

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. H. Hepp

**Pharmakokinetische, fluoreszenzmikroskopische Studie
zur Gewebeaufnahme und Verteilung von 5-Aminolävulinsäure
aus 5-ALA-Thermogel bei zervikaler intraepithelialer Neoplasie (CIN 1-3)**

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

vorgelegt von

Vaagn Andikyan

aus

Moskau

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Priv. Doz. Dr. med. P. Hillemanns

Mitberichterstatter:

Prof. Dr.A. M. Kellerer

Priv. Doz. Dr. Ch. Zietz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. rer. biol. hum. H. Stepp

Dekan:

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

Tag der mündlichen Prüfung:

27.02.2003

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1.	Zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN)	5
1.1.1.	Symptomatik der CIN	5
1.1.2.	Einteilung der CIN	5
1.1.3.	Natürliches Verhalten der CIN	7
1.1.4.	Erkrankungsbegünstigende Faktoren der CIN	7
1.2.	Diagnose der CIN	9
1.2.1.	Zytologische Diagnostik der CIN	9
1.2.2.	Kolposkopische Diagnostik der CIN	11
1.2.3.	HPV-Diagnostik	12
1.3.	Therapie der CIN	12
2.	Photodynamische Therapie und Diagnostik	14
2.1.	Photodynamische Therapie	14
2.2.	Photodynamische Diagnostik	16
2.3.	Autofluoreszenz	16
2.4.	5-Aminolävulinsäure als Präkursor der Porphyrine bei der PDT und PDD	18
3.	Material und Methoden	22
3.1.	Auswahl der Patientinnen	22
3.2.	5-ALA-Thermogel als Studienpräparat	23
3.3.	Verlauf der Untersuchungen	24
3.4.	Fluoreszenzbildgebung der Portio uteri	24
3.4.1.	Versuchsaufbau	24
3.4.2.	Fluoreszenzbildgebung der Portio uteri	26
3.5.	Semiquantitative, topografische Fluoreszenzmikroskopie und quantitative Fluoreszenzspektrometrie	27
3.5.1.	Versuchsaufbau	27
3.5.2.	Semiquantitative, topografische Fluoreszenzmikroskopie	28
3.5.3.	Quantitative Fluoreszenzspektrometrie	29
3.6.	HPV-DNS-Assay	30

3.7.	Statistische Auswertung _____	30
4.	Ergebnisse _____	31
4.1.	Patientenkollektiv _____	31
4.2.	Fluoreszenzbildgebung der Portio uteri _____	33
4.3.	Semiquantitative topografische Fluoreszenzmikroskopie und quantitative Fluoreszenzspektrometrie _____	34
4.3.1.	Quantitative Fluoreszenzspektrometrie _____	37
4.3.1.1.	Vergleich der Mittelwerte der PPIX-Fluoreszenzintensitäten bei CIN der verschiedenen Grade und bei normalem Plattenepithel _____	37
4.3.1.2.	Einfluss der Applikationsdauer auf die PPIX-Fluoreszenzintensität _____	38
4.3.1.3.	Tumorselektivität der PPIX-Fluoreszenzintensität der CIN und des normalen Plattenepithels _____	40
4.3.1.4.	Einfluss der 5-ALA-Thermogel Konzentration auf die Intensität der PPIX-Fluoreszenz _____	43
4.3.2.	Semiquantitative, topografische Fluoreszenzmikroskopie _____	45
5.	Diskussion _____	47
5.1.	Einfluss der applizierten 5-ALA-Thermogel Konzentration auf die PPIX-Fluoreszenzintensität _____	50
5.2.	PPIX-Fluoreszenzintensität bei CIN und bei normalem Plattenepithel _____	52
5.3.	Applikationsdauer und PPIX-Fluoreszenzintensität _____	52
5.4.	Semiquantitative, topografische Fluoreszenzmikroskopie bei CIN und bei normalem Plattenepithel der Portio uteri _____	54
5.5.	Das 5-ALA-Thermogel als lokal applizierter Photosensibilisator _____	55
6.	Zusammenfassung _____	57
7.	Literaturverzeichnis _____	60
8.	Anhang _____	74
9.	Lebenslauf _____	75

1. Einleitung

Vor 20 Jahren war das Zervixkarzinom bei geschlechtsreifen Frauen ungefähr drei Mal so häufig wie das Korpuskarzinom. Nach wie vor nimmt das Zervixkarzinom den zweiten Platz unter den Krebserkrankungen der Frau (WHO 1990) ein. Dank der Früherkennung, der in Westeuropa viel Aufmerksamkeit gewidmet wird und die in der zytologischen Kontrolle und rechtzeitigen chirurgischen Behandlung besteht, erfolgte ein wesentlicher Rückgang der Zervixkarzinommortalität um ca. 40% [Brenner 1990].

Das Zervixkarzinom entsteht aus einer Präkanzerose – der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN). Im Großen und Ganzen gehen weniger als 20% der intraepithelialen atypischen Veränderungen in ein invasives Wachstum über [Champion 1986, Barron 1970].

1.1. Zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN)

1.1.1. Symptomatik der CIN

Die CIN zeigt in der Regel keine Symptome. Sie wird meistens zufällig während der gynäkologischen Vorsorgeuntersuchungen entdeckt.

Bei 10-15% der Patientinnen sind Kontaktblutungen möglich, die als Folge der mechanischen Reizung der CIN entstehen. Beim Übergang der CIN in fortgeschrittene Karzinome gilt die abnorme Blutung als wichtiges Symptom, das sich manifestiert als:

- Schmier- oder Zwischenblutung
- Klimakterische oder postmenopausale Blutung.

1.1.2. Einteilung der CIN

Die aktuelle Klassifikation der CIN enthält drei Stadien: CIN 1, 2, 3.

Klassifikation der Vorstadien des Zervixkarzinoms	
neue Klassifikation	alte Klassifikation
CIN 1	Leichte Dysplasie
CIN 2	Mittelschwere Dysplasie Atypische Zellen reichen bis in höhere Schichten. Es treten vermehrt Zell- und Kernatypien sowie atypische Mukosaschichten auf.
CIN 3	Schwere Dysplasie/Carcinoma in situ Atypische Veränderungen des gesamten Epithels. Schichtung aufgehoben; es ist ein Karzinom, das die Basalmembran noch nicht durchbrochen hat

Tabelle 1.1. Stadieneinteilung der CIN (WHO).

Die CIN 1 oder leichte Dysplasie ist durch die leichten Atypien im Plattenepithel gekennzeichnet. Die Zellveränderungen befinden sich vorwiegend in den unteren Schichten des Plattenepithels.

Als Zwischenstufe gilt die CIN 2, die als mäßige Dysplasie bezeichnet wird. Bei der CIN 2 nehmen die atypischen Zellveränderungen einen wesentlich breiteren Raum von der Basis bis weit in die mittleren Schichten des Epithels ein.

Die CIN 3 zeigt das Bild der schweren Dysplasie bzw. Carcinoma in situ. Histologisch werden CIN 1, 2, 3 durch zunehmende atypische Epithelproliferationen von gehäuften oder atypischen Mitosen, Dyskeratosen, Kernatypien, Störung der Kern-Plasma-Relation begleitet. Das Carcinoma in situ, bzw. CIN 3 ist durch Hyper- und Parakeratosen, sowie Akanthose (Epithelverbreitung) mit vollständigem Schichtungsverlust, Kernverklumpungen, Zellatypien, Mitosen in sämtlichen Epithellagen und einer intakten Basalmembran ohne Hinweis auf eine Invasion gekennzeichnet. Diese Zellveränderungen ergreifen alle Schichten des Epithels [Fujiwara 1997, Al-Nafussi 1993, Berchuck 1990, Feldman 1984, Averette 1970].

1.1.3. Natürliches Verhalten der CIN

Langfristige Beobachtungsuntersuchungen aus den 50-er und 60-er Jahren zeigten, dass etwa 15-20% der unbehandelten CIN 1, 2 im Zeitraum von 10-20 Jahren in der CIN 3 und etwa 5-10% in ein invasives Zervixkarzinom übergehen [Hillemanns 1997, Barron 1970]. Eine spontane Remission ist bei 30-50% der Patientinnen nachweisbar. Da ein Übergang von CIN 1, CIN 2 in CIN 3 bzw. in ein invasives Zervixkarzinom doch relativ häufig beobachtet wird, müssen sich die Frauen dreimonatlichen gynäkologischen, zytologischen, kolposkopischen Untersuchungen so wie evtl. gezielten Knipsbiopsien der Portio uteri bzw. endozervikaler Kurretage unterziehen.

Befund	Spontanremission	Persistenz	Progression
CIN 1	55%	30%	15%
CIN 2	40%	30%	20-30%
CIN3	10%	20-40%	50-70%

Tabelle1.2. Spontaner Verlauf der CIN ohne Behandlung [Hillemanns 1997].

Ein wesentlicher Nachteil dieser wiederholten Kontrolluntersuchungen besteht allerdings in einer hohen psychischen und moralischen Belastung dieser Patientinnen. Es ist die Tatsache zu berücksichtigen, dass der Übergang der CIN 3 in ein invasives Karzinom etwa 30-50% beträgt. In diesem Fall (bei CIN 3) wird die Durchführung einer operativen Behandlung empfohlen. Eine Ausnahme stellt jedoch die Schwangerschaft dar. Bei CIN 3 in graviditate wird unter 2-monatigen Kontrollen die Geburt abgewartet und erst 2-3 Monate postpartal die Therapie durchgeführt.

1.1.4. Erkrankungsbegünstigende Faktoren der CIN

Epidemiologische Untersuchungen zur Entwicklung von CIN und Zervixkarzinom zeigen eine Reihe von Risikofaktoren auf. Ein wichtiger Faktor, der mit dem Erkrankungsrisiko zusammenhängt, ist eine frühe Sexarche (bis 16 Jahre). Des weiteren

spielt die Zahl der Geschlechtspartner eine bedeutende Rolle [Schiffman 2000, Schiffman 1995].

Andere Risikofaktoren sind eine erste Schwangerschaft in sehr jungem Alter (bis 18 Jahre), ein niedriger sozioökonomischer Status, Immunsuppression, Vitaminmangel und Einnahme von oralen Kontrazeptiva [Irwin 1988, Graham 1984, Romney 1981]. Bekannt ist, dass die HIV-Infektion mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Zervixkarzinoms assoziiert ist [Sun 1997, Wright 1996]. Weitere Risikofaktoren sind Rauchen und HSV-Infektion [Zur Hausen 1991, Vonka 1984].

Eine besondere Rolle für die Karzinogenese an der Zervix uteri spielt das Humane Papillomvirus (HPV) [Schiffman 1993, Gissmann 1980, Zur Hausen 1976, Meisels 1976]. Papillomviren sind Tumoviren mit einem großen Verbreitungsspektrum. Sie sind beim Menschen, Affen, Kaninchen, auch im Rind und anderen Säugetieren anzutreffen [Syverton 1935].

Das menschliche Papillomvirus ist ein DNS-Virus mit knapp 8000 Basenpaaren [Modrow 1997]. Die Wirkungsspezifität ist bei den humanen Papillomviren sehr hoch und infiziert nur den Menschen. Die humanen Papillomviren findet man vorwiegend in Haut und Schleimhäuten, in denen die Infizierung der Epithelzellen erfolgt, was zu charakteristischen Epithelproliferationen führt [Gross 1985, Gross 1982].

Dieser Virustyp gilt als entscheidendes Merkmal für die Lokalisation der infizierten Zellen. Mit Hilfe molekularbiologischer Analysemethoden sind über 100 verschiedene Virustypen beschrieben worden [Modrow 1997, Bernard 1994]. Die Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 68 sind mit der CIN assoziiert [Gross 1997]. Die Typen 6 und 11 verursachen mit großer Wahrscheinlichkeit benigne Veränderungen. Die durch die Typen 16 und 18 verursachten Infektionen stellen ein hohes Risiko für die Entwicklung der CIN und des Zervixkarzinoms dar [Lorincz 1992].

Bei klinischen Untersuchungen wurde eine Prävalenz von HPV bei CIN 2, CIN 3 von 93% [Hillemanns 1999 a] und bei invasiven Zervixkarzinomen von 99,7% festgestellt [Walboomers 1999]. Die Prävalenz beträgt bei gesunden Frauen etwa 10-20% [Hillemanns 1997].

Typ des Humanen Papillomvirus			
Erkrankung	16,18	31, 33, 35	6, 11
Cervix –Ca	85%	5%	0%
CIN 2, 3	75%	15%	2%
CIN 1	20%	20%	20%

Tabelle 1.3. Prozentuale Häufigkeit des Nachweises von bestimmten HPV-Typen bei zervikaler intraepithelialer Neoplasie und invasivem Zervixkarzinom [Hillemanns 1997].

1.2. Diagnose der CIN

Die verbreitetsten Methoden der CIN- und Zervixkarzinomdiagnostik sind die Zytologie und die Kolposkopie mit der Essigprobe und Jodprobe. Diese Methoden gehören zum Krebsfrüherkennungsprogramm.

Mit den frühzeitigen, ab dem 20. Lebensjahr beginnenden Vorsorgeuntersuchungen sind ca. 80-90% der Veränderungen im Stadium der Präkanzerose (CIN 2-3) und des Mikrokarzinoms erfassbar, d. h. im Zustand einer optimalen Heilbarkeit [Schmidt-Matthiesen 1995, Maaßen 1991].

1.2.1. Zytologische Diagnostik der CIN

Zellabstriche werden von der Portiooberfläche und vom Zervikalkanal getrennt entnommen und nach Fixierung und Färbung mikroskopisch beurteilt. Die Feststellung der zytologischen Befunde basiert auf dem bewährten Schema von Papanicolaou, das modifiziert wurde und als sogenanntes Münchner Schema im heutigen deutschen Sprachraum bekannt ist.

Gruppe	Zellbild	Vorgehen, Therapie
I	Normales Zellbild, dem Alter entsprechend, einschließlich leichter degenerativer Veränderungen sowie bakterieller Zytolyse	Kontrolle in einem Jahr
II	Deutliche entzündliche Veränderungen an Zellen des Platten- und zervikalen Zylinderepithels, unreife metaplastische Zellen, stärkere degenerative Zellveränderungen, Para- und Hyperkeratosezellen. Normale Endometriumzellen, auch nach der Menopause. Ferner spezielle Zellbilder wie folliculärer Zervizitis, Zellveränderungen bei IUP, Zeichen einer HPV-Infektion ohne wesentliche Kernveränderungen, Zeichen einer Herpes- oder Zytomegalievirusinfektion	Entzündungsbehandlung oder Aufhellung durch Östrogene. Zytologische Kontrolle, Zeitabstand nach klinischem Bild
III D	Zellen einer Dysplasie leichten bis mäßigen Grades (CIN 1 und CIN 2). HPV-Infektionen sollten besonders erwähnt werden	Kolposkopisch-zytologische Kontrolle in 3 Monaten.
III	Unklarer Befund: schwere entzündliche degenerative oder iatrogene Zellveränderungen, die eine sichere Beurteilung zwischen gut- und bösartig nicht zulassen. Auffällige Zellen eines Drüsenepithels, deren Herkunft aus einem Karzinom nicht sicher auszuschließen ist, möglichst mit Hinweis, ob die Zellen endometrialen oder extrauterinen Ursprungs sind	Je nach klinischem und kolposkopischem Befund kurzfristige zytologische Kontrolle oder histologische Klärung, z. B. Biopsie, Abschabung und Kürettage oder Konisation
IV a	Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ (CIN 3). (Zeichen einer HPV-Infektion sollten besonders erwähnt werden)	Histologische Klärung unter kolposkopischer Kontrolle, z. B. Konisation und Kürettage, gezielte Biopsie und Kürettage oder Portioabschabung, Zervixkürettage. Bei histologischer Bestätigung von CIN 3 Konisation oder Hysterektomie
IV b	Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ (CIN 3). Zellen eines invasiven Karzinoms nicht auszuschließen	wie IV a
V	Zellen eines malignen Tumors, Zellen eines Plattenepithelkarzinoms, Zellen eines Adenokarzinoms, möglichst mit Hinweis, ob endometrialen oder endozervikalen Ursprungs. Zellen sonstiger maligner Geschwülste	Histologische Klärung unter kolposkopischer Kontrolle, z. B. gezielte Biopsie. Therapie in Abhängigkeit vom Stadium

Tabelle 1.4. Klassifizierung des Zellbildes nach dem sogenannten Münchener Schema II [Maaßen 1991], modifiziert 1997.

Wie großen Studien nachweisen, schwankt die Sensitivität der Pap-Abstriche von 50-90% und ihre Spezifität von 80-90% [Fahey 1995, Soost 1991]. Die Hauptfaktoren, welche die falsch-negativen Ergebnisse hervorrufen, sind Fehler bei den Abstrichabnahmen und bei deren Bewertungen [Koss 1989].

Wenn der Pap-Test eine CIN oder ein invasives Karzinom aufzeigt, ist in dem gegebenen Fall die Kolposkopie notwendig.

1.2.2. Kolposkopische Diagnostik der CIN

Bei der Kolposkopie wird die Portiooberfläche mit einer Lupenoptik untersucht. Insbesondere bei der Differentialdiagnostik nach auffälligem zytologischen Befund und bei der Auswahl des geeigneten Operationsverfahrens hat die Kolposkopie einen hohen Stellenwert. Sie ermöglicht die Bestimmung der Ausdehnung des suspekten Areals bei Einsehbarkeit der Plattenepithel-Zylinderepithel-Grenze. Bei dieser Methode ist vorteilhaft, dass die Knipsbiopsien unter Sicht exakt gesteuert werden können. Eine diagnostische Treffsicherheit von etwa 90% wird hier erreicht. Dabei hat die Kolposkopie eine hohe Sensitivität, etwa 80-90%. Allerdings bleibt ihre Spezifität relativ niedrig bei etwa 50-60% [Mitchell 1994, Reid 1990, Schneider 1988].

Den kolposkopischen Befund ordnet man nach folgender Tabelle 1.5 ein. Grad 0 bedeutet einen normalen kolposkopischen Befund ohne suspekte Veränderungen in der Essigsäurereaktion. Einem abnormen kolposkopischen Befund mit geringen bzw. ausgeprägten Veränderungen an der Zervix entsprechen Grad1 und Grad 2.

Kolposkopischer Befund	Graduierung	CIN
<i>Normale kolposkopische Befunde</i>	Grad 0	
Originäres Plattenepithel		
Ektopie (Zylinderepithel)		
Normale Transformation		
<i>Abnorme kolposkopische Befunde</i>	Grad 1	HPV/CIN 0 oder CIN 1
Geringe Veränderungen		
Abnorme Transformation		
Feines Mosaik		
Feine Punktierung		
Feine Leukoplakie		
Erosion		

<i>Ausgeprägte Veränderungen</i>	Grad 2	CIN 2-3
Abnorme Transformation		
Grobes Mosaik		
Grobe Punktierung		
Ausgeprägte Leukoplakie		
Irreguläre Gefäßzeichnung		
Ulkus		

Tabelle 1.5. Kolposkopienomenklatur [europäische Terminologie, 1989].

Es ist zu betonen, dass die erfolgreichen kolposkopischen Ergebnisse mit den Erfahrungen des Kolposkopisten zusammenhängen [Hillemanns 1997].

1.2.3. HPV-Diagnostik

Trotz des rasanten Fortschritts in der HPV-Forschung und HPV-Typisierung ist die Wertigkeit des HPV-DNS Nachweises als diagnostische Methode nicht abschließend geklärt.

Aufgrund der hohen Sensitivität des HPV-DNS-Assays könnte dieses Verfahren eine große Bedeutung für das Screening des Zervixkarzinoms erlangen, bisher jedoch kommt es nur zu einer geringen Implementation dieser Methode [Hillemanns 1999, Cuzick 1995].

1.3. Therapie der CIN

Die Behandlung der zervikalen intraepithelialen Neoplasie reicht vom beobachtenden Abwarten bis zur Hysterektomie. Einfluss auf die Wahl der Methode haben Schweregrad und Ausdehnung der CIN an der Portio uteri, aber auch die Lebenssituation der Patientin bezüglich der Familienplanung sowie zusätzliche Beschwerden, z. B. Blutungsstörungen oder Genitalsenkung. Generell ist eine ablativ Methode einem lokal destruierenden Verfahren vorzuziehen, da höchstmögliche Sicherheit letztendlich nur in der histologischen Aufarbeitung des Konus zu erzielen ist.

Folgende Voraussetzungen gelten für lokal destruierende Methoden:

- Die Läsion sollte sicher identifiziert sein, d.h. Übereinstimmung zwischen Zytologie, Kolposkopie und gezielt entnommenen Knipsbiopsien.
- Die Läsion sollte ektozervikal liegen, d.h. kolposkopisch sichtbar und die endozervikale Curettage negativ sein.
- Eine gute Compliance in der Nachsorge sollte gewährleistet sein.

Exzisionsmethoden	Destruierende Methoden
Messerkonisation	CO ₂ -Laservaporisation
Hochfrequenzschlingenexzision	Kryotherapie
CO ₂ -Laserkonisation	Kauterisation/
Hysterektomie	Thermokoagulation n. Semm
Lokale Exzision	

Tabelle 1.6. Therapiemodalitäten bei CIN

Die in Tabelle 1 aufgeführten destruierenden und ablativen Methoden weisen in großen Studien durchwegs gute Therapieerfolge auf, die in Sammelstatistiken bei 85-95% liegen [Jones 1995]. Zurückhaltung sollte bei großen ektozervikalen CIN-Läsionen mit der Kryotherapie geübt werden, hier erweist sich die Laservaporisation neben der Schlingenexzision und der Messerkonisation als deutlich überlegen [Wright 1994]. Die gebräuchlichsten Therapieverfahren und ihre Komplikationen sind in Tabelle 2 gegenübergestellt [Hillemanns 1999 c].

	Messerkonisation	HF-Schlingenexzision	Lasertherapie	Kryotherapie
Zervixkarzinom nicht entdeckt	selten	selten	häufiger	häufiger
Komplikationen:				
• Blutung	9%	3%	1%	1%
• Stenose	1,7%	1%	1%	1%
• Fluor	mäßig	gering	gering	20%
• Zervixinsuffizienz	+	+/-	+/-	+/-
Ambulant	Alle Eingriffe sind ambulant durchführbar			
Zeitaufwand	30 min	10 min	15-20 min	15 min
Kosten	+	++	+++	+

Tabelle 1.7. Vor- und Nachteile der verschiedenen Therapieformen [Hillemanns 1999c].

2. Photodynamische Therapie und Diagnostik

Die Photodynamische Therapie unterscheidet sich von der Photodynamischen Diagnostik in erster Linie nur in der Zielsetzung. Während in der PDD nur die Detektion des veränderten Gewebes von Interesse ist, steht bei der PDT die Zerstörung des veränderten Gewebes im Vordergrund. Das Prinzip der Wirkungsweise ist jedoch dasselbe. Die meisten im Kapitel Photodynamische Therapie angesprochenen Punkte treffen somit auch für die PDD zu. Die wesentlichen Unterschiede werden kurz im Kapitel Photodynamische Diagnostik angeführt.

