Aus dem Laser-Forschungslabor im LIFE-Zentrum der Universität München

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

Inkohärente Lichtsysteme für die Fluoreszenzdiagnostik und die Photodynamische Therapie

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

vorgelegt von
André Ehrhardt

aus
Tuttlingen

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. P. Kaudewitz Priv. Doz. Dr. med. C. Folwaczny
Mitbetreuung durch den Promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. biol. hum. H. Stepp
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	28. Juni 2005

Gewidmet

Herrn Dr. med. h. c. Karl Storz (1911-1996)

1. Einführung 1

1.1 Einleitung 1

1.2 Historischer Überblick 3

1.3 Begriffsdefinitionen 5

1.3.1 Physikalischer Effekt der Fluoreszenz 5

1.3.2 Fluoreszenzdiagnostik 7

1.3.3 Photodynamische Therapie 8

1.3.4 Natürliche Photosensibilisatoren 10

1.3.4.1 Protoporphyrin IX 12

1.3.4.2 Hypericin 15

1.4 Biologische Wirkung optischer Strahlung 17

1.4.1 Ultraviolette Strahlung 18

1.4.1.1 Spektralbereich des UV-A 20

1.4.1.2 Spektralbereich des UV-B 20

1.4.1.3 Spektralbereich des UV-C 20

1.4.2 Sichtbare Strahlung 21

1.4.3 Infrarote Strahlung 21

1.4.4 Richtlinien und Grenzwerte 22

2 Material und Methoden 26

2.1 Neuartiges inkohärentes Lichtsystem für die Fluoreszenzdiagnostik 26

2.1.1 Technischer Überblick zu UV-Lampen 26

2.1.2 Vergleich von UV-Lampen für das UV-Lichtsystem 29

2.1.3 Inkohärentes UV-Lichtsystem 30

2.1.4 Lichtleiter 32

2.1.5 UV-Endoskop 32

2.1.6 Endoskopisches Kamerasystem 33

2.1.7 Experimentelle Untersuchungen mit den inkohärenten FD-Systemen 34

2.1.7.1 Experimentelle Untersuchung an einem Gewebephantom 34

2.1.7.2 In vitro Untersuchungen an Glioblastomgewebeproben 34

2.1.7.3 In vivo Untersuchungen im Tierversuch ... 36
2.1.7.4 In vivo Untersuchungen in der Mundhöhle ... 38
2.1.7.5 In vivo Untersuchungen in der Harnblase ... 38
2.1.7.6 Ausbleichen der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz ... 39
2.1.7.7 Bestimmung der Effektivität der Anregungswellenlängenbereiche beider Lichtsysteme für die HYP-induzierte Fluoreszenz ... 40
2.2 Neuartiges inkohärentes Lichtsystem für die photodynamische Therapie ... 41
2.2.1 Inkohärente PDT-Lichtquelle ... 42
2.2.2 PDT-Applikationskatheter für die Harnblase ... 45
2.2.3 Operatives Vorgehen bei der 5-ALS-induzierten PDT des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms ... 49
3 Ergebnisse ... 52
3.1 Inkohärentes UV-Lichtsystem ... 52
3.1.1 Experimentelle Untersuchungen an einem Gewebephantom ... 55
3.1.2 In vitro Untersuchungen an Glioblastomgewebeproben ... 56
3.1.3 In vivo Untersuchungen im Tierversuch ... 59
3.1.4 In vivo Untersuchungen in der Mundhöhle ... 63
3.1.5 In vivo Untersuchungen in der Harnblase ... 66
3.1.6 Ausbleichen der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz ... 72
3.1.7 Bestimmung der Effektivität der Anregungswellenlängenbereiche beider Lichtsysteme für die HYP-induzierte Fluoreszenz ... 79
3.2 Inkohärentes PDT-Lichtsystem ... 81
3.2.1 Experimentelle Untersuchungen mit dem inkohärenten PDT-Lichtsystem ... 81
3.2.2 Klinische Ergebnisse der Pilotstudie ... 84
4 Diskussion ... 86
4.1 Fluoreszenzdiagnostik ... 86
4.1.1 Inkohärentes UV-Lichtsystem ... 86
4.1.1.1 Farbkontrastbildgebung ... 87
4.1.1.2 Optische Störeinflüsse ... 88
4.1.1.3 Filtercharakteristik ... 89

4.1.1.4 Autofluoreszenz 89
4.1.1.5 Ausbleichen 91
4.1.2 Ergebnisse klinischer Untersuchungen 92
4.1.2.1 Neurochirurgie 92
4.1.2.2 Urologie 93
4.1.3 Ausblick für das inkohärente UV-Lichtsystem 94
4.2 Photodynamische Therapie 95
4.2.1 Inkohärentes PDT-Lichtsystem 95
4.2.2 Klinische Ergebnisse des inkohärenten PDT-System 97
4.2.3 Ausblick für das inkohärente PDT-Lichtsystem 99
5 Zusammenfassung 104
5.1 Inkohärentes UV-Lichtsystem für die Fluoreszenzdiagnostik 104
5.2 Inkohärentes PDT-Lichtsystem 106
6 Anhang 108
6.1 Literaturverzeichnis 108
6.2 Verwendete Abkürzungen und physikalische Größen 125
6.3 Danksagung 127
6.4 Lebenslauf 128

Abb. 1.1 Jablonski-Diagramm: Molekulare Energieniveaus und Elektronenübergänge für die FD und die PDT ... 6

Abb. 1.2 PS-Generationen und ihre Eigenschaften ... 11

Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Hämbiosynthese ... 12

Abb. 1.4 Anregungsspektrum und Fluoreszenzemissionsspektrum von PpIX im Glioblastomgewebe ... 13

Abb. 1.5 Fluoreszenzanregungsspektrum von HYP-Polyvinylpyrrolidon (HYP-PVP) im Glioblastomgewebe ... 17

Abb. 1.6 Schematische Darstellung des optischen Spektralbereichs ... 18

Abb. 1.7 Spektrale Verteilung der Augenempfindlichkeit ... 19

Abb. 1.8 Relative spektrale Wirksamkeit s(λ) gemäß ACGIH und ICNIRP ... 23

Abb. 2.1 Vergleich der spektralen Verläufe von Hochdrucklampen für das UV-Lichtsystem ... 29

Abb. 2.2 Spektraler Verlauf von UV-Bandpassfiltern ... 30

Abb. 2.3 Spektraler Verlauf unterschiedlicher Konfigurationen des UV-Lichtsystems ... 32

Abb. 2.4 Systemaufbau zur Visualisierung und spektroskopischen Erfassung der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz in Glioblastomgewebe ... 35

Abb. 2.5 Schematische Darstellung des Systemaufbaus zur Visualisierung und spektroskopischer Erfassung der HYP- und 5-ALS-induzierten Fluoreszenz beim C6-Glioblastom-Modell der Ratte ... 37

Abb. 2.6 Inkohärente PDT-Lichtquelle (T-light) ... 41

Abb. 2.7 Interner Aufbau des inkohärenten PDT-Lichtsystems ... 42

Abb. 2.8 Detailansicht der Lichteinkopplung des PDT-Lichtsystems ... 43

Abb. 2.9 PDT-Applikationskatheter für die Harnblase ... 45

Abb. 2.10 Lichtapplikator des PDT-Applikationskatheters mit befülltem Blockingballon ... 47

Abb. 2.11 Schnittdarstellung des Steckers des PDT-Applikationskatheters ... 48

Abb. 2.12 Transabdominale Sonographie zur Kontrolle der korrekten Lage des PDT-Applikationskatheters. ... 50

Abb. 3.1 Leistungsdaten des UV-Lichtsystems ... 53

Abb. 3.2 Winkelverteilung des UV-Endoskops im Vergleich zum FD-Endoskop ... 54

Abb. 3.3 Spektraler Verlauf der Emission des Gewebephantoms für unterschiedliche Systemkonfigurationen des UV-Lichtsystems ... 56

Abb. 3.4 Vergleich der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz in Glioblastomgewebe bei Anregung durch das D-light-System und das UV-Lichtsystem 57

Abb. 3.5 Spektraler Verlauf der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz von Glioblastomgewebeproben bei Anregung durch das D-light-System und das UV-Lichtsystem 58

Abb. 3.6 Spektraler Verlauf des AF-Signals von Glioblastomgewebe bei Anregung durch das D-light-System und das UV-Lichtsystem 59

Abb. 3.7 HYP-induzierte Fluoreszenz angeregt durch das UV-Lichtsystem und durch das D-light-System beim C6-Gliom-Modell der Ratte 60

Abb. 3.8 Spektraler Verlauf der HYP-induzierten Fluoreszenz beim C6-Gliom-Modell der Ratte durch Anregung des UV-Lichtsystems 61

Abb. 3.9 5-ALS-induzierte PpIX-Fluoreszenz angeregt durch das UV-Lichtsystem und durch das D-light-System beim C6-Gliom-Modell der Ratte 62

Abb. 3.10 Spektraler Verlauf der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz beim C6-Gliom-Modell der Ratte durch Anregung des UV-Lichtsystems 63

Abb. 3.11 HYP-induzierte Fluoreszenz gemessen an verschiedenen Standard-Screening-Punkte in der Mundhöhle 64

Abb. 3.12 Intensität des HYP-induzierten Fluoreszenzsignals der Versuchsperson 2 an der Wange-rechts, vor und nach dem Abbürsten eines Screening-Punkts 65

Abb. 3.13 Vergleich des UV-Lichtsystems mit dem D-light-System bzgl. der HYP-induzierten Fluoreszenz an verschiedenen Screening-Punkten in der Mundhöhle 66

Abb. 3.14 Unspezifische Fluoreszenz am Harnblasenauslass bei Anregung der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz durch das D-light-System. Unauffälliger Harnblasenauslass bei Anregung der HYP-induzierten Fluoreszenz durch das UV-Lichtsystem 67

Abb. 3.15 Unspezifische Rotfluoreszenz der Harnblasenschleimhaut bei tangentialer Sicht 68

Abb. 3.16 Haupt- und Nebenbefund eines fluoreszenzpositiven Areals in der Harnblase unter Weißlicht und Fluoreszenzanregung durch das D-light-System 69

Abb. 3.17 Spektraler Verlauf der HYP-induzierten Fluoreszenz in der Harnblase durch Anregung mit dem D-light-System und UV-Lichtsystem 70

Abb. 3.18 Emissionsspektrum eines fluoreszenzpositiven Areals im Vergleich zu angrenzendem Normalgewebe in der Harnblase 71

Abb. 3.19 Spektraler Verlauf von PpIX und dessen Photoprodukt durch Anregung mit dem D-light-System 72

Abb. 3.20 Ausbleichverhalten von PpIX in Lösung sowie der Verlauf des Photoprodukts bei Anregung durch das UV-Lichtsystem und durch das D-light-System 74

Abb. 3.21 Hirngewebeproben zur Messung des Ausbleichverhaltens der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz bei Anregung durch das D-light-System und das UV-Lichtsystem 76

Abb. 3.22 Ausbleichverhalten von PpIX und Verlauf des Photoprodukts in Glioblastomgewebe bei Anregung durch das UV-Lichtsystem und durch das D-light-System 77

Abb. 3.23 Vergleich des Emissionsspektrums von PpIX gelöst in Wasser und Ethanol mit dem von in Glioblastomgewebe akku-muliertem PpIX 78

Abb. 3.24 Vergleich der Entstehung des Photoprodukts in Lösung zum dem im Gewebe bei Anregung durch das UV-Lichtsystem 79

Abb. 3.25 Messung der Fluoreszenzintensität einer mit HYP angereicherten Glioblastomgewebeprobe bei einer Anregungswellenlänge von 407 nm und 365 nm durch ein Spektralfluorometer 80

Abb. 3.26 Spektraler Verlauf der inkohärenten PDT-Lichtquelle mit Quarzglaslichtleiter 81

Abb. 3.27 Aktionsspektrum der PDT-Lichtquelle 82

Abb. 3.28 Verteilung des vom PDT-Applikationskatheter emittierten Lichts als Funktion des Winkels zur Katheterachse 83

Abb. 4.1 Schematische Darstellung des spektralen Verlaufs der Transmission der Anregungs- und Beobachtungsfilter des D-light-Systems 87

Abb. 4.2 Anregungsspektren verschiedener endogener Fluorophore 90

Abb. 4.3 Prinzipaufbau der proximalseitigen Lichtleistungsmessung 101

1. Einführung

1.1 Einleitung

Die Fluoreszenzdiagnostik (FD) und die Photodynamische Therapie (PDT) haben sich im Laufe der letzten Jahre zu einer vielversprechenden Alternative bzw. Ergänzung bei der Erkennung und Behandlungsunterstützung neoplastischer Veränderungen entwickelt. Beide Verfahren beruhen auf der Wechselwirkung von Licht geeigneter Wellenlänge mit einer tumorselektiv angereicherten Substanz. Durch diese Substanz wird bei der FD ein Fluoreszenzkontrast erzeugt oder bei der PDT ein phototoxischer Effekt erzielt.

Die Grundlage für eine erfolgreiche praktische Umsetzung der endoskopischen FD und der PDT bildet die Wahl einer geeigneten tumorselektiven Substanz in Kombination mit einer speziellen Lichtquelle sowie einem Lichtapplikationssystem zur Ausleuchtung des zu diagnostizierenden bzw. therapierenden Gewebes. Bei der FD werden zur visuellen Erfassung der durch Licht induzierten Fluoreszenz, neben der Betrachtung durch das bloße Auge, auch angepasste Kamerasysteme eingesetzt. Eine zusätzliche Möglichkeit einer Quantifizierung des optischen Eindrucks besteht darin, das Fluoreszenzsignal über ein endoskopisch optimiertes Detektionssystem spektroskopisch zu erfassen und parallel zum Kamerabild darzustellen.

Die derzeit verfügbaren Systeme zur endoskopischen FD weisen verschiedene Nachteile auf, welche die klinische Durchführung der Methode erschweren. So beeinträchtigen beispielsweise Reflexionen auf der feuchten Gewebeoberfläche die visuelle Abbildung. Lichtschwache Systeme erzielen die zur Fluoreszenzanregung notwendige Lichtleistung nur eingeschränkt und reduzieren damit die Aussagekraft des Verfahrens.

Um die klinische Anwendung der endoskop- bzw. mikroskopgestützten FD zu verbessern und somit auch die Akzeptanz des Verfahrens zu steigern, soll im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiges inkohärentes Lichtsystem entwickelt, aufgebaut und mit einem bereits kommerziell verfügbaren System verglichen werden. Die für dieses System selektierte Lampe ermöglicht, im Gegensatz zu bereits verfügbaren Systemen, neben der Anregung von Photosensibilisatoren (PS) durch sichtbares Licht auch eine Anregung der PS durch kurzwellige Strahlung im Ultraviolett (UV) Bereich.

Da es sich bei der UV-Strahlung um unsichtbare Strahlung handelt, können keine sichtbaren und somit störenden Reflexe auf der Gewebeoberfläche entstehen. Dies wirkt sich besonders vorteilhaft bei allen endoskopischen und mikroskopischen Anwendungen aus, bei denen der zu untersuchende Bereich nicht mit Flüssigkeit gefüllt ist. Durch die Optimierung des Kondensorsystems, hauptsächlich bestehend aus einem Filtersatz sowie einer neuen leistungsstarken Lampe, kann die Ausgangsleistung dieses inkohärenten Lichtsystems im Vergleich zu bestehenden Systemen deutlich gesteigert werden. Daraus resultiert eine effiziente Anregung des PS und somit eine optimale Fluoreszenzdarstellung des Tumorgewebes. Weiterhin wird durch die Erweiterung des Anregungsspektrums um den UV-Bereich die Möglichkeit eröffnet, zusätzlich zu den bereits etablierten PS neue einzusetzen.

Der zweite Teil dieser Arbeit beinhaltet die Konzeption und den Aufbau eines inkohärenten Lichtsystems für die PDT zur Behandlung des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms. Dieses Verfahren findet seine Anwendung bei Patienten, bei denen alle konventionellen Maßnahmen einschließlich intravesikaler Chemotherapie und Immuntherapie mittels Bacillus Calmette-Guérin (BCG) versagt haben. In der Regel besteht bei diesen Patienten die Indikation zur radikalen, operativen Entfernung der Harnblase (Zystektomie). Wird jedoch dieser Eingriff vom Patienten verweigert oder kann wegen schwerer internistischer Begleiterkrankungen keine offene Operation durchgeführt werden, so kommt momentan die integrale PDT der Harnblase als einzige Alternative in Frage.

Durch den Einsatz des inkohärenten PDT-Lichtsystems in Kombination mit einem speziell angepassten Applikationskatheter lassen sich Tumore an endoskopisch zugänglichen Hohlorganoberflächen wie beispielsweise der Harnblase behandeln. Aufgrund der geringen Eindringtiefe von Licht von nur einigen Millimetern in das Gewebe können jedoch nur oberflächlich wachsende, nicht zu stark fortgeschrittene Tumorfrühstadien erfolgreich therapiert werden.

Die derzeit klinisch eingesetzten PDT-Systeme basieren zu einem großen Teil auf Lasern, die als Anregungslichtquelle verwendet werden. Diese Lasersysteme bedingen neben sehr hohen Anschaffungskosten auch einen erheblichen Platzbedarf im Operationssaal (OP). Die Bedienung dieser Systeme ist kompliziert und muss in den meisten Fällen durch einen geschulten Techniker durchgeführt werden. Nicht zu vergessen ist der hohe Wartungsaufwand dieser Systeme. Wiederholte photodynamische Bestrahlungen bei hohem Patientenaufkommen erfordern jedoch kostengünstige und einfache technische Lösungen.

Zwischenzeitlich bietet der Markt erste kompakte und bedienungsfreundliche auf Laserdioden basierende PDT-Systeme. Aufgrund des Nachteils der hohen Anschaffungskosten dieser Laserdiodensysteme wird im Rahmen dieser Arbeit ein im Vergleich dazu kostengünstigeres, inkohärentes PDT-Lichtsystem entwickelt werden.

Im Anschluss an die Konzeptionsphase und den Aufbau des neuartigen inkohärenten PDT-Lichtsystems soll die klinische Tauglichkeit anhand eines kleinen Patientenkollektivs evaluiert werden.

1.2 Historischer Überblick

Die Wurzeln photodynamischer Verfahren können bis in das antike Griechenland, Ägypten und Indien zurückverfolgt werden [22]. Schon damals erkannte man den Zusammenhang zwischen der biologischen Wirksamkeit bestimmter Substanzen und Licht. Auch im alten Rom war schon das Phänomen der Biolumineszenz bekannt. So beschrieb Plinius der Ältere im ersten Jahrhundert nach Christus das helle Leuchten einiger Quallenarten [158].

Die erste klinische Anwendung photochemischer Prozesse in der Neuzeit wird dem Münchner Professor von Tappeiner zugeschrieben. Studien seines Mitarbeiters Oskar Raab an Infusorien wiesen auf eine lichtinduzierte Toxizität bestimmter fluoreszierender Stoffe hin [126, 143]. Basierend auf diesen Beobachtungen behandelte von Tappeiner gemeinsam mit dem Dermatologen Jesionek karzinomatöse, tuberkulöse und luetische Krankheitsherde der Haut durch Bestrahlung mit Sonnenlicht, später auch mit dem Licht einer Bogenlampe und topischer Applikation von Eosin [126, 144, 145].

1913 studierte Meyer-Betz erstmalig die photosensibilisierende Wirkung von Hämatoporphyrin durch Eigeninjektion im Selbstversuch [106].

Der Nachweis der selektiven Fluoreszenzdetektion durch endogene Porphyrine erfolgte 1924 durch Policard [124]. Er verwendete eine Woods-UV-Lampe zur Anregung der Fluoreszenz.

Knapp zwanzig Jahre später fanden Auler und Banzer heraus, dass eine exogene Applikation von Hämatoporphyrin zu einer deutlich höheren selektiven Tumorfluoreszenz in neoplastischem Gewebe führt [5]. Dies wurde einige Jahre später durch Figge et al. bestätigt [41, 42]. Da die zur Diagnostik und Therapie mit den damals verfügbaren Mitteln erforderliche Dosis jedoch mit starken Nebenwirkungen verbunden waren und die Tumorselektivität nicht ausreichte, kam es zu keinem klinischen Einsatz [135].

Erst mit der synthetischen Herstellung von Hämatoporphyrin Derivat (HPD) kam es 1960 zu einem Durchbruch; es gelang nun, die Selektivität des PS nach einer exogenen Gabe entscheidend zu steigern [97]. Dies führte jedoch erst in den siebziger Jahren zu intensiven Forschungsaktivitäten [27, 33].

Die erste Fluoreszenzzystoskopie mit HPD wurde 1975 von Kelly und Snell durchgeführt. Dabei zeigte sich jedoch nur eine sehr schwache Fluoreszenz, die nur mit Hilfe einer Bildverstärkerkamera registriert werden konnte [79, 80].

Die Hauptursache für die verzögerte Einführung der intrakorporalen Fluoreszenzdiagnostik bestand darin, dass es noch keine ausreichend lichttransmittierenden, endoskopischen Übertragungssysteme gab, mit denen man die inneren Organoberflächen erreichen konnte, obgleich inkohärente Kaltlichtquellen und starre Endoskope mit Faserlichtleitern bereits in den 60er Jahren durch Karl Storz erfunden und als Produkt auf dem Markt eingeführt wurden [138]. Erst mit der Entwicklung von Endoskopen mit einem integrierten Lichtleiter und experimentellen Lasersystemen, die als Lichtquellen verwendet wurden, gelang die klinische Umsetzung der FD und PDT.

Im Zeitraum von 1982 bis 1990 wurde von der Urologischen Klinik des Klinikums Großhadern, der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF) in München und der Fa. Karl Storz aus Tuttlingen der Prototyp eines FD-Systems entwickelt. Die Kernkomponenten bestanden aus einem Krypton-Ionenlaser und einem speziellen Zweikanal-Endoskopiesystem. Als tumorselektive Substanz wurde Photofrin II (Quadra Logic Technologies, Vancouver, Kanada) eingesetzt [6, 7, 75]. Dieses Experimentalsystem bedingte neben den sehr hohen Anschaffungskosten einen großen Installations- sowie Bedienungs- und Wartungsaufwand.

1990 wurde von Kennedy et al. [81] das klinische Potential der 5-Aminolävulinsäure (5-ALS) erkannt. Im Gegensatz zu allen anderen bis dato eingesetzten fluoreszierenden Kontrastmitteln wird das Fluorophor Protoporphyrin IX (PpIX) erst nach Gabe von 5-ALS in situ gebildet. Eine lang anhaltende Sensibilisierung der Haut, wie sie nach Gabe von Photofrin beobachtet wird, existiert nicht, da 5-ALS und PpIX innerhalb von 24 Stunden vom Körper abgebaut werden [150].

Der erste klinische Einsatz von 5-ALS für die Diagnostik des Harnblasenkarzinoms erfolgte durch Kriegmair et al. [87]. Zunächst wurde noch der in der Handhabung sehr aufwändige

Krypton-Ionenlaser zur Anregung der PpIX–induzierten Fluoreszenz verwendet. Dieser Laser wurde jedoch bald durch ein inkohärentes Anregungslichtsystem (487 Blue, Karl Storz) ersetzt [89]. Mit diesem ersten Prototypen eines inkohärenten Lichtsystems konnten weitere klinische Erfolge erzielt und eine breite Akzeptanz in der Urologie gefunden werden.

Seit 1995 wird von Karl Storz ein kompaktes Fluoreszenzanregungssystem (D-light-System) [37] für die FD zur Früherkennung des Harnblasenkarzinoms in der Urologie kommerziell angeboten. Zunächst konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der FD das Carcinoma in situ (CIS) und Frühstadien des Harnblasentumors mit einer hohen Sensitivität nachgewiesen werden [88]. Es folgten weitere klinische Studien, die diese Ergebnisse bestätigten [43, 72, 92].

In einer kontrollierten, randomisierten, multizentrischen Phase III-Studie, die im Einklang mit GCP-Richtlinien durchgeführt worden war, wurde untersucht, ob sich mit einer FD mit 5-ALS der Anteil der übersehenen Tumore signifikant reduzieren lässt [45, 68, 93, 94]. Inwiefern die Reduktion der Residualtumorraten und die gesteigerte Detektionsrate von flachen, aggressiven Tumorläsionen (CIS, Dysplasie II) Auswirkungen auf die Rezidiv- und möglicherweise Progressionsraten der Patienten haben, ist derzeit Gegenstand mehrerer prospektiver Studien in Europa.

1.3 Begriffsdefinitionen

Im Folgenden sind die für diese Arbeit relevanten biologischen und physikalischen Grundlagen dargestellt.

1.3.1 Physikalischer Effekt der Fluoreszenz

Das Phänomen Fluoreszenz ist eine besondere Art der Lumineszenz und wurde nach dem fluoreszierenden Mineral Fluorit (Flussspat, Kalziumfluorit) benannt [44].

Nach Absorption eines Photons bzw. Lichtquants, dem kleinsten Energiebetrag, der als elektromagnetische Welle transportiert wird, durch ein Atom oder ein Molekül, geht dieses in einen angeregten Zustand (S2) über (vgl. Gl. 1.1). Dies entspricht einer Anhebung eines Valenzelektrons von einer inneren auf eine weiter außen liegende Bahn.

$$PS(\uparrow\downarrow) + h\cdot\nu_1 \longrightarrow PS^*(\uparrow\downarrow) \qquad \text{(Gl. 1.1)}$$

Dabei bezeichnen die gegenläufigen Pfeile den Singulett-Zustand des PS, d. h. die totale Elektronenspin-Quantenzahl (S) des PS-Moleküls ist Null, da sich die Drehrichtungen der Elektronen gegenseitig aufheben. Die Kennzeichnung des PS mit einem Stern stellt einen angeregten Zustand dar. „h“ entspricht dem Planckschen Wirkungsquantum (6,6262 x 10^{-34} Js) und ergibt multipliziert mit der Frequenz „ν“ die Energie eines Photons.

Das PS-Molekül verbleibt in dem instabilen, angeregten Zustand (S2) nur für ganz kurze Zeit (Nanosekundenbereich) und kann durch unterschiedliche Kanäle wieder in den Grundzustand (S0) relaxieren. Wird die absorbierte Energie vollständig in Wärme umgewandelt, so führt dies schließlich zu einer Erwärmung des PS; man spricht von einer nichtstrahlenden Relaxation oder einer sogenannten inneren Konversion (Internal Conversion).

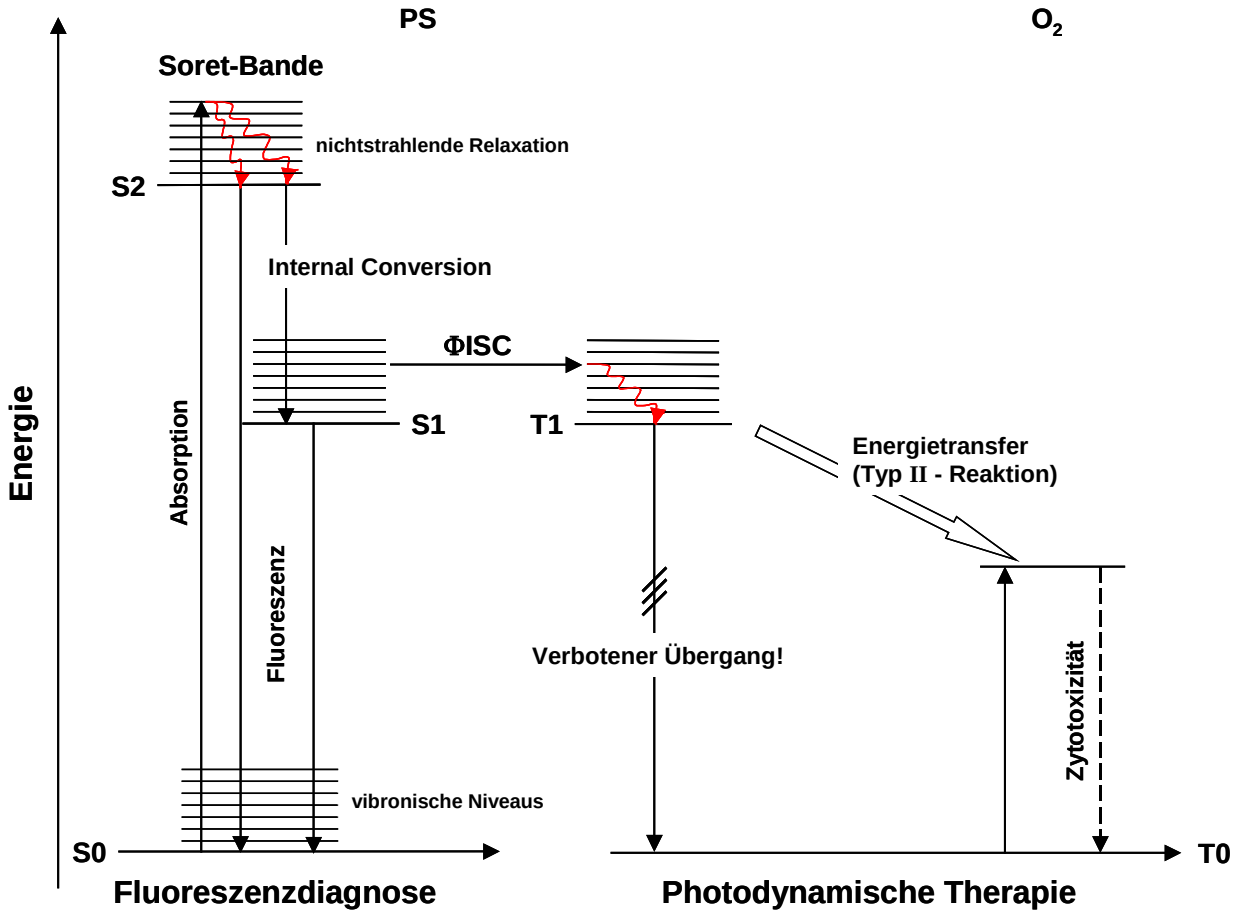

Abb. 1.1 Jablonski-Diagramm: Molekulare Energieniveaus und Elektronenübergänge für die FD und die PDT

Oft ist die Anregung höherer elektronischer Zustände auch mit der Anregung von Molekülschwingungen verbunden, d. h. jedem Energiezustand S_n können weitere sogenannte vibronische Niveaus zugeordnet werden. Daher setzt sich das Absorptionsspektrum eines PS-Moleküls aus zahlreichen Übergängen von S0 nach S_n und deren vibronischen Niveaus zusammen, was in der Regel zu breiten und sich überlappenden Absorptionsbanden führt. Durch Kollisionen mit anderen Molekülen kommt es zu einer begrenzten Energieabgabe durch Wärme innerhalb des angeregten Zustandes auf den tiefsten, schwingungsfreien angeregten Zustand. Dieser Abstieg über die vibronischen Niveaus erfolgt im Femtosekundenbereich (10^{-15} s). Im Anschluss daran kann die spontane Emission eines neu entstandenen Photons ($h \cdot \nu_2$) erfolgen, wodurch das Molekül wieder in seinen Grundzustand (S0) gelangt. Diesen Prozess bezeichnet man als Fluoreszenz (vgl. Gl. 1.2).

$$PS^*(\uparrow\downarrow) \longrightarrow PS(\uparrow\downarrow) + h \cdot \nu_2 + \text{Energierest} \qquad \text{(Gl. 1.2)}$$

Die entsprechenden Vorgänge sind im erweiterten Jablonski-Diagramm (vgl. Abb. 1.1) dargestellt.

Durch den Energieverlust beim Abstieg sowohl über die vibronischen Niveaus als auch durch den Abstieg auf einen niedriger angeregten elektronischen Zustand (z. B. S1) ist die Absorptionsenergie gewöhnlich immer größer als die Emissionsenergie. Daher ist die Wellenlänge des emittierten Photons (ν_2) gegenüber der Anregung (ν_1) stets zu längeren Wellenlängen hin verschoben. Dieses Phänomen wird als „Stokes-Verschiebung“ bezeichnet.

Die Effizienz der Fluoreszenzemission wird Fluoreszenzquantenwirkungsgrad genannt und bezeichnet die Anzahl von Fluoreszenzphotonen pro 100 absorbierter Photonen.

1.3.2 Fluoreszenzdiagnostik

Bei der FD wird die Gewebedignität durch den Nachweis tumorselektiver Unterschiede der Intensität und des spektralen Verlaufs der Fluoreszenz beurteilt. Man unterscheidet eine gewebeeigene (intrinsische) Fluoreszenz, die man auch als Autofluoreszenz (AF) bezeichnet, von der Fluoreszenz, die durch Verabreichung eines Fluoreszenzfarbstoffs (Xenofluoreszenz) erzeugt wird.

In Anlehnung an die PDT wird für die fluoreszenzgestützte Diagnostik oft der Begriff „Photodynamische Diagnostik“ (PDD) verwendet. Dabei ist aber genau genommen der „dynamische Effekt“ der PDT, nämlich die Anregung des PS in den Triplett-Zustand (Elektronenspin-Quantenzahl S = 1) und von hier ausgehend die Bildung von reaktivem Singulett-Sauerstoff, ohne Belang und sogar als konkurrierender Prozess eher störend (vgl. Kap. 1.3.3). Ebenso ist die damit verbundene Phototoxizität unerwünscht. Für eine fluoreszenzgestützte Diagnostik werden daher niedrigere Anregungsintensitäten verwendet als für die PDT. Besser sollte also anstelle von PDD der Begriff „Fluoreszenzdiagnose“ oder „Fluoreszenzdiagnostik“ (FD) verwendet werden [1].

1.3.3 Photodynamische Therapie

Zusätzlich zu den unter Kap. 1.3.1 beschriebenen Energieübergängen in Molekülen ist beim PS ein direkter Energietransfer auf einen geeigneten Partner möglich, in der Regel molekularer Sauerstoff. Dazu ist es notwendig, dass das PS-Molekül strahlungslos von dem kurzlebigen Singulett-Zustand durch Umklappen des Elektronenspins in einen langlebigen Triplett-Zustand (T1) übergeht. Dies wird als Intersystem Crossing (ISC) bezeichnet (vgl. Abb. 1.1).

$$PS^*(\uparrow\downarrow) \xrightarrow{ISC} PS^*(\uparrow\uparrow) \qquad \text{(Gl. 1.3)}$$

Der Triplett-Zustand weist dann im Gegensatz zu dem Singulett-Zustand parallele Elektronen-Spins auf (vgl. Gl. 1.3).

Im Gegensatz zum Singulett-Zustand ist ein strahlender Übergang vom Triplett-Zustand in den Grundzustand des PS-Moleküls nicht möglich. Die quantenmechanische Ursache hierfür liegt darin, dass die Emission eines Photons nur bei einer gleichzeitigen Erhaltung des Elektronen-Spins des PS-Moleküls erlaubt ist. Dies hat zur Folge, dass die Halbwertszeit des Triplett-Zustands mit einer Mikrosekunde bis zu einigen Sekunden deutlich länger ist als die mittlere Fluoreszenzlebensdauer des Singulett-Zustands.

Vom Triplett-Zustand aus finden in Gegenwart geeigneter Substrate Elektronen- und Energietransferreaktionen statt, die als Typ I- bzw. Typ II-Reaktionen bezeichnet werden und zur Entstehung von hochreaktiven Singulett-Sauerstoff führen. Bei der Typ I-Reaktion fungieren die angeregten PS-Moleküle als Elektronendonoren oder –akzeptoren für Substrat- oder Sauerstoffmoleküle und erzeugen hierbei hochreaktive Radikale (z. B. O_2-). Diese führen zur Oxidation verschiedenster Biomoleküle und letztlich zu einer Zellschädigung.

Für die PDT ist die Typ II-Reaktion (vgl. Abb. 1.1) von sehr großer Bedeutung. Hier findet ein direkter Transfer elektronischer Anregungsenergie vom PS-Molekül auf ein Sauerstoffmolekül statt. Dabei erfolgt gleichzeitig ein Übergang des PS-Moleküls vom angeregten Triplett-Zustand in den Singulett-Grundzustand und ein Übergang des Sauerstoffmoleküls vom Triplett-Grundzustand in den angeregten Singulett-Zustand (vgl. Gl. 1.4).

$$PS^*(\uparrow\uparrow) + O_2(\uparrow\uparrow) \longrightarrow PS(\uparrow\downarrow) + O_2^*(\uparrow\downarrow) + \text{Energierest} \qquad \text{(Gl. 1.4)}$$

In beiden Fällen ändert sich somit der Elektronenspin, was physikalisch einem erlaubten Übergang entspricht. Sauerstoff ist eines der wenigen Moleküle, dessen Grundzustand ein Triplett-Zustand darstellt. Nach der Relaxation des PS-Moleküls in den Grundzustand (S0) ist es wieder bereit neue Photonen zu absorbieren, um den Zyklus weiter fortzusetzen.

Eine direkte Anregung des molekularen Sauerstoffs in den reaktiven Singulett-Zustand durch Bestrahlung mit Licht ist nicht möglich, sondern kann nur über den PS vermittelt werden, der somit wie ein Katalysator wirkt.

Die Übertragungsrate ϕ_{ISC} (vgl. Abb. 1.1) bestimmt den Anteil des absorbierten Lichts, der zur Besetzung des Triplett-Zustands verwendet wird. Die Menge des angeregten Sauerstoffs ist abhängig von dem Sauerstoffangebot in der Umgebung des PS und von dessen Molekülparametern. Ziel ist es, möglichst viel angeregten Singulett-Sauerstoff für die PDT zur Verfügung zu haben.

Angeregter Singulett-Sauerstoff ist ein hochreaktives Molekül, das zu ähnlichen Oxidationsmechanismen wie bei der Typ I-Reaktion führt (vgl. Gl. 1.5).

$$O_2^*(\uparrow\downarrow) + \text{Substratmolekül} \longrightarrow \text{Substrat-Oxid} \qquad \text{(Gl. 1.5)}$$

Die primären Oxidationsprodukte sind häufig instabil und damit Ausgangsprodukte für zahlreiche Folgereaktionen. Aus der Oxidation der Biomoleküle resultiert eine Änderung ihrer physiologischen Funktion bzw. eine Minderung der funktionellen Integrität gesamter Zellbestandteile, die in Summe direkt oder indirekt zu einer letalen Zellschädigung führen kann. Man unterscheidet zwischen der Nekrose, bei der die Zellen lysiert d. h. aufgelöst werden und der Apoptose, einem aktiven Zell-"Selbstmord", der über ein Programm abläuft. Die Art der Zellschädigung ist außerdem abhängig vom verwendeten PS. Bei der 5-ALS-PDT sind vor allem mitochondriale Schädigungen der Auslöser für den Zelltod. Es kommt zur Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und der Elektronen-Transport-Enzyme sowie zur Verminde-

rung des zellulären ATP-Spiegels [162]. Die “Energieladung“ der Zelle mit ATP scheint dabei ein wichtiger Parameter bei der Entscheidung zwischen Apoptose und Nekrose zu sein [117].

Der Singulett-Sauerstoff greift auch das PS-Molekül selbst an und bildet sogenannte Photoprodukte. Dies ist in der Regel mit einer Veränderung oder dem Verlust der therapeutischen Wirksamkeit und der Fluoreszenzfähigkeit verbunden. Wenn die Fluoreszenz durch die photooxidative Reaktion des Singulett-Sauerstoffs mit dem PS-Moleküls verloren geht, spricht man vom Ausbleichen oder auch Photobleaching des PS (vgl. Gl. 1.6).

$$PS(\uparrow\downarrow) + O_2{}^*(\uparrow\downarrow) \longrightarrow \text{PS-Oxid} \qquad \text{(Gl. 1.6)}$$

1.3.4 Natürliche Photosensibilisatoren

Die Mehrzahl der bekannten PS zeigen auch Fluoreszenz. Die PS sind zudem besonders dann geeignete Kandidaten für eine klinische Anwendung, wenn sie sich selektiv im Tumorgewebe akkumulieren. In diesem Fall kann ihre Fluoreszenz zur kontrastreichen Sichtbarmachung von Tumoren, insbesondere der sonst schwer erkennbaren Tumorfrühstadien nutzbar gemacht werden. Diese Tumorselektivität ist eine der wichtigsten Eigenschaften der PS. Die anschließende Bestrahlung des Gewebes sollte mit einer Wellenlänge durchgeführt werden, die im Bereich des absoluten Absorptionsmaximums (Soret-Bande, vgl. Abb. 1.1) des PS liegt. Dies ermöglicht eine optimale Aktivierung der Fluoreszenz des PS und somit die exakte Tumorlokalisation und Abgrenzung vom gesunden Gewebe. Ein PS kann topisch, also lokal oberflächlich, oder systemisch, z.B. durch Injektion oder auch oral, appliziert werden.

PS werden sowohl vom Tumor- als auch vom gesunden Gewebe aufgenommen; der sogenannte Akkumulationsindex liegt für die meisten PS zwischen 2:1 und 5:1. Er ist definiert durch die Akkumulation im Tumorgewebe bezogen auf die im gesunden Gewebe.

Die tumorselektive PS-Akkumulation erfolgt durch unterschiedliche Mechanismen [121, 159]:

- Affinität vieler PS zu Low-density-Lipoproteinen bedingt die Endozytose der LDL-assoziierten PS im Tumorgewebe
- verstärkte Aufnahme durch Makrophagen und Tumor-assoziierte Monozyten
- erhöhte Zufuhr aufgrund von Tumorneovaskularisierung
- erhöhte Retention aufgrund von verminderter Löslichkeit im sauren Milieu des Tumorgewebes
- verminderter Abtransport aufgrund unterentwickelter Tumorlymphgefäße

Die Aufnahmemechanismen sind PS-abhängig und in manchen Fällen nur unzulänglich bekannt. Die Entwicklung neuer und immer besserer PS hat dazu geführt, dass man mittlerweile zwei Generationen von PS unterscheidet, die in Abb. 1.2 verglichen werden.

PS-Entwicklung

1. Generation

- v.a. Hämatoporphyrinderivat (HPD) oder Photofrin I® und Dihämatoporphyrinester und –äther (DHE) oder Photofrin II®
- Absorptionsmaximum bei ca. 400 nm
  - Anregung der maximalen Fluoreszenz bei der FD
- weitere Maxima mit abnehmender Intensität bei 500, 525, 560 und 630 nm
  - PDT bei 630 nm, da größte optische Penetrationstiefe von 1 bis 6 mm
- sehr lange kutane Photosensibilisierung (6 – 8 Wochen)
  - Einschränkung der klinischen Anwendung der PDT

2. Generation

- v.a. Benzoporphyrinderivat (BPD); auch Zink-Phthalozyanin, Aluminiumchlorsulfophthalozyanin, meso-Tetraphenylporphyrine, Chlorine, Purpurine und kationische Farbstoffe
- schnelle Anreicherung im Tumorgewebe als HPD und DHE
- kürzere kutane Photosensibilisierung von 1 – 2 Tagen
- Absorptionsbanden im langwelligen Bereich
  - größere Penetrationstiefe des Lichts möglich (4 – 9 mm)
  - auch PDT von dickeren Tumoren möglich

Abb. 1.2 PS-Generationen und ihre Eigenschaften

Im Folgenden werden die PS PpIX und Hypericin (HYP) detailliert beschrieben, da sie im Rahmen der Untersuchungen Bestandteil dieser Arbeit sind.

1.3.4.1 Protoporphyrin IX

Bei den tumorselektiven Substanzen wird derzeit der 5-ALS eine entscheidende Rolle zugemessen. Sie ist zunächst eine körpereigene Substanz und Ausgangsprodukt der intrazellulären Hämbiosynthese. Nach mehreren Reaktionsschritten werden in den Mitochondrien und im Cytosol endogene Porphyrine, in erster Linie das PpIX, synthetisiert. Dies ist das entscheidende Fluorochrom, das während der fluoreszenzdiagnostischen Untersuchung nachgewiesen wird. Der Ablauf der Hämbiosynthese zur Bildung des Fluorochroms PpIX ist in Abb. 1.3 schematisch dargestellt.

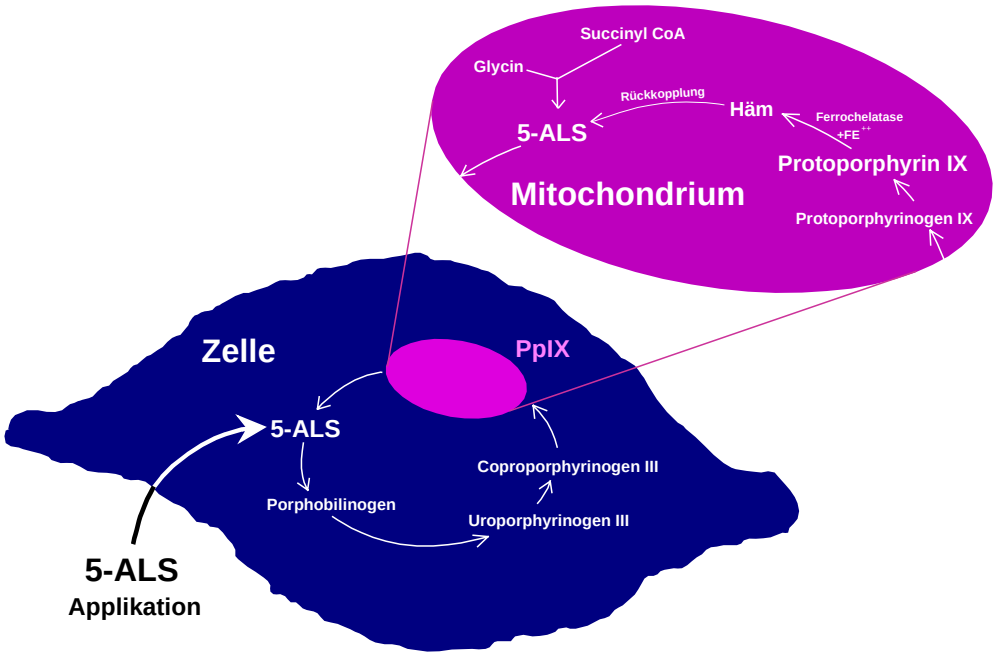

Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Hämbiosynthese

Eine fluoreszenzdiagnostische Untersuchung gelingt allerdings nur, wenn den befallenen Organen 5-ALS in ausreichender Konzentration zugeführt wird. Dabei ist oft eine oberflächliche d. h. topische Applikation möglich und die klinisch praktikabelste Lösung [82].

Die Vorteile der Applikation von 5-ALS liegen in der schnellen Metabolisierung, der topischen Applizierbarkeit und dem hohen Fluoreszenzkontrast zwischen Tumor- und Normalgewebe und somit in ihrer hohen Tumorselektivität. Da 5-ALS selbst nicht fluoresziert, bewirkt eine systemische Verteilung von 5-ALS keine unspezifische Fluoreszenz aus dem

Interstitium oder dem Gefäßsystem. Die PpIX-Akkumulation besitzt eine hohe Gewebeselektivität. Die zur Auslösung der Porphyrinakkumulation benötigte 5-ALS Dosis für Bindegewebe und Muskelgewebe ist höher als diejenige für epitheliales Gewebe. Deshalb ist auch keine unspezifische PpIX-Fluoreszenz aus der Gewebetiefe zu berücksichtigen, die den Fluoreszenzkontrast verschlechtern könnte [63].

