

Aus der  
Urologischen Klinik und Poliklinik  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Untersuchungen zur CPI/III-Konzentration im Urin mittels  
Fluoreszenz-Spektroskopie zur Tumordiagnostik und zur  
Identifikation potenzieller Störfaktoren**

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

vorgelegt von  
Praveen George Johnson Chalissery

aus  
München

Jahr  
2025

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten:	Prof. Dr. Ronald Sroka
Zweites Gutachten:	Prof. Dr. Alexander Buchner
Drittes Gutachten:	Prof. Dr. Michael Vogeser
Promovierter Mitbetreuer:	Dr. rer. nat. Christian Homann
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	31.07.2025

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Vorbemerkungen.....</b>	<b>6</b>
<b>Publikationsliste.....</b>	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>11</b>
<b>Abstract (English) .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>15</b>
1.1 Photodynamische Therapie (PDT) und Photodynamische Diagnostik (PDD) .....	15
1.2 Häm-Synthese und -abbau .....	16
1.3 Herausforderungen in der Diagnostik onkologischer und genetischer Erkrankungen und Bestandteile der Häm-Synthese als deren potenzielle Marker .....	20
1.4 Harnbereitung und Harnableitung .....	22
1.4.1 Die Niere .....	22
1.4.2 Ableitende Harnwege .....	25
1.5 Urin als diagnostisches Mittel.....	26
1.6 Exogene Einflüsse auf Farbe und Geruch des Urins .....	29
1.7 Fluoreszenz und Spektroskopie des Urins.....	29
1.8 Urin-Fluoreszenzspektroskopie im Urin als potenzielles diagnostisches Mittel in der Humanmedizin .....	31
1.9 Einflüsse von Nahrungsergänzungsmitteln und Lebensmitteln auf das Urin-Fluoreszenzspektrum bei fluoreszenz-gestützten Untersuchungsmethoden .....	32
1.10 Fragestellung und Zielsetzung .....	33
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.1 Material und Methoden zur Untersuchung der Einflüsse von NEM/LM auf das Urin-Fluoreszenzspektrum .....	35
2.1.1 Eingeschlossene Studienteilnehmer .....	35
2.1.2 Verwendete Nahrungsergänzungsmittel und Lebensmittel .....	35
2.1.3 CP-III-Referenzlösungen.....	37
2.1.4 Messung und Auswertung der Urinproben.....	38
2.1.5 Statistische Auswertung.....	42
2.2 Material und Methoden der ALA-RDT-Studie.....	43
2.2.1 Kohorten 0 und 1 der ALA-RDT-Studie.....	45

2.2.2	Studienteilnehmer .....	46
2.2.3	Verabreichung von 5-ALA .....	46
2.2.4	Sammlung der Urinproben .....	46
2.2.5	Transport und Lagerung der Urinproben.....	47
2.2.6	Messung der Urinproben.....	48
2.2.7	Statistische Auswertung.....	50
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
3.1	Ergebnisse der Untersuchung der Einflüsse von Nahrungsergänzungsmitteln und Lebensmitteln auf das Urin- Fluoreszenzspektrum.....	51
3.1.1	Allgemeine Anmerkungen zum Urin-Fluoreszenzspektrum .....	51
3.1.2	Durchschnittliche Intensität des Urin-Fluoreszenzspektrums.....	53
3.1.3	Detaillierte Betrachtung der Urin-Fluoreszenzspektren.....	55
3.1.4	Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen beiden Spektrofluorometern.....	61
3.1.5	Konzentrationen der CPIII-Referenzlösungen.....	63
3.1.6	Ermittlung der Wiederfindungsrate für die CPIII-Konzentration im Urin .....	64
3.2	Ergebnisse der ALA-RDT-Studie .....	67
3.2.1	Ergebnisse der absoluten CPI/III-Konzentrationen in Kohorte 0 .....	67
3.2.2	Ergebnisse der absoluten CPI/III-Konzentrationen in Kohorte 1 .....	70
3.2.3	Ergebnisse in Kohorte 0 bei Division der CPI/III-Konzentration durch den Kreatinin-Wert der jeweiligen Urinprobe.....	73
3.2.4	Ergebnisse in Kohorte 1 bei Division der CPI/III-Konzentration durch den Kreatinin-Wert der jeweiligen Urinprobe.....	75
3.2.5	Multiplikation der CPI/III-Konzentration mit dem jeweiligen Volumen der Urinprobe in Kohorte 0.....	77
3.2.6	Multiplikation der CPI/III-Konzentration mit dem jeweiligen Volumen der Urinprobe in Kohorte 1 .....	79
3.2.7	Vergleich der beiden Oxidationsverfahren .....	80
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>82</b>
4.1	Untersuchung der Einflüsse von NEM/LM auf das Urin- Fluoreszenzspektrum.....	82
4.1.1	Einflüsse von NEM/LM auf das Urin-Fluoreszenzspektrum .....	82
4.1.2	Diskussion der Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Spektrofluorometer.....	83
4.1.3	Einflüsse von NEM/LM auf die CPIII-Wiederfindungsrate .....	84
4.1.4	Diskussion der Statistik .....	86
4.1.5	Limitationen und Ausblick .....	87
4.2	Diskussion der Ergebnisse der ALA-RDT-Studie.....	89
4.2.1	Absolute CPI/III-Konzentrationen in Kohorte 0.....	89
4.2.2	Absolute CPI/III-Konzentrationen in Kohorte 1.....	90

---

4.2.3	Division der CPI/III-Konzentrationen durch den Kreatinin-Wert der jeweiligen Urinprobe.....	91
4.2.4	Multiplikation der CPI/III-Konzentration mit dem Urinvolumen .....	92
4.2.5	Schlussfolgerung aus der ALA-RDT-Studie .....	92
4.2.6	Diskussion der verabreichten ALA-Dosis und deren potenzielle Verstoffwechslung im menschlichen Organismus.....	93
4.2.7	Diskussion der Statistik .....	95
4.2.8	Limitationen und Ausblick .....	96
<b>5.</b>	<b>Fazit.....</b>	<b>98</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>99</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>100</b>
	<b>Übereinstimmungserklärung .....</b>	<b>101</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>106</b>

## Vorbemerkungen

1. Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation das generische Maskulinum verwendet. Die in dieser Dissertation verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich, sofern nicht anders kenntlich gemacht, auf alle Geschlechter.
2. Ein Teil der in dieser Dissertation verwendeten Tabellen, Abbildungen und Bildunterschriften stammt aus der folgenden Primärquelle:

Chalissery et al.: Influence of vitamins and food on the fluorescence spectrum of human urine. *Lasers Surg Med.* 2024; 56: 485–495.

Obwohl die vollständige veröffentlichte Version der Primärquelle einer restriktiven Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0) unterliegt, gestattet der Verlag John Wiley & Sons den Autoren, Teile der Primärquelle nicht-kommerziell wiederzuverwenden, zu übersetzen und bei Tabellen sowie Abbildungen Änderungen vorzunehmen, sofern auf diese hingewiesen wird bzw. diese kenntlich gemacht werden.

Zusätzlich erfolgt die Verwendung dieser Tabellen, Abbildungen und Bildunterschriften mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons sowie des Copyright Clearance Center (Lizenz-Nummern: 6010090297169 und 1599898-2).

Die Tabellen und Abbildungen wurden inhaltlich nicht verändert, jedoch graphisch angepasst und ins Deutsche übersetzt. Bildunterschriften sind, sofern sie aus der Primärquelle übernommen wurden, ebenfalls ins Deutsche übersetzt worden. Das Copyright der originalen Abbildungen, originalen Tabellen und originalen Bildunterschriften liegt beim Verlag John Wiley & Sons.

---

Die Hinweise zum Copyright wurden gemäß den Lizenzbedingungen übernommen und in der Originalsprache belassen, da sie sich auf die englischsprachige Originalveröffentlichung beziehen. Die Nutzung erfolgt ausschließlich zu nicht-kommerziellen akademischen Zwecken im Rahmen dieser Dissertation.

## Publikationsliste

Veröffentlichungen in begutachteten Fachmagazinen:

- **Chalissery Praveen**, Homann Christian, Stepp Herbert, Eisel Maximilian, Aumiller Maximilian, Rühm Adrian, Buchner Alexander, Sroka Ronald: Influence of vitamins and food on the fluorescence spectrum of human urine. *Lasers Surg Med.* 2024; 56: 485–495.
- **Chalissery Praveen**, Homann Christian, Sroka Ronald (2024): Vitamin Supplements and Nutrition: Impact on the Urine Fluorescence Spectrum. *J Food Process Technol.* 15:1123

Konferenzbeiträge international:

- Mündlicher Vortrag: **Praveen Chalissery**, Max Eisel, Herbert Stepp, Adrian Rühm, Christian Homann, Ronald Sroka: Influence of specific supplements on urine fluorescence spectrum. SFM, 10th International Symposium on Optics and Biophotonics, Conference on Optical Technologies in Biophysics & Medicine XXIV, e-Congress, 09/2022
- Mündlicher Vortrag: **Praveen Chalissery**, Christian Homann, Maximilian Eisel, Herbert Stepp, Adrian Rühm, Ronald Sroka: Influence of vitamins and food on the fluorescence spectrum of human urine. European Conference on Biomedical Optics, München, Deutschland, 06/2023

## Abkürzungsverzeichnis

5-ALA, ALA	5-Aminolävulinsäure
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
AEM	Anregungs-Emissions-Matrix
ca.	circa
CoA	Coenzym A
CPgen III	Coproporphyrinogen III
CPI	Coproporphyrin I
CPI/III	Coproporphyrin I und III
CPIII	Coproporphyrin III
E	Exemplar
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FGR	Fluoreszenzgestützte Resektion
FZ	Fluoreszenz-Zystoskopie
GLY	Glycin
Gy	Gray
HMB	Hydroxymethylbilan
kDa	Kilodalton
LM	Lebensmittel
Mo.	Monat(e)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NEM	Nahrungsergänzungsmittel
nm	Nanometer
OP	Operation
PBG	Porphobilinogen
PDD	Photodynamische Diagnostik

---

PDT	Photodynamische Therapie
PPgen	Protoporphyrinogen IX
PpIX	Protoporphyrin IX
ProSp	Prototyp-Spektrofluorometer
RDT	Radiodynamische Therapie
RES	Retikuloendotheliales System
RT	Radiotherapie
s.	siehe
SCoA	Succinyl-Coenzym A
sog.	sogenannt
Std.	Stunde(n)
T.	Tag(e)
UPgen III	Uroporphyrinogen III
UPI	Uroporphyrin I
UPIII	Uroporphyrin III
Wo.	Woche(n)

## Zusammenfassung

Im Rahmen der Photodynamischen Therapie (PDT) und der Photodynamischen Diagnostik (PDD) kommen oral verabreichte oder lokal applizierte Photosensibilisatoren bzw. deren Vorstufen zum Einsatz. Durch die Verstoffwechslung im menschlichen Körper kommt es zu einer selektiven Anreicherung des Photosensibilisators oder dessen metabolisierter Stoffwechselprodukte im pathologischen Gewebe, zum Beispiel Tumoren.

Sowohl bei der PDT als auch bei der PDD wird das pathologische Gewebe mit Licht bestimmter Wellenlänge bestrahlt. Bei der PDT führt die Bestrahlung zu einer photodynamischen Reaktion mit Bildung von Sauerstoffradikalen, die in einer Elimination des pathologischen Gewebes resultiert. Bei der PDD führt die Bestrahlung zu einer Fluoreszenz des pathologischen Gewebes, wodurch es sich vom umliegenden gesunden Gewebe abhebt und seine Resektion mittels konventionellen Prozeduren erleichtert wird. Eine bei der PDT und PDD häufig verwendete Substanz ist 5-Aminolävulinsäure (5-ALA). Sie ist die Vorstufe des Photosensibilisators Porphyrin IX (PpIX).

Zudem sind 5-ALA und PpIX biochemische Stoffwechselprodukte der Häm-Synthese. Ausgehend von 5-ALA entstehen im Verlauf der Häm-Synthese weitere Stoffwechselprodukte wie unter anderem Coproporphyrin I und III (CPI und CPIII). Von diesen ist CPIII in den Fokus der Forschung gerückt, denn die Bestimmung der CPIII-Konzentration im Urin mittels Fluoreszenz-Spektroskopie könnte sich als zuverlässiger, effizienter und minimalinvasiver Marker für akute Porphyrrien und onkologische Erkrankungen erweisen.

Hierbei ist die Identifikation potenzieller Störfaktoren, die das Urin-Fluoreszenzspektrum und/oder die CPIII-Konzentration verfälschen könnten, notwendig, um mögliche Fehlinterpretationen bei Verwendung der CPIII-Konzentration in der Urindiagnostik zu verhindern. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel im Hinblick auf deren Einfluss auf das Urin-Fluoreszenzspektrum sowie auf die Bestimmung der CPIII-Konzentration im Urin untersucht. Daraus geht hervor, dass lediglich durch Vitamin B2 die Intensität des Urin-Fluoreszenzspektrums gesteigert wird, die Bestimmung der CPIII-Konzentration bleibt hingegen davon unberührt und unterliegt keinen Störfaktoren.

Des Weiteren wurde bei fluoreszenzgestützter Resektion (FGR) von Glioblastomen im Rahmen von PDD unter oraler Verabreichung von 5-ALA untersucht, ob die CPI/III-Konzentration im Urin vor der Resektion von der Konzentration nach der Resektion abweicht. Dieses Vorgehen könnte ggf. für CPI/III-Diagnostik im Urin als potenziellen Tumormarker genutzt werden. Zudem wurde die CPI/III-Konzentration in Urinproben untersucht, die während und nach der Bestrahlung bzw. Radiodynamischer Bestrahlung mit vorheriger 5-ALA-Gabe gesammelt wurden. Bei diesen klinischen Untersuchungen konnte eine Verringerung der CPI/III-Konzentration im Urin nach Resektion des Glioblastoms jedoch noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden und bedarf somit weiterer Forschung.

## Abstract (English)

In the context of photodynamic therapy (PDT) and photodynamic diagnostics (PDD), photosensitizer or its precursor substances such as 5-aminolevulinic acid (5-ALA) are either administered orally or applied locally. This leads to a targeted accumulation of metabolites like Protoporphyrin IX (PpIX) within diseased tissues, such as tumors. When these diseased tissues are exposed to light of specific wavelengths, they can be destroyed through a photodynamic reaction that generates oxygen radicals (PDT). Alternatively, the pathological tissue may exhibit fluorescence, distinguishing it from healthy tissue, thereby aiding in its surgical removal through conventional methods, such as surgery (PDD).

Precursor substances for PDT and PDD such as 5-ALA and photosensitizer in PDT and PDD such as PpIX are metabolites involved in the heme synthesis pathway. Based on 5-ALA, further involved metabolites of the heme synthesis pathway include Coproporphyrin I and III (CPI and CPIII). The measurement of CPIII levels in urine through fluorescence spectroscopy may serve as a reliable, efficient, and minimally invasive biomarker for acute porphyrias and certain oncological conditions.

However, it is crucial to identify potential confounding factors that could alter the urinary fluorescence spectrum and CPIII levels to avoid misinterpretation in diagnostic applications. This doctoral thesis investigates the impact of nutrition and dietary supplements on the urine fluorescence spectrum and furthermore the quantification of CPIII in urine. The findings indicate that only supplemented vitamin B2 shows an impact in form enhanced intensity of the urine fluorescence spectrum. The determination of the CPIII concentration within the urine remains

stable and unaffected by any supplemented and potentially interfering substances.

Furthermore, additional investigations were conducted on glioblastoma patients. The concentration of CPI/III in urine was monitored before, while and after the excision of glioblastomas during the PDD procedure with oral application of 5-ALA. A discovery of differences of the CPI/III-concentration at different times could make it possible to employ CPI/III as a marker for urine tumors. Moreover, the CPI/III-concentration was examined in urine samples collected during and after radiation and radiodynamic therapy with prior 5-ALA administration. Further research is necessary since the evidence for a clear decrease in CPI/III-concentration in urine following glioblastoma resection is still equivocal.

# 1. Einleitung

## 1.1 Photodynamische Therapie (PDT) und Photodynamische Diagnostik (PDD)

Die PDT ist eine Behandlungsform, welche in der Medizin eingesetzt wird [1, 2]. Sie macht sich die Eigenschaften eines Photosensibilisators mit bekannten optischen Eigenschaften zunutze, der von pathologischem Gewebe (z. B. Tumoren) vermehrt aufgenommen/produziert wird [1, 3, 4]. Nach Einnahme oder Applikation des Photosensibilisators bzw. dessen Vorstufe wird das pathologische Gewebe mit Licht bestimmter Wellenlängen bestrahlt, durch die der Photosensibilisator angeregt wird [1, 3, 4]. Dies führt zu einer photodynamischen Reaktion mit Fluoreszenz und mit Bildung von Sauerstoffradikalen, die in einer Zerstörung des pathologischen Gewebes resultiert [1, 3-5].

Eine Etablierung der PDT ist in verschiedenen Fachbereichen der Medizin zu beobachten: in der Dermatologie ist der Einsatz bei Hautläsionen und in der Gastroenterologie bei Läsionen des Gastrointestinaltraktes erprobt [6-10]. Die PDT findet zudem bei der Behandlung von Tumoren der Lunge, des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs, des Prostatakarzinoms und des Glioblastoms Anwendung [11-18].

Neben der PDT macht man sich in der Medizin ferner die PDD zunutze: Bei der PDD wird, wie in der PDT, ein Photosensibilisator bzw. dessen Vorstufe verabreicht oder appliziert, der vom pathologischen Geweben vermehrt aufgenommen wird [19, 20]. Im Falle einer Bestrahlung mit Licht einer bestimmter Wellenlänge lässt sich das pathologische Gewebe aufgrund von Fluoreszenz vom gesunden Gewebe unterscheiden [19, 20]. In der Neurochirurgie wird die PDD im Rahmen

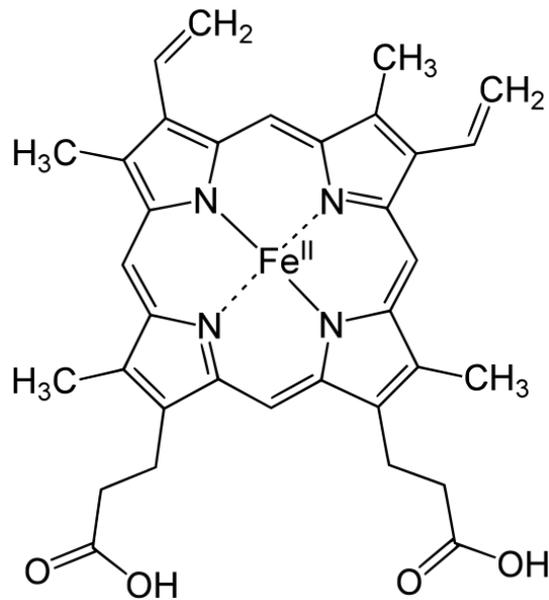
fluoreszenzgestützter Resektionen (FGR) angewendet: nach Verabreichung eines Photosensibilisators bzw. dessen Vorstufe und Bestrahlung mit Licht lässt sich das Tumorgewebe sichtbar vom gesunden Gehirngewebe unterscheiden, was zu einer präziseren Resektion des Tumorgewebes verhelfen kann [21-23].

Ein Photosensibilisator, der sowohl in der PDT als auch in der PDD Anwendung findet, ist Protoporphyrin IX (PpIX), das nach der oralen Einnahme der Vorstufe 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) entsteht [8, 18, 21, 23-25].

## 1.2 Häm-Synthese und -abbau

Häm stellt das wichtigste Porphyrin des Menschen dar und ist Bestandteil des Hämoglobins, eines in den Erythrozyten befindlichen Proteins [18, 26, 27]. Die Funktion des Hämoglobins besteht darin, Sauerstoff im Körper zu binden und zu transportieren [18, 26, 27]. Darüber hinaus findet sich Häm nicht nur im Hämoglobin, sondern auch in einer Vielzahl anderer Enzyme wie beispielsweise Guanylatzyklasen, Cytochromen der Atmungskette, Oxygenasen und Peroxidasen [26, 27]. Folglich ist jede Zelle des menschlichen Körpers zur Häm-Synthese befähigt [26-28]. Vorrangig findet die Häm-Synthese jedoch in den Hepatozyten und bei den erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark statt [26-29].

Häm gehört zur Gruppe der Porphyrine und diese bestehen aus vier Pyrrolringen, die durch Methinbrücken miteinander verbunden sind (**Abbildung 1**) [26, 27]. Ferner tragen Porphyrine neben den Pyrrolringen Substituenten [26, 27]. Die Substituenten des Häms sind vier Methyl-, zwei Propionyl- und zwei Vinylgruppen sowie zweiwertiges Eisen (**Abbildung 1**) [26, 27]. Vorstufen der Porphyrine werden als Porphyrinogene bezeichnet [26, 27].

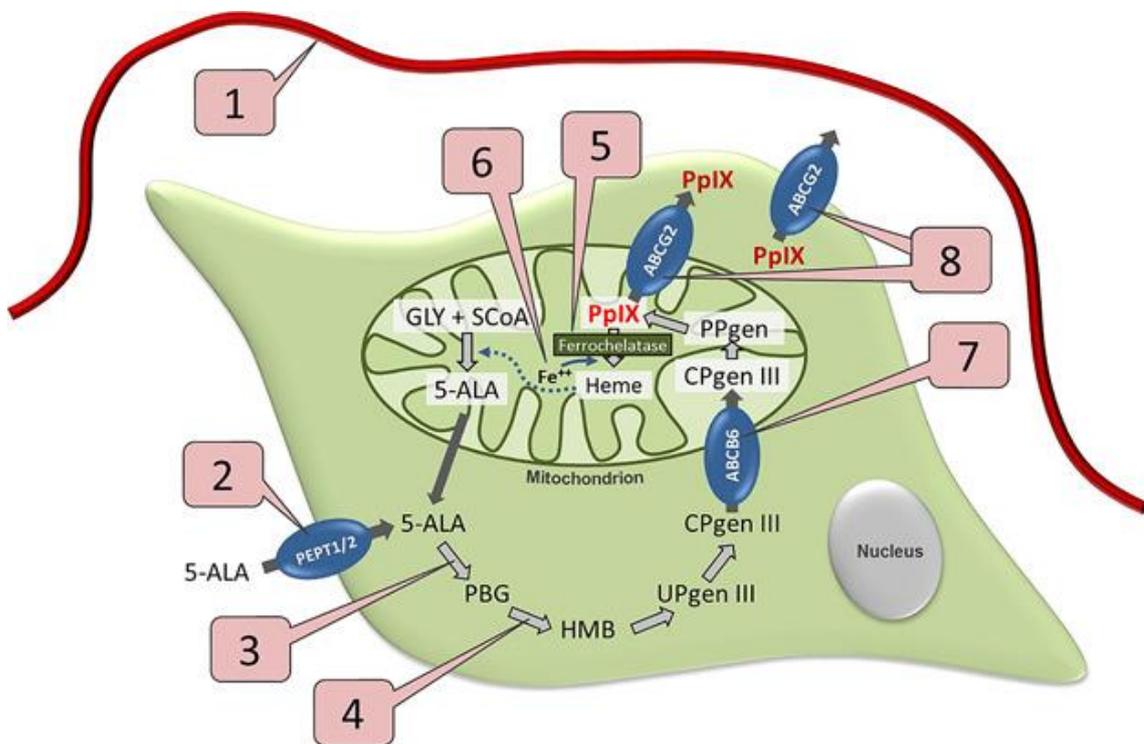


**Abbildung 1:** Chemische Struktur von Häm, adaptiert nach [30].

Im Rahmen der PDT und PDD wird 5-ALA verabreicht, wobei es sich um ein Zwischenprodukt der Häm-Synthese handelt (s. Kapitel 1.1) [18, 26]. Ohne exogene Zufuhr erfolgt die Synthese von 5-ALA durch die Reaktion von Succinyl-CoA (SCoA) und der Aminosäure Glycin (GLY) unter katalytischer Wirkung eines Enzyms namens ALA-Synthase in der mitochondrialen Matrix (**Abbildung 2**) [18, 26, 27].

In sieben weiteren enzymatischen Schritten wird die Synthese von 5-ALA zum Häm fortgeführt (**Abbildung 2**) [18, 26, 27]: es ist zu beobachten, dass 5-ALA das Mitochondrium verlässt und in das Zytosol gelangt [18, 26]. Im Zytosol erfolgt die Kondensation zweier Moleküle 5-ALA unter Abspaltung zweier Wassermoleküle zum Porphobilinogen (PBG) [18, 26, 27]. Im Anschluss daran werden vier Moleküle PBG durch vierfache Desaminierung zu Hydroxymethylbilan (HMB) kondensiert; dann wird das HMB durch den Ringschluss zum Uroporphyrinogen III (UPgen III) zyklisiert [18, 26, 27]. Daraufhin erfolgt eine Decarboxylierung der vier Acetylseitenketten des UPgen III, wodurch Coproporphyrinogen III (CPgen III)

entsteht [18, 26, 27]. Das CPgen III wird in den Intermembranraum des Mitochondriums befördert [18, 26, 27], wo eine Decarboxylierung und Oxidation der Propionylseitenketten des CPgen III zu Vinylresten stattfindet [26, 27]. Daraus entsteht Protoporphyrinogen IX (PPgen), dessen Methylenbrücken nachfolgend durch Oxidation zu Methinbrücken transformiert werden [26, 27]. Dadurch entsteht ein neuer Metabolit namens Protoporphyrin IX (PpIX), welcher in die mitochondriale Matrix transportiert wird [26, 27]. Dort erfolgt der Einbau von zweiwertigem Eisen, woraus Häm entsteht (**Abbildung 2**) [26, 27].



**Abbildung 2:** Vereinfachte Darstellung der Häm-Synthese, adaptiert nach [18, 31]. Die Zahlen 1-8 kennzeichnen Stoffwechselschritte und Lokalisationen, die zu einer selektiven Akkumulation von PpIX im Tumorgewebe führen könnten. 1 steht für eine durchlässige Blut-Hirn-Schranke bei Erkrankung durch Gliome. 2 bezieht sich auf die erhöhte Aufnahme von 5-ALA in Gliom-Zellen; 3 und 4 auf erhöhte Enzymaktivitäten. 5 bezieht sich auf verminderte Enzymaktivität und 6 auf die verminderte Verfügbarkeit von Eisen. 7 und 8 zeigt die Transportsysteme der Zelle auf.

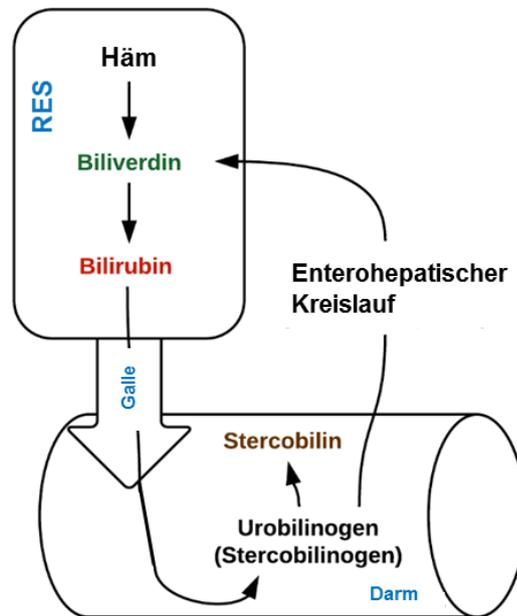
Die Regulation der Häm-Synthese erfolgt über die Aktivität bzw. Inaktivität der ALA-Synthase [26, 27]. Zwei Isoenzyme der ALA-Synthase sind bekannt: ALA-

Synthase 1 und 2 [26, 27]. Erstere kommt in allen Geweben vor, wohingegen letztere lediglich in Erythroblasten zu finden ist [26, 27]. Während die ALA-Synthase 1 bei hohen Häm-Spiegeln durch negative Rückkopplung gehemmt wird, bewirken zweiwertiges Eisen und Erythropoietin eine Stimulation der ALA-Synthase 2 [26, 27].

Des Weiteren haben Medikamente und Ernährung einen Einfluss auf die Expression der in allen Geweben vorkommenden ALA-Synthase 1 [26, 27]. Bei Defekten von Enzymen der Häm-Synthese kommt es zur Ansammlung von Metaboliten der Häm-Synthese [26, 27]. Ein Beispiel hierfür ist die akute Porphyrrie, bei welcher es sich um eine genetische Erkrankung handelt [26, 27]. Die Einnahme von Arzneimitteln wie Barbituraten oder Steroiden führt zur Stimulation der Transkription des ALA-Synthase-1-Gens [26, 27], was durch eine Ansammlung von Stoffwechselprodukten der Häm-Synthese zu einem Schub der akuten Porphyrrie führen kann [26, 27]. Während eine Energieaufnahme in Form von Glukose zur Hemmung der Expression der ALA-Synthase 1 führt, bedingt die Nahrungskarenz eine Stimulation der Bildung der ALA-Synthase 1 [26, 27]. Somit kann Fasten durch die Ansammlung von Stoffwechselprodukten der Häm-Synthese zu einem Schub der akuten Porphyrrie führen [26, 27].

Der Abbau und die Ausscheidung von Häm erfolgen durch Umwandlungsschritte von Biliverdin zu indirektem Bilirubin, was im hauptsächlich in der Leber befindlichen retikuloendothelialen System (RES) stattfindet [26, 27, 32]. Daraufhin erfolgt die Biotransformation von indirektem Bilirubin zu direktem Bilirubin, welches über die Galle in den Darm gelangt und von der Darmflora in Urobilinogen und Stercobilinogen umgewandelt wird (**Abbildung 3**) [26, 27]. Die Ausscheidung von Stercobilinogen erfolgt nach Oxidation zu Stercobilin über den Stuhl [26, 27]. Das

verbliebene Urobilinogen wird zum Teil über den enterohepatischen Kreislauf rückresorbiert, zum anderen Teil nach Oxidation als Urobilin über den Urin ausgeschieden [26, 27]. Urobilin verleiht dem Urin seine gelbe Farbe [26, 27].



**Abbildung 3:** Häm-Abbau, adaptiert nach [33].

### 1.3 Herausforderungen in der Diagnostik onkologischer und genetischer Erkrankungen und Bestandteile der Häm-Synthese als deren potenzielle Marker

Bei hochgradigen Gliomen handelt es sich um bösartige Tumoren des zentralen Nervensystems [24, 34]. Die Therapie der hochgradigen Gliome besteht aus einer Kombination von chirurgischer Resektion und anschließender Radio- und Chemotherapie [24]. Nichtsdestotrotz gelten sie als unheilbar und ihre Prognose ist infaust [21, 24, 34]. In der Neurochirurgie wird 5-ALA bei FGR im Rahmen von PDD verabreicht, da es mehrere Stunden nach Einnahme zur Ansammlung von PpIX in den Gliomen führt und bei Bestrahlung mit blauem Licht rote Fluoreszenz emittiert [24, 35]. Aktuelle wissenschaftliche Untersuchungen deuten darauf hin,

dass sich bei Patienten mit hochgradigen Gliomen nach oraler Verabreichung von 5-ALA im Blutserum signifikant höhere PpIX-Konzentrationen zeigen im Vergleich zu gesunden Probanden [24]. Die Messung der PpIX-Konzentration im Blutserum kann eine effizientere diagnostische Methode für den Therapieverlauf der Patienten im Vergleich zu seriellen MRTs darstellen [24]. Außerdem zeigten sich signifikant höhere Konzentrationen von PpIX im Blutplasma nach Verabreichung von 5-ALA bei an Blasenkrebs leidenden Menschen, sodass PpIX das Potenzial aufweist, sich als Tumormarker für Blasenkrebs etablieren zu können [24, 35].

Nicht nur die Bestimmung der PpIX-Konzentration im Blut, sondern auch die Bestimmung von CPIII- und UPI-Konzentrationen im Urin wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Screening-Methode für Karzinome untersucht [36, 37]. Das Forschungsteam sammelte acht Stunden nach Einnahme von 5-ALA Urinproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom und gesunden Probanden [36, 37]. Es stellte sich heraus, dass die Porphyrinkonzentrationen im Urin bei den an kolorektalem Karzinom leidenden Patienten signifikant höher waren im Vergleich zu den gesunden Probanden [36, 37]. Vier Wochen nach operativer Resektion des kolorektalen Karzinoms zeigten die Patienten unter Einnahme von 5-ALA signifikant niedrigere Porphyrinkonzentrationen im Urin im Vergleich zu vor der Resektion [36, 37]. Auch im Urin von Patienten mit Blasenkarzinomen konnten acht Stunden nach 5-ALA-Gabe erhöhte Porphyrinkonzentrationen von CPI, CPIII, UPI und UPIII verglichen zu gesunden Probanden festgestellt werden [38]. Dieses Erkenntnis könnte ebenfalls zu effizienterer und nicht-invasiverer Diagnostik von Blasenkarzinomen beitragen [38].

