

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik - Großhadern
Klinikum der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter

**Quantifizierung der 5-Aminolävulinsäure-induzierten
Protoporphyrin-IX-Fluoreszenz bei der Diagnostik des
Harnblasenkarzinoms**

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

Vorgelegt von
Rahmatullah Alakkozai
aus
Kandahar/Afghanistan

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. W. Stummer

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Dr. med. D. Zaak

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung 20.02.03

Rahmatullah Alakkozai

**Quantifizierung der 5-Aminolävulinsäure-induzierten
Protoporphyrin-IX-Fluoreszenz bei der Diagnostik des
Harnblasenkarzinoms**

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Harnblasenkarzinom	3
1.2	Fluoreszenz	8
1.3	Historische Entwicklung	9
1.4	5-Aminolävulinsäure	10
1.5	Porphyrine und Hämbiosynthese	10
1.6	Ziel der Arbeit	13
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	5-ALA Instillation	15
2.2	Technische Komponenten	15
2.3	Durchführung der Fluoreszenzendoskopie (AFE)	17
2.4	Methode der Bildaufnahme, Archivierung und Verarbeitung	18
2.5	Normieren der PPIX-Fl auf Fluoreszenz eines Fluoreszenzstandards	18
2.6	Fluoreszenzquantifizierung (BV)	19
3	ERGEBNISSE	21
3.1	Visuelle Bewertung der AFE durch den Operateur	21
3.1.1	Korrelation der AFE mit der Histologie	21
3.1.2	Vergleich der AFE mit der Weißlichtendoskopie (WLE)	23
3.1.3	Korrelation der AFE mit der WLE hinsichtlich Sensivität und Spezifität	24
3.2	Bildanalytische Quantifizierung des PPIX-Fluoreszenzkontrastes (BV)	24
3.2.1	Schwelle für die Trennung der Läsionen	25
3.2.2	BV versus Histologie	26
3.2.3	Der Mittelwert der BV (Rot/Blau) in einzelnen Befundkategorien	28
3.2.4	Die BV ((R/B)Befund / (R/B)N)) in den einzelnen Befundkategorien	29
3.2.5	Die BV ((R/B)Befund / (R/B)N)) in den einzelnen (G1-G3) M-K	30
3.3	Vergleich der BV mit der AFE hinsichtlich Sensitivität und Spezifität	31
3.4	Vergleich aller Diagnosen bezüglich Sensitivität und Spezifität	32

4	DISKUSSION	34
5	ZUSAMMENFASSUNG	39
6	ABKÜRZUNGEN	40
7	LITERATUR.....	41
8	DANKSAGUNG	45
9	LEBENS LAUF	46

1 Einleitung

Das Harnblasenkarzinom ist der zweithäufigste urologische Tumor nach dem Prostatakarzinom. In der BRD erkranken jährlich ca. 15.000 Personen an diesem Tumor (Robert-Koch-Institut-Pressemitteilung, 1999). In 95 % der Fälle handelt es sich hierbei um ein Urothelkarzinom. Bei 75-85 % der Patienten findet sich bei Erstdiagnose ein oberflächliches, nicht die Harnblasenmuskulatur infiltrierendes Tumorstadium. Die endoskopische, organerhaltende Therapie ist die Therapie der Wahl in diesen Tumorstadien.

Beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom unterscheidet man 2 Tumorentitäten: das papilläre Karzinom (pTa/1) und das Carcinoma in situ (Cis). Flache urotheliale Läsionen, wie die höhergradige Dysplasie und das Carcinoma in situ finden sich häufig in der unauffällig erscheinenden Schleimhaut und sind somit in der konventionellen Weißlichtendoskopie nicht an typischen morphologischen Kriterien zu erkennen (Soloway et al., 1978).

Neben den flachen Tumorstadien sind aber auch die Tumorrandgrenzen in der herkömmlichen Endoskopie leicht zu übersehen. In aktuellen Untersuchungen fanden sich 2-6 Wochen nach einer transurethralen Resektion von Harnblasentumoren in 38% bis 58% der Fälle noch Tumorresiduen im Resektionsareal (Klän 1991, Köhrmann 1994, Vögeli (1992 und 1998), Mersdorf, 1998). Vor diesem Hintergrund bestand schon immer das Bestreben, Detektionsverfahren zur in vivo Markierung urothelialer Neoplasien zu entwickeln. Allerdings haben sich Versuche einer Fluoreszenzdetektion mit Tetracyclinen (Whitmore et al., 1965), Methylenblau (Fukui, 1983) oder synthetischen Porphyringemischen (Jocham, 1989) als unzulänglich bzw. technisch nicht realisierbar erwiesen.

Im Klinikum Großhadern wird seit 1992 die 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) zur Fluoreszenzmarkierung der urothelialen Neoplasien eingesetzt. 5-ALA ist das Ausgangsprodukt der intrazellulären Hämbiosynthese. 5-Aminolävulinsäure selbst ist nicht fluoreszierend. Nach exogener Applikation findet sich eine Anreicherung von endogenen Porphyrinen, insbesondere von Protoporphyrin IX (PPIX), in Zellen epithelialen Ursprungs. PPIX ist das entscheidende Fluorochrom für die Fluoreszenzdiagnostik. Seine tumorselektive Akkumulation in Harnblasen-

karzinomen konnte an einem tierexperimentellen Modell nachgewiesen werden (Kriegmair, 1992). Das Fluoreszenzanregungsspektrum von PPIX weist ein Maximum im violettblauen Wellenlängenbereich um 400 nm auf. Zur Fluoreszenzanregung wird eine inkohärente Hochleistungslichtquelle verwendet. Die Lichtquelle transmittiert violettblaues Anregungslicht der Wellenlänge zwischen 375 und 440 nm durch ein Glasfaserbeleuchtungsbündel.

Sowohl papilläre Tumore, als auch die flachen Läsionen fluoreszieren rot und zeichnen sich mit hohem Kontrast von der blauvioletten Schleimhaut der übrigen Blase ab (Abb. 1).

In mehreren Phase-II-Studien wurde die Aussagekraft und Praktikabilität des Verfahrens untersucht (Jichlinski 1997, Kriegmair 1998, König 1999, Filbeck 1999, Zaak et al., 2001). Es wurde die Sensitivität und Spezifität der Detektion urothelialer Tumoren unter Weißlicht mit der unter Fluoreszenzlicht verglichen. Es zeigte sich eine hoch signifikante Korrelation von bioptisch gewonnenem Material aus Arealen mit positiver Fluoreszenz und negativer Fluoreszenz mit der Histologie, aus der sich eine Sensitivität von ca. 90-95% und eine Spezifität von ca. 60-70% für die AFE errechnete.

35% der fluoreszenzpositiven Biopsien wurden histopathologisch als benigne Befunde eingestuft.

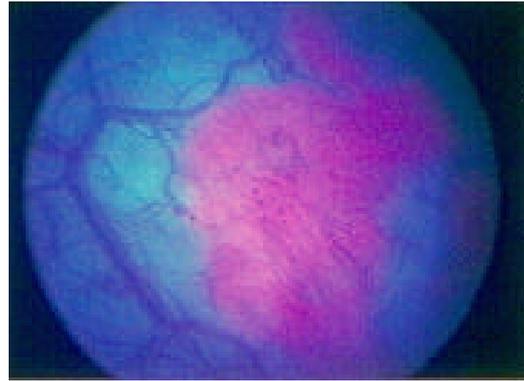
Hierbei handelt es sich vor allem um Plattenepithelmetaplasien , aber auch einfache urotheliale Hyperplasien , Entzündungen und normales Urothel (Zaak, 2001) fluoreszierte.

Inzwischen konnte ein bildgebendes Verfahren entwickelt werden, daß eine intraoperative Quantifizierung der PPIX-Fluoreszenz ermöglicht (Wagner, 2000).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die visuelle (subjektive) Bewertung der Fluoreszenz- und der Weißlichtendoskopie durch den Operateur mit der bildanalytischen Quantifizierung des PPIX-Fluoreszenz-Kontrastes zu vergleichen.



WLE



AFE

Abb. 1: Weißlichtendoskopie (WLE) und 5-ALA-induzierte Fluoreszenzendoskopie (AFE). : das fluoreszenzpositive circumscribed Areal in der AFE zeigt histologisch das Bild eines Carcinoma in Situ (Cis)

1.1 Das Harnblasenkarzinom

Blasentumoren machen etwa 3% aller bösartigen Tumoren aus.

Die Tumorinzidenz nimmt nach dem 40. Lebensjahr zu und erreicht ihren Höhepunkt im sechsten und siebten Dezennium (Altwein, 1986).

Das Verhältnis der Inzidenz des Blasenkarzinoms bei Männern und Frauen beträgt 3:1. Ursache ist womöglich die längere Urinkarzinogen-Expositionsdauer beim Mann mit obstruktiver Prostatahyperplasie (Altwein, 1986).

Ätiologie:

Ätiologisch kann der Kontakt mit verschiedenen karzinogenen oder co-karzinogenen Substanzen und deren Ausscheidung im Urin, nach einer Latenzzeit von bis zu 30 Jahren das Vorstadium eines mesothelialen Karzinoms auslösen (Norpoth und Weitowitz , 1994).

Die bekanntesten menschlichen Blasenkarzinogene sind in Tab. 1. aufgeführt.

1. Einleitung

- **Chemische Farbstoffe**
 - 2-β-Naphthylamin
 - 1-Naphthylamin
 - Auramin
 - Fuchsin
 - Benzidin
 - Anilin
 - 4-Amino-biphenyl
 - Dichlorbenzidin
- **Nikotinkonsum**
- **Chronische Infekte** (Nitrosamine)
- **Mykotoxine** (Balkannephritis)
- **Medikamente**
 - Chlornaphazin
 - Phenacetin
 - Cyclophosphamid

Tabelle 1: Kanzerogene beim Harnblasenkarzinom (Huland 2000)

Wesentliche Risikofaktoren für die Entwicklung eines Urothelkarzinoms sind in Tab. 2 aufgeführt.

Alter, Geschlecht

Rasse,
Weiße > Schwarze

Geographische Gesichtspunkte
Südafrika > Europa > Asien

Aromatische Amine

Nitrosamine

Chronische Harnwegsinfektionen

Bilharziose

Harnstein

Chronische Interstitielle Nephritis

Tabelle 2: Risikofaktoren für die Entwicklung eines Urothelkarzinoms

Histopathologie:

Man unterscheidet epitheliale, mesenchymale und sekundäre Harnblasentumoren. Histopathologisch handelt es sich in über 90% um Urothel-, in 7% um Plattenepithel- und in 1-2% der Fälle Adenokarzinome.

Die Einteilung in Invasionsgrade (TNM) und in Malignitätsgrade (G) erfolgt entsprechend einem Vorschlag der WHO von 1999 (L).

