

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität München

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

**Weißlicht und Autofluoreszenz-Bronchoskopie zur
Früherkennung von Lungentumoren**

**Biophysikalische Grundlagen,
Optimierung durch Bildverarbeitung,
klinische Anwendung**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

An der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Josef Peter Pichler

aus

Hausham

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

Der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Häußinger

Prof. Dr. R.M. Huber

Mitbetreuung durch den

Promovierten Mitarbeiter: Dr. H. Stepp

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

Tag der mündlichen Prüfung : 18. 11. 2003

Widmung:

**Auch wenn mein Vater sie nicht mehr lesen konnte,
So ist diese Arbeit doch meinem Vater und meiner Mutter gewidmet
und allen untersuchten Patienten.**

Wie entschieden die Farbe sei

**Entstehen der Farbe und sich entscheiden ist eins. Wenn das Licht mit einer
allgemeinen Gleichgültigkeit sich und die Gegenstände darstellt und uns
von einer bedeutungslosen Gegenwart gewiß macht, so zeigt sich die Farbe
jederzeit spezifisch, charakteristisch, bedeutend.**

**Im allgemeinen betrachtet entscheidet sie sich nach zwei Seiten. Sie stellt
einen Gegensatz dar, den wir eine Polarität nennen und durch ein + und -
recht gut bezeichnen können**

(Aus Goethes Farbenlehre Kapitel 4: 695/696)

1. Einleitung	1
1.1 Problemstellung	1
1.2 Grundlagen	2
1.2.1 Biologische Grundlagen	2
1.2.2 Physikalische Grundlagen	8
1.2.3 Zytologische und Histopathologische Grundlagen	12
1.2.4 Klinische Grundlagen	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Risikogruppen	17
2.2 Lichtquelle, Endoskopische Geräte	17
2.3 visuelle Beurteilung	20
2.4 Bildverarbeitung	21
2.5 Spektroskopie	22
2.6 Ergänzende Untersuchungen	22
2.7 Auswertung	23
3. Ergebnisse	27
3.1 Untersuchungen mit Weißlicht	27
3.2 Spektroskopische Untersuchungen (nach Applikation von 5-ALA)	33
3.3 Untersuchungen im Autofluoreszenzmodus	37
3.3.1 Untersuchungen des Lungengewebes und seiner Histologie	37
3.3.2 Montecarlosimulation zur Optimierung der Autofluoreszenz	40
3.3.3 Untersuchung der Autofluoreszenz bei Hypoxie	50
3.3.4 Winkelabhängigkeit der Fluoreszenz	51
3.3.5 Bleaching der Autofluoreszenz	52
3.4 Quantifizierende Bildverarbeitung	53
3.4.1 Farbratios von Befunden (Weißlichtmodus und Autofluoreszenzmodus)	54
3.4.2 Farbratios des Normalgewebes im Autofluoreszenzmodus	57
3.4.3 Farbratios der Befunde im Autofluoreszenzmodus	62
3.4.4 Diskriminierung von Befundrändern: Autofluoreszenz	65
3.4.5 Adaptation eines Neuronalen Netzes zur Diskriminierung von Farbratios	67
3.5 Klinischer Vergleich der Methoden Weißlicht, Autofluoreszenz	70
3.6 Klinische Ergänzungen zur Methode Autofluoreszenz	77
4. Diskussion	81
4.1 Biologische und physikalische Aspekte	81
4.2 Pathologische Aspekte	84
4.3 Klinische Aspekte	88
4.4 Ausblick	90
5. Zusammenfassung	92
6. Literatur	94
7. Veröffentlichungen	105
8. Patentschriften (Stand: Januar 2002)	106
9. Danksagung	106
10. Lebenslauf	107

1. Einleitung

1.1 Problemstellung

1995 erkrankten in der EU 170000 Menschen an Bronchialkarzinom. Als Folge der Erkrankung an Lungenkrebs versterben 160000 Menschen/Jahr, mehr als an allen anderen Tumorerkrankungen. In Deutschland werden zur Zeit jährlich etwa 42000 Bronchialkarzinome neu diagnostiziert. 1995 starben 37147 Erkrankte, 77 % davon Männer, 23 % Frauen (Spektrum der Wissenschaft 1997). Hauptursache des Bronchialkarzinoms ist mit ca. 90% das inhalative Zigarettenrauchen (Peto et al 1994). Darüberhinaus können genetische Ursachen, Exposition gegen Strahlung und andere Kanzerogene für die Tumorerkrankung verantwortlich sein (Häußinger et al 1997). Das Risiko des Rauchers, ein Bronchialkarzinom zu entwickeln, ist bei männlichen Rauchern 22 mal und bei Frauen 12 mal so hoch wie bei Nichtrauchern. Aber nur 10-15% aller Raucher entwickeln im Laufe ihres Lebens ein Bronchialkarzinom (Doll et al 1994). Die geringe Prävalenz bezüglich der Symptome in operablen Stadien macht es erforderlich, die Erkrankung durch Sputumproben, Röntgenuntersuchungen und eine endoskopische Untersuchung möglichst frühzeitig zu diagnostizieren. Ziel ist es Veränderungen möglichst im Anfangsstadium der Malignität zu erfassen. Leider sind die Sputumuntersuchung, das radiologische Diagnostik und die Weißlichtbronchoskopie wenig sensitiv (Fontana et al 1996). Das heißt, selbst bei der endoskopischen Untersuchung mit konventionellem Licht (Weißlicht WL) werden vor allem Tumorfrühstadien wie Dysplasien (Dys), Cacinomata in situ (CIS) und mikroinvasive Tumoren leicht übersehen, zumal sie sich meist nur als relativ kontrastarme Veränderungen wie erhöhter Rauigkeit, Glanzverlust oder Rötung darstellen. Eine entscheidende Verbesserung für die Sensitivität der Erkennung bringt der Einsatz von Fluoreszenzverfahren (Profio et al 1979): Lichtaktive Substanzen werden im Gewebe durch Bestrahlung mit blauem Licht angeregt. Tumor- und Normalgewebe remittieren ein unterschiedliches Fluoreszenz- und Anregungslicht. Der Kontrastunterschied ist bereits mit bloßem Auge sichtbar, wird aber besonders in der Anfangsphase von ungeübten Untersuchern verschieden beurteilt (Häußinger et al 1998). Hier kann eine Quantifizierung der Lichtphänomene der Fluoreszenz mittels Spektroskopie oder Bildverarbeitung eine kontrastreichere,

Einleitung

objektivere Darstellung der Befunde liefern (Pichler et al 1998). Damit könnte es künftig eventuell möglich werden, verschiedene histologische Grundmuster zu differenzieren.

Ziel dieser Arbeit war es, eine bessere visuelle Darstellung des Fluoreszenzkontrastes zu erreichen und mittels Spektroskopie und Bildverarbeitung eine genauere Analyse der Befunde zu erreichen, als dies mit bisherigen Weißlichtverfahren oder Fluoreszenzverfahren möglich ist.

1.2 Grundlagen

1.2.1 Biologische Grundlagen

Die Lunge entwickelt sich als ektodermale Einstülpung und hat die Funktion des Austausches von Atemgasen (Sauerstoff und CO₂). Für den Gasaustausch sind eine große Oberfläche (100 m²) und eine direkte Anbindung an das Blutgefäßsystem und die Ventilation nötig. Eine strömungstechnisch günstige Ausgangsbasis mit einem Ein/Ausgang stellt unser dichoton verästeltes Bronchialsystem dar (Hansen et al 1975). Es ist überwiegend versteift durch Knorpel und durch kontraktile Muskelfasern. Querschnitt und Länge der Röhren werden immer kleiner und an jeder Verzweigungsstelle befinden sich flache Karinen (Abbildung 1). Am Ende dieses "Baumes" und damit auch im wesentlichen an der zu den Rippen gerichteten Oberfläche der Lunge befinden sich an der 26. Verzweigungsstelle die vollelastischen Lungenbläschen, die indirekt über pneumatischen Unterdruck durch die Bewegung des Zwerchfells (tiefe Atmung) und der Rippen (flache Atmung) gefüllt werden.

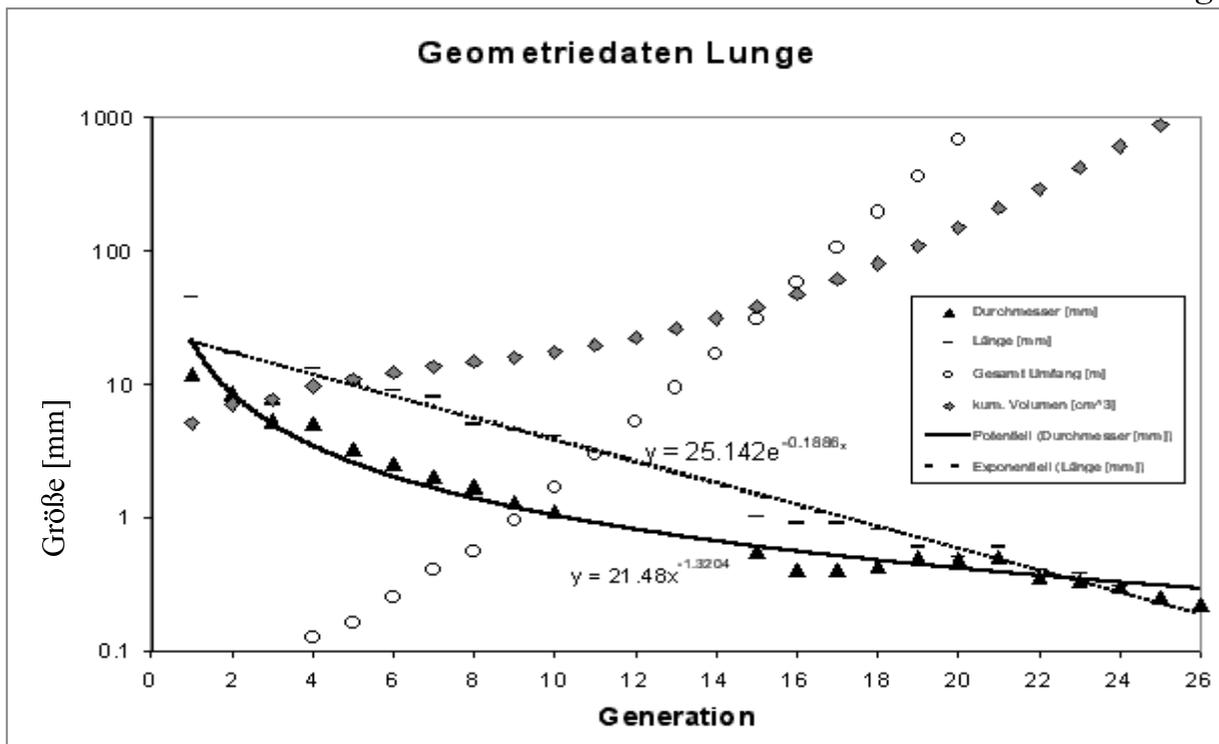


Abb. 1: Reale und idealisierte Daten zur Verzweigung der Lunge: Durchmesser, Länge der Bronchialröhren, sowie der Gesamtumfang und das kumulative Volumen mit zunehmender Generation der Verzweigung (Hansen et al 1975)

Die für Wirbeltiere übliche bilaterale segmentale Symmetrie bleibt dabei weitestgehend bestehen, es befinden sich aber rechts drei Lungenlappen und links zwei (Thews et al 1989). Der exponierte Kontakt der Lunge mit der Umwelt macht das Organ anfällig für Infektionskrankheiten. Daher ist das Bronchialsystem durchgängig ausgekleidet mit einem metachronen Flimmerepithel und ein von tiefer liegenden Drüsen abgegebener aseptisch wirksamer muköser Schleim sorgt für eine Reinigung der Lunge. Um Obstruktionen zu vermeiden, muß der Schleimfluß gleichmäßig und nach proximal gerichtet sein. An den Verzweigungsstellen (Karinen) ist die Transportrichtung uneindeutig, so daß es hauptsächlich hier zu Akkumulationen kommen kann. Die Lungengeometrie wird im wesentlichen bestimmt durch eine konstante Gesamtquerschnittsfläche pro Verzweigungsebene um den Strömungsfluß der Einatemluft konstant und laminar zu halten. Letzteres hat die Konsequenz, daß der Gesamtumfang der Röhren exponentiell mit der Verzweigung zunimmt. Ab etwa der 10. Generation gilt dies noch deutlicher zumal sich der Durchmesser der Röhren immer

Einleitung

weniger ändert und 0,3 mm nicht mehr unterschreiten. Das bedeutet für den gleichmäßigen Schleimtransport in der umgekehrten Richtung, daß die metachrone Schlagfrequenz der Flimmerepithelzellen, ihr Metabolismus und ihre Koordination zunehmen müssen. Für die Funktion der bronchialschleimhaut sind also Plattenepithelzellen, Drüsenzellen und Flimmerepithelzellen notwendig (Abbildung 2). Die Versorgung vor allem des aktiven Flimmerepithels erfolgt durch das darunter liegende submuköse Gewebe. Zur Versteifung des Gewebes sind ein hoher Anteil von stark kollagenhaltigem Bindegewebe und ein hyaliner Knorpel vorhanden (Geneser 1989).

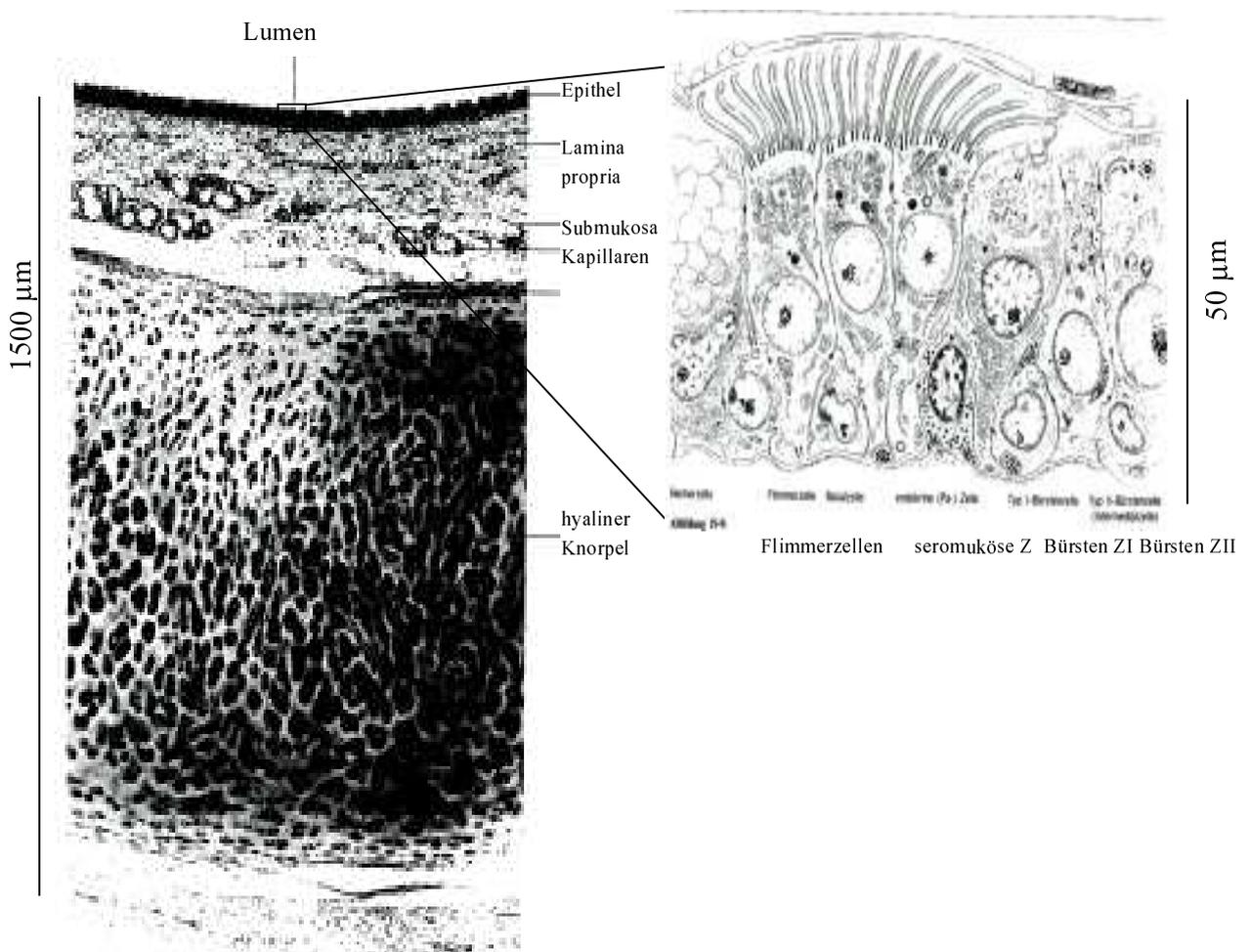
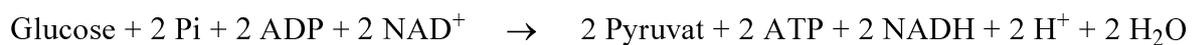


Abb. 2: Schichtung des Lungengewebes im Schnitt und Zelltypen des Epithels: Schemazeichnung nach SOROKIN (Geneser 1989)

Einleitung

Der Energiehaushalt von tierischen Zellen ist bestimmt durch oxidative metabolische Prozesse in der Mitochondrienmembran (Abbildung 3). Aufgrund möglicher Auswirkungen auf die Fluoreszenz sollen hier die Atmungskette, die dazu notwendigen Enzyme und ihre Genese näher betrachtet werden (Koolmann et al 1994).

Zytosol:



Mitochondrium:

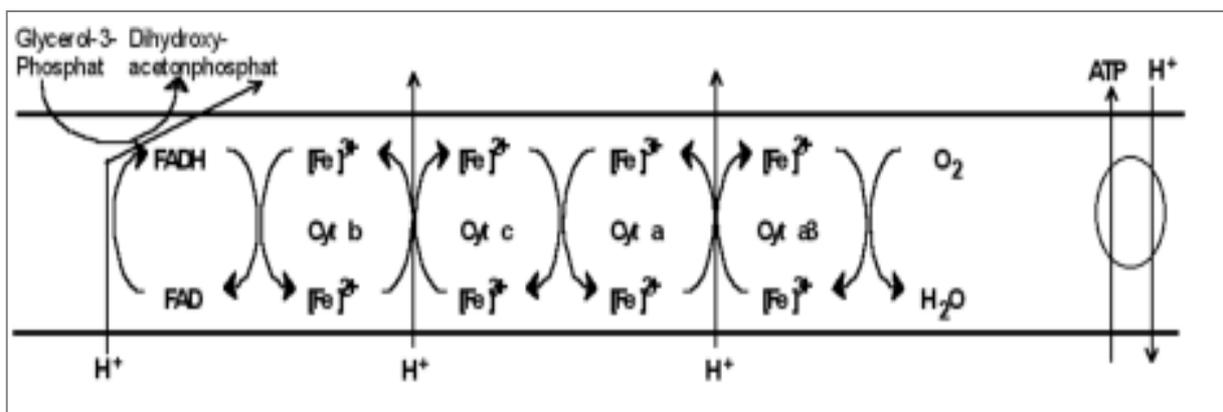


Abb. 3: Atmungskette (innere Mitochondrienmembran)

Das Redoxpotential des Sauerstoffs wird letztlich genutzt zur Umsetzung der hämtragenden Enzyme zu gebundenem oxidiertem FAD und freiem NAD. Der Pool an freiem NAD in der Zelle ist gering und muß in der aktiven Zelle ständig ergänzt werden. In schlecht mit Sauerstoff versorgten Zellen, d.h. in Zellen mit hohem Metabolismus und geringer Blutgefäßversorgung ist die Glycolyse vorherrschend, NAD reichert sich im Zytosol an und FAD in den Mitochondrien. Ersteres ist im Gegensatz zu seiner oxidierten Form ein fluoreszierender Aromat, während letzteres im Gegensatz zu seiner oxidierten Form nicht

Einleitung

fluoresziert (Galeotti et al 1970, Ghisla 1975). Der Nachteil der Glycolyse ist eine Übersäuerung der Zellen. Zum Ausgleich müssen die Zellen Säure an das umgebende Gewebe abgeben. In den kapillaren Blutgefäßen dieses Gewebes wird bei niedrigem pH das Hämoglobin der Erythrozyten vom Sauerstoff befreit und liegt letztlich in seiner reduzierten Form vor. Normalerweise spielt die Glycolyse bei der Energiegewinnung nur eine untergeordnete Rolle (Thews et al 1989). Die Zahl der Mitochondrien verdoppelt sich in etwa pro Zellteilung, dies gilt daher auch für die hämtragenden Proteine. Somit ist die Hämproduktion insgesamt in stark teilungsaktiven Geweben gesteigert. Häm wird über den im Abbildung 4 dargestellten Weg synthetisiert (Berlin et al 1956):

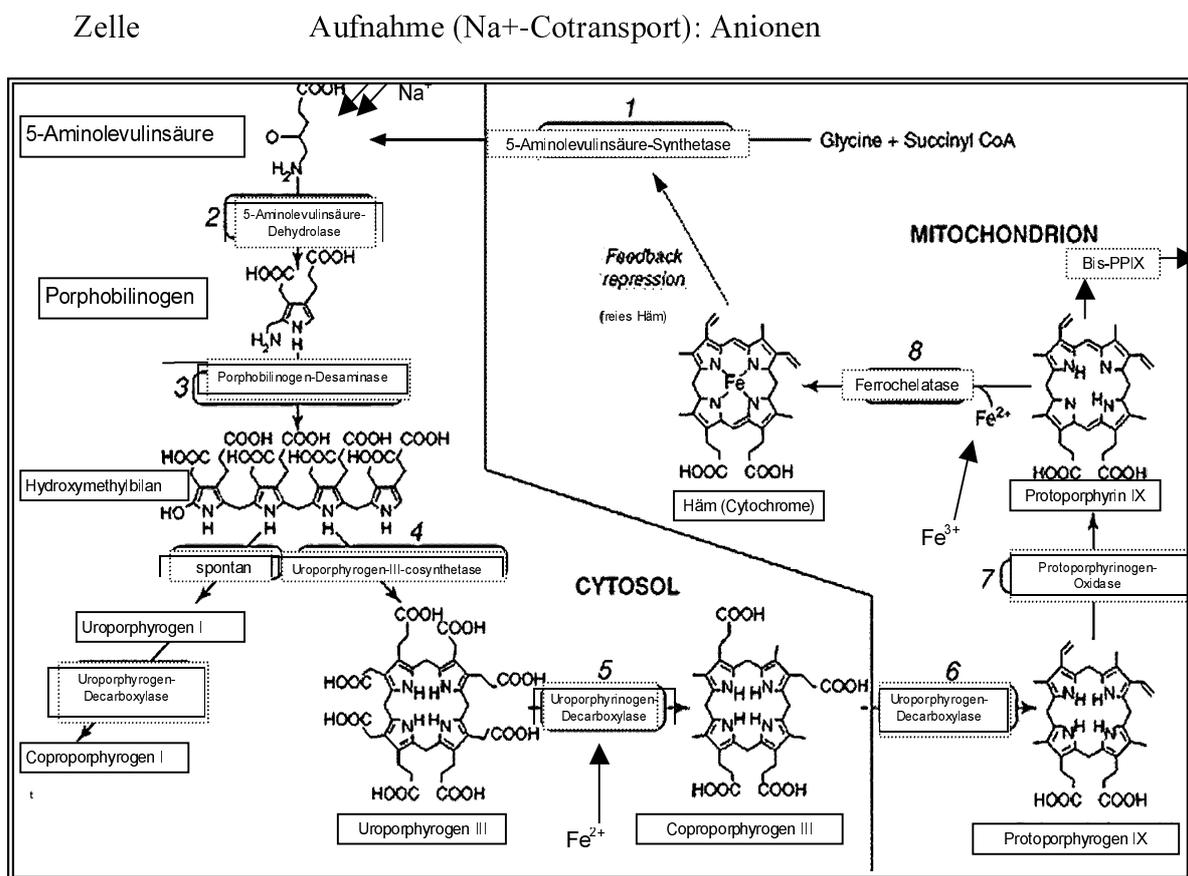


Abb. 4: PPIX-Stoffwechsel: Synthese eines Moleküls Protoporphyrin IX aus 8 Molekülen 5-Aminolävulinat, sowie Synthese bzw. Aufnahme von 5-Aminolävulinat und die Weiterverarbeitung vom PPIX zu Häm bzw. ausgeschleustes Bis-PPIX und das beteiligte Proteom (1-8). Desweiteren ist die Rolle von Eisen dargestellt.

Einleitung

Unterschiede zwischen verschiedenen Gewebearten können sich ergeben durch unterschiedliche Proteome (Rasetti et al 1963). Da freies Häm im normalen Stoffwechsel die PPIX-Synthese bereits auf der Stufe der 5-Aminolävulinsäure-Synthese hemmt, kommt es zu einer erhöhten PPIX-Konzentration nur dann, wenn 5-ALA exogen zugeführt wird, verstärkt aufgenommen wird bzw. ggf. beschleunigt zu PPIX synthetisiert wird und dieses ggf. nicht mehr abgebaut werden kann. In zytologischen Versuchen wurde für die Aufnahme von 5-ALA in die Zelle eine fördernde Wirkung von Na^+ und ein aktiver Transport nachgewiesen (Berg et al 1996, Fuchs 1996). Eine weitergehende Kontrolle des Stoffwechsels als die Endprodukthemmung durch Häm ist bislang nicht beschrieben, wenngleich die Aktivität der Uroporphyrinogen-Decarboxylase (5) durch Zugabe von Fe^{2+} erhöht wird (Berg et al 1996). Bei einer Zerstörung der Mitochondrien durch Bestrahlung wird von erhöhten Konzentrationen der Uro- und Coproporphyrine nach 5-ALA-Applikation berichtet, was darauf hindeutet, daß eine weitere Hemmung durch ein Zwischenprodukt nicht stattfindet (Dietel, VDI-Abschlußbericht 1999). Das Protoporphyrin liegt frei im Mitochondrium vor, bei hohen Konzentrationen bildet sich daraus Bis-PPIX, welches in einem aufwendigen Prozeß von der Zelle aktiv ausgeschleust wird (Bottomley 1998). Insbesondere bei Tumorzellen wird von einer verminderten Aktivität der Ferrochelatase berichtet (Rasetti et al. 1967). Wenn auch die biologischen Zusammenhänge mittlerweile recht gut verstanden sind, so sind diese Parameter meist meßtechnisch schwer zu erfassen und starken Schwankungen unterworfen. Daher ist es gerade bei makroskopischen Betrachtungen oft einfacher, physikalische Parameter heranzuziehen.

Einleitung

1.2.2 Physikalische Grundlagen

Makroskopisch sichtbar werden die biochemischen und strukturellen Unterschiede zwischen den Geweben erst nach entsprechender Anregung mit Licht und der Detektion des zurückgestrahlten Lichtes. In der vorliegenden Arbeit wird fast überwiegend sichtbares Licht zur Kontrastierung verwendet. Es lassen sich im wesentlichen drei Prozesse unterscheiden, die zu einer Detektion von Licht führen können. Photonen sind das Resultat elektromagnetischer Zustände der Molekülorbitale und somit indirekt auch über diese Beschreibung zugänglich.

1.2.2.1 Rückstreuung des anregenden Lichtes

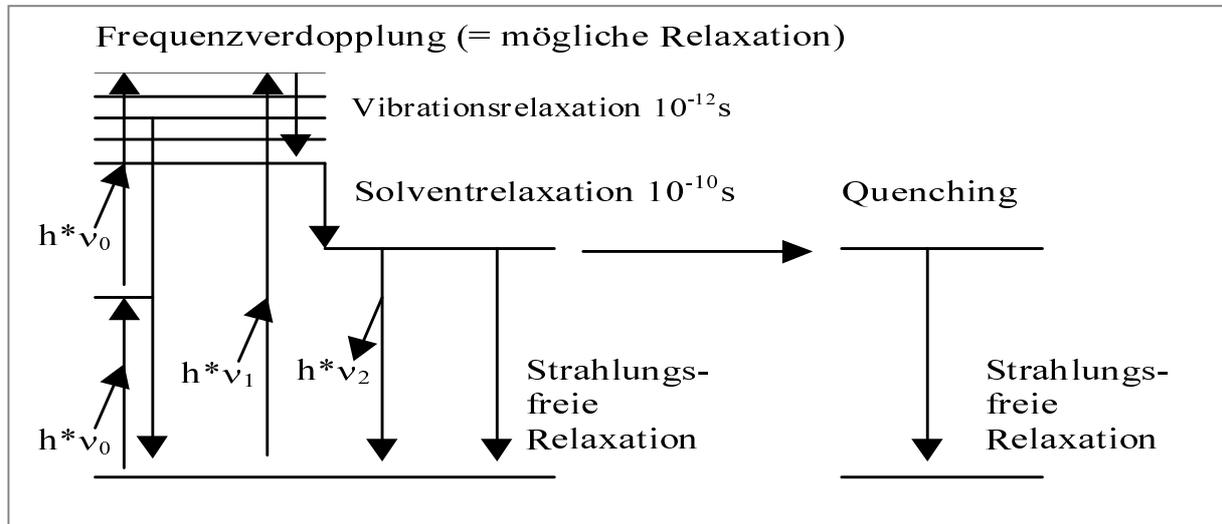
An zytologischen Strukturen mit hohem Brechungsindexunterschied, d.h. vornehmlich an Zellmembranen (auch der Zellorganellen) wird Licht entsprechend der Mie-Streuung gebrochen und reflektiert. Es ändert dabei aber nur die Richtung und nicht die Wellenlänge. Je nach der Dichte der Zellen kommen auch Mehrfachstreuungen vor. Der Winkel der Streuung ist im sichtbaren bis infraroten Bereich um so größer, je energiereicher die Photonen sind (Auftragung: $1/\lambda^4$). Dieses Gesetz gilt relativ genau im Bereich von 450 - 800 nm. Vornehmlich im ultravioletten Wellenlängenbereich ergibt sich eine erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Mehrfachbeugung, was zu wellenlängenabhängigen Intensitätsschwankungen führt (Boyer et al 1995). Für verschiedene Gewebearten und Wellenlängen können charakteristische Parameterwerte verwendet werden (optische Parameter) (Cheong et al 1990).

1.2.2.2 Fluoreszenz nach Absorption von Licht

Durch die Absorption von energiereichem Licht werden Elektronen, sofern es die Energieniveaus der Molekülorbitale zulassen, in energetisch höhere Zustände überführt bzw. ionisiert. Damit ergibt sich meist eine definite Lücke bei den energiearmen Zuständen, die mit einer bestimmten Übergangswahrscheinlichkeit von anderen Elektronen gefüllt werden kann. Ein Übergang von einem energetisch höheren Zustand auf diesen Zustand ist

Einleitung

unter Einhaltung der physikalischen Erhaltungssätze mit der Abstrahlung eines Photons mit definiter Wellenlänge verbunden (Eichler et al 1987). Die Photonen können auch nur teilweise oder mit geringerer Wahrscheinlichkeit mehrfach hintereinander absorbiert werden.



Absorption - Fluoreszenz

Angeregtes Molekül 1

Quenching

Quench-Molekül 2

Abb. 5: Jablonski-Diagramm: Die Intensität der Fluoreszenz hängt ab von der Anregungsintensität, bei einer Zweiphotonenanregung von der quadrierten Anregungsintensität (modifiziert nach Eichler et al 1987)

Das Absorptionsspektrum hängt somit vom Molekül, vom Besetzungszustand der Molekülorbitale, seiner Umgebung und der Photonendichte ab. Die Emissionsspektren zeigen im allgemeinen ausgeprägte Maxima, denn sie sind bestimmt durch die Energieübergänge im Molekül, die abgesehen von einem geringfügigen Einfluß der elektronischen Umgebung relativ konstant sind (Abbildung 5). Diese Eigenschaft kann man sich zu Nutze machen, um Moleküle makroskopisch via spektraler Detektion zu charakterisieren. Die Wahrscheinlichkeit der Fluoreszenzemission eines Photons ist aber in jedem Falle geringer als die Wahrscheinlichkeit der Absorption eines Photons. Damit ist der Quantenwirkungsgrad (= Fluoreszenz/Absorption) selbst bei optimalen Voraussetzungen meist gering. Im Vergleich zu einer gleichbleibend streuenden Umgebung erwartet man also eine geringere Fluoreszenzmodulation als Absorptionsmodulation. Abgesehen von Mehrphotonenanregungen sind aber das kurzwellige Absorptionsspektrum und das

Einleitung

langwellige Fluoreszenzspektrum der einzelnen Moleküle meist deutlich voneinander getrennt. Auch wenn dies nicht gegeben ist, ist bei höheren Konzentrationen des Fluorophors im allgemeinen die Absorption so stark vorherrschend, daß es zu einer sofortigen Absorption der emittierten Photonen durch Moleküle in der Nachbarschaft kommt (Quenching) (Gryczynski et al 1997). Die Energie und die Wahrscheinlichkeit einer erneuten Fluoreszenz nimmt dabei mit jedem Absorptionsschritt ab. Detektiert man mithilfe einer speziellen Filteranordnung (Stepp et al 1997) nur die Fluoreszenz und regt in einem differenten Spektralbereich an, gibt es trotz des stark streuenden Gewebes keinen Einfluß des anregenden Lichtes auf das detektierte Licht. Zumal die Streueinflüsse bei längeren Wellenlängen abnehmen, ist der Einfluß dieser Größe für die Fluoreszenz im Allgemeinen geringer. All dies soll beschreiben, wie komplex die wirklichen physikalischen Verhältnisse sind.

1.2.2.3 Reflexion von Licht

Die einfachste Möglichkeit der Detektion ist die Spiegelung von Licht an Grenzflächen mit unterschiedlichem Brechungsindex. Hier kommt es nach den Fresnelschen Gesetzen zu einem reflektierten und gebrochenen Anteil. Die Intensität und die Polarisation beider Anteile ist stark abhängig vom einfallenden Winkel. Ein Detektor mit und ohne Polarisationsfilter führt aber nur zu geringfügig unterschiedlichen Winkelabhängigkeiten der Reflexion. Verglichen mit der Winkelabhängigkeit der Streuung (angenähert nach Lambert, bei isotroper Streuung $g=1$) und der im Allgemeinen isotropen Fluoreszenz ergeben sich Unterschiede. Die Winkelabhängigkeiten im Gewebe sind zusammengesetzt aus reflektiven, isotropen und streuenden Anteilen (Abbildung 6; Wilson et al 1990).



Abb. 6: Winkelabhängigkeit der Remission eines idealisierten Lambert-Strahlers (streuend), sowie der Reflexion und der Remission eines isotropen Strahlers

Ergänzend sei angemerkt, daß Polarisierungseffekte und anisotrope Effekte auch bei der Fluoreszenz und der Streuung auftreten können. Desweiteren ist eine Drehung der Polarisationsrichtung bei der Durchstrahlung chiraler Moleküle möglich (Hoppe et al 1978).

Einleitung

1.2.3 Zytologische und Histopathologische Grundlagen

	Typ	Subtyp	Häufigkeit bei Risikopatienten	Spontane Rückbildung	Dauer
Tumorfrühformen:					
1.	Hyperplasie				
	A	Metaplasie	?	?	ca. 15 J
	B	Basalzellhyperplasie	?	?	?
	C	Papillomatose	?	?	?
2.	Dysplasie				
	A	Leichte Dysplasie	19%*	90%	ca. 8 J
	B	Moderate Dysplasie	40%*	50%	ca. 3 J
	C	Schwere Dysplasie	11%*	10%	ca. 2 J
3.	Carcinoma in situ		10%*	0%	0.5-2 J
Tumorspätformen:				Heilungsrate	Tumorverdoppelungszeit (t)
1.	Plattenepithelkarzinome		30-40%	15% (Operation)	88
2.	Kleinzellige Karzinome		15-20%	1-3% (Operation)	29
3.	Adenokarzinome		25-30%	15-20% (Operation)	161
4.	Großzellige Karzinome		10-15%	ca. 15%	89
5.	Adenosquamätöse Karzinome		2-3%	ca. 15%	90
6.	Karzinoidtumoren		1%	70% / 50% Operation/PDT	

Tab. 1: Übersichtstabelle histopathologischer Klassen von möglichen Tumorfrühformen und verschiedenen Tumorspätformen (The World Health Organization 1977, *Lam et al 1993, Müller-Höcker 1997, Beinert und Mergenthaler 1997, Mountain 1997)

Entsprechend Tabelle 1 werden verschiedene Befundtypen histologisch unterschieden, die weiter charakterisiert werden können durch die auftretende Häufigkeit bei Risikopatienten, die spontane Remissionsrate und ihren zeitlichen Verlauf. Die Tumorgenese beginnt mit einer genetischen Veränderung, deren Ursache exogen durch kanzerogene Stoffe, Radioaktivität, Viruserkrankungen (Brenzpyrrol, Zigarettenkonsum (Opitz et al 1994), Arsen, Asbest, Chloromethylester, Vinylchlorid, radioaktive Strahlung (insbesondere Alphastrahler, Nickel) oder endogen durch vererbte Genschäden hervorgerufen sein kann (Mason et al 1994, Johnson et al 1996). Diese Schäden sind meist direkt nachweisbar (Kleinzellige Karzinome), viele Tumoren sind aber auch schon in der Anfangsphase polygenetisch verursacht (Nicht kleinzellige Karzinome) (Sekido et al 1978). Die Zellen teilen sich übermäßig (ras, erbB, myc-Genschäden) und verlieren ihre Sterblichkeit (hohe Telomeraseaktivität) (Bültzingslöwen et al 1997). Epithelschichtdicke (Hyperplasie), Zellform und Größe ändern sich dabei (Metaplasie/Dysplasie). Weitere genetische Defekte führen zum Verlust der

Einleitung

Kontaktinhibition, so daß mehrlagige Epithelschichten resultieren und das Gewebe aufgelockert wird (tight junctions) (Dysplasie). Die Versorgung der Zellen wird durch die Diffusion bestimmt (Hoppe et al 1978). Dies führt zu einer Unterversorgung der Zellen mit Sauerstoff und großen Molekülen, so daß die Energiegewinnung des biochemischen Stoffwechsels auf Glycolyse und die Molekülgenese auf kleinen Molekülen basiert. Dies führt zu einem reduktiven Mileau in der Zelle und zu einer Übersäuerung der Umgebung. Histologische Färbungen können dies farblich sichtbar machen (PAP, Fe²⁺, HE-Färbung, erhöhte NADH-Fluoreszenz, verminderte FAD-Fluoreszenz) und stellen somit einen indirekten Tumornachweis dar (Müller et al 1991, Labkowicz 1992, Schneckenburger 1994). Normalerweise führt der Sauerstoffmangel dazu, daß die Zellen in die Apoptose gehen. Eine genetische Schädigung dieses Programms (p53, RDC₁) oder/und auch die Sauerstoffversorgung über das Bronchiallumen könnten dies verhindern. Der Verbrauch an Basisbausteinen ist relativ zum Normalgewebe erhöht, die Aufnahme und Weiterverarbeitung sind erhöht (Glucose, 5-ALA). Daher können diese Moleküle als indirekte Marker dienen. Eine Zelle kann sich erst dann teilen und überlebensfähig bleiben, wenn die Chromosomen verdoppelt sind (G-Phase) und ein Mindestmaß an Zellorganellen vorhanden ist. Trotz der großen Diffusionsstrecke ist die Versorgung mit den kleinen Grundbasen gegeben, d.h. die S-Phase verlängert sich kaum im Vergleich zur komplexen G-Phase und in vielen Tumoren sind polyploide Zellen häufiger. Der Ploidiestatus stellt somit eine wichtige Grundlage für die Diagnostik dieser Zellen dar (ab Dysplasie II), ist aber nur ein indirekter Nachweis (Böcking et al 1992). Die Zellgröße und die Anzahl der Zellorganellen verringert sich. Weiterhin ändern sich die Zelloberflächenmerkmale (Antigene) durch Ausdünnung oder genetische Defekte. Einige dieser Rezeptoren sind wichtig für eine zellregulierende Signaltransduktion (z.B. Kontaktinhibition) und sind immunhistochemisch nachzuweisen (Bültzingslöwen et al 1997). Eine entsprechende Übersicht findet sich in Tabelle 2.

Einleitung

Karzinomtyp	Onkogen-aktivierung	Suppressorgen-inaktivierung	Aneuploidiestatus	Cyto Savant
Carcinoid			ca. <40 %	?
Plattenepithelkarzinom	c-erbB-1 65 - 90% c-erbB-2 30% c-myc 10 - 50% n-myc ras (p21 ras) 40 - 70%	p53 ca.70% Rb 20 - 30%	ca.40 - 90%	96%
Adenokarzinom	c-erbB-1 15 - 40% c-erbB-2 (p185) 30% k-ras 30 - 40%, c-myc 10 - 50% n-myc	p53 ca.30 - 40% Rb 20 - 30%	ca. 40 - 90%	86%
Kleinzelliges Karzinom	c-myc bis 100%, n-myc ras ./.	p53 ca 70 - 80% Rb bis zu 100%	70 - 80%	100%
Großzelliges Karzinom	c-myc bis 100%, n-myc ras ./.	p53 ca 70 - 80% Rb bis zu 100%	70 - 80%	88%

Tab. 2: Molekulargenetik - Ploidiestatus der Lungenkarzinome und seine prognostische Bedeutung

Die Übersäuerung des umliegenden Gewebes führt zu einer Verminderung des Oxyhämoglobins und einer Erhöhung des Desoxyhämoglobins. Außerdem ist das Gefäßwachstum gefördert. Solange der Tumor dabei auf das Epithel beschränkt bleibt ist das Stadium des Carcinoma in situ noch nicht überschritten (Saccomano et al 1974). Erst eine erneute genetische Veränderung führt dazu, daß nun auch die Epithelzellen Signalpeptide aussenden, die zur Infiltration der Blutgefäße in das Gewebe führen. Die Kombination aus unkontrolliertem Wachstum und Blutgefäßversorgung führt zu schnell wachsenden, kaum mehr kurativ zu behandelnden und metastasierenden Tumoren. Eine Unterversorgung mit Sauerstoff ist dann nur noch für das oberflächlich liegende Tumorgewebe gegeben, so daß es hier zu einer Nekrosenbildung kommt (Häußinger et al 1996). Diese Mechanismen sind nicht beschränkt auf die Lunge. Der zeitliche Ablauf der Tumorgenese ist also in zwei Phasen geteilt: Eine langsame Entwicklungsphase polygenetischer Schädigungen und eine schnelle Phase nach Infiltration. Die Summe der Zeiträume pro Entwicklungsschritt beträgt ca. 20 Jahre, so daß es nicht verwundert, daß die Erkrankung Lungentumor gehäuft erst ab einem Alter von 45 Jahren auftritt (Bolliger et al 1998). Nicht geklärt ist bislang, ob alle Schritte notwendig sind und welche Schritte reversibel sind (Thiberville 2001). Trotzdem bilden die starke Exposition gegenüber kanzerogenen Stoffen, die große Oberfläche der Lunge, die hohe

Regenerationsrate und die hohe Stoffwechselaktivität des Flimmerepithels und der Schleimdrüsenzellen einen idealen Ort zur Tumorgenese, was erklären kann warum hier die meisten Tumoren entstehen (Beckett et al 1993).

