

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Em. Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter

**5-ALA induzierte Fluoreszenz-Zytologie und –Spektrometrie zur
Diagnostik des Harnblasenkarzinoms**

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

vorgelegt von:

Agneta Bone
aus
Arad/Rumänien

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Univ. Prof. Dr. A. Schilling

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Stephan Tauber und
Dr. hum. biol. Herbert Stepp

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2007

1. Einleitung	5
1.1. Inzidenz und Ätiologie des Harnblasenkarzinoms	5
1.2. Klinisches Beschwerdebild	6
1.3. Histologie	7
1.4. Standard - Diagnostik	9
1.5. Tumor-assoziiertes Trypsin-Inhibitor (TATI)	11
1.6. Bisherige Weiterentwicklungen der Urinzytologie	12
1.7. Fluoreszenzdiagnostik	13
1.7.1. Autofluoreszenz.....	14
1.7.2. Fluoreszenzdiagnostik mit 5-Aminolävulinsäure	15
1.7.3. ALA-induzierte Fluoreszenz-Endoskopie	16
1.7.4. 5-ALA-induzierte Fluoreszenz-Zytologie	18
1.7.5. Ausbleichphänomen.....	19
1.8. Ziel der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Patientenkollektiv	21
2.2. Untersuchungsmethodik im Standardverfahren.....	21
2.3. Präparation zur Ex-Vivo-Fluoreszenzanalyse	23
2.3.1. Probenentnahme.....	23
2.3.2. Probenpräparation.....	23
2.4. Methodik der Fluoreszenz-Zytologie	24
2.5. Methodik und Auswertung der spektralen Messung	24
2.5.1. Methodik.....	24
2.5.2. Auswertung	25
2.6. Statistische Methoden.....	27
2.6.1. Festlegung der Auswertungs- und Datenbankkriterien.....	27
2.6.2. Entwicklung eines statistischen Auswertungsprogramms	28
2.6.3. Anwendung weiterer statistischer Methoden.....	34

3. Ergebnisse.....	39
3.1. Korrelation der Diagnostikmethoden.....	40
3.1.1. Häufigkeit der Befunde.....	40
3.1.2. Berechnung von Sensitivitäten und Spezifitäten	42
3.1.3. Detailergebnisse der Weißlicht-Endoskopie und der AFE.....	44
3.1.4. Detailergebnisse der Standardzytologie (MUC – AA).....	44
3.1.5. Detailergebnisse der Fluoreszenz-Zytologie	46
3.1.6. Sensitivität und Spezifität der Befunde mit vollständigem Datensatz	47
3.2. Ergebnisse des Spektrometrierfahrens	49
3.2.1. Sensitivität und Spezifität der Spektrometrie.....	49
3.2.2. Die Standarddiagnoseverfahren - Proben mit vollständigem Datensatz und auswertbaren Spektrometriedaten	57
4. Diskussion.....	59
4.1. Patientenauswahl und Ablauf	59
4.2. Vergleich der beiden Standardverfahren WLE und AFE.....	60
4.3. Ergebnisse der Fluoreszenz-Zytologie (AFZ)	64
4.3.1. Störgrößen	64
4.3.2. Ergebnisse der Fluoreszenz-Zytologie im Vergleich	65
4.4. Quantitative Spektrometrie	65
4.4.1. Allgemeines.....	65
4.4.2. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit	66
4.4.3. Ergebnisse und Vergleich mit anderen Diagnosemethoden.....	68
5. Zusammenfassung	69
6. Ausblick und Verbesserungsvorschläge.....	72
7. Verzeichnis der Abkürzungen.....	73
8. Literaturverzeichnis	74
9. Danksagung	80
10. Lebenslauf.....	81

1. Einleitung

1.1. Inzidenz und Ätiologie des Harnblasenkarzinoms

Das Harnblasenkarzinom ist mit einer Inzidenz von 17 - 19 Neuerkrankungen pro Jahr bezogen auf hunderttausend Personen der zweithäufigste Tumor des Urogenitaltrakts, wobei die Tendenz steigend ist. In Europa rechnet man mit 74000 Neuerkrankungen pro Jahr und für die USA gibt die American Cancer Society 52900 Neuerkrankungen und 11700 Todesfälle infolge eines Harnblasenkarzinoms pro Jahr an (Parker SL et al., 1996).