2.1. Photodynamische Therapie

Die PDT ist besonders bei epithelialen Neoplasien von großer Bedeutung. Das Prinzip der PDT besteht in der Applikation eines Photosensibilisators, der von Licht mit einer spezifischen Wellenlänge angeregt wird und zusammen mit Sauerstoff zytotoxische Stoffe entfaltet. Der PDT-Prozess ist nur dann möglich, wenn alle drei Faktoren vorhanden sind und ihre Wirkungen ausüben. Dazu gehören:

- sensibilisierender Farbstoff (Photosensibilisator)
- Licht
- Sauerstoff

Wenn einer dieser Faktoren fehlt, findet keine Reaktion statt.

Der Prozess verläuft folgenderweise: als Photosensibilisator werden z.B. Porphyrine und deren Derivate verwendet, die im neoplastischen Gewebe bzw. in Gefäßen im Bereich neoplastischer Gewebe akkumulieren und durch Licht aktiviert werden. Im weiteren wird der Photosensibilisator durch die Absorption von Photonen aus seinem Grundzustand in einen höheren energetischen Zustand gehoben. Aus diesem angeregten Zustand überträgt sich freiwerdende Energie auf den Sauerstoff, wodurch die Bildung einer hochreaktiven Sauerstoffspezies wie dem äußerst zytotoxischen Singulett-Sauerstoff bewirkt wird. Neben Singulett-Sauerstoff können Sauerstoffradikale z. B. Superoxid- und Hydroxylradikale gebildet werden, die zum zytotoxischen Effekt beitragen [Goff 1992, Henderson 1992, Kanofsky 1990, Henderson 1989]. Diese Reaktion bezeichnet man als Typ II. Bei einer anderen Reaktion, als Typ I bezeichnet,

reagiert der angeregte Photosensibilisator direkt mit biologischen Substraten [Takemura 1994, Lin 1991, MacRobert 1989].

In biologischen Systemen auf molekularer Ebene sind Aminosäuren, Lipide und Nucleinsäuren Ziele der zytotoxischen Reaktionen. Die Aminosäuren Methionin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Cystein werden als freie Aminosäuren bezeichnet und in Peptiden stark geschädigt [Bottiroli 1992, Riccheli 1991, Riccheli 1990, Boegheim 1988, Kessel 1986]. Wenn sich diese Aminosäuren im aktiven Zentrum eines Enzyms befinden, können Konformationsänderungen und Enzyminaktivierung die Folge sein [Schulok 1990, Moan 1989, Bonnet 1988, Torinuki 1980]. Was die Nucleinsäuren anbetrifft, ist nur Guanin für die Photosensibilisierung empfindlich [Michaeli 1994, Yu 1993]. Im DNS Molekül führt dies zu Punktmutationen, Brüchen im DNS Strang und zu Deletionen [Noodt 1993]. Photooxidation von ungesättigten Fettsäuren, z.B. in Membransystemen und im Cholesterin, führt zu Veränderungen der Membranpermeabilität [Moan 1992]. Vaskulär kommt es zu einer Permeabilitätssteigerung und Stase mit konsekutiver Tumorischämie. Die weitere Entwicklung führt zu selektiver Nekrose des neoplastischen Gewebes [Potter 1987, Girotti 1983].

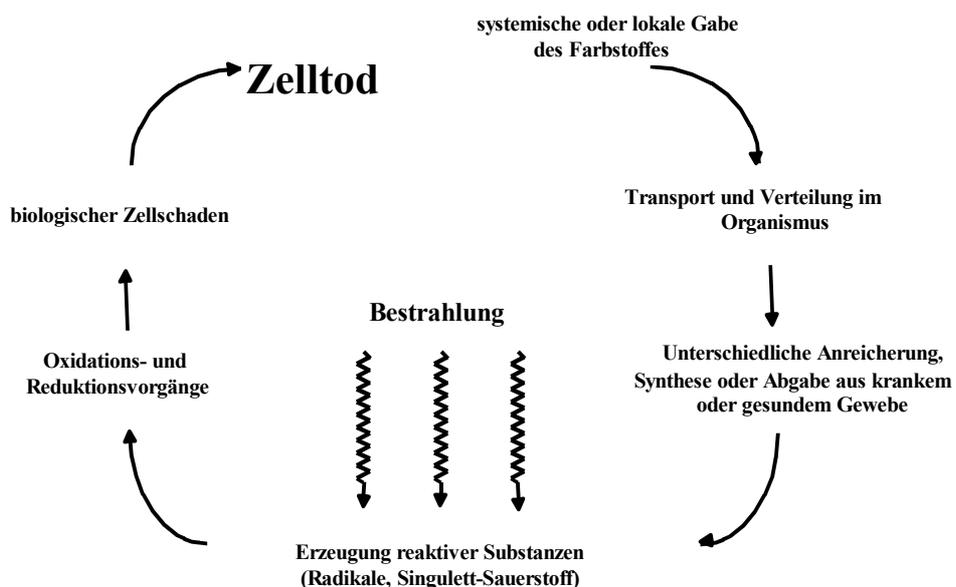


Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf der Photodynamischen Therapie [Szeimies 1994 b].

2.2. Photodynamische Diagnostik

In der Photodynamischen Diagnostik (PDD) werden fluoreszierende Farbstoffe im Gewebe durch Licht mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt und sichtbar gemacht. Das remittierte Fluoreszenzlicht wird der Analyse unterworfen. Aufgrund dieses Prozesses sollen insbesondere abnormale Gewebeveränderungen wie maligne Tumoren deutlicher sichtbar werden, als bei der normalen visuellen Beobachtung. Zu diesem Zweck kann man sich die tumorselektive Anreicherung von Photosensibilisatoren zu Nutze machen.

Der Unterschied zwischen PDT und PDD ist, dass Sauerstoff im zweiten Fall kein erforderlicher Faktor ist, da eine Zerstörung des malignen Gewebes nicht Ziel der Diagnostik ist. Bei der PDD wird nur eine Detektion der veränderten Areale angestrebt. In der PDD wie in der PDT sollte ein Photosensibilisator eine chemisch definierte Substanz sein. Außerdem sollte dieser Photosensibilisator keine toxische Wirkung ohne Bestrahlung mit Licht aufweisen, sondern nur selektiv von dem zu behandelnden Gewebe aufgenommen werden und eine kurze Verweildauer im Körper besitzen. Eine starke Absorption im roten Wellenlängenbereich ist für die PDD nicht notwendig, da im Gegensatz zur Therapie in der Diagnostik keine wesentliche Eindringtiefe des Lichtes benötigt wird. Bei der PDD kann unter Umständen eine Photosensibilisierung, d.h. ein therapeutischer Effekt unerwünscht sein. Wünschenswert ist eine hohe Stabilität (kein Ausbleichen) des Photosensibilisators, dabei Fluoreszenzsausbeute in einem Wellenlängenbereich, der nicht von unspezifischen Fluoreszenzen (Autofluoreszenz) überlagert ist.

2.3. Autofluoreszenz

Neben der Fluoreszenz des verabreichten Photosensibilisators, dessen tumorlokalisierende Eigenschaften zu einem selektiven Fluoreszenznachweis führen sollen, existieren einige endogene Substanzen, die zur Fluoreszenz anregbar sind. Bestimmte Bedingungen und zwar die gewählten Anregungs- und Detektionswellenlängenbereiche, führen im Regelfall zu einer Überlagerung der

Fluoreszenz von endogenen Substanzen (Autofluoreszenz) und exogenem Fluorochrom. Im Fall einer spektralen Auflösung der Fluoreszenz können die jeweiligen Anteile relativ einfach diskriminiert werden. Wird jedoch lediglich die Gesamtfluoreszenzintensität innerhalb eines breiten Wellenlängenbandes erfasst, wie dies zunächst bei der bildgebenden Form der Fluoreszenzdetektion der Fall ist, sind der endogene und exogene Anteil nicht zu unterscheiden. Der endogene Anteil ist als Untergrund zu bewerten, der sich insbesondere dann störend bemerkbar macht, wenn er innerhalb des untersuchten Bereichs in seiner Intensität variiert.

In der Literatur wird eine Vielzahl verschiedener Fluorophore als Quellen für die Autofluoreszenz genannt. Darunter sind: Lipofuszin, Kollagen, Elastin, NADH, oxidierte Flavine [Vo-Dinh 1995, Schomaker 1992, Anderson-Engels 1991, Benson 1979]. Jedes dieser Fluorophore besitzt ein anderes Anregungs- und Emissionsspektrum. (Tabelle 2.1.)

Substanz	Funktion	Anregung (nm)	Emission (nm)
Lipofuszin	gealterte Zellen	340-395	540-640
Kollagen	Bindegewebe	450	530
Elastin	Bindegewebe	410, 500	500, 520
NADH	Atmungskette	340	450
oxidierte Flavine	Atmungskette	450	515

Tabelle 2.1. Fluorophore, die im betrachteten Wellenlängenbereich einen Beitrag zur Autofluoreszenz liefern [Benson 1979, Campbell 1984, Lakowicz 1985, Richards-Kortum 1990].

Eine Menge anderen Faktoren wie Blutfluß, Absorption durch Hämoglobin, Gewebestruktur und Streuung des anregenden Lichts durch das Gewebe sind fähig, auf den Prozess der Autofluoreszenz zu wirken [Vo-Dinh 1995, Schomaker 1992].

In mehreren Studien wurde versucht, mit Hilfe der Autofluoreszenz neoplastische Veränderungen von normalem Gewebe zu diskriminieren. Die Studien weisen darauf hin, dass verschiedene Tumorerkrankungen im Vergleich zum umliegenden gesunden

Gewebe eine geringere Autofluoreszenz zeigen [Zonios 1996, Vo-Dinh 1995, Ramanujam 1994, Schomaker 1992, Hung 1991].

Als Ursache für die geringere Autofluoreszenz dysplastischer Veränderungen wird unter anderem die Verdickung des Epithels genannt. Bevor es zur Anregung der Bindegewebsfluoreszenz kommt, wird das Anregungslicht durch das schwächer fluoreszierende Epithel abgeschwächt. An Stellen mit verdicktem Epithel ist diese Abschwächung größer und auch das emittierte Fluoreszenzlicht wird stärker gedämpft. Insgesamt kommt es also zu einer Verringerung der beobachtbaren Autofluoreszenzintensität.

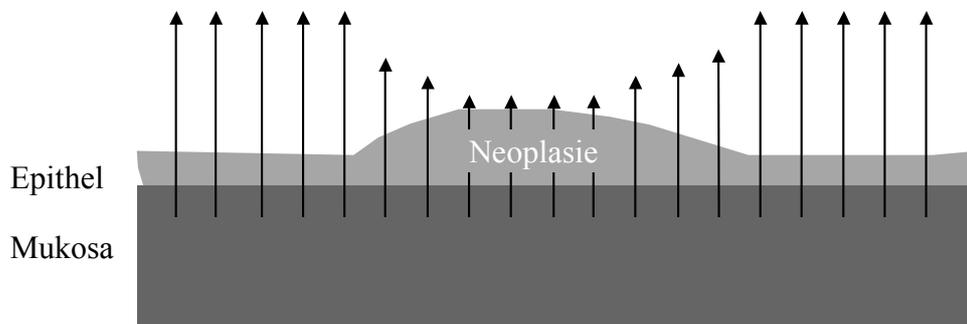


Abbildung 2.2: Abschwächung der Autofluoreszenz durch verdicktes Epithel [Baumgartner 1999].

2.4. 5-Aminolävulinsäure als Präkursor der Porphyrine bei der PDT und PDD

5-Aminolävulinsäure ist ein körpereigenes Substrat der Porphyrinbiosynthese und als Aminosäure selbst nicht fluoreszierend.

Ausgehend von Succinyl-CoA, einem Zwischenprodukt des Citratcyklus, und Glycin, der einfachsten Aminosäure, entsteht im Mitochondrium 5-ALA, welches das erste Syntheseprodukt der Häm-Biosynthese ist. Dieser Schritt wird durch die 5-Aminolävulinatsynthase (ALA-Synthase) katalysiert und ist geschwindigkeitsbestimmend.

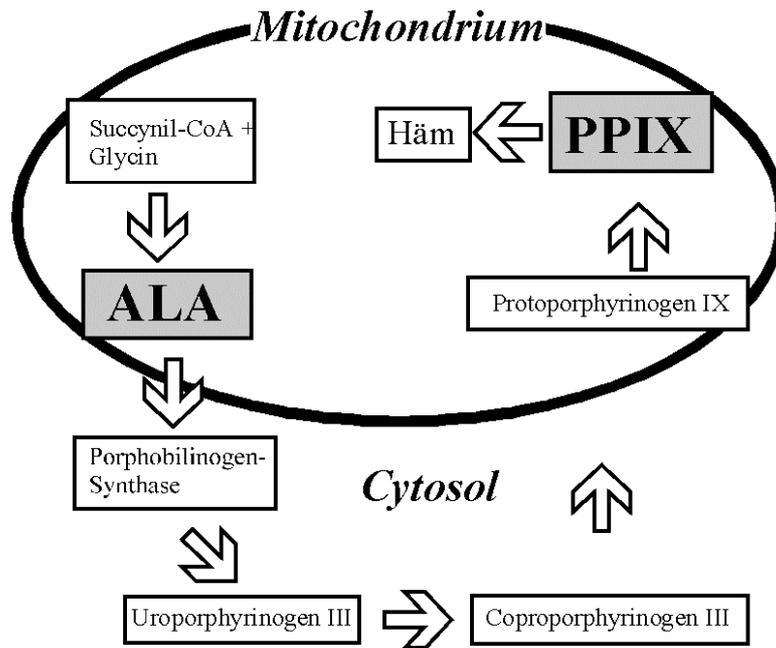


Abbildung 2.3: Häm-Biosynthese

Malignome setzen mehr oder minder selektiv exogen applizierte 5-ALA in fluoreszierende Porphyrine, v.a. Protoporphyrin IX um [Kennedy 1992, Rebeiz 1992]. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass sich die Enzymaktivitäten der in der Häm-Biosynthese beteiligten Enzyme für Tumorzellen und gesunde Zellen unterscheiden. Eine erhöhte Aktivität der Enzyme 5-Aminolävulinat-Dehydratase, Porphobilinogen-Desaminase und Uroporphyrinogen-Decarboxylase wurde im Tumorgewebe gezeigt [Navone 1990].

Protoporphyrin IX ist ein Intermediärprodukt der Hämbiosynthese, dessen Chelatierung mit Eisen in der Häm-Biosynthese den Blutfarbstoff Häm ergibt [Batlle 1993, Stryer 1991].

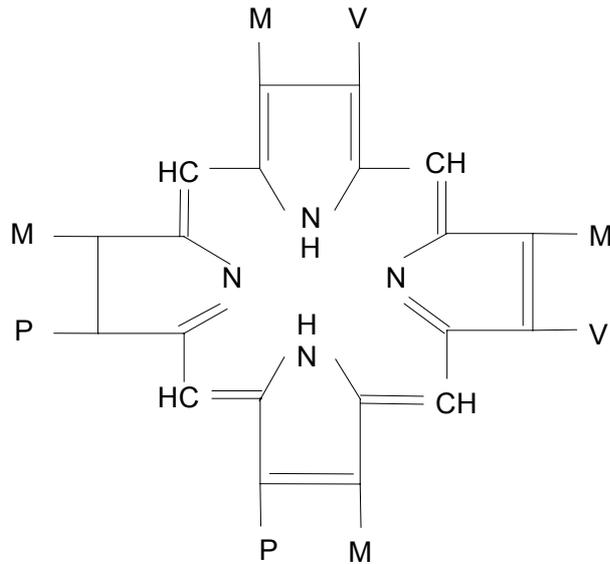


Abbildung 2.4: Strukturformel von Protoporphyrin IX (P=Propionylethyl-, M=Methylethyl-, V=Vinylethyl-Gruppen).

Die chemische Struktur von PPIX bedingt eine intensive Rotfluoreszenz mit Emissionmaxima bei 635 und 704 nm mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 400 nm [Weingandt 1995].

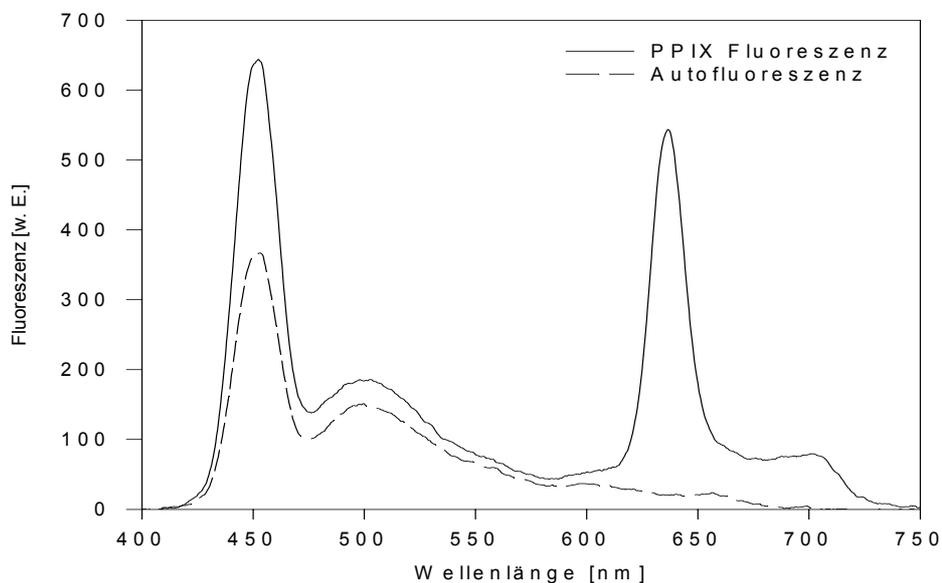


Abbildung 2.5: Fluoreszenzspektren der Portio uteri mit und ohne vorherige 5-ALA Applikation.

Die bisher verwendeten Substanzen wie Photofrin II und andere Photosensibilisatoren wurden intravenös verabreicht und sind durch eine mäßige Selektivität in Karzinomen

gekennzeichnet [Fukuda 1993, Dougherty 1987]. Darüber hinaus induzierten sie eine bis zu einigen Wochen andauernde Photosensibilisierung der Patienten [Batlle 1993, Lin 1991].

Heutzutage wird vorwiegend 5-ALA bei der PDT und der PDD verwendet [Hillemanns 1999 b, Charlesworth 1993]. Als Vorteile von 5-ALA gegenüber anderen Photosensibilisatoren sind folgende zu betonen. Das ist die mögliche topische Applikation mit der Vermeidung einer systemischen Photosensibilisierung, die selektive Anreicherung 5-ALA induzierter Porphyrine im neoplastischen Gewebe, die schnelle Pharmakokinetik der applizierten Substanzen auch in großer Konzentration sowie keine verstärkte phototoxische Schädigung von gesundem Gewebe [Riesenberg 1996, Yang 1993, Pandey 1991]. Die mehrfache Wiederholung der Therapie kann die chirurgischen Verfahren in manchen Fällen ersetzen [Monk 1997].

3. Material und Methoden

Diese Studie entspricht allen in der Deklaration von Helsinki dargelegten Regeln. Es ist zu betonen, dass dieses Studienprotokoll von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München die Genehmigung erhalten hat.

3.1. Auswahl der Patientinnen

Nach ausführlicher Aufklärung über diese Studie wurde von allen Patientinnen eine Einverständniserklärung unterschrieben.

Einschlusskriterien waren:

- histologisch nachgewiesene CIN 1 bis CIN 3
- Kolposkopie: Transformationszone vollständig einsehbar
- Zytologie: Pap-Resultate vereinbar mit CIN 1-3 (Pap III D bis IV b)
- Verwendung einer zuverlässigen Verhütungsmethode (Verhütungsmittel in oraler, injizierter oder implantierter Form) falls die Patientin vor der Menopause steht, ihre Postmenopause noch keine 2 Jahre her ist oder sie nicht operativ sterilisiert ist.
- unterzeichnete Einverständniserklärung

Als Ausschlusskriterium für die Studie wurden die folgenden Kausalitäten angewandt:

- nicht volljährig
- Entfernung aller CIN 1-3 Läsionen durch Screening Biopsie (nachgewiesen durch entsprechende Kolpophotographien)
- endozervikale Dysplasie in endozervikaler Kürretage oder endozervikaler Zytobrush: zervikales Adenokarzinoma in situ, invasives Karzinom oder endozervikale Dysplasie
- Schwangerschaft oder Laktation
- positiver Urin-Schwangerschaftstest bei der Screeninguntersuchung (Test notwendig bei nicht sterilisierten und prä- und perimenopausalen Patientinnen)
- toxisches Schock-Syndrom in der Anamnese
- bekannte Überempfindlichkeit auf 5-ALA

- Entzündungen in Gebärmutter oder Vagina mit klinischen Symptomen
- Adhäsion zwischen Zervix und Vagina
- Geburt innerhalb von zehn Wochen vor Studieneintritt oder Fehlgeburt innerhalb von sechs Wochen vor Studieneintritt
- Verwendung eines Intrauterinpessars der Patientin im gebärfähigen Alter, die kein anderes Verhütungsmittel nimmt bzw. nehmen kann
- klinisch bedeutsame abnorme Laborbefunde in Routineblutabnahme:
 - Transaminasen ≥ 2 fache normale Obergrenze
 - Alkalische Phosphatase ≥ 2 fache normale Obergrenze
 - Bilirubin, gesamt $\geq 2,0$ mg/100 ml
 - Kreatinin $\geq 2,0$ mg/100 ml
 - Glukose ≥ 180 mg/100 ml

Insgesamt 27 Patientinnen haben an dieser klinischen Studien mit verschiedenen Graden der zervikalen intraepithelialen Neoplasie teilgenommen.

3.2. 5-ALA-Thermogel als Studienpräparat

Hierbei geht es um eine Lösung von 5-Aminolävulinsäure und 0,19 g/ml Pluronic F 127 in Wasser. Dieses Präparat ist ein Thermogel. Es geht bei mehr als $+31^{\circ}$ C in einen gelartigen Zustand über. Die Lösung wird unter Zuhilfenahme einer Zervixkappe aufgebracht. Durch die Gewebetemperatur erfolgt dann die Umwandlung zum Gel. Wir gehen davon aus, dass das Gel zu einer besseren Aufrechterhaltung einer hohen lokalen ALA-Konzentration als die Auftragung einer flüssigen Präparation führt, da letztere sich, selbst unter Verwendung einer Zervixkappe zur verbesserten Retention der Lösung an der Zervix, nur begrenzt am Applikationsort halten lässt. Darüber hinaus haben Voruntersuchungen (Tierexperimente mit Mausmagenmukosa) gezeigt, dass die ALA-Aufnahme aus dem Gel auch dann höher ist, wenn die zu vergleichende flüssige Präparation optimal am Applikationsort fixiert ist (verschlossener Magenein- und -ausgang). Es gibt also noch einen pharmakokinetischen Vorteil des Gels über die fixierte Lokalisation der ALA hinaus. Beide Bestandteile des ALA-Thermogels, 5-ALA und Pluronic F127, sind in Hinsicht auf lokale Anwendung toxikologisch geprüft und für unbedenklich befunden worden. Die verwendeten Konzentrationen des 5-ALA-

Thermogels waren 4%, 10% und 20%. Das Gel wurde mittels einer 10 ml Spritze an der Zervix appliziert.

