

Aus der
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Klinikum der Universität München – Großhadern

Vorstand: Prof. Dr. med. K. Friese

**Klinische Studie zur Photodynamischen Diagnostik
des Ovarialkarzinoms mit 5-Aminolävulinsäure**

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

vorgelegt von

Jessica Reif

aus

Rosenheim

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Hillemanns
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Bjoern Lampe Priv. Doz. Dr. Ronald Sroka
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. Pauline Wimberger
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACP, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	21.05.2015

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Zielsetzung dieser Arbeit	3
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 Ovarialkarzinom	4
2.1.1 Epidemiologie	4
2.1.2 Ätiologie und Karzinogenese	5
2.1.3 Histologische Einteilung	7
2.1.4 Prognose	9
2.1.5 Ausbreitung	11
2.1.6 Klinische Symptomatik und Diagnostik	12
2.1.7 Therapie	13
2.1.8 Nachsorge und Rezidivtherapie	14
2.2 Fluoreszenzspektroskopie	16
2.2.1 Zusammenhang von Wellenlänge und Farbeindruck	16
2.2.2 Elektronenanregung	16
2.2.3 Energieabgabe	17
2.3 Grundlagen der Photodynamischen Diagnostik und Therapie	18
2.3.1 Grundprinzip der Photodynamischen Diagnostik	18
2.3.2 Grundprinzip der Photodynamischen Therapie	18
2.3.3 Autofluoreszenz	20
2.4 Porphyrine als Photosensibilisatoren	21
2.4.1 Hämbiosynthese	21
2.4.2 5-Aminolävulinsäure	23
2.4.3 Protoporphyrin IX	23
2.4.4 Medizinische Anwendung	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Allgemeines	27
3.2 Rahmenbedingungen des Studiendesigns	27
3.2.1 Einschlusskriterien	27
3.2.2 Ausschlusskriterien	28
3.2.3 Abbruchkriterien	28
3.3 Medikation	29
3.4 Fluoreszenzanregung	29

3.5 Fluoreszenzbetrachtung	29
3.6 Spektroskopie	30
3.7 Patientendokumentation	31
3.7.1 Präoperative Patientendokumentation	31
3.7.2 Intraoperative Patientendokumentation	31
3.7.3 Postoperative Patientendokumentation	32
3.8 Statistische Auswertung	33
4 Ergebnisse	35
4.1 Patientencharakterisierung	35
4.2 5-ALA induzierte Fluoreszenz	37
4.3 Quantitative Fluoreszenzspektrometrie	38
4.3.1 Einfluss des Applikationszeitpunktes und derALA-Konzentration auf die Fluoreszenzintensität	38
4.3.2 Spezifität und Sensitivität in Abhängigkeit von Applikationszeitpunkt undALA-Konzentration	49
4.3.3 Einfluss der Tumorbiologie auf die Fluoreszenzintensität	51
4.3.4 Einfluss einer Chemotherapie auf die Fluoreszenzintensität	53
4.4 Messungen der Serum-Porphyrine	54
4.5 Nebenwirkungen der Fluoreszenzdiagnostik mit 5-ALA	57
5 Diskussion	60
5.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie	60
5.2 Angewandte Methode	61
5.2.1 Photosensibilisatoren	61
5.2.2 5-Aminolävulinsäure als Photosensibilisator	63
5.2.3 Anwendung der PDD mit 5-ALA bei Peritonealkarzinose	64
5.2.4 Einfluss der Applikationsform auf die PDD	66
5.2.5 Einfluss des Applikationszeitpunktes auf die PDD	67
5.2.6 Einfluss des Applikationszeitpunktes auf die PPIX-Konzentration	69
5.2.7 Einfluss der 5-ALA Konzentration auf die PDD	69
5.3 Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Tumorbiologie	71
5.4 Nebenwirkungen	73
5.5 Wertung der PDD mit 5-ALA des Ovarialkarzinoms	74
6 Zusammenfassung	76
7 Literaturverzeichnis	78

8 Abkürzungsverzeichnis	91
9 Eidesstattliche Versicherung	92
10 Danksagung	93

1 Einleitung und Zielsetzung dieser Arbeit

1.1 Einleitung

Das Ovarialkarzinom stellt nach wie vor eine der großen Herausforderungen in der gynäkologischen Onkologie dar. Durch das Fehlen früher Symptome wird das Ovarialkarzinom bei 75% der Patientinnen in einem fortgeschrittenen Stadium (FIGO III oder IV) entdeckt [*Young R.C. et al., 1978*]. Ziel ist es durch eine maximale Tumorreduktion eine makroskopische Tumorfreiheit zu erzielen, da der postoperative Tumorrest einen der wichtigsten prognostischen Faktoren darstellt [*Du Bois A. et al., 2009*].

Ein weiterer Grund, weshalb das Ovarialkarzinom die höchste Mortalitätsrate unter allen gynäkologischen Malignomen hat, ist, dass der Großteil der Patientinnen trotz initial hoher Ansprechraten auf eine adjuvante platinhaltige Chemotherapie ein Rezidiv entwickelt [*Ozols R.F., 2005*]. Kommt es zu einem Rezidiv ist typischerweise keine Heilung mehr möglich. Im Einzelfall ist eine Rezidivoperation in Erwägung zu ziehen, vor allem falls ein platsinsibles Spätrezidiv mit einem sehr langen therapiefreien Intervall vorliegt mit nur geringer Tumoraussaat. Zu einem Überlebensvorteil kommt es laut retrospektiver Daten nur bei Rezidivoperationen mit Komplett-Resektion [*Harter P. et al., 2006, 2009 und 2011*].

Zum heutigen Zeitpunkt gibt es immer noch keine zuverlässige Methode kleinste Tumorherde in der Primärsituation oder beim Rezidiv per Bildgebung nachzuweisen. Die bisherige bildgebende Diagnostik mit Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Ultraschall und die Positronenemissionstomographie kann häufig Läsionen unter 10 mm Durchmesser nicht darstellen [*Hauth E.A. et al., 2005*]. Auch bei der Exploration im Sinne der Inspektion bei der Primäroperation können sehr kleine Herde gegebenenfalls übersehen werden.

Ob die Photodetektion des Ovarialkarzinoms einen innovativen und praktischen Ansatz für diese kleinherdige Peritonealkarzinose bieten kann, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Ziel ist es, mit dieser neuen Methode karzinomatöse Läsionen zu detektieren, welche bei einer bisher üblichen intraabdominellen Standardinspektion übersehen worden wären. Unter den neu entwickelten diagnostischen und eventuell therapeutischen Modalitäten für das Ovarialkarzinom könnte die Photodynamische Diagnostik (PDD) ein bedeutender Schritt sein.

Die lichtinduzierte Fluoreszenz ist eine relativ neue Technik, die die Diagnostik von Oberflächenveränderungen bei verschiedenen Neoplasien ermöglicht. Es können zum einen die direkte Fluoreszenzvisualisierung wie auch die Spektroskopie zur Darstellung der Autofluoreszenz und der Photosensitizer- induzierten Fluoreszenz angewandt werden.

Der Fluoreszenz-Marker, welcher in unserer Studie verwendet wurde ist das Protoporphyrin IX (PPIX), ein natürliches Stoffwechselprodukt der Hämbiosynthese, dessen Chelatierung mit Eisen in der Hämbiosynthese den Blutfarbstoff Häm ergibt. Es reichert sich v.a. in neoplastischen Läsionen durch exogene Applikation des Präkursors 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) vermehrt an [*Grant W.E. et al.,*

1993; *Kennedy J.C. et al., 1992*]. 5-ALA ist überdies ein körpereigenes Substrat der Porphyrinbiosynthese und als Aminosäure selbst nicht fluoreszierend. Malignome setzen mehr oder minder selektiv 5-ALA zu fluoreszierenden Porphyrinen, v.a. Protoporphyrin IX um.

Die chemische Struktur des PPIX bedingt eine intensive Rotfluoreszenz mit Emissionsmaxima bei 635 und 704 nm mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 400 nm. Auch Ovarialkarzinomzellen sind in der Lage selektiv exogen zugeführtes 5-ALA in fluoreszierendes Protoporphyrin IX umzusetzen und zu akkumulieren. Unter Fluoreszenzanregung mit blau-violettem Licht (D-Light, Fa. Storz, $\lambda = 385 - 440$ nm) und entsprechender Beobachtungsfilter ($\lambda > 440$ nm) stellt sich Tumorgewebe rot dar, während normales Gewebe keine PPIX-Fluoreszenz zeigt. Das rot fluoreszierende Tumorgewebe kann somit selektiv entfernt werden.

Die Photodynamische Diagnostik und auch die Therapie unter Verwendung von topischer, inhalativer, oraler oder intravenöser 5-ALA Applikation ist in verschiedenen Organ systemen untersucht worden.

In klinischen Studien wird dieser Fluoreszenz-Tumormarker bereits erfolgreich bei oberflächlichen Blasentumoren und malignen Gliomen eingesetzt. Zusätzlich konnten bei der Diagnostik der intraepithelialen Neoplasien des unteren Genitaltraktes (Zervixdysplasie) mittels der 5-ALA-induzierten Fluoreszenz vielversprechende Ergebnisse erzielt werden. Die Fluoreszenzdiagnostik nach oraler Gabe von 5-ALA wurde ebenfalls zur Evaluierung von peritonealen Endometrioseherden mittels Endoskopie in verschiedenen Zentren eingesetzt [*Müller P.J., et al., 1990; Hillemanns et al., 1999 und 2000b, c*].

Erste klinische Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Löning et al. an 13 Patientinnen mit Ovarialkarzinom konnten zeigen, dass peritoneale Tumormetastasen des Ovarialkarzinoms mittels vorheriger oraler 5-ALA-Applikation in einer Dosis von 30 mg/kg KG in der endoskopischen Diagnostik deutlich und hochspezifisch fluoreszenzpositiv reagieren. Hierbei kam es zu keinen relevanten Nebenwirkungen intraoperativ und postoperativ [*Löning M. et al., 2004*]. Bei höheren Konzentrationen traten in einigen Fällen Übelkeit, Erbrechen und ein reversibler Anstieg der Transaminasen auf. Zudem konnte beobachtet werden, dass es bei oraler Applikation von 5-ALA zu einer Photosensibilisierung der Haut über 24 bis maximal 48 Stunden kommt, so dass innerhalb dieses Zeitraums keine ausgeprägte Lichtexposition stattfinden sollte [*Kriegmair M., et al., 1999*].

1.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Dissertation ist die Evaluierung der Photodynamischen Diagnostik als eine neue diagnostische Option zur Detektion von Peritonealmetastasen des Ovarialkarzinoms.

Es soll im Rahmen der Primäroperation bei Erstdiagnose eines Ovarialkarzinoms sowie bei Verdacht auf ein Rezidiv das genaue Ausmaß des Tumorbefalls mittels Fluoreszenzdiagnostik im Vergleich zur Weißlichtdiagnostik eruiert werden und dementsprechend die Radikalität des operativen Vorgehens bestimmt werden.

Die Sensitivität der Photodynamischen Diagnostik (PDD) unter Verwendung von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) soll untersucht werden, um neben dem Ausmaß der Ersterkrankung bei der Primäroperation auch gegebenenfalls frühzeitig kleinste Rezidive zu erkennen. Die PDD wird mit der Standardmethode der Weißlichtdiagnostik verglichen.

Innerhalb dieser Machbarkeitsstudie soll geklärt werden, welche 5-ALA Konzentration bei oraler Applikation zur Photodynamischen Diagnostik des Ovarialkarzinoms nötig ist, um intraoperativ eine ausreichende Fluoreszenz erreichen zu können.

Das optimale Inkubationsintervall, also der Zeitraum zwischen Aufnahme des Photosensibilisators 5-ALA und dem intraoperativen Ausleuchten, zu kennen, ist für eine weiterführende fluoreszenzdiagnostische Darstellung von großem Interesse und soll durch diese Studie evaluiert werden.

Überdies sollen alle unerwünschten Ereignisse, wie auch alle möglicherweise vorkommenden Nebenwirkungen, die im Rahmen der Photodynamischen Diagnostik mit 5-Aminolävulinsäure auftreten können, überwacht und dokumentiert werden. Dies ist von Relevanz, da in ähnlichen Vorstudien als Begleiterscheinungen der Medikation Übelkeit, Erbrechen, ein transitorischer Transaminasenanstieg und eine Photosensibilisierung der Haut für 24 Stunden aufgetreten sind.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Ovarialkarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Weltweit erkrankten nach Angaben der WHO im Jahr 2012 fast 240.000 Frauen an einem Ovarialkarzinom, mehr als 150.000 Frauen verstarben daran. Es lassen sich bezüglich der Inzidenz und der Mortalität jedoch erhebliche Schwankungen sowohl zwischen den unterschiedlichen geographischen Regionen wie auch zwischen den verschiedenen ethnischen Gruppen feststellen. Eine hohe Inzidenz findet man in Nord- und Osteuropa, wobei die weltweit höchsten Inzidenzen auf den Fjord-Inseln, in Lettland und Bulgarien vorliegen. Eine eher niedrige Inzidenz kommt dagegen beispielsweise in Asien und Afrika vor [IACR, 2014].

Nach Angaben des Zentrums für Krebsregisterdaten am Robert-Koch-Instituts (RKI) sind in Deutschland 7790 Frauen im Jahre 2010 neu an einem Ovarialkarzinom erkrankt. Dies macht einen Anteil von 3,5% aller weiblichen Krebsneuerkrankungen aus. Das Ovarialkarzinom steht in Deutschland damit an sechster Stelle bezüglich der Inzidenz der Malignome. Die altersstandardisierte Inzidenz lag 2010 bei 12,1 je 100.000 Frauen. Für das Jahr 2014 werden 7500 Neuerkrankungen erwartet, was einer altersstandardisierten Inzidenz von 11,2 je 100.000 Frauen entsprechen würde.

Das Ovarialkarzinom gehört zudem zu den fünf häufigsten Krebstodesursachen, es hat die höchste Mortalitätsrate unter den gynäkologischen Malignomen. Für das Jahr 2010 betrug die Anzahl an Sterbefällen wegen eines Ovarialkarzinoms knapp 5600. Das ergibt einen Anteil von 5,6% an den krebsbedingten Sterbefällen [RKI, 2013].

Der Altersgipfel bei Diagnosestellung liegt um die sechste Lebensdekade, für die hereditären Ovarialkarzinome 10 Jahre früher [Prat J. et al., 2005; Boyd J. et al., 1997]. Jede 68. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom, was einem Lebenszeitrisiko von 1,5% entspricht, jede 91. Frau stirbt an einem Ovarialkarzinom [RKI, 2013]. Dabei ist es wichtig zu beachten, dass Frauen mit einem hohen Risikoprofil, auf welches noch näher in 2.1.2 eingegangen wird, ein „life-time-risk“ von bis zu 9,4% haben [Hartge P. et al., 1994]. Die absolute Fünfjahres-Überlebensrate liegt bei 38,4%, das relative 5-Jahres-Überleben bei etwa 42% [RKI, 2013]. Nach Angaben des Tumorzentrums München (TZM), das eine Kohorte von Patientinnen für die Statistiken herangezogen hat, die im Zeitraum von 1998 bis 2011 im Einzugsgebiet des TZM erkrankt ist, liegt die relative 5-Jahresüberlebensrate im Stadium III um 35 %, im Stadium IV unter 15%. Die relative Überlebensrate in 10 Jahren beträgt im Stadium III nur noch 20%, im Stadium IV unter 10% [TZM, 2014].

2.1.2 Ätiologie und Karzinogenese

Bezüglich der Ätiologie des Ovarialkarzinoms gibt es immer noch Unklarheiten. Multiple Graviditäten, Stillen, die Dauer der Einnahme von Ovulationshemmern, späte Menarche und frühe Menopause bieten einen gewissen Schutz vor der Entstehung des Ovarialkarzinoms [Modugno F. et al., 2004; Rostgaard K. et al., 2003; Brekelmans C.T., 2003]. Ebenso scheint eine gesunde Lebensführung mit körperlichen Aktivitäten sowie eine gesunde Ernährung protektive Wirkung zu haben [Zhang M. et al., 2003].

Als Risikofaktoren gelten Infertilität, Nulliparität, dauerhafte ovulatorische Zyklen, die medikamentöse Ovulationsauslösung und die Endometriose für bestimmte Tumortypen [Purdie D.M. et al., 2003; Brekelmans C.T., 2003; Pearce C.L. et al., 2012]. Des Weiteren werden wie bei vielen Malignomen das Lebensalter, Umwelt- und Ernährungsfaktoren mit einer erhöhten Inzidenz in Verbindung gebracht [Terry P.D. et al., 2003].

Salazar et al. untersuchte in einer Studie Ovarien von „Hochrisiko-Patientinnen“ für ein Ovarialkarzinom und verglich sie mit denen von Patientinnen ohne erhöhtes Risiko für ein Ovarialkarzinom. Er stellte fest, dass Ovarien von „Hochrisiko-Patientinnen“ signifikant häufiger histologische Strukturen wie oberflächliche epitheliale Pseudoschichtung oder Papillomatose und eine tiefe Rindeninvagination des Oberflächenepithels, oft mit multiplen papillären Projektionen innerhalb kleiner zystischer Räume, aufwiesen. Ebenso wurden epitheliale Einschlusssysteme, diese oft mit epithelialer Hyperplasie und papillären Strukturen, eine gesteigerte Follikelaktivität sowie Corpus luteum Hyperplasien häufiger beobachtet [Salazar H. et al., 1996].

Ness erklärt die Prädisposition für ein endometroides Ovarialkarzinom oder für einen hellzelligen Tumor nach Erkrankung an Endometriose über die gemeinsame Pathophysiologie, die beide durch einen Östrogenüberschuss sowie einem Progesteronmangel gefördert werden und auf einer anormalen Immunfunktion basieren [Ness R.B., 2003].

Neue Daten der molekularen Genetik zeigen, dass es zwei Subtypen mit bestimmten histologischen Gradings und tumorspezifischen Mutationsmuster gibt. Der seltener vorkommende Typ I verläuft mit niedriggradigeren Tumoren weniger aggressiv. Oft kann dort eine Aktivierung der Onkogene KRAS, BRAF und PIK3CA gefunden werden, sowie ein Verlust der Heterozygotie von Xq, eine Expression von Amphiregulin und eine Mikrosatelliteninstabilität. Bei den hochgradigen, aggressiv und schnell proliferierenden Typ II-Tumoren kann meist eine p53- und BRCA 1/2-Mutation oder BRCA-Dysfunktion mit nachfolgender Amplifikation unterschiedlichster Proliferationsgene nachgewiesen werden [Bast RC. Et al., 2009].

90% der Ovarialkarzinome treten sporadisch auf, bis zu ca. 10% scheinen jedoch genetisch bedingt zu sein [Prat J. et al., 2005]. Ursächlich für die Entstehung dieser hereditären Ovarialkarzinome sind Keimbahnmutationen, die zu dem hereditären Brust- und Ovarialkarzinom-Syndrom, dem Lynch-Syndrom oder dem seltenen Li-Fraumeni-Syndrom führen können. Eine Mutation des Tumorsuppressorgens BRCA-1 (Breast Cancer Gene 1) ist mit einem deutlich erhöhten Risiko für ein Mamma- oder Ovarialkarzinom verbunden [Miki Y. et al., 1994]. 36 bis 46% der Frauen mit diesem

Gendefekt erkranken im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom. Liegt die Mutation in den Exons 12-24 sogar 76% [Brose M.S. et al., 2002]. Frauen mit einer Mutation des BRCA-2-Gens auf dem Chromosom 13 (13q12-13) haben immer noch ein Risiko von 10-27%. Die genetische Prädisposition wird bei Vorliegen einer Keimbahnmutation autosomal dominant vererbt, wobei das prädisponierende Allel wie ein rezessives Allel in einer somatischen Zelle fungiert. Der Verlust bzw. die Inaktivierung des Wildtypallels in der somatischen Zelle führt dann zur Ausprägung des malignen Phänotyps [Welcsh P.L. et al., 2001; Smith S.A. et al., 1992].

In Tab. 2.1-1 sind zusammenfassend die Risikofaktoren und protektive Faktoren für ein Ovarialkarzinom mit ihrem jeweiligen geschätzten Risiko abgebildet.

		Geschätztes Risiko	Geschätztes rel. Risiko
Lebenszeitrisiko		1,4-1,8	1
Risikofaktoren	Pos. Familienanamnese	9,4	5-7
	Mutation BRCA-1/ BRCA-2	30-40/ 27	18-29/ 16-19
	Lynch II / HPNCC	10	6-7
	Sterilität, Nullipara		2-5
	Späte Menopause/ Frühe Menarche		1,5-2/ 1-1,5
Protektive Faktoren	Multipara, Hysterekt. oder Tuberligat.		0,4-0,6
	Orale Kontrazeptiva (abh. von Dauer)		0,4-0,6

Tab. 2.1-1 Einflussnehmende Faktoren auf das Risiko eines Ovarialkarzinoms (nach Hofsneider C.H. et al., 2000)

Eine Darstellung, die die Karzinogenese im Zusammenhang mit langen hohen Östrogenspiegeln, unter Berücksichtigung der genetischen Veranlagung veranschaulichen soll, zeigt Abbildung 2.1-1.

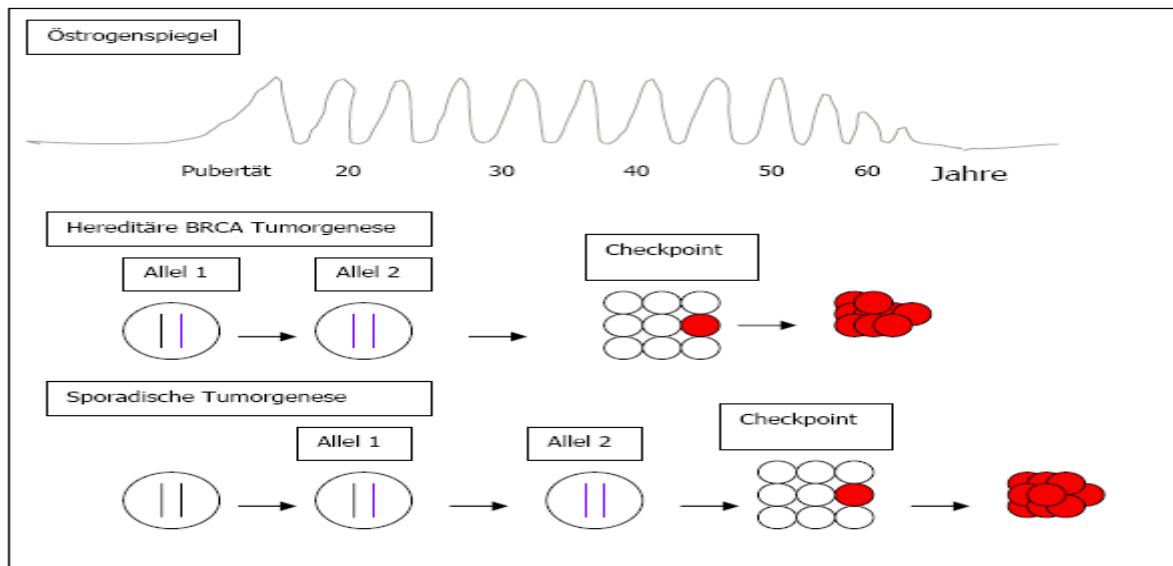


Abb. 2.1-1: Zusammenhang zwischen Karzinogenese, Östrogenspiegel und BRCA-Mutation (modifiziert nach Welcsh P.L., 2001)

Unter physiologischen Bedingungen wird der Zellzyklus so kontrolliert, dass ein evtl. auftretender DNA-Schaden sofort repariert wird, oder falls dies nicht möglich ist, es zu einem Absterben der Zelle kommt.

Aufgrund des Östrogen-Einflusses kommt es zu einer sehr hohen Proliferationsrate im Ovar. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass die Reparaturkapazität innerhalb einer Zelle abnimmt. Besteht nun eine BRCA-Mutation (blau) in der Keimbahn, und kommt es auch noch zu einer Mutation in dem noch

intakten Allel, so wird die Zelle über eine Aktivierung der „critical cell cycle checkpoints“ eliminiert. Treten die Mutationen an den beiden Allelen erst im Laufe des Lebens auf, so ist es nahe liegend, dass der Schaden erst einige Zeit später relevant wird [Welcsh P.L. et al., 2001]. Damit es nun endgültig zum ungebremsten Zellwachstum kommt, bedarf es neben den Mutationen zusätzlich noch eines Defekts innerhalb den Kontrollpunkten, wie z.B. dem Tumorsuppressor-Gen p53 [Xu X. et al., 1999]. Auch Fathalla et al. vertreten die Theorie, dass eine permanente Ovulation, welches ein ständiges Zerreißen des oberflächlichen Ovarepithels mit darauf folgender Reparatur nach sich zieht wahrscheinlich zu einer höheren Möglichkeit an spontanen Mutationen und somit einem erhöhtem Risiko für ein Ovarialkarzinom führt [Fathalla M.F. et al., 1971].

2.1.3 Histologische Einteilung

Das Ovar wird von drei histogenetisch unterschiedlichen Geweben gebildet. Dementsprechend ergeben sich nach der Klassifikation der WHO neun Hauptgruppen mit jeweils verschiedenen Untergruppen.

Mit fast 90% bilden die epithelialen Ovarialkarzinome die statistisch bedeutsamste Gruppe unter den Malignomen des Ovars. Davon sind zwischen 75 und 80% serös, die muzinösen und endometrioiden epithelialen Karzinome lassen sich zu jeweils 10% finden [Holschneider C.H. et al., 2000]. 3 bis 5% der Malignome entstehen primär aus Keimzellen, 5 bis 8% haben ihren Ursprung im Keimstrangstroma. Einen kleinen Anteil der Ovarialtumoren bilden Metastasen anderer Karzinome, beispielsweise des Endometriumkarzinoms, des Mammakarzinoms oder gastrointestinaler Karzinome wie der Krukenbergtumor [Pilli G.S. et al., 2002].

Die folgende Tabelle 2.1-2 gibt die WHO-Klassifikation der Ovarialtumoren wieder.

I Oberflächenepithel-Stromatumoren	III Keimzelltumoren
I.1 Seröse Tumoren	III.1 Dysgerminom
I.2 Muzinöse Tumoren, endozervikale u. intestinale Typen	III.2 Endodermaler Sinustumor
I.3 Endometriode Tumoren	III.3 Embryonales Karzinom
I.4 Klarzellige Tumoren	III.4 Polyembryom
I.5 Transitionalzellige Tumoren	III.5 Chorionkarzinom
I.6 Plattenepithelkarzinome	III.6 Teratom
I.7 Epitheliale Mischtumoren	III.7 Gemischte Keimzelltumoren
I.8 Undifferenzierte Karzinome	IV Gonadoblastom
II Keimstrangstromatumoren	V Keimzell-Keimstrangstroma-Tumor
II.1 Granulosa-Stromazelltumoren	VI Tumoren des Rete ovarii
II.2 Sertoli-Stromazelltumoren, Androblastom	VII Mesotheliale Tumoren
II.3 Keimstrangtumoren mit annulären Tubuli	VIII Tumoren unsicherer Histogenese und verschiedene Tumoren
II.4 Gynandroblastom	IX Gestationale tropopl. Erkrankung
II.5 Unklassifizierbar	X Weichgewebstumoren, nicht ovarspez.

II.6 Steroid-(Lipid-)Zelltumoren	XI Maligne Lymphome, Leukämien
	XII Unklassifizierbare Tumoren
	XIII Metastasen

Tab. 2.1-2 WHO-Einteilung der Ovarialtumoren

Einige histologische Untergruppen der epithelialen Tumore repräsentieren die epithelialen Merkmale des unteren Genitaltraktes. Man nimmt an, dass diese Differenzierungen den aus der Embryologie bekannten Entwicklungspotenzen des Müller-Zölopithels entsprechen. Papillär-seröse Tumoren erinnern bezüglich ihres Aussehens an das glanduläre Epithel, welches die Eileiter auskleidet. Muzinöse Tumoren enthalten Zellen, die den Endozervikaldrüsen ähneln und endometroide Tumore lassen an ein Endometrium denken [Holschneider C.H. et al., 2000]. Auch Kombinationen der einzelnen histologischen Typen kommen vor.

Die Stadieneinteilung nach den Richtlinien des TNM-Systems der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) von 2014 und der FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) sind in der anschließenden Tabelle 2.1-3 dargestellt [Prat J., 2014].

TNM	FIGO	Befundsituation
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien
T1a	IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
T1b	IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien; keine malignen Zellen im Aszites oder Peritonealspülung
T1c1	IC1	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit intraoperativer Kapseleröffnung
T1c2	IC2	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur vor der Operation und/ oder Tumor an Ovaroberfläche
T1c3	IC3	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien und maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
T2a	IIA	Ausbreitung auf und/ oder Implantate an Uterus und/ oder Tube(n)
T2b	IIB	Ausbreitung auf anderes Beckengewebe
T3	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/ oder regionären Lymphknotenmetastasen
T1/T2 N1	IIIA1	Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T1/T2 N1a	IIIA1i	Retroperitoneale Lymphknotenmetastasen </= 10mm
T1/T2 N1b	IIIA1ii	Retroperitoneale Lymphknotenmetastasen > 10mm
T3a N0/N1	IIIA2	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
T3b N0/N1	IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung < 2 cm
T3c N0/N1	IIIC	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung > 2 cm
M1	IV	Fernmetastasen (ausgeschl. Peritonealmetastasen)
M1a	IVA	Maligne Zellen im Pleuraerguss
M1b	IVB	Parenchymmetastasen
NX		Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1		Regionäre Lymphknotenmetastasen

Tab. 2.1-3 Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms

Unabhängig vom histologischen Typ wird das Grading des Ovarialkarzinoms bestimmt. Bisher gibt es für das Ovarialkarzinom kein spezielles Graduierungssystem. Allgemein anerkannt ist das Gradiersystem nach Silverberg, welches aus einem Punkte-Score besteht. Dieser wird durch Analyse der histologischen Parameter Architektur, Kernpleomorphie und Mitosezahl erhoben. Es können zwischen drei und neun Punkte erreicht werden. Aus dem Gesamtscore, nach Addition der drei Punktewerte für diese Parameter ergibt sich der Differenzierungsgrad, bei dem zwischen hoch differenziert (Grad 1), mäßig differenziert (Grad 2) und gering differenziert bis undifferenziert (Grad 3-4) unterschieden wird [Silverberg SG, 2000].

Bei den Tumoren mit niedriger maligner Potenz, den so genannten Borderline-Tumoren bzw. atypisch proliferierenden Tumoren handelt es sich um eine heterogene Gruppe epithelialer Tumoren, die einen Anteil von 15-20% der epithelialen Ovarneoplasien ausmacht. Sie sind gekennzeichnet durch eine gesteigerte Zellproliferation, verbunden mit zellulären Atypien, vermehrtem Mitosegehalt und Störung der Architektur. Im Unterschied zu den Karzinomen fehlt jedoch ein invasives Wachstum [Holschneider C.H. et al., 2000]. Die 5 Jahres Überlebensrate beträgt zwischen 90 und 100%. Extraovarielle peritoneale Absiedlungen, welche in bis zu 30-40% der Fälle gefunden werden, sind in etwa 90% nicht-invasiv, können aber in ca. 10% der Fälle auch ein invasives Wachstum zeigen [Gershenson D.M. et al., 1998].

2.1.4 Prognose

Man unterscheidet beim Ovarialkarzinom klinische, histologische und tumorbiologische Prognosefaktoren. In erster Linie wird die Prognose signifikant durch klinische Indikatoren wie dem Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und insbesondere durch den postoperativ verbliebenen Tumorrest bestimmt [Chan J.K. et al., 2003; Tingulstad S. et al., 2003].

Tumorbiologische Prognosefaktoren, die direkt auf den malignen Eigenschaften der Tumorzelle wie Proliferation, Invasion und Metastasierung beruhen, liefern wichtige Zusatzinformationen über den Verlauf der Erkrankung [Du Bois A. et al., 2009].

Entscheidend für die Prognose sind zunächst einmal das Staging, die Tumorausbreitung, sowie das Tumorvolumen bei der Erstdiagnose [Tentes A.A. et al., 2003]. So beträgt die Fünfjahres-Überlebensrate im Stadium FIGO I zwischen 80 und 95%, im Stadium FIGO II liegt sie bei 51 bis 75%. Patientinnen mit Ovarialkarzinom im FIGO-Stadium III haben eine Fünfjahres-Überlebensrate von 17-35%, im Stadium FIGO IV nur noch 10% bis 15% [Nguyen H.N. et al., 1993, Wong K.H., 2012, TZM, 2014]. Nach Erhebungen des Tumorzentrum München liegen die Zehnjahres-Überlebensraten im Stadium I zwischen 90 und 70%, im Stadium IIIC unter 20% und im Stadium IV unter 10% [TZM, 2014].

Beim Ovarialkarzinom hat sich gezeigt, dass vor allem der residuale Tumor nach der Operation der stärkste, unabhängige prognostische Parameter ist. Die beste Prognose haben Patientinnen mit makroskopischer Komplettresektion, gefolgt von Patientinnen mit einem Tumorrest kleiner 1 cm.

Patientinnen mit einem Tumorrest größer 1 cm, haben die schlechteste Prognose, wobei die genaue Größe des Tumorrestes dann keine Bedeutung mehr hat. Du Bois et al. konnte durch Analyse der Daten von über 3100 Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom aus drei randomisiertenAGO-Multicenterstudien darstellen, dass eine Komplettresektion für das Überleben eine signifikante Rolle spielt, selbst im Vergleich zu einem minimalen Tumorrest. Tumorfrei operierte Patientinnen überlebten im Schnitt 99,1 Monaten, Patientinnen mit einem Tumorrest von 1-10 mm nur noch 36,2 Monate und Patientinnen mit einem Tumorrest größer 10 mm starben im Mittel nach 29,6 Monaten [Du Bois A. et al., 2009]. Durch Eisenkop et al. konnte zudem in einer prospektiven Studie mit 408 Patientinnen im Stadium IIIC gezeigt werden, dass eine Tumorreduktion auf makroskopische Tumorfreiheit einen signikanteren Einfluss auf das Überleben hat als das Ausmass der Tumorausbreitung vor der Therapie [Eisenkop S.M. et al., 2003]. Du Bois stellte durch Analyse des Zusammenhangs zwischen FIGO-Stadium und verbleibendem Tumorrest dar, dass alle Patientinnen von einer Komplettresektion profitieren. Folgende Graphiken wurden aus dieser Publikation entnommen [Du Bois A. et al., 2009].

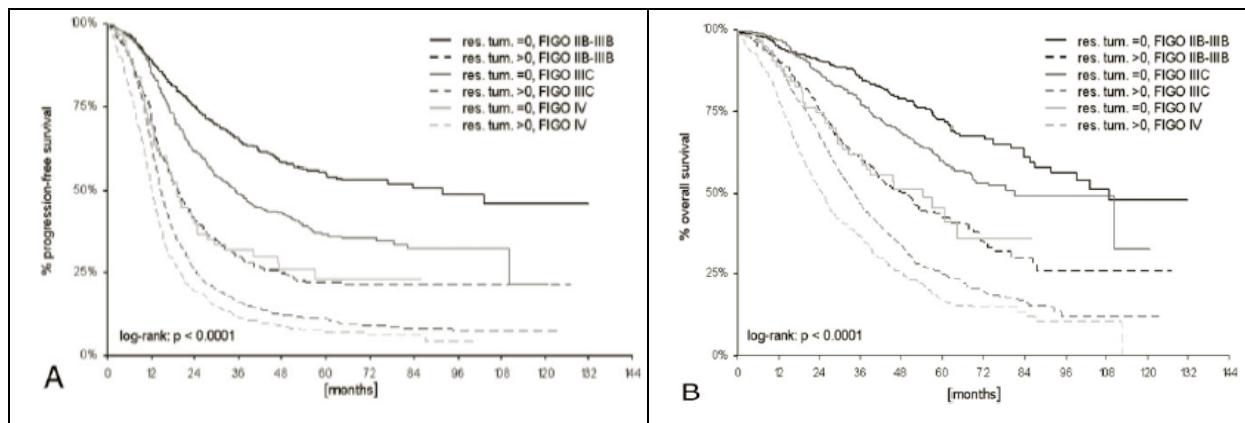


Abb. 2.1-2 Gesamt-Überleben (A) und progressionsfreies Überleben (B) für die FIGO-Stadien II bis IV in Abhängigkeit von der operativen Radikalität [Du Bois A. et al., 2009]

Auch die Daten des Tumorzentrums München belegen die Daten von Du Bois, dass durch eine Erhöhung des Anteils radikaler Tumorentfernung die Überlebenszeit deutlich verlängert werden kann. Bei einer radikalen Operation im Stadium FIGO III liegt die 10-Jahres-Überlebensrate bei ca. 37%, bei einem Tumorrest von mehr als einem Zentimeter unter 10%. Auch Patientinnen mit einem FIGO-Stadium IV profitieren von einer makroskopischen Komplettresektion, hierbei ergibt sich eine Fünfjahres-Überlebensrate von 35%. Gelingt keine Komplettresektion, ist der Tumorrest jedoch kleiner als ein Zentimeter, sinkt die Fünfjahres-Überlebensrate auf 18% ab, bei einem Rest von mehr als einem Zentimeter liegt sie bei unter 10% [TZM, 2014]. Auch die Daten von Wimberger et al. im Rahmen einer Auswertung von großen Multicenter first-line Studien bestätigen den Benefit von einer Komplettresektion bei Patientinnen mit einem FIGO-Stadium IV [Wimberger P. et al., 2010].