1.2.4 Klinische Grundlagen

Oberster Grundsatz für die Entwicklung von Geräten und die Erhebung von klinischen Daten sind die Wahrung der Menschenrechte und damit die Wahrung der Unversehrtheit der Patienten (Auswärtiges Amt 1985) und die Aussicht auf einen potentiellen Nutzen für die Patienten (Ethikkommission). Gerade bei der Messung von Daten während der Bronchoskopie, die ohnehin mit einem gewissen potentiellen Risiko behaftet ist, gilt es, das Gefährdungspotential der Patienten so gering wie möglich zu halten. An möglichen Risiken treten auf: Blutungen nach Biopsieentnahme oder Vulneration des Gewebes, Überhitzung oder UV-Bestrahlung des Gewebes (Bundesamt für Strahlenschutz 1990). Verlängerung der Untersuchungszeit und damit der Narkose, bzw. der knappen Zeit in der die Lokalanästhesie wirksam ist. Um diese Risiken zu reduzieren, wurde auf Biopsien des Normalgewebes weitgehend verzichtet (in der Kenntnis, daß Randombiopsate früherer Untersuchungen nur in ca. 3% der Fälle abnorm waren), die Daten wurden weitgehend mit konventionellen Geräten bzw. darauf adaptierten spektroskopischen Methoden im sichtbaren Spektralbereich ermittelt (Pottier et al 1986). Labile Patienten werden nicht untersucht. Endoskopisch zugänglich mit konventionellen Bronchoskopen (Querschnitt > 3 mm) ist nur der proximale Teil des Bronchialsystems bis zu den Subkarinen (6.-7. Verzweigungsebene). Für einen Großteil der malignen Erkrankungen beim Raucher ist dies auch ausreichend. So finden sich hier vor allem kleinzellige Tumoren (SCLC, Rate 30%) aber auch ein Großteil der nichtkleinzelligen Tumoren (NSCLC, Rate 70%). Letztere werden unterteilt in Plattenepithelkarzinome (Rate 45%), in Adenokarzinome (Rate 35%), in großzellige Tumoren (Rate 10%) und sonstige Tumoren (Rate 5%). Peripher finden sich überwiegend Adenokarzinome. Desweiteren finden sich im zentralen Bereich der Lunge Papillomatosen und Entzündungsherde (Tuberkulose) (Weißbuch Lunge 1996). Andere Befunde wie Hyperplasien, Metaplasien, Dysplasien und

Einleitung

das Carcinoma in situ (CIS) gelten als (mögliche) Vorstufen der Tumore (Petersen et al 1999). Tödlich verlaufende Erkrankungen sind allerdings insbesondere die malignen Tumore (SCLC: Mortalitätsrate 80%, PlattenepithelCa Mortalitätsrate 70%, AdenoCa Mortalitätsrate 40%) (siehe Tabelle 1). Bei diesen ist selbst eine Operation nur in 20%-30% der Fälle erfolgreich. Medikamentöse Behandlungen (Chemotherapie) und Bestrahlung (Radiotherapie) sind oft wenig effektiv und belastend und werden, wenn erforderlich, um endoskopische palliative Methoden ergänzt. Eine Erkennung der Erkrankungen in einem frühen Stadium verbessert die Heilungschancen erheblich (Wagner et al 1998). Die primäre Diagnostik der Erkrankung erfolgt bislang aufgrund von Symptomen (Atembeschwerden, Schmerzen, Blut im Sputum), im Bereich der Vorsorge nach Risiken (Rauchen, genetisches Risiko, arbeitsbedingte Risiken, mögliche Metastasierung) (Burns et al 1994). Die Sputumanalyse zur Erkennung von Tumoren ist wenig sensitiv und wenig spezifisch (Bechtel et al 1994) und selbst das hochauflösende, vergleichende (Tumorgröße) CT ist nur für periphere Adenokarzinome geeignet und hier nicht Gegenstand dieser Arbeit. Somit stellt momentan die (semi-) invasive endobronchiale Endoskopie mit histologischer Untersuchung der gewonnenen Proben die bislang einzige praxisgerechte Möglichkeit der Diagnostik zentraler Lungenkarzinome dar (Bolliger et al 1998). Früher stellte die Weißlichtbronchoskopie (WL) die einzige endoskopische Möglichkeit der Tumorkontrastierung dar (STORZ, OLYMPUS, PENTAX). Durch die Beobachtung der schwachen Autofluoreszenz (Herly et al 1943) (XILLIX, STORZ, PENTAX) nach Anregung mit blauem Licht wurde das diagnostische Spektrum ergänzt (Doiron et al 1979, Lam et al 1993, Häußinger et al 2000). Der Einsatz photosensitiver Kontrastmittel (Photofrin, 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), induziertes Protoporphyrin IX (PPIX)) erweitert diese Diagnostik um zusätzliche therapeutische Möglichkeiten, die vor allem für frühe Tumorstadien gute Behandlungsergebnisse ermöglichen (photodynamische Therapie PDT) (Kessel et al 1984, Häußinger et al 2000, Peng et al 1997).

2. Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit Verdacht auf Bronchialkarzinom, sowie Freiwillige ohne entsprechende Verdachtsmomente bronchoskopisch untersucht. Die Bronchoskopie erfolgt bei den Patienten im Rahmen der Indikation, die aufgrund von Symptomen oder aufgrund des in Tab. 3 aufgeführten Risikokonstellation gegeben war.

2.1 Risikogruppen

Der Verdacht auf Bronchialkarzinom kann nach Tabelle 3 durch Einteilung in Risikogruppen weiter unterteilt werden:

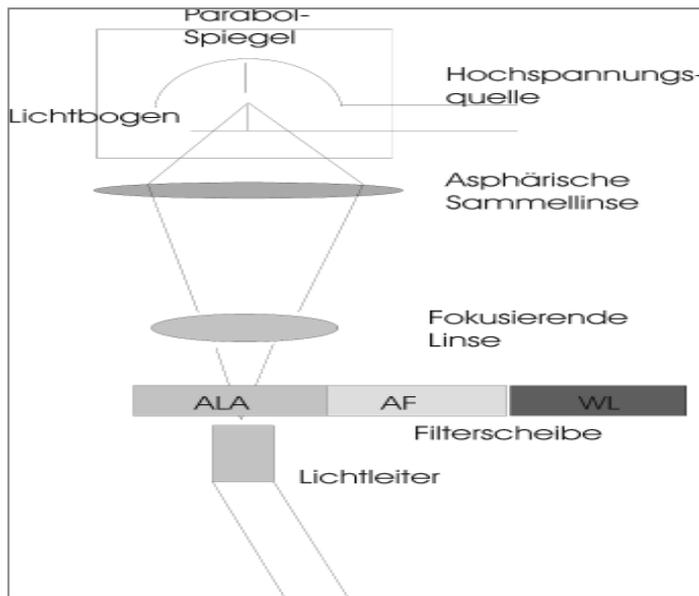
1. Radiologischer oder klinischer Karzinomverdacht.
2. Postoperative Nachsorge (rezidiertes Bronchialkarzinom)
3. Positive zytologische Befunde
4. Frühere positive Befunde von Dysplasie/CIS
5. Bekanntes Bronchialkarzinom (z.B. Staging)
6. Raucher älter als 40 Jahre mit dem Nachweis einer COPD und/oder beruflicher Schadstoffexposition

Tab. 3: Risikogruppen der Patienten mit Verdacht auf Bronchialkarzinom nach internationalen Konventionen (ISALC, Bolliger et al 1998)

2.2 Lichtquelle, Endoskopische Geräte

Es wurde breitbandig mit einer speziellen Xenonlichtquelle der Firma Karl Storz (D-LIGHT/AF) angeregt und mit einer flexiblen Optik (BI 11001) und einer 1-Chip-Kamera detektiert (Endovision Telecam PAL-Kamera). Die Lichtquelle wurde mit verschiedenen Filtern modifiziert (Abbildung 7).

Material und Methoden



- I. ALA (380 - 440 nm)
Blauanteil 440 - 470 nm
- II. AF (380 - 470 nm)
Blauanteil 470 - 480 nm
- III. WL (380 - 700 nm)

Abb. 7: Xenon-Weißlichtquelle zur Erzeugung verschiedener Anregungscharakteristiken: ALA, AF, WL

Die Xenon-Lampe erzeugt entsprechend der Abbildung 8 ein definiertes Spektrum, Filter können verwendet werden, um bestimmte Wellenlängen herauszugreifen.

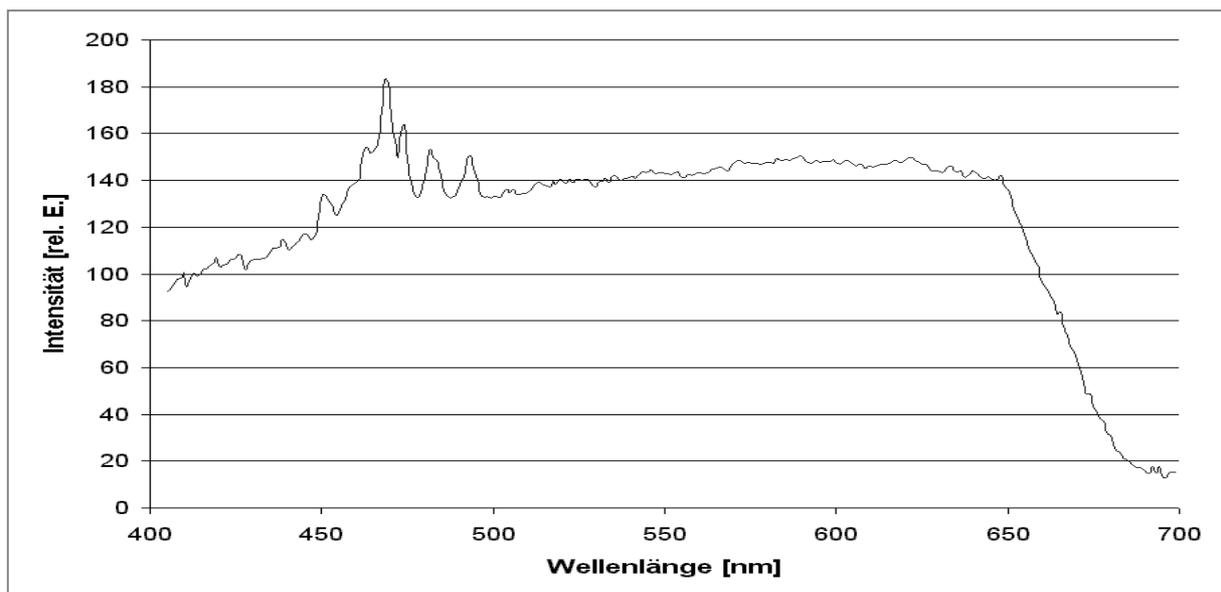


Abb. 8: Spektralcharakteristik der Xenon-Weißlichtquelle im Bereich von 400 - 700 nm (Ein geringer weiterer Anteil befindet sich bei 760 - 800 nm)

Während Filter I (ALA-Filter 380 - 440 nm) integral ca. 50 mW liefert, verdoppelt sich die Lichtintensität beim Filter II (AF-Filter 380 - 470 nm) auf ca. 100 mW, zumal hier die Intensitätsmaxima mit genutzt werden. Der Beobachtungfilter läßt ebenfalls einen geringen Anteil des blauen Remissionslichtes passieren, so daß hier zusätzlich zur reinen

Autofluoreszenz etwa 35% mehr Licht detektiert werden kann. Die entsprechenden Filtercharakteristiken des Systems D-Light/AF (K. Storz) bestehend aus Lichtquelle (Anregung 1=ALA-Mode und Anregung 2=AF-Mode), Beobachtungsfiter im Okular eines Endoskops (BI 11001) und Kamera mit drei Farbkanälen (3-Chip Endovision Telecam K-Storz) sind in Abbildung 9 dargestellt.

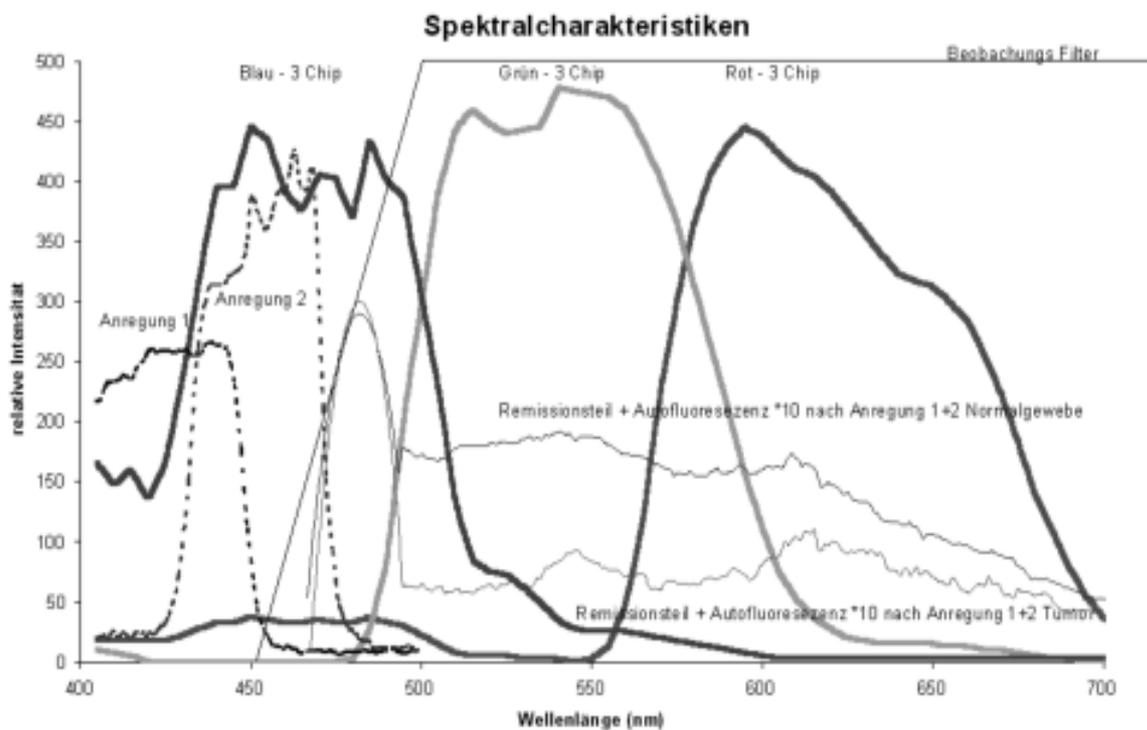


Abb. 9: Filtercharakteristik für die Fluoreszenzdetektion: Das anregende Licht wird durch den Detektionsfilter weitgehend geblockt. Der resultierende detektierbare Wellenlängenbereich von 460 nm - 700 nm wird vom Auge oder der Kamera in die drei Farben Rot, Grün und Blau zerlegt. Die idealen steilen Schnittkanten sind nahezu durch die 3-Chip-Kamera realisiert. Ergänzend ist das im Vergleich zur Anregung wesentlich geringere (ca. 3%) resultierende abstandsnormierte Spektrum von Tumor- und Normalgewebsfluoreszenz dargestellt.

Der visuelle Kontrast entspricht einer 1-Chip-Kamera (K. Storz, Endovision Telecam), die Schnittkanten sind nicht so steil, so daß der offsetbehaftete Farbkontrast visuell und über die 1 Chip-Kamera etwas geringer ist. Angenähert wird blau bei ca. 475 nm, grün bei ca. 540 nm und rot bei ca. 620 nm detektiert. Entsprechend Abbildung 9 ist für das im AF-Modus offensichtlich im grünen Bereich unterschiedliche Tumor- und Normalgewebe eine gute

Material und Methoden

Detektion mit der 3-Chip-Kamera möglich. Gleichzeitig ergeben sich optimale Schnittkanten für den roten und blauen Bereich.

2.3 visuelle Beurteilung

Von N = 528 Patienten wurden 258 Patienten mittels WL und 270 Patienten mittels AF und WL untersucht und wie folgt charakterisiert (Tabelle 4):

1. Normales Erscheinungsbild, nicht verdächtig	= normal
2. Nicht-spezifische Veränderungen	= abnorm
3. Verdacht auf maligne Veränderungen	= supekt
4. Sichtbarer Tumor (z.B. exophytisch)	= manifest

Tab 4: Beurteilungsstufen in der Autofluoreszenzuntersuchung/Weißlichtuntersuchung

Im Rahmen einer Multicenterstudie wurden von insgesamt 528 zugehörigen Befundgruppen 316 vom Lokalpathologen (Dr. A. Morresi-Hauff) und 212 vom Referenzpathologen (Prof. Dr. KM Müller) untersucht. (November 1998-November 2001)

Die Histologie wurde wie folgt eingeteilt (Tabelle 5):

Name		Beschreibung
Normal	no	Epithel, verschieden differenzierte Zellen $d \approx 45 \mu\text{m}$
Entzündung	inf	Schwellung des Gewebes, differenzierte Zellen
Zellhyperplasie	hyr	Vermehrung eines Zelltyps: Basalzellen 3-10 Zellschichten
Gewebshyperplasie	hyp	Zellvermehrung oberste Schicht, mehrere Zelltypen
Narbe	sca	Destruktion des Zellverbandes nach Biopsieentnahme
Metaplasie	met	Zellvermehrung eines Zelltyps, oberste Schicht $d < 65 \mu\text{m}$
Papillomatose	pap	virusbedingte Hyperplasie (Herpes zoster)
leichte Dysplasie	dys I	Atypien im metaplastischen Areal $d \approx 70 \mu\text{m}$
moderate Dysplasie	dys II	Atypien im metaplastischen Areal: Photonendicht $d \approx 70 \mu\text{m}$
schwere Dysplasie	dys III	Atypien im metaplastischen Areal: Photonendicht $d \approx 70 \mu\text{m}$
Carcinoma in situ	cis	verstärkte Zellvermehrung, Basallamina gefaltet: $d \approx 120 \mu\text{m}$
Tumor unbestimmt	tu	Tumorbefund: keine Angabe einer weiteren Differenzierung
Kleinzelliges Karz.	sc	kleine Zellen (aus neurosek. Z.), Tumor mit Blutgefäßversorgung
Plattenepithelkarz.	pla	große Zellen (aus Zilien Z.), Tumor mit Blutgefäßversorgung
Adenokarzinom	ade	große Zellen (aus Drüsen Z.), Tumor mit Blutgefäßversorgung

Tab 5: Beurteilungsstufen in der Untersuchung mit AF, Die Reihenfolge entspricht weitestgehend dem Differenzierungsgrad, Narben sind meist begleitet von Gewebshyperplasien

2.4 Bildverarbeitung

Mit einer abgeglichenen, geprüfte einheitlichen Geräteeinheit, (bestehend aus Lichtquelle (D-Light/AF), Endoskopkamera (Einchipkamera, K. Storz) und Bronchoskop (BI 11001, K Storz)) endoskopisch erfaßte Bilder wurden am SVHS-Ausgang mit einer PCTV-Grabber-Karte (Pinnacle, München) digitalisiert (768*576 Pixel). Von 33 Patienten/78 Befunden in der Endoskopie (D-LIGHT/AF) wurden mit dem Programm Thumbs Plus (Kelly Data GmbH, Martinsried) pixelweise Farbwerte bestimmt. Diese Farbwerte wurden mit einer Eichkurve ($y=x^2$ für die Gammakorrektur) gemäß der Intensität aller drei Farbkanäle Rot, Grün und Blau korrigiert. Histologien der Befunde (Lokalpathologien und Referenzpathologen) wurden im Rahmen einer Multicenterstudie ermittelt und den erhaltenen Farbwerten zugeordnet. Die Biopsiestellen befanden sich hauptsächlich in dem zentralen Bereich der auffälligen und biopsierten Stellen. Für jeden Befund wurde daher in der Mitte, am Befundrand und peripher (Abstand etwa Distanz Befundmitte, Befundrand) ein Datenwert erhoben. Für bestimmte ausgezeichnete Befunde (moderate Dysplasien) wurden zudem von der Gesamtfläche des Befundes und der Umgebung Pixelwerte bestimmt und radial in äquidistanten Relationen zum Rand gemittelt, um eine genauere Darstellung der Ursache des Kontrastes zu ermöglichen. Weiterhin wurde eine online-verfügbare Bildverarbeitung etabliert, die den Befund, wie er von der Videokamera erfaßt wird in einem 512x512-Pixel großen Bereich zentriert auf dem Bildschirm darstellt. In einem 256x256-Pixel umfassenden Bereich konnte gleichzeitig das Ausgangsbild verarbeitet werden (Histogrammkorrektur, Mittelung und Farb- zu Farb-Zuordnung), so daß Farbkontraste verstärkt werden konnten und letztlich Befundgruppen zugeordnet werden konnte (Visual-C-Klassenbibliothek).

Material und Methoden

2.5 Spektroskopie

Im Rahmen einer Phase I-Studie der Firma Medac konnten von 14 Patienten/27 Befunden suffiziente Spektren über einen Strahlteiler (K. Storz 50/50) am Endoskopokular, einer Linse (Spindler und Hoyer, 10mm), einer Lichtleitfaser (400 μm konventionelle Glasfaser) und einem kalibrierten Spektrometer (Wellenlängenbereich 400 - 800 nm, Auflösung 2 nm, optical Multichannelspektrometer OMA, SI Penzberg) aufgenommen werden. Durch das abbildende System wurde das remittierte Licht entsprechend einem Areal in der Größe von 10 Grad des Endoskopbildes (gesamt 90 Grad) aufgenommen. Der Abstand des Endoskops vom Gewebe betrug ca. 0.5 cm. Sämtliche Fluoreszenzspektren wurden mit einem einheitlich kalibrierten Spektrometer aufgenommen. Zur Korrektur des schwankenden Abstands bei der Messung wurde auf die Intensität eines Remissionspeaks bei 830 nm normiert. Spektren wurden in den drei verschiedenen Modi (Weißlicht, ALA-Anregung, AF-Anregung) aufgenommen. Für die automatisierte Auswertung und Darstellung auf dem Monitor wurde ferner ein Spektrometer (Ocean Optics S2000, Fasereingang 400 μm , Auflösung 7 nm, Wellenlängenbereich 350 nm-780 nm) mit einem Visual-Basic-Programm in Excel eingebunden, so daß hier flexibel über eine einfache Tabellenkalkulation automatisierte Auswertungen (Multi-Regressions-Analysen) möglich waren.

2.6 Ergänzende Untersuchungen

Histologische Biopsate (n = 10) wurden mit flüssigem Stickstoff in Tissue-Tec eingefroren, mit einem Kryotom (Leica) wurden 10 μm Schnitte angefertigt. Bilder wurden nach Anregung mit einer Quecksilberlampe (405 nm) mit einem Leica-Fluoreszenzmikroskop und einer 3-Chip-Kamera (Storz Endovision) aufgenommen. Punktuell wurden Spektren mit einem kalibrierten Spektrometer (Wellenlängenbereich 400 - 800 nm, Auflösung 2 nm, optical Multichannelspektrometer OMA, SI Penzberg) im Schnitt untersucht (Zeng et al SPIE 2324). Elastin, NADH, Flavin, Lipoprotein, Hämoglobin und PPIX (Sigma/Fluka) wurden ebenfalls mit einem Fluoreszenzspektrometer vermessen (Perkin Elmer).

2.7 Auswertung

Klinische Daten wurden gemäß den GCP-Richtlinien erhoben und bezüglich Sensitivität, Spezifität und Prävalenz ausgewertet. Eine Prüfung auf Signifikanz erfolgte mit dem Student-t-Test. Farbwerte und Spektralwerte wurden aus den Bildern und Spektren gewonnen. Diese Daten wurden korrigiert und mit folgenden Methoden weiter analysiert:

(1) Modellbasierte Komponententrennung

mittels regressiver gestaffelter multipler Regression (aufbauend auf Durkin et al 1996). Hierbei werden die kalibrierten Spektren $I(\lambda)$ zunächst in Einzelkomponenten (Fluoreszenzkomponenten $c_i F_i(\lambda)$) getrennt und ein Relativspektrum (%-Änderungen) zum Ausgangsspektrum ermittelt $R(\lambda)$. Dieses wird auf weitere Komponenten untersucht (multiple Regression mit absorptiven Komponenten und Offsetwert in der logarithmischen Auftragung). Die potenzierte Summe der Komponentenanteile werden invertiert auf das Ausgangsspektrum angewandt (Bereinigung der Absorption: Division durch die einzelnen Absorptionskomponenten) und dieses Spektrum $S(\lambda)$ in einem iterativen Prozeß solange adaptiert, bis die Änderung ε zwischen dem Ausgangsspektrum und dem aus den Komponenten berechneten Spektrum sehr gering wird. Bei den vorliegenden Spektren und Komponenten konnte für alle Einzelkomponenten stets ein Fehler unterhalb von 5% und eine Konvergenz erzielt werden. Letztlich wird mit Hilfe von Fluoreszenzkomponenten $F_i(\lambda)$ und den Absorptionskomponenten μ_a , sowie der Streuungsparameter μ_s in folgende Gleichung beschrieben:

$$I(\lambda) = \sum [F_i(\lambda) * c_i] * e^{a * \mu_{a_ox}(\lambda) + b * \mu_{a_desox}(\lambda) + c * \mu_s(\lambda) + d * \mu_{a_fad}(\lambda) + e * \mu_{a_ppix}(\lambda)}$$

Schritt 1: Multiregression: $I(\lambda): \sum [F_i(\lambda) * c_i]$

Schritt 2: $R(\lambda) = \log[I(\lambda)] / (\sum [F_i(\lambda) * c_i] + \delta)$; δ : klein, positiv

Schritt 3: Multiregression: $R(\lambda): a * \mu_{a_ox}(\lambda) + b * \mu_{a_desox}(\lambda) + c * \mu_s(\lambda) + d * \mu_{a_fad}(\lambda) + e * \mu_{a_ppix}(\lambda)$

Schritt 4: $S(\lambda) = I(\lambda) / e^{a * \mu_{a_ox}(\lambda) + b * \mu_{a_desox}(\lambda) + c * \mu_s(\lambda) + d * \mu_{a_fad}(\lambda) + e * \mu_{a_ppix}(\lambda)}$

Schritt 5: Multiregression: $S(\lambda): \sum [F_i(\lambda) * c_i]$

Iterativ Schritt 2-5 wiederholen bis relativer Fehler über alle λ : $\varepsilon = \sum [I(\lambda) - S(\lambda)] / \sum [I(\lambda)]$ entweder $<5\%$ ist oder nicht mehr wesentlich kleiner wird.

Material und Methoden

Dies entspricht folgendem vereinfachten Modell:

Verschiedene Konzentrationen c der Fluorophoren und verschiedene relative Dichteparameter a, b, c, d, e bei den Absorptionen/Streuung führen multiplikativ zu einer Änderung der Intensität:

wellenlängenabh. Absorptions/Streuungsschwankungen:

Schicht 1	Schicht 2	Schicht 3	Schicht 4	usw.	
Fluoreszenzen $F_i(\lambda)$	Streuung c	$\mu_s(\lambda)$	$a\mu_{a_ox}(\lambda)$	$b\mu_{a_desox}(\lambda)$

Im vereinfachten Modell werden fluoreszierende Anteile, wie sie nach Anregung entstehen, nachträglich modifiziert über wellenlängenabhängige absorptiv/streuende Wechselwirkungen (multiplikativ). Die Zahl der Photonen wird demnach in mehreren Kaskaden reduziert (Entsprechend mehreren Filterschichten, wobei diese aber nicht einer bestimmten räumlichen Anordnung entsprechen müssen, sondern grundsätzliche Wechselwirkungsmöglichkeiten innerhalb des betrachteten Volumens repräsentieren). Der Streuungsanteil c dominiert, was gleichsam als Offsetwert wirkt, so daß die Parameter a, b, d und e positiv oder negativ sein können. Der iterative Ansatz hat den Vorteil, daß die Absorption und die Fluoreszenz getrennt angepaßt werden können, womit keine Mischung der Komponenten und damit ein weit komplexerer nichtlinearer Ansatz notwendig ist. Die Konvergenz des Verfahrens muß dann für jedes Spektrum getrennt geprüft werden. Innerhalb einer einheitlichen Serie von Spektren konvergierte das Verfahren jedoch ausnahmslos. Allerdings muß gerade bei den breitbandigeren Komponenten der Absorption darauf geachtet werden, daß die Zahl der verwendeten Komponenten gering bleibt (≤ 5), zumal die Konvergenz des multiregressiven Ansatzes von den Flankensteigungen in den Komponentenspektren (Mischungen daraus und auch den Gesamtspektren) abhängt. Letztlich erfolgt eine Trennung in Absorptions-, Streuungs- und Fluoreszenzkomponenten.

(2) Kohonen Farbdiskriminierung (modifiziert nach Decker 1994)

Hierbei werden für jeden Befund und sein umliegendes Normalgewebe jeweils die korrigierten Farbratiowerte Rot/Blau, Rot/Grün und Blau/Grün bestimmt und ein neuronales Netz mit 256 Neuronen damit trainiert. Später lassen sich bestimmte Neuronengruppen bestimmten histologischen Gruppen zuordnen. Die resultierenden Farbratiowerte der Neurone können abgefragt werden, so daß letztlich für alle auftretenden Farben eine histologische Einteilung möglich wird. Diese Zuordnung kann in den Farb- zu Farb-Zuordnungstabellen der Online-Bildverarbeitung verwendet werden, um eine genauere Befunddarstellung zu ermöglichen.

Für die Montecarloberechnungen wurden folgende Modelle verwendet:

Weißlicht: Zweischichtsystem (modifiziert nach Anderson Cancer Center 1992)

Autofluoreszenz: Mehrschichtsystem (n=3000) für 20 Wellenlängen im Bereich von 400 - 800 nm (modifiziert nach Anderson Cancer Center 1992).

Hierbei wurden insbesondere die Fluoreszenzdetektion ergänzt (Welch et al 1997) und eine direkte gleichzeitige Beobachtung der Photonen 20 verschiedener Wellenlängen während der Simulation ermöglicht (Visual-C-Programm). In Abbildung 10a) ist für eine typische Parameterbesetzung des Normalgewebes zu dem Zeitpunkt, an dem alle anregenden Photonen (n=100.000) das Gewebe verlassen haben dargestellt, wie sich die Photonen verteilen. Abgebrochen wurde die Simulation, nachdem 99,9% der anregenden Photonen das Gewebe verlassen hatten oder absorbiert wurden (Abbildung 10).

Material und Methoden

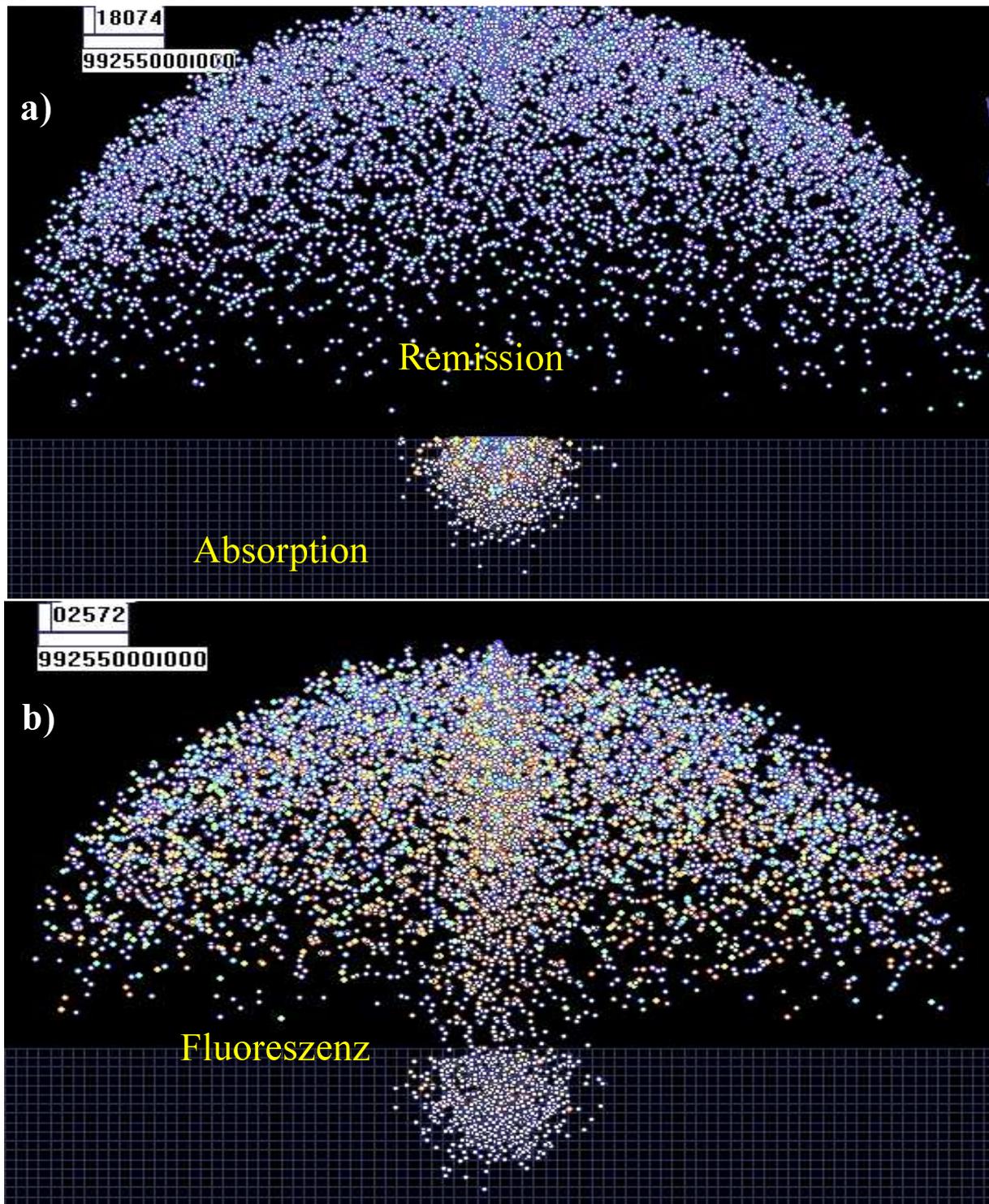


Abb. 10: a) Absorption und Remission im Gewebe: Photonen unterschiedlicher Farbe: alle anregenden Photonen sind bereits remittiert (n=18074); b) Fluoreszenz im Gewebe zeitverzögert und spektral breiter (n=2572 Photonen). Gitterlänge 25 μ m.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse lassen sich einteilen in Untersuchungen mit Weißlicht und Autofluoreszenz (spektroskopisch, Bildverarbeitung, visuelle Beurteilung). Das Hauptaugenmerk wurde dabei gerichtet auf mögliche objektivierende Verfahren zur Tumordiskriminierung, um eine wissenschaftliche Erklärung für die visuell detektierten Phänomene zu geben.

3.1 Untersuchungen mit Weißlicht

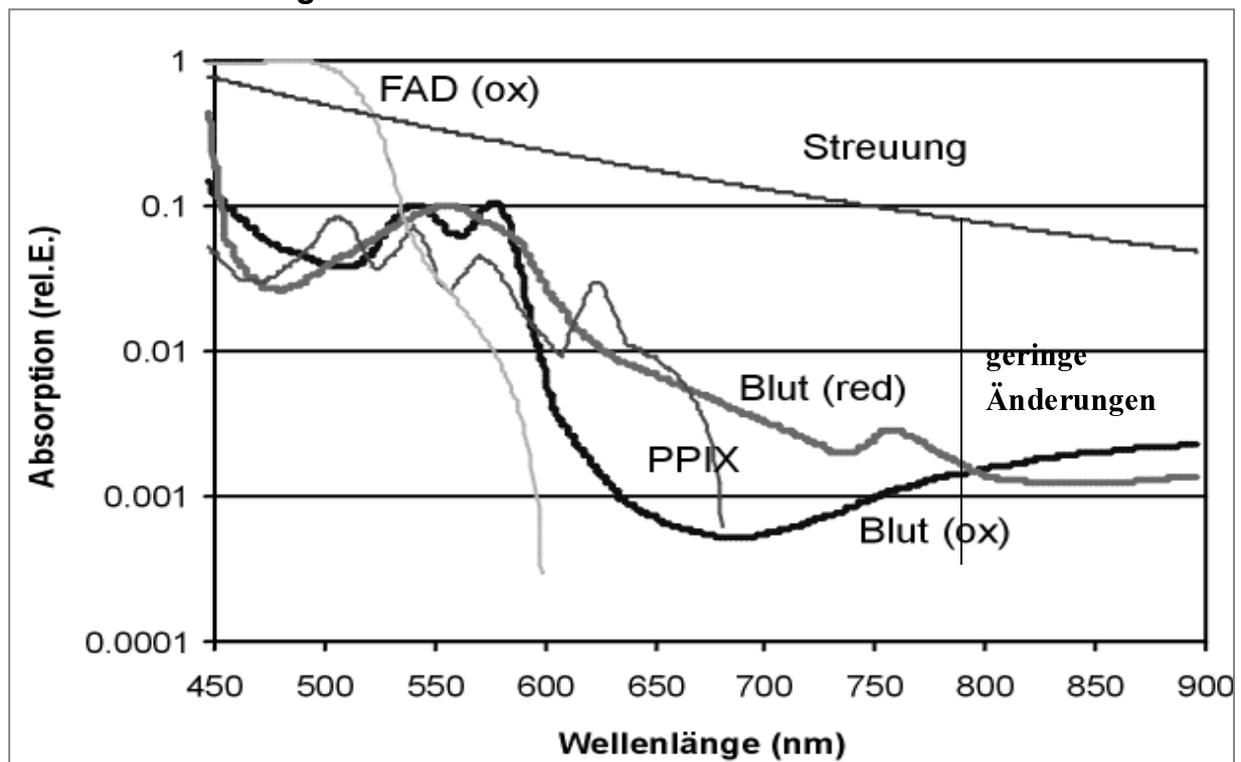


Abb. 11: Absorptionsspektren verschiedener Substanzen und diffuses Streuungsspektrum eines punktuellen Streukörpers ($1/\lambda^4$) als Basisbestandteile des Remissionsspektrums nach Weißlichtanregung. Geringe Änderungen ab 800 nm.

Im wesentlichen ist das Weißlichtspektrum ein Remissionsspektrum des eingestrahlt Lichtes und daher zusammengesetzt aus Streuungsanteilen, Reflexionsanteilen und absorptiven Anteilen (gemäß Abbildung 11). Im Wellenlängenbereich von 450-900 nm finden sich für die meisten Gewebstypen eine Streuungsabhängigkeit nach Tyndall ($1/\lambda^4$) und die Absorptionsspektren des oxygenierten und reduzierten Blutes, des Protoporphyrin IX und des oxidierten

Ergebnisse

Flavins (letzteres bis ca. 600 nm). Die geringsten Schwankungen aufgrund absorptiven Komponenten finden sich ab 800 nm.

Als lineare Approximation insgesamt recht komplexer Prozesse (siehe Material und Methoden, Einleitung Abbildung 6) gilt nachdem die Spektren mit der Charakteristik der Anregungslichtquelle $A(\lambda)$ normiert wurden in etwa unter Berücksichtigung der Reflexanteile r :

$$\text{Gleichung 1: } I(\lambda) = r + (1-r) \cdot e^{a \cdot \mu_a_{\text{ox}}(\lambda) + b \cdot \mu_a_{\text{desox}}(\lambda) + c \cdot \mu_s(\lambda) + d \cdot \mu_a_{\text{fad}}(\lambda) + e \cdot \mu_a_{\text{ppix}}(\lambda)}$$

Durch Anwendung dieser Gleichung konnten die anregungsnormierten Spektren durch lineare Regression in einzelne Komponenten zerlegt werden. Der Fehler der Zerlegung in Einzelkomponenten lag dabei für alle erhobenen Spektren etwas unterhalb von 5%. Eine Erweiterung dieser Gleichungen um nichtlineare Terme existiert bereits und minimiert die Fehler nur auf ca. 2%. Die Fehlerdifferenz beschreibt dann in etwa wellenlängenabhängige Effekte, die durch die Miestreuung kleiner Kugeln beschrieben werden kann (Boyer et al 1995). Der Vorteil der ersten Approximation besteht aber darin, daß sie gemäß den Angaben in den Methoden auch um zusätzliche Fluoreszenzkomponenten erweitert werden kann. Somit sind die Anteile der Fluoreszenzkomponenten und der Absorptions/Streuungskomponenten gleichzeitig verfügbar. Hier werden nur die Absorptionskomponenten dargestellt, bei denen eine signifikante Trennung von verdächtigen Befunden (\geq Reservezellhyperplasie) und unverdächtigen Befunden (Normal,Entzündung) möglich war. Insbesondere die reduktive Blutabsorption (= BA(red) + Offset) und die oxidative Blutabsorption (= BA(ox) + Offset) sind indirekt als interessante Parameter der Multiregressionsanalyse (ohne den Offsetwert) zu entnehmen.