3.3. Verlauf der Untersuchungen

Bei den Patientinnen wurde 5-ALA-Thermogel mit einer Zervixkappe lokal an der Portio appliziert. Die Expositionszeit betrug 0,5 bis 12 Stunden. Weiter fanden intraoperative Fluoreszenzbildgebung der Portio uteri und therapeutische Schlingenkonisation oder Entnahme einer Knipsbiopsie statt. Die erhaltenen Gewebe wurden mit Hilfe histologischer Routineuntersuchungen bearbeitet und ein Teil davon wurde in tiefgefrorenem Zustand (-80°C) für die Durchführung der semiquantitativen, topografischen Fluoreszenzmikroskopie und der quantitativen Fluoreszenzspektrometrie aufbewahrt. Aus diesen Geweben wurden die histologischen Präparate vorbereitet. Der Prozess der Vorbereitung verlief in abgedunkelten Räumen. 7µm Schnitte wurden für die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin verwendet, 15µm Schnitte für die Durchführung der semiquantitativen, topografischen Fluoreszenzmikroskopie und der quantitativen Fluoreszenzspektrometrie.

3.4. Fluoreszenzbildgebung der Portio uteri

3.4.1. Versuchsaufbau

Der schematische Aufbau zur Durchführung der Fluoreszenzbildgebung der Portio uteri ist in Abbildung 3.1 gezeigt.

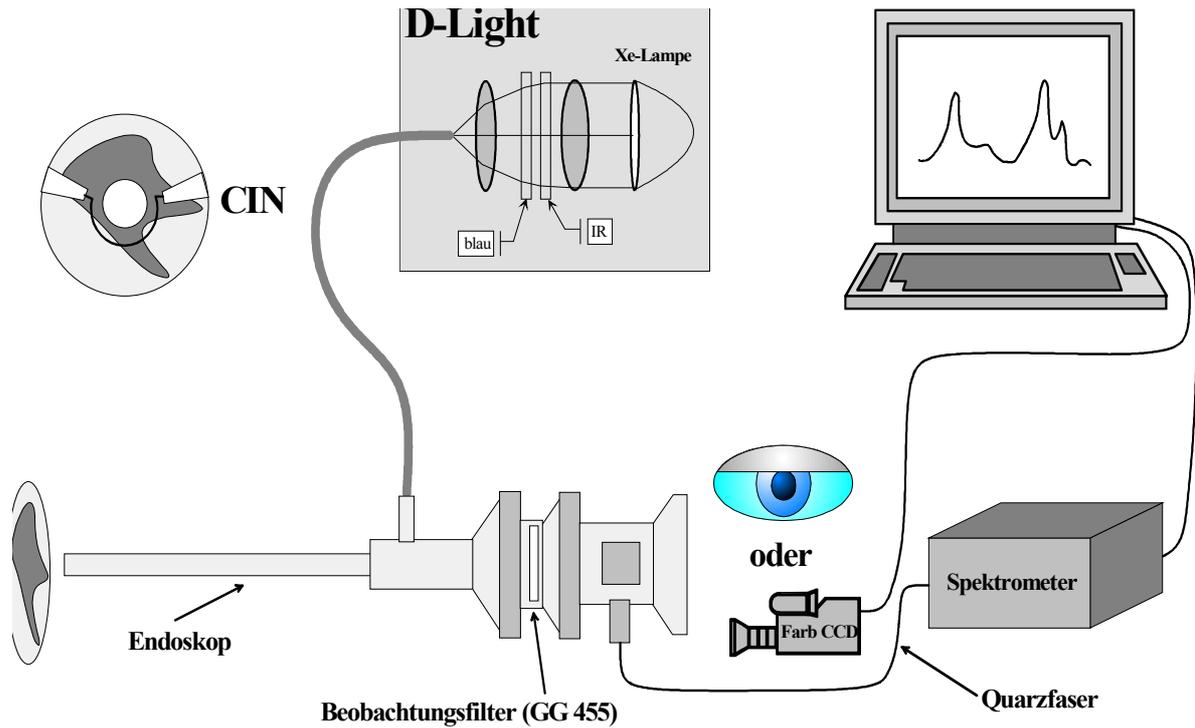


Abbildung 3.1: Schema des Aufbaus zur Durchführung der Fluoreszenzbildgebung.

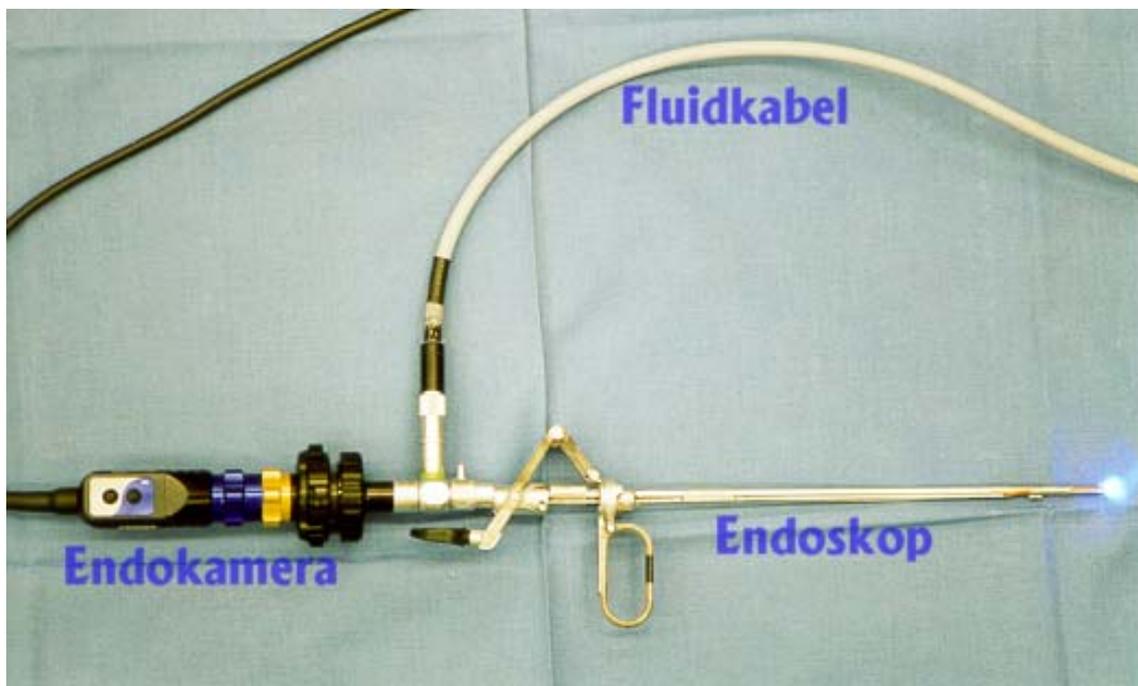


Abbildung 3.2: Endoskop mit angekoppelter Endokamera für die Fluoreszenzbildgebung.

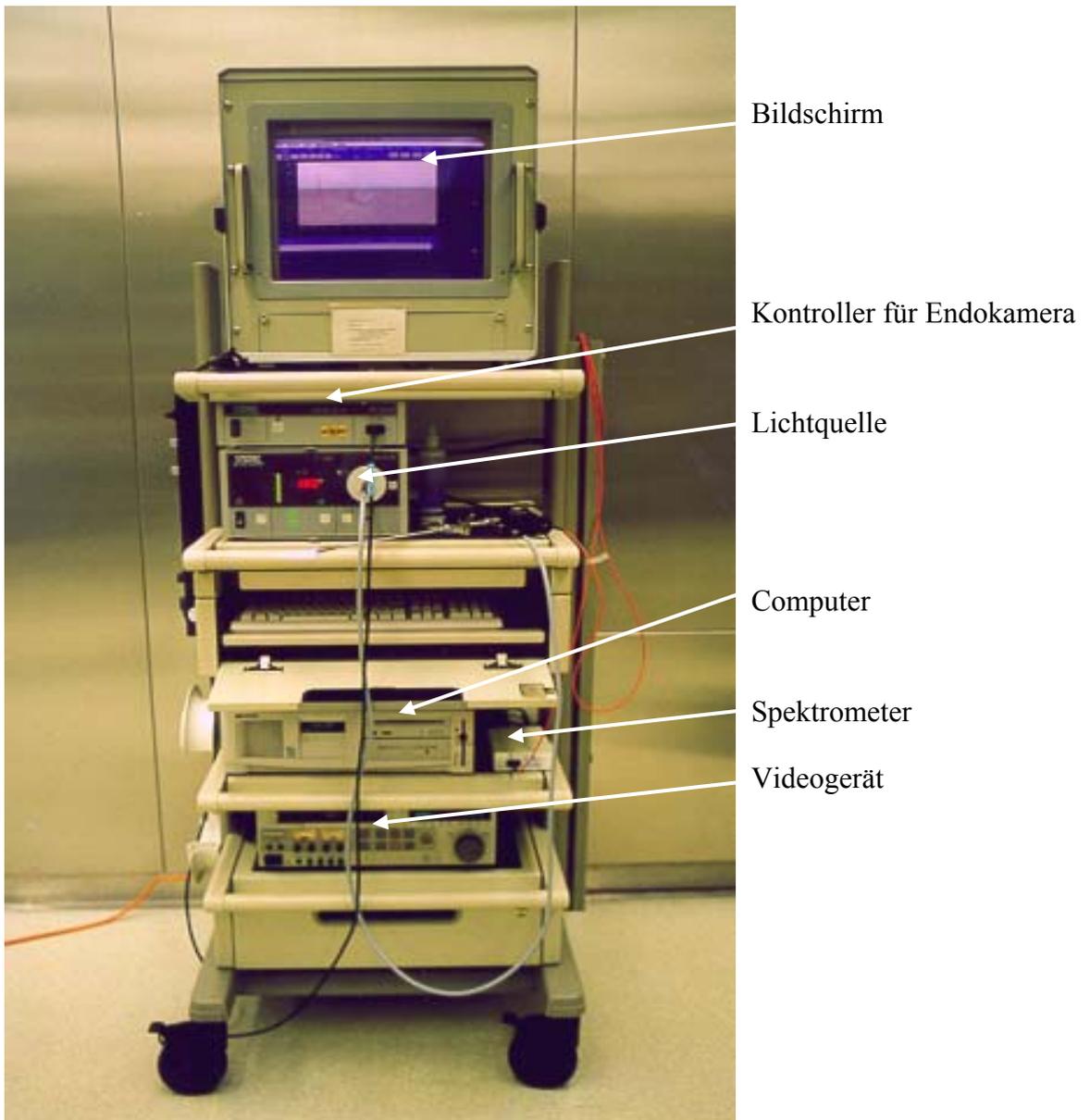


Abbildung 3.3: Diagnostikturm für die Fluoreszenzbildgebung der Zervixdysplasie.

3.4.2. Fluoreszenzbildgebung der Portio uteri

Nach der Verwendung des 5-ALA-Thermogels fand die Fluoreszenzbildgebung der Portio uteri statt. Unmittelbar vor der Fluoreszenzbildgebung wurden die Zervixkappe und das verbleibende Gel entfernt. Die Räumlichkeiten wurden abgedunkelt, um eine vorzeitige Exposition der Zervix mit Licht zu unterbinden.

Da das remittierte Anregungslicht sehr viel intensiver ist als das beobachtbare Fluoreszenzlicht, muß es durch eine geeignete Filterung selektiv abgeschwächt werden. Mit Hilfe eines speziellen Gelbfilters wird nur Licht mit einer Wellenlänge größer als 455 nm transmittiert.

Beobachtung der Fluoreszenz mit dem bloßen Auge ist möglich. Daneben wurde eine speziell für die PDD entwickelte Endokamera für die Bildgebung eingesetzt (Telecam SL-PDD, Fa. Karl Storz GmbH & Co, Tuttlingen, Deutschland, siehe Abbildung 3.2). Die Kamera ist neben einem Weißlichtmodus mit einem Fluoreszenzmodus ausgestattet, in dem die elektronische Farbbalance so voreingestellt ist, dass das Videobild der Fluoreszenz weitgehend dem *in situ* Bild des Operateurs entspricht. Die wellenlängenabhängige Empfindlichkeit ist so modifiziert, dass im Wellenlängenbereich der PPIX Fluoreszenz eine besonders hohe Transmission erreicht wird. Die Sensitivität des Rotkanals der Kamera ist zwischen 600 und 700 nm deutlich gegenüber der Sensitivität einer Standardkamera erhöht.

Das Signal der Kamera kann während der gesamten Untersuchung auf Videoband gespeichert werden. Des weiteren können jederzeit Bilder direkt auf Festplatte gespeichert werden.

In Abbildung 3.3. ist der Diagnostikturm gezeigt, wie er für die Fluoreszenzbildgebung der Zervixdysplasie Anwendung findet.

3.5. Semiquantitative, topografische Fluoreszenzmikroskopie und quantitative Fluoreszenzspektrometrie

3.5.1. Versuchsaufbau

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Gefrierschnitte wurde ein inverses Forschungsmikroskop (DM IRBE, Leica, Wetzlar) mit 10x Objektiv verwendet.

Die Fluoreszenzanregung erfolgte durch eine Hg-Lichtquelle über einem wellenlängenselektiven Strahlenfilter (D-Block, Leica, Wetzlar) durch das Mikroskopobjektiv (Epifluoreszenz). Somit erfolgte die Anregung hauptsächlich durch die Hg-Linie bei 405 nm, und der Wellenlängenbereich ab ca. 460 nm stand für die Beobachtung zur Verfügung.

Die Exposition der 15 µm Gefrierschnitte mit Anregungslicht wurde so kurz wie möglich gehalten, um ein Ausbleichen der PPIX-Fluoreszenz zu minimieren.

3.5.2. Semiquantitative, topografische Fluoreszenzmikroskopie

Für die Dokumentation des mikroskopischen Fluoreszenzbildes wurde eine für diesen Zweck optimierte Drei-Chip CCD Kamera mit Integrationsmodus (Tricam SL PAL PDD, Karl Storz, Tuttlingen Deutschland) am Kameraausgang des Mikroskops angeschlossen. Um ein kontrastreiches Bild zu erhalten, wurden die RGB-Verstärkungsfaktoren der Kamera angepasst und Integrationszeiten von 0,5 bis 2 Sekunden verwendet. Ein PC mit Framegrabber-Karte und Bildbearbeitungssoftware (Optimas 6.2, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, U.S.A.) diente zur Darstellung und Speicherung der Fluoreszenzbilder.

Die Auswertung der Fluoreszenzaufnahme erfolgte in gezielt gewählten areas of interests (AOI) nach Vergleich mit HE-gefärbten benachbarten Schnitten. Soweit im Schnitt vorhanden und identifizierbar wurde die Fluoreszenz in folgenden topografisch zugeordneten Bereichen erfasst: normales Epithel, CIN, Stroma, endozervikale Drüsen. Das Plattenepithel der Portio uteri wurde für diese Studie in 3 Schichten eingeteilt:

- untere Schicht, bestehend aus den basalen und parabasalen Zellen
- mittlere Schicht, bestehend aus den intermediären Zellen
- obere Schicht, bestehend aus den superfiziellen Zellen

Bei CIN 1 spielen sich die Zellveränderungen in der unteren Schicht des Plattenepithels, bei CIN 2 in der unteren und in der mittleren Schicht ab. Bei CIN 3 ergreifen die Zellveränderungen die gesamte Plattenepithel-Schicht der Portio uteri [Feldman 1984]. Ausgehend davon kann man über die Heterogenität des Plattenepithels und die verschiedenen Stellen der Zellveränderungen innerhalb des Plattenepithels bei CIN 1, CIN 2, CIN 3 beurteilen.

Aufgrund der heterogenen Morphologie des dysplastischen Epithels analysierten wir anhand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen die PPIX-Fluoreszenzintensität in den jeweiligen Schichten des normalen und dysplastischen Plattenepithels.

Der Kontrast der roten PPIX-Fluoreszenz im Vergleich zur grünen Autofluoreszenz wurde in vier Stufen eingeteilt:

- keine Fluoreszenz (0 Punkt)
- geringe Fluoreszenz (1 Punkt)
- mäßige Fluoreszenz (2 Punkte)
- starke Fluoreszenz (3 Punkte)

3.5.3. Quantitative Fluoreszenzspektrometrie

Wie bekannt spiegelt die PPIX-Fluoreszenzintensität nach der Applizierung von 5-ALA-Thermogel den Anreicherungsgrad von PPIX wider, der sich als lichtaktive Substanz repräsentiert. Je mehr PPIX im Gewebe angereichert ist, desto intensiver fluoresziert das Gewebe bei der Anregung unter Blaulicht [Szeimies 1995, Ortel 1993, Loh 1992]. Den Prozess der Anreicherung des Gewebes mit PPIX beeinflusst eine Reihe von Faktoren, zu denen die Applikationsdauer von 5-ALA-Thermogel, die Dosis von 5-ALA-Thermogel, der Dysplasiegrad u.a. gehören [Heil 1997, Monk 1997, Rossi 1996, He 1993 a, He 1993 b].

Die Fluoreszenzspektrometrie ist eine Methode der quantitativen Erfassung der Fluoreszenzintensität, die in willkürlichen Einheiten ausgedrückt wird. Diese Methode ist am besten geeignet für die Messung von Fluoreszenzintensität und findet in zahlreichen Untersuchungen Anwendung [Fukuda 1993, Malik 1993, Bedwell 1992].

Die spektrometrische Untersuchung der mikroskopisch beobachteten Fluoreszenz erfolgte mit einem optischen Vielkanalanalysator (Princeton Instruments, Trenton, NJ, U.S.A.), der über ein Faserbündel an einem weiteren Kameraausgang des Mikroskops angeschlossen wurde. Um ausreichend hohe Intensitäten zu erzielen, wurden die Spektren mit einer Spaltbreite von 250 μm und einer Integrationszeit von 1 sec aufgenommen. Die spektrale Auflösung betrug 2 nm. Die Detektion erfolgte im zentralen Bereich des Fluoreszenzbildes.

Die quantitative Auswertung der Spektren erfolgte für die PPIX-Fluoreszenz (mit Autofluoreszenzuntergrund) bei 635 nm, für die Autofluoreszenz bei 600 nm. Hierzu wurde die Fluoreszenzintensität in einem Wellenlängenbereich von 635 nm \pm 5 nm bzw. 600 nm \pm 5 nm gemittelt. Um den Beitrag der Autofluoreszenz bei 635 nm zu berechnen, wurde der bei 600 nm für die Autofluoreszenzintensität ermittelte Wert mit dem konstanten Faktor 0,7 multipliziert. Dies entspricht dem Spektralverlauf der reinen

Autofluoreszenz. Der so erhaltene Wert wurde von der bei 635 nm ermittelten Fluoreszenzintensität subtrahiert, um die Fluoreszenzintensität für PPIX zu erhalten. Zur Berücksichtigung eventueller Schwankungen der Anregungslichtleistung oder Geräteempfindlichkeit wurden die berechneten Werte auf die Fluoreszenz eines Fluoreszenzstandards normiert. Als Fluoreszenzstandard wurde die Fluoreszenz einer roten Filterfolie (Kodak Gel-Filter #25) verwendet. Diese verursacht kein Ausbleichen und zeigt somit nur eine von der Intensität des anregenden Lichtes abhängige Fluoreszenz. Die Intensität des Fluoreszenzstandards wurde in einem Wellenlängenbereich von 550-650 nm gemittelt.

3.6. HPV-DNS-Assay

Alle Patientenproben wurden mit dem kommerziell erhältlichen Hybrid Capture System (Digene, Silver Spring, U.S.A.) auf Anwesenheit von HPV DNS untersucht. In diesem Test werden die 18 häufigsten HPV-Typen in zwei Gruppen eingeteilt, und zwar in Low-risk HPV Typen und Intermediate/High-risk HPV Typen.

- Low-risk HPV-Typen: 6,11,42,43,44
- Intermediate/High-risk HPV-Typen: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68

3.7. Statistische Auswertung

Für die statistische Bearbeitung der Unterschiede in der Fluoreszenz bei der CIN und bei dem normalen Plattenepithel wurde der Student-t-Test benutzt – Signifikanzniveau: $p < 0,05$. Die gemittelten Werte werden in der Form: Mittelwert \pm 95% Konfidenzintervall angegeben [Excel, Microsoft Office 2000].

4. Ergebnisse

4.1. Patientenkollektiv

Im Zeitabschnitt von Dezember 2001 bis April 2002 wurde nach ausführlicher Aufklärung über die vorgenommene klinische Studie eine Einverständniserklärung von allen Patientinnen unterschrieben. An dieser Studie haben 27 Patientinnen mit verschiedenen Graden der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) teilgenommen. Das Durchschnittsalter der Untersuchten lag bei zirka 37 Lebensjahren mit einer Standardabweichung von 14 Jahren. Die jüngste Teilnehmerin war 21 Jahre alt, das Alter der ältesten Patientin betrug 79 Jahre.

15 Patientinnen (56%) waren jünger als 35 Jahre alt.

8 Patientinnen (30%) waren zwischen 35 und 50 Jahre alt.

4 Patientinnen (14%) waren älter als 50 Jahre.

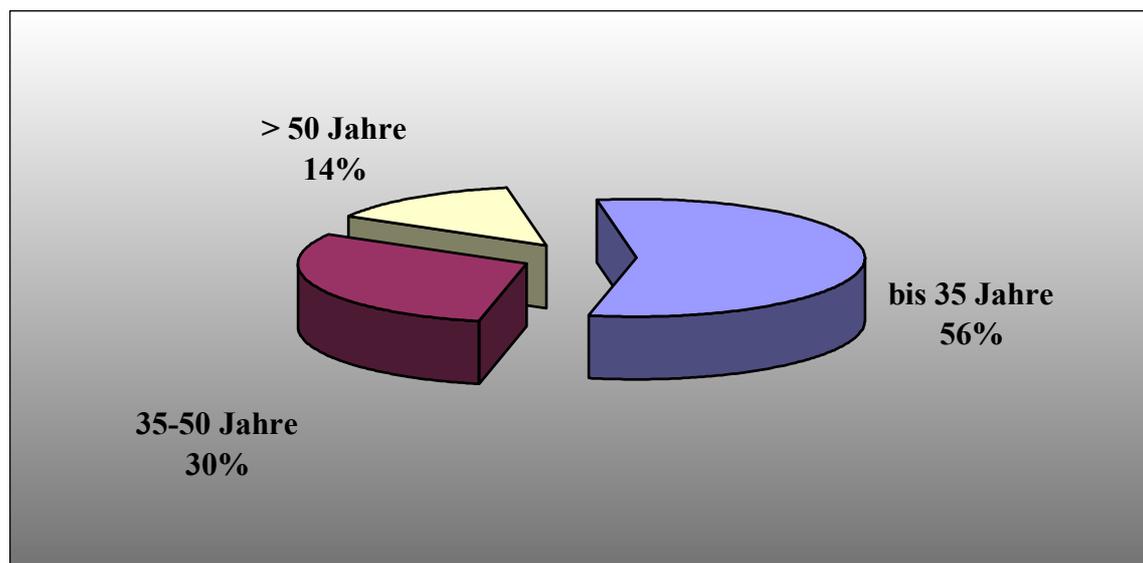


Abbildung 4.1: Altersverteilung der Patientinnen (n=27).