<p>Normal Normales Urothel</p> <p>Hyperplasie Flache Hyperplasie Papilläre Hyperplasie</p> <p>Flache Läsionen mit Atypien Reaktive (inflammatorische)Atypie Atypie unklarer Bedeutung Dysplasie (low-grade intraurotheliale Neoplasie) Carcinoma in situ (high-grade intraurotheliale Neoplasie)</p> <p>Papilläre uotheliale Neoplasien Papillom Invertiertes Papillom Papilläre Neoplasie mit niedrig-malignem Potential Papilläres urotheliales Karzinom (low grade) Papilläres urotheliales Karzinom (high grade)</p> <p>Invasive Neoplasien Invasion der Lamina propria Invasion der Muskulatur</p>

Tabelle 3: WHO/ISUP-Konsensus Klassifikation (Mostofi et al, 1999)

Häufigkeitsverteilung von Lokalisation und Form mit schematischer Darstellung von Tumoren unterschiedlicher T-Kategorien des Blasenkarzinoms

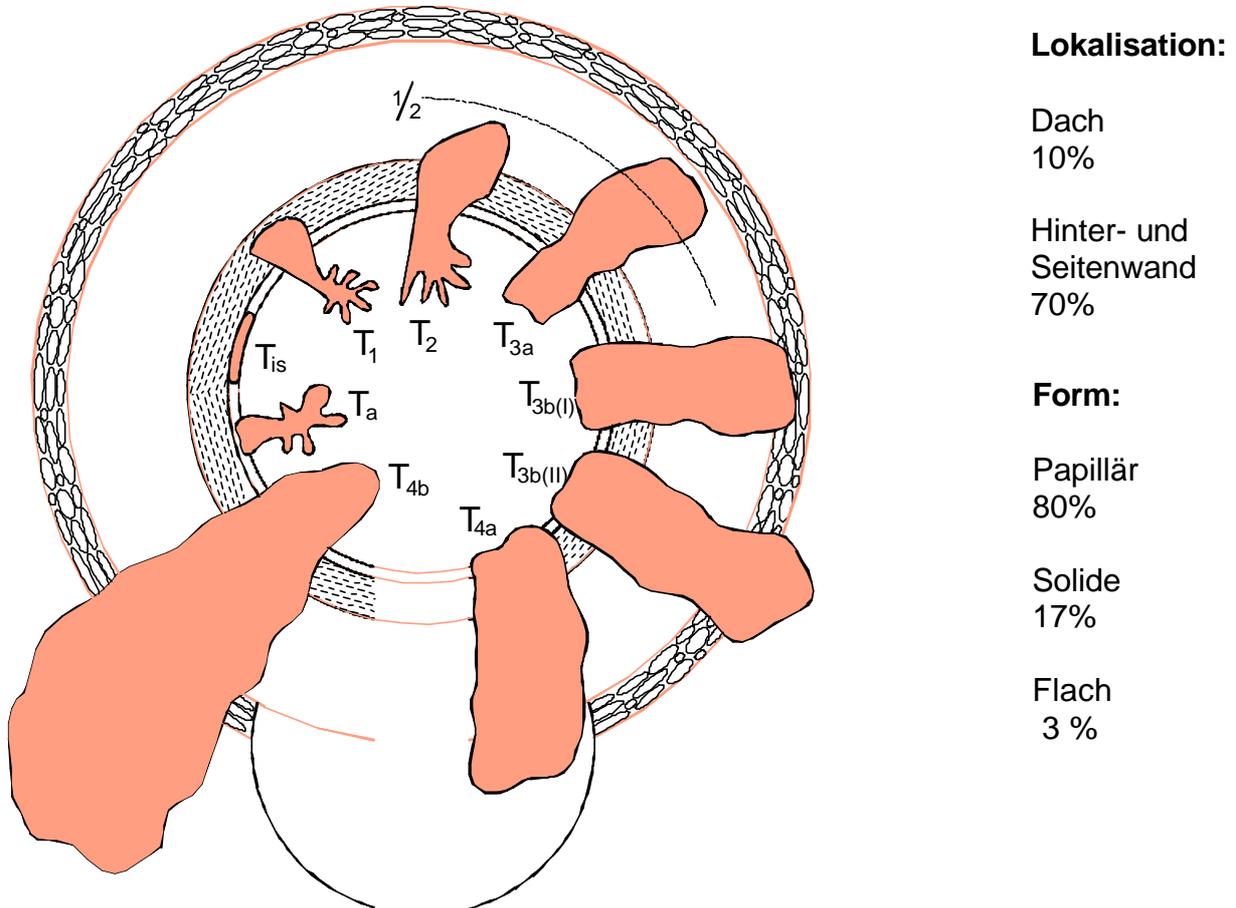


Abb. 2: Häufigkeitsverteilung von Lokalisation und Form mit schematischer Darstellung von Tumoren unterschiedlicher T-Kategorien des Blasenkarzinoms (Altwein, 1986), T_{is} (Carcinoma in situ), T_a (nichtinvasives papilläres Karzinom), T₁ (Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe), T₂ (Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur), T₃ (Tumor infiltriert tiefe Muskulatur oder perivesikales Fettgewebe), T_{3a} (Befall der tiefen Muskulatur), T_{3b} (Infiltration des perivesikalen Fettgewebes), T_{3b(i)} (mikroskopische Infiltration des perivesikalen Fettgewebes), T_{3b(ii)} (makroskopische Infiltration des perivesikalen Fettgewebes), T_{4a} (Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina), T_{4b} (Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand).

Symptome beim Harnblasenkarzinom

Das Kardinal- und in bis zu 80% der Patienten das Initialsymptom des Blasen-tumors ist die intermittierende schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie.

Eine Dysurie oder Pollakisurie sowie eine Harndrangsymptomatik können ebenfalls auf einen Harnblasentumor verweisen.

Tumorwachstum im Bereich der Ureterostien verursacht eine uni- und/oder bilaterale Obstruktion, konsekutiven Harnstau und Flankenschmerzen.

Diagnostik

Da das primäre, oberflächliche Harnblasenkarzinom normalerweise noch keine Metastasierung aufweist, ist fast immer ein Organerhalt möglich. Bei fortgeschrittenen Tumoren ist für die Planung der Therapie die Beurteilung des organüberschreitenden Wachstums und/oder der Metastasierung von Bedeutung. Durch die endoskopische Diagnostik werden Lokalisation, Zahl und Wachstumstyp der Tumore sowie auch Differenzierungen zwischen oberflächlichen oder infiltrierenden Tumoren vorgenommen.

Im klinischen Alltag stehen hierzu die konventionelle Weißlichtendoskopie, die Randoibiopsie und die zytologische Untersuchung des Urins zur Verfügung.

Im positiven Falle erfolgt die transurethrale Resektion (TUR) in Narkose. Getrennte Resektionsbiopsien aus Tumor und Tumorgrund geben Aufschluß über die Infiltrationstiefe. Die Quadrantenbiopsie kann ein multilokuläres Wachstum nachweisen. Spezifische Tumormarker fehlen. Die Urinzytologie spielt aufgrund der hohen Rate an falsch negativen Ergebnissen bei hochdifferenzierten Tumoren nur im Rahmen der Therapiekontrolle eine Rolle. Auf die Defizite dieser Standardverfahren in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms wurde bereits in der Einleitung eingegangen.

Sonographisch sind exophytische Blasentumore bei gefüllter Blase gut zu erkennen. Im Ausscheidungsurogramm stellen sich Blasentumore durch KM-Verdrängung dar. Weitere technische Verfahren (CT, Knochenscan, etc.) sind nur bei fortgeschrittenen Stadien im Rahmen des Metastasen - Screenings von Bedeutung (Hofstetter, Eisenberger, 1985).

1.2 Fluoreszenz

Licht (Photonen) kann von Molekülen absorbiert oder emittiert werden. Die bei einem Absorptionsprozeß von Molekülen aufgenommene Energie kann in Wärme, chemische Energie oder aber Lumineszenz umgewandelt werden. Die Fluoreszenz ist eine Form der Lumineszenz, bei der innerhalb von etwa 10^{-8} sec nach dem Absorptionsprozeß das anregende Photon wieder emittiert wird. Die Energie des emittierten Lichts ist dabei kleiner als die des Anregungslichts.

Zunächst befindet sich das Molekül im elektronischen Grundzustand. Wird ein Photon geeigneter Wellenlänge absorbiert, wird ein Elektron in einen elektronisch angeregten Zustand angehoben. Durch Wechselwirkung mit der Matrix, in die das Molekül eingebettet ist, wird ein Teil der Energie in Wärme umgewandelt (strahlungslose Übergänge). Aus dem tiefsten Zustand des elektronisch angeregten Niveaus kann es dann zu einem strahlenden Übergang kommen. Dabei emittiert das Molekül ein Photon (Fluoreszenz) und das Elektron kehrt wieder in den Grundzustand zurück.

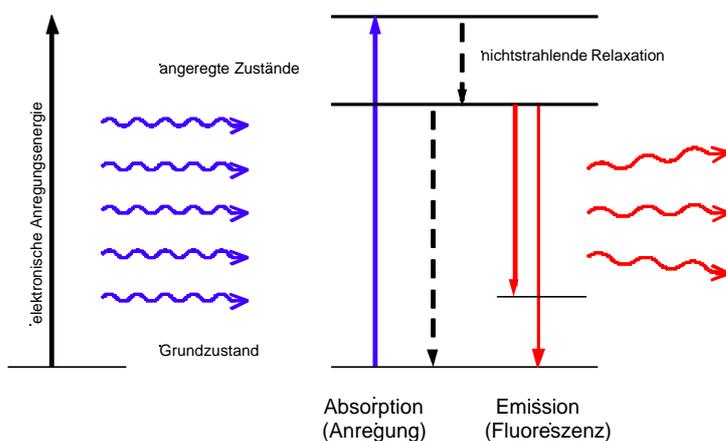


Abb. 3: Energieniveauschema eines Photosensibilisators

Ein Photosensibilisator wird im Grundzustand mit Licht einer definierten Wellenlänge angeregt. Ein Teil der so eingebrachten Energie relaxiert nichtstrahlend auf ein tiefer liegendes Niveau, von wo aus eine charakteristische Fluoreszenzemission möglich ist

1.3 Historische Entwicklung

Die erste Studie, die von einer selektiven Tumorfluoreszenz (Porphyrin-fluoreszenz) berichtet, stammt aus dem Jahre 1924. 1924 konnte von Policard in Rattensarkomen nach Anregung mit der Wood'schen Lampe eine intensive Rotfluoreszenz festgestellt werden, welche auf mikrobielle Zerstörungsvorgänge zurückgeführt wurde und so erstmals zur Differenzierung zwischen vitalem und nekrotischem Tumorgewebe verwendet wurde (Policard, 1924).

1942 fanden Auler und Banzer in tierexperimentellen Untersuchungen, daß eine exogene Applikation von Porphyrin zu einer deutlich erhöhten selektiven Tumorfluoreszenz führt. Sie zeigten an transplantierten Rattensarkomen- und Karzinomen, daß sich systemisch appliziertes Hämatoporphyrin selektiv im Tumorgewebe anreichert. Zudem wurden mit dem zur Anregung verwendeten ultravioletten Licht im Tumorgewebe Nekrosen erzeugt. Auffallend war auch die Tatsache, daß nach drei erfolgten Bestrahlungen keine Rotfluoreszenz mehr nachweisbar war (Auler, Banzer, 1942).

1975 wurde von Kelly die erste Fluoreszenzzystoskopie mit Hämatoporphyrinderivaten durchgeführt. Es zeigte sich aber, daß die Fluoreszenz zu schwach war, um eine Blaseninspektion mit dem bloßen Auge durchführen zu können (Kelly, 1975).

Die verhältnismäßig geringe Tumorselektivität von Hämatoporphyrinderivat in Verbindung mit einer nur mäßigen Fluoreszenzausbeute erforderte einen enormen technischen Aufwand, um bei tolerablen Konzentrationen des Photosensibilisators eine bildgebende Fluoreszenzdiagnose zu ermöglichen (Baumgartner et al. 1987; Stepp, 1993).

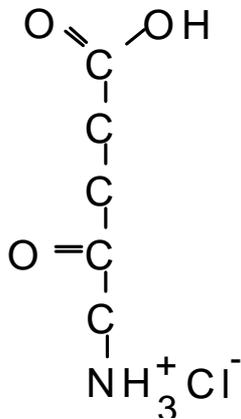
Der schlechte Quantenwirkungsgrad von Photofrin in der photodynamischen Diagnostik wie Therapie bei zugleich nicht unerheblichen Nebenwirkungen (cutane Phototoxizität) motivierte die Gruppe um Hofstetter Ende der 80-iger Jahre nach neuen und effizienteren Photosensibilisatoren zu suchen.

