Schreiber detektiert, s. Abb. 3. Die Nachweisgrenze liegt bei dieser Apparatur bei etwa 10 ng/ml HpD in PBS, pH = 7,4.

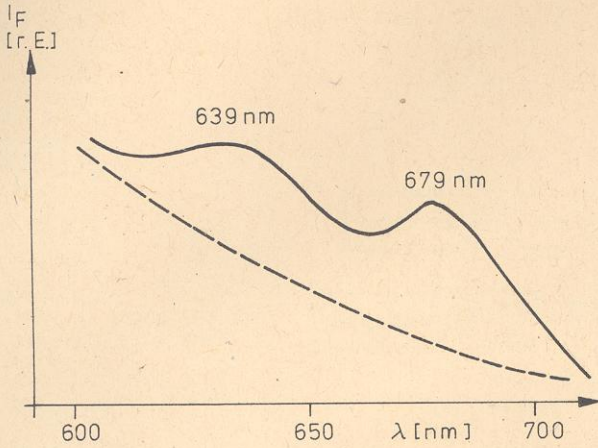


Abb. 5. Autofluoreszenzspektrum (keine HpD-Applikation) des soliden Ehrlich-Karzinoms. Die schwache Autofluoreszenz des Tumors (spezifische Autofluoreszenz) wird von einer unspezifischen Autofluoreszenz (gestrichelte Kurve) überlagert.
 — Eigenfluoreszenz des Ehrlich-Karzinoms (Maus)
 - - - Eigenfluoreszenz des normalen Gewebes

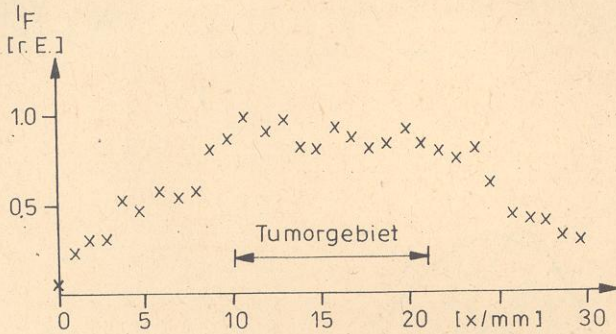


Abb. 6. Laterale Verteilung der Fluoreszenzintensität innerhalb des Tumorgebietes.

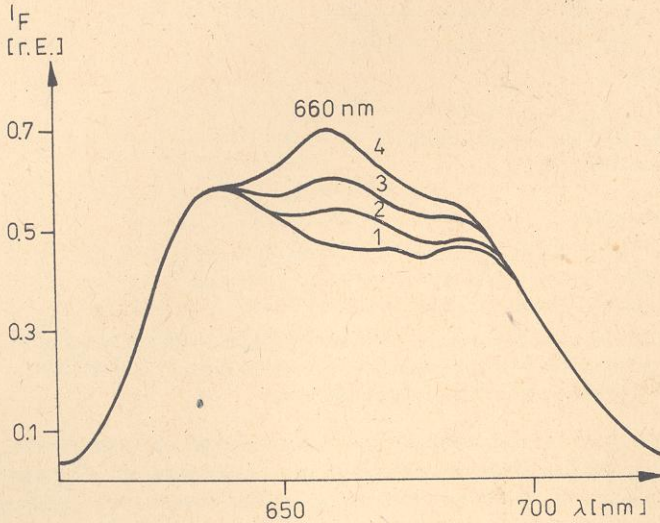


Abb. 7. In-vivo-Fluoreszenzspektrum eines HpD-inkubierten Tumors in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (10 mW/mm^2 , $\lambda = 364 \text{ nm}$, 1: ohne Bestrahlung, 2: 10 min, 3: 20 min, 4: 30 min, Normierung der Fluoreszenzintensität bezüglich 635-nm-Peak). Es ist deutlich die Generation eines neuen Fluoreszenzpeaks bei ca. 660 nm zu erkennen.