Einen Tag vor der Applizierung von 5-ALA-Thermogel an der Portio wurde ein erneuter zytologischer Abstrich entnommen.

Die Ergebnisse dieser Zytodiagnostik veranschaulicht die nächste Abbildung.

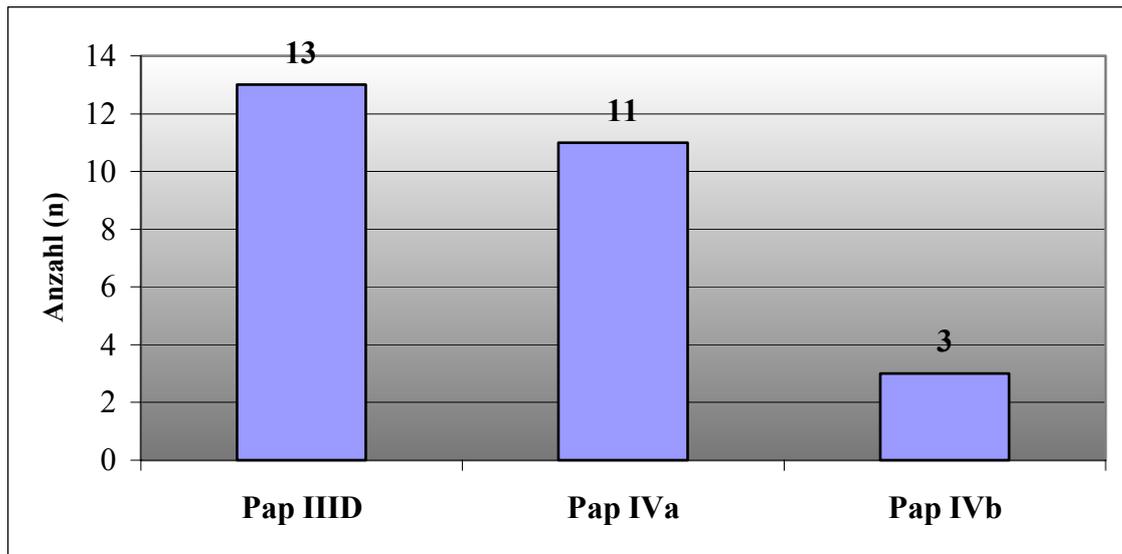


Abbildung 4.2: Einteilung der Patientinnen nach Schweregrad des zytologischen Befundes (Zytdiagnostik nach Münchner Schema II).

Daraus kann man folgendes erkennen. Bei 13 Patientinnen (48%) wurde ein Pap IIIID; mit Verdacht auf CIN 1 und CIN 2 beobachtet. Bei 14 anderen (52%) wurde ein Pap IV a/b mit Verdacht auf CIN 3 diagnostiziert. Bei auffälligen zytologischen Befunden erfolgte die Entnahme von Knipsbiopsien in der Dysplasiesprechstunde. Die Histologie der Knipsbiopsien wird in der Abbildung 4.3. dargestellt.

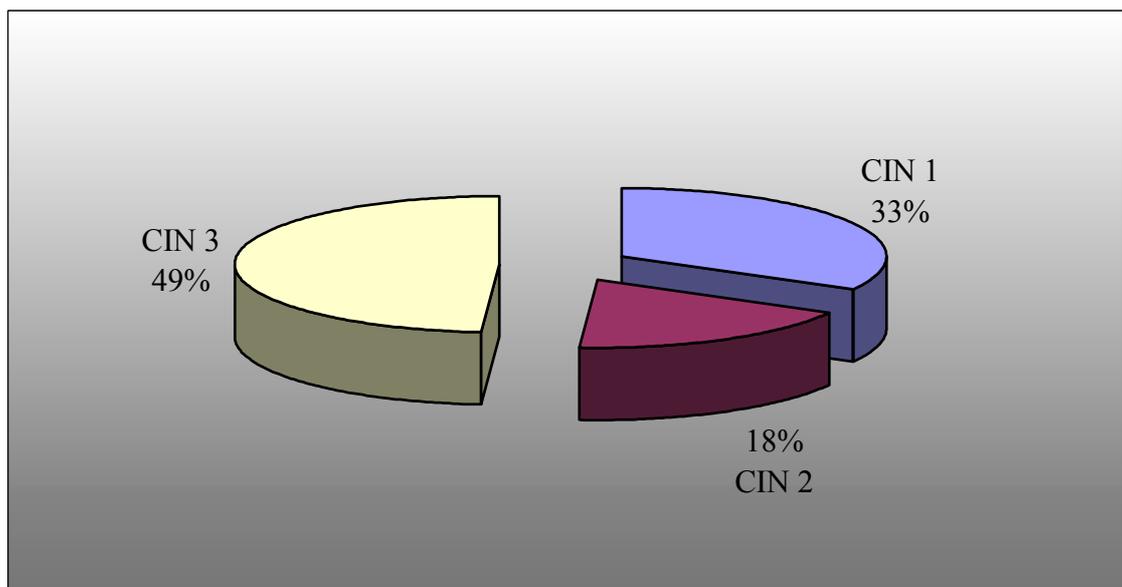


Abbildung 4.3: Einteilung der Patientinnen nach Schweregrad der Histologie (n=27).

9 Patientinnen (33%) wiesen eine CIN 1 auf.

5 Patientinnen (18%) wurden mit CIN 2 diagnostiziert.

13 Patientinnen (49%) hatten eine CIN 3.

Alle Patientinnen wurden der HPV-DNS-Analyse mittels Hybrid-Capture-Assay unterzogen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.4 dargestellt.

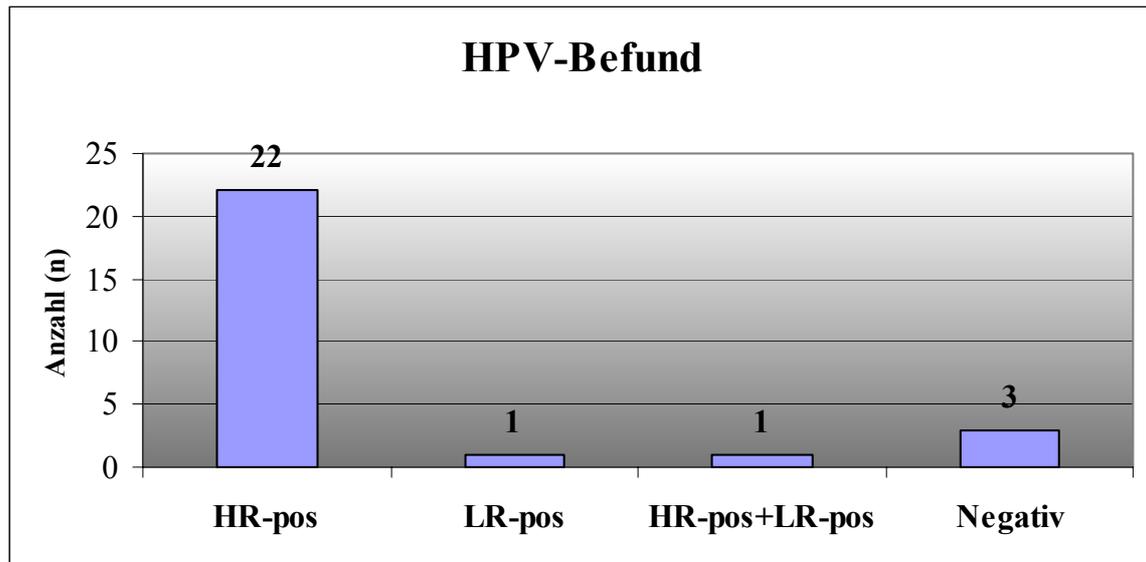


Abbildung 4.4: Einteilung der Patientinnen nach HPV-Diagnose (HR-positiv – Nachweis von HPV-Typen mit einem hohen onkogenen Risiko, LR-positiv – Nachweis von HPV-Typen mit einem niedrigen onkogenen Risiko).

4.2. Fluoreszenzbildgebung der Portio uteri

Nach der Inkubation des applizierten 5-ALA-Thermogels in verschiedenen Konzentration (4%, 10%, 20%) und über verschiedene Zeiträume kann die PPIX-Fluoreszenz in der Portio makroskopisch nachgewiesen werden. Dabei ist im dysplastischen Gewebe eine Erhöhung von PPIX-Fluoreszenz zu erkennen.

Die PPIX-Fluoreszenz, dessen Emissionsmaximum sich bei 636 nm befindet, stellt sich visuell als eine rötliche Fluoreszenz dar, die eine deutliche Abgrenzung von der grünen Autofluoreszenz aufwies.

Die Abbildung 4.5 (rechtes Bild) macht ein abgegrenztes Areal auf der Portio uteri sichtbar, das sich unter der Wirkung des Anregungslichtes als rote PPIX-Fluoreszenz erkennen lässt. Die Abbildung 4.5 (linkes Bild) stellt den gleichen Ausschnitt der

Portio uteri dar. Diese Aufnahme erfolgte mittels Kolposkop nach topischer Applikation von 3% Essigsäure unter Weißlicht.

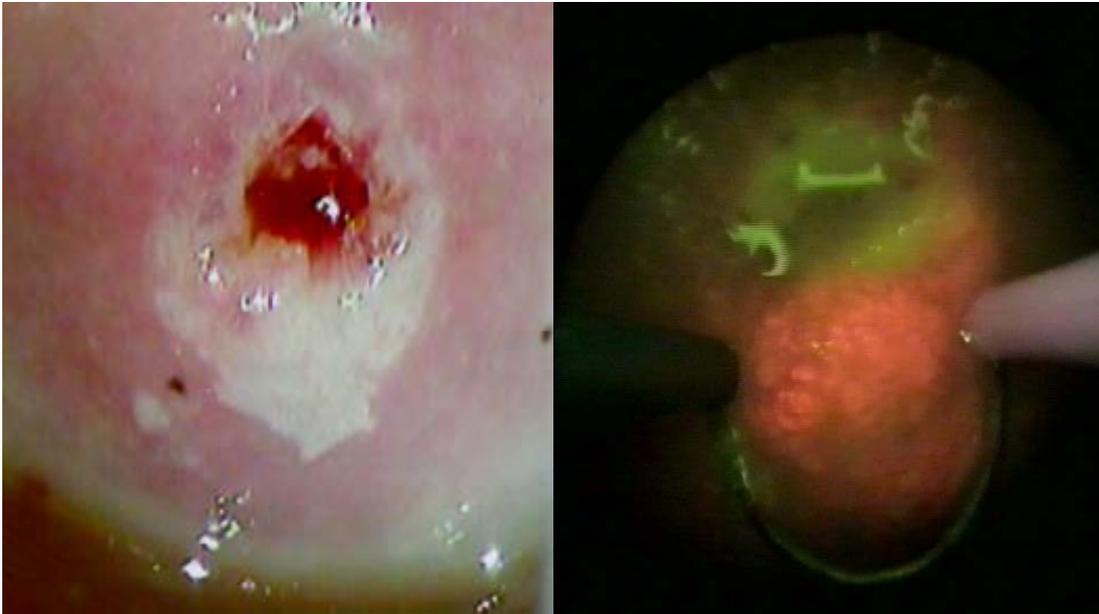


Abbildung 4.5: Links: Kolposkopischer Befund der Portio uteri (CIN 2). Rechts: Entsprechende Fluoreszenzaufnahme (4%iges 5-ALA-Thermogel, Expositionszeit 4 Stunden).

4.3. Semiquantitative, topografische Fluoreszenzmikroskopie und quantitative Fluoreszenzspektrometrie

Nach der Durchführung der Fluoreszenzaufnahme von der Portio erfolgte entweder eine Schlingenkonisation oder die Entnahme von Knipsbiopsien (in drei Fällen). Vom Konisat wurden die mikroskopischen Schnitte für Fluoreszenzspektrometrie und Fluoreszenzmikroskopie hergestellt (siehe 3.3. Verlauf der Untersuchungen).

Nach der histopathologischen Diagnose von Konisat und Knipsbiopsien, die von 27 Patientinnen entnommen wurden, kam man zu folgenden Ergebnissen: In 25 Fällen zeigte sich eine CIN verschiedenen Grades. In einem Fall war nur Stroma ohne Plattenepithel in den mikroskopischen Schnitten erkennbar. Im letzten Fall waren endozervikale Drüsen vorhanden, aber kein Anhalt für CIN (siehe Abbildung 4.6.).

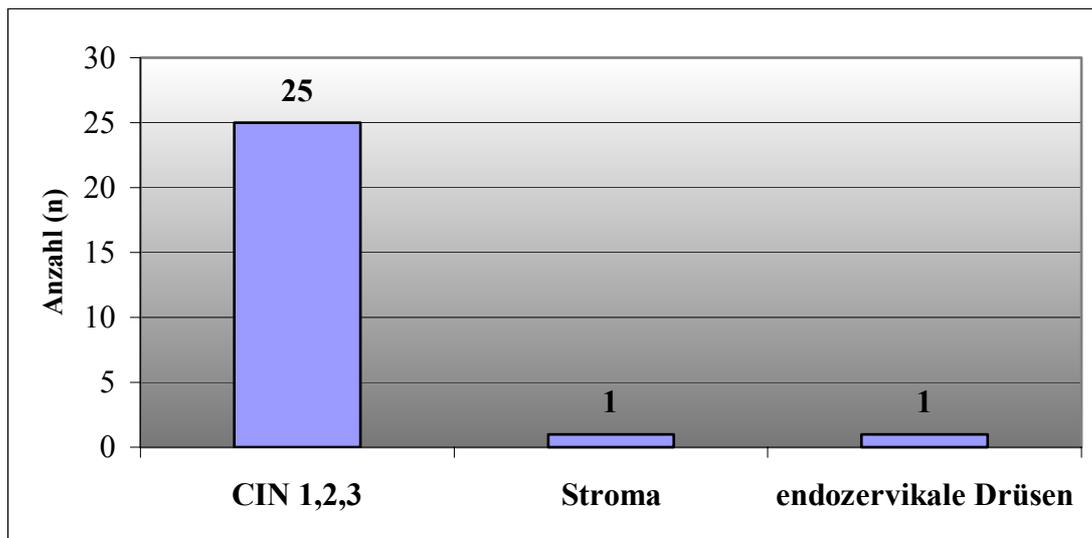


Abbildung 4.6: Einteilung der Patientinnen nach der histologischen Beurteilung der HE-Schnitte.

Die histologischen Schnitte, die CIN der verschiedenen Grade enthielten, wurden weiteren Untersuchungen unterworfen. Innerhalb dieser durch Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte zeigten sich die CIN-Areale und die Areale des normalen Plattenepithels, die mit dem Pathologen markiert wurden. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung sind in der Abbildung 4.7 zusammengestellt.

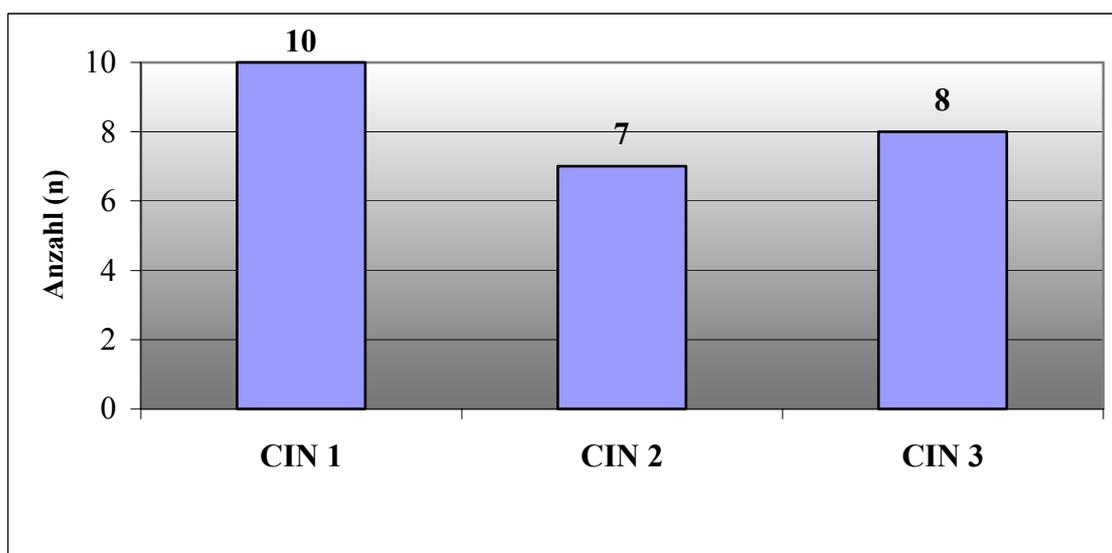


Abbildung 4.7: Einteilung der Patientinnen nach Schweregrad der Histologie.

Hinsichtlich der Applikationsdosis von 5-ALA-Thermogel wurden die Patientinnen folgenderweise eingeteilt.

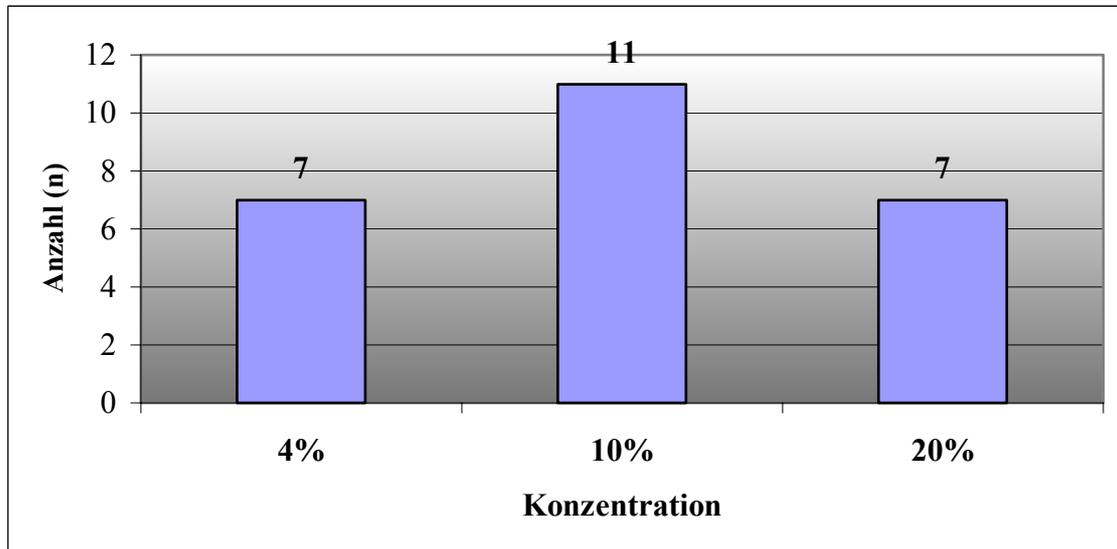


Abbildung 4.8: Einteilung der Patientinnen nach 5-ALA-Thermogel-Konzentration.

Die Einteilung der Patientinnen hinsichtlich des Inkubationsintervalls von 5-ALA-Thermogel wurde in der nächste Abbildung dargestellt.

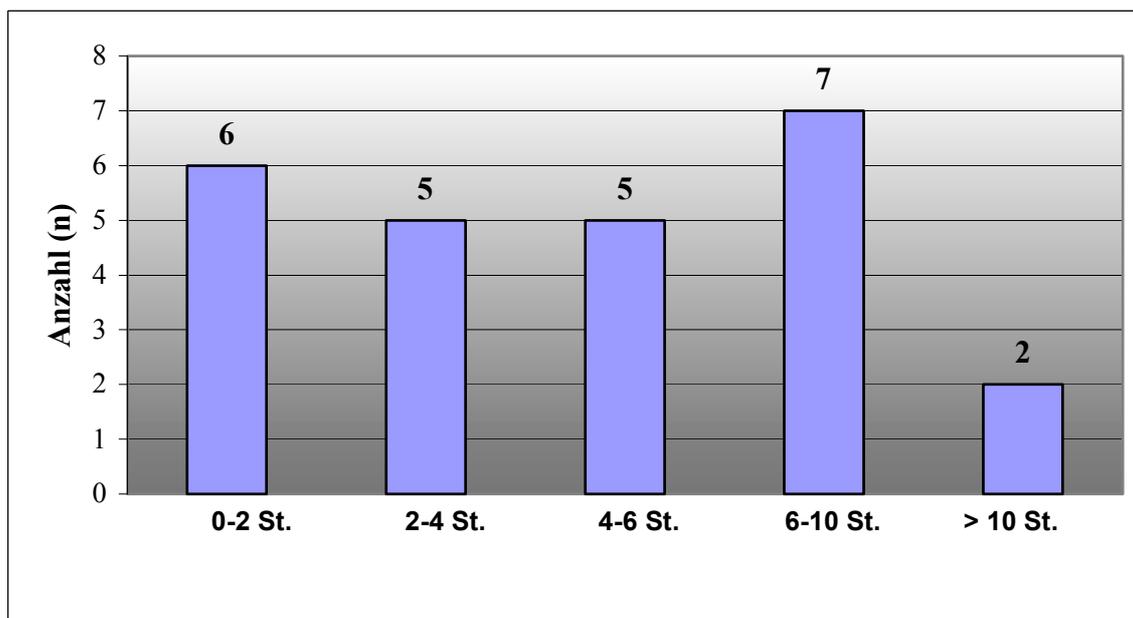


Abbildung 4.9: Einteilung der Patientinnen nach dem Inkubationsintervall von 5-ALA-Thermogel.

4.3.1. Quantitative Fluoreszenzspektrometrie

Vor der Anwendung der Fluoreszenzspektrometrie wurden die HE-Schnitte untersucht, auf denen die CIN-Areale der verschiedenen Grade und die Areale des normalen Plattenepithels von dem Pathologen markiert wurden. Dabei zeigten sich auf den für Fluoreszenzspektrometrie vorbereiteten Schnitten die gleichen Areale, die den markierten Arealen entsprachen.

4.3.1.1. Vergleich der Mittelwerte der PPIX-Fluoreszenzintensitäten bei CIN der verschiedenen Grade und bei normalem Plattenepithel

Nach dem Vergleich der Werte der PPIX-Fluoreszenzintensitäten bei CIN und beim umgebenden normalen Plattenepithel wurde eine statistisch signifikante Differenz festgestellt (704 ± 166 w.E. beim normalen Plattenepithel und 1116 ± 241 w.E. bei CIN der verschiedenen Grade, $p < 0,05$).