Einen großen klinischen Stellenwert unter den neuen Photosensibilisatoren genießt das nach exogener Gabe von 5-Aminolävulinsäure im Rahmen der Hämbiosynthese synthetisierte und in der Tumorzelle angereicherte Protoporphyrin IX. Auf die 5-Aminolävulinsäure und das Protoporphyrin IX wird nun in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

1.4 5-Aminolävulinsäure

Eigenschaften

Name: 5-Aminolävulinsäure(hydrochlorid), 5-ALA (manchmal δ -ALA)



Chem. Bezeichnung: 5-Amino-4-oxo- pentansäure-
hydrochlorid (C₅ H₁₀ Cl N O₃)

Molekulargewicht: 167,59 g/mol

Aussehen: weißes bis bräunlich weißes Pulver

Schmelzpunkt: 151-154 °C

pH (1% in Wasser): 2,2 - 3,2

Löslichkeit: löslich in Wasser, wenig löslich in Ethanol und Methanol

Formulierung: steriles, pyrogenfreies Lyophilisat in lichtgeschützter Flasche

1.5 Porphyrine und Hämbiosynthese

Alle Zellen von Säugern synthetisieren Porphyrine und Häm. Die Hauptsyntheseorte sind, neben der Leber, vor allem die Retikulozyten des Knochenmarks.

Porphyrine und Häm spielen die zentrale Rolle für Sauerstoff- und Kohlendioxidtransport.

Der Ablauf der Häm-Biosynthese ist in der Abb. 6 schematisch dargestellt.

Diese Schritte finden z.T. in den mitochondrialen (der erste und die letzten drei) sowie in den cytosomalen Zellbestandteilen statt.

Der erste Schritt ist die Kondensation von Glycin mit Succinyl-CoA zu 5-ALA, katalysiert von dem Enzym 5-Aminolävulinat-Synthase in den Mitochondrien. Danach verläßt 5-ALA das Mitochondrium und wird in Porphobilinogen umgewandelt, wovon vier Moleküle zu einem Porphyrin-Ring kondensieren.

Die nächsten drei Schritte (Reaktionen) im Cytosol beinhalten die Oxidation der Substituenten an den Pyrrolringen; es entsteht Portoporphyrinogen IX, dessen Bildung mit dem Rücktransport in das Mitochondrium verbunden ist. Durch Oxidation der Methylengruppen, die die Pyrrole verbinden, entsteht PPIX. Durch Einbau von Fe²⁺ (Ferrochelatase-katalysiert) entsteht schließlich Häm (Batlle, 1993).

Das Enzym 5-Aminolävulinat-Synthase, das die Schrittmacherreaktion dieses Stoffwechselweges katalysiert, unterliegt der Feedback-Hemmung durch Häm. Es wird nur immer gerade soviel 5-ALA in der Zelle synthetisiert, wie Häm benötigt wird (Kennedy 1990).

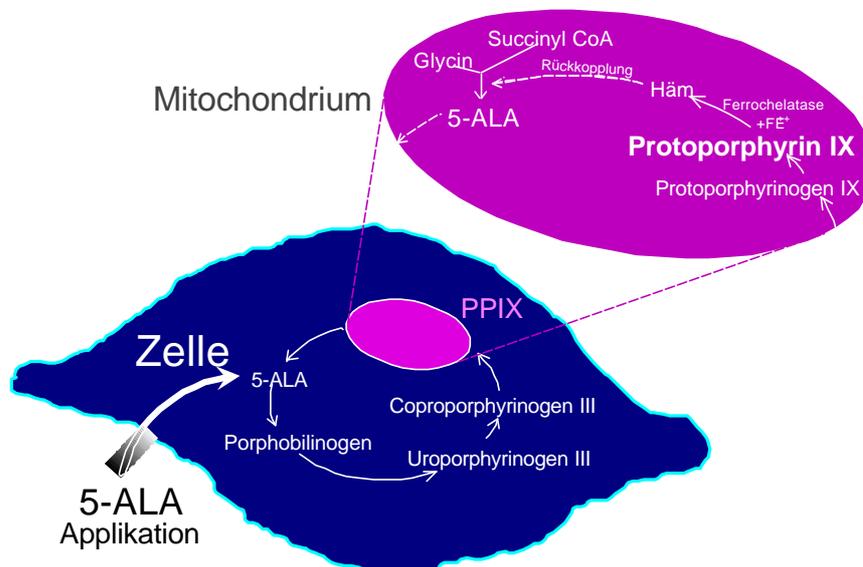


Abb. 4: Häm-Biosynthese

Die Faktoren, die für eine vermehrte Anreicherung von PPIX in Tumorgewebe verantwortlich sind, werden derzeit erforscht und konnten bisher nur in Teilaspekten geklärt werden.

Von der Verabreichung von 5-ALA bis zur Bildung des PPIX und seiner weiteren Verstoffwechslung werden mehrere Teilschritte benötigt. Diese können eine Tumorselektivität bewirken. Im einzelnen sind dies die:

a) Gewebepenetration von 5-ALA:

Die Diffusionsbarriere, die das Eindringen und die interstitielle Verteilung von 5-ALA behindert kann tumorbedingt erniedrigt sein (Kennedy und Pottier 92; Kennedy et al., 90).

b) Intrazelluläre Aufnahme von 5-ALA:

5-ALA wird aktiv über ein Transportmembranmolekül *intrazellulär* aufgenommen. Zahl und Aktivität der Kanalproteine kann bei Tumorzellen erhöht sein (Fuchs, 1996).

c) Plasmaenzymaktivität:

In einigen in-vitro-Experimenten ließ sich in entarteten Zellen eine erhöhte Aktivität dieser Enzyme nachweisen, die an der Synthese der Zwischenprodukte zum PPIX beteiligt sind (z.B. erhöhte Aktivität des Enzyms PBG-Desaminase) (Navone, 1990).

d) Ferrochelatase-Aktivität:

Eine tumorspezifisch erniedrigte Ferrochelatase-Aktivität und eine gesteigerte Aktivität des Enzyms PBG-Desaminase, möglicherweise bedingt durch zu wenig verfügbares Eisen, wird von vielen Untersuchern als die Hauptursache einer tumorspezifisch erhöhten PPIX-Fluoreszenz angesehen (Rasetti et al. 67; Rubino et al., 66).

Entsprechend den Anregungs- und Emissionseigenschaften von PPIX werden zur Visualisierung der PPIX-Fluoreszenz geeignete optische Filtersysteme in den Anregungs- und Detektionsweg eingebracht. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, zur Darstellung der PPIX-Fluoreszenz neben dem Wellenlängenbereich der PPIX-Fluoreszenz auch einen Teil des vom Gewebe diffus zurückgestreuten Lichtes der Anregungslichtquelle zu erfassen. Auf diese Art und Weise werden suspektere Areale anhand eines Farbkontrastes gegenüber der Umgebung (rot versus blau) identifiziert. Dies ist zuverlässiger als die Beurteilung eines Intensitätskontrastes, weil dieser im Gegensatz zum Farbkontrast auch von Faktoren wie Ausleuchtungsintensität, Beobachtungsabstand und -Winkel abhängt, die nichts über das Akkumulationsverhalten von PPIX aussagen. Der Farbkontrast ist darüber hinaus weniger von Inhomogenitäten der Blutgefäßdichte beeinflusst, wenn die Wellenlänge des dargestellten rückgestreuten Lichts geeignet gewählt wird. Durch Simulationsrechnungen und Messungen der optischen Gewebeparameter konnte hierfür als optimale Wellenlänge der Bereich um 450 nm identifiziert werden (Wagner, 2000). Mit Hilfe der digitalen Bilderfassung und -speicherung kann der ortsabhängige Farbwert bzw. der Kontrast zur Umgebung quantitativ erfasst werden. Dies ermöglicht die Gegenüberstellung eines objektiven Fluoreszenzwertes zur histologischen Befundung, wie in dieser Arbeit praktiziert. Der auf diese Art und Weise erhobene Fluoreszenzwert ist, wie in der oben zitierten Arbeit (Wagner, 2000) ausgeführt, unabhängig von den störenden

Einflussfaktoren „Beobachtungsgeometrie“ und Blutabsorption. Es verbleibt lediglich eine Abhängigkeit von der Dicke der fluoreszierenden Schicht (Urothel) und des Gewebestreuparameters, wodurch eine direkte Eichung des Fluoreszenzwertes auf die Fluorochromkonzentration nicht möglich ist. Dennoch ist durchaus zu erwarten, dass unspezifische PPIX-Akkumulationen gegenüber spezifischen signifikant niedrigere Fluoreszenzwerte aufweisen.

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob die visuell ermittelte Spezifität der AFE mittels Farbanalyse (Quantifizierung) von Bildern durch Definition eines Schwellwertes verbessert werden kann.

Aus diesem Grund wurden zwei Auswertungen vorgenommen:

1. Visuelle Bewertung der AFE durch den Operateur (3.1)
2. Bildanalytische Quantifizierung des PPIX-Fluoreszenz-Kontrastes (BV),
Bildverarbeitung zwischen Läsion (L) und normaler Schleimhaut (N)
(3.2)

Weiterhin wurden auch alle Befunde unter WLE ausgewertet und mit den Ergebnissen der AFE verglichen.

2 Material und Methoden

Patientenselektion

Insgesamt wurden 150 Biopsien von 70 Patienten (51 Männern und 19 Frauen) entnommen. Das Alter der Patienten lag zwischen 18 und 91 im Mittel über 60 Jahre.

Als Einschluß- und Ausschlußkriterium für die Patientenuntersuchungen wurden die folgenden Kriterien festgelegt:

Einschlußkriterien:

1. Patientenalter über 18 Jahre.
2. V.a. oder gesichertes Vorliegen eines Harnblasentumors
3. Endoskopische Tumor-Nachsorge bei Patienten mit einem Harnblasentumor in der Vorgeschichte.

Ausschlußkriterien.

1. Chronische oder akute Porphyrie.
2. Niereninsuffizienz, Kreatinin über 2,5 mg%.
3. Leberinsuffizienz, Bilirubin über 3 mg%.
4. Transaminasen mehr als das Doppelte des oberen Normgrenzwertes.
5. Quick unter 60%.
6. Thrombozyten unter 100.000/mm³
7. Leukozyten unter 3.500/mm³
8. Schwangerschaft und Stillzeit
9. Zweitmalignom außer Basaliom
10. Lymphknoten oder Fernmetastasen
11. Psychische Erkrankungen
12. Teilnahme an anderer Studie

2.1 5-ALA Instillation

Es wurde 1,5g 5-Aminolävulinsäurehydrochlorid Trockensubstanz in 50 ml Natriummonohydrogenphosphat 1,4 %; pH 4,9 nach Desinfektion des äußeren Genitals mittels eines sterilen Einmalkatheters (14 Charr.) in die zuvor entleerte Harnblase intravesikal zwei bis drei Stunden präoperativ instilliert. Eine Retentionszeit von mindestens 30 Minuten sollte keinesfalls unterschritten werden. Die Patienten wurden dazu angehalten, die Instillationslösung bis zur Operation zu halten. In über 90% kam es zu keiner Miktion vor der Operation.

Aufgrund der ausstehenden Zulassung der Substanz 5-ALA zur intravesikalen Diagnostik des Harnblasenkarzinoms wurden die Patienten vor der Endoskopie auf diesen Sachverhalt und den experimentellen Charakter der Studie hingewiesen.

2.2 Technische Komponenten

Für die praktische Durchführung der AFE wurden geeignet modifizierte Komponenten des konventionellen zystoskopischen Instrumentariums benutzt, um die schwache Fluoreszenz zufriedenstellend zur Darstellung zu bringen.