Pharmakon: HpD mit hohem Aggregatgehalt stand als Lösung (Hersteller: Dr. Lotz, HNO-Universitätsklinik Halle) mit einer Ausgangskonzentration von 2,5 mg/ml zur Verfügung. Es wurde mit PBS, pH = 7,4, verdünnt. Für Voruntersuchungen wurde 20%iges humanes Serum (HSA, Dessau) verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Spektrale Lage der Fluoreszenzbanden in vitro und in vivo

Das Absorptionsspektrum von HpD in PBS zeigt Abb. 2, das Fluoreszenz- und das Fluoreszenzanregungsspektrum Abb. 1. Zwei charakteristische Banden bei 613 und 673 nm können im Emissionsspektrum beobachtet werden. Bei Zugabe von HSA tritt infolge einer Porphyrinmonomer-Protein-Ionenbindung eine Rotverschiebung der Absorptionsbanden auf, die mit einer bathochromen Verschiebung und einer Intensitätszunahme (Dissoziation der Aggregate) der Emissionsbanden korreliert.

In vivo zeigt das HpD-Fluoreszenzspektrum ebenfalls eine Rotverschiebung (Abb. 4, Kurve 2, sowie Abb. 7). Aussagen zur Verschiebung der Absorptionsbanden sind in vivo infolge der hohen Gewebeextinktion nur schwer zu erhalten. Hier bieten sich für die Messung oberflächennaher Gewebepartien die nichtinvasiven Methoden der Photoakustik (8) und der Remissionsspektroskopie (11) zur Untersuchung des Absorptionsverhaltens an.

Tabelle Normierte Fluoreszenzintensitäten 24 h nach HpD-Applikation (exitus), $c_0 = 10 \text{ mg/kg KM}$
0 = nicht nachweisbar; - = keine Messung; * = vom Injektionsort abhängig; oberflächlich: durch Aufpinseln

Gewebe	Fluoreszenzintensitäten (rel. Einheiten)			
	i. p.	i. v.	s. c.*	oberflächlich
Tumor	0,9	1,0	0,9	0,1-0,2
Peritoneum (5 mm)	0,5	0,5	0,4	0,1-0,2
(10 mm von Tumor)	0,1-0,2	0,2	0,2	0,1-0,2
Cutis	0,1	0,1-0,2	0,2	0,1-0,2
Darm	0,1-0,2	-	0,2	<0,05
Ohr	0,1-0,2	0,3	0,1	<0,05
Muskel	0,05	0,05	<0,05	0
Niere	0,1	0,05-0,1	<0,05	0
Leber	-	0,2	<0,05	0

Autofluoreszenz

Ohne HpD-Applikation zeigt Gewebe eine Autofluoreszenz (Eigenfluoreszenz), die für Muskelgewebe im blau-grünen Spektralbereich (HSA-Fluoreszenz bei 480 nm) ein Maximum hat und stetig zum roten Spektralbereich abfällt. Dieser unspezifischen Autofluoreszenz des Gewebes ist im Falle des Tumors eine spezifische Autofluoreszenz überlagert, die im roten Spektralbereich mit empfindlicher Nachweisttechnik beobachtet werden kann. Dieses spezifische Autofluoreszenzspektrum wurde mit der in Abb. 3 skizzierten Apparatur gemessen und ist in Abb. 5 zu sehen. Das tumorspezifische Autofluoreszenzspektrum (durchgezogene obere Kurve in Abb. 5) zeigt große Ähnlichkeit mit dem in vivo HpD-Fluoreszenzspektrum in Abb. 1 und Abb. 4. Es läßt sich deshalb vermuten, daß auch natürliche im Körper vorkommende Porphyrine stärker im Tumor akkumuliert werden können und zu der beobachteten spezifischen Autofluoreszenz führen.

Liegt der Tumor unter einer Gewebeschicht und ist der Fluoreszenzmessung nicht direkt zugänglich, so wird die Tumorfluoreszenz durch die selektive Gewebeextinktion (Filterwirkung) geschwächt und durch die stärkere Autofluoreszenz des Gewebes signifikant beeinflusst (Abb. 4). Durch vorsichtiges Entfernen von Teilen der kutanen Gewebeschicht wurden die Tumoren deshalb für alle weiteren Fluoreszenzmessungen freigelegt.

Räumlich-zeitliche Verteilung der fluoreszierenden HpD-Komponenten

In Abhängigkeit von der Applikationsart (i. v., i. p., i. t.) und dem Zeitintervall zwischen Applikation und Messung sowie der Ausgangskonzentration kann HpD in verschiedenen Körperarealen nachgewiesen werden. Relativ starke Fluoreszenzintensitäten zeigen neben den tumoralen und peritumoralen Gebieten auch die äußeren kutanen Schichten (Ohr und Schwanz der Versuchstiere) sowie der Darmtrakt und Urin.