Insgesamt lässt sich sagen, dass nur eine makroskopische Komplettresektion als optimales Operationsergebnis gilt, der Tumorrest spielt eine große prognostische Bedeutung [Du Bois A. et al., 2009; Wimberger P. et al., 2010].

Weitere Prognosefaktoren sind der histologische Typ des Ovarialkarzinoms und der Differenzierungsgrad. Nach Daten des Tumorzentrums München haben in fortgeschrittenen Stadien muzinöse und klarzellige Karzinome eine signifikant schlechtere Prognose als serös papilläre Karzinome [TZM, 2014]. Das endometroide Adenokarzinom neigt eher dazu auf das Ovar begrenzt zu bleiben, wohin gegen das seröse Adenokarzinom überwiegend in den späteren Stadien FIGO III und IV gefunden wird [Eisenkop S.M., 1998; Kaku T. et al., 2003; Polverino G. et al., 2005]. Du Bois konnte in seiner Analyse zeigen, dass der muzinöse Subtyp die meisten anderen Prognosefaktoren wie Alter, Allgemeinzustand der Patientin und Grading deutlich überwiegt. Lediglich das Ausgangsstadium und die Komplettresektion nehmen bei einem muzinösen Ovarialkarzinom einen Einfluss auf die Prognose [Du Bois A. et al., 2009].

Ob der Differenzierungsgrad einen prognostischen Indikator darstellt, wird immer noch kontrovers diskutiert. Aus der Studie von Sato et al. liegen Ergebnisse vor, die eine eindeutige Signifikanz zeigen. Von den Patientinnen mit Grad 1 lebten nach 5 Jahren noch 91%, mit Grad 2 noch 64% und mit Grad 3 nur noch 38% [Sato Y. et al., 2003]. Tingulstad et al. konnte in seiner Studie jedoch zeigen, dass Faktoren wie histologischer Typ und Grading nicht signifikante Variablen bzgl. der Vorhersage des 5-Jahres-Überlebens sind [Tingulstad S. et al., 2003]. Scheinbar spielt das Grading vor allem bei den frühen Tumorstadien eine prognostische Rolle [Dembo AJ. Et al., 1990].

Als gesicherte prognostische Indikatoren können auch der Karnofsky-Index und das Erkrankungsalter [Tingulstad S. et al., 2003] herangezogen werden. Auch das Vorhandensein oder das Fehlen von Aszites können die Prognose beeinflussen [Chi D.S. et al., 2001].

Der DNA-Index (Ploidiestatus) und das Ausmaß der S-Phase werden als von der Histomorphologie unabhängige Faktoren bei invasiven Karzinomen betrachtet, im FIGO Stadium III stellt der DNA-Index neben dem verbleibenden Tumorrest den größten prognostischen Faktor dar [Kimmig R. et al., 2002]. Außerhalb von Studien sind routinemäßige Bestimmungen dieser tumorbiologischen Parameter nicht sinnvoll, da sie bisher zu keiner klinischen Konsequenz führten. Neue Erkenntnisse über Molekularbiologie und Genetik in neue Therapieoptionen umzusetzen ist Gegenstand aktueller Forschungsvorhaben.

2.1.5 Ausbreitung

In erster Linie breitet sich das Ovarialkarzinom intraabdominell und retroperitoneal über die Lymphbahnen in die regionären Lymphknoten aus.

Zur intraabdominellen Metastasierung kommt es über Ablösung von Tumorzellen aus der Ovaroberfläche. Diese zirkulieren dann mit der Peritonealflüssigkeit in der Bauchhöhle und können sich auf dem Peritoneum implantieren. Bereits im Frühstadium sind solche Implantationsmetastasen nachzuweisen. Es wird dabei zwischen einem Befall der Serosa des kleinen Beckens, was dem FIGO-Stadium II entspricht, und einer Ausbreitung jenseits des kleinen Beckens, FIGO III, differenziert. In diesem Stadium können sowohl Darmschlingen, das Zwerchfell, die Milz, die Leberkapsel wie auch die

parakolische Räume befallen sein. Sehr häufig sind Tumorabsiedlungen im Omentum majus feststellbar. Aufgrund der relativ geringen Invasivität des Ovarialkarzinoms kommt es äußerst selten zu einer primären parenchymatösen Invasion der Leber oder Lunge oder zu einem transmuralen Einbruch in das Darm- oder Magenlumen.

Das Ovarialkarzinom kann sich direkt über die Lymphbahnen in die paraaortalen Lymphknoten ausbreiten, entlang dem Lig. infundibulo pelvicum. Außerdem kann es zu einem direkten Befall der pelvinen Lymphknoten über das Ligamentum latum kommen. Nach einer Studie von Morice et al. haben rund 30% bzw. 40% der Patientinnen bei Diagnosestellung bereits positive pelvine bzw. positive paraaortale Lymphknoten, zu mehr als 40% sind beide Stationen betroffen [Morice P. et al., 2003]. Die Untersuchungen von Pickel et al. führten zu dem Ergebnis, dass bereits über 70% der pelvinen und 60% der paraaortalen Lymphknoten befallen waren. Die höchste Inzidenz mit über 70% bei den pelvinen und fast 70% bei den paraaortalen Lymphknoten wurde im FIGO-Stadium III beobachtet [Pickel H. et al., 1989]. Schon im Stadium pT1 muss man mit einer Häufigkeit von bis zu 20% mit positiven Lymphknoten rechnen [Morice P. et al., 2003]. Bei 40% der Patientinnen im Stadium FIGO II sind befallene Lymphknoten zu finden [Morice P. et al., 2003].

Eine hämatogene Dissemination im Sinne einer Fernmetastasierung in parenchymatöse Organe ist selten. Meist findet sich beim FIGO IV ein maligner Pleuraerguß. Parenchymatöse Fernmetastasierungen finden sich hauptsächlich in Lunge und Leber, seltener im Knochen oder Gehirn. Im späteren Verlauf der Erkrankung lassen sich diese jedoch sekundär häufiger finden [Cormio G. et al., 2003].

2.1.6 Klinische Symptomatik und Diagnostik

Ein großes Problem des Ovarialkarzinoms ist, dass es keine charakteristischen Frühsymptome gibt. Bei fortgeschrittenen Tumorstadien treten abdominelle Schmerzen, vor allem Zunahme des Bauchumfanges sowie gastrointestinale Beschwerden mit Obstipation bis zum Subileus/ Ileus [Chan Y.M. et al., 2003].

Erster und wichtigster Schritt zur Beurteilung der Ovarien ist die rektovaginale Palpation. Als bedeutendes bildgebendes Verfahren zur Diagnostik des Ovarialkarzinoms dient die transvaginale Sonographie, die der abdominalen Sonographie hinsichtlich der Beurteilung der Ovarien deutlich überlegen ist [Lewis S. et al., 2003]. Möglicherweise kann durch die Farb-Dopplersonographie aufgrund von unterschiedlichen Flußgeschwindigkeiten des Blutes im Tumor eine noch bessere Dignitätsbeurteilung erzielt werden [Kawai M. et al., 1992]. Die Beurteilung des Ovars, die bei prämenopausalen Patientinnen u.a. durch funktionelle Veränderungen am Ovar sehr diffizil sein kann, erfolgt mit Hilfe etablierter Kriterien, die eine Einteilung in zystische und solide Tumorkomplexe ermöglichen, sowie mit so genannten morphologischen Scores.

Als Versuch um gegebenenfalls die Ausdehnung des Tumors und dessen Manifestation im Bereich des Abdomens besser abschätzen zu können hat die Magnetresonanztomographie ihren Stellenwert.

Bezüglich der Beurteilung des kleinen Beckens ist sie dem CT zwar deutlich überlegen, hat aber leider auch sehr große Defizite und ist der Vaginalsonographie nicht überlegen.

Zusätzlich können auch Tumormarker wie CA-125 gemessen werden, die aber zum Screening nicht geeignet sind. Die Tumormarker CA 12-5 kann beispielsweise durch andere benigne Erkrankungen wie die Endometriose oder Lebererkrankungen erhöht sein [*Lewis S. et al., 2003*].

2.1.7 Therapie

Die Operation hat den höchsten Stellenwert in der Therapie des Ovarialkarzinoms. Oberstes Ziel ist die radikale Tumorresektion. Wie schon erwähnt verschlechtert sich bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom die Prognose bei postoperativ verbleibendem Tumorrest. Daher sollte wenn irgend möglich eine komplette Tumorresektion erfolgen und falls dies nicht erreicht werden kann, zumindest eine Reduktion auf unter einen Zentimeter. Die Standardoperation des Ovarialkarzinoms beinhaltet in der Regel eine Hysterektomie mit beidseitiger Adnektomie, eine infragastrische Omentektomie, beim muzinösen Subtyp auch eine Appendektomie, sowie zahlreiche Entnahmen von Peritonealbiopsien im Unter- und Oberbauch v.a. vom Douglas Raum. Bei Befall des Mittel- und Oberbauches sind ggf. noch weitere oberbauchchirurgische Eingriffe nötig. Aufgrund des häufigen Lymphknotenbefalls sollte, falls eine makroskopische Tumorfreiheit erzielt werden kann, zudem eine radikale Lymphadenektomie angestrebt werden, wo sowohl die pelvinen als auch die paraaortalen Lymphknoten bis zum Abgang der Nierenvenen beidseits entfernt werden sollen [*Scarabelli C. et al., 1997; Pickel H. et al., 1989*]. Die Wertigkeit der radikalen Lymphonodektomie wird derzeit bei Patientinnen mit FIGO IIB-IV und Komplettresektion in der prospektiv randomisierten, multizentrischen LION-Studie der AGO Ovar überprüft.

Auch bei einem klinisch fassbaren Rezidivtumor kann durch eine Tumorreduktion die Überlebenszeit der Patientinnen verlängert werden, aber nur sofern makroskopische Tumorfreiheit erreicht werden kann. Prognostisch günstig für eine Rezidivoperation ist hierbei ein rezidivfreies Intervall größer als zwölf Monate [*Hoskins W.J. et al., 1994*]. Die Peritonealkarzinose gilt als negativer Prädiktor für das Erreichen einer Komplettresektion in der Rezidivchirurgie des Ovarialkarzinoms. Die DESKTOP-Studien konnten zeigen, dass jedoch bei Erzielen einer R0-Resektion die Peritonealkarzinose per se keinen Einfluss auf die Prognose hatte. Positive prädiktive Faktoren für das Erreichen einer Komplettresektion in der Rezidivsituation sind eine Komplettresektion bei der Primäroperation, ein guter Allgemeinzustand und das Fehlen von Aszites [*Harter P. et al., 2009 und 2011*].

Eine Second-look Operation wird außerhalb von Studien kaum noch durchgeführt, da sie für die Prognose der Patientin irrelevant ist [*Sato, N. et al., 2003*].

Die Chemotherapie hat bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms einen besonderen Stellenwert. Nur im FIGO-Stadium IA mit einem Grading G1 kann auf eine Chemotherapie verzichtet werden [*Trimbos B. et al., 2010*]. Alle anderen Stadien erhalten eine systemische Primärbehandlung. Die adjuvante Chemotherapie soll nach operativer Entfernung des makroskopisch sichtbaren Tumorgewebes die

vermeintlich verbliebenen Mikrometastasen bekämpfen. Ist keine relevante Tumorreduktion möglich, wird nach histologischer Sicherung des Ovarialkarzinoms eine primäre Chemotherapie durchgeführt und gegebenenfalls nach zwei bis drei Zyklen eine Interventionslaparotomie, dies möglichst mit dem Ziel der maximalen Tumorreduktion.

Bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom FIGO IB-IV wird eine primäre platinhaltige Chemotherapie empfohlen. Der derzeitige Standard der Primärtherapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms (Stadium IIB-IV) ist eine Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel. Es sollten hierbei sechs Zyklen Carboplatin (AUC 5) und Paclitaxel (175 mg/m² KOF) 3-wöchentlich appliziert werden. Der Zusatz eines dritten Chemotherapeutikums wie z.B. Epirubicin, Doxorubicin, Topotecan oder Gemcitabine führt zu keiner Verbesserung des Überlebens bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom [Du Bois A. et al., 2005 und 2010].

Die Hinzugabe des Angiogenesehemmers Bevacizumab in der Dosierung 15 mg/kg KG alle drei Wochen initial zur Standardchemotherapie konnte in zwei Phase-III-Studien GOG-218 und ICON7 eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens zeigen, Daten zum Gesamtüberleben stehen noch aus. Der Antikörper wird zusätzlich nach Beenden der Chemotherapie als Monotherapie über insgesamt 15 Monate oder bis zum Progress verabreicht. Zugelassen ist die Substanz seit 2011 für die Primärtherapie des Ovarialkarzinoms in den FIGO-Stadien IIIB bis IV in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel [Burger R.A. et al., 2011 und Perren T. et al., 2012].

2.1.8 Nachsorge und Rezidivtherapie

In der onkologischen Nachsorge gehören die rektovaginale Palpation und die transvaginale Sonographie zum Standard. Bei Verdacht auf ein Rezidiv können die Tumormarker CA 125 und beim muzinösen Subtyp CA 72-4 bestimmt werden. Eine signifikante Erhöhung der Tumormarker im Verlauf weist mit hoher Sensitivität und Spezifität auf ein Vorliegen eines Rezidives hin [Perkins G. L. et al., 2003]. Erst bei klinisch begründetem Verdacht auf eine Rezidiverkrankung laut Bildgebung besteht derzeit die Indikation für eine weitere Therapie.

Die meisten Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom werden im Rahmen der Primärtherapie trotz einer Kombination aus operativem Tumor-Debulking und anschließender Standard-Chemotherapie ein Rezidiv des Ovarialkarzinoms erleiden. Dann ist keine Heilung mehr möglich. Die therapeutischen Möglichkeiten bei einer Progression oder einem Rezidiv sind begrenzt. Entscheidend für die Planung der weiteren Behandlung sind die Abwägung der zu erwartenden Wirkung über die Nebenwirkungen, sowie die Lebensqualität der Patientin.

Patientinnen, bei denen die letzte platinhaltige Chemotherapie kürzer als sechs Monate zurück liegt profitieren nur wenig von einer chemotherapeutischen Behandlung. Man spricht hier von einem platinresistenten Ovarialkarzinomrezidiv. Die Ansprechraten der palliativen Monochemotherapie liegen nur um die 20%. Eingesetzt werden können pegyliertes liposomales Doxorubicin, Topotecan, Gemcitabine oder Paclitaxel weekly bei gleicher Effektivität.

Patientinnen hingegen mit einem platinsensiblen Rezidiv, also einem längeren rezidivfreien Intervall profitieren von der Reinduktion einer platinhaltigen Kombinationschemotherapie wie u.a. die CALYPSO-Studie belegen konnte. Diese non-inferiority-Studie, zeigte in der Rezidivtherapie des platinsensiblen Ovarialkarzinoms bei der Kombination Carboplatin und pegyliertes liposomales Doxorubidin im Vergleich zu Carboplatin und Paclitaxel ein längeres progressionsfreies Intervall [*Pujade-Lauraine E. et al., 2009*]. Die OCEANS-Studie zeigte, dass durch Addition von Bevacizumab zu Carboplatin und Gemcitabine beim platinsensiblen Ovarialkarzinom-Rezidiv das progressionsfreie Intervall signifikant verlängert werden konnte. Nach Daten der AURELIA-Studie verlängert sich auch beim platinresistenten Ovarialkarzinomrezidiv durch die Applikation von Bevacizumab zu einer nicht-platinhaltigen Monochemotherapie das progressionsfreie Intervall [*Shaw D. et al., 2013*].

In seltenen Fällen profitieren die Patientinnen von einer Rezidivoperation, falls dort eine Komplettresektion erreicht wird [*Kuhn W.C., 2003; Harter P. et al., 2009*].

2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Wechselwirkung von Licht mit der zu analysierenden Substanz ist die Basis aller spektroskopischen Untersuchungsmethoden. Licht kann dabei von der Substanz absorbiert wie auch abgestrahlt werden. Zunächst soll auf einige physikalische Vorgänge, die bei der photodynamischen Diagnostik (PDD) vorkommen, näher eingegangen werden.

2.2.1 Zusammenhang von Wellenlänge und Farbeindruck

Physikalisch gesehen, ist Licht eine elektromagnetische Welle, die sich transversal ausbreitet, also deren Schwingungsebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung steht.

Die elektromagnetischen Wellen lassen sich in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ verschiedenen Spektralbereichen zuteilen. Bedeutend für die photodynamische Diagnostik ist dabei der Bereich des sichtbaren Lichts, der nur ein sehr kleines Spektrum von $\lambda = 400\text{-}800\text{ nm}$ umfasst.

Erreichen alle Wellenlängen des sichtbaren Bereichs die Netzhaut des Auges, ist ein weißer Körper zu sehen. Werden alle Wellenlängen des sichtbaren Bereichs vom Körper absorbiert und trifft somit kein Licht auf das Auge, so entsteht der Sinneseindruck schwarz.

Ein Farbeindruck von einem betrachteten Körper entsteht dann, wenn Wellenlängen absorbiert werden und der Körper nur einen Rest aus dem Spektrum reflektiert oder durchlässt. Die Farbe, die dann vom Auge gesehen wird, wird von der Wellenlänge dieses „Restlichts“ bestimmt.

Ein Körper kann ebenso farbig gesehen werden, wenn er Licht mit einer Wellenlänge, die im sichtbaren Bereich liegt, abstrahlt, man spricht von emittiert.

Das Anregungslicht der PDD liegt in einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 380\text{ - }440\text{ nm}$ und erscheint durch die Reflexion am Gewebe violett bis blau. Das Maximum der Autofluoreszenz liegt bei $\lambda = 500\text{-}520\text{ nm}$ und kann der Farbe grün zugeordnet werden. Der rote Farbeindruck, den man bei der Porphyrinfluoreszenz erhält, wird durch die emittierte Wellenlänge im Bereich von $\lambda = 635\text{ nm}$ erzeugt.

2.2.2 Elektronenanregung

Moleküle und Atome können durch eine auftreffende Strahlungsenergie des Lichts angeregt werden. Das bedeutet, dass Elektronen aus einem Schwingungsniveau des Grundzustandes auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Die möglichen Niveaus, die diese Elektronen im Atom oder Molekül dann erreichen können, haben nach Bohr diskrete Werte, man spricht von gequantelt.

Um ein Elektron aus dem Niveau S_0 mit der Energie E_0 in ein Niveau S_1 der Energie E_1 zu überführen, ist ein Energiebetrag von $E = |E_1 - E_0|$ nötig. Diese Energie kann von „Energieträgern“ des Lichts, den Photonen durch Absorption auf die Elektronen übertragen werden. Da die Energie der Photonen mit

der Wellenlänge λ durch die Gleichung $E = (h*c)/\lambda$ definiert ist und h und c konstant sind, müssen die Photonen zum Erreichen dieses bestimmten Energiebetrages eine vorgeschriebene Wellenlänge haben. Ansonsten wird die gesamte Intensität des einfallenden Lichts vom Körper durchgelassen.

2.2.3 Energieabgabe

Die von einem Molekül absorbierte Energie kann durch verschiedene photodynamische Prozesse wieder abgegeben werden, wobei nur auf die Fluoreszenz eingegangen werden soll.

Bei der Fluoreszenz, wie sie bei der photodynamischen Diagnostik auftritt, fällt das Elektron vom Schwingungszustand eines elektronischen Anregungszustands in beliebige Schwingungsniveaus des Grundzustands zurück. Die Energiedifferenz $E = |E_1 - E_0| = (\eta * \chi)/\lambda$ wird als Licht mit der Wellenlänge λ emittiert. Die charakteristische Zeitspanne, die gemessen wird ab der Anregung des Elektrons bis zur Fluoreszenzbeobachtung, liegt im Bereich von 10^{-10} bis 10^{-6} s.

2.3 Grundlagen der Photodynamische Diagnostik und photodynamische Therapie

2.3.1 Grundprinzip der photodynamischen Diagnostik

Ziel der photodynamischen Diagnostik (PDD) ist es, mittels Fluoreszenznachweis einen oberflächlichen Tumor oder eine Dysplasie möglichst genau lokalisieren zu können, sowie eine exakte Abgrenzung vom gesunden Gewebe erreichen zu können.

Bei der PDD wird zunächst ein Farbstoff, der Photosensibilisator, lokal oder systemisch appliziert. Eine wichtige Eigenschaft des Photosensibilisators, der für die PDD eingesetzt wird ist, dass er sich vor allem in neoplastischem Gewebe akkumuliert [*Kennedy J.C. et al., 1990*]. Dieser Farbstoff wird nach einer gewissen Zeit, in welcher er von den Zellen aufgenommen wurde, mit Licht eines vom verwendeten Photosensibilisators abhängigen Wellenlängenspektrums bestrahlt. Dieses liegt optimalerweise im Bereich des absoluten Absorptionsmaximums des Photosensibilisators. Von jenem werden dann kurzzeitig Elektronen angeregt, die unter Aussendung eines ebenfalls für den Photosensibilisator charakteristischen Fluoreszenzlichtes in den Grundzustand zurückkehren.

Das Anregungslicht bei der PDD mit 5-ALA liegt im blauen Wellenlängenbereich, das des Fluoreszenzlichtes im roten Spektrum.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Lichtfarben und der Zellselektivität des Photosensibilisators lassen sich die neoplastischen Areale, die rot leuchten, leichter vom umgebenden gesunden Gewebe abgrenzen, an welchem nur das blaue Anregungslicht reflektiert wird. Zusätzlich sollen durch die farbliche Hilfe kleinste Herde entdeckt werden, die bei Weißlichtbetrachtung gegebenenfalls übersehen worden wären.

Da es für jeden Photosensibilisator ein charakteristisches Fluoreszenzlicht gibt, kann man, um Verwechslungen mit ähnlich strahlenden Substanzen ausschließen zu können, dieses Licht spektrometrisch analysieren.

In Abb. 2.3-1 (Seite 19) ist der Mechanismus der PDD und der nachfolgend beschriebenen photodynamischen Therapie (PDT) noch einmal anschaulich dargestellt.

2.3.2 Grundprinzipien der photodynamischen Therapie

Bei der photodynamischen Therapie (PDT) wird im Unterschied zur Diagnostik nicht nur eine Detektion des veränderten Gewebes angestrebt, sondern über eine Zell- und Gewebeschädigung eine Zerstörung des betroffenen Bereiches erwünscht, wobei das umgebende gesunde Gewebe weitgehend geschont wird und somit erhalten bleibt [*Levy J.G., 1995, Dougherty T.J., et al., 1998*].

Hierfür ist neben einem sensibilisierenden Farbstoff und Licht spezifischer Wellenlänge, die Anwesenheit von Sauerstoff ein wesentlicher Faktor [*Fingar V.H., et al., 1992*]. Die Lichtanregung erfolgt hier zudem meist nicht im absoluten Absorptionsbereich, sondern im langwelligsten Absorptionsmaximum des Photosensibilisators, da mit zunehmender Wellenlänge durch einen

geringeren Streukoeffizienten eine bis zu 30% größere Eindringtiefe erreicht werden kann [Pass H.I., 1993; Dougherty T.J., et al., 1992].

Die angeregten Elektronen der Sensibilisatormoleküle können zum einen durch darauf folgende Redoxreaktionen und Radikalkettenreaktionen direkt Schäden am Gewebe verursachen was als phototoxische Reaktion vom Typ 1 bezeichnet wird.

Zum anderen können sie ihre Energie auf molekularen Sauerstoff übertragen und somit zur Bildung von Singulett-Sauerstoff, zytotoxischem Sauerstoff und freien Radikalen führen. Die reaktiven Sauerstoffmoleküle reagieren mit einer Reihe von Biomolekülen oder Redoxsystemen der Zelle und führen so u.a. durch Permeabilitätsänderungen der Zell- und Mitochondrienmembran zu dem erwünschten Tumorzelluntergang [Peng Q., et al., 1992]. Man spricht in diesem Fall, wo die Zellzerstörung vom hochreaktiven Singulett-Sauerstoff ausgeht von einer photooxidativen Reaktion vom Typ 2. Die selektive und lokale Zellzerstörung wird hauptsächlich durch diesen Mechanismus erreicht [Wolf P., 1999]. Außerdem kommt es zu einer Schädigung der Endothelien der tumorversorgenden Gefäße. Dies führt zu einer Blutstase der Tumorgefäße mit anschließendem Austritt von zellulären Blutbestandteilen und Flüssigkeit [Krammer B., 1992, Henderson B.W., 1992, Pass H.I., 1993]. Licht- und elektronenmikroskopisch zeigt sich nach einer photodynamischen Therapie das Bild einer ausgedehnten hämorrhagischen Nekrose im Tumorgewebe [Peng Q., et al., 1992].

In der Abbildung 2.3-1 ist zusammenfassend der Ablauf der photodynamischen Diagnostik und Therapie schematisch veranschaulicht.

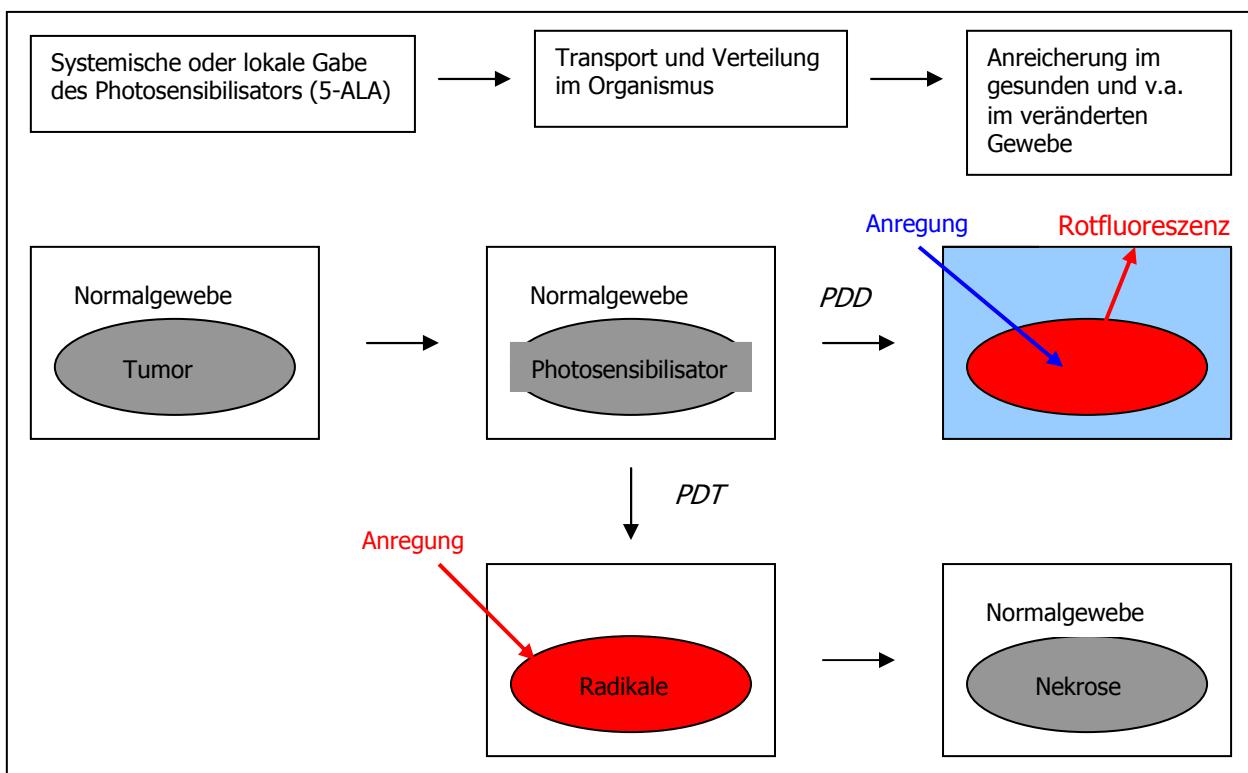


Abb. 2.3-1: Mechanismus der photodynamischen Diagnostik und Therapie

2.3.3 Autofluoreszenz

Auch ohne Photosensibilisator können im Gewebe verschiedene Komponenten zur Fluoreszenz angeregt werden. Man spricht in diesem Fall von einer Autofluoreszenz des Gewebes. Als mögliche Substanzen werden in der Literatur Tryptophan, Kollagen, Elastin, NADH, β -Karotin und Flavin genannt [Wagnieres G.A. et al., 1998]. Wie jeder Photosensibilisator besitzen auch diese Fluorophore, die hauptsächlich in der Submukosa vorkommen, charakteristische Anregungs- und Emissionsspektren.

Störend wirkt sich die Autofluoreszenz auf die PDD aus, wenn sie den Wellenlängenbereich der Fluoreszenz des Photosensibilisators überlagert. Gemessen wird nämlich jeweils die Gesamtfluoreszenzintensität innerhalb eines breiten Wellenlängenbandes, bei der nicht zwischen endogenen und exogenen Anteilen unterschieden werden kann. Besonders schwierig richtige Aussagen bzgl. der Intensität zu treffen wird es, wenn der endogene Anteil im Untergrund innerhalb des untersuchten Bereichs in seiner Intensität variiert z.B. auf Grund wechselnder Gewebemorphologie.

In Tab. 2.3-1 sind einige Fluorophore mit den jeweiligen Anregungs- und Emissionsmaxima aufgeführt, die als Quellen für die Autofluoreszenz des Gewebes während der PDD oder PDT in Frage kommen [Richards-Kortum R. et al., 1996]

Fluorophore	Vorkommen/Funktion	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Elastin	Submukosa	350/410/450	420/500/520
Kollagen	Submukosa	280/265/330/450	310/385/390/530
Oxidierte Flavine	Atmungskette/Epithel	390/460	530
Lipofuszin	Gealterte Zellen	340/430	560
Porphyrin	Hämbiosynthese	405	635/700

Tab. 2.3-1: Endogene Fluorophore mit ihren Anregungs- und Emissionsmaxima

Auch andere Substanzen im Gewebe wie Melanin, Hämoglobin und Wasser beeinflussen das Emissionsspektrum durch eine wellenlängenabhängige Lichtabsorption. Wasser absorbiert jedoch in dem zur PDD verwendeten Wellenlängenbereich kaum und Melanin weist eine relativ konstante Absorptionsintensität auf.

Die Absorptionskurve des Hämoglobins zeigt aber zwei exakt definierte Peaks innerhalb des beobachteten Emissionsbereichs. Daher können Schwankungen der Hämoglobinauflagerungen auf dem Meßbereich oder auch Blutfluß zu unterschiedlich ausgeprägter Intensität der Fluoreszenz führen [Vo-Dinh T. et al., 1995].

Die Autofluoreszenz kann aufgrund der beobachtbaren gewebeabhängigen Variationen der Intensität und der Verteilung ihrerseits ebenfalls eingesetzt werden, um neoplastische Veränderungen vom normalen Gewebe zu unterscheiden [Zonios G.I. et al., 1996, Vo-Dingh T. et al., 1995; Ramanujam N. et al., 1994; Schomacker K.T. et al., 1992; Hung J. et al., 1991]. Es wird dabei auf eine Abnahme der Autofluoreszenz im dysplastischen Areal geachtet. Diese wird u.a. durch die verminderte Konzentration an Fluorophoren im Tumor begründet [Hung J. et al., 1991].

2.4 Porphyrine als Photosensibilisatoren

Eine neue Modalität zur Tumordetektion wurde durch Kennedy und Pottier dargestellt, der für die PDT zu den endogenen Porphyrinen exogene 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) verabreichte [Kennedy J.C. et al., 1990]. 5-ALA ist ein Vorläufer von Häm im körpereigenen Stoffwechsel. 5-ALA selbst ist kein Photosensibilisator, es wird jedoch im Zielgewebe zu Protoporphyrin IX (PPIX) metabolisiert, welches einen sehr guten Photosensibilisator repräsentiert.

Im Folgenden soll auf biologischen und physikalischen Eigenschaften von 5-ALA und PPIX eingegangen werden.

2.4.1 Hämbiosynthese

Prinzipiell sind alle kernhaltigen Zellen durch ihre Enzymausstattung in der Lage, Hämmoleküle und damit auch Porphyrine, zu produzieren, da Häm für die Funktion aller aeroben Zellen essentiell ist. Häm dient als prosthetische Gruppe in zahlreichen Hämproteinen wie beispielsweise Hämoglobin, Myoglobin, Cytochrom und Guanylatzyklase. Außerdem spielt es eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Proteinsynthese und Zelldifferenzierung [Cornah J.E. et al., 2003].

Der zelluläre Häm-Spiegel ist durch eine feine Balance zwischen Hämbiosynthese und Katabolismus streng kontrolliert [Ponka P., 1999]. Zwei der bedeutendsten Organe mit der höchsten Häm-Produktion sind das Knochenmark mit den erythroiden Zellen und die Leber [Fujita H., 1997].

Die Hämbiosynthese läuft in acht Schritten ab, welche alle durch acht verschiedene Enzyme katalysiert werden. Die erste Reaktion und die letzten beiden Schritte der Hämbildung laufen im Mitochondrium ab, die Zwischenschritte finden im Zytosol statt.

Der erste Schritt, der gleichzeitig die Schrittmacherreaktion der Hämbildung darstellt, ist die Synthese der 5-ALA aus Glycin, einer Aminosäure, und Succinyl-CoA, einem Zwischenprodukt im Citratzyklus. Das dazu notwendige Enzym ist die 5-Aminolävulinsäure Synthase (ALA-S), für die es zwei unterschiedlich codierende Gene gibt mit zwei unterschiedlichen Subtypen. Das ALA-S1-Gen auf Chromosom 3(p21.1) trägt die Information für ein ubiquitär verbreitetes Enzym. Das ALA-S2-Gen auf dem X-Chromosom (p11-q21) codiert hingegen für ein Enzym, das nur in den Erythroblasten vorkommt [Cotter P.D. et al., 1995; Cox T.C. et al., 1990]. ALA-S1 katalysiert in den nicht-erythroiden Zellen die Schrittmacherreaktion der Häm-Produktion durch einen negativen Feedback-Mechanismus mit Häm. Auch in den Erythroblasten wird ALA-S1 durch Häm reguliert, die ALA-S2 wird jedoch aufgrund einer eisenempfindlichen Region über die Verfügbarkeit von Eisen kontrolliert [Ponka P. 1999]. Die ALA-S1 dient wahrscheinlich v.a. der Häm-Produktion für Cytochrom P-450, wohingegen das Häm für das Hämoglobin mit Hilfe der ALA-S2 synthetisiert wird [Fujita H., 1997].

5-ALA geht aus dem Mitochondrium ins Zytosol über, wo zwei Moleküle 5-ALA zu Porphobilinogen kondensieren. Das Enzym, welches für die Wasserabspaltung benötigt wird, ist die 5-Aminolävulinsäure Dehydrase. Vier Moleküle des Porphobilinogen kondensieren und zyklisieren unter

Ammoniumverlust zu Uroporphyrinogen III. Die eingesetzten Enzyme für diese Reaktion sind die Porphobilinogen Desaminase sowie die Uroporphyrinogen III Cosynthase. Schließlich kommt es zur Ausbildung des Porphyrinskeletts. Über eine Decarboxylierung der Acetatseitenketten entsteht Coproporphyrinogen III. Durch Oxidation an den Pyrrolringen entsteht Protoporphyrinogen IX, dessen Bildung mit dem Rücktransport ins Mitochondrium, dem Ausgangsort der Hämbiosynthese, gekoppelt ist. Durch Oxidation der Methylengruppen, die die Pyrrole verbinden, entsteht Protoporphyrin IX (PPIX). Durch Chelatbildung mit Eisen, das über die Ferrochelatase katalysiert wird, entsteht schließlich das Häm [Dailey H.A., 2002].

Neben der 5-Aminolävulinsäure Synthase unterliegt auch die 5-Aminolävulinsäure Dehydrase und die Ferrochelatase einer Feedback-Hemmung durch Häm [Cornah J.E. et al., 2003].

In Abb. 2.4-1 ist der Ablauf der Hämbiosynthese in den jeweiligen Kompartimenten mit den jeweiligen Enzymen noch einmal schematisch dargestellt.