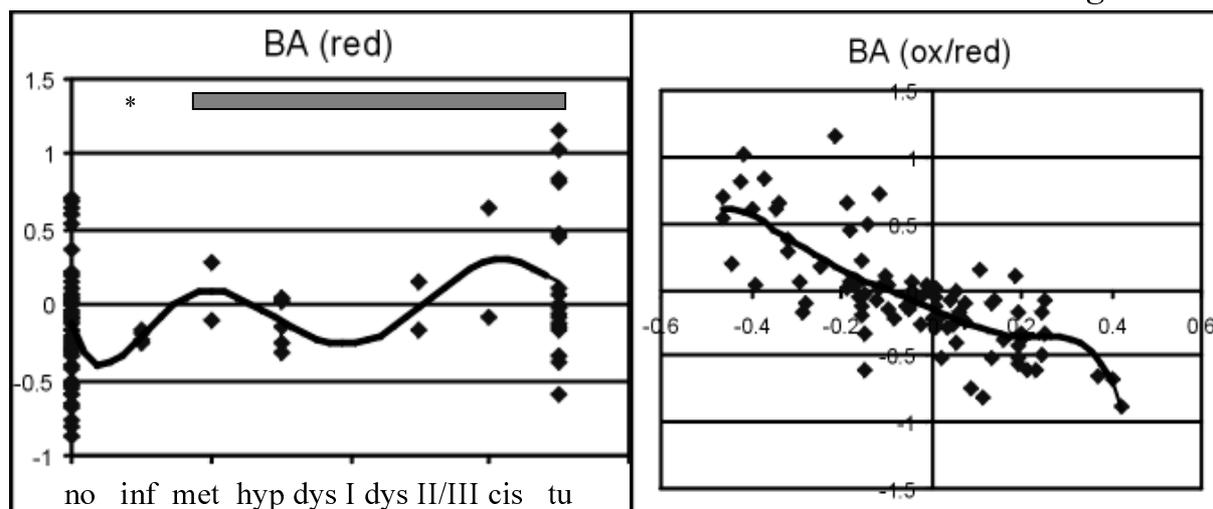


Abb. 12: a) relativer Anteil der Absorption des reduzierten Blutes am Fluoreszenzspektrum für verschiedene Befunde, signifikanter Unterschied Normal/Entzündung vs. Metaplasie/Hyperplasie/leichte Dysplasie/moderate Dysplasie/schwere Dysplasie/CIS/Tumor und eine Trendline durch die Mittelwerte der einzelnen Kategorien b) Korrelation der Anteile des oxygenierten Blutes mit dem des reduzierten Blutes (jeweils relative Anteile) für alle Befundtypen. Die polynomische Trendlinie 6. Grades entspricht in etwa $BA(ox) \sim -BA(red)$

Für die Korrelation des relativen Anteils der reduktiven Blutabsorption $BA(red)$ mit dem histologischen Befund ergibt sich eine Zunahme mit der Schwere der Befunde (Abbildung. 12a). Trotz der interindividuellen Unterschiede insbesondere des Normalgewebes verschiedener Patienten findet sich ein signifikanter Unterschied der verdächtigen Befunde zum Normalgewebe und den Entzündungen. Für die anderen absorptiven Anteile wurden keine erwähnenswerten signifikanten Unterschiede zwischen den Befundgruppen gefunden. Auch insgesamt ist die Güte der Zerlegung in einzelne Bestandteile anhand des weitgehend linearen Zusammenhangs ersichtlich (siehe polynomische Trendlinie 6. Grades in Abb. 12b), aus dem folgt:

$$\text{Gleichung 2: } BA(ox) + \mu * BA(red) = \text{const} ; \mu > 1$$

Diese Gleichung und auch die Abbildungen 12b) resultiert letztlich daher, daß die Summe der Absorptionsanteile und damit die Gesamtblutmenge in etwa konstant bleiben. Eine Regressionsrechnung ist allerdings nicht sinnvoll, da unterschiedliche Befundtypen durchaus eine

Ergebnisse

unterschiedliche Blutmenge (= im wesentlichen der Offsetwert) und andere Absorptionen aufweisen, was sich aber nicht auf die Linearität der Gesamtkurve auswirkt. Festzustellen ist allerdings, daß der reduktive Anteil stärker betont ($\mu > 1$) ist. Desweiteren ist die Remission und hierbei insbesondere der Reflexanteil stark winkelabhängig. Auch hierzu lassen sich Simulationen durchführen bei senkrechtem Einfall des Lichtes. Die Intensität des Glanzlichtes (Anregung und Emission senkrecht zur Oberfläche) ist hauptsächlich bestimmt durch die Fresnel-Gesetze, während die Intensität der Remission unter anderen Winkeln bestimmt ist durch das Lambert-Gesetz (Cosinusverteilung) und die obige Remissionsgleichung.

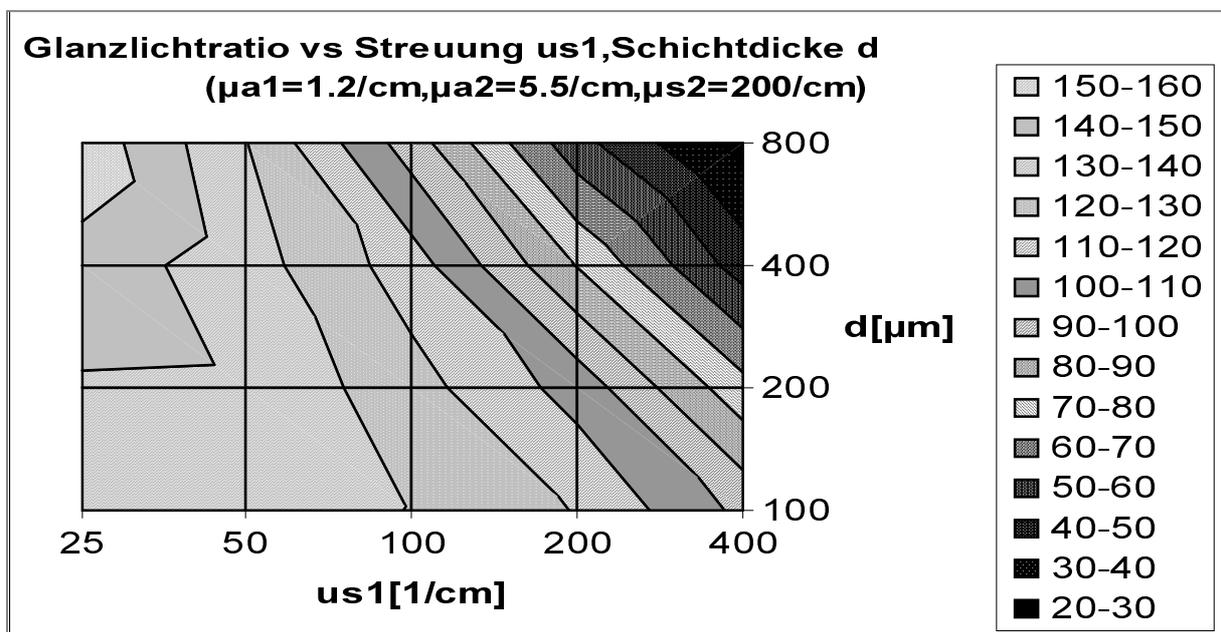


Abb. 13: Abhängigkeit der relativen Intensität des Glanzlichtes [$G=I(0^\circ)/I(45^\circ)$] von der Schichtdicke und Streuung der oberen Schicht bei fixierten Werten der Absorption und der Streuung der unteren Schicht entsprechend dem Lungengewebe bei einer Bestrahlung mit ca. 580 nm.

Für das Ratio G des Reflexes bei 0 Grad und der Remission bei 45 Grad (hier liegt der nicht offsetbehaftete Reflexanteil gemäß Abbildung 7 bereits unter 1%, für andere Winkel wäre somit eine entsprechende Korrektur notwendig) gilt für Schichten $>50\mu\text{m}$ entsprechend Abbildung 13 in guter Näherung:

Gleichung 3: $G \sim 1/(\mu_{s1} * d)$

Ergebnisse

Für lungentypische Werte (nach Tabelle 6) der verschiedenen optischen Parameter folgt für verschiedene Schichtdicken im blauen Spektrum (450 nm) des Lichts eine relativ stärkere Abnahme der Intensität des Glanzlichtes $G=I(0^\circ)/I(45^\circ)$ über dem histologisch gesicherten verdächtigen Befund, als es beim histologisch gesicherten unverdächtigen Befund der Fall ist. Wie nachfolgend dargestellt sind die Werte aber auch noch stark abhängig vom Blutgehalt des Gewebes (siehe Abbildung 14).

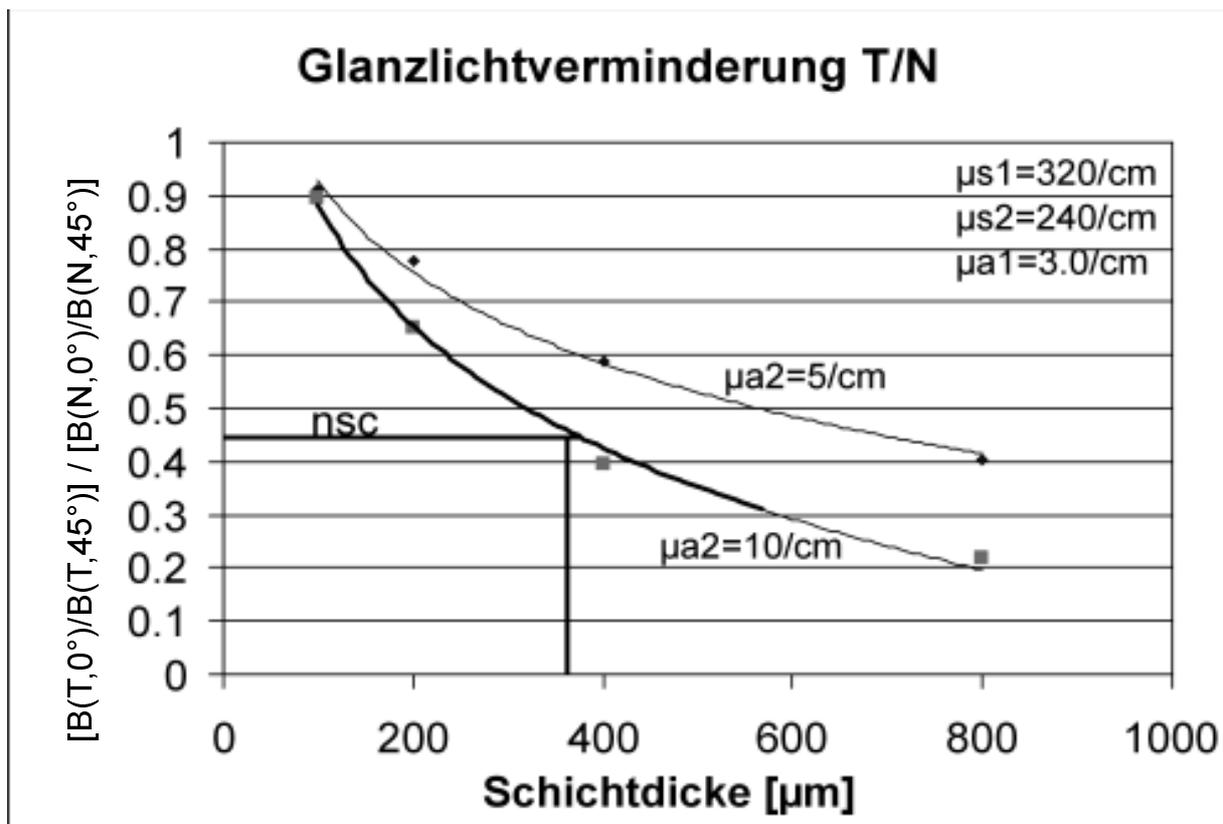


Abb. 14: Abhängigkeit der relativen Intensität des blauen Glanzlichtes (B) als Tumor- zu Normalratio (T/N) bei ca. 450 nm $[I(0^\circ)/I(45^\circ)]$ von der Schichtdicke für typische Werte des Lungengewebes (siehe Tabelle 6) normiert auf den Wert erhalten bei einer Schichtdicke von 50 μm . Änderung des etwa hyperbolischen Kurvenverlaufs bei unterschiedlichen Absorptionswerten in Schicht 2. Bestimmung der Schichtdicke am Beispiel des kleinzelligen Karzinoms in Abb. 49d vermutlich aufgrund der relativ zum Normalgewebe erhöhten Streuung ca. 1.5 fach zu hoch.

Ergebnisse

Am Bildbeispiel 49d) konnte durch Messung der gammakorrigierten, offsetnormierten Blauwerte des Pixels im Glanzpunkt und seiner entfernten Umgebung jeweils von Tumor und Normalgewebe der Wert $V = 0.435$ bestimmt werden. Das kleinzellige Karzinom in Abbildung 49d) hätte somit für $\mu_{a2} = 10/\text{cm}$ eine Schichtdicke von ca. $370 \mu\text{m}$. Eine erhöhte Blutabsorption konnte entsprechend dem unauffälligen Weißlichtbild (Abbildung 49 a) nicht nachgewiesen werden. Die Dicke des Tumors wurde im mikroskopischen Schnitt nachgemessen und lag nur bei $240 \mu\text{m}$. Vermutlich bewirkte also eine erhöhte Streuung der obersten Schicht eine Veränderung des Glanzlichtes. Näherungsweise kann dieser Sachverhalt mit Gleichung 3 bestätigt werden. Eine weitere Berücksichtigung der Blutabsorption findet nicht statt zumal die Schichtdicke und Streuung in dieser Arbeit im Vordergrund standen.

Für zwei verschiedene Gewebe mit den Epithelschichtdicken d_1 und d_2 gilt nach Gleichung 3:

$$V = G(d_2)/G(d_1) = (\mu_{s1} * d_1)/(\mu_{s2} * d_2)$$

Für die Werte des verdächtigen Befundes $\mu_{s,d}$ zur Referenz "Normalgewebe" $c_1 = d_1 * \mu_{s1}$ gilt also etwa:

$$\text{Gleichung 4: } V = c_1/(\mu_s * d)$$

V ist damit, sollte die Blutabsorption keine weitere Rolle spielen im Bereich kleiner Änderungen der angegebenen Parameter (siehe Abbildung 14), umgekehrt proportional zu Schichtdickenunterschieden d und Streuungsunterschieden μ_s . Eine weitere Bestätigung dieses Sachverhaltes ist möglich, wenn z.B. über OCT eine einfache Messung der relevanten Epithelschichtdicken möglich ist. Änderungen der absorptiven Eigenschaften sind auch makroskopisch (spektral, Verfärbung) zugänglich. Der Vorteil der Methode besteht insbesondere darin, daß sie unabhängig vom Abstand (der eingestrahlten Intensität) eine Berechnung (relativ zum Normalgewebe) der in der Arbeit wichtigen Streuungsparameter ermöglicht. Für das Befundbeispiel (Verrechnet in Abbildung 14) wäre der Streuungsparameter somit $1.5 * 320/\text{cm} = 480/\text{cm}$. Das Glanzlichtverhältnis vermindert sich mit der Schichtdicke, der Streuung und der Blu-

absorption und ist somit eine Maßzahl, die empfindlich auf Änderungen (verdächtige Befunde) reagiert.

3.2 Spektroskopische Untersuchungen (nach Applikation von 5-ALA)

Im Rahmen einer Phase-I-Studie zur Untersuchung der Pharmakokinetik der PPIX-Fluoreszenz von Tumoren nach 5-ALA-Applikation wurde von Tumorbefunden und Normalgewebefunden und weiteren histologischen Befunden nach Anregung entsprechend dem ALA-Mode der Lichtquelle Spektren (verschiedene Untersuchungszeitpunkte der Patienten) über einen Beamsplitter am Endoskopokular aufgezeichnet (Rick et al 1998, Sroka et al 1996). Diese Spektren wurden normiert auf einen Remissionspeak bei 830 nm mit den günstigen abstandsnormierenden Eigenschaften nach Abbildung 11. Für Spektren in einem Untersuchungszeitbereich von 90 min bis 300 min ergibt sich für das Normalgewebe eine erhöhte Intensität im blauen und grünen Spektralbereich und eine verminderte Intensität im roten Spektralbereich. Die Schwankungen sind im blau-grünen Spektralbereich sehr hoch und gering im roten Spektralbereich. Dies gilt in etwa gleichermaßen für das Tumor- und Normalgewebe (Abbildung 15).

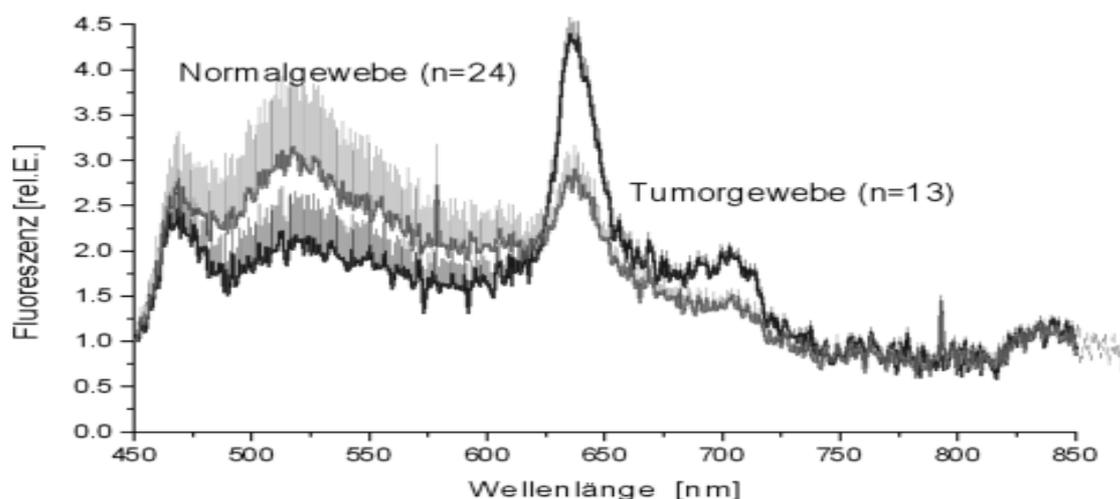


Abb. 15: Spektren 90-300 min nach Inhalation von 200 mg 5-ALA von Normalgewebe und Tumorgewebe normiert auf einen vom Redoxstatus, der Streuung und absorbierenden Molekülen nahezu unabhängigen Remissionspeak bei 830 nm. Als Abweichungen nach oben (und unten) ist der Fehler des Mittelwertes angegeben.

Ergebnisse

Es stellte sich die Frage, was die Schwankungen verursacht. Daher wurden die spektralen Anteile in einem ersten Schritt mittels multipler linearer Regression zerlegt in mögliche Fluoreszenzbestandteile. Die normierte integrierte Relation von realen und idealisierten Bestandteilen war aber meist noch größer als 5%. Daher wurden die prozentualen Unterschiede in einem zweiten Schritt einer weiteren multiplen linearen Regression mit den absorptiven und streuenden Komponenten nach Abbildung 11 unterzogen (gemäß Material und Methoden) und nun ein idealisiertes Spektrum aus den Anteilen der Fluoreszenzspektren und den Anteilen der absorptiv/streuenden Komponenten berechnet (Durkin et al 1996, Schomaker et al 1992). Die Schritte wurden solange iterativ wiederholt, bis der Unterschied zu Ausgangsspektrum unter 5% lag. Auch der Fehler der Einzelparameter lag dabei unter 5%. Dieses Verfahren konvergierte für alle verwendeten Spektren so gut, daß komplexere nichtlineare Prozesse nicht mehr in Betracht gezogen wurden (Beispiel für eine Zerlegung in einzelne Komponenten siehe Abbildung 16). Eine weitere Verbesserung der Ergebnisse (insbesondere des nichtlinearen Einflusses der Streuung und der Anregung) durch Berücksichtigung von weiteren nichtlinearen Anteilen ist möglich, bedarf aber einer genauen Kenntnis aller beteiligten Komponenten (Avriller et al 1997, Wagnieres et al 1998) und einer hochauflösenden spektralen Messung. Gemäß der Beschreibung im Abschnitt Material und Methoden soll hier noch einmal die verwendete Approximation dargestellt werden:

$$\text{Gleichung 5: } I(\lambda) = \sum [F_i(\lambda) * c_i] * e^{a * \mu_{a_ox}(\lambda) + b * \mu_{a_desox}(\lambda) + c * \mu_s(\lambda) + d * \mu_{a_fad}(\lambda) + e * \mu_{a_ppix}(\lambda)}$$

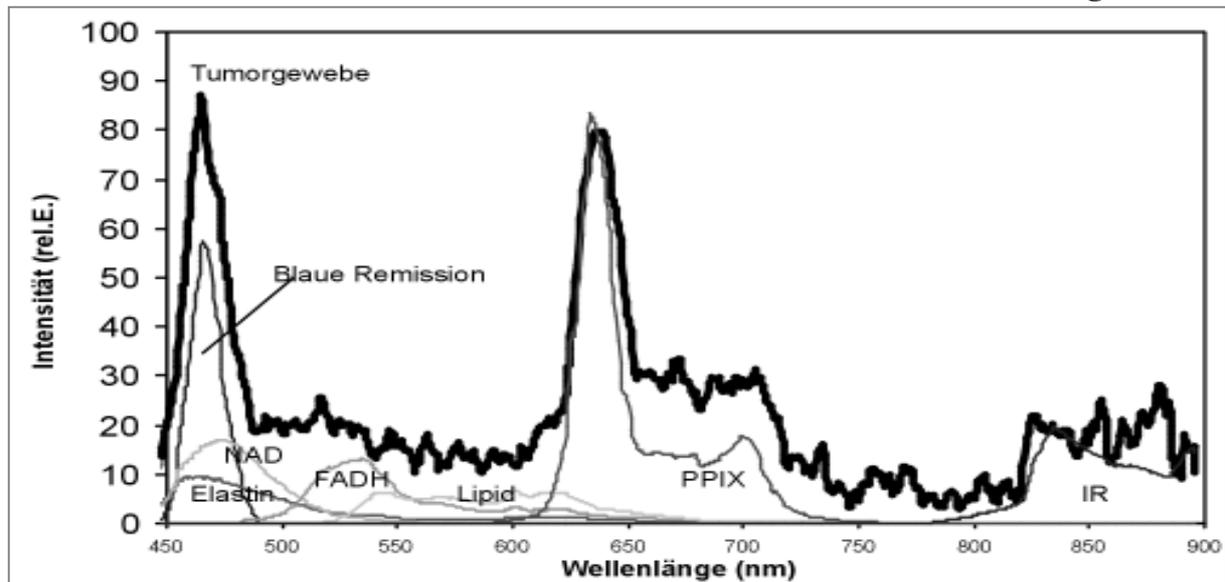


Abb. 16: Spektrale Anteile verschiedener mit dem Fluoreszenzspektrometer gemessenen Fluorophoren (moduliert durch absorptive Komponenten) sowie (abgedämpften) Remissionsanteile im blauen und infraroten Spektralbereich als Anteile des Gesamtspektrums eines Tumorbefundes

Die erhaltenen Anteile entsprechen in etwa den Substanzkonzentrationen der Fluorophore und den relativen Anteilen der absorptiven Komponenten in den Volumina, die durch die mittlere Weglänge des Anregungslichtes erreicht werden können (Abbildung 16). Für oberflächennahe Fluorophoren (PPIX) bleiben diese in etwa gleich (Goutermann et al 1961), während für tiefer liegende Fluorophoren der Wert der Fluoreszenz mit zunehmender Schichtdicke der oberen Schicht auch dann abnimmt, wenn sich an den Fluorophorengesamt nichts ändert. Anteile und Ratiobildungen zwischen Ihnen lassen sich gegen die Histologie auftragen und gegeneinander korrelieren. Interessante Werte für die Unterscheidung von Befunden ergaben sich vor allem für das Ratio zwischen PPIX-Konzentration und der infraroten Remission (Abbildung 17a), sowie zwischen den relativen FAD-Konzentrationen und der blauen Remission (Abbildung 17b). Ersteres führt zu einer höchst signifikanten Unterscheidung von verdächtigen Befunden (Metaplasie, Hyperplasie, leichte Dysplasie, moderate Dysplasie, schwere Dysplasie, CIS, Tumor) und unverdächtigen Befunden (Normal, Entzündung), während letzteres nur zu einer hoch signifikanten Unterscheidung führt. Diese Methode der spektralen Zerlegung liefert kein einfach zu interpretierendes endoskopisches Bild und bedarf einer weiteren Überprüfung

Ergebnisse

(Ramanujam et al 1996), hat aber im Vergleich zu einfacheren multiregressiven Verfahren der spektralen Zerlegung der Fluoreszenz den Vorteil einer höheren Genauigkeit (Schomaker et al 1992) zumal hier absorptive Bestandteile mit eine Rolle spielen.

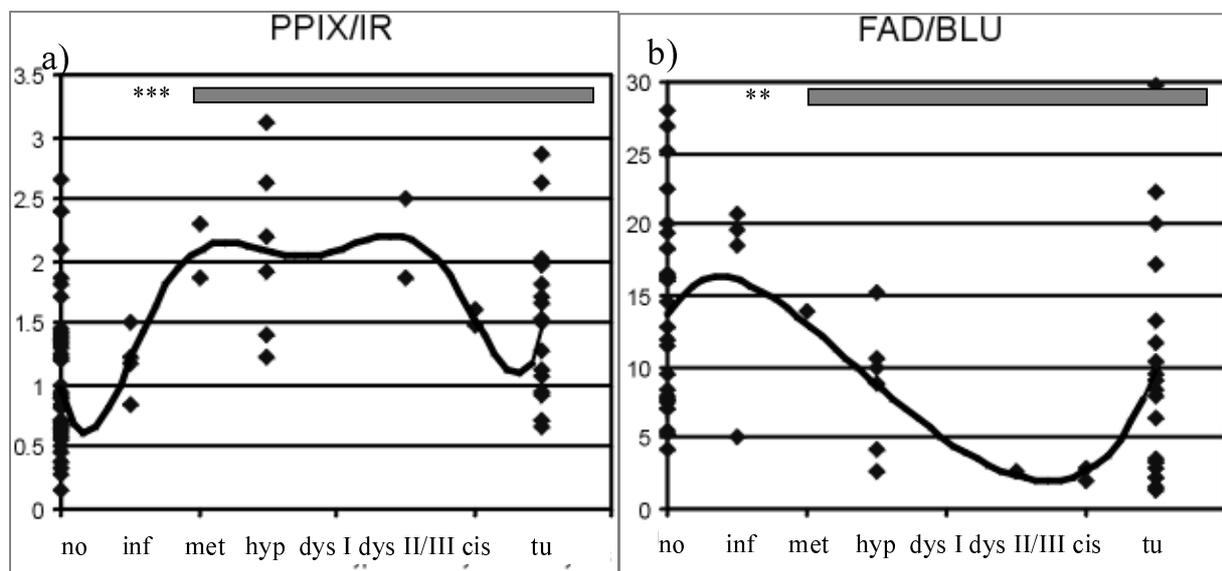


Abb. 17: a) Relativer Anteil von PPIX normiert auf die ungefähr mit gleichen absorptiven und streuenden Eigenschaften behaftete infrarote Remission; Erhöhung von Dysplasien/CIS beträgt im Vergleich zum Normalgewebe in etwa 2,5:1. b) Relativer Anteil des FAD normiert auf die ungefähr mit gleichen absorptiven Eigenschaften behaftete blaue Remission; jeweils Trendlinie durch die Mittelwert; Absenkung von Dysplasien/CIS beträgt im Vergleich zum Normalgewebe in etwa 1:3.

Es gibt keine Korrelation zwischen der Protoporphyrinanreicherung und der Autofluoreszenzminderung im spektralen Bereich der Flavine (siehe Abbildung 18a). Es gibt eine schwache, negative Korrelation zwischen der Autofluoreszenzminderung und der reduktiven Blutabsorption (siehe Abbildung 18b) (Weißlichtkontrast). Die relative Anfärbung [PPIX] für Befunde (>Metaplasie) ist 2,5:1. Die Relative Absenkung [FAD/BLU] für Befunde (Dysplasien/CIS) beträgt 1:3 im Vergleich zum Normalgewebe.

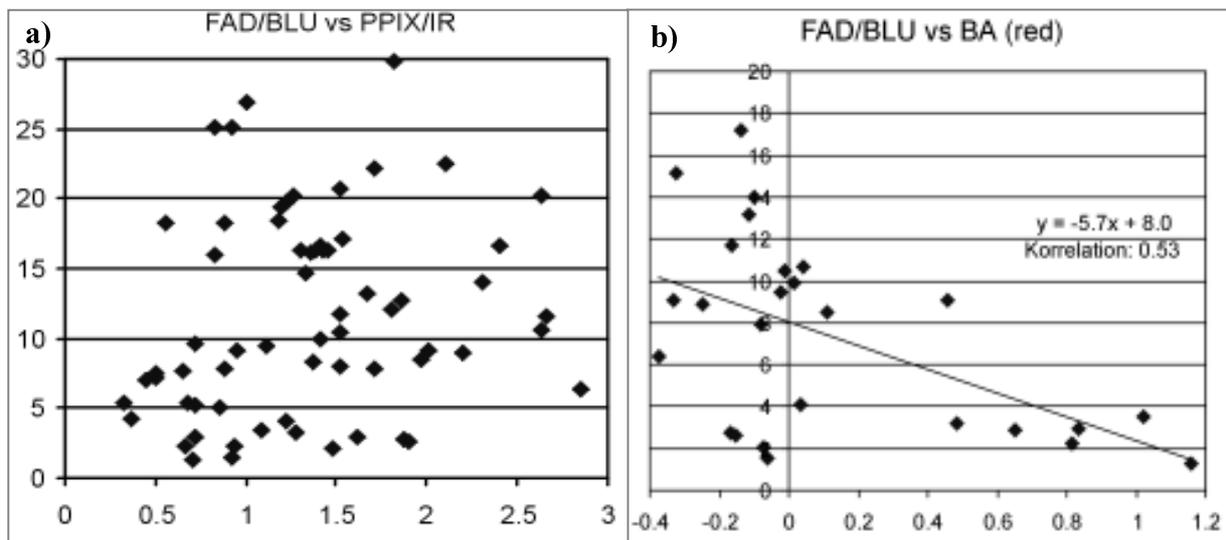


Abb. 18: a) Korrelation von PPIX und FAD (jeweils normiert auf die in etwa mit gleichen absorptiven Eigenschaften behaftete Remission) für verdächtige Befunde und Normalgewebe b) Korrelation von FAD und dem Anteil der reduzierten Blutabsorption ausschließlich für verdächtige Befunde

3.3 Untersuchungen im Autofluoreszenzmodus

Elastine, Collagene, Flavine und NADH können durch Anregung im blauen Spektralbereich zur Fluoreszenz angeregt werden (Anidjar et al 1996, Schomaker et al 1992).

3.3.1 Untersuchungen des Bronchialgewebes und seiner Histologie

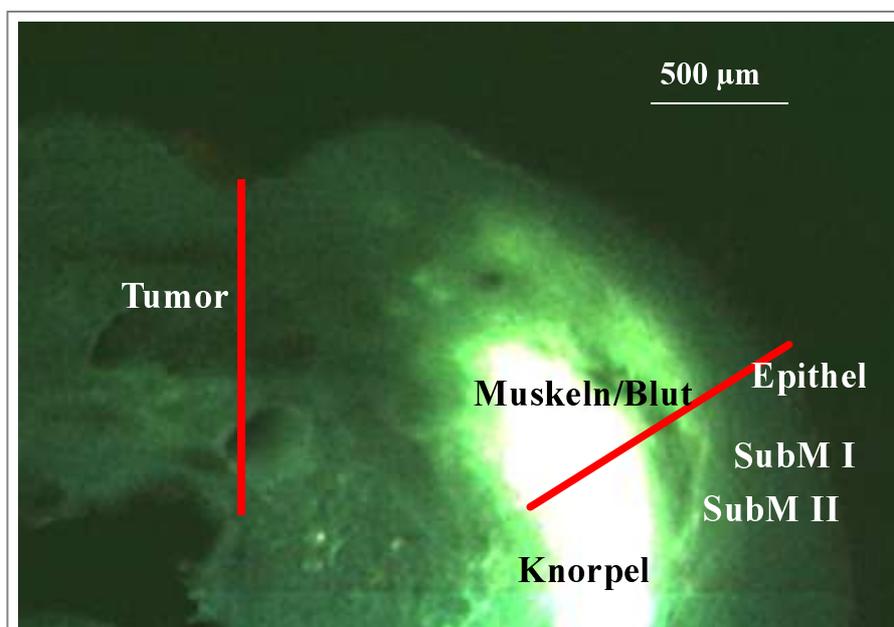


Abb. 19: Histologischer Schnitt (10 µm) durch einen Tumor mit angrenzendem Normalgewebe nach Anregung mit 405 nm (Blau) unter dem Fluoreszenzmikroskop: Tumor, Normalgewebe: Epithel, obere Submucosa (SubM I), untere Submucosa (SubM II), Muskeln/Blut, Knorpel

Ergebnisse

Im histologischen Schnitt dominiert nach Anregung mit 405 nm die grüne Fluoreszenz, die insbesondere in der ersten Schicht der Submucosa und im Knorpelgewebe gefunden wird. Die Dicke der Schichten im Normalgewebe ist sehr konstant, die Dicke des fluoreszierenden Anteils in der oberen Submucosa schwankt (wie auch schon in Abbildung 19 ersichtlich ist) allerdings sehr stark. Ursächlich dafür sind myoglobinreiche stark absorbierende Muskelfaserstrukturen und Blutgefäße in der unteren Submucosa. Mittels Bildverarbeitung und Spektroskopie konnten Intensitätsverläufe der Fluoreszenz in der Tiefe gemessen werden.

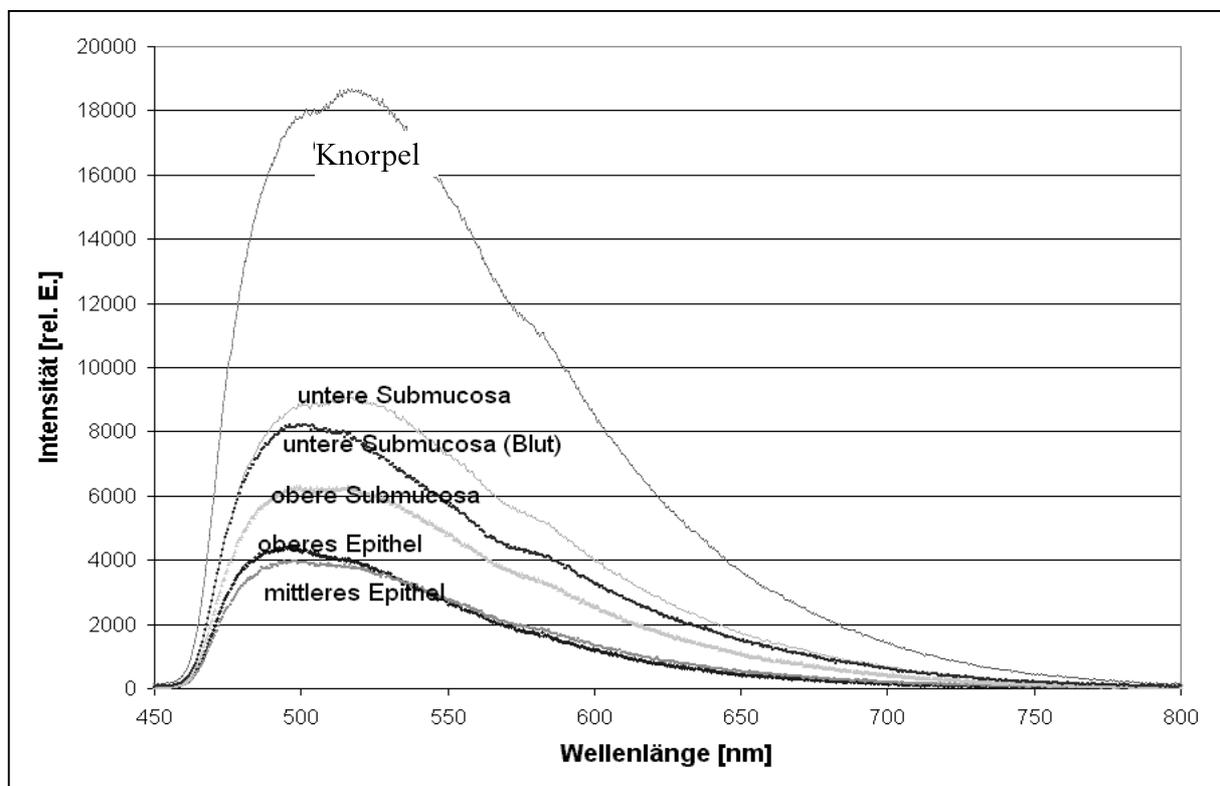


Abb. 20: Differenzspektren der Fluoreszenz im Normalgewebe in verschiedenen Schichttiefen und der oberflächlichen Fluoreszenz

Im Normalgewebe findet sich gemäß Abbildung 20 im Epithel eine blau-grüne Fluoreszenz, im Bereich der oberen Submucosa eine grüne Fluoreszenz, im Bereich der unteren Submucosa finden sich Spektren, die je nach Myoglobin/Blut-Gehalt rötlich verfärbt sind. Der Knorpel ist grün gefärbt; es ist bekannt, daß sich hier vor allem Kollagen und Elastin finden (Wag-

nieres et al 1998). Spektren in den Übergangsbereichen der Schichten können erklärt werden durch Mischung dieser Bestandteile.

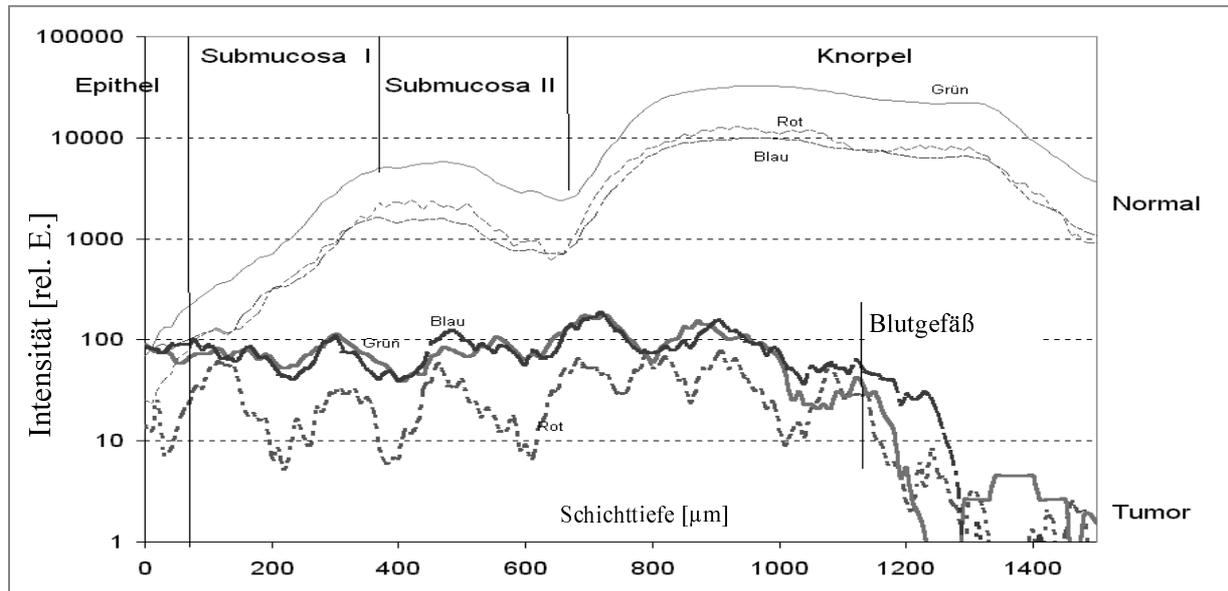


Abb. 21: Relative Intensität der roten, blauen und grünen Bestandteile der Fluoreszenz im Tumorgewebe und Normalgewebe in verschiedenen Schichttiefen

Im Epithel und im Tumor findet sich nach Abbildung 21 eine in etwa gleich große blaue, grüne und rote Fluoreszenz. Es ergibt sich also keine Unterscheidungsmöglichkeit von normalem Epithelgewebe und Tumorgewebe anhand von Fluoreszenzunterschieden in den Zellen. Mit zunehmender Schichttiefe nimmt der Anteil der grünen Fluoreszenz im Normalgewebe aber stark zu. Die gleichzeitige proportionale Zunahme des grünen und blauen Spektralanteils in der oberen Hälfte der Submucosa korreliert mit dem breitbandigen spektralen Anteil der allgemeinen Gewebsfluoreszenz (siehe Wagnieres et al 1998). In der unteren Hälfte der Submucosa nimmt die Rotfluoreszenz etwas zu. Die höchste Fluoreszenz findet sich im Knorpel. Der Unterschied zwischen Tumor und Normalgewebe ist also hauptsächlich durch die stetige Zunahme der allgemeinen Gewebsfluoreszenz im Normalgewebe begründet und in zweiter Linie durch Unterschiede im roten Anteil der Fluoreszenz. Die erhaltenen Fluoreszenzwerte können nun verwendet werden, um die mikroskopisch gemessenen Daten über die nachfolgende Berechnung mit den makroskopisch (endoskopisch) erhaltenen Daten vergleichen zu können.

Ergebnisse

3.3.2 Montecarlosimulation zur Optimierung der Autofluoreszenz

Ausgangspunkt der Montecarlosimulation ist ein Photon, das von einer Lichtquelle ausgesandt wird und unter einem bestimmten Winkel auf das Gewebe trifft. Hier erfährt es im wesentlichen am Übergang Luft-Gewebe (Brechungsindex 1.0/1.33) eine Brechung/Reflexion nach den Fresnelschen Gesetzen. Die Gleichungen erlauben auch Aussagen über die Wahrscheinlichkeit p mit der die Photonen reflektiert oder gebrochen ($1-p$) werden:

$$\text{Gleichung 6a: } p = \sin(\alpha - \beta) \cdot [\cos(\alpha + \beta) / \cos(\alpha - \beta)^2 + 1] / [2 \cdot \sin(\alpha + \beta)]$$

unter der Kondition des Brechungsgesetzes $\sin(\beta) = n_1/n_2 \cdot \sin(\alpha)$

für den Einfallswinkel α und dem Ausfallswinkel β

$$\text{Gleichung 6b: } p = (n_2 - n_1)^2 / (n_1 + n_2)^2$$

für den Spezialfall $\alpha = 0, \beta = 0$

Ein Photon bewegt sich im Gewebe fort, kann dort gestreut oder absorbiert werden und energiereiche Photonen können bestimmte Moleküle zur Fluoreszenz anregen (Abbildung 22).