Das Urothelkarzinom ist hauptsächlich ein Tumor des höheren Alters mit einem Altersgipfel von 65-70 Lebensjahren. In nur weniger als 1% der Fälle erkranken jüngere Patienten unter 45 Jahren (Zaak D, Weiss M, 2003).

Das Harnblasenkarzinom ist der fünfthäufigste Tumor überhaupt und steht an der zwölften Stelle der Todesursachen, bezogen auf alle auftretenden Karzinome (Cohen SM, 1992). Dabei ist das männliche Geschlecht 2- bis 3-mal häufiger betroffen als das weibliche, wobei jedoch eine überproportionale Zunahme der Häufigkeit bei Frauen in den letzten 20 Jahren zu beobachten ist.

Ätiologie

Die ätiologisch bekannten Risikofaktoren sind in Tab. 1-1 und Tab. 1-2. aufgelistet. Der Kontakt mit verschiedenen karzinogenen Substanzen (Tab.1-1) kann nach einer Latenzzeit von bis zu 30 Jahren zu einem urothelialen Karzinom führen (Norpoth K, Woitowitz HJ, 1994).

Erbliche Faktoren scheinen nur eine untergeordnete Bedeutung zu haben, da eine familiäre Häufung nur selten beobachtet werden konnte (Zaak D, Weiss M, 2003).

Eine jüngste Studie aus dem Jahr 2006 untersucht die kanzerogene Wirkung des häufig angewandten Anästhetikums Prilocain (Gaber K et al, to be published).

Tab. 1 - 1: Kanzerogene beim Harnblasenkarzinom

▪ Farbstoffe	Naphthylamin
	Auramin
	Fuchsin
	Benzidin
	Anilin
	4-Amino-biphenyl
	Dichlorbenzidin
▪ Nikotin	
▪ Nitrosamine	
▪ Mykotoxine (Balkannephritis)	
▪ Medikamente	Chlonaphzamin
	Phenacetin
	Cyclophosphamid
	Prilocain

Tab. 1 - 2: Risikofaktoren für die Entwicklung eines Urothelkarzinoms

▪ allgemeine Faktoren	Alter, Geschlecht
▪ Rasse	Weißer > Schwarze
▪ geographische Gesichtspunkte	Südafrika > Europa > Asien
▪ Chemikalien	aromatische Amine
	Nitrosamine
▪ chronische Infektionen mit und ohne Harnsteinbildung	
▪ Bilharziose	
▪ Harnsteinleiden	
▪ chronische interstitielle Nephritis	

1.2. Klinisches Beschwerdebild

Häufigstes Initialsyndrom des Harnblasentumors ist die **schmerzlose**, meist intermittierende Makrohämaturie (80%). Oft führt aber auch die hausärztliche Urin-Routineuntersuchung (Mikroskopie, semiquantitativer Teststreifen) mit dem Nachweis einer Mikrohämaturie zum ersten Krankheitsverdacht.

Des Weiteren können dysurische und pollakisurische Beschwerden, eine zunehmende Harndrangssymptomatik, sowie Flankenschmerzen, hervorgerufen durch tumorbedingte Harnleiterobstruktionen im Bereich der Ostien mit

konsekutivem Harnstau, richtungsweisend für einen Harnblasentumor sein. Subjektive Beschwerden können lange Zeit fehlen. Fortgeschrittene Blasentumore machen sich durch allgemeine Tumorsymptome wie Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit und Anämie bemerkbar.

1.3. Histologie

Über 90% der Harnblasenkarzinome sind Urothelkarzinome. Nur selten finden sich Plattenepithelkarzinome (7%), Adenokarzinome (1 - 2%), mesenchymale Tumore oder sekundäre Blasentumore durch Infiltration und Metastasierung (Zaak D, Weiss M, 2003). Bei der Erstdiagnose handelt es sich in über 80% um superfizielle Karzinome, d.h. sie sind auf die Schleimhaut beschränkt und haben die Lamina propria noch nicht durchbrochen. Zum Urothelkarzinom zählt auch das Carcinoma in situ (CIS), welches im Niveau der Blasenschleimhaut flächenhaft wächst, jedoch aufgrund der hohen Metastasierungstendenz als sehr aggressiv einzustufen ist.