Sogar ohne Verabreichung von 5-ALA konnten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom, Mamma- und Nierenkarzinom erhöhte Porphyrin-Konzentrationen im Blut mittels Analyse von Fluoreszenzspektren gefunden werden [24, 39-44].

Weitere wissenschaftliche Untersuchungen legen nahe, dass die Bestimmung der CP-III-Konzentration im Urin nicht nur für die Tumordiagnostik, sondern auch für die Diagnostik von genetischen Erkrankungen wie der akuten Porphyrrie geeignet sein könnte [45].

Es folgen allgemeine Informationen zur Anatomie und Physiologie der Harnbereitung und Harnableitung sowie Einblicke in die klinische Relevanz der Urindiagnostik.

## **1.4 Harnbereitung und Harnableitung**

Das nephro-urogenitale System des Menschen besteht aus zwei Nieren, zwei Harnleitern, der Harnblase sowie der Harnröhre [46]. Der Urin wird als Ultrafiltrat des Blutplasmas von den Nieren produziert und anschließend im nephro-urogenitalen System transportiert, gespeichert sowie bei Bedarf ausgeschieden [46-52].

### **1.4.1 Die Niere**

Durch die Niere werden wasserlösliche Endprodukte mittels Urin aus dem Körper ausgeschieden, der Volumenhaushalt des Körpers reguliert, die Homöostase der Elektrolytkonzentration und des Säure-Basen-Haushalts im Körper aufrechterhalten und weitere hormonelle Aufgaben erledigt [46-55]. Des Weiteren ist die Niere für humorale Aufgaben sowie dem Katabolismus von Peptiden, dem Pro-

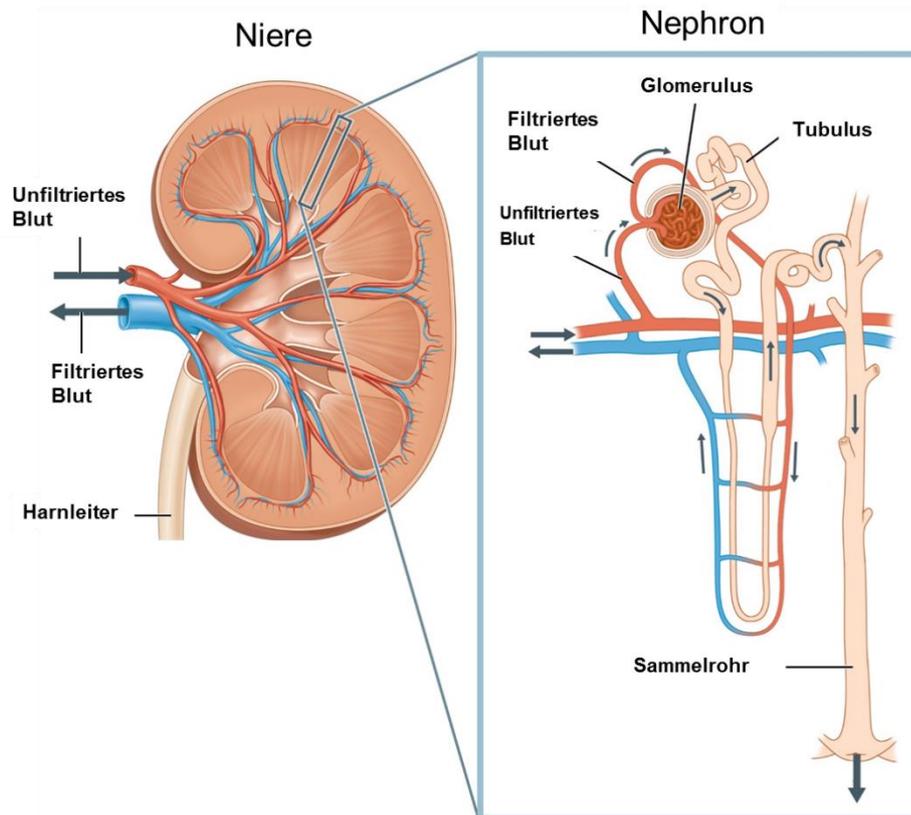
teinabbau sowie der Glukoneogenese zuständig [48, 49]. Aufgrund dieser wichtigen Funktionen sind intakte Nieren für die Homöostase des menschlichen Organismus unabdingbar [49].

Die Nieren weisen eine paarige Anordnung auf und befinden sich mit den Nebennieren innerhalb einer Fettkapsel im Retroperitonealraum [49]. Sie lassen sich aus anatomisch-funktioneller Sicht in Nierenlappen unterteilen [49]: Innerhalb dieser Nierenlappen besteht die Niere an ihrer Oberfläche aus Rinde (Cortex renalis), während sich innen das Mark (Medulla renalis) befindet [49]. Letzteres weist mit seiner Innenzone, welche auch als Papille bezeichnet wird, Verbindungen zum Nierenbecken (Pelvis renalis) auf [49]. Die kleinsten funktionellen Einheiten der Niere werden als Nephrone bezeichnet und umfassen die Nierenkörperchen mit Glomeruli und das Tubulussystem (**Abbildung 4**) [47, 49-52].

In der Nierenrinde befinden sich ungefähr eine bis eineinhalb Millionen Glomeruli, [49-52]. Das Blut gelangt über die beiden Nierenarterien (Aa. renales) und ihren Verzweigungen in die Glomeruli, wo das durchfließende Plasma zum Primärharn filtriert wird [49-52, 56, 57]. Hierdurch entstehen pro Tag schätzungsweise 130 bis 200 Liter Primärharn [49-52]. Die Filtration des Primärharns über die Glomeruli findet nach Molekülgröße sowie Molekülmasse und nach Ladung statt [49]. Moleküle mit einem Radius kleiner als 1,6 bis 1,8 nm und einer Masse von 6 bis 15 kDa können frei filtriert werden und werden somit mit dem Primärharn ausgeschieden [57]. Bei Molekülradien von 1,8 bis 4,4 nm ist die Durchlässigkeit des Filters abhängig von der Ladung des jeweiligen Moleküls [57]. Positiv geladene Moleküle können im physiologischen Zustand besser filtriert werden als ungeladene Moleküle [57, 58], letztere hingegen besser als negativ geladene Moleküle

[57, 58]. Zu den in den Glomeruli filtrierten Stoffen gehören unter anderem Aminosäuren, Salze und Zucker, obwohl sie für den menschlichen Körper essenziell sind [49]. Im Gegensatz dazu würde die Ansammlung mancher Endprodukte aus dem Protein- und Nukleinsäurestoffwechsel toxisch für den Organismus sein, beispielsweise Ammoniak, Harnstoff, Kreatinin, Oxalat und Harnsäure [49].

Somit finden sich im Ultrafiltrat sowohl eine Vielzahl an essenziellen Molekülen als auch ausscheidungspflichtige Stoffe [49]. Um diese voneinander zu trennen, ist das Tubulussystem zuständig, das an die Glomeruli angeschlossen ist [49]: das Tubulussystem sorgt dafür, dass jene essenziellen Stoffe sowie Wasser resorbiert und die toxischen Endprodukte aus dem Körper sezerniert werden [49, 51, 56, 59]. Der nun bei der Passage durch das Tubulus- und Sammelrohrsystem entstehende Harn wird zum Endharn konzentriert und macht einen Prozent des Primärharns aus [49, 51]. Der Endharn wird anschließend über die ableitenden Harnwege aus dem Körper ausgeschieden [49, 51].



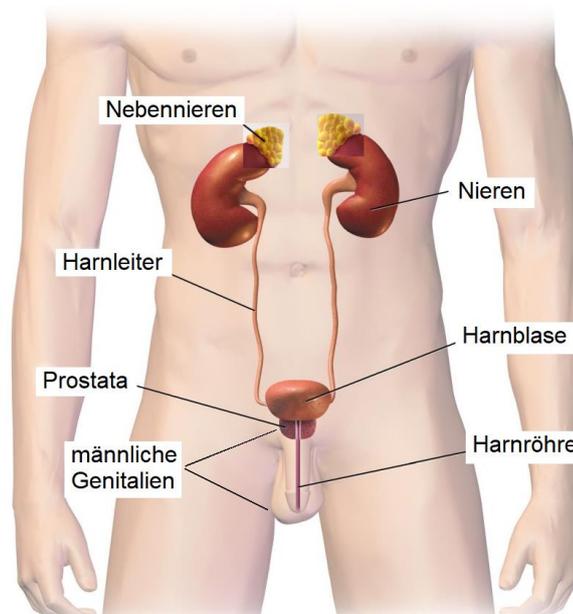
**Abbildung 4:** Aufbau der Niere, adaptiert nach [60]. Das unfiltrierte Blut gelangt über die A. renalis in die Niere und wird vom Nephron filtriert. Der im Glomerulus filtrierte Primärharn gelangt in das nachgeschaltete Tubulus- und Sammelrohrsystem zur weiteren Resorption, Sekretion und Konzentration des Harns. Arteriell Blut ist in dieser Abbildung rot und venöses Blut ist blau dargestellt.

#### 1.4.2 Ableitende Harnwege

Die ableitenden Harnwege bestehen aus den Nierenkelchen, den Nierenbecken, den Harnleitern, der Harnblase sowie der Harnröhre (**Abbildung 5**) [49-51, 61].

Die Peristaltik des Harnleiters stellt den Transportmechanismus für den in der Niere produzierten Endharn bzw. Urin dar [49, 51]. Der Endharn wird in der Harnblase während der Füllungsphase gesammelt [49], deren maximales physiologisches Fassungsvermögen 0,5 bis 2 Liter beträgt [50]. Bei ausreichendem Inhalt (ca. 0,15 bis 0,3 Liter) senden die Dehnungsrezeptoren der Harnblase viszerofereente Signale an das vegetative Nervensystem und führen zum Harndrang [50,

62]. Verstärkte Aktivität der Blasenmuskulatur führt zur Erhöhung des Drucks in der Blase und bei Relaxation der Schließmuskulatur kann die Entleerung der Harnblase stattfinden, wobei der Urin über die Harnröhre ausgeschieden wird [50, 62].



**Abbildung 5:** Nephro-urogenitales System mit Nieren und ableitenden Harnwegen beim biologischen Mann, adaptiert nach [63].

## 1.5 Urin als diagnostisches Mittel

Untersuchungen des Urins reichen bis weit in die Vergangenheit zurück [64, 65]. In den ältesten erhaltenen medizinischen Schriftstücken wird erwähnt, dass Parameter wie Menge, Farbe, Konsistenz und sogar Geschmack des Urins bei der Entscheidungsfindung im Rahmen der Diagnostik und Therapie berücksichtigt wurden [64, 65]. Beispielsweise hat im 5. Jahrhundert v. Chr. der Philosoph Heronogenes die Farbe und andere Eigenschaften des Urins als mögliche Hinweise auf bestimmte Krankheiten beschrieben [47, 66]. Es ist bekannt, dass Urin Ärzten seit Jahrhunderten als Untersuchungsmaterial dient [47, 64].

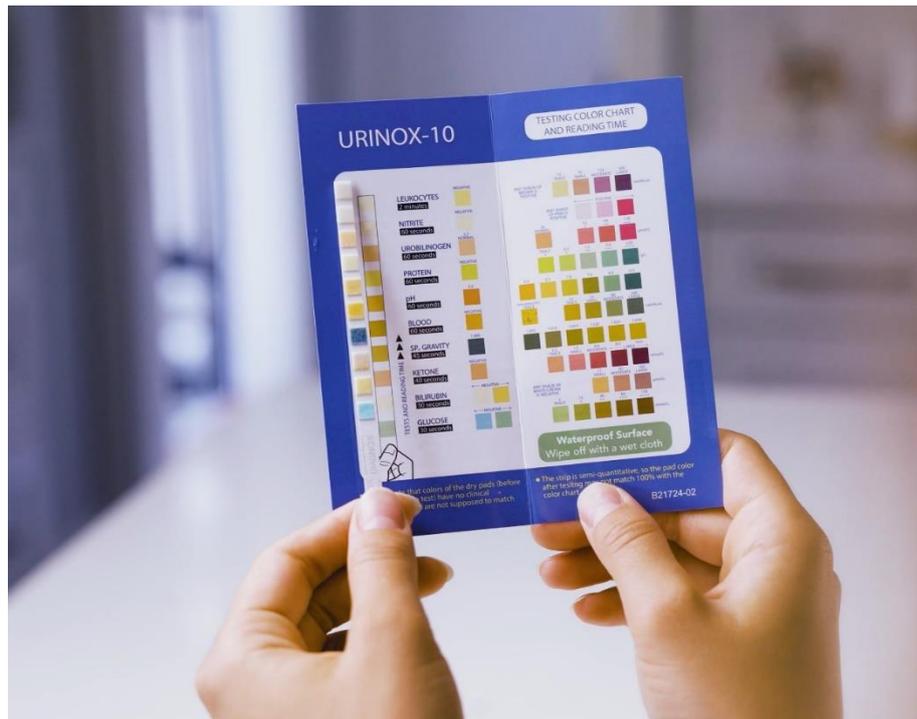
Die Urindiagnostik ist ein wichtiger Bestandteil der klinischen Diagnostik und bringt Erkenntnisse über den Gesundheitszustand des Patienten ein [47, 64]. Sie besteht hauptsächlich aus der Untersuchung des Urinstatus und der laboratoriumsmedizinischen Untersuchung des Urinsediments [52, 67]. Dafür wird die Urinprobe frisch gewonnen und sollte aus Mittelstrahlurin bestehen [52, 67, 68]. Die Untersuchung des Urinstatus umfasst zuerst die Inspektion der Urinprobe, dann die Diagnostik mittels Teststreifen und gegebenenfalls weitere laboratoriumsmedizinische Untersuchungen [67, 68].

Bei der Inspektion des Urins gelten alle Farbtöne von hellem bis dunklem Gelb als physiologisch, wobei dunkles Gelb Folge einer Dehydratation sein kann [67]. Der physiologische Urin ist klar, wohingegen Trübungen auf Infektionen hinweisen können [67]. Eine rötliche Verfärbung des Urins kann Symptom einer Hämaturie sein, während brauner Urin mit Glomerulonephritiden in Zusammenhang gebracht werden kann [67]. Darüber hinaus wird eine rot-orange Färbung des Urins mit einer Hyperbilirubinämie in Verbindung gebracht [67]; hingegen können zu hohe Konzentrationen an Urobilinogen dem Urin eine schwarze Farbe verleihen [69]. Farblosigkeit des Urins kann auf einen unkontrollierten Diabetes hinweisen [67].

Normalerweise weist der Urin einen leicht muffigen, abgestandenen Geruch auf [67]. Pathologische Zustände wie Harnwegsinfektionen können zur Veränderung von Farbe und Geruch des Urins führen, während Stoffwechselkrankheiten wie Diabetes mellitus für einen süßen und fruchtigen Geruch sorgen können [67, 70].

Der Urinteststreifen ermöglicht den unverzüglichen und semiquantitativen Nachweis von Parametern wie Leukozyten, Erythrozyten, Nitrit, Protein, pH-Wert, Ke-

tonkörper, Glukose und Bilirubin (**Abbildung 6**) [52, 67]. Bei der laboratoriumsmedizinischen Untersuchung des Urinsediments findet eine mikroskopische Betrachtung des Bodensatzes statt, nachdem der Urin zentrifugiert wurde [67]. Gängige Parameter bei der Untersuchung des Urinsediments sind Leukozyten, Erythrozyten, Zylinder, Kristalle, Bakterien, Pilze und Lipide [67].



**Abbildung 6:** Beispiel für einen Urinteststreifen mit Legende, adaptiert nach [71]. Der Teststreifen wird in der Regel in die frisch gewonnene Probe aus Mittelstrahlurin gehalten. Bei pathologischen Zuständen führen chemische Reaktionen zu einer Veränderung der Farbe, deren Auswertung mithilfe der Legende erfolgen kann.

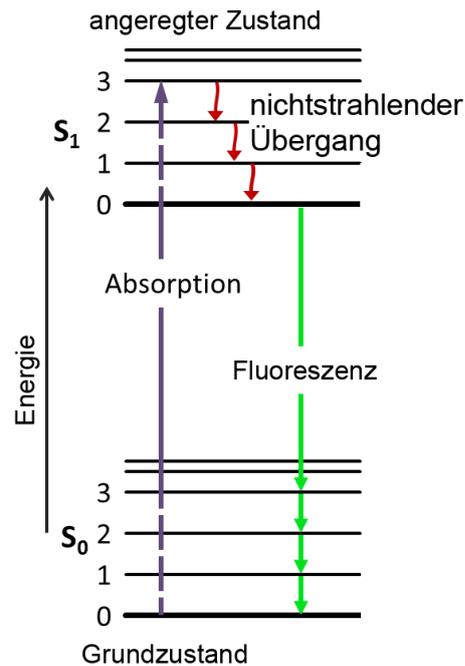
Außerdem gibt es weiterführende laboratoriumsmedizinische Untersuchungsmethoden des Urins, um beispielsweise Zuständen wie einer Proteinurie und Hämaturie bzw. Erkrankungen wie einem Plasmozytom genauer auf den Grund zu gehen [67].

## 1.6 Exogene Einflüsse auf Farbe und Geruch des Urins

Dass pathologische Zustände im menschlichen Organismus die Farbe und den Geruch des Urins verändern können, wurde bereits erläutert (s. Kapitel 1.5). Allerdings können auch exogene Faktoren wie Medikamente, Chemikalien, Nahrungsmittel sowie Vitaminpräparate die Farbe und den Geruch des Urins verändern [67-69, 72-80]. Medikamente wie Propofol und Metoclopramid können den Urin grün färben [73, 77, 78], Ciprofol dagegen rosa [72]. Die Einnahme von Multivitaminpräparaten kann den Urin hellgelb färben, was an den wasserlöslichen Vitaminen B2 und B12 liegen kann [68, 74, 79]. Verzehr von Spinat kann den Urin blau-grün verfärben [79], Verzehr von roter Bete kann den Urin rot verfärben [79]. Dagegen kann Verzehr von Spargel den Geruch des Urins verändern [67, 79, 80].

## 1.7 Fluoreszenz und Spektroskopie des Urins

Unter Fluoreszenz versteht man die Emission eines Photons, wenn ein Elektron nach optischer Anregung des Mediums aus einem kurzlebigen höher angeregten energetischen Zustand in einen niedriger angeregten energetischen Zustand oder in den Grundzustand übergeht [81, 82]. Sowohl der Grundzustand als auch der angeregte Zustand bestehen aus Unterzuständen (**Abbildung 7**) [83]. Die Übergänge zwischen den Unterzuständen werden als nichtstrahlende Übergänge bezeichnet, da sie keine Fluoreszenz verursachen, sondern strahlungsfrei Energie freisetzen [83]. Das Fluoreszenzphoton besitzt eine geringere Energie und damit eine höhere Wellenlänge als das Photon, das benötigt wird, um das Mediums anzuregen [83-86]. Dieser Vorgang wird als Stoke-Verschiebung bezeichnet [83-86].



**Abbildung 7:** Jablonski-Diagramm, adaptiert nach [87]. Sowohl der Grundzustand ( $S_0$ ) als auch der angeregte Zustand ( $S_1$ ) besteht aus Unterzuständen. Zur Anregung des Elektrons ist Energie nötig. Die Fluoreszenz setzt ein, sobald ein Photon emittiert werden kann.

Spektroskopie umfasst analytische Methoden, welche auf der Interaktion von elektromagnetischer Strahlung unterschiedlicher Wellenlängen und der zu analysierenden Substanz beruhen [88].

Da Urin fluoreszierende Substanzen enthalten kann, kann er als Gegenstand von Fluoreszenz- und Spektroskopie-Untersuchungen herangezogen werden [89]. Beispiele für im Urin fluoreszierende Substanzen sind Neurotransmitter wie Serotonin sowie Dopamin, Aminosäuren wie Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin sowie Vitamine wie Vitamin B2, Vitamin B9 (Folsäure) und Vitamin B6 [90].

## **1.8 Urin-Fluoreszenzspektroskopie im Urin als potenzielles diagnostisches Mittel in der Humanmedizin**

Fluoreszenzspektroskopie-gestützte Untersuchungen des Urins können einen Beitrag zu verbesserter Diagnostik in der Humanmedizin leisten [37, 91]: Beispiele hierfür sind Konzentrationsmessungen von metabolisierten Fluorchinolon-Antibiotika im Urin [37, 92] und die Diagnostik von Bluthochdruck [37, 90].

In der Onkologie besteht außerdem die Hoffnung, dass die Urin-Fluoreszenzspektroskopie zum Screening und zur Diagnosefindung von Tumorerkrankungen beitragen könnte [37, 91]. Marker wie NADH und Flavine könnten auf Krebserkrankungen im Allgemeinen hinweisen [37, 93]. Abnormer Metabolismus von Porphyrin-Derivaten und Bilirubin im Urin könnte zur Diagnostik eines hepatozellulären Karzinoms oder einer Leberzirrhose beitragen [37, 94]. Tryptophan, Isoxanthopterin und Xanthopterin im Urin könnten als Marker für Blasenkrebs dienen [37, 95], Isoxanthopterin im Urin darüber hinaus noch als potenzieller Indikator für Magenkrebs [37, 96]. Tryptophan, NADH, FAD und Porphyrine im Urin könnten mit Nierenkrebs in Verbindung gebracht werden [97]. Pteridine im Urin könnten über das Potential verfügen, sich als Fluoreszenzmarker im gynäkologischen Bereich bei Eierstockkrebs zu etablieren [37, 98]. Porphyrine, NADH und Kollagen könnten zur Diagnostik von Zervixkarzinomen beitragen [43]. Des Weiteren könnte in der Dermatologie Lipofuszin als potenzieller Marker für das maligne Melanom herangezogen werden [37, 99].

## **1.9 Einflüsse von Nahrungsergänzungsmitteln und Lebensmitteln auf das Urin-Fluoreszenzspektrum bei fluoreszenz-gestützten Untersuchungsmethoden**

Die im vorherigen Kapitel (1.8) erwähnten Studien untersuchten verschiedene Biomarker mittels Urin-Fluoreszenzspektroskopie und stellten Zusammenhänge zu Krankheiten her [37]. Sie untersuchten jedoch weder die Existenz potenzieller Störfaktoren noch den potenziellen Einfluss dieser Störfaktoren auf die Messgenauigkeit der jeweiligen Biomarker [37].

Ernährung, die Einnahme von Medikamenten oder die Exposition gegenüber Chemikalien stellen mögliche exogene Faktoren dar, die in der Lage sind, die Farbe und den Geruch des Urins zu verändern (s. Kapitel 1.6). An dieser Stelle kommt die Frage auf, ob diese Verfärbungen des Urins Auswirkungen auf die Diagnostik durch Urin-Fluoreszenzspektroskopie und damit auch auf die darauf basierende Therapieentscheidung haben können [37, 91].

Mögliche Störfaktoren während fluoreszenz-gestützter Untersuchungen wie der Fluoreszenz-Zystoskopie (FZ) wurden von Zellweger et al. untersucht [89]. Die FZ ist eine Untersuchungsmethode zur Diagnostik und Therapie von Blasenkrebs [89]. Falls sich im Urin fluoreszierende Substanzen befinden, kann die Fluoreszenz dieser Substanzen zu einer Beeinträchtigung der Qualität der FZ-Bildgebung führen und damit die diagnostischen Ergebnisse und mögliche Therapiekonsequenzen der FZ beeinflussen [37, 89]. Ernährung und Stoffwechsel stellen Faktoren dar, die darüber hinaus zu dieser Fluoreszenz beitragen können und diese gegebenenfalls verstärken können [89]. Das Forschungsteam stellte die Hypothese auf, dass Vitamine fluoreszieren könnten und untersuchte daher die Auswirkungen der Einnahme eines Multivitaminpräparats auf die Qualität der

Bildgebung einer FZ an neun gesunden Probanden [89]. Die Urin-Fluoreszenzspektren der Probanden wurden anhand von Anregungs-Emissions-Matrizen (A-EMs) vor, während und nach Einnahme des Multivitaminpräparats analysiert [89]. Das Forschungsteam kam zu dem Erkenntnis, dass die Fluoreszenzintensitäten ungefähr 8-10 Stunden nach Einnahme des Multivitaminpräparats ansteigen, in den folgenden 12 Stunden fallen und den Ausgangszustand vor Einnahme des Präparats gegen 24 Stunden nach dessen Einnahme erreichen [37, 89]. Laut dem Forschungsteam sind die B-Vitamine ein potenzieller Auslösefaktor für die Fluoreszenzintensitäten, davon am ehesten die Vitamine B2, B6 und B12 [89]. Das Forschungsteam leitet daraus die Empfehlung ab, ungefähr eine Woche vor einer anstehenden FZ keine Multivitaminpräparate einzunehmen [37, 89].

Allerdings ist weiterhin nicht klar, welche einzelnen Vitamine, Nahrungsergänzungsmittel (NEM) und Lebensmittel (LM) die Fähigkeit besitzen, das Urin-Fluoreszenzspektrum zu verändern [37]. Ob NEM/LM mit der Bestimmung der CP-III-Konzentration im Urin interferieren, ist ebenfalls unklar [37].

### **1.10 Fragestellung und Zielsetzung**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde mittels einer klinischen Studie untersucht, ob Vitamine in Form von NEM sowie LM die Intensität des Urin-Fluoreszenzspektrums beeinflussen [37]. Zudem wurde in der klinischen Studie überprüft, ob dieselben NEM/LM einen Störfaktor bei der Bestimmung der CP-III-Konzentration im Urin darstellen [37]. Für die Diagnostik von akuten Porphyrinen mittels Fluoreszenz-Spektroskopie des Urins sowie anderer fluoreszenzgestützter Untersuchungsmethoden des Urins wie beispielsweise einer FZ können solche Erkenntnisse hilfreich sein.

Des Weiteren wurde anhand der sog. ALA-RDT-Studie untersucht, wie sich die CPI/III-Konzentration im Urin vor, während und nach FGR von rezidivierenden Glioblastomen sowie während Bestrahlung bzw. Radiodynamischer Therapie (RDT) mit vorheriger 5-ALA-Gabe verhält. Diese Untersuchungen erfolgten mit der Fragestellung, ob die Bestimmung der CPI/III-Konzentration als potenzieller Tumormarker für Diagnostik, Screening oder Monitoring von Glioblastomen dienen kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material und Methoden zur Untersuchung der Einflüsse von NEM/LM auf das Urin-Fluoreszenzspektrum

Die Einflüsse von NEM/LM auf das Urin-Fluoreszenzspektrum und die Bestimmung der CP-III-Konzentration wurden im Rahmen einer klinischen Studie untersucht [37]. Die Durchführung der Studie erfolgte gemäß der Deklaration von Helsinki sowie mit der Zustimmung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland (Nr.: 22-0762) [37].

#### 2.1.1 Eingeschlossene Studienteilnehmer

Insgesamt umfasste die Studie acht Teilnehmer, von denen sieben männlichen und eine weiblichen biologischen Geschlechts waren [37, 91]. Die Altersspanne erstreckte sich von 22 bis 64 Jahren [37, 91]. Während der Durchführung der Studie lag keine Erkrankung bei den Probanden vor.

#### 2.1.2 Verwendete Nahrungsergänzungsmittel und Lebensmittel

In der Studie erfolgte die Einnahme der wasserlöslichen B-Vitamine und des wasserlöslichen Vitamin C durch die Probanden [37, 91]. Des Weiteren wurden von den Probanden die fettlöslichen Vitamine A, D, E, K1 und K2 eingenommen [37, 91]. Als Lebensmittel wurden Spinat, Spargel und rote Beete von den Probanden verzehrt [37, 91]. Eine detaillierte Auflistung der für die Studie verwendeten NEM/LM ist in **Tabelle 1** zu finden.

**Tabelle 1:** Detaillierte Auflistung aller in der Studie verwendeten Nahrungsergänzungsmittel und Lebensmittel, adaptiert nach [37].

© 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center.

Produkt	Bestandteile / Beschreibung	Eingenommene Dosis pro Person [mg]
Vitamin A	Retinylacetat (Sunday Natural Products GmbH, Berlin, Deutschland)	3
Vitamin B Komplex	Thiamin-Hydrochlorid Natrium-Riboflavin-5'-Phosphat Nicotinamid D-Calcium-Panthotenat Pyridoxal-5'-Phosphat D-Biotin 6S-5-Methyltetrahydrofolsäure-Glucosaminsalz, Calcium-L-Methylfolat Methylcobalamin, Hydroxycobalamin, Adenosylcobalamin Citicholin Trimethylglycin-Betain Myo-Inositol (Sunday Natural Products GmbH, Berlin, Deutschland)	40 20 100 50 20 0,5 0,4 0,3 10 50 25
Vitamin B1	Thiamin-Hydrochlorid (Nutraceutical Corp., Park City, Utah, USA)	100
Vitamin B2	Natrium-Riboflavin-5'-Phosphat (Sunday Natural Products GmbH, Berlin, Deutschland)	100
Vitamin B3	Nicotinamid (Sunday Natural Products GmbH, Berlin, Deutschland)	500
Vitamin B5	D-Calcium-Pantothenat (Sunday Natural Products GmbH, Berlin, Deutschland)	500
Vitamin B6	Pyridoxal-5'-Phosphat-Monohydrat (Sunday Natural Products GmbH, Berlin, Deutschland)	25
Vitamin B7	D-Biotin (Sunday Natural Products GmbH, Berlin, Deutschland)	10
Vitamin B9	L-Methylfolat (Sunday Natural Products GmbH, Berlin, Deutschland)	0,4
Vitamin B12	Cyanocobalamin (Queisser Pharma GmbH & Co. KG, Flensburg, Deutschland)	0,35
Vitamin C	Ascorbinsäure (Sunday Natural Products GmbH, Berlin, Deutschland)	1000
Vitamin D	Cholecalciferol (Queisser Pharma GmbH & Co. KG, Flensburg, Deutschland)	0,05
Vitamin E	Alpha-Tocopherol-Acetat (Euro Vital Pharma GmbH, Hamburg, Deutschland)	600
Vitamin K1	Phytomenadion (Gall Pharma GmbH, Judenburg, Österreich)	0,06
Vitamin K2	Vitamin K2 MK7 all-trans (Sunday Natural Products GmbH, Berlin, Deutschland)	0,2
Alpha-Liponsäure	R-Alpha-Liponsäure (Vitabay, Maastricht, Niederlande)	300
Rote Beete	Gewöhnliche Portion einer Mahlzeit	200.000
Spinat	Gewöhnliche Portion einer Mahlzeit	200.000

Spargel	Gewöhnliche Portion einer Mahlzeit	200.000
---------	------------------------------------	---------

### 2.1.3 C<sub>PIII</sub>-Referenzlösungen

Die Entwicklung von C<sub>PIII</sub>-Referenzlösungen mit medizinisch relevanten Konzentrationen erfolgte vor dem Hintergrund, mögliche Einflüsse von NEM/LM auf die Wiederfindungsrate der C<sub>PIII</sub>-Konzentration im Urin zu untersuchen [37]. Dafür wurde zuerst eine C<sub>PIII</sub>-Stammlösung erstellt [37, 91]. Folgende Materialien kamen zum Einsatz:

- C<sub>PIII</sub>-Dihydrochloridsalz (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA)
- Salzsäure 2,5 mol/l (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Essigsäure 50% (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) [37, 91].

1 mg des C<sub>PIII</sub>-Dihydrochloridsalzes wurden zunächst mit 10 ml der Salzsäure vermischt [37, 91]. Danach wurden 40 ml der 50-prozentigen Essigsäure hinzugegeben [37, 91]. Die Lagerung dieser C<sub>PIII</sub>-Stammlösung erfolgte lichtgeschützt bei 8 Grad Celsius im Kühlschrank [37].

Aus der C<sub>PIII</sub>-Stammlösung erfolgte das Mischen von drei C<sub>PIII</sub>-Referenzlösungen mit den Verdünnungen 1:50, 1:100 und 1:200 durch Zugabe von 50-prozentiger Essigsäure [37, 91]. Das Mischen der drei C<sub>PIII</sub>-Referenzlösungen wurde jedes Mal erneut vollzogen, wenn ein neues NEM/LM getestet wurde [37].