Das Absorptionsspektrum von PpIX weist ein Maximum im violettblauen Wellenlängenbereich bei ca. 412 nm auf (vgl. Abb. 1.4), das als Soret-Bande bezeichnet wird. Daneben gibt es die Q-Banden, die eine vierfach bis zehnfach niedrigere Absorption als die Soret-Bande aufweisen [50]. Die Fluoreszenzemission von PpIX erfolgt in einer spektral charakteristischen Verteilung im roten Wellenlängenbereich zwischen 600 nm und 730 nm, wobei die Emissionsmaxima bei 635 nm und 705 nm liegen (vgl. Abb. 1.4).

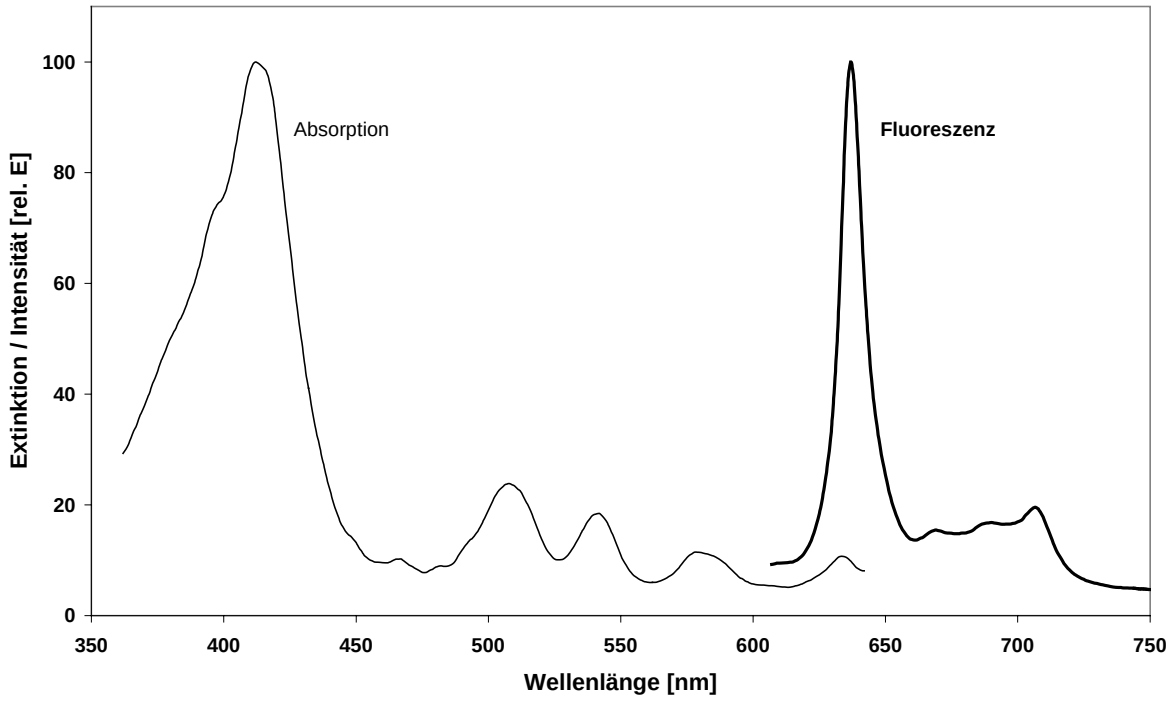

Abb. 1.4 Anregungsspektrum und Fluoreszenzemissionsspektrum von PpIX im Glioblastomgewebe

Die Faktoren, die für eine vermehrte Anreicherung von PpIX im Tumorgewebe (Tumorselektivität) verantwortlich sind, werden derzeit erforscht und konnten bisher nur in Teilaspekten geklärt werden.

Von der Verabreichung von 5-ALS bis zur Bildung des PpIX und seiner weiteren Verstoffwechslung werden mehrere Teilschritte benötigt (vgl. Abb. 1.3), die eine Tumorselektivität bewirken können.

Bei der topischen Applikation von 5-ALS bei der Behandlung von Basalzell- und Plattenepithelkarzinomen, sowie aktinischer Keratose der Haut beschreibt Kennedy et al. [81, 82] als entscheidenden Mechanismus eine tumorbedingt erniedrigte Diffusionsbarriere des Stratum corneum in dysplastisch veränderten Arealen, die das Eindringen und die interstitielle Verteilung von 5-ALS fördern kann.

Auf zellulärer Ebene konnte nachgewiesen werden, dass 5-ALS nicht durch einfache Diffusion über die Zellmembran in den intrazellulären Raum gelangt, sondern eine aktive Aufnahme über ein Transportmembranmolekül wahrscheinlich ist. Die Anzahl und Aktivität der Kanalproteine kann bei Tumorzellen erhöht sein [46].

In einigen in vitro Experimenten ließ sich in entarteten Zellen eine erhöhte Aktivität der Enzymketten von 5-ALS-Dehydratase bis hin zur Uroporphyrinogen-Dekarboxylase nachweisen, die an der Synthese der Zwischenprodukte zum PpIX beteiligt sind [111]. Neuerdings richtet sich das Augenmerk auf die Porphobilinogen-Deaminase (PBGD), die neben ihrer Funktion in der Hämbiosynthese offenbar auch eine wesentliche Rolle während der Zellteilung spielt und damit in proliferierenden Zellen vermehrt exprimiert wird [51, 52].

Die Mitochondrien sind die Schlüssel-Organellen des PpIX-Metabolismus; in ihnen findet der finale Schritt der PpIX-Produktion statt. Das PpIX umwandelnde Enzym Ferrochelatase (FC), das in den inneren Membranen der Mitochondrien lokalisiert ist, spielt hierbei, laut in vitro Untersuchungen, die Krieg et al. [85] durchführte, eine entscheidende Rolle. Die FC-Aktivität kann jedoch nicht direkt mit einer erhöhten bzw. verminderten Fluoreszenz und somit einer Konzentration von PpIX in den Tumorzellen in Verbindung gebracht werden. Es ist vielmehr die Kombination und das Zusammenspiel von FC und PBGD, das die PpIX-Anreicherung als ein Ergebnis des zellulären Stoffwechsels bestimmt [86].

1.3.4.2 Hypericin

Eine weitere Substanz, die zunehmend für die FD eingesetzt wird, ist HYP. Es gehört zur Substanzgruppe der Phenanthroperylenchinone.

Die Wurzeln der Kenntnisse über diese Substanzgruppe liegen in der Antike. Damals unterschied man bereits mehrere Arten der Gattung Hypericum und nutzte sie therapeutisch. Die früheste Erwähnung dürfte bei Nikandros von Kolophon im zweiten vorchristlichen Jahrhundert zu finden sein. Er empfiehlt die „Cheironswurzel“ gegen Vergiftungen durch Tiere [128]. Von der Zeit der griechischen und römischen Autoren über Galenus bis zu Paracelsus und Matthiolus [104] gehörte das Johanniskraut (Hypericum perforatum) ohne Unterbrechung zum Arzneimittelschatz. Seine Anwendungen waren vielfältig und reichten von magischen Praktiken bis zur Wundbehandlung und der Verwendung als Antidepressivum [104, 128], wofür es noch heute verwendet wird.

Das Johanniskraut wächst bevorzugt auf trockenen Wiesen und Hängen. Die Blüte erfolgt von Ende Juni bis September, wobei der Tag Johannes des Täufers (24. Juni) als Beginn der Blütezeit namensgebend war [10, 119].

Unter anderem leiden Tiere, die größere Mengen dieser Johanniskrautblüten gefressen haben, häufig unter der sogenannten Lichtkrankheit (Hypericismus), verursacht durch den PS HYP [3]. Diese Photosensibilisierung ist gekennzeichnet durch Rötung, Schwellung und Nekrosen an nicht behaarter Haut.

Die photodynamischen Wirkungen von Hypericum wurden zunächst zu Beginn des letzten Jahrhunderts in kausalen Zusammenhang gebracht und unter dem bereits genannten Syndrom Hypericismus zusammengefasst [12, 40, 58].

Erst Mitte des letzten Jahrhunderts konnte der dafür verantwortliche Inhaltsstoff, HYP, von Brockmann aus Hypericum perforatum und Hypericum hirsutum rein isoliert und seine Konfiguration durch Totalsynthese aufgeklärt werden [13, 14, 15, 16, 17, 40]. Der Name HYP wurde im Rahmen der ersten Isolierung 1911 durch Cerny geprägt [18]. Die photodynamische Wirkung von HYP ist mit der Erzeugung von äußerst reaktiven Singulett-Sauerstoffmolekülen verknüpft [35, 146] (vgl. Kap. 1.3.3).

Eine HYP bezogene PDT induziert Apoptose und Nekrose in einer von der Konzentration des PS und der Lichtdosis der Anregungslichtquelle abhängigen Art und Weise. Der Effekt der Apoptose ist unter anderem mit einer Blockierung der Proteinkinase C assoziiert [143]. Schempp et al. [129] konnte vor kurzem zeigen, dass die HYP-induzierte Apoptose über den Tumor-Necrosis-Factor-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand (TRAIL) und durch die Aktivierung einer Kaskade spezialisierter Enzyme, die sogenannten Caspasen, vermittelt wird.

Der hydrophobe Charakter von HYP führt dazu, dass es in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates lokalisiert werden kann [2]. Bei einer Untersuchung zur HYP-induzierten Fluoreszenz beim Harnblasenkarzinom wurde anhand von zwei Tumorzelllinien eine rasche Aufnahme und eine signifikante Lokalisation von HYP in den Mitochondrien und Lysosomen beobachtet. Die größte Fluoreszenzintensität wurde 2 bis 4 Stunden nach Gabe des PS erzielt [118].

Untersuchungen von Kamuhabwa et al. [77, 78] bestätigen die selektive Anreicherung von HYP beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom an einem Rattentumormodell. Nach intravesikaler Instillation reicherte sich HYP sowohl im Tumor als auch im normalen Urothel an. Von der Submukosa und den Muskelschichten ging keine nennenswerte Fluoreszenz aus. Auch hier ergaben sich die höchsten Fluoreszenzintensitäten 4 Stunden nach der Gabe des PS. Bei einem Vergleich unterschiedlicher PS zeigte HYP das größte Potential bei der intrazellulären Anreicherung in einem Tumormodell (EAT). Die intrazelluläre Konzentration von HYP war dabei um den Faktor 2.5 höher als die des PpIX [99].

Aus den Untersuchungen von Jacobson et al. geht hervor, dass HYP keine Dunkeltoxizität besitzt [71].

HYP ist ein rot fluoreszierender Farbstoff mit einem Emissionsmaximum bei 595 nm [36]. In Abb. 1.5 ist das Anregungsspektrum von HYP-Polyvinylpyrrolidon (HYP-PVP) exemplarisch im Glioblastomgewebe dargestellt, wenn man das Emissionsmaximum bei 600 nm erwartet.

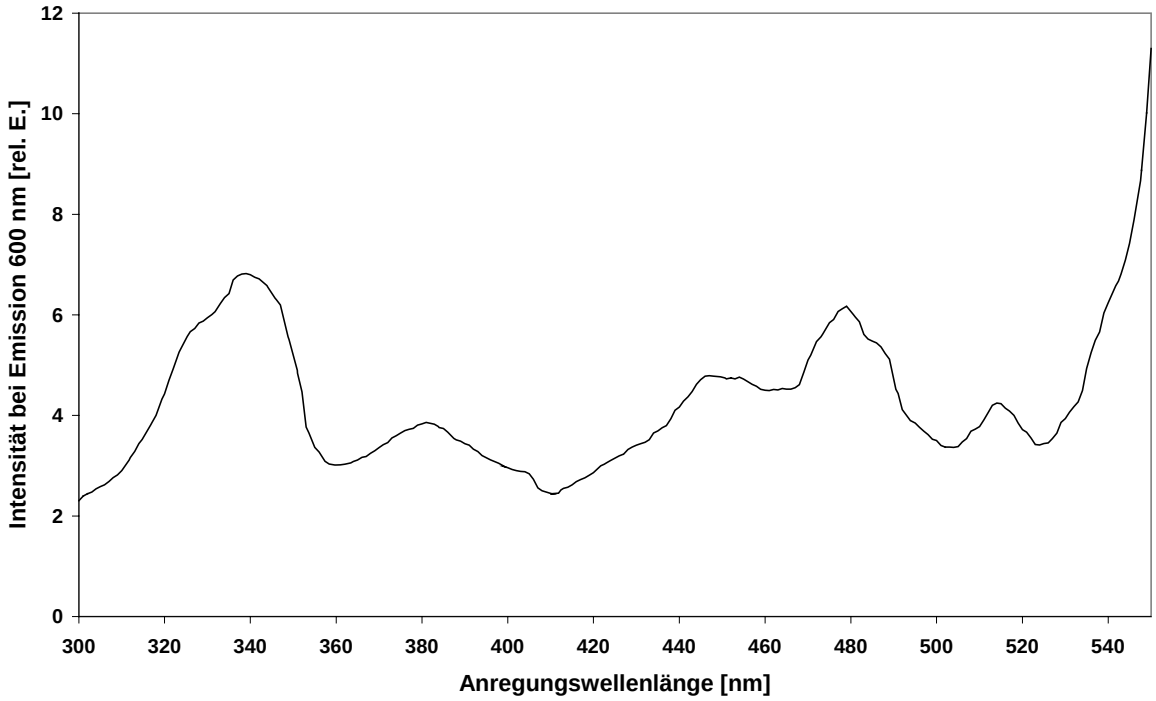

Abb. 1.5 Fluoreszenzanregungsspektrum von HYP-Polyvinylpyrrolidon (HYP-PVP) im Glioblastomgewebe

1.4 Biologische Wirkung optischer Strahlung

Wie eingangs bereits erwähnt, beruhen die Verfahren der FD und die PDT auf der Wechselwirkung von Licht einer geeigneten Wellenlänge mit einer tumorselektiv angereicherten Substanz. In diesem Kapitel wird auf die biologische Wirkung des Lichts näher eingegangen.

Das Licht ist Teil der elektromagnetischen Strahlung, deren Quantumenergie nicht ausreicht, um ein Atom zu ionisieren, man spricht daher von nicht ionisierender Strahlung (NIS). Das Spektrum der NIS umfasst die elektromagnetischen Felder mit einer Wellenlänge von unendlich bis 1 mm und die optische Strahlung mit einer Wellenlänge von 1 mm bis 100 nm (vgl. Abb. 1.6).

Für den Schutz vor optischer Strahlung ist nur der Bereich von Bedeutung, in dem die Luft durchlässig ist, also von etwa 180 nm bis 1 mm. Die Schadensmechanismen, die von der Strahlung in diesem Bereich ausgehen, hängen von verschiedenen Parametern wie der Leistungsdichte, Energiedichte, Einwirkungsdauer und nicht zuletzt der Wellenlänge ab.

Als grobe Einteilung des optischen Spektralbereiches wurden UV, das sichtbare Licht (VIS) und die Infrarot-Strahlung (IR) eingeführt. UV und IR werden, hauptsächlich wegen der Wellenlängenabhängigkeit der biologischen Wirkung in diesen Spektralbereichen, zusätzlich feiner unterteilt [142].

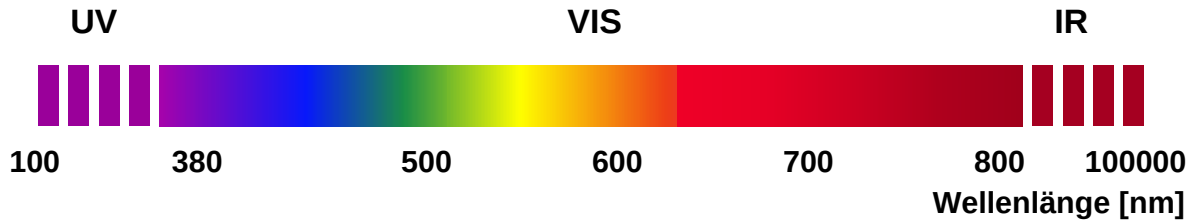

Abb. 1.6 Schematische Darstellung des optischen Spektralbereichs

Die biologische Wirkung optischer Strahlung ist in der Literatur fast ausschließlich nur für die Oberflächenorgane Auge und Haut beschrieben. Daher wird bei der folgenden Abhandlung vom Einfluss der optischen Strahlung auf diese Organe ausgegangen.

1.4.1 Ultraviolette Strahlung

Die kurzwellige Grenze des UV-Spektralbereiches liegt nach Norm [28] bei einer Wellenlänge von 100 nm. Die langwellige Grenze des UV-Spektralbereiches zum VIS wird in den Normen [28, 69] entweder mit 380 nm oder 400 nm angegeben. Diese Grenze ist im Prinzip physiologisch durch die Grenze des durch die Strahlung hervorgerufenen Seheindruckes bestimmt. Die Netzhaut ist auch für Wellenlängen unter 380 nm empfindlich. Die Transmission der vorderen Augenmedien, insbesondere bei älteren Menschen, nimmt jedoch unterhalb 400 nm stark ab [101, 102]. Daher ist die genaue Festlegung der Grenze zwischen dem VIS- und dem UV-Spektralbereich insofern willkürlich, da sie von der angenommenen Schwelle des Sinneseindruckes abhängt. Die Augenempfindlichkeitskurve ist von der CIE [110] bis herab zu 380 nm definiert. Die spektrale Verteilung der Augenempfindlichkeit für Tages- und Nachtsehen ist in Abb. 1.7 dargestellt [142].

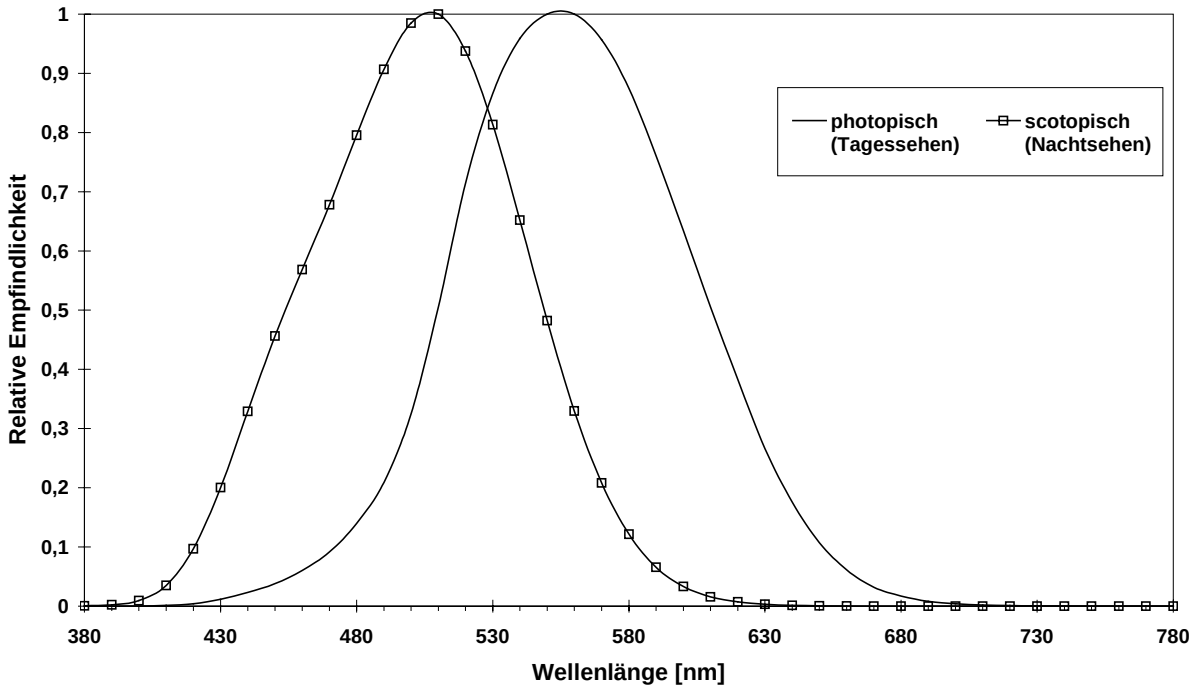

Abb. 1.7 Spektrale Verteilung der Augenempfindlichkeit [142]

Die starke Zunahme der Absorption aller biologischen Gewebe zu kürzeren Wellenlängen hin bewirkt, dass die Strahlung in einer immer dünneren Oberflächenschicht der Haut bzw. des Auges absorbiert wird. Damit ändert sich die Stelle der Einwirkung und die biologische Wirkung. Aufgrund dieser Zusammenhänge wird der UV-Spektralbereich in UV-A, UV-B und UV-C eingeteilt [28]. Das UV-C erstreckt sich bis 100 nm Wellenlänge. Unterhalb von 200 nm Wellenlänge fängt jedoch der Sauerstoff in der Luft an zu absorbieren, so dass unterhalb 180 nm Wellenlänge eine freie Ausbreitung von UV-Strahlung in Luft praktisch nicht mehr möglich ist. Für Probleme der Strahlungssicherheit braucht man daher den Spektralbereich zwischen 100 nm und 180 nm nicht zu betrachten [133].

UV-Strahlung kann zur Bildung freier Radikale beitragen, die sehr reaktionsfreudig sind und Zellen destabilisieren können. Außerdem sensibilisiert eine Reihe von Medikamenten und chemischen Verbindungen (PS) biologisches Gewebe für die Wirkung von UV-Strahlung [142], so dass schon für Bestrahlungen, die weit unterhalb der sonst geltenden Grenzwerte liegen, starke biologische Reaktionen, sogenannte phototoxische Reaktionen, auftreten können (vgl. Kap. 1.3.3).

1.4.1.1 Spektralbereich des UV-A

Der Spektralbereich des UV-A erstreckt sich von 315 nm bis 380 nm. In diesem Bereich dringt die Strahlung bei schwacher Pigmentierung (Bräunung) noch wenige Millimeter tief in die Haut ein. Im Auge wird sie hauptsächlich in der Linse absorbiert. Die biologische Wirkung der Strahlung manifestiert sich in einer Sofortpigmentierung der Haut ohne vorherige Erythembildung (Hautrötung, Sonnenbrand) bzw. in der Bildung eines Katarakts (Grauer Star) in der Linse. Aus Tierversuchen gibt es Hinweise, dass UV-A-Strahlung auch maligne Melanome erzeugen kann [142].

1.4.1.2 Spektralbereich des UV-B

Der Spektralbereich des UV-B schließt sich an das UV-A an und reicht von 280 nm bis 315 nm. Die hauptsächliche biologische Wirkung der Strahlung in diesem Bereich ist die Erythembildung, die ein recht schmales Maximum ihrer Wirkungsfunktion bei 297 nm hat. Die Wirkungsfunktion für die Erythembildung folgt im Wesentlichen der DNS-Absorption. Mit dem Abklingen der Hautrötung entsteht als Folge des Erythems eine sekundäre d. h. eine verzögerte Pigmentierung der Haut. Am Auge kann UV-B-Strahlung eine Photokeratitis, dies ist eine Entzündung der Hornhaut des Auges, erzeugen [163, 164]. Ebenso können durch UV-B-Strahlung beispielsweise Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 entstehen, die Hautkrebs zur Folge haben. Die Wirkungsfunktion für die Entstehung von Hautkrebs folgt im Wesentlichen der Erythemkurve [142].

1.4.1.3 Spektralbereich des UV-C

Der Spektralbereich des UV-C erstreckt sich von 180 nm bzw. von 100 nm nach der Definition der CIE bis 280 nm. In diesem Gebiet ist die Absorption aller biologischen Gewebe so stark, dass die Strahlung nur noch in eine sehr dünne Oberflächenschicht eindringen kann. Die bereits im UV-B einsetzende Photokeratitis-Bildung hat hier ihr Wirkungsmaximum bei 270 nm. Nur wenig unterhalb, bei 260 nm, hat die Wirkungsfunktion für die Photokunjunktivitis, die Entzündung der Bindehaut des Auges, ihr Wirkungsmaximum [142].

UV-Strahlung wirkt beispielsweise auch auf das Zellwachstum, von Stimulation bis hin zu einer dauerhaften Zellschädigung, wie sie zur Bakterientötung ausgenutzt wird, deren Wirkungsmaximum bei 265 nm liegt [29].

1.4.2 Sichtbare Strahlung

Wie der Name schon sagt, erstreckt sich der Spektralbereich der VIS-Strahlung über den Wellenlängenbereich, dessen Strahlung in der Lage ist, einen Licht- oder Seheindruck im Auge zu erzeugen (vgl. Abb. 1.7). Da die Grenzen, abhängig von der angenommenen Schwellenempfindlichkeit, fließend sind, findet man für sie verschiedene Wellenlängenangaben; meist wird als untere Grenze 380 nm und als obere Grenze 780 nm verwendet [28].

Hinsichtlich der biologischen Wirkung der Strahlung muss man für das VIS zwei hauptsächliche Wirkmechanismen unterscheiden. Im kurzwelligen Teil des VIS sind es photochemische Prozesse, die für lange Einwirkzeiten die Schadensgrenze bestimmen. Im langwelligen Teil des VIS dagegen ist es hauptsächlich die Wärmewirkung der im Gewebe absorbierten Strahlung, die schließlich bei zu hoher Bestrahlungsstärke zu einer Schädigung führt [142].

Die Wirkungsfunktion für photochemische Schäden, die sogenannte Blaulicht-Gefährdung, eine Schädigung der Netzhaut des Auges, hat im Bereich um 435 nm bis 440 nm ihr Maximum und fällt oberhalb 500 nm schnell ab [22].

1.4.3 Infrarote Strahlung

Der IR-Spektralbereich schließt sich an das VIS an und reicht bis zur Grenze zum Mikrowellengebiet, die bei 1 mm Wellenlänge festgelegt ist. Die schädigende Wirkung der IR-Strahlung ist rein thermisch, jedoch ergeben sich infolge des Absorptionsverhaltens der Gewebe wellenlängenabhängige Eindringtiefen der Strahlung und damit unterschiedliche Gefährdungen und wellenlängenabhängige Grenzwerte [142].

Ähnlich wie der UV-Spektralbereich wird der IR-Spektralbereich nach DIN 5031 Teil 7 [28] auch in drei Teilbereiche unterteilt. Der IR-A-Bereich erstreckt sich von 780 nm bis 1400 nm, der IR-B-Bereich von 1400 nm bis 3000 nm und der IR-C-Bereich von 3000 nm bis zu 1 mm Wellenlänge.

1.4.4 Richtlinien und Grenzwerte

Wie bereits aufgeführt beziehen sich alle derzeit geltenden Richtlinien und Grenzwerte auf die Exposition von Strahlung auf die Haut oder auf das Auge. Ausgehend von diesen bestehenden Grenzwerten soll auch für andere Organe, z. B. die Harnblase, eine Risikoabschätzung der Bestrahlung durchgeführt werden.

Zur Beurteilung einer möglichen schädigenden Wirkung der optischen Strahlung ist der Vergleich von den gemessenen Bestrahlungswerten mit den international gültigen Grenzwerten notwendig. Die wichtigsten und etabliertesten Richtlinien wurden veröffentlicht von den Gremien:

- Am. Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) [4]
- Int. Commission on Non-Ionizing Radiation Protection of the International Radiation Protection Association (ICNIRP (IRPA)) [67, 68]
- Commission International de l'Eclairage (CIE) [23]

Da die biologische Wirkung stark von der Wellenlänge der Strahlung abhängt, ist zur Ermittlung von Grenzwerten das Spektrum der inkohärenten Lichtquelle je nach Gewebeart mit unterschiedlichen biologischen Faktoren zu gewichten. In den internationalen Richtlinien werden folgende Bewertungskurven, auch als Gewichtungskurven oder Wirkungsfunktionen bezeichnet, verwendet:

- UV-A Bewertung nach ACGIH und ICNIRP zur wellenlängenabhängigen Bewertung der Strahlung für eine Untersuchung der schädigenden Wirkung auf die Linse des Auges [4, 68]
- s_λ-Bewertung nach ACGIH und ICNIRP zur wellenlängenabhängigen Bewertung der Strahlung für eine Untersuchung der schädigenden Wirkung auf die Hornhaut des Auges und auf die Haut [4, 68]
- Erythemale Bewertung nach CIE zur wellenlängenabhängigen Bewertung der Strahlung für eine Untersuchung der schädigenden Wirkung auf die Haut [23]

Diese Bewertungskurven beschreiben die relative Empfindlichkeit der unterschiedlichen Gewebe gegenüber der Bestrahlung mit verschiedenen Wellenlängen (vgl. Abb. 1.8).

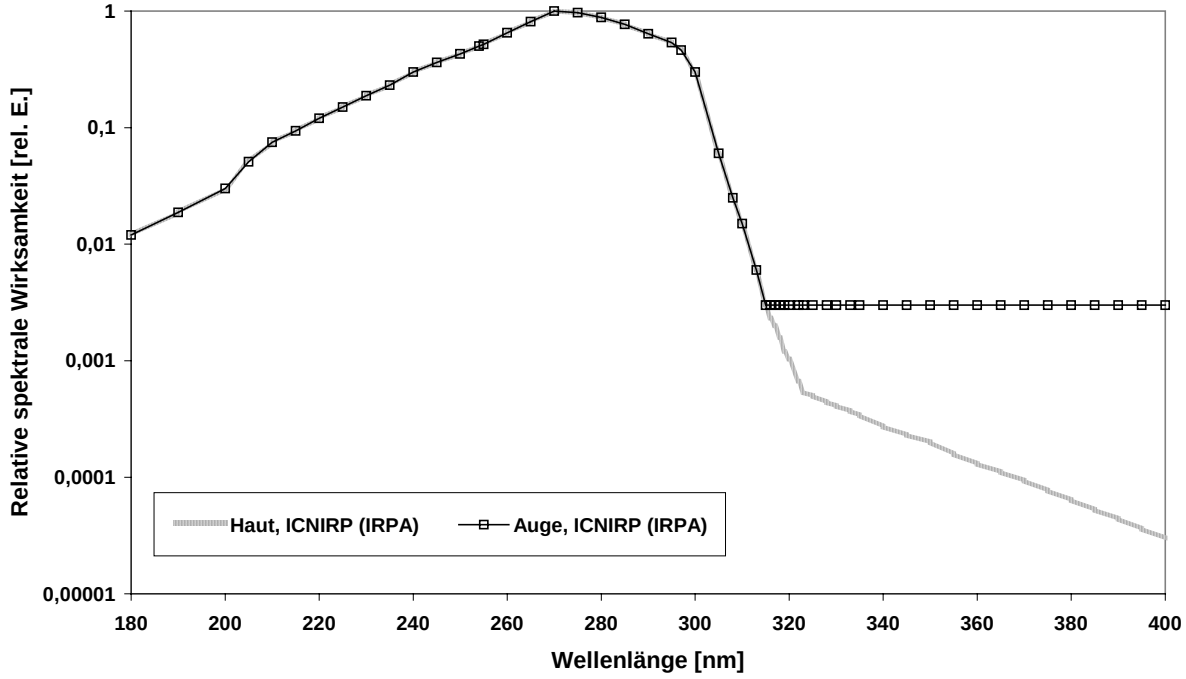

Abb. 1.8 Relative spektrale Wirksamkeit s(λ) gemäß ACGIH und ICNIRP [4,68]

Das gemessene Spektrum der inkohärenten Lichtquelle ist mit der entsprechenden Bewertungskurve zu gewichten, d. h. die gemessenen Werte der spektralen Bestrahlungsstärke E(λ) für jede Wellenlänge ist mit dem korrespondierenden Wert der relativen spektralen Empfindlichkeit S(λ) der entsprechenden Bewertungskurve zu multiplizieren. Diese bewertete spektrale Bestrahlungsstärke wird als effektive spektrale Bestrahlungsstärke $E_{eff}(\lambda)$ bezeichnet (vgl. Gl. 1.7).

$$E_{eff}(\lambda) = E(\lambda) \cdot S(\lambda) \qquad [\mathrm{W/m^2nm}] \qquad \text{(Gl.1.7)}$$

Danach sind die Werte der effektiven spektralen Bestrahlungsstärke aller Wellenlängen über den jeweiligen Wellenlängenbereich der Bewertungskurve zu integrieren. Die Summe aller effektiven spektralen Bestrahlungsstärken im Wellenlängenbereich der Bewertungskurve wird als effektive Bestrahlungsstärke E_{eff} bezeichnet (vgl. Gl. 1.8).

$$E_{eff} = \int_{\lambda 1}^{\lambda 2} E(\lambda) \cdot S(\lambda) \cdot d\lambda \qquad [W/m^2] \qquad (Gl.1.8)$$

Da das Ausmaß der Schädigung von der Bestrahlungsstärke der inkohärenten Lichtquelle und der Expositionsdauer abhängt, werden die Grenzwerte als ein Produkt der effektiven Bestrahlungsstärke und der Expositionsdauer angegeben. Dieses Produkt wird als effektive Bestrahlung H_{eff} oder auch als Dosis bezeichnet (vgl. Gl. 1.9).

$$H_{eff} = \int_{t} E_{eff} \cdot dt \qquad [J/m^2] \qquad (Gl.1.9)$$

Der Grenzwert für die effektive Bestrahlung $H_{eff(GW)}$ (bewertet) durch UV-Strahleneinwirkung auf das Auge und auf die Haut im Wellenlängenbereich von 180 nm bis 400 nm ist festgelegt mit [57]:

$$H_{eff\,(GW)} = 30 \frac{J}{m^2}$$

Der Expositionsgrenzwert für die unbewertete Bestrahlung $H_{(GW)}$ durch UV-Strahleneinwirkung auf das Auge im Wellenlängenbereich von 315 nm bis 400 nm beträgt [57]:

$$H_{(GW)} = 10000 \frac{J}{m^2}$$

Die unbewertete Bestrahlungsstärke E berechnet sich aus der Integration der spektralen Bestrahlungsstärken im Wellenlängenintervall von 315 nm bis 400 nm gemäß Gl. 1.10.

$$E = \int_{315nm}^{400nm} E(\lambda) \cdot d\lambda \qquad [W/m^2] \qquad (Gl.1.10)$$

Bei ermittelter unbewerteter Bestrahlungsstärke E oder effektive Bestrahlungsstärke E_{eff} kann durch die Grenzwerte $H_{(GW)}$ oder $H_{eff(GW)}$ über die Beziehung 1.9 die maximal zulässige Bestrahlungszeit ermittelt werden.

Die eingeführten Beziehungen und Grenzwerte sollen nachfolgend für die Berechnung einer zulässigen Bestrahlungsdosis der Harnblase, der Mundhöhle und des Gehirns verwendet werden.

2 Material und Methoden

Im diesem Kapitel werden im ersten Teil die neuartigen inkohärenten Lichtsysteme, die für die Untersuchungen zur FD eingesetzt wurden, detailliert beschrieben. Ebenso erfolgt die Beschreibung der für diese Untersuchungen verwendeten Versuchsaufbauten.

Im zweiten Teil wird das inkohärente Lichtsystem zur PDT der Harnblase inklusive dem dazu angepassten Applikationskatheter erklärt.

2.1 Neuartiges inkohärentes Lichtsystem für die Fluoreszenzdiagnostik

Bisherige im VIS-Bereich arbeitende Anregungslichtquellen bewirken zum Teil störende Reflexe an feuchten Gewebeoberflächen, die über die Bilderfassungs- und Verarbeitungskette vor allem im Anwendungsbereich der Neurochirurgie zu kritischen diagnostischen Fehlinterpretationen führen können. Zur Anregung der PS PpIX und HYP ist daher ein neuer Ansatz über eine UV-Anregung gewählt worden.

Kernstück des technischen Instrumentariums bildet ein für die Fluoreszenzdiagnostik entwickeltes UV-Hochleistungslichtsystem. Als Basis für dessen Entwicklung wurden zunächst unterschiedliche auf dem Markt befindliche UV-Lampen auf ihre technische Eignung hin untersucht.

2.1.1 Technischer Überblick zu UV-Lampen

Die technisch wichtigsten Lampentypen, die einen nennenswerten Anteil an UV-Strahlung im UV-A-Bereich emittieren, sind:

- Hochleistungs-Glühlampen im Bereich von 500 bis 1000 W
- (Niederdruck-) Quecksilberdampf-Leuchtstoffröhren
- Hochdrucklampen
  - Quecksilber-Hochdrucklampen
  - Halogen-Metalldampf-Hochdrucklampen
  - Bogenlampen

Das Spektrum von Glühlampen enthält selbst bei sehr hoher elektrischer Leistung nur einen relativ geringen UV-Strahlungsanteil von durchschnittlich 12 % bezogen auf die Gesamtlichtleistung [120]. Halogenglühlampen weisen gegenüber normalen Glühlampen einen leicht erhöhten UV-Anteil auf, der jedoch durch eine Verglasung wieder deutlich vermindert wird. Daher sind Glühlampen als UV-Lichtquelle für ein UV-Hochleistungslichtsystem ungeeignet.

In (Niederdruck-) Leuchtstofflampen herrscht ein relativ geringer Druck von 200 bis 300 Pa. Die Lampen sind mit einer Mischung aus einem Edelgas (z. B. Argon) und etwa 1 % Quecksilberdampf gefüllt. Der zur Lichterzeugung notwendige Durchschlag, also das Durchfliegen von Elektronen von der einen zur anderen Elektrode, kann bereits bei einer Wechselspannung von 220 V aufrecht erhalten werden. UV-Strahlung entsteht beim Zurückfallen von dabei in höhere Orbitale angeregte Elektronen aus der Valenzschale der Quecksilber-Atome (sogenannte Spektrallinien des Quecksilbers, z. B. bei 254 nm und 185 nm), welche durch den Gasdurchschlag aktiviert werden. Für den UV-Bereich können bei der Beschichtung von Leuchtstofflampen Leuchtstoffe verwendet werden, die im gewünschten UV-Bereich emittieren. Leuchtstoffröhren werden mit einer sogenannten Schwarzglas-Hülle hergestellt, die sichtbare Emissionen in VIS-Bereich weitgehend sperrt. Die erreichten Bestrahlungsstärken liegen bei ca. 0,5 W/m², gemessen in 1 m Abstand von der Lampenmitte [160]. Aufgrund ihrer erheblichen Baugröße und der damit verbundenen Schwierigkeit, die erzeugte Strahlung zu fokussieren, ist es unmöglich, diese Lampen für den Einsatz in einem endoskopischen UV-Hochleistungslichtsystem zu verwenden.

Hochdrucklampen werden mit verschiedenen Mischungen gefüllt. Die wichtigsten Vertreter sind die Quecksilberdampf-Hochdrucklampe, die Halogen-Metalldampflampe und die Xenon-Kurzbogenlampe. Im Gegensatz zur Glühlampe und zur Leuchtstoffröhre benötigen die meisten Hochdrucklampen Vorschaltgeräte zur Strombegrenzung; sie können also nicht direkt am Netz betrieben werden. Bei den nachfolgend beschriebenen Hochdrucklampen handelt es sich um Lampen, die mit einem Reflektor ausgestattet sind. Die dichroitisch beschichteten Reflektoren erzeugen ein anwendungsspezifisches spektrales Verhalten. Diese Hochdrucklampen werden hauptsächlich in endoskopischen Lichtsystemen verwendet, da das Licht primär in einem kleinen Volumen erzeugt wird und somit auch auf einen kleinen Brennpunkt fixiert werden kann. Auf zusätzliche Fokussierlinsen kann meist verzichtet werden.

Die kompakten Quecksilberdampf-Kurzbogenlampen haben ein kugel- oder ellipsoidförmiges, aus Quarzglas bestehendes Entladungsgefäß, das ein Grundglas und einen definierten Quecksilberanteil enthält. Die Gasmischung erreicht erst während des Betriebes den typischen, hohen Druck. Lampen dieses Typs (z. B. HBO®-Lampen, Osram GmbH, München) geben einen relativ hohen Anteil an UV-Licht ab (vgl. Abb. 2.1). Nach der Zündung läuft zuerst ein etwa 15 Minuten dauernder Einbrennvorgang ab, der durch eine Bogenentladung im Grundgas initiiert wird. Dadurch heizt sich die Lampe auf und das enthaltene Quecksilber verdampft so, dass ein schmaler Bogen mit höherer Leuchtdichte entsteht. Vor Ablauf dieser Einbrennzeit sollte eine derartige Lampe nicht ausgeschaltet werden, da sich sonst die Lebensdauer drastisch verkürzt. Ebenso sollte dieser Lampentyp nie im heißen Zustand erneut gestartet werden. Diese Lampen werden mit einem Vorschaltgerät betrieben; die typische elektrische Leistungsaufnahme liegt im Bereich von 50 bis 500 W. Durch die kompakte Bauform sowie hohe Bestrahlungsstärken im UV-Bereich eignen sich diese Lampen sehr gut als UV-Lichtquelle für ein UV-Hochleistungslichtsystem, obgleich der Einbrennvorgang und die problembehaftete Zündung im heißen Zustand dem optimalen Einsatz in der Endoskopie entgegensteht.

Halogen-Metalldampflampen (z. B. HTI®-Lampen, Osram GmbH, München) weisen als typische VIS-Lampen, gegenüber reinen Quecksilberdampf-Hochdruckstrahlern, nur eine geringe Intensität im UV-B- und UV-A-Bereich auf (vgl. Abb. 2.1). Bei diesem Lampentyp werden Füllungszusätze wie Eisen-, Nickel- und Kobalthalogenide verwendet. Ein kompaktes, eingebautes Entladungsgefäß aus Quarz oder einem modernen Sintermaterial enthält die Mischung, in welcher der Durchschlag auftritt. Neben der kompakten Bauweise erleichtern auch kurze Einbrennzeiten sowie gute Heißstartmöglichkeiten den praktischen Umgang und somit die Eignung als endoskopische Weißlichtquelle.

Xenon-Kurzbogenlampen (z. B. XBO®-Lampen, Osram GmbH, München und Cermax®-Lampen, Perkin Elmer Inc., Wellesley, USA) zeichnen sich durch eine relativ homogene Strahlungsverteilung aus, die vom mittleren UV- bis in den NIR-Bereich reicht. Das kontinuierliche Spektrum weist eine große Ähnlichkeit mit der typischen natürlichen Tageslichtmischung aus direktem Sonnen- und diffusem Himmelslicht auf (vgl. Abb. 2.1). Daher werden diese Lampen bevorzugt als endoskopische Weißlichtquellen eingesetzt.

2.1.2 Vergleich von UV-Lampen für das UV-Lichtsystem

Anhand der Abb. 2.1 ist zu erkennen, dass lediglich zwei Lampen eine ausgeprägte Übertragungscharakteristik im UV-Bereich aufweisen. Die Xenon-Kurzbogenlampe Cermax® EX300-10UV erzeugt einen homogenen spektralen Verlauf im Bereich von 300 nm bis 380 nm. Würde man bei der Quecksilberdampflampe HBO® R103 W45 in diesem Wellenlängenbereich die charakteristischen Peaks abschneiden, so erzielte man die gleiche integrale Lichtleistung entsprechend der Cermax® EX300-10UV.

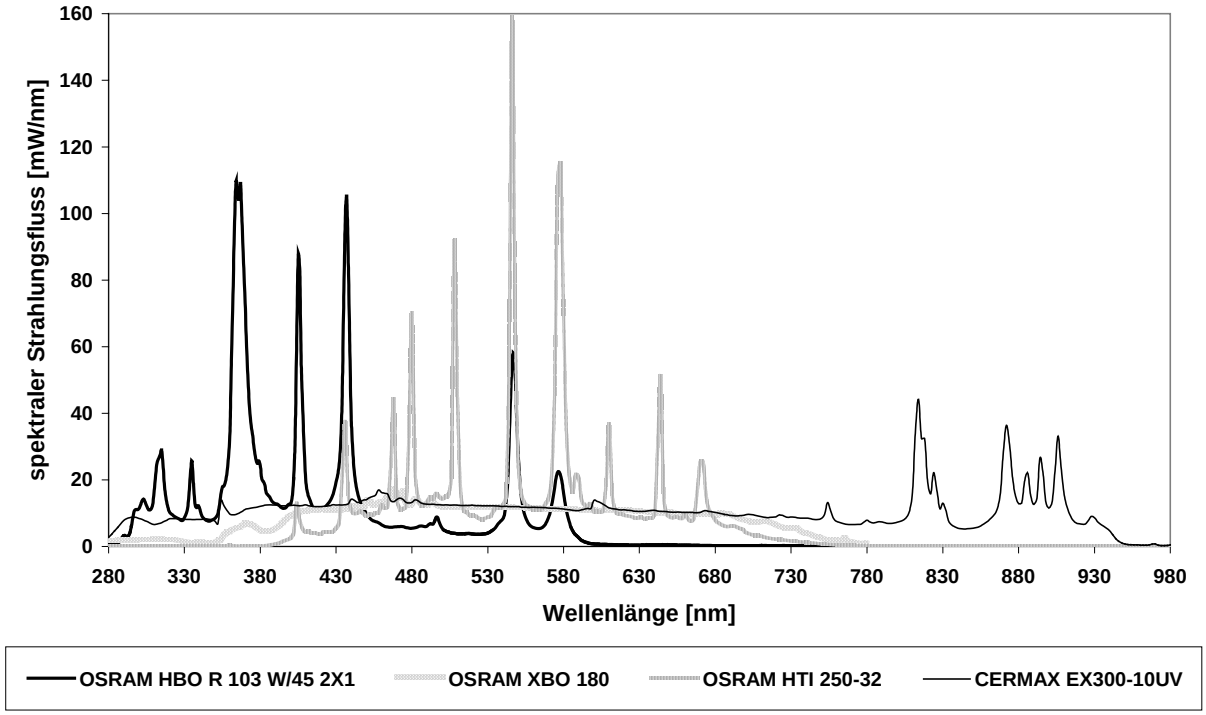

Abb. 2.1 Vergleich der spektralen Verläufe von Hochdrucklampen für das UV-Lichtsystem. Das Spektrum ist jeweils distalseitig am Fluidlichtleiter 495 FR gemessen worden.

Gerade diese typischen Peaks der Quecksilberdampflampe bei 315 nm, 335 nm und 365 nm bewirken aber den leistungsbezogenen Vorteil gegenüber der Xenon-Kurzbogenlampe. Für den Einsatz als UV-Lichtquelle für das UV-Hochleistungslichtsystem wurde daher die Quecksilberdampflampe HBO® R103 W45 als am besten geeignet angesehen.

2.1.3 Inkohärentes UV-Lichtsystem

Die Kernkomponente des UV-Anregungslichtsystems ist die unter Kap. 2.1.2 beschriebene Quecksilberdampflampe HBO® R103 W45. Die Lampe ist mit einem elliptischen Reflektor ausgestattet, der das erzeugte Licht auf einen Brennpunkt von ca. 5 mm Durchmesser fokussiert. Über einen mechanischen Dimmer, der direkt vor der Lampe angebracht ist, kann die Lichtleistung nahezu stufenlos, im Bereich von 0 % bis 100 %, variiert werden.

Da die Lampe ein Spektrum von 280 nm bis 600 nm aufweist, werden unerwünschte Anteile über ein Filtersystem unterdrückt. Um eine maximale Lichtleistung im Wellenlängenbereich von 340 nm bis 380 nm zu erreichen, sind verschiedene UV-Bandpassfilter getestet worden. In Abb. 2.2 ist das Spektrum mit einem kommerziell verfügbaren UV-Bandpassfilter (U-360, Pörschke GmbH, Höchst) dargestellt. Dieses Absorptionsfilter erzielt unter 340 nm keine ausreichende Blockung. Der Peak des Lampenspektrums bei 365 nm wird aufgrund der Transmissionseigenschaften des Filters deutlich reduziert.