Die Histopathologie und die auf sie fußende Stadieneinteilung ist von entscheidender Bedeutung für die Prognose sowie das therapeutische Vorgehen beim Harnblasentumor. Deshalb sei hier tabellarisch auf die Stadieneinteilung nach dem UICC/TNM-System und der WHO-Klassifikation hingewiesen (Tab. 1-3 bis 1-5).

Tab. 1 - 3 Stadieneinteilung nach dem UICC TNM-System (2002)

	<i>[T = lokale Ausdehnung des Primärtumors]</i>
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
Ta	nicht-invasives papilläres Karzinom
T1	Infiltration subepithelial
T2	Invasion der Blasenmuskulatur
T2a	.. Infiltration der oberflächlichen Muskulatur
T2b	.. Infiltration der tiefen Muskulatur
T3	Infiltration des perivesikalen Gewebes
T3a	.. mikroskopisch
T3b	.. makroskopisch
T4	Infiltration von Prostata oder Uterus, Vagina, Becken oder Bauchwand
T4a	.. Infiltration von Prostata, Uterus oder Vagina
T4b	.. Infiltration von Becken- und Bauchwand

Die neue WHO Klassifikation urothelialer Karzinome aus dem Jahre 1999 unterscheidet als ein neues Kriterium minimal invasive papilläre urotheliale Neoplasien mit Infiltration bis zur Lamina Propria (T1a) bei niedrigem Malignitätspotential (PUNLMP) von papillären urothelialen Karzinomen, die die Lamina Muskularis Mucosae infiltrieren (T1b). Die subepitheliale Infiltration über diese Schicht hinaus wird in T1c eingeteilt (Helpap B, 2002).

Tab. 1 - 4: Stadieneinteilung des Lymphknotenbefalls

	<i>[N = Lymphknoten]</i>
Nx	Lymphknotenstatus unbekannt
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Befall eines Lymphknotens ≤ 2 cm im größten Durchmesser
N2	Befall eines Lymphknotens von 2 - 5 cm oder mehreren Lymphknoten
N3	Lymphknoten > 5 cm im größten Durchmesser

Tab. 1 - 5: Fernmetastasenstatus nach dem UICC TNM-System

Mx	Unbekannt
M0	Metastasenfrei
M1	Fernmetastasen

Tab. 1 - 7: Klassifikation nach Gradingkriterien nach TNM-System und Tumordifferenzierungsgrad (UICC 1992)

G0	kein Tumor
G1	gut differenziert
G2	mässig / mittelgradig differenziert
G3	entdifferenziert bzw. schlecht differenziert
CIS	Carcinoma in situ

In Anlehnung an die Leitlinien zum Harnblasenkarzinom der „*European Association of Urology*“ werden nach Prognosekriterien neuerdings drei Gruppen wie folgt definiert (Tab. 1-6):

Tab. 1 - 6: Klassifikation nach Prognosekriterien

„low risk“	solitäre und primäre Tumoren im Stadium pTaG1 – 2 und pT1G1 – G2.
„intermediate risk“	primäre multifokale Tumoren und Rezidive pTaG1 – 2 und pT1G1 – G2.
„high risk“	pT1G3, pTaG3 und CiS.

In einer von *Witjes* durchgeführten Studie, in der die Diagnosergebnisse verschiedener renommierter pathologischer Institute miteinander verglichen wurden, ergab sich bei den „high-risk“-Tumoren eine hohe diagnostische Übereinstimmung, hauptsächlich bedingt durch pTa-Tumore. Die Diagnostik der pT1-Tumore und der Invasivität gestaltete sich hingegen schwieriger (*Witjes JA et al, 2006*).

1.4. Standard - Diagnostik

Die rechtzeitige und korrekte Tumordiagnostik ist für die erfolgreiche Behandlung der betroffenen Patienten mit einem Harnblasentumor von größter Bedeutung (*Carmack AJ et al., 2006*). Bei Auftreten von klinischen Symptomen, vor allem schmerzloser Hämaturie, ist die erste diagnostische Maßnahme die **Sonographie**, mit der die Nieren, die gefüllte Harnblase, die Leber und der Retroperitonealraum beurteilt werden können. Die **Ausscheidungsurographie** gibt Auskunft über etwaige Tumore im Harnleiter oder im Nierenbecken.