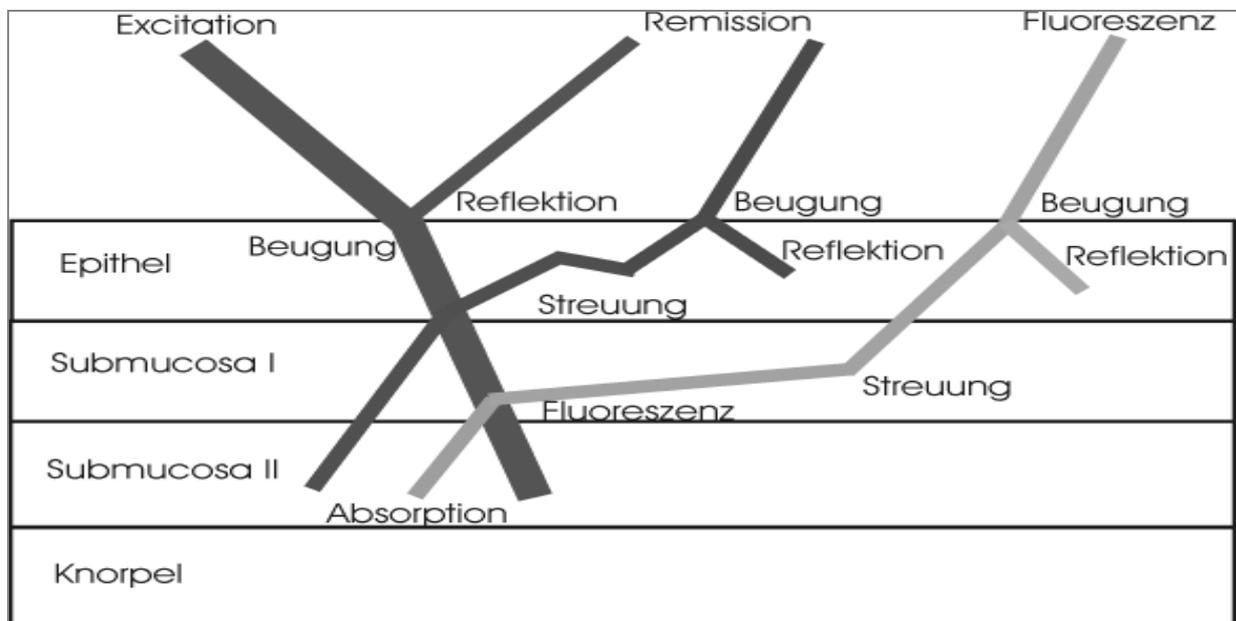


Abb. 22: Mögliche Wechselwirkungen von Licht im Gewebe

Ergebnisse

Die Wahrscheinlichkeit dieser Übergänge hängt ab von der Dichte der streuenden Korpuskel (μ_s), der Dichte der absorbierenden Korpuskel (μ_a) und von der Dichte der fluoreszierenden Korpuskel (μ_f), sowie der Quanteneffizienz q mit der die anregenden Photonen eine Emission der Fluoreszenz-Photonen bewirken. Im gewählten Modellansatz werden diese Effekte mit Hilfe eines homogenen Zufallswertes entsprechend ihrer Wahrscheinlichkeitsdichte ausgewählt. Eine Beschreibung über den reduzierten Streukoeffizienten ist somit nicht nötig. Die ersten Kenngrößen wurden bereits in der Literatur ausreichend bestimmt und die wenigen Meßpunkte mittels Regression auf den gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich ausgedehnt. Die beiden letztgenannten Kenngrößen sind zusammengefaßt als Fluoreszenzdichte D in der Fluoreszenzmikroskopie leicht zu bestimmen (Zeng et al 1995).

$$\text{Gleichung 7: } D(x, y, z, \lambda) = \mu_f(x, y, z, \lambda) \cdot q(x, y, z, \lambda)$$

Sie wurde nach Anregung mit 405 nm spektroskopisch für alle Wellenlängen und Gewebetiefen für das Tumor und Normalgewebe bestimmt und kann auch ausreichend genau aus den fluoreszenzmikroskopischen Farbbildaufnahmen ermittelt werden (siehe Abbildung 21).

Die Absorptionskenngrößen der Literatur (Tabelle 6) wurden mit mikroskopischen Weißlichtaufnahmen überprüft. Die Streukenngrößen sind für dünne Schichten nur schwer zu bestimmen und beruhen auch in der Literatur (Qu et al 1995) auf Modellannahmen und Extrapolationen. Die Streuung hängt zudem von der Geometrie der Streukorpuskel ab. Um diese annäherungsweise zu berücksichtigen, wird der Parameter g verwendet. In der Heney-Greenstein-Gleichung wird dieser Parameter verwendet, um die Winkelabhängigkeit der Verteilung festzulegen (Anderson Cancer Center 1992).

Ergebnisse

Mit Zufallswerten r_1 und r_2 können folgende Raumwinkel ω und φ zwischen der ursprünglichen (u_x, u_y, u_z) und der künftigen Richtung (v_x, v_y, v_z) des Photons nach der Streuung festgelegt werden gemäß einer Verteilung nach Heney - Greenstein mit dem Verteilungsparameter g für den transversalen Anteil ω :

$$\text{Gleichung 8a: } \cos(\omega) = 2 \cdot r_1 - 1 \quad \text{für } g = 0$$

$$\text{Gleichung 8b: } \cos(\omega) = [1 + g^2 - (1 - g^2)^2 / (1 - g + 2g \cdot r_1)^2] / [2g] \quad \text{für } g \neq 0$$

Gleichverteilung für den radialen Anteil φ :

$$\text{Gleichung 9: } \varphi = 2 \cdot \pi \cdot r_2$$

Für Photonen, die sich nur in z-Richtung bewegen gilt dann:

$$\text{Gleichung 10a: } v_x = \sin(\omega) \cdot \cos(\varphi)$$

$$\text{Gleichung 10b: } v_y = \sin(\omega) \cdot \sin(\varphi)$$

$$\text{Gleichung 10c: } v_z = \cos(\omega) \cdot \text{Signum}(u_z)$$

Für alle anderen Richtungen:

$$\text{Gleichung 11a: } v_x = \sin(\omega) \cdot [u_x \cdot u_z \cdot \cos(\varphi) - u_y \cdot \sin(\varphi)] / \sqrt{(1 - u_z^2)} + \cos(\omega) \cdot u_x$$

$$\text{Gleichung 11b: } v_y = \sin(\omega) \cdot [u_y \cdot u_z \cdot \cos(\varphi) + u_x \cdot \sin(\varphi)] / \sqrt{(1 - u_z^2)} + \cos(\omega) \cdot u_y$$

$$\text{Gleichung 11c: } v_z = -\sin(\omega) \cdot \cos(\varphi) \cdot \sqrt{(1 - u_z^2)} + \cos(\omega) \cdot u_z$$

Für $g = 1$ ergibt sich eine reine Vorwärtsstreuung in Richtung des einfallenden Photons, für $g = -1$ eine Streuung in Gegenrichtung zum einfallenden Photon und für $g = 0$ eine zirkulare isotrope Streuung.

Ergebnisse

Das Rechenmodell verwendet 100.000 einfallende Photonen (zu 400 nm, 420 nm, 440 nm und 460 nm) und eine Granularität der Gewebszellen von 1 μm . Es wurden vier Gewebsschichten verwendet. Für jede dieser Gewebsschichten wurde ein μ_a , ein μ_s und ein g - Wert angegeben (Ebert et al 1998). Innerhalb der oberen Hälfte der Submucosa findet sich eine geringere Blutabsorption, als in der unteren Hälfte der Submucosa (Qu et al 1995, Zeng et al 1997). Die optischen Parameterwerte (Tabelle 6) der oberen Submucosa wurden daher linear interpoliert aus Werten des Epithels und der unteren Hälfte der Submucosa (+). Das Rechenmodell unterbricht, wenn 99,9% der Photonen aus dem Gewebe ausgetreten sind oder absorbiert worden sind.

	d (μm)	WL (nm)	μ_a (1/cm)	μ_s (1/cm)	g
Epithel	45	442	2.9	343	0.94
		500	2.1	285	0.94
		577	1.4	223	0.95
		630	1.1	204	0.95
Submucosa oben	233	442	2.9 +	253 +	0.91
		500	2.1 +	238 +	0.92
		577	1.4 +	217 +	0.93
		630	1.1 +	208 +	0.94
Submucosa unten	466	442	10.0	253	0.91
		500	4.1	238	0.93
		577	3.7	217	0.94
		630	1.8	208	0.95
Knorpel	1200	442	6.7	290	0.92
		500	2.5	270	0.93
		577	1.3	253	0.94
		630	1.0	246	0.95

Tab. 6: Optische Parameter μ_a , μ_s , g der verschiedenen Schichten des Normalgewebes für verschiedene Wellenlängen, + bezeichnet lineare Übergänge bezüglich der Schichttiefe

Die Fluoreszenzdichte (nach Abbildung 21) wurde ca. auf 3 μm genau bestimmt und auf die Berechnungszellen übertragen. Innerhalb einer horizontalen Schicht wurde Homogenität angenommen. Zur Vergleichbarkeit der berechneten Daten mit den Literaturwerten wurde dar-

Ergebnisse

auf verzichtet auch die mittels Mikroskopie geometrisch genauer gemessene Absorption zu verwenden (Prahl et al 1999). Für die anregenden Photonen wurde eine gleichmäßige Verteilung mit den Wellenlängen 400 nm, 420 nm, 440 nm und 460 nm unter den Winkeln 0 Grad (senkrecht), 15 Grad, 30 Grad, 45 Grad, 60 Grad und 75 Grad angenommen. Die Anregungswinkel sind zugleich die Beobachtungswinkel.

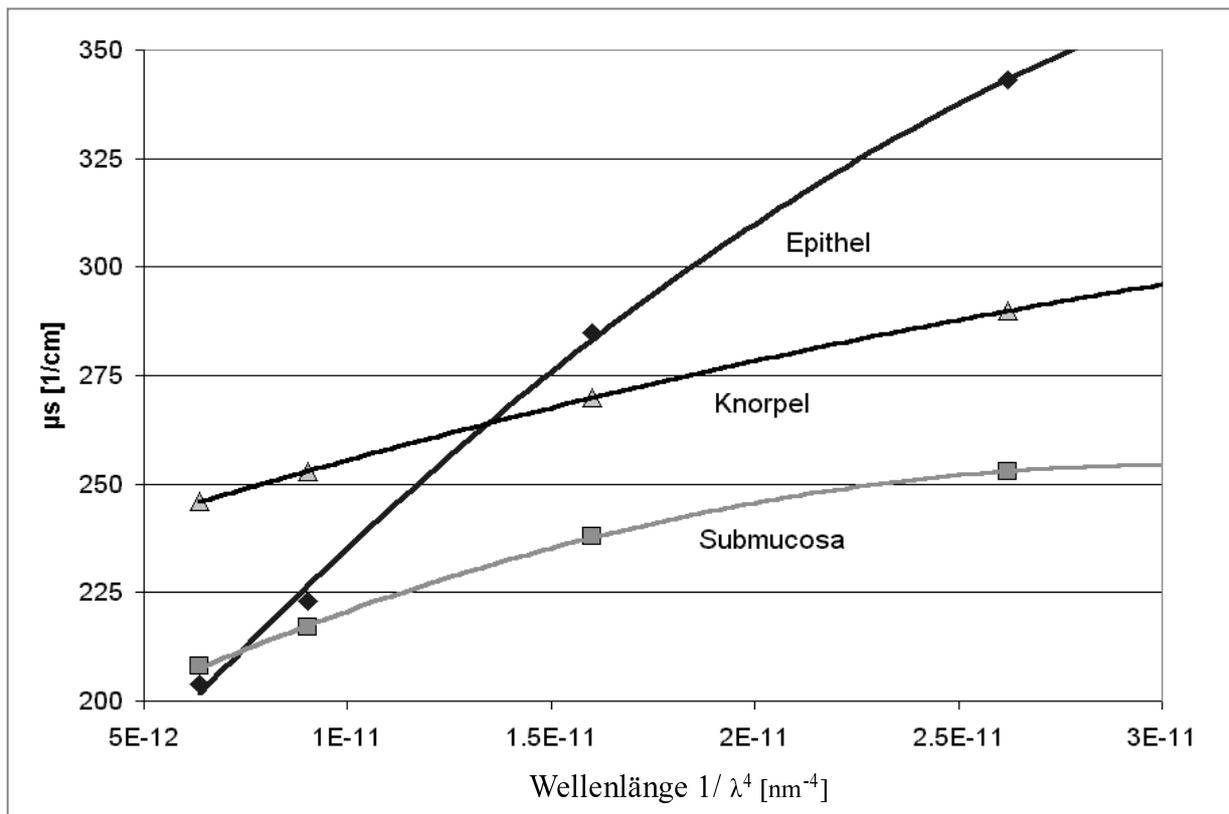


Abb. 23: quadratische Interpolation der Abhängigkeit des Streuparameters μ_s von der Wellenlänge $[1/\lambda^4]$

Für die Interpolation der verschiedenen optischen Parameter zur Bestimmung eines kontinuierlichen Wellenlängenverlaufs eignete sich besonders eine Auftragung gegen $1/\lambda^4$. Hier lassen sich die Streuung μ_s (Abbildung 23), die Absorption μ_a (Abbildung 24) und der Parameter g als quadratische Funktionen interpolieren (Abbildung 25).

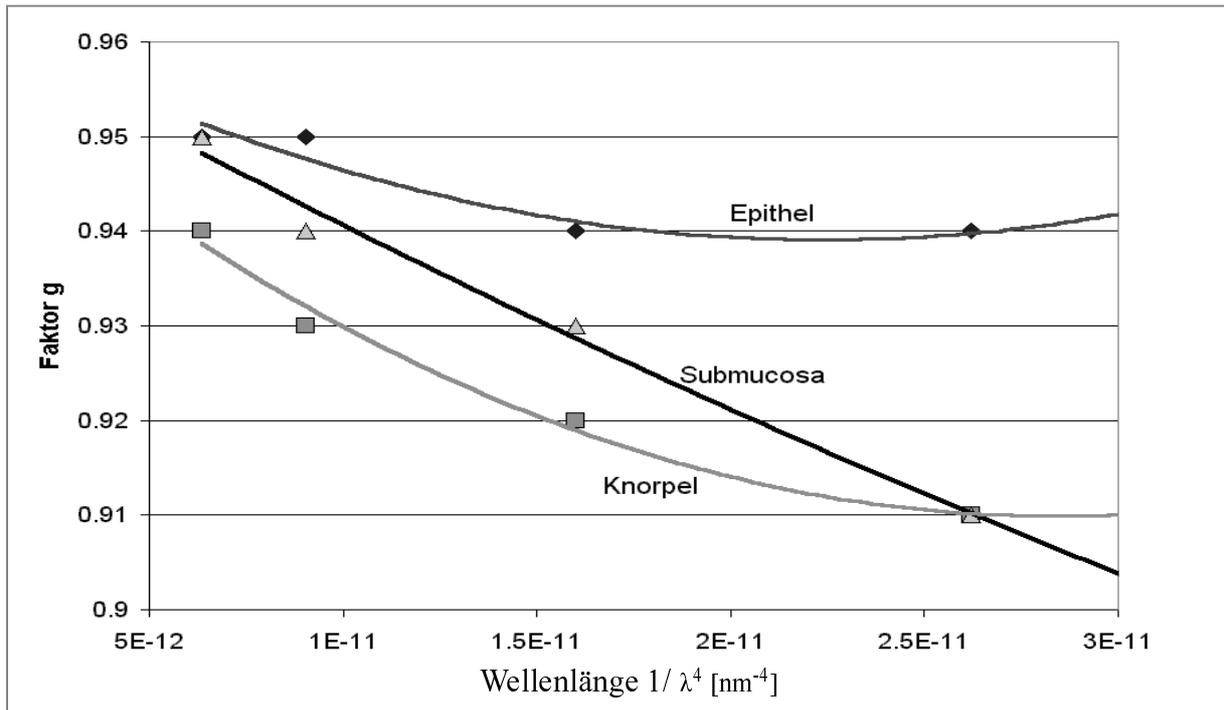


Abb. 24: quadratische Interpolation des geometrischen Parameters g von der Wellenlänge [$1/\lambda^4$]

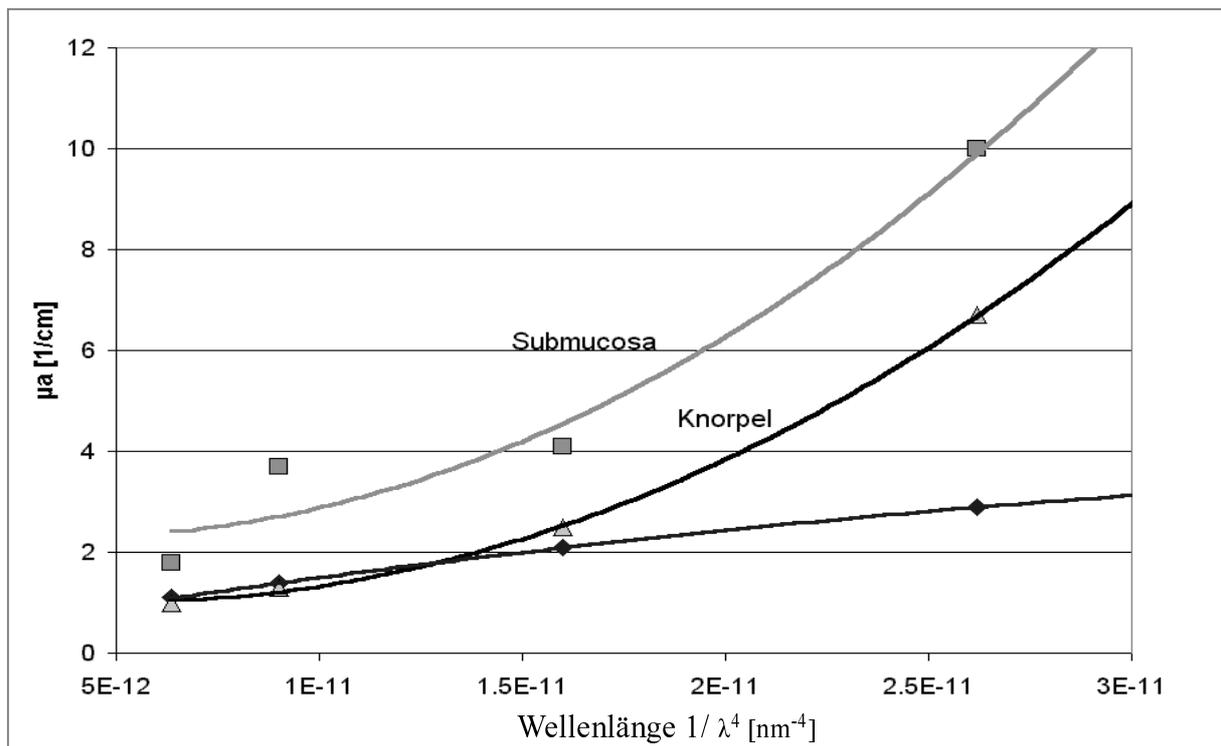


Abb. 25: quadratische Interpolation des Absorptionsparameters μ_a von der Wellenlänge [$1/\lambda^4$]

Ergebnisse

Die emittierten Fluoreszenzphotonen befinden sich im Bereich von 480 nm - 800 nm mit einer Genauigkeit von 20 nm. Akkumuliert wurde alles remittierte Licht, das das Gewebe in Richtung Anregungslichtquelle (Endoskop) verläßt (Winkelunterschied maximal 90 Grad). Variiert wurde neben dem Winkel, die Dicke des Epithels von 50, 75, 100, ... 500 μm (50 μm ca.= Normalgewebe, 70 μm ca.= Dysplasie, 120 μm ca.= CIS, ≥ 130 μm ca.= Tumor), der Blutgehalt der unteren 2/3 der Submucosa (Absorption) von 0%, 2.5%, 5% und 10% sowie sein Redoxstatus (Anteil von oxygeniertem Blut) zu 100%, 75%, 50% und 0%.

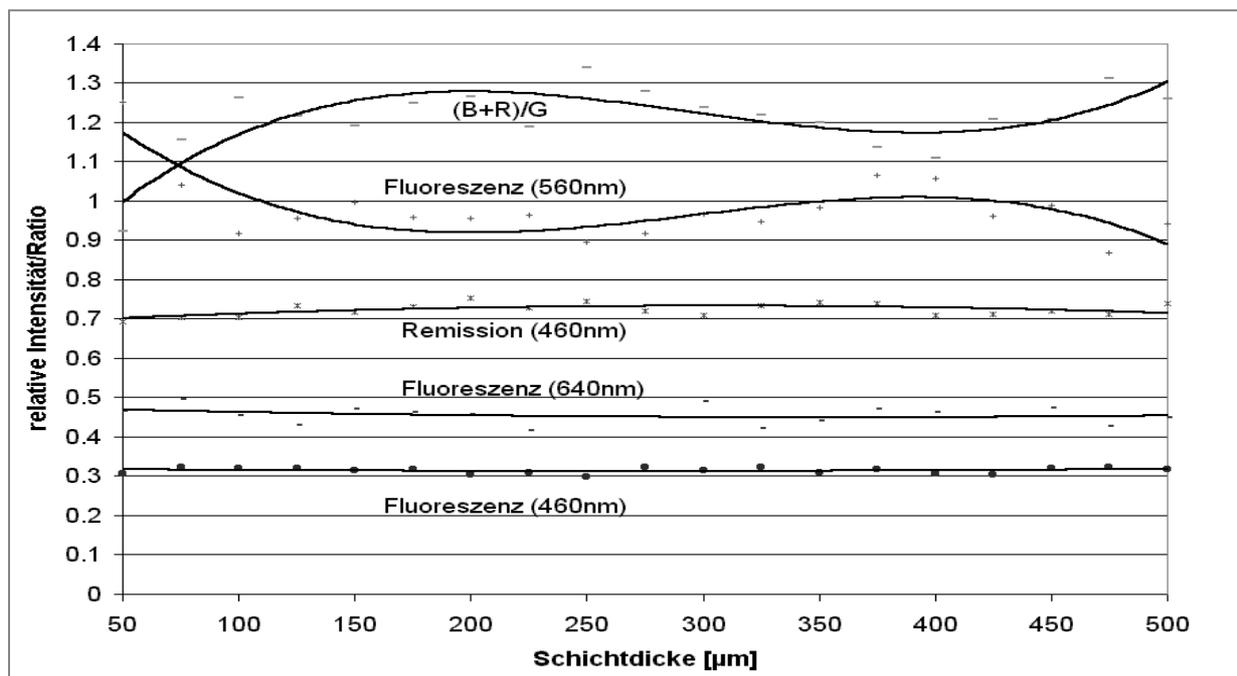


Abb 26: Montecarlosimulation der Abhängigkeit verschiedener Fluoreszenzwerte, der Remission und des optimalen Ratios (Rotfluoreszenz + Blauremission)/Grünfluoreszenz von der Schichtdicke nach gleichmäßiger Anregung im Bereich von 390 - 470 nm. (Endoskopwinkel 0 Grad, 2.5 % Blut, 75 % Sauerstoffsättigung)

Mit zunehmender Schichtdicke vermindert sich im wesentlichen die grüne Fluoreszenz (560 nm) und steigt die blaue Remission (460 nm) stetig an (Abbildung 26). Ein Grund dafür kann die mittlere freie Weglänge des Anregungslichtes sein. Mit zunehmender Schichtdicke des Epithels werden immer weniger Fluorophoren und absorptives Blut der Tiefe erreicht (Abbildung 21, Tabelle 6), so daß bei sehr hohen Schichtdicken der Anteil der remittierten Photonen in die Sättigung geht und der Anteil der Fluoreszenz sich wieder erhöht, weil er nicht mehr

Ergebnisse

absorbiert wird. Die rote (640 nm) und blaue (460 nm) Fluoreszenz bleiben in etwa konstant, so daß sich letztlich für den Vergleich der Schichtdicke (50 µm) und der Schichtdicke (120 µm) ein ansteigendes (Rot+Blau)/Grün-Ratio von ca. 1.22 ergibt.

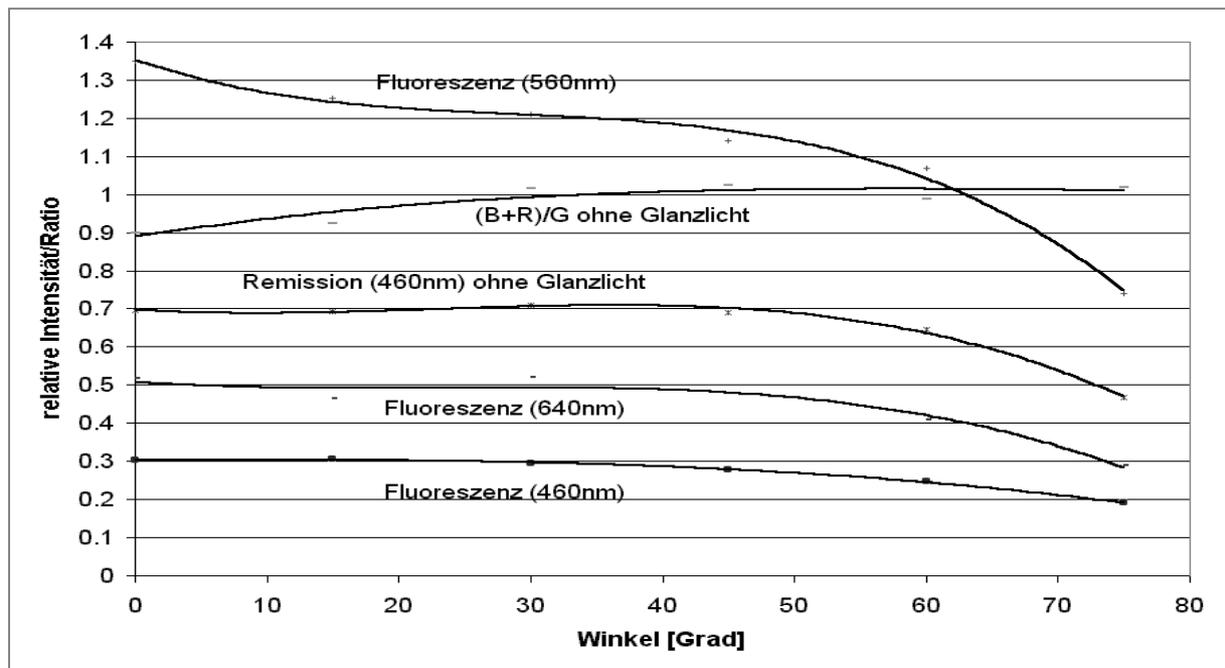


Abb. 27: Montecarlosimulation der Abhängigkeit verschiedener Fluoreszenzwerte, der Remission und des optimalen Ratios (Rotfluoreszenz + Blauremission)/Grünfluoreszenz von dem Endoskopwinkel bezüglich der Flächennormalen nach gleichmäßiger Anregung im Bereich von 390 - 470 nm. (Epithel 50 µm, 2.5 % Blut, 75 % Sauerstoffsättigung).

Ab einem Winkel von 45 Grad vermindern sich die rote (640 nm), grüne (560 nm) und blaue (460 nm) Fluoreszenz und die blaue Remission (460 nm) jeweils in etwa nach dem Lambert-schen Strahlungsgesetz (siehe Abbildung 7). Hingegen ist das (Rot+Blau)/Grün-Ratio in diesem Bereich äußerst konstant. Im Bereich unterhalb von 30 Grad nimmt es ab (Abbildung 27). Im realen Endoskopbild würde dieses durch eine zusätzliche blaue Remission des Reflexes/Glanzlichtes (siehe Abbildung 7) im Bereich von 0 - 30 Grad erhöht werden. Das Ratio Blau/Grün wäre nach Division der entsprechenden Kurven im Winkelbereich von 0-30 Grad zu hoch, während das Ratio Rot/Grün zu niedrig wäre (siehe hierzu Ergebnis in Abbildung 31).

Ergebnisse

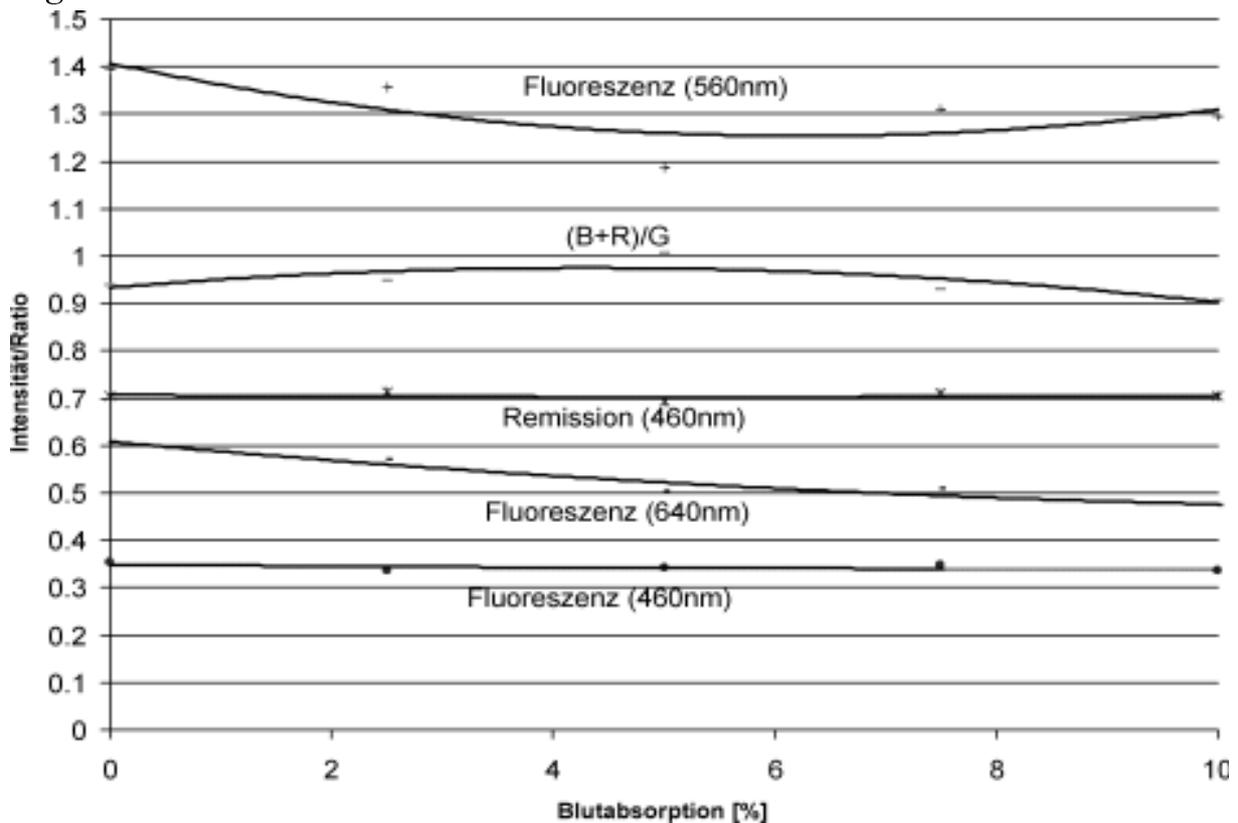


Abb. 28: Montecarlosimulation der Abhängigkeit verschiedener Fluoreszenzwerte, der Remission und des optimalen Ratios (Rotfluoreszenz + Blauremission)/Grünfluoreszenz von dem Blutanteil der Submucosa nach gleichmäßiger Anregung im Bereich von 390 - 470 nm. (Epithel 50 μ m, Endoskopwinkel 0 Grad, 100% Sauerstoffsättigung)

Gemäß Abbildung 28 wird die Blutabsorption in der Submukosa langsam von 0% auf 10% gesteigert und deren Auswirkung simuliert (Entsprechend der Varianz der stark myoglobinhaltigen Muskelfasern im Normalgewebe). Vornehmlich die Grünfluoreszenz (560 nm) und die Rotfluoreszenz fällt mit der Blutabsorption, die blaue Remission und Fluoreszenz bleibt in etwa konstant. Der Grund für Ersteres ist die starke Absorption der anregenden Photonen, so daß die tieferen stark Fluorophoren tragenden Schichten nicht mehr erreicht werden (zu geringe mittlere freie Weglänge). Die Erklärung für Letzteres ist die gleichbleibende von der Absorption der Submucosa wenig beeinflusste Streuung und Anregung der blauen Fluoreszenz des Epithels im Normalgewebe. Das Ratio (Rot+Blau)/Grün erhöht sich maximal um den Wert 1.1. Hier kompensieren sich im wesentlichen die rote Fluoreszenz und die grüne Fluoreszenz.

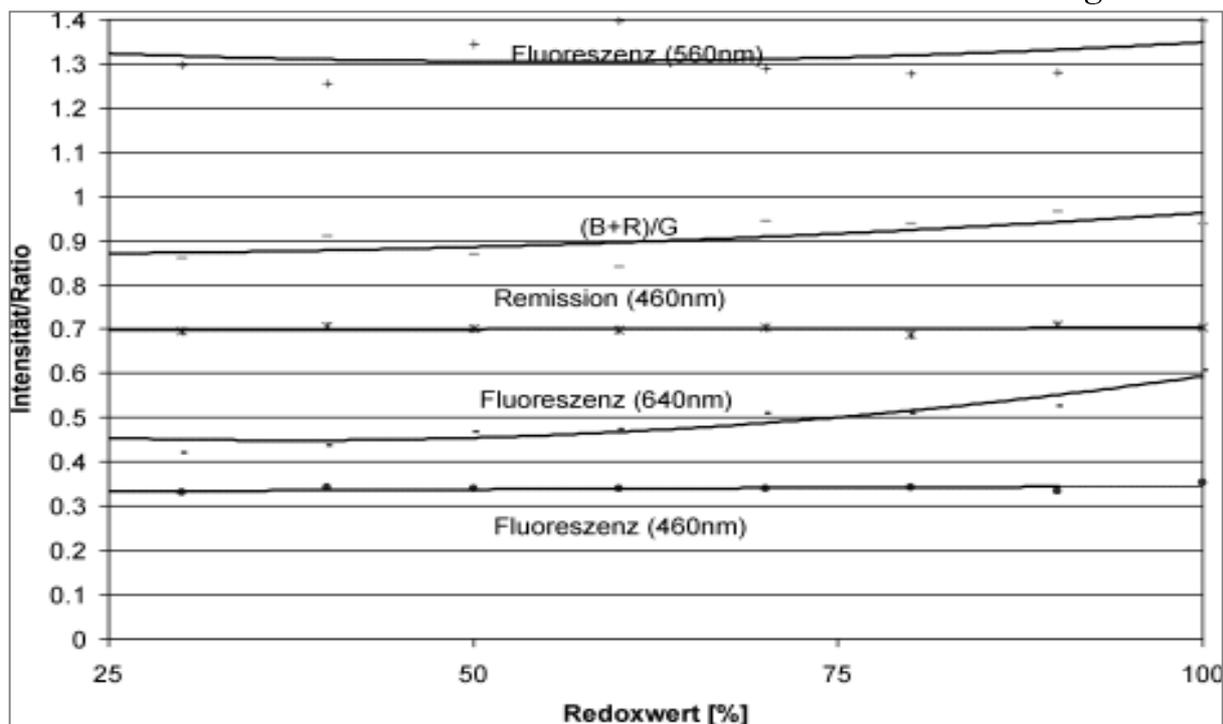


Abb. 29: Montecarlosimulation der Abhängigkeit verschiedener Fluoreszenzwerte, der Remission und des optimalen Ratios (Rotfluoreszenz + Blauremission)/Grünfluoreszenz von der Sauerstoffsättigung im Blut der Submucosa nach gleichmäßiger Anregung im Bereich von 390 - 470 nm. (Epithel 50 μ m, Endoskopwinkel 0 Grad, 10% Blut in der Submucosa)

Auch der Redoxwert (Sauerstoffsättigung) hat Auswirkungen auf die Fluoreszenz und Remission (siehe Abbildung 29). Insbesondere findet sich eine Absenkung der roten Fluoreszenz. Dies hat aber nur geringen Einfluß auf das (Rot+Blau)/Grün-Ratio. Die Amplitude der Änderungen der obigen Werte hängt zudem auch von der eingesetzten Blutmenge ab (nach Abbildung 28), so daß die Änderungen bei realistischeren Änderungen der Blutabsorption eher geringer sein dürften. Im Vergleich bei einer Sauerstoffsättigung von 100 % findet sich bei Sauerstoffsättigung von 75 % eine gleichbleibende blaue Remission und grüne Fluoreszenz, eine erniedrigte rote Fluoreszenz und eine in etwa gleich bleibende blaue Fluoreszenz. Zur Prüfung insbesondere dieses Zusammenhangs, wurde die spektrale Abhängigkeit der Autofluoreszenz bei einem freiwilligen Probanden gemessen, der die Luft anhielt. Neben der Autofluoreszenz wurde am Finger mit einem klinisch verfügbaren Pulsoxymeter auch die Sauerstoffsättigung gemessen. Normiert wurden die Spektren auf die Rotfluoreszenz (Rotremissi-

Ergebnisse

on), so daß eine relativ dazu erhöhte grüne Fluoreszenz bzw. blaue Remission zu erwarten wäre.

3.3.3 Untersuchung der Autofluoreszenz bei Hypoxie

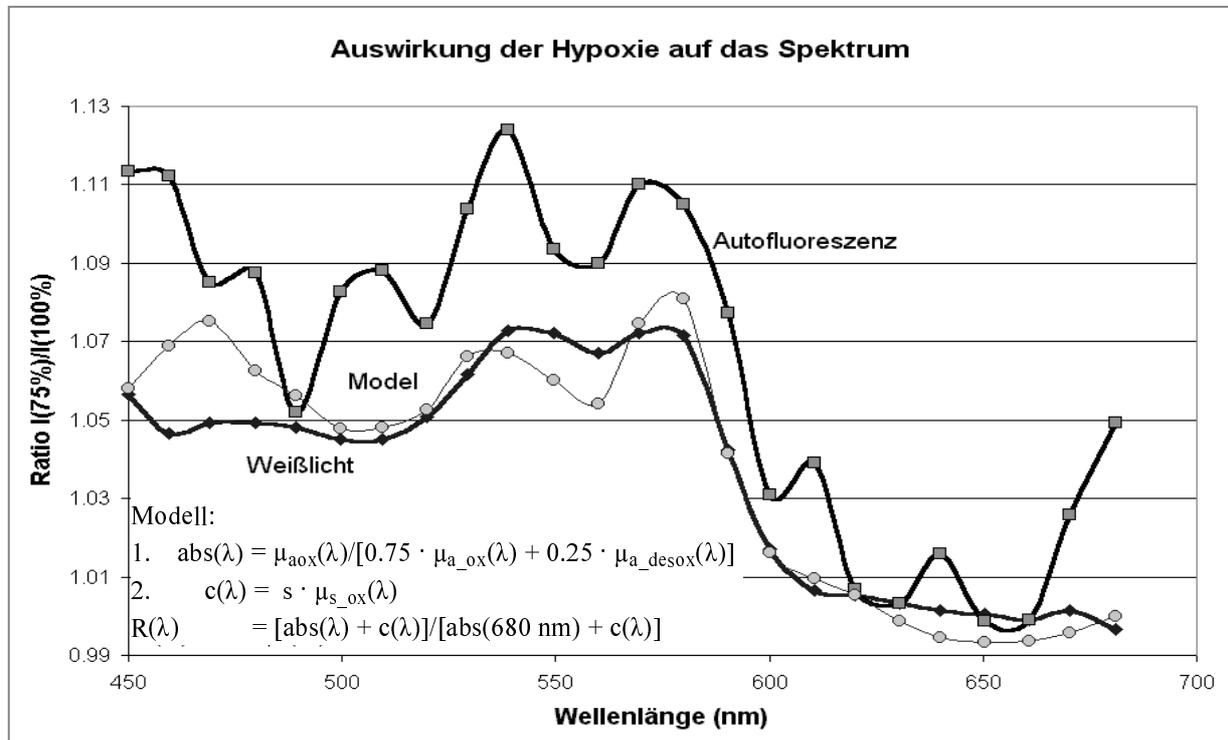


Abb. 30: Auswirkungen der Hypoxie (75% Sauerstoffsättigung versus 100% Sauerstoffsättigung) auf das Weißlichtspektrum und auf das Autofluoreszenzspektrum des Daumens (AF-Mode mit Remissionsanteil bei 450 - 470 nm) sowie ein Erklärungsmodell mit den absorptiven Eigenschaften des oxygenierten und reduzierten Blutes und einer allgemeinen Streuung $s \cdot \mu_s$; s ist festgelegt als konstanter Parameter. Abweichungen im blauen Spektralbereich können über den Parameter s erklärt werden.

Tatsächlich findet sich nach der Messung (in Abbildung 30) die eben besprochene Veränderung der Fluoreszenzen und der Remission. Ein blauer Fluoreszenzanteil wurde nicht untersucht. Die abnehmende Tendenz der (mit einer blauen Remission behafteten) Autofluoreszenz weist aber zwischen 480-500 nm eine Abnahme der Fluoreszenz aus. Insgesamt liegen die Werte der Autofluoreszenzerhöhung durch die Absenkung der Sauerstoffsättigung etwas höher als die der Remission. Das Ratio Blau/Grün des Autofluoreszenzmodus wird von der Sauerstoffsättigung kaum beeinflusst. Das ebenfalls auf 680 nm normierte Modell beste-

hend aus Komponenten der wellenlängenabhängigen und vom jeweiligen Redoxstatus abhängigen Absorptionsanteil und einem Streuungsanteil beschreibt den Kurvenverlauf des Gewebes im Bereich von 500-650 nm recht genau. Im Bereich von 450 nm -500 nm sind die nicht-linearen Wechselwirkungen aufgrund der erhöhten Streuung größer, so daß es hier zu größeren Abweichungen kommt.