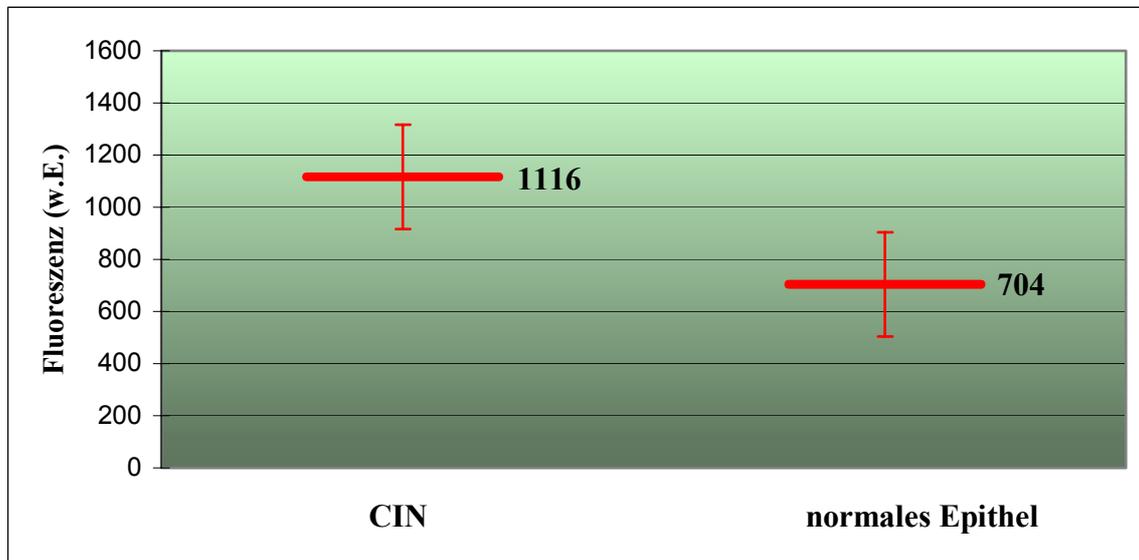


Abbildung 4.10: Mittelwerte von PPIX-Fluoreszenzintensität bei CIN 1–3 und beim normalen Plattenepithel ($p < 0,05$).

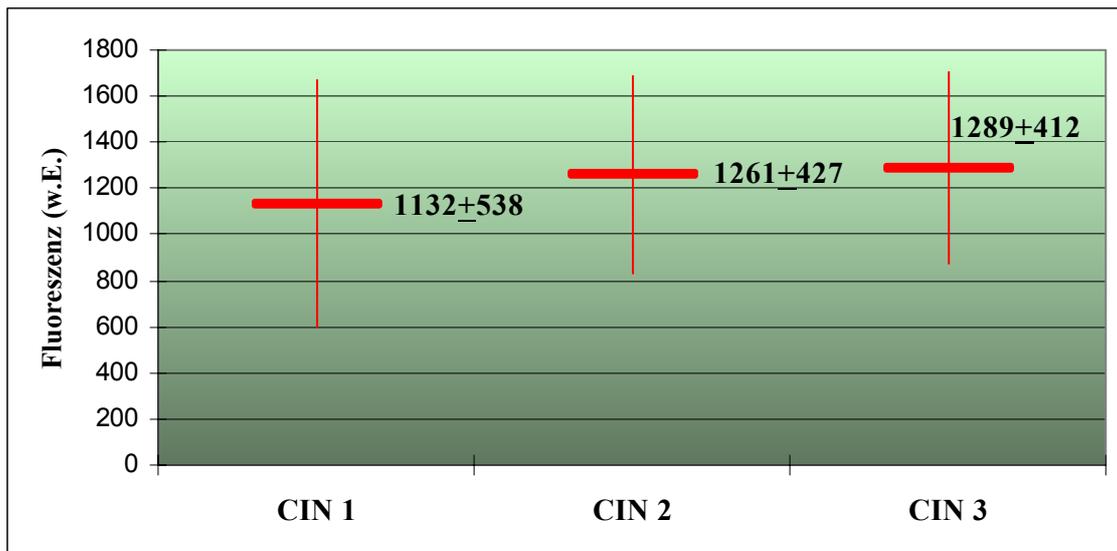


Abbildung 4.11: Mittelwerte von PPIX Fluoreszenzintensität bei CIN 1-3 ($p>0,05$).

Die Abbildung 4.11 veranschaulicht deutlich, dass keine statistisch belegte Differenz zwischen CIN 1, CIN 2 und CIN 3 beobachtet wurde ($p>0,05$).

4.3.1.2. Einfluss der Applikationsdauer auf die PPIX-Fluoreszenzintensität

Für die klinische Anwendung von 5-ALA ist von großer Bedeutung, Informationen über die Kinetik der PPIX-Akkumulation zu erlangen, um eine optimale Zeitspanne zwischen der Verabreichung von 5-ALA und der Einleitung von PDT zu erkennen und zu beachten.

Bei der Analyse der Fluoreszenzintensität in allen CIN-Arealen und in den Arealen mit normalem Plattenepithel wurden folgende Resultate erreicht: Die PPIX-Fluoreszenzintensität auf der CIN-Arealen stieg mit zunehmender Applikationsdauer. In der Zeitspanne von 0 bis 2 Stunden war sie fast nicht detektierbar. Bei einer Applikationsdauer von mehr als 2 Stunden war die Fluoreszenzintensität deutlich erhöht. In dem Zeitabschnitt zwischen 4 und 6 Stunden wurde das Fluoreszenzmaximum erreicht. Bei einer Applikationsdauer von 6-8 Stunden zeigte sich eine reduzierte PPIX-Fluoreszenzintensität. Die PPIX-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Expositionszeit des 5-ALA-Thermogels werden in der Abbildung 4.12. dargestellt.

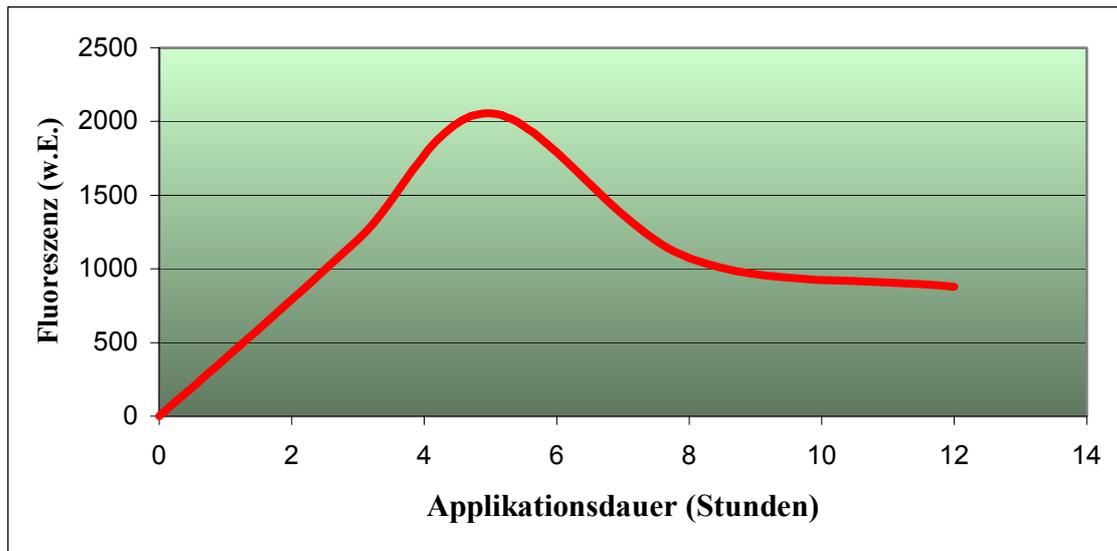


Abbildung 4.12: Fluoreszenzintensität und Applikationsdauer des 5-ALA-Thermogels bei CIN 1-3.

Eins ist zu betonen: Die PPIX-Fluoreszenzintensität veränderte sich sowohl im normalen Plattenepithel als auch in den CIN-Arealen abhängig von der Applikationsdauer des 5-ALA-Thermogels. Allerdings wies die Fluoreszenzintensität des normalen Plattenepithels einige Unterschiede im Vergleich zur CIN auf.

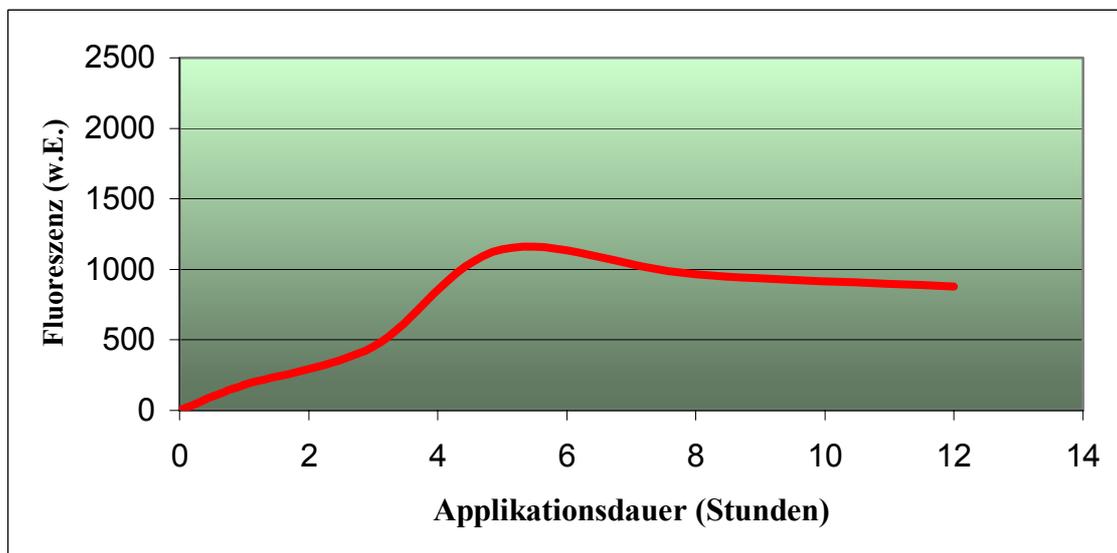


Abbildung 4.13: Fluoreszenzintensität und Applikationsdauer des 5-ALA-Thermogels beim normalen Plattenepithel.

Die PPIX-Fluoreszenzintensität war in der Zeitspanne von 3 bis 4 Stunden relativ schwach und unter 2 Stunden kaum detektierbar. Ab 4 Stunden erhöhte sich die PPIX-Fluoreszenzintensivität deutlich und erreichte das Maximum bei 5 bis 6 Stunden. Im weiteren erfolgte ein langsamer, schwach ausgeprägter Abfall der PPIX-Fluoreszenzintensität und bei einer Applikationsdauer von zirka 8 Stunden sanken die PPIX-Fluoreszenzwerte des normalen Plattenepithels und des CIN-Areals mit gleicher Kinetik.

4.3.1.3. Tumorselektivität der PPIX-Fluoreszenzintensität der CIN und des normalen Plattenepithels

Die PPIX Fluoreszenzintensität der CIN nimmt über einen Zeitraum von 0.5 bis 2 Stunden zu. Für die PDT ist jedoch nicht nur diejenige Zeit von Bedeutung, nach der ein maximaler PPIX Spiegel im zu untersuchenden Gewebe erreicht wird, sondern auch die Zeit, nach der ein maximales „Ratio“ zwischen verändertem und gesundem Gewebe zu erreichen ist. Diese Tumorselektivität des 5-ALA-Thermogels wird definiert als Ratio zwischen PPIX-Fluoreszenzintensität von CIN zu Normalgewebe.

Das Ratio zwischen der PPIX-Fluoreszenzintensität der CIN 1 zu histologisch negativem Gewebe ist in Abbildung 4.14. wiedergegeben.

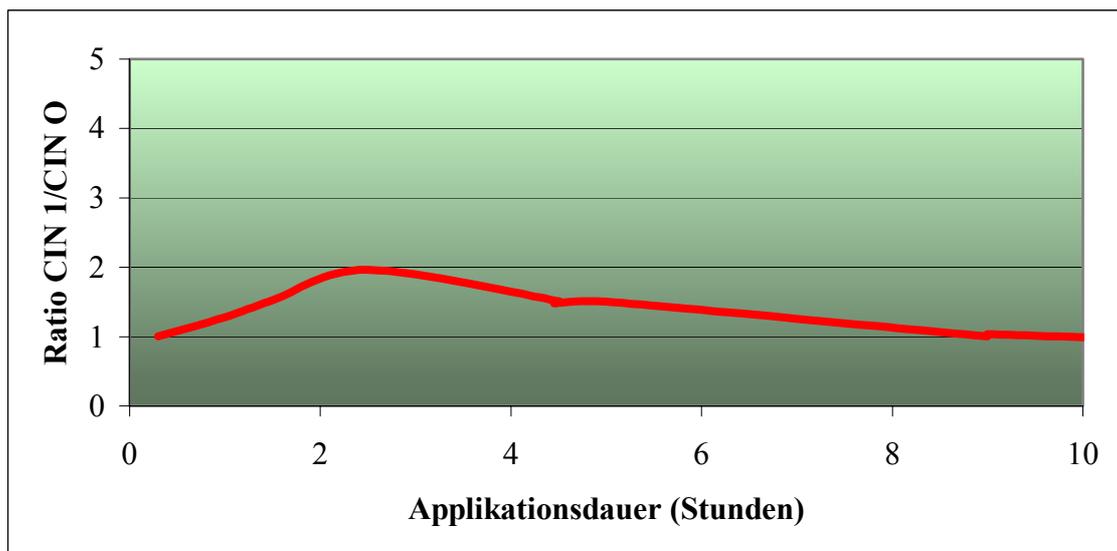


Abbildung 4.14: Ratio zwischen der PPIX-Fluoreszenzintensität der CIN 1 zu dem normalen Plattenepithel.

Ab 0,5 Stunden stieg das Ratio bis zum Maximum bei der Applikationsdauer von 2-5 Stunden. An diesem Punkt betrug es zirka 1,5. Bei einer Applikationsdauer von 8 bis 10 Stunden betrug das Ratio zwischen den PPIX-Fluoreszenzintensitäten zirka 1.

Bei der CIN 2 erreichte das Ratio das Maximum bei einer Applikationsdauer von 2-6 Stunden und betrug ca. 2,5. Die Tumorselektivität nahm mit längerer Applikationsdauer über 6 Stunden ab. Bei einer Applikationsdauer von 8 bis 10 Stunden betrug das Ratio zwischen der PPIX-Fluoreszenzintensität der CIN 2 zu dem normalen Plattenepithel zirka 1.

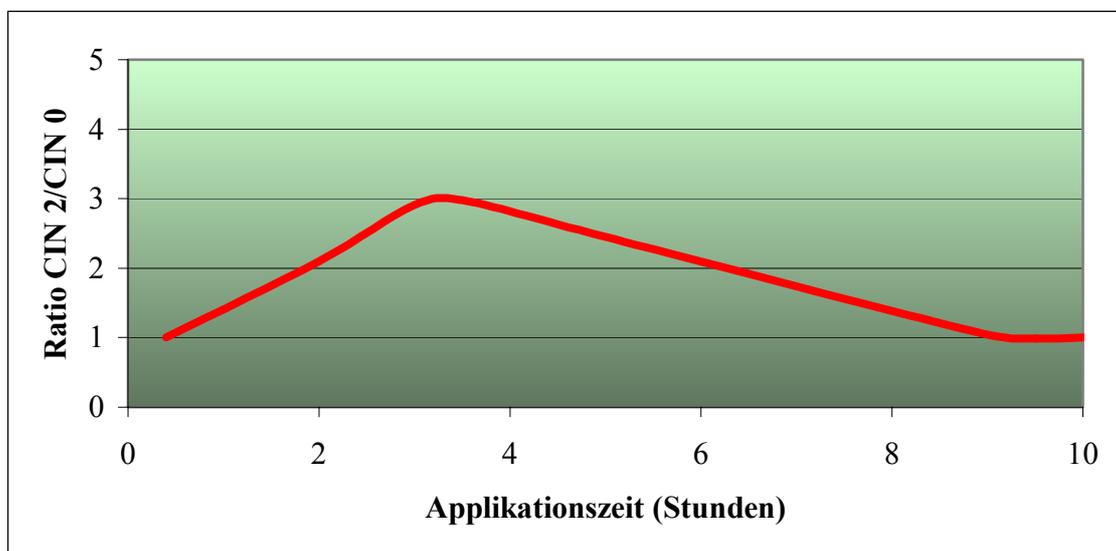


Abbildung 4.15: Ratio zwischen der PPIX-Fluoreszenzintensität der CIN 2 zu dem normalen Plattenepithel.

Das Ratio zwischen der PPIX-Fluoreszenzintensität der CIN 3 zu dem normalen umgebenden Plattenepithel ist im Zeitverlauf ähnlich mit CIN 1 und CIN 2. Das Ratio erreichte das Maximum bei einer Applikationsdauer von 2-6 Stunden und betrug ca. 3,5. Die Tumorselektivität nahm mit längerer Applikationsdauer über 6 Stunden ab. Bei einer Applikationsdauer von 8 bis 10 Stunden betrug das Ratio zwischen der PPIX-Fluoreszenzintensität der CIN 3 zu dem normalen Plattenepithel zirka 1.

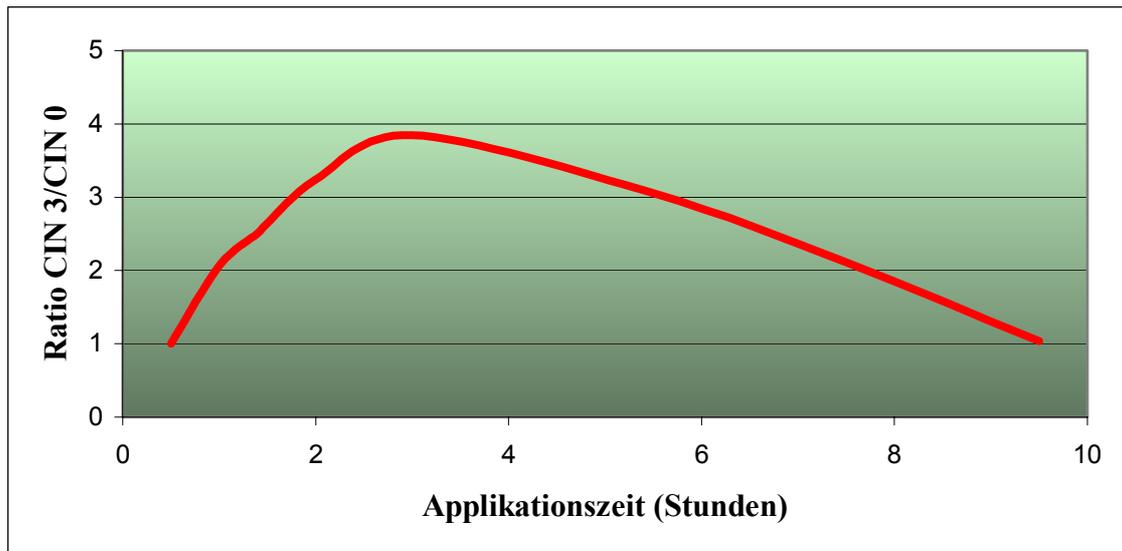


Abbildung 4.16: Ratio zwischen der PPIX-Fluoreszenzintensität der CIN 3 zu dem normalen Plattenepithel.

Beim Vergleich der Werte des Ratios zwischen der PPIX-Fluoreszenzintensität der CIN zu dem normalen Plattenepithel kam man zu folgendem Ergebnis (siehe Abbildung 4.17).

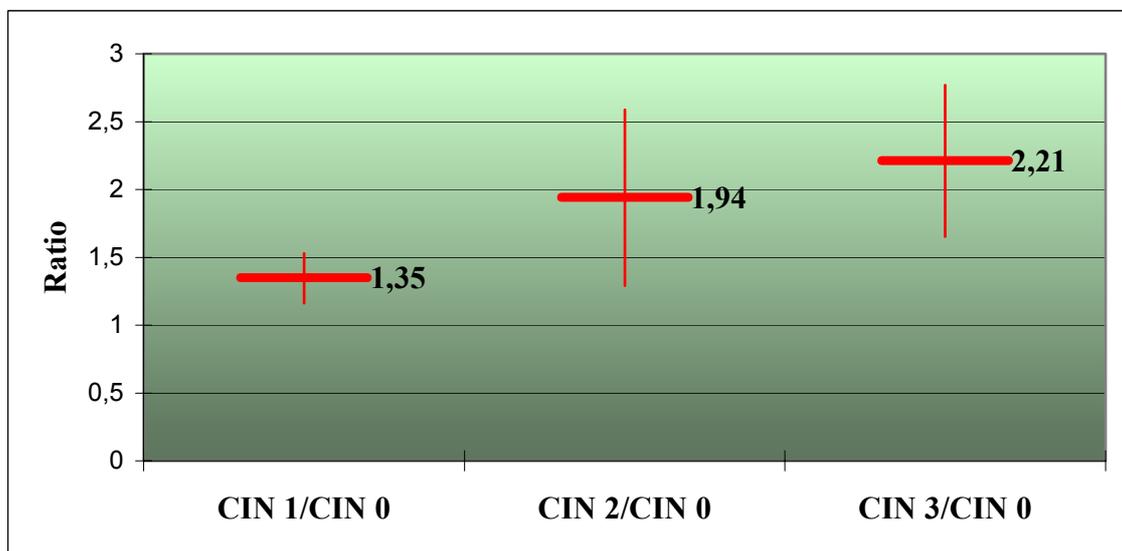


Abbildung 4.17: Mittelwerte des Ratios zwischen PPIX-Fluoreszenzintensität von CIN 1-3 zu normalem Plattenepithel.

Es ist zu sehen, dass die maximale Tumorselektivität bei CIN 3 Läsionen erreicht wurde und 2,2 betrug, bei CIN 2 lag sie bei 1,94. Die geringste Tumorselektivität wurde bei CIN 1 beobachtet und betrug 1,35. Zwischen dem Fluoreszenzratio bei CIN 1 ($1,35 \pm 0,18$) und bei CIN 3 ($2,21 \pm 0,56$) wurde eine statistisch signifikante Differenz festgestellt ($p < 0,05$).

4.3.1.4. Einfluss der 5-ALA-Thermogel Konzentration auf die Intensität der PPIX-Fluoreszenz

Bei dem Vergleich der PPIX-Fluoreszenzintensitäten verschiedener Konzentrationen gab es keine signifikanten Ergebnisse.

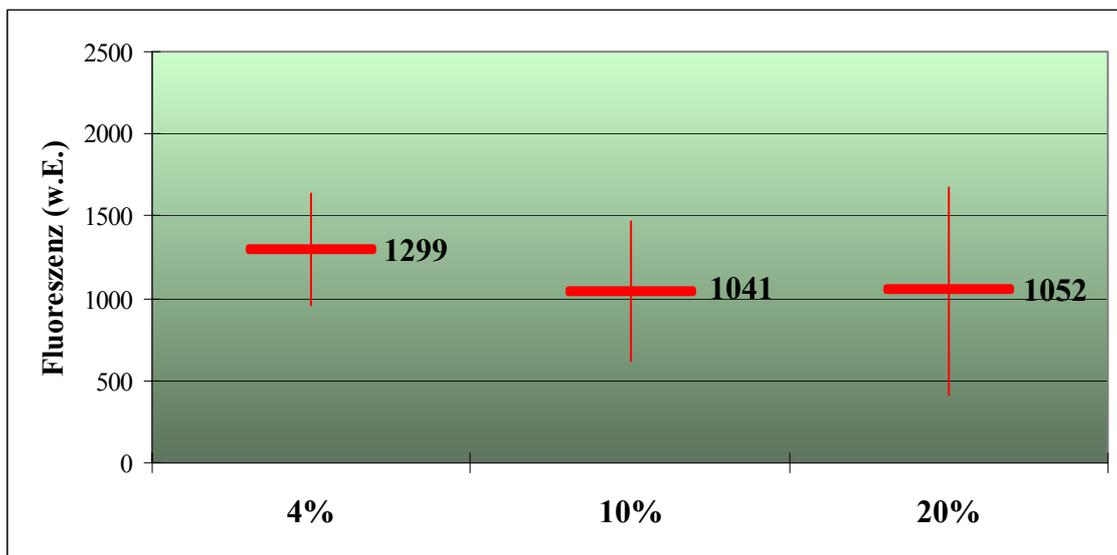


Abbildung 4.18: Die PPIX-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des 5-ALA-Thermogels bei CIN 1-3.