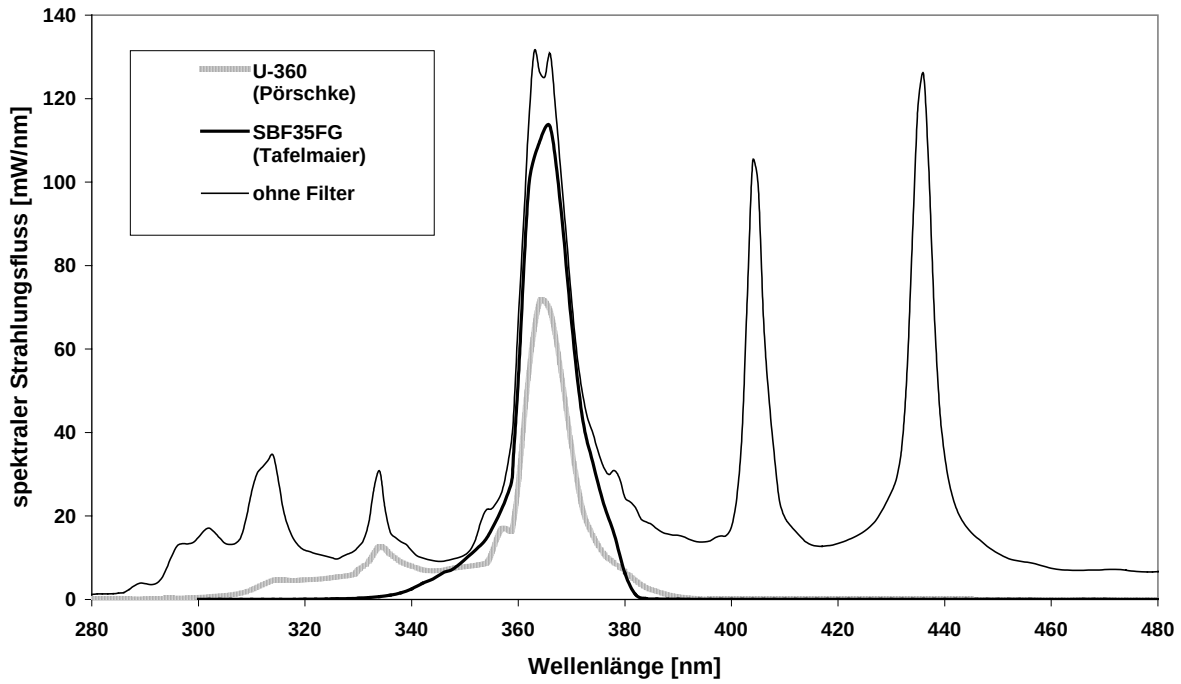

Abb. 2.2 Spektraler Verlauf von UV-Bandpassfiltern. Die Spektren wurden mit der Osram-Lampe HBO R 103 W45 und dem Fluidlichtleiter 495 FR gemessen.

Die hohe Lichtleistung der Quecksilberdampflampe bewirkt außerdem schon nach wenigen Sekunden ein Zerplatzen des Filters und macht es somit für die vorliegende Anwendung ungeeignet.

Ein eigens berechnetes und gefertigtes dichroitisches Bandpassfilter (SBF 35 FG, Dünnschicht Technik, Rosenheim) weist eine maximale Transmission in dem geforderten Spektralbereich auf und führt somit lediglich zu einer geringfügigen Reduzierung des Peaks bei 365 nm. Da die Beschichtung dieses Filters auf einem hochhitzebeständigen Substratmaterial (Borofloat®, Schott Glaswerke, Mainz) erfolgt und ungewollte Strahlungsanteile aufgrund der Interferenzeigenschaft reflektiert werden, kommt es zu keinem Versagen des Filters im optischen Strahlengang der Quecksilberdampflampe.

Um eine maximale Blockung im Bereich größer 385 nm zu erreichen, werden zwei Bandpassfilter SBF 35 FG in den Strahlengang der Quecksilberdampflampe eingesetzt. Zusätzlich werden für den Bereich von 580 nm bis 750 nm, in dem die Fluoreszenz der PS erwartet wird, noch drei weitere Blockfilter (STO 01097, Dünnschicht Technik, Rosenheim) integriert. Diese Blockfilter erhöhen die Blockung in diesem Bereich um ca. eine Zehnerpotenz.

Der spektrale Verlauf der UV-Lichtquelle inklusive Lichtleiter ergibt sich gemäß Abb. 2.3. Die Bestrahlungsstärke ist logarithmisch dargestellt. Deutlich sichtbar ist der ausgeprägte Doppel-Peak im Anregungswellenbereich mit einem Maximum bei 363 nm und bei 368 nm. Bei dem Peak im Bereich von 720 nm bis 770 nm handelt es sich um nicht unterdrücktes Anregungslicht, das für die FD keine Bedeutung hat. Der Peak kann jedoch als Referenzsignal für Vergleichsmessungen herangezogen werden.

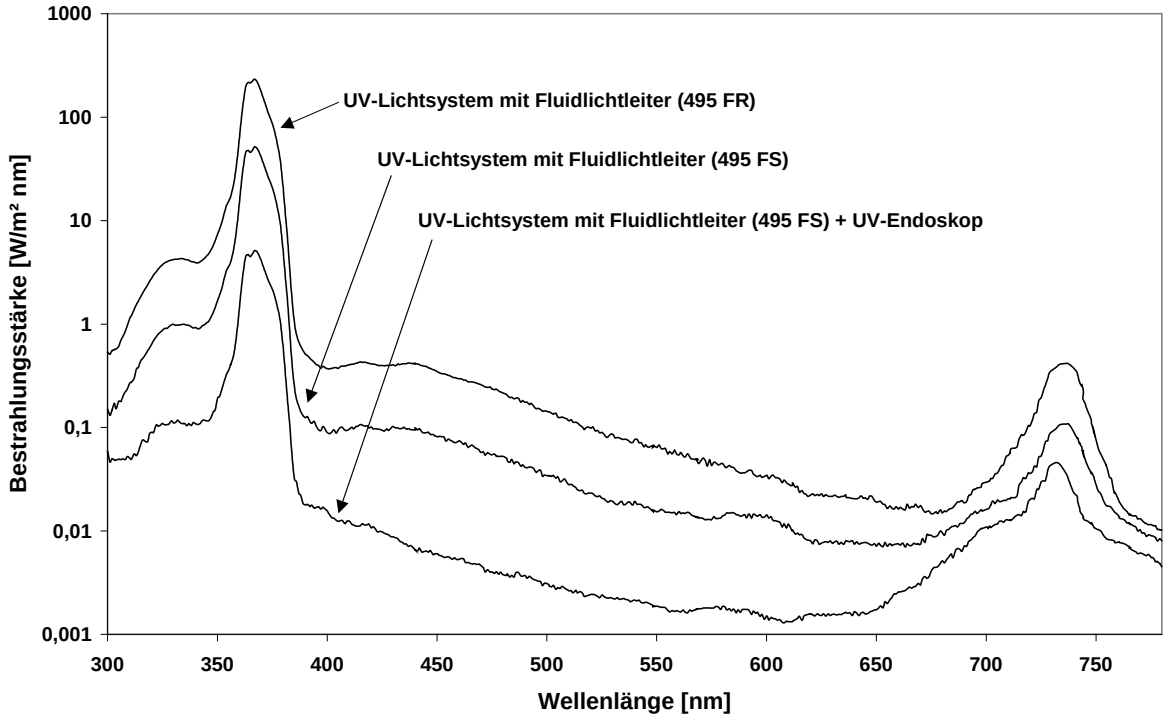

Abb. 2.3 Spektraler Verlauf unterschiedlicher Konfigurationen des UV-Lichtsystems

2.1.4 Lichtleiter

Ein weiterer Bestandteil des UV-Anregungslichtsystems ist ein speziell gefertigter Fluidlichtleiter, da UV-Licht nur effektiv durch Quarzglasfasern oder durch sogenannte Fluidsysteme von der Lichtquelle zum proximalen Lichteintritt des Endoskops übertragen werden kann. Die Vorteile des Fluidsystems bestehen in der vollständigen Blockung der IR-Strahlung ab einer Wellenlänge von 1050 nm sowie der geringen Eigenfluoreszenz. Außerdem weist ein Fluidlichtleiter im Vergleich zu einem Quarzlichtleiter eine deutlich höhere Transmission (ca. 20 %) und eine wesentlich höhere numerische Apertur (NA) auf. Der bedeutende Nachteil der Fluidsysteme besteht darin, dass sie nicht autoklaviert werden können.

2.1.5 UV-Endoskop

Innerhalb des Endoskops muss die Lichtübertragung ebenso für das UV-Licht der Anregungslichtquelle optimiert sein, um eine möglichst effiziente bzw. verlustfreie Übertragung zu gewährleisten. Da die Integration eines Fluidsystems in einem Endoskop zur Inspektion der Harnblase (Zystoskop) mit 4 mm Außendurchmesser enormen technischen Einschränkungen unterliegt, kommen für diesem Fall spezielle Glasfasern (UVF-40, Sumita Optical Glass Inc., Japan) zum Einsatz. Die Transmission dieser Glasfasern ist im UV-A-Bereich zwar etwas

geringer als die reiner Quarzglasfasern, jedoch weisen die Glasfasern eine deutlich höhere NA (NA = 0,35) auf, die bei reinen Quarzglasfasern auf einen maximalen Wert von 0,22 beschränkt ist. Je höher die NA, desto besser ist die Ausleuchtung des Endoskops. Eine geringe NA führt zu einer Randabschattung des endoskopischen Bilds, die den endoskopischen Überblick deutlich einschränkt.

Der spektrale Verlauf der Übertragungskette UV-Lichtsystem, Fluidlichtleiter und UV-Endoskop ist in Abb. 2.3 dargestellt. Diese Charakteristik entspricht weitgehend dem spektralen Verlauf des UV-Lichtsystems mit dem Fluidlichtleiter 495 FS. Die integrale Lichtleitung ist jedoch aufgrund der Verluste durch eine zusätzliche Koppelstelle zwischen Lichtleiter und Endoskop sowie durch die Reduzierung der Transmission durch das integrierten Glasfaserbündels des UV-Endoskops um den Faktor 10 schwächer.

Im Vergleich zu einem Standard-Endoskop unterscheidet sich das UV-Endoskop weiterhin durch ein Beobachtungsfilter (Langpassfilter GG 400, Dicke 2 mm, Schott Glaswerke, Mainz), das im bildgebenden Strahlengang okularseitig eingebaut ist. Der Zweck dieses Beobachtungsfilters liegt in der Unterdrückung des gesamten rückgestreuten Anregungslichtes (Remission), um die im Vergleich zur Anregung schwache Fluoreszenz sichtbar zu machen.

Bei Standardendoskopen befindet sich direkt nach dem Lichtleiteranschluss ein Faserkonus, der aufgrund seiner optischen Eigenschaft eine Erhöhung der NA des lichtübertragenden Systems und eine daraus resultierende Verbesserung der Ausleuchtung des Endoskops bewirkt. Beim UV-Endoskop wurde zu Lasten einer besseren Ausleuchtung auf einen Faserkonus verzichtet, da dieser durch seine Eigenverluste und durch die zusätzliche Koppelstelle zwischen Faserkonus und integriertem Faserbündel, zu einer deutlichen Reduzierung der Transmission führt.

2.1.6 Endoskopisches Kamerasystem

Für die 5-ALS- bzw. HYP-induzierte FD werden im Gegensatz zur konventionellen Weißlichtendoskopie besonders rotempfindliche Kamerasysteme eingesetzt, da die zu detektierende rote Gewebefluoreszenz (ca. $\lambda = 580\ nm - 700\ nm$) sehr schwach ist. Getrennte Betriebsmodi der Kamera für Weißlicht und Fluoreszenz erlauben die jeweils optimale Einstellung der Verstärkungswerte für die einzelnen Farbkanäle. Da Fluoreszenzbilder, aufgenommen mit Standard-Videofrequenzen (PAL: 50 Hz; NTSC: 60 Hz) oft keine ausreichende Empfindlichkeit mehr aufweisen, existiert ein kameraseitiger Integrationsmodus, der Belich-

tungszeiten über 20 ms ermöglicht, und somit zu Lasten der zeitlichen Auflösung Fluoreszenzbilder mit ausreichender Empfindlichkeit garantiert. Durch den Integrationsmodus sind bis zu 2 Sekunden Belichtungszeit einstellbar. Durch elektronische Verstärkung (Gain) kann die Bildhelligkeit zusätzlich erhöht werden, dies führt zu signifikant helleren Bildern im Fluoreszenzmodus. Für die Fluoreszenzendoskopie wurden bisher zwei unterschiedliche Kameratypen optimiert. Einerseits die 1-Chip-Kamera (TELECAM® SL PDD, Karl Storz), die im Vergleich zur 3-Chip-Kamera mehr als das Doppelte an Lichtempfindlichkeit aufweist, und andererseits die 3-Chip-Kamera (TRICAM® SL PDD, Karl Storz), welche die bessere räumliche Auflösung und eine deutlich bessere Trennung der Farbkanäle bietet [38, 39].

2.1.7 Experimentelle Untersuchungen mit den inkohärenten FD-Systemen

Experimentelle Untersuchungen des inkohärenten UV-Lichtsystems im Vergleich zu dem bereits etablierten D-light-System sollen eine quantitative Beurteilung des UV-Lichtsystems ermöglichen.

2.1.7.1 Experimentelle Untersuchung an einem Gewebephantom

Für die Evaluierung und eventuelle Optimierung der spektralen Charakteristik des Filtersystems des UV-Lichtsystems wurde ein Gewebephantom erstellt.

Das Gewebephantom basiert auf einem Zweikomponentensystem auf Polyorganosiloxan-Basis (POS, Silikon), das als Wirtsmaterial verwendet wird. POS ist gegenüber UV-Strahlung beständiger und altert langsamer als beispielsweise organische Polymere. Da die Lichtstreuung des verwendeten POS im VIS vernachlässigbar ist, werden zur Modellierung der Lichtstreuung Partikel aus Aluminiumoxid (α-AL_2O_3) verwendet. Die Lichtstreuung ist im Spektralbereich von 380 nm bis 1000 nm der dominierende Prozess bei der Lichtausbreitung in biologischem Gewebe. Um einen Fluoreszenzeffekt zu erzielen, werden fluoreszenzfarbstoffdotierte, lichtabsorbierende Partikel (Leutalux T1S Flammrot, Leuchtstoffwerk Heidelberg, Heidelberg) verwendet [8].

2.1.7.2 In vitro Untersuchungen an Glioblastomgewebeproben

Ziel dieser Untersuchungen war ein direkter Vergleich des UV-Lichtsystems mit dem D-light-System anhand von Gewebeproben. Im Zeitraum von zwei Jahren wurden von insgesamt 10 Patienten, die an einem malignen Hirntumor (anaplastisches Astrozytom, Glioblastoma

multiforme, WHO Grad III und IV) erkrankt waren, mehrere Gewebebiopsien entnommen. Die Patienten bekamen ca. 3 Stunden vor Beginn der Anästhesie 20 mg/kg 5-ALS, gelöst in 100 ml Wasser, oral verabreicht. Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte während der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung aus verschiedenen Arealen des Tumors. Anschließend wurden die Proben bis zum Tag der Messung tiefgefroren.

Die messtechnische Erfassung sowie die Bilddokumentation der Proben erfolgte mittels des in Abb. 2.4, rechts schematisch dargestellten experimentellen Aufbaus.

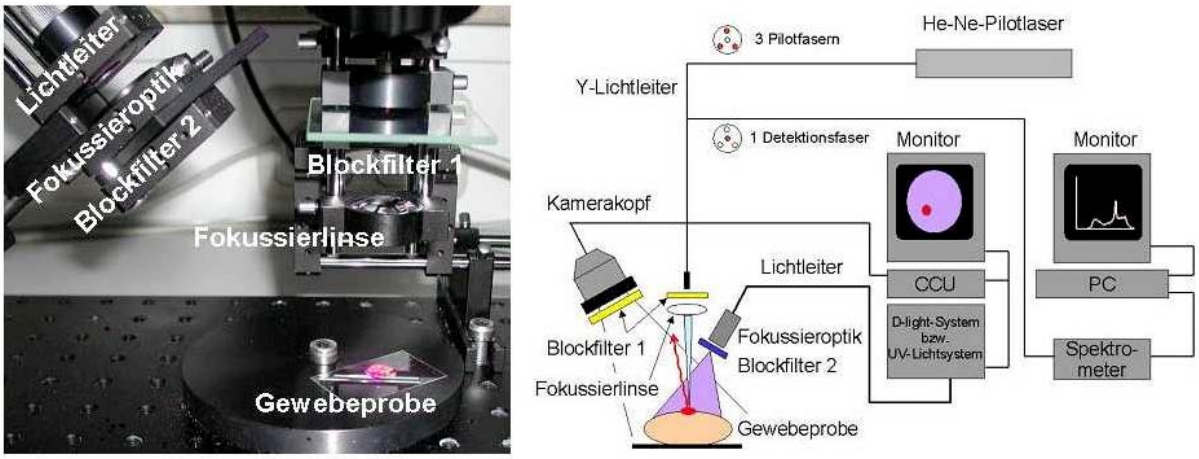

Abb. 2.4 **Systemaufbau zur Visualisierung und spektroskopischen Erfassung der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz in Glioblastomgewebe. Links: Detailaufnahme der Bestrahlungs- und Detektionseinheit. Rechts: Gesamtaufbau in schematischer Darstellung.**

Durch die inkohärenten Lichtsysteme, den Fluidlichtleiter 495 FR und eine Fokussieroptik (Bikonvexlinse, 31 1338, Linos Photonics GmbH, Göttingen) erfolgte die homogene Bestrahlung der Probe. Die Bestrahlungsstärke betrug bei beiden Systemen 22,6 W/m². Ein zusätzliches Blockfilter (BG 28, Dicke 4 mm, Schott Glaswerke, Mainz), welches vor der Fokussieroptik montiert war, erhöhte die Blockung im Bereich von 650 nm bis 800 nm bei der Anregung durch das UV-Lichtsystem.

Die spektroskopische Erfassung der Probendaten erfolgte über einen dreiarmigen Lichtleiter (Y-Lichtleiter). Dieser Lichtleiter führte vier Fasern in einem Arm gemeinsam zum Objekt. Die zentrale Faser des Lichtleiters führte das Messsignal zu einem Spektrometer (S 2000, Integrationszeit 40 ms). Die drei anderen Fasern wurden abgezweigt und Licht eines Helium-Neonlaser (OS-LHR-021, Melles Griot GmbH, Bensheim) eingekoppelt, um die Gewebeoberfläche zu markieren. Der distale gemeinsame Arm des Y-Lichtleiters wurde über eine

Fokussierlinse (Bikonvexlinse, 31 1338, Linos Photonics GmbH, Göttingen) auf die Probe abgebildet. Bei UV-Anregung wurde hinter der Fokussierlinse ein Langpassfilter (GG 400) fixiert, welches das Anregungslicht vollständig unterdrückt.

Die Visualisierung der Gewebeproben erfolgte mittels einer 3-Chip-Kamera (TRICAM® SL PDD, vgl. Kap. 2.1.6), vor die, identisch wie bei der Detektionsfaser, je nach Art des Anregungslichts, das entsprechende Langpassfilter eingesetzt wurde. Das Kamerasystem lieferte jeweils für die UV- und Blaulicht-Anregung einen speziellen Farblichtmodus (DAC-Einstellungen für UV-Licht: Blau 170 / Rot 80 / Grün 130; für Blau-Licht: Blau 30 / Rot 110 / Grün 20), so dass das Videobild der Fluoreszenz weitgehend dem optischen Eindruck des Auges entspricht.

Nach dem Auftauen erfolgte die Messung und Visualisierung der Gewebeproben auf einem Glasträger.

2.1.7.3 In vivo Untersuchungen im Tierversuch

In vivo Untersuchungen an der Ratte, die am Institut für Hirnforschung des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt wurden, sollten zeigen, ob die Verabreichung des PS HYP und eine damit verbundene Lokalisation von Tumorarealen durch das UV-Lichtsystem zu einer Fluoreszenz-Visualisierung und damit zu einem neuen bildgebenden Verfahren führen könnte, welches ein klinisch verbessertes operatives Vorgehen zur Folge haben könnte.

24 Tage vor der eigentlichen fluoreszenzdiagnostischen Untersuchung wurden vier Ratten (Sprague Dawley, SPD) von Schlüsener et. al [130] wie folgt vorbereitet: Eine Ratten C6-Glioblastomzelllinie der American Type Culture Collection wurde in einem Nährsubstrat (RPMI 1640, Life Technologies Inc., Paisley, England) bei 37 °C und 5 % CO_2 gezüchtet. Das Nährsubstrat enthielt weiterhin 10 % FCS (Life Technologies Inc.) und 1,2 % Penicillin-Streptomycin (Fluka, Buchs, Schweiz). Nach 10 Tagen konnten die Zellen geerntet werden. Je 5 µl der Zellsuspension einer Konzentration von 4×10^5 Zellen/µl wurde den Ratten im Bereich des Basalganglions injiziert.

Am Tag der Untersuchung bekamen 2 Ratten die 5-ALS in einer Dosis von 200 mg/kg (Pufferlösung: destilliertes Wasser mit NaOH auf PH 6,4 eingestellt, steril filtriert) und die verbleibenden zwei Ratten HYP in einer Dosis von 1 mg/kg KG (Pufferlösung: PEG 400 und

800 µl PBS) intraperitoneal (ip) appliziert. Die Tötung der Versuchstiere und die Entnahme der Gehirne erfolgte im Zeitraum von 3 bis 4 Stunden nach der Gabe der Substanzen.

Die Gehirne wurden auf einem Glasträger fixiert und nacheinander mit beiden Lichtsystemen bestrahlt. Die Bestrahlungsstärke des UV-Lichtsystems lag distalseitig nach der Fokussieroptik bei 0,10 W/cm²; die des D-light-Systems bei 0,12 W/cm².

Die Visualisierung der Gehirne erfolgte durch ein Laparoskop (26033 AA, Karl Storz) mit proximalseitig fixierter TRICAM® SL PDD.

Die Erfassung der spektralen Daten erfolgte mit Hilfe eines Spektrometers (S 2000) und einer Messsonde (FCRL-7UV100, Ocean Optics, Dunedin, USA), die direkt mit dem Gewebe kontaktiert wurde. Der schematische Versuchsaufbau ist in Abb. 2.5 skizziert.

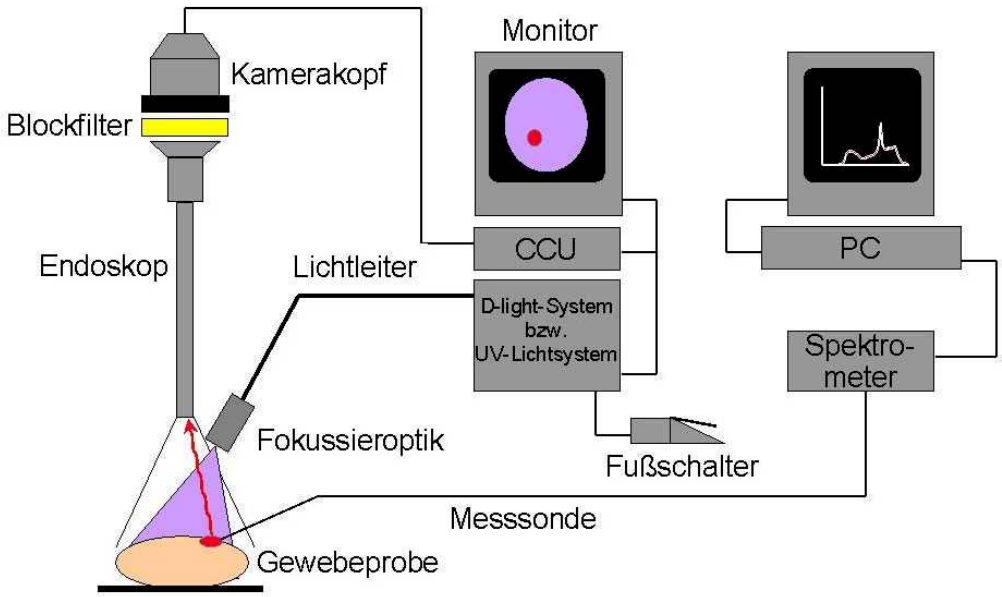

Abb. 2.5 Schematische Darstellung des Systemaufbaus zur Visualisierung und spektroskopischer Erfassung der HYP- und 5-ALS-induzierten Fluoreszenz beim C6-Glioblastom-Modell der Ratte

Entsprechend der Experimente mit den Hirngewebeproben wurde auch bei diesem Versuch ein Blockfilter (Langpassfilter LPF 30S, Dünnschicht Technik, Rosenheim) eingesetzt, das zwischen Endoskop und Kamerakopf integriert wurde.

2.1.7.4 In vivo Untersuchungen in der Mundhöhle

Ziel dieser Untersuchungen war der quantitative Vergleich der UV-Lichtquelle mit dem D-light–System anhand eines in vivo Modells (Mundhöhle). Weiterhin sollte dieser Versuch

Aufschluss darüber geben, ob eine topische Applikation von HYP in der Mundhöhle zu einer Anreicherung des PS in der Mundschleimhaut führt.

Dazu wurde drei Versuchspersonen (VP) 5.0 ml HYP (Hypervidon®, Planta Natural Products, Wien) gelöst in 45 ml NaCl 0.9% als Spüllösung verabreicht. Dies entspricht einer HYP-Konzentration von 100 µM. Die Spüllösung verblieb für 15 Minuten in der Mundhöhle.

Über einen Fluidlichtleiter 495 FS, der distalseitig an einem Endoskop (27005 AIA, Karl Storz) fixiert war, wurde das entsprechende Areal in der Mundhöhle bestrahlt. Die Systemkonfiguration für das UV-Lichtsystem ergab eine Bestrahlungsstärke von 0,34 W/cm², die für das D-light-System eine Bestrahlungsstärke von 0,19 W/cm² am Ende des Lichtleiters.

Die spektroskopische Datenerhebung (S 2000) erfolgte erstmals nach 30 Minuten und dann nach 1, 2, 3 und 4 Stunden an acht unterschiedlichen Standard-Screening-Punkten. Damit die Messungen miteinander vergleichbar waren, wurde die Messsonde (FCRL-7UV100) für die spektroskopische Datenerhebung distalseitig am Endoskop fixiert. Eine modifizierte Resektionsschlinge am distalen Ende des Endoskops gewährleistete immer einen definierten Abstand der Messsonde und des Lichtleiters zum kontaktierten Gewebe.

2.1.7.5 In vivo Untersuchungen in der Harnblase

Ein Pilotversuch anhand eines kleinen Patientenkollektivs in der Urologie sollte zeigen, ob sich in Frühstadien des Harnblasenkarzinoms akkumuliertes HYP mittels des UV-Lichtsystems visualisieren lässt. Eine Bestätigung der mit HYP angereicherten fluoreszenzpositiven Areale könnte dann die spektroskopische Erfassung des hypericintypischen Fluoreszenzsignals geben.

Die Patienten bekamen 3,5 Stunden vor der geplanten FD 50 ml einer 0,5 mmol HYP-PVP Stammlösung (Hypervidon®, Planta Natural Products, Wien) intravesikal instilliert. Die Lösung wurde dazu im Verhältnis 1:50 mit isotonem Natrium Chlorid (NaCl) verdünnt.

Die Durchführung der Zystoskopie erfolgte mit dem speziell für diesen Versuch entwickelten UV-Endoskop (vgl. Kap. 2.1.5), das sich in einem Standard-Rückspülresektoskop (27050 EH, Karl Storz) integrieren lässt. Über den Fluidlichtleiter 495 FS wurde die Lichtübertragung vom UV-Lichtsystem zum UV-Endoskop realisiert. Die Lichtleistung des UV-Gesamtsystems betrug distalseitig am UV-Endoskop 80 mW.

Auch bei diesem Versuch wurde vergleichsweise das D-light-System in Verbindung mit dem Lichtleiter 495 FS und dem FD-Endoskop (27005 BIA, Karl Storz) eingesetzt. Die Lichtleistung dieses Systems betrug distalseitig 250 mW. Das D-light-System liefert im Gegensatz zum UV-Lichtsystem zusätzlich einen Standard-Weißlicht-Modus. Ein Wechsel zwischen Weißlicht und Fluoreszenzanregungslicht (Blaulicht) ist durch einen Fußschalter oder eine Umschalttaste am Kamerakopf möglich.

Im Vergleich zu den Messungen der Hirngewebeproben (vgl. Kap. 2.1.7.2) wurden die DAC-Einstellungen der TRICAM® SL PDD beim Einsatz des UV-Lichtsystems modifiziert. Eine Anhebung des Rotkanals (DAC-Einstellungen für UV-Licht: Blau 170 / Rot 220 / Grün 130) sollte die schwache Rot-Fluoreszenz verstärken.

2.1.7.6 Ausbleichen der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz

Anhand dieser Versuche sollte geklärt werden, wie sich das unterschiedliche Anregungslicht des UV-Lichtsystems und des D-light-Systems auf das Ausbleichen des PS PpIX auswirkt.

Die Erfassung der Messdaten erfolgte entsprechend dem Versuchsaufbau zur Messung der Hirngewebeproben (vgl. Abb. 2.4). Die Bestrahlungsstärke der inkohärenten Lichtsysteme war identisch (22,6 W/m²).

Zur Messung des Ausbleichverhaltens von PpIX in Lösung wurden 100 µl Ethanol (96 %) mit 10 ml destilliertem Wasser und eine gesättigte Lösung von 5 ml PpIX (Porphyrin Systems, Lübeck) vermischt. Anschließend wurden 100 µl der Lösung in einen Aluminiumträger gefüllt, der mit einer kegelförmigen Senkung mit Durchmesser 6 mm versehen war.

Die Integrationszeit des Spektrometers betrug 100 ms. Alle 10 s wurde automatisch ein Spektrum erfasst.

Die Messung des Ausbleichverhaltens von PpIX in Gewebe erfolgte mit dem identischen Aufbau der in Kap. 2.1.7.2 beschriebenen Untersuchungen der Hirngewebeproben.

Zur Bestimmung des Ausbleichens von PpIX in Lösung wurde die folgende Vorgehensweise gewählt. Um ein reines PpIX-Spektrum zu erhalten, muss der gemessene spektrale Verlauf von PpIX in Lösung von den Einflüssen des Lösungsmittels (Wasser bzw. Ethanol) und des Probeträgers, zusammen als Untergrund bezeichnet, bereinigt werden. Daher erfolgte zuerst eine Messung des reinen Untergrunds. Hierzu wurde der Probeträger mit Wasser und Ethanol,

jedoch ohne gesättigten PpIX-Anteil, befüllt und spektral vermessen. Der ermittelte spektrale Verlauf des Untergrundsignals wurde dann jeweils von jedem erzeugten PpIX-Spektrum der Lösung abgezogen.

2.1.7.7 Bestimmung der Effektivität der Anregungswellenlängenbereiche beider Lichtsysteme für die HYP-induzierte Fluoreszenz

Zur Bestimmung der Effektivität beider inkohärenten Lichtsysteme zur Induktion der HYP-Fluoreszenz in Gewebe wurden Messungen mit einem Spektralfluorometersystem (Fluoromax 2, Jobin Yvon GmbH, München) durchgeführt.

Als Probe diente mit HYP angereichertes Glioblastomgewebe, das zur Messung als sehr dünne Schicht (< 1 mm Schichtdicke) zwischen zwei Glasträgern fixiert wurde. Die erste Messung erfolgte mit einer Anregungswellenlänge von 407 nm. Dies entspricht dem Maximum des breitbandigen Anregungsfilters (380 nm - 430 nm) des D-light-Systems. Die zweite Messung mit einer Anregungswellenlänge von 365 nm entspricht dem Maximum des Bandpassfilters des UV-Lichtsystems (vgl. Kap. 2.1.3).

2.2 Neuartiges inkohärentes Lichtsystem für die photodynamische Therapie

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit bestand in der Konzeption, in der Entwicklung und im Aufbau eines inkohärenten Lichtsystems für die 5-ALS-induzierte PDT des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms sowie dem Nachweis der klinischen Tauglichkeit des Systems an einem kleinen Patientenkollektiv.

Bisher sind ausschließlich Laser für die intrakorporale PDT zum Einsatz gekommen. Dem Vorteil der guten Fokussierung bei Lasern stehen vor allem die Kosten und der aufwändige Betrieb im OP entgegen. Ausgehend von den Erfahrungen inkohärenter Hochleistungslichtquellen für die FD sind daher im Folgenden die Entwicklungsarbeiten zu einer neuen PDT-Lichtquelle (vgl. Abb. 2.6) für den endoskopischen Einsatz dargestellt.

Abb. 2.6 Inkohärente PDT-Lichtquelle (T-light)

Im Wesentlichen besteht das PDT-System aus einer Hochleistungslampe, einem Lichtleiter und einem Lichtapplikator. Lichtleiter und Lichtapplikator sind zusammen in einem Applikationskatheter integriert. Als Hochleistungslampe wird eine Kurzbogenlampe mit 500 W Nennleistung eingesetzt. Das Licht dieser Lampe wird über einen speziell entwickelten Einkoppelmechanismus auf einen im Applikationskatheter befindlichen Quarzglaslichtleiter fokussiert. Am distalen Ende des Lichtleiters befindet sich ein zylinderförmiger Lichtappli-

kator aus Silikon, der mit Streupartikeln durchsetzt ist, um eine homogene Ausleuchtung der Harnblase zu ermöglichen.

2.2.1 Inkohärente PDT-Lichtquelle

In Abb. 2.7 ist die inkohärente PDT-Lichtquelle (T-light, Karl Storz) im geöffneten Zustand in der Draufsicht dargestellt.

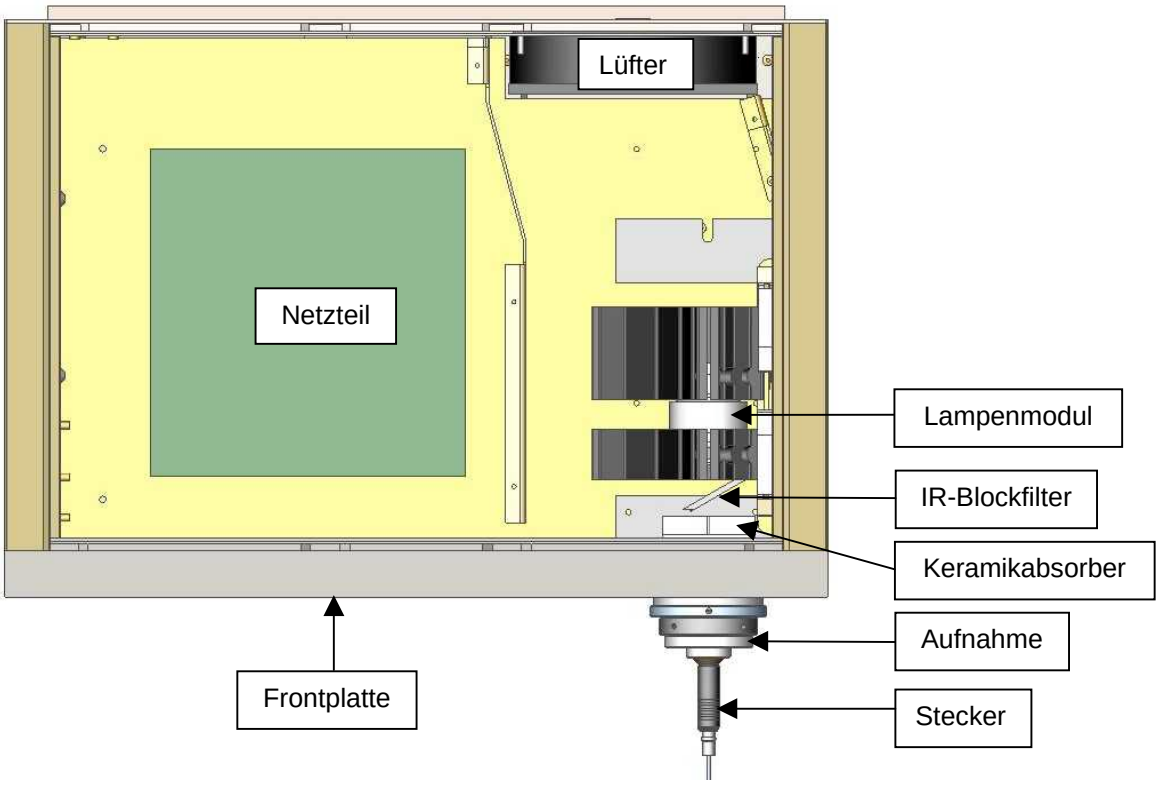

Abb. 2.7 Interner Aufbau des inkohärenten PDT-Lichtsystems (Darstellung in der Draufsicht)

Der Stecker des Applikationskatheters rastet in der Aufnahme ein. Dabei wird eine Schutzhülse, die das distale Faserende im nicht eingesteckten Zustand umgibt, zurückgeschoben, so dass ca. 20 mm der Kernfaser des Quarzglaslichtleiters freiliegen (vgl. Abb. 2.11). Dieser Schutzmechanismus dient zur Vorbeugung von Verbrennungen, denn bei der hohen Lichtleistung und der hohen Fokussierung der Lampe kommt es am proximalen Steckerbereich durch Absorption bedingte Prozesse zu Temperaturen von weit über 100°C.

Durch manuelle Justage wird der Quarzglaslichtleiter in der Aufnahme positioniert, so dass die maximale Lichtleistung der Lampe eingekoppelt werden kann. Das Licht, das nicht in den Lichtleiter eingekoppelt wird, wird von einem Keramikabsorber aufgenommen. Eine effiziente Wärmeabfuhr erfolgt zum einen über die speziellen Materialeigenschaften des Keramikmaterials und zum anderen über einen speziell für den Keramikabsorber designten Kühlkörper. Diese Sonderkonstruktion ist zwingend notwendig denn die enorme Lichtintensität des nicht in den Quarzglaslichtleiters eingekoppelten Lichts würde schnell zu einem sehr hohen Temperaturanstieg der Einkoppelmechanik und des Mantelmaterials des Lichtleiters führen und diesen zerstören.

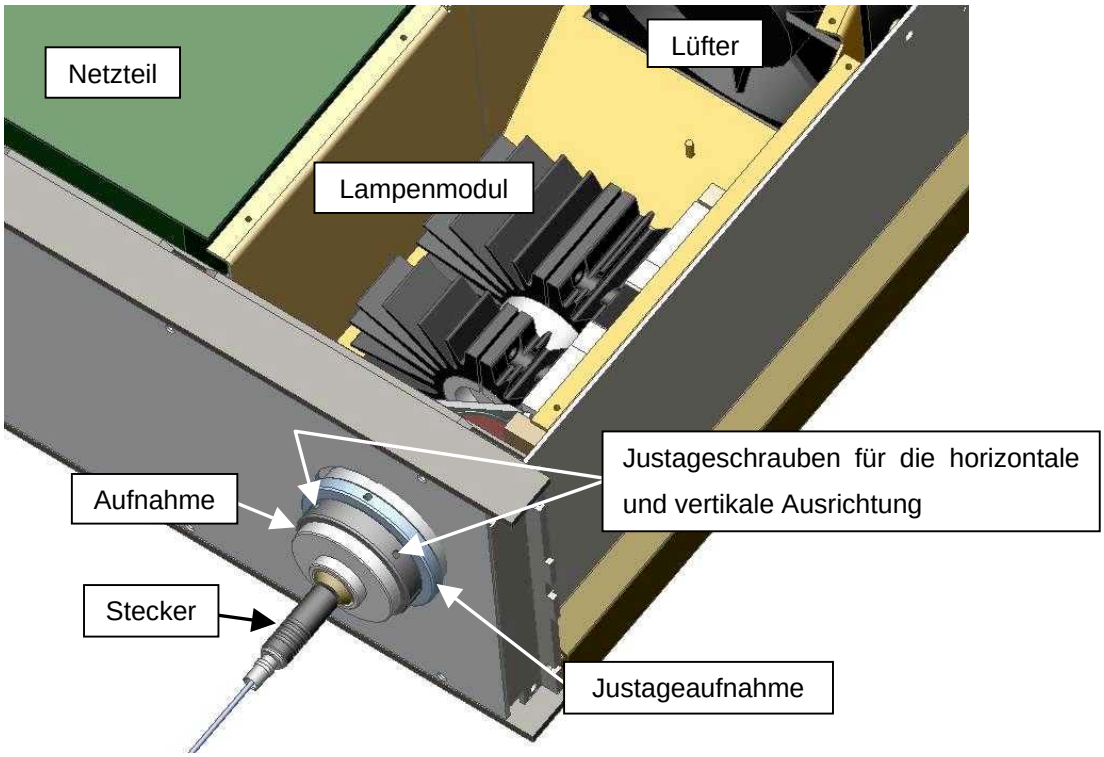

Abb. 2.8 Detailansicht der Lichteinkopplung des PDT-Lichtsystems

Die horizontale (x-Richtung) und vertikale (y-Richtung) Justage des Lichtleiters zur Lampe erfolgt mittels der beiden Justageschrauben an der Justageaufnahme (vgl. Abb. 2.8). Die Justage in Richtung der optischen Achse (z-Richtung) erfolgt durch Verschieben des gesamten Lampenmoduls.

Für die notwendige Kühlung der Lampe sorgen zwei stranggepresste Lampenkühlkörper, deren Wärme über einen Lüfter abgeführt wird. Der Lüfter, der hinter dem Lampenmodul an der Rückwand des Gehäuses befestigt ist, saugt die Luft, die hinter dem Netzteil in das Gehäuse einströmt und nachfolgend über das Einkoppel- und Lampenmodul geleitet wird, an.

Als Hochleistungslampe wird eine 500 W Xenon-Kurzbogenlampe verwendet. Die Vorteile dieses Lampentyps sind zum einen ein gleichmäßiges Spektrum im VIS, zum anderen eine hohe Lichtleistung bei guter Fokussierbarkeit und relativ langer Lebensdauer bis zu 1000 Stunden. Nachteilig ist jedoch die hohe Wärmeentwicklung auf sehr engem Raum, die den beschriebenen erhöhten Kühlaufwand bedingt.

Die Xenonlampe besteht aus Metall und Keramik. Als Füllgas wird Xenon, ein nichtgiftiges Edelgas, verwendet. Die drei wichtigsten Baugruppen der Lampe sind: Kathode, Anode und Reflektor. Die Kathode hat die Form eines Bleistiftes. Sie emittiert Elektronen, die durch den Spalt zwischen Elektrode und Kathode hindurchwandern und auf die Anode auftreffen. Die Emission von Elektronen wird durch thermische Effekte ausgelöst. Die Kathodenstütze hält die Kathode an ihrem Platz und versorgt sie mit Strom. Das Lampenfenster ist aus poliertem Einkristall-Saphir (AlO_2) hergestellt. Saphir erlaubt eine thermische Ausdehnung des Fensters. Dadurch ist die hermetische Abdichtung über einen großen Temperaturbereich gewährleistet. Außerdem hat Saphir den Vorteil der sehr guten Wärmeleitung, so dass ein Zerspringen des Lampenfensters vor allem an der Außenkante des Lampenkörpers verhindert wird. Sogenannte „Getter“ sind um die Kathode herumgewickelt und absorbieren verschmutztes Gas, das während des Lampenbetriebs entsteht. Dieser Vorgang wirkt sich positiv auf die Lebensdauer der Lampe aus. Die Verschmutzung von Kathode, Reflektor und Fenster steht dem entgegen. Bei der Xenonlampe handelt es sich um eine Gasentladungslampe. Um das Xenon im Quarzkolben dauerhaft zum Leuchten zu bringen, wird zur Zündung an die Elektroden eine Hochspannung von bis zu 30 kV angelegt. Es entsteht ein kleiner Lichtbogen und das Gas verwandelt sich in ein hell leuchtendes Plasma. Der Lichtbogen erzeugt sehr hohe Temperaturen im Inneren der Lampe von bis zu 5000°C. Der elliptische Reflektor fokussiert das Licht auf einen Brennpunkt mit einem Durchmesser von ca. 5 mm.

Vor der Lampe wurde ein IR-Blockfilter angebracht, das wie ein dichroitischer Spiegel wirkt. Es ist für sichtbares Licht durchlässig und reflektiert den IR-Anteil der Xenonlampe ab 700 nm bis ca. 1050 nm. Das PDT-System liefert somit Weißlicht im Wellenlängenbereich von 380 nm bis 700 nm, um gleichzeitig alle Absorptionsbanden des PS PpIX anzuregen. Die

Unterdrückung des IR-Anteils ist notwendig, um eine zusätzliche Erwärmung der Spülflüssigkeit und somit der Harnblase zu verhindern, was einen erhöhten Spüldurchlauf während der Bestrahlung zur Folge hätte (vgl. Kap. 2.2.3). Weiterhin könnte der nicht unterdrückte IR-Anteil durch Absorption zu einem temperaturbedingten Versagen des Applikationskatheters führen.

2.2.2 PDT-Applikationskatheter für die Harnblase

Für eine erfolgreiche PDT wird ein Lichtapplikationssystem benötigt, das eine homogene Ausleuchtung des zu behandelnden Gewebeareals erlaubt. Die Beleuchtung der Gewebeoberfläche hängt von der Geometrie des zu therapierenden Organs ab, die im Fall der Harnblase als ideal kugelförmig angenommen werden kann. Der Quarzglaslichtleiter überträgt das Anregungslicht von der Lichtquelle bis zu einem Lichtapplikator, der als zylindrische Streustange ausgebildet ist. Die Streustange ist das eigentliche Element, das durch Streuung des eingekoppelten Lichts eine annähernd homogene Lichtverteilung bewirkt. Beide Kernkomponenten sind in einem Kathetersystem integriert, das für die intrakorporale Einführung geeignet ist (vgl. Abb. 2.9).

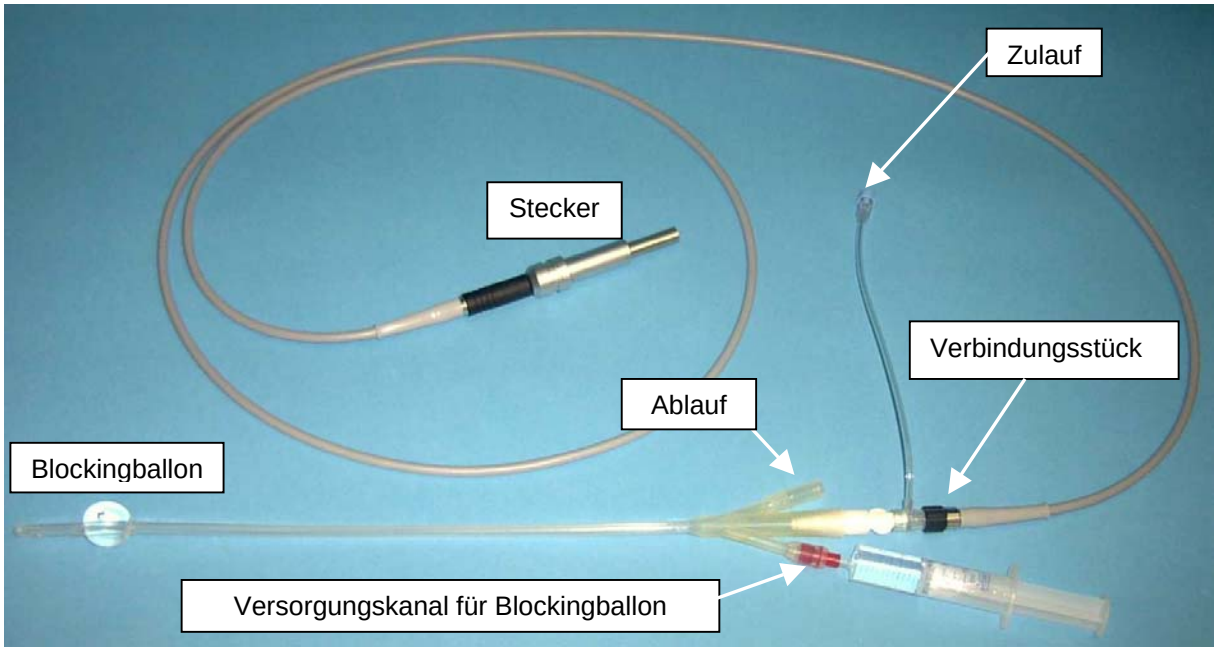

Abb. 2.9 PDT-Applikationskatheter für die Harnblase

Das aus Silikon realisierte Kathetersystem (OptiMed Medizinische Instrumente GmbH, Ettlingen) weist 3 Kanäle auf. Es ist komplett mit einer Gleitschicht überzogen, die ebenfalls auf einem Silikongemisch basiert. In einem Katheterkanal befindet sich ein optimierter Quarzglaslichtleiter (Optran HWF, Ceram Optec GmbH, Bonn) mit 1,5 mm Kerndurchmesser und einem „hard polymer“ Kunststoffmantel. Zusätzlich ist der Lichtleiter noch mit einem Teflonschutzmantel versehen, der die spröde Quarzglasfaser vor dem Brechen schützt. Der Gesamtdurchmesser des Lichtleiters beträgt 2 mm.