- Anregungslichtquelle (Karl Storz/Tuttlingen, D-Light-System):

In das für die photodynamische Diagnostik eingesetzte D-Light ist ein Filter eingebaut, der im Wellenlängenbereich 375 bis 440 nm transmittiert, alle anderen spektralen Anteile jedoch abblockt.

- Spezielle Zystoskop-Optik mit integriertem Beobachtungsfiter und dem dazu gehöriger Fluidlichtleiter (Fluidsystem).

- Fluoreszenznachweis taugliche Videokamera (Drei-Chip-Kamera Tricam® SL PDD, Karl Storz GmbH & Co, Tuttlingen)



- Monitor für den Rechner
- Mikrofon für die Tonaufnahme
- Tastatur für die Kamera
- Tastatur für den Rechner
- Maus
- Rechner
- Monitor für die Kamera
- Drei-Chip-Kamerakopf
- D-Light System
- Kamerasteuerung
- Videocassettenrecorder
- Videoprinter

Abb. 5: Darstellung der technischen Komponenten für die Autofluoreszenzendoskopie

2.3 Durchführung der Fluoreszenzendoskopie (AFE)

Prinzipiell unterscheidet sich die AFE in Ablauf und Zeitaufwand nicht von der konventionellen WLE. Vor der Einführung des Zystoskops wird ein Weißabgleich vorgenommen.



Abb. 6: Durchführung der AFE

Die Lagerung des Patienten erfolgt typischerweise in Steinschnittlage. Nach Einführung des Zystoskops wird zuerst eine Zystoskopie unter Weißlicht durchgeführt. Im Anschluß erfolgt die Spülung der Harnblase mit 0,9%iger NaCl-Lösung und Entnahme der Spüllösung zur zytologischen Untersuchung (=Spülzytologie). Mittels eines Fußschalters bzw. per Knopfdruck an der Kamera ist dann der Wechsel auf das blauviolette Anregungslicht zur Durchführung der AFE zwischen dem konventionellen Weißlicht und dem blauvioletten Anregungslicht möglich.

2.4 Methode der Bildaufnahme, Archivierung und Verarbeitung

Es wurden aus den verdächtigen Arealen zuerst im Weißlichtmodus und dann im Fluoreszenzlichtmodus Bilder aufgenommen bzw. archiviert. Parallel dazu wurde der gesamte Verlauf der AFE auf einem Videoband gespeichert. Lokalisation, Weißlicht- und Fluoreszenzbefunde zu jeder Gewebeprobe wurden auf einem Erhebungsbogen (PDD-Op-Bogen) dokumentiert. Nach den Biopsieentnahmen wurden vom Operateur in gleicher Sitzung sowohl papilläre Tumoren als auch flache Läsionen, die sich mit ihrer Rotfluoreszenz von der blauen normalen Schleimhaut der übrigen Blase abhoben mit der Elektroschlinge reseziert oder mit dem Nd:YAG-Laser koaguliert

Die digitale Archivierung und Verarbeitung der intraoperativ gewonnenen Bilder wurde mit Hilfe eines PCs mit einem speziellen Bildverarbeitungsmodul (MfG-Board, Stemmer Puchheim) und selbstgeschriebenem Programm (Bildverarbeitungsprogramm: Optimas, Programmiersprache: ALI) (Wagner, 1997) durchgeführt.

2.5 Normieren der PPIX-FI auf Fluoreszenz eines Fluoreszenzstandards

Zu diesem Zweck wurde postoperativ mit Kamera, Endoskop und Lichtquelle ein Fluoreszenzbild des Fluoreszenzstandards aufgenommen und dann das mittlere Verhältnis der Pixelwerte zwischen Rot- und Blaukanal ermittelt. Alle späteren Verhältnisse dieser Größen wurden auf dieses Kalibriermaß bezogen. Als Fluoreszenzstandard wurde ein Radiergummi (Faber-Castell) verwendet (Abb. 12). Dieser zeigt auch über längere Zeit kein Ausbleichen, sondern nur eine von der Intensität des anregenden Lichts abhängige Fluoreszenz.

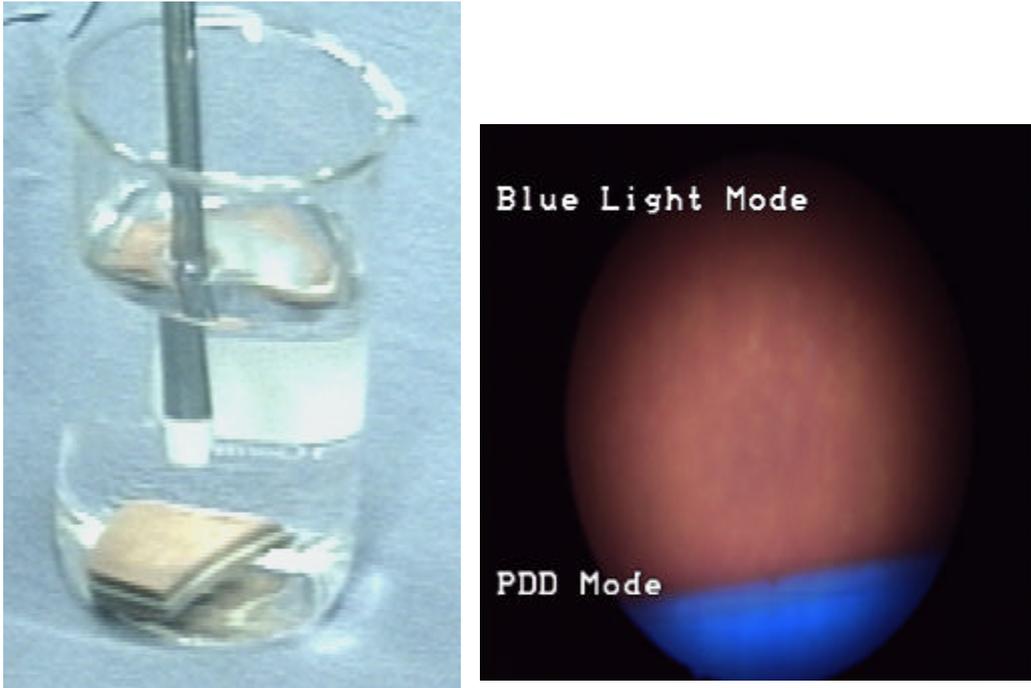


Abbildung Nr. 7: Normieren der PPIX-Fluoreszenz auf einen Fluoreszenz-Standard. Links: Zystoskop und Radiergummi in NaCl. Rechts: Bildaufnahme im Blue Light Mode für die Bildverarbeitung vom Fluoreszenzbild des Fluoreszenzstandards

2.6 Fluoreszenzquantifizierung (BV)

Unmittelbar nach der Operation wurde die Auswertung der Fluoreszenzbilder aus der Blase durchgeführt. Dazu wurden zuerst alle gespeicherten Bilder geladen und danach in den Fluoreszenzbildern zuerst innerhalb der Läsion (Rote Farbe) ein 10 x 10 Bildpunkte (Pixel quadratisch angeordnet) großes Areal angesetzt, aus dem die Intensität der drei Farbkanäle der Kamera (rot, grün, blau) ermittelt werden. Zusätzlich wurden im gleichen Bild vier weitere unmittelbar der Läsion benachbarte Areale gewählt. Es ergibt sich damit zum einen zu jeder Läsion ein absoluter Fluoreszenzwert (rot/blau) und zum anderen ein Tumor zu Normal-Kontrast. Die Ergebnisse wurden in einer automatisch angelegten Excel-Datei archiviert und zusammen mit den Bildern gespeichert. Die Biopsien wurden histologisch klassifiziert und der Befund mit der Fluoreszenz- bzw. mit dem Tumor zu Normal-kontrast korreliert.

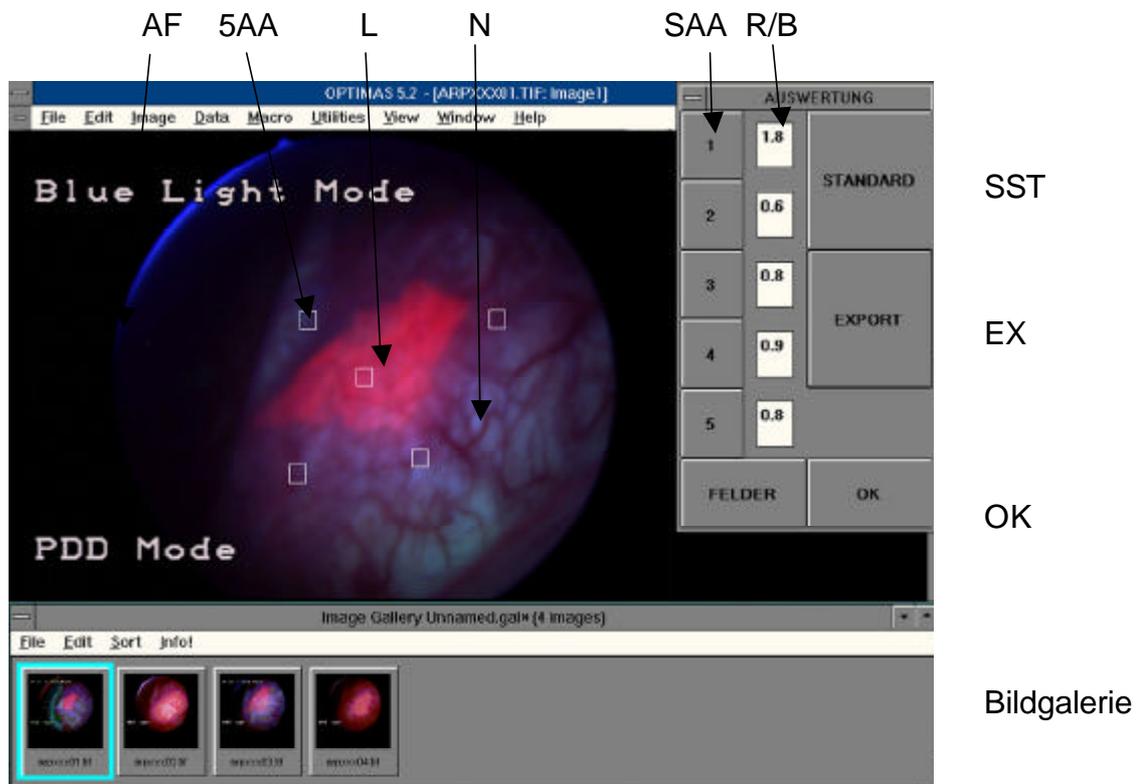


Abb. 8: Fluoreszenzquantifizierung (BV) (Programmoberfläche)

AF: Auswertefenster.

5AA: Auswertearealen: Eines in der Läsion (L, Rot) und 4 in der benachbarten normalen Schleimhaut (N, Blau).

SAA: Schaltflächen zum Setzen der 5 Auswerteareale, die per Maus in den Auswertefenstern (AF) verschoben werden können.

R/B: Ergebniswerte von R/B für die jeweiligen Auswerteareale

SST: Schaltfläche für die Normierung mit dem Fluoreszenzstandard.