Die Transmission der C<sub>PIII</sub>-Lösungen wurde mit einem Absorptionsspektrometer (Lambda 40 von Perkin Elmer, Waltham, USA) gemessen. Die Berechnung der exakten Konzentrationen der C<sub>PIII</sub>-Lösungen erfolgte mithilfe von Daten der Absorption bei einer Wellenlänge von 402 nm und dem Extinktionskoeffizient  $\alpha =$

$4,9 \times 10^5 \frac{L}{mol \times cm}$  aus der Literatur [37, 100]. Die CPIII-Stammlösung wies eine CPIII-Konzentration von  $63 \mu\text{mol/l}$  auf [37].

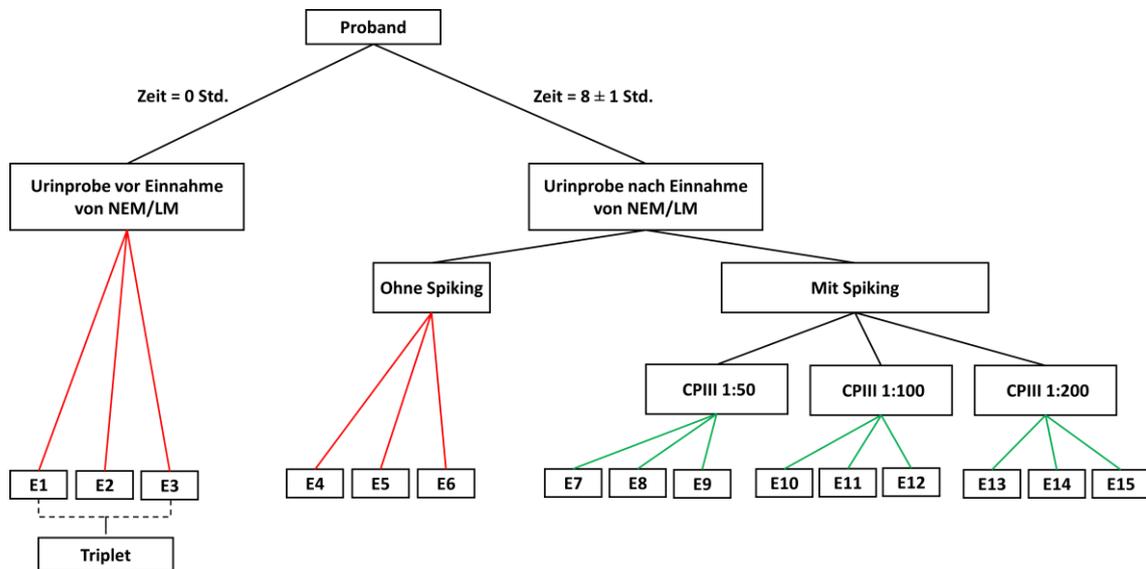
#### **2.1.4 Messung und Auswertung der Urinproben**

Die Einnahme des NEM/LM erfolgte abends vor der Nachtruhe [37]. Urinproben wurden für jedes NEM/LM direkt vor dessen Einnahme und ungefähr  $8 \pm 1$  Stunden nach dessen Einnahme von drei der insgesamt acht Probanden am folgenden Morgen gesammelt [37, 91]. Die Abgabe der Urinproben erfolgte am selben Morgen und deren Messung wurde innerhalb von zwei Stunden nach Abgabe durchgeführt [37].

##### **2.1.4.1 Messung im Prototyp-Spektrofluorometer**

Für jede abgegebene Urinprobe wurden drei unabhängige Messungen in einem Prototyp-Spektrofluorometer (FerroSens GmbH, München, Deutschland, Seriennummer: FS-PORscreen-00002) (ProSp) durchgeführt, was im Folgenden als Triplet-Messung bezeichnet wird [37]. Außerdem wurden bei den Urinproben nach Einnahme des NEM/LM darüber hinaus drei CPIII-Referenzlösungen mit den Verdünnungen 1:50, 1:100 und 1:200 zugegeben (sog. Spiking) [37, 91]. Dieses Spiking erfolgte, um potenzielle Einflüsse auf die Wiederfindungsrate der CPIII-Konzentration im Urin zu untersuchen [37, 91]. Bei Messungen mit Spiking fanden pro verwendeter CPIII-Referenzlösung ebenfalls Triplet-Messungen statt [37]. Bei drei CPIII-Referenzlösungen ergibt dies pro Proband insgesamt neun gemessene Urinproben mit zusätzlichem CPIII-Spiking der jeweiligen Urinprobe

[37]. **Abbildung 8** dient zur Verschaffung eines Überblicks über die Messprozedur.



**Abbildung 8:** Darstellung der Messprozedur für jeden Probanden, adaptiert nach [37]. Die roten Linien stehen für die Messprozedur mit 500 µl Wasser, 100 µl Urin und 10 µl Salzsäure, die grünen Linien stehen für die Messprozedur mit 400 µl Wasser, 100 µl Urin, 10 µl Salzsäure und 100 µl CPIII-Referenzlösung [37]. E: Exemplar. © 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center.

Für die Messung der Urinproben im ProSp wurden folgende Materialien benötigt:

- HPLC Wasser (Fisher Scientific, Loughborough, Vereinigtes Königreich)
- Salzsäure 6 mol/l (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 700 µl-Plastikküvetten (UV-Cuvette micro von Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland) [37, 101].

In eine Küvette wurden 500 µl HPLC Wasser, 10 µl Salzsäure sowie 100 µl der jeweiligen Urinprobe pipettiert [37, 91, 101]. Im Falle von Spiking mit CPIII-Referenzlösungen wurden 100 µl des verwendeten Wassers mit derselben Menge der jeweiligen CPIII-Referenzlösung ersetzt [37]: es wurden somit 400 µl des HPLC Wassers, 10 µl der Salzsäure, 100 µl der jeweiligen Urinprobe sowie 100 µl der jeweiligen CPIII-Referenzlösung in eine Küvette gegeben [37].

Die Anregungswellenlänge bei Messungen im ProSp betrug  $407 \pm 3$  nm und die Messung des Fluoreszenzspektrums erfolgte im Spektralbereich von 490 bis 800 nm [37, 91].

In Lang et al. [45] wurde die Vorgehensweise zur Berechnung der CPIII-Konzentration im Urin ausführlich dargelegt. Zur Berechnung der CPIII-Konzentration im Urin kommt ein Fit-Algorithmus zum Einsatz, der die Amplitude des CPIII-Spektrums im gemessenen Fluoreszenzspektrum mittels zweiter Ableitung bestimmt [37, 45]. Daraus wird die CPIII-Konzentration nach vorheriger Kalibration des ProSp berechnet [37, 45].

#### **2.1.4.2 Messung von Anregungs-Emissions-Matrizen**

Neben den Messungen im ProSp wurden Messungen mit einem Fluoreszenzspektrometer (FluoroMax-2, Horiba Jobin Yvon GmbH, Unterhaching, Deutschland) durchgeführt [37]. Dieses Fluoreszenzspektrometer ist in der Lage, Anregungs-Emissions-Matrizen (AEMs) zu generieren [37]. Die Messungen erfolgten im Anregungswellenlängenbereich von 300 bis 500 nm mit einer Schrittweite von 5 nm [37, 91]. Der Emissionswellenlängenbereich betrug 400 bis 700 nm mit einer Schrittweite von jeweils 5 nm [37, 91]. Die AEMs zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine umfassendere Darstellung des Urin-Fluoreszenzspektrums im Vergleich zu ausschließlichen Messungen im ProSp ermöglichen [37].

Für die Messung im FluoroMax-2 wurden benötigt:

- HPLC Wasser (Fisher Scientific, Loughborough, Vereinigtes Königreich)
  - Messküvette (Cuvette STD UV 4 clear side, Kartell S.p.A, Noviglio, Italien)
- [37].

Die zu messende Urinprobe wurde mit einer Konzentration von 1:20 mit dem HPLC Wasser verdünnt und davon wurden 3 ml in die Messküvette pipettiert [37]. Hierbei erfolgten keine Triplet-Messungen, sondern nur einmalige Messungen der Urinproben [37]. Außerdem hat kein Spiking mit CPIII-Referenzlösungen stattgefunden [37].

Des Weiteren wurden im FluoroMax-2 verschiedene Dosierungen von Harnstoff gemessen. Die Messungen mit Harnstoff zielten darauf ab, um zu ermitteln, ob sich höhere Mengen an Harnstoff in einer höheren Fluoreszenzintensität des Urin-Fluoreszenzspektrums manifestieren könnten. Es wurden Dosierungen von 6 mg, 12 mg, 70 mg, 200 mg, 1000 mg, 5000 mg und 10.000 mg Harnstoff in Pulverform (Urea, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) verdünnt zu 1:20 mit HPLC Wasser und davon 3 ml in die Küvette für die Messung pipettiert. Hierbei fanden keine Triplet-Messungen, sondern einmalige Messungen statt.

#### **2.1.4.3 Vergleichbarkeit der Messungen zwischen beiden verwendeten Spektrofluorometern**

Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit zwischen den beiden Geräten (ProSp sowie FluoroMax-2) wurden Messungen in beiden Geräten mit modifizierter Messprozedur des jeweils anderen Gerätes durchgeführt [37].

Bei der regulären Messprozedur für Messungen im FluoroMax-2 wurden 3000 µl vom 1:20 mit HPLC Wasser verdünnten Urin in die Küvette gegeben und im Gerät gemessen [37]. Im ProSp hingegen wurden bei regulären Messungen ein Fünftel davon, also 600 µl (exkl. Salzsäure), in die Küvette gegeben [37].

Für die vergleichende Messung wurde im ProSp mit einer Verdünnung des Urins mit HPLC Wasser und dem Faktor  $\frac{1}{5}$  gearbeitet, da die Küvette für Messungen

im ProSp nur ein Fünftel von der Küvette für Messungen im FluoroMax-2 beinhaltet, und dazu 10 µl Salzsäure (6 mol/l) gegeben [37].

Um im FluoroMax-2 mit derselben Messweise wie im ProSp zu messen, wurde die proportionale Menge an Salzsäure in die Messküvette zur 1:20 mit HPLC Wasser verdünnten Urinprobe verabreicht [37]. Bei 3000 µl Probenmaterial bedeutet dies die fünffache Menge im Vergleich zum ProSp mit 600 µl Urin sowie Wasser und 10 µl Salzsäure, also 50 µl Salzsäure (6 mol/l) [37].

### **2.1.5 Statistische Auswertung**

Statistische Tests wurden aufgrund der geringen Teilnehmerzahl nicht angewendet [37], stattdessen wurden inter- und intraindividuelle Intensitätsunterschiede der Urin-Fluoreszenzspektren analysiert [37, 91]. Hierfür wurde die Intensität im Wellenlängenbereich von 518 nm  $\pm$  3 nm für jede Urinprobe jedes Probanden betrachtet [37, 91]. Dabei wurde analysiert, wie hoch die Intensität in der Einheit Counts verglichen mit den anderen Spektren ist [37]. Von drei der insgesamt acht Studienteilnehmer wurde mehr als die Hälfte der Urinproben abgegeben, sodass von diesen ein Großteil der Daten vorlagen, um inter- sowie intraindividuellen Intensitätsunterschiede im Fluoreszenzspektrum des Urins zu untersuchen [37]. Die Analyse der inter- und intraindividuellen Intensitätsunterschiede verhalf zu einem besseren Überblick über das Urin-Fluoreszenzspektrum in gesunden Probanden [37].

Zudem erfolgte die Definition einer Wiederfindungsrate für die CPIII-Konzentration im Urin [37]. Die Intention dafür lag darin, potenzielle Störfaktoren zwischen

der Einnahme von NEM/LM und der Bestimmung der CPIII-Konzentration zu beurteilen [37]. Die Berechnung der Wiederfindungsrate erfolgt gemäß dem hier dargestellten Quotienten:

$$\text{CPIII – Wiederfindungsrate} = \frac{\text{Mittelwert der Konzentration von CPIII im Urin}}{\text{Konzentration der jeweiligen CPIII-Referenzlösung}} \quad [37,$$

91]. Der Dividend besteht aus dem Mittelwert der gemessenen CPIII-Konzentrationen im Urin aller drei Probanden, die Urinproben nach Einnahme des jeweiligen NEM/LM bereitstellten [37]. Der Divisor besteht aus der einmalig gemessenen CPIII-Konzentration der jeweiligen CPIII-Referenzlösung [37]. Aufgrund der direkten Substitution von 100 µl Wasser durch 100 µl der jeweiligen CPIII-Referenzlösung beim Dividenden, sind die Konzentrationen von Dividend und Divisor miteinander vergleichbar [37].

Da Ungenauigkeiten bei der Durchführung der Messung, beispielsweise beim Pipettieren, nicht auszuschließen sind, wurde für die Wiederfindungsrate eine akzeptable Abweichung erörtert [37]. Gemäß der Empfehlung der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) wurde die Orientierung an eine Abweichung von 15 % vorgenommen [37, 91, 102, 103]. Die Wiederfindungsrate der CPIII-Konzentration im Urin sollte gemäß dieser Festlegung zwischen 0,85 und 1,15 liegen [37, 91].

## 2.2 Material und Methoden der ALA-RDT-Studie

Es erfolgte eine Phase-I/II-Eskalationsstudie zur Radiodynamischen Therapie (RDT) mit 5-ALA bei Patienten mit rezidivierenden Glioblastomen [104]. Die Durchführung der Studie erfolgte gemäß der Deklaration von Helsinki sowie mit der Zustimmung der Ethikkommission der örtlichen Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe, Deutschland, der Universität Münster, Deutschland,

dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Deutschland, sowie dem Bundesamt für Strahlenschutz, Deutschland [104]. Zudem ist die Studie in der europäischen EudraCT-Datenbank eingetragen (EudraCT-Nr.: 2021-004631-92) [104].

Insgesamt wurden in die Studie 30 Patienten mit Rezidiv eines supratentoriellen Glioblastoms in acht Kohorten eingeschlossen [104]. Neben der operativen Resektion des Glioblastoms werden sowohl neoadjuvante als auch adjuvante Bestrahlungen (Radiotherapien, RT) mit einer Dosis von 1,8 Gy durchgeführt [104]. Manche dieser RTs finden als RDT mit vorangegangener oraler Verabreichung von 5-ALA statt [104]. Die 5-ALA Dosis betrug 20 mg pro Kilogramm Körpergewicht und die orale Verabreichung erfolgte, gelöst in Leitungswasser, sieben bis neun Stunden vor der Bestrahlung [104].

Wann und wie oft die Bestrahlung als RDT durchgeführt wird, unterscheidet sich je nach Kohorte: in Kohorte 1 findet die RDT neoadjuvant statt, in den restlichen Kohorten (0,2,3,4,5,6,7,8) adjuvant [104]. Mit Ausnahme von Kohorte 1 finden die adjuvanten RDTs je nach Kohorte in verschiedenen Abständen und Häufigkeiten statt [104]. Die jeweils anderen 1,8-Gy-Bestrahlungen finden ohne die vorherige Verabreichung von 5-ALA statt; folglich handelt sich dabei um übliche RTs [104]. Neoadjuvante RTs finden ausschließlich in den Kohorten 0 und 1 statt, in den restlichen Kohorten werden alle RTs adjuvant durchgeführt [104]. Die operative Resektion findet als FGR im Rahmen von PDD nach vorheriger Einnahme von 5-ALA als Vorstufe des Photosensibilisators PpIX statt [104]. Zwei bis sechs Wochen nach der operativen Resektion des Glioblastoms beginnt die adjuvante Therapie, je nach Kohorte zu unterschiedlichen Zeitpunkten, jedoch einmalig als

RDT mit vorheriger Verabreichung von 5-ALA, ansonsten als übliche 1,8-Gy-Be-  
strahlung [104]. Aktuelle wissenschaftliche Untersuchungen legen nahe, dass die  
Kombination aus RT und PDT eine effektivere Therapieform für onkologische Er-  
krankungen darstellen könnte als eine alleinige Behandlung aus RT oder PDT  
[105].

### **2.2.1 Kohorten 0 und 1 der ALA-RDT-Studie**

In Kohorte 0 findet die RT neoadjuvant am dritten und zweiten Tag vor der ge-  
planten Operation (Resektion) statt [104]. Urinproben wurden jedoch lediglich  
vom dritten Tag vor OP zur Messung bereitgestellt. Vor der Resektion wurde 5-  
ALA verabreicht [104]. Zudem wurde in der ersten adjuvanten Therapiewoche  
eine RDT mit 5-ALA-Gabe durchgeführt [104]. In Kohorte 1 finden die Bestrah-  
lungen neoadjuvant am dritten und zweiten Tag vor der geplanten operativen  
Resektion statt, dabei findet die erste Bestrahlung als RDT mit Gabe von 5-ALA  
statt [104]. Auch hier liegen lediglich Urinproben vom dritten Tag vor der OP vor.  
Die operative Resektion fand mit vorheriger 5-ALA-Verabreichung statt [104]. Im  
Vergleich zur Kohorte 0 gab es jedoch keine adjuvante RDT, sondern eine ad-  
juvante RT [104]. Von diesen beiden Kohorten erfolgten Auswertungen der Urin-  
proben im Rahmen dieser Dissertation. Bedauerlicherweise wurden in der Doku-  
mentation die Bezeichnungen der Kohorten vertauscht, sodass Kohorte 0 aus  
der Publikation [104] Kohorte 1 in dieser Dissertation ist und umgekehrt. In den  
nachfolgenden Erläuterungen werden diese vertauschten Bezeichnungen beibe-  
halten. In der Kohorte 0 fand die RDT also neoadjuvant statt, in der Kohorte 1  
adjuvant.

### **2.2.2 Studienteilnehmer**

Sowohl Kohorte 0 als auch in Kohorte 1 bestanden aus jeweils drei Patienten. Alle Patienten in Kohorte 0 waren männlichen biologischen Geschlechts. Zwei Patienten in Kohorte 1 waren männlichen biologischen Geschlechts und eine Patientin weiblichen biologischen Geschlechts. Die Altersspanne erstreckte sich von 52 bis 69 Jahren in Kohorte 0 und von 59 bis 66 Jahren in Kohorte 1. Die Patienten litten an einem histologisch gesicherten Rezidiv eines supratentoriellen Glioblastoms und hatten einen Karnofsky-Index von  $\geq 60$  [104].

### **2.2.3 Verabreichung von 5-ALA**

Die Verabreichung von 5-ALA erfolgte oral mit einer Dosis von 20 mg pro Kilogramm Körpergewicht, gelöst in Leitungswasser [104].

Das Studienprotokoll sah die Verabreichung von 5-ALA 7 bis 9 Stunden vor der RDT sowie 4 Stunden vor Einleitung der Anästhesie an Tagen der operativen Resektion vor [104]. Laut übermittelten Daten erfolgte die tatsächliche Verabreichung von 5-ALA im Mittel  $4,5 \pm 0,75$  Stunden vor Einleitung der Anästhesie. Die Einleitung der Anästhesie wird in dieser Dissertation nachfolgend synonym als OP-Beginn bezeichnet.

### **2.2.4 Sammlung der Urinproben**

Am Tag der operativen Resektion des Glioblastom-Rezidivs wurde den Patienten ein Blasenkatheter angelegt. Dies fand direkt nach der Einleitung der Intubation im Rahmen der Anästhesie statt. Die Entnahme der Urinproben erfolgte direkt aus dem Katheter. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme wurde intraoperativ das

ausgeschiedene Urinvolumen dokumentiert. Der Blasenkatheter wurde nicht geleert, weswegen es sich beim Urinvolumen um Kumulativangaben handelt. Aus dem Blasenkatheter wurden für jede Urinprobe drei Aliquots gewonnen. Zwei Aliquots wurden bei minus 80 Grad Celsius zur Bestimmung der CPI/III-Konzentration tiefgefroren und ein Aliquot zur Bestimmung des Kreatinin-Wertes an die hausinterne Laboratoriumsmedizin weitergeleitet.

An Tagen der neoadjuvanten und adjuvanten Bestrahlung im Rahmen der RDT wurde der Urin in einem Sammelgefäß gesammelt. Start der Sammlung des Urins war morgens gleichzeitig mit der oralen Einnahme von 5-ALA, Ende der Sammlung des Urins nachmittags nach der Bestrahlung. Im Falle einer RT wurde der Urin während desselben Zeitraums in einem Sammelgefäß gesammelt. Eine Verabreichung von 5-ALA entfiel bei RTs. Aus dem Sammelgefäß wurden drei Aliquots gewonnen, davon wurden zwei bei minus 80 Grad Celsius zur Bestimmung der CPI/III-Konzentration tiefgefroren und eins zur Bestimmung des Kreatinin-Wertes an die hausinterne Laboratoriumsmedizin weitergeleitet.

### **2.2.5 Transport und Lagerung der Urinproben**

Da die ALA-RDT-Studie [104] in Münster durchgeführt wurde, die Messungen der Urinproben aber in Martinsried bei München stattfand, sind die Urinproben unter einer Kühlung von minus 80 Grad Celsius nach München transportiert worden. Von den zwei pro Urinprobe eingefrorenen Aliquots wurde eine nach München versandt, das jeweils andere Aliquot verblieb in Münster. Unverzüglich nach Erhalt der Aliquots der Urinproben in München erfolgte die Lagerung dieser bei minus 80 Grad Celsius. Lediglich zur Messung sind die Proben aus der Kühltruhe genommen worden, ansonsten verblieben sie in der Kühltruhe.

Interne Versuche aus dem Laser-Forschungslabor im LIFE-Zentrum der Urologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland, ergaben, dass die im Urin zu messenden Porphyrinogene bei einer Temperatur von minus 80 Grad Celsius nicht mehr in Porphyrine umgewandelt werden [101, 106]. Außerdem findet bei dieser Temperatur keine Zerstörung bereits vorhandener Porphyrinogene und Porphyrine statt [106].

### **2.2.6 Messung der Urinproben**

Für die Messung der Aliquots wurden diese aus der Kühltruhe entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Damit die in den Urinproben noch vorhandenen Porphyrinogene zu Porphyrinen umgewandelt werden, wurden zwei verschiedene Oxidationsverfahren verwendet: zum einen die sog. Photo-Oxidation, basierend auf Bestrahlung der Probe mit Licht der Wellenlänge 450 nm, zum anderen eine chemische Oxidation basierend auf der Zugabe von Iod. Die Proben wurden im ProSp bei einer Anregungswellenlänge von  $407 \pm 3$  nm bei Emissionswellenlängen zwischen 490 bis 800 nm gemessen.

Aufgrund der Tatsache, dass CPI und CPIII dasselbe Fluoreszenzspektrum besitzen und CPI sowie CPIII bei Messungen im ProSp nicht unterschieden werden können, wird von der CPI/III-Konzentration gesprochen.

#### **2.2.6.1 Messprozedur mittels Photo-Oxidation**

Die Messprozedur mittels Photo-Oxidation fand wie in 2.1.4.1 beschrieben statt. Folgende Utensilien wurden benötigt:

- HPLC Wasser (Fisher Scientific, Loughborough, Vereinigtes Königreich)
- Salzsäure 6 mol/l (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

- 700 µl-Plastikküvetten (UV-Cuvette micro von Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland) [37, 101].

500 µl HPLC Wasser, 10 µl Salzsäure (6 mol/l) sowie 100 µl der jeweiligen Urinprobe wurden allesamt in eine 700 µl-Plastikküvette gegeben werden [37, 101]. Die Küvette wird im ProSp gemessen [37, 101].

#### **2.2.6.2 Messprozedur mittels Jod-Oxidation**

Neben dem Material, das für die Photo-Oxidation benötigt wird, kamen zusätzliche Utensilien für die Jod-Oxidation zum Einsatz:

- Reaktionsgefäß (safe-lock tubes) 2 ml, Eppendorf, Hamburg Deutschland
- Jod-Pulver, Sigma Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Natriumthiosulfat-Lösung, Sigma Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Vortex-Schüttler, Heidolph REAX Top, Heidolph Scientific Products GmbH, Schwabach, Deutschland [101].

80 mg Jod-Pulver wurden in 100 ml 96%-Essigsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelöst [101]. Um die Aliquots der Urinproben für die Messung im ProSp aufzubereiten, wurden zunächst 100 µl der jeweiligen Urinprobe mit 100 µl der Jod-Essigsäuren-Lösung in ein Reaktionsgefäß gegeben [101]. Die Flüssigkeit wurde fünf Sekunden im Vortex-Schüttler bei 2400 U/min durchmischt [101]. Danach wurden 300 µl HPLC Wasser in die Flüssigkeit hinzugegeben und diese wieder für fünf Sekunden im Vortex-Schüttler durchmischt [101]. Im Anschluss daran wurden 100 µl der Natriumthiosulfat-Lösung sowie 10 µl der 6-molaren Salzsäure in das Reaktionsgefäß gegeben und dieses wieder für fünf

Sekunden im Vortex-Schüttler gemischt [101]. Diese Lösung wurde dann in eine 700 µl-Plastikküvette gegeben und anschließend im ProSp gemessen [101].

### **2.2.7 Statistische Auswertung**

Erst nach der Messung aller Aliquots der Urinproben wurden Daten über die Zugehörigkeit der Patienten zu der jeweiligen Kohorte bereitgestellt. Informationen der jeweiligen Entnahmezeitpunkte der Aliquots der Urinproben wurden ebenfalls erst nach Durchführung aller Messungen zur Auswertung und Interpretation übermittelt.

Aufgrund der geringen Probandenanzahl wurden keine statistischen Tests angewendet. Jedes Aliquot einer Urinprobe wurde als Triplet dreimal unabhängig voneinander pro Oxidationsverfahren im ProSp gemessen. Dies bedeutet, dass jedes Aliquot mittels Photo-Oxidation als Triplet und mittels Jod-Oxidation als Triplet gemessen wurde. Aus diesen Triplet-Messungen pro Oxidationsverfahren wurde für jedes Aliquot der Mittelwert der CPI/III-Konzentration berechnet.

Im nächsten Schritt fand eine Division der Mittelwerte der CPI/III-Konzentration durch den Kreatinin-Wert der Urinprobe statt. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die abgegebenen Urinproben unterschiedliche Konzentrationen haben können, weil die ausgeschiedene Flüssigkeitsmenge und dadurch auch die Dichte des Urins variieren kann. Es wird dafür angenommen, dass Kreatinin mit dem Volumen des Urins korreliert [107, 108].

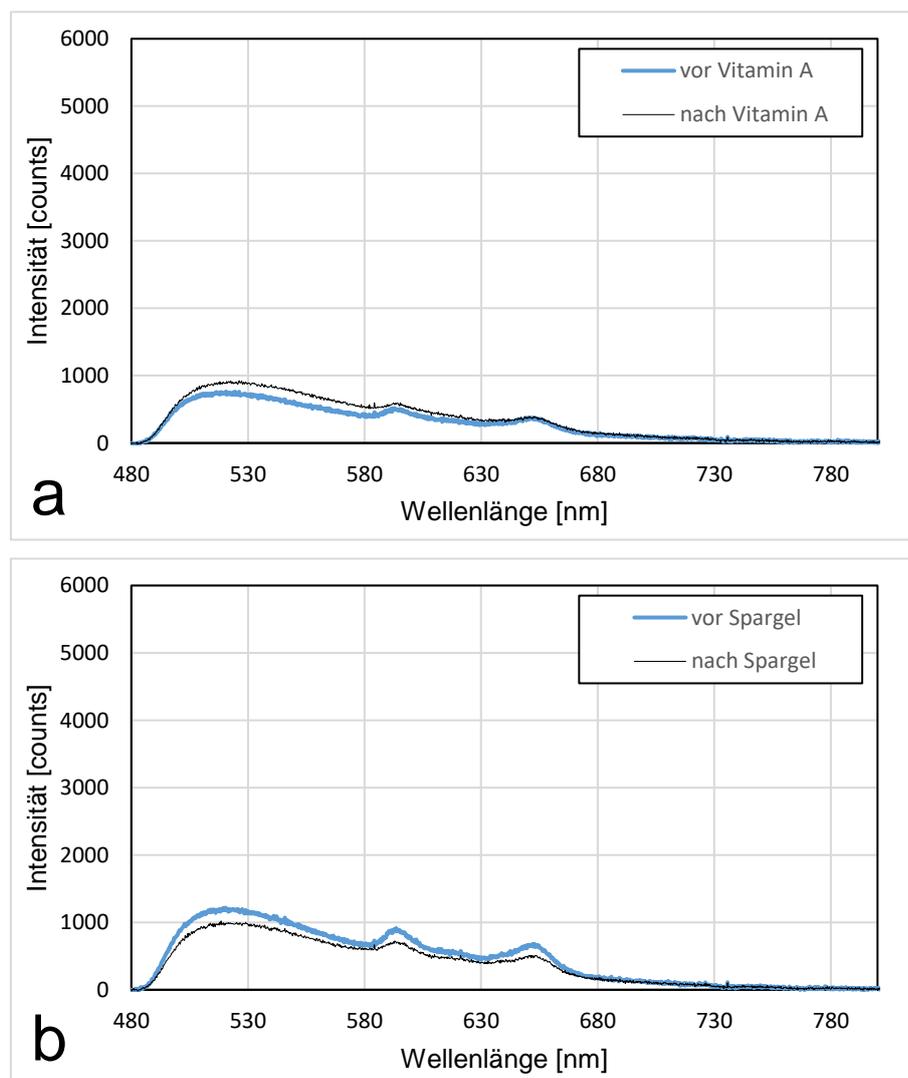
Außerdem wurde die CPI/III-Konzentration mit dem abgegebenen Urinvolumen multipliziert. Mithilfe dieser Methodik soll die insgesamt ausgeschiedene CPI/III-Menge berechnet und Aufschluss über die Dynamik der ausgeschiedenen CPI/III-Menge gegeben werden.

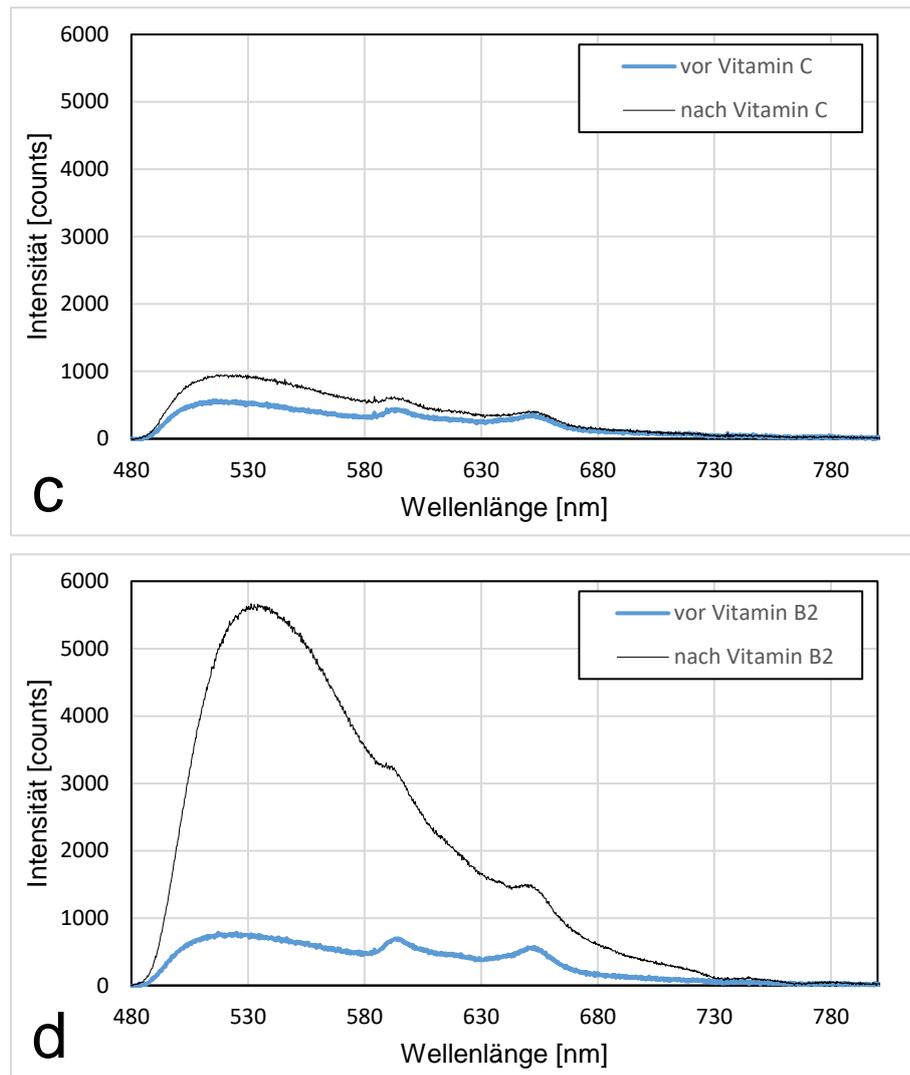
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der Untersuchung der Einflüsse von Nahrungsergänzungsmitteln und Lebensmitteln auf das Urin-Fluoreszenzspektrum

##### 3.1.1 Allgemeine Anmerkungen zum Urin-Fluoreszenzspektrum

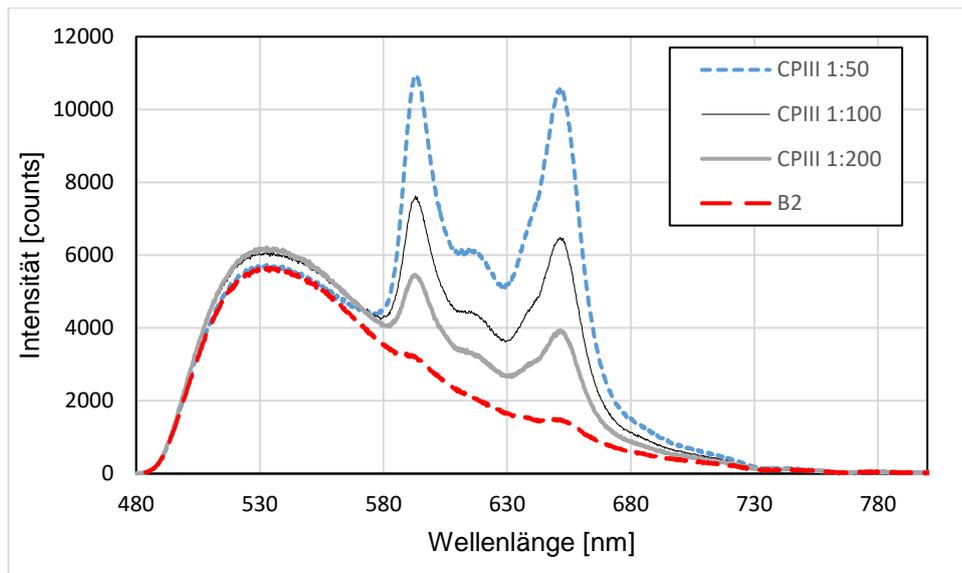
Das Fluoreszenzspektrum des Urins gesunder Menschen ist im Emissionswellenlängenbereich von 490 nm bis 800 nm bei einer Anregungswellenlänge von  $407 \pm 3$  nm weitgehend unstrukturiert (**Abbildung 9**) [37, 91]. Das Maximum bei  $518 \pm 3$  nm ist künstlicher Natur [37, 91].