Am distalen Ende des Quarzglaslichtleiters befindet sich ein mit einem Streumaterial dotierter Silikonzylinder mit 2 mm Durchmesser und 20 mm Länge. Er besteht aus einem bei Raumtemperatur vernetzenden Zweikomponenten-Silikonkautschuk (Elastosil 601, Wacker Chemie, München), der mit einer TiO_2-haltigen Farbpaste versetzt ist (Paste FL, Wacker Chemie, München). Der größte Teil des Lichtes tritt bereits auf den ersten 5 mm des Streuzylinders aus. Durch die partielle Rückstreuung des Lichtes von der Harnblasenwand wird die räumliche Verteilung des Lichtes im Vergleich zu der des Primärlichtes weiter homogenisiert. Daraus resultiert eine nahezu integrale Bestrahlung der Harnblasenwand. Die Entwicklung der zylinderförmigen Streustange erfolgte durch Beyer et al. [11].

Der Kanal für den Quarzglaslichtleiter dient gleichzeitig der Zufuhr von Spülflüssigkeit, da die Harnblase aufgrund der Wärmeentwicklung während der gesamten Bestrahlung gespült werden muss. Auf diese Weise wird auch der Streuzylinder gekühlt. Ein weiterer Kanal dient als Ablauf für die Spülflüssigkeit. Der dritte versorgt den Blockingballon, der zur Positionierung des distalen Katheterendes im Harnblasenzentrum dient. Durch Zufuhr von 25 ml destilliertem Wasser wächst dieser auf einen Durchmesser von 20 mm an.

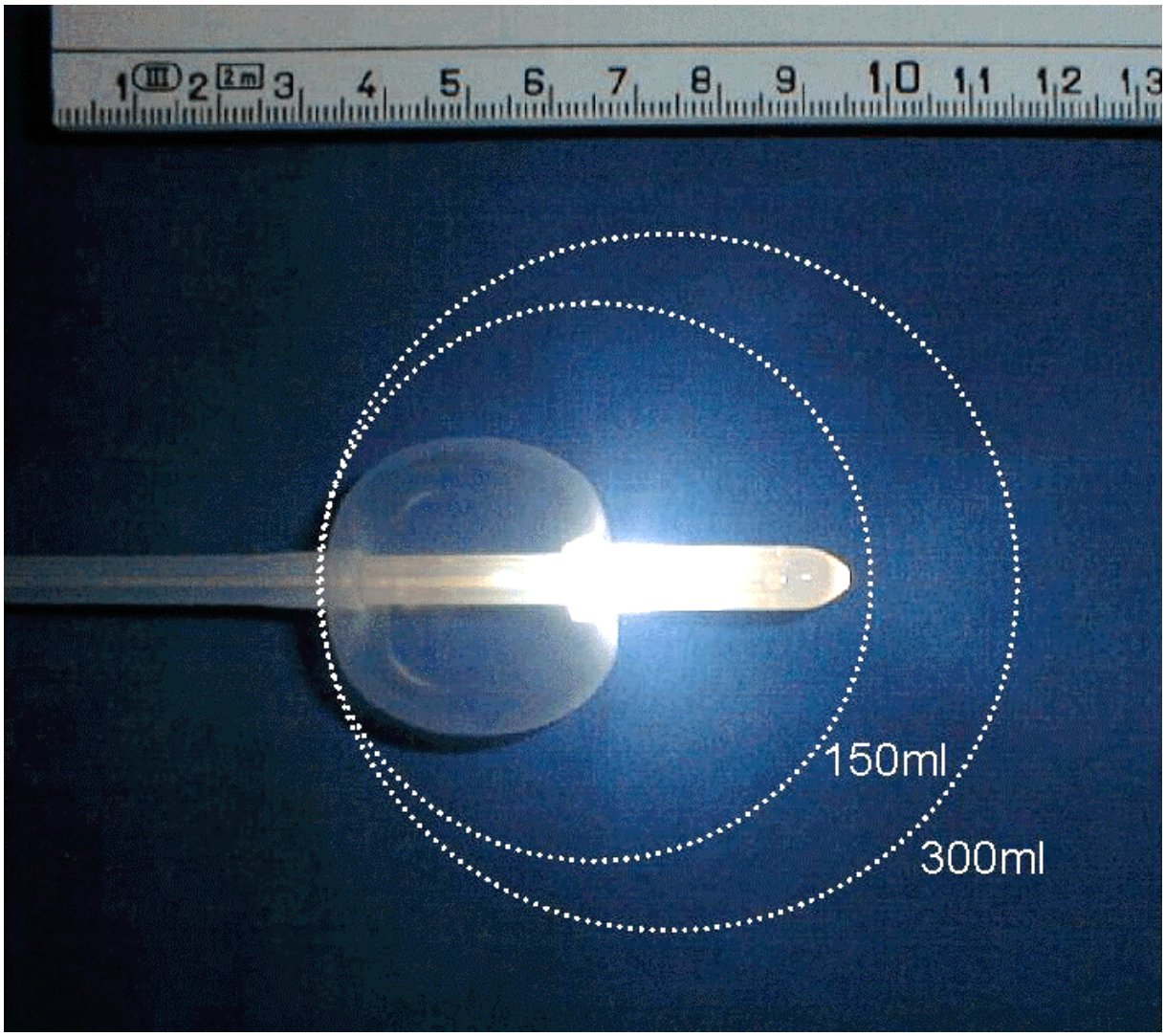

Abb. 2.10 Lichtapplikator des PDT-Applikationskatheters mit befülltem Blockingballon

Der Streuzylinder befindet sich nach der Positionierung ungefähr in der Mitte der gefüllten Harnblase, sofern das Harnblasenvolumen im Bereich von 150 und 300 ml variiert (vgl. Abb. 2.10).

Proximalseitig ist der Quarzglaslichtleiter in einem Stecker fixiert. Der Stecker ist geometrisch und funktionell exakt der Aufnahme der PDT-Lichtquelle angepasst. Er besteht im Wesentlichen aus einem Griff, einem Steckerkopf mit Faserführung und der Schutzhülse. Das proximale Ende des Lichtleiters (Bereich X, Abb. 2.11) ist vom Mantelmaterial befreit, da das nicht in die Kernfaser eingekoppelte Licht zu einer starken Erhitzung der metallischen Faserfassung führt, welche sofort zu einem Verschmelzen des Kunststoffmaterials führen würde. So verschmolzenes Mantelmaterial würde eine effiziente Lichteinkopplung in die Kernfaser

verhindern. Durch eine absorptionsbedingte Temperatursteigerung käme es letztendlich zur Zerstörung der Faser.

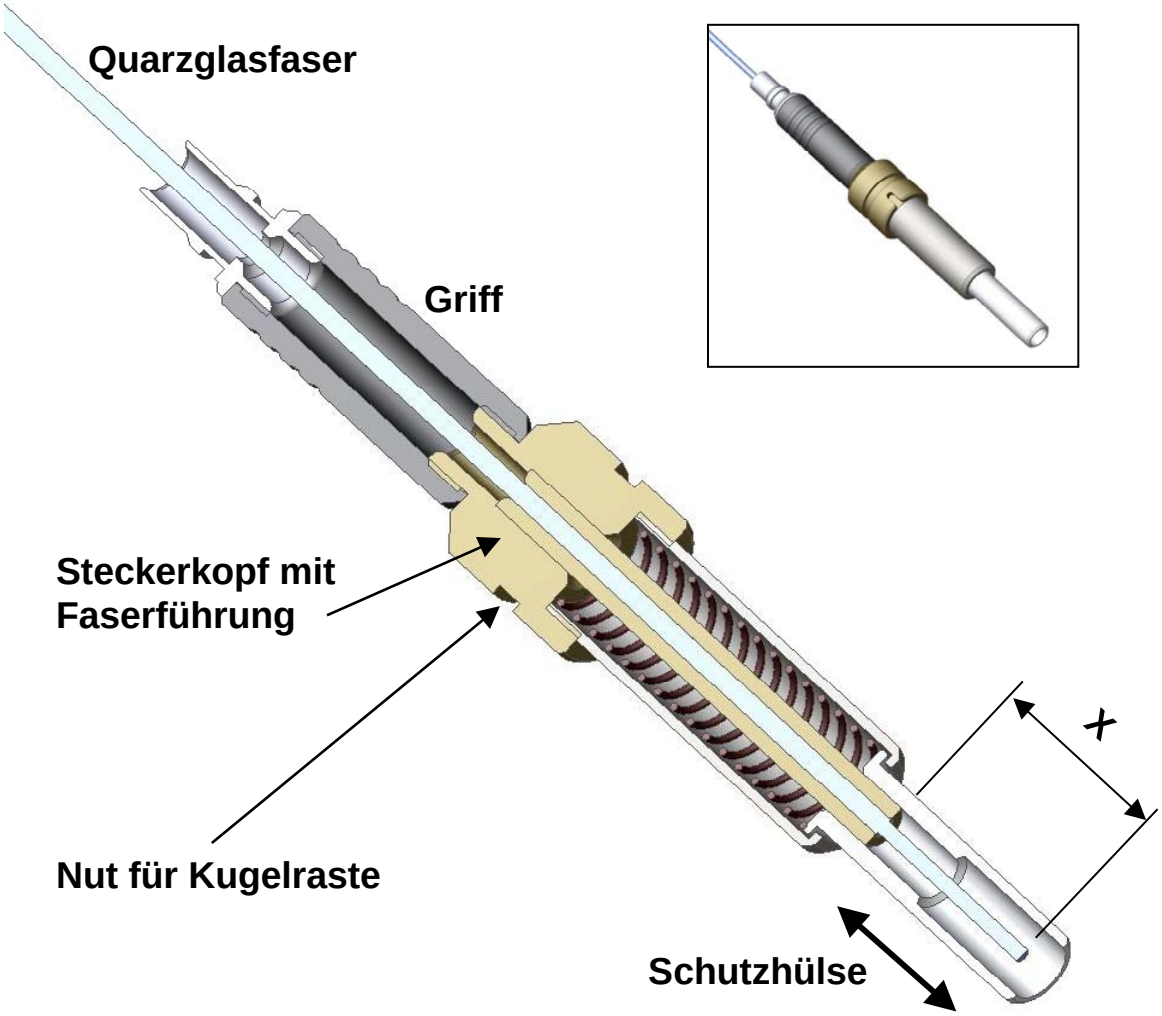

Abb. 2.11 Schnittdarstellung des Steckers des PDT-Applikationskatheters

Zwischen dem Stecker und dem Silikonkatheter ist der Quarzglaslichtleiter durch einen zusätzlichen Schutzschlauch, der durch eine Metallspirale verstärkt ist, geschützt. Die Verbindung zwischen Schutzschlauch und Katheter ist durch ein Verbindungsstück (vgl. Abb. 2.9) realisiert, das die Schnittstelle zwischen dem für diese Arbeit entwickelten und aufgebauten PDT-Lichtsystem und den zugekauften Systemkomponenten, wie z. B. dem Silikonkatheter, darstellt.

Zur Lichteinkopplung wird der Katheterstecker in die Aufnahme des Lichtsystems adaptiert und mittels einer Kugelraste fixiert (vgl. Abb. 2.7 und Abb. 2.8).

2.2.3 Operatives Vorgehen bei der 5-ALS-induzierten PDT des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms

5-ALS ermöglicht derzeit als einzige klinisch einsetzbare Substanz eine intrakorporale PDT nach topischer Applikation. Zur Anwendung in der Harnblase wird 5 g 5-ALS, gelöst in 52 ml Natriumbicarbonat (pH 4,8) sterilfiltriert und intravesikal mittels Einmalkatheter instilliert. Unmittelbar nach Ende der Retentionszeit von 2 bis 5 Stunden erfolgt die integrale Bestrahlung der Harnblase. Ein Schutz der Körperoberfläche des Patienten vor Lichtexposition ist nicht erforderlich.

Die Durchführung einer FD in der gleichen Sitzung vor der PDT bietet den Vorteil der Erfassung des aktuellen Tumorbefalls, die unter anderem als Basiswert für Follow-up Untersuchungen herangezogen werden kann. Mit der FD ist eine einfache Therapiekontrolle möglich, mit der die Wirksamkeit und Effizienz der PDT über mehrere Behandlungen hin verfolgt werden kann.

Während der PDT muss die Harnblase entfaltet sein, damit es nicht zu partiellen Abschattungen kommen kann und das Bestrahlungslicht auf alle Harnblasenwandareale homogen wirkt. Hierzu wird für den Patienten individuell die Harnblasenkapazität bestimmt. Das Harnblasenvolumen ist ein wichtiger Ausgangswert für die Berechung der Bestrahlungszeit. Es liegt in der Regel im Bereich von 150 ml bis 300 ml (vgl. Abb. 2.10).

Vor der eigentlichen PDT erfolgt nach Einschalten und Überprüfung der Funktionsfähigkeit der PDT-Lichtquelle die Messung der Lichtleistung über einen Referenzlichtleiter. Die ermittelte Lichtleistung geht ebenso wie das Harnblasenvolumen in die Bestimmung der Bestrahlungszeit ein. Je nach Lampenlebensdauer wird eine Lichtleistung im Bereich von 2 W bis 6 W in den Quarzglaslichtleiter des Applikationskatheters eingekoppelt.

Als nächstes wird der Applikationskatheter vorbereitet und überprüft. Die zentrale Positionierung des distalen Endes des Katheters in der Harnblase wird dadurch erreicht, dass der Katheter nach dem Blocken des Ballons nach unten hängen gelassen wird; der Ballon den Harnblasenauslass berührt und somit ein Herausrutschen des Katheters verhindert wird.

Anschließend erfolgt eine Lage- und Füllstandskontrolle mittels transabdominaler B-Bild-Sonographie, die während der Bestrahlung kontinuierlich in Intervallen von 10 Minuten wiederholt wird (vgl. Abb. 2.12). Es ist auf einen gleichbleibenden Zu- und Ablaufstrom zu achten, damit ein Anliegen des distalen Endes des Katheters an der Harnblasenwand und eine dadurch ausgelöste thermische Beanspruchung derselben vermieden wird.

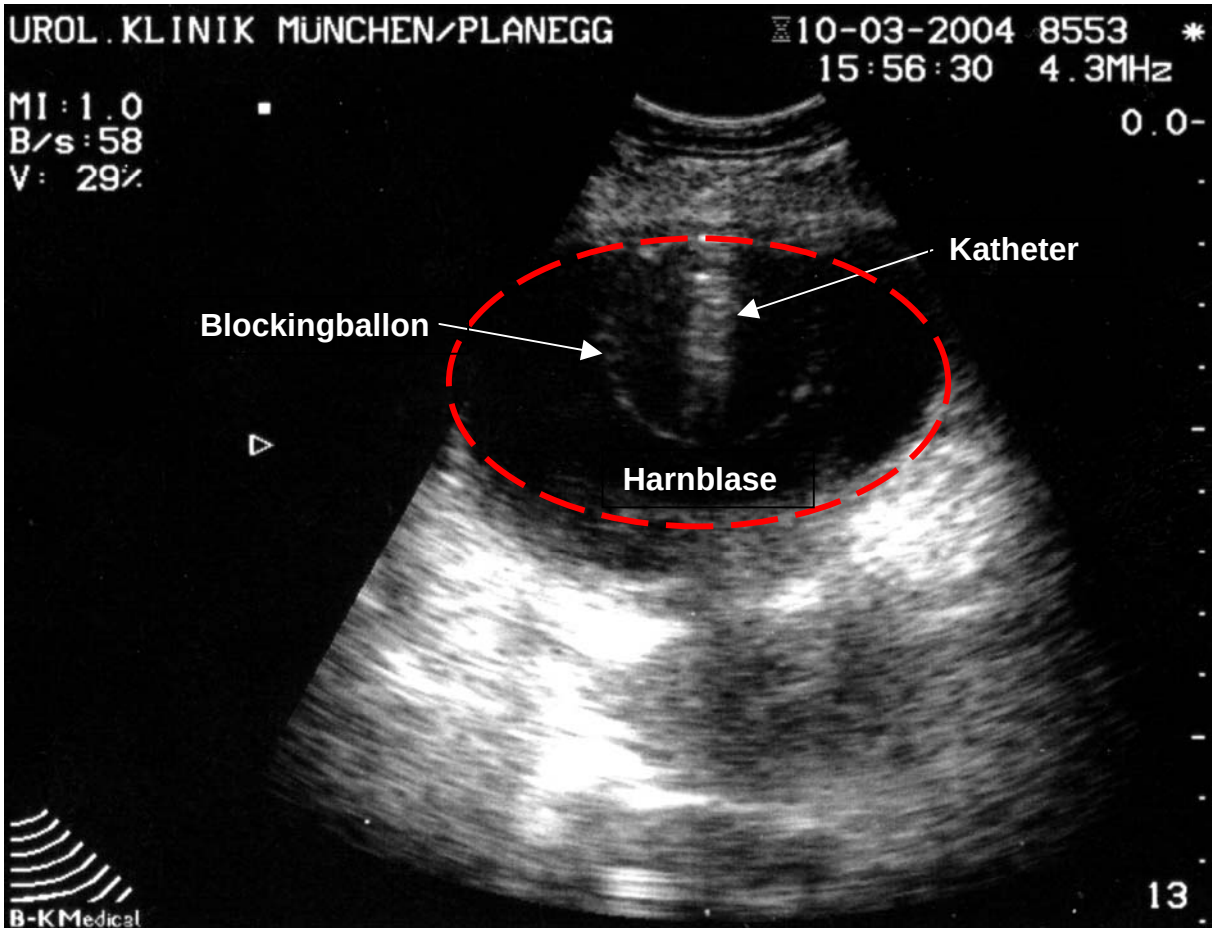

Abb. 2.12 Transabdominale Sonographie zur Kontrolle der korrekten Lage des PDT-Applikationskatheters.

Nach dem Einschalten der Lichtquelle wird die Bestrahlung durchgeführt. Die Bestrahlungsdauer ist abhängig vom ermittelten Füllvolumen der Harnblase und von der emittierten Lichtleistung der inkohärenten PDT-Lichtquelle. Die wirksame Lichtdosis wird stets so festgelegt, dass der PS weitgehend ausbleicht. Anhand einer Analyse des Lampenspektrums der PDT-Lichtquelle und des PpIX-Absorptionsspektrums erwartet man für eine Weißlichtdosis von ca. 100 J/cm² einen optimalen therapeutischen Effekt [11].

Während der Bestrahlung wird zusätzlich zu der sonographischen Kontrolle kontinuierlich der Zu- und Ablauf des Katheters kontrolliert. Bei erkennbar blutigem Ablauf wird die Blutung

über eine zystoskopische Interaktion gestillt und die Harnblase mehrfach gespült. Eine blutige Spülflüssigkeit absorbiert insbesondere die kurzwelligen Lichtanteile und reduziert somit die Wirksamkeit der Bestrahlung.

Die abschließende Kontrolle des Katheters sowie die finale Messung der Lichtleistung der Lichtquelle mittels des Referenzlichtleiters erlauben Rückschlüsse, ob die vorgegebene optimale Dosis eingehalten wurde. Durch den Fluoreszenzzystoskopie-Nachweis nach der PDT wird zudem sicher gestellt, ob der PS tatsächlich vollständig ausgeblichen ist.

3 Ergebnisse

Die klinisch relevanten Untersuchungsergebnisse zur FD wurden an einem Gewebephantom, an Glioblastomgewebeproben in vitro und in vivo am Tier sowie in vivo in der menschlichen Mundhöhle und Harnblase erzielt.

Die Ergebnisse zur PDT wurden an der menschlichen Harnblase gewonnen.

3.1 Inkohärentes UV-Lichtsystem

Um das UV-Lichtsystem in vivo einsetzen zu können, ist es zunächst notwendig, den spektralen Verlauf des Lichtsystems für unterschiedliche Systemkonfigurationen zu bestimmen und eine Bewertung (vgl. Kap. 1.4.4) gemäß dem Einsatz in der entsprechenden medizinischen Fachdisziplin durchzuführen.

Im einfachsten Fall wird das zu diagnostizierende Areal eines Organs über das Lichtsystem direkt durch einen speziellen Lichtleiter (vgl. Kap. 2.1.4) bestrahlt. Dabei wird bei Verwendung des großlumigen Fluidlichtleiters 495 FR mit einem aktiven Durchmesser von 5 mm die maximal mögliche Systemlichtleistung übertragen. Die Bezeichnung aktiver Durchmesser bezieht sich auf den effektiven Durchmesser des lichtübertragenden Elements wie beispielsweise des Glasfaserbündels oder des Fluids, ohne Mantel- und Stützkomponenten. Systemkonfigurationen mit Lichtleitern kleineren Querschnitts übertragen aufgrund der reduzierten aktiven Lichtleiterfläche weniger Lichtleistung. Insbesondere bei Konfigurationen mit einem zusätzlich adaptierten Endoskop wird durch die systembedingten Koppelstellen die Lichtleistung nochmals vermindert.

In Abb. 3.1 sind die Leistungsdaten der unterschiedlichen Systemkonfigurationen des UV-Lichtsystems dargestellt (vgl. Abb. 2.3). Aus diesen Daten kann entsprechend Kap. 1.4.4 die zulässige, maximale Bestrahlungsdauer berechnet werden. Für die Bewertung des Systems wurden die Vorgaben der relativen spektralen Wirksamkeit für das Organ Haut gemäß ICNIRP (IRPA) zugrunde gelegt, da die Haut im Gegensatz zum Auge morphologisch gesehen die größere Verwandtschaft zur Schleimhaut der in vivo untersuchten Organe aufweist. Weitere Untersuchungen erfolgten an künstlich generierten Fluoreszenzproben sowie ex vivo an Gewebeproben und im Tierversuch.

Systemkomponenten	***Konfiguration I*** UV-Lichtquelle mit Fluidlichtleiter 495 FS	***Konfiguration II*** UV-Lichtquelle mit Fluidlichtleiter 495 FS und UV-Endoskop	***Konfiguration III*** UV-Lichtquelle mit Fluidlichtleiter 495 FR
Effektive Bestrahlungsstärke [W/m²] *(gemäß Gl. 1.8)*	0,046	0,015	0,97
Grenzwert für die effektive Bestrahlung [J/m²] (vgl. Kap. 1.4.4)	30	30	30
Bestrahlungsdauer [min] *(gemäß Gl 1.9)*	11 [1)]	35 [2)]	0,5 [1)]

[1)] Abstand von 20 mm zwischen distalem Ende des Lichtleiters und dem Gewebe sowie einer NA des Lichtleiters von 0,588

[2)] Abstand von 20 mm zwischen distalem Ende des Endoskops und dem Gewebe sowie einer NA des Lichtleiterbündels im Endoskop von 0,35

Abb. 3.1 Leistungsdaten des UV-Lichtsystems

Zudem ist zu bemerken, dass die berechneten Werte der maximalen Bestrahlungsdauer für alle Systemkonfigurationen einer etablierten Richtlinie entsprechen, die einer möglichen schädigenden Wirkung, der durch das UV-Gesamtsystem erzeugten kurzwelligen optischen Strahlung auf die Haut, entgegenwirken soll. Dem Autor ist keine Norm oder Richtlinie bekannt, die eine Regelung für Grenzwerte vorsieht, die bei einer Bestrahlung während einer fluoreszenzdiagnostischen Untersuchung zwingend eingehalten werden müssen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass im Rahmen dieser Untersuchungen das Risiko einer schädigenden Wirkung durch die mit dem UV-Lichtsystem erzeugte Strahlung z. B. auf die Schleimhaut der Harnblase vernachlässigbar klein ist.

Im Vergleich dazu ist die Strahlungsbelastung, die bei einer Röntgenuntersuchung appliziert wird, um ein Vielfaches höher, als die, die unter Normalbedingungen zulässig ist. Da bei den hier beschriebenen Untersuchungen nur kurzzeitig, d. h. maximal eine halbe Stunde pro Tag und Anwendung, im Fluoreszenzmodus mit UV-Strahlung bestrahlt wurde, kann von einem

minimalen Risiko für den Patienten ausgegangen werden. Zumal die berücksichtigten Grenzwerte eine täglich wiederholte Anwendung von bis zu 8 Stunden pro Tag zulassen.

Ein weiterer entscheidender Aspekt für den klinischen Einsatz des UV-Lichtsystems ist neben der spektralen Charakteristik und der maximal zulässigen Lichtleistung die Ausleuchtung des Systems respektive die des UV-Endoskops. Dazu ist in Abb. 3.2 die Winkelverteilung der Austrittsstrahlen bezogen auf die relative Beleuchtungsstärke des UV-Endoskops im Vergleich zu einem FD-Endoskop (27005 BIA, Karl Storz) aufgezeigt. Zur Gewinnung der Daten wurden beide Endoskope an das D-light-System und den Lichtleiter 495 FS adaptiert.

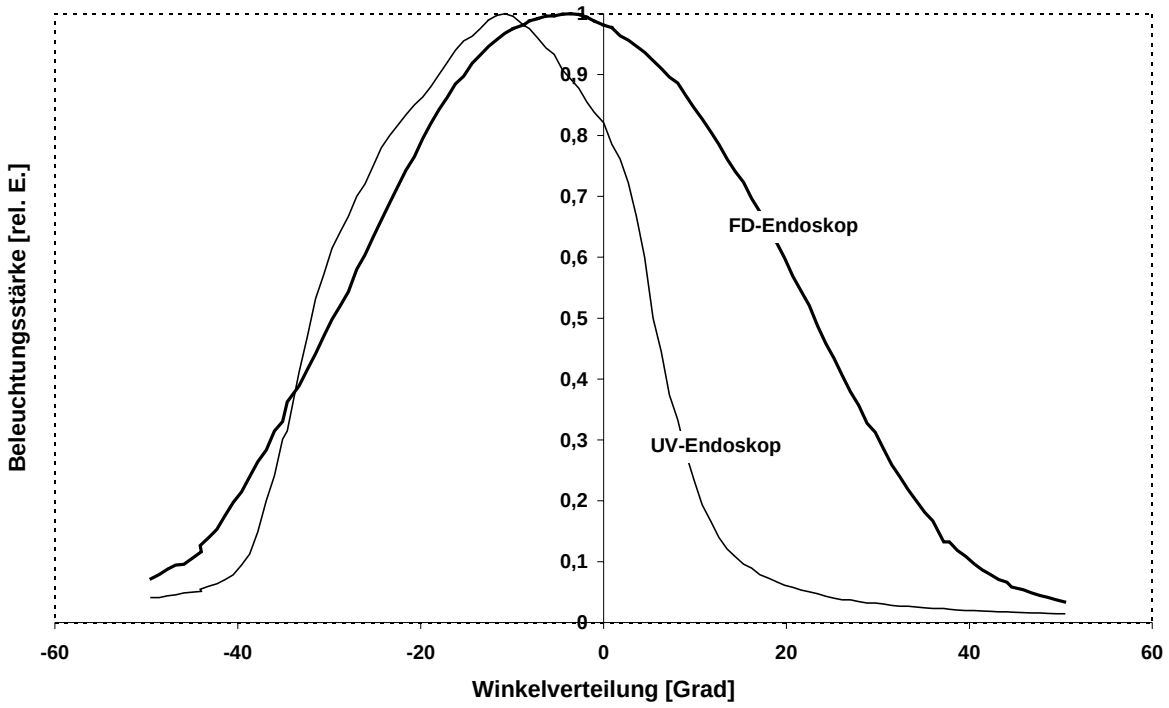

Abb. 3.2 Winkelverteilung des UV-Endoskops im Vergleich zum FD-Endoskop (27005 BIA)

Für das FD-Endoskop ergibt sich ein Öffnungswinkel von 53°. Die Grundlage zur Ermittlung des mittleren Öffnungswinkels bilden die bei jeweils 50 % Beleuchtungsstärke gemessenen Winkel. Der Öffnungswinkel ist definiert als der doppelte Winkel α, wobei sich α aus dem arc sin der NA errechnet.

Da die UVF-40-Fasern des UV-Endoskops eine geringere NA als die Fasern des FD-Endoskops besitzen, ergibt sich demzufolge ein geringerer Öffnungswinkel des UV-Gesamtsystems von 37°. Der Versatz des Maximalwerts der beiden Kurven zur Abszisse ist auf die distalseitige Anordnung der Faser im Endoskop zurückzuführen (vgl. Abb. 3.2).

Da beide Endoskope ein Objektivsystem mit einer 30°-Blickrichtung aufweisen, sind die Fasern distalseitig ebenso auf 30° ausgerichtet. Dies gelingt entsprechend der Materialzusammensetzung sowie der Beschaffenheit der Fasern und des davon abhängigen Biegeradius unterschiedlich gut. In diesem Fall erklärt der geringere Biegeradius der Glasfasern des UV-Endoskops den größeren Versatz der maximalen Beleuchtungsstärke zur Abszisse.

Die geringere NA des UV-Endoskops könnte durch die Integration eines Faserkonus erhöht werden. Von dieser Möglichkeit wird jedoch zu Gunsten einer für die Bestrahlung notwendigen höheren Transmission abgesehen.

3.1.1 Experimentelle Untersuchungen an einem Gewebephantom

Für die Evaluierung und eventuelle Optimierung der spektralen Charakteristik des Filtersystems des UV-Lichtsystems erfolgten Messungen unterschiedlicher Systemkonfigurationen an einem Gewebephantom.

Bei Bestrahlung des Gewebephantoms mit UV-Licht ergibt sich eine Emission im Bereich von 550 nm bis 700 nm mit einem Maximum bei 600 nm (vgl. Abb. 3.3).

Die Messung des ersten Spektrums (dünne Linie) erfolgte direkt am Fluoreszenzphantom mittels des Spektrometers S 2000 unter Bestrahlung mit dem UV-Lichtsystem und dem Lichtleiter 495 FS. Der Peak im Bereich von 350 nm bis 380 nm ergibt sich aus dem am Fluoreszenzphantom reflektierten UV-Anregungslicht, der bei dieser Messung nicht durch ein zusätzliches Blockfilter unterdrückt worden ist.

Das zweite Spektrum (dicke Linie) wurde proximalseitig an der Okularmuschel des UV-Endoskops aufgenommen. Durch das integrierte Beobachtungsfilter im UV-Endoskop (vgl. Kap 2.1.5) wird das reflektierte Anregungslicht von 350 nm bis 380 nm im Vergleich zum ersten Spektrum fast vollständig unterdrückt. Dadurch kann die im Verhältnis zur Anregung schwache Fluoreszenz deutlich besser darstellt werden.

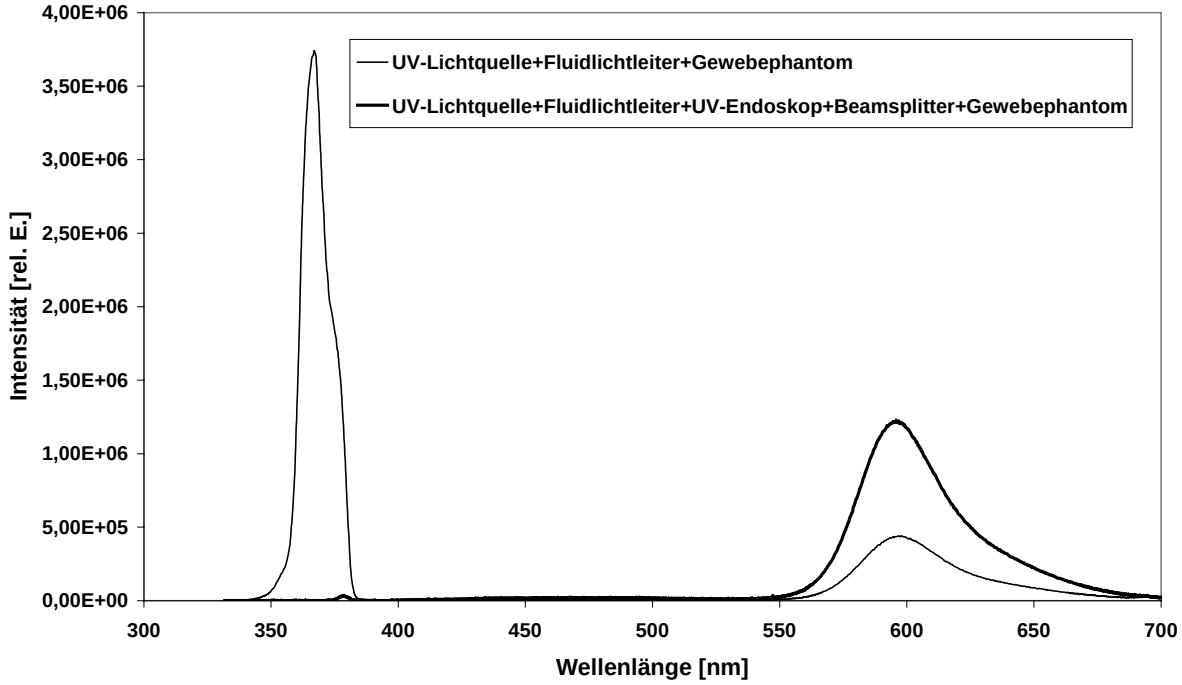

Abb. 3.3 Spektraler Verlauf der Emission des Gewebephantoms für unterschiedliche Systemkonfigurationen des UV-Lichtsystems

Die in der UV-Lichtquelle und im UV-Endoskop integrierten und exakt aufeinander abgestimmten Filter ermöglichen die Erfassung von Fluoreszenzsignalen im Bereich von 400 nm bis 700 nm.

3.1.2 In vitro Untersuchungen an Glioblastomgewebeproben

In diesem Kapitel werden das D-light- und das UV-Lichtsystem zur Bestrahlung von Glioblastomgewebeproben eingesetzt (vgl. Kap. 2.1.7.3). Ein Teil dieser Tumorgewebeproben war mit PpIX angereichert, der andere Teil nicht. Zweck dieser Untersuchungen war der visuelle Vergleich der durch beide FD-Systeme erzeugten Bilder sowie der Vergleich der generierten spektralen Daten.

Bei der Fluoreszenzanregung mit dem D-light-System beschränkte sich die Farbwiedergabe der Bilder auf hauptsächlich zwei Farben. Das diffus zurückgestreute blaue Anregungslicht (Remission) kennzeichnete das Normalgewebe; fluoreszierende Gewebeareale wurden rosa bis rot dargestellt (vgl. Abb. 3.4, links). Bei diesen sehr lichtschwachen Fluoreszenzbildern musste das FD-Kamerasystem, im Vergleich zu einem mit Weißlicht bestrahlten Gewebeareal, entsprechend länger integrieren (Integrationszeiten von 1/30 s und 1/15 s), um signifikant hellere Bilder darzustellen.

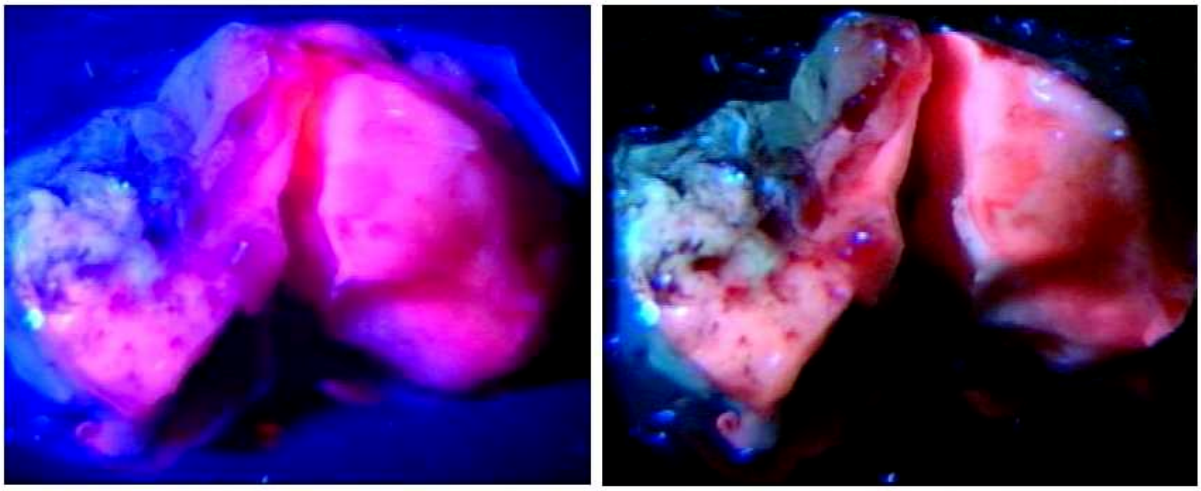

Abb. 3.4 Vergleich der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz in Glioblastomgewebe bei Anregung durch das D-light-System (links) und das UV-Lichtsystem (rechts)

Bei der Anregung durch das UV-Lichtsystem konnte das Kamerasystem bereits mit einer Integrationszeit von 1/60 s Bilder ausreichend hell visualisieren. Die Darstellung des Normalgewebes unterschied sich kaum von der unter Weißlicht. Die Tumoren wurden rot fluoreszierend dargestellt (vgl. Abb. 3.4, rechts). Das UV-Lichtsystem lieferte im Fluoreszenzmodus im Unterschied zu dem D-light-System eine Darstellung, die auch eine Feinstruktur des Gewebes und Details wie z. B. kleine Gefäße erkennen ließ. Derartige Gefäßdetaildarstellungen waren bisher nur unter Weißlichtbeleuchtung möglich.

Daher kann mit dem UV-Lichtsystem ein Eingriff ausschließlich oder über längere Zeiträume direkt unter Fluoreszenzlicht durchgeführt werden, was bisher eher die Ausnahme war, da der Fluoreszenzmodus immer nur intermittierend zur Orientierung zugeschaltet wurde. Allerdings muss bei dieser Vorgehensweise das schnellere Ausbleichen des PS bedacht werden.

Die Auswertung der spektralen Daten ergab für beide Systeme das erwartete charakteristische Emissionsspektrum von PpIX mit Maxima bei 635 nm und 700 nm, das je nach Anregungslicht in der Intensität variiert. Eine exakte Angabe des Intensitätsunterschieds war allerdings dadurch erschwert, dass jeder Messpunkt durch beide Systeme angeregt wurde und somit aufgrund des Ausbleichens des PpIX, dass jeweils zweite System nicht mehr die Ausgangsintensität des ersten hatte. Im Mittel ergab sich jedoch für das D-light-System ein ca. um den Faktor 1,2±0,3 stärkeres Fluoreszenzsignal bei gleicher Bestrahlungsstärke (vgl. Abb. 3.5).

Ein Unterschied in der Ausprägung des AF-Signal zeigte sich im Bereich von 480 nm bis 600 nm. Eine Besonderheit im Spektrum des D-light-System war der Anteil der Remission

mit einem Maximum bei 455 nm. Der Zweck dieses bewusst zugelassenen Anteils des blauen Anregungslichts ist die Unterdrückung der Rotfluoreszenz endogener Fluorophore und unspezifischer PpIX-Fluoreszenz deren Detektion zu einer falsch-positiven Aussage führen kann.

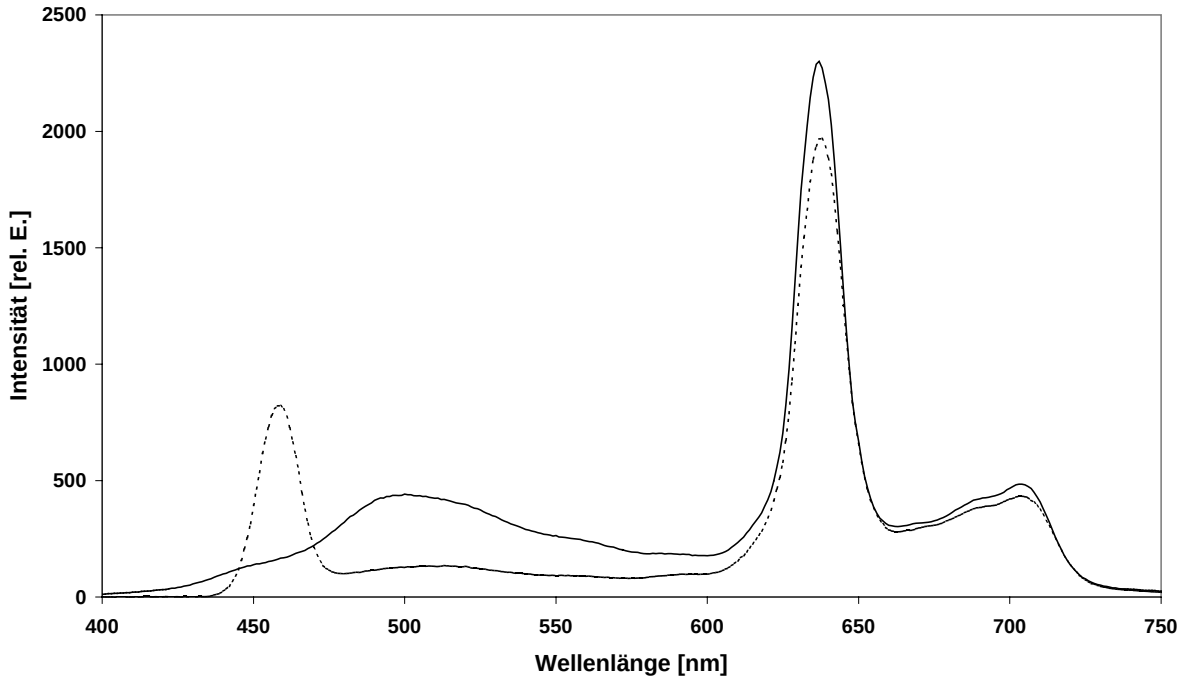

Abb. 3.5 Spektraler Verlauf der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz von Glioblastomgewebeproben bei Anregung durch das D-light-System (gestrichelter Verlauf) und das UV-Lichtsystem (durchgezogener Verlauf)

Beim Vergleich der beiden inkohärenten Lichtsysteme fiel die unterschiedliche Ausprägung des AF-Signals auf, die in Abb. 3.6 dargestellt ist. Damit jeweils das reine AF-Signal beurteilt werden konnte, erfolgte für diesen Versuch die Bestrahlung von Glioblastomgewebe ohne angereicherten PS. Die Auswertung der Messungen (n = 20) ergab, dass das integrale AF-Signal bei Anregung durch das UV-Lichtsystem um den Faktor 1,7±0,3 stärker ausgeprägt war. Hierzu wurde beim Spektrum des D-light-Systems der Anteil der Remission mit dem Maximum bei 455 nm abgezogen.

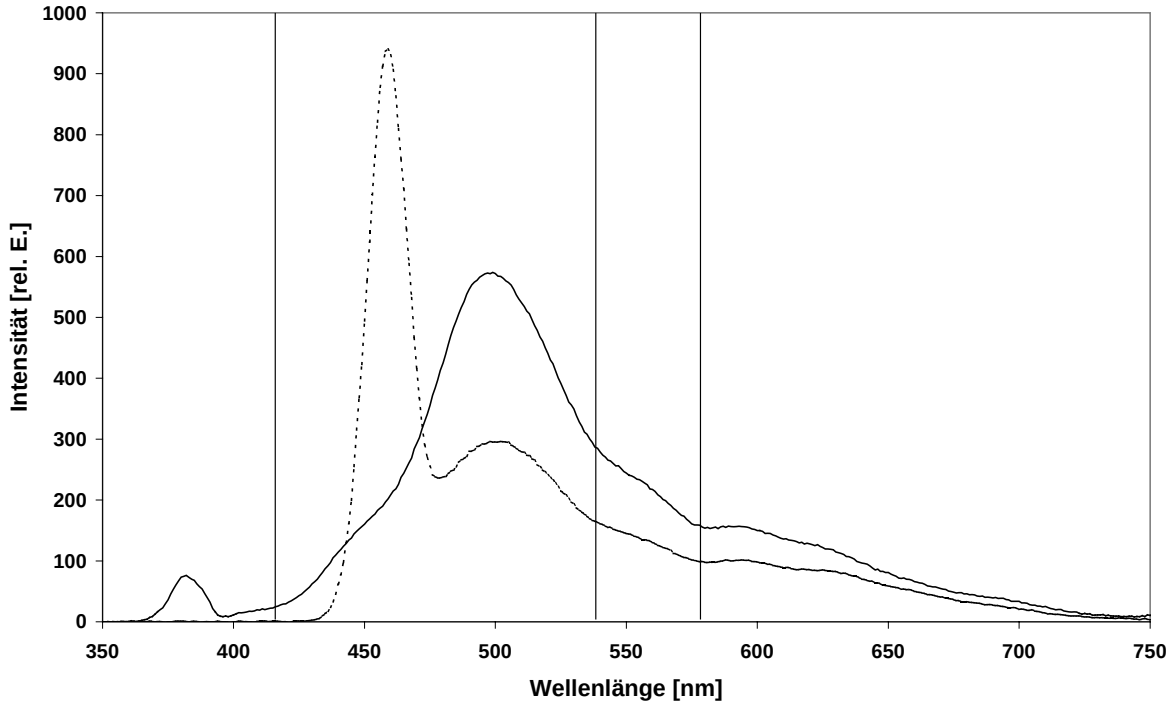

Abb. 3.6 Spektraler Verlauf des AF-Signals von Glioblastomgewebe bei Anregung durch das D-light-System (gestrichelter Verlauf) und das UV-Lichtsystem (durchgezogener Verlauf)

Auffällig bei diesen Spektren ist zudem der Einfluss der Blutabsorption auf die Verläufe des AF-Signals, die im Fall der Anregung durch das UV-Lichtsystem bei 414 nm, 542 nm und 576 nm und im Fall der Anregung durch das D-light-System bei 542 nm und 576 nm lokale Minima, entsprechend der Absorptionsmaxima von Oxyhämoglobin, aufweist.

3.1.3 In vivo Untersuchungen im Tierversuch

Anhand dieser Versuche sollte der erstmalige bildgebende Nachweis von spezifisch in Glioblastomen angereichertem HYP durch das etablierte D-light-System und durch das neuartige UV-Lichtsystem erfolgen.

Bei der Visualisierung der mit dem UV-Lichtsystem angeregten HYP-induzierten Fluoreszenz durch das FD-Kamerasystem stellte sich das Tumorgewebe hellrosa fluoreszierend dar. Es grenzte sich deutlich vom hellblau erscheinenden Normalgewebe ab (vgl. Abb. 3.7, linkes Bild). Das leicht hellblau erscheinende Normalgewebe basierte auf einem geringen Remissionsanteil des UV-Lichtsystems.