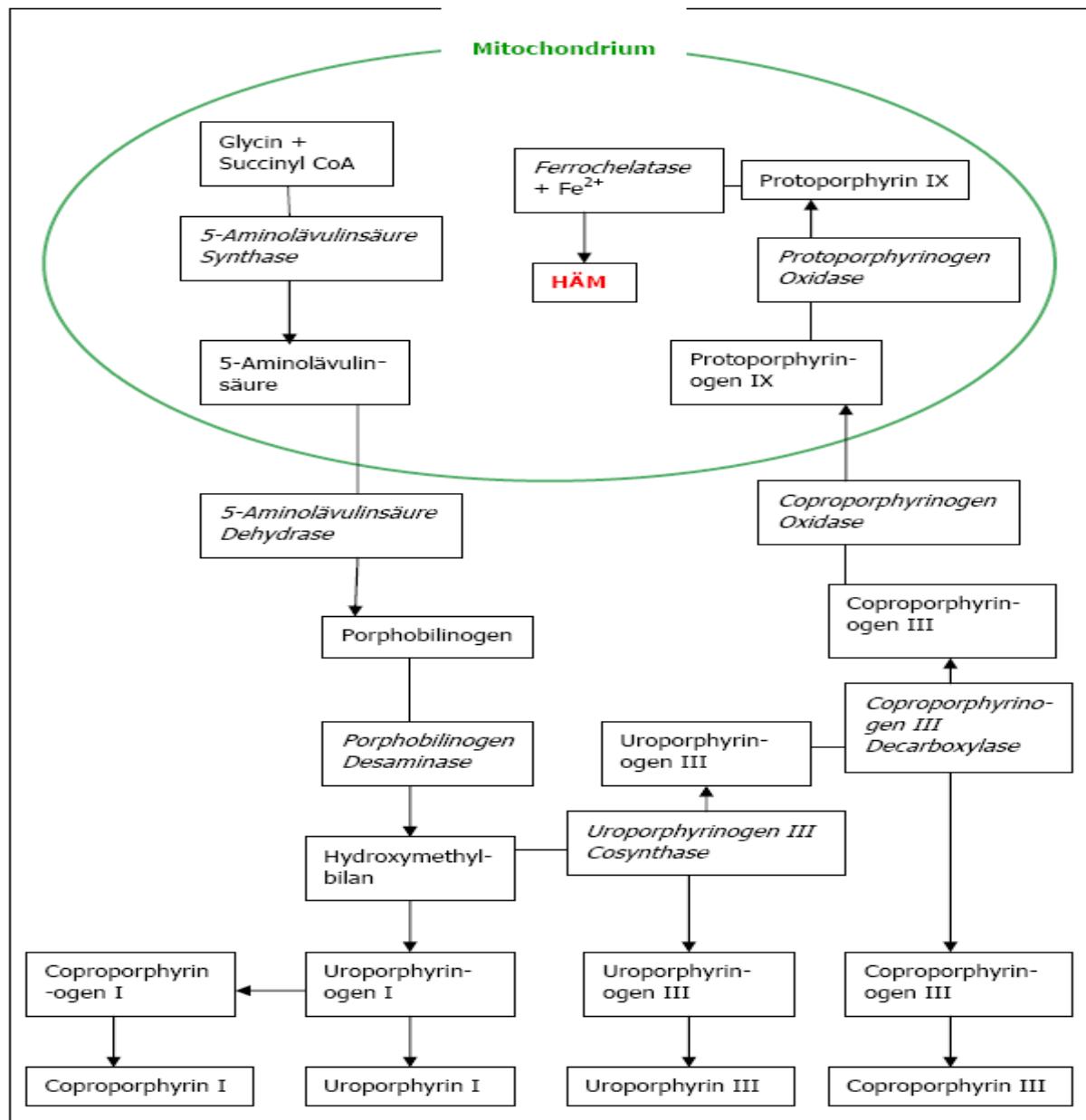


Abb. 2.4-1 Hämbiosynthese modifiziert nach Kennedy J.C. et al., 1992

2.4.2 5-Aminolävulinsäure

Die genaue Bezeichnung des in dieser Studie applizierten Photosensibilisators 5-Aminolävulinsäure lautet 5-Amino-4-oxo-Pentansäurehydrochlorid. In Abb. 2.4-2 ist die chemische Formel für 5-ALA dargestellt, welches die Summenformel $C_5H_{10}ClNO_3$ hat.

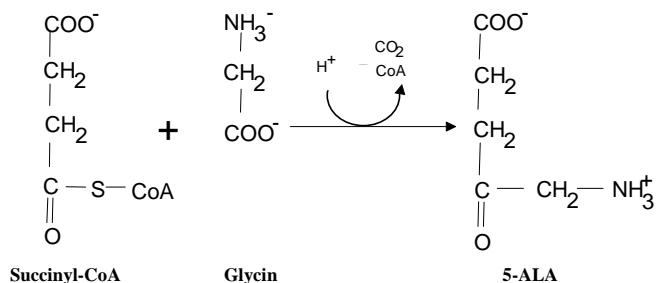


Abb. 2.4-2: Kondensation von Succinyl-CoA mit Glycin zu 5-Aminolävulinsäure

Das Molekulargewicht dieses Photosensibilisators ist 167,59 g. Der Schmelzpunkt liegt zwischen 151 und 154 °C. Der pH-Wert dieser Substanz ist in einem Bereich von 2,5 bis 3 zu finden. Das bräunlich-weiße Pulver ist in Wasser löslich und in Ethanol und Methanol nur wenig löslich. Die Lagerung sollte lichtgeschützt und trocken erfolgen.

2.4.3 Protoporphyrin IX

Das Grundgerüst der Porphyrine und somit auch des Protoporphyrin IX (PPIX), besteht aus vier Pyrrolmolekülen, die über Methinbrücken zu einem Ring verbunden sind. Das Ringsystem, welches, was für einen Photosensibilisator wichtig ist, eine hohe Stabilität besitzt, stellt ein aromatisches System dar. Die verschiedenen Porphyrine unterscheiden sich nur hinsichtlich der Seitenketten.

In Abb. 2.4-3 ist die Strukturformel von PPIX dargestellt.

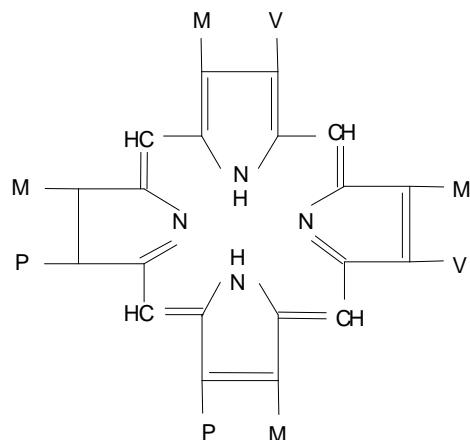


Abb. 2.4-3: Strukturformel von Protoporphyrin IX (P, M, V: Propionyl-, Methyl- bzw. Vinyl-(-CH₂=CH₂)-Gruppen)

PPIX zeigt neben seiner hohen Stabilität noch andere Eigenschaften, die es gegenüber den älteren Photosensibilisatoren auszeichnet. Wie bereits in mehreren Studien eindrücklich bewiesen worden ist, kann durch eine exogene Gabe von 5-ALA ein hoher Akkumulationsindex von PPIX in vielen Tumorzellen aus verschiedensten Organen erreicht werden [Malik Z. et al., 1989; Kennedy J.C. et al., 1992; Gallegos E.R. et al., 1999; Gibson S.L. et al., 2001]. Die vorherrschende PPIX-Fluoreszenz findet sich v.a. im Zellbereich und weniger im Stroma [Inuma S. et al., 1995]. Auch unsere Studie bestätigte dies wie die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung eines befallenen Lymphknotens in Abb. 2.4-4 zeigt. Deutlich ist die rote PPIX-Fluoreszenz innerhalb eines mit einem serös-papillären Adenokarzinoms infiltrierten Lymphknotens zu erkennen, wohingegen das nicht infiltrierte umgebende Bindegewebe nur die grüne Autofluoreszenz aufweist.

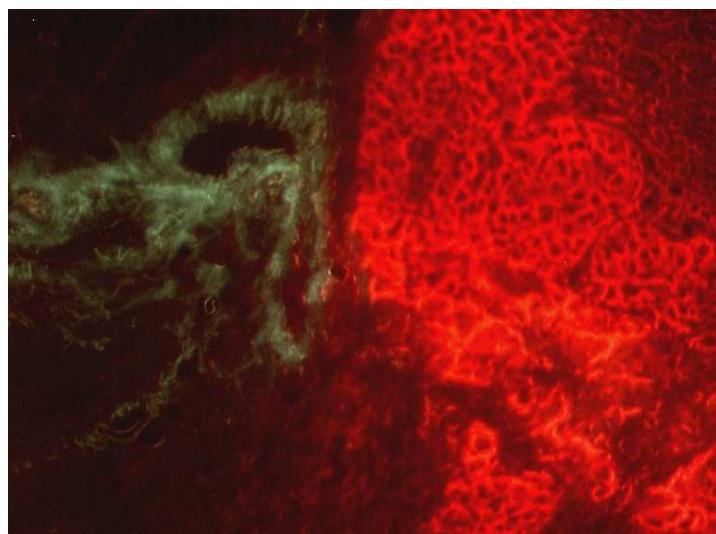


Abb. 2.4-4: Fluoreszenzmikroskopische Darstellungen eines durch ein serös-papilläres Adenokarzinom infiltrierten Lymphknotens

Einen weiteren Vorteil, den der Photosensibilisator PPIX bietet zeigt sich in seinen spektralen Eigenschaften. Wie alle Porphyrine liegen die Absorptions- und Fluoreszenzwellenlängen im sichtbaren Bereich. Eine starke Absorptionsbande, die Soretbande, zeigt sich im Blaulichtbereich um 400 nm. Weitere Absorptionsbanden liegen im Bereich von 450 und 700 nm. Die genauen Lagen der Emissionsmaxima und deren Ausprägung sind sowohl abhängig vom verwendeten Porphyrin wie auch von den Eigenschaften des Mediums, in dem das Molekül gelöst ist. Der Fluoreszenzbereich vieler metallfreier Porphyrine liegt im roten Wellenlängenbereich zwischen 600 und 720 nm. Das Maximum zeigt sich meist im Rotbereich um 630 nm und einen niedrigeren Peak bei 700 nm.

In Abb. 2.4-5 ist das Autofluoreszenzspektrum (gestrichelte Linie) gegenüber dem Fluoreszenzspektrum von PPIX (durchgezogene Linie) graphisch dargestellt. Die Autofluoreszenz stellt sich hier als ein mit zunehmender Wellenlänge kontinuierlich abnehmendes Spektrum mit einem Maximum im grünen Bereich bei 500 nm dar. Durch das vom Gewebe rückgestreute Anregungslicht entsteht das Maximum bei 450 nm. Durch die unterschiedlichen Farbeindrücke von PPIX-Fluoreszenz und Autofluoreszenz ist eine Zuordnung gut möglich.

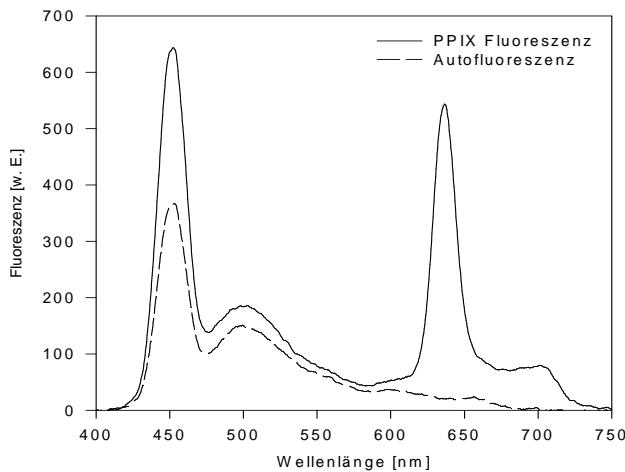


Abb.: 2.4-5 Graphische Darstellung des Autofluoreszenzspektrums im Vergleich mit dem Fluoreszenzspektrum des Photosensibilisators Protoporphyrin IX

Da PPIX ein körpereigener Stoff ist, gibt es keine Fremdkörperreaktion. Ebenso kann das PPIX vollständig im körpereigenen Stoffwechsel abgebaut werden. Das Porphyringerüst wird im Monozyten-Makrophagen-System von Leber, Milz und Knochenmark in zwei NADPH/H⁺-abhängigen Reaktionen über Biliverdin zu Bilirubin abgebaut. Bilirubin wird über die Galle ausgeschieden. Eine geringe Gefahr besteht jedoch in der möglichen Toxizität von Bilirubin in höheren Konzentrationen [Peng Q. et al., 1997a].

Da die Verweildauer im Körper sehr kurz ist bieten sich noch zwei weitere Vorteile. Zum einen ist die photosensibilisierende Wirkung von PPIX nur von kurzer Dauer, so dass Patienten maximal 24 Stunden nach ALA-Applikation vor intensiver Sonnen- bzw. Lichteinstrahlung geschützt werden müssen [Kennedy J.C. et al., 1992]. Zusätzlich ist eine an die PDD anschließende PDT mit erneuter ALA-Gabe möglich, die auch an mehreren Tagen hintereinander durchgeführt werden kann [Kennedy J.C. et al., 1992].

2.4.4 Medizinische Anwendung

Die PDD und die PDT werden in den verschiedensten Bereichen der Medizin eingesetzt. In einigen Gebieten ist die Methodik schon fest etabliert, in anderen befindet sie sich noch im experimentellen Einsatz.

So wurden in der Gynäkologie bereits Studien zur Diagnostik und Behandlung der peritonealen Endometriose durchgeführt. Die verwendeten 5-ALA Konzentrationen, die oral appliziert wurden lagen zwischen 1 bis 30 mg/kg KG. So untersuchte Hillemanns et al. an 15 Patientinnen den Einsatz der PDD, indem er präoperativ 1 bis 10 mg/kg KG 5-ALA oral applizierte. Die endoskopische Fluoreszenzbetrachtung wurde 1,5 bis 6 Stunden später durchgeführt. Bei der niedrigeren Konzentration konnte zu keinem Zeitpunkt eine ausreichende Fluoreszenz beobachtet werden. Bei einer Gabe von 10 mg/kg KG wurde ab einem Applikationsintervall von mehr als drei Stunden eine signifikant höhere Porphyrinfluoreszenz in aktiver peritonealer Endometriose beobachtet als im

umgebenden Gewebe. Dabei war außerdem zu sehen, dass pigmentierte und noduläre Endometriose weniger fluoresziert [Hillemanns P. et al., 2000c]. Bei den durchgeführten Fluoreszenzdiagnostiken traten weder intraoperativ noch postoperativ klinisch relevante Nebenwirkungen auf, auch keine Schädigungen intraabdomineller Organe. Dies konnte u.a. durch eine erneute Kontroll-Laparoskopie bestätigt werden. Auch die mit maximaler Fluoreszenz reagierenden, sehr sensiblen Fimbrientrichter der Eileiter zeigten keine photozytotoxischen anatomischen Schäden. Weiterhin wurde auch die Funktion der Eileiter nicht beeinträchtigt, was durch spätere Schwangerschaften dokumentiert ist [Hillemanns P. et al., 2000c]. Auch die PDT ist in der Frauenheilkunde eine große Bereicherung. Bereits in mehreren Studien wurde der Einsatz bei der zervikalen (CIN), der vulvären (VIN) und vaginalen (VAIN) intraepithelialen Neoplasie untersucht. Bodner et al. konnten u.a. zeigen, dass bei topischer Applikation von 5-ALA eine CIN II unter Einhaltung bestimmter Bedingungen zur Konisation eine gute Alternative bieten könnte [Bodner K. et al., 2003]. Auch bei der VIN kann bei entsprechender Indikationsstellung durch diese einfach durchzuführende Behandlung eine kürzere Heilungsphase erreicht werden als mit der konventionellen Therapie, sowie ein exzellentes kosmetisches Ergebnis erzielt werden [Hillemanns P. et al., 2000a].

Die PDD und PDT gehören mittlerweile insbesondere in der Urologie bei malignen Erkrankungen zu festen Therapieoptionen. Durch eine intravesikale Applikation beim Blasenkarzinom können die unerwünschten Nebenwirkungen zudem sehr gering gehalten werden [Zaak D. et al., 2005].

Aufgrund steigender Inzidenz- und Mortalitätsraten beim Karzinom des oberen Atemtrakts ist man auch in der HNO an einer frühen Detektion und Resektion dieser Karzinome interessiert. Bei topischer Applikation von 5-ALA können prämalige und maligne Läsionen mit einer sehr hohen Sensitivität aufgefunden werden [Leunig A. et al., 2004]. Auch in den unteren Atemwegen erleichtert die photodynamische Bronchoskopie das Auffinden dysplastischer Veränderungen [Piotrowski W.J. et al., 2004].

Zahlreiche Hauterkrankungen und vor allem maligne und prämalige Läsionen stellen in der Dermatologie die Hauptindikationen für die Durchführung einer photodynamischen Diagnostik dar [Ericson M.B. et al., 2005; Smits T. et al., 2005].

Weitere Anwendungsbereiche der PDD und PDT sind die Neurochirurgie beim Neuroblastom, hier ist ein möglichst kleiner Gewebeschaden an gesundem Gewebe von extrem hoher Bedeutung [Duffner F. et al., 2005]. Die Viszeralchirurgie setzt die Fluoreszenzdiagnostik und Therapie mit 5-ALA u.a. bei intraepithelialen Neoplasien im Barrett-Ösophagus und Hepatoblastomzellen ein [Claydon P.E. et al., 2004; Till H. et al., 2005]. Auch zur Detektion von dysplastischen Neoplasien bei der Colitis ulcerosa bietet die Fluoreszenzendoskopie eine gute Einsatzmöglichkeit [Messmann H. et al., 2003].

Beim Ovarialkarzinom ist die Photodynamische Diagnostik noch nicht etabliert. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es einen Case-Report von einer Patientin und zwei *in vivo* Studien mit viel versprechenden Ergebnissen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Fluoreszenzdiagnostik Peritonealkarzinoseherde entdeckt wurden, welche bei konventioneller Weißlichtbetrachtung übersehen worden wären [Major A.L. et al., 2002; Löning M. et al., 2004 und 2006].

3 Material Und Methoden

3.1 Allgemeines

Die vorliegende Studie ist eine monozentrische, prospektive Machbarkeitsstudie (n = 26 Patientinnen). Sie wurde unter Einhaltung ethischer, rechtlicher und wissenschaftlicher Richtlinien klinischer Forschung der Europäischen Gemeinschaft sowie unter Berücksichtigung der Prinzipien des Weltärztekongresses nach der Deklaration von Helsinki/ Somerset 1997 durchgeführt. Außerdem wurde auf eine ordnungsgemäße Durchführung nach den Bestimmungen des Deutschen Arzneimittelgesetzes [AMG, 8. AMG-Novelle (11. Dezember 1998)] geachtet.

Ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München lag vor Beginn der Studie vor.

Die Patientinnen wurden von Oktober 2001 bis Juli 2002 in die Studie eingeschlossen.

Die Fluoreszenzdiagnostik mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) soll als eine beim Ovarialkarzinom neue diagnostische Option zur Detektion von Peritonealkarzinoseherden bei Primärdiagnose oder Rezidivsituation eruiert werden. Geprüft werden einerseits die Konzentrationen der oralen Applikation 1 mg/kg Körpergewicht (KG) und 10 mg/kg KG als auch unterschiedliche Zeitintervalle zwischen der 5-ALA-Applikation und der Operation.

3.2 Rahmenbedingungen des Studiendesigns

Im Folgenden sollen die Ein- und Ausschlusskriterien der Studie erläutert werden.

3.2.1 Einschlusskriterien

Eingeschlossen in die Studie wurden Frauen ab 18 Jahren mit gesichertem Ovarialkarzinom FIGO I-IV, bei Verdacht auf Ovarialkarzinom oder Ovarialkarzinomrezidiv. Der Karnofsky-Index für den Allgemeinzustand sollte mindestens 70% betragen. Außerdem musste eine schriftliche Einverständniserklärung der Patientin vorliegen, in welcher sie sich bereit erklärte, an der Studie teilzunehmen und willentlich dazu in der Lage gewesen sein, alle Studienbedingungen zu erfüllen und zu verstehen. Die Patientinnen wurden vor Abgabe ihres Einverständnisses ausführlich über den Studienablauf, Vorteile und Nachteile der Fluoreszenzdiagnostik sowie über mögliche Nebenwirkungen von 5-ALA aufgeklärt.

3.2.2 Ausschlusskriterien

Nicht in die Studie eingeschlossen wurden Patientinnen, die keine Anzeichen für die Diagnose eines invasiven Ovarialkarzinoms aufwiesen oder an einem Zweitmalignom erkrankt waren.

Als weitere Ausschlusskriterien galten Porphyrie bzw. Überempfindlichkeit gegenüber Porphyrinen, sowie schwerwiegende medizinische Konditionen und/ oder das Bestehen einer Kontraindikation bezüglich der Studienmedikation, die die Patientin nach Einschätzung des Prüfarztes als nicht geeignet für die Studie erscheinen ließen.

Des Weiteren wurden Patientinnen, die eine bekannte Niereninsuffizienz (Kreatinin > 2,0 mg/dl) oder Leberinsuffizienz (Bilirubin > 3 mg/dl; Quickwert < 60%; γ -GT > 170 U/l) hatten nicht zur Studie zugelassen.

Auch eine gegenwärtige oder frühere Teilnahme in einer anderen klinischen Studie innerhalb der letzten 60 Tage sprach gegen einen Einschluss in diese Studie.

Bei bekanntem oder vermutetem Alkohol- oder Drogenmissbrauch wurde von einer Partizipation abgesehen, oder auch wenn nach Einschätzung des Prüfarztes die Patientin nicht compliant für die Studienteilnahme erschien.

Von einer Studienteilnahme abgesehen wurde zudem bei Patientinnen, bei denen psychiatrische oder neurologische Erkrankungen, wie Demenz oder sonstige psychische Zustände, vorlagen, die das Verständnis über die Therapie und damit die schriftliche Einwilligung nicht erlaubten.

3.2.3 Abbruchkriterien

Die Patientin konnte jederzeit ohne Angabe von Gründen aus der Untersuchung ausscheiden, mit der Zusicherung, dass ihr dadurch kein Behandlungsnachteil widerfahren wird.

Mögliche Gründe für das Ausscheiden der Patientin konnten ein Widerruf der Patienteneinwilligung sein, aber auch ein nachträgliches Feststellen nicht erfüllter Ein- oder Ausschlusskriterien.

Ebenfalls aus der Studie herausgenommen wurden Patientinnen, wenn Erkrankungen neu diagnostiziert wurden, die die Wirksamkeit der Behandlung oder die Sicherheit der Patientin beeinflussen hätten können, wie zum Beispiel eine Porphyrie. Patientinnen, die ein Medikament erhielten, welches bei gleichzeitiger Verabreichung mit der Studienmedikation ein hohes Risiko für die Patientin bedeutete, sollten auch nicht weiter an der Studie teilnehmen.

Die Gründe hierfür wurden sorgfältig dokumentiert.

3.3 Medikation

5-Aminolävulinsäure wurde als Pulver von der Firma Medac (Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Wedel, Deutschland) bezogen. Unmittelbar vor Applikation wurde die entsprechende Menge lichtgeschützt in 200 ml Mineralwasser ohne Kohlensäure gelöst und den Patientinnen oral verabreicht.

Die Patientinnen erhielten entweder die Konzentration 1 mg/kg Körpergewicht oder 10 mg/kg Körpergewicht. Ab einem Bodymass-Index größer 37 kg/m² bekamen die Patientinnen 7 mg/kg KG 5-ALA anstelle von 10 mg/kg KG.

Die Operation erfolgte in einem Zeitintervall von 3 bis 14,5 Stunden nach ALA-Applikation.

3.4 Fluoreszenzanregung

Es wird zunächst wie üblich ein Weißlicht-Staging des intraabdominellen Situs durchgeführt. Anschließend wird die Porphyrinfluoreszenz der Peritonealkarzinoseherde detektiert.

Als Lichtquelle dient eine Xenon-Kurzbogenlampe (D-Light, Karl Storz GmbH & Co, Tuttlingen, Deutschland), hierbei kann digital zwischen Weißlicht und blauem Fluoreszenzlicht gewählt werden. Die Leistung der Lampe beträgt 300 Watt. Soll eine Fluoreszenzanregung der ALA-induzierten Porphyrine erfolgen, werden mittels Bandpassfilter nur Spektren im Wellenlängenbereich von $\lambda = 380 - 440$ nm erzeugt. Der grüne und rote Spektralbereich wird dadurch weitgehend ausgeblendet, so dass das Anregungslicht blau-violett erscheint.

Das Beleuchtungsbündel des Endoskops wird über ein Linsensystem gebündelt weitergeleitet und durch einen eingekoppelten Flüssigkeitslichtleiter auf das zu untersuchende Areal gebracht. Der Flüssigkeitslichtleiter gewährt einen verlustarmen Lichtdurchsatz.

3.5 Fluoreszenzbetrachtung

Die Optik des Endoskops (Fa. Karl Storz GmbH & Co, Tuttlingen, Deutschland) ist mit zwei zusätzlichen Filtern ausgestattet, die jederzeit einen Wechsel zwischen bisher üblicher Weißlichtdiagnostik sowie einer durch Blaulicht angeregten Autofluoreszenz (AF)- oder Protoporphyrin IX (PPIX)-Fluoreszenz-Betrachtung ermöglichen. Der jeweils gewünschte Filter wird durch einfaches Drehen an der Endoskopoptik gewählt.

Ist die Optik auf Weißlicht-Modus eingestellt, kann die gewohnte Standard-Diagnostik ohne Filter durchgeführt werden. Diese erfolgt nach Weißlicht-Abgleich mit einem Tupfer. Der AF-Filter lässt nur noch Wellenlängen im Rotlichtbereich transmittieren.

Der PPIX-Filter ist so konstruiert, dass Wellenlängen im Bereich $\lambda = 470\text{-}700\text{ nm}$ selektiert werden. Damit werden nicht nur die Fluoreszenzen, sondern auch ein Teil des blauen Anregungslichts (450-460nm) transmittiert. Dies ermöglicht eine optimale Erkennung suspekter Areale, weil es zu einem deutlicheren Kontrast zwischen rotem und blauem Licht kommt, also eine Unterscheidung zwischen „positiven“ und „negativen“ Arealen optimiert.

Die Bildgebung erfolgt mit einer speziell entwickelten drei-chip-Endokamera (Tricam SL-PDD, Fa. Karl Storz GmbH & Co, Tuttlingen, Deutschland) mit Integrationsmodus. Ein Moduswechsel zwischen Weißlichtmodus und einem eigens für die Fluoreszenzdiagnostik entwickelten Fluoreszenzmodus kann sofort über ein Keyboard erfolgen, das mit der Steuerung der Kamerafunktion verbunden ist. Die elektronische Farbbebalance dieses Modus ist dabei so eingestellt, dass das Videobild der Fluoreszenz dem Bild entspricht, welches der Operateur während des Blicks durch das Endoskop erhält.

Die Empfindlichkeit der Kamera ist zudem so modifiziert, dass im Wellenbereich der PPIX-Fluoreszenz eine besonders hohe Transmission erreicht wird. Damit erzielt man eine deutlich höhere Nachweisempfindlichkeit im Rotkanal zwischen 600 und 700 nm gegenüber der Sensitivität einer Standardkamera.

3.6 Spektroskopie

Es erfolgt eine quantitative Spektroskopie durch die Erfassung eines 2 mm großen Gewebeareals über das Endoskop, das über eine Quarzfaser mit einem Kerndurchmesser von 600 μm an ein Vielkanalspektrometer (Optical Multichannel Analyser, Spectroscopy Instruments, Gilching und S2000, Ocean Optics, Mikropack, Ostfildern) eingekoppelt wird. Die Fluoreszenzspektren im Bereich von 450 bis 750 nm werden während der Messungen auf dem PC dargestellt.

Somit wird schon intraoperativ eine vorläufige Beurteilung der zu sehenden Spektren von verdächtigen Herden möglich, welche sowohl weißlichtgesteuert als auch fluoreszenzgesteuert biopsiert werden.

Die endgültige Spektralanalyse wird nach der Operation über wissenschaftliche Graphik Software (SIGMA PLOT 4.0, Jandel Scientific, San Raphael, Kalifornien, USA) am PC erstellt.

3.7 Patientendokumentation

Die Patientendokumentation umfasst den gesamten perioperativen Zeitraum, in welchem sich die Patientin in stationärer Behandlung der gynäkologischen Abteilung befindet.

3.7.1 Präoperative Patientendokumentation

Vor der Operation werden von den Patientinnen persönliche Angaben wie Alter, Größe und Gewicht, sowie der Karnofsky-Index bestimmt. Vorhandene Begleiterkrankungen sowie deren Medikation werden ebenfalls eruiert.

Falls bei der Patientin schon früher Operationen, wie zum Beispiel die Primäroperation eines Ovarialkarzinoms durchgeführt worden sind, wird auch dieses mit zugehörigem Pathologiebefund (TNM-Klassifikation), Operationsbericht, adjuvanten und palliativen Therapieschematas dokumentiert. Die Patientinnen werden nach ihrem momentanen Befinden und vor allem speziell nach den Symptomen Nausea, Emesis, Obstipation und Diarrhoe befragt, sowie dem Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens. Die Klassifikation erfolgt nach WHO-Kriterien.

Es wird auch darauf geachtet, ob die Patientinnen Hauteffloreszenzen aufweisen und gegebenenfalls deren Art, Ausmaß, Lokalisation und Dauer des bisherigen Bestehens vermerkt.

An Laborparametern werden einen Tag vor der Operation Blutbild einschließlich Differentialblutbild, Gerinnung (Thromboplastinzeit und partielle Thromboplastinzeit (PTT)), Leberwerte wie GOT, GPT, γ-GT, Bilirubin und alkalische Phosphatase, die Nierenwerte Kreatinin und Harnstoff, sowie die Tumormarker (CA 125 und CA 72-4) bestimmt.

Außerdem wird von den Patientinnen ein 10 ml-Serumröhrchen Blut abgenommen, welches zum Abdunkeln sofort in Alufolie gewickelt und zur Kühlung in den Kühlschrank gegeben wird. Dadurch wird ein weiteres Umwandeln von 5-ALA in deren Folgeprodukte ex vivo weitgehend unterbunden, da dies ansonsten zu einer Fehlbestimmung der Werte führen würde. Die Serumröhrchen werden zur Aufbereitung ins Labor weitergegeben, wo die 5-ALA- und die PPIX-Konzentrationen vor der oralenALA-Applikation als Ausgangswerte ermittelt werden.

3.7.2 Intraoperative Patientendokumentation

Zur Ermittlung des Zeitintervalls zwischen 5-ALA-Applikation und Fluoreszenzdiagnostik wird sowohl der Zeitpunkt der 5-ALA-Gabe als auch der Beginn der Ausleuchtung notiert. Zudem werden die Zeiten des ersten Hautschnittes und der Peritoneumeröffnung erfasst.

Besondere Ereignisse während der Operation wie beispielsweise Wechsel von Laparoskopie auf Laparotomie, oder Verzögerung der Fluoreszenzdiagnostik durch vorher notwendige Eingriffe wie Adhäsionlyse oder Tumorentfernung werden ebenfalls dokumentiert.

Während der Videoaufzeichnung werden zum postoperativen Wiederauffinden der für die Auswertung wichtigen Stellen die Vorlaufzeiten des Videobandes in Minuten/Sekunden festgehalten. Zudem werden die subjektiven Eindrücke des Operateurs von der Fluoreszenzintensität mit der Quantifizierung Fluoreszenzpositiv (F +) und Fluoreszenznegativ (F -) und der gewählte Betrachtungsmodus (Weißlicht- (WL), Blaulicht- (BL), Autofluoreszenzmodus (AF)) in einem dafür erstellten Bogen eingetragen. Die nachfolgende Tabelle 3.7-1 zeigt einen Auszug aus diesem Bogen.

Lokalisation:	F +	F -	WL	BL	AF	Vorlaufzeit Band
<i>Colon ascendens:</i>	<input type="checkbox"/> : <input type="checkbox"/>					

Tbl. 3.7-1: Auszug aus Dokumentationsbogen „Befunde während der Operation“

Die genaue Lokalisation der durch die Spektroskopie erfassten Bereiche wird mit der jeweils zugeordneten Nummerierung der Messung ebenfalls auf einem dafür ausgearbeiteten Bogen erfasst um eine spätere Entschlüsselung zu gewährleisten. Außerdem werden die subjektiven Fluoreszenzintensitäten des Operateurs nach der gleichen Graduierung wie bei der Videodokumentation notiert. Da das Anregungslicht in der Intensität variiert werden kann, wird auch der Prozentanteil der maximal möglichen Leistung festgehalten.

Da zwischen den Spektrenmessungen größere Zeitspannen liegen können, wird auch nochmals die zugehörige Uhrzeit aufgeschrieben.

Ein Teil aus diesem Bogen ist in Tabelle 3.7-2 dargestellt.

Messung	Lokalisation:	F +	F -	%	Uhrzeit
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<i>Colon ascendens:</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> : <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Tbl. 3.7-2: Auszug aus Dokumentationsbogen „Befunde während der Operation“

Um einen Vergleich zwischen den Messungen bei den unterschiedlichen Patientinnen erzielen zu können, wird die Diagnostik schwerpunktmäßig auf definierte Areale festgelegt. Hierzu gehören das Peritoneum an der linken und rechten Beckenwand, beide Adnexe mit Uterus, die Leber und das Diaphragma, sowie verschiedene Darmabschnitte und das Omentum majus.

Zusätzlich werden alle weiteren, bei der Diagnostik auffällig erscheinenden Lokalisationen auf Video aufgezeichnet und entsprechende Spektralanalysen durchgeführt.

Während der Operation wird der Patientin wie auch schon präoperativ ein 10 ml- Serumröhrchen Blut abgenommen, das lichtgeschützt bei 4 °C kühl gelagert wird. Dieses wird zur Bestimmung der Konzentration des 5-ALA- und PPIX zum Zeitpunkt der Fluoreszenzdiagnostik ebenfalls analysiert.

3.7.3 Postoperative Patientendokumentation

Der postoperative Verlauf mit gegebenenfalls auftretenden Besonderheiten oder Komplikationen wird detailliert dokumentiert.

Zusätzlich werden die Patientinnen speziell hinsichtlich des Auftretens von Nausea, Emesis, Obstipation und Diarrhoe sowie erhöhter Körpertemperatur beobachtet.

Die Dokumentation umfasst außerdem die Feststellung neu aufgetretener Hauteffloreszenzen bzw. Veränderungen der bereits präoperativ vorhandenen.

Am ersten und siebten Tag nach der Operation werden von der Patientin im Rahmen des postoperativen Routinelabors Blutbild einschließlich Differentialblutbild, Gerinnung (Thromboplastinzeit und PTT), das C-reaktive Protein, die Leberwerte GOT, GPT, γ -GT, Bilirubin und alkalische Phosphatase, die Nierenwerte Kreatinin und Harnstoff bestimmt und auf signifikante Normabweichungen untersucht.

Die Tumormarker, die auch präoperativ gemessen wurden, CA 125 und CA 72-4, werden wie die 5-ALA- und PPIX-Konzentrationen auch erneut am ersten Tag nach der Operation gemessen.

3.8 Statistische Auswertung

Für die quantitative Auswertung der Spektren wird der Wellenlängenbereich gewählt, in welchem das Maximum der PPIX-Fluoreszenz ($\lambda = 635$ nm \pm 5 nm) zu erwarten ist. Die dort gemessenen Fluoreszenzintensitäten werden gemittelt.

Führt man Messungen der Fluoreszenzintensität durch, wird jeweils die gesamte Fluoreszenz (f), bestehend aus erwünschter PPIX-Fluoreszenzintensität (p) und unerwünschtem Autofluoreszenzwert (a) ermittelt. Wie aus Abb. 3.8-1 zu entnehmen ist, erhält man damit eine fälschlicherweise zu hohe PPIX-Intensität ($f=a+p$). Die theoretische Autofluoreszenzintensität bei $\lambda_a = 635$ nm wird berechnet und von der Gesamtfluoreszenzintensität subtrahiert ($p=f-a$).

Eine Fluoreszenz wird als fluoreszenzpositiv eingestuft, wenn der erhaltene PPIX-Wert größer als der berechnete Wert der Autofluoreszenz ist ($p>a$), der Quotient somit größer als 1 ist ($p/a>1$). Bei negativem korrigiertem Fluoreszenzwert, wird er mit 0 gleichgesetzt.

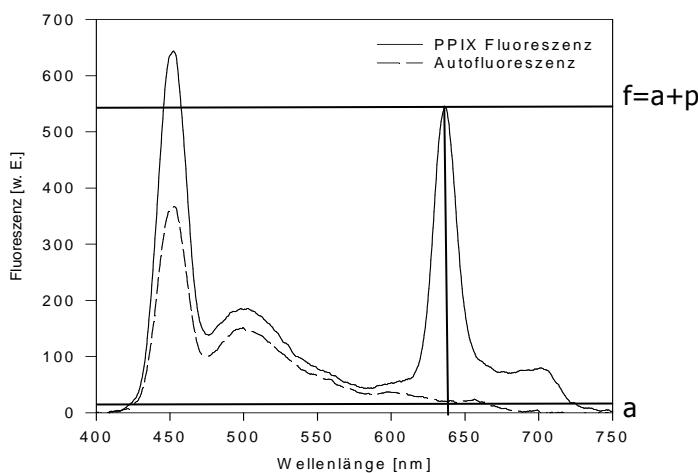


Abb. 3.8-1: Fluoreszenzspektrum der PPIX Fluoreszenz und der Autofluoreszenz

Für die statistische Auswertung werden die Patientinnen drei Gruppen zugeordnet. In Gruppe 1 sind die Patientinnen, die 1 mg/kg KG 5-ALA erhielten, unabhängig vom Zeitpunkt der Applikation.

Gruppe 2 umfasst die Patientinnen, die 10 mg/kg KG 5-ALA vier bis neun Stunden vor der Operation bekommen haben. Gruppe 3 bilden die Patientinnen, die 5-ALA in einer Konzentration von 10 mg/kg KG mehr als neun Stunden vor den intraoperativen Messungen einnahmen. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten werden gruppenabhängig getrennt nach den einzelnen Organen Adnexe, Omentum, Colon, Peritoneum und Leber dargestellt. Die Unterschiede in der Fluoreszenz für die verschiedenen Gruppen, der Dignität und der Tumorbiologie werden mit dem einfachen t-Test auf Signifikanz überprüft (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

Um die Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit von Applikationszeitpunkt und 5-ALA-Konzentration (Kapitel 4.3.2) zu bestimmen, werden die subjektiven Fluoreszenzeindrücke mit den Ergebnissen der histologischen Untersuchung verglichen. Dazu wurde intraoperativ ein bestimmtes Areal als fluoreszenzpostiv (F+) eingestuft, wenn das mit Blaulicht angeregte Gewebe eine deutlich vom umgebenden Gewebe abzugrenzende Rotfluoreszenz zeigte. Wurde keine Fluoreszenz gesehen, so wurde ein F- vermerkt. Anschließend wurde das betrachtete Areal zur Histologie eingesandt und bzgl. der Dignität untersucht.