EX: Schaltfläche für die Auswertung der Fluoreszenzbilder

OK: Zurück zur Erfassungsebene

3 Ergebnisse

Die histologisch gesicherten Biopsien wurden in den 7 folgenden Kategorien zusammengefasst:

1. **Benigne** (blande Schleimhaut, Ödem, Narbe, Hyperämie, Hyperplasie, Metaplasie): 30
2. **Benigne-entzündlich** (akut, chronisch): 40
3. **Dysplasien** (6 x Grad I Dysplasien, 10 x Grad II Dysplasien):16
4. **Carcinoma in Situ (CIS)**:12
5. **Ta G1-G3** : 39
6. **T1 G1-G3**: 6
7. **T2 G1-G3**: 7

Als Grenze zwischen benignen und malignen Befunden wurde die Dysplasie Grad II festgelegt. Das bedeutet, daß alle benigne Befunde, einschließlich der Dysplasie I° als benigne klassifiziert wurden. Nach dieser Einteilung wurden 76 benigne Befunde und 74 maligne Befunde histologisch gesichert. Darüberhinaus wurden von 150 makroskopisch unauffälligen, fluoreszenz-negativen Arealen Biopsien entnommen. Diese Areale befanden sich in der Nähe von makroskopisch auffälligen oder fluoreszenz-positiven Herden (s.o.).

3.1 Visuelle Bewertung der AFE durch den Operateur

3.1.1 *Korrelation der AFE mit der Histologie*

Hinsichtlich falsch-positiv, falsch-negativ, richtig-positiv, richtig-negativ:

Hier wurden zuerst in der Tabelle 4 alle Befunde und dann in der Tabelle 5 in einzelnen Befundkategorien die subjektive Beurteilung der AFE mit der Histologie verglichen.

3. Ergebnisse

Fluoreszenz	Histo. Positiv	Histo. Negativ
Positiv	72	41
Negativ	2	35+150

$p \leq 0,0001$ (Fischer's exact Test)

Tabelle 4: Vergleich des AFE-Befundes mit dem histopathologischen Ergebnis

Tabelle 4 zeigt, dass 72 der 74 Tumoren unter der AFE durch den Operateur richtig-positiv beurteilt wurden. Bei den Dysplasien II wurde zweimal makroskopisch die Diagnose Entzündungen gestellt.

41 der 226 benignen Befunden haben ebenfalls rot fluoresziert (falsch-positiv)(s. Tabelle 5).

Histologie	Anzahl (N)	Fluoresz. Neg.	Fluoresz. Pos.
Benigne	30+150	17+150	13
Benigne-entzünd.	40	17	23
Dysplasien G. I	6	1	5
Dysplasien G. II	10	2	8
Cis bis T2 G1-G3	64	0	64
Biopsien gesamt	150	35	113
Benigne gesamt	76	35	41
Maligne gesamt	74	2	72

Tabelle 5: Visuelle Beurteilung der AFE hinsichtlich falsch- positiv und falsch-negativ in jeweiligen Befundkategorien

3. Ergebnisse

3.1.2 Vergleich der AFE mit der Weißlichtendoskopie (WLE)

Hinsichtlich falsch-positiv, falsch-negativ, richtig-positiv, richtig-negativ:

In der Tabelle 6 ist das Verhältnis der WLE mit dem histopathologischen Ergebnis der gesamten Befunde und in der Tabelle 7 ist die WLE mit AFE hinsichtlich Falsch-negative Befunde dargestellt.

Weißlicht	Histo. Positiv	Histo. Negativ
Positiv	52	45
Negativ	22	31 + 150

Tabelle 6: Vergleich des weißlichtendoskopischen Befundes mit dem histopathologischen Ergebnis

Man erkennt in der Tabelle 6, dass 22 der 74 Tumoren unter der WLE übersehen wurden, die im Einzelnen in der Tabelle 7 dargestellt sind.

Histologie	Anzahl (N)	Weißlicht negativ	Fluo. Positiv
Dysplasie G II	10	2	8
Cis	12	6	12
Ta G1-G3	39	11	39
T1 G1-G3	6	2	6
T2 G1-G3	7	1	6
Tumore gesamt	74	22	72

Tabelle 7: Falsch-negative Befunde: AFE vs. WLE Resultate

3.1.3 Korrelation der AFE mit der WLE hinsichtlich Sensivität und Spezifität

Die Abbildung 9 zeigt die beiden diagnostischen Verfahren WLE und AFE hinsichtlich Sensitivität und Spezifität.

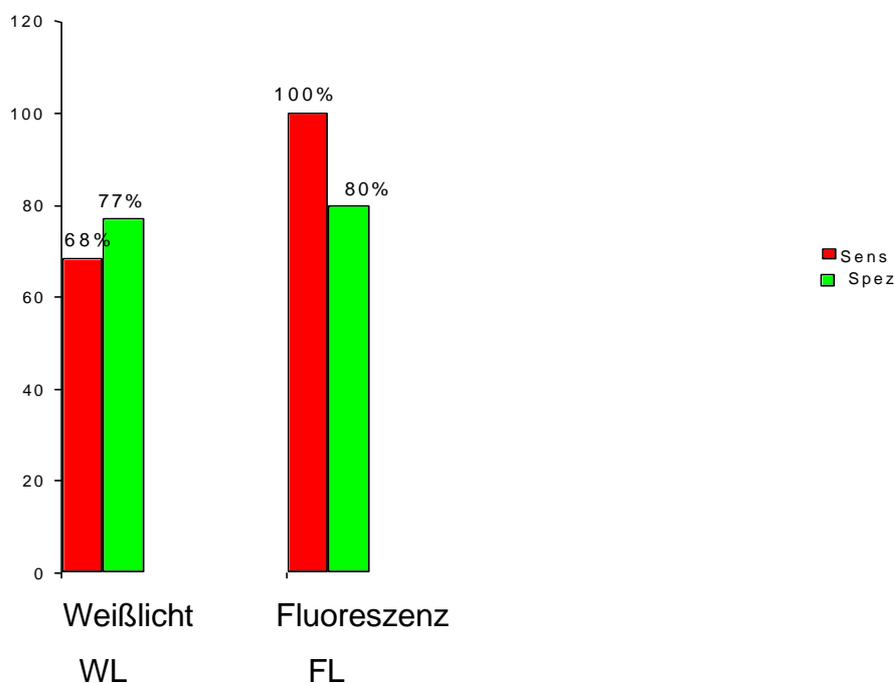


Abb. 9: Vergleich der WLE mit der AFE

Die WLE zeigt eine Sensitivität von 68% und eine Spezifität von 77% gegenüber einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 80% bei der AFE.

3.2 Bildanalytische Quantifizierung des PPIX-Fluoreszenzkontrastes (BV)

Hier wird das Ergebnis nach der Fluoreszenzbildverarbeitung dargestellt.

Um die Trennung der Läsionen zu gewährleisten, wurde ein Schwellenwert definiert.

In der Abbildung 10 wurde versucht, die Trennung der benignen Befunde im Vergleich zu malignen Befunden mit Hilfe eines Schwellenwertes bezüglich des Kontrastes ((Rot:Blau)Befund : (Rot:Blau)Normal) festzulegen. Daraus ergeben sich die Sensitivität und Spezifität.

3. Ergebnisse

Je nach Schwelle sind diese Werte verschieden groß, so nimmt die Sensitivität zunächst ausgehend von einem Schwellenwert = 0,5 von 100% immer weiter ab und erreicht bei zirka 3,8 den 50%-Wert. Im Gegensatz dazu nimmt die Spezifität in diesem Bereich zu. Sie erreicht rasch 85% bei einer Schwelle von 1,43 und steigt dann langsam weiter an.

So ergibt sich letztlich, daß die Schwelle von 1,43 einen noch sehr hohen Sensitivitätswert von 95% ergibt, während die Spezifität bei 85% noch so hoch ist, daß die Anzahl der falsch positiven Befunde akzeptabel erscheint.

3.2.1 Schwelle für die Trennung der Läsionen

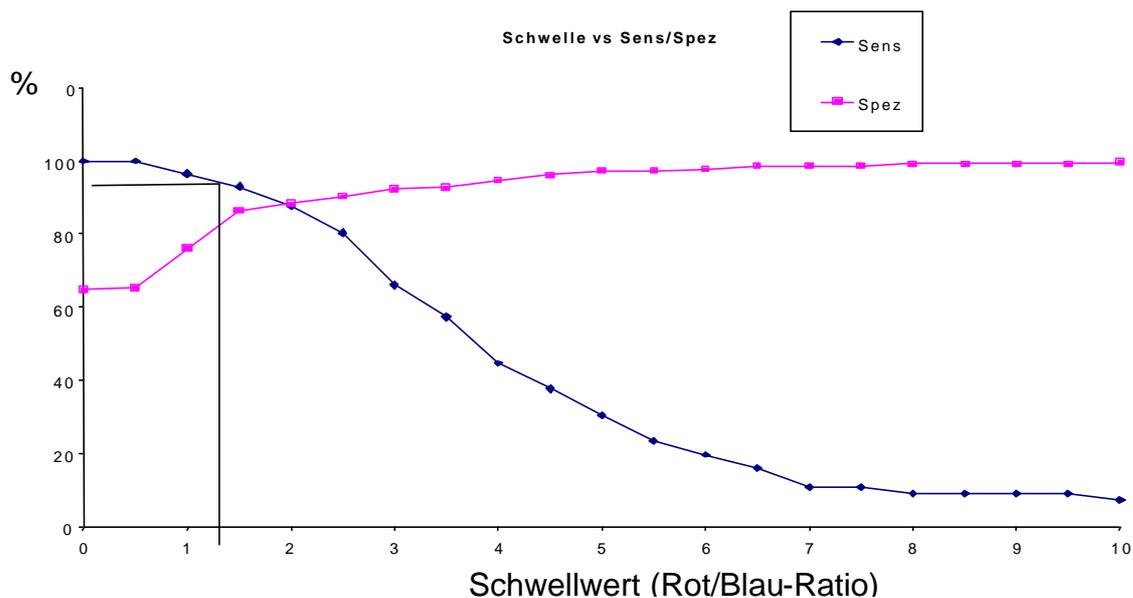


Abb. 10: Abhängigkeit der Sensitivität und Spezifität vom Schwellwert

Für den weiteren Vergleich des Verfahrens wurde hier ein Schwellenwert von Rot/Blau=1,43 definiert

3.2.2 BV versus Histologie

Hinsichtlich falsch-positiv, falsch-negativ, richtig-positiv, richtig-negativ:

Tab. 8 zeigt die Korrelation der BV mit der Histologie mit einem Schwellenwert von (1,43).

PPIX-Fluoreszenz	Histo. Positiv	Histo. Negativ
Positiv	72	30
Negativ	2	46 +150

$p \leq 0,0001$ (Fischer exacte Test)

Tab. 8: Korrelation der BV mit der Histologie mit einem Schwellenwert von (1,43) hinsichtlich falsch-positiv, falsch-negativ, richtig-positiv, richtig-negativ

In der Tab. 9 werden die falsch-positiven und in der Tab. 10 werden die falsch-negativen Befunde wie folgt zusammengefasst:

Falsch-positive Befunde:

In der Tabelle 9 sind die wesentlichen falsch-positiven Befunde mit Angabe der visuellen Beurteilung des Operateurs unter Fluoreszenzzystoskopie zusammengefasst.

Histologie	Anzahl (N)	PPIX-Fluoreszenz (Bildverarbeitung) Falsch-positiv	Fluoreszenz (Zystoskopie)
Benigne	30	9	3 Benig.-entz. 6 Benigne
Benigne-entzündlich	40	15	6 Benigne 9 Benig.-entz.

Tabelle 9: Zusammenfassung der falsch-positiven Befunde nach der visuellen Beurteilung des Operateurs unter Fluoreszenzzystoskopie

3. Ergebnisse

Tabelle 9 zeigt:

Die Zuordnung der Fluoreszenzbefunde aus der Bildverarbeitung mit einem Schwellwert von 1,43 zur visuellen Bewertung der AFE durch den Operateur:

- a) 9 von 30 Benigne-Befunden waren falsch-positiv. Damit wurde der intraoperative subjektive Fluoreszenzeindruck als (richtig) negativ in 70% angegeben.
- b) 15 der 40 Benigne-entzündlich waren ebenfalls falsch-positiv.