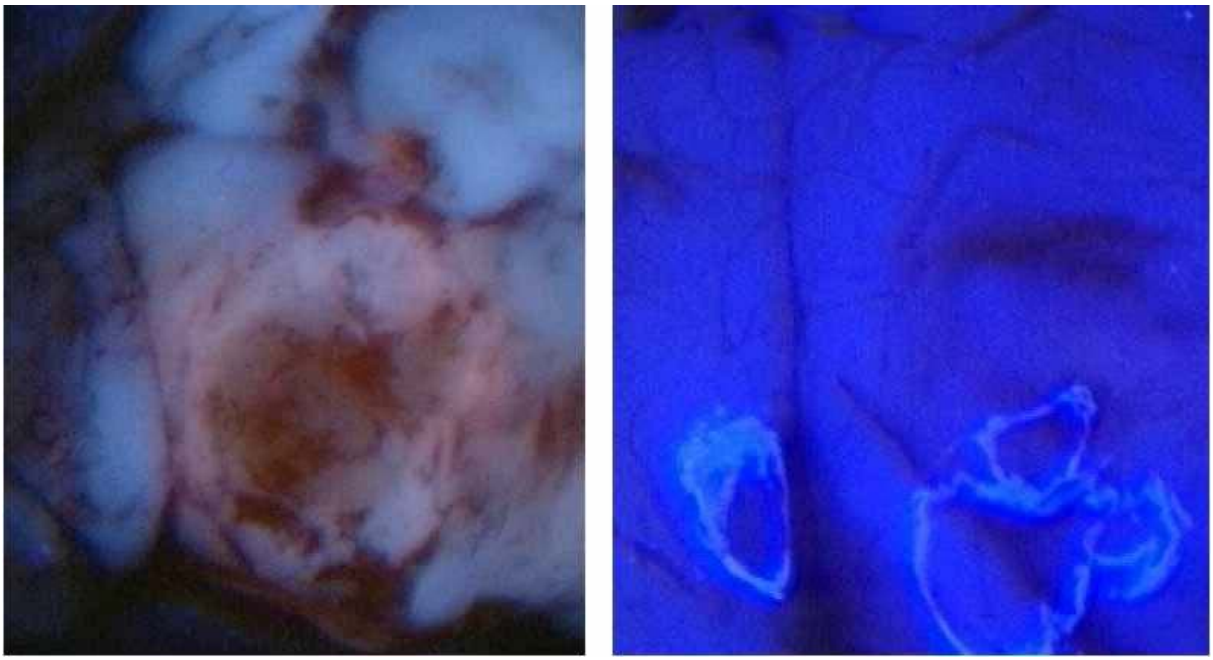

Abb. 3.7 HYP-induzierte Fluoreszenz angeregt durch das UV-Lichtsystem (links) und durch das D-light-System (rechts) beim C6-Gliom-Modell der Ratte

Die mit dem D-light–System angeregte HYP-induzierte Fluoreszenz konnte durch das FD-Kamerasystem nicht visualisiert werden. Dies ist maßgeblich darauf zurückzuführen, dass eine nicht vollständige Unterdrückung des rückgestreuten Anregungslichts die Darstellung des schwachen Fluoreszenzsignals nicht ermöglicht. Auf dem rechten Bild sind durch Anregung mit sichtbarem blauen Licht erzeugte störende Reflexe zu erkennen. Insgesamt konnte bei der Bestrahlung mit UV-Licht die Morphologie des Gewebes deutlich besser visualisiert werden.

In Abb. 3.8 ist der spektrale Verlauf für ein HYP-induziertes fluoreszenzpositives Areal sowie für benachbartes Normalgewebe dargestellt. Das Fluoreszenzspektrum für das Tumorgewebe wies im Gegensatz zum Normalgewebe ein für HYP charakteristisches Emissionsmaximum bei 600 nm auf. Das Nebenmaximum bei 700 nm wurde durch das Anregungslicht des UV-Lichtsystems erzeugt (Beugung erster Ordnung im Spektrometer). Der auffällige starke Anteil des AF-Signals ist darauf zurückzuführen, dass diese Daten durch eine Kontaktmessung generiert wurden, d. h. die Messsonde wurde direkt mit dem Gewebe kontaktiert.

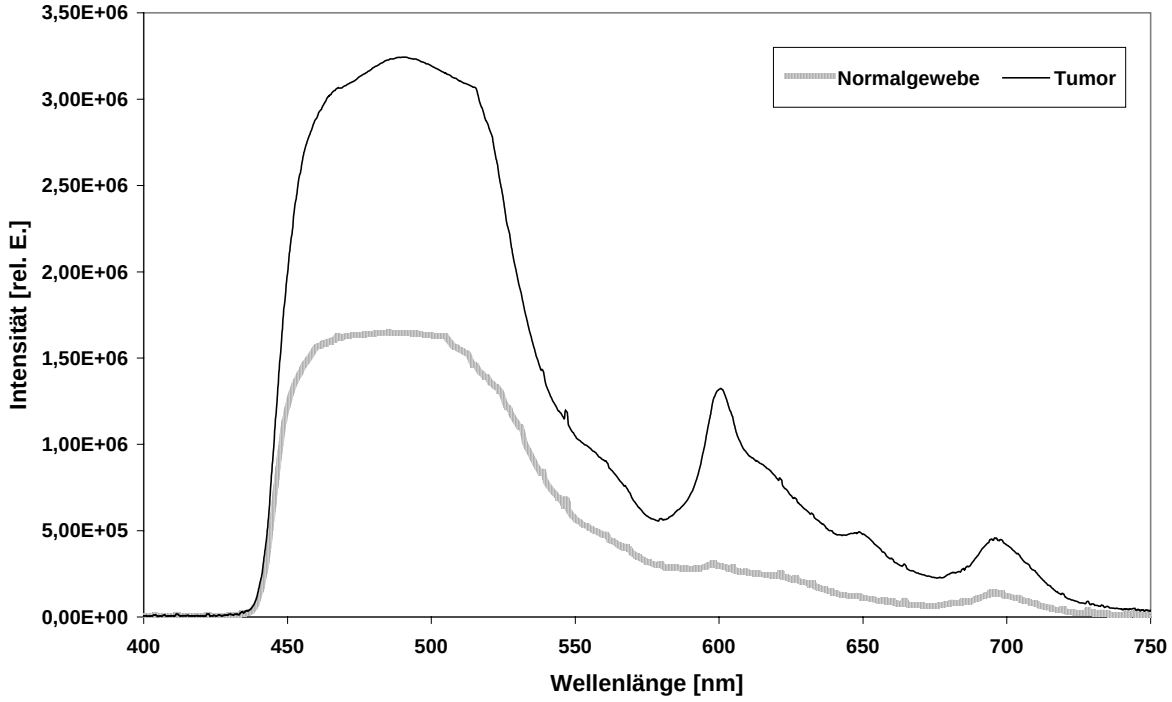

Abb. 3.8 Spektraler Verlauf der HYP-induzierten Fluoreszenz beim C6-Gliom-Modell der Ratte durch Anregung des UV-Lichtsystems

Das Anregungslicht des UV-Lichtsystems im Wellenlängenbereich von 340 nm bis 380 nm war ausreichend effizient, um die Fluoreszenz des induzierten PpIX im Rattentumor darzustellen.

Im linken Bild der Abb. 3.9 stellt sich das fluoreszenzpositive Gewebe, ähnlich der HYP-induzierten Fluoreszenz, rosa dar. Das hellblau erscheinende Normalgewebe ist wie bereits erwähnt auf den Remissionsanteil des UV-Lichtsystems zurückzuführen.

Abb. 3.9 **5-ALS-induzierte PpIX-Fluoreszenz angeregt durch das UV-Lichtsystem (links) und durch das D-light-System (rechts) beim C6-Gliom-Modell der Ratte**

In Abb. 3.8, rechts ist die mit dem D-light-System angeregte 5-ALS-induzierte PpIX-Fluoreszenz dargestellt. Das Tumorgewebe fluoreszierte subjektiv im Vergleich zur Anregung mit UV-Licht stärker. Das Normalgewebe war durch den hohen Anteil des diffus rückgestreuten blauen Anregungslichts gekennzeichnet. Im Vergleich zur UV-Anregung war weder beim Normal- noch beim Tumorgewebe eine Feinstruktur zu erkennen. Über das gesamte Bild sind störende sichtbare Reflexe überlagert, die eine detaillierte Beurteilung erschweren.

Das charakteristische Emissionsspektrum der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz ergab Fluoreszenzmaxima bei 635 nm und 700 nm (vgl. Abb. 3.10). Hier wiederum ist zu berücksichtigen, dass ein Anteil des Maximums bei 700 nm durch das Anregungslicht selbst erzeugt wurde. Beide Spektren sind durch ein stark ausgeprägtes AF-Signal gekennzeichnet. Benachbartes nicht fluoreszierendes Gewebe zeigte kein charakteristisches PpIX-Signal.

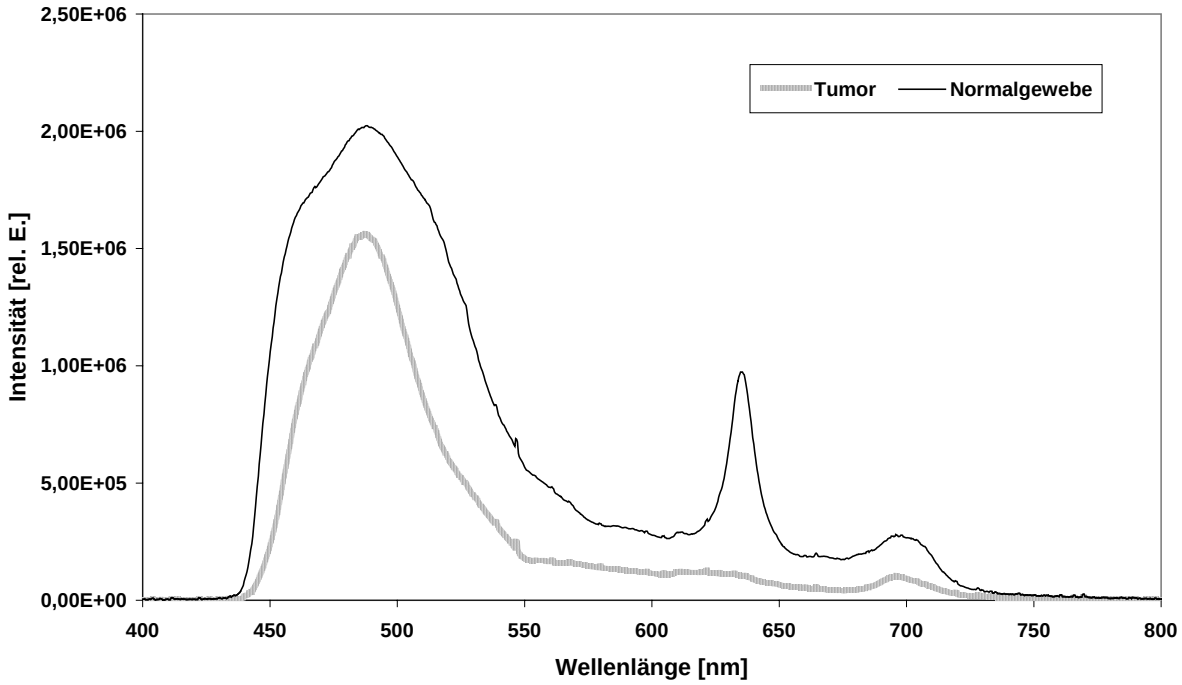

Abb. 3.10 Spektraler Verlauf der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz beim C6-Gliom-Modell der Ratte durch Anregung des UV-Lichtsystems

3.1.4 In vivo Untersuchungen in der Mundhöhle

Diese Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob eine Anreicherung von HYP in der Mundschleimhaut durch Anregung mit dem UV-Lichtsystem spektral nachgewiesen werden kann. Auch bei diesen Versuchen wurde zum Vergleich das D-light-System eingesetzt.

Abb. 3.11 stellt die spektralen Verläufe für unterschiedliche Screening-Punkte in der Mundhöhle dar. Das Emissionsmaximum für HYP ergab sich, entsprechend der Untersuchungen der Rattentumoren, bei ca. 600 nm. Die stärksten Intensitätswerte des Fluoreszenzmaximums wurden bei allen drei VP an den Screening-Punkten: Zungenrücken, Wange-rechts, Wange-links und am Zungenrand gemessen. Die Fluoreszenzsignale an den Screening-Punkten: harter Gaumen, Mundboden-lateral, Lippe-innen und weicher Gaumen hingegen waren im Vergleich dazu eher schwach ausgeprägt.

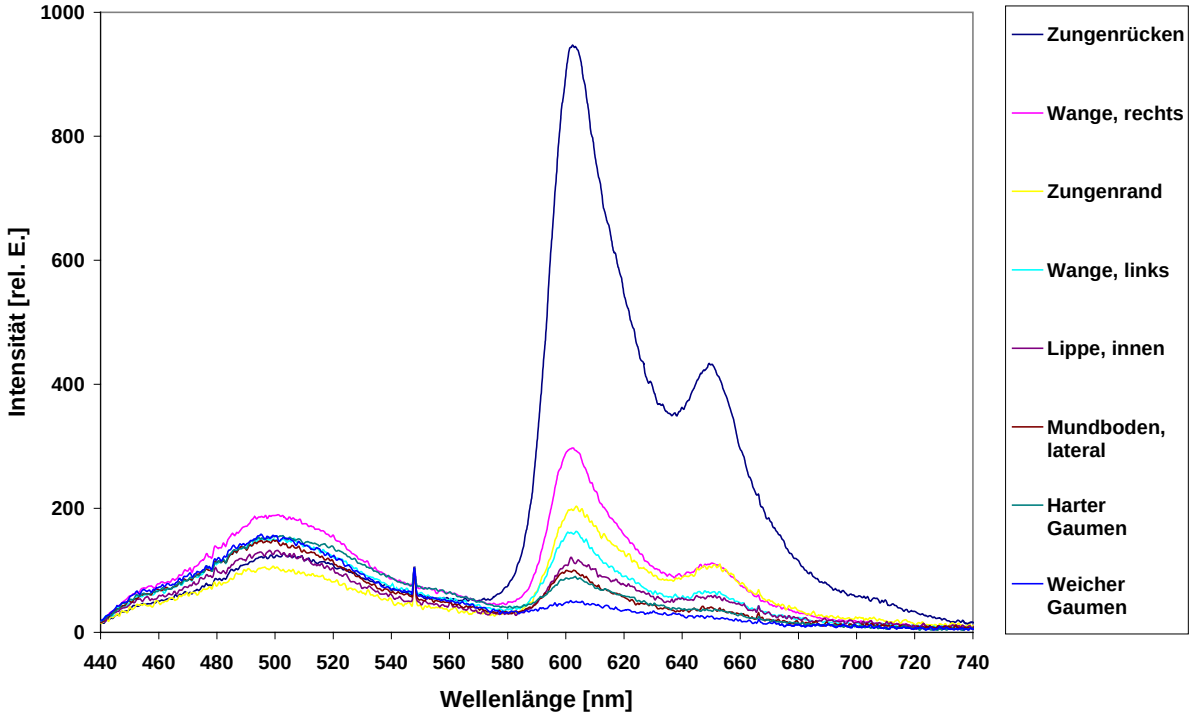

Abb. 3.11 HYP-induzierte Fluoreszenz gemessen an verschiedenen Standard-Screening-Punkte in der Mundhöhle (Bezeichnung der Screening-Punkte in der Legende rechts, von oben nach unten mit abnehmender Intensität)

Sowohl die Fluoreszenzintensität von HYP, als auch die AF des Gewebes wiesen eine starke Ortsabhängigkeit auf. Beide Signalanteile zeigten qualitativ in etwa ein gegenläufiges Verhalten: das maximale Fluoreszenzsignal und gleichzeitig das annähernd schwächste AF-Signal wurde am Zungenrücken gemessen. Die geringsten Fluoreszenzintensitäten erzeugten die Screening-Punkte harter und weicher Gaumen mit jeweils einem sehr stark ausgeprägtem AF-Signal.

Zur Beantwortung der Frage, ob sich der PS nur oberflächlich auf der Schleimhaut anlagerte, oder ob es zu einer Akkumulation des PS in der Schleimhaut kam, wurde bei der VP 2 nach 30 Minuten der Screening-Punkt „Wange-rechts“ abgebürstet. In Abb. 3.12 ist der spektrale Verlauf, der vor und nach dem Bürsten gemessen wurde, dargestellt. Das vor dem Bürsten ausgeprägte Fluoreszenzsignal bei 600 nm konnte nach dem Bürsten nicht mehr detektiert werden. Da die Messungen unmittelbar vor bzw. nach dem Bürsten erfolgten und nach dem Bürsten der Screening-Punkt nur kurzzeitig bestrahlt wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass das Verschwinden des Fluoreszenzsignals nicht auf ein Ausbleichen des PS zurückzuführen war.

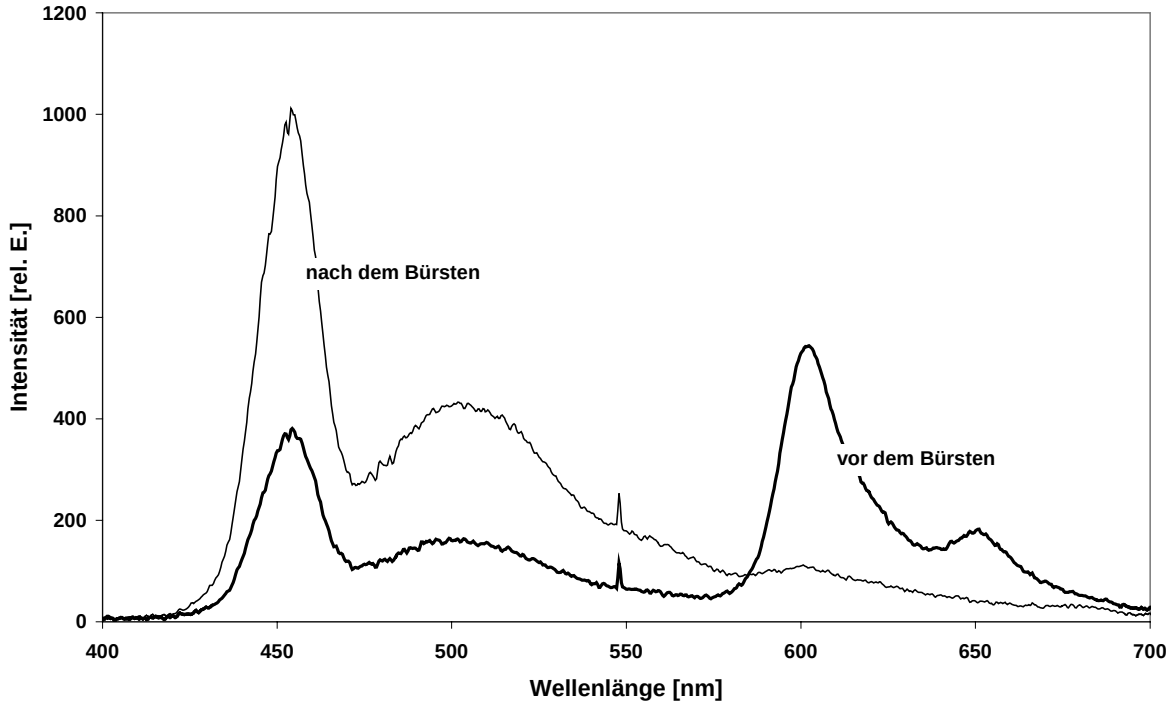

Abb. 3.12 Intensität des HYP-induzierten Fluoreszenzsignals der Versuchsperson 2 an der Wange-rechts, vor und nach dem Abbürsten eines Screening-Punkts

Zur Prüfung der Effektivität des UV-Lichtsystems als Anregungslichtquelle für die HYP induzierte Fluoreszenz erfolgte ein direkter Vergleich des Systems mit dem D-light-System. In Abb. 3.13 sind exemplarisch jeweils die Intensitätsverläufe für drei verschiedene Screening-Punkte dargestellt.

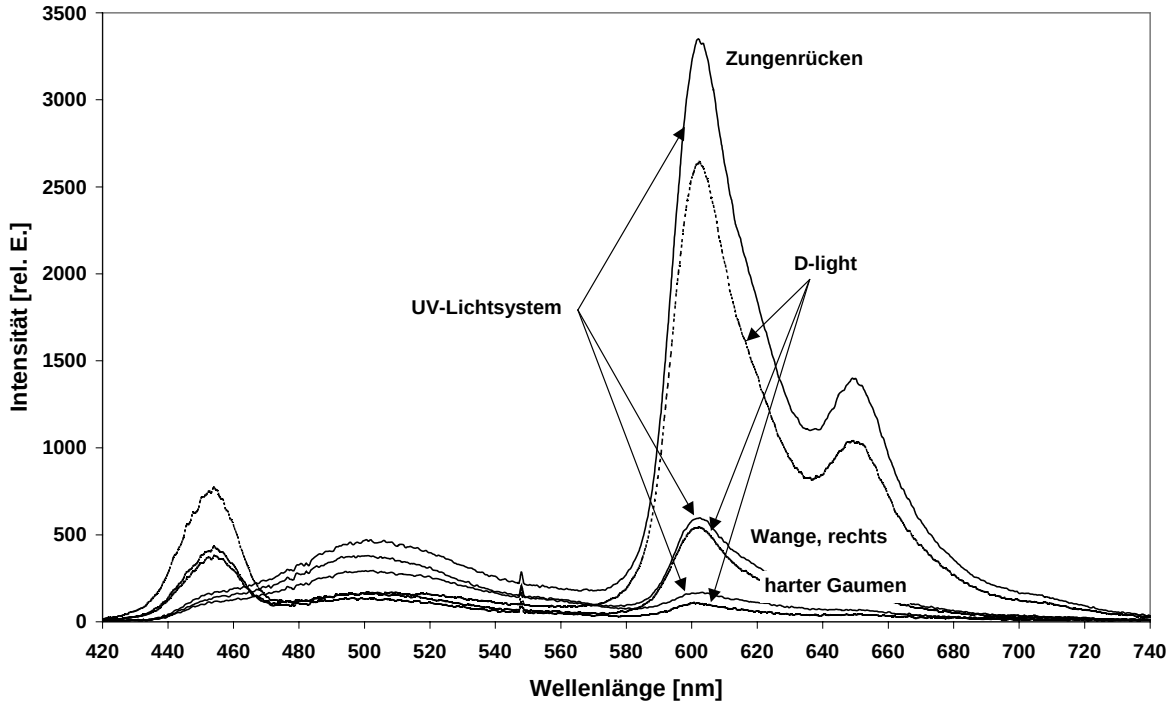

Abb. 3.13 Vergleich des UV-Lichtsystems mit dem D-light-System bzgl. der HYP-induzierten Fluoreszenz an verschiedenen Screening-Punkten in der Mundhöhle

Die stärkere Ausprägung des Emissionsspektrums bei der Anregung durch das UV-Lichtsystem war auf dessen höhere Bestrahlungsstärke zurückzuführen. Unter Berücksichtigung einer Anregung mit der gleichen Bestrahlungsstärke für beide Systeme würde das D-light-System ein ca. um den Faktor 1,28±0,21 stärkeres Fluoreszenzsignal induzieren. Unter der gleichen Berechnungsgrundlage erhält man für das UV-Lichtsystem ein ca. um den Faktor 1,33±0,47 stärker ausgeprägtes AF-Signal. Das Ergebnis der Ausprägung des Fluoreszenzsignals ist vergleichbar mit dem, das bei den Untersuchungen der Glioblastomgewebeproben (vgl. Kap.3.1.2) erzielt wurde.

3.1.5 In vivo Untersuchungen in der Harnblase

Ziel dieser Untersuchungen war der bildgebende Nachweis von spezifisch in der Harnblase akkumuliertem HYP durch das D-light- und UV-Lichtsystem. Im ersten Teil dieser Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob die bildgebende Darstellung von Phänomenen, die bei der Anregung der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz durch das D-light-System auftreten, sich entsprechend bei der Anregung der HYP-induzierten Fluoreszenz durch beide inkohärente Lichtsysteme reproduzieren lassen.

So zeigt sich nämlich bei der Anregung der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz durch das D-light-System am Harnblasenauslass und im Bereich der prostatischen Harnröhre eine unspezifische Fluoreszenz (vgl. Abb. 3.14 links) [161]. Diese unspezifische Fluoreszenz dient als Kontrolle für eine stattgefundene und ausreichende Exposition mit 5-ALS, insbesondere im Falle einer ansonsten vollständig fluoreszenznegativen Harnblase. Eine derartige unspezifische Rotfluoreszenz konnte durch Anregung der HYP-induzierten Fluoreszenz mit beiden Lichtsystemen nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 3.14, rechts).

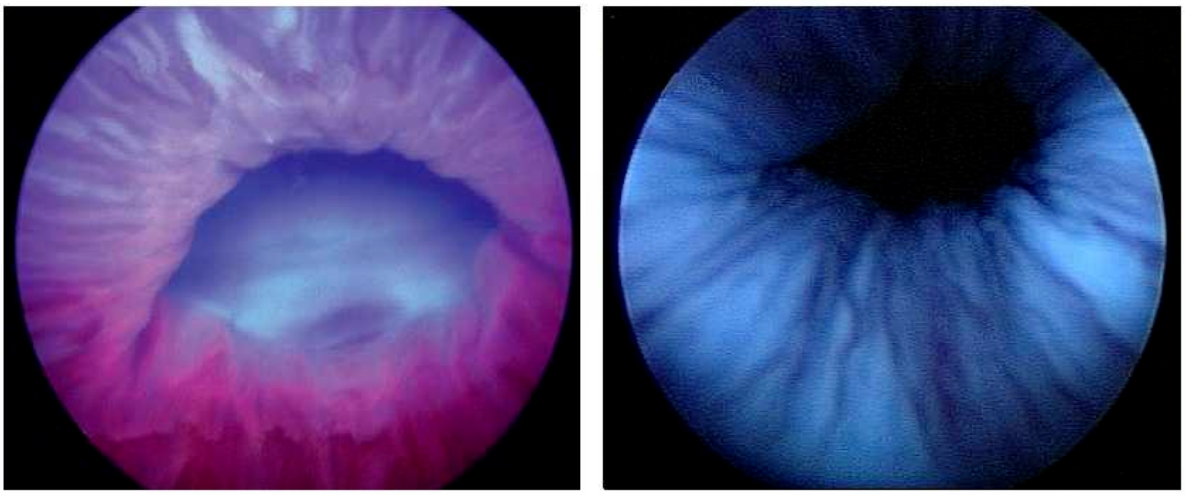

Abb. 3.14 **Links: unspezifische Fluoreszenz am Harnblasenauslass bei Anregung der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz durch das D-light-System. Rechts: Unauffälliger Harnblasenauslass bei Anregung der HYP-induzierten Fluoreszenz durch das UV-Lichtsystem**

Ein Phänomen das sowohl bei der Anregung der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz durch das D-light-Systems als auch bei der Anregung der HYP-induzierten Fluoreszenz durch beide Lichtsysteme beobachtet werden konnte, sind streifenförmige fluoreszenzpositive Artefakte, die durch eine tangentiale endoskopische Beurteilung der Schleimhaut der Harnblasenwand erzeugt wurden. Abb. 3.15 stellt die unspezifische Rotfluoreszenz dar, die durch das D-light-System bei Anregung der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz (linkes Bild) und bei Anregung der HYP-induzierten Fluoreszenz (rechtes Bild) erreicht wurde.

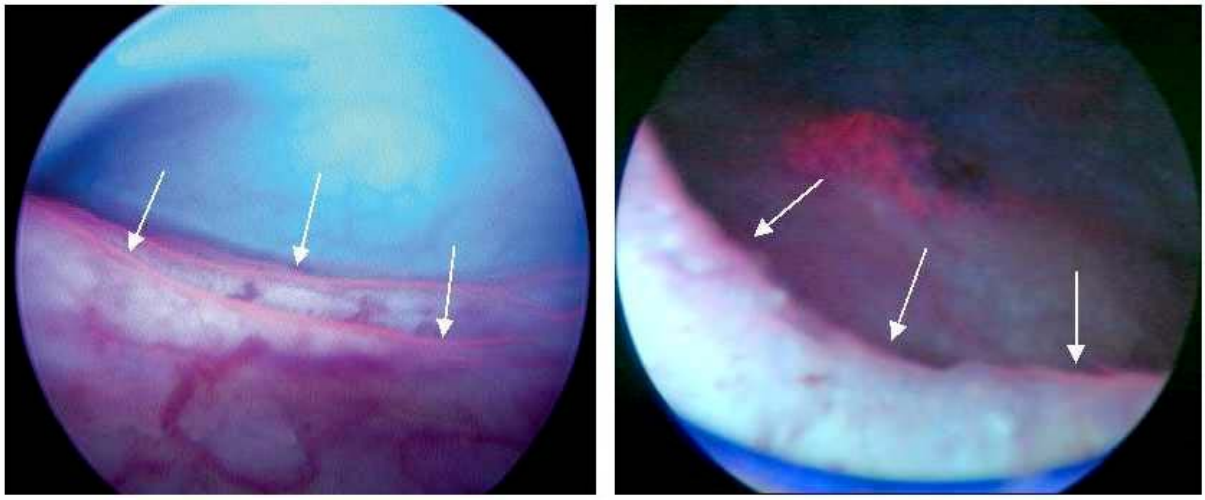

Abb. 3.15 Unspezifische Rotfluoreszenz der Harnblasenschleimhaut bei tangentialer Sicht. Links bei Anregung der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz und rechts bei Anregung der HYP-induzierten Fluoreszenz durch das D-light-System

Für diesen gewebeoptischen Effekt gibt es zwei Ursachen: zum einen führt die schräge Beleuchtung bei tangentialer Sicht zu einer Erhöhung der Bestrahlungsstärke direkt unterhalb der Oberfläche des Urothels. Als Folge daraus kommt es zu einer Erhöhung der Fluoreszenz der in dieser Schicht befindlichen Fluorophore. Zum anderen trägt die Winkelabhängigkeit der Fluoreszenzabstrahlcharakteristik dieser Fluorophore zu diesem Effekt bei, so dass die unter einem flachen Winkel bestrahlten Fluorophore mehr Fluoreszenzlicht emittieren [150].

Abb. 3.16 zeigt den Haupt- (oben) und Nebenbefund (unten) eines Patienten nach HYP-Instillation unter Weißlicht (links) und Fluoreszenzanregungslicht (rechts). Beim Hauptbefund ging man von einem ausgedehnten exophytären Tumor aus, der sich sowohl unter Weißlicht als auch unter Fluoreszenzanregungslicht deutlich vom Normalgewebe abgrenzte. Die eindeutig unter Weißlicht erkennbare Blutung im Bereich des Hauptbefunds, stellt sich unter Fluoreszenzanregungslicht dunkelgrün bis schwarz dar. Dies resultiert aus der speziellen Farbkontrastbildgebung des FD-Kamerasystems.

Der Nebenbefund ließ sofort ein CIS vermuten. Diese flachen Läsionen sind nicht immer an typischen morphologischen Auffälligkeiten zu erkennen. Daher haben sie einen großen Einfluss auf die Prognose des Patienten. CIS, die wie in diesem Fall, in der Nähe von exophytären Tumoren auftreten, können sich sehr rasch zu muskelinfiltrierenden Tumoren entwickeln. Durch den Fluoreszenzmodus konnte die Ausdehnung dieses Befunds exakter abgegrenzt werden. Es sind auch kleinste Details, wie der kleine fluoreszierende Bereich am rechten

Rand des Bilds, oberhalb des größeren Blutgefässes erkennbar, die unter Weißlicht nur sehr schwer oder gar nicht detektiert werden können.

Nach eingehender histopathologischer Untersuchung wurden beide fluoreszenzpositiven Befunde entgegen der Erwartung als benigne eingestuft.

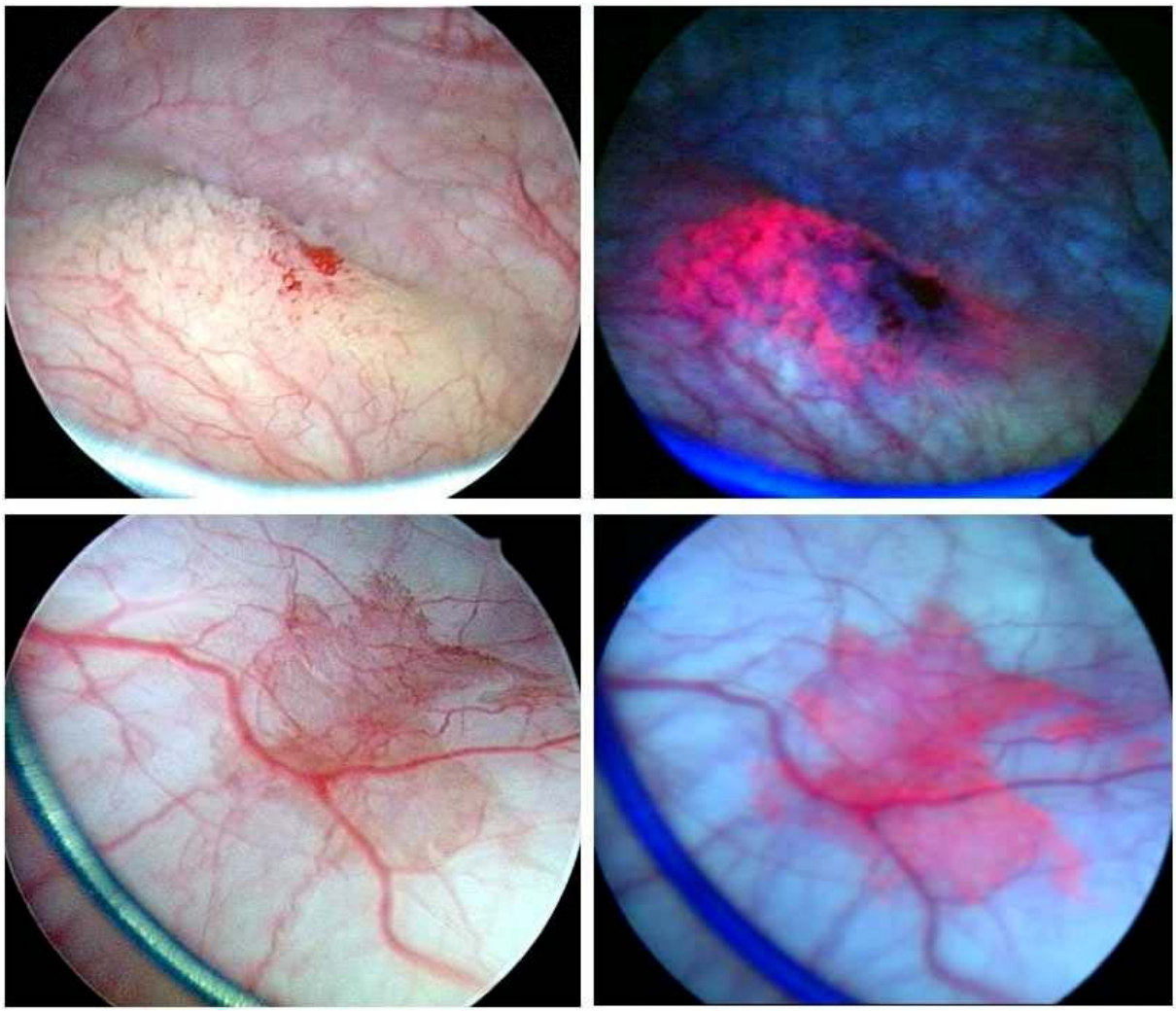

Abb. 3.16 Haupt- (oben) und Nebenbefund (unten) eines fluoreszenzpositiven Areals in der Harnblase unter Weißlicht (links) und Fluoreszenzanregung durch das D-light-System (rechts)

Im zweiten Teil dieses Kapitels erfolgt die endoskopische in vivo Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten, die in einem Hohlorgan wie der Harnblase mit zwei grundsätzlichen Schwierigkeiten behaftet sind.

Die erste Schwierigkeit sind die geometrischen Verhältnisse bei der Messung. Das Fluoreszenzsignal ist stark vom Abstand des distalen Endes des Endoskops zur Harnblasenwand abhängig. Ebenso hat der Beobachtungswinkel des Endoskops zur Harnblasenwand einen

Einfluss. Zur Erfassung der Spektren wurde daher der Abstand und die Ausrichtung des Endoskops zur Harnblasenwand in etwa konstant gehalten.

Die zweite Schwierigkeit liegt in der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität zu den gewebeoptischen Parametern und der Dicke der mit PpIX akkumulierten Urothelschicht. Da im Rahmen dieses Versuchs die Spektren jeweils am selben Referenzpunkt gemessen wurden, können diese Einflüsse für eine vergleichende, relative Aussage vernachlässigt werden.

In Abb. 3.17 sind zwei Spektren, die während einer Zystoskopie in einem fluoreszenzpositiven Areal (vgl. Abb. 3.16 oben rechts) detektiert wurden, dargestellt. Zur Erfassung der Spektren erfolgte die Anregung der HYP-induzierten Fluoreszenz zuerst mit dem D-light-System und anschließend mit dem UV-Lichtsystem.

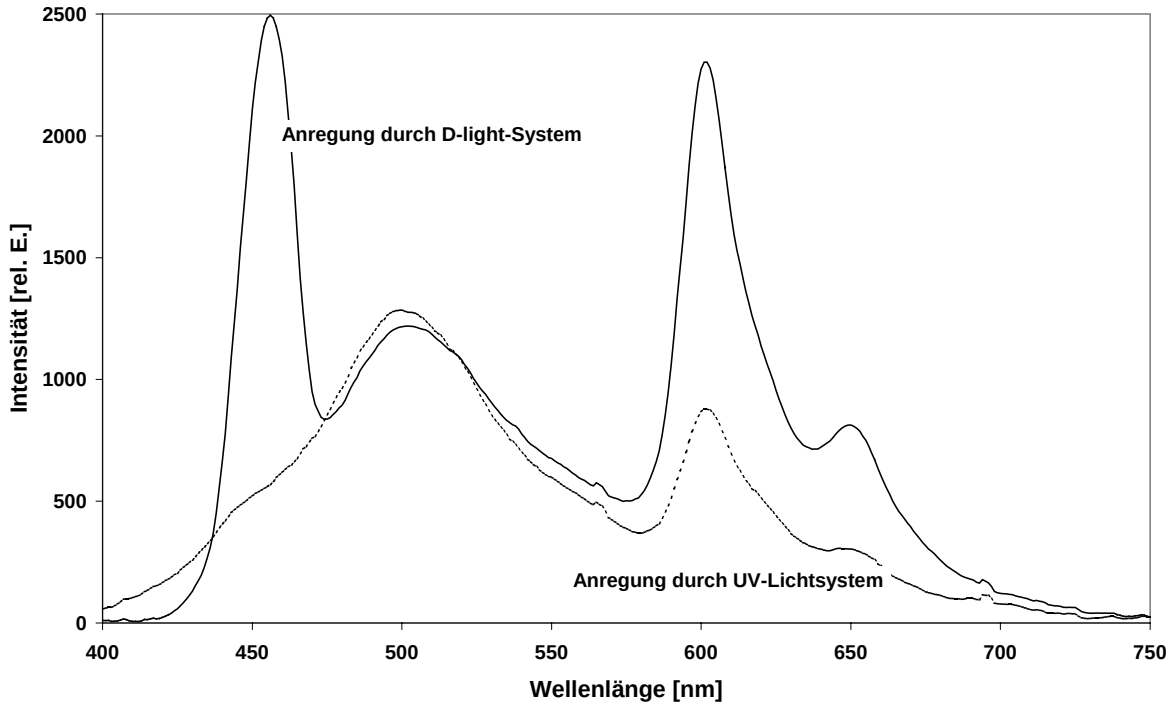

Abb. 3.17 Spektraler Verlauf der HYP-induzierten Fluoreszenz in der Harnblase durch Anregung mit dem D-light-System und UV-Lichtsystem

Der charakteristische Verlauf des HYP-Signals fiel bei der Anregung durch das UV-Lichtsystem schwächer aus. Ursachen dafür sind zum einen unterschiedliche Bestrahlungsstärken der Lichtsysteme und zum anderen die Tatsache, dass durch den Systemwechsel während der Untersuchung nicht exakt der gleiche Messpunkt getroffen werden konnte. Bei der UV-Anregung war das AF-Signal im Vergleich zum HYP-Signal stärker ausgeprägt. Bei der Anregung mit dem D-light-System zeigte sich ein ausgeprägtes Fluoreszenzmaximum bei 600 nm mit

einem dazu schwächeren AF-Signal. Beide Systeme erzeugten ein nahezu identisch charakteristisches AF-Signal.

Abb. 3.18 zeigt exemplarisch das Emissionsspektrum eines fluoreszenzpositiven Areals am Harnblasenboden nach intravesikaler Instillation von HYP im Vergleich zu direkt benachbartem Normalgewebe (vgl. Abb. 3.16, Hauptbefund). Als Anregungslichtquelle diente das D-light-System.

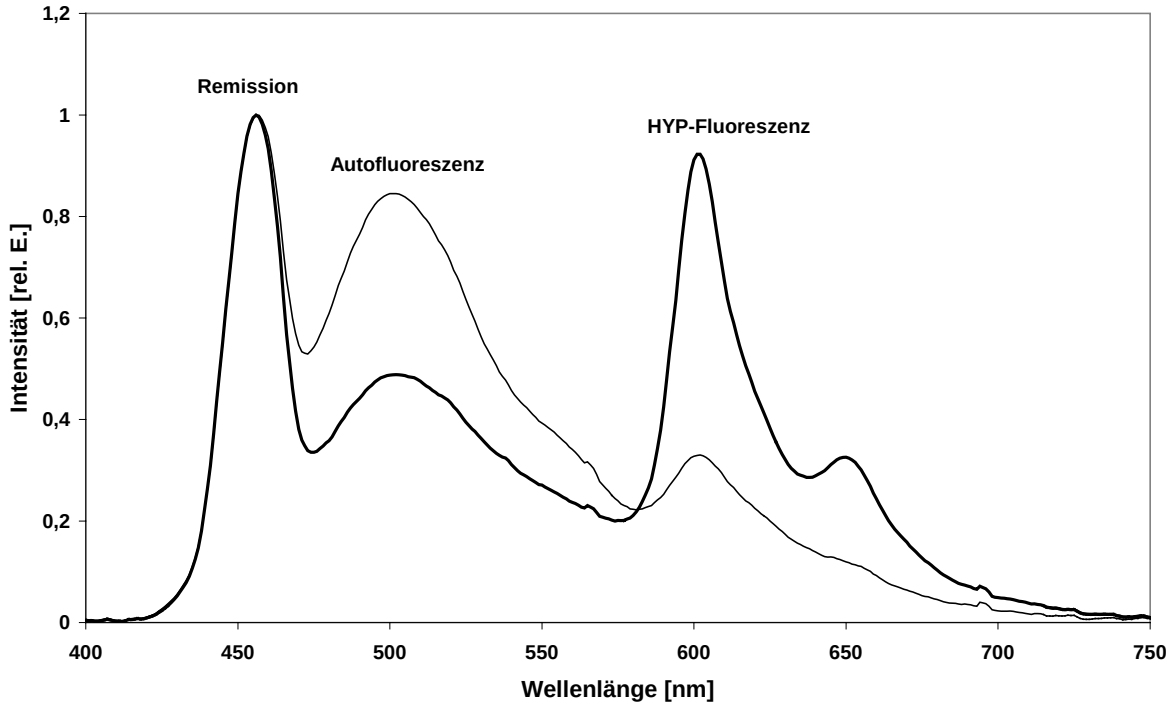

Abb. 3.18 Emissionsspektrum eines fluoreszenzpositiven Areals (dicke Linie) im Vergleich zu angrenzendem Normalgewebe (dünne Linie) in der Harnblase. Die Anregung der HYP-induzierten Fluoreszenz erfolgte durch das D-light-System.

Der spektrale Verlauf des fluoreszenzpositiven Areals und des Normalgewebes beschrieb im kurzwelligen Bereich mit dominantem AF-Signal (480 nm bis 580 nm) und dem längerwelligen Bereich der HYP-Fluoreszenz mit dem Maximum bei 600 nm ein gegenläufiges Verhalten: während die Intensität der HYP-Fluoreszenz im fluoreszenzpositiven Areal deutlich höher war (ca. Faktor 2,2), wies das Normalgewebe eine erhöhte AF (ca. Faktor 1,6) auf.

3.1.6 Ausbleichen der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz

Die Fluoreszenz von PpIX nimmt unter Bestrahlung mit UV-Licht oder Blaulicht im Bereich der Absorptionsbanden von PpIX ab. Diesen Vorgang bezeichnet man als Ausbleichen oder auch als Photobleaching. Im Falle des PpIX führt dies letztendlich zu einem Verschwinden der roten Fluoreszenz.

In diesem Kapitel wird zum einen das Ausbleichverhalten von PpIX in Lösung und zum anderen von PpIX in Glioblastomgewebe mittels der Bestrahlung durch jeweils beide Lichtsysteme beschrieben (vgl. Kap. 2.1.7.6).

Der spektrale Verlauf von reinem PpIX ergab sich gemäß Abb. 3.19.

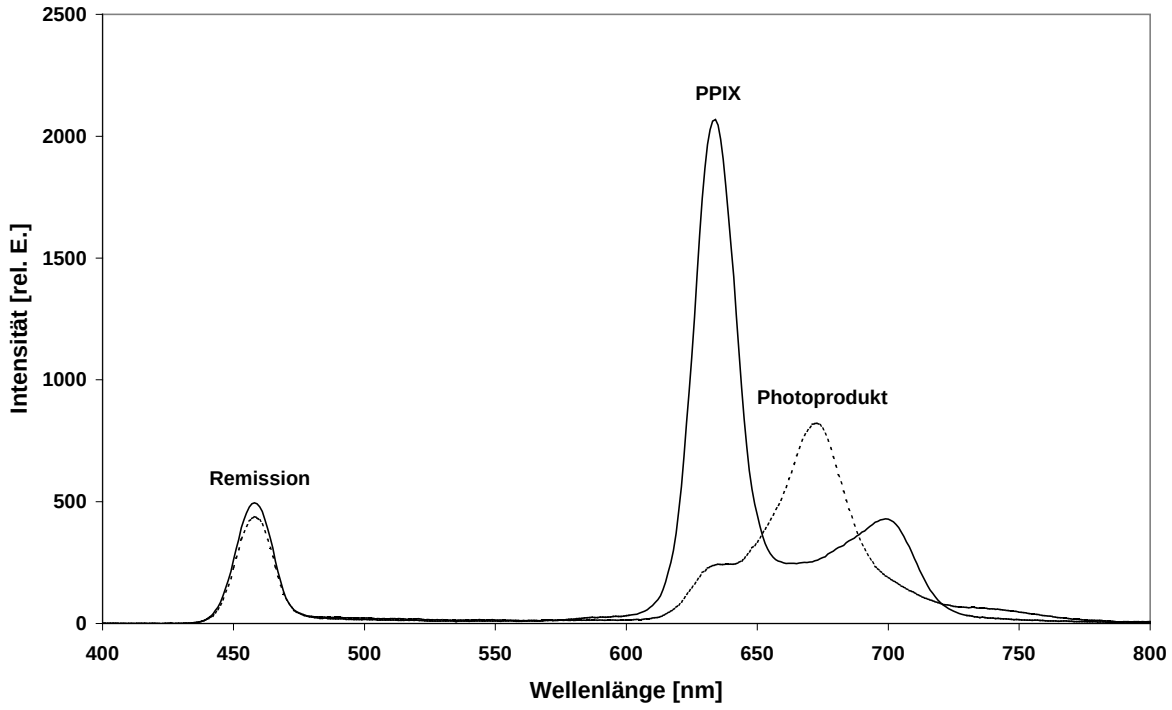

Abb. 3.19 Spektraler Verlauf von PpIX (durchgezogene Linie) und dessen Photoprodukt (gestrichelte Linie) durch Anregung mit dem D-light-System

Mit zunehmender Bestrahlungsdauer der PpIX-Lösung kommt es zur Bildung und zum Anstieg der Photoprodukte, hauptsächlich Chlorin Photoprotoporphyrin (Ppp). Der jeweilige Anteil der Photoprodukte musste ebenfalls von jedem PpIX-Spektrum abgezogen werden.