In Tabelle I sind gemessene Fluoreszenzintensitäten angegeben. Die Messung erfolgte nach Exitus, die untersuchten Gewebepartien wurden reseziert. Aus dem Vergleich von tumoralen und peritumoralen Fluoreszenzintensitäten sind unter der Voraussetzung eines linearen Zusammenhanges zwischen Intensität und Menge des Farbstoffes, Konzentrationsgradienten bestimmbar. Verhältnisse von 1:5 bis 1:9 (10 mm Abstand zum Tumorareal) können der Tabelle entnommen werden. Eine bevorzugte Anlagerung am soliden Ehrlichkarzinom bei i. v. Applikation von HpD gegenüber der i. p. Injektion konnte nicht beobachtet werden.

Messungen zur Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität ergeben ein Maximum nach 4 Stunden (Meßpunkte: 1, 4, 8, 12, 24 h). Bereits eine Stunde nach i. p. Applikation konnte das Einsetzen der Fluoreszenz im Tumorgebiet registriert werden. Maximale Fluoreszenzintensitäten nach 12 Stunden, wie in (13) angegeben, konnten nicht bestätigt werden.

Durch laterale Translation des Objektisches wurde die Fluoreszenzintensität des Tumorareals ortsabhängig untersucht. Der Anregungsstrahl wurde fokussiert und wies am Bestrahlungsort einen Durchmesser von ca. 0,2 mm auf. Um den Einfluß der Höhenschwankungen des Objektes vernachlässigen zu können, wurde ein flächig gewachsener Tumor ausgewählt. Abb. 6 zeigt die Funktion der Intensität in Abhängigkeit vom Ort. Es zeigt sich, daß im makroskopisch homogenen Tumorareal die Fluoreszenzintensität räumlich nicht konstant ist und über das Tumorareal hinaus allmählich abnimmt. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen anderer Autoren überein (12).

Einfluß der Anregungsstrahlung

HpD-Konzentration und die Photonenflußdichte der Anregungsstrahlung beeinflussen die Form der Fluoreszenzspektren. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer ist der Abbau der Fluoreszenzbanden, insbesondere der 635-nm-Bande, zu beobachten. Gleichzeitig tritt eine neue Fluoreszenzbande bei 660 nm auf (Abb. 7). Die Fluoreszenzintensität dieser Bande ist bei gleicher Bestrahlungsdosis innerhalb des Tumorareals größer als in der Umgebung.

Diese Bande ist das Resultat photochemischer Umwandlungen und kann auch in bestrahlten hochkonzentrierten HpD-Lösungen (Maximum bei 645 nm) gefunden werden (Abb. 8a). Dabei begünstigt eine hohe Sauerstoffkonzentration der Probe die irreversible Generation dieser Bande (Abb. 8b). Die absolute Fluoreszenzintensität der Bande bei 645 nm erreicht einen Maximalwert und nimmt mit zunehmender Bestrahlungsdauer wieder ab.

Bei der Messung des Absorptionsspektrums der bestrahlten HpD-Lösungen wurde eine Korrelation zwischen dem Entstehen der Fluoreszenzbande bei ca. 645 nm und der Generation einer neuen Absorptionsbande im roten Spektralbereich mit einem Maximum bei 640 nm gefunden (Abb. 9a). Die relative Zunahme der Absorption bei 640 nm ist in Abb. 9b dargestellt. Daraus entnimmt man die Existenz eines stabilen Photoproduktes. Das nach dem Ausbleichen der HpD-Absorption verbleibende Absorptionsspektrum (Abb. 9a, gestrichelte Kurve) zeigt neben der breitbandigen UV-Absorption große Ähnlichkeit mit dem Fluoreszenzanregungsspektrum bei $\lambda_F = 645$ nm nach langer Bestrahlung (Abb. 8a, gestrichelte Kurve), d. h. beide Kurven entsprechen dem Absorptions- bzw. Fluoreszenzanregungsspektrum eines stabilen fluoreszierenden Photoproduktes.

HpD (bzw. Photofrin II) wird aufgrund seiner photodynamischen Wirkung besonders als Pharmaka zur selektiven Photochemotherapie von Tumoren verwendet. Bevorzugte Therapiewellenlänge ist 630 nm (2, 16). Inwieweit die Erhöhung des molaren Absorptionskoeffizienten im therapeutisch interessierenden roten Spektralbereich nach Bestrahlung die Effektivität der Therapie beeinflusst, wird gegenwärtig untersucht.