**Abbildung 9:** Urin-Fluoreszenzspektren einzelner Probanden vor und nach Einnahme von NEM/LM, adaptiert nach [37]. Es sind das fettlösliche Vitamin A (a), das LM Spargel (b), sowie zwei wasserlösliche Vitamine (C (c) und B2 (d)) abgebildet [37]. © 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center.

Es lassen sich zwei Maxima in den Emissionswellenlängen 595 nm und 650 nm feststellen, die dem C<sub>PIII</sub> zugeordnet werden können (**Abbildung 9**) [37]. Diese Maxima vergrößerten sich beim Spiking mit den C<sub>PIII</sub>-Referenzlösungen (**Abbildung 10**) [37]. Zusätzlich wird beim Spiking ein weiteres Maximum bei der Emissionswellenlänge 620 nm erkennbar (**Abbildung 10**), welches ohne Spiking nur sehr schwach ausgeprägt ist (**Abbildung 9**) [37].



**Abbildung 10:** Urin-Fluoreszenzspektren eines einzelnen Probanden nach der Einnahme von Vitamin B2 ohne und mit Spiking mit den CPIII-Referenzlösungen, adaptiert nach [37]. Die Spektren von 490 bis 575 nm sind sowohl mit als auch ohne Spiking nahezu identisch [37]. In den Wellenlängen 595, 620 und 650 nm sind proportional zur CPIII-Konzentration induzierte Maxima sichtbar [37]. © 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center.

### 3.1.2 Durchschnittliche Intensität des Urin-Fluoreszenzspektrums

Drei der insgesamt acht Studienteilnehmer stellten mehr als die Hälfte der Urinproben vor und nach Einnahme eines NEM/LM bereit (**Tabelle 2**) [37].

**Tabelle 2:** Probanden und eingenommene NEM/LM.

NEM/LM	Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4	Proband 5	Proband 6	Proband 7	Proband 8
Vitamin A	X		X		X			
Vitamin B Komplex	X	X	X					
Vitamin B1	X	X			X			
Vitamin B2	X		X				X	
Vitamin B3	X	X	X					
Vitamin B5	X	X	X					
Vitamin B6	X	X	X					
Vitamin B7	X	X	X					

Vitamin B9	X		X					X
Vitamin B12	X	X		X				
Vitamin C	X	X		X				
Vitamin D	X	X		X				
Vitamin E	X	X	X					
Vitamin K1	X		X			X		
Vitamin K2	X		X					X
Alpha-Liponsäure	X				X	X		
Rote Beete	X	X	X					
Spinat	X	X	X					
Spargel	X	X		X				

Die Intensitäten des künstlichen Maximums ( $518 \pm 3$  nm) wurden aus jenen Urinproben ermittelt, die von diesen drei Probanden vor Einnahme eines NEM/LM abgegeben wurden [37]. Daraus wurden Mittelwerte der Intensitäten des künstlichen Maximums berechnet [37]. Sie betragen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

- $947 \pm 318$  counts bei Proband 1 (berechnet aus 17 Urinproben)
- $806 \pm 258$  counts bei Proband 2 (berechnet aus 13 Urinproben) und
- $2054 \pm 532$  counts bei Proband 3 (berechnet aus 12 Urinproben) [37].

Zur Berechnung der mittleren Intensitäten des künstlichen Maximums konnten nicht alle Urinproben herangezogen werden. Grund hierfür waren unter anderem hohe Fluoreszenzintensitäten des Hintergrunds durch private Einnahme von B-Vitaminen. Die in der Studie niedrigste gemessene Intensität des künstlichen Maximums des Fluoreszenzspektrums einer Urinprobe vor Einnahme eines NEM/LM waren 365 counts, die höchste betrug 3130 counts [37].

Die mittleren gemessenen CPIII-Konzentrationen in jenen Urinproben, die vor Einnahme eines NEM/LM eingenommen wurden, betragen:

- $0,03 \pm 0,01 \mu\text{mol/l}$  für Proband 1 (berechnet aus 17 Urinproben)
- $0,04 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$  für Proband 2 (berechnet aus 13 Urinproben) und
- $0,04 \pm 0,01 \mu\text{mol/l}$  für Proband 3 (berechnet aus 12 Urinproben) [37].

### 3.1.3 Detaillierte Betrachtung der Urin-Fluoreszenzspektren

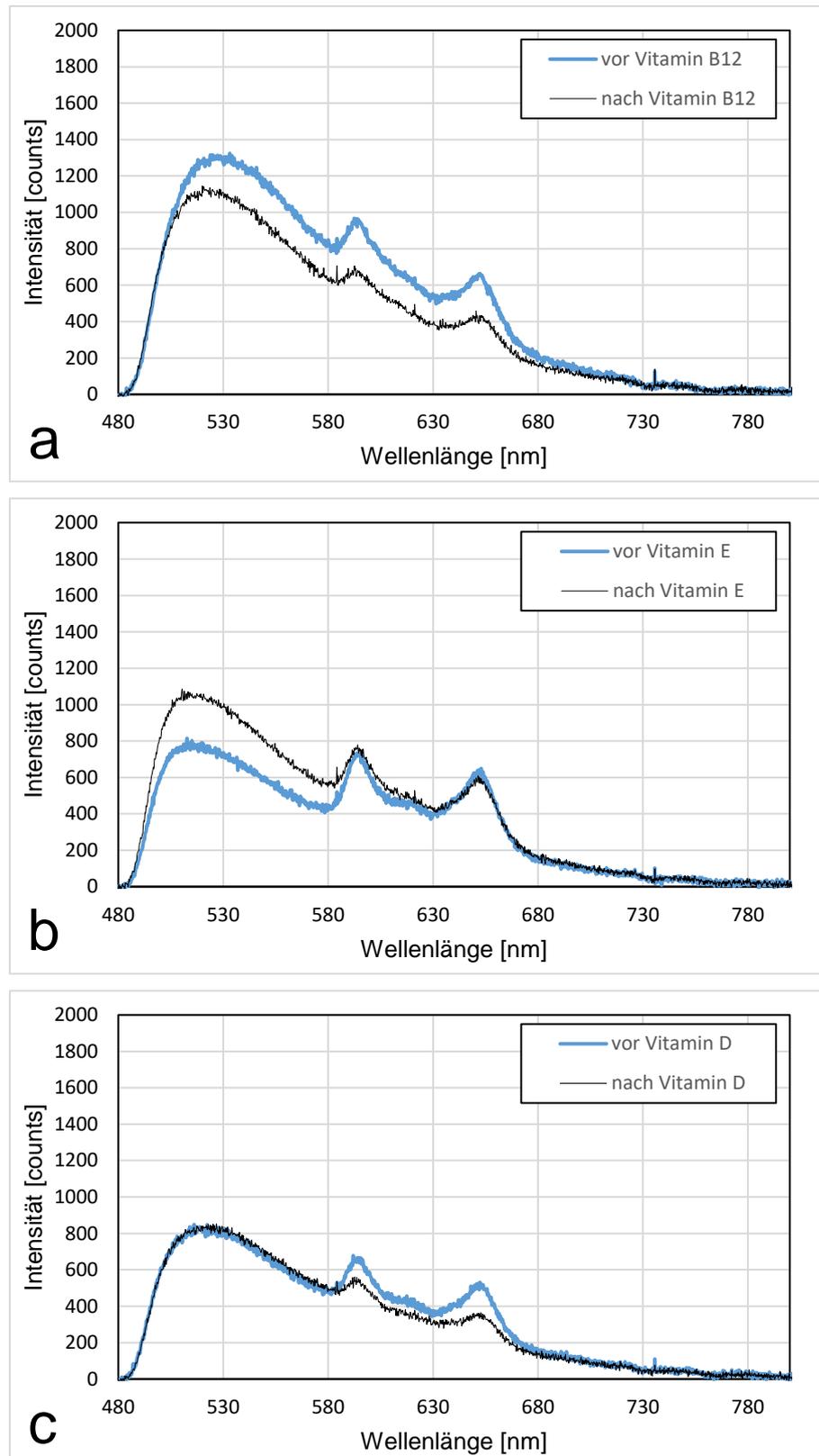
In **Abbildung 9** werden die Urin-Fluoreszenzspektren von vier Urinproben einzelner Probanden vor und nach Einnahme eines NEM/LM dargestellt.

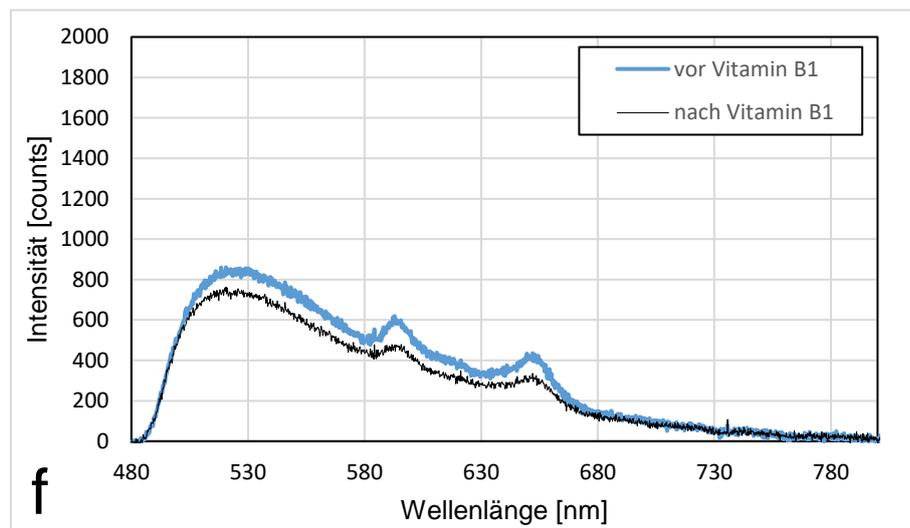
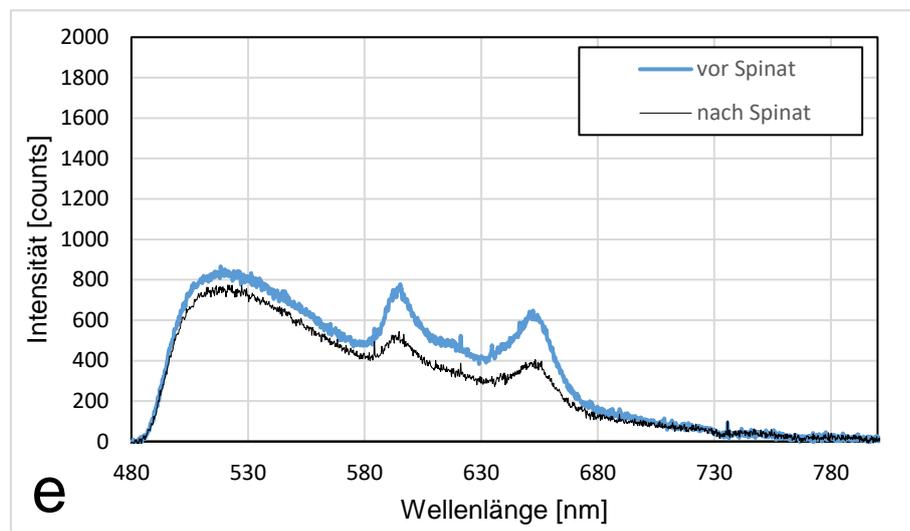
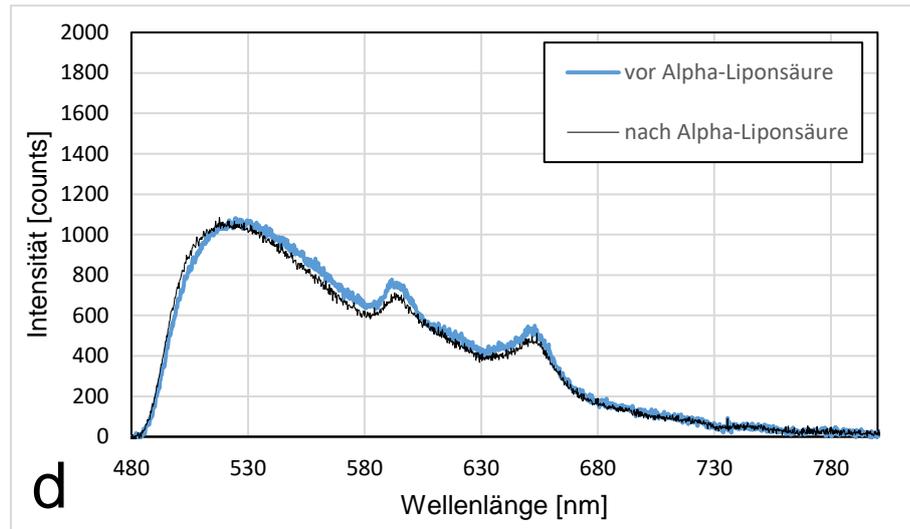
Aus der Gruppe der fettlöslichen Vitamine sind in **Abbildung 9a** die Spektren vor und nach Einnahme von Vitamin A dargestellt. Es ist eine leichte Erhöhung der Intensität des künstlichen Maximums nach Einnahme von Vitamin A zu beobachten [37]. Waren es vor Einnahme noch ungefähr 750 counts, so sind es nach der Einnahme beinahe 1000 counts.

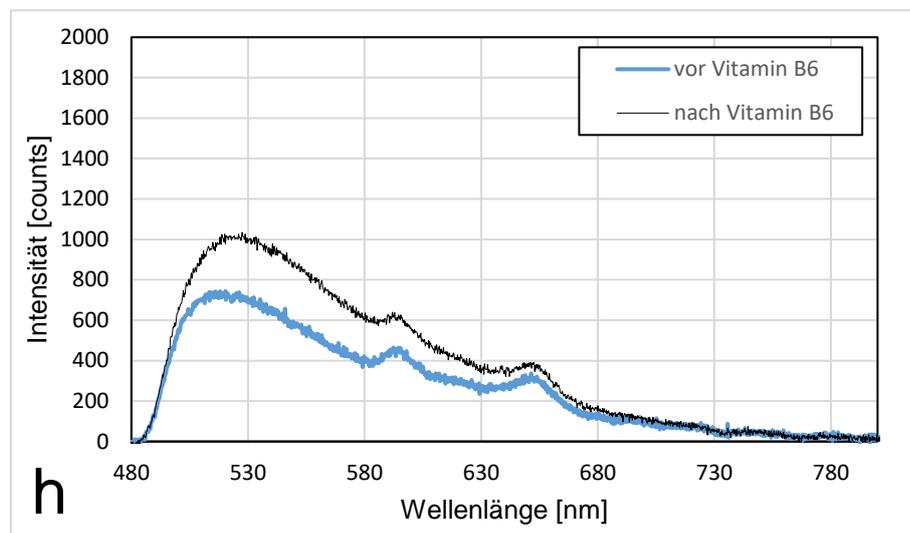
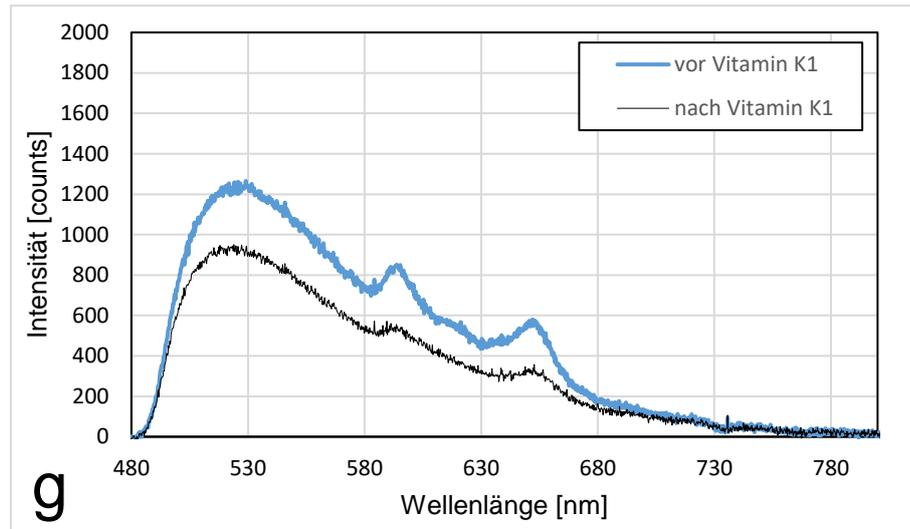
Aus der Gruppe der LM sind die Spektren vor und nach Einnahme von Spargel abgebildet (**Abbildung 9b**). Vor Einnahme betrug die Intensität des künstlichen Maximums ungefähr 1200 counts, während sie nach Einnahme ungefähr 1000 counts betrug. Es ist also eine Verringerung der Intensität des Spektrums nach Einnahme von Spargel zu beobachten [37].

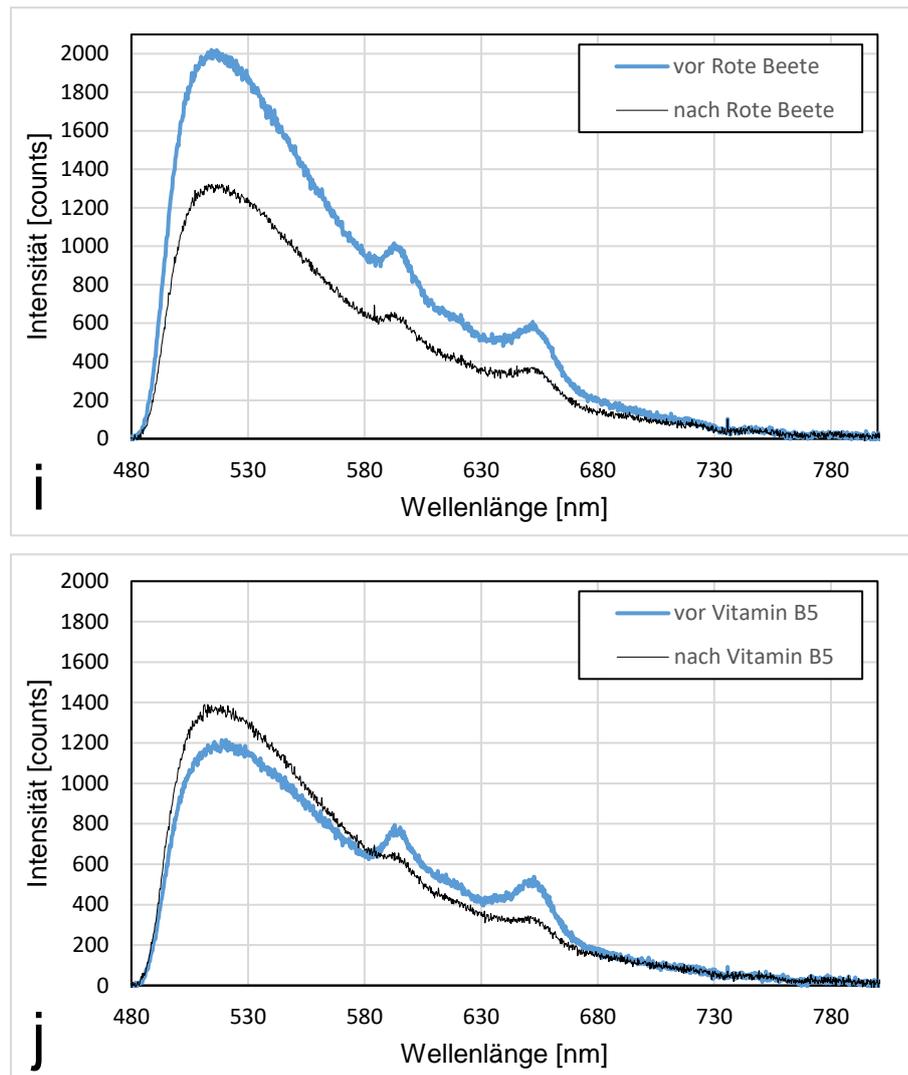
Aus der Gruppe der wasserlöslichen Vitamine finden sich in **Abbildung 9c** und **Abbildung 9d** die Spektren einzelner Probanden vor und nach Einnahme von Vitamin C und B2. Vor Einnahme von Vitamin C lag die Intensität des Spektrums bei ungefähr 500 counts, nach Einnahme von Vitamin C waren es ungefähr 1000 counts, was einer Verdopplung entspricht [37]. Bei Betrachtung der Spektren vor und nach Einnahme von Vitamin B2 ist festzustellen, dass eine Versiebenfachung der Intensität des Urin-Fluoreszenzspektrums vorliegt [37, 91]. Waren es noch ungefähr 800 counts vor der Einnahme, so sind es ungefähr 5700 counts

nach der Einnahme [37]. Zudem ist eine Verschiebung des künstlichen Maximums von  $518 \pm 3$  nm auf ungefähr 535 nm erkennbar [37, 91].



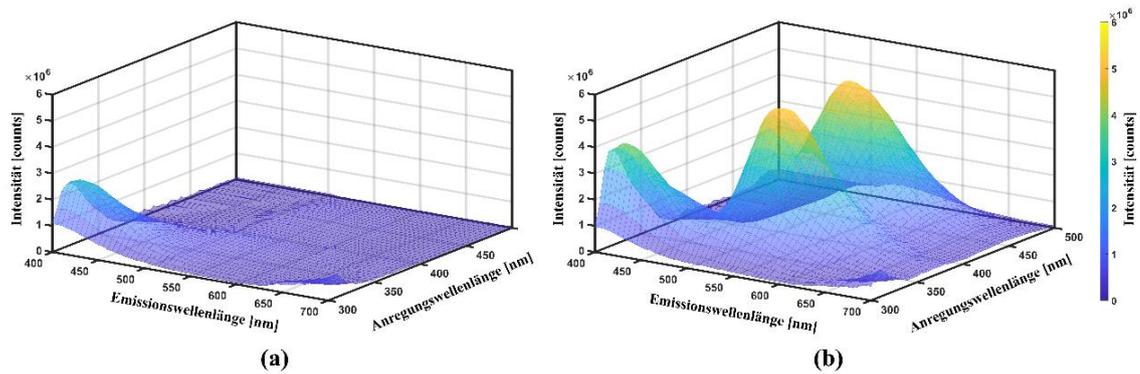






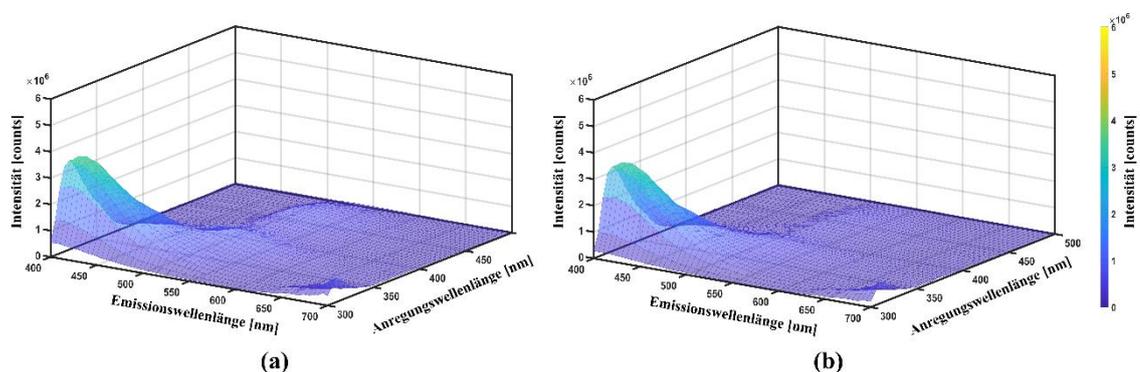
**Abbildung 11:** Weitere Urin-Fluoreszenzspektren einzelner Probanden vor und nach Einnahme der Vitamine B12, E, D, B1, K1, B6, B5, Alpha-Liponsäure, Spinat sowie Rote Beete.

In **Abbildung 11** sind zehn weitere Grafiken abgebildet. In jeder Grafik ist das Urin-Fluoreszenzspektrum eines einzelnen Probanden vor und nach Einnahme des jeweiligen NEM/LM abgebildet. Die Grafiken dienen der Veranschaulichung gewöhnlicher Schwankungen des Urinfluoreszenzspektrums. In **Abbildung 11a**, **e**, **f**, **g** und **i** ist eine höhere Intensität des künstlichen Maximums vor Einnahme des NEM/LM erkennbar. In **Abbildung 11b**, **h** und **j** hingegen liegt eine Erhöhung der Intensität des künstlichen Maximums nach Einnahme des NEM/LM vor. In **Abbildung 11c** und **d** sind nahezu identische Spektren vor und nach Einnahme des NEM/LM zu beobachten.

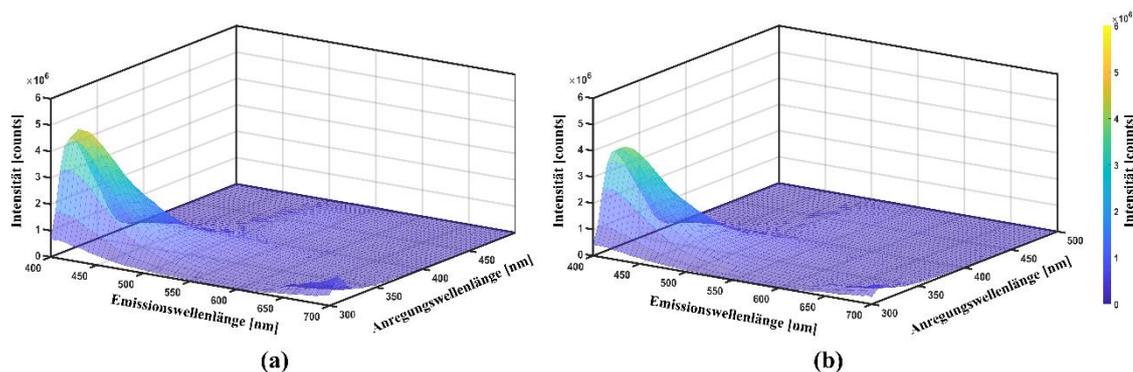


**Abbildung 12:** AEMs vor (a) und nach (b) Einnahme von Vitamin B2, adaptiert nach [37]. Nach Einnahme von Vitamin B2 zeigen sich zwei Maxima [37]. © 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center.

**Abbildung 12** visualisiert AEMs vor und nach der Einnahme von Vitamin B2 eines einzelnen Probanden. Zwei Maxima im Bereich der Anregungswellenlänge von 375 bis 445 nm und Emissionswellenlänge von 525 bis 545 nm nach Einnahme von Vitamin B2 treten besonders hervor [37, 91]. Im Gegensatz dazu sind AEMs einzelner Probanden vor und nach Einnahme von Vitamin K1 in **Abbildung 13** und Spargel in **Abbildung 14** dargestellt. Bei Einnahme dieser und der übrigen NEM/LM war eine Veränderung des in den AEMs abgebildete Fluoreszenzspektrums nicht erkennbar.



**Abbildung 13:** AEMs vor (a) und nach (b) Einnahme von Vitamin K1.



**Abbildung 14:** AEMs vor (a) und nach (b) Einnahme von Spargel.

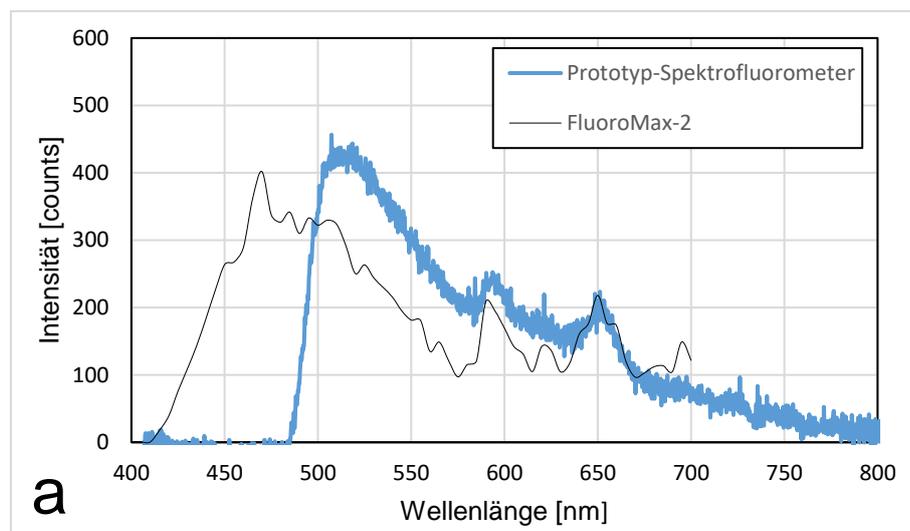
Initial wurde vermutet, dass das Maximum bei 300 nm Anregungs- und 400 nm Emissionswellenlänge durch Harnstoff verursacht sein könnte. Um diese Vermutung zu prüfen, wurden verschiedene Dosierungen an Harnstoff (6 mg, 12 mg, 70 mg, 200 mg, 1000 mg, 5000 mg und 10.000 mg) in einer Verdünnung von 1:20 mit HPLC Wasser im FluoroMax-2 gemessen. Diese AEMs weisen jedoch keine Unterschiede über den gesamten Wellenlängenbereich bei steigender Menge an Harnstoff auf und sind nahezu identisch. Somit konnte die Vermutung nicht bestätigt werden.

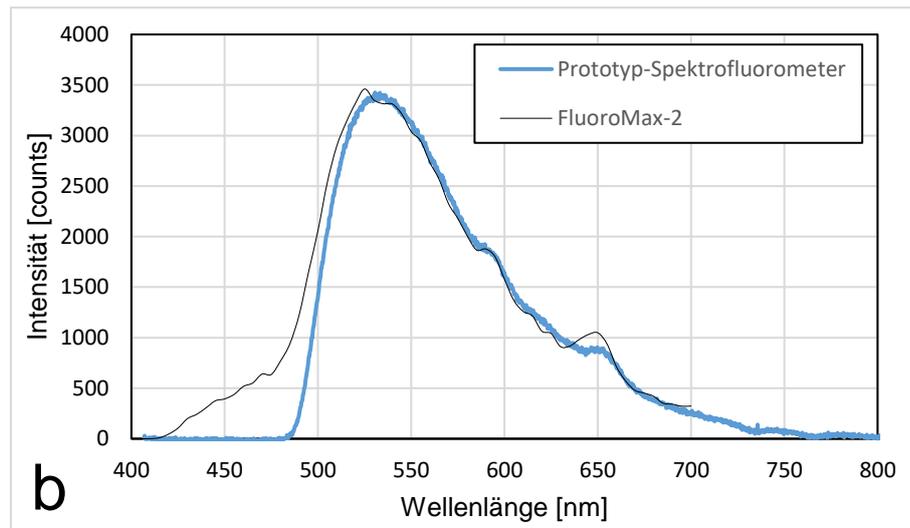
#### 3.1.4 Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen beiden Spektrofluorometern

Beim Vergleich der Urin-Fluoreszenzspektren zwischen ProSp und FluoroMax-2 erfolgten Messungen von Urinproben in beiden Geräten mit modifizierter Messprozedur. Dabei wurde eine deutlich höhere Sensitivität des ProSp gegenüber dem FluoroMax-2 festgestellt, bezogen auf eine Anregungswellenlänge von 407 nm und Emissionswellenlängen oberhalb von 520 nm [37].