3.3.4 Winkelabhängigkeit der Fluoreszenz

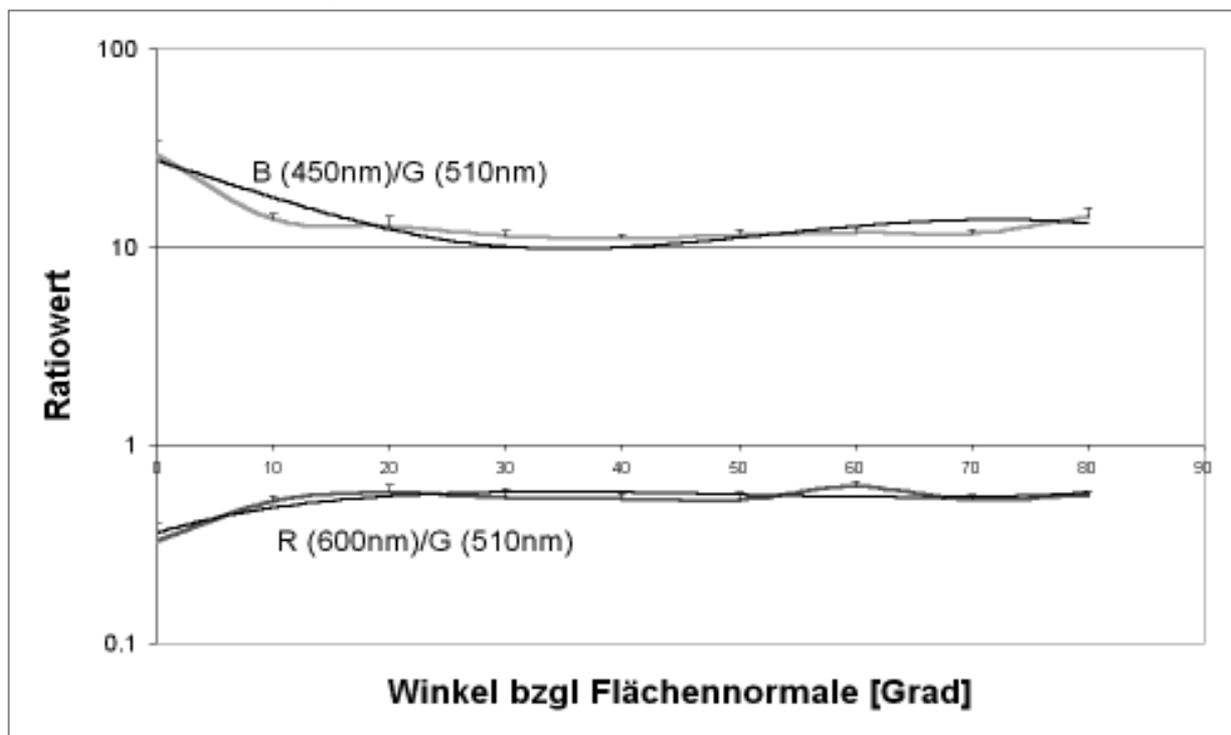


Abb. 31: Reale endoskopische Winkelabhängigkeit der Lippe für verschiedene Ratios nach Betrachtung im AF-Modus

Weiterhin kann durch Messung die in Abbildung 27 berechnete Winkelabhängigkeit überprüft werden. Die Winkelabhängigkeit wurde an der Oberlippe gemessen. Für alle Ratios ergibt sich eine relative Winkelunabhängigkeit von 30 Grad bis 50 Grad. Unterhalb von 30 Grad ist das Autofluoreszenzratio Rot/Grün erniedrigt und ist das Ratio Blau/Grün erhöht. In der logarithmischen Auftragung in Abbildung 31 kompensieren sich für die Autofluoreszenz $\log(\text{Blau/Grün})$ und $\log(\text{Rot/Grün})$ in etwa, so daß die beste Winkelunabhängigkeit für $R \cdot B/G^2$ erreicht wird. Aber auch das Ratio $(\text{Rot}+\text{Blau})/\text{Grün}$ ist weitgehend winkelunabhängig.

Ergebnisse

3.3.5 Bleaching der Autofluoreszenz

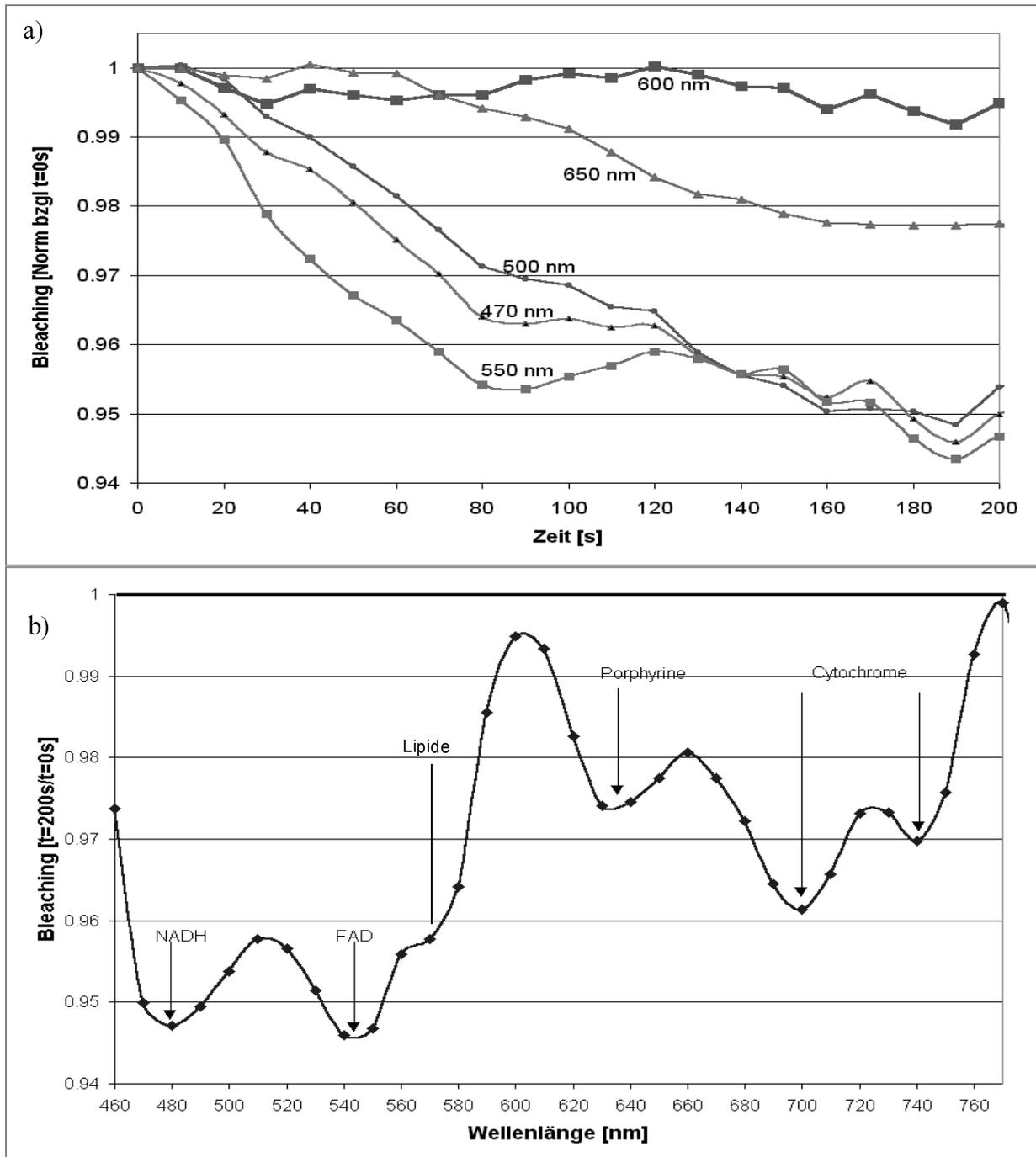


Abb 32: Autofluoreszenzbleaching Gaumen nach Anregung (400-460 nm) mit 100 mW/cm^2 :

5% Bleaching im blauen-grünen Spektralbereich, 2% Bleaching im roten Spektralbereich innerhalb von 300 s.

a) Bleaching innerhalb der ersten 200s. b) Ausbleichrate nach 200 s, Zuordnungsmöglichkeit der Minima zu verschiedenen Fluorophoren

Im Gegensatz zur PPIX-Fluoreszenz findet sich bei den in der Endoskopie üblichen Lichtdosen kaum ein Ausbleichen der Autofluoreszenz (Abbildung 32a). Erst bei einem sehr geringen Abstand des Endoskops vom Gewebe und einer sehr hohen Intensität, wie sie in der starren Bronchoskopie auftreten, verläuft das Ausbleichen der Fluoreszenz schneller, geht also vermutlich einher mit einer immer tieferen Zerstörung der Fluorophoren im Gewebe (Hier nicht gezeigt). Die roten Anteile bleichen vermutlich aufgrund ihrer tieferen Lage im Gewebe etwas langsamer als die blauen bis grünen Anteile. Bei den Schwankungen könnte es sich um Meßartefakte handeln, oder um Fluoreszenzen von Photoprodukten. trägt man die Ausbleichrate nach einer gewissen Zeit (200s) wellenlängenabhängig auf (Abbildung 32b), so macht man die erstaunliche Entdeckung, daß die Lage Minima der resultierenden Kurve den Fluorophoren NADH, FAD, Lipiden, den Prophyrynen und vermutlich den Zytochromen entspricht. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Abbildung 16 und Abbildung 20.

3.4 Quantifizierende Bildverarbeitung

Aus den Daten der letzten Kapitel ist ersichtlich, daß bestimmte Eigenschaften der Autofluoreszenz und des Weißlichtes als Methode dienen, um verdächtige Befunde von unverdächtigen Befunden (Normal/Entzündung) zu unterscheiden. Die Autofluoreszenz wurde optimiert und dabei das Fluoreszenzratio (Rot+Blau)/Grün als günstige Möglichkeit identifiziert, um eine einheitliche Darstellung des Normalgewebes zu erhalten. Die Frage war nun, wie sich diese Möglichkeit in Vergleich zu anderen Verrechnungsmöglichkeiten verhält. Hierzu wurden ausgehend von den Befunden von festgelegten Stellen (zentral, randlich und peripher) und an den Stellen der Autofluoreszenz Farbwerte bestimmt und verschiedene Verrechnungsmöglichkeiten überprüft.

Ergebnisse

3.4.1 Farbratios von Befunden (Weißlichtmodus und Autofluoreszenzmodus)

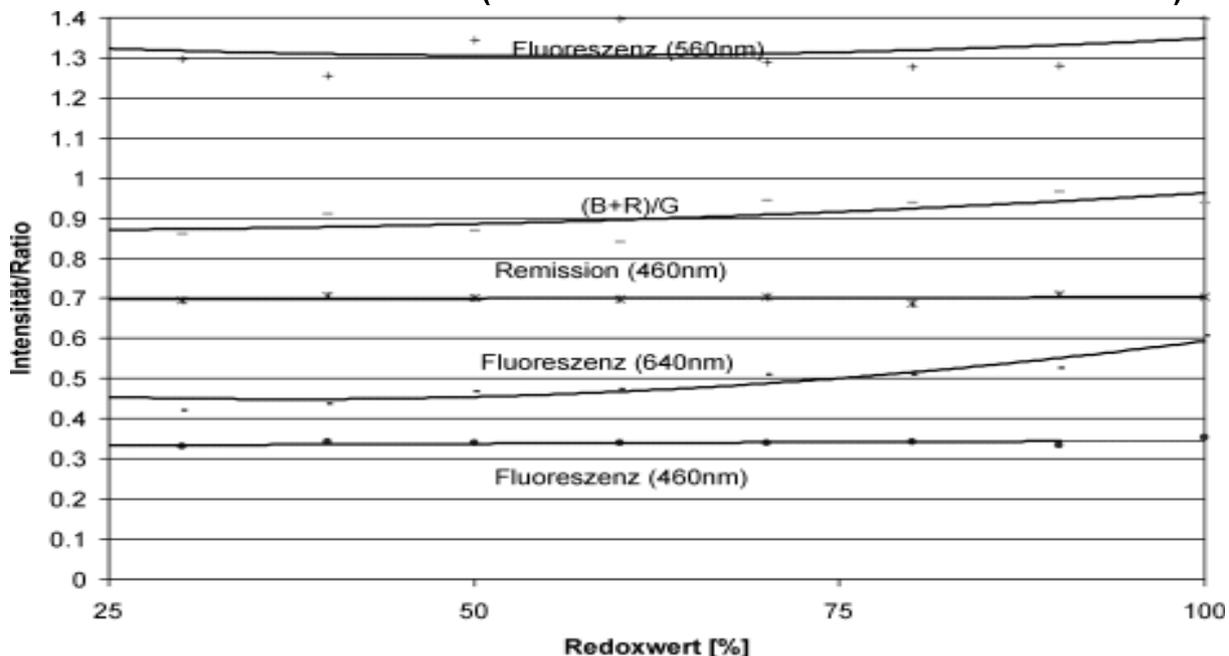


Abb. 33: Unterschiedsschwellen verschiedener Ratios (R, G, B = Rot, Grün, Blau | Bef = Befund | N = Normal | TN = Tumor/Normal | AF = Autofluoreszenz | WL = Weißlicht) für unverdächtigen Befunden=Normal/Entzündung versus Befund=Reservezellhyperplasie/Hyperplasie/Metaplasie/leichte Dysplasie/moderate Dysplasie/schwere Dysplasie/CIS/Kleinzelliges-Ca/Plattenepithel-Ca/Adeno-Ca/nicht näher differenzierter Tumor definiert als Mittelwertsunterschied von verdächtigem Befund und unverdächtigem Befund geteilt durch die Streuungen von verdächtigem Befund und unverdächtigem Befund. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Anzahl der gemessenen Werte.

Die Beurteilung der Ratios ist ein Maß für die Diskriminierung von verdächtigem Befund (\geq Reservezellhyperplasie) und unverdächtigem Befund (Normal,Entzündung) (Anderson-Engels et al 1991). Je größer dieser Wert ist, desto besser ist der Kontrast, wobei hier die Homogenität der Gewebe und der Unterschied eine Rolle spielt. Der Kontrast ist im Falle des Blau/Grün-Ratios der Autofluoreszenz der Befunde sehr hoch, für das Weißlicht ist das Rot/Grün-Ratio hoch, besser aber noch der Kontrast dieses Ratios gegenüber dem umliegenden Normalgewebe (siehe Abbildung 33). Eine Kontrastanhebung findet sich bei der Autofluoreszenz nur beim Rot/Grün-Ratio. Diese Möglichkeiten wurden nachfolgend genauer untersucht:

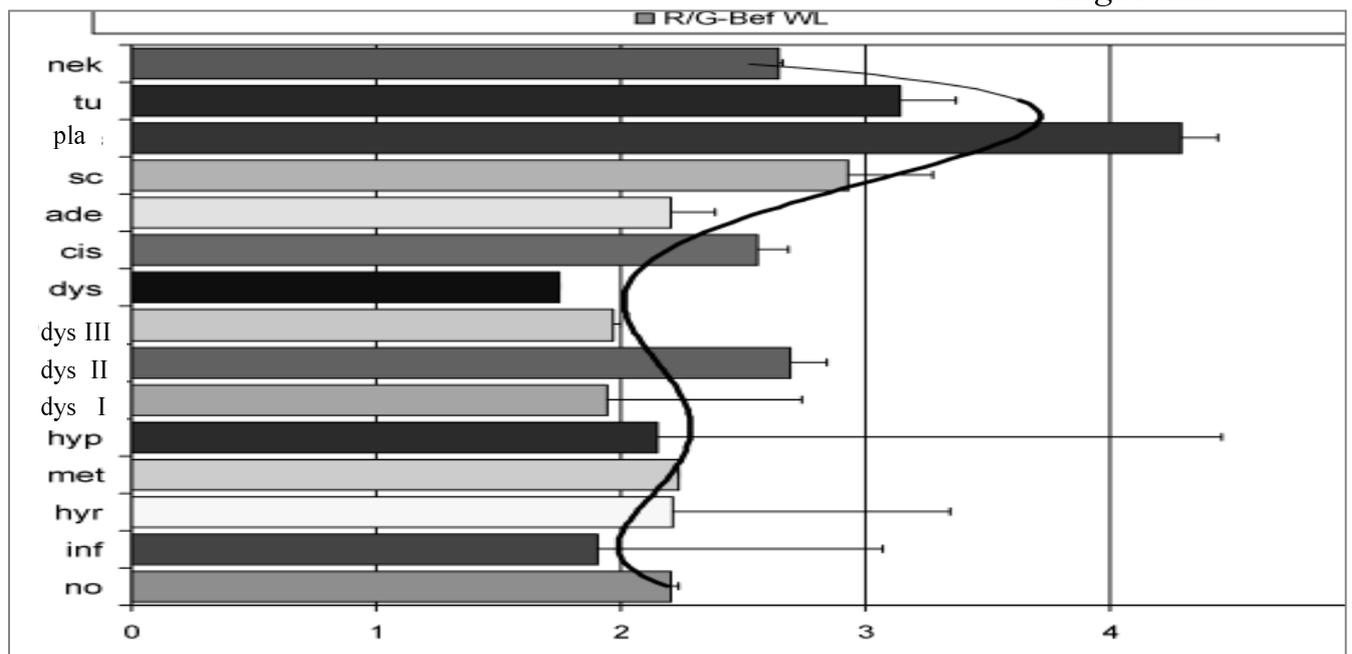


Abb. 34: Rot/Grün-Ratio verschiedener Befunde und ihre Streuung (SD) nach Weißlichtanregung zeigt insbesondere die Blutmenge im Befund an.

Im Weißlicht sind nach Abbildung 34 für das Rot/Grün-Ratio nur die Befunde kleinzelliges Karzinom und Plattenepithelkarzinom von den übrigen Befunden eindeutig zu unterscheiden. Für die individuellen Kontrastwerte gilt entsprechendes, wenngleich hier die Verhältnisse ein klein wenig günstiger liegen.

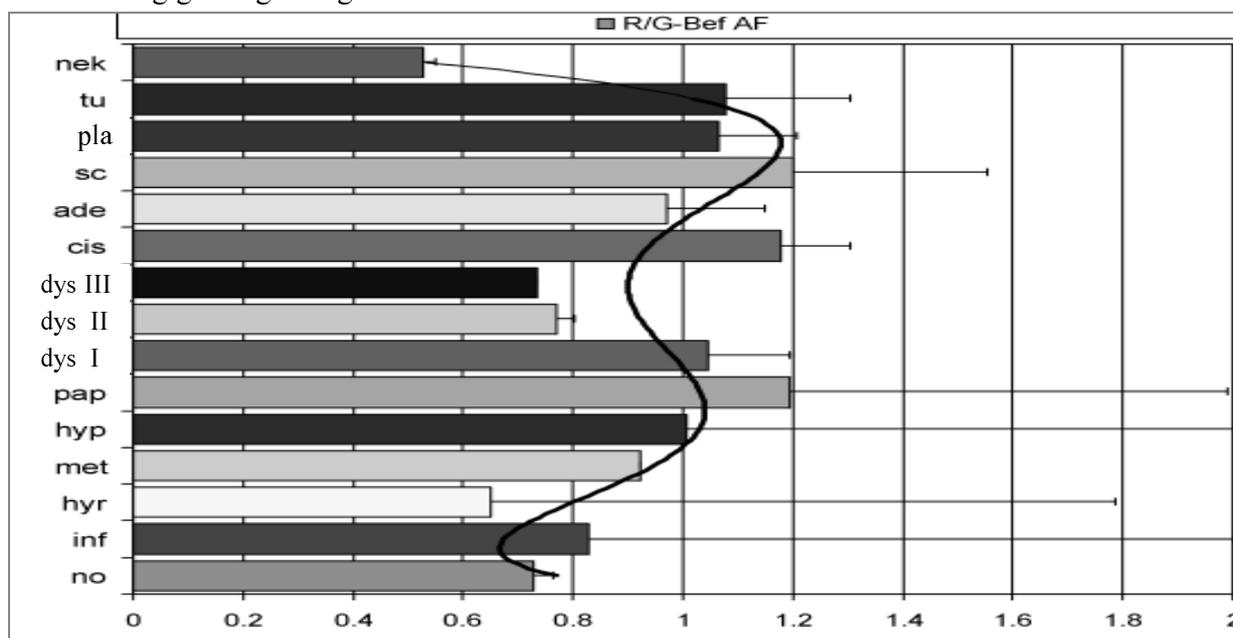


Abb. 35: Rot/Grün-Ratio Autofluoreszenz verschiedener Befunde und ihre Streuung (SD)

Ergebnisse

Die Rot/Grün-Werte der Autofluoreszenz in Abbildung 35 ermöglichen eine Trennung von Pappillomatose, leichter Dysplasie, CIS, Adenokarzinom, kleinzelligem Karzinom, Plattenepithelkarzinom von Normalgewebe, Entzündung und Zellhyperplasie. Für die moderate/schwere Dysplasie scheint die Trennung noch nicht ausreichend zu sein. Insbesondere hier und bei den Nekrosen ergeben sich nach Abbildung 36 Vorteile durch das Ratio Blau/Grün, das insgesamt auch geringeren Schwankungen unterworfen ist. Die beste Diskriminierung wird ermöglicht, wenn das Normalgewebe einheitlich ist.

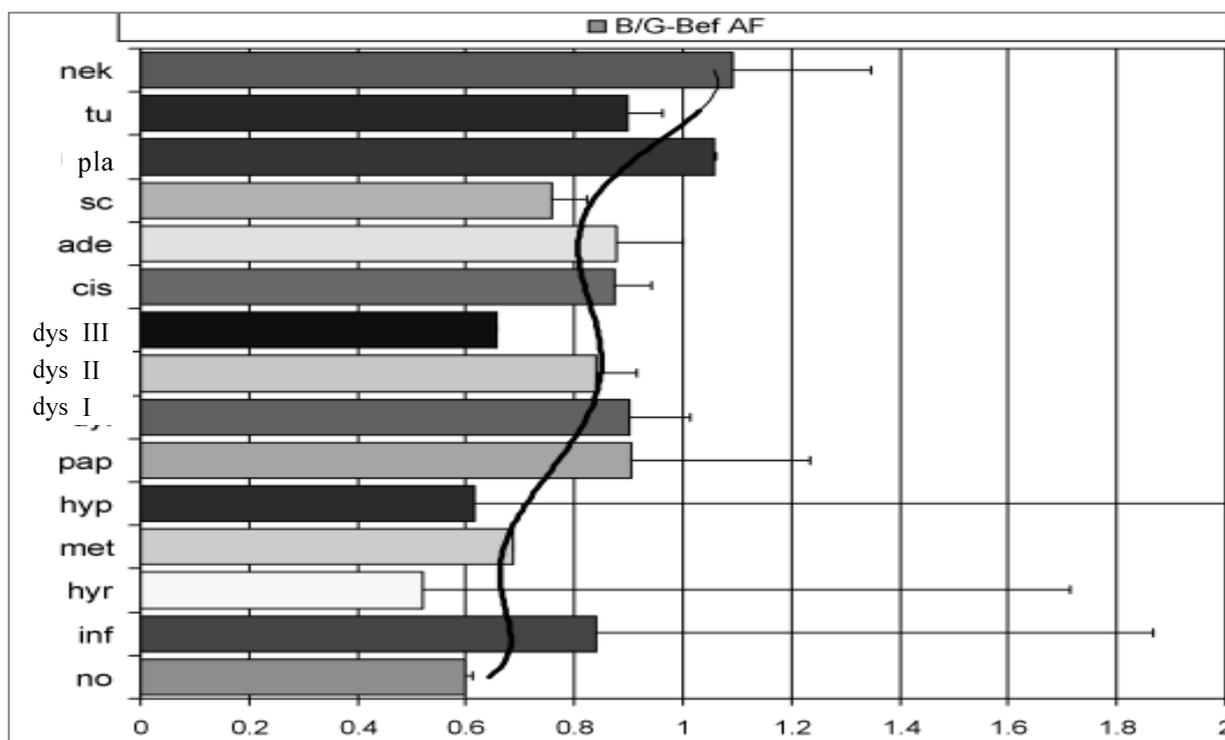


Abb. 36: Blau/Grün-Ratio Autofluoreszenz verschiedener Befunde und ihre Streuung (SD)

3.4.2 Farbratios des Normalgewebes im Autofluoreszenzmodus

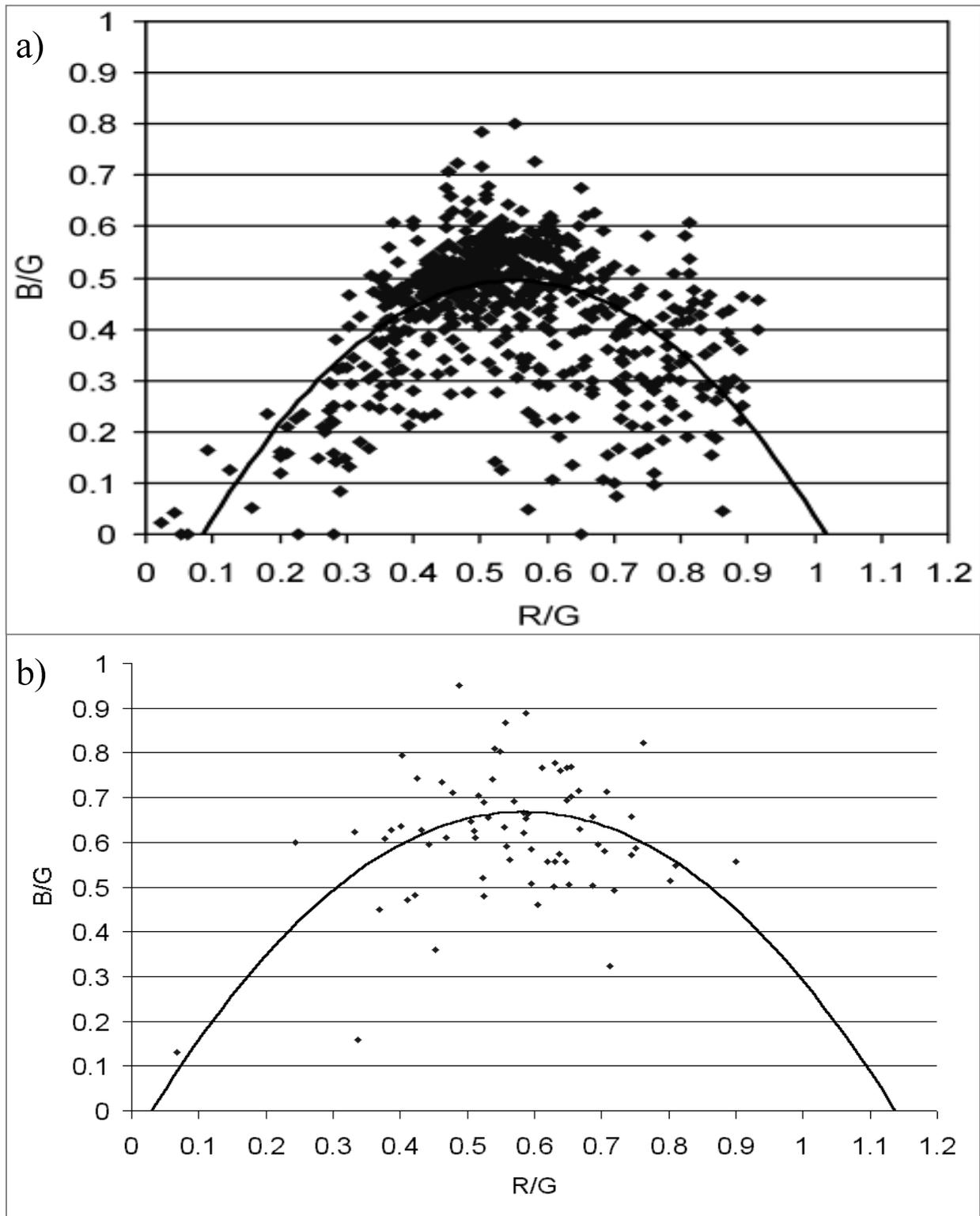


Abb 37: Verteilung der AF-Ratios des Normalgewebes, parabelförmige Approximation a) wandständiger Bereich bei einem Patienten b) Farbratiowerte bei vielen Patienten

Ergebnisse

Für sich betrachtet ist die Homogenität des Normalgewebes ein wichtiger Faktor, um Befunde überhaupt diskriminieren zu können. Korreliert man die Ratios Rot/Grün und Blau/Grün, so finden sich auch für verschiedene Patienten die Ratiowerte des Normalgewebes hauptsächlich an einem Punkt im Diagramm. Dennoch schwanken die Werte in Blau/Grün-Richtung und mehr noch in Rot/Grün-Richtung. Durch Anpassung von Kurven verschiedener Grade sieht man, daß eine Parabel als Regressionskurve die Werte am Besten beschreibt. Dies gilt für die obigen Datenwerte, wobei viele der Befunde aus Karinenbereichen stammen (Abbildung 37b). Wandständige Bereiche sind durch strukturelle Muster mit stärker abwechselnden Fluoreszenzen behaftet (Abbildung 37a).

Die Parabel geht durch folgende Punkte in Abbildung 37b):

Beginn (0, 0) Maximum (0.6, 0.65) Ende (1.1, 0)

Daraus errechnet sich folgende Formel für normales Gewebe:

$$\text{Gleichung 12a: (B/G)} = 2 \cdot (\text{R/G}) - p \cdot (\text{R/G})^2$$

$$\text{Gleichung 12b: (B/R)} = 2 - p \cdot (\text{R/G})$$

$$\text{Gleichung 12c: } p = (2 - (\text{B/R})) / (\text{R/G})$$

Für die obigen Datenwerte ergibt sich ein p-Wert von 1.8.

Dieser Parameter wird kleiner durch eine große Epitheldicke, eine dünne obere Submucosa, eine hohe Blutabsorption in der unteren Submucosa, eine geringe Blutabsorption in den oberen Schichten, eine hohe Streuung in den oberen Schichten. Daher ist die Änderung der Parabelform über den Parameter p auch der Schlüssel zum Verständnis der Fluoreszenz der Befunde. Genauer untersucht werden im nachfolgenden die Zusammenhänge zwischen diesem Parameter, der Schichtdicke und der Streuung der Befunde. Dazu werden aus Simulationsrechnungen zunächst die roten und grünen Fluoreszenzwerte und die blauen Remissionswerte für verschiedene Schichten ermittelt.

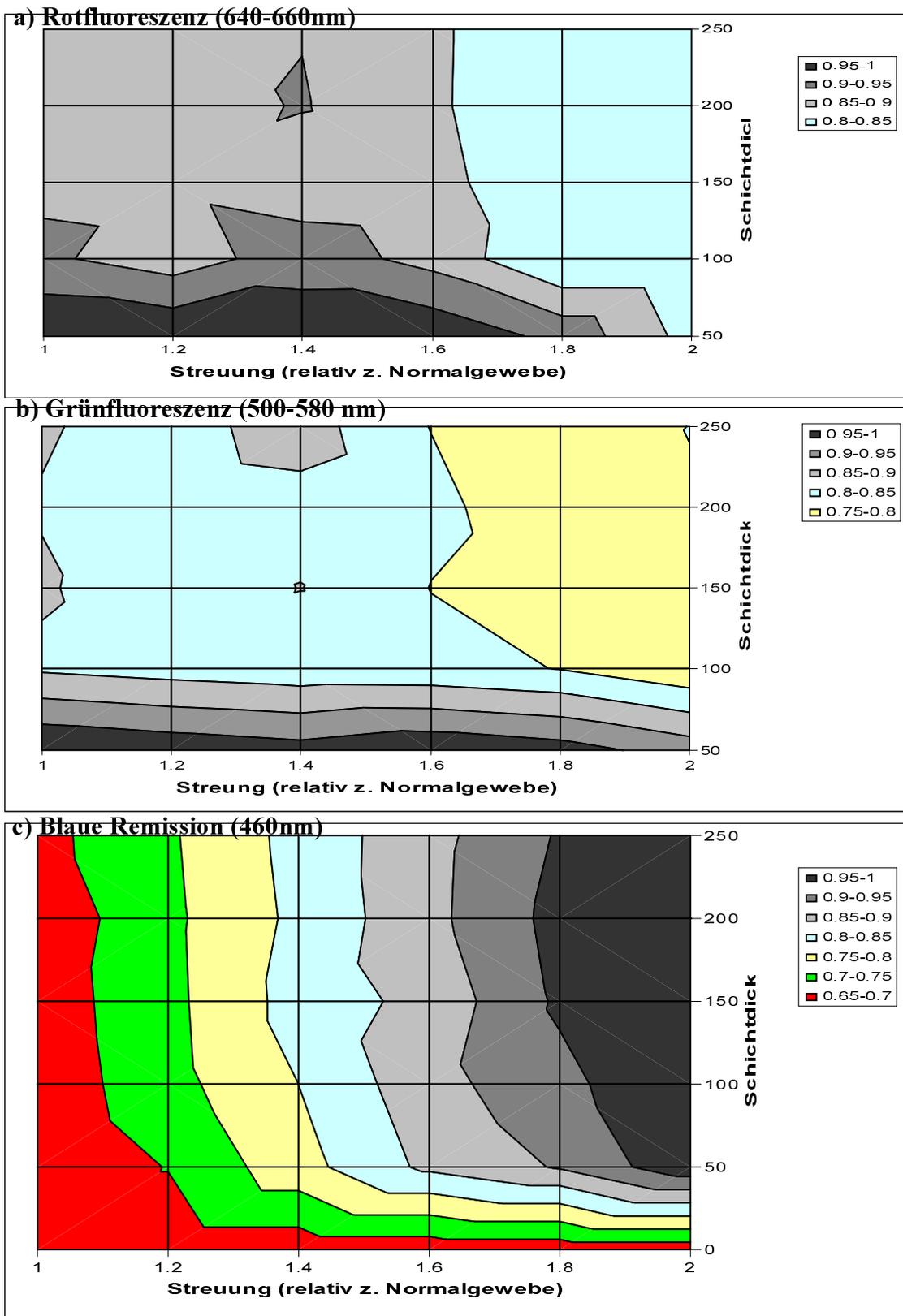


Abb 38: Farbwerte normiert auf das Maximum in der Montecarlosimulation für verschiedene Schichtdicken und relative Streuungen des Epithels: a) Rotfluoreszenz, b) Grünfluoreszenz, c) blaue Remission

Ergebnisse

Die rote Fluoreszenz ist zum einem abhängig davon, wieviel anregende Photonen ankommen, das heißt von der Schichtdicke und zum anderen, ob sie durch starke Streuungseinflüsse (auch Rot) absorbierenden Schichten zugeführt wird (nach Abbildung 38a). Die Grünfluoreszenz ist weitestgehend umgekehrt proportional zur Schichtdicke d , die Remission ist weitestgehend proportional zur relativen Streuung s (Faktor zum Normalgewebe), hat aber auch für Epithelschichten ohne relevante Streuung einen festgelegten Wert ($c=0.25$), der in diesem Falle durch die Submucosa bedingt ist (nach Abbildung 38b). Für Schichtdicken bis etwa $150\ \mu\text{m}$ und Streuungen bis zum etwa 1.6-fachen der Normalgewebstreueung kann aus den obigen Abbildungen (Abbildung 38 a-c) in etwa folgende Beziehungen abgelesen werden:

$$\text{Gleichung 13a): } R \sim (1.2 - 0.2 s)/d^{0.06}$$

$$\text{Gleichung 13b): } G \sim 1.4/d^{0.1}$$

$$\text{Gleichung 13c): } B \sim 0.4 s + 0.25$$

Gemäß Gleichung 12c) kann daraus der Parameter p berechnet werden, der sehr stark variiert mit der Dicke des Epithels und der Streuung des Epithels.

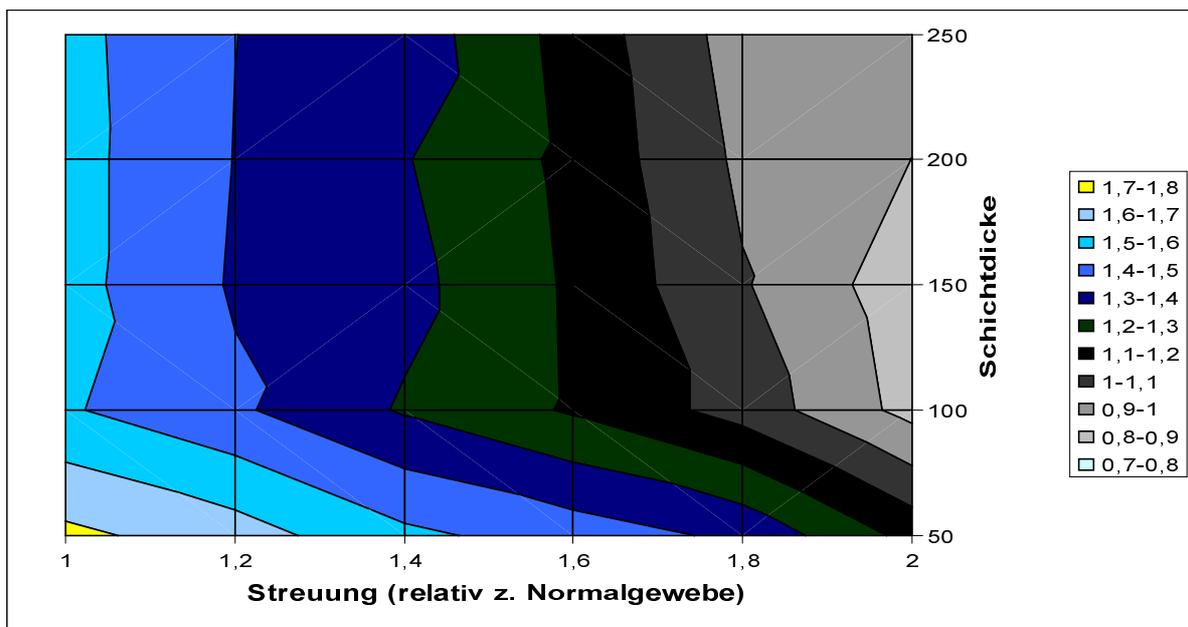


Abb 39: Berechnung von p -Werten für verschiedene Schichtdicken und Streuungen des Epithels

Ergebnisse

Der Parameter p variiert gemäß Abbildung 39 sehr stark mit der Schichtdicke (gerade auch für kleine Schichtdickenänderungen zum Normalgewebe) und der Streuung, so daß sich pathologische Befunde mit diesem Parameter sehr gut vom Normalgewebe trennen lassen. Desweiteren erklärt die Variation von p auch die höhere Schwankung des Rot/Grün-Ratios im Vergleich zum Blau/Grün-Ratio und die niedrige Schwankung des (Rot+Blau)/Grün-Ratios, das eine Tangente der Parabel darstellt und senkrecht zu den Ursprungsgeraden (Rot/Blau = const.) steht. Eine Variation der absorptiven Eigenschaften im Normalgewebe führt hingegen nur zu geringen Veränderungen des Parameters p und führt damit zu keiner Überschreitung der festgesetzten Schwelle (Rot+Blau)/Grün. Eine geringfügige Erhöhung der Schichtdicke (oder der Streuung) könnte p so stark ändern (Abbildung 39), daß gerade am Punkt der Tangente Überschreitungen des festgelegten Schwellwertes $(R+B)/G=1.1$ möglich werden. Weiterhin ändert sich der Wert von p ab einer Schichtdicke von etwa $100 \mu\text{m}$ nicht mehr. Hier kann gemäß Abbildung 39 nur eine erhöhte Streuung eine weitere Diskriminierung ermöglichen.

Ergebnisse

3.4.3 Farbratios der Befunde im Autofluoreszenzmodus

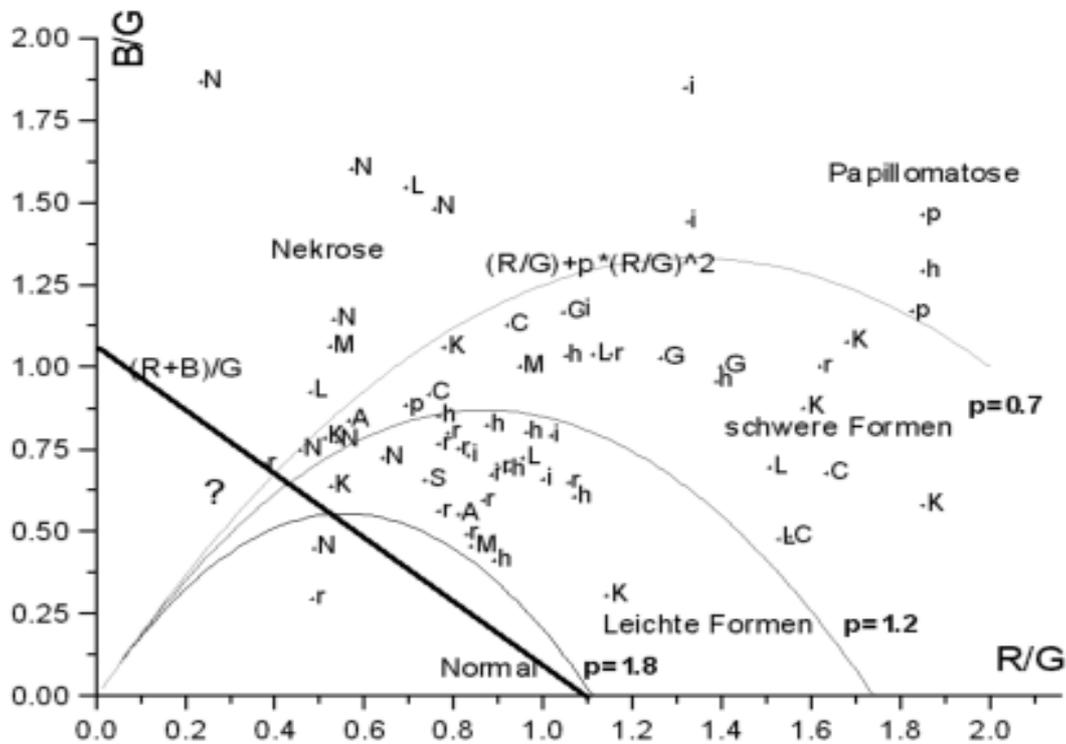


Abb. 40: Verteilung der AF-Ratios von Befunden: i = Entzündung, r = Reservezellhyperplasie, h = Hyperplasie, p = Papillomatose, L = leichte Dysplasie, M = moderate Dysplasie, S = schwere Dysplasie, C = CIS, K = Kleinzelliges-Ca, G = Plattenepithel-Ca, A = Adeno-Ca, N = Nekrosen. Vergleich der parabolischen Diskriminierungslinie mit der visuellen Diskriminierungslinie. Weitere parabolische Diskriminierungslinien zur Unterscheidung von Befundtypen. Primäre Selektion der Befunde nach dem visuellen Eindruck: (Rot+Blau)/Grün-Wert.