Grundlage für diese Berechnungen waren folgenden Annahmen: Das erste Spektrum, bereinigt vom Untergrund, enthielt ausschließlich PpIX also noch kein Photoprodukt. Das letzte gemessene Spektrum, bereinigt vom Untergrund, abzüglich des PpIX war reines Photoprodukt (vgl. Abb. 3.19).

Das Ergebnis des Ausbleichverhaltens von PpIX in Lösung sowie der Verlauf des Photoprodukts ist in Abb. 3.20 für die Anregung durch das UV-Lichtsystem und das D-light-System dargestellt.

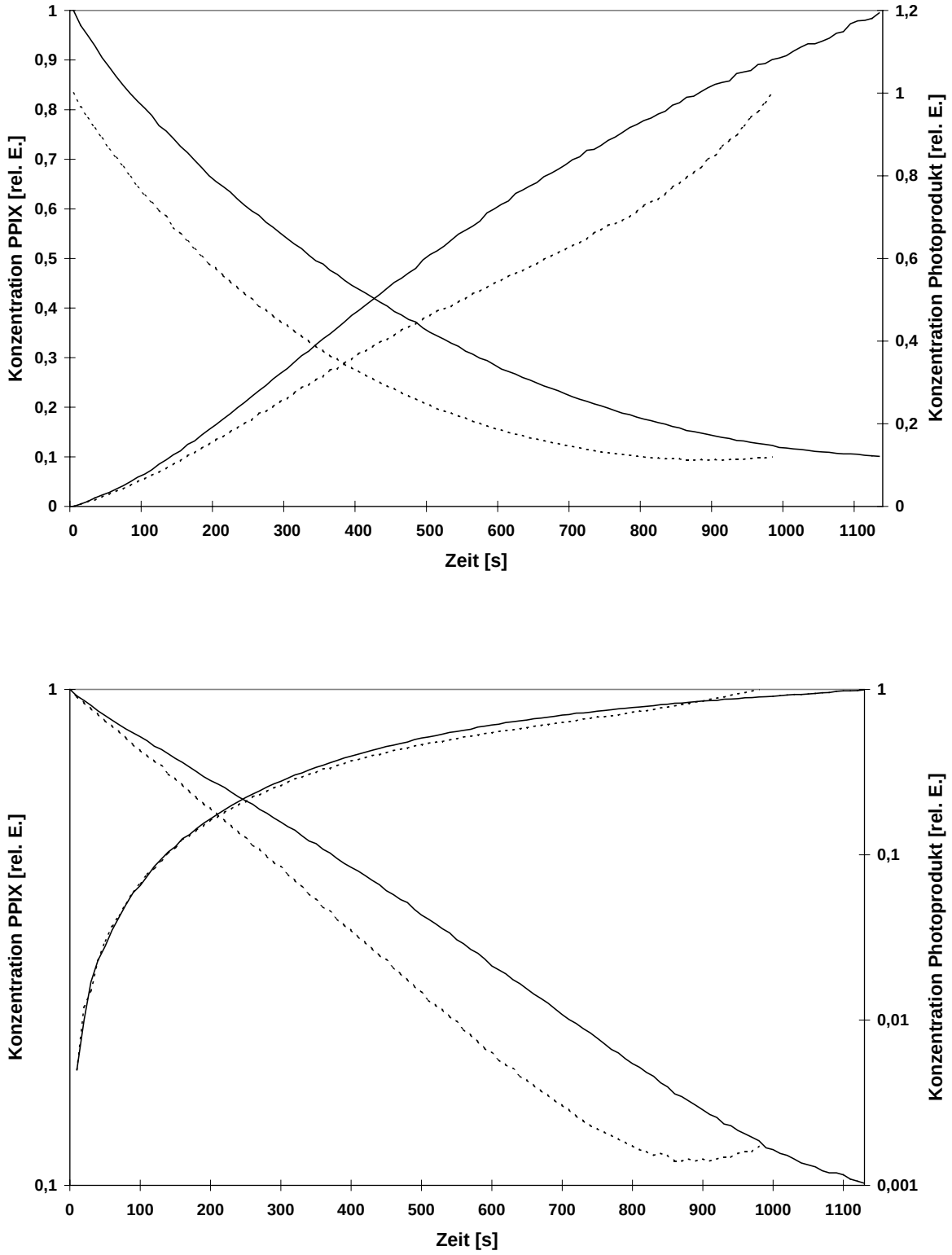

Abb. 3.20 **Ausbleichverhalten von PpIX in Lösung sowie der Verlauf des Photoprodukts bei Anregung durch das UV-Lichtsystem (gestrichelte Linie) und durch das D-light-System (durchgezogene Linie). Abb. unten: Darstellung mit logarithmischer Ordinate.**

Durch Bestrahlung mit UV-Licht wurde das PpIX in Lösung im Vergleich zur Bestrahlung mit blauem Anregungslicht stärker ausgeblichen. Verdeutlicht wird dies durch die logarithmische Darstellung der Verläufe, die annähernd linear mit unterschiedlicher Steigung verlaufen; abgesehen vom Ausbleichverhalten von PpIX bei UV-Anregung für Bestrahlungszeiten größer 800 s. Die geringere Steigung der PpIX-Funktion, die durch die Anregung des D-light-Systems erzeugt wurde, ergab ein geringeres Ausbleichen von PpIX in Lösung im Vergleich zur Anregung mit dem UV-Lichtsystem.

Der Verlauf der Funktion des Photoprodukts verhielt sich für beide Anregungswellenlängenbereiche annähernd gleich. Dies wird bei der logarithmischen Darstellung der Verläufe verdeutlicht.

Zur Berechnung der Ausbleichfunktion von PpIX in Glioblastomgewebe wurden folgende Festlegungen getroffen. Da für diese Messungen keine Gewebeprobe ohne angereichertes PpIX zur Verfügung stand und somit kein reines Untergrundsignal gemessen werden konnte, errechnete sich das reine PpIX-Spektrum aus der Differenz des zweiten mit dem ersten Spektrum (Referenzspektrum). Der Untergrund ergab sich folglich aus der Differenz des Referenzspektrums mit dem reinen PpIX-Spektrum. Die Bestimmung des reinen Photoprodukts erfolgte aus dem letzten Spektrum, mit maximalem Photoproduktanteil, abzüglich dem Untergrund und dem reinen PpIX-Spektrum.

Für einen quantitativen Vergleich wurde eine gleichmäßig fluoreszierende Gewebeprobe verwendet. Nach Teilung der Probe in zwei gleich große Volumenanteile (vgl. Abb. 3.21), erfolgte die Messung jeweils auf den erzeugten Schnittflächen. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass der jeweils bestrahlte Bereich der Zellen entsprechend gleich stark mit PpIX akkumuliert war.

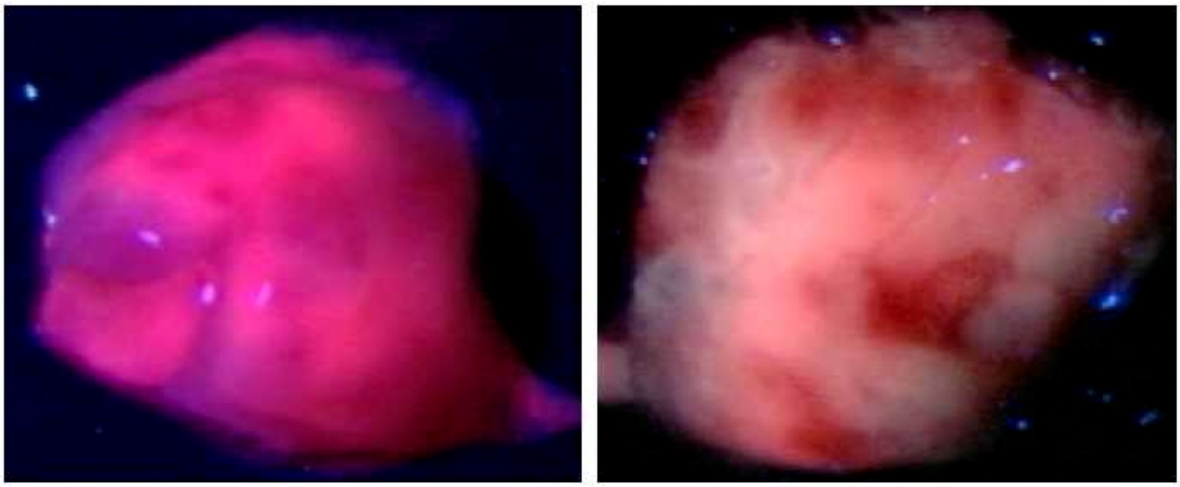

Abb. 3.21 Hirngewebeproben zur Messung des Ausbleichverhaltens der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz bei Anregung durch das D-light-System (links) und das UV-Lichtsystem (rechts)

Abb. 3.22 stellt das Ausbleichverhalten von PpIX und den Verlauf des Photoprodukts im Glioblastomgewebe für die Anregung durch das UV-Lichtsystem und das D-light-System dar.

Bis zu einer Dauer von 400 s erfolgte ein gleichmäßiges Ausbleichen von PpIX bei der Bestrahlung durch beide Lichtsysteme. Anschließend differieren beide Verläufe. Es kam zu einem umgekehrten Effekt im Vergleich zur Messung des Ausbleichens von PpIX in Lösung. Im Gewebe wurde das PpIX durch Anregung mit UV-Licht weniger stark ausgeblichen als durch die Anregung mit blauem Licht.

Ähnlich dem Ausbleichverhalten von PpIX in Lösung war auch bei diesem Versuch der Verlauf des Photoprodukts bei der Anregung durch beide Lichtsysteme annähernd gleich.

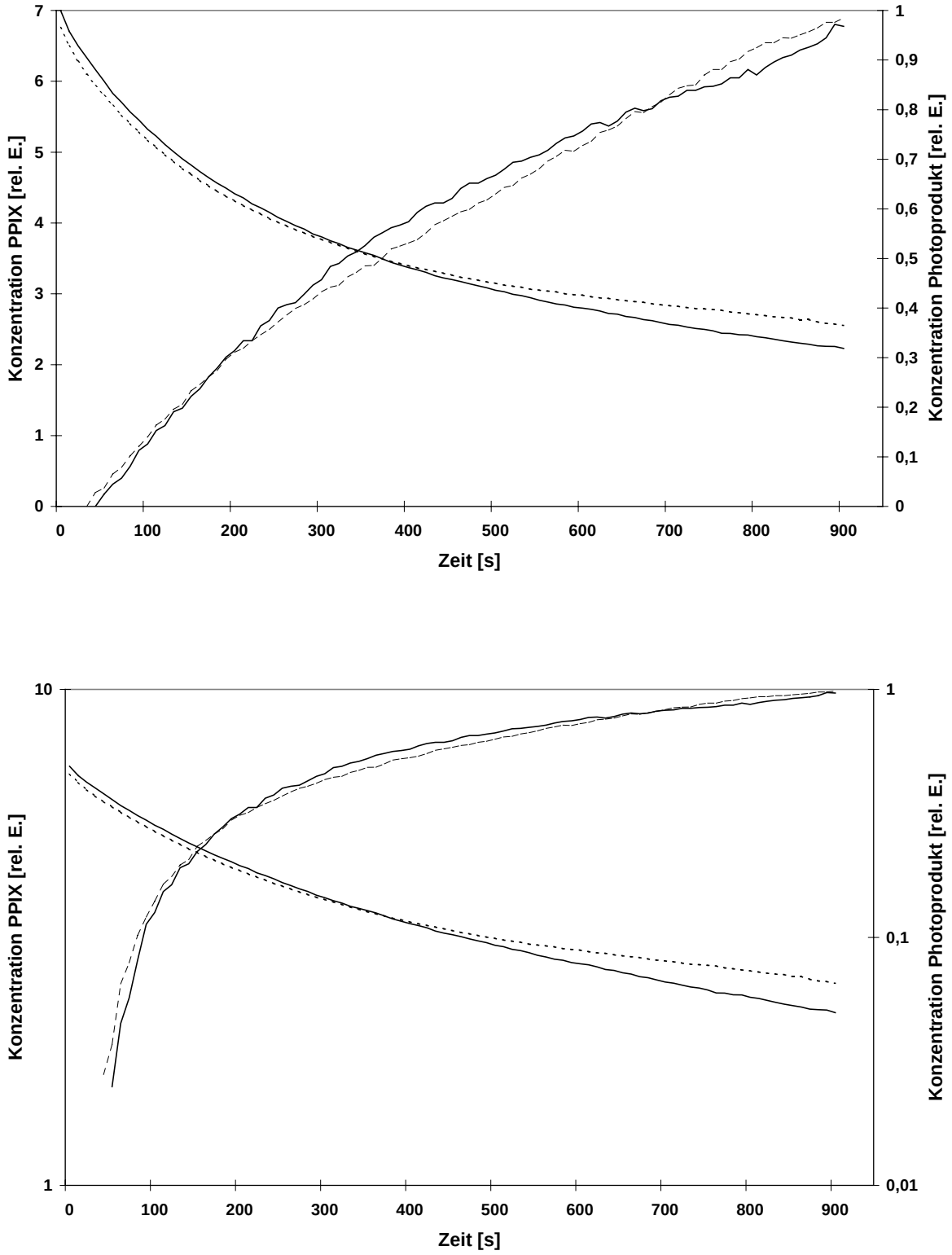

Abb. 3.22 **Ausbleichverhalten von PpIX und Verlauf des Photoprodukts in Glioblastomgewebe bei Anregung durch das UV-Lichtsystem (gestrichelte Linie) und durch das D-light-System (durchgezogene Linie). Abb. unten: Darstellung mit logarithmischer Ordinate.**

Als ein Ergebnis der Bestimmung des reinen PpIX-Spektrums zum einen aus der Lösung und zum anderen aus dem Glioblastomgewebe ist in Abb. 3.23 der Vergleich beider Verläufe dargestellt.

Die bekannte Rotverschiebung des Emissionsspektrums von Porphyrinen in Gewebe [49, 107, 125] zu PpIX in Lösung um 3 nm konnte hierdurch bestätigt werden.

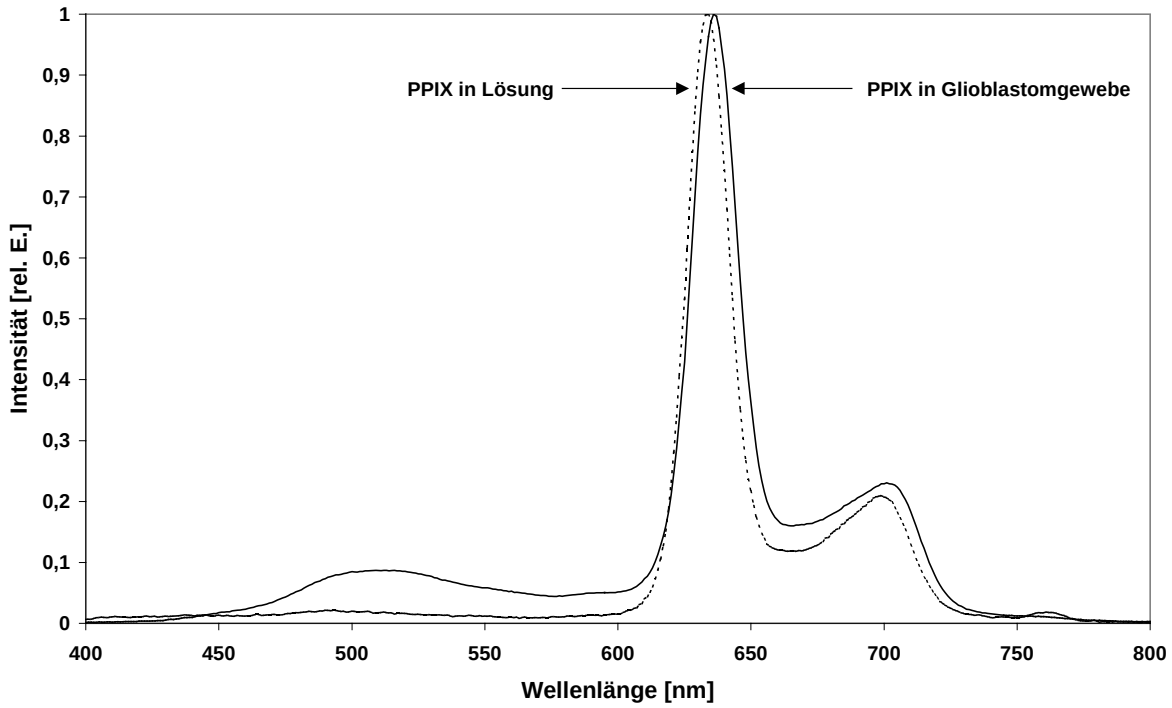

Abb. 3.23 Vergleich des Emissionsspektrums von PpIX gelöst in Wasser und Ethanol (gestrichelte Linie) mit dem von in Glioblastomgewebe akkumuliertem PpIX (durchgezogene Linie)

Der Unterschied des PpIX-Spektrums in Glioblastomgewebe zum PpIX-Spektrum in Lösung im Bereich von 450 nm bis 620 nm war auf die AF, bedingt durch die im Gewebe befindlichen Fluorophore, zurückzuführen.

Betrachtet man die Entstehung des Photoprodukts in Lösung und im Gewebe bei jeweils nahezu identischem PpIX-Ausgangsspektrum, so ergeben sich die Spektren gemäss Abb. 3.24 für die Anregung mit dem UV-Lichtsystem. Bei der Bestrahlung von PpIX in Lösung über einen Zeitraum von 950 Sekunden entsteht deutlich mehr Photoprodukt mit einem Maximum bei ca. 670 nm im Vergleich zur Bestrahlung von PpIX im Gewebe über den gleichen Zeitraum.

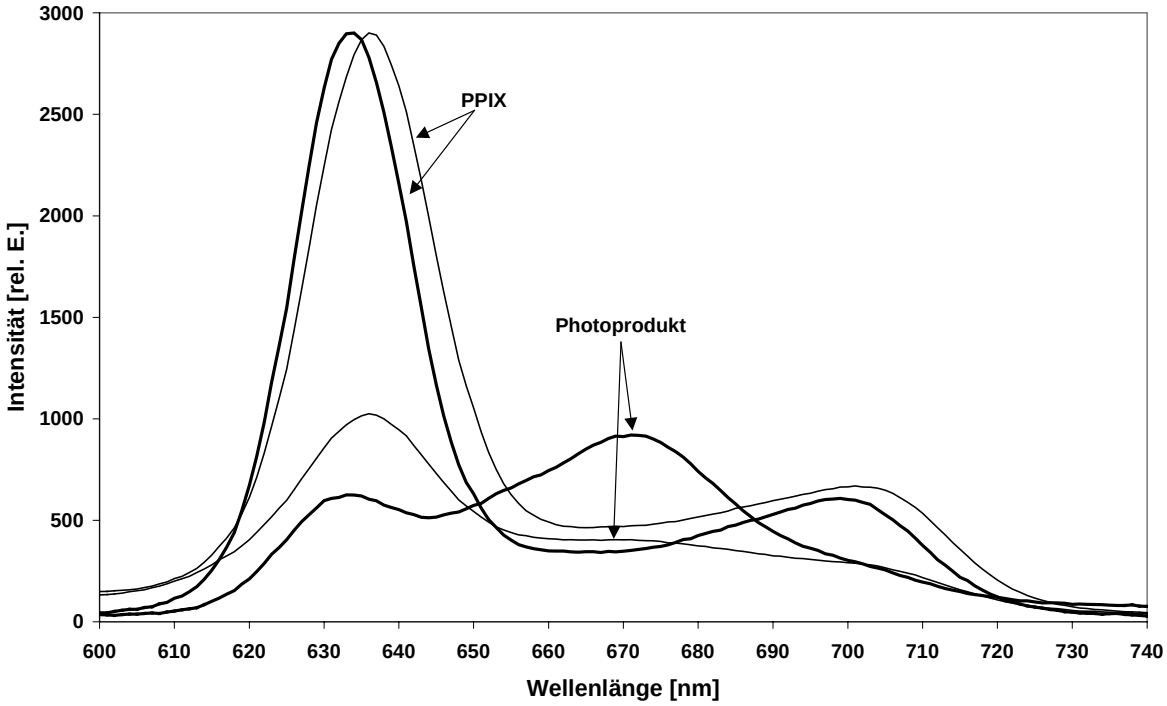

Abb. 3.24 Vergleich der Entstehung des Photoprodukts in Lösung (dicke Linie) zum dem im Gewebe (dünne Linie) bei Anregung durch das UV-Lichtsystem. Zur Ergänzung ist das PpIX-Ausgangssignal in Lösung (dicke Linie) und im Gewebe (dünne Linie) dargestellt.

Bei identischer Vorgehensweise wurde bei der Bildung des Photoprodukts bei Bestrahlung von PpIX in Lösung und im Gewebe durch das D-light-System ein entsprechendes Verhalten beobachtet.

3.1.7 Bestimmung der Effektivität der Anregungswellenlängenbereiche beider Lichtsysteme für die HYP-induzierte Fluoreszenz

Abb. 3.25 zeigt das Ergebnis der HYP-Emission bei einer Wellenlänge von 600 nm zum einen für eine Anregungswellenlänge von 365 nm, die der Zentralwellenlänge des Bandpassfilters des UV-Lichtsystems entspricht und zum anderen für eine Anregungswellenlänge von 407 nm, die der Zentralwellenlänge des Anregungsfilters des D-Light-Systems entspricht.

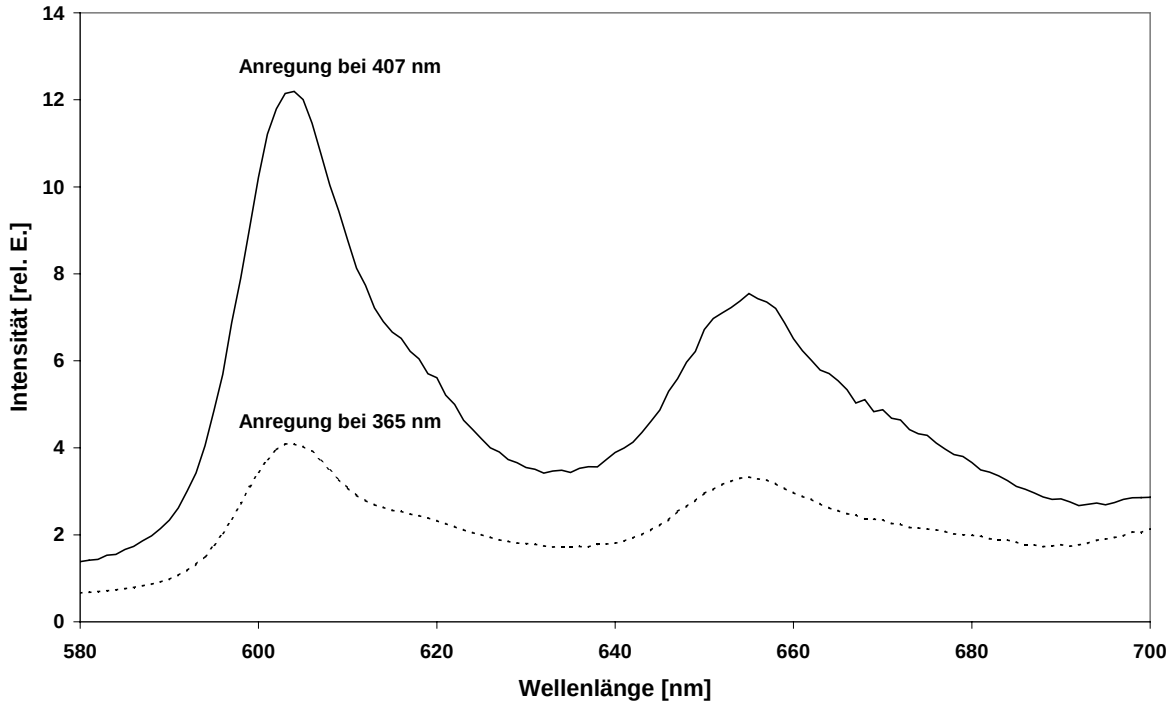

Abb. 3.25 Messung der Fluoreszenzintensität einer mit HYP angereicherten Glioblastomgewebeprobe bei einer Anregungswellenlänge von 407 nm und 365 nm durch ein Spektralfluorometer (Fluoromax 2)

Bei einer Anregungswellenlänge von 407 nm wurde ein signifikant stärkeres HYP-Signal induziert im Vergleich zur Anregungswellenlänge bei 365 nm.

3.2 Inkohärentes PDT-Lichtsystem

3.2.1 Experimentelle Untersuchungen mit dem inkohärenten PDT-Lichtsystem

Ein entscheidendes Ergebnis dieser Arbeit war die Entwicklung und Realisierung eines Prototyps eines inkohärenten PDT-Systems zur integralen Bestrahlung der Harnblase.

In Abb. 3.26 ist das Spektrum des inkohärenten PDT-Systems dargestellt, das am distalen Ende des Quarzglaslichtleiters (vgl. Kap. 2.2.2) gemessen wurde.

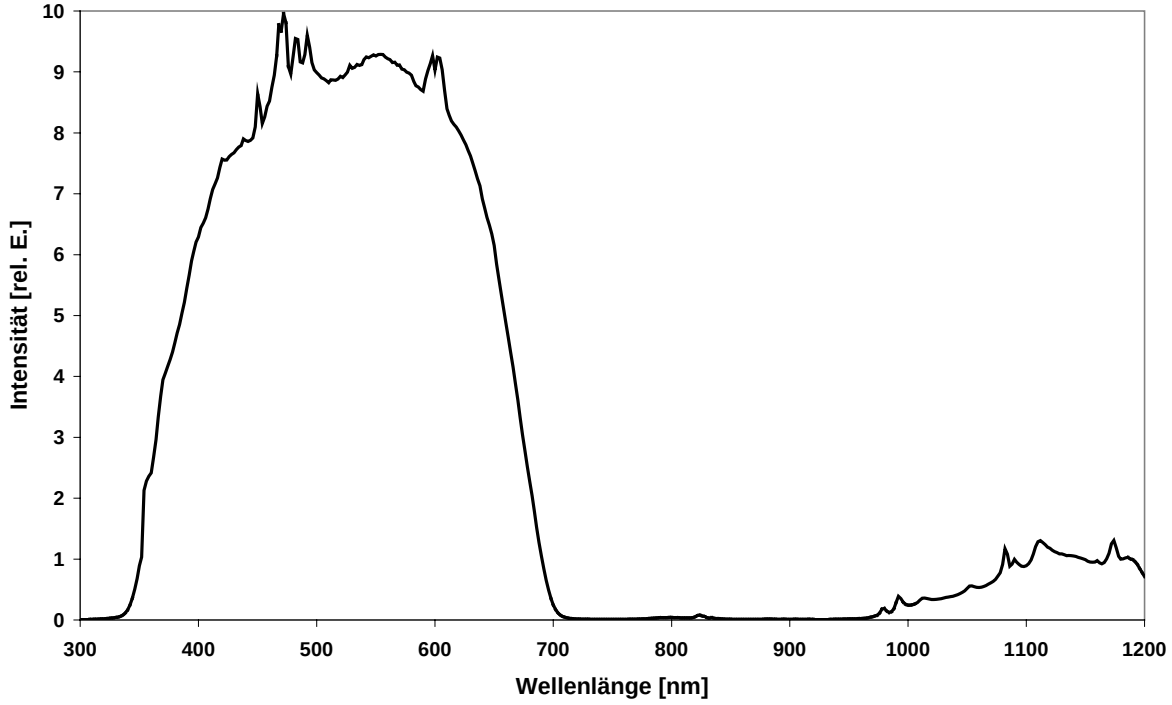

Abb. 3.26 Spektraler Verlauf der inkohärenten PDT-Lichtquelle mit Quarzglaslichtleiter

Um einen phototoxischen Effekt zu erzielen, muss das Anregungslicht der PDT-Lichtquelle die Absorptionsmaxima des PS abdecken. PpIX wird am effektivsten durch blau-violettes Licht im Bereich von 400 nm bis 410 nm (Soret-Bande) und dann mit einer verminderten Wirksamkeit durch die Q-Banden von 500 nm bis 505 nm, 535 nm bis 540 nm, 565 nm bis 575 nm und 620 nm bis 635 nm angeregt (vgl. Kap. 1.3.4.1).

Die gegenwärtig hauptsächlich verwendeten Lichtquellen für eine integrale PDT der Harnblase sind jedoch im roten Wellenlängenbereich emittierende Laser [9, 30, 56, 76, 90, 114, 116, 155].

Um PpIX optimal anzuregen, wäre es von Vorteil das gesamte Absorptionsspektrum zu erfassen. Daher liefert das inkohärente Lichtsystem Licht im Bereich von 350 nm bis 700 nm, um sämtliche Banden des PS anzuregen.

Die Verteilung der unterschiedlichen Wellenlängenbereiche bezogen auf den therapeutischen Effekt ist in dem Aktionsspektrum in Abb. 3.27 dargestellt. Dieses Aktionsspektrum ergibt sich aus dem Produkt des spektralen Verlaufs der inkohärenten PDT-Lichtquelle und dem Absorptionsspektrum von PpIX.

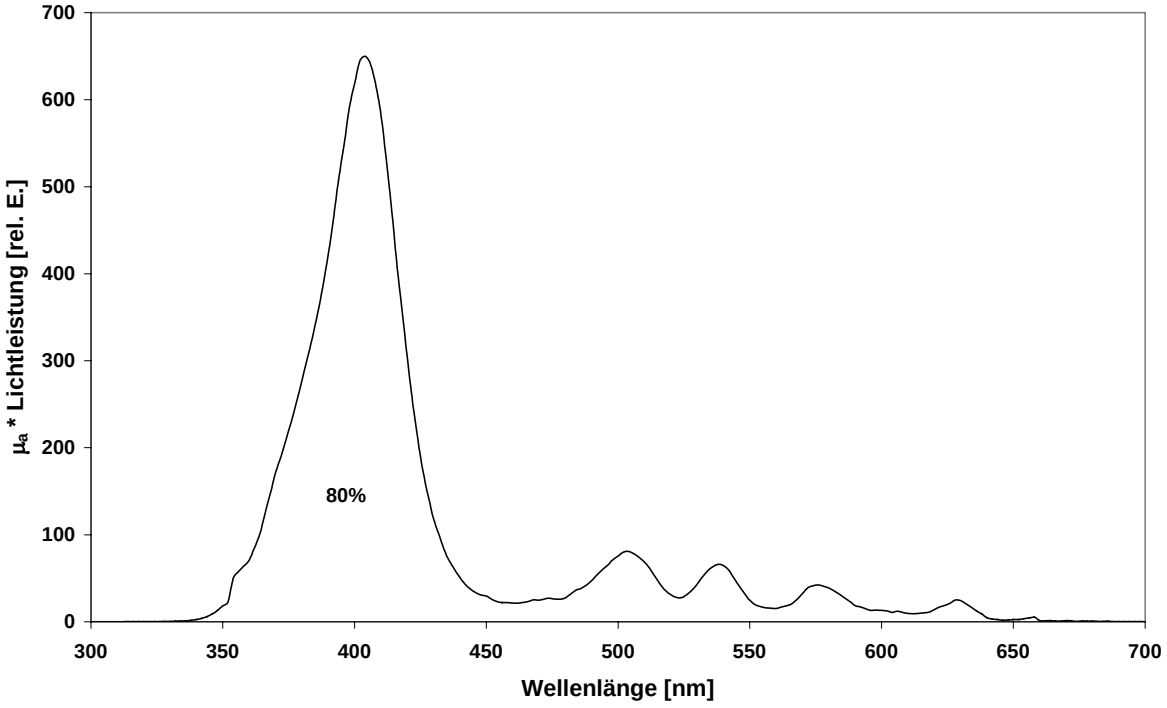

Abb. 3.27 Aktionsspektrum der PDT-Lichtquelle

Anhand des Aktionsspektrums wird deutlich, dass 80% des therapeutischen Effekts von dem blau-violetten Teil des Lichts im Bereich von 340 nm bis 450 nm zu erwarten ist, wenn man die konkurrierende Absorption des Blutes unberücksichtigt lässt. Die Lasersysteme, die momentan für eine 5-ALS-induzierte PpIX PDT eingesetzt werden, emittieren hauptsächlich rotes Licht im Bereich von 630 nm bis 635 nm. Der blau-violette Teil des Absorptionsspektrums wird von diesen Systemen nicht erfasst und trägt daher auch nicht zur Anregung von PpIX und demzufolge zu einem therapeutischen Effekt bei.

Das Konzept des PDT-Applikationskatheters mit dem zentral platzierten isotrop abstrahlenden Streuzylinder ist darauf ausgerichtet, bereits mit dem primär auf die Harnblasenwand eingestrahlten Licht eine möglichst homogene Bestrahlung zu erreichen. Verbleibende Inhomogenitäten, wie z. B. der schlecht erreichbare Bereich am Harnblasenauslass, werden teilweise vom zurückgestreuten Anregungslicht bestrahlt.

Ausgehend von der ursprünglichen Lichtverteilung für eine gemessene Remission (R) für Blaulicht, im Wellenlängenbereich von 430 nm bis 580 nm, von R = 20% und für Rotlicht, für Wellenlängen größer 600 nm, von R = 60% wurde eine Monte-Carlo-Simulation durchgeführt. Die daraus resultierende Gesamtlichtverteilung ist in Abb. 3.28 dargestellt. Es zeigt sich eine deutlich verbesserte Lichtverteilung über den gesamten Winkel von 180° bezogen auf die optische Achse des PDT-Applikationskatheters.

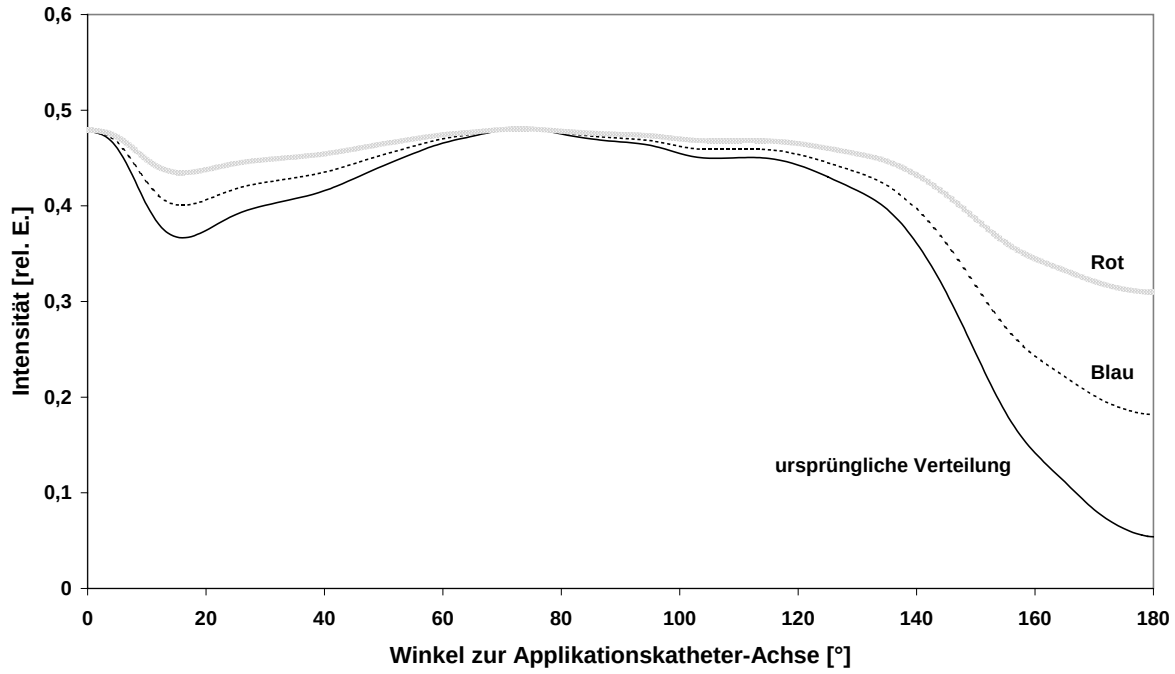

Abb. 3.28 Verteilung des vom PDT-Applikationskatheter emittierten Lichts als Funktion des Winkels zur Katheterachse. Die durchgezogene Linie entspricht der gemessenen primären Lichtverteilung. Die gestrichelten Linien basieren auf einem berechneten (Monte-Carlo-Simulation) Homogenisierungseffekt durch Berücksichtigung von Vielfachstreuung an der Harnblasenwand für blaues (R = 20 %) und für rotes Licht (R = 60 %).

Aus der Abb. 3.28 wird weiterhin ersichtlich, dass die Bestrahlungslücke am Harnblasenauslass bei ca. 180° durch das rückgestreute Anregungslicht der Harnblasenwand kompensiert wurde.

Für die Eindringtiefe des Lichts in das Gewebe der Harnblasenwand ermittelte Beyer et al. [11] aus in in-vivo gemessenen optischen Gewebeparametern 0,8 mm bei 400 nm, 1,5 mm bei 532 nm und 5 mm bei 632 nm.

3.2.2 Klinische Ergebnisse der Pilotstudie

Zur Evaluierung der therapeutischen Wirkung des inkohärenten PDT-Systems wurde eine Pilotstudie anhand von 12 Patienten durchgeführt. Die klinische Vorgehensweise zur 5-ALS-induzierten PDT ist in Kap. 2.2.3 beschrieben.

Histologische Untersuchungen vor der PDT ließen bei 10 Patienten multifokale CIS erkennen. Drei davon hatten zusätzlich nicht invasive, papilläre Urothelkarzinome, Grad II-III. Die verbleibenden zwei Patienten hatten innerhalb der Harnblase ausgedehnte nicht invasive, papilläre Urothelkarzinome, Grad I-II [154].

Bei der FD, die vor der PDT durchgeführt wurde, zeigten die flachen verdächtigen Läsionen mit histologisch nachgewiesenem CIS und auch die papillären Tumoren die zu erwartende Rotfluoreszenz. Biopsien, die unmittelbar nach der PDT von verdächtigen flachen Bereichen entnommen wurden, enthielten keine vitalen Zellen. Besonders in den oberen Teilen der papillären Tumoren fand man von dem Tumorzellverband losgelöste Zellen. Die Tumorbasis hingegen wies keines dieser Zeichen auf [154].

Die stromale Reaktion war vergleichbar zu der, die in Patienten beobachtet wurde, die nicht durch eine PDT sondern konventionell mittels intravesikaler Immuntherapie behandelt wurden. Die Patienten zeigten intakte vaskuläre Strukturen, einige zeigten Ödeme. In elektronenmikroskopischer Auflösung zeigte die feinstrukturelle Morphologie von freigelegten Bereichen des Stromas sowohl endotheliale Zellen mit teilweise geschwollenen Mitochondrien, als auch Mitochondrien mit einer höheren Aufnahme von Osmium, das auf eine verminderte Aktivität der Mitochondrien hinweist. Eine ähnliche Morphologie wurde in normalen Urothelzellen in der Nähe von freigelegten Bereichen und in tieferen Bereichen der papillären Tumore gefunden.

Die oberflächlichen Teile der papillären Tumore als auch die angrenzenden freigelegten Bereiche zeigten eine bedeutende Schädigung der Mitochondrien, eine um den Zellkern liegende Schwellung sowie eine Ausdehnung des Golgikomplexes. Dies konnte als deutliches Zeichen einer Nekrose bestimmt werden [154].

Als Nebenwirkung wurde nach der PDT eine vorübergehende, von 3 Tagen bis 3 Wochen andauernde jedoch voll reversible irritative Harnblasensymptomatik festgestellt. Unter Lichtschutz für 24 Stunden zeigte keiner der Patienten phototoxische Hautreaktionen. Es wurden keine haemodynamischen Nebenwirkungen festgestellt. Die durchschnittliche Harnblasenkapazität von 250 ml nach der PDT und während des Follow-ups war gegenüber dem Zustand vor der PDT unverändert [154].

11 von 12 Patienten nahmen an dem Follow-up teil. Bei 7 von 11 Patienten konnte 3 Monate nach der PDT eine komplette Remission gezeigt werden. Bei einem durchschnittlichen Follow-up Zeitraum von 18 Monaten waren 3 der 7 Patienten mit einem CIS und 2 der 4 Patienten mit papillären Tumoren tumorfrei. Ein Patient zeigte eine komplette Remission des CIS nach der PDT; er hatte jedoch noch verbleibende papilläre Tumore. Keiner der Patienten zeigte ein lokales oder systemisches Tumorfortschreiten nach dem letzten Follow-up [154].

4 Diskussion

4.1 Fluoreszenzdiagnostik

Die 5-ALS-gestützte FD zur Erkennung des Harnblasenkarzinoms und des Glioblastoms mit inkohärenten endoskopischen Lichtquellen hat sich in Deutschland klinisch durchgesetzt. Nach der europaweiten Zulassung des PS 5-ALS oder eines Derivats davon (Hexvix® [66], zugelassen in Schweden seit 20.9.2004) werden sich das Verfahren und die Komponenten für die obige Applikation auch international etablieren.

4.1.1 Inkohärentes UV-Lichtsystem

Sowohl die 5-ALS-induzierte PpIX-Fluoreszenz als auch die HYP-induzierte Fluoreszenz konnte mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten UV-Lichtsystem angeregt und bildgebend dargestellt werden.

Zur Anregung einer PS-gestützten Fluoreszenz wurden anfänglich hauptsächlich kohärente Lichtsysteme eingesetzt. Wie eingangs beschrieben setzte Kriegmair et al. [89] einen Krypton-Ionenlaser mit einer Anregungswellenlänge bei 406,7 nm für die fluoreszenzzystoskopische Erkennung urothelialer Neoplasien mittels der 5-ALS ein (vgl. Kap. 1.1).

Zur Anregung der AF bei Untersuchungen des Urothelkarzinoms, Bronchialkarzinoms und des niedermalignen Astrozytoms verwendete Hohla [64] einen optimierten Xenon-Chlorid-Excimerlaser, der bei 308 nm emittiert. Bei diesen interdisziplinär durchgeführten Untersuchungen wurden schnell die Grenzen, im Sinne eines OP-tauglichen Gerätesystems, aufgezeigt. Dennoch waren die klinischen Ergebnisse, vor allem in der Fluoreszenzbildgebung maligner Gliome nach 5-ALS-Gabe so vielversprechend, dass sie zur Entwicklung eines anwendungsfreundlichen und kostengünstigen bildgebenden Systems basierend auf einer inkohärenten UV-Anregungslichtquelle und einem UV-tauglichen Kamerasystem, das auch eine intraoperative Bildgebung größerer tumorverdächtiger Areale erlaubt, anregten.

Ein erster Schritt in diese Richtung war die Entwicklung des inkohärenten UV-Lichtsystems, das im Vergleich zu dem etablierten D-light-System folgende Unterschiede aufweist.

4.1.1.1 Farbkontrastbildgebung

Beim D-light-System und anderen für die FD auf dem Markt befindlichen Systemen [21, 61] führt hauptsächlich das diffus zurückgestreute blaue Anregungslicht (bei 450 nm in der Größenordnung von etwa 30 %) zu physikalisch bedingten Reflexion auf der Gewebeoberfläche. Um die im Verhältnis deutlich schwächere spezifische PpIX-Fluoreszenz zu visualisieren, wird ein kleiner Teil des Anregungslichts im Bereich von 440 nm bis 470 nm als eine Art Hintergrundbeleuchtung zugelassen (vgl. Abb. 4.1).

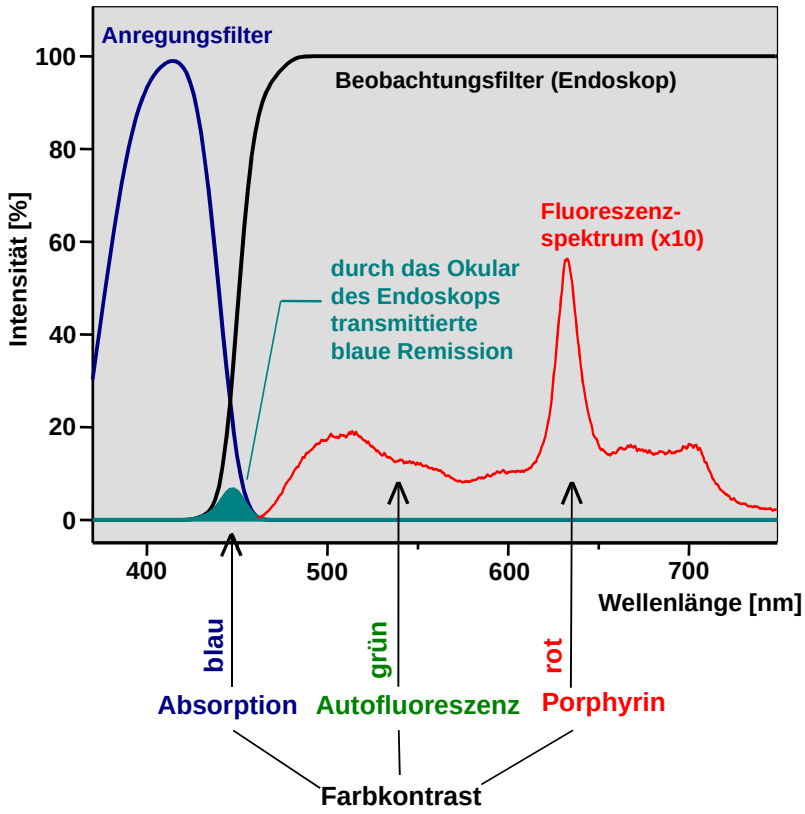

Abb. 4.1 **Schematische Darstellung des spektralen Verlaufs der Transmission der Anregungs- und Beobachtungsfilter des D-light-Systems**

Dieser Blaulichtanteil ist gerade so stark, um die Rotfluoreszenz endogener Fluorophore (vgl. Abb. 4.2) und die unspezifische PpIX-Fluoreszenz zu unterdrücken. Es stellt sich dadurch ein Rot-/Blau-Farbkontrast zwischen suspekten und normalen Arealen ein, der eindeutig zu beurteilen ist. Die blaue Hintergrundbeleuchtung kann auch diesen Farbkontrast erhöhen, da in diesem Spektralbereich malignes Gewebe oft eine geringere Rückstreuung als gesundes Gewebe besitzt [65]. Damit schwache Fluoreszenzsignale nicht vom blauen Hintergrundlicht überstrahlt werden, ist eine exakte Abstimmung der Intensität dieser Hintergrundbeleuchtung und der spezifischen PpIX-Fluoreszenz notwendig. Da sowohl das Helligkeitsempfinden des Auges als auch die Rückstreuung von Gewebe wellenlängenabhängig sind,

beeinflussen der spektrale Verlauf und die Intensität der blauen Hintergrundbeleuchtung den Farbkontrast bei der 5-ALS-FD. Für einen optimalen Farbkontrast zwischen fluoreszierendem und nicht fluoreszierendem Gewebe sollten die blaue Hintergrundbeleuchtung und die Fluoreszenz die gleiche Intensität aufweisen. Nahezu unabhängig ist dieser Farbkontrast vom Beobachtungsabstand und Beobachtungswinkel, da die Fluoreszenzintensität und die Intensität des blau remittierten Lichts in annähernd gleicher Weise von Abstand und Winkel der Beobachtung abhängen [136, 137].