In **Abbildung 15** stellt das blaue Spektrum das mit dem ProSp gemessene Urin-Fluoreszenzspektrum dar [37]. Das schwarze Spektrum in **Abbildung 15** stellt das mit dem FluoroMax-2 gemessene Urin-Fluoreszenzspektrum dar, multipliziert mit

dem Skalierungsfaktor  $s = \frac{1}{300}$  nach Subtraktion der Grundlinie [37]. Bei Messungen im FluoroMax-2 (schwarzes Spektrum) kann die Urin-Fluoreszenz ab einer Emissionswellenlänge von 415 bis 700 nm detektiert werden (**Abbildung 15**) [37]. Im ProSp (blaues Spektrum) kann die Urin-Fluoreszenz hingegen erst ab 490 nm Emissionswellenlänge gemessen werden und reicht bis 800 nm (**Abbildung 15**) [37]. Beide Spektren weisen vor und nach Einnahme von Vitamin B2 eine ansteigende Flanke auf, jedoch in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen (**Abbildung 15**): das schwarze Spektrum weist die ansteigende Flanke von 400 bis ungefähr 470 nm auf, das blaue Spektrum hingegen von 490 bis etwa  $518 \pm 3$  nm. Die CP-III-induzierten Maxima in den Wellenlängenbereichen 595, 620 und 650 nm waren bei Messungen mit beiden Geräten erkennbar (**Abbildung 15**) [37].





**Abbildung 15:** Grafik mit Spektren, die mit beiden Spektrofluorometern vor (a) und nach Einnahme (b) von Vitamin B2 generiert wurden, adaptiert nach [37]. © 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center.

### 3.1.5 Konzentrationen der CPIII-Referenzlösungen

Die Messung der Konzentrationen der CPIII-Referenzlösungen erfolgte jedes Mal, wenn Messungen von Urinproben vor und nach Einnahme eines NEM/LM anstanden [37]. Der Mittelwert der Konzentration betrug

- für die 1:50 CPIII-Referenzlösung 1,30  $\mu\text{mol/l}$  mit einer Spannweite von 1,18 bis 1,45  $\mu\text{mol/l}$  und einer relativen Standardabweichung von 7 %,
- für die 1:100 CPIII-Referenzlösung 0,63  $\mu\text{mol/l}$  mit einer Spannweite von 0,52 bis 0,75  $\mu\text{mol/l}$  und einer relativen Standardabweichung von 12 %,
- für die 1:200 CPIII-Referenzlösung 0,31  $\mu\text{mol/l}$  mit einer Spannweite von 0,27 bis 0,39  $\mu\text{mol/l}$  und einer relativen Standardabweichung von 10 % [37].

### 3.1.6 Ermittlung der Wiederfindungsrate für die CPIII-Konzentration im Urin

Zur Untersuchung von möglichen Störfaktoren und Interferenzen von NEM/LM auf die Bestimmung der CPIII-Konzentration im Urin wurde die Wiederfindungsrate definiert [37, 91]. Die Berechnung der Wiederfindungsrate erfolgte durch die Division der mittleren CPIII-Konzentration im Urin aller drei Probanden durch die Konzentration der jeweiligen CPIII-Referenzlösung [37, 91]. Eine Abweichung von 15 % wurde als akzeptabel definiert, d. h. eine Wiederfindungsrate von 0,85 bis 1,15 galt als annehmbar [37, 91].

**Tabelle 3:** Berechnete Wiederfindungsraten für CPIII im Urin nach Einnahme von NEM/LM, adaptiert nach [37]. Werte über oder unter der definierten akzeptablen Abweichung (0,85 bis 1,15) sind unterstrichen [37]. © 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center.

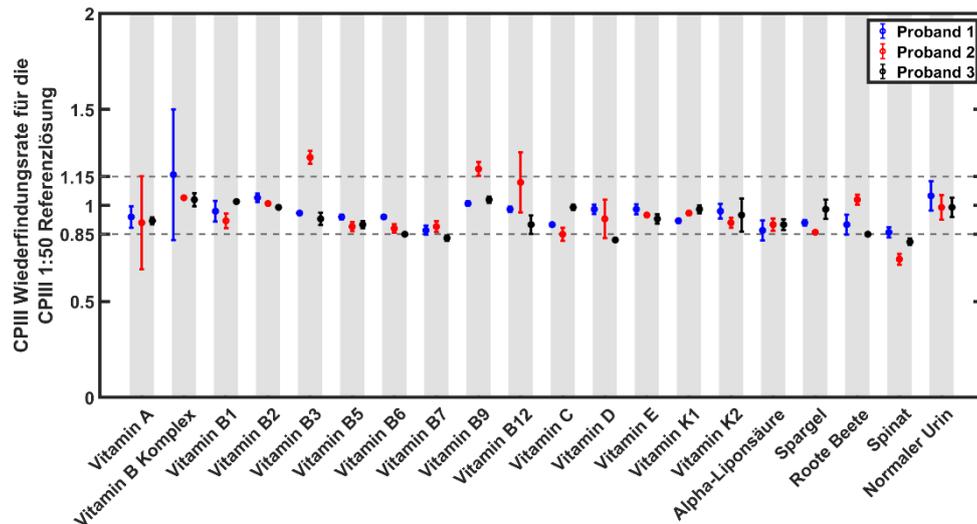
NEM/LM	CPIII 1:50	CPIII 1:100	CPIII 1:200
Vitamin A	0,93	1,01	<u>1,20</u>
Vitamin B Komplex	1,07	1,07	<u>1,18</u>
Vitamin B1	0,97	<u>1,29</u>	1,04
Vitamin B2	1,01	0,99	1,12
Vitamin B3	1,05	1,14	<u>1,19</u>
Vitamin B5	0,91	0,89	0,95
Vitamin B6	0,89	0,87	0,96
Vitamin B7	0,86	0,91	0,91
Vitamin B9	1,08	<u>1,22</u>	1,09
Vitamin B12	1,01	1,11	1,00
Vitamin C	0,92	0,96	1,00
Vitamin D	0,92	0,98	0,92

Vitamin E	0,96	1,00	1,01
Vitamin K1	0,96	0,99	1,09
Vitamin K2	0,94	1,00	1,03
Alpha-Liponsäure	0,89	0,89	1,00
Rote Beete	0,93	1,05	1,13
Spinat	<u>0,80</u>	<u>0,81</u>	<u>0,84</u>
Spargel	0,92	1,12	1,03
Normaler Urin	1,01	0,90	1,00

Bei der überwiegenden Mehrheit dieser Werte ist zu erkennen, dass diese sich innerhalb der als akzeptabel definierten Wiederfindungsrate befinden [37, 91].

Insgesamt lagen folgende acht Ausreißer vor:

- Urin nach Einnahme von Vitamin A bei Spiking mit der 1:200 CPIII-Referenzlösung (Wiederfindungsrate 1,20),
- Urin nach Einnahme von Vitamin B Komplex bei Spiking mit der 1:200 CPIII-Referenzlösung (Wiederfindungsrate 1,18),
- Urin nach Einnahme von Vitamin B3 bei Spiking mit der 1:200 CPIII-Referenzlösung (Wiederfindungsrate 1,19),
- Urin nach Einnahme von Vitamin B1 bei Spiking mit der 1:100 CPIII-Referenzlösung (Wiederfindungsrate 1,29),
- Urin nach Einnahme von Vitamin B9 bei Spiking mit der 1:100 CPIII-Referenzlösung (Wiederfindungsrate 1,22),
- Urin nach Einnahme von Spinat bei Spiking mit allen drei CPIII-Referenzlösungen (Wiederfindungsraten 0,80; 0,81 und 0,84) [37, 91].



**Abbildung 16:** CPIII-Wiederfindungsraten der 1:50 CPIII-Referenzlösung mit Standardabweichungen [ $\mu\text{mol/l}$ ] für jedes NEM/LM und jeden Probanden, adaptiert nach [37]. © 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center.

Im Gegensatz zu **Tabelle 3** ist in **Abbildung 16** die Wiederfindungsrate der CPIII-Konzentration im Urin mit Standardabweichung für jeden einzelnen Probanden und jedes NEM/LM bei der 1:50 CPIII-Referenzlösung dargestellt [37]. **Abbildung 16** liefert einen weiterführenden und ergänzenden Überblick auf die Wiederfindungsraten der CPIII-Konzentration im Urin. Es ließen sich insgesamt sieben Ausreißer in **Abbildung 16** feststellen, die sich außerhalb der als akzeptabel definierten Wiederfindungsrate von 0,85 bis 1,15 befanden [37]. Bei den Ausreißern handelt es sich um:

- Urin nach Einnahme von Vitamin B Komplex bei Proband 1 (Wiederfindungsrate 1,16)
- Urin nach Einnahme von Vitamin D bei Proband 3 (Wiederfindungsrate 0,83)
- Urin nach Einnahme von Vitamin B7 bei Proband 3 (Wiederfindungsrate 0,83)

- Urin nach Einnahme von Spinat bei Proband 2 und 3 (Wiederfindungsrate 0,72 und 0,81)
- Urin nach Einnahme von Vitamin B9 bei Proband 2 (Wiederfindungsrate 1,20)
- Urin nach Einnahme von Vitamin B3 bei Proband 2 (Wiederfindungsrate 1,26).

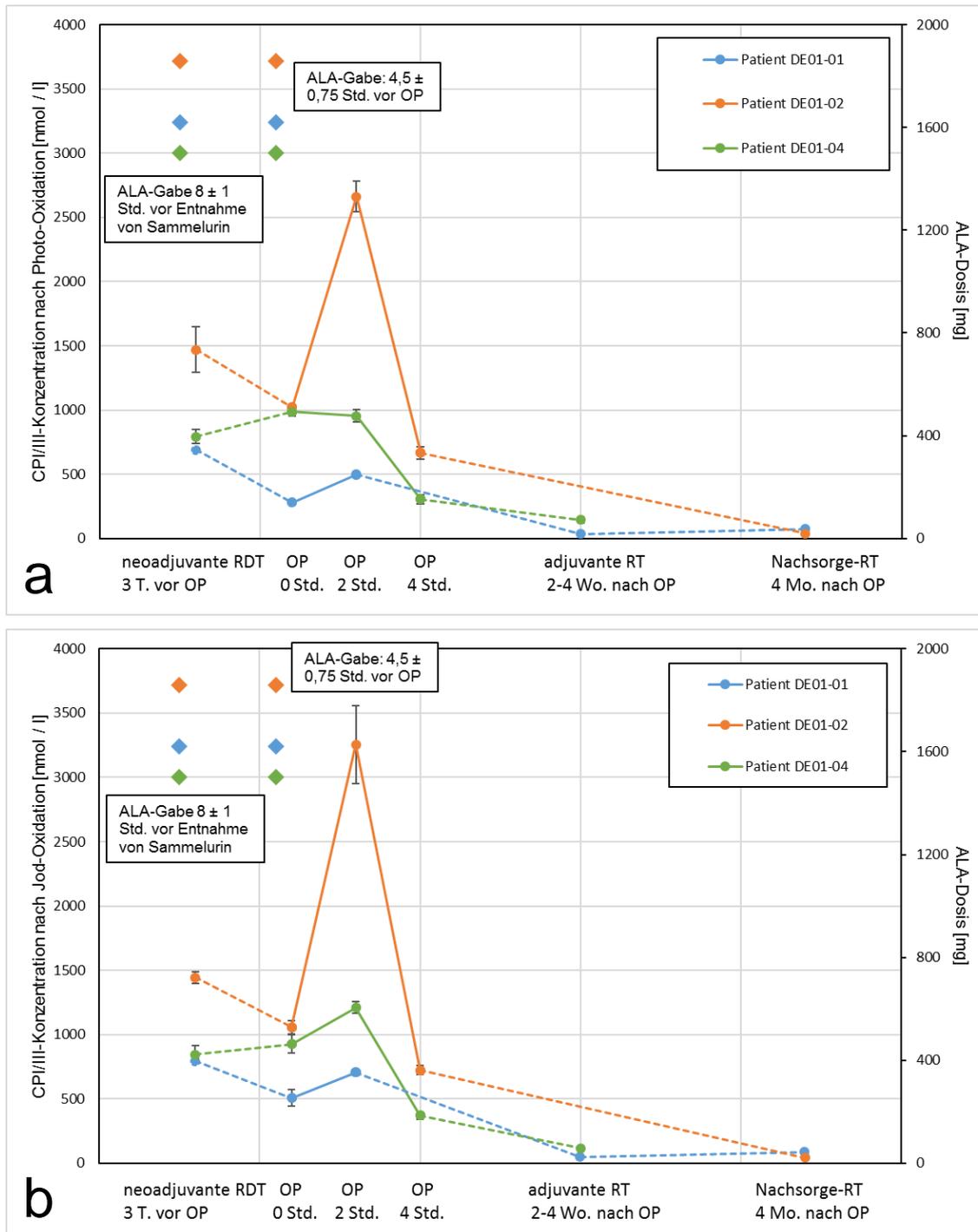
Drei Werte fielen zudem durch hohe Standardabweichungen auf (Proband 2 nach Vitamin A und Vitamin B12, Proband 1 nach Vitamin B Komplex) [37].

## **3.2 Ergebnisse der ALA-RDT-Studie**

### **3.2.1 Ergebnisse der absoluten CPI/III-Konzentrationen in Kohorte 0**

Die beiden Graphen in **Abbildung 17** veranschaulichen die mit dem ProSp im Urin gemessenen CPI/III-Konzentrationen in Kohorte 0, **Abbildung 17a** mittels Photo-Oxidation und **Abbildung 17b** mittels Jod-Oxidation.

Die Verabreichung von 5-ALA erfolgte drei Tage vor der operativen Resektion des Glioblastoms zur neoadjuvanten RDT sowie am Tag der OP.



**Abbildung 17:** Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen mit Standardabweichungen der Kohorte 0 im Verlauf. Gestrichelte Linien zeigen an, dass die Konzentrationen von mehreren Tagen bis Wochen gezeigt werden. Die linke Skala bezieht sich auf die gemessene CPI/III-Konzentration im Urin (Punkte), die rechte Skala bezieht sich auf die Rauten, die die verabreichte 5-ALA-Dosis darstellen.

Am Tag der RDT wurde morgens das 5-ALA verabreicht, gleichzeitig erfolgte ab diesem Zeitpunkt die Sammlung des Urins für 7 bis 9 Stunden bis zum Ende der Bestrahlung. Bei Patient DE01-01 wurden mittels Photo-Oxidation eine mittlere

CPI/III-Konzentration (Mittelwert aus drei Einzelmessungen) von 688,6 nmol/l gemessen. Für Patient DE01-02 waren es gemittelt 1470,5 nmol/l und für Patient DE01-04 gemittelt 792,2 nmol/l. Bei Messung mittels Jod-Oxidation betragen die entsprechenden Werte gemittelt 794,4, 1443,9 sowie 845,1 nmol/l.

Am Tag der operativen Resektion wurde das 5-ALA laut übermittelten Daten  $4,5 \pm 0,75$  Stunden vor Einleitung der Anästhesie verabreicht. Während der Einleitung der Anästhesie unmittelbar nach der Intubation bekamen die Patienten einen Blasenkatheter angelegt. Zwei Stunden nach Einleitung der Anästhesie, also ungefähr 6,5 Stunden nach Verabreichung von 5-ALA, stiegen die CPI/III-Konzentrationen im Urin bei allen Patienten im Vergleich zum Wert bei Einleitung der Anästhesie an. Die gemittelten Werte bei Photo-Oxidation hierfür betragen 497 nmol/l für Patient DE01-01, 2663,2 nmol/l für Patient DE01-02 und 953 nmol/l für Patient DE01-04. Die gemittelten Werte bei Jod-Oxidation betragen 706, 3255,3 und 1211 nmol/l. Nach vier Stunden im OP, also ungefähr 8,5 Stunden nach 5-ALA-Gabe, ist ein Absinken der gemessenen mittleren CPI/III-Konzentrationen im Urin bei allen Patienten festzustellen.

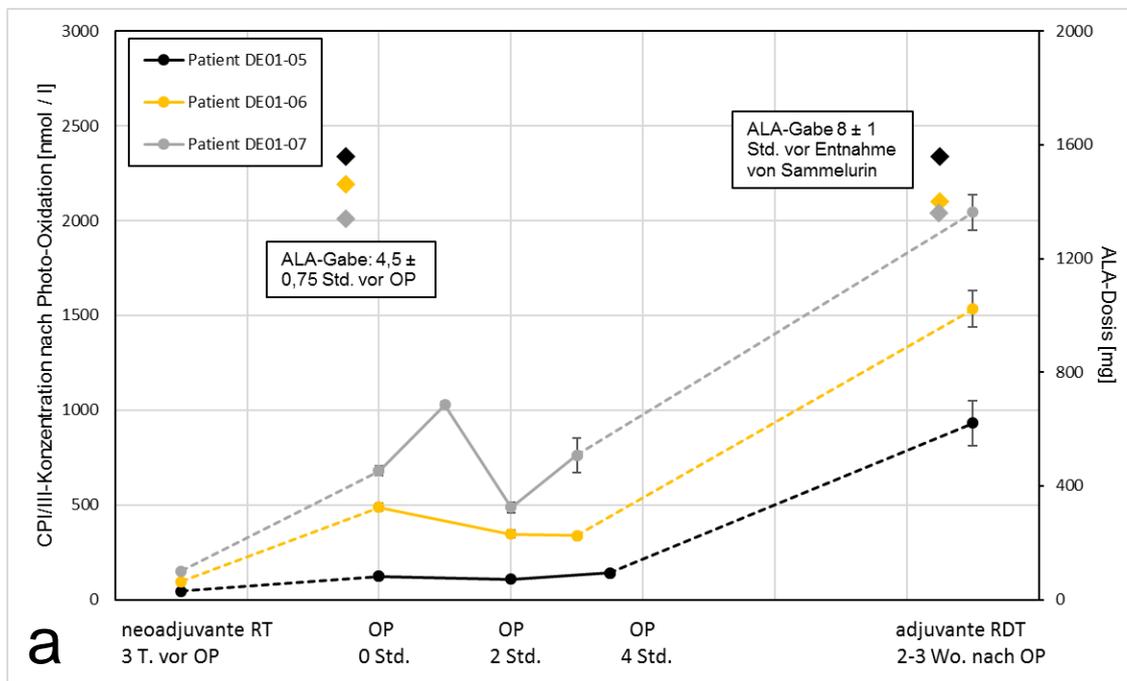
Sowohl in der adjuvanten Bestrahlung als auch in der Nachsorge-Bestrahlung sind die mittleren CPI/III-Konzentrationen bei allen Patienten deutlich unter 150 nmol/l und somit niedriger verglichen zum Zeitpunkt der neoadjuvanten RDT und Operation. Dies ist sowohl bei den Messungen mittels Photo- als auch mittels Jod-Oxidation zu beobachten.

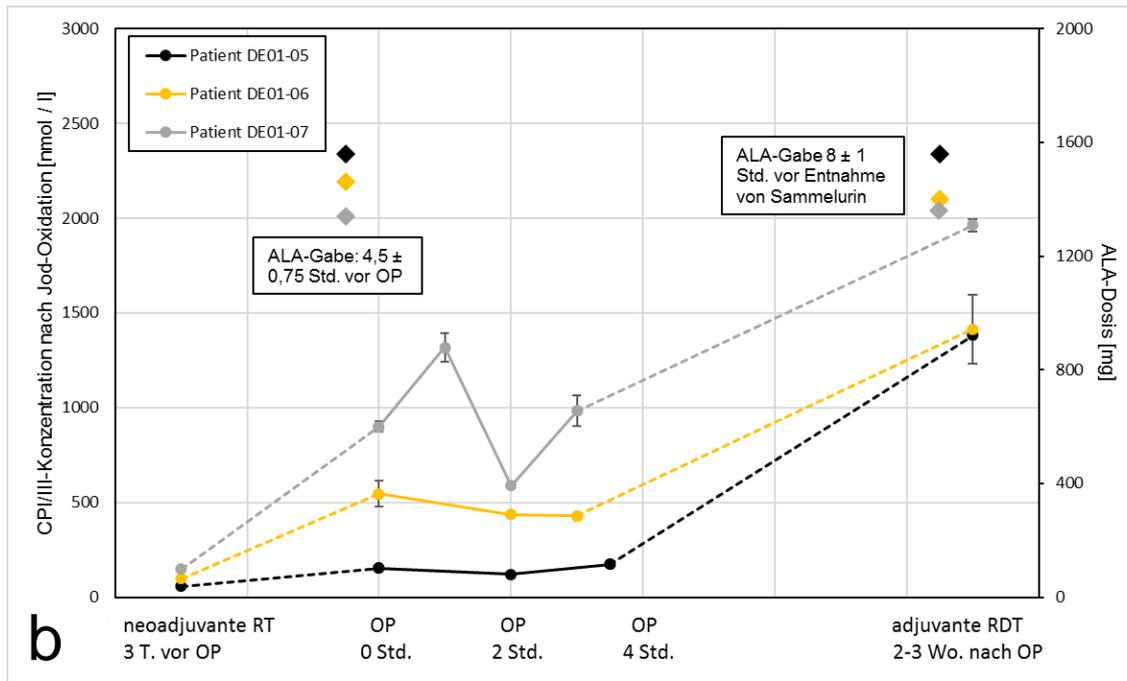
Bei Patient DE01-02 fallen im Vergleich zu den restlichen CPI/III-Mittelwerten höhere Standardabweichungen auf. Dies bezieht sich bei der Photo-Oxidation auf den CPI/III-Mittelwert der neoadjuvanten RDT (Standardabweichung 177,00

nmol/l) sowie auf den intraoperativen CPI/III-Mittelwert nach zwei Stunden (Standardabweichung 117,03 nmol/l). Bei der Messung mittels Jod-Oxidation ist letzterer nochmals höher mit einer Standardabweichung von 303,07 nmol/l.

### 3.2.2 Ergebnisse der absoluten CPI/III-Konzentrationen in Kohorte 1

In Kohorte 1 erfolgte die Verabreichung von 5-ALA sowohl am Tag der OP als auch zur adjuvanten RDT.





**Abbildung 18:** Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen mit Standardabweichungen der Kohorte 1 im Verlauf. Gestrichelte Linien zeigen an, dass die Konzentrationen von mehreren Tagen bis Wochen gezeigt werden. Graph (a) zeigt die Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen nach Photo-Oxidation, Graph (b) nach Jod-Oxidation. Die linke Skala bezieht sich auf die gemessene CPI/III-Konzentration im Urin, die rechte Skala bezieht sich auf die Rauten, die die verabreichte 5-ALA-Dosis darstellen.

Am Tag der neoadjuvanten RT zeigen sich Mittelwerte von CPI/III-Konzentrationen unter 160 nmol/l für Messungen sowohl mittels Photo- als auch Jod-Oxidation (**Abbildung 18**).

Wie in Kohorte 0 fand am Tag der operativen Resektion die Verabreichung von 5-ALA  $4,5 \pm 0,75$  Stunden vor Einleitung der Anästhesie statt. Die Einleitung der Anästhesie und das Anlegen des Blasenkatheters erfolgten ebenfalls wie in Kohorte 0. Während der OP sind die Mittelwerte der gemessenen CPI/III-Konzentrationen bei allen Patienten höher als bei der neoadjuvanten RT. Patient DE01-05 hatte während der gesamten OP die niedrigsten CPI/III-Mittelwerte. Bei Patient DE01-06 lässt sich im Verlauf der OP ein Absinken der CPI/III-Mittelwerte beobachten. Bei Patient DE01-07 steigt der Mittelwert ca. eine Stunde nach OP-Beginn auf 1029,2 nmol/l (Photo-Oxidation) bzw. 1318,5 nmol/l (Jod-Oxidation)

an. Im Vergleich dazu fällt die mittlere CPI/III-Konzentration zwei Stunden später niedriger aus und beträgt 762,1 nmol/ bzw. 982,7 nmol/l.

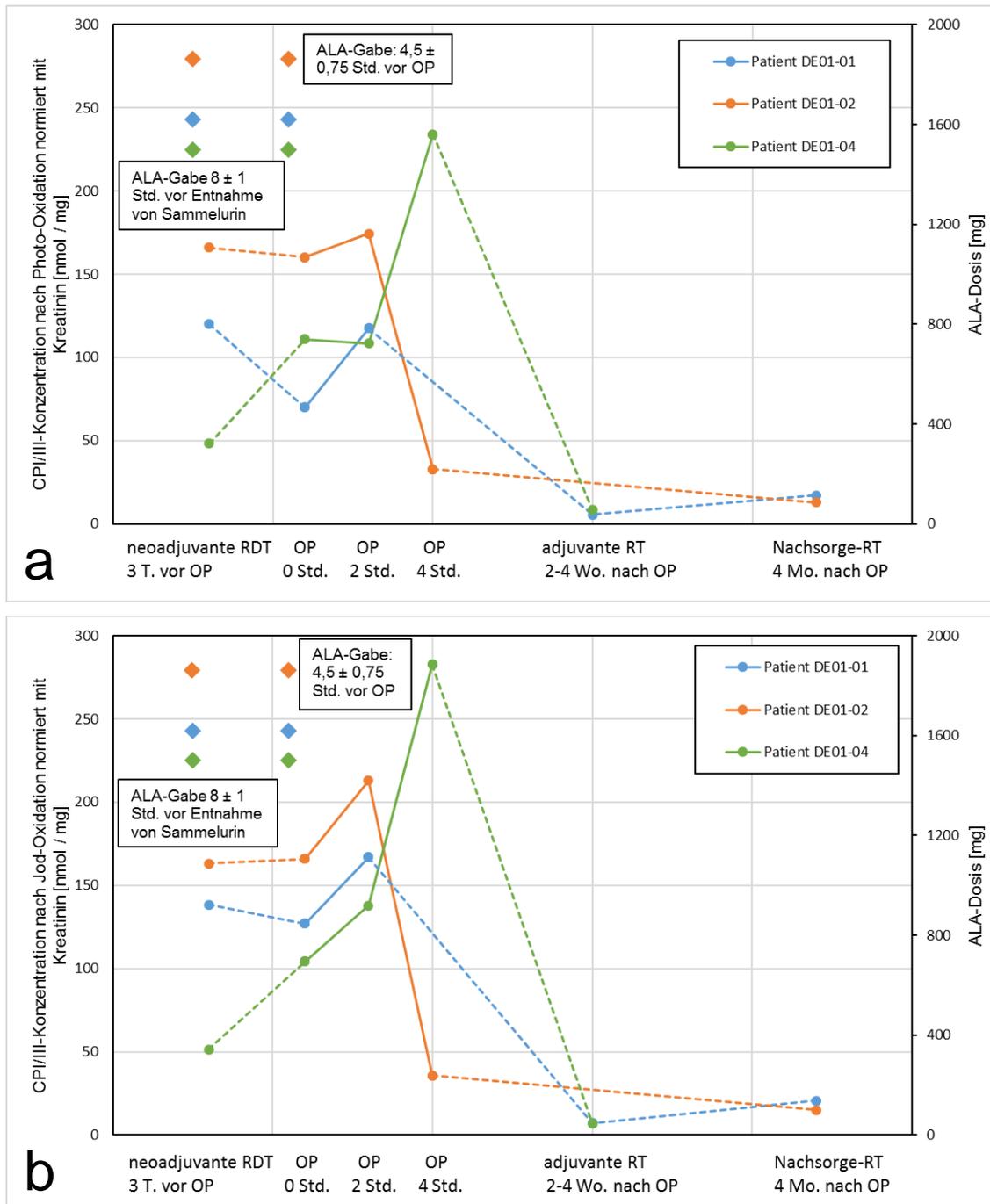
Am Tag der adjuvanten RDT haben alle Patienten höhere CPI/III-Mittelwerte im Vergleich zu vorherigen Zeitpunkten in dieser Kohorte. Patient DE01-05 und DE01-06 haben bei Messung mittels Photo-Oxidation CPI/III-Mittelwerte von 931,5 nmol/l und 1533,7 nmol/l, bei Messung mittels Jod-Oxidation liegen beide CPI/III-Mittelwerte sehr nah beieinander mit 1380,8 und 1413 nmol/l. Bei Patient DE01-07 liegen die Werte für Photo- und Jod-Oxidation bei 2043,2 und 1962,5 nmol/l und stellen damit höhere mittlere CPI/III-Konzentrationen bei RDT als bei den anderen beiden Patienten derselben Kohorte dar.

Bei den Messungen mittels Photo-Oxidation treten vier CPI/III-Mittelwerte mit vergleichsweise hohen Standardabweichungen hervor. Es handelt sich bei allen drei Patienten der Kohorte um die CPI/III-Mittelwerte der adjuvanten RDT. Die Standardabweichungen betragen hier 118,07 nmol/l, 97,07 nmol/ sowie 92,76 nmol/l für die Patienten DE01-05, DE01-06 und DE01-07. Bei Patient DE01-07 ist der letzte intraoperativ gemessene CPI/III-Mittelwert mit einer Standardabweichung von 92,25 nmol/l ebenfalls hoch.

Außerdem weisen bei den Messungen mittels Jod-Oxidation vier CPI/III-Mittelwerte hohen Standardabweichungen auf. Zwei davon beziehen sich auf Patient DE01-06, dessen mittlere CPI/III-Konzentration zu Beginn der OP eine Standardabweichung von 68,89 nmol/l aufweist. Der CPI/III-Mittelwert bei der adjuvanten RDT des Patienten hat eine Standardabweichung von 181,69 nmol/l. Die restlichen beiden hohen Standardabweichungen sind bei Patient DE01-07 intraoperativ zu finden: nach einer Stunde im OP mit 76,77 nmol/ sowie nach drei Stunden im OP mit 80,37 nmol/l.

### 3.2.3 Ergebnisse in Kohorte 0 bei Division der CPI/III-Konzentration durch den Kreatinin-Wert der jeweiligen Urinprobe

Durch diese Kalkulation wurden die Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen durch den in derselben Urinprobe gemessenen Kreatinin-Wert dividiert.



**Abbildung 19:** Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen der Kohorte 0 dividiert durch die jeweilige Kreatinin-Konzentration der Urinprobe. Graph (a) zeigt die Werte nach Photo-Oxidation, Graph (b) nach Jod-Oxidation.