Zur Prüfung der vorherigen Aussagen wurden in Abbildung 40 alle aufgenommenen Befunde im Blau/Grün vs Rot/Grün-Diagramm aufgetragen und mit Parabeln verschiedener p-Werte verglichen. Es lassen sich damit im wesentlichen drei Hauptbereiche festlegen: Normal ($p < 1.8$), leichte Befunde ($1.2 \leq p < 1.8$) erklärbar nach Abbildung 39 allein mit erhöhter Schichtdicke ($50\mu\text{m}-100\mu\text{m}$) und schwere Befunde ($0.6 \leq p < 1.2$) erklärbar nach Abbildung 39 mit erhöhter Streuung. Nur Nekrosen und Papillomatosen scheinen eine davon abweichende Farbcharakteristik zu haben. Ersteres kann durch die erhöhte Streuung abgestorbenen Zellmaterials (blau/weißliches Erscheinungsbild in der Endoskopie), letzteres durch eine

Ergebnisse

erhöhte Streuung und eine erhöhte Rotfluoreszenz im Vergleich zur Grünfluoreszenz bzw. durch einen starken Rückgang der Grünfluoreszenz erklärt werden (hell pinkes Erscheinungsbild in der Endoskopie). Das zur visuellen Detektion adäquate (Rot+Blau)/Grün-Ratio (Schwellwert (Rot+Blau)/Grün=1.1) führt zu einer guten Trennung von verdächtigem Befund und Normalgewebe, ist aber noch mit dem Nachteil behaftet, daß es Bereiche (=?) gibt, in denen sich weitere Befunde befinden könnten.

Signifikanzniveaus Gewebsunterschiede p (t-Test)

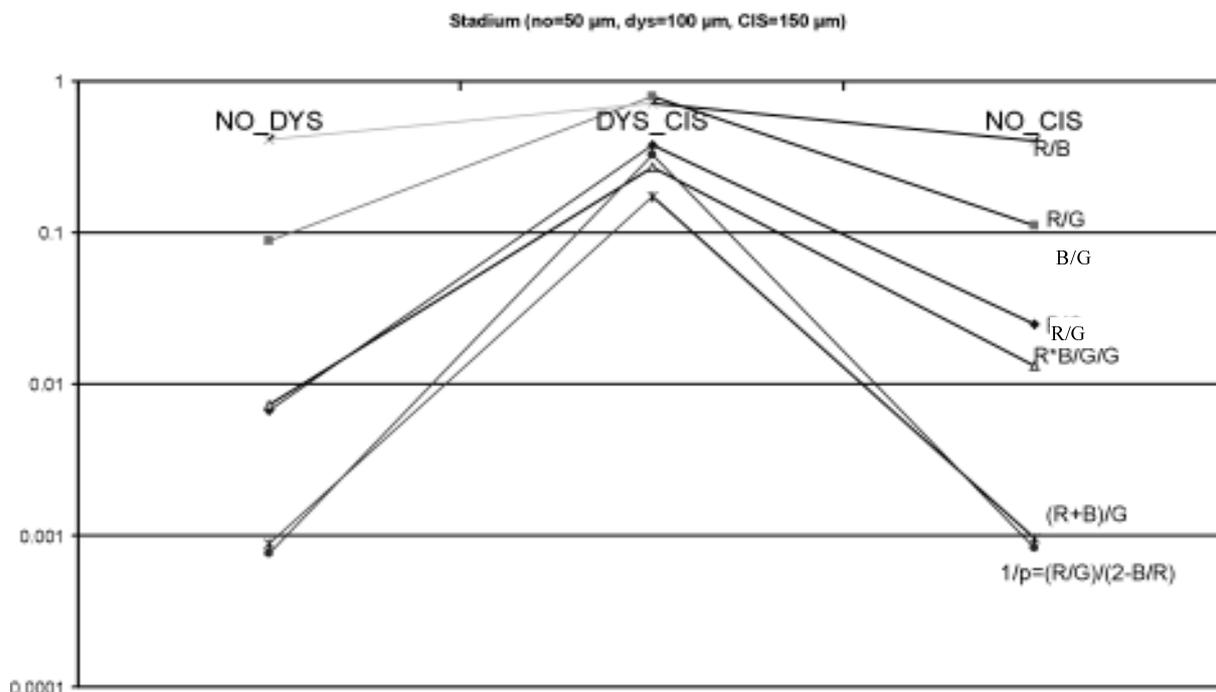


Abb. 41: Signifikanzniveaus für die paarweise Unterscheidung von Normalgewebe (NO), Dysplasien I-III (DYS) und Carcinoma in situ (CIS) für die Ratios Blau/Grün (Streuung betont), Rot/Grün (Fluoreszenz betont), (R/G):(B/G) (Winkelunabhängigkeit betont), $1/p=(R/G)/(2-B/R)$ (parabolischer Zusammenhang betont), (Rot+Blau)/Grün (Ratio adäquat zum visuellen Eindruck). Primäre Selektion der Befunde nach dem visuellen Eindruck.

Am besten läßt sich der Wert der verschiedenen diagnostischen Verfahren der Bildverarbeitung in Autofluoreszenz zeigen, indem Signifikanzniveaus der Befunddiskriminierungsmöglichkeiten miteinander verglichen werden (Abbildung 41). Eine signifikante Unterscheidung zwischen Dysplasie und CIS konnte für keines der Verfahren nachgewiesen werden. Alle Ratios außer Rot/Blau korrelieren mit der Schichtdicke. Wenn der Hauptunterschied zwischen

Ergebnisse

Dysplasie (ca. 70 μm), CIS (ca. 120 μm) und dem Normalgewebe (ca. 50 μm) die Schichtdicke ist, so ist es nicht verwunderlich, daß Rot/Blau zunächst nur eine schlechte Unterscheidung ermöglicht. Allerdings steigt gerade dieses Ratio bei schwereren Befunden an (siehe Abbildung 42), so daß diese Information nach der Separation der verdächtigen Befunde vom Normalgewebe bei der Klassifizierung durchaus eine Rolle spielt. Die beste Unterscheidung ist mit dem Ratio (Rot+Blau)/Grün und der parabolische Diskriminierung möglich und damit besser als eine kanalweise Remissionskorrektur und die winkelunabhängige Diskriminierung und immer noch besser als die Diskriminierung über das Ratio Rot/Grün. Insbesondere die Güte des (Rot+Blau)/Grün-Ratios hängt aber noch ab von der visuellen Selektion der Befunde, so daß die sehr gute Unterscheidung zwischen Normalgewebe und verdächtigem Befund (Dysplasien/CIS) nicht verwundert, wohl aber die immer noch bessere Unterscheidung zwischen Dysplasien und CIS.

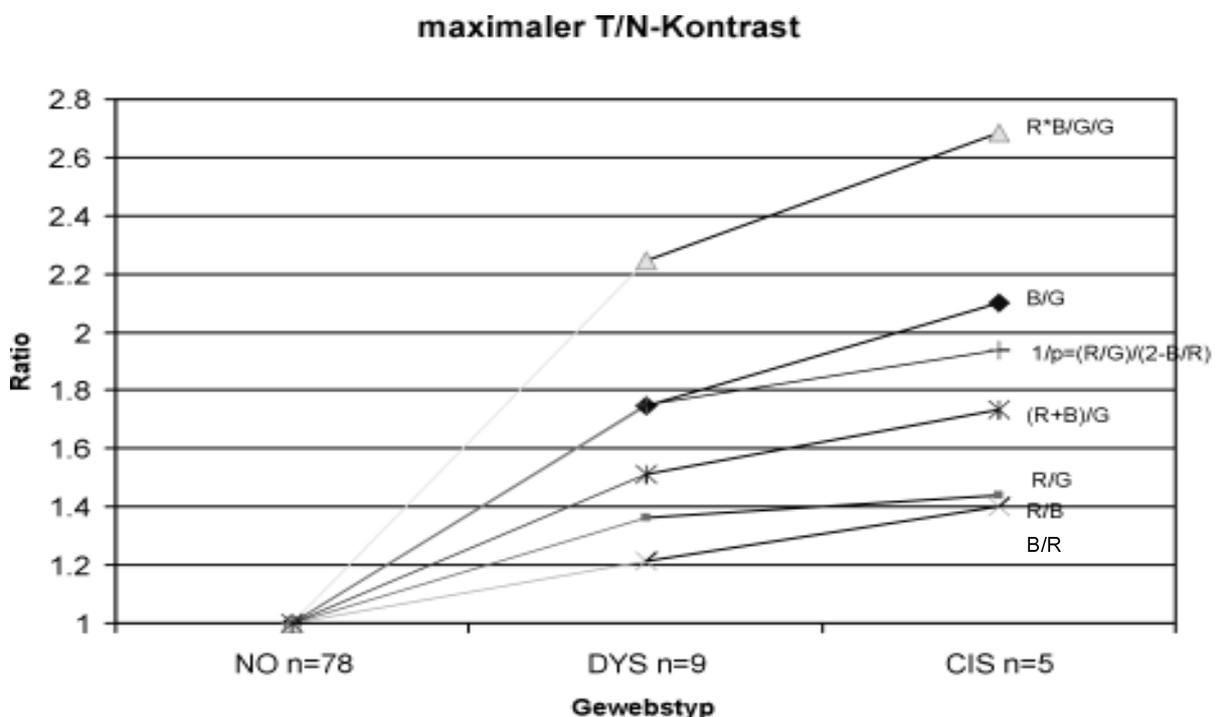


Abb. 42: Relativer Kontrast zum Normalgewebe (= ca. 50 μm) von Dysplasien (DYS = ca. 70 μm) und Carcinoma in situ (CIS = ca. 120 μm) für die Ratios Blau/Grün (Streuung betont), Rot/Grün (Fluoreszenz betont), (R/G):(B/G) (Winkelunabhängigkeit betont), $1/p=(R/G)/(2-B/R)$ (parabolischer Zusammenhang betont), (Rot+Blau)/Grün (Ratio adäquat zum visuellen Eindruck) und Rot/Blau (Ratio adäquat zum Blutgehalt oberer Schichten)

Ergebnisse

Auch beim Kontrast der einzelnen Ratios ergeben sich Unterschiede. Rot/Grün zeigt einen langsamen Anstieg zum CIS. Dieser dürfte auf einer Zunahme der Schichtdicke beruhen. Der Kontrast des gemittelten Ratios (Rot+Blau)/Grün ist etwas geringer als der des Ratios Blau/Grün. Die Schwankungen der Blutabsorption werden aber ebenfalls minimiert und es ist verständlich, warum remissionskorrigierte Ratios eine bessere Diskriminierung von Befunden ermöglichen. Die parabolische Diskriminierung hat hier einen höheren Kontrast als die Unterscheidung mit (Rot+Blau)/Grün. (Rot+Blau)/Grün ist für CIS (Schichtdicke ca. 120 μm) ca. 1.70-fach höher als für das das Normalgewebe.

3.4.4 Diskriminierung von Befundrändern: Autofluoreszenz

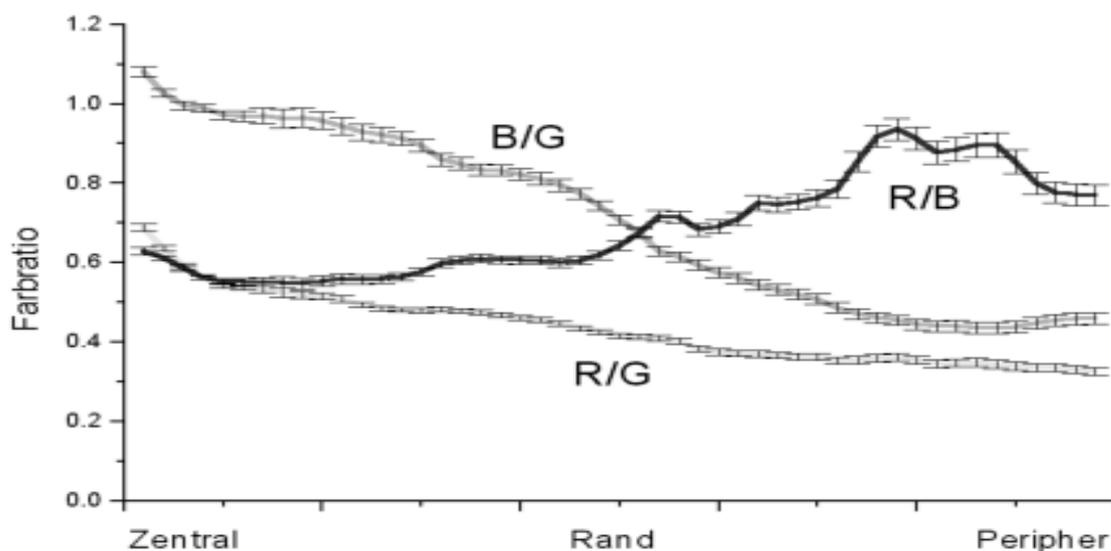


Abb. 43: Abhängigkeit der Ratios Rot/Grün, Blau/Grün und Rot/Blau eines grenzwertigen Befundes (moderate Dysplasie in der Bronchialwand) nach Untersuchung in AF von der Lage (zentral, am Rand der Sichtbarkeit, in der Peripherie), Mittelung aller Pixelwerte des flächigen Befundes in gleichem relativen Anstand von Rand und Zentrum

Für die Darstellung von Befunden in der Endoskopie sind nicht nur die punktuellen Werte an den Biopsiestellen, sondern auch die Befundränder interessant, zumal diese oft für therapeutische Fragestellungen herangezogen werden müssen. Exemplarisch ist dies anhand der Farbra-

Ergebnisse

tios Blau/Grün, Rot/Blau und Rot/Grün an dem grenzwertigen Befund einer mittelgradigen Dysplasie dargestellt (Abbildung 43). Hier wird folgendes sichtbar: Das Farbratio Blau/Grün ist für sehr dünne Schichtdicken relativ höher als das Farbratio Rot/Grün und weist am Rand einen deutlichen Kontrastsprung auf. Das Rot/Blau-Ratio ist für diesen Befund kleiner als das Rot/Blau-Ratio des Normalgewebes. Hauptursache für den höheren Kontrast ist eine erhebliche Steigerung des Blauanteils. Der ausgeprägte Knick des Blau/Grün-Ratios am Rand von ca. 0.2 Einheiten entspricht einer Anhebung gegenüber dem Normalgewebe um den Faktor von 1.40. Dieser Kontrastsprung kann nicht durch eine plötzliche Änderung der Schichtdicke verursacht sein, da er sich sonst gemäß Abb. 26 als Absenkung der Grünfluoreszenz darstellen müsste, und sich daher auch im Rot/Grün-Ratio wiederfinden müsste.

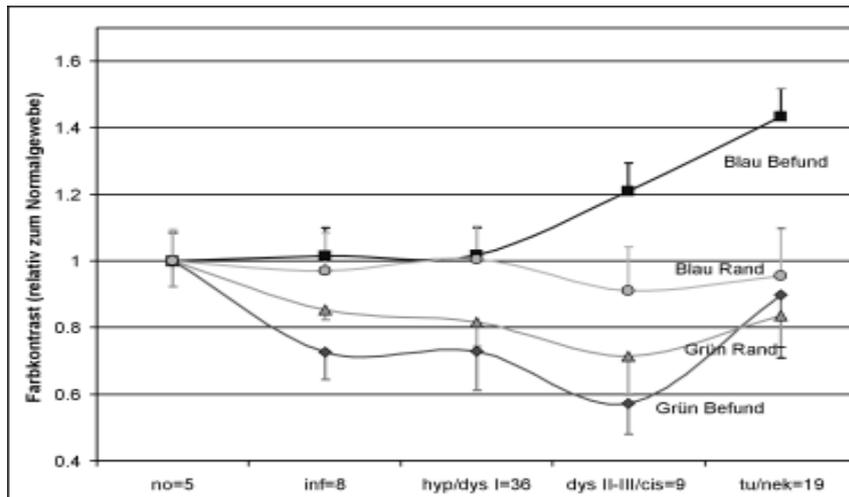


Abb. 44: Abhängigkeit des Kontrastsprunges verschiedener Farben (Normiert auf Rot, Peripherie) zwischen Befund und umliegendem Normalgewebe bei verschiedenen Befunden nach Untersuchung in AF von der Lage bezüglich der nachfolgenden Biopsie (zentral, am Rand der Sichtbarkeit, in der Peripherie)

Eine weitere Frage ist, wie sich verschiedene Befunde in der Diskriminierung des Randes darstellen (Abbildung 44). Für alle Befunde findet sich eine Absenkung des Kontrastes der Grünfluoreszenz des Randes und des Befundes, während die blaue Remission am Rand in etwa

gleich hoch ist, wie in der Peripherie und ab der mittelgradigen Dysplasie stark zunimmt. Dies findet sich bis hinauf zum Tumor und am stärksten bei den Nekrosen. Somit scheint eine Differenzierung in normale, leichte und schwere Befunde möglich zu sein.

3.4.5 Adaptation eines Neuronalen Netzes zur Diskriminierung von Farbratios

Zur Prüfung, ob eines der in Kapitel 3.4 angesprochenen Verfahren über einen nichtlinearen Zusammenhang besser beschreibbar ist, als durch ein einfaches Ratio, wurde mit den Farbratioswerten jeweils ein neuronales Netz nach Kohonen antrainiert und dann die einzelnen Neurone mit ihrer individuellen Farbcharakteristik mit der Histologie verglichen und versucht nachbarschaftliche Gruppen von Neuronen histologischen Gruppen zuzuordnen (modifiziert nach Decker 1994). Auf diese Weise werden in nahezu optimaler Weise nur die Farbratioswerte zusammengefaßt, die eine diskriminierbare Farbcharakteristik aufweisen. Die Methodik könnte verglichen werden mit dem parvozellulären System unseres visuellen Systems, und konzentriert sich eher auf Farben als auf Farbratiosschwellwerte. Bei bestimmten Farben/Farbratios feuern dann bestimmte Neurone (Kandel et al 1998).

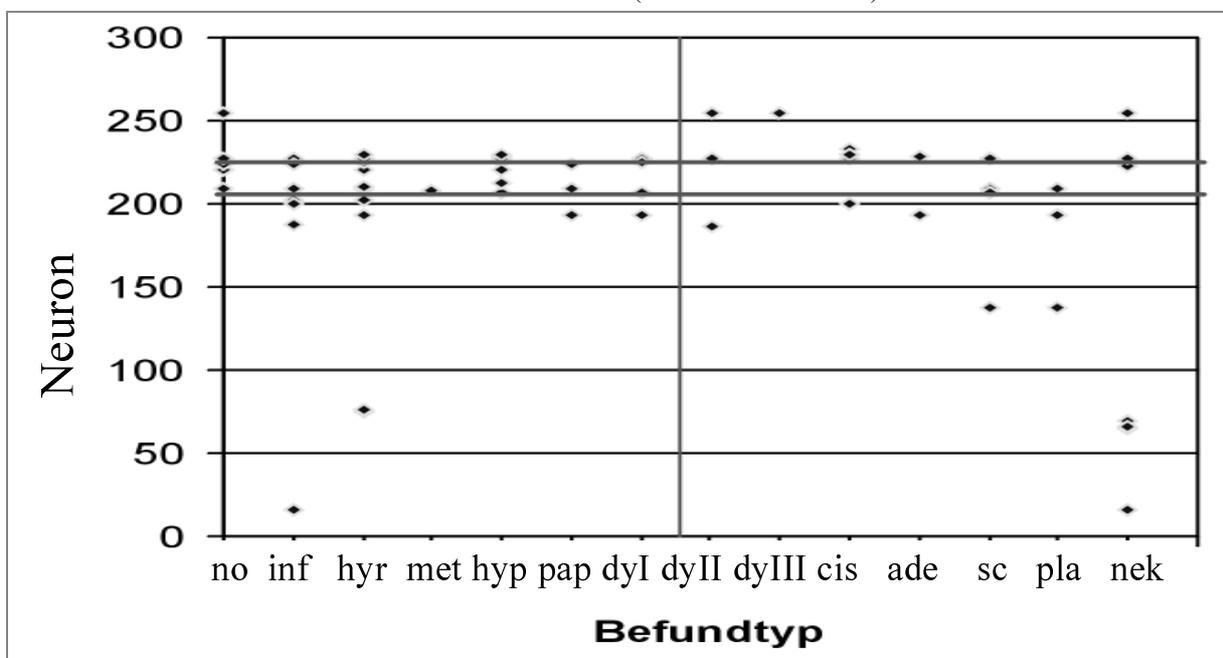


Abb. 45: Neuronales Netz nach Kohonen zur Diskriminierung von Farbkontrasten in der Weißlichtdiagnostik. Korrelation passender Neurone mit trainiertem Farbkontrast mit den Befunden zur Berechnung von Sensitivität und Spezifität.

Ergebnisse

Für die Tumor- zu Normalkontraste der Farbratios des Weißlichtbildes konnten normale Befunde bis hin zur leichten Dysplasie durch die Neurone 205 - 225 beschrieben werden (Abbildung 45). Wenn man diesen Bereich noch ein klein wenig einschränkt und alle anderen Neurone als verdächtige Befunde anzeigende Neurone bezeichnet, wird gerade 90% Sensitivität erreicht. Die geringe Bandbreite der den unverdächtigen Befunden zugeordneten Neurone weist bereits darauf hin, daß das Verfahren aufgrund des schwachen Eingangskontrastes mit großen Unsicherheiten behaftet ist. Charakteristisch für die Güte der Diskriminierung bleibt aber als Vergleichskriterium die Spezifität (Rate der fälschlich als positiv bezeichneten Befunde). Diese wird in Tabelle 9 mit Ergebnissen anderer Methoden der Befunddiskriminierung verglichen.

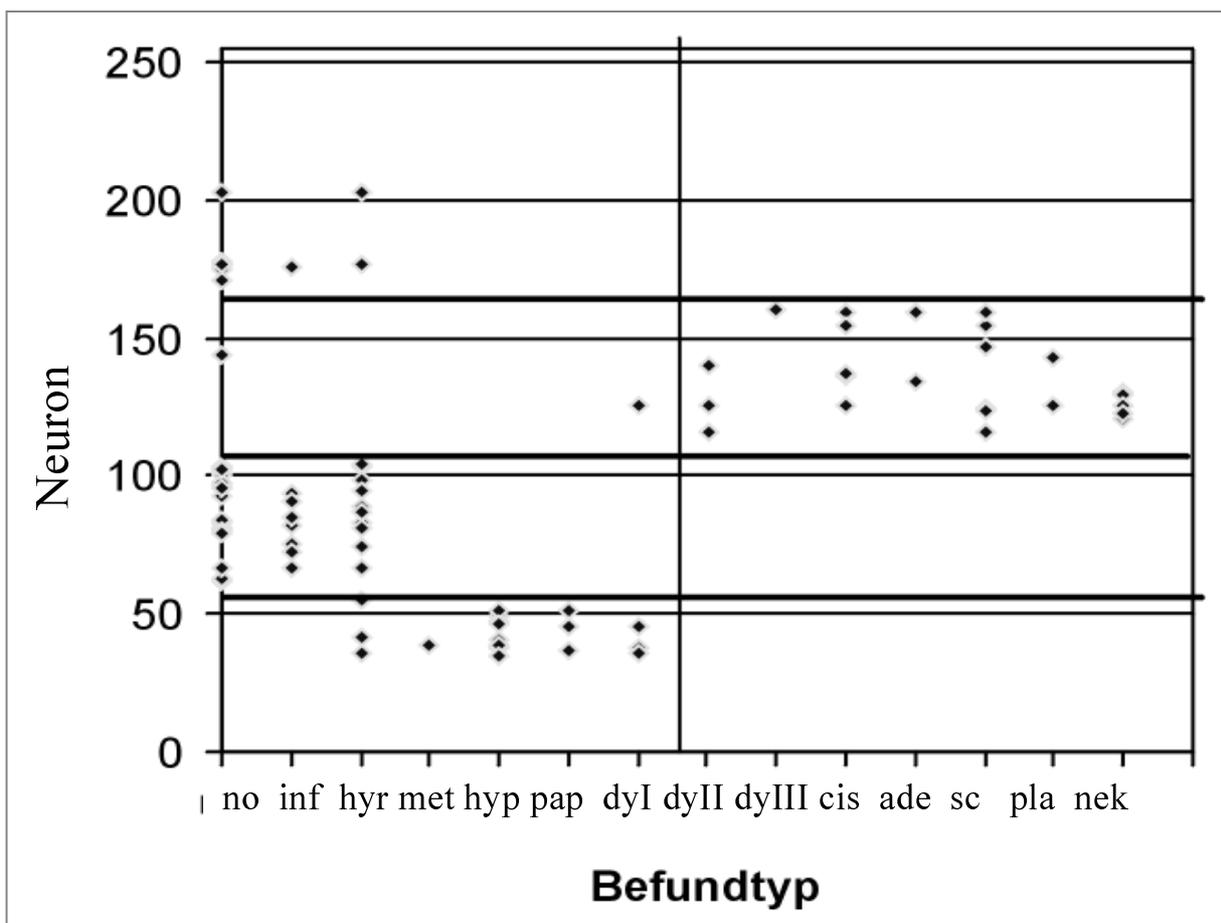


Abb. 46: Neuronales Netz nach Kohonen zur Diskriminierung von Farbratiowerten in der Autofluoreszenzdiagnostik. Korrelation passender Neurone mit aus den Daten trainiertem Farbratio mit leichten (\leq leichte Dysplasie) und schweren (\geq moderate Dysplasie) Befunden zur Berechnung von Sensitivität und Spezifität.

Ergebnisse

Besser und einfacher möglich ist die Diskriminierung mittels Autofluoreszenz (Abbildung 46). Obgleich hier nur die punktuellen Farbratios verwendet werden, reicht dies aus, um drei histologische Gruppen mit Gruppen von Neuronen zu charakterisieren. Neuron 0 - 55 sprechen bei den leichten Befunden an. Neuron 55 - 105 und Neuron 170 - 255 bei normalen Gewebe bis maximal bei Reservezellhyperplasien. Die Uneinheitlichkeit des Normalgewebes beruht vor allem auf Messungen von bereits unsichtbaren Schichtdickenänderungen (unterhalb des klinisch sinnvollen Schwellwertes) in der Nähe von Befunden. Bei Befunden größer gleich Dysplasie II werden die Neurone 105 - 170 angesprochen. Durch eng anliegende Diskriminierungsgrenzen wird die Sensitivität auf 95 % festgesetzt. Im Vergleich zur Weißlichtdiskriminierung ist es hier wesentlich einfacher, Grenzen zu ziehen. Auch die jeweiligen Bandbreiten sind wesentlich größer. Dies wirkt sich auch aus auf die Spezifität, die in Tabelle 9 vergleichend dargestellt ist.

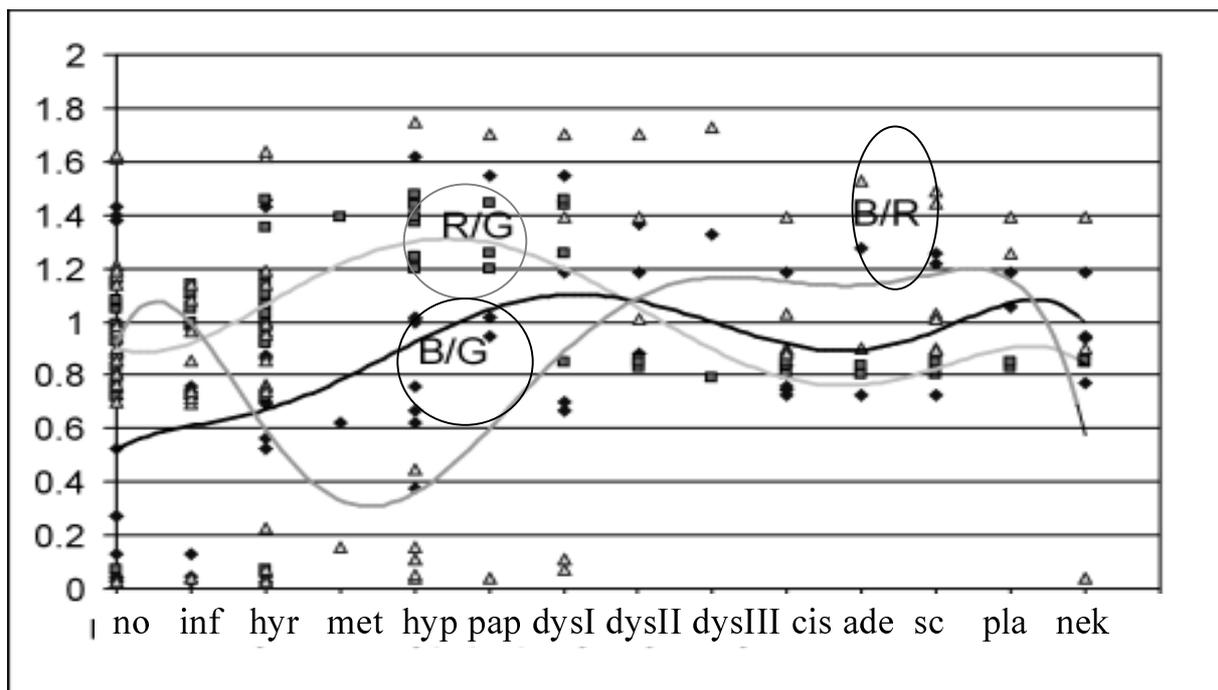


Abb. 47: Farbratiowerte einzelner Neurone aufgetragen nach ihren zugehörigen Befundtyp zur Klassifizierung beliebiger Befunde nach dem Distanzminimum der Farbe.

Den Neuronen sind bestimmte Farbratiowerte zugeordnet (Abbildung 47). Ein neues Farbratio wird immer primär demjenigen Neuron zugeordnet, das den geringsten geometrischen

Ergebnisse

Abstand bezüglich des Farbratios aufweist. In der Lernphase bewegen sich dann dieses Neuron und seine unmittelbaren Nachbarn (Die Neurone sind in einer linearen Kette angeordnet) auf den neuen Farbratiowert zu. So wird der 3-dimensionale Raum der Farbratios von der Neuronenkette durchzogen und es kann später für jeden einkommenden Farbratiowert (Punkt im Raum) das nächstliegende Neuron der Kette gefunden werden und antworten. Die in Abbildung 44 für die verschiedenen Befunde angegebenen Farbratiowerte der Neurone sind daher als Eckwerte zu verstehen, die zu realen Farbratiowerten nach der Trainingsphase einen minimalen Abstand haben. Diese einfache Möglichkeit der optimalen Linearisierung mehrdimensionaler Datensätze betont zudem wichtige Farbratiowerte (häufiger auftretende Farben) durch eine höhere Neuronendichte (=Detailauflösung) in diesem Bereich.

3.5 Klinischer Vergleich der Methoden Weißlicht, Autofluoreszenz

Letztlich interessant ist klinische Vergleich der verschiedenen Methoden.

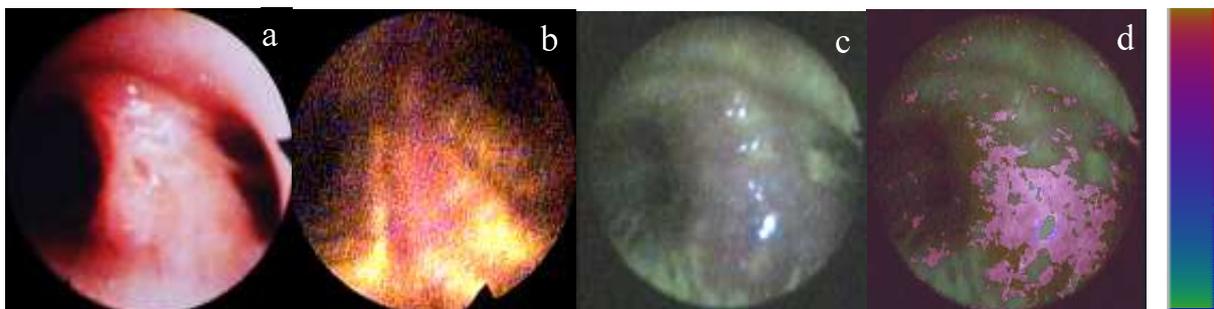


Abb. 48: Carcinoma in situ der Oberlappenkarina einer Patientin: a) Weißlichtbefund, b) Autofluoreszenzbefund adäquat zur Methode Xillix c) Autofluoreszenzbefund Storz d) elektronisch verarbeitetes Ratiobild (Blau+Rot)/Grün

Im endoskopischen Bild (Abbildung 48 a-d) stellt sich der CIS-Befund an der Oberlappenkarina einer Patientin für verschiedene Methoden verschieden stark kontrastiert dar. Der Kontrast im Weißlicht und in der einfachen Rot/Grün-Darstellung ist gering. In der (Rot+Blau)/Grün-Darstellung ist der Kontrast höher und wird mittels Bildverarbeitung (hier im wesentlichen als verstärkte Anfärbung der Bereiche mit einem (Rot+Blau)/Grün-Wert oberhalb einer bestimmten Schwelle) kontrastreicher dargestellt. Die Verstärkung des Kontrastes durch Hinzunahme weiterer Farbkanäle sieht man am besten anhand der

Ergebnisse

nachfolgenden Darstellung eines kleinzelligen Karzinoms, bei dem neben dem Weißlicht eine reine Grünfluoreszenz (adäquat zu einem Endoskopiesystem der Firma Pentax), eine gemischte Darstellung aus Rotfluoreszenz und Grünfluoreszenz (adäquat zu einem Endoskopiesystem der Firma Xillix), sowie eine Darstellung mit einer zusätzlichen blauen Remission verglichen wird. Übersehen worden wäre das kleinzellige Karzinom in der Weißlichtdarstellung. Innerhalb der Reihe Abbildung 49b-d erscheinen insbesondere die Befundränder immer schärfer kontrastiert. In Abbildung 49d verbessert sich zusätzlich die geometrische Zuordnung über die blauen Glanzlichter.

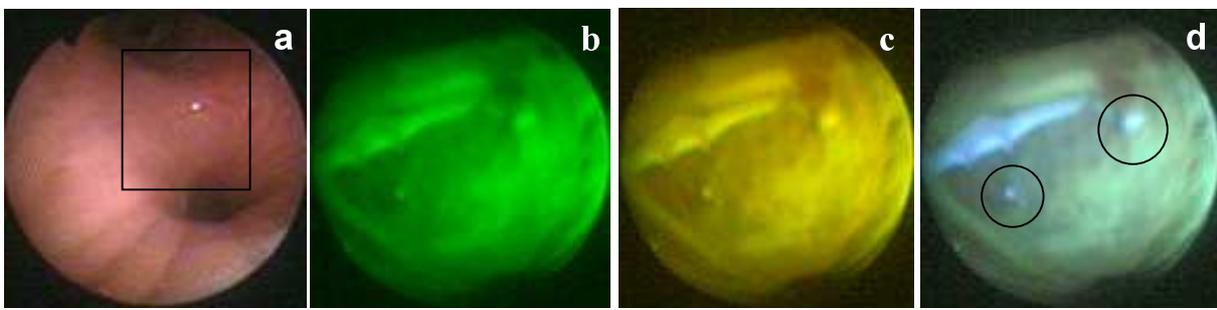


Abb. 49: Kleinzelliges Karzinom der rechten Unterlappenbronchuswand eines Patienten:

a) Weißlichtbefund, das Quadrat markiert den Befund für den nachfolgenden Vergleich b) Autofluoreszenzbefund ausschließlich Grünkanal c) Autofluoreszenzbefund Rotkanal und Grünkanal d) Autofluoreszenzbefund Storz: Rotkanal, Grünkanal und Blaukanal, Kreise markieren Glanzlichter im Tumorareal und im Normalgewebsareal

Schwierig zu interpretieren ist bislang die falsch positive Fluoreszenz von Narben mit der Autofluoreszenz. Zumindest eine Unterscheidung der leichten Befunde (Metaplasie, Hyperplasie, leichte Dysplasien und Cis) und den Tumorbefunden wäre hilfreich, um eine hohe Spezifität zu erzielen und so die Grenzen von therapierlevanten Befunden festzulegen. Die etwas unterschiedliche Spektroskopie am Ende des blauen Anteil des Spektrums und ganz am Beginn des roten Anteils des Spektrums bei diesen Befundgruppen scheint die Ursache für die Diskriminierbarkeit leichter Befunde von schweren Befunden mit dem neuronalen Netz nach Kohonen (Abbildung 46) zu sein. Aufgrund der gegensätzlichen Effekte wäre dann die

Ergebnisse

Absenkung des Ratios Rot/Blau charakteristisch für leichte Befunde (Häußinger et al 2000) (siehe Abbildung 50).

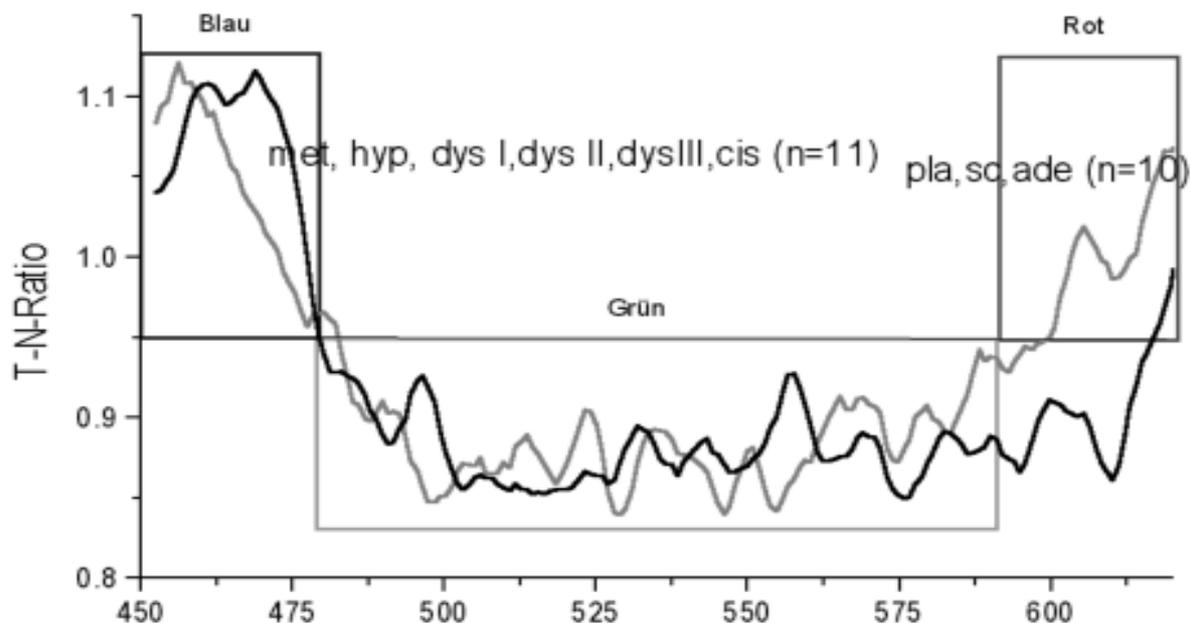


Abb. 50: Verschiedene Möglichkeiten der Kontrastgenerierung mittels endoskopischer Fluoreszenzspektroskopie gleichermaßen bei leichten und schweren Tumorformen im AF-Mode. Normierung der Spektren auf einen Remissionspeak bei 830 nm.

Anhand der spektroskopischen Daten können im Wesentlichen drei Bereiche festgelegt werden: Erhöhung der spektralen Anteile im blauen Bereich (Remission) verstärkt vor allem bei leichten Befunden (ca. 470 nm), Erniedrigung der spektralen Anteile im grünen Bereich (475-580 nm) (Autofluoreszenz) ohne Unterscheidungsmöglichkeit zwischen schweren und leichten Befunden sowie erhöhte Rotfluoreszenz (590 nm-625nm) für Tumorbefunde, bzw. verminderte Rotfluoreszenz für leichte Befunde. Die Zuordnungsmöglichkeit in drei Spektralbereiche entspricht weitestgehend der Farbseparation, die auch von den Farbrezeptoren des Auges geleistet werden. Eine bessere Möglichkeit (und damit eine kontrastreichere Darstellung) ermöglichen spezielle Kameras (3-Chip-Kamera, Endovision, Karl Storz GmbH) (siehe Abbildung 6).