Die Sensitivität wird organspezifisch berechnet indem die Probenanzahl der Areale die intraoperativ Fluoreszenz zeigten (F+) und zugleich in der Histologie Malignität aufwiesen, durch die Gesamtanzahl aller malignen Proben dividiert wird. Analog wird die Spezifität ermittelt indem die Anzahl der fluoreszenznegativen Bezirke und zugleich histologisch benignen Biopsien durch die Gesamtanzahl aller histologisch benignen Areale geteilt wird.

4 Ergebnisse

4.1 Patientencharakterisierung

In die vorliegende Studie wurden 26 Patientinnen im Alter zwischen 36 und 76 Jahren eingeschlossen. Eine Patientin, die mit dem Verdacht eines fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms operiert wurde, musste von der Studie ausgeschlossen werden, da sich der Verdacht nicht bestätigen ließ. Bei der Patientin wurde ein hepatzelluläres Karzinom diagnostiziert.

In Abb. 4.1-1 ist die Altersverteilung der in die Studie eingeschlossenen Frauen dargestellt. Das Durchschnittsalter der Patientinnen lag bei 57 Jahren.

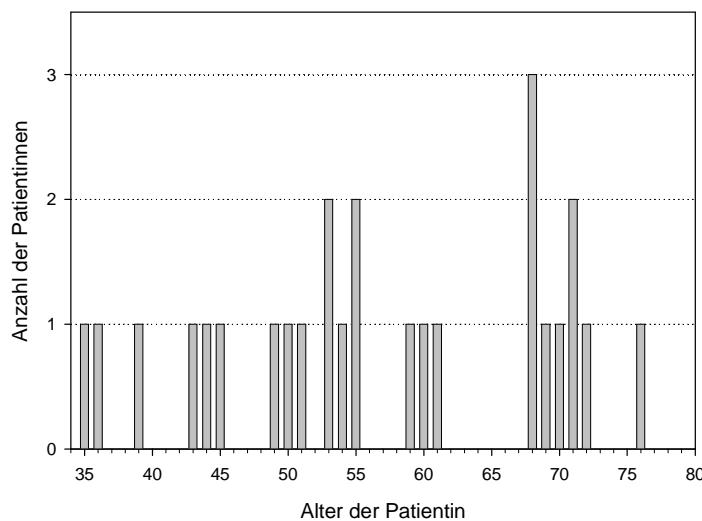


Abb. 4.1-1: Altersverteilung der in die Studie aufgenommenen Patientinnen

Da die zu applizierende ALA-Menge vom Körpergewicht der Patientinnen abhängig ist, wurde deren Körpergewicht und deren Körpergröße gemessen und der Bodymass-Index (BMI) als Quotient des Körpergewichts und dem Quadrat der Körpergröße in Metern bestimmt. Die Patientinnen wogen zwischen 47 und 101 kg, so dass sich für den BMI Werte zwischen 18,4 und 47,3 kg/m² ergaben. Ab einem BMI größer 37 kg/m² wurden anstatt 10 mg/kg KG ALA nur noch 7 mg/kg KG ALA appliziert. Diese Dosisreduktion wurde bei zwei Frauen angewendet. In der Auswertung wurden sie der Gruppe mit der Konzentration 10 mg/kg KG zugewiesen.

Die Fluoreszenzmessungen wurden bei 18 Patientinnen im Rahmen der Primäroperation des Ovarialkarzinoms durchgeführt, drei dieser Patientinnen hatten „neoadjuvant“ eine Chemotherapie erhalten. Die Messungen zweier Patientinnen wurden während einer Komplettierungs-Laparotomie durchgeführt, wobei bereits in der vorangegangenen Erst-Operation ein Ovarialkarzinom histologisch gesichert werden konnte und der Tumor in diesem Erst-Eingriff vollständig entfernt worden ist. Fünf der an der Studie teilnehmenden Patientinnen wurden aufgrund des Verdachts auf ein Rezidiv eines Ovarialkarzinoms operiert. Diese Patientinnen erhielten alle eine adjuvante Chemotherapie nach ihrer Primäroperation. Vier von diesen Patientinnen zeigten ein Rezidiv, bei einer Patientin konnte trotz

erhöhter Tumormarker intraoperativ kein Rezidiv nachgewiesen werden. Eine Patientin war wegen eines Borderline-Tumors des einen Ovars schon früher in Behandlung gewesen und wurde nun mit einem Ovarialkarzinom des kontralateralen Ovars in die Studie eingebracht.

In der Abb. 4.1-2 sind zum einen die postoperativ bestimmten FIGO-Stadien der Patientinnen dargestellt, zum anderen die Differenzierungsgrade der Ovarialkarzinome. Das FIGO-Stadium IA bzw. IC konnte jeweils einer Patientin zugeordnet werden. 18 Patientinnen wurden mit FIGO-Stadium IIIC klassifiziert, weitere drei Patientinnen wiesen bereits ein Stadium FIGO IV auf. Die vorgefundenen Ovarialkarzinome waren zur Hälfte mäßig, zur anderen Hälfte nur noch schlecht differenziert.

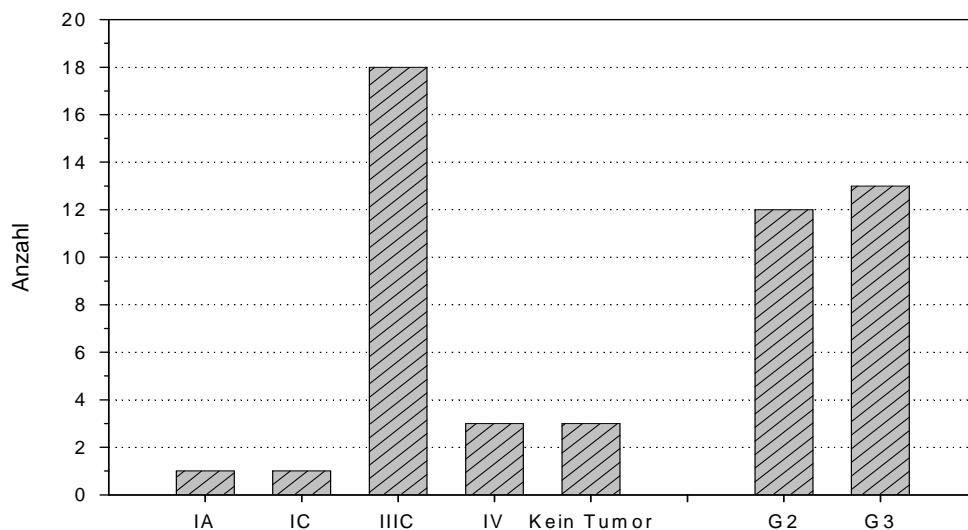


Abb. 4.1-2: Einteilung der Patientinnen nach FIGO-Stadium und Differenzierungsgrad des Ovarialkarzinoms

In der Histologie zeigte sich am häufigsten ein serös-papilläres Karzinom. In einem Kasus ließen sich muzinöse Anteile nachweisen. In drei Fällen gelang eine Zuordnung zum endometrioiden Typ des Ovarialkarzinoms und vier Mal ergab sich ein undifferenzierter Typ.

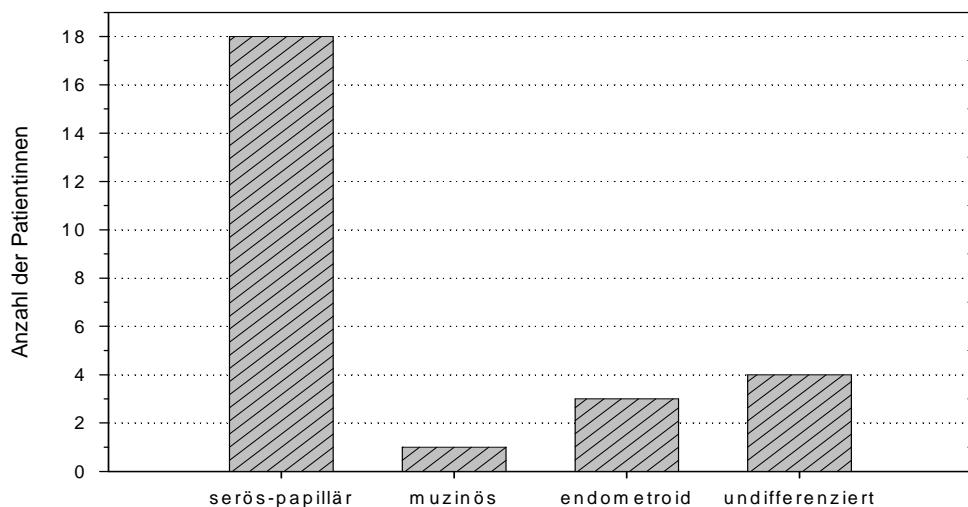


Abb. 4.1-3: Einteilung der Patientinnen nach WHO-Klassifikation der Ovarialtumoren

4.2 5-ALA induzierte Fluoreszenz

Wird Patientinnen mit einem Ovarialmalignom 5-ALA in Konzentrationen von 1 mg/kg KG oder 10 mg/kg KG oral appliziert, so kann intraoperativ nach differierenden Zeitintervallen PPIX-Fluoreszenz im Gewebe nachgewiesen werden. In unserer Studie zeigten sich dabei sowohl Unterschiede in der Intensität zwischen den einzelnen Patientinnen am gleichen Organ, wie auch variierende Fluoreszenzeindrücke bei der gleichen Patientin an verschiedenen Organen.

Da der Fluoreszenzbereich des verwendeten PPIX im roten Wellenlängenbereich mit einem Emissionsmaximum um 630 nm liegt, kann man diese Rotfluoreszenz sehr gut gegen das blaue Anregungslicht abgrenzen.

In den Abb. 4.2-1 und Abb. 4.2-2 ist ein intraoperativer Befund dargestellt. Die Patientin, die ein serös-papilläres Ovarialkarzinom hatte, erhielt 4 Stunden vor der Operation 10 mg/kg KG 5-ALA. Das linke Bild zeigt das Mesocolon der Patientin mit Weißlicht. Die rechte Aufnahme wurde unter Blaulichtanregung aufgenommen. Die rote Fluoreszenz des in Herden akkumulierten PPIX ermöglicht eine deutlich leichtere Detektion suspekter Areale.

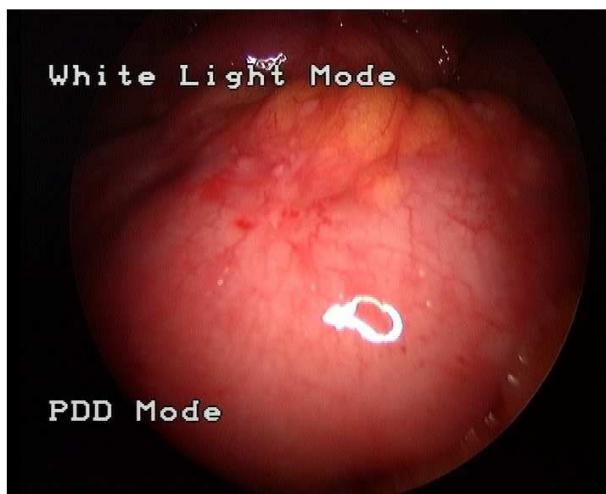


Abb. 4.2-1: Weißlichtaufnahme des Mesocolons

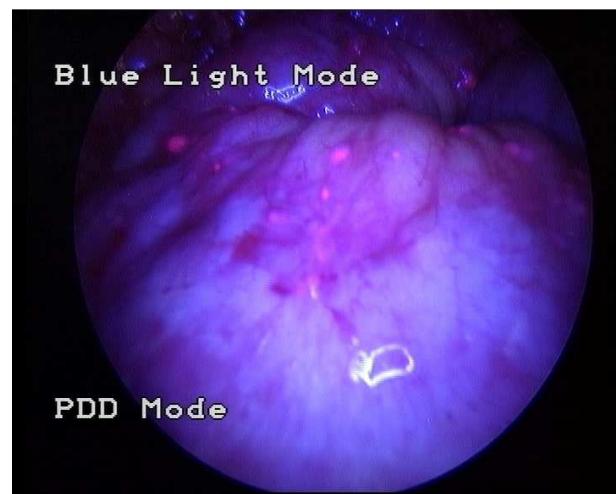


Abb. 4.2-2: Blaulichtaufnahme des gleichen Mesocolons

4.3 Quantitative Fluoreszenzspektrometrie

Die Patientinnen wurden zunächst abhängig von der ALA-Konzentration und dem Applikationsintervall drei Gruppen zugeordnet. Die erste Gruppe bestand aus den Patientinnen, die das 5-ALA in einer Konzentration von 1 mg/kg KG bekommen haben, drei bis 14 Stunden vor der Operation. Die nächste Gruppe wurde von den Patientinnen gebildet, welche 10 mg/kg KG 5-ALA in einem Zeitraum von vier bis neun Stunden vor der Operation erhalten haben. Die Patientinnen, die 10 mg/kg KG 5-ALA 10 bis 16 Stunden vor der Operation eingenommen haben, bildeten die dritte Gruppe. Die Tabelle Tab. 4.3-1 soll diese Einteilung noch einmal verdeutlichen und gibt die Anzahl der jeweiligen Gruppenzugehörigen an.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
ALA-Konzentration	1 mg/kg KG	10 mg/kg KG	10 mg/kg KG
Applikationszeitpunkt	3 – 14 Std. prä-op.	4 – 9 Std. prä-op.	10 - 16 Std. prä-op.
Anzahl der Patientinnen	6	15	5

Tab. 4.3-1: Einteilung der Patientinnen in die Gruppen

Die gewonnenen Messergebnisse wurden den drei Gruppen zugeordnet und zunächst die Fluoreszenzintensitäten an diversen Organen und Stellen mit und ohne Tumorbefall verglichen.

Im Folgenden sollen Aussagen über die Spezifität und Sensitivität bzgl. der drei Gruppen und des Gewebes gemacht werden.

Des Weiteren wurde das Fluoreszenzverhalten der verschiedenen Subtypen des epithelialen Ovarialkarzinoms und des Differenzierungsgrades dargestellt. Zusätzlich werden die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit einer vor der Operation vorhergehenden Chemotherapie demonstriert.

4.3.1 Einfluss des Applikationszeitpunktes und der ALA-Konzentration auf die Fluoreszenzintensität

Die Abb. 4.3-1 bis Abb. 4.3-5 zeigen mit Hilfe von Boxplots den Bereich der Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit der drei Gruppen und damit in Abhängigkeit des Applikationszeitraumes und der ALA-Konzentration. Die horizontale Linie bei 1 kennzeichnet den bereits zu Studienbeginn definierten fluoreszenzpositiven Bereich.

Da die Messwerte Unterschiede hinsichtlich des Gewebes gezeigt haben, werden die Ergebnisse diesbezüglich getrennt für die verschiedenen Organe in mehreren Graphen dargestellt.

Die den Graphen folgenden Abbildungen zeigen jeweils für das entsprechende Organ den intraoperativen Befund in Form von Weißlicht und im Vergleich dazu die Fluoreszenzaufnahmen.

Nachfolgende Abbildung 4.3-1 stellt die Fluoreszenzwerte dar, die an den Adnexen bzw. am Primärtumor gemessen wurden. Der Boxplot „Tu-Gruppe 1“ zeigt die Werte, die innerhalb der Gruppe 1 (1 mg/kg KG und 3-14 Std. prä-op) am Tumor verzeichnet wurden. Dies gilt analog für die Boxplots „Tu-Gruppe 2“ und „Tu-Gruppe 3“ für die Messwerte der Gruppe 2 und 3 am Tumorgewebe. Diesen „Tumor-Boxplots“ gegenüber gestellt sind die Fluoreszenzwerte, die an tumorfreien Adnexen erreicht wurden. Alle Messergebnisse der drei Gruppen sind durch den Boxplot „Kein Tumor“ dargestellt. Die Berechnungen der Signifikanz wurden dann gruppenspezifisch durchgeführt.

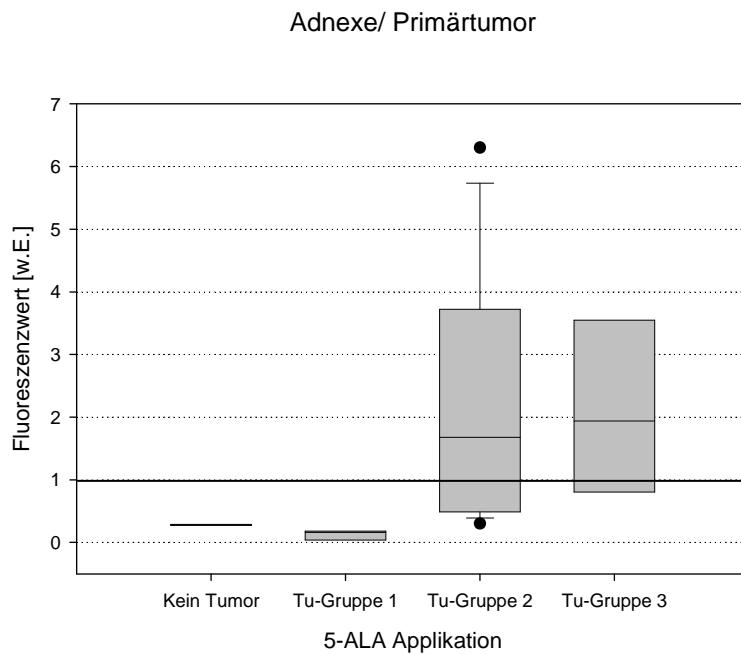


Abb. 4.3-1: Fluoreszenzwerte der Adnexe/ des Primärtumors bei verschiedenen 5-ALA Applikationen

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Tumor vs. Tumorfrei	p= 0,093	p= 0,012	p= 0,128
		Tumor Gruppe 2	Tumor Gruppe 3
Tumor Gruppe 1		p= 0,008	p= 0,107
Tumor Gruppe 2			p= 0,883

Tab. 4.3-1: Darstellung der Signifikanzniveaus bei Vergleich der Fluoreszenzwerte am Adnex bezüglich Tumor versus benignem Gewebe aufgeteilt in die verschiedenen Gruppen

Bezüglich der Messwerte am Tumorgewebe der Gruppen 1 und 3 besteht kein signifikanter Unterschied zu Messungen an tumorfreien Adnexen (p= 0,093 und p= 0,128). Vergleicht man innerhalb der Gruppe 2, also Messwerte von Patientinnen, die 10 mg/kg KG 5-ALA vier bis neun Stunden prä-operativ erhalten haben, die Fluoreszenzwerte von tumorfreien Adnexen mit befallenen Adnexen ergibt sich ein signifikanter Unterschied (p= 0,012). Der Mittelwert der Gruppe 2 bei Tumor betrug 2,35 gegenüber 0,29 an nicht befallenen Adnexen.

Anschließend wurden die Messwerte von befallenen Adnexen bzw. vom Primärtumor innerhalb der einzelnen Gruppen verglichen. Hohe Signifikanz festgestellt werden konnte bei Patientinnen, die 10 mg 5-ALA vier bis neun Stunden vor der Operation verabreicht bekommen haben im Vergleich zu denen mit 1 mg 5-ALA ($p= 0,008$). An den befallenen Adnexen werden signifikant bessere Fluoreszenzwerte erreicht werden, wenn die Patientinnen 10 mg/ kg KG 5-ALA im Vergleich zu 1 mg /kg KG 5-ALA erhalten. Das beste Zeitintervall wird bei vier bis neun Stunden vor der Operation erzielt.

Nachfolgende Abbildungen Abb.4.3-1a und b zeigen die intraoperativen Aufnahmen eines malignen Ovarialtumors, der mit der Beckenwand verwachsen ist. Die Patientin hat bei einem serös-papillären Ovarialkarzinom sechs Stunden vor den Messungen 10 mg/kg KG 5-ALA erhalten. Links sieht man den Befund mit konventionellem Weißlicht und rechts im Fluoreszenzmodus mit Blaulicht (Blue Light Mode). Man erkennt, dass sich die rot fluoreszierenden Tumorherde gut vom umliegenden blau reflektierenden Gewebe abgrenzen lassen. Der Fluoreszenzwert lag bei dieser Patientin am Adnex bei 3,72.

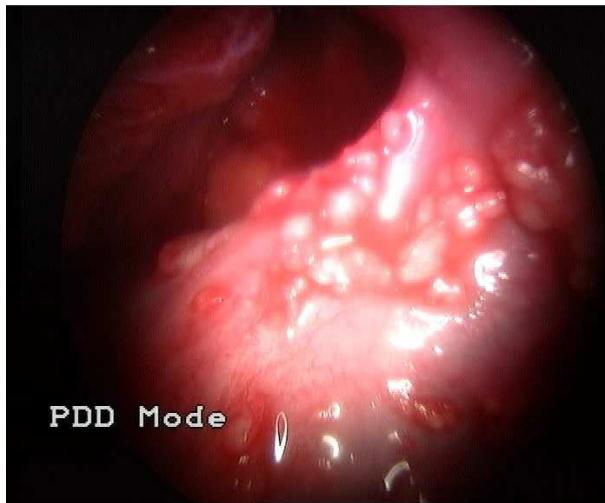


Abb. 4.3-1a: Weißlichtaufnahme eines Primärtumors

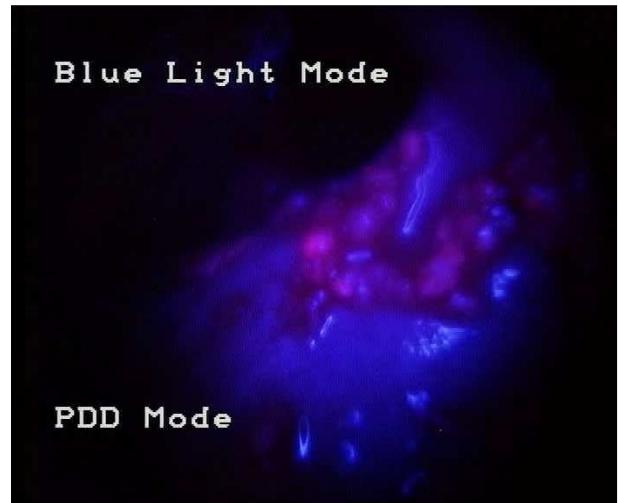


Abb. 4.3-1b: Blaulichtaufnahme eines Primärtumors

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Messungen am Omentum majus dargestellt (Abb. 4.3-2). Da an diesem Gewebe auch bei Benignität unterschiedliche Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit von der Gruppe auftraten, werden diese getrennt dargestellt. Der Boxplot „1 tumorfrei“ entspricht den Werten, die an tumorfreien Netzanteilen bei Patientinnen der Gruppe 1 gemessen wurden. Analog dazu die Boxplots „2 tumorfrei“ und „3 tumorfrei“ für die Gruppen 2 und 3.

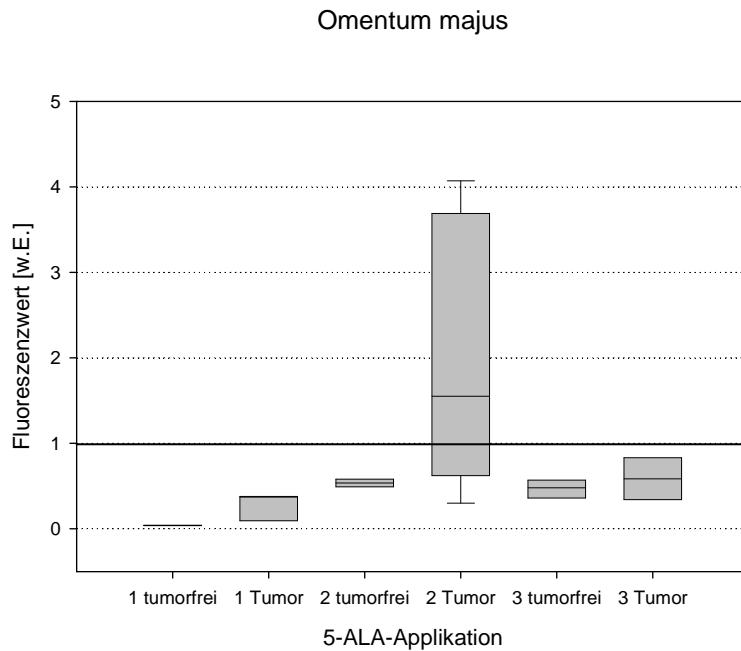


Abb. 4.3-2: Fluoreszenzwerte des Omentum majus bei verschiedenen 5-ALA Applikationen

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Tumor vs. Tumorfrei	p= 0,232	p= 0,041	p= 0,715
		Tumor Gruppe 2	Tumor Gruppe 3
Tumor Gruppe 1		p= 0,021	p= 0,378
Tumor Gruppe 2			p= 0,056

Tab. 4.3-2: Darstellung der Signifikanzniveaus bei Vergleich der Fluoreszenzwerte am Netz bezüglich Tumor versus benignem Gewebe aufgeteilt in die verschiedenen Gruppen und bei Vergleich der Fluoreszenzwerte am malignen Netzknöten innerhalb der Gruppen untereinander

Anhand Abb. 4.3-2 lässt sich erkennen, dass nur die Messwerte der Gruppe 2 an tumorösen Netzanteilen im fluoreszenzpositiven Bereich (>1) liegen. Die acht Messpunkte lagen dort zwischen 0,18 und 4,19, was einem Mittelwert von 2,0 entspricht. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied, wenn diese Fluoreszenzwerte mit tumorfreiem Netz der gleichen Gruppe verglichen werden ($p= 0,041$). Bei Patientinnen der Gruppe 1 und Gruppe 3 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, wenn man die Fluoreszenzwerte an tumorfreiem Omentum denen an tumorösen Netzanteilen gegenüber stellt ($p= 0,232$ und $p= 0,715$).

Auch der Vergleich der Fluoreszenzwerte der einzelnen Gruppen an malignen Netzanteilen untereinander zeigt zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 einen signifikanten Unterschied ($p= 0,021$). Knapp über dem Signifikanzniveau lag die Gegenüberstellung der Werte von Gruppe 2 und Gruppe 3 ($p= 0,056$).

Die Abbildungen Abb. 4.3-2a wurden bei der Operation einer an einem serös-papillären Ovarialkarzinom erkrankten Patientin erstellt, die 5,5 Stunden präoperativ 10 mg/kg KG 5-ALA appliziert bekam. Auf beiden Bildern ist eine Netzmetastase dargestellt, einmal mit Weißlicht und einmal mit Blaulicht. Im Fluoreszenzmodus lässt sich die rot fluoreszierende Metastase sehr gut erkennen. Die Berechnung des Fluoreszenzwertes ergab 3,8.

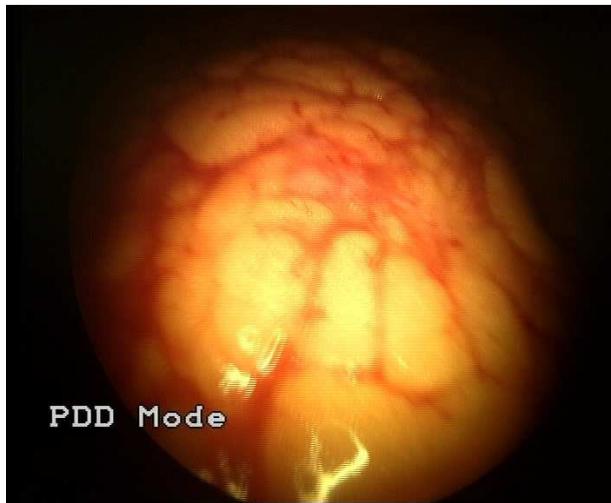


Abb. 4.3-2a: Weißlichtaufnahme einer Netzmetastase

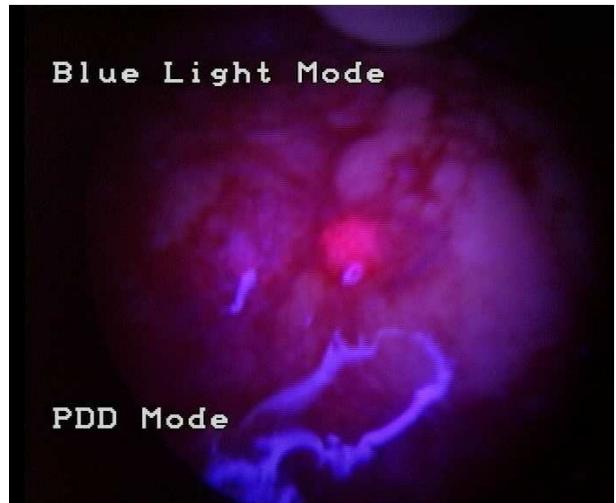


Abb. 4.3-2b: Blaulichtaufnahme einer Netzmetastase

Anschließend sollen nun die Ergebnisse der Messungen am Darm bzw. Darm-Meso gezeigt werden. Die Fluoreszenzwerte werden wie bereits zur Graphik des Omentums erläutert gruppenspezifisch dargestellt.

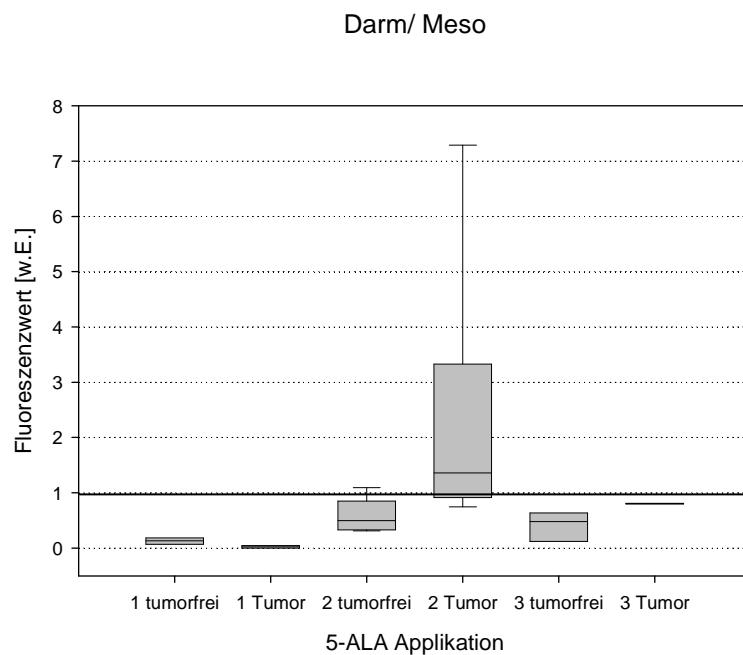


Abb. 4.3-3: Fluoreszenzwerte des Darms/ Mesodarms bei verschiedenen 5-ALA Applikationen

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Tumor vs. Tumorfrei	p= 0,122	p= 0,049	p= 0,179
		Tumor Gruppe 2	Tumor Gruppe 3
Tumor Gruppe 1		p= 0,048	p= 0,014
Tumor Gruppe 2			p= 0,140

Tab. 4.3-3: Darstellung der Signifikanzniveaus bei Vergleich der Fluoreszenzwerte am Darm bezüglich Tumor versus benignem Gewebe aufgeteilt in die verschiedenen Gruppen und bei Vergleich der Fluoreszenzwerte von Tumoren am Darm bzw. Darmmeso innerhalb der Gruppen untereinander

Auch bei den Messungen am Darm bzw. des Mesocolons liegen bei einer Konzentration von 1 mg/kg KG keine Werte im Bereich der „positiven Fluoreszenz“. Analog sind die Intensitäten bei einer Konzentration von 10 mg/kg KG bei Applikationen über zehn Stunden unterhalb der positiven Fluoreszenzmarke von 1. Fünf der sieben Fluoreszenzwerte von Patientinnen der Gruppe 2 mit einer Konzentration von 10 mg/kg KG bei Applikationen zwischen vier und neun Stunden sind bei Messungen an malignen Absiedelungen am Darm bzw. am Mesodarm größer als 1 mit einem Mittelwert um 2,54. Es konnte eine Signifikanz zu unauffälligem Darm mit einem Mittelwert von 0,60 nachgewiesen werden (p= 0,049).

Bei einer Dosis von 1 mg/kg KG 5-ALA lagen die Messwerte mit einem Mittel von 0,023 signifikant unter denen der Gruppe zwei ($p= 0,048$) und Gruppe 3 ($p= 0,014$). Nicht signifikant war hingegen der Vergleich der Messwerte der Gruppen 2 und 3 an Tumorgewebe des Darms.

Unten dargestellte Abbildungen Abb. 4.3-3a und b geben den intraoperativen Befund einer 53-jährigen Patientin wider. Histologisch wurde ein schlecht differenziertes serös-papilläres Ovarialkarzinom nachgewiesen. Man erkennt auf beiden Bildern das Querkolon mit einer circa 3 cm großen Metastase neben weiteren kleinknotigen Auflagerungen. Durch den Fluoreszenzmodus leuchten diese gut abgrenzbar vom umliegenden Gewebe. Die Fluoreszenzwerte lagen dort bei 8,14.

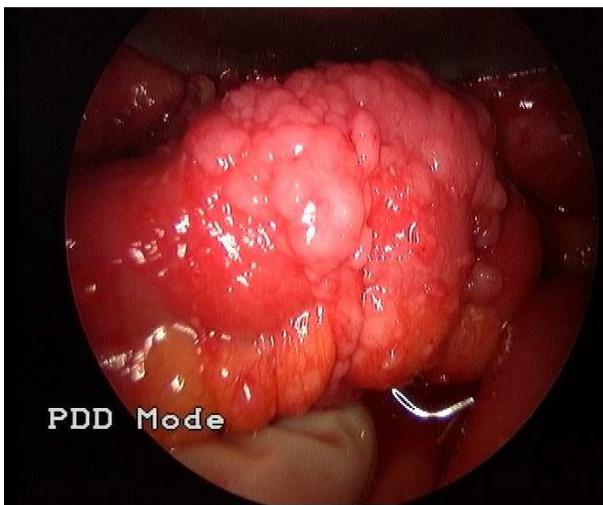


Abb. 4.3-3a: Weißlichtaufnahme einer Colonmetastase

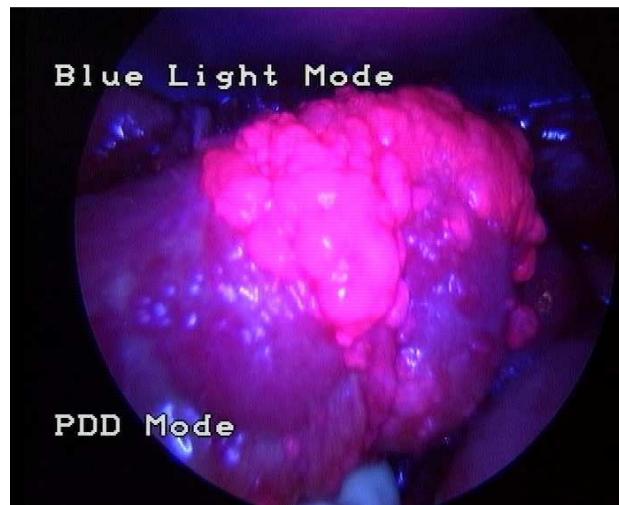


Abb. 4.3-3b: Blaulichtaufnahme einer Colonmetastase

Die Abbildung Abb. 4.3-4 und Tabelle Tab 4.3-4 stellen die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen am Peritoneum dar. Die Werte der drei Gruppen werden erneut wie auf S.43 anhand der Messungen am Omentum erläutert in sechs Boxplots veranschaulicht.

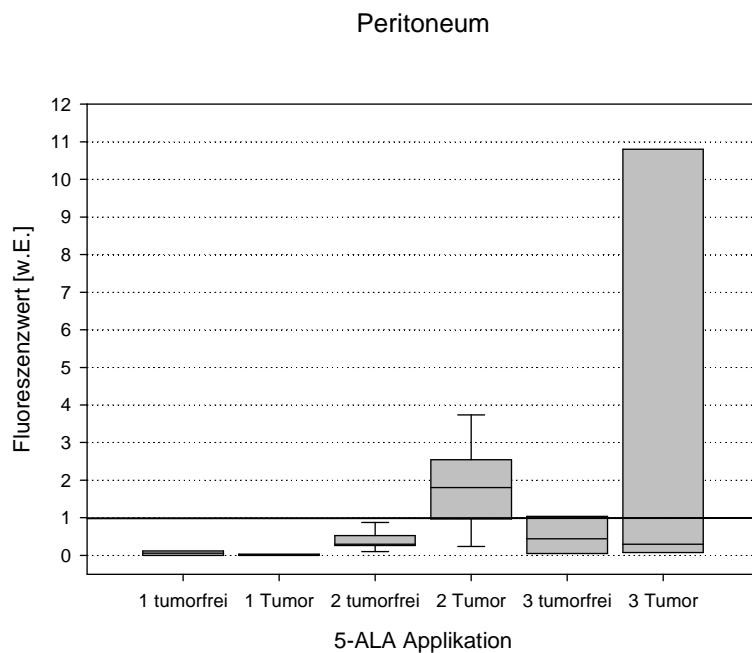


Abb. 4.3-4: Fluoreszenzwerte des Peritoneums bei verschiedenen 5-ALA Applikationen

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Tumor vs. Tumorfrei	p= 0,588	p= 0,017	p= 0,456
		Tumor Gruppe 2	Tumor Gruppe 3
Tumor Gruppe 1		p= 0,005	p= 0,412
Tumor Gruppe 2			p= 0,589

Tab. 4.3-4: Darstellung der Signifikanzniveaus bei Vergleich der Fluoreszenzwerte an Peritonealkarzinoseherden versus nicht befallenem Peritoneum aufgeteilt in die verschiedenen Gruppen und bei Vergleich der Fluoreszenzwerte von malignen Knoten innerhalb der Gruppen untereinander

Die niedrige Konzentration 1mg/kg KG führte sowohl bei benignen als auch malignen Abschnitten des Peritoneums zu keiner Fluoreszenz. Die Messpunkte der Konzentration 10 mg/kg KG des Intervalls vier bis neun Stunden lagen an Karzinomherden zwischen 0,024 und 4,17 mit einem Mittelwert bei 1,85 und bei nicht befallenem Peritoneum zwischen 0,065 und 0,96 mit einem Mittelwert von 0,42. Für diese Gruppe war eine Signifikanz nachweisbar (p= 0,017).