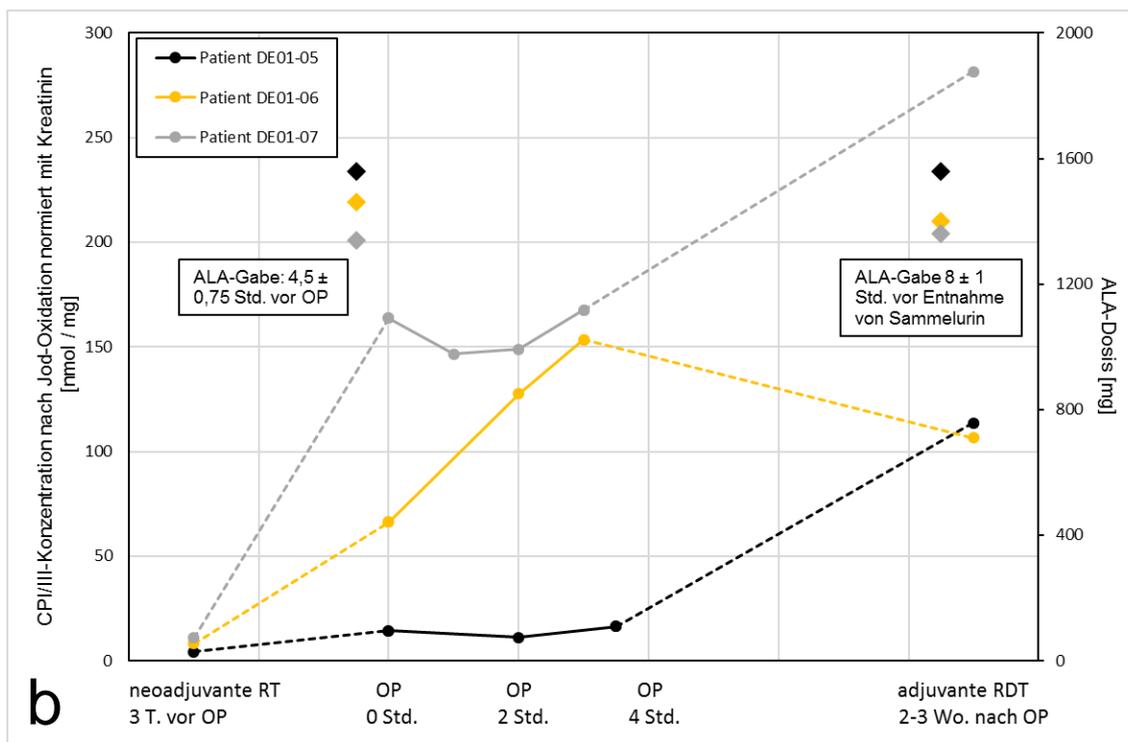
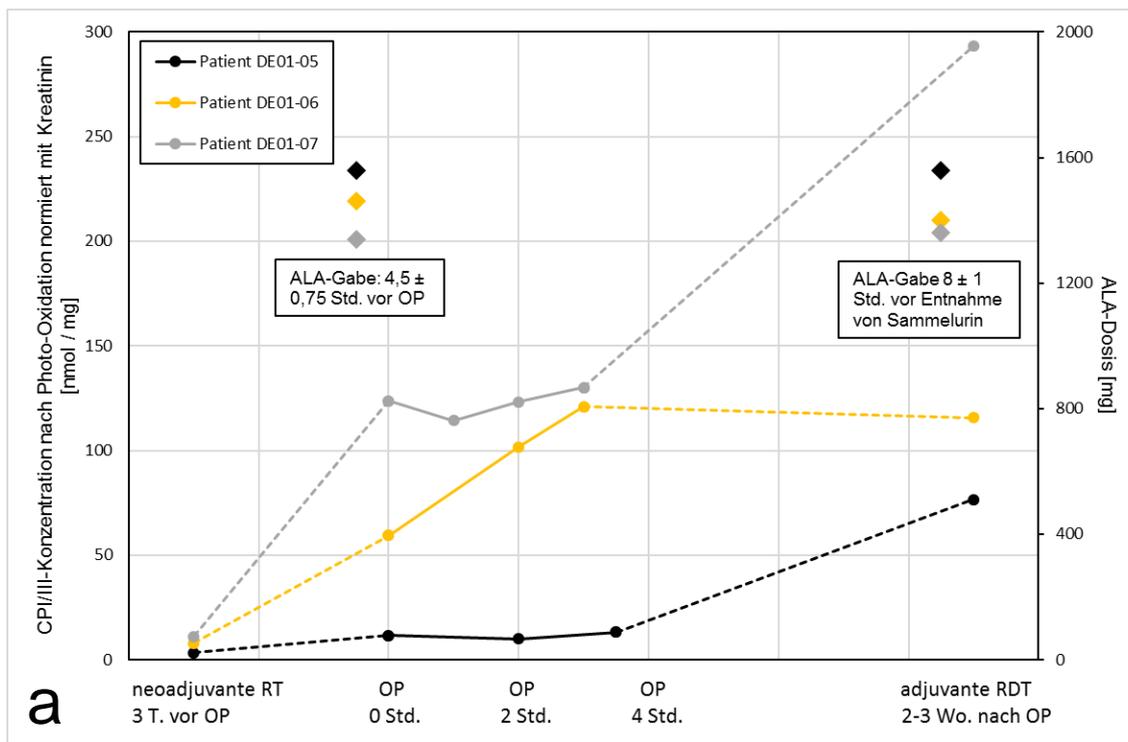
Die Mittelwerte der Kreatinin-korrigierten CPI/III-Konzentration am Tag der neoadjuvanten RDT sind bei Patient DE01-01 höher als bei Beginn der OP, sowohl bei Messungen mittels Photo- als auch Jod-Oxidation (**Abbildung 19**). Bei Patient DE01-02 befinden sich die Werte bei der neoadjuvanten RDT und bei OP-Beginn auf ähnlichem Niveau sowohl bei Messungen mittels Photo- als auch mittels Jod-Oxidation. Bei Patient DE01-04 sind die Werte bei der neoadjuvanten RDT niedriger als bei OP-Beginn für Messungen beider Oxidationsverfahren.

Der CPI/III-Mittelwert der Urinprobe von Patient DE01-02 zwei Stunden nach OP-Beginn hat sich durch die Division durch den jeweiligen Kreatinin-Wert der Urinprobe im Gegensatz zur Betrachtung der absoluten CPI/III-Konzentration verringert und stellt in diesem Fall keinen Höchstwert in der Kohorte 0 dar. Stattdessen zeigt sich nach Division mit dem jeweiligen Kreatinin-Wert der Urinprobe bei Patient DE01-04 der Höchstwert nach vier intraoperativen Stunden mit einer Kreatinin-korrigierten CPI/III-Konzentration von 234,05 nmol/mg (Photo-Oxidation) bzw. 282,67 nmol/mg (Jod-Oxidation). Bei Messungen mittels Photo-Oxidation bei Patient DE01-04 ist ein leichtes Abfallen der Kreatinin-korrigierten CPI/III-Mittelwerte bei Urinproben zwischen OP-Beginn und zwei Stunden später zu beobachten. Dahingegen steigen unter Jod-Oxidation die Kreatinin-korrigierten CPI/III-Mittelwerte der Urinproben bis zu zwei Stunden nach OP-Beginn bei allen Patienten der Kohorte.

Bei Betrachtung der Kreatinin-korrigierten CPI/III-Mittelwerte ist festzustellen, dass diese bei der neoadjuvanten RDT und während der OP höher sind als bei der adjuvanten Bestrahlung und Nachsorge-Bestrahlung. Die Kreatinin-korrigierten CPI/III-Mittelwerte fallen außerdem an Tagen nach 5-ALA-Gabe gegenüber Tagen ohne 5-ALA-Gabe höher aus. Die Kinetik der CPI/III-Mittelwerte bleibt bei

der Division durch den Kreatinin-Wert der jeweiligen Urinprobe weiterhin unverändert.

### 3.2.4 Ergebnisse in Kohorte 1 bei Division der CPI/III-Konzentration durch den Kreatinin-Wert der jeweiligen Urinprobe



**Abbildung 20:** Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen der Kohorte 1 dividiert durch die jeweilige Kreatinin-Konzentration der Urinprobe. Graph (a) zeigt die Werte nach Photo-Oxidation, Graph (b) nach Jod-Oxidation.

Sowohl in **Abbildung 20a** als auch in **Abbildung 20b** befinden sich die Mittelwerte der Kreatinin-korrigierten CPI/III-Konzentrationen am Tag der neoadjuvanten RT unter 15 nmol/mg.

Während der 5-ALA-gestützten operativen Resektion ist bei Patient DE01-06 ein kontinuierlicher Anstieg der mittleren Kreatinin-korrigierten CPI/III-Konzentrationen zu beobachten. Zu OP-Beginn betragen sie 59,3 (Photo-Oxidation) bzw. 66,2 nmol/mg (Jod-Oxidation), zum Ende der OP betragen sie 120,9 bzw. 153,4 nmol/mg. Bei Patient DE01-05 sind die intraoperativen mittleren Kreatinin-korrigierten CPI/III-Konzentrationen zwar höher bei neoadjuvanter RT, allerdings bleiben sie überwiegend konstant und unterhalb 20 nmol/mg während der OP. Patient DE01-07 hat zu Beginn der OP eine mittlere Kreatinin-korrigierte CPI/III-Konzentration von 123,7 bzw. 163,79 nmol/mg, zum Ende der OP waren es 130,05 bzw. 167,7 nmol/mg mit kleinem Absinken und Ansteigen dazwischen.

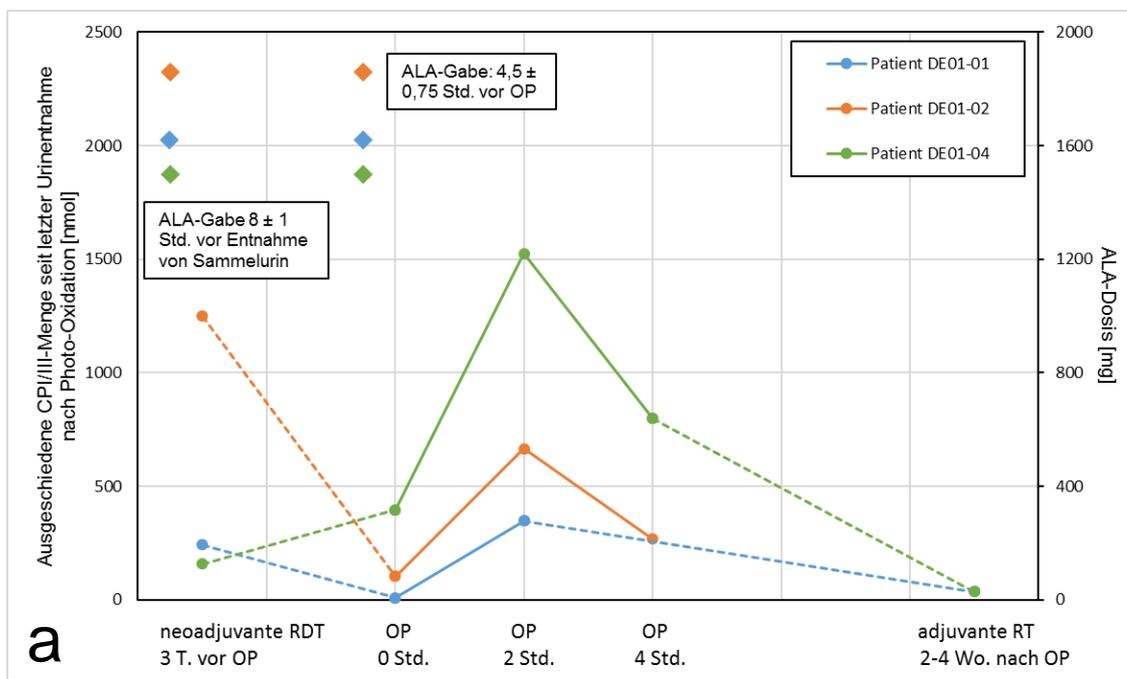
Bei der adjuvanten RDT steigt die mittlere Kreatinin-korrigierten CPI/III-Konzentration bei Patient DE01-05 auf 76,6 bzw. 113,6 nmol/mg. Unter der Photo-Oxidation bleibt dieser Wert bei Patient DE01-06 im Vergleich zum letzten intraoperativen Wert nahezu gleich, bei der Jod-Oxidation fällt dieser auf 106,6 nmol/mg ab. Bei Patient DE01-07 ist ein kontinuierlicher Anstieg dieser Werte an im Vergleich zum letzten intraoperativen Wert erkennbar: 293,14 bzw. 281,56 nmol/mg beträgt die mittlere Kreatinin-korrigierten CPI/III-Konzentration bei adjuvanter RDT.

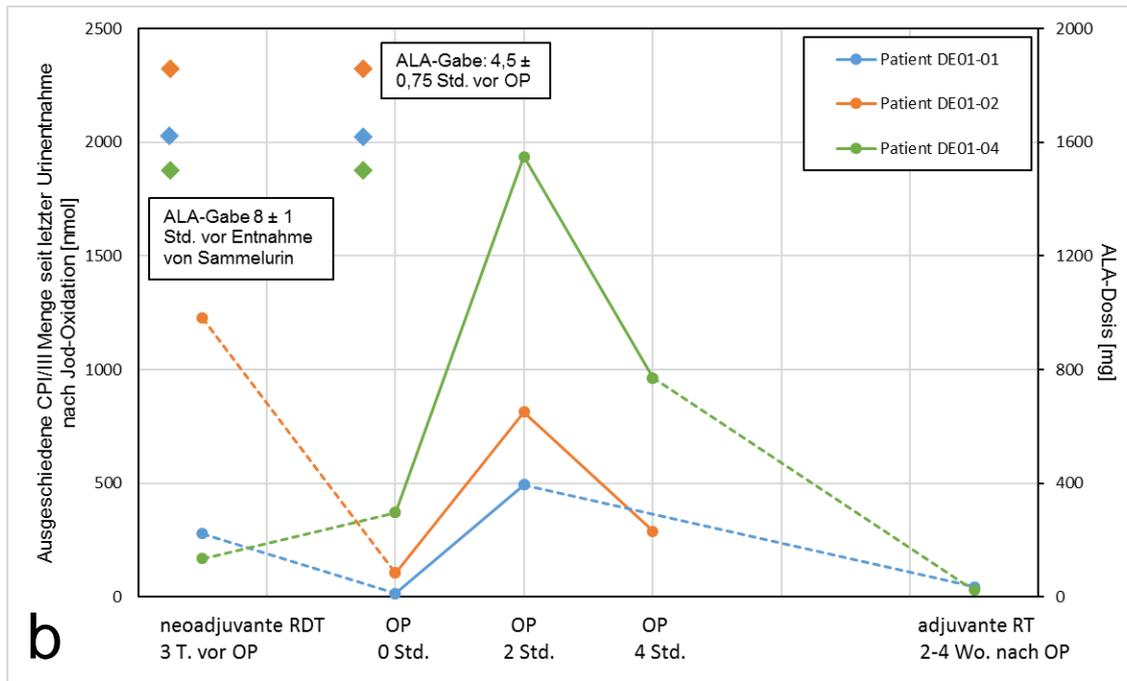
An Tagen mit Verabreichung von 5-ALA sind die mittleren Kreatinin-korrigierten CPI/III-Mittelwerte höher als an Tagen ohne Gabe von 5-ALA. Wie in Kohorte 0

bleibt die Kinetik der CPI/III-Mittelwerte bei der Division durch den Kreatinin-Wert der jeweiligen Urinprobe weiterhin unverändert.

### 3.2.5 Multiplikation der CPI/III-Konzentration mit dem jeweiligen Volumen der Urinprobe in Kohorte 0

In **Abbildung 21** wurden die Mittelwerte der CPI/III-Konzentration mit dem abgegebenen Urinvolumen multipliziert. Damit kann die absolute ausgeschiedene Menge an CPI/III berechnet werden. Diese ist unabhängig von der Trinkmenge und damit von der Konzentration des Urins.





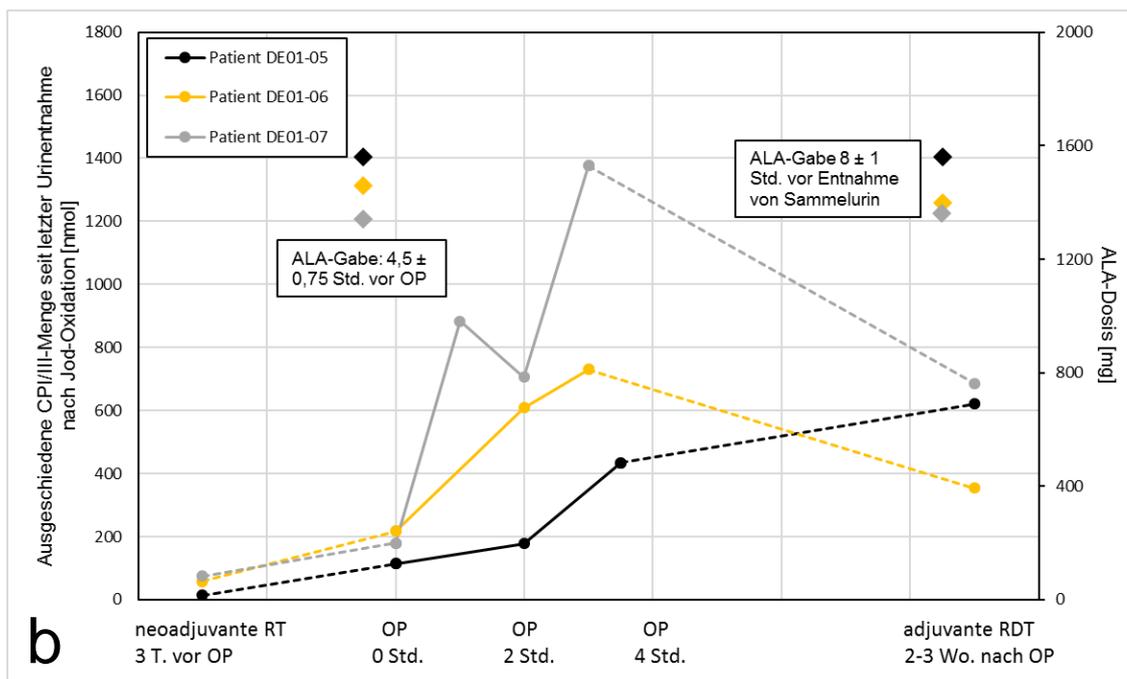
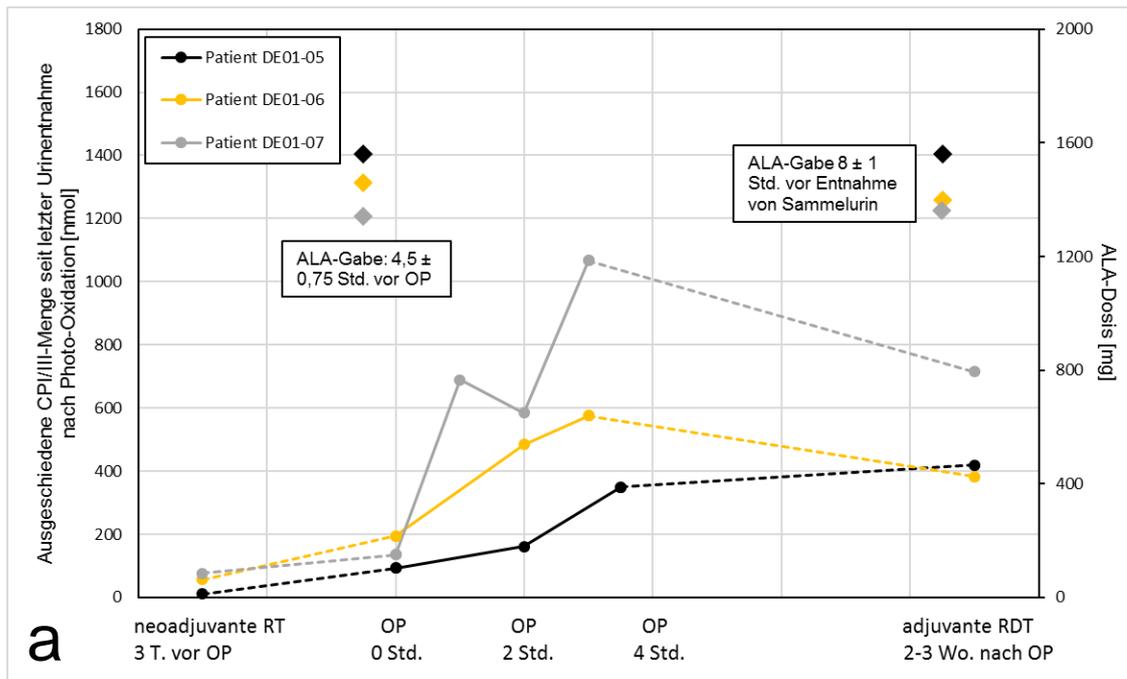
**Abbildung 21:** Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen multipliziert mit dem ausgeschiedenen Urinvolumen der Kohorte 0 im Verlauf. Graph (a) bezieht sich dabei auf die Photo-Oxidation, Graph (b) auf die Jod-Oxidation.

Intraoperativ wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Urin aus dem am Katheter angeschlossenen Urinbeutel entnommen. Weil der Urinbeutel während der OP nicht geleert wurde, stieg das Urinvolumen an. Aus diesem Grund sollte eine kontinuierliche Zunahme der ausgeschiedenen CPI/III-Menge zu beobachten sein. Für die Patienten DE01-02 und DE01-04 ist dies nicht der Fall (**Abbildung 21**). Bei ihnen scheint die ausgeschiedene Menge an CPI/III vier Stunden nach OP-Beginn zu sinken, verglichen zum vorherigen Wert nach zwei Stunden im OP. Patient DE01-04 hat dabei den höchsten Wert nach zwei Stunden im OP mit 1524,8 (Photo-Oxidation) bzw. 1937,6 nmol (Jod-Oxidation). Bei den anderen beiden Patienten liegen Werte zum selben Zeitpunkt unter 1000 nmol.

Bei allen Patienten ist die mittlere ausgeschiedene CPI/III-Menge zu den Zeitpunkten ohne 5-ALA-Gabe geringer als mit 5-ALA-Gabe. Dies zeigt sich am Tag der adjuvanten RT im Vergleich zur neoadjuvanten RDT, dennoch gibt es Unterschiede: während Patient DE01-02 bei der neoadjuvanten RDT Werte über 1000

nmol hat, haben die anderen beiden Patienten Werte unter 500 nmol. Außerdem bleibt die Kinetik der CPI/III-Mittelwerte bei der Multiplikation mit dem Volumen der jeweiligen Urinprobe weiterhin unverändert.

### 3.2.6 Multiplikation der CPI/III-Konzentration mit dem jeweiligen Volumen der Urinprobe in Kohorte 1



**Abbildung 22:** Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen multipliziert mit dem ausgeschiedenen Urinvolumen der Kohorte 1 im Verlauf. Graph (a) bezieht sich dabei auf die Photo-Oxidation, Graph (b) auf die Jod-Oxidation.

Die Mittelwerte der ausgeschiedenen CPI/III-Mengen am Tag der neoadjuvanten RT sind im Vergleich zu den zu anderen Zeitpunkten gemessenen Werten am niedrigsten. Sie liegen alle unter 80 nmol.

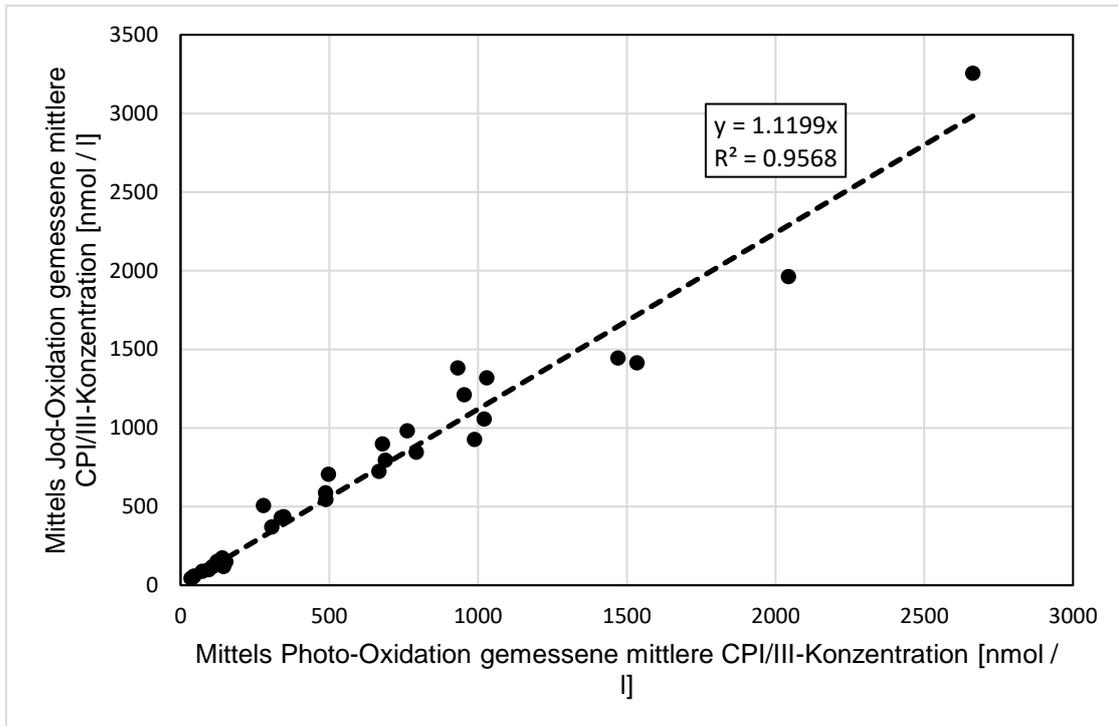
Mit Ausnahme von Patient DE01-07 ist ein kontinuierlicher Anstieg der intraoperativen CPI/III-Menge bei den Patienten zu verzeichnen (**Abbildung 22**). Bei Patient DE01-07 gibt es zwar ein kurzzeitiges intraoperatives Absinken der ausgeschiedenen CPI/III-Menge, jedoch steigt diese im Verlauf weiter auf 1066,94 nmol (Photo-Oxidation) bzw. 1375,78 nmol (Jod-Oxidation) am Ende der OP.

Die Mittelwerte der ausgeschiedenen CPI/III-Mengen am Tag der adjuvanten RDT fallen bei Patient DE01-06 (383,43 bzw. 353,48 nmol) und DE01-07 (715,12 bzw. 686,88 nmol) ab, sind jedoch höher als die Werte am Tag der neoadjuvanten RT. Bei Patient DE01-05 steigen sie zum Ende der OP auf 419,18 bzw. 621,36 nmol) und befinden sich wie bei den anderen Patienten bei der adjuvanten RDT auf höherem Niveau als am Tag der neoadjuvanten RT. Die Kinetik der CPI/III-Mittelwerte bleibt bei der Multiplikation mit dem Volumen der jeweiligen Urinprobe unverändert: es ist festzustellen, dass bei allen Patienten die mittlere ausgeschiedene CPI/III-Menge zu den Zeitpunkten ohne 5-ALA-Gabe geringer ist als zu den Zeitpunkten mit 5-ALA-Gabe.

### 3.2.7 Vergleich der beiden Oxidationsverfahren

In **Abbildung 23** sind die gemessenen Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen durch beide Oxidationsverfahren gegenübergestellt. Die CPI/III-Mittelwerte liegen bei Messung durch beide Oxidationsverfahren in derselben Größenordnung,

jedoch sind sie bei Messung durch Jod-Oxidation im Mittel um ca. 12 % höher als bei Messung durch Photo-Oxidation. Das Bestimmtheitsmaß beträgt aufgerundet 0,96.



**Abbildung 23:** Gegenüberstellung von CPI/III-Mittelwerten beider Oxidationsverfahren.

## 4. Diskussion

### 4.1 Untersuchung der Einflüsse von NEM/LM auf das Urin-Fluoreszenzspektrum

#### 4.1.1 Einflüsse von NEM/LM auf das Urin-Fluoreszenzspektrum

Im Wellenlängenbereich von  $518 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$  weist das Urin-Fluoreszenzspektrum ein Maximum auf, welches jedoch kein natürliches Maximum ist, sondern ein künstliches Maximum [37, 91]: der Langpassfilter (GG495, Schott AG, Mainz, Deutschland) lässt Licht erst ab einer Wellenlänge von 490 nm durch und verursacht dadurch eine ansteigende Flanke bis etwa  $518 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$  [37, 91]. Somit spiegelt die ansteigende Flanke den roten Wellenlängenbereich der Filtercharakteristik wider.

Von den getesteten NEM/LM zeigte lediglich Vitamin B2 einen nennenswerten Effekt auf das Urin-Fluoreszenzspektrum [37, 91]. Dahingegen zeigten die übrigen getesteten NEM/LM keine nennenswerten Effekte auf das Urin-Fluoreszenzspektrum, sondern die Ergebnisse und Intensitätsunterschiede der Spektren nach deren Einnahme liegen innerhalb der inter- und intraindividuellen Schwankungen, die bei den Messungen beobachtet wurden [37, 91].

Vitamin B2 ist Teil der wasserlöslichen Vitamine im Gegensatz zu den Vitaminen A, D, E, K1 und K2 [109-113]. Die Ausscheidung von Vitamin B2 erfolgt daher durch die Nieren [37]. Aus diesem Grund ist die gewonnene Erkenntnis, dass Vitamin B2 einen Effekt auf das Urin-Fluoreszenzspektrum hat, grundsätzlich plausibel [37]. Ein weiterer Grund für die Plausibilität des Einflusses auf das Urin-Fluoreszenzspektrum ist die chemische Struktur von Vitamin B2 [37]: Aufgrund der  $\pi$ -Konjugation der aromatischen Ringe und Resonanz des Isoalloxazins in

seiner chemischen Struktur ist Vitamin B2 in der Lage zu fluoreszieren [37, 114, 115]. Untersuchungen zum Fluoreszenzspektrum von Vitamin B2 kommen zum Schluss, dass Vitamin B2 je nach Anregungswellenlänge im Wellenlängenbereich von ungefähr 500 bis ungefähr 700 nm Fluoreszenz emittiert [116, 117]. Fettlösliche Vitamine hingegen können zwar fluoreszieren [118-120], werden jedoch nicht über die Nieren ausgeschieden [121, 122], was darin resultiert, dass nach deren Einnahme kein Effekt auf das Urin-Fluoreszenzspektrum erkennbar ist [37].

In den AEMs sind neben den Vitamin B2 zuzuschreibenden Maxima noch weitere Maxima bei 300 nm Anregungswellenlänge sowie 400 nm Emissionswellenlänge zu beobachten [37]. Anfangs wurde vermutet, dass diese durch Harnstoff verursacht werden könnten, was durch entsprechende Experimente jedoch nicht bestätigt werden konnte [37]. Die Erhöhung der Harnstoffdosis übte keinerlei Wirkung auf die Intensität der AEMs aus. Somit besteht die Vermutung, dass die Aminosäure Tryptophan und ihre Metaboliten für diese Fluoreszenz im Urin verantwortlich sein könnten [37, 123, 124].

#### **4.1.2 Diskussion der Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Spektrofluorometer**

Ziel des Vergleichs der beiden Geräte war, die spektralen Signaturen der Urin-fluoreszenz und von CPIII mit beiden Geräten nachzuweisen und den ProSp als geeignet für die Messungen zu qualifizieren.

Prinzipiell wären detailliertere quantitative Vergleichsuntersuchungen als die in Kapitel 3.1.4 beschriebenen möglich gewesen, wurden aber nicht durchgeführt [37]. Detailliertere quantitative Vergleichsuntersuchungen würden weitere Daten

voraussetzen, wie beispielsweise die Korrektur des Gitters und Detektoreffizienzen [37]. Ein relevanter Erkenntnisgewinn für den dafür erforderlichen Aufwand war jedoch nicht erkennbar [37]. Die qualitative Vergleichsuntersuchung hat ergeben, dass die Spektren beider Geräte hohe Ähnlichkeiten aufweisen und aufgrund dessen von einer Vergleichbarkeit der Messungen zwischen beiden Geräten ausgegangen werden kann [37]. Daher konnten Untersuchungen zu potenziellen Einflüssen von NEM/LM auf das Urin-Fluoreszenzspektrum mit beiden Geräten erfolgen [37].

#### **4.1.3 Einflüsse von NEM/LM auf die CPIII-Wiederfindungsrate**

Im Falle einer klinischen Anwendung der Bestimmung der CPIII-Konzentration im Urin als Screening-Methode für onkologische Erkrankungen [36] und akute Porphyrrien [45], ist eine verlässliche Ermittlung der CPIII-Konzentration erforderlich [37]. Die CPIII-Wiederfindungsrate wurde als ein Mittel dafür definiert, um mögliche Einflüsse der getesteten NEM/LM auf die Bestimmung der CPIII-Konzentration im Urin zu quantifizieren [37, 91]. Aufgrund der geringen Menge an physiologischem CPIII im Urin erschien deren Vernachlässigung bei der Definition der CPIII-Wiederfindungsrate vertretbar. Die als annehmbar definierte Abweichung der CPIII-Wiederfindungsrate orientierte sich an den Vorgaben der EMA und betrug 15 %, sodass ein Bereich von 0,85 bis 1,15 als akzeptabel anzusehen war [37, 91, 102, 103].

Keine der getesteten NEM/LM zeigte Auswirkungen auf die CPIII-Wiederfindungsrate [37]. Selbst bei Vitamin B<sub>2</sub>, das eine Verstärkung der Urin-Fluoreszenz bewirkt, führt der benutzte Fit-Algorithmus mit zweiter Ableitung dazu [45], der

die unstrukturierte Fluoreszenz nicht beeinflusst, die CPIII-Konzentration richtig zu berechnen [37].

Sowohl in **Tabelle 3** als auch in **Abbildung 16** fällt auf, dass der Verzehr von Spinat zu CPIII-Wiederfindungsraten unterhalb von 0,85 führte [37, 91]. In Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, dass Verzehr von Spinat eine höhere Produktion von Carotenoiden induziert [125]. Beim Menschen können Carotenoide sowohl in der menschlichen Leber als auch im menschlichen Urin akkumulieren [126] und die Zerstörung der Photoaktivität der Porphyrine bewirken [127]. Somit besteht die Vermutung, dass die CPIII-Konzentration im Urin durch den nach Spinatverzehr erhöhten Carotenoid-Gehalt im Urin vermindert werden könnte [37].