Wie die Abbildung 4.18. zeigt, befand sich das Maximum der PPIX-Fluoreszenzintensität bei einer Applikationsdosis von 4% (1299 ± 336 w.E.). Bei einer Applikationsdosis von 10% und 20% war die PPIX-Fluoreszenzintensität etwas niedriger (1041 ± 428 w.E. und 1052 ± 621 w.E.). Aber zwischen diesen Mittelwerten wurde keine statistisch signifikante Differenz beobachtet ($p > 0,05$).

Diese Berechnungen wurden ohne Berücksichtigung der 5-ALA-Thermogel-Applikationszeit vorgenommen. Die PPIX-Fluoreszenzintensität war bei einer

Applikationszeit von weniger als 2 Stunden relativ gering und bei einer Applikationsdauer von weniger als 1 Stunde kaum detektierbar.

Für die Gruppe der Patientinnen, bei denen das 5-ALA-Thermogel in der Konzentration von 4% appliziert wurde, betrug die Applikationsdauer in allen Fällen mehr als 2 Stunden. Für die Gruppe, in der die Konzentration des 5-ALA-Thermogels 10% und 20% betrug, war die Expositionszeit in einigen Fällen weniger als 2 Stunden. Deshalb war es notwendig, den Vergleich der Mittelwerte der PPIX-Fluoreszenzintensität bei den Konzentrationen von 4%, 10%, 20% nur für Expositionszeiten über 2 Stunden zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.19. zu sehen.

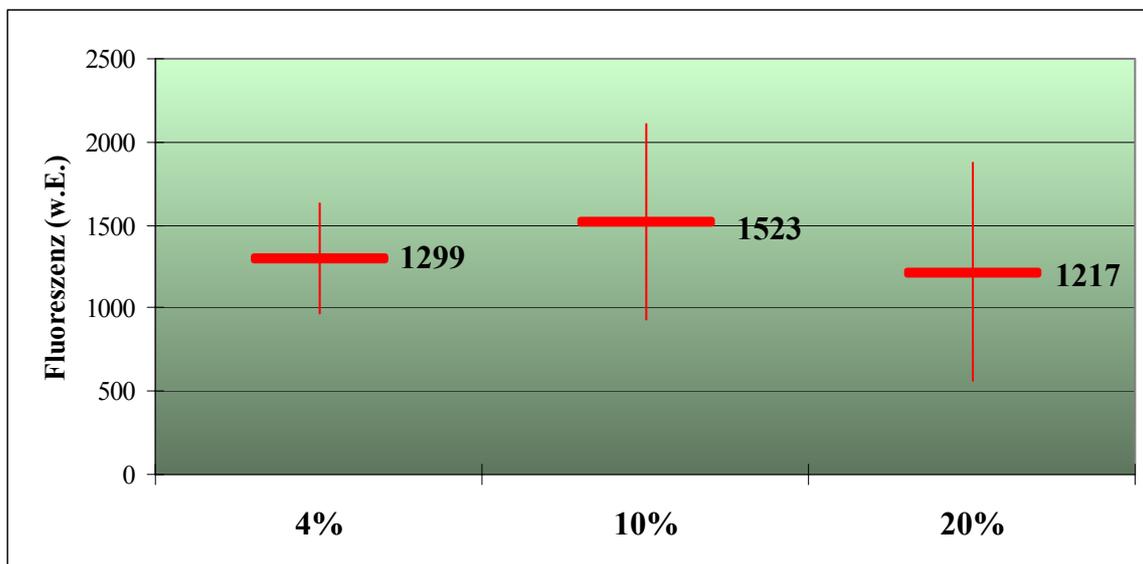


Abbildung 4.19: Die PPIX-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentrationen des 5-ALA-Thermogels bei CIN 1-3 (Applikationszeit über 2 Stunden).

Bei der Analyse dieser Abbildung kann man feststellen, dass die maximale PPIX-Fluoreszenzintensität bei der Applikationsdosis von 10% erreicht wurde. Etwas niedriger war die PPIX-Fluoreszenzintensität bei den Konzentrationen von 4% und 20%. Aber es war auch hier keine statistisch signifikante Differenz nachweisbar ($p > 0,05$).

4.3.2. Semiquantitative, topografische Fluoreszenzmikroskopie

Die semiquantitative, topografische Fluoreszenzspektrometrie ermöglicht die Messung der PPIX-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Schichtung des Plattenepithels der Portio uteri.

Insgesamt wurden 25 Schnitte mit den CIN 1, CIN 2, CIN 3-Arealen und mit den Arealen des normalen Plattenepithels untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst 4.1.

Befund	Gesamte Fluoreszenz	Fluoreszenz in unteren Schichten	Fluoreszenz in mittleren Schichten	Fluoreszenz in oberen Schichten
Negativ	3,36 \pm 0,73	1,4	1,36	0,6
CIN 1	4,8 \pm 1,57	2,3	1,7	0,8
CIN 2	5,57 \pm 0,84	2,7	1,7	1,17
CIN 3	5,0 \pm 1,77	2,125	1,75	1,125

Tabelle 4.1: Der PPIX-Fluoreszenzmittelwert bei semiquantitativer, topografischer Fluoreszenzmikroskopie von CIN 1-3 und normales Plattenepithels.

Die Untersuchungen ergaben eine statistisch signifikante Differenz in der PPIX-Fluoreszenzintensität zwischen den verschiedenen Schichten des Plattenepithels und zwischen der CIN und dem normalen Plattenepithel.

Das Maximum der PPIX-Fluoreszenzintensität befindet sich immer in der unteren Schicht des Plattenepithels, die aus den basalen und parabasalen Zellen besteht. Dies trifft sowohl auf CIN-1-3-Läsionen als auch auf histologisch normales Epithel zu. Bei CIN 1-3 ist die PPIX-Fluoreszenzintensität in der unteren Schicht höher als im normalen Plattenepithel. Hier ist eine Gesetzmäßigkeit festzustellen. Es zeigt sich eine graduelle Abnahme der Fluoreszenz von der Basalmembran bis zur Oberfläche des Plattenepithels. Wobei die PPIX-Fluoreszenzintensität der CIN-Areale ausgeprägter ist als im Bereich des normalen Plattenepithels. Die Ergebnisse der PPIX-Fluoreszenzintensität auf den CIN-Arealen und auf den Arealen des negativen Befundes sind in der Abbildung 4.20. und 4.21. dargestellt.

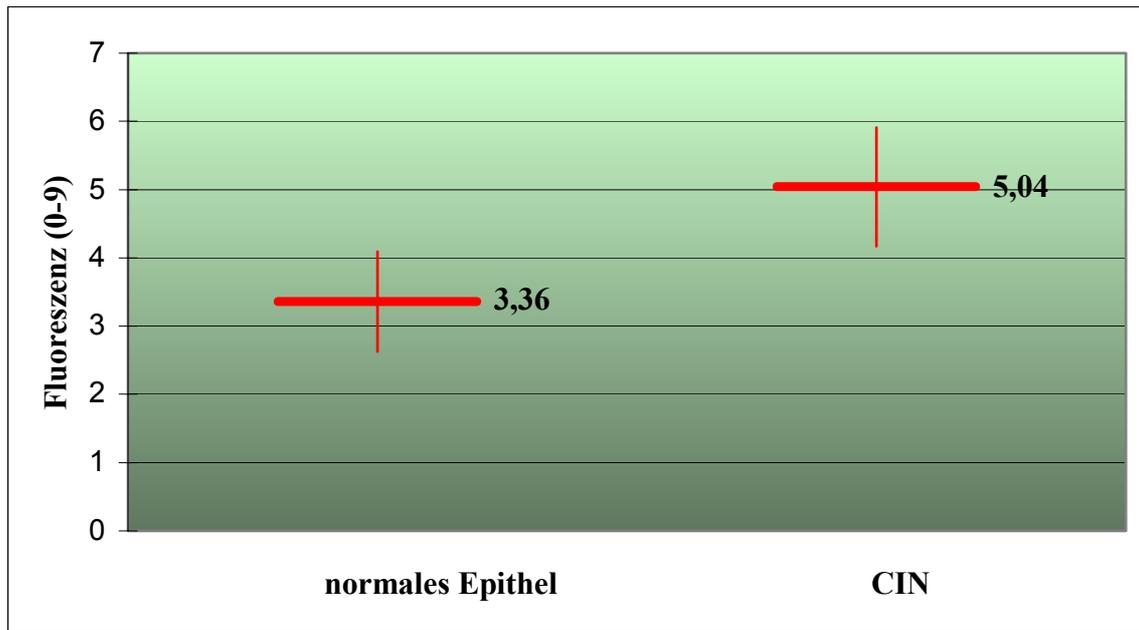


Abbildung 4.20: Semiquantitative, topografische Auswertung der PPIX-Fluoreszenzintensität der 3 Zellschichten in der Fluoreszenzmikroskopie

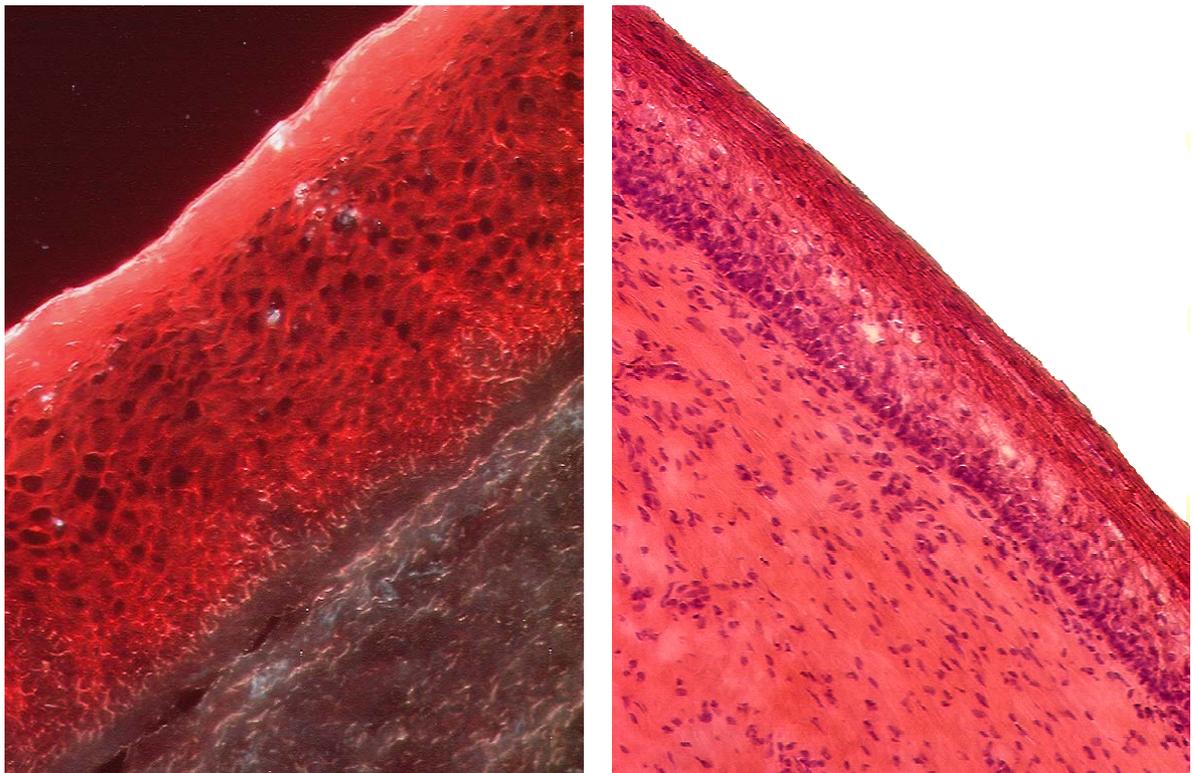


Abbildung 4.21. Links: Die starke PPIX-Fluoreszenzintensität in allen drei Schichten des Plattenepithels der Portio uteri bei CIN 1 nach der topischen Applikation 20% 5-ALA-Thermogel und bei einer Expositionszeit von 4,5 Stunden. Das Stroma ist fluoreszenznegativ. Der Schnitt wird mit 9 Punkten bewertet. Die quantitative Fluoreszenzintensität ergab 2209 w.E. Rechts: Entsprechender Hämatoxylin-Eosin-Schnitt als Nachweis für CIN 1.

5. Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit ist die fluoreszenzspektrometrische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der CIN nach Applikation von 5-ALA in der neuartigen Applikationsform eines Thermogels. Eine Verbesserung der Diagnostik und der Therapie der CIN ist heutzutage von großer Aktualität, da eine ständige Zunahme dieser Vorstufe vom Zervixkarzinoms in den letzten zwei Dekaden in Westeuropa und in den USA bei Frauen im reproduktiven Alter zwischen 25 und 40 Jahren registriert wurde. Der Anteil an Frauen mit CIN in dieser Gruppe liegt bei 3-5%. Die zervikale intraepitheliale Neoplasie stellt eine Präkanzerose dar, deren Übergang innerhalb von 10 Jahren in ein invasives Plattenepithelkarzinom nicht auszuschließen ist [Hillemanns 1997].

Wie zahlreiche Studien beweisen, ist die durch bestimmte Typen von humanen Papillomviren (HPV) hervorgerufene Infektion ein wesentlicher Faktor in der Entwicklung der zervikalen Neoplasie. Dabei wurde festgestellt, dass die Prävalenz von HPV bei allen Schweregraden der Dysplasie 93% [Hillemanns 1999 a] und beim invasiven Zervixkarzinom 99,7% beträgt [Walboomers 1999]. Das relative Risiko, an einem Zervixkarzinom zu erkranken, steigt um das bis zu 24fache beim Nachweis von HPV-DNA [Bosch 1992].

Entsprechend den Studien gehen etwa 15-20% der unbehandelten leichten Dysplasien (CIN 1) der Portio uteri in eine schwere Dysplasie (CIN 3) über und 5-10% in ein invasives Zervixkarzinom [Hillemanns 1997]. Etwa 75% der hochgradigen Dysplasien bzw. Carzinoma in situ (CIN 3) entwickeln sich zu einem Plattenepithelkarzinom der Zervix [Coppleson 1970].

Die primäre Prävention des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufe, die in der Einführung einer antiviralen Impfung gegen humane Papillomviren bestehen kann, weist in den Studien erste Erfolge auf, ist jedoch heutzutage noch nicht möglich. Ausgehend davon wird zur Zeit besonders hoher Wert auf das Krebsfrüherkennungsprogramm gelegt. Die Effektivität des Krebsfrüherkennungsprogramms des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen ist deutlich erkennbar an dem Rückgang von Inzidenz und Mortalität des invasiven Zervixkarzinoms, der Verschiebung zu niedrigen Stadien und der Verschiebung zu gehäuftem Auftreten von CIN bei wenigen invasiven Fällen [Pretorius

1991, Brenner 1990]. Das Krebsfrüherkennungsprogramm schließt die zytologische Untersuchungen und Kolposkopie ein.

Die Sensitivität und die Spezifität der Zytologie schwankt von 50-95% bzw. 80-90% [Fahey 1995, Soost 1991]. Hauptfaktoren, die im Laufe der zytologischen Untersuchungen falsch-negative Ergebnisse hervorrufen können, sind Fehler bei der Abstrichabnahme oder bei deren Bewertungen.

Die Sensitivität der Kolposkopie ist relativ hoch und beträgt 70-90% [Schneider 1988]. Ihre Spezifität erreicht nur 50-60% [Mitchel 1994, Reid 1990]. Es ist hinzuzufügen, dass diese Methode in der Differentialdiagnostik die erfolgreichsten Ergebnisse gebracht hat [Hillemanns 1997].

Die Wertigkeit der HPV-Diagnostik stellt sich in der modernen medizinischen Wissenschaft als nicht abschließend aufgeklärt dar, obwohl die HPV-Forschung zur Zeit einen großen Aufschwung erlebt. Bei einer Prävalenz von 10-15% HPV-DNS (Deutschland 5-8%) in der Population gegenüber einer Prävalenz von 3% CIN erscheint die Spezifität für ein generelles Screening ungenügend. Klinische Konsequenzen für die Routine sind zum jetzigen Zeitpunkt nur schwer zu ziehen. Die HPV-Typisierung eignet sich nicht zur Differenzierung zwischen CIN 1, CIN 2 und CIN 3, da auch die hoch onkogenen HPV-Typen (16, 18 u.a.) in beiden CIN Kategorien nachzuweisen sind. Allerdings sind sie signifikant häufiger bei CIN 2 und CIN 3. Allenfalls könnte beim Nachweis von hoch onkogener Virus-DNS (HPV 16/18 u.a.) eine Verkürzung des Kontrollzeitraums bzw. ein Vorziehen der therapeutischen Maßnahmen diskutiert werden.

Bei Persistenz oder Progression der CIN ist eine Behandlung indiziert. Die im deutschen Sprachraum vorherrschende Technik zur Behandlung der CIN ist die klassische Messerkonisation. Mehrere Studien konnten jedoch belegen, dass diese Methode mit einem statistisch signifikant erhöhten Risiko für Zervixinsuffizienz und Frühgeburtlichkeit einhergeht (siehe Tabelle 1.7.) [Hillemanns 1999c, Wright 1994]. Ein weiteres Problem ist die erhöhte perioperative Blutungsrate. Solche Nachteile weisen destruierende Methoden wie CO₂-Lasertherapie, Kryotherapie oder Kauterisation nicht auf [Lopes 1993]. Diese Verfahren konnten sich allerdings nicht etablieren.

Mit Photodynamischer Therapie unter Verwendung von einem Photosensibilisator können prinzipiell Dysplasien mit einer begrenzten Dicke, wie bei den zervikalen

Dysplasien anzutreffen, behandelt werden. Die Wirksamkeit dieser Therapie für zervikale Dysplasien ist zu prüfen. Es ist eine sehr große Akzeptanz seitens unserer Patientinnen zu erwarten, da die bisherige Alternative allein ein chirurgisches Verfahren mit Destruktion der Portio uteri darstellt.

Die Photodynamische Therapie unterscheidet sich von der Photodynamischen Diagnostik in erster Linie nur in der Zielsetzung. Während in der PDD nur die Detektion des veränderten Gewebes von Interesse ist, steht bei der PDT die Zerstörung des veränderten Gewebes im Vordergrund.

Einige durchgeführte Studien befassten sich mit der PDT der zervikalen intraepithelialen Neoplasie unter der Verwendung von 5-ALA.

Hillemanns et al. untersuchten die Applikation des 20%igen 5-ALA auf die Portio uteri mit einer Applikationszeit von 4-5 Stunden. Dabei wurde eine hohe PPIX-Fluoreszenz der Ektozervix und der Scheide beobachtet. Die Selektivität zwischen CIN-Läsionen und normaler Mukosa war in der Regel sehr gering. Die Intensität der PPIX-Fluoreszenz korrelierte nicht mit dem kolposkopischen Muster der Läsionen. Alle sieben Patientinnen zeigten keine Regression der höhergradigen CIN-Läsionen [Hillemanns 1999].

In der Studie von Monk et al. wurde die PDT nach einer Applikationszeit von 24 Stunden mit einer Energiedichte zwischen 100 und 140 J/cm² durchgeführt. Von 11 Patientinnen (73%) wiesen 8 nach topischer Applikation einer 1%igen Photofrinlösung eine komplette Remission der CIN-Läsionen auf [Monk 1997].

Pahernik et al. untersuchten mittels der Fluoreszenzmikroskopie die Pharmakokinetik und die Selektivität von 5-ALA induzierten Porphyrinen *ex vivo* an Konisationspräparaten von 14 Patientinnen. Für eine Applikationszeit zwischen 150 und 250 min und einer 5-ALA-Konzentration von 3% erhielten sie eine im Vergleich zur Fluoreszenz des gesunden umgebenen Plattenepithels 2-fach erhöhte Fluoreszenz der CIN 3 Läsionen. Die PPIX-Fluoreszenz der CIN 1 und CIN 2 Läsionen war nur um etwa das 1,3-fache erhöht [Pahernik 1998].

Löning untersuchte 22 Patientinnen mit einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie. Er führte ein bis vier Stunden präoperativ eine topische Applikation von 10%igem 5-ALA durch. Die Portio uteri wurde mit Licht einer Wellenlänge zwischen 400-450 nm beleuchtet. Durch diese Anregung zeigte sich makroskopisch eine deutliche Fluoreszenz

im Bereich des Drüsengewebes und der Vaginalschleimhaut. Dabei ließ sich keine klare Zuordnung zu kolposkopisch auffälligen Bezirken erkennen. Außerdem fanden sich keine signifikant höheren Fluoreszenzen in den CIN-Läsionen [Löning 1998].

Hillemanns et al. beobachteten bei der Durchführung der PDD eine spezifische PPIX-Fluoreszenz der CIN-Areale nach der Applikation des 1%igen 5-ALA und bei einer Applikationsdauer von 60-90 Minuten. Die Ergebnisse ihrer Fluoreszenzuntersuchungen zeigten eine hohe Sensitivität für den Nachweis von CIN 2, CIN 3, bei deutlich verbesserter Spezifität im Vergleich zur konventionellen Kolposkopie [Hillemanns 2000].

Basierend auf diesen zitierten Studiendaten ergibt sich, dass es keine einheitliche Empfehlung in Bezug auf die optimale Applikationsdauer und Dosis von 5-ALA bei der PDT gibt. Außerdem besteht ein Defizit an Information über die Pharmakokinetik und Selektivität von 5-ALA. Ein bis dato noch nicht adäquat gelöstes Problem stellt die Form der topischen Applikation des Photosensibilisators dar. Die bisher verwendeten Applikationsmethoden wie ein 5-ALA-flüssigkeitsgetränkter Tupfer oder Kieselgel als Trägersubstanz führten zu inhomogener Anreicherung von PPIX im Epithel (Pahernik et al.) bei nur mäßig reproduzierbarer Gesamtdosis vor der Potio uteri aufgrund der Leckage. Aus diesem Grund evaluierten wir ein thermolabiles Gel als Applikationsform mittels semiquantitativer, topografischer Fluoreszenzmikroskopie und quantitativer Fluoreszenzspektrometrie mit dem Ziel, die Pharmakokinetik und Selektivität von 5-ALA-Thermogel bei Patientinnen mit CIN zu bestimmen.

5.1. Einfluss der applizierten 5-ALA-Thermogel-Konzentration auf die PPIX-Fluoreszenzintensität

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der applizierten 5-ALA-Konzentration wurde in mehreren Studien *in vitro* untersucht.