Ergebnisse

Innerhalb der Untersuchungen wurden die Patienten (56 Frauen und 472 Männer) in zwei Gruppen aufgeteilt und in Autofluoreszenz + Weißlicht und Weißlicht alleine untersucht:

Patienten im AF+WL-Arm: 270 Biopsien: 678 Biopsien/Patient: 2.51

Patienten im WL-Arm: 258 Biopsien: 621 Biopsien/Patient: 2.41

visuelle Beurteilung	Histologie						
	Normal	Entzündung	Hyper- plasie/Meta- plasie	Dysplasie I	Dysplasie II/III	CIS	Tumor
	Richtig negativ: 448				Falsch negativ: 12		
WL- (<=abnorm)	88	119	226	15	10	2	19
	Falsch positiv: 50				Richtig positiv: 6		
WL+ (>=suspekt)	6	17	26	1	4	2	86
	Richtig negativ: 264				Falsch negativ: 0		
WL+AF- (WL<=abnorm und AF=normal)	84	67	107	6	0	0	7
	Falsch positiv: 314				Richtig positiv: 26		
WL+AF+ (WL>=suspekt oder AF>=abnormal)	41	86	172	15	18	8	67
	Negativkriterium			Positivkriterium			
Ratio (AF+WL)/WL	6.83	5.05	6.61	15	4.5	4.0	0.78
p-Wert (CHI²)	5.4E-6**	2.5E-14**	7.8E-34**	2.8E-4**	8.14E-5**	0.17	0.16

Tab. 7: Biopsiezahlen verschiedener Befundklassen in der zweiarmligen Studie: WL-Arm Negativ, d.h. normal oder abnorm; Weißlicht positiv, d.h. suspekt oder sichtbarer Tumor; WL+AF-Arm Negativ, d.h. normal oder abnorm im Weisslicht und normal in der Autofluoreszenz; WL+AF positiv, d.h. suspekt oder sichtbarer Tumor im Weisslicht oder abnormal oder suspekt in der Autofluoreszenz; sowie das Ratio (AF + WL)/WL, das in etwa ein Maß ist für die effektive Kontraststeigerung für verschiedene Befunde der zusätzlichen AF-Untersuchung im WL+AF-Arm. p-Wert nach Chi²-Vierfeldertest mit Yates-Korrektur: ** höchst signifikanter Unterschied

Im Allgemeinen werden gemäß Tabelle 7 im AF+WL-Arm mit dem Kriterium WL ist suspekt oder sichtbarer Tumor oder AF ist abnormal oder suspekt ca. 4.0 - 15 mal mehr Dysplasien und CIS-Befunde richtig positiv eingestuft als mit Weißlicht alleine. Dies ist mehr als nach der einarmigen Untersuchung gemäß Tabelle 8:

Ergebnisse

Bei 270 Patienten, die in AF und WL untersucht wurden (freie Untersuchungsmöglichkeit mit beliebigem Wechsel zwischen AF und WL), fanden sich für 678 Biopsate folgende Ergebnisse (Gewertet wurden im AF-Zweig nur die AF-Biopsate, die verdächtiger beurteilt wurden, als unter Weißlicht.):

visuelle Beurteilung	Histologie						
	Normal	Entzündung	Hyperplasie Metaplasie	Dysplasie I	Dysplasie II/III	CIS	Tumor
WL+AF- Gesamt	125	153	279	21	18	8	74
	Richtig negativ WL: 256				Falsch negativ: 0		
Geringer Befund (WL normal)	77	65	111	3	0	0	3
	Falsch positiv WL: 322				Richtig positiv: 26		
WL (>=abnorm)	19	33	46	7	5	5	59
AF (mehr als WL)	29	55	122	11	13	3	12
	Negativkriterium				Positivkriterium		
Ratio (AF+WL)/WL	2.52	2.66	3.65	2.57	3.60	1.80	1.20
p-Wert (CHI²)	6.4E-5**	2.7E-10**	6.0E-26**	1.6E-3**	3.1E-5**	0.20	5.6E-3**

Tab. 8: Biopsiezahlen verschiedener Befunde in einer kombinierten WL/AF-Untersuchung im WL+AF-Arm: Gesamtzahl der Befunde, Geringe Befunde (AF nicht schwerer beurteilt als WL), Befunde im WL-Mode als abnorm, suspekt oder sichtbarer Tumor klassifiziert, zusätzlich dazu gefundene Befunde in AF-Mode schwerer beurteilt als im WL-Mode: Beurteilung erfolgt oft nach mehrmaligem hin- und herschalten der beiden Modi. Effizienz der zusätzlichen AF-Untersuchung (des erhöhten Kontrastes) dargestellt als Ratio (AF+WL)/WL. p-Wert nach Chi²-Vierfeldertest mit Yates-Korrektur: ** höchst signifikanter Unterschied

Im Allgemeinen werden in der Kombination AF + WL ca. 1.8 - 3.6 mal mehr Dysplasien und CIS-Befunde verdächtiger eingestuft als mit Weißlicht alleine (Tabelle 8). Die große Gruppe der Hyperplasien/Metaplasien ist hier noch näher zu untersuchen. Mit AF deutlicher gesehen wurden 16 Dysplasien und CIS-Befunde. Aber auch die Tumoren werden deutlicher beurteilt. Im Vergleich zu Tabelle 7 ist die Beurteilung WL abnorm von höherer diagnostischer Bedeutung. Letzteres kommt vermutlich durch eine Überbewertung des WL durch die Möglichkeit des Hin- und Herschaltens zwischen WL und AF zustande. Die Erstfindung wird vermutlich auch in diesem Zweig meist durch die primäre Autofluoreszenzuntersuchung erreicht.

Ergebnisse

Visuell und mit den Farbwerten, die die Kameras liefern könnten die Befunde diskriminiert und beurteilt werden. Dies war im Autofluoreszenzmodus (AF, Abbildung 46) und im Weißlichtmodus (WL, Abbildung 45) möglich. Je nach Zuordnung der Beurteilung richtig negativ, falsch positiv und richtig positiv, falsch positiv zu den histologischen Befunden ergeben sich so verschiedene Kennzahlen für die Sensitivität und die Spezifität:

Verfahren	Patienten (davon dys II/ dys III/CIS)	Biopsien (davon dys II/ dys III/CIS)	Spezifität für dys II/dys III/CIS/TU	Sensitivität für dys II/dys III/CIS (dys I/dys II/dys III/CIS)
a) visuelle Verfahren				
WL	258 (5)	621 (18)	90%	33% (11%)
WL+AF WL>=suspekt oder AF>=abnorm	270 (18)	678 (26)	48% (mit Narben) 61% (ohne Narben*)	100% (87%)
WL+AF WL>=abnorm und AF>WL	270 (18)	678(26)	44% (mit Narben) 59%(ohne Narben*)	100% (94%)
b) nichtvisuelle Ratiobildung				
AF (R+B)/G	33 (9)	78 + 78** (9)	60%	90% (90%)
c) nichtvisuelle Beurteilung des Farbratio und Farbratioktrastes via Neuronales Netz				
AF Bildverarbeitung	33 (9)	78 + 78** (9)	85%	95% (92%)
WL Bildverarbeitung	33 (9)	76 + 76** (9)	50%	90% (82%)

Tab. 9: Ermittlung von Sensitivität und Spezifität für verschiedene endoskopische Verfahren: Visuelle Beurteilung WL-Arm und WL+AF-Arm, letzterer definiert positive Befunde auf zwei verschiedene Arten: Zum ersten WL suspekt oder sichtbarer Tumor oder AF abnorm oder suspekt, zum zweiten WL abnorm, suspekt oder sichtbarer Tumor und AF schwerer beurteilt entsprechend einem wechselseitigen Einfluß durch hin- und herschalten der WL-Beobachtung und der AF-Beobachtung. Nichtvisuelle Beurteilung durch das Ratio (Rot+Blau)/Grün, das in etwa der visuellen Farbwahrnehmung entspricht. Klassifikation der Farben mit dem neuronalen Netz nach Kohonen angewandt auf die Farbratios im AF-Mode und die Farbratioktraste (bezgl. Normalgewebe) im WL-Mode. Für die Berechnung ohne Narben wird angenommen, daß 50% der falsch positiven Befunde in der Klasse Hyperplasie/Metaplasie vorher bekannte Narben waren.* Nichtstudienkonforme Daten (Zahl der Normalbiopsate ≠ Zahl der auffälligen Biopsate) wurden entsprechend um meßbare, aber nicht biopsierte Normalgewebsstellen ergänzt**, um vergleichbare Spezifitätsdaten zu ermitteln. Spezifitäten höchst signifik. unterschiedlich.***

Ergebnisse

Für die visuelle Untersuchung mit Weißlicht finden sich geringe Sensitivitätswerte (33%) für die Erkennung von schweren Befunden (Tabelle 9). Die Spezifität bleibt hoch, wenn nur das biopsiert wird, was mindestens suspekt erscheint. Von den anderen visuellen Verfahren weist die Autofluoreszenzmethodik die höchste Sensitivität auf. Die Spezifität liegt unter Berücksichtigung vorbekannter Narben für die Autofluoreszenz bei 61%. Die Daten der nicht-visuellen Verfahren wurden immer auf der Basis des hoch sensitiven visuellen Verfahrens (WL+AF) erstellt. Für einen geeigneten Schwellwert kommen die Ergebnisse des AF-Ratio (Rot+Blau)/Grün dem visuellen Eindruck sehr nahe. Durch die nichtlineare Verrechnung der Farben mithilfe von neuronalen Netzen erhält man für die Autofluoreszenz nahezu ideale Sensitivitäts- und Spezifitätswerte. Auch für die T/N-Kontraste im Weißlicht kann diese Art der Bildverarbeitung angewendet werden und liefert so für Weißlicht aber nur in etwa die gleichen Sensitivitäten und Spezifitäten wie die bereits visuell zu detektierende Autofluoreszenz. Wichtig ist ferner neben den bioptischen Sensitivitäten und Spezifitäten, der Benefit in Patientenzahlen und die Prävalenz.

	Histologie			
visuelle Beurteilung	Dysplasie I	Dys II/III	CIS	Tumor
WL -Arm +/-Ges	1/15	3/12	2/2	57/60
WL+AF-Arm +/-Ges	11/17	14/14	4/4	40/43
Ratio	9.70	4.0	1.0	0.83
p-Wert (CHI²)	2.5E-3**	0.11	oo	1

Tab. 10: Patientenzahlen mit Befunden (verschiedene Klassen) in der zweiarmigen Studie: WL-Ast: Positive:Gesamt (= WL+Random), WL+AF-Ast Positive:Gesamt (= AF+WL+Random), sowie das Ratio als Maß ist für den effektiven Nutzen für die Patienten, p-Wert nach Chi²-Vierfeldertest mit Yates-Korrektur: ** höchst signifikanter Unterschied

Wertet man nur den Benefit den die Patienten haben durch eine Früherkennung, so findet sich für CIS kein Nutzen durch die zusätzliche Autofluoreszenz. Für Dysplasien liegt er bei 4.0-9.7 (Tabelle 10).

Ergebnisse

Aus den Werten nach Tabelle 10 errechnet sich Findungsraten und die Prävalenz:

Findungsrate m-s Dys/CIS: WL:(Non-Random-Findings): $5/258 = 1.93\%$

Findungsrate=Prävalenz m-s Dys/CIS: AF+WL: (Non-Random-Findings): $18/270 = 6.68\%$

Damit ist der Anteil der gefundenen Frühstadien (Findungsraten) im betrachteten Patientengut um den Faktor 3.45 gestiegen. Der p-Wert nach Chi²-Vierfeldertest mit Yates-Korrektur beträgt 0.014, der Unterschied ist damit signifikant.

Der Anteil der Biopsien pro Patient erhöhte sich nur um nicht signifikante 4.1%.

Die mittlere Untersuchungsdauer betrug im Weißlicht: 21.57 min

Die mittlere Untersuchungsdauer betrug in der Fluoreszenz: 23.63 min

Weiterhin ist interessant, wo die Befunde liegen: Mehr an den Karinen oder mehr an den Wänden ?

WL+AF	Dysplasie I	Dysplasie II, III	CIS	Tumor (nsc,sc,ade)
Karinen	20	14	4	18 (4, 5, 9)
Wände	1	4	4	22 (10, 8, 4)
Ratio (W/K)	0.05	0.285	1.0	1.22 (2.5, 1.6, 0.44)

Tab. 11: Vergleich der bioptischen Findungsraten von Karinen und Wänden für verschiedene Befundklassen

Je geringer das Stadium ist, desto weniger Befunde werden in den Wänden im Vergleich zu den Karinen gefunden oder biopsiert (Tabelle 11). Ursächlich dafür könnte die zunehmende Flächenausbreitung, der abnehmende Kontrast oder eine Präferenz der Karinen bei der Tumorgenese sein.

3.6 Klinische Ergänzungen zur Methode Autofluoreszenz

Für die im Rahmen einer multizentrischen Studie mit Autofluoreszenz untersuchten Patienten können weitere statistische Größen ermittelt werden, die möglicherweise Aussagen über die Tumorgenese erlauben. Die relativ geringe Zahl der Daten macht es nötig für die nachfolgenden histogrammischen Aussagen Klassen von 5 Jahren zu bilden:

Ergebnisse

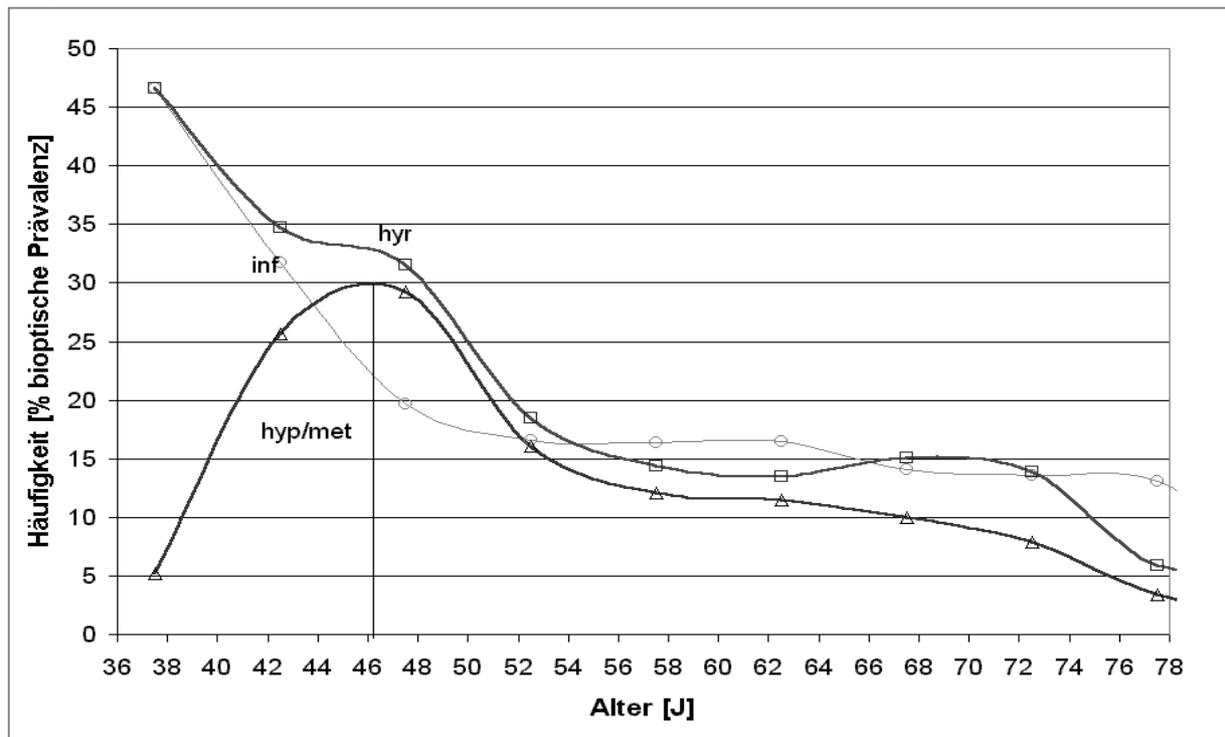


Abb. 51: Altersabhängige Verteilung (Häufigkeiten der Biopsien) von Befundklassen mit noch fraglicher Relation in der Tumorgenese und i. A. relativ geringer Tumorkontrastierung: Hyperplasie, Metaplasie entspricht häufig den vorbekannten Narben.

Für verschiedene leichte Befundtypen wurde in Abbildung 51 eine Altersabhängigkeit der biopsischen Prävalenz erstellt. Vermutlich aufgrund der gehäuften Biopsierate bei jüngeren Patienten findet sich für Hyperplasie und Entzündung eine abfallende Tendenz. Die Gruppe Hyperplasie/Metaplasie (oftmals Narben) zeigt später bei ca. 46 J ein Maximum. Die erhöhte Biopsierate für junge Patienten kann eliminiert werden, indem die Anzahl der Biopsate auf die Entzündungen normiert wird.

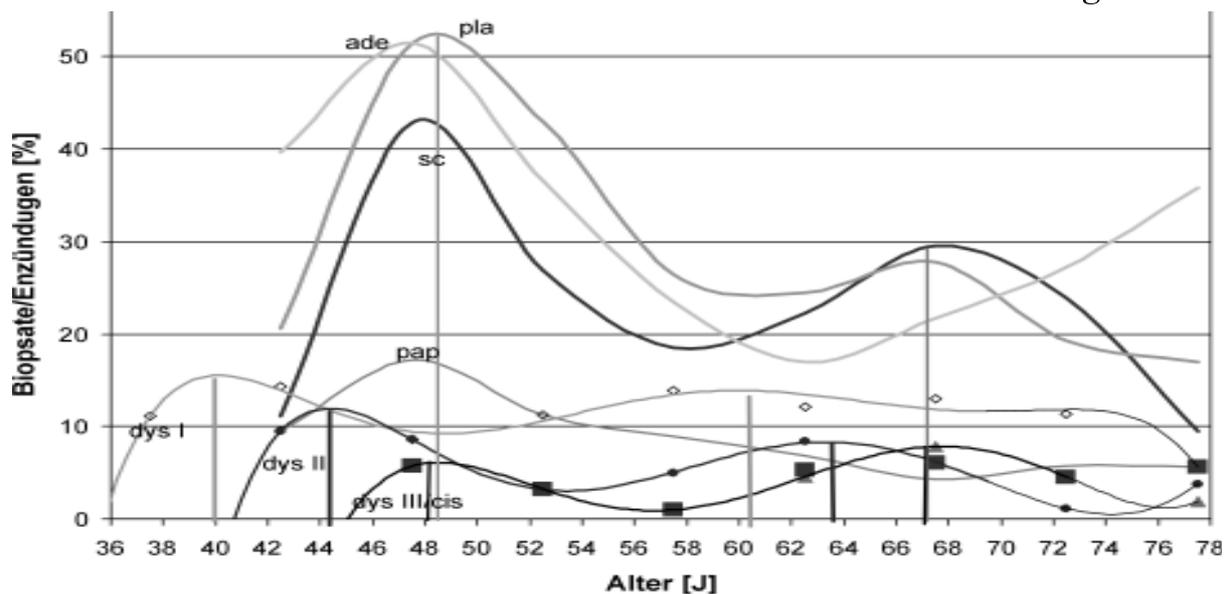


Abb. 52: Altersabhängige Verteilung verschiedener Befundklassen: Häufigkeiten der Biopsien normiert auf die Anzahl der schwach positiven Entzündungen zur Korrektur der gaußförmigen Altersabhängigkeit der untersuchten Patienten und der subjektiven Steigerung der Biopsierate bei jungen Patienten. *Weitere Korrekturen (Biopsierate/Patient) würde den Wert von sc, ade und pla maximal um den Faktor 1.5 verringern.

So kann gemäß Abbildung 52 folgende Reihe bei den Maxima der verschiedenen Befunde bei Männern (Bültzingslöwen von, 1997) festgestellt werden:

Maximum leichte Dysplasie im Alter von 40 Jahren, moderate Dysplasie im Alter von 44 Jahren, schwere Dysplasie/CIS im Alter von 48 Jahren, Plattenepithelkarzinome im Alter von 49 Jahren. Der Kurvenverlauf für die schwere Dysplasie ist dabei fast identisch zum Kurvenverlauf des CIS-Befundes. Die Höhe des Maximums, nicht aber die Breite der Verteilung verringert sich für die Folge Dys I, Dys II, Dys III. Adenocarcinom und kleinzelliges Karzinom sind noch vor den CIS-Befunden maximal. Selbst, wenn mit der Biopsierate/Patient korrigiert wird, ist die Höhe des Maximums der Verteilung der kleinzelligen Karzinome noch ca. um den Faktor 5 höher, als die Höhe des Maximums der Verteilung der CIS-Befunde. Ab einem höheren Alter von 61 Jahren findet sich bei Frauen (Bültzingslöwen von, 1997) eine ganz ähnliche Abfolge der Befunde Dys I, Dys II, Dys III, CIS, nichtkleinzelliges Karzinom. Hier stimmen die Höhen des zusätzlichen Anteils der Plattenepithelkarzinome und der CIS-Befunde überein. Neben der Altersverteilung der verschiedenen Befundtypen, findet sich für

Ergebnisse

spätere Tumorformen im Gegensatz zu den Tumorfrühstadien Dys I, Dys II, Dys III, CIS, eine unterschiedliche Häufigkeitsverteilung im Bronchus (Abbildung 53). Plattenepithelkarzinome finden sich vornehmlich im Oberlappenbronchus und der Oberlappenkarina, Nichtkleinzeller verteilt im Bronchus und in den Segmenten.

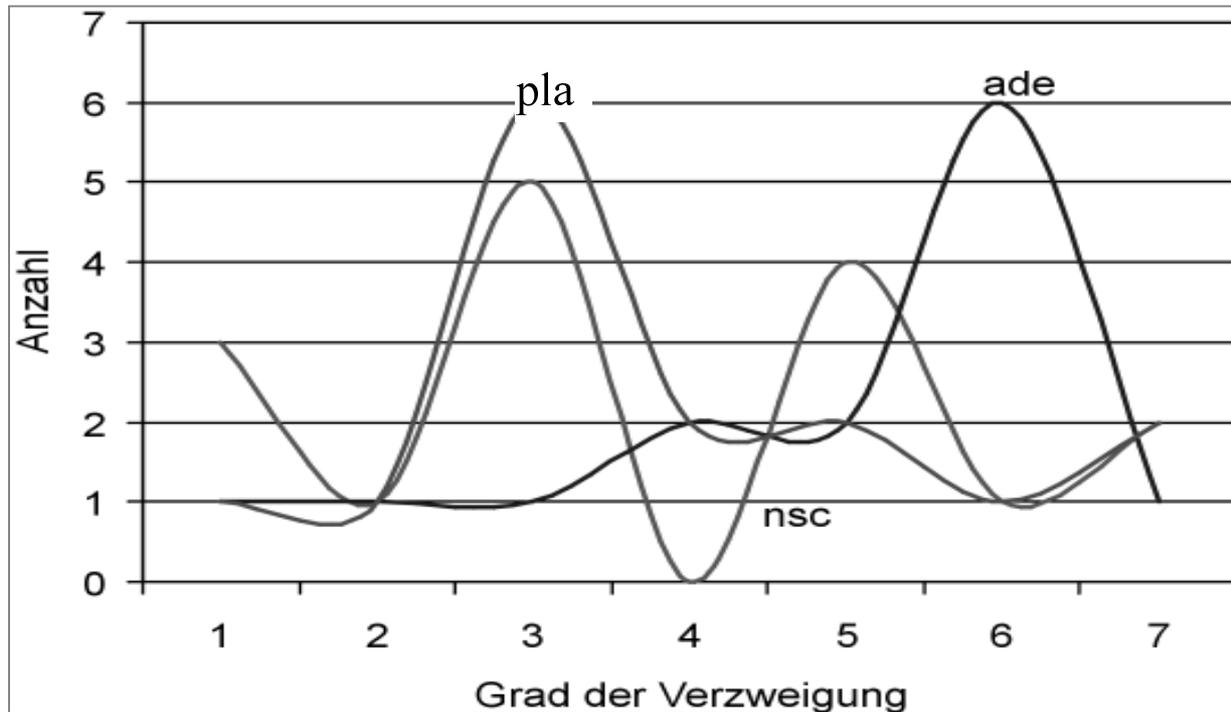


Abb. 53: Verteilung näher charakterisierter fortgeschrittener Befunde (kleinzelliges Karzinom sc, Plattenepithelkarzinom pla und Adenokarzinom ade) im Bronchus: Grad 1 = Trachea Grad 2 = Hauptbronchien, Hauptkarina, Grad 3 = Oberlappenbronchus, Oberlappenkarina., Grad 4 = Mittellappen, Mittellappenkarina, Grad 5 = Unterlappen, Lingulakarina, Grad 6 = Segmente, Segmentkarinen, Grad 7 = Subsegmente, Subsegmentkarinen

4. Diskussion

4.1 Biologische und physikalische Aspekte

Die Beschreibung der Phänomene Fluoreszenz, Remission und Absorption standen im Mittelpunkt dieser Arbeit. Alle diese Eigenschaften, die das Gewebe unter Einfluß von Licht aufweist, lassen sich nutzen, um einen Tumor/Normalkontrast zu erhalten (König et al 1996, König et al 1998). Für die PPIX-Detektion in der Urologie war bereits seit längerem ein System auf der Basis einer 300W Xe-Lampe mit wechselbaren Filtern für die Anregung und die Detektion vorhanden (D-Light/Karl Storz GmbH & Co. aus Tuttlingen, Deutschland). Mit diesem System wurde zunächst auch in der Bronchologie die PPIX-Fluoreszenz nach inhalativer Applikation von 5-ALA untersucht (Stepp 1993, Baumgartner et al 1996, Huber et al 1998). Eine Anfärbung von 2:1 bis 3:1 konnte mithilfe der Spektroskopie bestätigt werden (Pichler et al 1999). Häufig war jedoch auch eine unspezifische Anfärbung des Normalgewebes vorhanden. Diese wurde zunächst auf eine unkontrollierte Deposition zurückgeführt. Es wurde daher ein Inhalator mit kontrolliertem Volumen und Fluß (Brand 1996) eingesetzt um die Deposition zu vereinheitlichen, der das Problem aber nicht endgültig löste (LIFE-Forschungsbericht 1999). Die relativ zur Urologie geringe Anfärbung des PPIX im Tumorgewebe führte zu einem raschen Ausbleichen der Fluoreszenz (Kriegmair et al 1995, Heil et al 1996). Als neue Detektionsmethode für Lungenkarzinome wurde bereits 1987 die Verminderung der Autofluoreszenz über Tumorgewebe beschrieben (Brodbeck 1987). Dieses System nach Brodbeck kommt ohne medikamentöse Kontrastmittel aus, die in der routinemäßigen klinischen Anwendung problematisch sein können (Fiedler et al 1993). Es wurde später von der Forschungsgruppe der British Columbia Cancer Agency in Zusammenarbeit mit Xillix Technologies Corporation in Vancouver, Kanada weiterentwickelt und in umfangreichen Studien erprobt (Hung et al 1996, Lam et al 1993, Lam et al 1997). In einer ersten nichtveröffentlichten Untersuchung wurde geprüft, ob ein breitbandiges Bandpaß-Langpaß-Filterpaar (Xenonlampe/Okular) das Autofluoreszenzsystem 'Lung-Imaging-Fluorencence-Endoscope (LIFE) ersetzen kann, das auf einem schmalbandigen HeCd-Niedrigenergielaser (150 mW, 442 nm monochromatisch) beruht. Bei diesem Ansatz stellte sich heraus, daß die Grünabsenkung der

Diskussion

Fluoreszenz über Tumoren adäquat zum Xillix-System war, die Rotfluoreszenz aber meist nicht ausreichte, um einen Farbkontrast (Lam et al 1992) zu ermöglichen. Insgesamt war der Kontrast ähnlich dem Xillix-System und relativ gering (Lam et al 1992) und die Bilder zeigten keine Glanzlichter, die in der Weißlichtuntersuchung einen räumlichen Eindruck vermittelten (Siehe Abb. 48). Somit entfiel auch das von der Weißlichtuntersuchung bekannte Phänomen der Verminderung des Glanzlichtes über (prä)malignen Arealen. Weiterhin war das Normalgewebe unterschiedlich gefärbt und die Rot/Grün-Fluoreszenz spiegelte die Muskelfaserstrukturen des bronchialen Epithels wieder. Auch war das Bild dunkel und die Befundränder waren undeutlich. Daher wurde zunächst der bereits vorhandene Filtersatz für die PPIX-Detektion, der aber noch eine geringere Helligkeit und Kontrast aufwies, zum Erhalt von spektroskopischen Daten verwendet (Stepp et al 1994). Dies führte dazu, daß eine besondere Anhebung des blauen Anteils der Remission und eine geringfügige Absenkung des roten Spektrums für maligne Befunde ab der moderaten Dysplasie gefunden wurde, die sich bei entzündlichen Befunden nicht zeigte. Daraufhin wurden die Anregungs- und Detektionsfilter entsprechend ausgerichtet. Die Wellenlängenkante des Anregungsfilters wurde dabei zu höheren Wellenlängen verschoben und eine geringe blaue Remission genauestens auf den besten visuellen Eindruck in Hinblick auf Kontrast und ausgewogene Glanzlichtintensität angepaßt. Das resultierende Bild zeigt drei Farben: Die rote und grüne Fluoreszenz und die blaue Remission. Mittels genauer Analyse von mittelgradigen Dysplasien ließ sich der Befundrand genauer diskriminieren. Dieser zeigte eine starke Kontrastanhebung, die nur auf der Anhebung des blauen Anteils beruhen konnte. Um zu prüfen worauf dies beruht, wurden Computersimulationen mit den typischen optischen Parameterwerten der Bronchialwand und eine Statistik der spektralen und farblichen Charakteristika der endoskopischen Befunde erstellt. Anhand der resultierenden Daten zeigte sich, daß dem $(\text{Rot}+\text{Blau})/\text{Grün}$ -Ratio eine besondere Bedeutung zukommt. Es ist zum einen ideal unabhängig von der Blutabsorption, von Redoxschwankungen und nahezu winkelunabhängig und zum anderen abhängig von der Schichtdicke des Gewebes. In unserer Methodik mit dem zusätzlichen Blauanteil wird gerade das Ratio $(\text{Rot}+\text{Blau})/\text{Grün}$ vom Auge als besonders effektiver Farbkontrast (Pink gegen Grün)

Diskussion

wahrgenommen. Zumal absorptive Eigenschaften des Blutes in dieser Anwendung erstmalig abgeglichen sind stellte sich nun das Normalgewebe farblich sehr einheitlich dar. Abweichende Befunde fallen bereits durch geringe Farbänderungen auf. Die Ursache dafür blieb zunächst unklar. Anhand früherer Montecarloberechnungen und Forschungen an Tumoren wurden für die AF-Detektion drei Mechanismen propagiert: Die Schichtdicke, die Blutabsorption, Reduktion und der Fluorophorengehalt nach Reduktion (Qu et al 1995, Zeng et al 1997). Blutabsorption und Reduktion werden durch das vorgegebene System kompensiert. Der erhaltene Kontrast des Ratios (Rot+Blau)/Grün für Befunde \geq Dysplasie II kann mit der Schichtdicke allein nicht erklärt werden. Nach einer multiregressiven Zerlegung makroskopischer Spektren in einzelne Komponenten und der Vermessung von histologischen Schnitten konnten keine Änderungen in den Fluorophorenkonzentrationen gefunden werden, die nicht durch die Schichtdicke erklärbar sind. Die Absenkung der Fluoreszenz im grünen Spektralbereich (FAD) beruht ebenfalls auf der Schichtdicke d. Erwartet wird in etwa ein Ratio von $50\mu\text{m}/d$. Für CIS-Befunde ergeben sich Werte von ca. 0.4 was den gemessenen Werten von 0.33 in etwa entspricht. Die effektiven Kontrastwerte von 1.7, die nach Abbildung 43 aus der Bildverarbeitung zu ermitteln sind lassen sich wie folgt erklären (Tabelle 12):

	Wert des (R+B)/G-Ratios CIS:Normal	Abbildung Nr.
Bildverarbeitung	1.70	43
1. Kontrastanhebung Rand	1.40	26
2. Modell Schichtdicke	1.22	28
3. Modell Blutabsorption	maximal 1.10	42
Produkt (1. und 2.)	1.71	
Produkt (1. und 3.)	1.54	
Produkt (2. und 3.)	1.34	
Produkt (1. und 2. und 3.)	1.87	

Tab. 12: Vergleich der Daten des Farbratios (Rot+Blau)/Grün für CIS-Befunde in der AF-Untersuchung mit Modellen und Daten der relativen Kontrastanhebung der Befunde

Nachdem der Kontrastsprung am Rand von Befunden (\geq moderate Dysplasie) zusammen mit der Schichtdicke das effektiv detektierte Ratio genau erklärte (Produkt 1 und 2 = Bildverar-

Diskussion

beitung), kam (Einfluß der Streuung gemäß Gleichung 5b) nur eine Änderung der Streuung als Ursache der scharfen Ränder von moderaten Dysplasien - CIS in Frage. Nun ist gerade ein Merkmal dieser Befunde die hohe Streuung, die in der Pathologie z.B. in der Sputumdiagnostik mit dem Zytosavant (Nakhosteen et al 1997) und in der Endoskopie (Richards Kortum 1991) bereits zur Tumordetektion genutzt wird. Für eine genauere Analyse des Zusammenhanges wurde das Normalgewebe sehr gut beschrieben durch eine parabolische Gleichung im Rot/Grün-Raum und Blau/Grün-Raum. Hierfür wurde als Ausgangsanahme ein Wert für den Blauanteil angenommen, der entsprechend abhängt von der Schichtdicke und der Streuung. Effektiv ist die Befunddetektion damit eine Schichtdickenmessung, zu der sich ab der mittelgradigen Dysplasie eine Messung der Streuung (=Photodichte) gesellt.

Wird ein neuronales Netz nach Kohonen mit den Farbratios trainiert, so bildet dieses die Karte des parabolischen Zusammenhangs nach (Ritter et al 1990) und zeigt ganz ohne äußeren Zwang, wie dies bei den bisher verwendeten Verfahren der Fall ist (Staveren et al 2000, O'Brien et al 1989), eine Klassenbildung in normale bis entzündliche Befunde, Befunde mit erhöhter Schichtdicke und photonendichte (stark streuende) Befunde. Die erhöhte Streuungseigenschaft von mittelgradigen Dysplasien bis hin zum Tumor wird damit erstmalig mit einem einfachen Verfahren sichtbar gemacht und für eine Befundklassifikation herangezogen. Die Autofluoreszenz dient hier als Referenz für die eigentlich in der Weißlichtdetektion bereits vorkommende aber ohne erweiterte Verfahren nicht sichtbar werdende Streuung. Daher ist es auch günstig, daß die Autofluoreszenz kaum ausbleicht. Bei niedrigen Lichtintensitäten entspricht der Kurvenverlauf einer einfachen Kinetik (Jongsen et al 1997).

4.2 Pathologische Aspekte

Bei der histologischen Betrachtung ergibt sich für das normale Epithel eine Dicke von 45 µm, für Dysplasien durchschnittlich 70 µm und für CIS 120 µm. (Lam et al 1992). Bislang wird folgender Zusammenhang vermutet:

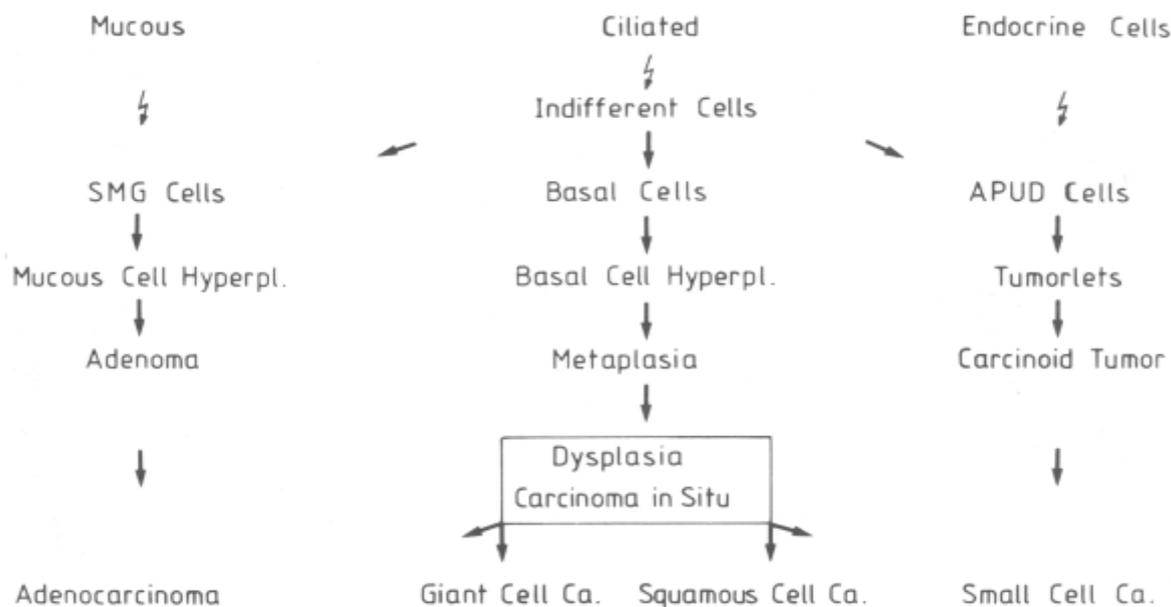


Abb.: 54 Histogenese des Lungenkrebses (Müller et al 1991)

In Abbildung 52. wird eine Entwicklung aufgezeigt von der Dysplasie zu CIS (Saccomano 1982) hin zum Plattenepithelkarzinom, die sich über mehrere Jahre hinzieht und in Übereinstimmung mit Abbildung 54 steht. Die Adenokarzinome und die kleinzelligen Karzinome können dann von den hyperplastischen Befunden in Abbildung 51 abstammen, oder von den Entzündungen. Daher ist es für weitergehende Untersuchungen auch wichtig, hyperplastische Befunde zu finden. Insgesamt bietet die Chronologie der Karzinogenese ein Zeitfenster, so daß die Früherkennung auch in einem gewissen zeitlichen "Fenster" ablaufen kann. (Bollinger et al 1998). Die andauernde karzinogene Belastung durch das Rauchen führt vermutlich letztlich zur Entstehung der Dysplasie. Hier spielen vermutlich auch Faktoren eine Rolle, die als MAC-Phänomene bezeichnet werden und auch weit entfernt von der Dysplasie in der Lunge nachgewiesen werden können (Mac Auley 1995). Die angenommenen 6 Monate bis 2 Jahre zur Entwicklung des CIS (Woolner et al 1994) korrelieren mit der Zeitdifferenz der Häufigkeitsmaxima gemäß Abbildung 52. Die sequentielle Abfolge genetischer Änderungen im Laufe der Krebsentstehung sind am besten am Beispiel des Plattenepithelkarzinoms dokumentiert (Abbildung 55).

Diskussion

Normales Epithel Hyperplasie Dysplasie Carcinoma in situ invasives Karzinom

<u>3p-LOH</u>	>90 %
<u>9p-LOH</u>	>75 %
<u>MYC-Überrepression</u>	~60%
<u>Telomerase-Expression</u>	~80%
<u>Aneuploidie</u>	~90%
<u>17p13-LOH/p53</u>	>75%
<u>5q-LOH</u>	~35%
<u>Ras-Mutationen</u>	15-20%

Abb. 55: Sequentielle Akkumulation genetischer Veränderungen in der Tumorgenese von nichtkleinzelligen Lungentumoren und ihre Häufigkeiten (nach Sekido et al, 1998)

Ogleich der Verlauf der Entwicklung von genetischen Änderungen begleitet wird (Thiber-ville et al 1995), scheint angesichts der größeren Häufigkeit von leichten Dysplasien im Ver-gleich zu mittelgradigen Dysplasien in Abb. 52 eine Reversibilität von leichten Dysplasien möglich zu sein. Diese könnte durch eine adjuvante Retinolinhalation bei hohen Dosierungen unterstützt werden (Battey et al 1995).

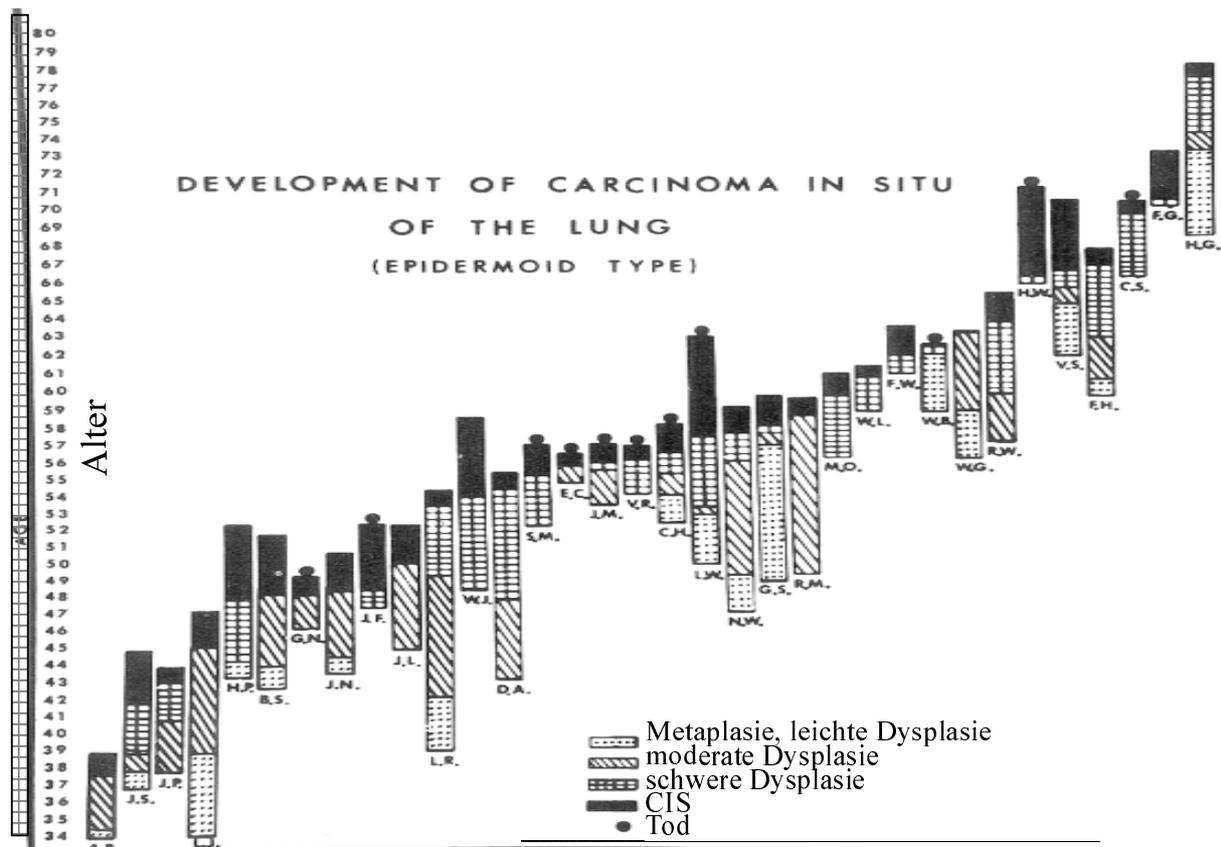


Abb. 56: Einzelbeispiele zur Tumorgenese (leichte Dysplasie bis CIS) von zytologisch untersuchten Uranbergarbeitern (nach Saccomano et al. 1974)

Der zeitliche Verlauf der Entwicklung von der leichten Dysplasie zum CIS wurde bereits anhand vieler Einzelbeispiele bei Uranbergarbeitern aufgezeigt (Abbildung 56; Saccomano et al. 1974), wobei es aber bei diesen Befunden zu keiner altersabhängigen Häufung kommt, die Zeitabstände der Entwicklung aber denen in Abbildung 52 gleichkommen. Die altersabhängige Häufung würde bedeuten, daß es es einen kurzen Induktionszeitraum und nachfolgend eine zeitlich strikt festgelegte Entwicklung gibt. Eine Prüfung dieses Zusammenhanges bedarf aber einer genaueren Analyse mit höheren Patientenzahlen, am besten mit einer festgelegten Anzahl von Patienten und einer festgelegten Biopsierate pro Patient.