Bei den restlichen fünf Ausreißern war keine systematische Abweichung erkennbar, weswegen am ehesten von Mess- und Pipettierfehlern auszugehen ist [37, 91]. Es ist festzustellen, dass bei den fünf Ausreißern (Urin nach Einnahme von Vitamin A, B Komplex, B1, B3 und B9) die Wiederfindungsraten jeweils nach Spiking mit zwei der drei Referenzlösungen nah beieinanderliegen, während sich die übrige Wiederfindungsrate nach Spiking über 1,15 befindet [37]. Diese Tatsache spricht für einen Mess- oder Pipettierfehler und gegen eine systematische Abweichung [37]. Für die Urinproben nach Einnahme von Vitamin A, B1 und B3 zeigt sich zudem die Konstellation, dass diejenige CPIII-Referenzlösung, die einen Ausreißer bei der Wiederfindungsrate darstellt, am Tag ihrer Messung eine niedrigere Konzentration als sonst ergab [37]. Weil bei der Berechnung der CPIII-Wiederfindungsrate die Konzentration der CPIII-Referenzlösung der Divisor ist, kann dies aus mathematischen Gründen zu einer höheren CPIII-Wiederfindungsrate beigetragen haben [37]. Für die Urinprobe nach Einnahme von Vitamin B9

ist anzumerken, dass ein Proband bereits ohne das Spiking höhere CPIII-Konzentrationen im Urin aufwies, was die CPIII-Wiederfindungsrate aus mathematischen Gründen höher ausfallen ließ [37]. Bei Vernachlässigung der CPIII-Konzentrationen dieses Probanden würde die CPIII-Wiederfindungsrate 1,00 betragen [37].

In **Abbildung 16** zeigt sich die Konstellation mit einem Ausreißer und zwei vergleichsweise homogenen Werten auch bei den Vitaminen B Komplex, B3, B9 und B12 [37], was am ehesten auf Mess- oder Pipettierfehler zurückzuführen ist. Bei Proband 2 nach Einnahme von Vitamin A sowie Vitamin B12 und bei Proband 1 nach Einnahme von Vitamin B Komplex zeigen sich hohe Standardabweichungen von 0,24, 0,16 und 0,34  $\mu\text{mol/l}$ . Dies deutet auf heterogene CPIII-Konzentrationen aufgrund von Mess- oder Pipettierfehlern hin, die insbesondere bei Proband 1 nach der Einnahme von Vitamin B Komplex zu einer Wiederfindungsrate außerhalb der akzeptablen Grenzen beigetragen haben könnte.

Dass Mess- und Pipettierfehler bei Messungen im ProSp an den Ergebnissen zu beobachten sind, könnte auch für eine hohe Sensitivität des ProSp sprechen.

#### 4.1.4 Diskussion der Statistik

Der Mittelwert aus den relativen Standardabweichungen aller 297 Triplets betrug 3 % [37]. Der Mittelwert aus den relativen Standardabweichungen für die 57 Triplets vor Einnahme eines NEM/LM war 3 % und nach Einnahme eines NEM/LM 4 % bei 60 Triplets [37]. Für die jeweils 60 Triplets der CPIII-Referenzlösungen betrug die mittlere relative Standardabweichung 3 %, 2 % und 2 % für 1:50, 1:100 und 1:200 Referenzlösung [37]. Dies spricht für eine niedrige Messungengenauigkeit des ProSp.

Bei der Definition der CPIII-Wiederfindungsrate erfolgte die Orientierung an die Vorgaben der EMA, die eine Abweichung von 15 % zur Berücksichtigung von Messfehlern und Pipettierfehlern als akzeptabel und angemessen ansieht [37, 91, 102, 103]. Außerdem wurden dadurch die Standardabweichungen der CPIII-Referenzlösungen berücksichtigt, deren Herstellung für jedes NEM/LM aus der CPIII-Stammlösung erfolgte [37].

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die durchgeführten Messungen eine hohe Reproduzierbarkeit aufwiesen [37].

#### **4.1.5 Limitationen und Ausblick**

In der Studie von Zellweger et al. erfolgte der Hinweis, von einer Einnahme von Multivitaminpräparaten vor Durchführung einer Fluoreszenz-Zystoskopie abzuraten [37, 89]. Durch die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen ist die Aussage von Zellweger et al. einzuschränken [37]: von einer Einnahme von Multivitaminpräparaten vor einer FZ sollte lediglich abgeraten werden, sofern dieses Vitamin B2 enthält [37]. Diese Aussage muss zudem auf Anregungswellenlängen von 300 bis 500 nm sowie Emissionswellenlängen von 400 bis 700 nm beschränkt werden [37]. Die CPIII-Konzentration im Urin bleibt von den getesteten NEM/LM unbeeinflusst und unterliegt keinen Störfaktoren [37]. Im Falle der Verwendung von Urin-Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung der CPIII-Konzentration für die Diagnostik akuter Porphyrrien würde die Einnahme von NEM/LM keinen Störfaktor darstellen [37, 45].

Grund für die Auswahl der verwendeten NEM/LM war die Tatsache, dass sie potenziell in der Lage sind, die Farbe oder den Geruch des Urins zu verändern [37,

79]. Die verwendeten NEM bestanden fast ausschließlich aus Vitaminen und enthielten keine Mineralstoffe. Mineralstoffe lassen sich in Mengen- und Spurenelemente unterteilen [128]. Zu den Spurenelementen zählen unter anderem Zink, Eisen, Kupfer, Jod, Selen, Chrom, Mangan, Molybdän und Bor [128-130]. Zu den Mengenelementen zählen unter anderem Magnesium, Kalzium und Kalium [128]. Eine Ausweitung der durchgeführten Untersuchungen auf Mineralstoffe erscheint empfehlenswert, um Erkenntnisse über potenzielle Einflüsse der verbleibenden Mikronährstoffe auf das Urin-Fluoreszenzspektrum und auf die Bestimmung der CPIII-Konzentration zu gewinnen.

Die bereits gewonnenen Erkenntnisse sind im Hinblick auf die Verwendung der Urin-Fluoreszenzspektroskopie und der Bestimmung der CPIII-Konzentration im Urin als diagnostisches Mittel hilfreich. Mögliche Störfaktoren, die durch die Einnahme von NEM/LM entstehen können, wurden untersucht. Da NEM/LM Einfluss auf therapeutische Entscheidungen haben könnten, indem sie das Urin-Fluoreszenzspektrum und die CPIII-Konzentration im Urin beeinflussen könnten, wurde ein Beitrag zur Anwendung des Urin-Fluoreszenzspektrums und der CPIII-Bestimmung im Urin im klinischen Kontext geleistet.

Weitere Untersuchungen könnten zur Klärung der Zeitabhängigkeit des Einflusses von Vitamin B2 beitragen, also wie lange nach Einnahme von Vitamin B2 die Wirkung auf die Intensität des Urin-Fluoreszenzspektrums anhält und wann diese abklingt. In der Studie von Zellweger et al. wird von einem Anstieg der Fluoreszenz-Intensität über ca. 8-10 Stunden gesprochen, woraufhin in den folgenden 12 Stunden ein Absinken der Fluoreszenz-Intensität zu beobachten ist, die spätestens 24 Stunden nach Einnahme des Präparats wieder zum Ausgangszustand

wie vor dessen Einnahme zurückkehrt [89]. Da in dieser Studie jedoch keine einzelnen Vitamine getestet wurden, sollten genauere Untersuchungen zu Vitamin B2 durchgeführt werden.

Des Weiteren ist empfehlenswert, die Untersuchungen an einer wesentlich größeren Anzahl von Probanden durchzuführen, um die Reproduzierbarkeit der hier beschriebenen Ergebnisse zu bestätigen.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse der ALA-RDT-Studie**

### **4.2.1 Absolute CPI/III-Konzentrationen in Kohorte 0**

Bei Messungen mittels Jod-Oxidation ist ein Anstieg der CPI/III-Konzentrationen im Urin ca. 6,5 Stunden nach ALA-Gabe, also ca. zwei Stunden nach OP-Beginn bei allen drei Patienten der Kohorte 0 zu verzeichnen. Allerdings unterscheidet sich die Stärke des Anstiegs der mittleren CPI/III-Konzentration im Urin bei den verschiedenen Patienten. Der stärkste Anstieg der mittleren CPI/III-Konzentration im Urin ist bei Patient DE01-02 zu beobachten. Trotz hoher Standardabweichung ist diese CPI/III-Konzentration mit Abstand die höchste der Kohorte. Bei den restlichen beiden Patienten sind die Anstiege der mittleren CPI/III-Konzentrationen im Urin geringer ausgefallen.

Bei Messung mittels Photo-Oxidation sinkt bei Patient DE01-04 die mittlere CPI/III-Konzentration in den ersten beiden intraoperativen Stunden. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung könnte es sich um eine Stagnation handeln. Des Weiteren ist bei Patient DE01-02 ein starker Anstieg der mittleren CPI/III-Konzentration im Urin innerhalb der ersten beiden intraoperativen Stunden zu verzeichnen.

Die Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen an Tagen mit Verabreichung von 5-ALA sind gegenüber den Tagen ohne Verabreichung von 5-ALA deutlich erhöht. Dies zeigt sich bei der neoadjuvanten RDT und am Tag der operativen Resektion. Außerdem erscheinen die nach OP gemessenen mittleren CPI/III-Konzentrationen geringer als vor der OP.

#### **4.2.2 Absolute CPI/III-Konzentrationen in Kohorte 1**

Es fällt auf, dass bei Patient DE01-05 am Tag der OP relativ niedrige mittlere CPI/III-Konzentrationen im Urin gemessen wurden. Folglich stellte sich die Frage, ob dieser Patient überhaupt 5-ALA bekommen hat und wenn ja, ob dies anhand adäquater Tumorfluoreszenz während der operativen Resektion sichtbar war. Die Rücksprache mit den Kollegen aus Münster ergab, dass 5-ALA verabreicht wurde und eine kräftige Tumorfluoreszenz während der OP dargestellt werden konnte.

Im Gegensatz dazu stellen die mittleren CPI/III-Konzentrationen im Urin bei Patient DE01-07 die höchsten der Kohorte dar. Die Rücksprache der Ergebnisse mit den Kollegen aus Münster ergab, dass dieser Patient zusätzlich zum Glioblastom spinale Manifestationen hatte. Dieser Umstand könnte zu den höheren mittleren CPI/III-Konzentrationen beigetragen haben.

In der gesamten Kohorte sind am Tag der adjuvanten RDT deutlich höhere mittlere CPI/III-Konzentrationen im Urin gemessen worden als während und vor der OP. Da die mittleren CPI/III-Konzentrationen während der OP sowie bei der adjuvanten RDT höher waren als bei der Bestrahlung vor der OP, lässt sich auch hier konstatieren, dass die gemessenen mittleren CPI/III-Konzentrationen im Urin

an Tagen mit Verabreichung von 5-ALA höher sind als an Tagen ohne Verabreichung.

#### 4.2.3 Division der CPI/III-Konzentrationen durch den Kreatinin-Wert der jeweiligen Urinprobe

Der Hintergedanke bei der Normierung der mittleren CPI/III-Konzentrationen auf den jeweiligen Kreatinin-Wert war die Korrektur der unterschiedlichen Konzentrationen der Urinproben aufgrund Schwankungen der ausgeschiedenen Flüssigkeitsmenge.

Die Normierung wirkte sich auf die mittlere CPI/III-Konzentration bei Patient DE01-02 zwei Stunden nach OP-Beginn aus. Während die absolute CPI/III-Konzentration 2663,2 nmol/l (Photo-Oxidation) bzw. 3255,3 nmol/l (Jod-Oxidation) betrug und damit die höchsten gemessenen mittleren CPI/III-Konzentrationen darstellten, normiert sich derselbe Wert bei der Division der mittleren CPI/III-Konzentration durch den Kreatinin-Wert und fällt in Relation nicht mehr so hoch aus (**Abbildung 19**). Patient DE01-04 zeigt vier Stunden nach OP-Beginn die höchste Kreatinin-korrigierte CPI/III-Konzentration der gesamten Kohorte. Da der Kreatininwert allerdings lediglich 13,1 mg/dl beträgt und Kreatinin der Divisor ist, fällt der ermittelte Wert mit 234,05 nmol/mg (Photo-Oxidation) bzw. 282,67 nmol/mg (Jod-Oxidation) höher aus (**Abbildung 19**). Die Vermutung, dass eventuell eine fehlerhafte Ermittlung der Kreatinin-Konzentration vorliegt, konnte nicht bestätigt werden.

Die generelle Aussage, dass die mittleren Kreatinin-korrigierten CPI/III-Konzentrationen bei Verabreichung von 5-ALA höher sind als ohne jene, zeigt sich hier weiterhin. In Kohorte 0 sind weiterhin niedrigere mittlere Kreatinin-korrigierte

CPI/III-Konzentrationen nach OP verglichen zu vor der OP erkennbar. Die grundlegende Kinetik der CPI/III-Konzentrationen bleibt folglich unverändert.

#### **4.2.4 Multiplikation der CPI/III-Konzentration mit dem Urinvolumen**

Durch die Multiplikation der mittleren CPI/III-Konzentrationen mit dem Urinvolumen soll die ausgeschiedenen CPI/III-Menge bestimmt werden. Der Urinbeutel wurde während des Tages nicht entleert, was einen Anstieg des Urinvolumens im Beutel zur Folge hat. Das ausgeschiedene Urinvolumen sollte an diesem Tag daher immer weiter ansteigen. Bei den Patienten DE01-02 und DE01-04 nach vier intraoperativen Stunden ist dies nicht der Fall. Für Patient DE01-07 gilt selbiges nach zwei intraoperativen Stunden. Potenzielle Ursachen dafür sind beispielsweise ein falsch abgelesenes Urinvolumen, Fehler bei der Messung der CPI/III-Konzentration oder ein anderes Vorgehen bei der Urinabnahme, das vom beschriebenen Vorgehen abweicht.

Die Feststellung, dass die mittleren mit dem Urinvolumen multiplizierten CPI/III-Konzentrationen mit 5-ALA höher sind als ohne 5-ALA, bestätigt sich erneut. In Kohorte 0 sind wieder niedrigere mittlere Kreatinin-korrigierte CPI/III-Konzentrationen nach OP im Vergleich zu vor der OP zu beobachten. Auch hier ist erkennbar, dass die grundlegende Kinetik der CPI/III-Konzentrationen unverändert ist.

#### **4.2.5 Schlussfolgerung aus der ALA-RDT-Studie**

Der beschriebene Effekt in den erwähnten Studien (s. Kapitel 1.3), bei denen die Porphyrin-Konzentrationen im Urin nach Resektion der Tumoren signifikant abnahmen [36, 38], konnte in der ALA-RDT-Studie anhand der wenigen Proben bisher nicht bestätigt werden.

Bei Vergleich der mittleren CPI/III-Konzentrationen an Tagen mit Verabreichung von 5-ALA zu jenen ohne 5-ALA-Gabe lassen sich in der Tendenz erhöhte mittlere CPI/III-Konzentrationen bei Verabreichung von 5-ALA beobachten. An OP-Tagen wurde dafür der Vergleichbarkeit wegen die letzte intraoperativ gemessene CPI/III-Konzentration herangezogen, da diese wie bei den RDTs und RTs einen Zeitraum von ca. acht Stunden nach 5-ALA-Gabe umfasst.

#### **4.2.6 Diskussion der verabreichten ALA-Dosis und deren potenzielle Verstoffwechslung im menschlichen Organismus**

Die in Kapitel 1.3 erwähnten Studien [36, 38], die signifikant erhöhte Porphyrin-Konzentrationen im Urin bei Tumorpatienten nach Einnahme von 5-ALA nachweisen konnten, beziehen sich auf Tumorarten wie beispielsweise kolorektale Karzinome und Blasenkarzinome, jedoch nicht auf rezidivierende Glioblastome wie in der ALA-RDT-Studie. Somit könnte die Tumorart eine Rolle bei der Verstoffwechslung von 5-ALA spielen.

Außerdem sind die in der ALA-RDT-Studie verabreichten 5-ALA-Dosen höher als bei den anderen Studien: Kamada et al. [36] verwendete Dosen von 100 bis 300 mg 5-ALA pro Patient, Inoue et al. 1000 mg 5-ALA pro Patient [38], während bei der ALA-RDT-Studie Dosen von 1340 bis 1860 mg 5-ALA pro Patient verabreicht wurden. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, kann jede Zelle des Körpers die Häm-Synthese betreiben [26, 27]. Es wird hypothetisch angenommen, dass es drei Dosierungsbereiche von 5-ALA geben könnte. Erstens: Bei niedriger Dosis würde das ALA hauptsächlich von den Hepatozyten und im Knochenmark verstoffwechselt. Die Verstoffwechslung sollte weitestgehend vollständig zu Häm erfolgen und es sollten nur in minimalen Mengen Intermediate wie z. B. CPI/III entstehen. Zweitens: Wenn die verabreichte Dosis höher ist, würde 5-ALA zusätzlich

von vorhandenen Tumoren verstoffwechselt und es ließen sich signifikant höhere Porphyrin-Konzentrationen im Blut und Urin ermitteln, wie die in Kapitel 1.3 erwähnten Studien zeigten. Dies könnte daran liegen, dass Intermediate der Häm-Synthese in höherer Konzentration akkumulieren als im Gesunden, was die Umwandlung von CPgen I und III in CPI/III mit zunehmender verstrichener Zeit begünstigt. Drittens: Bei weiterer Steigerung der ALA-Dosis würde diese nicht nur von der Leber, dem Knochenmark und dem Tumor verstoffwechselt, sondern zusätzlich von allen restlichen Körperzellen. Der Kontrast zwischen der CPI/III-Synthese zwischen Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen fiel damit deutlich kleiner aus als in den vorherigen beiden beschriebenen Szenarien. Zudem würde der Tumor sozusagen mit den restlichen Körperzellen um die Verstoffwechslung von 5-ALA konkurrieren und im Urin würden die CPI/III-Konzentrationen ein nicht eindeutiges Bild zwischen den Zeitpunkten vor und nach operativer Resektion abgeben. Für die ALA-RDT-Studie wird letzteres Szenario angenommen: die verabreichte 5-ALA-Dosis wäre so hoch, dass diese von allen Körperzellen verstärkt aufgenommen würde.

Da zwischen 5-ALA-Einnahme und Ende der Urinsammlung ungefähr acht Stunden vergangen sind, besteht die Vermutung, dass eventuell nach einem längeren Zeitraum eine konstante Menge an CPI/III durch den Urin ausgeschieden werden könnte. Es könnte beim Verstoffwechseln von CPI/III und dessen Transport über die Niere in den Urin noch ungeklärte Mechanismen geben, die zu einer verringerten Ausscheidung zugunsten des längeren Verbleibs im Körper beitragen. Ein weiterer möglicher Grund könnte eine maximale Filtrations- und Ausscheidungsrate der Niere bezüglich CPI/III sein.

Des Weiteren wird angenommen, dass CPI/III bei Verbleib im Körper von dessen Zellen abgebaut und in andere Metaboliten umgewandelt wird, beispielsweise PpIX, das zum Beispiel im Blutserum bei Patienten mit hochgradigen Gliomen akkumuliert [24]. Grund dafür könnte eine Art Rückstau von Metaboliten der Häm-Synthese sein, die bei Dosierungen von ALA wie in der ALA-RDT-Studie verabreicht wurden, während hingegen dieser Mechanismus bei niedrigeren Dosierungen von ALA wie in den in Kapitel 1.3 erwähnten Studien möglicherweise noch nicht auftritt. Eine weitere Vermutung ist, dass akkumuliertes CPI/III möglicherweise im Rahmen des Häm-Abbaus über den Stuhl ausgeschieden werden könnte. Da bei Patienten mit Porphyrien die Ausscheidung von verschiedenen Coproporphyrinen im Stuhl nachgewiesen werden konnte [131, 132], könnte dies möglicherweise auf Ansammlungen von Coproporphyrinen im Stuhl durch Einnahme von 5-ALA bei Tumoren übertragen werden.

#### **4.2.7 Diskussion der Statistik**

Für alle gemessenen Triplets wurden die relativen Standardabweichungen berechnet. Bei der Photo-Oxidation war die niedrigste relative Standardabweichung bei 0,7 %, die höchste lag bei 15,9 %. Der Mittelwert aller relativen Standardabweichungen für die Photo-Oxidation beträgt 5,3 %. Bei der Jod-Oxidation war die niedrigste relative Standardabweichung bei 1,0 %, die höchste bei 12,9 %. Der Mittelwert aller relativen Standardabweichungen beträgt 5,6 %.

Bei Betrachtung der relativen Standardabweichungen kann von einer hohen Reproduzierbarkeit der Triplet-Messungen sowie einer niedrigen Messungenauigkeit des ProSp ausgegangen werden.

Bei Messungen mit Jod-Oxidation waren die CPI/III-Mittelwerte im Mittel um ca. 12 % höher im Vergleich zu Messungen mit Photo-Oxidation. Das Bestimmtheitsmaß weist mit 0,96 eine hohe Korrelation zwischen den durch beide Oxidationsverfahren gemessenen CPI/III-Mittelwerten hin. Bei Messungen mittels Jod-Oxidation sind höhere Standardabweichungen einzelner Triplet-Messungen zu beobachten. Die Jod-Oxidation ist zudem eine aufwendigere und zeitintensivere Messprozedur als die Photo-Oxidation, sodass letztere vorzuziehen ist.

#### **4.2.8 Limitationen und Ausblick**

Die Ergebnisse aus der ALA-RDT-Studie sollten mit einer deutlich höheren Probandenzahl eingehender untersucht werden.

Außerdem sollte in Erwägung gezogen werden, ob ein längerer Zeitraum als acht Stunden zwischen ALA-Einnahme und Sammeln des Urins sinnvoll ist, um genauere Dynamiken der CPI/III-Konzentration im Urin zu erhalten.

Versuche mit verschiedenen Dosierungen von 5-ALA, insbesondere im Bereich zwischen 300 mg und 1500 mg mit Abstufungen erscheinen ebenfalls empfehlenswert, um herauszufinden, ob und ab welcher Dosierung eine Übersättigung 5-ALA im menschlichen Organismus vorliegt, die zu einer Verstoffwechslung von 5-ALA in allen Körperzellen führen könnte. Diese Übersättigung von 5-ALA im Organismus gilt es durch eine Verringerung der verabreichten Dosis von 5-ALA zu vermeiden, da sie zu einer Verringerung des Kontrasts der CPI/III-Synthese zwischen Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen bewirken könnte und damit nicht eindeutige diagnostische Ergebnisse zur Folge hätte.

Zudem ist es ratsam, gleichzeitig die CPI/III-Konzentration im Blut bestimmen zu lassen, um auch dort mögliche Veränderungen im Vergleich zu gesunden Probanden analysieren zu können.

Ob sich die CPI/III-Konzentration als verlässlicher Screening- und Monitoring-Biomarker bei Glioblastomen eignet, kann aufgrund der vorliegenden Datenlage noch nicht genau gesagt werden und sollte daher mit den erwähnten Vorschlägen weiterhin Gegenstand ausführlicher Forschung bleiben.

## 5. Fazit

Die getesteten Nahrungsergänzungsmittel und Lebensmittel stellen keinen Störfaktor im untersuchten Wellenlängenbereich bei der Bestimmung der CPIII-Konzentration im Urin dar. Die Fluoreszenzspektroskopie des Urins zur Diagnostik akuter Porphyrinen kann daher ohne Einschränkung der untersuchten Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel erfolgen und sollte weiterentwickelt werden. Vitamin B2 bewirkt eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität des Fluoreszenz-Untergrundes des Urins im untersuchten Wellenlängenbereich und sollte daher vor einer Fluoreszenz-Zystoskopie und anderen fluoreszenzgestützten Untersuchungsmethoden des Urins nicht eingenommen werden. Die Untersuchung potenzieller Einflüsse von Mineralstoffen wie beispielsweise Magnesium, Kalzium, Eisen und Zink auf das Urin-Fluoreszenzspektrum und auf die Bestimmung der CPIII-Konzentration ist empfehlenswert.

Die Verabreichung von 5-ALA bei Patienten mit rezidivierendem Glioblastom kann zu höheren CPI/III-Konzentrationen im Urin führen, verglichen zu fehlender Einnahme von 5-ALA. Eine deutliche Verringerung der CPI/III-Konzentration nach operativer Resektion des Glioblastoms und damit eine potenzielle Eignung der CPI/III-Konzentration im Urin als Screening- und Monitoring-Biomarker konnte in Rahmen dieser Dissertation bisher nicht bestätigt werden und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

## Danksagung

*Keine Pflicht ist notwendiger als die, Dank zu sagen.* – Marcus Tullius Cicero,

*De Officiis (I,47)*

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen meinen Dank aussprechen, die an diesem Projekt und an dieser Dissertation mitgewirkt haben.

Dazu gehört an erster Stelle Prof. Dr. Ronald Sroka mit den weiteren Mitgliedern der Betreuungskommission, Prof. Dr. Florian Kühn und Prof. Dr. Alexander Buchner. Auch meinem Mitbetreuer Dr. Christian Homann gilt mein besonderer Dank, da er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Mein weiterer Dank gilt Dr. Maximilian Eisel, Dr. Maximilian Aumiller, Dr. Herbert Stepp und Dr. Adrian Rühm. Ohne die ausgezeichnete Betreuung durch sie wären dieses Projekt und diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Bei meinen Kolleginnen und Kollegen sowie Doktorandinnen und Doktoranden Marco Foglar, Ester Pachyn und Muriel Kabus möchte ich mich ebenfalls für den wertschätzenden, wohlwollenden, unterstützenden und freundschaftlichen Umgang im LIFE-Zentrum bedanken.

Zuletzt möchte ich meinen Dank meinem Familien- und Freundeskreis für die emotionale Unterstützung aussprechen, insbesondere meinem Onkel Dr. Joseph J. Palackal in New York City, meiner Mutter, meiner Partnerin sowie meinem engsten Freund und Kollegen Joshua Luft.

## Eidesstattliche Versicherung



### Eidesstattliche Versicherung

Chalissery, Praveen George Johnson

Name, Vornamen

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Untersuchungen zur CPI/III-Konzentration im Urin mittels Fluoreszenz-Spektroskopie zur Tumordiagnostik und zur Identifikation potenzieller Störfaktoren**

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

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

München, 31.07.2025

Ort, Datum

Praveen George Johnson Chalissery

Unterschrift Doktorand

## Übereinstimmungserklärung



**Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung**

Chalissery, Praveen George Johnson

Name, Vornamen

Fraunhoferstraße 20

Adresse des Instituts

82152 Planegg

Postleitzahl und Ort des Instituts

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel

**Untersuchungen zur CPI/III-Konzentration im Urin mittels Fluoreszenz-Spektroskopie zur Tumordiagnostik und zur Identifikation potenzieller Störfaktoren**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 31.07.2025

Ort, Datum

Praveen George Johnson Chalissery

Unterschrift Doktorand

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Chemische Struktur von Häm, adaptiert nach [30]. ..... 17
- Abbildung 2:** Vereinfachte Darstellung der Häm-Synthese, adaptiert nach [18, 31]. Die Zahlen 1-8 kennzeichnen Stoffwechselschritte und Lokalisationen, die zu einer selektiven Akkumulation von PpIX im Tumorgewebe führen könnten. 1 steht für eine durchlässige Blut-Hirn-Schranke bei Erkrankung durch Gliome. 2 bezieht sich auf die erhöhte Aufnahme von 5-ALA in Gliom-Zellen; 3 und 4 auf erhöhte Enzymaktivitäten. 5 bezieht sich auf verminderte Enzymaktivität und 6 auf die verminderte Verfügbarkeit von Eisen. 7 und 8 zeigt die Transportsysteme der Zelle auf. .... 18
- Abbildung 3:** Häm-Abbau, adaptiert nach [33]. ..... 20
- Abbildung 4:** Aufbau der Niere, adaptiert nach [60]. Das unfiltrierte Blut gelangt über die A. renalis in die Niere und wird vom Nephron filtriert. Der im Glomerulus filtrierte Primärharn gelangt in das nachgeschaltete Tubulus- und Sammelrohrsystem zur weiteren Resorption, Sekretion und Konzentration des Harns. Arteriell Blut ist in dieser Abbildung rot und venöses Blut ist blau dargestellt. .... 25
- Abbildung 5:** Nephro-urogenitales System mit Nieren und ableitenden Harnwegen beim biologischen Mann, adaptiert nach [63]. ..... 26
- Abbildung 6:** Beispiel für einen Urinteststreifen mit Legende, adaptiert nach [71]. Der Teststreifen wird in der Regel in die frisch gewonnene Probe aus Mittelstrahlurin gehalten. Bei pathologischen Zuständen führen chemische Reaktionen zu einer Veränderung der Farbe, deren Auswertung mithilfe der Legende erfolgen kann. .... 28
- Abbildung 7:** Jablonski-Diagramm, adaptiert nach [87]. Sowohl der Grundzustand ( $S_0$ ) als auch der angeregte Zustand ( $S_1$ ) besteht aus Unterzuständen. Zur Anregung des Elektrons ist Energie nötig. Die Fluoreszenz setzt ein, sobald ein Photon emittiert werden kann. .... 30
- Abbildung 8:** Darstellung der Messprozedur für jeden Probanden, adaptiert nach [37]. Die roten Linien stehen für die Messprozedur mit 500  $\mu$ l Wasser, 100  $\mu$ l Urin und 10  $\mu$ l Salzsäure, die grünen Linien stehen für die Messprozedur mit 400  $\mu$ l Wasser, 100  $\mu$ l Urin, 10  $\mu$ l Salzsäure und 100  $\mu$ l CPIII-Referenzlösung [37]. E: Exemplar.  
© 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center. .... 39
- Abbildung 9:** Urin-Fluoreszenzspektren einzelner Probanden vor und nach Einnahme von NEM/LM, adaptiert nach [37]. Es sind das fettlösliche Vitamin A (a), das LM Spargel (b), sowie zwei wasserlösliche Vitamine (C (c) und B2 (d)) abgebildet [37].  
© 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center. .... 52
- Abbildung 10:** Urin-Fluoreszenzspektren eines einzelnen Probanden nach der Einnahme von Vitamin B2 ohne und mit Spiking mit den CPIII-Referenzlösungen, adaptiert nach [37]. Die Spektren von 490 bis 575

- nm sind sowohl mit als auch ohne Spiking nahezu identisch [37]. In den Wellenlängen 595, 620 und 650 nm sind proportional zur CPIII-Konzentration induzierte Maxima sichtbar [37].  
© 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center. .... 53
- Abbildung 11:** Weitere Urin-Fluoreszenzspektren einzelner Probanden vor und nach Einnahme der Vitamine B12, E, D, B1, K1, B6, B5, Alpha-Liponsäure, Spinat sowie Roter Beete..... 59
- Abbildung 12:** AEMs vor (a) und nach (b) Einnahme von Vitamin B2, adaptiert nach [37]. Nach Einnahme von Vitamin B2 zeigen sich zwei Maxima [37].  
© 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center. .... 60
- Abbildung 13:** AEMs vor (a) und nach (b) Einnahme von Vitamin K1. .... 60
- Abbildung 14:** AEMs vor (a) und nach (b) Einnahme von Spargel. .... 61
- Abbildung 15:** Grafik mit Spektren, die mit beiden Spektrofluorometern vor (a) und nach Einnahme (b) von Vitamin B2 generiert wurden, adaptiert nach [37].  
© 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center. .... 63
- Abbildung 16:** CPIII-Wiederfindungsraten der 1:50 CPIII-Referenzlösung mit Standardabweichungen [ $\mu\text{mol/l}$ ] für jedes NEM/LM und jeden Probanden, adaptiert nach [37].  
© 2024 The Authors. *Lasers in Surgery and Medicine* published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center. .... 66
- Abbildung 17:** Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen mit Standardabweichungen der Kohorte 0 im Verlauf. Gestrichelte Linien zeigen an, dass die Konzentrationen von mehreren Tagen bis Wochen gezeigt werden. Die linke Skala bezieht sich auf die gemessene CPI/III-Konzentration im Urin (Punkte), die rechte Skala bezieht sich auf die Rauten, die die verabreichte 5-ALA-Dosis darstellen. .... 68
- Abbildung 18:** Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen mit Standardabweichungen der Kohorte 1 im Verlauf. Gestrichelte Linien zeigen an, dass die Konzentrationen von mehreren Tagen bis Wochen gezeigt werden. Graph (a) zeigt die Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen nach Photo-Oxidation, Graph (b) nach Jod-Oxidation. Die linke Skala bezieht sich auf die gemessene CPI/III-Konzentration im Urin, die rechte Skala bezieht sich auf die Rauten, die die verabreichte 5-ALA-Dosis darstellen..... 71
- Abbildung 19:** Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen der Kohorte 0 dividiert durch die jeweilige Kreatinin-Konzentration der Urinprobe. Graph (a) zeigt die Werte nach Photo-Oxidation, Graph (b) nach Jod-Oxidation. .... 73