Rossi et al. konnten für verschiedene gynäkologische Tumorzelllinien eine von der 5-ALA-Konzentration abhängige PPIX-Fluoreszenz nachweisen. Eine wesentliche Zunahme der PPIX-Fluoreszenz wurde bei der 5-ALA-Konzentration von 5mM erreicht [Rossi 1996, Weingandt 1995, Fukuda 1993, He 1993 a, He 1993 b]. Weingandt verwendete in seinen Untersuchungen für verschiedene

Harnblasenkarzinomzelllinien unterschiedliche 5-ALA-Konzentrationen. Damit konnte er eine Stagnation der PPIX-Fluoreszenz mit zunehmender Konzentration erzielen. Die nachgewiesene Sättigung könnte entweder eine Folge einer begrenzten 5-ALA-Aufnahme oder einer limitierten Konversion zu PPIX sein [Inuma 1994]. Auch das für die Umwandlung von 5-ALA in PPIX zuständige Enzymsystem hat wie alle anderen nur eine beschränkte Kapazität [Kennedy 1992].

Analog erwarten wir für die PPIX-Synthese in den CIN-Arealen einen Anstieg mit Erhöhung der Applikationskonzentration des 5-ALA-Thermogels. Aber mit Erreichen einer 5-ALA-Thermogel-Sättigung sollte die PPIX-Synthese nicht weiter ansteigen.

Je mehr PPIX im Gewebe vorhanden ist, desto stärker ist die Fluoreszenz nach Anregung durch Anregungslicht. Eine verbreitete Methode der Feststellung der PPIX-Fluoreszenzintensität ist die quantitative Spektrometrie [Fukuda 1993, Malik 1993, Bedwell 1992].

Nach der Bewertung der PPIX-Fluoreszenzintensität im Gefrierschnitt kann man auf die relative Konzentration des PPIX im Gewebe rückschließen und damit die optimale Dosis des 5-ALA-Thermogels bestimmen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, wie in der Abbildung 4.19. zu sehen ist, dass der Mittelwert der PPIX-Fluoreszenz nach der Applizierung des 10%igen 5-ALA-Thermogels mit 1523 w.E. am höchsten lag. Bei den Konzentrationen von 4% und 20% war der Mittelwert etwas geringer und betrug 1299 w.E. bzw. 1217 w.E. Es wurde keine statistisch signifikante Differenz zwischen den Mittelwerten festgestellt.

Beim Vergleich der PPIX-Fluoreszenzintensitäten bei verschiedenen Konzentrationen des 5-ALA-Thermogels unabhängig von der Applikationszeit wurde auch keine statistisch signifikante Differenz zwischen diesen Mittelwerten beobachtet (siehe Abbildung 4.18.).

Aufgrund dieser Ergebnisse empfehlen wir für die Durchführung der PDT 10%iges 5-ALA-Thermogel, bei dessen Applikation die maximale PPIX-Fluoreszenzintensität mit Berücksichtigung des Inkubationsintervalls nachgewiesen wurde.

5.2. PPIX-Fluoreszenzintensität bei CIN und bei normalem Plattenepithel

Die Ergebnisse der Untersuchungen der PPIX Fluoreszenzintensität im histologisch negativen und neoplastisch veränderten Gewebe zeigt Abbildung 4.10. Ausgehend davon wurde eine statistisch signifikante Differenz der PPIX-Fluoreszenzintensität zwischen CIN-Arealen der verschiedenen Grade (1116 w.E.) und dem normalen umgebenden Plattenepithel (704 w.E.) festgestellt ($p < 0,05$). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen CIN 1, CIN 2 und CIN 3 konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.11.). Die Resultate belegen eine relativ gut ausgeprägte Umwandlung von 5-ALA in PPIX im neoplastisch veränderten Plattenepithel nach der Applikation des 5-ALA-Thermogels. Darüber hinaus ergab sich eine im Vergleich zur Studie von Pahernik et al. homogene Fluoreszenz im Plattenepithel. Diese Ergebnisse sind besonders relevant für die Durchführung der PDT, da inhomogene PPIX-Anreicherung zu einer ineffektiven Elimination dysplastischer Zellen führen kann [Hillemanns 1999b].

5.3. Applikationsdauer und PPIX-Fluoreszenzintensität

Einige Studien befassen sich mit dem Nachweis der Zeitabhängigkeit der Porphyrinsynthese nach Zugabe von 5-ALA.

Der PPIX Gehalt des Gewebes wird durch das Zusammenwirken mehrerer Faktoren beeinflusst. Die Aufnahme von 5-ALA durch die Zellen, die Synthese von 5-ALA zu Häm oder auch die Retention der Porphyrine haben einen Einfluß auf die Kinetik der Porphyrinsynthese. Fuchs et al. demonstrierten an Fibrosarkomzellen mittels 5-ALA induzierter Fluoreszenz einen temperaturabhängigen Transport von 5-ALA in die Zelle. Erst ab 20°C wurde 5-ALA von den Zellen eingeschränkt aufgenommen. Eine Diffusion in die Zelle kann somit ausgeschlossen werden, eine rezeptorvermittelte Aufnahme erscheint offensichtlich [Fuchs 1994]. Moretti et al. bestätigten diese Ergebnisse. Sie erhielten für Hefezellen eine energieabhängige 5-ALA-Aufnahme, was sie mittels radioaktiv markiertem 5-ALA nachweisen konnten [Moretti 1993]. Eine beschleunigte 5-ALA-Aufnahme hätte zur Folge, daß das exogene 5-ALA zu einem früheren Zeitpunkt in die Häm-Biosynthese eintritt und somit PPIX schneller gebildet

würde. Eine erhöhte Synthese von PPIX zu Häm sowie eine gesteigerte Ausschleusung an gebildeten Porphyrinen würde einen schnelleren Rückgang der maximalen intrazellulären PPIX-Konzentration bewirken.

In *in vivo* und *in vitro* Studien wird ein linearer Anstieg der PPIX-Fluoreszenz in den ersten Stunden gezeigt. Weingandt konnte Fluoreszenz nach 5-ALA Applikation schon nach einem Zeitraum von 13 min. detektieren [Weingandt 1995]. Nach drei bis fünf Stunden wird ein Plateau der Fluoreszenz erreicht [Weingandt 1995]. Abhängig von der Applikationsmethode erfolgt ein Fluoreszenzmaximum nach vier bis sieben Stunden [Ash 1993]. Nach etwa 24 Stunden ist keine Photosensitivität mehr zu verzeichnen [Kennedy 1992].

In der vorliegenden Studie wurde die Abhängigkeit zwischen der PPIX-Fluoreszenzintensität und der Applikationsdauer demonstriert, was Abbildung 4.12. und Abbildung 4.13. veranschaulichen. Die Erhöhung der PPIX-Fluoreszenzintensität mit der Zeit unterscheidet sich zwischen der CIN und dem normalen umgebenden Plattenepithel. In den CIN-Fällen wurde ein linearer Anstieg der PPIX-Fluoreszenz bis zu einer Applikationsdauer 4-6 Stunden beobachtet. Obwohl der lineare Anstieg bei einer Applikationsdauer von 0,5 bis 2 Stunden auch beobachtet wurde, war die PPIX-Fluoreszenzintensität relativ niedrig. Ab einer Applikationsdauer von mehr als 6 Stunden sinkt die Fluoreszenzintensität kontinuierlich bis zur maximalen Applikationsdauer von 12 Stunden ab. Diese Ergebnisse zeigen, dass die maximale PPIX-Fluoreszenzintensität bei einem Inkubationsintervall von 4 bis 6 Stunden beobachtet wurde. Die in diesem Zeitabschnitt durchgeführte PDT dürfte eine maximale Effektivität haben.

In dem normalen Plattenepithel war der ausgeprägte lineare Anstieg nicht präsent. Dabei fehlte auch die PPIX-Fluoreszenz bei der Applikationsdauer von unter 2 Stunden und erreichte ihr Maximum bei der Applikationsdauer von 4 bis 6 Stunden. Bei weiterer Erhöhung der Applikationsdauer sank die PPIX-Fluoreszenz.

Für die Durchführung der PDT ist nicht nur die Applikationsdauer mit dem Maximum der PPIX-Fluoreszenz von großer Bedeutung, sondern auch das Zeitintervall, während dem ein maximaler Kontrast (Tumorselektivität) zwischen CIN-Arealen und dem normalen umgebenden Plattenepithel erreicht wird. Die Tumorselektivität des Photosensibilisators wird definiert als Ratio zwischen PPIX-Fluoreszenzintensität von

CIN zu Normalgewebe. Für die PDT bedeutet dies einen verbesserten therapeutischen Effekt bei geringerer Destruktion von normalem Gewebe.

In den durchgeführten Untersuchungen dauerte diese Phase ungefähr 2-6 Stunden unabhängig vom Schweregrad der CIN (siehe die Abbildungen 4.14, 4.15. und 4.16.). Der Unterschied bestand in den absoluten Werten des Ratios der PPIX-Fluoreszenzintensität zwischen CIN und normalem Plattenepithel: CIN 3/CIN 0 = 2,21; CIN 2/CIN 0 = 1,94; CIN 1/CIN 0 = 1,35 (siehe die Abbildung 4.17.). Zwischen den Mittelwerten bei CIN 1 ($1,35 \pm 0,18$) und bei CIN 3 ($2,21 \pm 0,56$) wurde eine statistisch signifikante Differenz festgestellt ($p < 0,05$). Die maximale Tumorselektivität wurde bei CIN 3 und bei einer Applikationsdauer von 3 bis 4 Stunden registriert und betrug ca. 4. In der Studie von Pahernik et al., bei der als ein lokaler Photosensibilisator die 5-ALA-Kieselgel-Lösung verwendet hat, betrug die Tumorselektivität nur ca. 2.

Dieses Ergebnis weist auf die besseren Eigenschaften der hochgradigen CIN hin, 5-ALA zu speichern und in PPIX umzuwandeln. Für die Umsetzung in die Klinik könnte dies bedeuten, dass eine höhere Effektivität der PDT bei hochgradiger CIN gegenüber der niedriggradigen CIN zu erwarten ist sowie eine verbesserte Tumorselektivität nach der topischen Applikation des 5-ALA-Thermogels im historischen Vergleich zu der 5-ALA-Kieselgel-Lösung.

5.4. Semiquantitative, topografische Fluoreszenzmikroskopie bei CIN und bei normalem Plattenepithel der Portio uteri

Die Fluoreszenzmikroskopie sowie die Fluoreszenzspektrometrie ermöglichen die Feststellung der PPIX-Fluoreszenz. Wie jede Methode weisen sie ihre eigenen Vor- und Nachteile auf. Die semiquantitative, topografische Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Bewertung der PPIX-Fluoreszenzintensität in den einzelnen Schichten des Plattenepithels der Portio uteri. Das Plattenepithel der Portio uteri wurde für diese Studie in 3 Schichten eingeteilt (siehe Kapitel 4.3.2. Fluoreszenzmikroskopie).

Zu den Nachteilen dieser Methode gehört die Subjektivität der Bewertung der PPIX-Fluoreszenzintensität. (siehe Kapitel 3.3. Verlauf der Untersuchungen).

Die Ergebnisse, die Tabelle 4.1. und Abbildung 4.20. veranschaulichen, weisen darauf hin, dass die PPIX-Fluoreszenz in den CIN-Arealen ($5,04 \pm 0,87$) intensiver ist als in den

Arealen des normalen umgebenden Plattenepithels ($3,36 \pm 0,73$). Diese so festgestellte Differenz ist statistisch signifikant ($p < 0,05$). Es wurde aber keine statistisch signifikante Differenz zwischen CIN 1, CIN 2, CIN 3 erzielt.

Die Ergebnisse der semiquantitativen, topografischen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen entsprechen den Ergebnissen der quantitativen Fluoreszenzspektrometrie. (siehe Kapitel 4.3.1.) Dieses Resultat zeugt von der Kongruenz zwischen der subjektiven und der quantitativen Methode.

Bei der Analyse der PPIX-Fluoreszenzverteilung in den verschiedenen Schichten des Plattenepithels konnte eine maximale PPIX-Fluoreszenzintensität in den tieferen Schichten des Plattenepithels belegt werden, die in oberen Schichten niedriger ist (siehe Tabelle 4.1.). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass sich bei CIN die Zellen mit verschobener Kern-Plasma-Relation und höherer Zelldichte vorwiegend in den unteren Schichten des Plattenepithels der Portio uteri befinden. Dadurch könnte eine höhere Fluoreszenz in der Mikroskopie resultieren. Was das normale Plattenepithel betrifft, so bestehen seine unteren Schichten aus den basalen und parabasalen Zellen, die durch proliferierende Aktivität gekennzeichnet sind. Aus diesem Grund wandelt sich offenbar 5-ALA aktiv in das fluoreszierende PPIX um. Dementsprechend ist die PPIX-Fluoreszenzintensität in den unteren Schichten der Portio uteri bei der CIN und im normalen Plattenepithel viel ausgeprägter als in den anderen Schichten. Inwieweit dies zu einer verbesserten Suszeptibilität bei der Photodynamischen Therapie unter klinischen Gesichtspunkten führt, bleibt abzuwarten.

5.5. Das 5-ALA-Thermogel als lokal applizierter Photosensibilisator

Aufgrund der durchgeführten Studie hat sich das 5-ALA-Thermogel im Vergleich zu anderen Applikationsformen von 5-ALA als vorteilhaft erwiesen.

Das 5-ALA-Thermogel bildet bei normaler Raumtemperatur eine flüssige Lösung. Es kann mit der Zervixkappe oder mit einem Tupfer leicht an der Portio uteri aufgetragen werden. Durch die Gewebetemperatur erfolgt dann die Umwandlung zum Gel. Das Gel führt zu einer besseren Aufrechterhaltung einer hohen lokalen 5-ALA-Konzentration als Auftragung einer flüssigen Präparation. Letztere halten sich, selbst unter Verwendung

einer Zervixkappe zur verbesserten Retention der Lösung an der Portio uteri, nur begrenzt am Applikationsort.

Im Vergleich zur ähnlich konzipierten Studie von Pahernik et al., bei der die 5-ALA-Kieselgel-Lösung als Photosensibilisator verwendet wurde, zeigt 5-ALA-Thermogel homogene PPIX-Anreicherung in den dysplastisch veränderten Geweben und eine verbesserter Tumorselektivität. Diese Ergebnisse sind besonders relevant für die Durchführung der PDT, da eine homogene PPIX-Anreicherung und eine verbesserte Tumorselektivität des 5-ALA-Thermogels zu einer effektiven und selektiven Elimination dysplastischer Zellen führen können. Die verbesserte Retention von 5-ALA-Thermogel an der Portio und die Zervixkappe verhindern die Ausdehnung der 5-ALA an die Scheidewände. Dadurch wird die Phototoxizität mit Brennen der Vagina bei der PDT vermieden.

6. Zusammenfassung

Die photodynamische Diagnostik und Therapie sind relativ neue Methoden zur Detektion und Behandlung von CIN-Läsionen. Sie erfolgen nach Applikation einer photosensibilisierenden Substanz vor der Portio und einer Illumination mittels Laserlicht einer definierten Wellenlänge. In den von uns durchgeführten Untersuchungen wurde als photosensibilisierende Substanz 5-ALA-Thermogel verwendet. Diese Präparation geht bei mehr als +31° C in einen gelartigen Zustand über. Die Lösung wird unter Zuhilfenahme einer Zervixkappe aufgebracht. Durch die Gewebetemperatur erfolgt dann die Umwandlung zum Gel.

Das Ziel der Untersuchungen war die Feststellung der optimalen Applikationsdauer und der optimalen Applikationsdosis für die Durchführung der photodynamischen Therapie (PDT) bei Patientinnen mit Zervixdysplasie (CIN 1-3).

Im Zeitabschnitt zwischen Dezember 2001 und April 2002 wurden 27 nicht schwangere Patientinnen mit zytologisch bzw. histologisch nachgewiesener CIN 1, CIN 2 und CIN 3 nach Beachtung von Einschluss- und Ausschlusskriterien in die Studie einbezogen. 0,5 bis 12 Stunden vor therapeutischer Konisation wurden 10 ml eines 4%, 10% oder 20%igen 5-ALA-Thermogels auf die Portio uteri aufgetragen. Weiterhin wurden bei allen Patientinnen Biopsien entnommen, die histologisch untersucht wurden. Die Biopsien von 25 Patientinnen wurden der semiquantitativen, topografischen Fluoreszenzmikroskopie und der quantitativen Fluoreszenzspektrometrie unterzogen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die PPIX-Fluoreszenz ihr Maximum bei der Applikation von 10%igem 5-ALA-Thermogel und einem Inkubationsintervall von über 2 Stunden erzielt. Eine höhere Konzentration des 5-ALA-Thermogels verursachte keinen weiteren Anstieg der PPIX-Fluoreszenzintensität. Aufgrund dieser Ergebnisse empfehlen wir für die PDT 10%iges 5-ALA-Thermogel, das eine maximale PPIX-Sättigung (PPIX-Fluoreszenzintensität) im Gewebe ergibt und dadurch eine maximale Effektivität für die Therapie erwarten lässt.

Es sollte jedoch für eine PDT nicht nur eine maximale PPIX-Sättigung im Gewebe erzielt werden, sondern auch eine entsprechend hohe Selektivität nur für dysplastisch veränderte Zellen. In dieser Studie wurde eine statistisch signifikante höhere PPIX-Fluoreszenzintensität in den CIN-Arealen festgestellt im Vergleich zum normalen

umgebenden Plattenepithel ($p < 0,05$). Dies weist auf eine relativ selektive Aufnahme bzw. Konversion von 5-ALA bzw. Protoporphyrin IX aus Thermogel ins CIN-Gewebe hin. Eine statistisch signifikante Differenz zwischen CIN 1, CIN 2 und CIN 3 wurde nicht beobachtet.

Nach 4-6 Stunden war eine maximale PPIX-Fluoreszenzintensität im dysplastischen Epithel zu detektieren. Aber auch im normalen Epithel fand sich eine wenn auch schwächere Fluoreszenz mit Maximum ebenfalls nach 4 bis 6 Stunden. Es wird postuliert, dass das Ansprechen auf eine PDT mit der maximalen Fluoreszenz korreliert. Daher wird für den klinischen Einsatz des 5-ALA-Thermogels ein Inkubationsintervall von 4 bis 6 Stunden empfohlen. In diesem Zeitabschnitt dürfte die durchgeführte PDT maximale Effektivität haben.

Die für eine selektiv wirkende PDT relevante Inkubationszeit, nach der eine maximale Fluoreszenz-Ratio zwischen verändertem und gesundem Gewebe zu erzielen ist (Tumorselektivität) betrug 2-6 Stunden, unabhängig vom Schweregrad der CIN. Die Tumorselektivität des Photosensibilisators ist ein wichtiges Kriterium für die PDT, weil hierdurch eine selektive Therapie dysplastischer Areale unter weitgehender Schonung der gesunden Schleimhaut erwartet werden darf. Bei Analyse der stadienabhängigen Fluoreszenzratio zum normalen Gewebe zeigte sich, dass die maximale Tumorselektivität von ca. 4 bei Patientinnen mit CIN 3 nach einer Inkubation von 3-4 Stunden beobachtet wurde und gegenüber CIN 1 signifikant erhöht war. Im Vergleich zur Studie von Pahernik et al., der mit 5-ALA-Kieselgel-Lösung eine inhomogene PPIX-Fluoreszenz und eine wesentlich geringere Tumorselektivität nachgewiesen hat, konnten wir in unserer Studie belegen, dass das 5-ALA-Thermogel wohl zu einer besseren Aufrechterhaltung hoher lokaler ALA-Konzentration vor der Portio uteri führt. Das dürfte eine höhere Effektivität der PDT im klinischen Setting und eine verbesserte Selektivität bei Patientinnen mit hochgradiger CIN ergeben.

In der semiquantitativen, topografischen Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich eine statistisch signifikante Differenz in der PPIX-Fluoreszenzausprägung zwischen der CIN 1-3 und dem normalen umgebenden Plattenepithel ($p < 0,05$). Diese Ergebnisse stimmen mit den Studienergebnissen der quantitativen Fluoreszenzspektrometrie gut überein und bestätigen die Kongruenz der subjektiven mit der quantitativen Methode.

Ziel dieser Arbeit war es, die Pharmakokinetik von 5-ALA-Thermogel zu beurteilen im Hinblick auf einen klinischen Einsatz der 5-ALA PDT bei Patientinnen mit CIN. Aufgrund dieser fluoreszenzmikroskopischen und spektroskopischen Ergebnisse empfehlen wir für die PDT die Verwendung von 10%igem 5-ALA-Thermogel mit einem Zeitintervall von 4-6 Stunden.