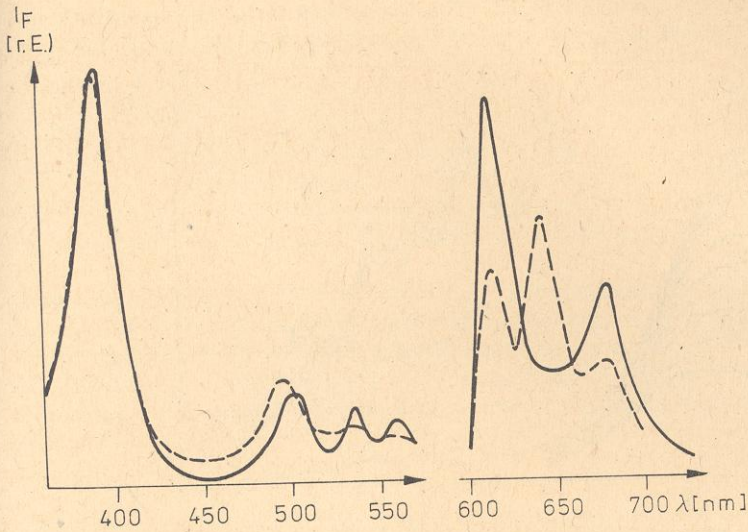


Abb. 8a. Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_F = 615 \text{ nm}$ und 650 nm) bei der Bestrahlung von HpD in PBS ($c = 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$) mit der Quecksilberhochdrucklampe HBO 200, 50 mW/cm^2 , $t_B = 0,5 \text{ h}$. Deutlich sichtbar wird die Herausbildung einer dritten Fluoreszenzbande bei 645 nm . Weiterhin ist erkennbar, daß die integrale Fluoreszenzintensität bei Bestrahlung reduziert wird.

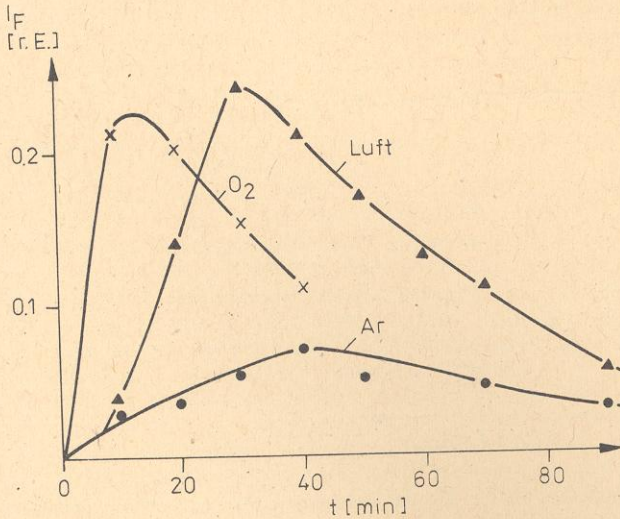


Abb. 8b. Einfluß der Sauerstoffkonzentration auf die Photoproduktgeneration. Bei sauerstoffangereicherten Proben wird die 645-nm -Fluoreszenzbande bereits nach kurzen Bestrahlungszeiten sichtbar. Die Fluoreszenzintensität erreicht einen Maximalwert (hier bei ca. $0,1 \text{ J/mm}^2$). Bei weiterer Bestrahlung nimmt die Intensität exponentiell ab. (Die Monomerfluoreszenz bei 613 nm ebenfalls).

Klinische Relevanz

Hämatoporphyrinderivat, insbesondere mit hohem Aggregatgehalt (Handelsname: Photofrin II), wird zur Photochemotherapie und gleichzeitigen Fluoreszenzdiagnose von Tumoren eingesetzt (3, 4, 14). Intensitätsverhältnisse von ca. 5:1 bis max. 10:1 der Tumorfluoreszenz zur Umgebungsfluoreszenz bieten die Möglichkeit der Früherkennung von oberflächigen Tumoren im Trachea-Bronchial-Trakt