- Abbildung 20:** Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen der Kohorte 1 dividiert durch die jeweilige Kreatinin-Konzentration der Urinprobe. Graph (a) zeigt die Werte nach Photo-Oxidation, Graph (b) nach Jod-Oxidation. .... 76
- Abbildung 21:** Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen multipliziert mit dem ausgeschiedenen Urinvolumen der Kohorte 0 im Verlauf. Graph (a) bezieht sich dabei auf die Photo-Oxidation, Graph (b) auf die Jod-Oxidation. .... 78
- Abbildung 22:** Mittelwerte der CPI/III-Konzentrationen multipliziert mit dem ausgeschiedenen Urinvolumen der Kohorte 1 im Verlauf. Graph (a) bezieht sich dabei auf die Photo-Oxidation, Graph (b) auf die Jod-Oxidation. .... 80
- Abbildung 23:** Gegenüberstellung von CPI/III-Mittelwerten beider Oxidationsverfahren. .... 81

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Detaillierte Auflistung aller in der Studie verwendeten Nahrungsergänzungsmittel und Lebensmittel, adaptiert nach [37]. © 2024 The Authors. <i>Lasers in Surgery and Medicine</i> published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center. ....	35
<b>Tabelle 2:</b> Probanden und eingenommene NEM/LM.....	53
<b>Tabelle 3:</b> Berechnete Wiederfindungsraten für CP111 im Urin nach Einnahme von NEM/LM, adaptiert nach [37]. Werte über oder unter der definierten akzeptablen Abweichung (0,85 bis 1,15) sind unterstrichen [37]. © 2024 The Authors. <i>Lasers in Surgery and Medicine</i> published by Wiley Periodicals LLC. Permission conveyed through Copyright Clearance Center. ....	64

## Literaturverzeichnis

- [1] S. Kwiatkowski *et al.*, "Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 106, pp. 1098-1107, 2018/10/01/ 2018.
- [2] D. Luo, K. A. Carter, D. Miranda, and J. F. Lovell, "Chemophototherapy: An Emerging Treatment Option for Solid Tumors," *Advanced Science*, vol. 4, no. 1, p. 1600106, 2017/01/01 2017.
- [3] R. R. Allison and K. Moghissi, "Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms," *Clin Endosc*, vol. 46, no. 1, pp. 24-29, 1 2013.
- [4] T. J. Dougherty *et al.*, "Photodynamic Therapy," *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 90, no. 12, pp. 889-905, 1998.
- [5] C. A. Robertson, D. H. Evans, and H. Abrahamse, "Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 96, no. 1, pp. 1-8, 2009/07/17/ 2009.
- [6] S. Fitzmaurice and D. B. Eisen, "Daylight Photodynamic Therapy: What Is Known and What Is Yet to Be Determined," *Dermatologic Surgery*, vol. 42, no. 3, 2016.
- [7] C. A. Morton and L. R. Braathen, "Daylight Photodynamic Therapy for Actinic Keratoses," (in eng), *Am J Clin Dermatol*, vol. 19, no. 5, pp. 647-656, Oct 2018.
- [8] L. Gossner *et al.*, "Photodynamic ablation of high-grade dysplasia and early cancer in Barrett's esophagus by means of 5-aminolevulinic acid," (in eng), *Gastroenterology*, vol. 114, no. 3, pp. 448-55, Mar 1998.
- [9] T. Yano and K. K. Wang, "Photodynamic Therapy for Gastrointestinal Cancer," (in eng), *Photochem Photobiol*, vol. 96, no. 3, pp. 517-523, May 2020.
- [10] B. J. Qumseya, W. David, and H. C. Wolfsen, "Photodynamic Therapy for Barrett's Esophagus and Esophageal Carcinoma," (in eng), *Clin Endosc*, vol. 46, no. 1, pp. 30-7, Jan 2013.
- [11] C. B. Simone, 2nd *et al.*, "Photodynamic therapy for the treatment of non-small cell lung cancer," (in eng), *J Thorac Dis*, vol. 4, no. 1, pp. 63-75, Feb 2012.
- [12] C. B. Simone, 2nd and K. A. Cengel, "Photodynamic therapy for lung cancer and malignant pleural mesothelioma," (in eng), *Semin Oncol*, vol. 41, no. 6, pp. 820-30, Dec 2014.
- [13] P. J. Lou, L. Jones, and C. Hopper, "Clinical outcomes of photodynamic therapy for head-and-neck cancer," (in eng), *Technol Cancer Res Treat*, vol. 2, no. 4, pp. 311-7, Aug 2003.
- [14] M. Osuchowski, D. Bartusik-Aebisher, F. Osuchowski, and D. Aebisher, "Photodynamic therapy for prostate cancer - A narrative review," (in eng), *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 33, p. 102158, Mar 2021.
- [15] Q. Xue, J. Zhang, J. Jiao, W. Qin, and X. Yang, "Photodynamic therapy for prostate cancer: Recent advances, challenges and opportunities," (in eng), *Front Oncol*, vol. 12, p. 980239, 2022.
- [16] S. Kaneko, S. Fujimoto, H. Yamaguchi, T. Yamauchi, T. Yoshimoto, and K. Tokuda, "Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas," (in eng), *Prog Neurol Surg*, vol. 32, pp. 1-13, 2018.
- [17] K. Herwig, B. W. Hochleitner, O. Alois, and M. Seiwald, "Clinical and experimental results of photodynamic therapy in neurosurgery," in *Proc.SPIE*, 1995, vol. 2371, pp. 126-128.
- [18] H. Stepp and W. Stummer, "5-ALA in the management of malignant glioma," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 50, no. 5, pp. 399-419, 2018/07/01 2018.
- [19] M. Kriegmair and R. Baumgartner, "Photodynamische Diagnose (PDD) und Therapie (PDT) des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms," in *Laser in der Urologie: Eine*

- Operationslehre*, A. G. Hofstetter, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1995, pp. 117-127.
- [20] B. Reinhold *et al.*, "Photodynamic diagnosis of early stage malignancies: preliminary results in urology and pneumonology," in *Proc.SPIE*, 1992, vol. 1641, pp. 107-112.
- [21] P. Y. Wen *et al.*, "Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions," *Neuro-Oncology*, vol. 22, no. 8, pp. 1073-1113, 2020.
- [22] N. Sanai and M. S. Berger, "GLIOMA EXTENT OF RESECTION AND ITS IMPACT ON PATIENT OUTCOME," *Neurosurgery*, vol. 62, no. 4, 2008.
- [23] W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O. D. Wiestler, F. Zanella, and H.-J. Reulen, "Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial," *The Lancet Oncology*, vol. 7, no. 5, pp. 392-401, 2006.
- [24] A. Walke, C. Krone, W. Stummer, S. König, and E. Suero Molina, "Protoporphyrin IX in serum of high-grade glioma patients: A novel target for disease monitoring via liquid biopsy," *Scientific Reports*, vol. 14, no. 1, p. 4297, 2024/02/21 2024.
- [25] M. Wachowska *et al.*, *Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer*. *Molecules*. 2011 May 19;16(5):4140-64. doi: 10.3390/molecules16054140. eCollection 2011 May.
- [26] M. Müller, H. E. Blum, and P. E. Petrides, "Porphyrine – Synthese und Abbau," in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, P. C. Heinrich, M. Müller, and L. Graeve, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, pp. 379-391.
- [27] M. Müller, H. E. Blum, and P. E. Petrides, "PorphyrinePorphyrine – Synthese und Abbau," in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, P. C. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, and H.-G. Koch, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2022, pp. 495-510.
- [28] M. Sachar, K. E. Anderson, and X. Ma, "Protoporphyrin IX: the Good, the Bad, and the Ugly," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 356, no. 2, p. 267, 2016.
- [29] M. Balwani and R. J. Desnick, "The porphyrias: advances in diagnosis and treatment," *Blood*, vol. 120, no. 23, pp. 4496-4504, 2012.
- [30] Yikrazuul, "Heme b," ed. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Heme\\_b.svg#file](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Heme_b.svg#file), file: Heme b.svg: Wikimedia Commons, Public Domain [cited 2024 November 13], 2010.
- [31] W. S. Herbert Stepp, "Simplified schematic of the biosynthesis of heme," ed. Stepp, H. and Stummer, W. (2018), 5-ALA in the management of malignant glioma. *Lasers Surg. Med.*, 50: 399-419. <https://doi.org/10.1002/lsm.22933>, Figure 1: Wiley Online Library, Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) [cited 2024 November 18], 2018.
- [32] J. Baas, N. Senninger, and H. Elser, "[The reticuloendothelial system. An overview of function, pathology and recent methods of measurement]," (in ger), *Z Gastroenterol*, vol. 32, no. 2, pp. 117-23, Feb 1994. Das retikuloendotheliale System. Eine Übersicht über Funktion, Pathologie und neuere Messmethoden.
- [33] Johndheathcote, "Heme Breakdown," ed. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Heme\\_Breakdown.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Heme_Breakdown.png), file: Heme Breakdown.png: Wikimedia Commons, Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>) [cited 2024 November 20], modified and translated, 2012.
- [34] Q. T. Ostrom *et al.*, "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015–2019," *Neuro-Oncology*, vol. 24, no. Supplement\_5, pp. v1-v95, 2022.
- [35] U. Ota *et al.*, "Plasma protoporphyrin IX following administration of 5-aminolevulinic acid as a potential tumor marker," *Mol Clin Oncol*, vol. 3, no. 4, pp. 797-801, 2015/07/01 2015.

- [36] Y. Kamada *et al.*, "Urinary 5-Aminolevulinic Acid Concentrations as a Potential Tumor Marker for Colorectal Cancer Screening and Recurrence," (in eng), *Anticancer Res*, vol. 36, no. 5, pp. 2445-50, May 2016.
- [37] P. Chalissery *et al.*, "Influence of vitamins and food on the fluorescence spectrum of human urine," (in eng), *Lasers Surg Med*, vol. 56, no. 5, pp. 485-495, Jul 2024.
- [38] K. Inoue *et al.*, "Porphyrins as urinary biomarkers for bladder cancer after 5-aminolevulinic acid (ALA) administration: The potential of photodynamic screening for tumors," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 10, no. 4, pp. 484-489, 2013/12/01/ 2013.
- [39] M. Lualdi *et al.*, "Early detection of colorectal adenocarcinoma: a clinical decision support tool based on plasma porphyrin accumulation and risk factors," *BMC Cancer*, vol. 18, no. 1, p. 841, 2018/08/22 2018.
- [40] R. Kalaivani *et al.*, "Fluorescence Spectra of Blood Components for Breast Cancer Diagnosis," *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 26, no. 3, pp. 251-256, 2008/06/01 2008.
- [41] L. C. Courrol *et al.*, "Study of Blood Porphyrin Spectral Profile for Diagnosis of Tumor Progression," *Journal of Fluorescence*, vol. 17, no. 3, pp. 289-292, 2007/05/01 2007.
- [42] F. R. de Oliveira Silva, M. H. Bellini, V. R. Tristão, N. Schor, N. D. Vieira, and L. C. Courrol, "Intrinsic Fluorescence of Protoporphyrin IX from Blood Samples Can Yield Information on the Growth of Prostate Tumours," *Journal of Fluorescence*, vol. 20, no. 6, pp. 1159-1165, 2010/11/01 2010.
- [43] M. Vadivel *et al.*, "Fluorescence spectra of blood and urine for cervical cancer detection," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 17, no. 9, p. 098001, 9/1 2012.
- [44] M. AlSalhi, V. Masilamani, V. Trinkka, M. Elangovan, V. Kochupillai, and N. Shah, "Detection of Cancer by Optical Analysis of Body Fluids — A Single Blind Study," *Technology in Cancer Research & Treatment*, vol. 10, no. 2, pp. 145-152, 2011/04/01 2011.
- [45] A. Lang *et al.*, "Rapid spectrophotometric quantification of urinary porphyrins and porphobilinogen as screening tool for attacks of acute porphyria," (in eng), *J Biomed Opt*, vol. 23, no. 5, pp. 1-12, May 2018.
- [46] M. A. Wallace, "Anatomy and Physiology of the Kidney," *AORN Journal*, vol. 68, no. 5, pp. 799-820, 1998/11/01/ 1998.
- [47] S. Decramer *et al.*, "Urine in Clinical Proteomics," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 7, no. 10, pp. 1850-1862, 2008.
- [48] R. Veelken and T. Ditting, "Nephrologie," in *Duale Reihe Innere Medizin*, K. Arastéh *et al.*, Eds. 4., überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG, 2018.
- [49] A. Kurtz and C. Wagner, "Niere und Salz-/Wasserhaushalt," in *Duale Reihe Physiologie*, J. Behrends *et al.*, Eds. 4., unveränderte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG, 2021.
- [50] E. Schulte, "Niere und ableitende Harnwege," in *Duale Reihe Anatomie*, G. Aumüller *et al.*, Eds. 5., korrigierte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG, 2020.
- [51] R. Lüllmann-Rauch and E. Asan, "Harnorgane," in *Taschenlehrbuch Histologie*, R. Lüllmann-Rauch and E. Asan, Eds. 6., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag, 2019.
- [52] "KAPITEL 19 - Nierenerkrankungen," in *Innere Medizin (Sechste Ausgabe)*, M. Classen, V. Diehl, and K. Kochsiek, Eds. Munich: Urban & Fischer, 2009, pp. 1223-1298.
- [53] V. Gueutin, G. Deray, and C. Isnard-Bagnis, "[Renal physiology]," (in fre), *Bull Cancer*, vol. 99, no. 3, pp. 237-49, Mar 1 2012. Physiologie rénale.
- [54] H. G. Preuss, "Basics of renal anatomy and physiology," (in eng), *Clin Lab Med*, vol. 13, no. 1, pp. 1-11, Mar 1993.
- [55] S. Silbernagl, "Die Funktion der Nieren," in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Eds. 10., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG, 2023.

- [56] S. Silbernagl, "Wie entsteht der Harn?," in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Eds. 10., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG, 2023.
- [57] S. Silbernagl, "Die Filtration des Primärharns," in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Eds. 10., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG, 2023.
- [58] M. P. Bohrer, C. Baylis, H. D. Humes, R. J. Glassock, C. R. Robertson, and B. M. Brenner, "Permeability of the glomerular capillary wall. Facilitated filtration of circulating polycations," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 61, no. 1, pp. 72-8, Jan 1978.
- [59] S. Silbernagl, "Tubulärer Transport organischer Stoffe," in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Eds. 10., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG, 2023.
- [60] N. I. o. H. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, "Kidney and Nephron," ed. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Kidney\\_and\\_Nephron.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Kidney_and_Nephron.jpg), file: [Kidney\\_and\\_Nephron.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Kidney_and_Nephron.jpg): Wikimedia Commons, Creative Commons CC0 1.0 Universal Public Domain Dedication (<https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/deed.en>), modified and translated [cited 2024, November 4], 2022.
- [61] U.-N. Riede and U. Wetterauer, "Ableitende Harnwege," in *Allgemeine und Spezielle Pathologie*, U.-N. Riede and M. Werner, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017, pp. 599-609.
- [62] J. Behrends, "Miktion und Defäkation," in *Duale Reihe Physiologie*, J. Behrends et al., Eds. 4., unveränderte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG, 2021.
- [63] BruceBlaus, "Human Urinary System," ed. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Human\\_Urinary\\_System.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Human_Urinary_System.png), file: [Human\\_Urinary\\_System.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Human_Urinary_System.png): Wikimedia Commons, Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.en>) [cited 2024 November 4], image cropped (female urinary system not shown), 2017.
- [64] T. Antic and R. M. DeMay, "The fascinating history of urine examination," *Journal of the American Society of Cytopathology*, vol. 3, no. 2, pp. 103-107, 2014/03/01/ 2014.
- [65] P. J. McIntire, I. Kilic, E. M. Wojcik, G. A. Barkan, and S. E. Pambuccian, "The color of urine: then and now—a comprehensive review of the literature with emphasis on intracytoplasmic pigments encountered in urinary cytology," *Journal of the American Society of Cytopathology*, vol. 9, no. 1, pp. 9-19, 2020/01/01/ 2020.
- [66] L. Iorio and F. Avagliano, "Observations on the Liber medicine orinalibus by Hermogenes," (in eng), *Am J Nephrol*, vol. 19, no. 2, pp. 185-8, 1999.
- [67] R. Veelken and T. Ditting, "Nephrologische Diagnostik," in *Duale Reihe Innere Medizin*, K. Arastéh et al., Eds. 4., überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG, 2018.
- [68] W. Hofmann, J. H. H. Ehrich, W. G. Guder, F. Keller, J. Scherberich, and N. Arbeitsgruppe Diagnostische Pfade der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und der Deutschen Gesellschaft für, "Diagnostische Pfade bei Nierenerkrankungen1) / Diagnostic pathways for renal diseases," vol. 35, no. 3, pp. 127-146, 2011.
- [69] N. S. Chindarkar, L. L. Rentmeester, B. T. Ly, and R. L. Fitzgerald, "Black urine due to urobilinogen in a patient with alcoholic pellagra," *Clinical Biochemistry*, vol. 47, no. 12, pp. 1132-1135, 2014/08/01/ 2014.
- [70] J. Lee, "Purple Urine," *New England Journal of Medicine*, vol. 357, no. 13, p. e14.
- [71] Hxa098020, "Visually read a urine test strip by comparing it with the color key provided by the manufacturer. Color chart from Urinox-10 urine test strips by Diagnox is shown in this image," ed. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Visually\\_read\\_a\\_urine\\_test\\_strip\\_by\\_comparing\\_it\\_with\\_the\\_color\\_key\\_provided\\_by\\_the\\_manufacturer.\\_Color\\_chart\\_from\\_Urinox-10\\_urine\\_test\\_strips\\_by\\_Diagnox\\_is\\_shown\\_in\\_this\\_image.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Visually_read_a_urine_test_strip_by_comparing_it_with_the_color_key_provided_by_the_manufacturer._Color_chart_from_Urinox-10_urine_test_strips_by_Diagnox_is_shown_in_this_image.jpg), file: [Visually read a urine test strip by comparing it with the color key provided by the manufacturer. Color](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Visually_read_a_urine_test_strip_by_comparing_it_with_the_color_key_provided_by_the_manufacturer._Color_chart_from_Urinox-10_urine_test_strips_by_Diagnox_is_shown_in_this_image.jpg)

- chart from Urinox-10 urine test strips by Diagnox is shown in this image.jpg: Wikimedia Commons, Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.en>) [cited 2024 November 6], 2022.
- [72] L. Xu, F. Yang, X. Zhu, and P. Wei, "Ciprofol-associated Pink Urine," (in eng), *Eur J Anaesthesiol*, vol. 41, no. 6, pp. 460-461, Jun 1 2024.
- [73] D. Sun and S. S. Huang, "Green urine," (in eng), *Cmaj*, vol. 190, no. 8, p. E224, Feb 26 2018.
- [74] R. D. Aycock and D. A. Kass, "Abnormal urine color," (in eng), *Southern medical journal*, vol. 105, no. 1, pp. 43-47, 2012/01// 2012.
- [75] J. R. Raymond and W. E. Yarger, "Abnormal urine color: differential diagnosis," (in eng), *South Med J*, vol. 81, no. 7, pp. 837-41, Jul 1988.
- [76] K. Dubayová *et al.*, "Visualization of the composition of the urinary fluorescent metabolome. Why is it important to consider initial urine concentration?," *Methods and Applications in Fluorescence*, vol. 11, no. 4, p. 045004, 2023/07/19 2023.
- [77] A. Elkoundi, M. Bensghir, H. Balkhi, and S. J. Lalaoui, "Green urine in the operating room: the 'Claret Sign'," *QJM: An International Journal of Medicine*, vol. 111, no. 4, pp. 265-266, 2018.
- [78] P. Leclercq, C. Loly, P. Delanaye, C. Garweg, and B. Lambermont, "Green urine," *The Lancet*, vol. 373, no. 9673, p. 1462, 2009.
- [79] D. Skrajnowska and B. Bobrowska-Korczak, "The Effects of Diet, Dietary Supplements, Drugs and Exercise on Physical, Diagnostic Values of Urine Characteristics," *Nutrients*, vol. 16, no. 18. doi: 10.3390/nu16183141
- [80] A. Ramamoorthy *et al.*, "Crowdsourced Asparagus Urinary Odor Population Kinetics," *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, vol. 7, no. 1, pp. 34-41, 2018/01/01 2018.
- [81] W. Demtröder, "Emission und Absorption elektromagnetischer Strahlung durch Atome," in *Experimentalphysik 3: Atome, Moleküle und Festkörper*, W. Demtröder, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, pp. 233-270.
- [82] A. Jablonski, "Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes," *Nature*, vol. 131, no. 3319, pp. 839-840, 1933/06/01 1933.
- [83] W. Schmidt, "Lumineszenzspektrophotometrie," in *Optische Spektroskopie*, 2000, pp. 191-251.
- [84] F. Ghasemi *et al.*, "Paper-based optical nanosensors – A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1238, p. 340640, 2023/01/15/ 2023.
- [85] X. Zhu, Q. Su, W. Feng, and F. Li, "Anti-Stokes shift luminescent materials for bio-applications," *Chemical Society Reviews*, 10.1039/C6CS00415F vol. 46, no. 4, pp. 1025-1039, 2017.
- [86] U. Ritgen, "Fluoreszenz-Verfahren," in *Analytische Chemie II*, U. Ritgen, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2020, pp. 175-195.
- [87] m. b. D. Jacobkhed, "Jablonski Diagram of Fluorescence Only-de," ed. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Jablonski\\_Diagram\\_of\\_Fluorescence\\_Only-de.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Jablonski_Diagram_of_Fluorescence_Only-de.png), file: Jablonski Diagram of Fluorescence Only-de.png: Wikimedia Commons, Creative Commons CC0 1.0 Universal Public Domain Dedication (<https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/deed.en>) [cited 2024 November 6], 2017.
- [88] U. Ritgen, "Allgemeines zur Spektroskopie," in *Analytische Chemie I*, U. Ritgen, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2019, pp. 189-193.
- [89] M. Zellweger, C. Martoccia, M. Mengin, C. Iselin, H. van den Bergh, and G. Wagnières, "Study of the influence of over-the-counter vitamin supplement intake on urine fluorescence to optimize cancer detection by fluorescence cystoscopy," (in eng), *J Biomed Opt*, vol. 20, no. 6, p. 066011, Jun 2015.

- [90] A. Birková *et al.*, "Human fluorescent profile of urine as a simple tool of mining in data from autofluorescence spectroscopy," *Biomedical Signal Processing and Control*, vol. 56, p. 101693, 2020/02/01/ 2020.
- [91] P. Chalissery, C. Homann, and R. Sroka, "Vitamin supplements and nutrition: Impact on the urine fluorescence spectrum," *J Food Process Technol.*, vol. 15, no. 5, 2024.
- [92] M. Vosough, S. N. Eshlaghi, and R. Zadnurd, "On the performance of multiway methods for simultaneous quantification of two fluoroquinolones in urine samples by fluorescence spectroscopy and second-order calibration strategies," (in eng), *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 136 Pt B, pp. 618-24, Feb 5 2015.
- [93] R. Rajasekaran *et al.*, "Characterization and diagnosis of cancer by native fluorescence spectroscopy of human urine," (in eng), *Photochem Photobiol*, vol. 89, no. 2, pp. 483-91, Mar-Apr 2013.
- [94] J. Dou *et al.*, "Urine fluorescence spectroscopy combined with machine learning for screening of hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis," (in eng), *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 40, p. 103102, Dec 2022.
- [95] L. Huang, L. Guo, Y. Wan, P. Pan, and L. Feng, "Simultaneous determination of three potential cancer biomarkers in rat urine by synchronous fluorescence spectroscopy," (in eng), *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 120, pp. 595-601, 2014.
- [96] Y.-Q. Wan, L.-J. Tang, and T. Tan, "Simultaneous Determination of Xanthopterin and Isoxanthopterin in Human Urine by Synchronous Fluorescence Spectroscopy," *Journal of Fluorescence*, vol. 20, no. 6, pp. 1191-1198, 2010/11/01 2010.
- [97] M. Atif, M. S. AlSalhi, S. Devanesan, V. Masilamani, K. Farhat, and D. Rabah, "A study for the detection of kidney cancer using fluorescence emission spectra and synchronous fluorescence excitation spectra of blood and urine," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 23, pp. 40-44, 2018/09/01/ 2018.
- [98] M. Zvarik, D. Martinicky, L. Hunakova, I. Lajdova, and L. Sikurova, "Fluorescence characteristics of human urine from normal individuals and ovarian cancer patients," (in eng), *Neoplasma*, vol. 60, no. 5, pp. 533-7, 2013.
- [99] I. Špaková, K. Dubayová, V. Nagyová, and M. Mareková, "Fluorescence biomarkers of malignant melanoma detectable in urine," vol. 18, no. 1, pp. 898-910, 2020.
- [100] C. Rimington, "Spectral-absorption coefficients of some porphyrins in the Soret-band region," (in eng), *Biochem J*, vol. 75, no. 3, pp. 620-3, Jun 1960.
- [101] M. Eisel, "L-Porscreen Work Instruction-03," *FerroSens*, 2023.
- [102] E. M. Agency, "Guideline on Bioanalytical Method Validation," *Committee for Medical Product for Human Use*, 2011.
- [103] P. van Amsterdam, A. Companjen, M. Brudny-Kloepfel, M. Golob, S. Luedtke, and P. Timmerman, "The European Bioanalysis Forum community's evaluation, interpretation and implementation of the European Medicines Agency guideline on Bioanalytical Method Validation," (in eng), *Bioanalysis*, vol. 5, no. 6, pp. 645-59, Mar 2013.
- [104] N. B. Pepper *et al.*, "ALA-RDT in GBM: protocol of the phase I/II dose escalation trial of radiodynamic therapy with 5-Aminolevulinic acid in patients with recurrent glioblastoma," (in eng), *Radiat Oncol*, vol. 19, no. 1, p. 11, Jan 22 2024.
- [105] D. Viswanath and Y.-Y. Won, "Combining Radiotherapy (RT) and Photodynamic Therapy (PDT): Clinical Studies on Conventional RT-PDT Approaches and Novel Nanoparticle-Based RT-PDT Approaches under Preclinical Evaluation," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 8, no. 9, pp. 3644-3658, 2022/09/12 2022.
- [106] C. Homann and P. Chalissery, "Gespräch im Laser-Forschungslabor über die Umwandlung von Porphyrinogenen in Porphyrine im menschlichen Urin in Abhängigkeit von der Temperatur," 2024.
- [107] S. Silbernagl, "Renale Clearance," in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Eds. 10., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Thieme, 2023.

- [108] "Normierung von Stoffgehalten im Urin—Kreatinin," *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforsch.Gesundheitsschutz*, vol. 48, no. 5, pp. 616-616, 2005/05/01 2005.
- [109] K. Capone and T. Sentongo, "The ABCs of Nutrient Deficiencies and Toxicities," (in eng), *Pediatr Ann*, vol. 48, no. 11, pp. e434-e440, Nov 1 2019.
- [110] E. J. Bruno, Jr. and T. N. Ziegenfuss, "Water-soluble vitamins: research update," (in eng), *Curr Sports Med Rep*, vol. 4, no. 4, pp. 207-13, Aug 2005.
- [111] S. L. Stevens, "Fat-Soluble Vitamins," (in eng), *Nurs Clin North Am*, vol. 56, no. 1, pp. 33-45, Mar 2021.
- [112] P. Reddy and I. Jialal, "Biochemistry, Fat Soluble Vitamins," in *StatPearls*: StatPearls Publishing, 2024.
- [113] G. F. Combs and J. P. McClung, "Chapter 3 - General Properties of Vitamins," in *The Vitamins (Fifth Edition)*, G. F. Combs and J. P. McClung, Eds.: Academic Press, 2017, pp. 33-58.
- [114] S. G. Schulman, "pH Dependence of Fluorescence of Riboflavin and Related Isoalloxazine Derivatives," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 60, no. 4, pp. 628-631, 1971/04/01/ 1971.
- [115] E. S. Sim *et al.*, "Novel Use of Vitamin B2 as a Fluorescent Tracer in Aerosol and Droplet Contamination Models in Otolaryngology," (in eng), *Ann Otol Rhinol Laryngol*, vol. 130, no. 3, pp. 280-285, Mar 2021.
- [116] Y. Zhang, P. Sukthankar, J. M. Tomich, and G. W. Conrad, "Effect of the synthetic NC-1059 peptide on diffusion of riboflavin across an intact corneal epithelium," (in eng), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 53, no. 6, pp. 2620-9, May 4 2012.
- [117] M. Šubr *et al.*, "Magnetron-Sputtered Polytetrafluoroethylene-Stabilized Silver Nanoisland Surface for Surface-Enhanced Fluorescence," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 4. doi: 10.3390/nano10040773
- [118] J. Kahan, "[241] The fluorescence properties of vitamin A," in *Methods in Enzymology*, vol. 18: Academic Press, 1971, pp. 574-591.
- [119] P. Ramos-Lledó, S. Vera, and M. P. San Andrés, "Determination of vitamins A and E in milk samples by fluorescence in micellar media," (in eng), *Fresenius J Anal Chem*, vol. 369, no. 1, pp. 91-5, Jan 1 2001.
- [120] A. J. Passannante and L. V. Avioli, "Studies on the ultraviolet fluorescence of vitamin D and related compounds in acid-alcohol solutions," *Analytical Biochemistry*, vol. 15, no. 2, pp. 287-295, 1966/05/01/ 1966.
- [121] M. G. Traber and J. F. Stevens, "Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective," (in eng), *Free Radic Biol Med*, vol. 51, no. 5, pp. 1000-13, Sep 1 2011.
- [122] M. F. Holick, "Vitamin D Deficiency," *New England Journal of Medicine*, vol. 357, no. 3, pp. 266-281, 2007.
- [123] L. Lichardusová, J. Kušnír, M. Valko-Rokytovská, and M. Mareková, "The factors influencing direct spectral fluorimetry of some urine metabolites," (in eng), *Prague Med Rep*, vol. 111, no. 4, pp. 272-8, 2010.
- [124] M. J. P. Leiner, M. R. Hubmann, and O. S. Wolfbeis, "The total fluorescence of human urine," *Analytica Chimica Acta*, vol. 198, pp. 13-23, 1987/01/01/ 1987.
- [125] L. I. Elvira-Torales, I. Navarro-González, J. Rodrigo-García, J. Seva, J. García-Alonso, and M. J. Periago-Castón, "Consumption of Spinach and Tomato Modifies Lipid Metabolism, Reducing Hepatic Steatosis in Rats," *Antioxidants*, vol. 9, no. 11. doi: 10.3390/antiox9111041
- [126] T. Bohn *et al.*, "β-Carotene in the human body: metabolic bioactivation pathways – from digestion to tissue distribution and excretion," *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 78, no. 1, pp. 68-87, 2019.
- [127] T. A. Moore, D. Gust, and A. L. Moore, "Carotenoids: Nature's unique pigments for light and energy processing," vol. 66, no. 5, pp. 1033-1040, 1994.

- [128] P. Stehle and S. Ellinger, "Mineralstoffe," in *Einführung in die Humanernährung : Physiologische Grundlagen, Nährstoffe, Ernährungsformen*, P. Stehle and S. Ellinger, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2024, pp. 215-293.
- [129] M. U. Muckenthaler and P. E. Petrides, "Spurenelemente," in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, P. C. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, and H.-G. Koch, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2022, pp. 963-990.
- [130] C. C. Hack and S. Wasner, "Vitamine und Spurenelemente," *Der Gynäkologe*, vol. 54, no. 1, pp. 38-44, 2021/01/01 2021.
- [131] A. Kühnel, U. Groß, K. Jacob, and M. O. Doss, "Studies on coproporphyrin isomers in urine and feces in the porphyrias," *Clinica Chimica Acta*, vol. 282, no. 1, pp. 45-58, 1999/04/01/ 1999.
- [132] K. Jacob and M. O. Doss, "Excretion Pattern of Faecal Coproporphyrin Isomers I—IV in Human Porphyrias," vol. 33, no. 12, pp. 893-902, 1995.