Wurde das Zeitintervall auf über zehn Stunden vor der Operation vergrößert wurden an Tumorherden Intensitäten zwischen -0,28 und 14,31 gemessen, an tumorfreien Arealen zwischen 0,017 und 1,26. Dies ergab Mittelwerte von 4,87 und 0,54. Aufgrund der großen Streuung der „Tumor-Werte“ konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden (p= 0,456).

Bei Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des Tumorgewebes zwischen der Gruppe 1, welche 1 mg/kg KG 5-ALA-Konzentration bekam, mit der Gruppe 2 zeigte sich bei der Gruppe 2 hoch signifikant höhere Intensitäten ($p= 0,005$). Keinen signifikanten Unterschied fand man zwischen den Messwerten der Gruppe 3 mit denen der Gruppe 1 oder Gruppe 2.

Nachfolgende Abbildungen Abb. 4.3-4a und Abb. 4.3-4b geben den intraoperativen Befund einer an einem serös-papillären Ovarialkarzinom erkrankten 36-jährigen Patientin wider. Diese hatte sechs Stunden vor der Operation 10 mg/kg KG 5-ALA erhalten. Bei der Exploration des Abdomens wurde eine diffuse Karzinomaussaat im Bereich des gesamten Peritoneums festgestellt. Abb. 4.3-4a zeigt eine Aufnahme des Beckenperitoneums im konventionellen Modus, analog dazu ist in Abb. 4.3-4b der Fluoreszenzmodus eingestellt. Man kann sehr gut die deutlich fluoreszierenden Karzinoseherde erkennen. Es wurden Messwerte um 2,29 erreicht.

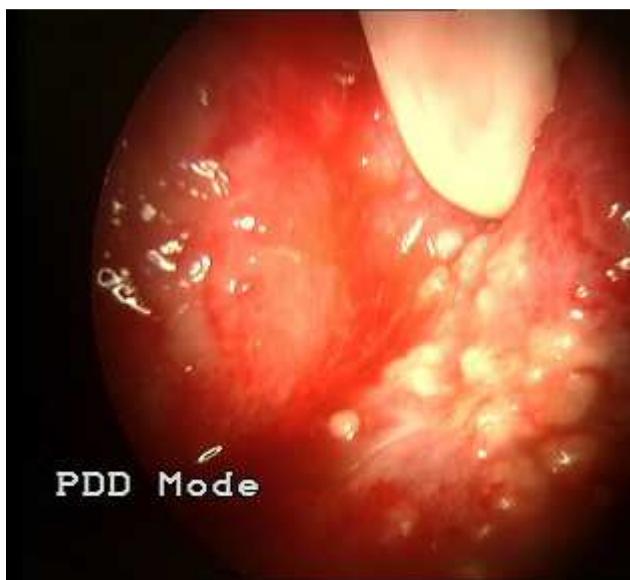


Abb. 4.3-4a: Weißlichtaufnahme einer Peritonealkarzinose



Abb. 4.3-4b: Blaulichtaufnahme einer Peritonealkarzinose

Anschließend werden die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen an der Leber dargestellt. Hierbei ist zu beachten, dass bei keiner Patientin Tumorgewebe auf der Leber oder intrahepatisch gefunden wurde. Alle Werte beziehen sich somit auf tumorfreies Gewebe. Die Werte wurden wieder entsprechend den zugehörigen Gruppen zugeordnet.

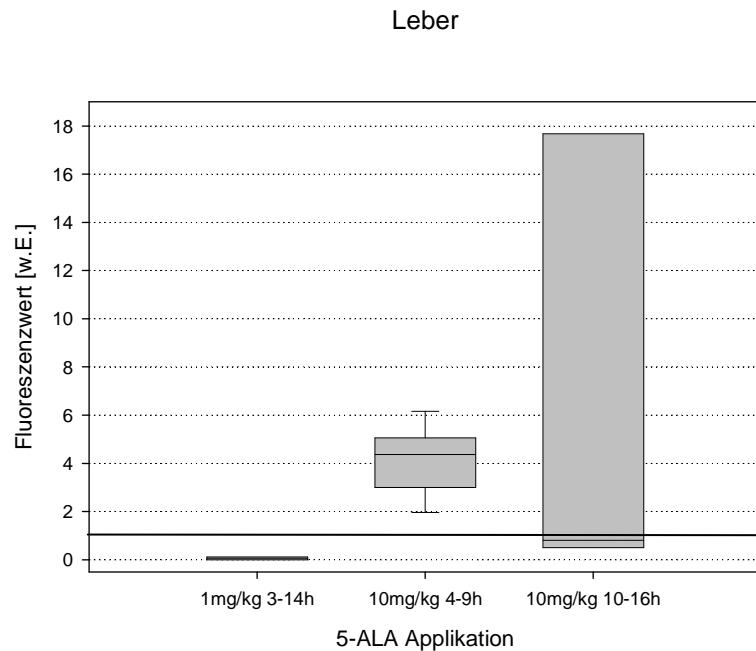


Abb. 4.3-5: Fluoreszenzwerte der Leber bei verschiedenen 5-ALA Applikationen

	Gruppe 2	Gruppe 3
Gruppe 1	p < 0,001	p = 0,396
Gruppe 2		p = 0,649

Tab. 4.3-5: Darstellung der Signifikanzniveaus bei Vergleich der Fluoreszenzwerte der tumorfreien Leber aufgeteilt in die verschiedenen Gruppen

Annähernd keine Leberfluoreszenz war bei der Gruppe 1 mit 1mg/kg KG 5-ALA zu messen, die Werte lagen zwischen -0,06 und 0,12. Im Gegensatz dazu waren alle Fluoreszenzwerte der Gruppe 2 im fluoreszenzpositiven Bereich > 1, es fanden sich Werte zwischen 1,85 und 6,54 und ergab einen Mittelwert von 4,16. Diese Werte lagen hoch signifikant höher als die der Gruppe 1 (p= 0,001). Bei der dritten Gruppe war trotz des hohen Mittelwertes von 8,17 bei einer Streuung von 13,11 keine Signifikanz gegenüber der Leber Fluoreszenzwerte der Gruppe 1 zu zeigen (p= 0,396). Diese war auch im Vergleich mit der Gruppe 2 nicht nachweisbar (p= 0,694).

Die Abbildungen Abb. 4.3-5a und Abb. 4.3-5b zeigen den intraoperativen Befund einer Patientin mit einem serös-papillären Ovarialkarzinom, die 5,5 Stunden vor den Messungen 10 mg/kg KG 5-ALA erhalten hatte. In der oberen Bildhälfte ist das Diaphragma mit kleinknotiger Peritonealkarzinose zu erkennen, die im Fluoreszenzmodus rot fluoreszieren. In der unteren Bildhälfte sieht man in der Blaulichtaufnahme die homogen rot fluoreszierende Leber. Es wurde ein Fluoreszenzwert von 4,8 gemessen.

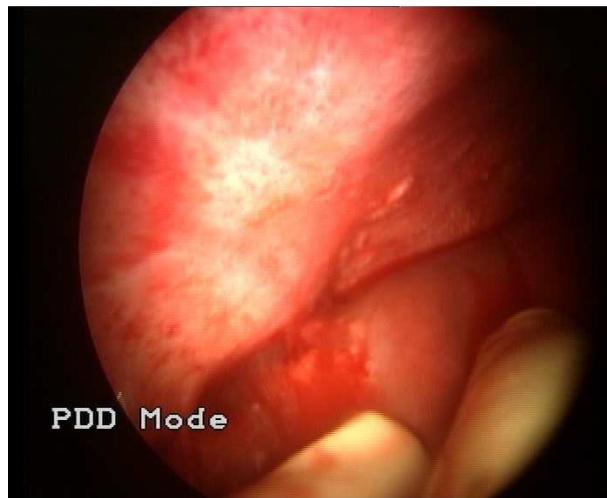


Abb. 4.3-5a: Weißlichtaufnahme der Leber und Diaphragma

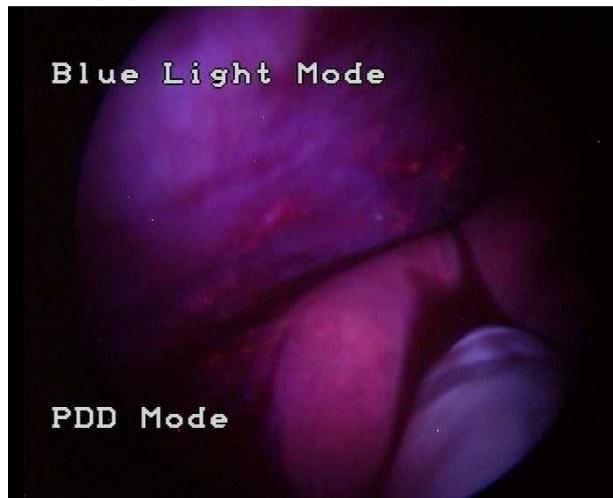


Abb. 4.3-5b: Blaulichtaufnahme der Leber und Diaphragma

4.3.2 Spezifität und Sensitivität in Abhängigkeit von Applikationszeitpunkt und ALA-Konzentration

Im Folgenden soll auf die Sensitivität und Spezifität der Fluoreszenzdiagnostik mit 5-ALA eingegangen werden.

Eine Messung wurde als fluoreszenzpositiv eingestuft, wenn das mit blauem Licht angeregte Gewebe eine selektive, vom Hintergrund abzugrenzende rötliche PPIX-Fluoreszenz zeigte. Die erreichten Ergebnisse wurden dann mit dem histologischen Befund des entsprechenden operativ entfernten Areals verglichen.

Da bei einer Konzentration von 1 mg/kg KG unabhängig von den vorliegenden Zellen keine ausreichende Fluoreszenzintensität erreicht wurde, ergibt sich für alle Gewebearten eine Sensitivität von 0%. Analog konnten keine falsch positiven Herde ausgemacht werden, so dass sich eine Spezifität von 100% ergibt.

Folgende Ergebnisse zeigten sich bei einer 5-ALA-Konzentration von 10 mg/kg KG.

Im Zeitintervall zwischen vier und neun Stunden fluoreszierten sieben der zehn befallenen Adnexe deutlich, was einer Sensitivität von 70% entspricht. Die Adnexe, die histologisch keine Malignität zeigten, fluoreszierten intraoperativ auch nicht, was eine Spezifität von 100% ergibt. Die Untersuchungen am Peritoneum zeigten im gleichen Zeitintervall eine noch höhere Sensitivität von 75% bei gleicher Spezifität von 100%. Fünf der sieben intraoperativ fluoreszenzpositiven Areale des Darms bzw. des Darmmesos konnten in der Histologie als maligne bestätigt werden, was eine Sensitivität von 71,4% ausmacht. Nur eine von sechs Proben fluoreszierte falsch positiv, es wurden also in der feingeweblichen Untersuchung trotz Fluoreszenz keine malignen Zellen gefunden, so dass die Spezifität 83,3% beträgt. Am Omentum majus konnte nur eine Sensitivität von 50% erreicht werden. Dabei war zu beobachten, dass mittels Fluoreszenz v.a. die nodulär wachsenden karzinomatösen Herde gut vom umgebenden nicht befallenen Omentumgewebe abgegrenzt werden konnten. Falsch negative, also trotz Befall als nicht fluoreszierende Areale wurde häufig bei histologisch diffus verteilter Infiltration registriert.

Wurden die Messungen am Peritoneum über zehn Stunden nach der 5-ALA-Gabe gemacht, sank die Sensitivität auf 33,3% und auch die Spezifität lag mit 75% unter der Spezifität bei Messungen zwischen vier und neun Stunden. Auffallend war zudem, dass innerhalb der Gruppe mit dem längeren Applikationszeitpunkt kein Fluoreszenznachweis bei Befall des Omentums oder des Darms gelang, so dass hier die Sensitivität 0 ist. Lediglich bei Messungen an den Adnexen konnte bei Applikation über neun Stunden vor der Operation mit 75% eine höhere Sensitivität als bei der Gruppe 2 mit 70% Sensitivität erreicht werden, bei gleicher Spezifität von 100%.

Im Allgemeinen zeigte sich bei Messungen an der Leber, die eine bedeutende Rolle in der Hämbiosynthese spielt, eine hohe unspezifische PPIX-Fluoreszenz nach oraler ALA-Applikation. Diese war ohne Peritonealkarzinose auf dem Leberperitoneum auszumachen.

In Tabelle 4.3-6 sind die Ergebnisse der Fluoreszenzdiagnostik bezüglich Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit von Applikationszeitpunkt und 5-ALA-Konzentration organspezifisch zusammengefasst. Die Sensitivität und Spezifität wurden in Prozent angegeben. Die in Klammern angegebenen Zahlen zeigen bei der Sensitivität die Probenanzahl der Areale die intraoperativ Fluoreszenz zeigten (F+) und zugleich in der Histologie Malignität aufwiesen im Verhältnis zur Gesamtanzahl aller malignen Proben. In der Zeile Spezifität entsprechen die in Klammern angegebenen Zahlen der Anzahl der fluoreszenznegativen Bezirke und zugleich histologisch benignen Biopsien in Bezug zur Gesamtanzahl aller histologisch benignen Areale.

Organ		1 mg/kg KG 3-14 h prä-op.	10 mg/kg KG 4 -9 h prä-op.	10 mg/kg KG 10-16 h prä-op.
Adnexe/ Primärtumor	Sensitivität	0% (0/3)	70% (7/10)	75% (3/4)
	Spezifität	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
Omentum majus	Sensitivität	0% (0/3)	50,0% (4/8)	0% (0/2)
	Spezifität	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (3/3)
Darm/Meso	Sensitivität	0% (0/2)	71,4% (5/7)	0% (0/2)
	Spezifität	100% (3/3)	83,3% (5/6)	100% (3/3)
Peritoneum	Sensitivität	0% (0/2)	75% (6/8)	33,3% (1/3)
	Spezifität	100% (2/2)	100% (7/7)	75% (3/4)
Leber	Sensitivität	k. A.	k. A.	k. A.
	Spezifität	100% (2/2)	0% (0/8)	66,7% (2/3)

Tab. 4.3-6: Sensitivität und Spezifität der PDD in Abhängigkeit von Applikationszeitpunkt und 5-ALA-Konzentration

4.3.3 Einfluss der Tumorbiologie auf die Fluoreszenzintensität

Wie in den vorangehenden Abschnitten 4.3.1 und 4.3.2 gezeigt wurde, konnte bei einer 5-ALA-Konzentration von 1 mg/kg KG sowohl an tumorfreien wie auch tumorösen Gewebe keine Fluoreszenzintensität erreicht werden, die über dem vor Beginn der Studie definierten Bereich > 1 lag. Um nun eine adäquate Aussage über das Fluoreszenzverhalten hinsichtlich der Tumorbiologie machen zu können, wurden für folgende Auswertungen nur noch die Werte der Gruppen 2 und 3 mit einer 5-ALA-Konzentration von 10 mg/kg KG herangezogen. Es wurden die Fluoreszenzintensitäten verwendet, die an den Organen Adnexe, Netz, Darm und Peritoneum gemessen wurden.

Nachfolgende Abbildung 4.3-6 zeigt die Fluoreszenzwerte der Gruppen 2 und 3 aufgeteilt in die histologischen Subtypen, serös-papillär, muzinös, endometroid und undifferenziert. Diesen Werten graphisch gegenübergestellt wurden die Messwerte der Gruppen 2 und 3 an tumorfreiem Gewebe.

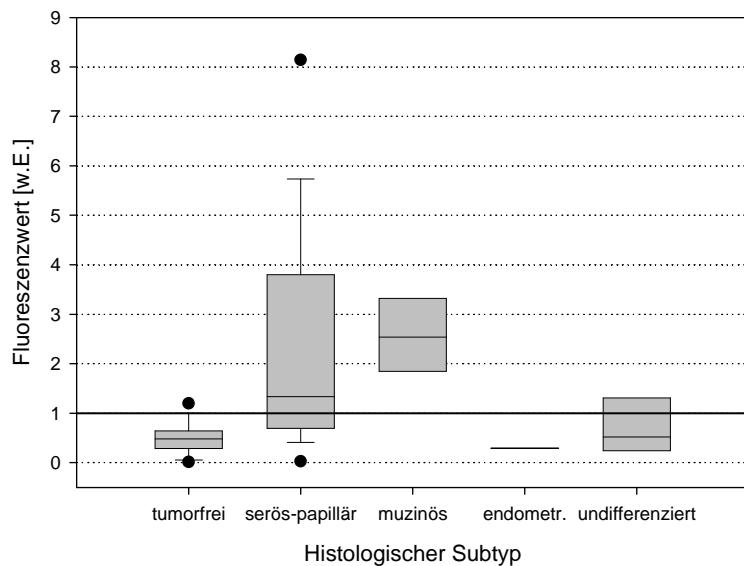


Abb. 4.3-6: Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit der Tumorklassifikation

Es konnte ein signifikanter Unterschied bzgl. der Messwerte an serös-papillären Herden mit einem Mittelwert um 2,56 und tumorfreien Messpunkten dargestellt werden ($p < 0,001$). Bei den anderen histologischen Subtypen wurde keine Signifikanz erreicht, wenn die Fluoreszenzwerte der tumorösen Herde mit denen an benignen Gewebeproben verglichen wurden. Die vier Messpunkte an undifferenziertem Tumorgewebe lagen zwischen 0,18 und 1,88 mit einem Mittelwert von 0,77, was zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich mit tumorfreiem Gewebe führte ($p = 0,469$). Auch bei den muzinösen Ovarialkarzinomen konnte knapp keine Signifikanz gezeigt werden ($p = 0,068$). Ein muzinöses Ovarialkarzinom lag aber lediglich bei einer Patientin vor. Für die Berechnung lagen jeweils drei Messpunkte von tumorfreiem und tumorösem Gewebe vor. Da nur ein Messwert bei endometroidem Karzinom vorlag, konnte bzgl. dieses Subtyps keine Signifikanz berechnet werden.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob das Tumor-Grading einen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität haben könnte.

In Abb. 4.3-7 sind die Ergebnisse dargestellt.

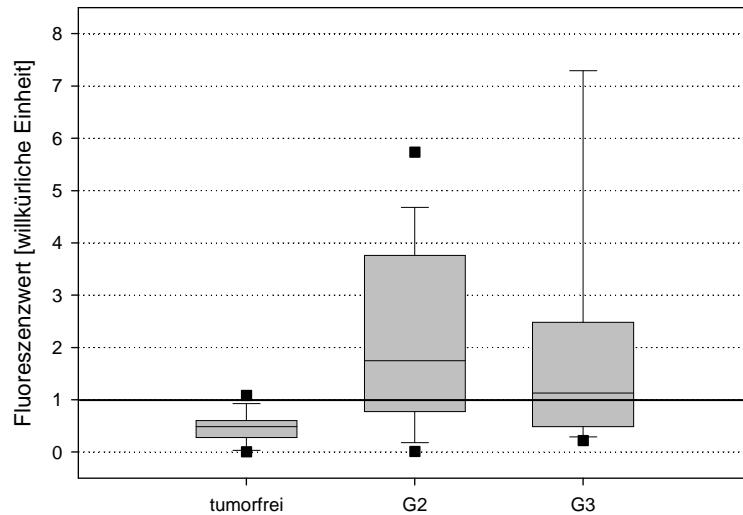


Abb. 4.3-7: Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit des Tumorgradings des Ovarialkarzinoms

Bei dem mäßig differenzierten Ovarialkarzinom lagen die Messwerte zwischen 0,024 und 6,3 mit einem Mittelwert von 2,29. Die Intensitäten des gering differenzierten Karzinoms reichten von 0,18 bis 14,31, was einem Mittelwert von 2,34 entspricht. Wurden die Messwerte von Tumorherden den von benignem Gewebe gegenübergestellt zeigte sich sowohl für das mäßig differenzierte als auch für das schlecht differenzierte Karzinom eine signifikante Differenz ($p= 0,001$ bei G2-Tumoren; $p= 0,046$ bei G3-Tumoren).

In der Studie gab es keine Patientin mit einem gut differenzierten Ovarialkarzinom, so dass darüber keine Aussage getroffen werden kann.

4.3.4 Einfluss einer Chemotherapie auf die Fluoreszenzintensität

Überdies wurde untersucht, ob sich die Fluoreszenzintensitäten unterscheiden, falls die Patientin vor der Operationen schon einmal eine Chemotherapie erhalten hat oder noch nicht. Da nur wenige Messwerte von Patientinnen mit adjuvanter Chemotherapie und nun Rezidiv-Operation vorliegen, werden sie mit den Messwerten von Patientinnen mit neoadjuvanter Chemotherapie zusammengefasst.

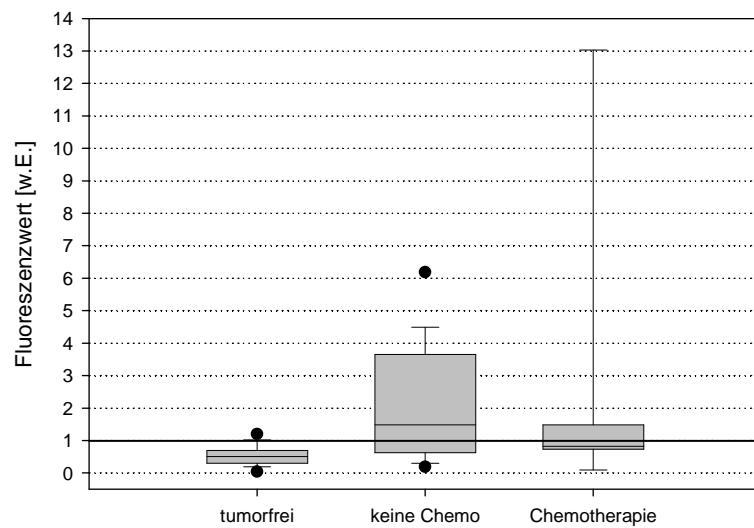


Abb. 4.3-8: Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit einer Chemotherapie

Die Intensitäten am Tumorgewebe erreichten bei Patientinnen ohne Chemotherapie im Mittel Werte um 2,18 und waren damit signifikant höher als die Intensitäten von tumorfreiem Gewebe ($p= 0,001$). Die Messwerte am Tumorgewebe der Patientinnen mit einer Chemotherapie in der Anamnese lagen mit einem Mittelwert von 3,03 nicht signifikant höher als bei tumorfreiem Gewebe ($p= 0,316$). Die Messwerte lagen dabei zwischen 0,024 und 14,31, aufgrund der großen Streuung der Werte bei kleiner Fallzahl wurde keine Signifikanz erreicht.

4.4 Messungen der Serum-Porphyrine

Von den Patientinnen wurde vor der 5-ALA-Gabe, während der Operation, also zum Zeitpunkt der Messungen und einen Tag nach der Operation die Konzentration der Porphyrine bestimmt, um zu untersuchen inwiefern der Serumspiegel der Porphyrine, insbesondere der des Protoporphyrins, durch eine exogene 5-Aminolävulinsäure-Gabe beeinflusst wird. Zudem war von Interesse, ob es Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen gibt.

Nachfolgende Abbildung Abb. 4.4-1 stellt die Protoporphyrin-Konzentration im Serum während der Fluoreszenzmessungen dar. Die Ausgangswerte der Patientinnen vor der 5-ALA-Applikation innerhalb der verschiedenen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander und werden daher zusammengefasst dargestellt.

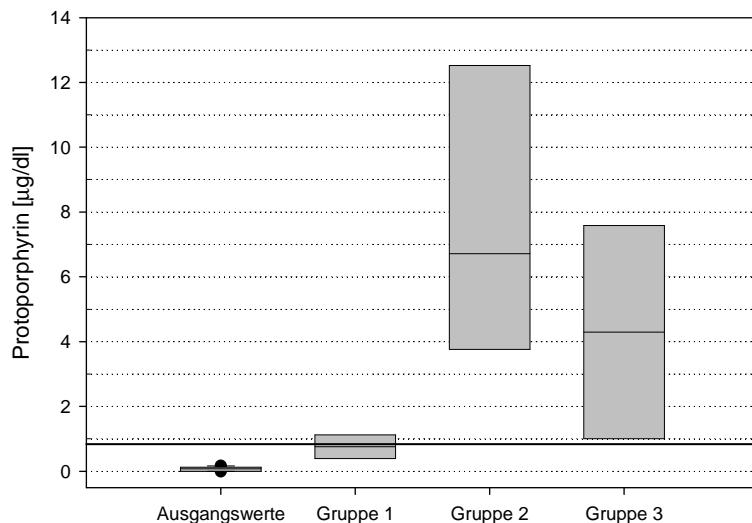


Abb. 4.4-1: Protoporphyrin-Konzentrationen im Serum zum Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung in Abhängigkeit der Gruppen 1-3 und vor der 5-ALA-Applikation. Die Linie markiert den Normbereich des Protoporphyrins, welcher bei $<0,8 \mu\text{g}/\text{dl}$ liegt.

Die Protoporphyrin-Konzentrationen der Patientinnen liegen vor der 5-ALA-Gabe zwischen nicht nachweisbar und $0,17 \mu\text{g}/\text{dl}$ und damit deutlich unterhalb des Grenzwertes von $0,8 \mu\text{g}/\text{dl}$. Der Mittelwert der Ausgangswerte beträgt $0,07 \mu\text{g}/\text{dl}$.

Durch die Gabe von $1 \text{ mg}/\text{kg} \text{ KG}$ 5-ALA, steigt die Protoporphyrin-Konzentration im Serum kaum an. Einige Werte liegen während der Fluoreszenzdiagnostik etwas über dem Normbereich, der als kleiner $0,8 \mu\text{g}/\text{dl}$ angegeben wird. Erhalten die Patientinnen das 5-ALA in einer höheren Dosierung von $10 \text{ mg}/\text{kg} \text{ KG}$ ist zu erkennen, dass die Serum-Konzentrationen von Protoporphyrin während der Operation dann am höchsten sind, wenn man das ALA vier bis neun Stunden vor der Operation verabreicht. Die Konzentrationen erreichen Werte zwischen $3,4$ und $15,76 \mu\text{g}/\text{dl}$ und sind damit z.T. über 200-mal höher als die Ausgangswerte. Betrachtete man die Veränderungen der Protoporphyrin-Konzentration innerhalb der Gruppen im Verlauf, so erkennt man in Gruppe 2 eine eben noch signifikante Erhöhung zwischen Ausgangswert und Wert zum Zeitpunkt der Messung ($p= 0,067$). Es

besteht ein Trend zu höheren Konzentrationen von Gruppe 2 im Vergleich zu Gruppe 1 zum Zeitpunkt der Messungen ($p= 0,08$).

Die intraoperativen Werte des Zeitintervalls über zehn Stunden liegen alle über dem Normbereich. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der Gruppe 2 und 3 ($p= 0,451$). Dieser kann auch nicht zwischen Gruppe 1 und 3 gezeigt werden ($p= 0,476$).

Des Weiteren wurde analysiert, ob die Fluoreszenzwerte einen Tag nach den Messungen zwischen den Gruppen differieren (Abb. 4.4-2).

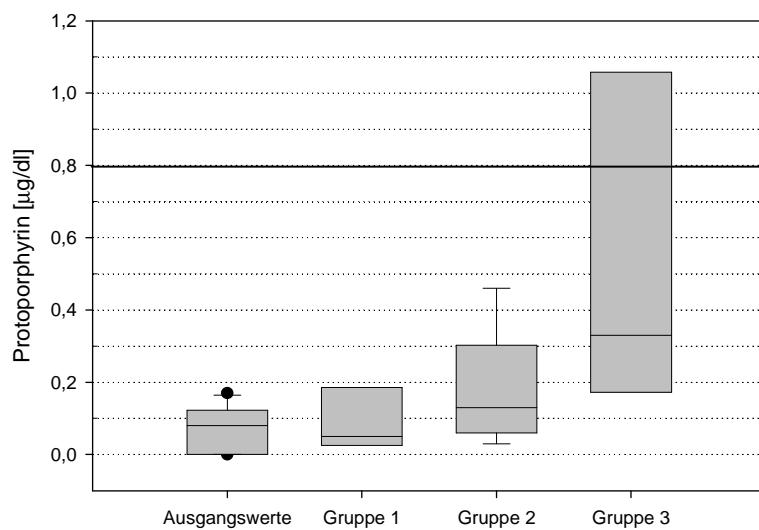


Abb. 4.4-2: Protoporphyrin-Konzentrationen im Serum einen Tag nach den Fluoreszenzmessungen in Abhängigkeit der Gruppen 1-3 und vor der 5-ALA-Applikation. Die Linie markiert den Normbereich des Protoporphyrins, welcher bei $<0,8 \mu\text{g}/\text{dl}$ liegt.

Einen Tag nach der Operation liegen bei fast allen Patientinnen die Protoporphyrin-Konzentrationen wieder im Normbereich unter $0,8 \mu\text{g}/\text{dl}$. Lediglich eine Patientin, die $10 \text{ mg}/\text{kg} \text{ KG}$ 5-ALA 12 Stunden vor der Operation erhielt hatte einen Wert von $1,30 \mu\text{g}/\text{dl}$. Zwischen den Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied unabhängig, ob die Patientinnen $1 \text{ mg}/\text{kg} \text{ KG}$ 5-ALA oder $10 \text{ mg}/\text{kg} \text{ KG}$ 5-ALA erhalten ($p= 0,460$ bzw. $p= 0,318$). Ebenfalls besteht keine Signifikanz bei Betrachtung des Zeitintervalls der 5-ALA-Applikation zwischen Gruppe 2 und 3 ($p= 0,391$).

Die Konzentrationen der Gruppe 2 liegen einen Tag nach der Operation signifikant niedriger als zum Zeitpunkt der Fluoreszenzdiagnostik ($p= 0,069$). Keinen signifikanten Unterschied kann man bei Vergleich der Werte vor und einen Tag postoperativ erkennen.

Ebenfalls ergeben Berechnungen der Protoporphyrin-Konzentrationen innerhalb der Gruppen 1 und 3 im zeitlichen Verlauf betrachtet keine Signifikanz.

Es stellt sich die Frage, ob die intraoperativ gemessenen Protoporphyrin-Konzentrationen eine Korrelation zu den Fluoreszenzwerten der verschiedenen Organe besitzt. Für diese Auswertung werden die Daten aller Gruppen herangezogen.

Zwischen den Protoporphyrin-Konzentrationen während der Messungen und den Fluoreszenzwerten der Adnexe, des Peritoneums, des Omentums und des Darms besteht keine Korrelation ($p= 0,874$; $p= 0,450$; $p= 0,691$ bzw. $p= 0,616$).

Unten dargestellte Abbildung Abb. 4.4-3 zeigt die Gegenüberstellung der Protoporphyrin-Konzentration und der Fluoreszenzwerte der Leber.

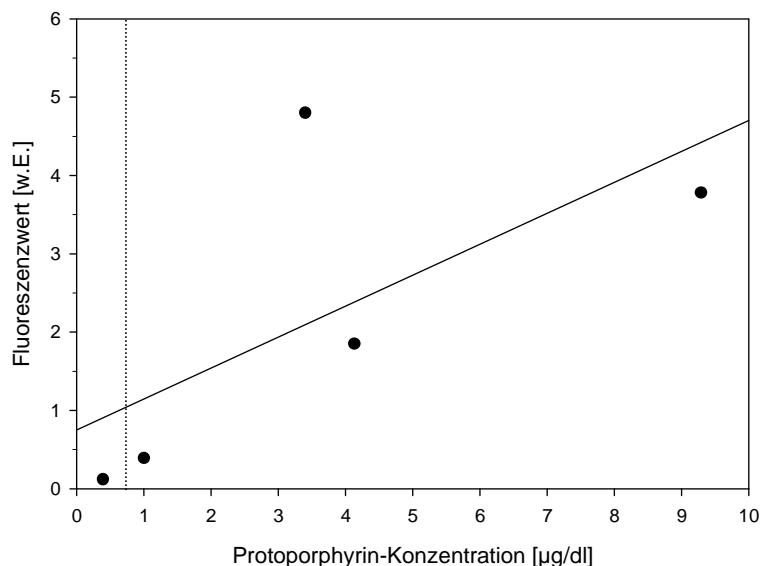


Abb. 4.4-3: Protoporphyrin-Konzentration im Serum zum Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung vs. Fluoreszenzwert der Leber. Die durchgezogene Linie ist die Korrelationslinie, die Gestrichelte markiert den Normbereich, der links davon auszumachen ist.

Hier zeigt sich, dass eine hohe Korrelation zwischen der Serum-Konzentration und der Fluoreszenzintensität der Leber besteht, die jedoch nicht signifikant ist ($p= 0,210$). Ein höherer Protoporphyrin-Wert ist mit einem höheren Fluoreszenzwert der Leber verbunden.

4.5 Nebenwirkungen der Fluoreszenzdiagnostik mit 5-ALA

Des Weiteren wurden sowohl die klinischen als auch die laborchemischen Nebenwirkungen der PDD evaluiert.

Bei keiner Patientin sind nach der Operation neue Hauteffloreszenzen, insbesondere solche, die auf eine Porphyrie hindeuten könnten, beobachtet worden. Intraoperativ waren die Patientinnen durch die sterilen Abdecktücher weitgehend von intensiver Lichteinstrahlung abgeschirmt und postoperativ erholten sich die Patientinnen in den „empfindlichsten“ ersten zwei Tagen ab der Operation in den Krankenzimmern bzw. auf der Intensivstation und waren somit auch keiner direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt.

Bei zwei Frauen dauerte die Genesungsphase subjektiv etwas länger als durchschnittlich bei Patientinnen nach einer Ovarialkarzinomoperation. Dabei ist anzumerken, dass bei einer Patientin, die 10 mg/kg KG ALA erhielt, die Operation u.a. mit Darmchirurgie sehr lang dauerte und mehrere Erythrozytenkonzentrate und FFP intraoperativ verabreicht wurden. Bei der zweiten Patientin wurde präoperativ die niedrige 5-ALA-Konzentration von 1 mg/kg KG appliziert.

Prä- und postoperativ wurden die Patientinnen laborchemisch kontrolliert. Die präoperativen Hämoglobin-Werte lagen zwischen 7,9 g/dl und 15,9 g/dl, wobei der Normbereich im Labor bei 12-16 g/dl liegt. Am 1. postoperativen Tag konnten Werte zwischen 7,5 g/dl und 12,6 g/dl und am 7. postoperativen Tag von 7,6 g/dl bis 11,4 g/dl gemessen werden. Die postoperative Hämoglobin-Differenz lag in einem Bereich von -6,8 g/dl bis +2,1 g/dl. Im Durchschnitt kam es zu einem Hämoglobin-Abfall von 3,9 g/dl. Insgesamt erhielten zwölf Patientinnen ein bis acht Erythrozytenkonzentrate im Rahmen des stationären Aufenthaltes.

Da die Hämbiosynthese des menschlichen Organismus am ausgeprägtesten in Knochenmarks- und Leberzellen stattfindet, waren bei den Blutkontrollen insbesondere die Leberenzyme von großem Interesse.

Der Normbereich der γ -GT lag bei 4-18 U/l, in welchem 21 Ausgangswerte der Patientinnen lagen. Bei vier Patientinnen wurde eine γ -GT zwischen 19 und 30 U/l gemessen, bei Dreien waren die präoperativen Werte 41, 72 und 98 U/l.

Nachfolgende Abbildung 4-5.1 demonstriert die γ -GT-Werte am ersten Tag nach der Operation entsprechend den zugehörigen Gruppen 1 bis 3. Diesen Werten gegenübergestellt sind die Werte vor der 5-ALA-Applikation, als Ausgangswerte bezeichnet.

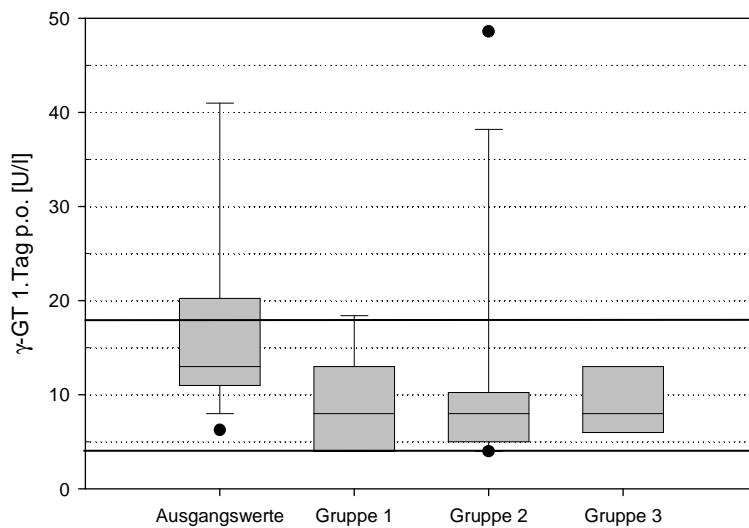


Abb. 4-5.1: γ -GT-Werte vor der 5-ALA-Applikation (linker BoxPlot) und am ersten Tag postoperativ in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit. Die durchgezogenen Linien markieren den Normbereich [4-18 U/l].

Am ersten Tag nach der Operation liegen die meisten γ -GT-Werte gruppenunabhängig innerhalb des Normbereichs zwischen vier und 18 U/l. Lediglich zwei Messwerte von Patientinnen der Gruppe 2 mit 10 mg/kg KG 5-ALA und der Applikation vier bis neun Stunden vor der Operation waren höher als der Normbereich. Eine Patientin hatte einen Ausgangswert von 98 U/l, am ersten Tag nach der Operation sank der Wert auf 35 U/l, bei der zweiten Patientin fiel das γ -GT auf 51 U/l bei einem Vorwert von 72 U/l.