Falsch-negative Befunde:

Bei den beiden in der Fluoreszenzbildverarbeitung falsch-negativ beurteilten Befunden handelt es sich um zwei histologisch als CIS eingestufte Befunde. In der Tabelle 10 wurden alle 12 CIS-Befunde zusammen mit der AFE und WLE dargestellt.

Histologie	Anzahl (N)	BV Rot/Bau(Befund): Rot/lau (Normal) Falsch-negativ	AFE	WLE
CIS	12	2	12 Positiv 0 Negativ	6 Positiv 6 Negativ

Tabelle 10: Darstellung aller 12 CIS unter PPIX-Fluoreszenzbilverarbeitung mit der Angabe der visuellen Beurteilung des Operateurs unter WLE und AFE

Hier wurde unter der AFE alle 12 CIS richtig gesehen. Unter der WLE wurde 6 CIS übersehen.

Die beiden CIS-Befunde, die unter der Bildverarbeitung falsch-negativ erschienen, wurden unter WLE beide Male den Entzündungen zugeordnet.

3.2.3 Der Mittelwert der BV (Rot/Blau) in einzelnen Befundkategorien

Abb. 11 zeigt die Messungen der Rot/Blau-Ratios von histologisch abgesicherten Normalbefunden, Normalbefunde neben Tumorläsionen (keine histologische Abklärung) und der übrigen 7 Kategorien.

Histologisch abgesicherte Normalbefunde zeigen geringfügig höhere Rot/Blau-Ratios gegenüber den „Normalbefunden daneben“.

Die entzündlich veränderten Areale und die Dysplasien wiesen eine stärkere Rotfluoreszenz auf als das Normalgewebe (Benigne). Eine Steigerung findet sich beim Cis, TaG1-3, T1G1-3 und T2G1-3 ausgeprägt ($p \leq 0,001$ Mann-Whitney-U Test).

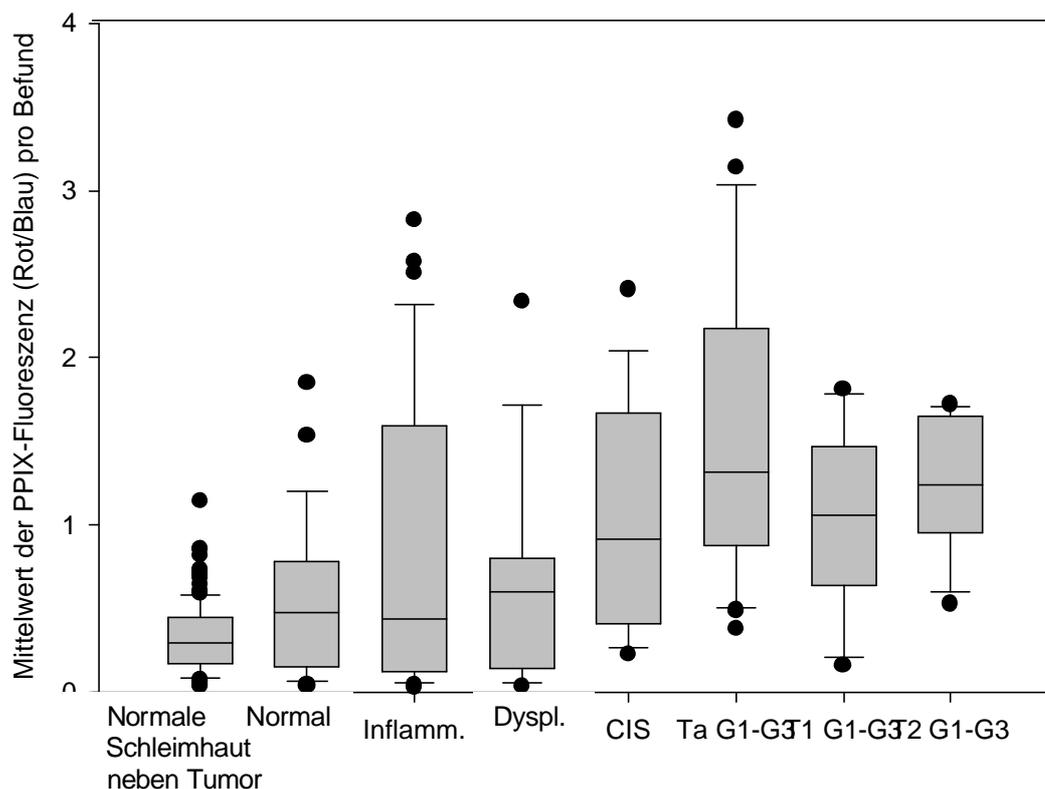


Abb. 11: PPIX-Fluoreszenz (Rot/Blau) angeordnet nach den Befundkategorien

3.2.4 Die BV ((R/B)Befund / (R/B)N) in den einzelnen Befundkategorien

In der Abbildung 12 ist der Fluoreszenzwert Rot durch Blau für den Befund geteilt durch den Fluoreszenzwert des benachbarten Normalgewebes aufgetragen. Somit wird der Kontrast zwischen Tumor und Normalgewebe deutlich gemacht.

Die benignen Befunde bis hin zu Dysplasien zeigen einen mittleren Kontrast von 1,3 bis 1,5 während Cis, TaG1-3, T1G1-3 und T2-G1-3 einen Kontrast größer 3,5 aufweisen ($p \leq 0,001$ Mann-Whitney-U Test). Die 50% Quartile zeigten eine deutliche Trennung zwischen benignen und malignen Befunden. Nur für das Cis gibt es eine Überlappung, was sich letztlich negativ auf die Sensitivität auswirkt.

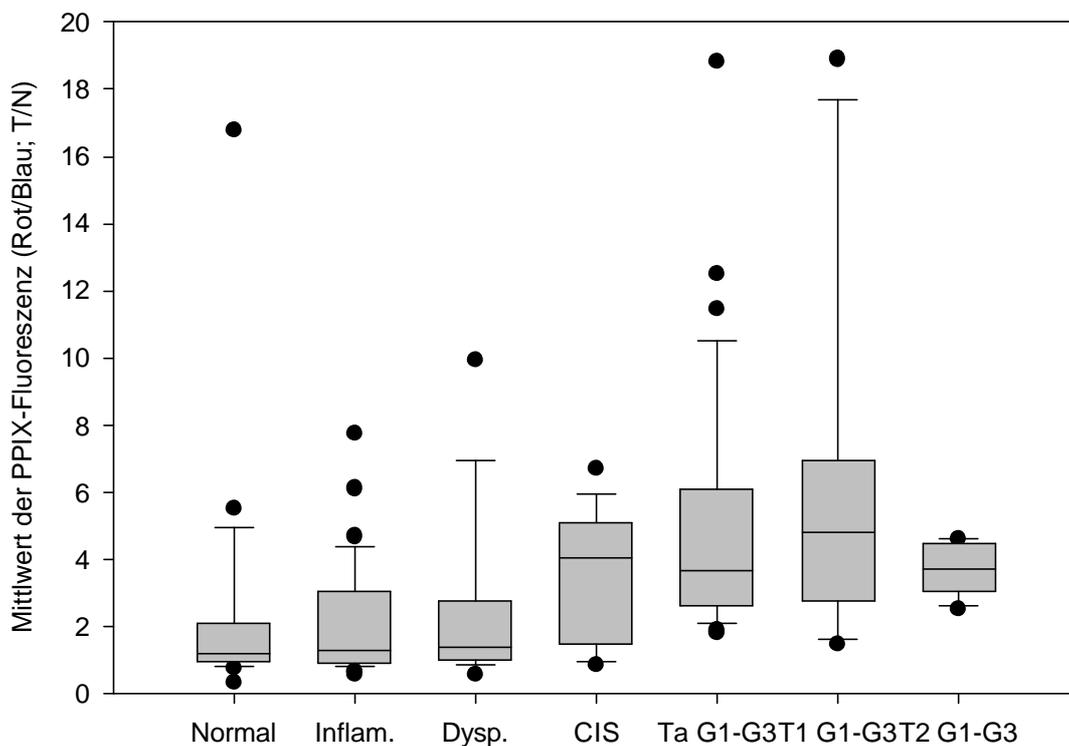


Abb. 12: Der PPIX-Fluoreszenzwert ((Rot:Blau)Befund : (Rot/Blau)Normal)) in den einzelnen Befundkategorien

3.2.5 Die BV ((R/B)Befund / (R/B)N) in den einzelnen (G1-G3) M-K

Hier wurde der PPIX-Fluoreszenzwert T/N in den einzelnen Malignitätskategorien (M-K) (G1-G3) dargestellt. Die G1 Kategorie zeigt mehr Kontrast als die G3 Kategorien.

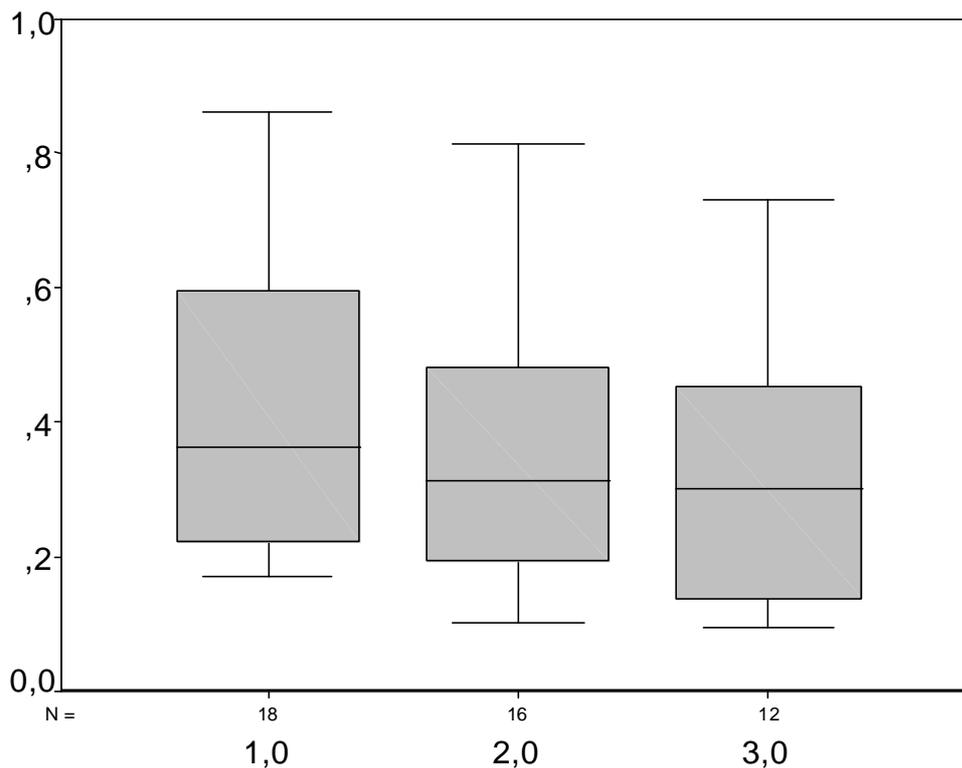


Abb. 13: Darstellung des PPIX-Fluoreszenzwerts T/N in den einzelnen Malignitätskategorien (G1-G3)

3.3 Vergleich der BV mit der AFE hinsichtlich Sensitivität und Spezifität

Ausgehend von einem Schwellenwert von 1,43 zeigt Abb. 14 einen Spezifitätszugewinn für die PPIX-Fluoreszenzquantifizierung (BV). Unter diesen Bedingungen werden jedoch 2 CIS-Befunde nicht mehr positiv zugeordnet, womit nur unter eine Sensitivität von 95% erreicht wird.