Die Darstellung des zu untersuchenden Gewebeareals beschränkt sich bei der Anregung durch das D-Light-System vorwiegend auf den Blau-Rot-Farbkontrast. Viele Informationen, die bei einer Beleuchtung mit Weißlicht auffällig sind, können bei der hauptsächlich durch die Farbe Blau dominierenden Darstellung des Normalgewebes sehr schlecht oder gar nicht erkannt werden.

Das UV-Lichtsystem erzeugt die gewebeeigene Fluoreszenz im blauen und grünen Wellenlängenbereich mit deutlich höherer Effizienz als das D-Light-System (vgl. Abb. 3.4). Im Gegensatz zum D-light-System gibt es bei der Anregung durch das UV-Lichtsystem keine Remission im VIS. Daher basiert der Weißlichteindruck beim UV-Lichtsystem rein durch die Erzeugung einer Fluoreszenz im blauen, grünen und roten Wellenlängenbereich. Diese angeregte Fluoreszenz ist bei der Diffusion aus dem Gewebe heraus den gleichen Bedingungen unterworfen, wie einmal eingedrungenes Weißlicht. Das UV-Anregungslicht erzeugt also sozusagen eine Volumenweißlichtquelle im Gewebe, die jedoch aufgrund lokaler Unterschiede in der Fluorochromzusammensetzung nicht homogen abstrahlt.

Somit wird durch das UV-Anregungslicht ein Weißlichtbild dargestellt, das zusätzlich rot fluoreszierende Tumorareale aufweisen kann.

Im Gegensatz zur blau dominierenden Darstellung des D-light-Systems ermöglicht das UV-Lichtsystem daher eine bessere Erkennung farblicher und struktureller Unterschiede des Gewebes. Der Beobachter erkennt dadurch beispielsweise feine Blutgefäße deutlich besser.

4.1.1.2 Optische Störeinflüsse

Weiterhin entstehen durch das sichtbare blaue Anregungslicht des D-light-Systems und der Konkurrenzsysteme auf feuchten Gewebeoberflächen störende Reflexionen, die eine Beurteilung des zu betrachtenden Areals maßgeblich erschweren können.

Besonders gravierend wirkt sich dieser Nachteil bei der Visualisierung von Hirntumoren wie dem Glioblastom oder Astrozytom aus. Zur Darstellung dieser Tumoren wurde in Zusammenarbeit mit den Firmen Carl Zeiss, Oberkochen, und Karl Storz ein Operationsmikroskop (OPMI NC4) so modifiziert, dass die fluoreszenzgestützte Resektion klinisch erfolgreich eingesetzt werden konnte [139]. Zur Verbesserung der Prognose setzt die radikale Operation dieser Hirntumoren eine möglichst exakte intraoperative Differenzierung zwischen randständigem, solide proliferierendem und infiltrierendem Tumorgewebe voraus [140, 141]. Eine großzügige Resektion von gesundem Gewebe ist wegen der Gefahr neurologischer Defizite durch die Beschädigung sogenannter eloquenter Areale wie Motorik oder Sprache nur selten möglich. Daher sollte der zu untersuchende Bereich unbedingt von störenden optischen Einflüssen bereinigt sein. Unter Verwendung des neuen UV-Lichtsystems erfolgte erstmalig die reflexfreie Darstellung der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz und der HYP-induzierten Fluoreszenz in Glioblastomgewebe.

4.1.1.3 Filtercharakteristik

Damit beim D-light-System ein optimaler Farbkontrast zwischen fluoreszierendem und nicht fluoreszierendem Gewebe erzielt werden kann, müssen die Anregungsfilter der Lichtquelle und das Beobachtungsfilter des Endoskops oder Mikroskops optimal aufeinander abgestimmt sein (vgl. Kap. 4.1.1.1 und Abb. 4.1). Lebensdauerbedingte Veränderungen des Lampenspektrums und toleranzbedingte Unterschiede der spektralen Verläufe der Transmission der optischen Komponenten sowie die Perfusion des Gewebes können den Farbkontrast dahingehend beeinflussen, dass eine sichere FD in Frage gestellt ist.

Bei dem UV-Lichtsystem wird das komplette Anregungslicht durch den integrierten Blockfilter im Beobachtungsstrahlengang des Endoskops unterdrückt (vgl. Kap. 2.1.3 und Kap. 2.1.5). Somit ergibt sich zwischen dem Anregungsfilter und dem Beobachtungsfilter auch keine Überlappung. Eine aufwändige Abstimmung des Filterdesigns zur Erzeugung einer optimalen Überlappung bzw. systembedingte und anwendungsspezifische Einflüsse auf die Überlappung existieren beim UV-Lichtsystem nicht. Dies ist ein nicht zu vernachlässigender Vorteil, der eine einfache und vor allem sichere Methode der FD garantiert.

4.1.1.4 Autofluoreszenz

Die AF wird vom UV-Lichtsystem im Vergleich zum D-light-System stärker angeregt. Bei den Untersuchungen der Glioblastomgewebeproben ergab sich der Faktor 1,7; bei den Unter-

suchungen in der Mundhöhle der Faktor 1,33 für die stärkere Anregung durch das UV-Lichtsystem. Dieses Verhalten liegt in dem Anregungswellenlängenbereich des Lichtsystems begründet. Das kurzwellige Anregungslicht des UV-Lichtsystems deckt die Absorptionsmaxima einiger endogener Fluorophore (vgl. Abb. 4.2) wirksamer ab und führt folglich zu einer effektiveren Anregung derselben im Vergleich zum D-light-System.

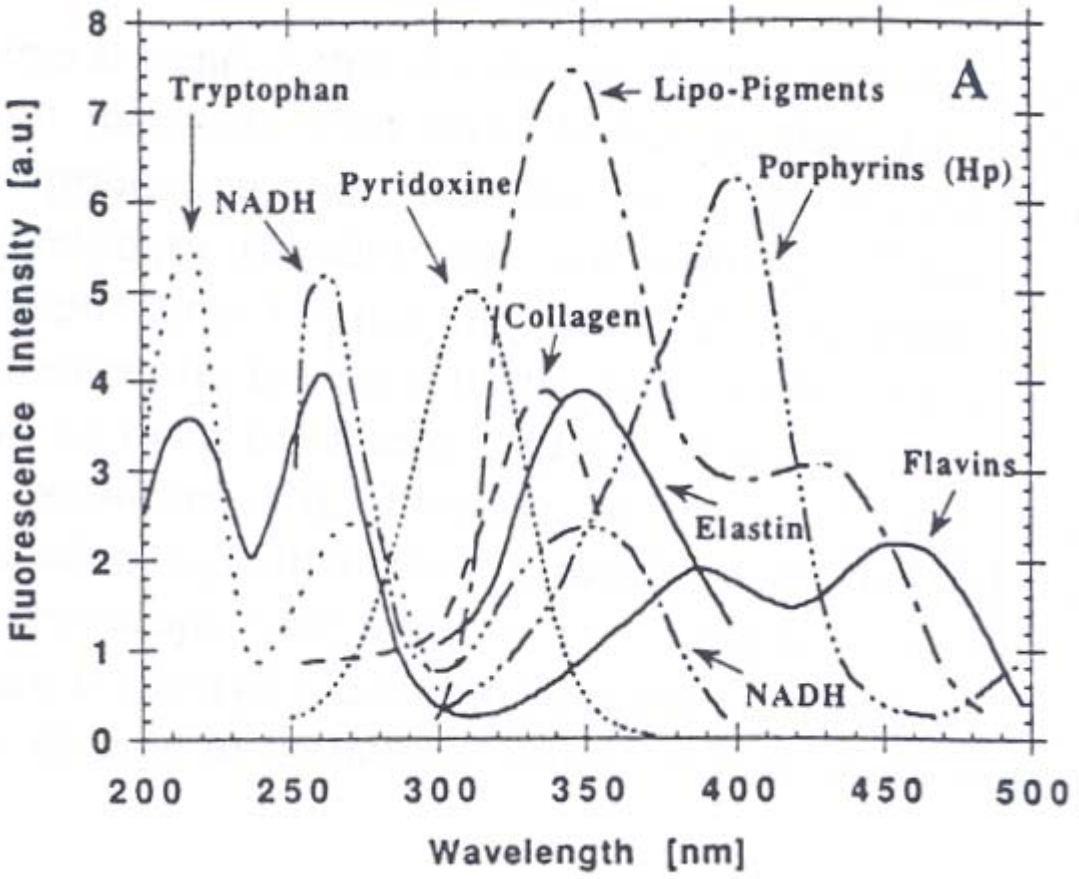

Abb. 4.2 **Anregungsspektren verschiedener endogener Fluorophore. Die Spektren sind jeweils bei der maximalen Emissionswellenlänge aufgezeichnet [151].**

In der Hauptsache tragen die reduzierte Form von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Flavin zur AF unter Anregung mit dem UV-Lichtsystem bei. NADH weist eine maximale Absorption im Wellenlängenbereich zwischen 350 nm und 380 nm auf, der sich exakt mit dem Anregungswellenlängenbereich des UV-Lichtsystems deckt. Das Fluoreszenzmaximum von NADH in Lösung ergibt sich bei 440 nm [98, 131]; im Gewebe verschiebt sich das Fluoreszenzspektrum jedoch durch Bindung mit anderen Molekülen um ca. 20 nm ins Kurzwellige [47, 84]. Im Gegensatz zu NADH hat Flavin (Riboflavin, FAD, Flavin-Mononukleotid) ein

breites Absorptionsspektrum vom ultravioletten bis in den sichtbaren Wellenlängenbereich mit einem Anregungsmaximum bei 450 nm und einem Emissionsmaximum bei 525 nm.

Die Generierung eines stärkeren AF-Signals durch die UV-Anregung erzeugt gleichermaßen im Vergleich zur Blaulicht-Anregung eine stärkere grüne Komponente für die Zusammensetzung des Farbkontrastes (vgl. Abb. 4.1). Dies ist mit ein Grund, dass die Darstellung unter UV-Licht sich der unter Weißlicht annähert, da sich der Farbkontrast aus allen drei Grundfarben zusammensetzt. Aufgrund des generell sehr schwachen AF-Signals, das bei der Bestrahlung mittels Blaulicht induziert wird, beschränkt sich die Darstellung, wie bereits erwähnt, auf die Farben Blau und Rot.

4.1.1.5 Ausbleichen

PS bleichen bei Bestrahlung mit Licht aus. Es konnte exemplarisch gezeigt werden, dass PpIX in Lösung durch das kurzwellige Anregungslicht des UV-Lichtsystems schneller ausbleicht als durch das im Längerwelligen liegende blaue Anregungslicht des D-light-Systems.

Die Ursache für das schnellere Ausbleichen ist vermutlich auf den Effekt zurückzuführen, dass die Ethanolmoleküle, die in der stark verdünnten Lösung (vgl. Kap. 2.1.7.6) näherungsweise in gleicher Konzentration mit den PpIX-Molekülen vorlagen, bei Bestrahlung mit UV-Licht heterolytisch gespalten werden und dann in der Regel sehr reaktionsfähige Radikale bilden, die wiederum PpIX-Moleküle angreifen können. Diese beschädigten PpIX-Moleküle stehen für den Ausbleichvorgang nicht mehr zur Verfügung. Die wenigen verbleibenden, intakten PpIX-Moleküle werden somit durch das UV-Licht sehr rasch ausgeblichen. Diese These muss jedoch anhand weitere Untersuchungen bestätigt werden.

Ein anderes Verhalten ergibt sich jedoch, wenn in Glioblastomgewebe akkumuliertes PpIX ausgeblichen wird. Hier führt die Bestrahlung mit UV- und blauem Licht zu einem annähernd gleichen Ablauf des Ausbleichens. Da UV-Licht nicht so tief in das Gewebe eindringt wie blaues Licht und daher nur eine dünne oberflächliche Schicht durch das UV-Licht erfasst wird, sollte im Gewebe angereichertes PpIX bei UV-Bestrahlung eher schneller ausbleichen als bei Blaulicht-Bestrahlung. In diesem Fall ist jedoch die konkurrierende Absorption des Blutes und anderer Fluorophore (vgl. Abb. 4.2) größer als die von PpIX. Dies führt dann, entgegen der ersten Annahme, zu einem langsameren Ausbleichen von PpIX bei Anregung durch das UV-Lichtsystem.

Das Ausbleichen durch beide Lichtsysteme verläuft anfänglich schnell und verlangsamt sich dann sukzessive. Dieser typische Verlauf wurde auch von Marti et al. [103] bei der Untersuchung des Ausbleichverhaltens von PpIX im Urothel beobachtet.

Ursache dafür ist der Verlauf des Ausbleichens über die Tiefe der Fluorophorschicht. Die untersten Fluorophorschichten bleichen aufgrund der dort applizierten geringeren Bestrahlungsstärke, bedingt durch Absorption, langsamer aus. Im Fall des PS PpIX ist der Operateur zu einem zügigen Ablauf der Untersuchung gezwungen. Bei einem Abstand von einem Zentimeter des Endoskops zum Gewebe hat er typischerweise 12 Sekunden Zeit die Fluoreszenz zu analysieren, bevor sie auf die Hälfte ihrer ursprünglichen Intensität abgesunken ist. Bei einem Abstand von 4 cm ergeben sich bereits mehr als 3 Minuten Zeit [150].

4.1.2 Ergebnisse klinischer Untersuchungen

4.1.2.1 Neurochirurgie

Ausgehend von dem Vorschlag, HYP als PS für die intraoperative Darstellung von Glioblastomen heranzuziehen [70], konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig mit dem neuartigen Instrumentarium die spezifische Anreicherung von HYP in Glioblastomen im Tierversuch bildgebend gezeigt werden. Der fluoreszenzdiagnostische Nachweis am Menschen steht für diese Anwendung noch aus.

Gegenüber anderen PS besteht der entscheidende Vorteil beim HYP darin, dass es in Form von Johanniskraut als Phytopharmakon bereits seit langem als Antidepressivum verabreicht wird und die Nebenwirkungen bekannt sind. Darüber hinaus ist aus der Literatur ersichtlich, dass Überdosierungen von HYP unkritisch sind [26]. Dies dürfte bei einer pharmazeutischen Zulassung und dem Einsatz von HYP in Kombination mit dem UV-Lichtsystem zur intraoperativen Visualisierung von Glioblastomgewebe von großem Vorteil sein.

Weller et al. schließt aus seinen Untersuchungen, dass HYP ein vielversprechender Wirkstoff für die Behandlung von Glioblastomen ist, wenn es gelingt, die Substanz im Tumorgewebe photodynamisch zu aktivieren [157]. Grundlage dafür ist die Klärung der intrazellulären Prozesse bei der FD beim Glioblastom mit HYP. Uzdensky et al. [149] führte dazu eine Untersuchung an einer Glioblastom-Zellkultur (D54Mg) durch. Generell zeigten alle Zellen, die mit HYP inkubiert waren eine kräftige rote Fluoreszenz. HYP erwies sich als verhältnismäßig photostabiler Farbstoff. Es bleichte deutlich langsamer aus als bekannte PS wie beispielsweise

Meso-Tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) und Photofrin II. Dies konnte durch die Untersuchung der HYP- und 5-ALS-induzierten Fluoreszenz am Glioblastom der Ratte bestätigt werden. HYP zeigte im Vergleich zur 5-ALS, die aufgrund der sehr kleinen Tumorareale bereits nach 2 Minuten vollständig ausgeblichen war, kein Ausbleichen.

Der Mechanismus des photodynamischen Prozesses mit HYP sowie Grad und Ursachen für die tumorselektive Anreicherung von HYP beim Glioblastom sind jedoch bisher nur ansatzweise bekannt. Sie sollten durch die weitere Erforschung der biochemischen Vorgänge umfangreich geklärt werden.

4.1.2.2 Urologie

Der vielversprechende Einsatz von HYP wurde auch im Rahmen von FD-Untersuchungen in der Urologie bestätigt, die D'Hallewin et al. [31, 32] am oberflächlichen Harnblasenkarzinoms durchführten. Bei einer ersten Studie mit 40 Patienten, die 2 Stunden vor der fluoreszenzdiagnostischen Untersuchung 40 ml einer 8 µM HYP-Lösung instilliert bekamen, zeigten alle papillären Bereiche eine kräftige rote Fluoreszenz nach Anregung durch das D-light-System. Die Sensitivität des Verfahrens lag vergleichbar zu den Ergebnissen, die mit der 5-ALS erzielt worden sind, bei 93 %. Die Spezifität von 98,5 % lag jedoch deutlich höher als bei Untersuchungen mit dem PS 5-ALS [31]. Bei einer weiteren Studie mit 87 Patienten konnten die Ergebnisse der ersten Untersuchung bestätigt werden [32].

Bei beiden Untersuchungen fiel auf, dass der PS HYP durch die Anregung mit dem D-light-System nahezu kein Ausbleichen zeigte. Dieses Phänomen konnte bei den eigenen vorläufigen Untersuchungen sowohl bei der Anregung durch das D-light-System als auch durch das UV-Lichtsystem während der Inspektion und Resektion der Harnblase bestätigt werden.

Zur Klärung der mit dem D-light- und UV-Lichtsystem angeregten fluoreszenzpositiven, jedoch histopathologisch als benigne eingestuften Läsionen, sollten diese zukünftig auf das Vorliegen präneoplastischer chromosomaler Läsionen hin untersucht werden. Obwohl der Gedanke nahe liegt, dass die mittels Fluoreszenzendoskopie entdeckten histologisch normalen Läsionen bereits Präneoplasien sein könnten, ist es noch zu früh, diesen Kausalzusammenhang zu führen. Hier müssen intensive Untersuchungen von endoskopisch biopsierten frühen Urothelveränderungen und normalen Urothelien von Tumorpatienten durchgeführt werden, um systematisch die genetischen Schritte der Tumorentstehung des Harnblasenkarzinoms zu klären.

4.1.3 Ausblick für das inkohärente UV-Lichtsystem

Das UV-Lichtsystem weist gegenüber dem D-light-System hauptsächlich dort einen erheblichen Vorteil auf, wo feuchte Gewebeoberflächen dargestellt werden und die durch das D-light-System erzeugten störenden Reflexionen eine Beurteilung des zu betrachtenden Areals maßgeblich erschweren. Durch die reflexfreie Darstellung der 5-ALS-induzierten PpIX-Fluoreszenz und der HYP-induzierten Fluoreszenz wird dem UV-Lichtsystem daher eine große Bedeutung im medizinischen Fachbereich der Neurochirurgie bei der Visualisierung von Glioblastomen zugemessen. Die technische Integration des UV-Lichtsystems in ein Operationsmikroskop wird einen Einsatz im OP deutlich vereinfachen und somit die Tauglichkeit für in vivo Untersuchungen aufzeigen.

Bei dieser Integration ist jedoch auch die Verwirklichung eines wahlweise zuschaltbaren Weißlichtmodus unerlässlich, da das Operationsmikroskop für Standardanwendungen in gleicher Weise einsatzfähig sein muss. Die Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe des UV-Lichtsystems emittiert ausreichend Licht im VIS (vgl. Abb. 2.1), so dass durch ein geeignetes in der Lichtquelle integriertes, schaltbares Filtersystem diese Realisierung technisch möglich ist.

Um die Fluoreszenzintensität für die durch das UV-Lichtsystem angeregte HYP-induzierte Fluoreszenz zu erhöhen, ist eine Erweiterung des Anregungsspektrums ins Kurzwellige bis ca. 320 nm durch ein Redesign der Anregungsfilter technisch möglich. Unter Einbezug des Peaks bei 335 nm des Lampenspektrums (vgl. Abb. 2.2) könnte der Bereich von 320 nm bis 340 nm des Anregungsspektrums von HYP (vgl. Abb. 1.4) teilweise abgedeckt werden. Die Höhe dieses Zugewinns muss jedoch erst noch evaluiert werden, zumal durch den Einbezug dieses kurzwelligen UV-A-Anteils auch ein höheres Gefährdungsrisiko von dem UV-Lichtsystem ausgehen würde, wenn man den Verlauf der relativen spektralen Wirksamkeit gemäss Abb. 1.7 in diesem Wellenlängenbereich berücksichtigt. Ein möglicher Gewinn der Fluoreszenzintensität muss dann zu der Verkürzung der Bestrahlungszeit in Relation gesetzt und bewertet werden.

4.2 Photodynamische Therapie

Die PDT des Harnblasenkarzinoms wurde in den vergangenen Jahren im Laser-Forschungslabor [11] in Kooperation mit dem klinischen Partner, der Urologischen Klinik des Klinikum Großhadern [90, 91, 152, 153, 154], strategisch neu entwickelt. Als ein wesentlicher Unterschied zur konventionellen PDT wurde als Alternative zu dem bisher eingesetzten, auf einen Laser basierenden Experimentalsystem, in Zusammenarbeit mit Karl Storz, ein kostengünstiges und einfach zu bedienendes inkohärentes PDT-Lichtsystem für die endoskopische Applikation entwickelt.

4.2.1 Inkohärentes PDT-Lichtsystem

Die integrale Bestrahlung der Harnblase mittels des neuartigen inkohärenten PDT-Lichtsystems und dem eigens dazu entwickelten PDT-Applikationskatheter erlaubt nach intravesikaler Instillation von 5-ALS eine weitgehend nebenwirkungsfreie, technisch unkomplizierte PDT. Diese Methode führte zur selektiven Zerstörung insbesondere hochmaligner, flacher Urothelkarzinome wie dem CIS ohne Schädigung des Normalurothels und der stromalen oder muskulären Schichten der Harnblase.

Nach der erfolgreichen Einführung von 5-ALS als Fluoreszenznachweis oberflächlicher Neoplasien verfügt das oben benannte Zentrum über die weltweit ersten klinischen Erfahrungen mit dem Einsatz von 5-ALS in der PDT von Urothelkarzinomen. Als Lichtquelle für die ersten Untersuchungen [90, 91] diente ein Argon-Ionen-Laser gepumpter Farbstofflaser (Coherent GmbH, Dieburg), der rotes Licht der Wellenlänge 628 nm bis 670 nm und grünes Licht der Wellenlänge 488 nm bzw. 514 nm erzeugte. Die maximale Lichtleistung am distalen Ende einer flexiblen Quarzglasfaser (QLT, Vancouver, Kanada) mit 2 mm Durchmesser - betrug bei einer Wellenlänge von 635 nm - 2,8 W im Dauerstrichbetrieb.

Unter anderem haben die folgenden Argumente dazu geführt, das Lasersystem durch das inkohärente PDT-Lichtsystem (T-light-System) zu ersetzen:

Ein entscheidender Unterschied zwischen dem inkohärenten PDT-Lichtsystem und dem Lasersystem sind die in der Regel deutlich höheren Anschaffungskosten der kohärenten Lichtquelle. Zusätzliche Kosten entstehen aufgrund des hohen Wartungsaufwands.

Äußerst positiv im Sinne eines klinischen Einsatzes ist die einfache Bedienung des T-light-Systems. Bei einem Experimental-Lasersystem erfordert die Bedienung demgegenüber in den

meisten Fällen einen geschulten Techniker. Zwingend notwendig zum Betrieb eines Experimental-Lasersystems ist darüber hinaus ein Wasser- und Starkstromanschluss im OP.

Der Platzbedarf, der für ein derartiges Lasersystem beträchtlich ist, reduziert sich beim T-light-System auf die Abmaße einer Standard-Lichtquelle, die sich problemlos in einen gängigen, fahrbaren Gerätewagen integrieren lässt.

Die zentrale Verantwortung für den Betrieb eines Lasers trägt in der Regel der Chefarzt. Er kann sie an einen Laserschutzbeauftragten delegieren, der für die Überwachung der Schutzmaßnahmen gegen eine Lasergefährdung verantwortlich ist. Da die T-light als inkohärentes Lichtsystem der Gültigkeit aktueller Laservorschriften nicht unterliegt ist eine detaillierte Einweisung in die Gerätetechnik ausreichend. Ein Laserschutzbeauftragter wird für den Betrieb des T-light-Systems nicht benötigt.

Um einen optimalen Therapieeffekt zu erzielen, sollte das Anregungslicht einer PDT-Lichtquelle möglichst alle Absorptionsmaxima des verwendeten PS abdecken. Daher liefert das T-light-System Licht im Bereich von 350 nm bis 700 nm, um sämtliche Banden des 5-ALS-induzierten PS PpIX anzuregen.

Ein Vorteil dieser breitbandigen Anregung ist zum einen die einfache Adaptierbarkeit des T-light-Systems an zukünftige PS-Generationen durch die Integration eines für das Absorptionsspektrum des PS optimierten Anregungsfilters. Zum anderen kann diese breitbandige Anregung zu einem zusätzlichen Therapieeffekt führen, indem die bei der 5-ALS-PDT entstehenden Photoprodukte [54, 83], von denen wiederum einige selbst sehr effektive PS sein können, den phototoxischen Effekt verstärken.

Ein maßgebliches Photoprodukt ist das Ppp mit einem Absorptionsmaximum bei 670 nm [20, 83, 95]. Dieses Maximum wird durch das Anregungsspektrum des T-light-Systems abgedeckt. Nach einer Untersuchung am Basalzellenkarzinom von Moan et al. [108] ist die Eindringtiefe des Lichtes bei 670 nm zum Ausbleichen des Ppp mit 1,8 mm nur minimal größer als die des PpIX mit 1,6 mm bei 635 nm. Auch wenn sich Ppp als ein weniger effizienter PS im Vergleich zu PpIX darstellt und der Prozess der Photodegeneration von PpIX zu Ppp wahrscheinlich nicht reversibel zu sein scheint [101], da Ppp nicht zu fluoreszierenden Produkten zerfällt [101], so kann jedoch eine kombinierte Anregung von PpIX und Ppp durch das T-light-System zu einem möglichen kombinierten Therapieeffekt beitragen.

Der systemimmanente Nachteil des inkohärenten PDT-Lichtsystem besteht gegenüber dem Laser in der schlechteren Fokussierbarkeit und der damit verbundenen Erfordernis das Lichtzuführungssystem relativ großkalibrig auszulegen. Es ist daher zu erwarten, dass sich die inkohärenten Systeme in den Anwendungsfeldern durchsetzen werden, in welchen rigidere, relativ großkalibrige Lichtleiter ihren Einsatz finden. Bei der Anforderung nach voll flexiblen, kleinkalibrigen Lichtzuführungssystemen mit Durchmessern kleiner 1 mm wird der Laser und speziell der Diodenlaser zukünftig die Lichtquelle der Wahl darstellen, da sich mit diesen Systemen bezogen auf eine bestimmte Wellenlänge, weitaus höhere Lichtleistungen einkoppeln und übertragen lassen.

4.2.2 Klinische Ergebnisse des inkohärenten PDT-System

Patienten mit multifokalen, rezidivierenden, oberflächlichen Urothelkarzinomen der Harnblase (CIS, pTa bis pT1-Tumore) benötigen eine adjuvante, integrale Therapie der gesamten Harnblasenschleimhaut. Etablierte Therapieverfahren sind die intravesikale Chemotherapie z. B. mit Mitomycin C oder die Immuntherapie mittels BCG. Bezüglich der Rezidivrate zeigt das Mitte der 70er-Jahre zur intravesikalen Immuntherapie eingesetzte BCG [109] in der Mehrheit der Studien eine Überlegenheit gegenüber der intravesikalen Chemotherapie [96, 100, 112]. Bei allen 12 Patienten der Pilotstudie blieben diese konventionellen Maßnahmen frustran. Daher bestand ein hohes Risiko für eine nachfolgende Tumorprogression. In der Regel besteht dann die Indikation zur radikalen, operativen Entfernung der Harnblase (Zystektomie). Kann dieser Eingriff jedoch aufgrund internistischer Begleiterscheinungen mit deutlich erhöhtem Risiko der prä- und postoperativen Morbidität und Mortalität nicht durchgeführt werden oder wird die Zystektomie vom Patient verweigert, kommt als einzige Alternative eine integrale PDT der Harnblase in Frage.

Bei der PDT ist die Erzeugung des phototoxischen Effekts in malignen Läsionen unter anderem abhängig von der Fähigkeit des PS in neoplastischem Gewebe zu akkumulieren. Porphyrine reichern sich in signifikanter Konzentration im Stroma und der Harnblasenmuskulatur an und verursachen nach integraler Bestrahlung der Harnblase dort eine deutliche Verdickung der Submukosa sowie eine Schädigung der Harnblasenmuskulatur durch fibrotische Umwandlung [54]. Dies hat bei bis zu 40 % der behandelten Patienten eine dauerhafte Kontraktion der Harnblasenmuskulatur zur Folge [116]. Berichtet wird außerdem über das Risiko einer Harnblasenschrumpfung und von Harnleiterstrikturen bei der Applikation von synthetischen Porphyrinen [30, 56, 73, 74, 90, 115, 116, 147, 155]. Daher ist es für die synthetischen

Porphyrine zwingend notwendig eine akribische Lichtdosimetrie für die Bestrahlung durchzuführen, wenngleich diese aufwändig und kompliziert ist [114].

Nach intravesikaler Instillation von 5-ALS reichert sich das letzte Zwischenprodukt der Hämbiosynthese, PpIX ausschließlich im Urothel an. Im Gegensatz zu den synthetischen Porphyrinen wird es weder im Stroma noch in den Gefäßendothelien und der Harnblasenmuskulatur angereichert [134] womit auch das Risiko der Ausbildung einer Schrumpfblase nach einer PDT ausgeschlossen werden kann.

In Übereinstimmung mit Tierexperimenten, die Chang et al. [19] durchführte, konnte im Rahmen dieser klinischen Pilotstudie gezeigt werden, dass bei der integralen 5-ALS PDT mittels des T-light-Systems selektive urotheliale Nekrosen erzeugt werden, ohne die darunter liegende Muskelschicht zu beschädigen. Das normale Urothel blieb dabei morphologisch unversehrt, was eine Wiederherstellung des Urothels freigelegter Bereiche ermöglicht. Ghadially [48], der für seine Untersuchungen ebenfalls eine Weißlichtquelle zur 5-ALS-gestützten PDT einsetzte, bestätigte anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen, dass nach der Bestrahlung kein bedeutender Schaden der feinstrukturellen Morphologie des normalen Urothels auftrat. Es zeigten sich hauptsächlich geschwollene Mitochondrien oder Mitochondrien mit einer verdichteten Gestalt der Doppelmembran, die als morphologische Anhaltspunkte eines reversiblen Schadens bekannt sind. Letztere weisen auf eine verminderte mitochondriale Aktivität hin. Die signifikanten Unterschiede zwischen normalen Zellen und Tumorzellen wurden in der eigenen Gruppe von Seidl et al. [132] in einer in vitro Studie und im Tiermodel durch Gronlund-Pakkanen et al. [53] bestätigt.

Die relativen Beiträge direkter und indirekter phototoxischer Effekte zur Gewebeschädigung hängen von dem Tumormodell und der Art der Gabe der 5-ALS ab. Die PDT mit systemisch applizierter 5-ALS verursacht im begrenzten Umfang einen direkten Zelltod in Tumoren mesodermalen Ursprungs [59]. Im Fall der topischen Gabe von 5-ALS bei der PDT von epithelialen und mukosalen Läsionen basieren die therapeutischen Effekte wahrscheinlich auf der direkten Zytotoxizität und auf akuten entzündlichen Reaktionen, die kleinere Schäden vaskulärer Strukturen verursachen [122].

Die PDT hat sich als effektive Methode zur selektiven Zerstörung von CIS und in einem geringeren Ausmaß auch von kleinen papillären Tumoren erwiesen [30, 102, 156]. Dies findet mit den Ergebnissen der Pilotstudie eine Übereinstimmung. Mit dem T-light-System konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung des Tumors bis zu 8 Zellschichten tief induziert werden

kann. Diese Methode ist daher zur Therapie flacher maligner Läsionen geeignet. Große papilläre oder invasive Tumoren können jedoch damit nicht therapiert werden. Als ein Ergebnis der Pilotstudie ergab sich für papilläre Tumore eine Rezidivrate von 50 % und für das CIS 44 %. Ob eine wiederholte PDT die Rezidivrate weiter reduzieren kann, ist Bestandteil aktueller Untersuchungen.

Daher erfolgen bei allen Patienten mit Harnblasenkarzinom nach Instillation von 5-ALS vier integrale Bestrahlungen der Harnblase, jeweils in 3-monatigen Abständen, mittels des inkohärenten PDT-Systems zur Rezidivprophylaxe in der Absicht, die Rezidivhäufigkeit signifikant zu senken. Diese Vorgehensweise wurde bisher vereinzelt bei Worst-case-Patienten gewählt, die als PS das synthetische Porphyringemisch Photofrin II® appliziert bekamen und mit einem Lasersystem bestrahlt wurden. Photofrin II® hat als entscheidenden Nachteil, dass nach intravenöser Verabreichung eine Hautsensibilisierung gegenüber Sonnenlicht für mehrere Wochen auftreten kann. Dies verhindert eine wiederholte Anwendung der Methode in kurzen Zeitabständen wie sie zur Prophylaxe notwendig wäre [34].

Nach systemischer Gabe von 5-ALS besteht das Risiko hämodynamischer Nebenwirkungen und phototoxischer Hautreaktionen [60, 152, 153]. Jedoch wird nach intravesikaler Instillation von 5-ALS weniger als 1 % der applizierten Dosis im Plasma absorbiert, was darauf hindeutet, dass systemische Nebenwirkungen bei dieser Applikation eine unbedeutende Rolle spielen [24].

Nach intravesikaler Instillation von 5-ALS wurden im Rahmen dieser Pilotstudie keinerlei systemische Nebenwirkungen beobachtet, auch ein Lichtschutz war nicht notwendig. Auf der Basis dieser Erkenntnisse ist es erstmals möglich, wiederholte Therapiebehandlungen in kurzen Zeitabständen durchzuführen.

4.2.3 Ausblick für das inkohärente PDT-Lichtsystem

Die vorläufigen klinischen Ergebnisse, die mit dem inkohärenten PDT-System erzielt worden sind, sind sehr positiv. Der therapeutische Nutzen dieses Systems muss jedoch noch in ausgedehnten klinischen Studien statistisch abgesichert werden.

Gegenstand aktueller Entwicklung ist die Erweiterung und Optimierung des inkohärenten PDT-Systems, um den klinischen Einsatz zu vereinfachen und zu verbessern.

Neue Modulbausteine und Modifikationen bestehender Systemelemente sind im Folgenden beschrieben:

Damit die maximale Lichtleistung in die Quarzglasfaser des PDT-Applikationskatheters eingekoppelt werden kann, muss momentan eine Referenzfaser in der Aufnahme des Lichtadapters fixiert werden (vgl. Abb. 2.6 und Abb. 2.7). Anschließend erfolgt die manuelle Justage der Aufnahme in x- umd y-Richtung sowie die des Lampenmoduls in z-Richtung. Der Justagevorgang ist abgeschlossen, wenn am distalen Ende der Referenzfaser der Maximalwert gemessen wird. Nach Entfernen der Referenzfaser wird der Applikationskatheter adaptiert, in dem der identische Fasertyp der Referenzfaser integriert ist.

Da diese zeitaufwändige und komplizierte Vorgehensweise vor jedem klinischen Einsatz durchgeführt werden muss, soll eine adaptive Justageoptimierung der Faser des Applikationskatheters in allen drei Raumrichtungen erfolgen. Die dazu notwendigen Justagewege sollen mit Hilfe von Linearmotoren angesteuert werden.

Für den Ablauf der automatischen Fokussierung wird das distale Ende des Applikationskatheters in ein Messmodul eingeführt. Anschließend erfolgt die kontinuierliche Messung der Lichtleistung (distale Lichtleistungsmessung) während die Linearmotoren den Stecker des Applikationskatheters in x-, y- und z-Richtung bewegen, bis der Maximalwert erreicht ist.

Damit der Applikationskatheter während der Messung nicht kontaminiert wird, wird der sterile Teil des Katheters mit einem für diese Messung tauglichen, transparenten Schutz versehen, der nach der Prozedur resterilisiert werden kann.

Die Messung der Lichtleistung erfolgt in einem speziell auf die Geometrie des Katheterendes angepassten Hohlraum, der mit mehreren Photodioden als Lichtsensoren bestückt ist. Dieser neue Messmodulbaustein soll integraler Bestandteil des PDT-Lichtsystems werden. Das von den Photodioden erzeugte Signal wird an einen Mikrocontroller weitergeleitet und von diesem ausgewertet. Der Mikrocontroller steuert dann direkt die Linearmotoren an.

Dieser automatisierte Ablauf vereinfacht die klinische Anwendung ganz erheblich, da zum einen der Justageprozess verkürzt wird und zum anderen fundierte Kenntnisse der Lichtmesstechnik, die bei der manuellen Justage mittels eines zusätzlichen Messsystems vom Anwender zwingend erforderlich sind, entfallen.

Durch einen weiteren Messmodulbaustein soll ein Teil der Lichtleistung der Xenon-Kurzbogenlampe (proximale Lichtleistungsmessung) kontinuierlich gemessen werden. Diese Messung dient sowohl der Erfassung des lebensdauerbedingten Abfalls der Lampenlichtleistung als auch der Detektion eines möglichen Lampenausfalls.

Dazu wird ein Teil des Lichts der Xenon-Kurzbogenlampe durch das IR-Blockfilter, welches direkt vor der Lampe eingebaut ist, reflektiert und von einen Detektor erfasst. Wie aus Abb. 4.3 ersichtlich ist, wird hierzu die Fokussierung des Lichts durch den elliptischen Lampenreflektor ausgenutzt. Daher sind zur Abbildung des Lichts auf den Detektor keine zusätzlichen optischen Elemente notwendig.

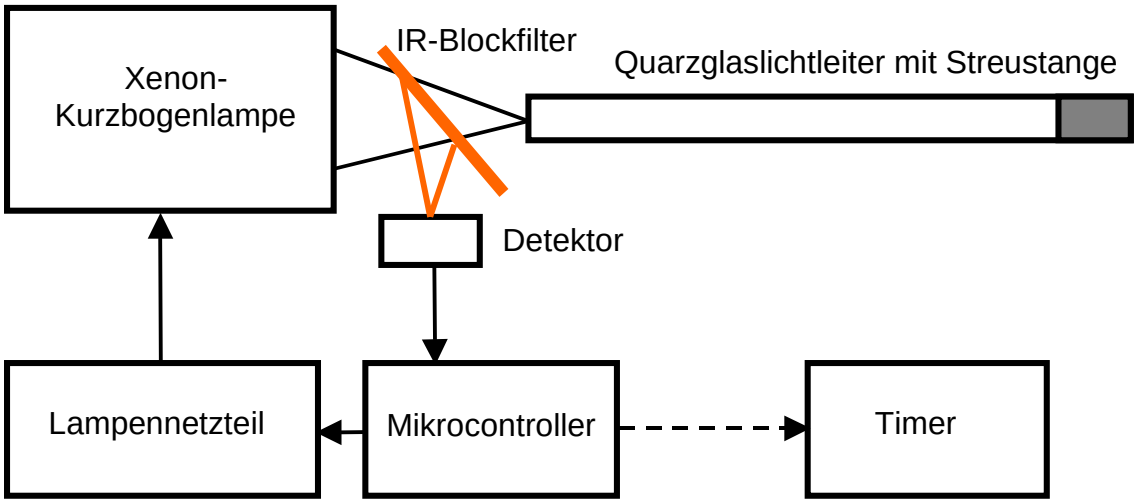

Abb. 4.3 Prinzipaufbau der proximalseitigen Lichtleistungsmessung

Fällt die Lichtleistung der Lampe lebensdauerbedingt ab, so wird über den Mikrocontroller, der auch das Signal dieses Detektors verarbeitet, die Ausgangsspannung des Lampennetzteils erhöht, um den ursprünglichen Leistungswert wieder zu erreichen. Befindet sich das Lampennetzteil bereits in der höchsten Leistungsstufe, erfolgt der Zugriff auf einen Timer, der die Bestrahlungszeit der PDT-Anwendung steuert. In diesem Fall wird die Bestrahlungszeit entsprechend verlängert, damit dem Patienten die erforderliche Bestrahlungsdosis verabreicht werden kann.

Die Eingabe der Bestrahlungsparameter und die Initialisierung der automatischen Fokussierung soll durch spezifische Funktionen, die über eine Tastatur eingegeben und auf einem übersichtlichen TFT-Display dargestellt werden, erfolgen. Tastatur und Display bilden dabei neue Modulbausteine des PDT-Lichtsystems.

Nach Eingabe der Bestrahlungsparameter soll eine geräteinterne Software folgende Betriebsmodi zur Verfügung stellen:

- Nach Fixierung des PDT-Applikationskatheters in der Harnblase und dem Start der Bestrahlung soll die Bestrahlungsstärke langsam bis auf die eingestellte Maximalbestrahlungsstärke erhöht werden. Da das Schmerzempfinden intensitätsabhängig ist, wird durch diese Maßnahme eine abrupten Applikation der Maximalbestrahlungsstärke verhindert und dadurch das Schmerzempfindens beim Patienten reduziert. Im weiteren Verlauf der Bestrahlung nimmt mit dem Prozess des Ausbleichens die Schmerzempfindung weiter ab. Nach Verabreichung der Soll-Lichtdosis erfolgt ein automatisches Abschalten der Lampe.

- Durch Implementierung eines speziellen Patientenmodus sollte es dem Patienten während der Anwendung ermöglicht werden, sich individuell die Bestrahlungsstärke entsprechend seines Schmerzempfindens zu regulieren. Durch die Erhöhung der Bestrahlungsstärke auf ein erträgliches Schmerzempfinden kann der Patient die Dauer der Behandlung reduzieren.

- Untersuchungen von Robinson et al. [127] und Messmann et al. [105] belegen, dass eine fraktionierte Bestrahlung, d. h. eine Bestrahlung, die definierte Unterbrechungen aufweist, den therapeutischen Effekt der PDT erhöht. Auf Basis eines speziellen Algorithmus soll dazu ein entsprechender Softwaremodus entwickelt werden. Die erforderlichen Basisdaten des Algorithmus müssen jedoch noch klinisch evaluiert werden.

Zur Änderung der Bestrahlungsstärke beispielsweise im Patientenmodus sollte die Lichtleistung der Xenon-Kurzbogenlampe geregelt werden können. Bis zu einer gewissen Leistung kann dies über den Lampenstrom, den das Netzteil liefert, geregelt werden. Fällt jedoch der Lampenstrom unter einen bestimmten Wert, so kommt es zum Zusammenbruch des Lichtbogens mit der Folge des Lampenausfalls. Daher soll diese Regelung mittels einer mechanischen Blendscheibe erfolgen. Dies hat den Vorteil, dass sich die lampenstromabhängige Änderung der Farbtemperatur nicht auf die spektrale Zusammensetzung des Lichts auswirkt. Darüber hinaus kann über die Blendscheibe das Licht komplett geblockt werden, ohne die Lampe elektrisch abzuschalten. Da die Xenon-Kurzbogenlampen im heißen Zustand statistisch verteilt Zündprobleme aufweisen, wird durch diese Lösung ein Abbruch der Anwendung verhindert.

Die Erkenntnisse, die bei dem PDT-Lichtsystem gewonnen wurden, können unmittelbar auch für die Weiterentwicklung von inkohärenten Lichtsystemen für die FD verwendet werden. So ist eine höhere Leistungsdichte bzw. Lichtleistung vor allem beim Einsatz in Verbindung mit kleinkalibrigen, flexiblen Endoskopen, die einen Faserbündelquerschnitt kleiner 2 mm aufweisen, wünschenswert.

Aufbauend auf das T-light-System ist ein multifunktionales Kombinations-Lichtsystem vorstellbar, das neben dem PDT-Modus einen Standard-Weißlicht-Modus sowie Modi für die Anregung der AF und Xenofluoreszenz für endoskopische und mikroskopische Anwendungen unterstützt.

5 Zusammenfassung

5.1 Inkohärentes UV-Lichtsystem für die Fluoreszenzdiagnostik

Die endoskopische Fluoreszenzdiagnostik (FD) hat sich in den letzten Jahren zu einer vielversprechenden Alternative und Ergänzung bei der Erkennung und Behandlungunterstützung neoplastischer Veränderungen entwickelt. Die derzeit auf dem Markt verfügbaren Systeme zur endoskopischen FD besitzen jedoch noch Optimierungspotentiale, welche die klinische Durchführung der Methode weiter verbessern könnten.

Ausgehend von einer Fluoreszenzanregungslichtquelle für den sichtbaren Bereich (D-light-System) ist daher ein System zur Ultraviolett (UV)-Anregung konzipiert und entwickelt worden, mit dem entscheidende Verbesserungen erzielt werden konnten. Dieses inkohärente UV-Lichtsystem beinhaltet ein optimiertes Kondensorsystems, das aus einem speziellen Filtersatz sowie einer neuen leistungsstarken UV-A emittierenden Lampe besteht. Die hohe Ausgangsleistung des UV-Lichtsystems resultiert in einer effizienten Anregung des Photosensibilisators (PS) und führt somit zu einer optimalen Fluoreszenzdarstellung des Tumorgewebes. Komplettiert wird das UV-Lichtsystem durch ein spezielles Endoskop mit einem UV-transmittierenden Lichtzuführungssystem.

Eine Risikobetrachtung ergab, dass unter der Berücksichtigung der geltenden Grenzwerte keine schädigende Wirkung für den Patienten durch die mit dem UV-Lichtsystem erzeugte Strahlung, bei einer Systemkonfiguration mit maximaler Lichttransmission, auftritt.

Die klinisch relevanten Untersuchungsergebnisse wurden an einem Gewebephantom, in vitro an Glioblastomgewebeproben und in vivo am Tier sowie in vivo in der menschlichen Mundhöhle und Harnblase erzielt. Für eine quantitative Beurteilung des UV-Lichtsystems erfolgte der Vergleich mit dem etablierten D-light-System.

Das sichtbare blaue Anregungslicht des D-light-Systems induziert auf feuchten Gewebeoberflächen störende Reflexionen, die eine Beurteilung des zu betrachtenden Areals maßgeblich erschweren können. Besonders gravierend wirkt sich dieser Nachteil bei der Visualisierung von Hirntumoren wie dem Glioblastom aus. Unter Verwendung des UV-Lichtsystems konnte erstmalig die reflexfreie Darstellung der 5-Aminolävulinsäure (5-ALS)-induzierten Protoporphyrin IX (PpIX)-Fluoreszenz in Glioblastomgewebe und der Hypericin (HYP)-induzierten Fluoreszenz in der Mundhöhle erfolgen.