Insgesamt ist zu erkennen, dass einen Tag nach der Operation meist niedrigere γ -GT-Werte erreicht wurden als vor der 5-ALA-Applikation. Diese γ -GT-Wert-Veränderungen sind in keiner Gruppe signifikant ($p= 0,268$, $p= 0,103$ und $p= 0,481$).

Bezüglich des γ -GT-Wertes am ersten postoperativen Tag findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 mit einer 5-ALA-Konzentration von 1 mg/kg KG gegenüber den Gruppen 2 und 3 mit 10 mg/kg KG 5-ALA ($p= 0,477$ und $p= 0,962$). Auch der Zeitpunkt der Messungen scheint bei Vergleich der Gruppen 2 und 3 für die Höhe des γ -GT-Wertes einen Tag nach der Operation nicht entscheidend zu sein ($p= 0,494$).

Interessante Laborwertveränderungen zeigen die Leberenzyme am siebten Tag nach der Operation. Die Abbildung Abb. 4.5-2 stellt diese γ -GT-Werte dar. Zum Vergleich werden die Ausgangswerte vor der Operation im linken BoxPlot mit aufgezeigt.

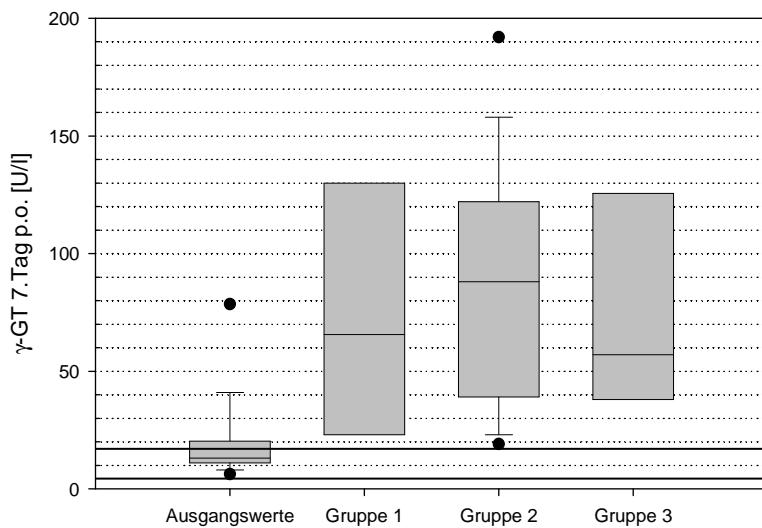


Abb. 4-5.2: γ -GT-Werte vor der 5-ALA-Applikation (linker BoxPlot) und am siebten Tag postoperativ in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit. Die durchgezogenen Linien markieren den Normbereich [4-18 U/l].

Am siebten Tag postoperativ liegen alle γ -GT-Werte höher als präoperativ bzw. einen Tag nach der Operation. Die Werte befinden sich in einem Bereich zwischen 19 und 192 U/l und damit sind alle außerhalb des Normbereichs.

In Gruppe 2 sind die γ -GT-Werte sieben Tage nach der Operation signifikant höher als vor der Operation ($p= 0,006$) und auch deutlich signifikant erhöht bei Vergleich mit den Werten vom ersten postoperativen Tag ($p= 0,002$). Es zeigte sich innerhalb Gruppe 2 eine Zunahme des γ -GT -Wertes um den Faktor 2 bis 12,5. Im Mittel nahmen die γ -GT-Werte sieben Tage nach der Operation der Gruppe 3 um den Faktor fünf zum präoperativen Ausgangsbefund zu. Für diesen Anstieg lässt sich jedoch keine Signifikanz herstellen, auch nicht bei Vergleich der Werte von einem zu sieben Tagen postoperativ ($p= 0,155$ und $p= 0,146$). Auch bei der niedrigen ALA-Konzentration von 1 mg/kg KG ist ein Anstieg auszumachen, der jedoch ebenfalls keine Signifikanz ergibt ($p= 0,145$ und $p= 0,131$).

Diese γ -GT-Erhöhungen waren von keiner klinischen Relevanz, die Werte waren im Verlauf ohne jegliche Therapie wieder rückläufig.

5. Diskussion

5.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie

Ein Ausschlusskriterium war in unserer Studie eine bekannte Niereninsuffizienz, definiert durch einen Serum-Kreatinin-Wert $>2,0$ mg/dl. Wir entschlossen uns zu dieser Regelung, da bei einer eingeschränkten renalen Ausscheidung der Hämatoporphyrinderivate aufgrund der veränderten Pharmakokinetik die Pharmakodynamik dieser Stoffe erheblich variieren kann [Dalton J.T. et al., 2002].

Die Leber gehört neben dem Knochenmark mit den erythroiden Zellen zu den zwei bedeutendsten Organen der Häm-Produktion [Fujita H., 1997]. Des Weiteren übernimmt die Leber eine wichtige Rolle im Abbau und damit in der Elimination des PPIX. Obwohl die 5-Aminolävulinsäure zu den Photosensibilisatoren gehört, die schnell aus dem Körper eliminiert werden, wurde von erhöhten PPIX-Spiegeln nach systemischer 5-ALA-Applikation berichtet [Peng Q. et al., 1997a].

Es ist nicht eindeutig geklärt, ob es nicht durch eine Akkumulation von PPIX in der Leber zu toxisitätsbedingten Schäden kommt [Weiss T.S. et al., 2003]. Zumindest ist auch innerhalb unserer Studie bei einigen Patientinnen nach der 5-ALA-Gabe zu einem transienten Anstieg der Leberenzyme gekommen. Sie fielen jedoch nach kurzer Zeit wieder in den Normbereich, was den Daten von Webber entspricht [Webber J. et al., 1997b]. Aufgrund dieses ungeklärten Sachverhalts haben wir Frauen mit auffälligen Leberwerten, wie einem Bilirubin > 3 mg/dl einem Quick-Wert $<60\%$ oder einer γ -GT > 170 U/I nicht in die Studie eingeschlossen.

Damit die Hämbiosynthese, in welchem 5-ALA über mehrere Schritte in PPIX umgewandelt wird, ungestört funktioniert, sind mehrere Enzyme notwendig. Kommt es zu einer hereditären oder erworbenen Störung eines Enzyms, resultiert daraus eine Akkumulation der entsprechenden Hämvorstufen in den Organen [Canavese C. et al., 2002]. Abhängig von der Hauptlokalisation des Enzymdefekts, Knochenmark oder Leber, werden sie in erythropoetische oder hepatische Porphyrie untergliedert. Ebenso wird der Typ der vermehrt vorhandenen Vorstufen beachtet, sowie das Vorherrschen der klinischen Symptome [Pimstone N.R. et al., 1976; Pimstone N.R., 1985]. Bei überwiegend neurologischen Symptomen wird von einer akuten Porphyrie, bei hauptsächlich kutanen Symptomen von einer chronischen Porphyrie gesprochen [Lecha M. et al., 2003; Canavese C. et al., 2002]. Um das Auslösen von Porphyrie-Symptomen bzw. das Auslösen eines Schubs zu vermeiden, wurden Patientinnen, bei denen eine Porphyrie oder eine Überempfindlichkeit gegenüber Porphyrinen vorab bekannt war von der Studienteilnahme ausgeschlossen.

5.2 Angewandte Methodik

Die Fluoreszenzdiagnostik ist eine vielversprechende Möglichkeit, die Detektion einzelner Peritonealkarzinoseherde intraoperativ zu verbessern. Dabei wird ein Farbstoff, der Photosensibilisator systemisch oder lokal appliziert. Der Photosensibilisator wird insbesondere von Karzinomzellen vermehrt aufgenommen. Durch Licht einer bestimmten Wellenlänge kann man den Photosensibilisator zum Fluoreszieren anregen und so Herde entdecken, welche man bei der konventionellen Diagnostik möglicherweise übersehen würde [Gahlen J. et al., 1999a].

Zunächst sollen die speziellen Eigenschaften eines Photosensibilisators dargestellt werden.

5.2.1 Photosensibilisatoren

Photosensibilisatoren sind Stoffe, die sich mit einem hohen Akkumulationsindex im Tumorgewebe anreichern. Darunter versteht man das Verhältnis der Akkumulation im Tumorgewebe zur Akkumulation im Normalgewebe. Für die verschiedenen Gewebe- und Tumortypen variiert dieser Index zwischen 2:1 bis 5:1. Eine hohe Konzentration findet man vor allem in neoplastischen Veränderungen sowie in der Leber, Milz, Niere und embryonalem Gewebe. Kaum Photosensibilisator-Anreicherungen kommen hingegen im Muskel- und Fettgewebe vor [Peng Q., 1992; Kennedy J.C., 1990].

Der genaue Mechanismus für die selektive Photosensibilisator-Akkumulation im Tumor ist noch nicht ganz geklärt. Wahrscheinlich basiert sie u.a. auf der hohen Affinität der meist hydrophoben Photosensibilisatoren zu Low-density-Lipoproteinen, an die sie gebunden werden und über Endozytose in den Tumorbereich gelangen [Allison B.A., 1990, Chowdhary R.K., 2003].

Ebenfalls förderlich für die Tumorselektivität scheint verstärkte Phagozytose durch Makrophagen und tumor-assoziierten Monozyten im Tumorgewebe zu sein. Als hilfreich kann auch die Neovaskularisierung des Tumors, sowie deren erhöhte vaskuläre Permeabilität diskutiert werden. Außerdem wird angenommen, dass durch das gestörte Drainagesystem der Lymphgefäße ein schlechterer Abtransport der Gewebsflüssigkeit und somit des Photosensibilisators entsteht [Pass H.I., 1993].

Damit ein Photosensibilisator für die PDD oder die PDT eingesetzt werden kann, muss er neben der Tumorselektivität noch weitere Eigenschaften aufweisen.

Dringend erforderlich ist eine kurze Verweildauer im Körper bzw. eine nur minimal lang anhaltende Photosensibilisierung. Bei den Photosensibilisatoren der 1. Generation, zu denen die Substanzen der Hämatoporphyrinderivate wie z.B. Photofrin I sowie dessen Folgeprodukt Photofrin II, ein Dihämatoporphyrinester, gehören, kam es nach systemischer Applikation häufig zu unerwünschten phototoxischen Reaktionen durch eine durchschnittlich sechs bis acht Wochen anhaltende Photosensibilisierung der Haut und der Augen. Die Patienten mussten nach einer PDD oder PDT für mindestens zwei Wochen jegliches Sonnenlicht meiden [Lim H.W., 1989]. Die zweite Generation der Photosensibilisatoren zeichnet sich durch eine nur mehr ein bis zwei Tage anhaltende

Photosensibilisierung aus. Diesen zugeordnet werden u.a. die Stoffe der Benzoporphyrinderivate sowie Chlorine und Phthalozyanine [Pandey R.K. et al., 1991; Roberts W.G. et al., 1988; Spikes J.D., 1990; Spikes J., 1986]. Eine schnelle Ausscheidung aus dem Körper bietet auch den Vorteil, dass die PDD oder PDT in kurzen Abständen mehrere Male wiederholt werden kann. Zudem besteht die Möglichkeit einer sofort anschließenden Chemotherapie oder Bestrahlung [Pandey R.K. et al., 1991; Sibata C.H. et al., 2001].

Außerdem erfolgt die Akkumulation im Tumorgewebe schneller als bei den Photosensibilisatoren der ersten Generation.

Eine weitere wichtige Eigenschaft für einen idealen Photosensibilisator ist, dass der Photosensibilisator ein chemisch genau definierter Stoff ist. Weist ein Photosensibilisator mehrere verschiedene photosensibilisierende und fluoreszierende Eigenschaften auf, so ist ein quantitativer Nachweis der Fluoreszenz nur schwer möglich [MacRobert A.J. et al., 1989].

Genau so hinderlich für die PDD wäre es, wenn der Photosensibilisator im Tumorgewebe eine hohe Fluoreszenzausbeute in einem Wellenlängenbereich der Autofluoreszenzen des umliegenden Gewebes hätte. Damit wäre eine Unterscheidung zwischen der Fluoreszenz des Tumorgewebes, welches aufgrund der Photosensibilisator-Anreicherung strahlt und der des gesunden Gewebes, welches aufgrund der morphologischen Strukturen leuchtet kaum mehr gewährleistet.

Der Photosensibilisator soll eine hohe Stabilität besitzen, so dass die Fluoreszenz in Beziehung zum zeitlichen Verlauf während der Bestrahlung nur sehr langsam verblasst. Diesen Vorgang nennt man Photobleaching, der durch einen Zerfall des Photosensibilisator in Photoprodukte entsteht. Diese können sich auf die Fluoreszenzintensität, das Fluoreszenzspektrum und auf die Fluoreszenzzerfallskinetik auswirken [Moan J., 1986; König K. et al., 1993; Karu T. et al., 1994]. Unterschieden werden muss das Photobleaching von dem Decay, der den Fluoreszenzintensitätsverlust nach Abbruch der Exzitationsbestrahlung beschreibt sowie vom Fading, bei dem die Abnahme der Intensität durch eine Langzeitlagerung der Proben entsteht.

Ohne Bestrahlung mit Licht soll der Photosensibilisator auch keine toxische Wirkung auf den Organismus besitzen. Entscheidend für die PDT ist ein Photosensibilisator, der eine gezielte Schädigung erst nach der lokalen Bestrahlung mit Licht entwickelt. Für die PDD ist wiederum wichtig, dass das toxische Potential des Photosensibilisator so gering wie möglich ist und es idealerweise zu gar keiner phototoxischen Reaktion des Photosensibilisator mit dem Gewebe kommt.

Nützlich für die PDT ist zudem, dass die Exzitationswellenlängen der neueren Photosensibilisator in einem langwelligeren Bereich liegen, wodurch eine größere Penetrationstiefe erreicht wird [Pandey R.K. et al., 1991; Sibata C.H. et al., 2001].

Die Gründe für eine erhöht gemessene Fluoreszenzintensität sind mannigfaltig. Sie kann sowohl auf einer unterschiedlichen Photosensibilisatorkonzentration im Gewebe basieren, wie auch auf einer Verdickung der Epithelschicht. Ebenso kommen ursächlich blutbedingte Absorption durch Blutaufklagerung auf dem gemessenen Areal und Unterschiede in den Streuparametern der Gewebe in Frage. Beispielsweise kann es zu einer Intensitätszunahme aufgrund einer Entzündung oder dysplastischen Veränderung kommen, da diese Prozesse mit einer Verdickung der Photosensibilisator-

speichernden Epithelschicht einhergehen. Das Ergebnis der Messung wäre in diesem Fall unabhängig vom Anreicherungsmechanismus.

Die PDD ist demzufolge nur nützlich für oberflächliche Veränderungen, da durch die vielfältigen Wechselwirkungen des Lichts mit dem Gewebe bei großer Eindringtiefe zu viele Störfaktoren auftreten würden.

5.2.2 5-Aminolävulinsäure als Photosensibilisator

Die 5-Aminolävulinsäure ist ein Stoff, der in der Fluoreszenzdiagnostik zunehmend an Bedeutung gewinnt. Verabreicht man 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) systemisch oder lokal, führt dies zu einer Überlastung in der Hämbiosynthese von Tumorzellen und es kommt zu einer Anreicherung von Protoporphyrin IX (PPIX). Dieses wird intraoperativ zum Fluoreszieren angeregt und erleichtert bei der Exploration die Detektion kleinstster Peritonealkarzinoseherde [*Gahlen J. et al., 1999a*].

Im Folgenden soll erläutert werden, was das 5-ALA bzw. das PPIX als besonders gut geeigneten Photosensibilisator auszeichnet.

Berlin et al. stellten 1956 anhand von vier Freiwilligen fest, dass die Hautveränderungen, die nach einer exogenen Verabreichung von 12,5 bis 35 mg/kg Körpergewicht 5-ALA auftreten, große Ähnlichkeiten mit dem klinischen Bild der kutanen Porphyrie haben [*Berlin N.I. et al., 1956a,b*]. Anhand von Untersuchungen an Mäusen, Katzen und freiwilligen Patienten wurde gezeigt, dass die Photosensibilisierung der Haut bereits 24 Stunden nach Zufuhr verschwunden war. Der Applikationsmodus scheint unwichtig zu sein [*Kennedy J.C. et al., 1992*].

In den darauf folgenden Studien kam man zu der Theorie, dass durch Verabreichung von entsprechenden 5-ALA-Konzentrationen der normalerweise wirksame negative Feedback-Mechanismus, der die ALA-Produktion abhängig von der Konzentration an freiem Häm reguliert, umgangen werden kann [*Kennedy J.C. et al., 1992*]. Dies führt letztendlich zu einer unkontrollierten Produktion der Folgeprodukte der Hämbiosynthese. Daraus entwickelte sich der Gedanke, dass durch eine ausreichende Menge an appliziertem 5-ALA eine so hohe PPIX-Konzentration im Gewebe erzielt werden kann, um sie für die Fluoreszenzdiagnostik und schließlich auch zur PDT nützen zu können.

Die Höhe des PPIX-Konzentrationsanstiegs nach exogener 5-ALA-Applikation scheint allerdings gewebespezifisch zu sein. So findet man eine gute PPIX-Fluoreszenz in oberflächlichen Gewebearten, wie z.B. Epidermis, Konjunktiva, Schleimhaut von Mund, Nase; Vagina und Rektum, Endometrium und Urothel genauso wie in Drüsen, deren Gänge an solchen Oberflächen enden. Dies gilt ebenso für die Leber, die Brustdrüse und Speicheldrüsen [*Kennedy J.C. et al., 1990; Kennedy J.C. et al., 1992*]. Im Gegensatz dazu, findet man nach einmaliger 5-ALA-Gabe im Gewebe aus dem Mesoderm, wie z.B. Bindegewebe, Muskel oder Knorpel kaum nachweisbare Mengen an PPIX [*Kennedy J.C. et al., 1992; Hua Z. et al., 1995; van den Boogert J. et al., 1998*].

Die Faktoren, die jedoch zu einer erhöhten PPIX-Akkumulation beitragen, sind noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise liegt es daran, dass der Hämbiosynthese-Ablauf nach exogener ALA-Gabe

nicht in allen Zellen durch eine schnelle Enzymleistung bis zum PPIX durchlaufen kann, sondern in den ersten Schritten bereits geblockt wird. Dies würde die unterschiedlichen Ergebnisse einiger Studien bzgl. der Konzentration von PPIX und anderen Vorläufersubstanzen erklären [Hua Z. et al., 1995].

Uroporphyrin, das nur eine sehr kurze Halbwertszeit hat, wird jedoch sehr schnell mit dem Urin ausgeschieden. Dessen Folgeprodukt Coproporphyrin, dass etwas schlechter wasserlöslich ist und eine etwas längere Halbwertszeit besitzt wird sowohl über die Nieren in den Urin und über die Galle in den Stuhl ausgeschieden [van den Boogert J. et al., 1998].

Eine starke Affinität zu Lipidmembranen zeigt hingegen PPIX, welches bei physiologischem pH-Wert kaum wasserlöslich ist [Uehlinger P. et al., 2000]. Dies könnte zu einem verbessertem Speichervermögen von PPIX im Gewebe führen als bei Uro- und Koproporphyrinen.

Es konnte aber u.a. gezeigt werden, dass schnell proliferierende Zellen mehr PPIX speichern [Kennedy J.C. et al., 1992; Rebeiz N. et al., 1992]. Möglicherweise spielt der Gehalt an Mitochondrien in neoplastischen Zellen eine wichtige Rolle um hohe Spiegel von 5-ALA induziertem PPIX erreichen zu können [Gibson S.L. et al., 1999].

Gallegos E.R. et al. konnte in seiner *in vitro* Studie mit normalen und kanzerösen Zervixzellen nachweisen, dass die PPIX-Akkumulation in Zellen des Zervixkarzinoms fünf- bis siebenmal höher ist als in gesunden Zervixzellen [Gallegos E.R. et al., 1999]. Auch humane Mammakarzinom und Mesotheliomzellen zeigen einen signifikanten PPIX-Anstieg [Gibson S.L. et al., 2001]. Neben zahlreichen anderen Tumorzellen kann dies auch in den erythropoetischen, lymphatischen und myeloplastischen Leukämiezellen nachgewiesen werden [Malik Z. et al., 1989].

Eine erhöhte Aktivität der Enzyme 5-Aminolävulinsäure Dehydrase, Porphobilinogen Desaminase und Uroporphyrinogen Decarboxylase konnte durch Hinnen et al. in Barrett-Ösophagus und Adenokarzinomen nachgewiesen werden [Hinnen P et al., 2000]. Zudem findet sich eine verringerte Aktivität der Ferrochelatase im Tumorgewebe, was die selektiv erhöhten PPIX Konzentrationen erklären könnte [Van Hillegersberg et al., 1992].

5.2.3 Anwendung der PDD mit 5-ALA bei Peritonealkarzinose

Bislang existieren nur wenige *in vitro* Studien, die die Verwendung des Photosensibilisators 5-Aminolävulinsäure zur Fluoreszenzdetektion von Peritonealkarzinoseherden untersuchten. Die Herde wurden entweder durch Colonkarzinomzellen oder durch Ovarialkarzinomzellen hervorgerufen. Nur zwei gynäkologische Arbeitsgruppen berichteten bislang von der Anwendung bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom.

Die erste publizierte *in vitro* Studie wurde 1997 von Major et al. durchgeführt. Weiblichen Ratten mit diffuser Peritonealkarzinose der Ovarialkarzinomzelllinien NuTu-19 wurde das 5-ALA entweder intraperitoneal oder intravenös zu verschiedenen Zeitpunkten und mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 25 und 100 mg/kg KG appliziert. Es konnte gezeigt werden, dass selbst Mikrometastasen mit

einem Durchschnitt kleiner 0,5 mm fluoreszierten, unabhängig von den Applikationsparametern, wobei das beste Ergebnis mit 100 mg/kg i.p. erreicht wurde [*Major A.L. et al., 1997*].

Hornung et al. konnten diese Ergebnisse in einer 1998 veröffentlichten Studie bestätigen. Als optimales Zeitintervall für die Fluoreszenzdiagnostik wurden eine bis drei Stunden nach der intravenösen 5-ALA Injektion genannt. Es gelang Herde zwischen 0,4 und 5mm eindeutig von tumorfreien Peritoneum zu unterscheiden [*Hornung R. et al., 1998*].

Die Arbeitsgruppe um Aalders untersuchte an Ratten die PPIX-Konzentration von tumorösen im Verhältnis zu gesundem Gewebe über einen Zeitraum von 24 Stunden. Unabhängig von den intravenös verabreichten 5-ALA-Konzentrationen (100, 25 und 5 mg/kg) wurde die beste Ratio nach zwei bis drei Stunden erzielt. Einen signifikanten Kontrast erreichte man bei einer Applikation von 5 mg/kg 5-ALA [*Aalders M.C. et al., 2000*].

Einen Vergleich zwischen Fluoreszenzdiagnostik und konventioneller Weißlichtbetrachtung publizierten Canis et al. 2001. Bei Weißlicht wurden im Mittel 2,84 Peritonealkarzinoseherde einer Ovarialkarzinomzelllinie aufgefunden. Durch die Fluoreszenzdiagnostik konnten drei Stunden nach einer 100 mg/kg ALA enthaltenden Peritoneallavage durchschnittlich sogar 5,74 Läsionen detektiert werden [*Canis M. et al., 2001*].

Ziel der Arbeit von Gahlen et al. war die Gegenüberstellung von lokaler und systemischer Applikationsform. Die Peritonealkarzinose wurde bei den WAG Ratten mit einer Colonkarzinomzelllinie erzeugt. Die eine Gruppe erhielt intraperitoneal (IP) 150 mg einer 3%-Lösung, was einer Konzentration von 440 bis 550 mg/kg KG 5-ALA entsprach, die andere bekam 100 mg/kg KG 5-ALA intravenös (IV) verabreicht. Nach vier Stunden fanden die Messungen und Beobachtungen statt. Alle Karzinoseherde, die mit Weißlicht gesehen wurden, fluoreszierten nach intraperitonealer 5-ALA Applikation. Zusätzlich konnten noch 21% weitere Läsionen mit einem Durchmesser zwischen 1 und 10mm detektiert werden, die mit Weißlicht übersehen worden waren. Nach intravenöser Gabe wurden nur 28% der bei Weißlicht identifizierten Läsionen aufgefunden, 7% wurden hingegen nur im Fluoreszenzmodus entdeckt. In beiden Gruppen gab es keine falsch-positiven Bezirke [*Gahlen J. et al., 2001*]. Da die Konzentration in der IP Gruppe vier- bis fünffach höher als in der IV Gruppe war, erscheint es schwierig die Applikationsformen gegeneinander zu bewerten.

In einer folgenden Studie verwendeten Gahlen et al. 1,5% und 3% 5-ALA Lösungen intraperitoneal und führten die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus. Die größten Fluoreszenzintensitäten wurden zwischen zwei und vier Stunden erreicht, wobei die 1,5% Lösung effektiver schien als die 3% Lösung. Auch hier zeigte die Fluoreszenzdiagnostik mit 35% zusätzlich entdeckten Herden einen deutlichen Vorteil gegenüber der konventionellen Weißlichtbetrachtung [*Gahlen J. et al., 2002*].

Durch die Fluoreszenzdiagnostik gelingt es nicht nur eine größere Anzahl an Peritonealkarzinoseherden zu detektieren, ebenso können kleinere Läsionen als bei der Weißlichtuntersuchung aufgefunden werden. Chan et al. zeigten, dass die durchschnittliche Größe der noch gesehenen Herde im Weißlicht 1,5 mm und im Fluoreszenzmodus 1,0 mm beträgt [*Chan J.K. et al., 2002*].

Die Arbeitsgruppe um Collinet konnte diese Ergebnisse bestätigen. Sie applizierten jeweils einem Dritteln der 21 Ratten mit peritonealer Mikrometastasierung der Ovarialkarzinomzelllinien NuTu-19 intraperitoneal 5-ALA, He-ALA oder Kochsalzlösung. Es zeigte sich, dass nach Gabe von 5-ALA durchschnittlich 32 Herde im Vergleich zu 20,7 Herden nach Kochsalz-Applikation identifiziert wurden ($p= 0,01$). Des Weiteren ergaben sich signifikant höhere Fluoreszenzwerte durch die 5-ALA-Applikation (Ratio 1,17, $p= 0,01$) [Collinet P. et al., 2007].

Bislang gibt es nur drei Studien über die Photodynamische Diagnostik bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Major et al. berichteten in einem Case-Report von einer Patientin mit Ovarialkarzinom, der nach der Laparotomie ein mit einer 1% 5-ALA Lösung getränkter Schwamm für eine Stunde eingesetzt wurde. Anschließend wurde eine Fluoreszenzdiagnostik durchgeführt. Alle im Weißlicht identifizierten Läsionen fluoreszierten und zusätzlich konnte noch ein 5 mm großer Herd ausgemacht werden, der histologisch als Metastase bestätigt werden konnte [Major A.L. et al., 2002]. Eine folgende Studie konnte die positiven Ergebnisse der Fluoreszenzdiagnostik bei Frauen mit Ovarialkarzinom bestätigen. 29 Frauen wurden vor einer Second-look Laparoskopie 30 mg/kg KG einer 1% 5-ALA Lösung intraperitoneal appliziert. Ein Rezidiv des Ovarialkarzinoms wurde anschließend bei 13 Patientinnen histologisch nachgewiesen. Bei 12 dieser 13 Frauen fluoreszierten die Peritonealkarzinoseherde rot. Bei einem Dritteln dieser Patientinnen waren die Metastasen sogar so klein, dass sie unter Weißlichtbetrachtung übersehen worden wären. Keine Fluoreszenz war bei einer Patientin zu beobachten, die Läsionen mit einem Durchmesser über 3 cm aufwies. Dies entspricht einer sehr hohen Sensitivität von 92%. Falsch-positive Messungen ergaben sich an Endometrioseherden einer Patientin, dies führte zu einer Spezifität von 95% [Löning M. et al., 2004]. Löning et al. erreichte in einer Studie mit 36 Ovarialkarzinom-Patientinnen und zwei Patientinnen mit Tubenkarzinom 5 Stunden nach 5-ALA Applikation eine Spezifität von 88% und eine Sensitivität von 100%. Der negative prädiktive Wert lag bei 100% und der positive prädiktive Wert bei 91%. Die Arbeitsgruppe bestimmte die PPIX-Fluoreszenz durch Verwendung einer digitalen Bildbearbeitung sowie eines Fluoreszenzmikroskops [Löning MC. et al., 2006].

5.2.4 Einfluss der Applikationsform auf die PDD

In den zahlreichen Studien zur photodynamischen Diagnostik kommen verschiedenste Applikationsformen zum Einsatz. Als nebenwirkungssärmste Form hat sich die topische Applikation erwiesen, wobei vor allem die Auftragung mit Gel Erfolg versprechende Ergebnisse zeigen konnte. Die topische Applikation findet beispielsweise bei der photodynamischen Therapie der zervikalen intraepithelialen Neoplasie Gebrauch [Hillemanns P. et al., 1999]. Aufgrund des nur sehr begrenzten Gebietes auf welches die 5-Aminolävulinsäure gelangt und in PPIX umgewandelt wird, besteht die Möglichkeit auf einem kleinen Bezirk hohe PPIX-Konzentrationen verwenden zu können ohne dabei systemische Reaktionen bei den Patienten erwarten zu müssen. Gleichermaßen gilt für die Anwendung in der Dermatologie, wo diese Therapieform einige Vorteile gegenüber der konventionellen Therapie bietet

[*Peng Q. et al., 1997a*]. Dass nur geringe Mengen von PPIX nach lokaler äußerer Anwendung in den systemischen Kreislauf gelangen, zeigen neben dem Fehlen von systemischen Nebenwirkungen, Messungen, bei welchen die PPIX-Konzentration im Serum nach Auftragen einer Salbe bestimmt wurden [*Rick K. et al., 1997*].

Beim Ovarialkarzinom sowie anderen Tumoren, bei welchem sich die Tumorzellen innerhalb der ganzen Peritonealhöhle absiedeln können, besteht die Möglichkeit den Photosensibilisator intraperitoneal zu verabreichen, um eine lokale Gabe zu ermöglichen. Es gilt jedoch zu beachten, dass das Peritoneum aufgrund seiner Beschaffenheit in der Lage ist, das 5-ALA zu absorbieren, einem Vorgang, welcher von der Peritonealdialyse bekannt ist und es somit nach dieser „Absorptionszeit“ auch zu einer systemischen Verteilung kommt [*van der Veen N. et al., 1996*].

Mehrere Studien berichten von besseren Fluoreszenzergebnissen, wenn man das 5-ALA intraperitoneal appliziert, anstatt es oral oder intravenös zu verabreichen. So berichtet Gahlen J. et al. von einer 100% Detektion von Herden, die man vorab durch Weißlicht identifiziert hat. In der Vergleichsgruppe nach intravenöser Applikation konnten nur 28% durch die Fluoreszenzdiagnostik wieder gefunden werden. Zudem wurden bei beiden Applikationsformen zusätzliche Areale ausgemacht, die Anzahl sprach ebenfalls für die intraperitoneale Gabe. Man muss hierbei jedoch berücksichtigen, dass unterschiedliche Konzentrationen verwendet wurden [*Gahlen J. et al., 2001*].

Loh C.S. und diverse andere Studien zeigen, dass sich die Kinetik und das Verteilungsmuster bei systemischer ALA-Applikation in Form von oral oder intravenös sehr ähnelt, beachtet man, dass bei oraler Zufuhr eine höhere Dosierung nötig ist, um gleiche PPIX-Konzentrationen im Gewebe zu erreichen [*Dalton J.T. et al., 2002; Loh C.S. et al., 1993*]. Nach enteraler Applikation von 40 mg/kg KG 5-ALA findet man seine höchsten Konzentrationen im Serum bereits nach 30 Minuten, der Wert liegt bei ungefähr 32 mg/l [*Rick K. et al., 1997*].

In unserer Arbeit entschieden wir uns für die orale Applikation, da sie einfacher, sicherer, billiger und nicht zuletzt bei den Patienten aufgrund der Schmerzfreiheit von einer größeren Akzeptanz auszugehen ist.

Auch mit unserer Studie konnten wir bestätigen, dass bei adäquater Dosierung und optimalem Zeitpunkt der Applikation ein Auffinden von kleinen Peritonealkarzinoseherde durch die Fluoreszenzdiagnostik erleichtert wird.

5.2.5 Einfluss des Applikationszeitpunktes auf die PDD

Bei der PDD mit dem Photosensibilisator 5-ALA ist es wichtig, die Diagnostik zu dem Zeitpunkt durchzuführen, in welchem man eine hohe PPIX-Konzentration im Tumorgewebe findet. Die früher eingesetzten Photosensibilisatoren wie beispielsweise Photofrin waren zeitlich unabhängig, da dieses Produkt bereits aus mehreren Porphyrinen bestand, so dass man die Diagnostik nach Applikation bis zu 50 Stunden danach durchführen konnte [*Dougherty T.J., 1989*]. Das Erreichen der maximalen Konzentration von PPIX im Tumorgewebe ist jedoch von der Aufnahmgeschwindigkeit von 5-ALA

durch die Tumorzellen über ein Transmembranprotein, der zugeführten 5-ALA-Konzentration, der Synthesegeschwindigkeit des Häms, sowie der Retention der Porphyrine abhängig. Es ist davon auszugehen, dass die Aufnahme von 5-ALA in die Tumorzellen temperaturunabhängig ist, für die Umwandlung von 5-ALA in PPIX jedoch Energie benötigt, welche vor allem für die Aktivierung des Enzyms Porphobilinogen desaminase verwendet wird [Nielsen H.M. et al., 2004; Moan J. et al., 1999]. Aufgrund der Vielzahl der Faktoren, die den Zeitpunkt der maximalen PPIX-Konzentration beeinflussen können, resultieren zum Teil erhebliche zeitliche Abweichungen innerhalb den Gewebearten wie auch unter den Patientinnen [Hinnen P. et al., 2002; Webber J. et al., 1997b].

Bei der Fluoreszenzdiagnostik möchte man die beste Unterscheidung von Tumorzellen zu normalem Gewebe erreichen, somit ist es nötig, den Zeitpunkt zu finden, wo zum einen eine für die Fluoreszenz ausreichend hohe PPIX-Konzentration im Tumorgewebe besteht, zum anderen soll eine möglichst große Differenz zwischen den PPIX-Mengen im Tumor und dem umgebenden gesunden Gewebe herrschen für einen maximalen Kontrast. Weingandt H. et al. zeigte für die PDD bei der zervikalen intraepithelialen Neoplasie mit Gel, dass zwar die Intensität der PPIX Fluoreszenz der Ektozervix über vier Stunden kontinuierlich zunahm, der Kontrast zwischen der PPIX Fluoreszenz der Scheide und histologisch negativem Gewebe für Inkubationszeiten über 90 Minuten jedoch weniger wurde [Weingandt H., 2000].

Durch bereits durchgeführte Studien ist bekannt, dass man die höchsten PPIX-Konzentrationen nach 5-ALA-Gabe im Gewebe vier bis neun Stunden nach der oralen Applikation bei bestem Kontrast findet [Rick K. et al., 1997; Webber J. et al., 1997b]. Die höchsten Konzentrationen des Photosensibilisators innerhalb tumorfreier Organe finden sich bei enteraler Gabe in der Magenschleimhaut, sowie Kolon- und Blasenschleimhaut [Loh C.S. et al., 1993b].

Von einem unterschiedlichen Ansprechen in Abhängigkeit vom makroskopischen und mikroskopischen Erscheinungsbild berichtete auch Hillemanns P. et al. bei der PDT der vulvären intraepithelialen Neoplasie (VIN). Die stärksten Porphyrinfluoreszenzintensitäten wiesen die basaloiden VIN Läsionen auf. Eine nur geringe Fluoreszenzintensität wurde bei den histologisch als bowenoider Typ eingeteilten Läsionen mit Merkmalen wie Hyper-/Parakeratose und/oder betonter Pigmentierung beobachtet. Die Ergebnisse der photodynamischen Behandlung waren in diesen Fällen weniger viel versprechend [Hillemanns P. et al., 2000a].

Des Weiteren wurde durch diese Arbeit abermals dargestellt, dass man sowohl zwischen den verschiedenen Gewebearten unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten erwarten muss, sowie dass die maximalen Intensitäten zeitlich differieren.

Bezüglich des Zeitintervalls konnten wir auch mit unserer Studie zeigen, dass man die höchsten Fluoreszenzwerte und den besten Kontrast zum umliegenden gesunden Gewebe erreicht, wenn man das 5-ALA in einem Zeitintervall von vier bis neun Stunden vor den Messungen appliziert. Am Primärtumor konnte unter diesen Bedingungen bei 10 mg /kg KG 5-ALA eine Sensitivität von 81,2% bei einer Spezifität von 75% erreicht werden. Am Darm fluoreszierten 87,5% der karzinomatösen Herde abgrenzbar zum umliegenden Gewebe, bei einer Spezifität von 100%. Nur jede zweite bösartige Absiedlung im Omentum majus zeigte eine ausreichende Fluoreszenz, diese war v.a. dann

zu beobachten, wenn es sich um einen nodulären Befall handelte. Es ist davon auszugehen, dass sich im Netz die malignen Zellen gleichmäßig absiedeln, somit kommt es zu einer ziemlich konstanten Fluoreszenzintensität über ein relativ großes Areal, was eine Unterscheidung zwischen fluoreszenzpositiv versus fluoreszenznegativ erschwert.