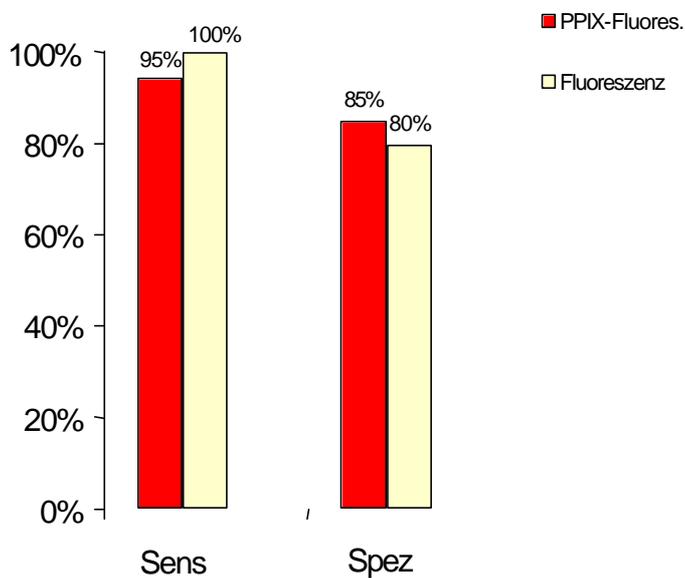


Abb. 14: Vergleich der PPIX-Fluoreszenzquantifizierung (bei einem Schwellenwert von 1,43) mit subjektivem Fluoreszenzbefund hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität (bei einem Schwellenwert von 1,43)

3.4 Vergleich aller Diagnosen bezüglich Sensitivität und Spezifität

Folgende Verfahren werden miteinander verglichen:

a) Die Bildverarbeitung, und zwar zunächst nur die Fluoreszenz-Ratio Rot durch Blau (BV R/B), dann die Bildverarbeitung mit Berechnung der Tumor- zu Normal-Ratio (BV T/N), die Weißlichtbeurteilung (WLE) und die subjektive Fluoreszenzbeurteilung (AFE) sowie die Kombination der Verfahren.

b) Die WLE wurde bereits diskutiert und zeigt eine Sensitivität von etwa 68% und eine Spezifität von 77%. Die AFE ist die Methode mit der höchsten Sensitivität von 100%, aber mit einer etwas verminderten Spezifität gegenüber der Bildverarbeitung von etwa 80 %.

Die einfache Form der Bildverarbeitung Rot/Blau in einzelnen Befunden weist durchaus hohe Sensitivitäten von etwa 91% auf, die Spezifität ist aber nicht besonders hoch und liegt bei 62%.

Die Bildverarbeitung mittels Kontrastdarstellung Rot/Blau (Tumor/Normal) bringt eine Sensitivität von etwa 95% und eine Spezifität von 85% (Abb. 15).

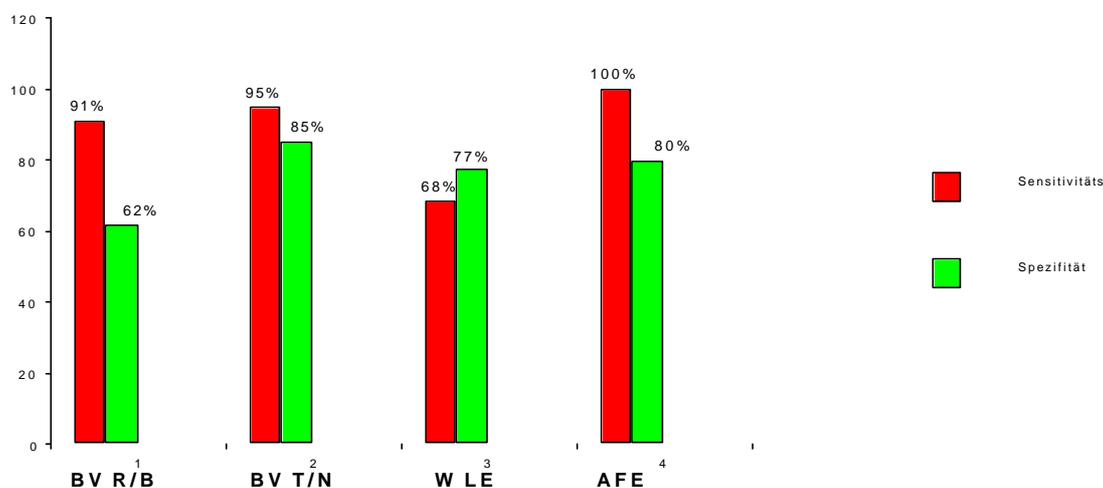


Abb. 15: Vergleich aller diagnostischen Verfahren hinsichtlich Sensitivität und Spezifität

3. Ergebnisse

Die Kombination der Bildverarbeitung (T/N) mit der subjektiven Fluoreszenz-zystoskopie zeigt die größte Spezifität von 91% und die bessere Sensitivität von 95% im Vergleich zu allen anderen Kombinationen (Tabelle 11).

Kombinations-Verfahren	Sensitivität	Spezifität
BV T/N und AFE	95%	91%
BV T/N und WLE	65%	93%
AFE und WLE	68%	89%

Tabelle 11: Kombination aller diagnostischen Verfahren

4 Diskussion

Rund 80% aller Harnblasenkarzinome befinden sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in einem oberflächlichen Stadium (Maier,Flamm,Mack, 2002).

Mit durchschnittlich 60% Tumorrezidiven trotz adäquater initialer Therapie weist die Erkrankung eine hohe Morbidität auf (Soloway, 1978).

Die konventionelle Weißlichtzystoskopie dient der Lokalisation von exophytisch wachsenden Tumoren. Nachteilig an diesem Verfahren ist aber der geringe visuelle Kontrast der Befunde, der insbesondere bei frühen Tumorformen nur eine geringe Sensitivität zur Folge hat. Vor allem flache Läsionen, wie das aggressive Carcinoma in situ entziehen sich häufig der konventionellen Endoskopie und beeinträchtigen damit den therapeutischen Behandlungserfolg (Soloway, 1978).

Zur Optimierung dieses Sachverhaltes werden Photosensibilisatoren oder ihre Vorläufer verwendet (Dougherty et al., 1998).

Die Fluoreszenzdiagnostik mit 5-Aminolävulinsäure wurde hierzu in einer Reihe von klinischen Studien hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit untersucht. In Tabelle 13 sind die bislang vorliegenden Studienergebnisse der Phase-2-Studien (Vergleich Weißlicht gegen AFE) aufgeführt. Der Anteil der durch die Fluoreszenzendoskopie zusätzlich diagnostizierten Tumoren gegenüber der Weißlichtendoskopie betrug im Mittel zwischen 20 und 40 %. Eine Hauptindikation für die Durchführung der Fluoreszenzendoskopie stellt nicht nur das Vorkommen von multifokalen kleinen papillären Tumoren, sondern vor allen Dingen der Einsatz bei Patienten mit high risk-Tumoren dar. Dies konnte in der konsekutiven Erfassung von mehr als 1.000 Fällen in Klinikum Großhadern gezeigt werden. In dieser Serie wurden insgesamt 552 Tumoren detektiert, 34 % davon nur auf Grund ihrer positiven Fluoreszenz. Die Inzidenz der flachen urothelialen Läsionen (Dysplasie, Carcinoma in situ) betrug ca. 25 %, wobei der Hauptanteil unter Weißlicht übersehen wurde. Neben dem Vorkommen der flachen, Weißlicht-endoskopisch nur schwer erkennbaren Läsionen, stellen die hohen Raten an Residualtumoren nach transurethraler Elektroresektion von Harnblasentumoren eine weitere Ursache für tatsächliche und virtuelle Rezidivraten dar und somit eine Indikation zur Durchführung einer Fluoreszenzendoskopie. Dieser Sachverhalt wurde bereits in 2 prospektiven Phase-3-Studien untersucht (Kriegmair 2002, Riedl 2001). Nach Randomisation und transurethraler Resektion unter Weißlicht oder mit

4. Diskussion

5-ALA erfolgte in beiden Studien 2 – 6 Wochen später eine Nachresektion. Als Hauptzielparameter wurde der Anteil der bereits in der Erstresektion tumorfrei resezierten Patienten festgelegt. In beiden Untersuchungen fanden sich signifikante Vorteile zugunsten einer fluoreszenzgestützten transurethralen Resektion gegenüber der konventionellen Resektion unter Weißlicht (Tabelle 12).

Name	Patienten	Res. TU AFE	Res. TU WLE
Kriegmair 2002 p=0,031	101	40,6%	61,5%
Riedel 2001 p=0,005	102	16%	39%

Tabelle 12: Gegenüberstellung der Studien von Kriegmair und Riedel bezüglich der Residualtumoren unter AFE und WLE

Trotz der ermutigenden klinischen Befunde hinsichtlich der Detektion urothelialer Tumoren mit der Fluoreszenzendoskopie bleibt die klinische Feststellung einer hohen Rate falsch-positiver Befunde von 30 – 40 % in den fluoreszenzpositiven Endoskopiearealen. Hierbei handelt es sich um Zystitiden, einfache Urothelhyperplasien, normales Urothel und Plattenepithelmetaplasien.

Die Beurteilung der Protoporphyrin IX-akkumulierenden Zellen im Rahmen der 5-Aminolävulinsäure induzierten Fluoreszenzendoskopie unterliegt der subjektiven Bewertung durch den Operateur. Die Beurteilung der Fluoreszenz beruht auf der qualitativen Aussage „fluoreszenzpositiv“ oder „fluoreszenznegativ“. Erste Untersuchungen der Arbeitsgruppe zur Etablierung eines bildgebenden Verfahrens mit der Möglichkeit der objektiven, quantitativen Bestimmung der PPIX-Fluoreszenz haben gezeigt, dass mit Definition eines Schwellenwertes für die Fluoreszenzintensität eine intraoperative Diskriminierung zwischen benignen und malignen fluoreszierenden Läsionen mit hoher Wahrscheinlichkeit möglich ist (Zaak, 1998).

4. Diskussion

Die Entwicklung dieses Systems beruht auf der Erfahrung, dass häufig schwächer leuchtende fluoreszenzpositive Areale in der endgültigen histologischen Untersuchung einen benignen Befund aufwiesen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war nun, diese ersten Daten im Rahmen einer klinischen Untersuchung zu validieren.

Hierzu wurden zunächst die beiden diagnostischen Verfahren der Weißlichtendoskopie und der 5-Aminolävulinsäure induzierten Fluoreszenzendoskopie hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität ausgewertet. Die Sensitivität der Weißlichtendoskopie (77 %) als auch die Spezifität (68 %) entsprechen den Daten die auch von anderen Arbeitsgruppen bislang publiziert wurden (Abbildung 15, Tabelle 13).