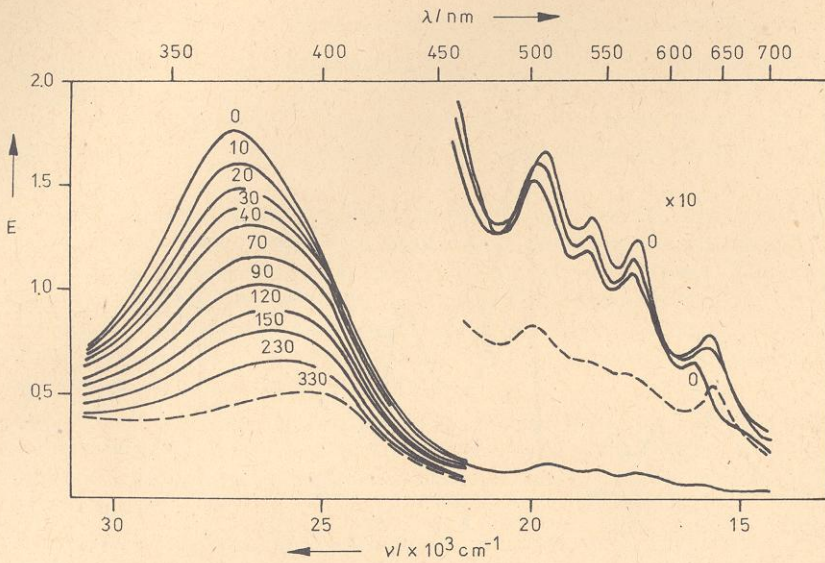


Abb. 9a. Absorptionsspektrum von HpD in PBS ($c = 1,5 \times 10^{-3}$ M, $d = 1$ mm). Mit zunehmender Bestrahlungsdauer ($t_B = 0$ bis 330 min, HBO 200, 50 mW/cm^2) bleicht die Absorption der Probe aus. Der Prozeß des Photobleaching (Abnahme der Absorption) wird von dem Prozeß der Photoproduktgeneration (Zunahme der Absorption speziell bei 640 nm) überlagert.

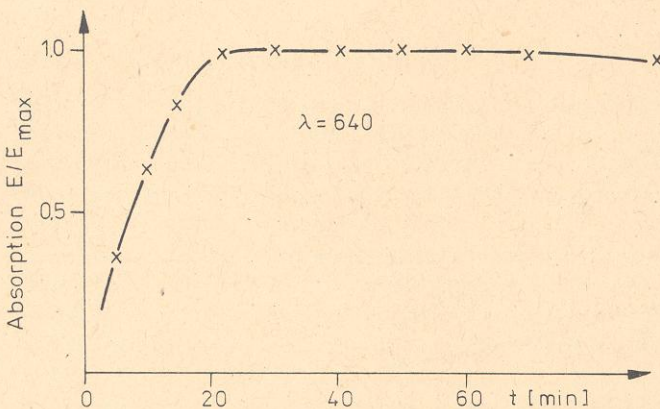


Abb. 9b. Die relative Zunahme der Absorption bei 640 nm läßt die Erzeugung eines stabilen Photoproduktes erkennen ($E(t_B = 0 \text{ min}) = 0$ gesetzt). Bei sauerstofffreien Proben (mehrmaliges Abpumpen (≈ 1 Pa) und anschließende N_2 -Spülung) konnte keine Photoproduktabsorption bei 640 nm beobachtet werden.

sowie im Urogenitaltrakt. Die Erkennung von Tumoren mit einer Ausdehnung in der Größenordnung Millimeter dürfte möglich sein. Bedeutung hat die Fluoreszenzdiagnose zudem für die Abgrenzung von Resektionsarealen.

Die Verwendung der UV-Linien des Argonionen-Lasers erlaubt die Einstrahlung in das Absorptionsgebiet der Aggregate, den für die tumorselektive Anlagerung wesentlichen Bestandteilen des Porphyrin-gemisches HpD. Durch die Verwendung dieser unsichtbaren Anregungsstrahlung ist eine gute Trennung der im roten Spektralbereich liegenden Fluoreszenzstrahlung von der Anregungsstrahlung gegeben. Die Tumorfluoreszenz ist dadurch bereits mit dem bloßen Auge erkennbar.

Um das Ausbleichen der Absorption und damit das Absinken der integralen Fluoreszenzintensität zu vermeiden, empfiehlt es sich, mit niedrigen Anregungsintensitäten zu arbeiten (Größenordnung 10 mW/cm^2).