5.2.6 Einfluss des Applikationszeitpunktes auf die PPIX-Konzentration

In diversen Studien ist eine Korrelation zwischen einem Anstieg der Serum-Konzentrationen von PPIX und den maximalen Fluoreszenzintensitäten dargestellt worden [*Webber J. et al., 1997a*]. Dabei erreicht man bei oraler Applikation von 40 mg/kg KG 5-ALA nach ca. fünf bis neun Stunden ein PPIX-Maximum bei 700-800 µg/l, bei 60 mg/kg KG 5-ALA den PPIX-Peak zwischen fünf und zwölf Stunden von 1500-3300 µg/l [*Rick K. et al., 1997; Webber J. et al., 1997a, b; Gahlen J. et al., 2002*]. Wir konnten bestätigen, dass die maximalen PPIX-Konzentrationen während dem günstigsten Zeitpunkt zur Fluoreszenzdiagnostik zwischen vier und neun Stunden lagen. Interessant an unseren Ergebnissen war außerdem, dass 24 Stunden nach den intraoperativen Messungen nur Patientinnen, bei denen die Messungen über zehn Stunden nach 5-ALA-Zuführung durchgeführt wurden, z.T. noch „Rest-PPIX-Spiegel“ über den Normwerten aufwiesen, wenn auch nur in sehr geringer Menge. In den anderen Gruppen lagen die Spiegel bereits wieder im Normbereich was auch den Ergebnissen in den bisher publizierten Studien entspricht [*Gahlen J. et al., 2002*]. Warum die erhöhten PPIX-Werte bei früherer Applikation trotz zunächst niedrigerer Werte während der Messungen länger nachweisbar sind bleibt unklar.

5.2.7 Einfluss der 5-ALA Konzentration auf die PDD

Ein weiterer Faktor, welcher großen Einfluss auf die Ergebnisse bei der Fluoreszenzdiagnostik nimmt, ist die Konzentration des zugeführten Photosensibilisators. Generell gilt, je größer die zugeführte 5-ALA-Konzentration umso höhere PPIX-Konzentrationen kann man im Gewebe beobachten [*Gibson S.L. et al., 1997; Roy B.N. et al., 1997; Loh C.S. et al., 1993a*]. Dieser Zusammenhang wird jedoch durch die begrenzte 5-ALA-Aufnahme über Transportproteine sowie das Erreichen einer Sättigung des Enzymsystems der Hämbiosynthese limitiert [*Iinuma S. et al., 1994*]. Auch hier muss man beachten, dass nicht die höchste Konzentration für die Fluoreszenzdiagnostik von größter Bedeutung ist, sondern der maximal erreichbare Kontrast.

Wählt man eine zu hohe Konzentration, so findet man nur mehr eine unspezifische Fluoreszenz, da auch das umliegende gesunde Gewebe ab einer bestimmten aufgenommenen Menge fluoresziert. Löning M. et al. demonstrierte dies anhand der PDD bei der zervikalen Dysplasie nach topischer Applikation von 10% 5-ALA. Es konnte zwar eine deutliche PPIX Fluoreszenz erreicht werden, welche

jedoch unspezifisch war und somit eine Abgrenzung der CIN Läsionen nicht mehr möglich war [*Löning M. et al., 1998*].

In bisher durchgeführten Studien wurden bei oraler Applikationsform Konzentrationen bis 60 mg/kg KG 5-ALA verabreicht. Es wurde innerhalb der Peritonealhöhle weder von einem Kontrastverlust noch einer steigenden Anzahl an falsch positiven Ergebnissen berichtet, unabhängig, ob die 5-ALA-Dosis in mehreren Sequenzen gegeben wurde [*Roy B.N. et al., 1997*]. Bei intraperitonealer Applikation konnte Löning et al. mit einer Konzentration von 30 mg/kg KG 5-ALA eine Sensitivität von 92% und eine Spezifität von 95% erreichen. Bei 12 von insgesamt 30 Patientinnen waren Metastasen durch die Rotfluoreszenz sichtbar, wobei bei vier Frauen die Herde sehr klein waren und bei Weißlichtbetrachtung nicht gesehen wurden [*Löning M. et al., 2004*].

Wird eine zu geringe Photosensibilisator-Konzentration für die PDD gewählt, befindet sich eine ungenügende Menge von PPIX in den Tumorzellen, so dass keine Fluoreszenz erkennbar wird, oder bereits nach kurzer Zeit die PPIX Fluoreszenz verschwindet. Dieser Effekt, das so genannte Bleaching war uns bereits aus Studien von Hillemanns et al. bei der Endometriose bekannt. Bei Konzentrationen von 1 mg/kg KG 5-ALA nach oraler Applikation konnte innerhalb der Bauchhöhle unabhängig vom Zeitpunkt der Messung keine typische rote Fluoreszenz der Porphyrine detektiert werden [*Hillemanns P. et al., 2000c*].

Wir entschieden uns dennoch den Patientinnen Konzentrationen von entweder 1 oder 10 mg/kg KG zu applizieren, da wir annahmen, dass bei karzinomatösen Läsionen eine Konzentration von 1 mg/kg KG 5-ALA zu einer höheren Fluoreszenzintensität von PPIX als bei der Endometriose führt, welche zur Detektion ausreicht. Die Vermutung konnte jedoch nicht bestätigt werden, bei der geringen 5-ALA-Konzentration wurde an keinem befallenen Organ eine signifikante Fluoreszenzintensität erreicht. Man muss davon ausgehen, dass eine orale Gabe von 1 mg/kg KG auch bei Peritonealkarzinose insuffizient für die PDD in der Bauchhöhle ist. Bei Gabe von 10 mg/kg KG konnten jedoch gute Ergebnisse erzielt werden. Wurde das 5-ALA im optimalen Zeitintervall, vier bis neun Stunden vor der Fluoreszenzdiagnostik, verabreicht, so kam es an den Tumorzellen der Adnexe, des Omentums, des Darmmesos sowie des Peritoneums zu einer signifikanten Fluoreszenzintensität. Des Weiteren wurde durch den Vergleich der Gruppe 1 (1mg/kg KG) mit Gruppe 2 (10mg/kg KG, vier bis neun Stunden) bewiesen, dass es zu einer signifikant höheren Intensität an allen befallenen Organen kommt, wenn die höhere Konzentration appliziert wurde.

5.3 Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Tumorbiologie

Das Ovar besteht mit Kapsel, Stroma und Eizellen aus verschiedenen Zellreihen, welche sich auch bei Entartung unterscheiden. Am häufigsten mit über 90% zeigen sich epitheliale Ovarialkarzinome. In unserer Studie wurden nur epitheliale Ovarialmalignome zugelassen. Zusätzlich werden die epithelialen Tumoren histologischen Untergruppen zugeordnet. Papillär-seröse Tumoren zeigen hauptsächlich glanduläres Epithel, welches die Eileiter auskleidet. Muzinöse Tumoren enthalten Zellen, die den Endozervikaldrüsen ähneln und endometroide Tumore lassen an ein Endometrium denken [Holschneider C.H. et al., 2000]. Die diversen Subtypen des Ovarialkarzinoms unterscheiden sich nicht nur histologisch sondern beispielsweise auch durch ein unterschiedliches Ausbreitungsmuster. Das endometroide Karzinom mit einer deutlich besseren Prognose als andere Ovarialkarzinomsubtypen sind bei Erstdiagnose eher noch auf das Ovar begrenzt zu sein, wohingegen das seröse Adenokarzinom überwiegend in den späteren Stadien FIGO III und IV gefunden wird [Kaku T. et al., 2003; Eisenkop S.M., 1998].

Bei den bisher durchgeföhrten Studien über die photodynamische Diagnostik beim Ovarialkarzinom wurden die Tumorbiologie der Tumorzellen wie Klassifikation oder Grading im Studiendesign nicht erwähnt oder nicht unterschieden. Die bereits publizierten *in vitro* Studien arbeiteten meist mit epithelialen Ovarialkarzinomzellen der Reihe NuTu-19, wobei nicht auf den Subtyp eingegangen wurde [Major A.L. et al., 1997; Hornung R. et al., 1998; Lüdicke F. et al., 2003]. Auch die *in vivo* Studien von Löning M. und Major A.L. beschrieben die histologischen Subtypen der Ovarialkarzinome nicht in ihrem Studiendesign [Major A.L. et al., 2002a; Löning M. et al., 2004].

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass man zwischen den histologischen Klassifizierungen unterscheiden muss. Die besten Fluoreszenzwerte wurden bei dem serös-papillären und dem muzinösen Typ erreicht, die als undifferenziert oder endometroid klassifizierten Ovarialkarzinome fluoreszierten deutlich weniger. Aber weitere Studien mit größeren Fallzahlen müssen zeigen, ob es sich hierbei nur um zufällige Beobachtungen, oder um einen signifikanten Sachverhalt handelt. Vielleicht sind für die diversen Subtypen auch verschiedene Konzentrationen oder Zeitintervalle nötig, um die besten Ergebnisse bei der Fluoreszenz zu erreichen.

Hillemanns P. et al. konnte zeigen, dass es bei der PDD der Endometriose, bereits sehr früh zu einer Fluoreszenz der Tubenschleimhaut kam ohne dass diese pathologisch verändert gewesen wäre [Hillemanns P. et al., 2000c]. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen dem gut fluoreszierenden glandulären Epithel, welches die Eileiter auskleidet und den besten Fluoreszenzintensitäten beim serös-papillären Typ des Ovarialkarzinoms.

Bisher existieren nur wenige Studien, die die Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Primärtumors publizierten. Bei der Photodynamischen Therapie der vulvären intraepithelialen Neoplasie gibt es bei den gut differenzierten VIN 1-Läsionen die besten Therapieerfolge. Dagegen sprechen multifokale und schlecht differenzierte Herde kaum auf diese Therapieform an [Hillemanns P. et al., 2000b]. Diese Beobachtung korreliert mit unseren Ergebnissen, es zeigte sich bei den besser differenzierten Ovarialkarzinomen eine höhere Fluoreszenzintensität als

bei den nur gering differenzierten. Gegebenenfalls ist bei den gering oder undifferenzierten Formen, der Stoffwechsel der Tumorzellen so verändert, dass weniger Protoporphyrin gebildet wird bzw. schon weniger 5-ALA in die Zellen gelangt. Weitere Studien mit größerem Patientenkollektiv müssen zeigen, ob auch diesbezüglich Unterscheidungen nötig sind.

Ähnliche Ergebnisse wie wir bei den gering differenzierten histologischen Subtypen beobachten konnten, machten wir bei Messungen der Fluoreszenzintensität bei Patientinnen die bereits eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten. Womöglich führt auch eine Chemotherapie zu einer Zellveränderung die nachteilig für eine Fluoreszenzdiagnostik ist. Dies zu überprüfen ist von großer Bedeutung nicht nur im gynäkologischen Fachbereich, insbesondere dann, wenn neben einer Fluoreszenzdiagnostik anschließend eine photodynamische Therapie angewendet werden soll und eine ausreichende Konzentration von PPIX in den Tumorzellen nötig ist.

5.4 Nebenwirkungen

Die Photodynamische Diagnostik durch 5-ALA-induziertes PPIX ist eine neue Möglichkeit das Staging beim Ovarialkarzinom zu erweitern, v.a. auch um makroskopisch beim konventionellen Staging okkulte Metastasen sichtbar zu machen. Man darf jedoch nicht vergessen, dass diese neue Methode ein gewisses Risiko der Gewebsschädigung mit sich trägt, da das PPIX neben der fluoreszierenden Eigenschaft auch eine photosensibilisierende besitzt. Dieses Risiko ist abhängig von der Lichtquelle, der zugeführten Dosis des Photosensibilisators, dem Intervall zwischen Gabe und Bestrahlung und von der Gewebeart.

Die am häufigsten beschriebene unerwünschte Nebenwirkung der PDD und PDT ist die Photosensibilisierung der Haut, da sich das PPIX neben den Tumorzellen auch in der Haut und anderen Organen ansammelt [*Rick K. et al., 1997; Webber J. et al., 1997b; Mlkvy P. et al., 1998*]. Dies führt zu einer kurz währenden sonnenbrandähnlichen Veränderung. Die größte Gefahr dafür besteht bei einer Lichtexposition zwischen 6,5 und 10 Stunden, abhängig von Dosierung und Ort, wobei v.a. Kopf und Hals und die Lippen die größte PPIX-Fluoreszenz-Intensitäten zeigen. Nach 40 Stunden kann man davon ausgehen dass der Hauptanteil verschwunden ist und die Patientinnen sich dem Sonnenlicht wieder exponieren können [*Webber J. et al., 1997b*]. In unserer Arbeit konnte dieser Sachverhalt nicht beobachtet werden. Die Patientinnen waren während der Operation durch die sterilen Tücher vor dem OP-Licht geschützt, post-operativ lagen sie in normal beleuchteten Zimmern. Herman beschrieb intraoperative hämodynamische Auswirkungen bei kardiovaskulär vorbelasteten Patienten, nachdem zu deren Abdominaleingriff eine PDT mit 5-ALA durchgeführt wurde. Es zeigte sich ein signifikanter Abfall des systolischen und diastolischen Blutdrucks. Des Weiteren trat bei den meisten Patienten ein erhöhter systemischer Gefäßwiderstand auf. Nicht signifikant nachgewiesen werden konnten Veränderungen im pulmonalen kapillären Wedge Druck oder im kardialen Output [*Herman M.A. et al., 1998*]. Da die Operation beim Ovarialkarzinom meist sehr ausgedehnt ist und es intraoperativ häufig zu einem größerem Blutverlust kommen kann, welcher physiologische

Auswirkungen auf die Hämodynamik zeigt, war es innerhalb unserer Studie nicht möglich einen solchen Sachverhalt auf die PDD mit 5-ALA zurück zu führen. Des Weiteren waren unsere Studienteilnehmerinnen anamnestisch nicht kardiovaskulär vorbelastet.

Als gastrointestinale Nebenwirkungen der Fluoreszenzdiagnostik mit einer 5-ALA-Konzentration von 30 bis 60 mg/kg KG wird bei 15-28% der Patienten Übelkeit beschrieben, bei 5% kommt es zudem zu Erbrechen. Das Risiko einer solchen Reaktion nimmt mit steigender Dosierung zu [Webber J. et al., 1997b]. Innerhalb unserer Studie klagten zwei Patientinnen über Übelkeit, wobei eine Patientin eine sehr ausgedehnte Operation inklusive Darmchirurgie hatte, die andere Patientin erhielt präoperativ die niedrigeALA-Konzentration von 1 mg/kg KG, so dass es in diesem Fall unwahrscheinlich ist, dass die Fluoreszenzdiagnostik Ursache ist.

Wichtig ist die Analyse des postoperativen Verlaufs der Leberenzyme. Bereits in zahlreichen Studien wurde ein vorübergehender Anstieg bei bis zu 25% der Patienten beschrieben [Webber J. et al., 1997b; Regula J. et al., 1995]. Außerdem wurden nach der systemischen Applikation von 5-ALA in der Leber mindestens so hohe PPIX-Konzentrationen gefunden wie im Tumorgewebe [Webber J. et al., 1997b]. Dies ist erklärbar durch den enterohepatischen Kreislauf der 5-Aminolävulinsäure nach oraler Gabe, zudem die Hepatozyten als Hauptort der Hämbiosynthese gelten und über eine ausreichende Menge an zur PPIX-Bildung benötigte Enzyme verfügen [Peng Q et al., 1997b]. Es ist nicht auszuschließen, dass es aufgrund der hohen Konzentration von PPIX im Rahmen einer Photodynamischen Therapie auch innerhalb der Leber zu einer Bildung von Sauerstoffradikalen kommt, ein erwünschter Vorgang im Tumorgewebe, welche der Leber bleibende Schäden anrichten könnten. Außerdem gibt es bereits Studien, die zeigen dass es bei humanen Hepatozyten nach 5-ALA-Applikation zu einer Porphyrin-Akkumulation kommt und dass eine mehrmals wiederholte höher dosierte Gabe zu einem Zelluntergang führen kann, ebenso wie eine einmalige nur ausreichend hoch dosierte Gabe [Weiss T.S. et al., 2003]. Beeindruckend war, dass in unserer Studie alle Patientinnen am siebten postoperativen Tag über die Norm erhöhte γ -GT-Werte hatten. Sogar bei Patientinnen, die lediglich 1 mg/kg KG 5-ALA erhielten, also die Konzentration, bei welcher keine ausreichende Fluoreszenzintensität erzeugt werden konnte, zeigten noch erhöhte γ -GT-Werte. In der Gruppe mit dem größten Zeitintervall sind die Werte im Mittel fünf Mal so hoch gewesen wie präoperativ. Erwähnenswert ist dabei, dass alle Werte im weiteren Verlauf ohne Therapie auf ihr Ausgangsniveau zurückfielen.

In der Abdominalchirurgie beobachtet man des Öfteren nach einer photodynamischen Therapie postoperative Komplikationen wie intestinale Fisteln, insuffiziente Darmanastomosen und verzögerte Heilungsprozesse [Sindelar W.F. et al., 1991]. Erklärbar ist dies durch eine innerhalb des Tumors gewünschte Nekrosebildung, welche eine zu große Tiefe erreicht. Die Komplikationsrate diesbezüglich scheint jedoch mit Einsatz des neuen Photosensibilisators 5-ALA abzunehmen [Mlkvy P. et al., 1998]. Ebenso wird ein vermehrtes Auftreten von Pleuraergüssen nach PDT beschrieben [DeLaney T.F. et al., 1993]. Ein Ereignis, welches nach unserer Fluoreszenzdiagnostik bei keiner Patientin festgestellt werden konnte. Eventuell trägt dazu auch der relativ kurze zeitliche Aufwand der Diagnostik bei, wohingegen sich die Operationszeit bei Durchführung der Therapie deutlich verlängert.

Das zytotoxische Potential eines Photosensibilisators lässt sich auch nach konventioneller Weißlicht-Bestrahlung der PPIX-speichernden Organe wie Leber und Darm feststellen. Als maximal tolerable Dosis wurde daraufhin 1, 10 und 100 mg/kg KG für die Zeitintervalle 2, 6 und 16 Stunden bei intravenöser oder intraperitonealer Gabe definiert. Genau so gilt, dass je kürzer das Intervall, desto niedriger ist die maximal tolerable Dosis [*Aalders M.C.G et al., 1999*].

5.5 Wertung der Photodynamischen Diagnostik mit 5-ALA des Ovarialkarzinoms

Die Effektivität der PDD ist von einigen Parametern abhängig. In unserer Studie wurden die optimaleALA-Konzentration sowie das beste Zeitintervall zwischen Applikation und Durchführen der Fluoreszenzdiagnostik evaluiert. Durch die relativ geringe Konzentration des 5-ALA sind trotz systemischer Verabreichung nur wenige Nebenwirkungen beim Patienten zu erwarten. Durch das großzügige Zeitintervall von vier bis neun Stunden wird dem Anwender ein annehmbarer operativer Spielraum zwischen Medikation und Fluoreszenzbetrachtung geschaffen. So wird man beispielsweise durch eine notwendige ausgedehnte Adhäsionlyse nicht zeitlich unter Druck gesetzt und kann vor der Diagnostik, wenn nötig eine ausgedehnte Adhäsionlyse durchführen.

Innerhalb unserer Studie untersuchten wir zudem die orale Applikationsform, die bisherigen Publikationen von Major A.L. und Löning M. gaben den Photosensibilisator jeweils intraperitoneal und erreichten damit gute Ergebnisse [*Major A.L. et al., 2002a; Loning M. et al., 2004*]. Wir konnten mit dieser Arbeit zeigen, dass auch durch die orale Verabreichung eine Fluoreszenzdiagnostik in der Peritonealhöhle möglich ist. Dies ist ein Fortschritt, da diese Methode für die Patientinnen deutlich weniger kompliziert und schmerhaft ist. Die Photosensibilisierung der Haut war bei keiner Patientin zu beobachten. Da die Operationen beim Ovarialkarzinom in fortgeschrittenen Stadien meist sehr umfangreich sind und die postoperative Erholungsphase einige Tage andauert, ist eine intensive Sonnenlichtexposition ohnehin kaum möglich [*Vaisbuch E. et al., 2005*].

Über die Videoaufzeichnung ist eine sofortige intraoperative Beurteilung der Fluoreszenz möglich. Die spektrometrische Auswertung nimmt jedoch einige Zeit in Anspruch, so dass ein Ergebnis, ob es sich um die typische PPIX-Fluoreszenz der malignen Herde handelt, nicht sofort während der Operation vorliegt. Es wäre wünschenswert, wenn durch ein einfacheres Software-Programm schon eine bessere Einschätzung intraoperativ möglich wäre.

Als nachteilig für die PDD beim Ovarialkarzinom hat sich innerhalb unserer Studie die Messung anhand eines Endoskops bei der Explorativlaparotomie erwiesen. Eine laparoskopisch durchgeführte Operation bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom, dem Hauptanteil unserer Studienteilnehmerinnen, wird nach den Leitlinien nicht empfohlen [*Rouzier R. et al., 2005*]. Somit war es zum Teil nötig die Diagnostik an der bereits geöffneten Bauchhöhle durchzuführen. Das Laparoskop ist im Allgemeinen so aufgebaut, dass jeweils das zu betrachtende Areal die höchste Lichtintensität bekommt. Im Fluoreszenzmodus bedeutet dies, die größte Menge an blauem Anregungslight. Um das Gewebe beurteilen zu können ist ein gewisser Abstand zwischen Laparoskop

und Objekt einzuhalten. Führt man die Operation laparoskopisch durch, ist dies ein automatischer Vorgang u.a. um die vom Abstand abhängige Bildschärfe zu erhalten. Bei der Fluoreszenzdiagnostik in unserer Studie war ein häufiger Wechsel zwischen „offener“ Präparation und laparoskopischer Beurteilung nötig. Der günstigste Abstand muss jeweils neu gesucht werden, was sich zum Teil als sehr zeitraubend erwies. Praktikabler wäre es durch eine Modifikation der Arbeitsgeräte die Messungen und die Betrachtung auch am geöffneten Bauch ohne großen Aufwand durchführen zu können.

Andererseits könnte die PDD auch Patientinnen mit einem niedrigen FIGO-Stadium angeboten werden, oder Patientinnen mit dem Verdacht auf ein Rezidiv eines Ovarialkarzinoms, wo bislang nur eine Tumormarkererhöhung vorliegt und von einem geringen Tumorbefall (minimal residual disease) auszugehen ist.

Mit unseren Ergebnissen konnten wir zeigen, dass man zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms differenzieren sollte. Nachfolgende Studien mit größerer Fallzahl müssen zeigen, ob es sich hierbei um signifikante reproduzierbare Unterschiede handelt. Bei Patientinnen mit einem serös-papillären Ovarialkarzinom erreichten wir bessere Fluoreszenzergebnisse als bei anderen Subtypen. Ebenso ist bei einer größeren Patientenzahl von Interesse, ob man nach einer neoadjuvanten Chemotherapie schlechtere Ergebnisse erwarten muss.

Durch ein Selektieren der für die Fluoreszenzdiagnostik geeigneten Ovarialkarzinom-Subtypen ist eine deutliche Verbesserung der Sensitivität und Spezifität zu erwarten. Ebenso kann man Patientinnen ausschließen, bei denen erwartet wird, dass die Fluoreszenzdiagnostik zum Beispiel aufgrund einer vor der Operation durchgeföhrten Chemotherapie schlecht anspricht. Sollte eine vor der Diagnostik durchgeföhrte Chemotherapie tatsächlich schlechtere Ergebnisse präsentieren, hätte dies auch erhebliche Folgen in der Diagnostik bei Rezidivoperationen, da die Standardtherapie nach der Operation in den meisten FIGO-Stadien eine adjuvante Chemotherapie ist. Wobei aber zu erwarten ist, dass der zeitliche Abstand zur letzten Chemotherapie berücksichtigt werden muss.

Im Allgemeinen lässt sich für die Photodynamische Diagnostik zum jetzigen Zeitpunkt sagen, dass es sich hierbei um eine relativ nebenwirkungsarme Möglichkeit handelt, Peritonealkarzinoseherde intraoperativ darzustellen.

6 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist das gynäkologische Malignom mit der höchsten Mortalität. Dies ist vor allem auf die meist sehr späte Diagnosestellung bei langem symptomarmen Verlauf zurückzuführen. Häufig wird das Ovarialkarzinom in einem schon fortgeschrittenen Stadium entdeckt.

Die Prognose von Patientinnen mit Ovarialkarzinom wird in erster Linie durch klinische Indikatoren bestimmt. Von besonders wichtiger prognostischer Relevanz ist hierbei neben der Tumorausbreitung bei Erstdiagnose insbesondere der postoperativ verbliebene Tumorrest. Es zeigt sich ein signifikant längeres Überleben bei Patientinnen, die makroskopisch tumorfrei operiert werden konnten. Es sollte bei jeder Operation Tumorfreiheit angestrebt werden, da sich bereits ein signifikanter Überlebensunterschied zwischen nur mikroskopischen Tumorrest und minimalem makroskopischen Rest zeigt. Bislang existiert kein Verfahren, welches präoperativ zuverlässig die gesamte Tumoraussaat bestimmen lässt.

Die Photodynamische Diagnostik (PDD) stellt einen neuen Ansatz in der intraoperativen Detektion von Peritonealkarzinoseherden eines Ovarialkarzinoms dar. Bei dieser Methode wird der Patientin präoperativ eine Substanz appliziert, welche sich insbesondere in den Tumorzellen ansammelt. Es handelt sich hierbei um einen Farbstoff, welcher durch Licht einer bestimmten Wellenlänge zum Fluoreszieren angeregt werden kann. Dies führt zu einem deutlicheren Kontrast zwischen benignem und malignem Gewebe als es mit bloßem Auge zu sehen ist. Somit gelingt es selbst kleinste Herde zu entdecken, welche unter Standardbedingungen möglicherweise übersehen worden wären.

Wir führten die PDD mittels 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) einem Derivat der Hämbiosynthese durch. Bei einer ausreichenden Menge von 5-ALA wird der negative Feedback-Mechanismus umgangen und es kommt zu einer Akkumulation von Folgeprodukten wie dem Protoporphyrin IX (PPIX). Die Anreicherung ist gewebeabhängig und lässt sich vor allem in Tumorzellen nachweisen.

Das PPIX ist ein Photosensibilisator, der durch blaues Licht im Wellenlängenbereich um 400nm angeregt werden kann. Dies resultiert in einer deutlich sichtbaren Rotfluoreszenz der Tumorzellen, die durch das blaue Anregungslight eindeutig vom umgebenden gesunden Gewebe abgegrenzt werden können.

Hintergrund dieser Studie war zum einen die Evaluierung der oralen Applikationsform von 5-ALA und zum anderen die Bestimmung der optimalen Applikationsparameter.

Bei 26 Patientinnen mit Verdacht auf Primärdiagnose oder Rezidiv eines Ovarialkarzinoms wurde eine PDD nach oraler Medikation mit 5-ALA durchgeführt. Es wurde zunächst wie üblich ein Weißlicht-Staging des intraabdominellen Situs durchgeführt und anschließend die Fluoreszenzbetrachtung. Neben der intraoperativen visuellen Beurteilung am Bildschirm wurden Messungen des Spektralbereichs gewonnen und postoperativ ausgewertet. Von verschiedenen repräsentativen Orten wurden Gewebeproben genommen und histologisch mit den Ergebnissen der PDD verglichen.

Wir konnten zeigen, dass bei einer 5-ALA-Konzentration von 10 mg/kg KG und einem Applikationsintervall von vier bis neun Stunden vor der Fluoreszenzbetrachtung am besten zwischen benignen Gewebe und Peritonealkarzinoseherden unterschieden werden kann. Verwendet man nur

eine Konzentration von 1mg/kg KG des 5-ALA ist keine Fluoreszenz erkennbar. Führt man die Fluoreszenzbetrachtung zu früh durch, ist noch keine Fluoreszenz nachweisbar. Ebenso erweist sich ein zu langer Abstand von über neun Stunden zwischen Applikation und Diagnostik als unbefriedigend, da die Fluoreszenzintensität deutlich schlechter ist, als zwischen vier und neun Stunden. Dieses Intervall ist ausreichend groß gesetzt um dem Anwender einen zeitlichen operativen Spielraum zu bieten.

Trotz systemischer Applikation des Photosensibilisators kam es bei keiner Patientin innerhalb unserer Studie zu relevanten Nebenwirkungen. Es fiel lediglich auf, dass bei allen Patientinnen am siebten postoperativen Tag eine transiente Erhöhung der Leberenzyme bestand, deren Bedeutung noch unklar ist. Die Leberwerte normalisierten sich im weiteren Verlauf ohne Therapie.

Die visuelle Betrachtung der PPIX Fluoreszenz erbrachte unter optimalen Bedingungen am Primärtumor eine Sensitivität von 81% und eine Spezifität von 75%, an Peritonealkarzinoseherden eine Sensitivität von 78% und eine Spezifität von 100%. Die Leber, einer der Hauptorte der Hämbiosynthese, fluoresziert auch bei Tumorfreiheit unspezifisch.

Mit unserer Studie konnten wir auch zeigen, dass man zwischen den histologischen Subtypen eines Ovarialkarzinoms unterscheiden muss. Wir erreichten bei serös-papillären Karzinomherden signifikante Fluoreszenzen. Ebenso scheint es, dass schlecht differenzierte und Ovarialkarzinome nach chemotherapeutischer Behandlung bei gleicher 5-ALA-Konzentration weniger fluoreszieren. Dies in folgenden Studien zu untersuchen ist für den weiteren Einsatz der PDD von großem Interesse um bereits präoperativ Patientinnen mit ungünstigen Voraussetzungen für die Fluoreszenzdiagnostik ausschließen zu können.

Ob sich die PDD beim Ovarialkarzinom bei hohem technischen und zeitlichen Aufwand in der Routine einsetzen lässt, ist fraglich.

7 Literaturverzeichnis

- (1) **Aalders MC, vd Vange N, Stewart FA, Klein MG, vd Vijver MJ, Sterenborg HJ:** White-light toxicity, resulting from systemically administered 5-aminolevulinic acid, under normal operating conditions. *J Photochem Photobiol B.* 1999 Jun;50(2-3):88-93
- (2) **Aalders MC, Sterenborg HJ, Stewart FA, van der Vange N:** Photodetection with 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in the rat abdominal cavity: drug-dose-dependent fluorescence kinetics. *Photochem Photobiol.* 2000 Oct;72(4):521-5
- (3) **Allison BA, Pritchard PH, Richter AM, Levy JG:** The plasma distribution of benzoporphyrin derivative and the effects of plasma lipoproteins on its biodistribution. *Photochem Photobiol.* 1990 Sep;52(3):501-7
- (4) **Bast RC, Jr, Hennessy B, Mills GB:** the biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jun;9(6):415-28. doi: 10.1038/nrc2644. Review.
- (5) **Berlin NI, Neuberger A, Scott JJ:** The metabolism of delta -aminolaevulic acid. 1. Normal pathways, studied with the aid of 15N. *Biochem J.* 1956 Sep;64(1):80-90(a)
- (6) **Berlin NI, Neuberger A, Scott JJ:** The metabolism of delta -aminolaevulic acid. 2. Normal pathways, studied with the aid of 14C. *Biochem J.* 1956 Sep;64(1):90-100(b)
- (7) **Bodner K, Bodner-Adler B, Wierrani F, Kubin A, Szolts-Szolts J, Spangler B, Grunberger W:** Cold-knife conization versus photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid (5-ALA) in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) II with associated human papillomavirus infection: a comparison of preliminary results. *Anticancer Res.* 2003 Mar-Apr;23(2C):1785-8
- (8) **Boyd J, Rubin SC:** Hereditary ovarian cancer: Molecular genetics and clinical implications [Review]. *Gynecol Oncol* 1997;64:196-206
- (9) **Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Nathanson KL, Weber BL:** Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Sep 18;94(18):1365-72
- (10) **Brekelmans CT:** Risk factors and risk reduction of breast and ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003 Feb;15(1):63-8
- (11) **Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, Mannel RS, Homesley HD, Fowler J, Greer BE, Boente M, Birrer MJ, Liang SX; Gynecologic Oncology Group.:** Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2011 Dec 29;365(26):2473-83.
- (12) **Canavese C, Gabrielli D, Guida C, Cappellini MD:** Nephrologists and porphyries. *G Ital Nefrol.* 2002 Jul-Aug;19(4):393-412
- (13) **Canis M, Botchorishvili R, Berreni N, Manhes H, Wattiez A, Mage G, Pouly JL, Bruhat MA:** 5-aminolevulinic acid-induced (ALA) fluorescence for the laparoscopic diagnosis of peritoneal metastasis. AST An experimental study. *Surg Endosc.* 2001 Oct;15(10):1184-6. Epub 2001 Aug 16
- (14) **Chan JK, Monk BJ, Cuccia D, Pham H, Kimel S, Gu M, Hammer-Wilson MJ, Liaw LH, Osann K, DiSaia PJ, Berns M, Tromberg B, Tadir Y:** Laparoscopic photodynamic diagnosis of ovarian cancer using 5-aminolevulinic acid in a rat model. *Gynecol Oncol.* 2002 Oct;87(1):64-70

- (15) **Chan JK, Loizzi V, Lin YG, Osann K, Brewster WR, DiSaia PJ:** Stages III and IV invasive epithelial ovarian carcinoma in younger versus older women: what prognostic factors are important?. *Obstet Gynecol.* 2003 Jul;102(1):156-61
- (16) **Chan YM, Ng TY, Lee PW, Ngan HY, Wong LC:** Symptoms, coping strategies, and timing of presentations in patients with newly diagnosed ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2003 Sep;90(3):651-6
- (17) **Chi DS, Liao JB, Leon LF, Venkatraman ES, Hensley ML, Bhaskaran D, Hoskins WJ:** Identification of prognostic factors in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2001 Sep;82(3):532-7
- (18) **Chi DS, Abu-Rustum NR, Sonoda Y, Ivy J, Rhee E, Moore K, Levine DA, Barakat RR:** The safety and efficacy of laparoscopic surgical staging of apparent stage I ovarian and fallopian tube cancers. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 May;192(5):1614-9
- (19) **Chowdhary RK, Sharif I, Chansarkar N, Dolphin D, Ratkay L, Delaney S, Meadows H:** Correlation of photosensitizer delivery to lipoproteins and efficacy in tumor and arthritis mouse models; comparison of lipid-based and Pluronic P123 formulations. *J Pharm Pharm Sci.* 2003 May-Aug;6(2):198-204
- (20) **Claydon PE, Ackroyd R:** 5-Aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy and photodetection in Barrett's esophagus. *Dis Esophagus.* 2004;17(3):205-12
- (21) **Collinet P, Sabban F, Cosson M, Farine MO, Villet R, Vinatier D, Mordon S:** Laparoscopic photodynamic diagnosis of ovarian cancer peritoneal micro metastasis: an experimental study. *Photochem Photobiol.* 2007 May-Jun;83(3):647-51
- (22) **Cormio G, Rossi C, Cazzolla A, Resta L, Loverro G, Greco P, Selvaggi L:** Distant metastases in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2003 Mar-Apr;13(2):125-9
- (23) **Cornah JE, Terry MJ, Smith AG:** Green or red: what stops the traffic in the tetrapyrrole pathway?. *Trends Plant Sci.* 2003 May;8(5):224-30
- (24) **Cotter PD, Drabkin HA, Varkony T, Smith DI, Bishop DF:** Assignment of the human housekeeping delta-aminolevulinate synthase gene (ALAS1) to chromosome band 3p21.1 by PCR analysis of somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet.* 1995;69(3-4):207-8
- (25) **Cox TC, Bawden MJ, Abraham NG, Bottomley SS, May BK, Baker E, Chen LZ, Sutherland GR:** Erythroid 5-aminolevulinate synthase is located on the X chromosome. *Am J Hum Genet.* 1990 Jan;46(1):107-11
- (26) **Dailey HA:** Terminal steps of haem biosynthesis. *Biochem Soc Trans.* 2002 Aug;30(4):590-5
- (27) **Dalton JT, Yates CR, Yin D, Straughn A, Marcus SL, Golub AL, Meyer MC:** Clinical pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid in healthy volunteers and patients at high risk for recurrent bladder cancer. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 May;301(2):507-12
- (28) **DeLaney TF, Sindelar WF, Tochner Z, Smith PD, Friauf WS, Thomas G, Dachowski L, Cole JW, Steinberg SM, Glatstein E:** Phase I study of debulking surgery and photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993 Feb 15;25(3):445-57
- (29) **Dembo AJ, Davy M, Stenwig AE, Berle EJ, Bush RS, Kjorstad K:** Prognostic factors in patients with stage I epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 1990 Feb;75(2):263-73
- (30) **DiSaia PJ, Bloss JD:** Treatment of ovarian cancer: new strategies. *Gynecol Oncol.* 2003 Aug;90(2 Pt 2):S24-32