7. Literaturverzeichnis

Al-Nafussi, A., Rebello, G., et al.: The assessment of PCNA immunostaging in the uterine cervix and cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*, 3, 154-158, 1993

Andersson-Engels, S., Beart, L., Berg, R., D'Hallewin, M. A., Johansson, J., Stenram, U., Svanberg, K., Svanberg, S.: Fluorescence characteristics of atherosclerotic plaque and malignant tumors. In: *Optical Methods for Tumor Treatment and Early Diagnosis: Mechanisms and Techniques*, SPIE 1426, 31-43, 1991

Ash, D.V., Brown, S.B.: New drugs and future developments in photodynamic therapy. *Eur. J. Cancer* 29A, 1781-1783, 1993

Averette, H., Weinstein, G., Frost, P.: Autoradiographic analysis of cell proliferation kinetics in human genital tissues. Normal cervix and vagina. *Am J Obstet Gynecol*, 68, 8-17, 1970

Barron, B.A., Richart, R.M.: A statistical model of the natural history of cervical carcinoma. II. Estimates of the transition from dysplasia to carcinoma in situ. *J. Natl. Cancer Inst.* 45, 1025, 1970

Battle, A.M.: Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy - a model for carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B* 20, 5-22, 1993

Baumgartner, R., Kriegmair, M., Hofstetter, A.: *Fluoreszenzdiagnostik des Harnblasenkarzinoms*. Endo-Press, Tuttlingen, 1999

Bedwell, J., MacRobert, A.J., Phillips, D., Bown, S.G.: Fluorescence distribution and photodynamic effect of ALA-induced PPIX in the DMH rat colonic tumour model. *Br. J. Cancer* 65, 818-824, 1992

Benson, R.C., Meyer, R.A., Zaruba, M.E., McKhann, G.M.: Cellular Autofluorescence - Is it Due to Flavins? *J. Histochem. Cytochem.* 27/1, 44-48, 1979

Berchuck, A., Rodriguez, G., Kamel, A., et al.: Expression of epidermal growth factor receptor and HER-2/Neu in normal and neoplastic cervix, vulva and vagina. *Obstet Gynecol.* 76, 381-387, 1990

Bernard, H., Chan, S., Manos, M.: Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms, *J. Infect. Dis.*, 170, 1077-1085, 1994

Boegheim, J.P.J., Lagerberg, J.W.M., Dubbelman, T. M. A. R., Tussen, K., Tanke, H.J., Van Der Meulen, J., Van Steveninck, J.: Photodynamic effects of hematoporphyrin derivative on the uptake of rhodamine 123 by mitochondria of intact murine L929 fibroblasts and chinese hamster ovary K1 cells. *Photochem. Photobiol.* 48, 613-620, 1988

Bonnet, R., Berenbaum, M.: Porphyrins as photosensitizers. In: *Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use* (Eds.: Bock, G., Harnett, S.), John Wiley & Sons, Chichester, 40-49, 1989

Boost, H., Bockmühl, B., Zock, H.: Results of cytologic mass screening in the Federal Republic of Germany. *The international Academy of Cytology*, 1981

Bosch, F., Munoz, N., de San Jose, S., et al.: Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer.* 52, 750-758, 1992

Bottiroli, G., Croce, A.C., Ramponi, R., Vaghi, P.: Distribution of di-sulfonated aluminium phthalocyanine and photofrin II in living cells: a comparative fluorometric study. *Photochem. Photobiol.* 55, 575-585, 1992

Brenner, H., Wiebelt, H., Ziegler, H.: Fortschritte in der Früherkennung des Zervixkarzinoms aus der Sicht des saarländischen Krebsregisters. *Gynecol. Oncol.* 42, 48-53, 1990

Campbell, I., Dwek, R.: *Biological Spectroscopy*. Benjamin Cummings, Menlo Park, CA, 1984

Champion, M.J., McCance, D.J., Cuzick, J., Singer, A.: Progressive potential of mild cervical atypia: Prospective cytological, colposcopic and virologic study. *Lancet*: II. 237-240, 1986

Charlesworth, P., Truscott, T.G.: The use of 5-aminolevulinic acid (ALA) in photodynamic therapy (PDT). *J. Photochem. Photobiol. B.* 18, 99-100, 1993

Coppleson M.: The origin and nature of premalignant lesions of the cervix uteri. *Intl. J. Gynecol Obstet*, 8, 539, 1970

Cramer, D. W.: The role of cervical cytology in declining morbidity and mortality of cervical cancer. *Cancer* 34, 2018-2027, 1974

Cuzick, J., Szarewski, A., Terry, G., Ho, L., Hanby, A., Maddox, P. et. al.: Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet*, 345, 1533-1536, 1995

de Villiers, E., Wagner, D., Schneider, A., et al.: Human papillomavirus infections in women with und without abnormal cervical cytology. *Lancet*, I, 703-706, 1987

Dougherty, T.J.: Yearly Review: Photosensitizers: Therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.* 45, 879-889, 1987

Fahey, M., Irwig, T., Macaskill, P.: Meta Analysis of pap test accuracy. *Am. J. Epidemiol.* 141, 680-689, 1995

Fand S.: The histochemistry of human cervical epithelium. In: Blandau, R., Moghissi, K. The biology of the cervix. University of Chicago Press, Chicago, 103-124, 1973

Feldman, D., Romney, S., Edgecomb, J., et al.: Ultrastructure of normal, metaplastic and abnormal human uterine cervix: use of montages to study the topographical relationship of epithelial cells, 150, 573-688, 1984

Fuchs, C., Siegert, J., Wessels, J.M.: In vitro Untersuchungen zur Aufnahme von 5-ALA und Retention von Protoporphyrin IX. Abstrakt, 1. Münchner ALA-Workshop, 1994

Fujiwara, H., Tortolero-Luna, G., Mitchell M., et al.: Adenocarcinoma of the cervix. Expression and clinical significance of estrogen and progesterone receptors. *Cancer*, 79, 505-512, 1997

Fukuda, H., Batlle, M.C., Riley, P.A.: Kinetics of porphyrin accumulation in cultured epithelial cells exposed to ALA. *Int. J. Biochem.* 25, 1407-1410, 1993

Girotti, A.W., Deziel, M.R.: Photodynamic action of protoporphyrin on resealed erythrocyte membranes: mechanisms of release of trapped markers. In: Porphyrin photosensitization, (Eds.: Kessel, D., Dougherty, J.T.), Plenum Press, New York, 213-225, 1983

Gissmann, L., Zur Hausen, H.: Partial: characterisation of viral DNA from genital warts. *Int. J. Cancer*, 25 605-609, 1980

Goff, B.A., Bachor, R., Kollias, N., Hasan, T.: Effects of photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid on normal skin of hairless guinea pigs. *J. Photochem. Photobiol. B* 15, 239-251, 1992

Graham, S.: Epidemiology of retinoids and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 73, 1423, 1984

Gross, G., Barraso, R.: *Human Papilloma Virus Infection: A clinical Atlas*, Berlin - Wiesbaden, Ullstein Mosby GmbH & Co KG, 1997

Gross, G., Ikenberg, H., Gissmann, L., Hagedorn, M.: Papillomavirus infection of the anogenital tract: correlation between histology, clinical picture and virus type. Proposal of new nomenclature. *J. Invest. Dermatol.*, 85, 147-152, 1985

Gross, G., Pfister, H., Hagedorn, M., Gissmann, L.: Correlation between human papillomavirus type and histology of warts. *J. Invest. Dermatol.*, 78, 160-164, 1982

He, D., Karas, E., Sassa, S., Lim, H.W.: Porphyrin synthesis by murine epidermal cells. *Skin Pharmacol.* 6, 20-25, 1993 a

He, D., Sassa, S., Lim, H.W.: Effect of UVA and blue light on porphyrin biosynthesis on epidermal cells. *Photochem. Photobiol.* 57, 825-829, 1993 b

Heil, P., Stocker, S., Sroka, R., Baumgartner, R.: In vivo kinetics of porphyrins following intravesical instillation of 5-aminolaevulinic acid in normal and tumour-bearing rat bladders. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 38 (2-3), 158-163, 1997

Henderson, B.W., Dougherty, T.J.: How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* 55, 145-157, 1992

Henderson, B.W., Bellnier, D.A.: Tissue localisation of photosensitizers and the mechanism of photodynamic tissue destruction. In: *Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use*, (Eds.: Bock, G., Harnett, S.), John Wiley & Sons, Chichester, 112-130, 1989

Hillemanns, P., Weingandt, H., Baumgartner, R., Diebold, J., Xiang, W., Stepp, H.: Photodetection of cervical intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Cancer*, 88, 2275-2282, 2000

Hillemanns, P., Kimmig, R., Hüttemann, U., Dannecker, C., Thaler, C.J.: Screening for cervical neoplasia by self assessment for human papilloma virus DNA. *Lancet*, 354,1970, 1999 a

Hillemanns, P., Korell, M., Schmitt-Sody, M., Baumgartner, R., Beyer, W., Kimmig, R., Untch, M., Hepp, H.: Photodynamic therapy in women with cervical intraepithelial neoplasia using topically applied 5-aminolevulinic acid. *Int. J. Cancer* 0, 1-5, 1999 b

Hillemanns, P., Landsmann, H., Kimmig, R.: Behandlung der Zervixdysplasien. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Zervixkarzinom, 31-40, München 1999 c

Hillemanns, P., Thaler, C., Kimmig, R.: Epidemiologie und Diagnostik der zervikalen intraepithelialen Neoplasie: Ist das derzeitige Konzept von Screening und Diagnostik noch aktuell? *Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch* 37, 179-190, 1997

Hillemanns, P., Ellerbrock, T., McPhillips, S., Dole, P., Alperstein, S., Johnson, D., Sun, X., Chiasson, M., Wright, T.: Prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cytological abnormalities in HIV-seropositive women. *AIDS*, 14, 1641-1649, 1996

Hung, J., Lam, S., LeRiche, J.C., Palcic, B.: Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue. *Laser-Surg-Med* 11(2), 99-105, 1991

Iinuma, S., Farshi, S.S., Ortel, B., Hasan, T.: A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *Br. J. Cancer* 70, 21-28, 1994

Irwin, K., Rosero-Bixby, L., Oberle, M.: Oral contraceptives and cervical cancer risk in Costa Rica: Detection bias or casual association? *JAMA*, 259, 59-64, 1988

Jones, H.: Cone biopsy and hysterectomy in the management of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gyneacol*, 9, 221-236, 1995

Kanofsky, J.R.: Quenching of singlet oxygen by human plasma. *Photochem. Photobiol.* 51, 299-303, 1990

Kennedy, J.C., Pottier, R.H.: Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B* 14, 275-292, 1992

Kessel, D.: Sites of photosensitization by derivatives of hematoporphyrin. *Photochem. Photobiol.* 44, 489-493, 1986

Koss, L. G.: The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. *J. Am. Med. Assoc* 261(5), 737-743, 1989

Lakowicz, J.: Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum, New York, 1985

Lin, C.: Photodynamic Therapy of malignant tumours - recent developments. *Cancer Cells* 3, 437-444, 1991

Loh, C.S., Bedwell, J., MacRobert, A.J., Krasner, N., Phillips, D., Bown, S.G.: Photodynamic therapy of the normal rat stomach: a comparative study between di-sulphonated aluminium phtalocyanine and 5-aminolaevulinic acid. *Br. J. Cancer* 66, 452-462, 1992

Löning, M., Hüttmann, G., Diddens, H., Bauer, O., Diedrich, K.: Photodynamische Diagnostik cervikaler Dysplasien nach topischer Applikation von 5-

Aminolävulinsäure (ALA). Archives of Gynaecology and Obstetrics 261 supplement 1, 102, 1998

Lopes, A., Morgan, P., Murdoch, J., Piura, B., Mohaghan, J.: The case for conservative management of "incomplete excision" of CIN after laser conisation. Gynecol Oncol, 49, 247-249, 1993

Lorincz, A.T., Reid, R., Jenson, A.B., Greenberg, M.D., Lancaster, W., Kurman, R.J.: Human papillomavirus infection of the cervix: Relative risk associations of 15 common anogenital types. Obstet. Gynecol. 79, 328-337, 1992

Maaßen, V., Baltzer, J.: Malignome der Cervix uteri. In: Gynäkologische Onkologie, (Eds.: Bender, H. G.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 176-181, 1991

MacRobert, A.J., Bown, S.G., Phillips, D.: What are the ideal photoproperties for a sensitizer? In: Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use, (Eds.: Bock, G., Harnett, S.), John Wiley & Sons, Chichester, 4-16, 1989

Malik, Z., Babushkin, T., Sher, S., Hanania, J., Ladan, H., Nitzan, Y., Salzberg, S.: Collapse of K^+ and ionic balance during photodynamic inactivation of leukemic cells, erythrocytes and *staphylococcus aureus*. Int. J. Biochem. 25, 1399-1406, 1993

Manos, M., Ting, Y., Wright, D., Lewis, A., Broker, T., Wolinsky, S.: Use the polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. Cancer Cells, 7, 209-214, 1989

Meisels, A., Fortin, R.: Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytological patterns. Acta. Cytol., 20, 505-509, 1976

Michaeli, A., Feitelson, J.: Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. Photochem. Photobiol. 59, 284-289, 1994

- Mitchell, M.: Accuracy of colposcopy. *Consult Obstet Gynecol*, 6, 70-73, 1994
- Moan, J., Berg, K.: Photochemotherapy of cancer: experimental research. *Photochem. Photobiol.* 55, 931-948, 1992
- Moan, J., Berg, K., Western, A., Malik, Z., Rück, A., Schneckenburger, H.: Intracellular localisation of photosensitizers. In: *Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use*, (Eds.: Bock, G., Harnett, S.), John Wiley & Sons, Chichester, 95-111, 1989
- Modrow, S., Falke, D.: Aufbau der Papillomviren, in *Spectrum: Molekulare Virologie*. Spectrum, 374-390, 1997
- Monk, B.J., Brewer, C., Van Nostrand, K., Berns, M.W., McCullough, J.L., Tadir, Y., Manetta, A.: Photodynamic therapy using topically applied dihematoporphyrin ether in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol-Oncol.* 64(1), 70-75, 1997
- Moretti, M.B., Garcia, S.C., Stella, C., Ramos, E., Battle, C.: δ -aminolevulinic acid transport in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Int. J. Biochem.* 25, 1917-1924, 1993
- Navone, N.M., Polo, C.F., Frisardi, A.L., Andrade, N.E., Battle, A.M.: Heme biosynthesis in human breast cancer - mimetic „*in vitro*“ studies and some heme enzymic activity levels. *Int. J. Biochem.* 22, 1407-1411, 1990
- Noodt, B.B., Kvam, E., Steen, H.B., Moan, J.: Primary DNA damage, HPRT mutation and cell inactivation photoinduced with various sensitizers in V79 cells. *Photochem. Photobiol.* 58, 541-547, 1993
- Ortel, B., Tanew, A., Hönigsmann, H.: Lethal photosensitization by endogenous porphyrins of PAM cells - modification by desferrioxamine. *J. Photochem. Photobiol. B* 17, 273-278, 1993

Pahernik, S.A., Botzlar, A., Hillemanns, P., Dellian, M., Kirschstein, M., Abels, C., Korell, M., Mueller-Hoecker, J., Untch, M., Goetz, A.E.: Pharmacokinetics and selectivity of aminolevulinic acid-induced porphyrin synthesis in patients with cervical intra-epithelial neoplasia. *Int. J. Cancer* 78, 310-314, 1998

Pandey, R.K., Bellnier, D.A., Smith, K.M., Dougherty, T.J.: Chlorin and porphyrin derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 53, 65-72, 1991

Pretorius, R., Semrad, N., Watring, W., Fotheringham, N.: Presentation of cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 42, 48-53, 1991

Ramanujam, N., Mitchell, M. F., Mahadevan, A., Warren, S., Thomsen, S., Silva, E.: *In vivo* diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 10193-10197, 1994

Rawls, W., Tomkins, W., Figeroa, M., Melnick, J.: Herpes simplex virus type 2: Association with carcinoma of the cervix. *Science*, 161, 1255-1256, 1968

Rebeiz, N., Rebeiz, C.C., Arkins, S., Kelley, K.W., Rebeiz, C.A.: Photodestruction of tumour cells by induction of endogenous accumulation of protoporphyrin IX: Enhancement by 1,10-Phenanthroline. *Photochem. Photobiol.* 55, 431-435, 1992

Reid, R.: Colposcopy of cervical preinvasive neoplasia. In: Singer A, editor. *Premalignant lesions of the lower genital tract. Volume 2.* New York: Elsevier, 87-116, 1990

Ricchelli, F., Jori, G., Gobbo, S., Tronchin, M.: Liposomes as models to study the distribution of porphyrins in cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1065, 42-48, 1991

Ricchelli, F., Jori, G., Moreno, G., Vinzens, F., Salet, C.: Factors influencing the distribution pattern of porphyrins in cell membranes. *J. Photochem. Photobiol. B* 6, 69-77, 1990

Richards-Kortum, R., Rava, R., Baraga, J., Fitzmaurice, M., Kramer, J., Feld, M.: *Optronic techniques in diagnostic and therapeutic medicine*. Hrsg.: Pratesi, R., Plenum, New York, 1990

Riesenberg, R., Fuchs, C., Kriegmair, M.: Photodynamic effects of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins on human bladder carcinoma cells *in vitro*. *Eur. J. Cancer* 32A(2), 328-334, 1996

Romney, S., Palan, P., Dattagupta, C., Wasertheil-Smoller, S., Wylie, J., Miller, G., Slagle, N., Lucido, D.: Retinoids and the prevention of cervical dysplasias. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 141, 890-894, 1981

Rossi, F.M., Campbell, D.L., Pottier, R.H., Kennedy, J.C., Gudgin Dickson, E.F.: *In vitro* studies on the potential use of 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy for gynaecological tumours. *Br. J. Cancer* 74, 881-887, 1996

Schiffman, M., Herrero, R., Hildesheim, A., Sherman, M., Bratti, M., Wachholder, S., Alfaro, M., Hutchinson, M., Morales, J., Greenberg, M., Lorincz, A.: HPV DNA testing in cervical cancer screening. Results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA*, 5, 283; 87-93, 2000

Schiffman, M., Kiviat, N., Burk, R., Shah, K., Daniel, R., Lewis, R., Kuypers, J., Manos, M., Scott, D., Sherman, M., et. al.: Accuracy and interlaboratory reliability of human papillomavirus DNA testing by hybrid capture. *J. Clin. Microbiol.* 33, 545-550, 1995

Schiffman, M., Bauer, H., Hoover, R., et. al.: Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85, 958, 1993

Schmidt-Matthiesen, H., Bastert, G.: *Gynäkologische Onkologie*. Schattauer, Stuttgart New York, 1995

Schneider, A., Sterzik, K., Buck, G., De Villiers, E.: Colposcopy is superior to cytology for the detection of early genital human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol* 71, 236-241, 1988

Schomacker, K.T., Frisoli, J.K., Compton, C.C., Flotte, T.J., Richter, J.M., Nishioka, N.S., Deutsch, T.F.: Ultraviolet Laser-Induced Fluorescence of Colonic Tissue: Basic Biology and Diagnostic Potential. *Laser. Surg. Med.*12, 63-78, 1992

Shulok, J.R., Wade, H.M., Lin, C.: Subcellular localisation of hematoporphyrin derivative in bladder tumour cells in culture. *Photochem. Photobiol.* 51, 451-457, 1990

Soost, H.J., Lange, H.J., Lehmacher, W., Ruffing-Kullmann, B.: The validation of cervical cytology - Sensitivity, specificity and predictive value. *Acta Cytol.* 35, 8-14, 1991

Stryer, L.: Biosynthese der Aminosäuren und des Häms. In: *Biochemistry*, (Eds.: Stryer, L.), Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, New York 601, 1991

Sun, X., et. al.: Human Papillomavirus infection in women infected with the Human Immunodeficiency Virus. *N. Engl. J. med.*, 337, 1343-1349, 1997

Syverton, J., Berry, G.: Carcinoma in the cottontails rabbit following spontaneous virus papilloma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 33, 399-400, 1935

Szeimies, R.M., Abels, C., Fritsch, C., Steinbach, P., Goerz, G., Goetz, A., Baumgartner, R., Landthaler, M.: Wavelength dependency of photodynamic effects after sensitisation with 5-aminolevulinic acid *in vitro* and *in vivo*. J. Invest. Dermatol. 105(5), 672-677, 1995

Szeimies, R.M., Landthaler, M.: Mit Licht gegen Krebs: Ein neues Behandlungskonzept für Tumoren der Haut. Blick in die Wissenschaft (Forschungsmagazin der Universität Regensburg) 5, 22-29, 1994

Takemura, T., Nakajima, S., Sakata, I.: Tumour-localising fluorescent diagnostic agents without phototoxicity. Photochem. Photobiol. 59, 366-370, 1994

Torinuki, W., Miura, T., Seiji, M.: Lysosome destruction and lipoperoxide formation due to active oxygen generated from hematoporphyrin and UV irradiation. Br. J. Dermatol. 102, 17-27, 1980

Vo-Dinh, T., Panjehpour, M., Overholt, B.F., Farris, C., Buckley, F.P., Sneed, R.: In Vivo Cancer Diagnosis of the Esophagus Using Differential Normalized Fluorescence (DNF) Indices. Laser-Surg-Med 16, 41-47, 1995

Vonka, V., Kanka, J., Hirsch, I., Zavadova, H., Krcmar, M., Suchankova, A., Rezacova, D., Broucek, J., Press, M., Domorazkova, E., Svoboda, B., Havrankova, A., Jelinek, J.: Prospective study on the relationship between cervical neoplasia und herpes-simplex-type-2 virus. Int. J. Cancer, 33, 49-60, 1984

Walboomers, J., Jacobs, M., Manos, M., Bosch, F., Kummer, J., Shan, K., Snijders, P., Peto, J., Meier, C., Munoz, N.: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J. Pathol., 189, 12-19, 1999

Weingandt, H.: *In vitro* Fluoreszenzuntersuchungen des endogenen Photosensibilisators Protoporphyrin IX. Diplomarbeit am Institut für Pathologie der Universität Regensburg, 1995

Wright, T., Koulos, J., Schnoll, F., et al.: Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus: outcome after loop electrosurgical excision. *Gynecol Oncol*, 55, 253-258, 1994

Wright, T., Sun X.: Anogenital papilloma infection and neoplasia in immunodeficient women. *Obstet. Gynecol. Clin. North. AM.*, 23, 861-895, 1996

Yang, J.Z., Vugt, van D.A., Kennedy, J.C., Reid, R.L.: Intrauterine 5-aminolevulinic acid induces selective fluorescence and photodynamic ablation of the rat endometrium. *Photochem. Photobiol.* 57, 803-807, 1993

Yu, D., Chang, S., Ma, C.: The effect of methylene blue-sensitised photodynamic treatment on bladder cancer cells: a further study on flow cytometric basis. *J. Urol.* 149, 1198-1201, 1993

Zonios, G.I., Cothren, R.M., Arendt, J.T., Wu, J., Van-Dam, J., Crawford, J.M., Manoharan, R., Feld, M.S.: Morphological model of human colon tissue fluorescence. *IEEE-Trans-Biomed-Eng.* 43(2), 113-122, 1996

Zur Hausen, H.: Viruses in human cancers. *Science*, 254, 1167-1173, 1991

Zur Hausen, H.: Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer res.*, 36, 794, 1976

8. Anhang

Abkürzungen

AOI	Area of interest
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humane Immundefekt Virus
HPV	Humane Papillomviren
HSV	Herpes-simplex-Virus
NADH	reduziertes Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid
PDD	Photodynamische Diagnostik
PDT	Photodynamische Therapie
PPIX	Protoporphyrin IX
w.E.	willkürliche Einheiten
5-ALA	5-Aminolävulinsäure

9. Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Vaagn Andikyan
Geburtsdatum: 07.03.1978
Geburtsort: Moskau, Russische Föderation
Staatsangehörigkeit: russisch
Familienstand: ledig
Adresse: Russland, 109559 Moskau
Zymlanskaja-Straße 2, Wohnung 326
Telefon: 007-095-359-1526
E-Mail: andikyan@hotmail.com

Ausbildung:

Schule: 1985-1989 - Experimentelle Oberschule N 710,
Moskau

1989-1995 - Gymnasium „Balaton“, Gumrie

Abschluss: 06. 1995. Abitur

Studium: 1996-1998 - Studium an der humanmedizinischen Fakultät der Moskauer Medizinischen Setschenow-Akademie

1998 – 2002 – Studium an der Fakultät für die Ausbildung der wissenschaftlichen und pädagogischen Mitarbeiter der Moskauer Medizinischen Setschenow-Akademie

Thema der Diplomarbeit: „Moderne Entwicklungen in Diagnostik und Therapie der fetoplazentaren Insuffizienz“

Forschungsstätten: Forschungszentrum für Geburtshilfe, Gynäkologie und Perinatalogie der Russischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften,
09.2000-09.2001

Abschluss: 06.2002 Drittes Staatsexamen, Diplom

Dezember 2001 – Oktober 2002. Preisträger des Stipendienprogramms des „Russischen Präsidenten“ und Programmstudent der LMU; Forschungstätigkeit im Universitätsklinikum Großhadern, Promotionsvorhaben

Thema der Doktorarbeit: „Pharmakokinetische, fluoreszenzmikroskopische Studie zur Gewebeaufnahme und Verteilung von 5-Aminolävulinsäure aus 5-ALA-Thermogel bei zervikaler intraepithelialer Neoplasie (CIN 1-3)“