Diskussion

4.3 Klinische Aspekte

Das Bronchialkarzinom ist die häufigste Tumorform und hat eine sehr schlechte Prognose (Krebsregister Saarland 1993). Die Prävalenz früher Karzinomformen im Bevölkerungsquerschnitt ist beträchtlich, insbesondere bei Risikopopulationen. Auerbach et al. untersuchten zuerst präparierte Schnitte der kompletten Lunge von Rauchern, die nicht an Lungenkrebs verstorben gekommen waren. Sie fanden eine CIS-Rate von 4,3% bei Rauchern mit 10-20 Packyears und eine CIS-Rate von 11,4% bei Rauchern mit einer karzinogenen Belastung von mehr als 20 Packyears (Auerbach et al 1956, Auerbach et al 1961). Di in unserer Studie gefundene Prävalenz von 6.8 % für Raucher beträgt für moderate und schwere Dysplasien 5.2% und für CIS 1.5%. Sie bezieht sich ausschließlich auf den oberen Bronchialtrakt und auf Patienten, die überwiegend aufgrund einer spezifischen Symptomatik in die Klinik kamen. So kann auch für Abbildung 52 erklärt werden, daß korrigiert auf die Biopsierate pro Patient die Plattenepithelkarzinome etwa 5 mal häufiger bioptisch erfaßt werden als die moderaten/schweren Dysplasien und das CIS. Die Ergebnisse zeigen letztlich, daß diese Frühformen tatsächlich gefunden werden können. Dies bedeutet einen klinischen Nutzen für die Patienten, zumal die Fünf-Jahres-Überlebensrate für das Stadium I mit 70%, und für die präklinischen Stadien der Dysplasie und des CIS sogar mit 95% angegeben werden (Bollinger et al 1998). Mit der konventionellen WLB alleine sind Dysplasien und CIS hingegen nur schwierig zu erkennen, da diese Veränderungen nur wenige Zellagen dick sind und sich oft nur auf wenige Millimeter Oberfläche erstrecken (Lam et al 1992). Diese Veränderungen können mittels Röntgenuntersuchung und in der Endoskopie nur schwer bzw. nicht zuverlässig detektiert werden (Marsh et al 1972). Da 50-60% aller Bronchialkarzinome, vor allem Plattenepithelkarzinome und kleinzellige Karzinome primär in den zentralen Atemwegen entstehen, sind diese überwiegend endoskopisch erfaßbar (Bollinger et al 1998).

Die klinische Evaluation des D-Light/AF-Systems erfolgte zunächst im Rahmen einer Pilotstudie (Häußinger, Stanzel el al 1998). Die Studie mit nur 60 Patienten erbrachte eine relative Sensitivitätssteigerung von 33 % im Weißlichtmodus auf 83 % im kombinierten Weißlicht- und Autofluoreszenzmodus, d.h. eine Verbesserung um den Faktor 2.5. Die Spezifität fiel von

Diskussion

94 % auf 89 %. Die Studie war wie alle anderen bisherigen Studien einarmig angelegt und zeigte bereits in der Lernphase und während der Optimierung der Geräte Ergebnisse, die nur von Khanavkar et al (LIFE-System), 1998 übertroffen wurden. Um den wechselseitigen Einfluß der alleinigen Weißlicht- und der zusätzlichen Autofluoreszenzbeobachtung zu vermeiden, wurde eine großangelegte zweiarmige randomisierte Studie zur Prüfung des diagnostischen Zugewinns durch die Autofluoreszenz begonnen. Die präliminären Ergebnisse zeigen, daß mit der Kombination von Autofluoreszenzuntersuchung und Weißlichtuntersuchung eine relative Sensitivität von 100% für Dysplasie II, Dysplasie III und CIS gegenüber der alleinigen Weißlichtuntersuchung erreicht werden kann. Auch aufgrund der unter den kontrollierten Bedingungen der zweiarmigen Studie etwas niedrigen Findungsrate im Weißlichtast findet sich ein Zugewinn um den Faktor 3.0 (Tabelle 13).

Autoren	Läsionen	Sensitivität	Sensitivität	Rel. Sensitivität
		WL	WL+AF	
Lam et al, 1993	113	39 %	84 %	2.2
Yokomise et al, 1997	19	63 %	90 %	1.4
Kato and Ikeda, 1998	73	51 %	93 %	1.8
Khanavkar et al, 1998	44	32 %	86 %	2.7
Lam et al, 1998	142	37 %	75 %	2.0
Vennmanns et al, 1999	79	59 %	85 %	1.4
Thiberville et al, 1999	83	62 %	86 %	1.4
Häußinger, Stanzel, Pichler Pilotstudie 1998	263	33 %	83 %	2.5
Häußinger, Stanzel, Pichler Lokale Ergebnisse im Rahmen der zweiarmige Multicenterstudie, 2001*	WL: 621 WL+AF: 678	33 %*	100 %*	3.0

Tab. 13 Ergebnisse verschiedener Studien im Vergleich (Khanavkar et al 2000, Häußinger, Stanzel et al 1998); *Lokale Ergebnisse für die Sensitivität im Rahmen einer zweiarmigen Multicenterstudie mit dem primärem Studienziel des Prävalenzvergleiches

Genauere klinische Ergebnisse sind von der angesprochenen Multicenterstudie mit ca. 1700 Patienten zu erwarten. Hier spielen auch die Vollständigkeit der pathologischen Ergebnisse

Diskussion

und die Eingangskriterien, sowie die statistische Absicherung eine wichtige Rolle, während diese Arbeit zum einen eine Zusammenfassung aller innerhalb des Studienzeitraumes ermittelten lokalen Daten darstellt, um einen präliminären Vergleich früherer Systeme mit dem aktuellen Storz-System zu ermöglichen und weitergehende Forschungsmöglichkeiten anzuregen.

4.4 Ausblick

Nur die Bildverarbeitung der ohnehin schon sehr kontrastreichen visuellen Bilder kann einen Spezifitätszugewinn (vielleicht auch einen Sensitivitätszugewinn) ermöglichen (Profio et al 1986). Desweiteren gewährleistet sie einen konstanten farblichen Eindruck (Fang et al 1998). Diese Form der Diagnostik ist dann nahezu optimal, da nach den vorliegenden präliminären Ergebnissen eine Klassifizierung in leichte und schwere Befunde möglich sein könnte und somit für die Wahl des Behandlungsmodus ein von der pathologischen Untersuchung unabhängiges Kriterium zur Verfügung steht. Außer der Fluoreszenzspektroskopie (Zonios SPIE 2324) könnte auch die Remissionsspektroskopie eine Verbesserung der Diagnostik darstellen, zumal die Eigenschaften dieser Methodik mittlerweile recht gut verstanden sind (Orenstein et al 1998). Moderate und schwere Dysplasien (ggf. für noch frühere Stadien) können photodynamisch behandelt werden. Die verwendete Substanz sollte möglichst effektiv und wenig belastend sein. Hierbei könnten bei der Behandlung von CIS-Befunden und frühinvasiven Karzinomen neben dem Photofrin auch weitere neue Substanzen eine Rolle spielen, wie zum Beispiel das Porphobilinogen oder das MTHPC (Sudhakar et al 1994, Koch et al, Edell et al 1996). Wenn sich für diese Substanz eine Anreicherung ergibt (Gomer et al 1979), könnte es über hochdeutertes Porphobilinogen möglich sein, eine nichtinvasive Diagnostik mittels MR durchzuführen. Auch eine Strahlentherapie könnte mit Hilfe dieser Substanz möglich sein (Anderson 1989). Bis dahin könnte die experimentell bereits in der Bronchologie und in der Hals-Nasen-Ohrenkunde verwendete 5-Aminolävulinsäure eingesetzt werden (Awadh et al 1997, Fan et al 1996). Aufgrund des höheren phototoxischen Effekts ist aber für Stadien ab

CIS bei inoperablen Patienten eine Therapie mit Photofrin vorzuziehen (Häußinger et al 1996). Gerade die Bestimmung der Dicke der Schichten und ihre Streucharakteristik ist mit dem neuen Verfahren OCT auch in der Tiefe möglich (Haberland et al 1998). Ein echter Vorteil gegenüber der Bildverarbeitung dürfte hier jedoch nicht bestehen, zumal die Bildanalyse dann einen Pathologen vor Ort erforderlich machen würde. Klinisch aktuell erfolgversprechender als diese aufgezeigten experimentellen endoskopischen Möglichkeiten ist das Screening von Patienten. Hier bietet sich die Sputumzytologie (Payne et al 1997, Strauss et al 1997) an. Das Verfahren ist klinisch sinnvoll, da nicht invasiv, aber mit dem Nachteil einer geringen Sensitivität für Dysplasien behaftet (Flehinger et al 1993). Eine bessere Möglichkeit stellen auch hier automatisierte Verfahren dar (Marek et al 1999), die auf den Streuungseigenschaften (Photonendichte) der Zellkerne beruhen, die für moderate bis schwere Dysplasie, CIS und invasive Karzinome gefunden werden (Böcking et al 1992). Eine weitere Verbesserung könnte sich möglicherweise ergeben, wenn in Umkehrung dazu die Inhalation von Tumormarkern und ihr Übergang in das Blut Verwendung fände (LIFE-Forschungsbericht 1999).

5. Zusammenfassung

Die relative Sensitivität der Erkennung von verdächtigen schweren Befunden (\geq moderate Dysplasie) ist für die WL-Bronchoskopie mit 33% relativ gering. Die Erkennung von verdächtigen Befunden hängt im Wesentlichen von der Schichtdicke der Befunde, von der Streuung der obersten Schicht, der Blutabsorption (reduktiv und oxidativ) und der verminderten Glanzlichtintensität ab. Die beste WL-Sensitivität und Spezifität lässt sich für den Kontrastunterschied mittels neuronalem Netz festlegen. Die relative AF-Sensitivität ist hoch und erreicht nahezu 100%. Die AF-Sensitivität ist abhängig von der Schichtdicke und der Streuung des Befundes und in der verwendeten Form (mit blauer Remission bei 460nm, Anregung 380-460nm) weitgehend unabhängig vom Fluorophorengehalt, von Schwankungen der Blutabsorption und des Redoxstatus, sowie unabhängig vom Winkel und dem Bleaching des Gewebes. Die beste Ratio ist das (Rot+Blau)/Grün-Verhältnis das eine farbliche Darstellung der Befunde (pink) versus dem Normalgewebe (grün) ermöglicht. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung eines parabolischen Zusammenhangs mit dem sich das Normalgewebe im Rot/Grün versus Blau/Grün-Raum darstellt, um verdächtige Befunde scharf vom Normalgewebe diskriminieren zu können. Die relative AF-Sensitivität/Spezifität beträgt hier nahezu 100% sowohl alleine als auch in der Kombination mit einer vorherigen WL-Diagnostik. Eine gute Diskriminierung findet sich hierbei zunächst durch die erhöhte Schichtdicke, bei Schichtdicken $>100 \mu\text{m}$ kann nur noch die Streuung den Verlauf der diskriminierenden Parabel bestimmen. So lassen sich drei Befundtypen festlegen: unverdächtige Befunde (Schichtdicke gering, Streuung gering), leichte, verdächtige Befunde (Schichtdicke ca $100 \mu\text{m}$, Streuung gering) und schwere, verdächtige Befunde (Schichtdicke $> 100\mu\text{m}$, Streuung hoch). Diese Unterscheidungsmöglichkeit kann sehr gut mithilfe von neuronalen Netzen nach Kohonen wiedergegeben werden. Die Unterscheidung beruht im wesentlichen auf Unterschieden in den Farben und der Schärfe des Randes: Unverdächtige Befunde (Türkisgrün), leichte, verdächtige Befunde (Pink, Rand unscharf) und schwere, verdächtige Befunde (Blau-Weiss oder Rot, Rand scharf). Pathologische Befunde finden sich hauptsächlich auf den Karinen, wandständige Befunde werden aber ebenfalls gut erfasst, zumal das verwendete Ratio nahezu vom Winkel unabhängig ist. In der Altersverteilung der verschiedenen Befunde ergeben sich ausgeprägte Maxima zumindest für die verschiedenen (prä)malignen Karzinomformen, die mit der Histogenese vereinbar sind. Unklar bleibt jedoch, ob die frühen Formen eine festgelegte Induktionsursache haben, deren Wirkung im klinischen

Zusammenfassung

Alltag erst spät und ohne ersichtlichen Grund gefunden wird. Im oberen Bronchialtrakt finden sich Plattenepithelkarzinome und kleinzellige Karzinome, im unteren Bronchialtrakt finden sich Adenokarzinome. Diagnostische endoskopische Ansätze scheinen mit den dargelegten Möglichkeiten der AF-Bronchoskopie weitestgehend abgeschlossen zu sein. Neue therapeutische Ansätze könnten sich aus der Anwendung von 5-ALA und seinen Derivaten ergeben zumal leichte Befunde bis hin zum CIS dann einer "einfachen" photodynamischen Therapie zugänglich gemacht werden könnten.

Literatur

6. Literatur

- *Anderson Cancer Center: Main program for Monte Carlo simulation of photon, Copyright Univ. of Texas M.D. 1992
- *Anderson JH: Innovations in Diagnostic Radiology: 6. NMR Spectroscopy and its Application to the Study of Cancer, Springer Verlag 1989; 93-116
- *Anderson-Engels S, Johannson J, Svanberg K, Svanberg S: Fluorescence imaging and point measurements of tissue: applications to the demarcation of malignant tumors and atherosclerotic lesions from normal tissue, Photochem. Photobiol. 1991; 53:807-814
- *Anidjar M, Ettori D, Cussenot O et al: Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder tumors: dependence on the excitation wavelength. J. Urol. 1996; 156:1590-1596
- *Auerbach O, Petrick TG, Stout AP et al.: The anatomical approach to the study of smoking and bronchogenic carcinoma, Cancer 1956; 9:76-83
- *Auerbach O, Stout AP, Hammond EC et al.: Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking and in relation to lung cancer, N. Engl. J. Med 1961; 256: 253-267
- *Auswärtiges Amt: Menschenrechte in der Welt, Ziegler JF KG Remscheid 1985; 111-125
- *Avrillier S, Tinet E, Ettori D, Anidjar M: Laser-induced autofluorescence diagnosis of tumors, Physica Scripta 1997; 72: 87-92
- *Awadh N, MacAuley C, Lam S: Detection and treatment of superficial lung cancer by using 5-aminolevulinic acid: A preliminary report, Journal of bronchology 1997; 4:13-17
- *Battey JF, Brown PH, Gritz ER, Hong WK, Johnson BE, Karp DD, Mulshine JL, Shaw GL, Shopland DR, Sunday ME, Szabo E: Primary and secondary prevention of lung cancer and international association for the study of lung cancer workshop, Lung Cancer 1995; 12: 91
- *Baumgartner R, Huber RM, Schulz H, Stepp H, Rick K, Gamarra F, Leberig A, Roth C: Inhalation of 5-Aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer, J. Pathbiol. B. 1996; 36: 169-174
- *Baumgartner R, Unsöld: High contrast fluorescence imaging using two-wavelength laser excitation and image processing, J. Photochem. Photobiol. 1987, 130-132

Literatur

- *Bechtel JJ, Kelley WR, Petty TL et al.: Outcome of 51 patients with roentgenographically occult lung cancer detected by sputum cytologic testing: A community hospital program, Arch. Intern. Med. 1994; 154: 957-980
- *Beckett WS: Epidemiology and ethiology of lung cancer, Lung Cancer 1993; 14:1-15
- *Beinert T, Mergenthaler HG: Bronchialkarzinome: Diagnostik, Therapie, Nachsorge, Dissertation Charite Humboldt-Universität Berlin 1997
- *Berg K., Anholt H. et al: The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic acid-treated cells, British Journal of Cancer 1996; 74:688-697
- *Berlin NI, Neuberger A, Scott IJ: The metabolism of 5-aminolevulinic acid, Biochem. J. 1956; 64: 80-100
- *Berlin NJ, Buchner CR, Fontana RS et al.: The National Cancer Institute cooperative early lung cancer detection program. Results of the initial screen (prevalence). Early lung cancer detection: Introduction, Am. Rev. Respir. Dis. 1984; 130: 545-549
- *Böcking A, Biesterfeld S, Chatelain R, Gien-Gerlach G, Esser E: Diagnosis of Bronchial Carcinoma on sections of Paraffin-Embedded Sputum, Acta Cytologica 1992; 36/1
- *Bolliger CT, Häußinger K: Early Detection of Lung Cancer; 1998
- *Bottomley SS, Müller Eberhard U: Pathophysiology of heme synthesis, Semin. Haematol. 1988; 25:282-302
- *Boyer J, Mourant J: Simulation of photon transport in biological tissues written, Los Alamos National Laboratory 1995
- *Brand P: Inhalationsstrategien zur optimierten lokalen bronchialen Deposition von Aminolävulinsäure (5-ALA), Institut für Inhalationsbiologie GSF Gauting Proposal 1996; 1-11
- *Brodbeck KJ, Profio AE, Frewin T, Balchum OJ: A system for real time fluorescence imaging in color for tumor diagnosis, Med. Phys. 1987; 14:637-639
- *Bültzingslöwen von, Emslander, Gallenberger, Hasholzner, Häußinger, Hauck, Henck, Huber, Lamerz, Pantel, Passlick, Seemann, Stieber: Diagnostik des Bronchialkarzinoms, Manual 'Tumoren der Lunge und des Mediastinums', Tumorzentrum München 1997

Literatur

- *Bundesamt für Strahlenschutz: Schutz des Menschen bei Sonnenbestrahlung und bei Anwendung von UV-Bestrahlungsgeräten. Empfehlungen der Strahlenschutzkommission vom 26. April 1990, 11-28
- *Burns DM: Tobacco Smoking, Epidemiology of Lung Cancer, edited by J. M. Samet, Lung Biology in Health and Disease 1994; 74:
- *Cheong WF, Prael SA, Welch AJ: A review of the optical properties of biological tissues. IEEE J. Quant. Electron 1990; 26:2166-2185
- *Decker A: Kohonen neural networks for optimal colour quantization Computation in Neural Systems, Network 1994; 5: 351-367
- *Deutsche Gesellschaft für Pneumologie: Weißbuch Lunge 1996: Zur Lage und Zukunft der Pneumologie in Deutschland
- *Dietel W: Untersuchungen zur ALA stimulierten Fluoreszenz für eine Verbesserung der Früherkennung von Karzinomen, VDI Abschlußbericht 13N6311/1 1998, 1-15
- *Doiron DR, Profio E, Vincent RG, Dougherty TJ: Fluorescence Bronchoscopy for Detection of Lung Cancer, Chest 1979; 76:27-32
- *Doll R, Introduction and Overview, Epidemiology of Lung Cancer, edited by J. M. Samet, Lung Biology in Health and Disease 1994; 74:
- *Durkin AJ, Richards Kortum R: Comparison of methods to determine chromophore concentrations from fluorescence spectra of turbid samples, Lasers Surg. Med. 1996, 75-89
- *Ebert DW, Roberts C, Farrar SK et al: Articular cartilage optical properties in the spectral range 300 - 850 nm, J of Biomedical Optics 1998; 3:326-333
- *Edell ES: Future therapeutic procedures, Thoracic Endoscopy 1996; 6:381-
- *Eichler HJ: Dispersion und Absorption des Lichtes, Lehrbuch der Experimentalphysik Band II, Optik, Bergmann L und Schaefer C, Walter de Gruiter 1987; 207-324
- *Fan KF, Hopper C et al: Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid for premalignant and malignant lesions of the oral cavity, Cancer 1996; 78: 1374-1383
- *Fang F, Meirong L, Yingjie L et al: Color correction of the video image obtained by angioscope, J. of Biomedical Optics 1998; 373-378

Literatur

- *Fiedler DM, Eckl PM, Krammer B: Does delta-aminolevulinic acid induce genotoxic effects ?, *J. Photochem. Photobiol.* 1993; 33: 39-44
- *Flehinger BJ, Kimmel M, Polyak T, Melamed MR: Screening for lung cancer: The Mayo Lung Project revisited, *Cancer* 1993; 72: 1573-80
- *Fontana RS, Sanderson DR, Taylor WF, Woolner LB, Miller WE, Mulun JR, Uhlenkopp MA: Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Mayo Clinic Study, *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984; 130: 561-565 Franklin WA: The Biology of Bronchial Premalignancy, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 1996; Vol. 17, No. 4
- *Fuchs C: In vitro Untersuchungen zu Fluoreszenz und photodynamischer Wirksamkeit 5-Aminolävulinsäure-induzierter Porphyrine, Dissertation an der med. Fak. der LMU München 1996
- *Galeotti T, Rossum GD et al: On the fluorescence of NAD(P)H in whole-cell preparations of tumours and normal tissues, *Eur. J. Biochem.* 1970; 17:485-496
- *Geneser F: Histologie: Atmungssystem, Deutscher Ärzte Verlag, 1990; 19:471-493
- *Ghisla S, Massey V, Lhoste JH, Mayhew SG: Fluorescence characteristics of reduced flavines and flavoproteins, In: K. Yagi, ed.: 'Reactivity of Flavins', Tokyo: University of Tokyo Press; 1975: 15-24
- *Gomer CJ, Daughtery TJ: Determination of [3H] and [14C] hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res.* 1979; 39:146-151
- *Goutermann M: Spectra of porphyrins, *J. Mol. Spectroscopy* 1961; 6:138-163
- *Gryczynski I, Kusba J, Lakowicz JR: Wavelength-selective light quenching of biomedical fluorophores: *Journal of biomedical optics*, 1997; 2:80-87
- *Haberland UHP, Blazek V, Schmitt HJ: Chirp Optical Coherence Tomography of layered scattering media, *J of Biomedical Optics* 1998; 3:259-266
- *Hansen JE, Ampaya EP: Human air space shapes, sizes, areas and volumes, *J of Applied Physiology* 1975; 38:990-995

Literatur

- *Häußinger K, Diaz-Jiménez JP, Rodriguez AN, Stanzel F, Huber RM, Pichler J, Baumgartner R: Photodynamic Therapy: Palliative and Curative Aspects, Prog. Respir. Res. Basel, Karger 2000; 30:1-12
- *Häußinger K, Kohlhäufel: Ätiologie und Epidemiologie des Bronchialkarzinoms, Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums, Tumorzentrum München, 1997
- *Häußinger K, Pichler J, Stanzel F, Markus A, Stepp H, Morresi-Hauff A, Baumgartner R: Interventional Bronchoscopy beyond the Year 2000: Autofluorescence, Prog. Respir. Res. Basel, Karger 2000; 30: 1-10
- *Häußinger K, Stanzel F, Huber MR, Pichler J, Stepp H: Autofluorescence Detection of Bronchial Tumors with the D-Light/AF, Diagnostic and Therapeutic Endoscopy 1998, 00: 1-8
- *Häußinger K, Stanzel F, Nimmermann C, Huber RM, Baumgartner R: Hämatoporphyrinderivate in der Therapie: Momentane Erkenntnisse und Ausblicke für die Zukunft, Atemw.-Lungenkrkh. 1996; 5:295-300
- *Herly L: Studies in selective differentiation of tissue by filtered ultraviolet light, Cancer Research 1943; 227-231
- *Huber RM, Gamarra F, Hautmann H: 5 Aminolevulinic Acid (ALA) for the fluorescence detection of bronchial tumors, Diagnostic and Therapeutic Endoscopy 1998, 5:113-118
- *Hermans C, Bernard A: Lung epithelium-specific proteins, Am J Respir Crit Care Med 1999; 159:646-678
- *Hoppe W, Lohmann W, Markl H, Ziegler H: Biophysik ein Lehrbuch, Springer Verlag 1978
- *Hung J, Lam S, LeRiche LC, Palcic B: Autofluorescence of Normal and Malignant Bronchial Tissue, Lasers in Surgery and Medicine 1991; 11:99-105 Johnson BE, Kelly MJ: Biology and Molecular Genetics of Lung Cancer, Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine 1996; 17/4
- *Jongen AJL, Sterenborg HJCM: Mathematical description of photobleaching in vivo describing the influence of tissue optics on measured fluorescence signals, Phys. Med. Biol 1997; 42:1701-1716

Literatur

- *Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM: Principles of neuronal science: Peter Gouras Color Vision, Elsevier Science Publishing, 1998; 31:467-480
- *Khanavkar B, Autofluorescence Bronchoscopy, Journal of Bronchology 2000; 7:60-66
- *Khanavkar B, Gnudi F, Muti A, Marek W, Müller KM, Atay Z, Topalidis T, Nakhosteen JA: Grundlagen der LIFE - Autofluoreszenzbronchoskopie, Ergebnisse nach 194 Untersuchungen im Vergleich mit Standardverfahren der Früherkennung des Bronchialkarzinoms, Übersicht
- *Koenig F, Larne R, Enquist H: Spectroscopic measurement of diffuse reflectance for enhanced detection of bladder carcinoma, J. Urol. 1998; 51:342-345
- *Koenig F, Mc Govern FJ, Altenhausen AF et al: Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer, J. Urol. 1996; 156:1597-1601
- *Koolman J, Röhm KH: Taschenatlas der Biochemie, Thieme 1994; 130,176
- *Krebsregister Saarland: Inzidenz des Bronchialkarzinoms, 1993
- *Kriegmair M, Stepp H, Steinbuch P, Lumper W, Ehson A, Stepp HG, Rick K, Knüchel R, Baumgartner R, Hofstetter A: Fluorescence cytometry following intravesical instillation of 5-Aminolevulinic acid: a new procedure with high sensitivity for detection of hardly visible urothelial neoplasias, Urol. Int. 1995; 55: 190-196
- *Labkowitz JR, Szmecinski H et al: Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89:1271-1275
- *Lam S, Becker HD: Future Diagnostic Procedures, Thoracic Endoscopy, Vol. 6, Number 2, May 1996; 6:363-379
- *Lam S, Hung J, Kennedy S, LeRiche JC, Vedal S, Nelems B, MacAulay C, Palcic B: Detection of Dysplasia and Carcinoma in Situ by Ratio Fluorometry, AM REV Respir. Dis. 1992; 146:1458-1461
- *Lam S, Kennedy T, Unger M, Miller YE, Gelmont D, Rusch V, Gipe B, Howard D, LeRiche JC, Goldman A, Gazar AF: Localization of Bronchial Intraepithelial Neoplastic Lesions by Fluorescence Bronchoscopy, Chest 1998; 113:696-702

Literatur

- *Lam S, Mac Auley C., Hung J. et al: Detection of dysplasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1993, 1035-1039
- *Leonhard M: New Incoherent Autofluorescence/Fluorescence System for Early Detection of Lung Cancer, Karl Storz GmbH & Co., Marketing New Technologies, Mittlerstr. 8, D-78532 Tuttlingen, Germany, *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy*; Vol. 5:71-75
- *MacAuley C, Lam S, Payne P et al: Malignancy associated changes in bronchial epithel cells in biopsy specimens, *Anal. Quant. Cytol.* 1995,17:53-61
- *Marek W, Krampe S: Automatisierte quantitative Image-Zytometrie bronchialer Spülflüssigkeiten bei Verdacht auf bronchopulmonale Tumoren: Vergleich mit Zytologie, Histologie und klinischer Diagnose, *Pneumologie* 1999; 53:583-595
- *Marsh BR, Frost JK, Erozan YS et al.: Occult bronchogenic carcinoma: Endoscopic localization and television documentation, *Cancer* 1972; 30:148-152
- *Mason TJ: The Descriptive Epidemiology of Lung Cancer, *Epidemiology of Lung Cancer*, edited by J. M. Samet, *Lung Biology in Health and Disease* 1994; 74:
- *Moore MR, McColl KEL et al: Porphyrins and enzymes of the heme biosynthetic pathway, *Disorders of Porphyrin Metabolism*, Plenum 1987; 21-116
- *Mountain CF: Revisions in the international system for staging lung cancer, *Chest* 1997; 111: 1710-1717
- *Müller KM, Gonzales S: Präneoplasien und Frühkarzinom der Lunge - Histogenetische Aspekte des Bronchialkarzinoms, *Pneumologie* 1991; 45:971-976
- *Müller KM: Early cancer of the lung, *Recent Results in Cancer Research* 1988; 106: 199-130
- *Müller-Höcker: Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; Tumoren der Lunge und des Medistinum, 4. Auflage 1997: 38-50
- *Nakhosten JA, Khanavkar B, Muti A, Marek W: Früherkennung des Bronchialkarzinoms durch Autofluoreszenz (LIFE)-Bronchoskopie und automatisierte Sputumzytometrie, *Atemwegs und Lungenkrankheiten* 1997, 23/4:211-217

Literatur

- *O'Brien KM et al: Development and evaluation of spectral classification algorithms for fluorescence guided laser angioplasty, IEEE Transactions on biomedical engineering 1989; 38:7 Seiten
- *Opitz K, Wirth W: Tabakrauchen und Raucherentwöhnung in Deutschland 1994
- *Orenstein A, Kostenich G, Rothmann C, Barschack I, Malik Z: Imaging of human skin lesions using multipixel fourier transform spectroscopy, Lasers Med. Sci., 1998; 13:112-118
- *Payne PW, Sebo TJ, Doudkine A, Garner D, MacAulay C, Lam S, LeRiche JC, Palcic B: Sputum screening by quantitative microscopy: A reexamination of a portion of the National Cancer Institute Cooperative Early Lung Cancer Study, Mayo Clin. Proc. 1997; 72:697-704
- *Peng Q, Berg K et al: 5-Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy: Principles and Experimental Research, Photochem. and Photobiol. 1997, 65:235-251
- *Petersen S: Identifizierung genetischer Läsionen in der Progression und Metastasierung von Bronchialkarzinomen, Dissertation an der Charite, Humboldt-Universität Berlin 1999
- *Peto R, Lopez A et al.: Mortality from Smoking in Developed Countries 1950-2000, Oxford, Oxford University Press, 1994
- *Pottier RH, Chow YF, LaPlante JP et al: Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission spectra in vivo, Photochem. and Photobiol. 1986; 44:679-687
- *Prahl S: Optical Property measurements using the inverse adding-doubling program, Oregon Medical Laser Center 1999; 1-37
- *Profio AE, Balchum OJ, Carstens F: Digital background subtraction for fluorescence imaging, Med Phys 1986; 13:717-721
- *Profio AE, Doiron DR, King EG: Laser fluorescence bronchoscope for localization of occult lung tumors. Med Phys 1979; 6:523-525
- *Qu J, MacAulay C, Lam S, Palcic B: Laser induced Fluorescence Spectroscopy at Endoscopy: Tissue Optics, Monte Carlo Modelling and in vivo Measurements, Optical Engineering 1995; 34:3334-3343

Literatur

- *Ramanujam N, Mitchell MF et al: Development of a multivariate statistical algorithm to analyze human cervical tissue fluorescence spectra acquired in vivo, *Lasers Surg. Med.* 1996; 46-62
- *Rasetti L, Rubino GF et al: Ferrochelatase, ALA-Dehydrase and ALA-synthetase activity in human tumor tissue, *Panminerva Med.* 1967; 9:132-135
- *Rasetti L, Rubino GF et al: Porphyrin porphobilinogen and amino ketone levels in tumor tissue, *Panminerva Med.* 1963; 7:105-110
- *Richards Kortum R, Rava RP et al: Spectroscopic diagnosis for colonic dysplasia, *Photochem. Photobiol.* 1991; 53:777-786
- *Rick K: Tumorselektivität und Pharmakokinetik von 5-Aminolävulinsäure-induziertem Protoporphyrin IX - Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen am Patienten. Dissertation an der med. Fak. der LMU München 1998
- *Ritter H, Martinetz T, Schulten K: Neuronale Netze: Kapitel 4: Das Modell Kohonen, Addison Wesley 1990; 67-77
- *Saccomano G, Archer VE, Auerbach O: Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells, *Cancer* 1974; 33: 256-270
- *Saccomano G: Carcinoma in situ of the lung: Its development, detection and treatment, *Semin. Resp Med.* 1982; 4:156-160
- *Schneckenburger H, Gschwend HM, Paul RJ et al: Time-gated spectroscopy of intrinsic fluorophores in cells and tissues, Optical biopsy and fluorescence spectroscopy and imaging, *Progress in biomedical optics, Proc SPIE* 1994; 187-195
- *Schomaker KT et al: UV Laser-induced fluorescence of colonic tissue, *Lasers in Surgery and Medicine* 1992; 12:63-78
- *Sekido Y, Fong KM, Minna JD: Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1978: F21-F59
- *Sheski FD et al: Endoscopic treatment of early-stage lung cancer: *Cancer Control Journal* 2000; 7: 1-12

Literatur

- *Spektrum der Wissenschaft: Special Edition on Cancer Medicine, Spektrum der Wissenschaft, Verlagsgesellschaft mbH Heidelberg 1997
- *Sroka R, Beyer W: Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic-acid-induced porphyrins in tumor-bearing mice, Photochem. and Photobiol. 1996; 34:13-19
- *Staveren HJ, Veen RLP et al: Classification of clinical autofluorescence spectra of oral leukoplakia using an artificial neural network: a pilot study, Oral Oncology 2000, 36:286-293
- *Stepp H, Baumgartner R et al: Bladder tissue diagnostics utilizing protoporphyrin IX fluorescence detection, Optical biopsy and fluorescence spectroscopy and imaging, Process in biomedical optics, Proc SPIE 1994: 20-31
- *Stepp H: Entwicklung und Optimierung eines computergestützten Tumorfrühdiagnoseverfahrens durch bildgebende Detektion tumorselektiver Fluoreszenzmarker. Dissertation an der med. Fak. der LMU München (1993)
- *Strauss GM, Gleason RE, Sugarbaker DJ: Screening for lung cancer: Another look; a different view, Chest 1997; 111: 754-68
- *Storz Karl GmbH & Co., Tuttlingen, Deutschland und Karl Storz Endoscopy, Amerika: Kombiniertes Autofluoreszenz-/Fluoreszenz-System zur Photodynamischen Diagnose bzw. Frühdiagnose von Lungenkrebs, nach Prof. Dr. K. Häußinger, Pneumologische Klinik, Gauting und PD Dr. R. M. Huber, Medizinische Klinik/Pneumologie, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Endoworld, Thor Nr. 2-D; 1997
- *Sudhakar K, Loe S et al: Fluorescent derivatives of human hemoglobin, J of Biol. Chemistry 1994; 269: 23095-23101
- *The World Health Organization histological typing of lung tumors, 2nd edition, Am.J.Clin Pathol 1977:123
- *Thews G, Mutschler E, Vaupel MA: Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1989
- *Thiberville L, Payne P, Vielkinds J, LeRiche J, Horsman D, Nouvet G, Palcic B, Lam S: Evidence of Cumulative Gene Losses with Progression of Premalignant Epithelial Lesions to Carcinoma of the Bronchus, Cancer Research; 55: 5133-5139, 1995

Literatur

- *Thiberville et al, Bota S: Small cell bronchial cancers: epidemiology, pathologic anatomy, etiology, diagnosis, course, treatment, Rev Prat 2001 Sep 1;51(13):1465-72
- *Wagner H, Ruckdeschel JC: Screening, Early Detection and Early Intervention Strategies for Lung Cancer, Cancer Control Journal 1998
- *Wagnieres GA, Star WM , Wilson BC : In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. Photochem. and Photobiol. 1998; 68:603-632
- *Welch AJ, Gardner C et al: Propagation of fluorescent light, Lasers in surgery and medicine 1997; 21:166-178
- *Wilson BC, Jaques SL: Optical Reflectance and Transmittance of tissues: Principals and Applications, IEEE J of Quantum Electronics 1990; 26/12:2186-2199
- *Woolner LB, Fontana RS et al: Roentgenographically occult lung cancer: Pathologic findings and frequency of multicentricity during a 10-year period, Mayo Clinic Proceedings 1984; 59:453-466
- *Wu J, Feld MS, Rava RP: Analytical model for extracting intrinsic fluorescence in turbid media, Appl. Opt. 1993; 3585-3595
- *Zeng H, MacAuley C et al: Reconstruction of in vivo skin autofluorescence spectrum from microscopic properties by Monte Carlo simulation, Journal of Photochemistry and Photobiology 1997; 38:234-240
- *Zeng H, MacAuley C et al: Spectroscopic and microscopic characteristics of human skin autofluorescence emission, Photochem. and Photobiol. 1995, 61: 639-645
- *Zeng H, MacAuley C et al: Spectroscopy and microscopy studies of skin tissue autofluorescence emission, SPIE 2324:198-207
- *Zonios G, Cothren RM et al: Fluorescence spectroscopy for colon cancer diagnosis, SPIE, 2324:9-13

7. Veröffentlichungen

- Forschungsberichte LIFE: Forschung für das Leben: Bronchologie; 1998, 1999, 2000
- Bericht VDI: Grundlagen zur Laser-induzierten Fluoreszenz-Diagnostik 13N6311; 1998
- Studienprotokoll: Europäische multizentrische Studie zum Nachweis von zentral lokalisierten Bronchialkarzinomfrühstadien im zentralen Bronchialsystem an Risikopatienten mittels Autofluoreszenz
- Pichler J, Stepp H, Baumgartner R, Häußinger K, Brand P, Stanzel F: Fluoreszenztumorlokalisierung nach Applikation von 5-Aminolävulinsäure Anwendung in der Pulmologie. Laser in der Medizin 1997, Lasermed 1997 München
- Pichler J, Stepp H, Baumgartner R, Häußinger K, Stanzel F, Brand P: Localization of early stages of bronchial tumors with autofluorescence and 5-aminolaevulinic acid induced fluorescence. BIOS Europe 1998 Stockholm
- Pichler J, Stepp H, Stanzel F, Hautmann H, Häußinger K, Huber R: Fluoreszenzgestützte Frühdiagnostik in der Bronchologie, Research Festival 1999 Großhadern
- Pichler J, Stepp H, Baumgartner R, Häußinger K, Stanzel F, Huber RM, Hautmann H, Gamarra F: Localisation of early stages of bronchial tumors with autofluorescence and 5-aminolaevulinic acid induced fluorescence, OSA 2000, Florida
- Häußinger K, Pichler J, Stanzel F, Markus A, Stepp H, Morresi-Hauff A, Baumgartner R: Interventional Bronchoscopy beyond the Year 2000: Autofluorescence, Prog. Respir. Res. Basel, Karger 2000; 30: 1-10
- Häußinger K, Stanzel F, Huber MR, Pichler J, Stepp H: Autofluorescence Detection of Bronchial Tumors with the D-Light/AF, Diagnostic and Therapeutic Endoscopy 1998, 00: 1-8
- Häußinger K, Diaz-Jiménez JP, Rodriguez AN, Stanzel F, Huber RM, Pichler J, Baumgartner R: Photodynamic Therapy: Palliative and Curative Aspects, Prog. Respir. Res. Basel, Karger 2000; 30:1-12

Anhang

8. Patentschriften (Stand: Januar 2002)

EP1052931 (WO9939626) : Endoskopisches System (zusammen mit K. STORZ)
NN : Bildverarbeitungssystem (zusammen mit K. STORZ)
EP 01108503.2 (1146039) : Hoch deuteriertes Porphobilinogen (zusammen mit LFL)

9. Danksagung

Name	Arbeit
Prof. Dr. K. Häußinger	Korrektur der Arbeit
Dr. F. Stanzel	Patientendaten AF/ALA Bilder AF
Prof. Dr. K. Müller, Dr. A. Morresi-Hauff	Pathologie
Dr. H. Stepp, Dr. R. Baumgartner	Mikroskopie, primäres endoskopisches Upset
Dr. H. Hautmann	spektroskopische Daten AF/ALA
H. Stepp, H. Schreckhase	Fa. H&H lokale AF-Erhebungsdaten
Dr. R. Sroka	Literatur
Dr. W. Bayer	Grundlagen der Gewebeoptik
Dr. K. Irion, A. Ehrhardt, Dr. M. Leonhard	Fa. Karl Storz endoskopische Geräte

10. Lebenslauf

Josef Peter Pichler

Geb. Datum: 23.03. 1966, ledig, römisch katholisch

Berufserfahrung:

Krankenhaus Hausham

83734 Hausham

Zivildienstleistender, Chirurgie und Intern Mai 85 bis April 87

Caritas Miesbach

83714 Miesbach

Altenpfleger, Betreuung und Pflege alter Menschen

Kreisjugendring Miesbach

83714 Miesbach

Mitglied des Vorstands, Errichtung von Jugendheimen, April 90 bis April 92

EKU Tübingen

72072 Tübingen, Biologische Kybernetik B/, Wanne

Betreuung des Großpraktikums der Biologischen Kybernetik, August 92 bis Feb. 93

MPI für biologische Kybernetik Tübingen

72072 Tübingen, Spemannstr. 38

Betreuung des Elektronenmikroskopischen Kurses, März 1993

MPI für biologische Kybernetik Tübingen

72072 Tübingen, Spemannstr. 38, Abteilung K.G. Götz

Tätigkeit in der Verhaltensforschung Juni 1995 bis Oktober 1995

Laserforschungslabor der Urologie, Klinikum Grosshadern

83144 München, Marchioninstr 23

Halbtagesstelle im Rahmen der Doktorarbeit

Januar 1997 bis Juli 2001

Anhang

Ausbildung:

Gymnasium Miesbach

83714 Miesbach

sehr gutes Abitur im mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig

September 1976 bis Mai 1985

LMU München

83411 München, Luisenstr. Studium der Biologie

sehr gutes Vordiplom (Nov 1989) in Chemie, Physik, Allg. Biologie, Zoologie

Scheine in Biophysik, org. Chemie, Biochemie

November 1987 bis April 1990

EKU Tübingen

72072 Tübingen, Biologische Kybernetik B/, Wanne

Hauptstudium Tierphysiologie

gute Diplom prüfung in Tierphysiologie/ Biologische Kybernetik

Genetik

Mikrobiologie

Elektronik

Scheine in Biomathematik, Informatik, Bildverarbeitung, Pflanzenphysiologie

Mai 1990 (6.Semester) bis Februar 1993 (9 .Semester)

MPI für biologische Kybernetik Tübingen

72072 Tübingen, Spemannstr. 38, Abteilung K.G. Götz sehr gute Diplomarbeit zum

Orientierungsverhalten von *Drosophila melanogaster* und Mutanten

April 1993 bis Mai 1995

Systemhaus Liegel München

80687 München, Elsenheimerstr. 63

Zertifikat in Medizinischer Informatik

November 1995 bis November 1996

Laserforschungslabor der Urologie, Klinikum Grosshadern

83144 München, Marchioninistr 23

Doktorarbeit zur endoskopischen Früherkennung von Lungentumoren

Januar 1997 bis Oktober 2002