- (31) **Dougherty TJ**: Photodynamic therapy: status and potential. *Oncology (Williston Park)*. 1989 Jul;3(7):67-73; discussion 74, 77-8
- (32) **Dougherty TJ, Marcus SL**: Photodynamic therapy. *Eur J Cancer*. 1992;28A(10):1734-42
- (33) **Du Bois A, Pfisterer J**: Future options for first-line therapy of advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2005 May-Jun;15 Suppl 1:42-50
- (34) **Du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J**: Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*. 2009 Mar 15;115(6):1234-44
- (35) **Du Bois A, Herrstedt J, Hardy-Bessard AC, Müller HH, Harter P, Kristensen G, Joly F, Huober J, Avall-Lundqvist E, Weber B, Kurzeder C, Jelic S, Pujade-Lauraine E, Burges A, Pfisterer J, Gropp M, Staehle A, Wimberger P, Jackisch C, Sehouli J**: Phase III trial of carboplatin plus paclitaxel with or without gemcitabine in first-line treatment of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Sep 20;28(27):4162-9. Epub 2010 Aug 23.
- (36) **Duffner F, Ritz R, Freudenstein D, Weller M, Dietz K, Wessels J**: Specific intensity imaging for glioblastoma and neural cell cultures with 5-aminolevulinic acid-derived protoporphyrin IX. *J Neurooncol*. 2005 Jan;71(2):107-11
- (37) **Eisenkop SM, Nalick RH, Teng NN**: Modified posterior exenteration for ovarian cancer. *Obstet Gynecol*. 1991 Nov;78(5 Pt 1):879-85
- (38) **Eisenkop SM, Friedman RL, Wang HJ**: Complete cytoreductive surgery is feasible and maximizes survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer: a prospective study. *Gynecol Oncol*. 1998 May;69(2):103-8
- (39) **Eisenkop SM, Spiro NM, Friedman RL, Lin WC, Pisani AL, Perticucci S**: Relative influences of tumor volume before surgery and the cytoreductive outcome on survival for patients with advanced ovarian cancer: a prospective study. *Gynecol Oncol*. 2003 Aug;90(2):390-6
- (40) **Ericson MB, Uhre J, Strandberg C, Stenquist B, Larko O, Wennberg AM, Rosen A**: Bispectral fluorescence imaging combined with texture analysis and linear discrimination for correlation with histopathologic extent of basal cell carcinoma. *J Biomed Opt*. 2005 May-Jun;10(3):034009
- (41) **Fathalla MF**: Incessant ovulation – a factor in ovarian neoplasia?. *Lancet* 1997; 349:760-764
- (42) **Fingar VH, Wieman TJ, Park YJ, Henderson BW**: Implications of a pre-existing tumor hypoxic fraction on photodynamic therapy. *J Surg Res*. 1992 Nov;53(5):524-8
- (43) **Fujita H**: Molecular mechanism of heme biosynthesis. *Tohoku J Exp Med*. 1997 Oct;183(2):83-99
- (44) **Gahlen J, Stern J, Laubach HH, Pietschmann M, Herfarth C**: Improving diagnostic staging laparoscopy using intraperitoneal lavage of delta-aminolevulinic acid (ALA) for laparoscopic fluorescence diagnosis. *Surgery*. 1999 Sep;126(3):469-73 (a)
- (45) **Gahlen J, Prosst RL, Pietschmann M, Rheinwald M, Haase T, Herfarth C**: Spectrometry supports fluorescence staging laparoscopy after intraperitoneal aminolevulinic acid lavage for gastrointestinal tumours. *J Photochem Photobiol B*. 1999 Sep-Oct;52(1-3):131-5 (b)

- (46) **Gahlen J, Pietschmann M, Pross RL, Herfarth C:** Systemic vs local administration of delta-aminolevulinic acid for laparoscopic fluorescence diagnosis of malignant intra-abdominal tumors. Experimental study. *Surg Endosc.* 2001 Feb;15(2):196-9
- (47) **Gahlen J, Pross RL, Pietschmann M, Haase T, Rheinwald M, Skopp G, Stern J, Herfarth C:** Laparoscopic fluorescence diagnosis for intraabdominal fluorescence targeting of peritoneal carcinosis experimental studies. *Ann Surg.* 2002 Feb;235(2):252-60
- (48) **Gallegos ER, DeLeon Rodriguez I, Martinez Guzman LA, Perez Zapata AJ:** In vitro study of biosynthesis of protoporphyrin IX induced by delta-aminolevulinic acid in normal and cancerous cells of the human cervix. *Arch Med Res.* 1999 May-Jun;30(3):163-70
- (49) **Gershenson DM, Silva EG, Tortolero-Luna G, Levenback C, Morris M, Tornos C:** Serous borderline tumors of the ovary with noninvasive peritoneal implants. *Cancer.* 1998 Nov 15;83(10):2157-63
- (50) **Gibson SL, Havens JJ, Foster TH, Hilf R:** Time-dependent intracellular accumulation of delta-aminolevulinic acid, induction of porphyrin synthesis and subsequent phototoxicity. *Photochem Photobiol.* 1997 Mar;65(3):416-21
- (51) **Gibson SL, Nguyen ML, Havens JJ, Barbarin A, Hilf R:** Relationship of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels to mitochondrial content in neoplastic cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Nov 19;265(2):315-21
- (52) **Gibson SL, Havens JJ, Metz L, Hilf R:** Is delta-aminolevulinic acid dehydratase rate limiting in heme biosynthesis following exposure of cells to delta-aminolevulinic acid?. *Photochem Photobiol.* 2001 Mar;73(3):312-7
- (53) **Grant WE, Speight PM, Hopper C, Bown SG:** Photodynamic therapy: an effective, but non-selective treatment for superficial cancers of the oral cavity. *Int J Cancer.* 1997 Jun 11;71(6):937-42
- (54) **Griffiths CT, Parker LM, Lee S, Finkler NJ:** The effect of residual mass size on response to chemotherapy after surgical cytoreduction for advanced ovarian cancer: long-term results. *Int J Gynecol Cancer.* 2002 Jul-Aug;12(4):323-31
- (55) **Harter P, du Bois A, Hahmann M, Hasenburg A, Burges A, Loibl S, Groppe M, Huober J, Fink D, Schröder W, et al.:** Surgery in recurrent ovarian cancer: the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) DESKTOP OVAR trial. *Ann Surg Oncol.* 2006 Dec; 13(12):1702-10.
- (56) **Harter P, Hahmann M, Lueck HJ, Poelcher M, Wimberger P, Ortmann O, Canzler U, Richter B, Wagner U, Hasenburg A, Burges A, Loibl S, Meier W, Huober J, Fink D, Schroeder W, Muenstedt K, Schmalfeldt B, Emons G, du Bois A.:** Surgery for recurrent ovarian cancer: role of peritoneal carcinomatosis: exploratory analysis of the DESKTOP I Trial about risk factors, surgical implications, and prognostic value of peritoneal carcinomatosis. *Ann Surg Oncol.* 2009 May;16(5):1324-30. Epub 2009 Feb 19.
- (57) **Harter P, Sehouli J, Reuss A, Hasenburg A, Scambia G, Cibula D, Mahner S, Vergote I, Reinthaller A, Burges A, Hunker L, Pölcher M, Kurzeder C, Canzler U, Petry KU, Obermair A, Petru E, Schmalfeldt B, Lorusso D, du Bois A.:** Prospective validation study of a predictive score for operability of recurrent ovarian cancer: the Multicenter Intergroup Study DESKTOP II. A project of the AGO Kommission OVAR, AGO Study Group, NOGGO, AGO-Austria, and MITO. *Int J Gynecol Cancer.* 2011 Feb;21(2):289-95.
- (58) **Hartge P, Whittemore AS, Itnyre J, McGowan L, Cramer D:** Rates and risks of ovarian cancer in subgroups of white women in the United States. The Collaborative Ovarian Cancer Group. *Obstet Gynecol.* 1994 Nov;84(5):760-4

- (59) **Hauth EA, Antoch G, Stattaus J, Kuehl H, Veit P, Bockisch A, Kimmig R, Forsting M:** Evaluation of integrated whole-body PET/CT in the detection of recurrent ovarian cancer. *Eur J Radiol.* 2005 Nov;56(2):263-268
- (60) **Henderson BW, Owczarczak B, Sweeney J, Gessner T:** Effects of photodynamic treatment of platelets or endothelial cells *in vitro* on platelet aggregation. *Photochem Photobiol.* 1992 Oct;56(4):513-21
- (61) **Herman MA, Webber J, Fromm D, Kessel D:** Hemodynamic effects of 5-aminolevulinic acid in humans. *J Photochem Photobiol B.* 1998 Apr;43(1):61-5
- (62) **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.* 1999 Mar 31;81(1):34-8
- (63) **Hillemanns P, Untch M, Dannecker C, Baumgartner R, Stepp H, Diebold J, Weingandt H, Prove F, Korell M:** Photodynamic therapy of vulvar intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer.* 2000 Mar 1;85(5):649-53 (a)
- (64) **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.* 2000 May 15;88(10):2275-82 (b)
- (65) **Hillemanns P, Weingandt H, Stepp H, Baumgartner R, Xiang W, Korell M:** Assessment of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence in patients with peritoneal endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Jul;183(1):52-7 (c)
- (66) **Hinnen P, de Rooij FW, Terlouw EM, Edixhoven A, van Dekken H, van Hillegersberg R, Tilanus HW, Wilson JH, Siersema PD:** Porphyrin biosynthesis in human Barrett's oesophagus and adenocarcinoma after ingestion of 5-aminolevulinic acid. *Br J Cancer.* 2000 Aug;83(4):539-43
- (67) **Hinnen P, de Rooij FW, Hop WC, Edixhoven A, van Dekken H, Wilson JH, Siersema PD:** Timing of 5-aminolevulinic acid-induced photodynamic therapy for the treatment of patients with Barrett's oesophagus. *J Photochem Photobiol B.* 2002 Aug;68(1):8-14
- (68) **Holschneider CH, Berek JS:** Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol.* 2000 Jul-Aug;19(1):3-10
- (69) **Hornung R, Major AL, McHale M, Liaw LH, Sabiniano LA, Tromberg BJ, Berns MW, Tadir Y:** In vivo detection of metastatic ovarian cancer by means of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in a rat model. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 1998 May;5(2):141-8
- (70) **Horowitz NS, Duska LR:** Advances in the surgical management of ovarian cancer. *J Reprod Med.* 2005 Jun;50(6):454-66
- (71) **Hoskins WJ, McGuire WP, Brady MF, Homesley HD, Creasman WT, Berman M, Ball H, Berek JS:** The effect of diameter of largest residual disease on survival after primary cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol.* 1994 Apr;170(4):974-9; discussion 979-80
- (72) **Hua Z, Gibson SL, Foster TH, Hilf R:** Effectiveness of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin as a photosensitizer for photodynamic therapy *in vivo*. *Cancer Res.* 1995 Apr 15;55(8):1723-31
- (73) **Hung J, Lam S, LeRiche JC, Palcic B:** Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue. *Lasers Surg Med.* 1991;11(2):99-105

- (74) **IACR**: International Agency for Research on Cancer. <http://globocan.iarc.fr>
- (75) **Iinuma S, Farshi SS, Ortel B, Hasan T**: A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin. *Br J Cancer*. 1994 Jul;70(1):21-8
- (76) **Iinuma S, Bachor R, Flotte T, Hasan T**: Biodistribution and phototoxicity of 5-aminolevulinic acid-induced PpIX in an orthotopic rat bladder tumor model. *J Urol*. 1995 Mar;153(3 Pt 1):802-6
- (77) **Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, Ohishi Y, Kobayashi H, Hirakawa T, Nakano H**: Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc*. 2003 Mar;36(1):9-17
- (78) **Karu T, Letokhov V**: Possible benefits of two-quantum excitation in ALA-PDT?. *J Photochem Photobiol B*. 1994 May;23(2-3):261-2
- (79) **Kawai M, Maeda O, Iwata M, Oguchi H, Kojima M, Kikkawa F, Tomoda Y**: Diagnosis of ovarian tumors by transvaginal Doppler ultrasound with color flow imaging. *Rinsho Byori*. 1992 Feb;40(2):146-51
- (80) **Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC**: Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B*. 1990 Jun;6(1-2):143-8
- (81) **Kennedy JC, Pottier RH**: Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 1992 Jul 30;14(4):275-92. Review
- (82) **Kimmig R, Wimberger P, Hillemanns P, Kapsner T, Caspary C, Hepp H**: Multivariate analysis of the prognostic significance of DNA-ploidy and S-phase fraction in ovarian cancer determined by flow cytometry following detection of cytokeratin-labeled tumor cells. *Gynecol Oncol*. 2002 Jan;84(1):21-31
- (83) **Koenig F, McGovern FJ, Althausen AF, Deutsch TF, Schomacker KT**: Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer. *J Urol*. 1996 Nov;156(5):1597-601
- (84) **Konig K, Schneckenburger H, Ruck A, Steiner R**: In vivo photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins. *J Photochem Photobiol B*. 1993 May;18(2-3):287-90
- (85) **Krammer B**: Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res*. 2001 Nov-Dec;21(6B):4271-7
- (86) **Kriegmair M, Zaak D, Knuechel R, Baumgartner R, Hofstetter A**: 5-Aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy for the detection of lower urinary tract tumors. *Urol Int*. 1999;63(1):27-31
- (87) **Kuhn WC**: Therapy for recurrent ovarian cancer. *Curr Womens Health Rep*. 2003 Feb;3(1):33-8
- (88) **Lecha M, Herrero C, Ozalla D**: Diagnosis and treatment of the hepatic porphyries. *Dermatol Ther*. 2003;16(1):65-72
- (89) **Lee BH, Hecht JL, Pinkus JL, Pinkus GS**: WT1, estrogen receptor, and progesterone receptor as markers for breast or ovarian primary sites in metastatic adenocarcinoma to body fluids. *Am J Clin Pathol*. 2002 May;117(5):745-50
- (90) **Leunig A, Betz CS, Heinrich P, Janda P, Baumgartner R**: Fluorescence staining of oral and laryngeal cancer after application of 5-aminolevulinic acid. *Laryngorhinootologie*. 2002 Nov;81(11):807-14

- (91) **Levy JG**: Photodynamic therapy. *Trends Biotechnol.* 1995 Jan;13(1):14-8
- (92) **Lewis S, Menon U**: Screening for ovarian cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2003 Feb;3(1):55-62
- (93) **Lim HW**: Effects of porphyrins on skin. *Ciba Found Symp.* 1989;146:148-53; discussion 154-8
- (94) **Loh CS, MacRobert AJ, Bedwell J, Regula J, Krasner N, Bown SG**: Oral versus intravenous administration of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. *Br J Cancer.* 1993 Jul;68(1):41-51 (a)
- (95) **Loh CS, Vernon D, MacRobert AJ, Bedwell J, Bown SG, Brown SB**: Endogenous porphyrin distribution induced by 5-aminolaevulinic acid in the tissue layers of the gastrointestinal tract. *J Photochem Photobiol B.* 1993 Sep;20(1):47-54 (b)
- (96) **Löning M, Hüttmann G, Diddens H, Bauer O, Diedrich K**: Photodynamische Diagnostik cervikaler Dysplasien nach topischer Applikation von 5-Aminolävulinsäure (ALA). *Archives Gynecol Obstet* 261 suppl.1, 102, 1998
- (97) **Löning M, Diddens H, Kupker W, Diedrich K, Hüttmann G**: Laparoscopic fluorescence detection of ovarian carcinoma metastases using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. *Cancer.* 2004 Apr 15;100(8):1650-6
- (98) **Löning MC, Diddens HC, Holl-Ullrich K, Löning U, Kupker W, Diedrich K, Hüttmann G**: Fluorescence staining of human ovarian cancer tissue following application of 5-aminolevulinic acid: fluorescence microscopy studies. *Lasers Surg Med.* 2006 Jun;38(5):549-54
- (99) **Ludicke F, Gabrecht T, Lange N, Wagnieres G, Van Den Bergh H, Berclaz L, Major AL**: Photodynamic diagnosis of ovarian cancer using hexaminolaevulinate: a preclinical study. *Br J Cancer.* 2003 Jun 2;88(11):1780-4
- (100) **MacRobert AJ, Bown SG, Phillips D**: What are the ideal photoproperties for a sensitizer?. *Ciba Found Symp.* 1989;146:4-12; discussion 12-16
- (101) **Major AL, Rose GS, Chapman CF, Hiserodt JC, Tromberg BJ, Krasieva TB, Tadir Y, Haller U, DiSaia PJ, Berns MW**: In vivo fluorescence detection of ovarian cancer in the NuTu-19 epithelial ovarian cancer animal model using 5-aminolevulinic acid (ALA). *Gynecol Oncol.* 1997 Jul;66(1):122-32
- (102) **Major AL, Ludicke F, Campana A**: Feasibility study to detect ovarian cancer micrometastases by fluorescence photodetection. *Lasers Med Sci.* 2002;17(1):2-5 (a)
- (103) **Major AL, Rose GS, Svaasand LO, Ludicke F, Campana A, van Gemert MJ**: Intraperitoneal photodynamic therapy in the Fischer 344 rat using 5-aminolevulinic acid and violet laser light: a toxicity study. *J Photochem Photobiol B.* 2002 Mar;66(2):107-14 (b)
- (104) **Malik Z, Ehrenberg B, Faraggi A**: Inactivation of erythrocytic, lymphocytic and myelocytic leukemic cells by photoexcitation of endogenous porphyrins. *J Photochem Photobiol B.* 1989 Nov;4(2):195-205
- (105) **Mayr D, Diebold J**: Grading of ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2000 Oct;19(4):348-53
- (105) **Messmann H, Endlicher E, Freunek G, Rummele P, Scholmerich J, Knuchel R**: Fluorescence endoscopy for the detection of low and high grade dysplasia in ulcerative colitis using systemic or local 5-aminolaevulinic acid sensitisation. *Gut.* 2003 Jul;52(7):1003-7

- (106) **Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W:** A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994 Oct 7;266(5182):66-71
- (107) **Mlkvy P, Messmann H, Regula J, Conio M, Pauer M, Millson CE, MacRobert AJ, Bown SG:** Photodynamic therapy for gastrointestinal tumors using three photosensitizers--ALA induced PPIX, Photofrin and MTHPC. A pilot study. *Neoplasma*. 1998;45(3):157-61
- (108) **Moan J:** Porphyrin photosensitization and phototherapy. *Photochem Photobiol*. 1986 Jun;43(6):681-90
- (109) **Moan J, Berg K, Gadmar OB, Iani V, Ma L, Juzenas P:** The temperature dependence of protoporphyrin IX production in cells and tissues *Photochem Photobiol*. 1999 Oct;70(4):669-73
- (110) **Modugno F, Ness RB, Allen GO, Schildkraut JM, Davis FG, Goodman MT:** Oral contraceptive use, reproductive history, and risk of epithelial ovarian cancer in women with and without endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Sep;191(3):733-40
- (111) **Morice P, Joulie F, Camatte S, Atallah D, Rouzier R, Pautier P, Pomel C, Lhomme C, Duvillard P, Castaigne D:** Lymph node involvement in epithelial ovarian cancer: analysis of 276 pelvic and paraaortic lymphadenectomies and surgical implications. *J Am Coll Surg*. 2003 Aug;197(2):198-205
- (112) **Muller PJ, Wilson BC:** Photodynamic therapy of malignant brain tumours. *Can J Neurol Sci*. 1990 May;17(2):193-8
- (113) **Munkarah AR, Hallum AV 3rd, Morris M, Burke TW, Levenback C, Atkinson EN, Wharton JT, Gershenson DM:** Prognostic significance of residual disease in patients with stage IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 1997 Jan;64(1):13-7
- (114) **Ness RB:** Endometriosis and ovarian cancer: thoughts on shared pathophysiology. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 Jul;189(1):280-94
- (115) **Nielsen HM, Aemisegger C, Burmeister G, Schuchter U, Gander B:** Effect of oil-in-water emulsions on 5-aminolevulinic acid uptake and metabolism to PpIX in cultured MCF-7 cells. *Pharm Res*. 2004 Dec;21(12):2253-60
- (116) **Nguyen HN, Averette HE, Hoskins W, Sevin BU, Penalver M, Steren A:** National survey of ovarian carcinoma. VI. Critical assessment of current International Federation of Gynecology and Obstetrics staging system. *Cancer*. 1993 Nov 15;72(10):3007-11
- (117) **Ozols RF:** Treatment goals in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2005 May-Jun;15 Suppl 1:3-11
- (118) **Pandey RK, Bellnier DA, Smith KM, Dougherty TJ:** Chlorin and porphyrin derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1991 Jan;53(1):65-72
- (119) **Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, Webb PM, Nagle CM, Doherty JA, Cushing-Haugen KL, Wicklund KG, Chang-Claude J, Hein R, Lurie G:** Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Lancet Oncol*. 2012 Apr;13(4):385-94
- (120) **Pass HI:** Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst*. 1993 Mar 17;85(6):443-56

- (121) **Peng Q, Moan J, Warloe T, Nesland JM, Rimington C:** Distribution and photosensitizing efficiency of porphyrins induced by application of exogenous 5-aminolevulinic acid in mice bearing mammary carcinoma. *Int J Cancer.* 1992 Sep 30;52(3):433-43
- (122) **Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM:** 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem Photobiol.* 1997 Feb;65(2):235-51 (a)
- (123) **Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, Nesland JM:** 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer.* 1997 Jun 15;79(12):2282-308 (b)
- (124) **Perkins GL, Slater ED, Sanders GK, Prichard JG:** Serum tumor markers. *Am Fam Physician.* 2003 Sep 15;68(6):1075-82
- (125) **Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Carey MS, Beale P, Cervantes A, Kurzeder C, du Bois A, Sehouli J, Kimmig R, Stähle A, Collinson F, Essapen S, Gourley C, Lortholary A, Selle F, Mirza MR, Leminen A, Plante M, Stark D, Qian W, Parmar MK, Oza AM; ICON7 Investigators.: A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer.** *N Engl J Med.* 2011 Dec 29;365(26):2484-96. Erratum in: *N Engl J Med.* 2012 Jan 19;366(3):284.
- (126) **Pickel H, Lahousen M, Stettner H, Girardi F:** The spread of ovarian cancer. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1989 Mar;3(1):3-12
- (127) **Pilli GS, Suneeta KP, Dhaded AV, Yenni VV:** Ovarian tumours: a study of 282 cases. *J Indian Med Assoc.* 2002 Jul;100(7):420, 423-4, 447
- (128) **Pimstone NR, Webber BL, Blekkenhorst GH, Eales L:** The hepatic lesion in protoporphyrina (PP): preliminary studies of haem metabolism, liver structure and ultrastructure. *Ann Clin Res.* 1976;8 Suppl 17:122-32
- (129) **Pimstone NR:** Hematologic and hepatic manifestations of the cutaneous porphyries. *Clin Dermatol.* 1985 Apr-Jun;3(2):83-102
- (130) **Piotrowski WJ, Marczak J, Nawrocka A, Antczak A, Gorski P:** Inhalations of 5-ALA in photodynamic diagnosis of bronchial cancer. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2004 Apr-Jun;61(2):86-93
- (131) **Polverino G, Parazzini F, Stellato G, Scarfone G, Cipriani S, Bolis G:** Survival and prognostic factors of women with advanced ovarian cancer and complete response after a carboplatin-paclitaxel chemotherapy. *Gynecol Oncol.* 2005 Nov;99(2):343-7. Epub 2005 Jul 26
- (132) **Ponka P:** Cell biology of heme. *Am J Med Sci.* 1999 Oct;318(4):241-56
- (133) **Prat J, Ribe A, Gallardo A:** Hereditary ovarian cancer. *Hum Pathol.* 2005 Aug;36(8):861-70
- (134) **Prat J, FIGO Committee on Gynecologic Oncology:** Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet.* 2014 Jan;124(1):1-5
- (135) **Pujade-Lauraine E, Mahner S, Kaern J, Gebski V, Heywood M, Vasey P, Reinthal A, Vergote I, Pignata S, Ferrero A:** A randomized, phase III study of carboplatin and pegylated liposomal doxorubicin versus carboplatin and paclitaxel in relapsed platinum-sensitive ovarian cancer (OC): CALYPSO study of the Gynecologic Cancer Intergroup (GCIG). *J Clin Oncol.* 2009;27:18s, 2009 (suppl; abstr LBA5509)
- (136) **Purdie DM, Bain CJ, Siskind V, Webb PM, Green AC:** Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2003 Mar 20;104(2):228-32

- (137) **Rahaman J, Dottino P, Jennings TS, Holland J, Cohen CJ:** The second-look operation improves survival in suboptimally debulked stage III ovarian cancer patients. *Int J Gynecol Cancer.* 2005 Jan-Feb;15(1):19-25
- (138) **Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan A, Thomsen S, Silva E, Richards-Kortum R:** Fluorescence spectroscopy: a diagnostic tool for cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Gynecol Oncol.* 1994 Jan;52(1):31-8
- (139) **Rebeiz N, Rebeiz CC, Arkins S, Kelley KW, Rebeiz CA:** Photodestruction of tumor cells by induction of endogenous accumulation of protoporphyrin IX: enhancement by 1,10-phenanthroline. *Photochem Photobiol.* 1992 Mar;55(3):431-5
- (140) **Regula J, MacRobert AJ, Gorchein A, Buonaccorsi GA, Thorpe SM, Spencer GM, Hatfield AR, Bown SG:** Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal, and colorectal tumours using 5 aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX--a pilot study. *Gut.* 1995 Jan;36(1):67-75
- (141) **Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E:** Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu Rev Phys Chem.* 1996;47:555-606
- (142) **Rick K, Sroka R, Stepp H, Kriegmair M, Huber RM, Jacob K, Baumgartner R:** Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood. *J Photochem Photobiol B.* 1997 Oct;40(3):313-9
- (143) **RKI:** Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) am Robert Koch-Institut, Stand 13.12.2013
- (144) **Roberts WG, Shiau FY, Nelson JS, Smith KM, Berns MW:** In vitro characterization of monoaspartyl chlorin e6 and diasparyl chlorin e6 for photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1988 May 4;80(5):330-6
- (145) **Rostgaard K, Wohlfahrt J, Andersen PK, Hjalgrim H, Frisch M, Westergaard T, Melbye M:** Does pregnancy induce the shedding of premalignant ovarian cells?. *Epidemiology.* 2003 Mar;14(2):168-73
- (146) **Rouzier R, Pomié C:** Update on the role of laparoscopy in the treatment of gynaecological malignancy. Update on the role of laparoscopy in the treatment of gynaecological malignancy
- (147) **Roy BN, Van Vugt DA, Weagle GE, Pottier RH, Reid RL:** Effect of 5-aminolevulinic acid dose and estrogen on protoporphyrin IX concentrations in the rat uterus. *J Soc Gynecol Investig.* 1997 Jan-Feb;4(1):40-6
- (148) **Salazar H, Godwin AK, Daly MB, Laub PB, Hogan WM, Rosenblum N, Boente MP, Lynch HT, Hamilton TC:** Microscopic benign and invasive malignant neoplasms and a cancer-prone phenotype in prophylactic oophorectomies. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Dec 18;88(24):1810-20
- (149) **Sant M, Capocaccia R, Coleman MP, Berrino F, Gatta G, Micheli A, Verdecchia A, Faivre J, Hakulinen T, Coebergh JW, Martinez-Garcia C, Forman D, Zappone A; EUROCARE Working Group:** Cancer survival increases in Europe, but international differences remain wide. *Eur J Cancer.* 2001 Sep;37(13):1659-67
- (150) **Sato N, Akahira J, Kitamura T, Aoki M, Yoshinaga K, Okamura C, Utsunomiya H, Shimizu T, Niikura H, Ito K, Okamura K, Yaegashi N:** Prognostic significance of second-look laparotomy for surgically confirmed early-stage epithelial ovarian cancer: a multicenter retrospective study. *Int J Clin Oncol.* 2003 Feb;8(1):40-4
- (151) **Sato Y, Shimamoto T, Amada S, Asada Y, Hayashi T:** Prognostic value of histologic grading of ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2003 Jan;22(1):52-6

- (152) **Scarabelli C, Gallo A, Visentin MC, Canzonieri V, Carbone A, Zarrelli A:** Systematic pelvic and para-aortic lymphadenectomy in advanced ovarian cancer patients with no residual intraperitoneal disease. *Int J Gynecol Cancer.* 1997 Jan;7(1):18-26
- (153) **Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, Flotte TJ, Richter JM, Nishioka NS, Deutsch TF:** Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential. *Lasers Surg Med.* 1992;12(1):63-78
- (154) **Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Akiyama F, Silverberg SG:** Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up. *Cancer.* 1998 Mar 1;82(5):893-901.
- (155) **SEER (Surveillance Epidemiology and End Results):** Cancer Statistics Review 1975-2008. <http://seer.cancer.gov/csr/1975-2008>
- (156) **Shaw D, Clamp A, Jayson GC.:** Angiogenesis as a target for the treatment of ovarian cancer. *Curr Opin Oncol.* 2013 Sep;25(5):558-65. Review.
- (157) **Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ:** Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opin Pharmacother.* 2001 Jun;2(6):917-27
- (158) **Silverberg SG:** Histopathologic grading of ovarian cancer: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol.* 2000 Jan;19(1):7-15. Review
- (159) **Sindelar WF, DeLaney TF, Tochner Z, Thomas GF, Dachowski LJ, Smith PD, Friauf WS, Cole JW, Glatstein E:** Technique of photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal malignant neoplasms. Phase I study. *Arch Surg.* 1991 Mar;126(3):318-24
- (160) **Smith SA, Easton DF, Evans DG, Ponder BA:** Allele losses in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome. *Nat Genet.* 1992 Oct;2(2):128-31
- (161) **Smits T, Robles CA, van Erp PE, van de Kerkhof PC, Gerritsen MJ:** Correlation between macroscopic fluorescence and protoporphyrin IX content in psoriasis and actinic keratosis following application of aminolevulinic acid. *J Invest Dermatol.* 2005 Oct;125(4):833-9
- (162) **Spikes JD:** Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol.* 1986 Jun;43(6):691-9
- (163) **Spikes JD:** Chlorins as photosensitizers in biology and medicine. *J Photochem Photobiol B.* 1990 Jul;6(3):259-74
- (164) **Tay EH, Grant PT, Gebski V, Hacker NF:** Secondary cytoreductive surgery for recurrent epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 2002 Jun;99(6):1008-13
- (165) **Tentes AA, Tripsiannis G, Markakidis SK, Karanikotis CN, Tzegas G, Georgiadis G, Avgidou K:** Peritoneal cancer index: a prognostic indicator of survival in advanced ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2003 Feb;29(1):69-73
- (166) **Terry PD, Miller AB, Jones JG, Rohan TE:** Cigarette smoking and the risk of invasive epithelial ovarian cancer in a prospective cohort study. *Eur J Cancer.* 2003 May;39(8):1157-64
- (167) **Till H, Bergmann F, Metzger R, Haeblerle B, Schaeffer K, von Schweinitz D, Probst RL:** Videoscopic fluorescence diagnosis of peritoneal and thoracic metastases from human hepatoblastoma in nude rats. *Surg Endosc.* 2005 Nov;19(11):1483-6. Epub 2005 Oct 3
- (168) **Tingulstad S, Skjeldestad FE, Halvorsen TB, Hagen B:** Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 2003 May;101(5 Pt 1):885-91

- (169) **Tong D, Fabjani G, Heinze G, Obermair A, Leodolter S, Zeillinger R:** Analysis of the human progesterone receptor gene polymorphism progrins in Austrian ovarian carcinoma patients. *Int J Cancer.* 2001 Nov 20;95(6):394-7
- (170) **Trimbos B, Timmers P, Pecorelli S, Coens C, Ven K, van der Burg M, Casado A:** Surgical staging and treatment of early ovarian cancer: long-term analysis from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Jul 7;102(13):982-7.
- (171) **Tumorzentrum München, Schmalfeldt B:** Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Maligne Ovarialtumoren, Manual des Tumorzentrums München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwigs-Maximilians-Universität und der Technischen Universität. 2014; 10.Auflage, W. Zuckschwerdt Verlag, München
- (172) **Uehlinger P, Zellweger M, Wagnieres G, Juillerat-Jeanneret L, van den Bergh H, Lange N:** 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J Photochem Photobiol B.* 2000 Jan;54(1):72-80
- (173) **Vaisbuch E, Dgani R, Ben-Arie A, Hagay Z:** The role of laparoscopy in ovarian tumors of low malignant potential and early-stage ovarian cancer. *Obstet Gynecol Surv.* 2005 May;60(5):326-30
- (174) **van den Boogert J, van Hillegersberg R, de Rooij FW, de Bruin RW, Edixhoven-Bosdijk A, Houtsmuller AB, Siersema PD, Wilson JH, Tilanus HW:** 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tissues: pharmacokinetics after oral or intravenous administration. *J Photochem Photobiol B.* 1998 Jun 15;44(1):29-38
- (175) **van der Veen N, de Brujin HS, Berg RJ, Star WM:** Kinetics and localisation of PpIX fluorescence after topical and systemic ALA application, observed in skin and skin tumours of UVB-treated mice. *Br J Cancer.* 1996 Apr;73(7):925-30
- (176) **Van Hillegersberg R, Van den Berg JW, Kort WJ, Terpstra OT, Wilson JH:** Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats. *Gastroenterology.* 1992 Aug;103(2):647-51
- (177) **Vo-Dinh T, Panjehpour M, Overholt BF, Farris C, Buckley FP 3rd, Snead R:** In vivo cancer diagnosis of the esophagus using differential normalized fluorescence (DNF) indices. *Lasers Surg Med.* 1995;16(1):41-7
- (178) **Wagnieres GA, Star WM, Wilson BC:** In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem Photobiol.* 1998 Nov;68(5):603-32
- (179) **Wang SC, Hung MC:** Transcriptional targeting of the HER-2/neu oncogene. *Drugs Today (Barc).* 2000 Dec;36(12):835-843
- (180) **Webber J, Kessel D, Fromm D:** Plasma levels of protoporphyrin IX in humans after oral administration of 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B.* 1997 Jan;37(1-2):151-3 (a)
- (181) **Webber J, Kessel D, Fromm D:** Side effects and photosensitization of human tissues after aminolevulinic acid. *J Surg Res.* 1997 Feb 15;68(1):31-7 (b)
- (182) **Weiss TS, Pahernik S, Scheruebl I, Jauch KW, Thasler WE:** Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid. *J Hepatol.* 2003 Apr;38(4):476-82
- (183) **Weingandt H:** Photodynamische Diagnostik der zervikalen intraepithelialen Neoplasie. Dissertation 2000
- (184) **Welcsh PL, King MC:** BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet.* 2001 Apr;10(7):705-13

- (185) **Wimberger P, Wehling M, Lehmann N, Kimmig R, Schmalfeldt B, Burges A, harter P, Pfisterer J, du Bois A:** Influence of residual tumor on outcome in ovarian cancer patientins with FIGO stage IV disease: an exploratory analysis of the AGO-OVAR (Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group). *Ann Surg Oncol.* 2010 Jun;17(6):1642-8
- (186) **Wolf P:** Photodynamische Therapie Grundlagen und klinische Anwendung in der Dermatologie. *Dt. Ärzteblatt.* 1999 Juni;96(22):1493-1498
- (187) **Wong KH, Mang OW, Au KH, Law SC:** Incidence, mortality, and survival trends of ovarian cancer in Hong Kong, 1997 to 2006: a population-based study. *Hong Kong Med J.* 2012 Dec;18(6):466-74
- (188) **Xu X, Weaver Z, Linke SP, Li C, Gotay J, Wang XW, Harris CC, Ried T, Deng CX:** Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell.* 1999 Mar;3(3):389-95
- (189) **Young RC, Fisher RI:** The staging and treatment of epithelial ovarian cancer. *Can Med Assoc J.* 1978 Aug 12;119(3):249-56
- (190) **Zaak D, Karl A, Knuchel R, Stepp H, Hartmann A, Reich O, Bachmann A, Siebels M, Popken G, Stief C:** Diagnosis of urothelial carcinoma of the bladder using fluorescence endoscopy. *BJU Int.* 2005 Aug;96(2):217-22
- (191) **Zhang M, Lee AH, Binns CW:** Reproductive and dietary risk factors for epithelial ovarian cancer in China. *Gynecol Oncol.* 2004 Jan;92(1):320-6
- (192) **Zonios GI, Cothren RM, Arendt JT, Wu J, Van Dam J, Crawford JM, Manoharan R, Feld MS:** Morphological model of human colon tissue fluorescence. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1996 Feb;43(2):113-22

8 Alphabetisches Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
Abb.	Abbildung
AF	Autofluoreszenz
AUC	Area under the curve
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
DI	Deziliter
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d' Obstétrique
Ggf	gegebenenfalls
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KOF	Körperoberfläche
Lig.	Ligamentum
mg	Milligramm
PDD	Photodynamische Diagnostik
PDT	Photodynamische Therapie
PPIX	Protoporphyrin IX
PS	Photosensibilisator
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
RKI	Robert-Koch-Institut
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results
Tab.	Tabelle
TZM	Tumorzentrum München
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VIN	vulvären intraepithelialen Neoplasie
w.E.	Willkürliche Einheit

9 Eidesstattliche Versicherung

Reif, Jessica

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Klinische Studie zur Photodynamischen Diagnostik des Ovarialkarzinoms mit
5-Aminolävulinsäure

selbständige verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 14.10.2014

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt vor allem Frau Prof. Dr. Pauline Wimberger für die ausdauernde und geduldige Unterstützung in der Erstellung und Fertigstellung der Doktorarbeit. Trotz der Ferne war sie immer eine präsente und sehr hilfreiche Ansprechpartnerin.

Vielen Dank an Herrn Prof. P. Hillemanns für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation.

Herzlichen Dank auch an Herrn Dr. H. Stepp aus dem Laserforschungslabor für die Unterstützung bei den Messungen und bei physikalischen und technischen Problemen.

Vielen Dank an die Ludwigs-Maximilians-Universität, die die Studie durch Bereitstellung von Drittmittelförderung unterstützt hat.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Frauenklinik des Klinikums Großhadern für die gute Zusammenarbeit während des praktischen Teils meiner Doktorarbeit.

Vielen Dank meinem Chef Herrn Prof. Dr. Ch. Anthuber für die Ausbildung in der gynäkologischen Onkologie, die mir bei der Fertigstellung der Doktorarbeit sehr geholfen hat.

Lieben Dank auch an Herrn Dr. S. Kessler für die Bereitstellung der Statistiksoftware SPSS und für das Beibringen der Grundkenntnisse.

Herzlichsten Dank an meine Familie und meine Freunde für den Glauben an die Fertigstellung dieser Dissertation.