An die Diagnose läßt sich eine Therapie unmittelbar anschließen („Umschalten“ auf Laserstrahlung von ca. 630 nm). Einige tausend Patienten wurden bisher derart behandelt (1, 3). Probleme bereitet die mehrwöchige Lichtempfindlichkeit des Patienten nach HpD-Applikation infolge einer geringen Akkumulation des Photosensibilisators in den Hautpartien. Gegenwärtige Forschungen konzentrieren sich unter anderem auf die Entwicklung neuer Sensibilisatoren sowie empfindlicher Verfahren zur Erfassung der spezifischen Autofluoreszenz von Tumoren mit der Zielstellung einer marker-freien Tumordiagnose.

Inwieweit die Applikation von HpD mit hohem Photoproduktanteil die Effektivität der Photochemotherapie infolge eines erhöhten Absorptionsvermögens im roten Spektralbereich günstig beeinflussen kann und ob die Messung der zusätzlichen Fluoreszenzbande Aussagen zum photodynamischen Wirkungsmechanismus (u. a. durch Messung des Sauerstoffgehaltes im Gewebe, Hypoxie vermindert die Effektivität der Therapie) ermöglicht, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Literatur

1. Andreoni, A., Cubeddu, R.: Photophysical Properties of Hp and its derivatives and their use in tumorphototherapy. In: "Optical Properties and Structure of Tetrapyrroles" by Walther de Gruyter and Co. Berlin-New York 1985.
2. Berns, M. W.: HpD Photoradiation Therapy of Cancer. Liss, New York 1984.
3. Dietel, W., König, K.: Laseranordnung zur Fluoreszenzdiagnose, Phototherapie und Photochemotherapie. Patent DD 254 139 A1, 1987.
4. Doiron, D. R., Gomer, C. J.: Porphyrin Localization and Treatment of Tumors. Liss, New York 1985.
5. Kessel, D., Dougherty, T. J.: Porphyrin Photosensitization. Plenum Press, New York 1983.
6. Knoth, E., König, K., Dietel, W., Donnerhacke, K. H., Grassme, W.: Tumorfluoreszenzdiagnostik und Photoradiotherapie. Zeitschr. Atmungsorgane. Im Druck.
7. König, R., Lademann, J., König, K.: Anordnung zur Photochemotherapie und Fluoreszenzdiagnostik. Patentanmeldung WPA 61 B/3036367. 1987.
8. König, K., Dietel, W.: Lichtleitereinkopplungsgerät zur Fluoreszenzdiagnostik, Phototherapie und Photochemotherapie. Medizintechnik 1 (1988), 1-2.
9. König, K., Welsch, E., Walther, H. G.: Photoakustisches Spektrometer. Medizintechnik. Im Druck.
10. König, K., Krause, U., Bockhorn, V., Dietel, W., Schubert, H., Lotz, W., Löbe, U.: Photodynamic therapy with HpD on mice with solid Ehrlich carcinomas. Arch. Geschwulstforsch. Im Druck.
11. König, K., Dietel, W.: In vivo autofluorescence investigations on animal tumors. Eingereicht.
12. Kortüm, G.: Reflexionsspektrometrie. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1969.
13. Montan, S., Svanberg, K., Snaberg, S.: Multicolor imaging and contrast enhancement in cancer localization using laser-induced fluorescence in HpD-bearing tissue. Optics Letters. 2 (1985), 56-58.
14. Profio, A. E., Balhum, O. J.: Fluorescence Diagnosis of cancer. In (2), S. 43-50.
15. Profio, A. E.: Laser excited fluorescence of HpD for diagnosis of cancer. IEEE QE-20, 12 (1984), 1502-1507.
16. Putten, W. J. M. van der, Gemert, M. J. C. van der: Phys. Med. Biol. 6 (1983), 633-638.
17. Yanming, Y., Yuanlong, Y., Yuten, L., Fuming, L., Fudan, K., Paozhang, M.: Characteristic Autofluorescence for cancer diagnosis and the explanation of its origin. Conference on Lasers and Electro-Optics. Baltimore 1985 (Tagungsband S. 84).

Anschrift der Verfasser:

Dipl.-Phys. Karsten König
Dr. sc. nat. Wieland Dietel
FSU/Sektion Physik
Max-Wien-Platz
Jena
DDR - 6900