Name	Jahr	Sensitivität AFE	Spezifität AFE	Sensitivität WLE	Spezifität WLE
Kriegmair (1996a)	1996	97%	67%	72,7%	68,5%
Jichlinski	1997	89%	57%	*	*
Filbeck	1999	96%	67%	67%	66%
Koenig	1999	87%	59%	84%	89%
Ehsan	2001	98%	65%		
Dominicis	2001	87%	63%	18%	82%
Zaak	2001	97%	65%		

Tabelle 13: Sensitivität und Spezifität der Fluoreszenzendoskopie (AFE) mit 5-ALA im Vergleich zur Weißlichtendoskopie (WLE). (* Diese Studie untersucht nur unter Weißlicht unauffällige Areale und macht daher für Weißlicht keine Angabe über die Spezifität und Sensitivität)

Die Sensitivität der AFE lag mit 100 % etwas über den im Durchschnitt mit 87 – 97 % erreichten Sensitivitätswerten der übrigen Studien, die Spezifität allerdings war

mit 80 % deutlich über den bislang publizierten Daten von 57 – 67 % (Abb. 15, Tab. 13) gelegen. Dieser Sachverhalt beruht möglicherweise auf dem Zufallsprinzip. Allerdings könnte auch eine subjektive Beeinflussung des Operateurs eine Rolle spielen. Der gleiche Operateur, hat nach der Weißlichtendoskopie auch die Fluoreszenzendoskopie durchgeführt.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Spezifität des Verfahrens zu untersuchen. Wenn ein Operateur von diesem Sachverhalt weiß, besteht grundsätzlich die Möglichkeit eines systematischen Fehlers. Aus diesem Grund ist eine Bewertung der Fluoreszenz-Quantifizierungen dieser Untersuchungsserie nur eingeschränkt möglich. Die Spezifität unter Zuhilfenahme einer Quantifizierung konnte zwar von 80 auf 85 % (Abb.15) angehoben werden, eine Signifikanz für diese Differenz von 5 % war jedoch nicht festzustellen. Hoch signifikant war allerdings eine Diskriminierung zwischen benignen Befunden und malignen Befunden. Die benignen Befunde wiesen einen mittleren Kontrast von 1,3 bis 1,5 auf, während die malignen Befunde einen Kontrast $> 3,5$ (Abb. 11 und 13) zeigten. Dieser Sachverhalt war auch im „Mann-Whitney-U Test“ hoch signifikant.

Zusammenfassend konnte anhand dieser Serie gezeigt werden, dass die Fluoreszenzendoskopie im Vergleich zur Weißlichtendoskopie eine deutlich höhere Sensitivität aufweist. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit erscheint eine Kombination von Bildverarbeitung (T/N) und der subjektiven Fluoreszenzendoskopie sinnvoll, da dies mit einem Anstieg der Spezifität auf insgesamt 91 % vergesellschaftet ist.

Darüber hinaus bildet diese Bestätigung der ersten von der Arbeitsgruppe um Zaak gezeigten fluoreszenzquantifizierten Werte die Grundlage für weitere Untersuchungen mit interessanten Fragestellungen im Rahmen der Fluoreszenzendoskopie.

Eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensität kann möglicherweise weitere Rückschlüsse im Rahmen von kontrollierten Studien hinsichtlich der optimalen Instillationszeit der 5-Aminolävulinsäure, als auch bezüglich der verwendeten Konzentration geben. Bis heute gibt es keine objektiven Daten, die den optimalen Instillationszeitpunkt der 5-Aminolävulinsäure untersucht haben. Die Validierung der Quantifizierung ermöglicht nun ihren Einsatz bei unterschiedlichen

4. Diskussion

Instillationszeiten bei Patienten mit Harnblasentumoren. Darüber hinaus kann hierbei die optimale Konzentration der 5-Aminolävulinsäure evaluiert werden. Dies dürfte hinsichtlich der Kostenreduktion (1,5 g 5-ALA = 60 €) von ökonomischer Bedeutung sein.

5 Zusammenfassung

Die 5-Aminolävulinsäure induzierte Fluoreszenzendoskopie (AFE) ermöglicht im Gegensatz zu den heutigen konventionellen Untersuchungsmethoden eine überlegene bessere diagnostische Erfassung oberflächlicher Tumorherde innerhalb der Harnblase (Kriegmair et al., 96c).

Ziel dieser Arbeit war es die Spezifität mit den objektiven Methoden einer Bildquantifizierung zu bestimmen sowie eine Korrelation mit der Histologie zu erstellen. Zu diesen Zweck wurde eine AFE nach topischer Applikation von 5-ALA im Rahmen der Tumordiagnostik in der Harnblase bei 70 Patienten durchgeführt.

Hierbei konnten mittels der Fluoreszenzzystoskopie ca 50% mehr flache Läsionen und ca. 25% papilläre Tumoren gegenüber der Weißlichtzystoskopie zusätzlich diagnostiziert werden ($p= 0,0001$, Fischer's exact Test). Für die AFE errechnete sich eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 80% gegenüber der Weißlichtzystoskopie mit einer Sensitivität von 68% und einer Spezifität von 77%.

Bei der PPIX-Fluoreszenz Quantifizierung wurde dann mit einem Schwellenwert für den T/N-Kontrast des R/B-Farbratios von 1,43 die Rate der falsch-positiven Befunde um über 25% verringert, womit sich eine Anhebung der Spezifität auf 85% erzielen lies. Die Sensitivität der Fluoreszenzquantifizierung mit 2 falsch negativen Befunden lag bei 95%.

Einen deutlich höheren PPIX-Fluoreszenzkontrast zeigten die malignen Befunde im Mittel mit einem Wert von $>3,5$ gegenüber den benignen Befunde von (1,3 bis 1,5) ($p= 0,0001$ Mann-Whitney-U Test).

Zusammengefaßt konnte in dieser Arbeit die Spezifität der visuellen Fluoreszenzystoskopie von 80% mit einem quantitativen Schwellenwert von 1,43 für die Fluoreszenz auf 85% erhöht werden. Mit einer Kombination der visuellen Beurteilung PPIX-Fluoreszenz und PPIX-Fluoreszenzquantifizierung konnte die Spezifität weiter auf 91% gesteigert werden. Daraus resultiert, daß mit Hilfe einer optimalen Schwelle für die Fluoreszenzquantifizierung die Rate der falsch-positiven Befunde objektiv deutlich reduziert werden kann.

- Jocham, D., Baumgartner, R., Fuchs, N., Lenz, H., Stepp, H., Unsöld, E.: Die Fluoreszenzdiagnose porphyrin-markierter urothelialer Tumoren. *Urologe* 28: (1989) 59
- Kelly, J. F.: Haematoporphyrins in the diagnosis and treatment of carcinoma of the bladder. *Proc.R.Soc.Med.* 68/8: (1975) 527-528
- Kennedy, J. C., Pottier, R. H.: Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J.Photochem.Photobiol.B.* 14/4: (1992) 275-292
- Kennedy, J.C., Pottier, R.H., Pross, D.C.: Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J. Photochem. Photobiol. B.* 6: (1990) 143-148
- Klän, R. , Loy, V., Hiland, H.: Residual tumor discovered in routine second transurethral resection in patients with stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 146: (1991) 316-318
- König, F., McGovern, F.J., Larne, R., Enquist, H., Schomacker, K.T., Deutsch, T.F.: Diagnosis of bladder carcinoma using protoporphyrin IX fluorescence induced by 5-aminolaevulinic acid. *BJU.Int.* 83/1: (1999) 129-135
- Köhrmann, K.U., Woeste, M. Rassweiler, J. Alken, P.: Die transurethrale Nachresektion, notwendig beim oberflächlichen Harnblasen-Carcinom?. *Urologe A* 31 suppl.: (1992) A59
- Köhrmann, KU., Woeste, M., Kappes, J., Rassweiler, J., Alken, P.: Der Wert der transurethralen Nachresektion beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom. *Akt Urol* 25: (1994) 208-213
- Kriegmair, M., Baumgartner, R.: Intravesikuläre Instillation von Delta-Aminolävulinsäure (ALA) – Eine neue Methode zur photodynamischen Diagnostik und Therapie. *Laser-Medizin* 8: (1992) 83
- Kriegmair, M.: Photodynamische Diagnose urothelialer Neoplasien nach intravesikaler Instillation von 5-Aminolävulinsäure. *Urologe A* 33: (1994) 270-275
- Kriegmair, M., Baumgartner, R., Knuechel, R., Steinbach, P., Ehsan, A., Lumper, W., Hofstadter, F., Hofstetter, A.: Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *Urology.* 44/6: (1994a) 836-841
- Kriegmair, M., Baumgartner, R., Riesenberger, R., Jocham, D., Sassy, T., Stocker, S., Lumper, W., Unsöld, E., Hofstetter, A.: Photodynamic diagnosis following topical application of delta- aminolevulinic acid in a rat bladder tumor model. *Investig.Urol.Berl.:* (1994b) 85-87
- Kriegmair, M., Stepp, H., Steinbach, P., Lumper, W., Ehsan, A., Stepp, H. G., Rick, K., Knuchel, R., Baumgartner, R., Hofstetter, A.: Fluorescence cystoscopy following intravesical instillation of 5- aminolevulinic acid: a new procedure with high sensitivity for detection of hardly visible urothelial neoplasias. *Urol.Int.* 4: (1995) 190-196

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. Hofstetter, Direktor der Urologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie des Laserforschungslabors am Klinikum Großhadern danke ich für die Überlassung dieses hochaktuellen Themas und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Dirk Zaak, der nicht nur als hervorragender Betreuer sondern immer auch als Freund mit großem Sach- und Fachverstand zur Seite stand.

Ganz herzlich danke ich an dieser Stelle Herrn Dr. H. Stepp und Herrn Dipl. Biol. J. Pichler, für die ausgezeichnete Unterstützung und fachübergreifende Kooperation bei der Erstellung dieser Arbeit. Ob im freundschaftlichen Gespräch oder in fachlicher Diskussion, sie waren immer dazu bereit, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Allen Mitarbeitern des Laser-Forschungslabors und der Urologischen Klinik danke ich für eine beispielhafte interdisziplinäre Zusammenarbeit, unzählige Ratschläge und Hinweise, ohne die eine so klinisch orientierte Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Frau Maria und meinen Kinder, den Söhnen Arien, Amu und der Tochter Hamima danke ich für unendliche Geduld während der vielen entgangenen gemeinsamen Stunden bei der Fertigstellung dieser Arbeit.



Dr. med. Rahmatullah Alakkozai

Geb. 1962 in Kandahar/ Afghanistan (AFG), verheiratet mit einer Afghanin (Praxismanagerin), 3 Kinder

Urologische Facharztausbildung und Tätigkeit als Urologe Andrologie

Sexualmedizin:

Begann 1992 an der urologischen Klinik und Poliklinik Innenstadt der Ludwig- Maximilians-Universität (LMU) München; nach dem Abschluss des Humanmed. Studiums und der medizinischen Informatik und fast einem Jahr als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Anatomischen Anstalt der LMU.

Beendet im März 2005 in der urolog. Abteilung des Städt. Krankenhauses M-Bogenhausen.

Die chirurgische Pflichtausbildung zum Facharzt für Urologie wurde mit den Schwerpunkten Phlebologie, Plastische Chirurgie und Proktologie in München absolviert. Zusätzlich konnte ich über 1 Jahr Erfahrungen in der Gynäkologie (Uro-Gynäkologie) und 8 Monate in der Inneren Medizin (Nephrologie) in München sammeln.

Promotionen:

1. BPH
2. Polytrauma

Approbation: Erteilt vom Bayerischen Staatsministerium.

Zusatzqualifikationen:

Zusatzbezeichnungen:

Für Phlebologie und Naturheilverfahren.
Angestrebt wird noch Sportmedizin.

Fachkunden:

Für Rettungsdienst, Strahlenschutz,

umfangreiche Laboruntersuchungen, Sonographie, Röntgendiagnostik, ambulante und stationäre Operationen, psychosomatische Grundversorgung. Chemotherapie in der Praxis ist beantragt.

Mitgliedschaft in Fachgesellschaften:

Berufsverband der Deutschen Urologen e.V., Deutsche Gesellschaft für Andrologie, Informationszentrum für Sexualität und Gesundheit (ISG e. V.), European Association of Urology, American Urologic Asso., sowie bei verschiedenen Hilfsorganisationen für den Aufbau von Afghanistan. Zusätzlich Berater des Gesundheitsministeriums in Afghanistan und der 2 afghanischen medizinischen Universitäten (Kabul und Kandahar).

Am 01.04.05 Übernahme die urologische Praxis v. Hr. Dr. Rosenthal in München-Neuperlach

Praxis für Urologie Andrologie Sexualmedizin München-Neuperlach

Peschelanger 11

81735 München

Tel: 089-671161

Fax: 089-6374440

Info@urologie-neuperlach.de