Eine weitere Besonderheit des UV-Lichtsystems liegt in der speziellen Art der Farbkontrastbildgebung der Fluoreszenz. Das UV-Lichtsystem erzeugt die gewebeeigene Fluoreszenz (Autofluoreszenz) im blauen und grünen Wellenlängenbereich mit deutlich höherer Effizienz als das D-Light-System. Im Gegensatz zum D-light-System, das eine vom rückgestreuten blauen Anregungslicht (Remission) dominierte Darstellung aufweist, tritt bei der Anregung durch UV-Licht keine Remission im sichtbaren Bereich auf. Daher basiert die Bilddarstellung bei der UV-Anregung auf der Erzeugung der Fluoreszenz im blauen, grünen und roten Wellenlängenbereich. Somit wird durch das UV-Anregungslicht eine Gewebedarstellung erreicht, die in der Farbgebung an ein Weißlichtbild erinnert und auch eine vergleichbare strukturelle Detailinformation liefert. Beide in dieser Arbeit untersuchten PS sind durch UV-Licht anregbar und führen zu einer kontrastreichen Rotfluoreszenz-Darstellung von Arealen, die diese PS selektiv eingelagert haben.

Untersuchungen in der Mundhöhle haben gezeigt, dass nach oraler Applikation keine Akkumulation des PS HYP in der Mundschleimhaut erfolgt, sondern dass es nur zu einer oberflächlichen Anlagerung des PS kommt.

Sowohl in der Urologie bei der endoskopischen Visualisierung des Harnblasenkarzinoms mittels Hypericin (HYP) als auch in der Neurochirurgie bei der Detektion von Glioblastomen mittels der 5-Aminolävulinsäure (5-ALS) konnte das neuartige UV-Lichtsystem seine Leistungsfähigkeit bestätigen.

Erstmalig wurde durch das UV-Lichtsystem im Tierversuch die spezifische Anreicherung von HYP im Glioblastomgewebe visualisiert bzw. bildgebend nachgewiesen.

Klinische Studien müssen nun zeigen, inwieweit sich durch den Einsatz des inkohärenten UV-Lichtsystems die Sensitivität und die Spezifität bei der Erkennung von Tumorfrühstadien beispielsweise von carcinomata in situ (CIS) in der Harnblase quantitativ verbessern.

Gegenstand einer aktuellen Untersuchung ist die Optimierung der Anregungsfilter des UV-Lichtsystems, um die Effizienz der Anregung des PS HYP zu verbessern und somit möglicherweise ein höheres Fluoreszenzsignal induzieren zu können.

Die Verwendung des neuartigen UV-Lichtsystems in der Neurochirurgie hat signifikante Verbesserungen im Vergleich zu den derzeit auf dem Markt verfügbaren Systemen aufgezeigt und lässt somit auf einen zukünftigen klinischen Einsatz erwarten.

5.2 Inkohärentes PDT-Lichtsystem

Die klinische Praxis hat gezeigt, dass eine erfolgreiche Behandlung des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms eine integrale Therapie der gesamten Harnblasenschleimhaut erfordert. Bei Patienten, bei denen alle konventionellen Verfahren einschließlich intravesikaler Chemotherapie und Immuntherapie mittels Bacillus Calmette-Guérin versagt haben, besteht in der Regel die Indikation zur radikalen, operativen Entfernung der Harnblase. Wird jedoch dieser Eingriff vom Patienten verweigert oder kann wegen schwerer internistische Begleiterkrankungen keine offene Operation durchgeführt werden, so bietet derzeit die integrale Photodynamische Therapie (PDT) des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms mittels der 5-ALS eine vielversprechende Alternative.

Für dieses Verfahren wurde eine inkohärente Lichtquelle (T-light) auf der Basis einer Hochleistungs-Xenon-Kurzbogenlampe entwickelt und aufgebaut. Das Licht dieser Lampe wird über einen speziellen Einkoppelmechanismus auf die Eingangsfläche eines Quarzglaslichtleiters fokussiert und durch diesen übertragen. Am distalen Ende des Lichtleiters befindet sich ein zylinderförmiger Lichtapplikator aus Silikon, der mit Streupartikeln durchsetzt ist und so eine homogene Ausleuchtung der Harnblase gewährleistet. Lichtleiter und Lichtapplikator sind integrale Bestandteile eines eigens angepassten, flexiblen PDT-Applikationskatheters.

Eine Kernkomponente der Entwicklung stellt der spezielle Einkoppelmechanismus dar, der die folgenden Funktionen aufweist. Eine manuelle Justage mit einer hohen Genauigkeit (1/100 mm) in allen drei Raumachsen gewährleistet eine effiziente Einkopplung des von der Xenon-Kurzbogenlampe erzeugten Lichts in die Quarzglasfaser. Licht, welches nicht in den Lichtleiter eingekoppelt werden kann, wird über spezielle Keramikelemente absorbiert. Die Wärmeabfuhr erfolgt über ein angepasstes Kühlsystem. Diese Sonderkonstruktion ist zwingend notwendig, da die enorme Lichtintensität des nicht eingekoppelten Lichts schnell zu einem sehr hohen Temperaturanstieg der Einkoppelmechanik und des Mantelmaterials des Lichtleiters führen und diesen zerstören würde. Ein Mechanismus am Stecker des Applikationskatheters dient zum Schutz der in diesem Bereich modifizierten und dadurch sehr bruchempfindlichen Quarzglasfaser.

Die optimierte Abstimmung der einzelnen Komponenten des Lichtzuführungssystems ermöglicht die Übertragung von 5 W Weißlicht zum distalen Ende des Applikationskatheters. Somit

kann das System die notwendige Bestrahlungsdosis von 100 J/cm² in akzeptabler Applikationsdauer liefern.

Bis zu einem Ausbleichgrad des PS von 10 % der Ausgangskonzentration wird bei der Dosis von 100 J/cm² 90 % vom gesamten induzierten therapeutischen Effekt durch das PDT-System erzielt. Das von der Harnblasenwand vielfach rückgestreute Anregungslicht erhöht zudem die wirksame Lichtleistung bei klarer Spülflüssigkeit im Mittel um etwa 80 %. Im Falle des nahezu vollständigen Ausbleichens hat eine Änderung der applizierten Lichtdosis nur einen geringen Einfluss auf den therapeutischen Effekt. Somit ist eine präzise Lichtdosimetrie und eine homogene Lichtverteilung nicht zwingend notwendig. Dies wiederum vereinfacht die Bestrahlungsprozedur beträchtlich.

Der Einsatz des inkohärenten PDT-Systems ermöglicht im Gegensatz zu kohärenten Lasersystemen die gleichzeitige Anregung aller Absorptionsbanden des PS PpIX. Die breitbandige Anregung bei der 5-ALS-PDT kann außerdem zu einem verstärkten Therapieeffekt bedingt durch zusätzlich entstehende Photoprodukte führen. Einige dieser Photoprodukte stellen selbst sehr effektive PS mit unterschiedlichen Absorptionsbanden dar.

Im Rahmen einer klinischen Pilotstudie [154] mit 12 Patienten bewies das T-light-System, dokumentiert durch histomorphologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen sowie klinische Kurzzeitbeobachtungen, seine Effektivität in erster Linie bei der selektiven Zerstörung hochmaligner, flacher urothelialer Neoplasien, wie dem CIS ohne Schädigung des Normalurothels, der stromalen oder muskulären Schichten der Harnblase.

Das T-light-System zeichnet sich besonders durch die einfache Bedienung, die kompakte Bauform und die im Vergleich zu Lasersystemen geringen Anschaffungskosten aus. Der flexible PDT-Applikationskatheter zur integralen Bestrahlung der Harnblase ist ohne besonderen Aufwand an das T-light-System zu adaptieren und leicht in die Harnblase einzuführen.

Im Frühjahr 2005 soll mit dem T-light-System eine Studie [165] starten, die in Verbindung mit der Substanz Hexvix® (vgl. [66]) die Sicherheit und Effektivität dieses neuen Verfahrens bei der Behandlung des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms bestätigen soll. Nach positivem Verlauf der Studie soll das T-light-System produziert und auf breiter Basis klinisch eingesetzt werden.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

[1] Ackermann, G., Abels, C., Karrer, S., Baeumler, W., Landthaler, M., Szeimies, R. M.: Fluoreszenzgestützte Biopsie von Basalzellkarzinomen. Hautarzt 51: 920-924 (2000)

[2] Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W., de Witte, P. A.: Hypericin in cancer treatment: more light on the way. Int. J. Biochem. Cell Biol. 34: 221-241 (2002)

[3] Aichele, D., Golte-Bechtle, M.: Was blüht den da? Kosmos Naturführer. Franckh, Stuttgart (1986)

[4] American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH: Threshold limit values for chemical substances and physical agents: Biological Exposure Indices. Cincinnati (1997)

[5] Auler, H., Banzer, G.: Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei Geschwulstkrankheiten von Menschen und Tieren. Z. Krebsforsch. 53: 65-68 (1942)

[6] Baumgartner, R., Buser, A., Kriegmair, M., Lenz, H., Stepp, H., Unsoeld, E., Jocham, D.: First clinical experiments with photodynamic fluorescence diagnosis in urology. Investigative Urologie 4: 107-112 (1991)

[7] Baumgartner, R., Hofstetter, A., Jocham, D., Kriegmair, M., Stepp, H., Unsoeld, E.: Die photodynamische Diagnose in der Urologie – Erste klinische Erfahrungen mit einer neuen Methode zur Tumorfrüherkennung. Lasermedizin 8: 16-21 (1992)

[8] Beck, G.: Gewebephantomsystem und tiefenauflösender Fluoreszenznachweis für die optische Diagnostik in der Medizin. Dissertation an der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm (1998)

[9] Benson, R. C., Kinsey, J. H., Cortese, D. A., Farrow, G. M. , Utz, D. C.: Treatment of transitional cell carcinoma of the bladder with hematoporphyrin derivative phototherapy. J. Urol. 130: 1090-1095 (1983)

[10] Bergmann, J.: Pflanzliche Antidepressiva. Seminararbeit, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Prof. P. Schreiber, Würzburg: 15-20 (1999)

[11] Beyer, W., Waidelich, R., Knuechel-Clarke, R., Stepp, H., Baumgartner, R., Hofstetter, A.: Technical concepts for white light PDT of bladder cancer. Med. Laser Appl. 17: 37-40 (2002)

[12] Blum, H. F.: Photodynamic action and diseases caused by light. Reinhold, New York (1941)

[13] Brockmann, H., Haschad, M. N., Maier, K., Pohl, F.: On the tautomers of hypericin. Naturwissenschaften 555: 27 (1939)

[14] Brockmann, H., Pohl, F., Maier, K., Haschad, M. N.: Justus Liebigs Ann. Chem. 553: 1-52 (1942)

[15] Brockmann, H., von Falkenhausen, E. H., Neeff, R., Dorlars, A., Budde, G.: Chem. Ber. 84: 865-887 (1951)

[16] Brockmann, H., Kluge, F., Muxfeldt, H.: Totalsynthese des Hypericins. Chem. Ber. 90: 2302-2318 (1957)

[17] Brockmann, H.: A structural proof for the hypericin 1,6-Dioxo tautomer. Fortschr. Chem. Org. Naturst. 14: 141-185 (1957)

[18] Cerny, C.: Hoppe Seyler's. Z. Physiol. Chem. 73: 371-382 (1911)

[19] Chang, S. C., Mac Robert, A. J., Brown, S. G.: Photodynamic therapy on rat urinary bladder with intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid: light diffusion and histological changes. J. Urol. 155: 1749-1753 (1996)

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

[21] Combilight PDD-Lichtprojektor 300 W, Xenon, Auto LP 5133, Richard Wolf GmbH, D-75434 Kittlingen

[22] Commission Internationale de l'Eclairage, CIE: Blue-light photochemical retinal hazard. 138/1 CIE TC 6-14 report, Wien (2000)

[23] Commission International de l'Eclairage, CIE: Erythemale Referenzwirkungsfunktion und standardisierte Erythemdosis. ISO 17166: 1999(E), CIE S007/E-1998

[24] Dalton, J. T., Yates, C. R., Yin, D., Straughn, A., Marcus, S. L., Golub, A. L., Meyer, M. C.: Clinical pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid in healthy volunteers and patients at high risk for recurrent bladder cancer. J. Pharmacol. Exp. Ther. 301(2): 507-512 (2002)

[25] Daniell, M. D., Hill, J. S.: A history of photodynamic therapy. Aust. N. Z. J. Surg. 61: 340-348 (1991)

[26] Delini-Stula, A., Lorenz, J., Holsboer-Trachsler, E.: Pflanzliche Antidepressiva. Schweiz Med. Forum 48: 1146-1154 (2002)

[27] Diamond, I., Mc Donagh, A. F., Wilson, C. B., Granelli, S. G., Nielsen, S., Jaenicke, R.: Photodynamic therapy of malignant tumours. Lancet: 1175-1177 (1972)

[28] DIN 5031-7: Strahlenphysik im optischen Bereich und Lichttechnik: Benennung der Wellenlängenbereiche. Beuth Verlag, Berlin (1984)

[29] DIN 5031-10: Norm-Entwurf: Strahlungsphysik im optischen Bereich der Lichttechnik – Teil 10: Photobiologisch wirksame Strahlung, Größen, Kurzzeichen und Wirkspektrum. Beuth Verlag, Berlin (1996)

[30] D'Hallewin, M. A., Baert, L.: Long-term results of whole bladder wall PDT for carcinoma in situ of the bladder. Urology 45: 763-767 (1995)

[31] D'Hallewin, M. A., de Witte, P. A., Waelkens, E., Merlevede, W., Baert, L.: Fluorescence detection of flat bladder carcinoma in situ after intravesical instillation of hypericin. J. Urol. 164: 349-351 (2000)

[32] D'Hallewin, M. A., Kamuhabwa, A., Roskams, T., de Witte, P. A., Baert, L.: Hypericin-based fluorescence diagnosis of bladder carcinoma. BJU. Int. 89: 760-763 (2002)

[33] Dougherty, T. J.: Activated dyes as antitumor agents. J. nat. Cancer Inst. 52(4): 1333-1336 (1974)

[34] Dougherty, T. J., Cooper, M. T., Mang, T. S.: Cutaneous phototoxic occurences in patients receiving photofrin. Las. Surg. Med. 10: 485 (1990)

[35] Duran, N., Song, P. S.: Hypericin and its photodynamic action. J. Photochem. Photobiol. 43: 677-680 (1986)

[36] Ehrenberg, B., Anderson, J. L., Foote, C. S.: Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by hypericin in organic and biological media. J. Photochem. Photobiol. 68(2): 135-40 (1998)

[37] Ehrhardt, A., Irion, K. M., Strobl, K. H., Stepp, H., Baumgartner, R.: Vorrichtung zur photodynamischen Diagnose. Patent A94038 III, DE, FR, GB, IT, US (1996)

[38] Ehrhardt, A., Stepp, H., Hofstetter, A.: Medizin: den Krebs zum Leuchten bringen: Inkohärente Lichtsysteme für die Fluoreszenzdiagnostik. Laser + Photonik 3: 30-32 (2002)

[39] Ehrhardt, A., Stepp, H., Irion, K. M., Stummer, W., Zaak, D., Baumgartner, R., Hofstetter, A.: Fluorescence detection of human malignancies using incoherent light systems. Med. Laser Appl. 18: 27-35 (2003)

[40] Falk, H.: Vom Photosensibilisator Hypericin zum Photorezeptor Stentorin – die Chemie der Phenanthroperylenchinone. Angew. Chem. 111: 3306-3326 (1999)

[41] Figge, F. J. H.: Relationship of pyrrol compounds to carcinogenesis. In: F. R. Moulton (ed.) A. A. A. S. Res. Conf. on Cancer, Washington, Am. Assoc. Adv. Sc.: 117-128 (1944)

[42] Figge, F. J. H. , Weiland, G. S., Manganiello, L. O. J.: Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 68: 640-641 (1948)

[43] Filbeck, T., Roessler, W., Knuechel-Clarke, R., Straub, M., Kiel, H. J., Wieland, W. F.: Clinical results of the transurethral resection and evaluation of superficial bladder carcinomas by means of fluorescence diagnosis after intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. J. Endourol. 13(2): 117-121 (1999)

[44] Fluoreszenz aus Wikipedia – Die freie Enzyklopädie. http://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenz (2003)

[45] Frimberger, D., Zaak, D., Hofstetter, A.: Endoscopic fluorescence diagnosis and laser treatment of transitional cell carcinoma of the bladder. Seminars in Urologic Oncology 18(4): 264-272 (2000)

[46] Fuch, C.: In-vitro-Untersuchungen zu Fluoreszenz und photodynamischer Wirksamkeit 5-Aminolävulinsäure-induzierter Porphyrine. Dissertation an der med. Fak. der LMU München (1996)

[47] Galeotti, T., van Rossum, G. D., Mayer, D. H., Chance, B.: On the fluorescence of NAD(P)H in whole-cell preparations of tumours and normal tissue. Eur. J. Biochem. 17(3): 485-496 (1970)

[48] Ghadially, F. N.: Mitochondria, in F. N. Ghadially (Ed): Ultrastructural pathology of the cell and martix. 4th ed. Boston, Butterworth-Heinemann, Vol. 1: 195-327 (1997)

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

[50] Gouterman, M.: Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings. In: The porphyrins. Edited by Dolphin, D. Academic Press, New York: 1-165 (1978)

[51] Greenbaum, L., Gozlan, Y., Schwartz, D., Katcoff, D. J., Malik, Z.: Nuclear distribution of porphobilinogen deaminase (PBGD) in glioma cells: a regulatory role in cancer transformation? Br. J. Cancer. 86(6): 1006-11 (2002)

[52] Greenbaum, L., Katcoff, D. J., Dou, H., Gozlan, Y., Malik, Z.: A porphobilinogen deaminase (PBGD) Ran-binding protein interaction is implicated in nuclear trafficking of PBGD in differentiating glioma cells. Oncogene. 22(34): 5221-8 (2003)

[53] Gronlund-Pakkanen, S., Pakkanen, T. M., Talja, M., Kosma, V. M., Ala-Opas, A., Alhava, E.: The morphological changes in rat bladder after photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX. BJU Int. 86(1): 126-32 (2000)

[54] Gudgin-Dickson, E. F., Pottier, R. H.: On the role of PpIX photoproducts in PDT. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 29: 91-93 (1995)

[55] Harty, J. I., Amin, M., Wieman, T. J., Tseng, M. T., Ackerman, D., Broghamer, W.: Complications of whole bladder dihematoporphyrin ether PDT. J. Urol. 141: 1341-1346 (1989)

[56] Harty, J. I., Amin, M., Wieman, T. J., Tseng, M. T., Ackerman, D., Broghamer, W.: Complications of whole bladder dihematoporphyrin ether photodynamic therapy. J. Urol. 141(6): 1341-1346 (1989)

[57] Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften, HVGB: Inkohärente optische Strahlung, Grundentwurf BGV B9 (2000)

[58] Hausmann, W.: Grundzüge der Lichtbiologie und Lichtpathologie, Strahlentherapie VIII. Sonderband, Urban & Schwarzenberg, Berlin (1923)

[59] Henderson, B. W., Vaughan, L., Bellnier, D. A., van Leengoed, H., Johnson, P. G., Oseroff, A. R.: Photosensitization of murine tumor, vasculature and skin by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin. J. Photochem. Photobiol. 62(4): 780-789 (1995)

[60] Herman, M. A., Webber, J., Fromm, D., Kessel, D.: Hemodynamic effects of 5-aminolevulinic acid in humans. J. Photochem. Photobiol. B 43(1): 61-65 (1998)

[61] Hochleistungs-Lichtprojektor CLV-FD, Olympus Deutschland GmbH, D-20097 Hamburg

[62] Hofstetter, A., Zaak, D.: Diagnosis and treatment of nonmetastasized superficial bladder cancer must be reconsidered. Lasermed. 15: 206-211 (2000)

[63] Hofstetter, A.: Lasergestützte Operationsverfahren in der Urologie. Thieme (2003)

[64] Hohla, A.: UV-angeregte Autofluoreszenz: Spektroskopische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Tumorselektivität endogener Gewebefarbstoffe. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (2003)

[65] Huettmann, G., Oelckers, S.: Der Einfluss des Spektrums von PDD-Lichtquellen auf die Erkennbarkeit der Fluoreszenz bei der ALA-Fluoreszenzdiagnostik. Forschungs- und Entwicklungsbericht des Medizinischen Laserzentrums Lübeck: 80-81 (2001)

[66] Hugin online (www.huginonline.com/norway/PHO): Marketing approval for Hexvix. PhotoCure ASA/OSE: PHO/ISIN: NO. 0010000045 (2004)

[67] International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection of the International Radiation Protection Association, ICNIRP(IRPA): Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelenghts between 180 nm and 400 nm. Health Physics 49: 331-340 (1985)

[68] International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection of the International Radiation Protection Association, ICNIRP(IRPA):Proposed change to the IRPA 1985 guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation. Health Physics 56: 971-972 (1989)

[69] Internationales Wörterbuch der Lichttechnik, CIE-Publication 17.4, Commission Internationale de l'Eclairage, CIE, Genève (1987)

[70] Irion, K. M., Beck, G.: Verwendung von Bestandteilen des Johanniskrauts zur PDD und PDT von intraoralen Erkrankungen sowie malignen Tumoren im Gehirn. Offenlegungsschrift DE19950933A1 (1999)

[71] Jacobson, J. M., Feiman, L., Liebes, L., Ostrow, N., Koslovski, V., Tobia, A., Cabana, B. E., Lee, D., Spritzler, J., Prince, A. M.: Pharmacokinetics, safety and antiviral effects of hypericin, a derivate of St John's wort, in patients with chronic hepatitis C virus infection. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 517-524 (2001)

[72] Jichlinski, P., Forrer, M., Mizeret, J., Glanzmann, T., Braicotte, D., Wagnières, G., Zimmer, G., Guillou, L., Schmidlin, F., Graber, P., van den Bergh, H., Lesinger, H. J.: Clinical evaluation for detecting superficial transition cell carcinoma of the bladder by light induced fluorescence of protoporphyrin IX following topical application of 5-aminolevulinic acid: Preliminary results. Lasers in Surgery and Medicine 20: 402-408 (1997)

[73] Jocham, D., Schmiedt, E.: Integrale photodynamische Therapie des multifokalen Blasenkarzinoms nach Photosensibilisierung mit Hämatoporphyrinderivat (HpD). In: Bichler, K. H., Fluechter, S. H., Strohmaier, W. L., Hrsg. Therapie des Harnblasenkarzinoms. Berlin, Heidelberg: Springer: 109 (1988)

[74] Jocham, D., Beer, M., Baumgartner, R., Staehler, G., Unsoeld, E.: Long-term experience with integral photodynamic therapy of TIS bladder carcinoma. Ciba Found Symp. 146: 198 (1989)

[75] Jocham, D., Baumgartner, R., Fuchs, N., Lenz, H., Stepp, H., Unsoeld, E.: Fluorescence diagnosis of porphyrin-marked urothelial tumors. Status of experimental development. Urologe A 28(2): 59-64 (1989)

[76] Jocham, D., Baumgartner, R., Stepp, H., Unsoeld, E.: Clinical experience with the integral PDT of bladder carcinoma. J. Photochem. Photobiol. B 6: 183-187 (1990)

[77] Kamuhabwa, A. A., Roskams, T., D'Hallewin, M. A., Baert, L., van Poppel, H., de Witte, P. A.: Whole bladder wall photodynamic therapy of transitional cell carcinoma rat bladder tumors using intravesically administered hypericin. Int. J. Cancer 107(3): 460-467 (2003)

[78] Kamuhabwa, A. A., Roskams, T., Baert, L., de Witte, P. A.: Microscopic quantification of hypericin fluorescence in an orthotopic rat bladder tumor model after intravesical instillation. Int. J. Oncol. 22(4): 933-937 (2003)

[79] Kelly, J. F., Snell, M. E., Berenbaum, M. C.: Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. Brit. J. Cancer 31: 237-244 (1975)

[80] Kelly, J. F.: Haematoporphyrins in the diagnosis and treatment of carcinoma of the bladder. Proc. R. Soc. Med. 68(8): 527-528 (1975)

[81] Kennedy, J. C., Pottier, R. H., Pross, D. C.: Photodynamic therapy with endogenous Protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. J. Photochem. Photobiol. B 6(1-2): 143-148 (1990)

[82] Kennedy, J. C., Pottier, R. H.: Endogenous Protoporphyrin IX, a clinical useful photosensitizer for photodynamic therapy. J. Photochem. Photobiol. B 14(4): 275-292 (1992)

[83] Koenig, K., Schneckenburger, H., Rueck, A., Steiner, R.: In vivo photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins. J. Photochem. Photobiol. B 18: 287-290 (1993)

[84] Koenig, K., Liu, Y., Sonek, G. J., Berns, M. W., Tromberg, B. J.: Autofluorescence spectroscopy of optically trapped cells. J. Photochem. Photobiol. 62(5): 830-835 (1995)

[85] Krieg, R. C., Fickweiler, S., Wolfbeis, O. S., Knuechel-Clarke, R.: Cell-type spezific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro. J. Photochem. Photobiol. 72(2): 226-233 (2000)

[86] Krieg, R. C., Messmann, H., Rauch, J., Seeger, S., Knuechel-Clarke, R.: Metabolic characterization of tumor cell-spezific protoporphyrin IX accumulation after exposure to 5-aminolevulinic acid in human colonic cells. J. Photochem. Photobiol. 76(5): 518-525 (2002)

[87] Kriegmair, M., Baumgartner, R.: Intravesikuläre Instillation von Delta-Aminolävulinsäure (ALA) – Eine neue Methode zur photodynamischen Diagnostik und Therapie. Laser-Medizin 8: 83 (1992)

[88] Kriegmair, M., Baumgartner, R., Knuechel-Clarke, R., Ehsan, A., Steinbach, P., Lumper, W., Hofstaedter, F., Hofstetter, A.: Photodynamische Diagnose urothelialer Neoplasien nach intravesikaler Instillation von 5-Aminolävulinsäure. Urologe 33: 270-275 (1994)

[89] Kriegmair, M., Stepp, H., Steinbach, P., Lumper, W., Ehsan, A., Stepp, H. G., Rick, K., Knuechel-Clarke, R., Baumgartner, R., Hofstetter, A.: Fluorescence cystoscopy following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid: A new procedure with high sensitivity for detection of hardly visible urothelial neoplasias. Urol. Int. 55: 190-196 (1995)

[90] Kriegmair, M., Waidelich, R., Lumper, W., Ehsan, A., Baumgartner, R., Hofstetter, A: Integral photodynamic treatment of refractory superficial bladder cancer. J. Urol. 154: 1339-1341 (1995)

[91] Kriegmair, M., Baumgartner, R., Lumper, W., Waidelich, R., Hofstetter, A.: Early clinical experience with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic therapy of superficial bladder cancer. Br. J. Urol. 77(5): 667-671 (1996)

[92] Kriegmair, M., Knuechel-Clarke, R., Stepp, H., Hofstaedter, F., Hofstetter, A.: Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence. J. Urol. 155: 105-110 (1996)

[93] Kriegmair, M., Zaak, D., Stepp, H., Stepp, H. G., Baumgartner, R., Hofstetter, A.: Transurethral resection and surveillance of bladder cancer supported by 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy. Eur. Urol. 36: 386-392 (1999)

[94] Kriegmair, M., Zaak, D., Knuechel-Clarke, R., Baumgartner, R., Hofstetter, A.: Photodynamic cystoscopy for detection of bladder tumors. Semin. Laparosc. Surg. 6(2): 100-103 (1999)

[95] Kubat, P., Zelinger, Z., Jirsa, M.: The effect of the irradiation wavelength on the processes sensitized by protoporphyrin IX dimethyl ester. Radiat. Res. 148: 382-385 (1997)

[96] Lamm, D. L., Riggs, D. R., Traynelis, C. L., Nseyo, U. O.: Apparent failure of current intravesical chemotherapy prophylaxis to influence the long-term course of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. Urol. 153(5): 1444-1450 (1995)

[97] Lipson, R. L., Baldes, E. J.: The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivate. Arch. Dermatol. 82: 508-516 (1960)

[98] Lohmann, W., Paul, E.: In situ detection of melanomas by fluorescence measurements. Naturwissenschaften 75(4): 201-202 (1988)

[99] Luksiene, Z., de Witte, P. A.: Hypericin as novel and promising photodynamic therapy tool: studies on intracellular accumulation capacity and growth inhibition efficiency. Medicina (Kaunas) 39(7): 677-82 (2003)

[100] Lundholm, C., Norlen, B. J., Ekman, P., Jahnson, S., Lagerkvist, M., Lindeborg, T., Olsson, J. L., Tveter, K., Wijkstrom, H., Westberg, R., Malmstrom, P. U.: A randomized prospective study comparing long-term intravesical instillations of Mitomycin C and bacillus Calmette-Guerin in patients with superficial bladder carcinoma. J. Urol. 156: 372-376 (1996)

[101] Ma, L. W., Bagdonas, S., Moan, J.: The photosensitizing effect of the photoproduct of protoporphyrin IX. Photochem. J. Photobiol. B: Biol. 60: 108-113 (2001)

[102] Manyak, M. J.: Photodynamic therapy: principles and urologic applications. Semin. Urol. 9(3): 192-202 (1991)

[103] Marti, A., Lange, N., van den Bergh, H., Sedmera, D., Jichlinski, P., Kucera, P.: Optimization of the formation and distribution of protoporphyrin IX in the urothelium: an in vitro approach. J. Urol. 162(2): 546-552 (1999)

[104] Matthiolus, P. A.: Kräuterbuch. Hrsg. J. Camerius, Frankfurt (1590)

[105] Messmann, H., Szeimies, R. M., Baeumler, W., Knuechel-Clarke, R., Zirngibl, H., Schoelmerich, J., Holstege, A.: Enhanced effectiveness of photodynamic therapy with laser light fractionation in patients with esophageal cancer. Endoscopy 29(4): 275-80 (1997)

[106] Meyer-Betz, F.: Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenstoffs. Dtsch. Arch. klin. Med. 112: 476-503 (1913)

[107] Moan, J., Sommer, S.: Fluorescence and absorption properties of the components of hematoporphyrin derivate. Photobiochem. Photobiophys. 3: 93-103 (1981)

[108] Moan, J., Iani, V., Ma, L. W.: Choice of the proper wavelength for photochemotherapy. SPIE 2625: 544-549 (1996)

[109] Morales, A., Eidinger, D., Bruce, A. W.: Intracavitary bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumours. J. Urol. 137: 180-183 (1976)

[110] N. N.: Farbmessung, CIE-Publication 15. Commission Internationale de l'Eclairage, Paris (1971)

[111] Navone, N. M., Polo, C. F., Frisardi, A. L., Andrade, N. E., Battle, A. M.: Heme biosynthesis in human breast cancer-mimetic "in vitro" studies and some heme enzymic activity levels. Int. J. Biochem. 22(12): 1407-1411 (1990)

[112] Nilsson, S., Ragnhammar, P., Glimelius, B., Nygren, P.: For the SBU-group: A systematic overview of chemotherapy effects in urothelial bladder cancer. Acta. Oncol. 40(2-3): 371-390 (2001)

[113] Norren, D. V., Vos, J. J.: Spectral transmission of the ocular media. Vision Res. 14: 1237-1244 (1974)

[114] Nseyo, U. O., Lundahl, S. L., Merrill, D. C.: Whole bladder PDT: critical review of present-day technology and rationale for development of intravesical laser catheter and monitoring system. Urology 36: 398-402 (1990)

[115] Nseyo, U. O.: Photodynamic Therapy. Urol. Clin. North Am. 19: 519-599 (1992)

[116] Nseyo, O. U., Shumaker, B., Klein, E. A., Sutherland, K.: PDT using porfimer sodium as an alternative to cystectomy in patients with refractory transtional cell carcinoma in situ of the bladder. J. Urol. 160: 39-44 (1998)

[117] Oberdanner, C. B., Kiesslich, T., Krammer, B., Plaetzer, K.: Glucose is required to maintain high ATP-levels for the energy-utilizing steps during PDT-induced apoptosis. J. Photochem. Photobiol. 76(6): 695-703 (2002)

[118] Olivio, M., Lau, W., Manivasager, V., Tan, P. H., Soo, K. C., Cheng, C.: Macro-microscopic fluorescence of human bladder cancer using hypericin fluorescence cystoscopy and laser confocal microscopy. Int. J. Oncol. 23(4): 983-990 (2003)

[119] Online-Lexikon Paramedizin: Zum Begriff: Johanniskraut. http.www.vrzverlag.com/esoterik/lejohann.htm (2002)

[120] Osram Lichtprogramm: Osram GmbH, Hellbrunner Str. 1, 81536 München. Version 04/2002 (2003)

[121] Pass, H. I.: Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. Journal of the National Cancer Institut 85(6): 443-456 (1993)

[122] Peng, Q., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Nesland, J. M.: 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. J. Photochem. Photobiol. 65(2): 235-51 (1997)

[123] Pokorny, J., Smith, V. C., Luze, M.: Aging of the human lens. Appl. Opt. 26: 1437-1440 (1987)

[124] Policard, A.: Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examienées a la lumière de Wood. C. R. Soc. Biol. 91: 1423-1428 (1924)

[125] Pottier, R. H.: In vitro and in vivo fluorescence monitoring of photosensitizers. J. Photochem. Photobiol. B 6: 103-109 (1990)

[126] Raab, O.: Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Z. Biol. 39: 524-526 (1900)

[127] Robinson, D. J., de Bruijn, H. S., Star, W. N., Sterenborg, H. J.: Dose and timing of the first light fraction in two-fold illumination schemes for topical ALA-mediated photodynamic therapy of hairless mouse skin. J. Photochem. Photobiol. 77(3): 319-23 (2003)

[128] Roth, L.: Hypericum, Hypericin: Botanik, Inhaltsstoffe, Wirkung. Ecomed, Landsberg (1990)

[129] Schempp, C. M., Simon-Haarhaus, B., Termeer, C. C., Simon, J. C.: Hypericin photo-induced apoptosis of Jurkat cells involves the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and activation of caspase-8. FEBS Lett. 493: 26-30 (2001)

[130] Schluesener, H., Deininger, M.: Institut für Hirnforschung, Universitätsklinikum Tübingen (UKT), Eberhard-Karls-Universität

[131] Schneckenburger, H., Gschwend, M. H., Paul, R. J., Stepp, H., Rick, K., Betz, C., Strauss, W.: Time-gated spectroscopy of intrinsic fluorophores in cells and tissues. Proc. SPIE 2324: 187-195 (1995)

[132] Seidl, J., Rauch, J., Krieg, R. C., Appel, S., Baumgartner, R., Knuechel-Clarke, R.: Optimization of differential photodynamic effectiveness between normal and urothelial cells using 5-aminolevulinic acid-induced protoprophyrin IX as sensitizer. Int. J. Cancer 92: 671-667 (2001)

[133] Smith, K. C., Hanawalt, P. C.: Molecular Photobiology. Academic Press, New York (1969)

[134] Steinbach, P., Kriegmair, M., Baumgartner, R., Hofstaedter, F., Knuechel-Clarke, R.: Intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid: the fluorescent metabolite is limited to urothelial cells. Urology 44(5): 676-681 (1994)

[135] Stepp, H.: Entwicklung und Optimierung eines computergestützten Tumorfrühdiagnoseverfahrens durch bildgebende Detektion tumorselektiver Fluoreszenzmarker. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (1993)

[136] Stepp, H., Baumgartner, R., Beyer, W., Knuechel-Clarke, R., Rick, K., Steinbach, P., Stepp, H. G., Kriegmair, M.: Bladder tissue diagnostics utilizing protoporphyrin IX fluorescence detection. Optical biopsy and fluorescence spectroscopy and imaging. ed. (Cubeddu, R., Marchesini, R., Mordon, S. R., Svanberg, K., Rinneberg, H. H., Wagnières, G., eds.) Lille, France: Proc. SPIE 2324: 20-31 (1994)

[137] Stepp, H., Baumgartner, R., Beyer, W., Knuechel-Clarke, R., Koerner, T. O., Kriegmair, M., Rick, K., Steinbach, P., Stepp, H. G., Hofstetter, A.: Fluorescence imaging and spectroscopy of ALA-induced protoporphyrin IX preferentially accumulated in tumour tissue. Optical biopsy. ed. (Cubeddu, R., Mordon, S. R., Svanberg, K., eds.) Barcelona, Spain: Proc. SPIE 2627: 13-24 (1995)

[138] Storz, K.: Patentschrift Nr. 1 113 788: Einrichtung an Endoskopen mit einer proximalen Lichtquelle. Deutsches Patentamt der BRD (1960)

[139] Stummer, W., Stepp, H., Moeller, G., Ehrhardt, A., Leonhard, M., Reulen, H. J.: Technical principles for protoporphyrin-IX-fluorescence guided microsurgical resection of malignant glioma tissue. Acta Neurochir. 140: 995-1000 (1998)

[140] Stummer, W., Novotny, A., Stepp, H., Goetz, C., Bise, K., Reulen, H. J.: Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. J. Neurosurg. 93(6): 1003-1013 (2000)

[141] Stummer, W., Meinel, T., Reulen, H. J.: Fluoreszenzgestützte Resektion maligner Gliome. Deutsches Ärzteblatt 98(7): 407 (2001)

[142] Sutter, E.: Schutz vor optischer Strahlung: Laserstrahlung, inkohärente Strahlung, Sonnenstrahlung. Berlin; Offenbach: VDE-Verlag (1999)

[143] von Tappeiner, H.: Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. Muench. Med. Wochenschr. 47: 5-7 (1900)

[144] von Tappeiner, H., Jesionek, A.: Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. Muench. Med. Wochenschr. 47: 2042-2044 (1903)

[145] von Tappeiner, H.: Die photodynamische Erscheinung. In: Ergebnisse der Physiologie, L. Asher, K. Spiro (eds). Verlag von J. F. Bergmann, Wiesbaden: 698-741 (1909)

[146] Thomas, C., Randall, S., MacGill, S., Miller, G. C., Pardini, R. S.: Photoactivation of hypericin generates singlet oxygen in mitochondria and inhibits succinyloxidase. J. Photochem. Photobiol. 55: 47-53 (1992)

[147] Uchibayashi, U., Koshida, K., Kunimi, K., Hisazumi, H.: Whole bladder wall photodynamic therapy for refractory carcinoma in situ of the bladder. Br. J. Cancer. 71(3): 625-8 (1995)

[148] Utsumi, T., Okuma, M.: Light-dependent inhibition of protein kinase C and superoxide generation of neutrophils by hypericin, an antiretroviral agent. Arch. Biochem. Biophys. 316: 493-497 (1995)

[149] Uzdensky, A. B., Ma, L. W., Iani, V., Hjortland, G. O., Stehen, H. B., Moan, J.: Intracellular localisation of hypericin in human glioblastoma and carcinoma cell lines. Lasers Med. Sci. 16: 276-283 (2001)

[150] Wagner, S.: Fluoreszenzquantifizierung beim Harnblasenkarzinom nach Instillation von 5-Aminolävulinsäure. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (2000)

[151] Wagnières, G. A., Star, W. M., Wilson, B. C.: In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. J. Photochem. Photobiol. 68(5): 603-632 (1998)

[152] Waidelich, R., Hofstetter, A., Stepp, H., Baumgartner, R., Weninger, E., Kriegmair, M.: Early clinical experience with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic therapy of upper tract urothelial tumors. J. Urol. 159(2): 401-404 (1998)

[153] Waidelich, R., Stepp, H., Baumgartner, R., Weninger, E., Hofstetter, A., Kriegmair, M.: Clinical experience with 5-aminolevulinic acid and photodynamic therapy for refractory superficial bladder cancer. J. Urol. 165: 1904-1907 (2001)

[154] Waidelich, R., Beyer, W., Knuechel-Clarke, R., Stepp, H., Baumgartner, R., Schroeder, J., Hofstetter, A., Kriegmair, M.: Whole bladder PDT with 5-ALA using a white light source. Urology 61(2): 332-337 (2003)

[155] Walther, M. M., Delaney, T. F., Smith, P. D., Friauf, W. S., Thomas, G. F., Shawker, T. H., Vergas, M. P., Choyke, P. L., Linehan, W. M., Abraham, E. H., Okunieff, P. G., Glatstein, E.: Phase I trial of PDT in the treatment of recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder. Urology 50: 199-206 (1997)

[156] Walther, M. M.: The role of photodynamic therapy in the treatment of recurrent superficial bladder cancer. Urol. Clin. North Am. 27(1): 163-170 (2000)

[157] Weller, M., Trepel, M., Gimmel, C., Schabet, M., Bremen, D., Krajewski, S., Reed, J. C.: Hypericin-induced apoptosis of human maligmant glioma cells is light dependent, independent of bcl-2 expression, and does not require wild-type p53. Neurol. Res. 19(5): 459-470 (1997)

[158] Wiedenmann, R., Nienhaus, G. U.: Leuchtende Proteine als Forschungsobjekte und –assistenten. Uni Ulm Intern 256: 8-10 (2002)

[159] Wolf, P.: Photodynamische Therapie (PDT). Der Hautarzt 48(2): 137-148 (1997)

[160] Wuelfert, S.: UV-Untersuchungsmethoden an Kunst und Kulturgut. http://surf.agri.ch/wuelfert/lecture/physics/imaging/UV/imag-uv-sources.htm (1998)

[161] Zaak, D., Knuechel-Clarke, R.: Clinical results. In: Fluorescence diagnosis of bladder tumor by use of 5-aminolevulinic acid – fundamentals and results. Editiert von Baumgartner, R., Kriegmair, M. und Hofstetter, A. Tuttlingen: Endo Press: 37-48 (1998)

[162] Zenzen, F., Foth, H.-J.: Photodynamische Diagnose und Therapie. http://www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Zankl/pdt2.htm (2001)

[163] Zigman, S.: Near UV light and cataract formation. J. Photochem. Photobiol. 26: 437-441 (1977)

[164] Zigman, S.: The role of sunlight in human cataractformation. Survey of Ophthalmology 27: 317-326 (1983)

[165] Zulassungsstudie: A phase I feasibility study of hexvix photodynamic therapy in patients with intermediate or high-risk bladder cancer. PC B251/03, PhotoCure ASA, Norway and Karl Storz GmbH & Co KG, Germany (beginning 2005)

6.2 Verwendete Abkürzungen und physikalische Größen

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ACGIH	American Conference of Governmental Industrial Hygienists
AF	Autofluoreszenz
5-ALS	5-Aminolävulinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CCD	Charge Coupled Device
CIE	Commission International de l'Eclairage
CIS	Carcinoma in situ
DAC	Digital Analog Converter
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAT	Ehrlich ascites tumor
FAD	Flavinadenindinukleotid
FC	Ferrochelatase
FD	Fluoreszenzdiagnostik
GCP	Good Clinical Practice (Anwendung der guten klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen mit Humanarzneimitteln)
Gl.	Gleichung
HYP	Hypericin
ICCD	Intensified Charge Coupled Device
ICNIRP (IRPA)	Int. Commission on Non-Ionizing Radiation Protection of the International Radiation Protection Association
ip	intraperitoneal
IR	Infrarot
Kap.	Kapitel
Karl Storz	Fa. Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen
NaCl	Natrium Chlorid
NIR	nahes Infrarot
NIS	nicht ionisierende Strahlung
OP	Operationssaal

PBGD	Porphobilinogen-Deaminase
PDD	Photodynamische Diagnose
PDT	Photodynamische Therapie
PpIX	Protoporphyrin IX
Ppp	Chlorin Photoprotoporphyrin
PS	Photosensibilisator
Tab.	Tabelle
TUR	transurethrale Resektion
UV	Ultraviolett
UV-A	Ultraviolett - Bereich A
UV-B	Ultraviolett - Bereich B
UV-C	Ultraviolett - Bereich C
VIS	sichtbare Strahlung bzw. sichtbares Licht

Physikalische Größen:

E	Bestrahlungsstärke	[W/m²]
$E(\lambda)$	spektrale Bestrahlungsstärke	[W/m²nm]
E_{eff}	effektive Bestrahlungsstärke	[W/m²]
$E_{eff}(\lambda)$	effektive spektrale Bestrahlungsstärke	[W/m²nm]
H	Bestrahlung, Dosis	[J/m²]
H_{eff}	effektive Bestrahlung, Dosis	[J/m²]
$H_{(GW)}$	Grenzwert der Bestrahlung, Dosis	[J/m²]
$H_{eff(GW)}$	Grenzwert der effektive Bestrahlung, Dosis	[J/m²]
NA	numerische Apertur	[ohne Einheit]
pH	pH-Wert [$pH = -lg(c[H_3O^+])$]	[ohne Einheit]
R	Remission	[%]
S	Elektronenspin-Quantenzahl	[ohne Einheit]
$S(\lambda)$	relative spektrale Wirksamkeit	[ohne Einheit]

6.3 Danksagung

Mein allerherzlichster Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter für die Übertragung der Arbeit und die Möglichkeit in einer innovativen Arbeitsgruppe mitzuwirken.
- der Geschäftsleitung der Firma Karl Storz GmbH & Co. KG, insbesondere Frau Sibyll Storz für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit.
- Herrn Dr. rer. nat. Reinhold Baumgartner für Rat und Tat bei allen organisatorischen Fragestellungen.
- Herrn Dr. rer. biol. hum. Herbert Stepp für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft, freundschaftliche Betreuung, die vielen Anregungen und die große Geduld bei der Erstellung dieser Arbeit.
- Herrn Dr.-Ing. Klaus Martin Irion von der Firma Karl Storz GmbH & Co. KG für seine exzellente Unterstützung bei der Konzeption und Durchführung dieser Arbeit und seine klaren und präzisen Formulierungsvorschläge.
- Frau Dr. rer. biol. hum. Susanne Stocker, Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Beyer und Herrn Dr. rer. biol. hum. Ronald Sroka für hilfreiche Diskussionen und tatkräftige Unterstützung.
- Herrn Richard Meier für seine tatkräftige Unterstützung und die Erstellung einer Software zur Auswertung eines Teils der Messergebnisse.
- Herrn Prof. Dr. med. Hermann Schlüsener vom Institut für Hirnforschung der Universitätsklinik Tübingen für die Präparation der Versuchstiere und die tatkräftige Unterstützung bei den Tierversuchen.
- dem Team im OP für die Kooperation bei allen gemeinsamen Untersuchungen am Patienten.
- last, but not least den ganzen Mitarbeitern des Laser-Forschungslabors. Es ist mir eine Freude mit ihnen zusammen zu arbeiten. Jeder war auf seine ganz bestimmte Art für mich eine wichtige Unterstützung.

6.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	André Ehrhardt
Geburtsdatum	09. Oktober 1966
Geburtsort	Aalen
Wohnort	78532 Tuttlingen

Schulbildung

1973-1977	Grundschule in Oberkochen
1977-1983	Realschule in Königsbronn
1983-1986	Technisches Gymnasium in Heidenheim an der Brenz

Wehrdienst

1986-1988	Reserveoffizierslaufbahn in München

Studium

1988-1994	Studium des Maschinenwesens an der Universität Stuttgart mit den Hauptfächern: Feinwerktechnik und Biomedizinische Technik
10/1994	Diplom Thema der Diplomarbeit*: „Konzeption und Konstruktion eines Stereo-Video-Endoskopes“*

Berufstätigkeit

seit 01/1995	Entwicklungsingenieur Bereich Elektronik Entwicklung, Abt. Grundlagenentwicklung Firma Karl Storz GmbH & Co. KG in Tuttlingen
seit 08/2000	freier Mitarbeiter Laser-Forschungslabor / Urologische Klinik und Poliklinik Klinikum Großhadern Ludwig Maximilians Universität München Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter Thema der Dissertation: „Inkohärente Lichtsysteme für die Fluoreszenzdiagnostik und die Photodynamische Therapie“