Bei fortgeschrittenen Tumoren der Harnblase sind weitere Untersuchungen zur Bestimmung der Tumorausbreitung und Metastasierung indiziert. Hierbei kommen

CT (Computertomographie), MRT (Magnetresonanz-Tomographie), Röntgen Abdomen, Röntgen Thorax und die Skelettszintigraphie zur Anwendung. Beurteilt werden die regionalen Lymphknoten (N-Kategorie) und eine hämatogene bzw. lymphogene Fernmetastasierung der Bereiche Lunge, Leber, Knochen und ZNS. Die Indikation zur Durchführung einer Knochenszintigraphie wird unterschiedlich diskutiert und von einzelnen Autoren nur im Falle von Knochenschmerzen oder einer Erhöhung der alkalischen Phosphatase gesehen (Rübben H, 1998).

Im Vordergrund der Blasentumordiagnostik steht die **Weisslicht-Zystoskopie, bzw. Weisslicht-Endoskopie (WLE)**. Hierdurch lassen sich insbesondere die exophytischen und soliden Tumoren gut erkennen. Die Beurteilung der Patho-Histologie und des Differenzierungsgrades erfolgen aus Biopsien und dem Resektionsmaterial. Flache Schleimhautveränderungen, wie das Carcinoma in situ (CIS), werden dagegen häufiger übersehen (Soloway MS et al., 1978). Das CIS gehört zu den „high-risk“-Tumoren mit einer 5-Jahres-Progressionsrate von 50% bei nicht rechtzeitig erkannten Tumoren (Witjes JA, 2004).

Seit den 60iger Jahren haben Urologen deswegen versucht, das Risiko, einen Tumor zu übersehen, zu minimieren und Methoden zu entwickeln, welche eine in-vivo-Markierung der kaum bzw. nicht sichtbaren Neoplasien mittels eines zusätzlichen Farbkontrastes ermöglichen. Diagnostische Methoden, die auf der Detektion der Fluoreszenz systemisch verabreichter Substanzen wie Tetracycline, Porphyrin-Mischungen oder Fluorescein beruhten, wurden an wenigen Patienten getestet und als ungeeignet verworfen (Devonec M, et al., 1985; Jocham D, et al., 1989; Whitmore WF). Der Versuch, Methylenblau intravesikal zu instillieren, schlug ebenfalls fehl (Fukui et al., 1983, Vicente J, et al., 1987).

Zur Erfassung dieser problematischen Tumore werden heute die **Urinzytologie** und die in der Arbeitsgruppe um *Univ. Prof. Dr. med. A. Hofstetter* (1990) durch 5-Aminolävulinsäure induzierte **Fluoreszenz-Endoskopie (AFE)** ergänzend eingesetzt (Kriegmair et al., 1994). Für die **Standardzytologie (SZ)** wird zur Erkennung von hoch-, mittel- und entdifferenzierten Urothelkarzinomen eine Sensitivität von 50, 65-80% bzw. 85- 90% angegeben (Rübben et al., 1998).

Durch die häufigen zellulären Veränderungen bei Harnwegsinfektionen wird die zytologische Auswertung zusätzlich erschwert. Daraus erklärt sich die niedrige Sensitivität der Standardzytologie (Steinbach P et al., 1994).

Die derzeit angebotenen Tumormarker zum Karzinomnachweis aus dem Urin, z.B. der Bard-® oder der NMP-22-Test®, haben mit einer Sensitivität von etwa 56% und einer Spezifität von etwa 67 bei der Diagnostik unterschiedlich differenzierter Blasen Tumoren bislang enttäuscht (Tauber, S. et al., 2000). Daher können diese Labortestverfahren nicht als sinnvolle Ergänzungen zur Zystoskopie und Zytologie angesehen werden.

Des Weiteren werden derzeit verschiedene Verfahren, z.B. immunologische Tumormarker wie das Onkoprotein Her2 oder eine Untereinheit des Telomerase-Enzyms (hTERT)® untersucht und entwickelt, um die Probleme der Invasivität der Zystoskopie und die Subjektivität der Urinzytologie zu umgehen (Khalbuss W et al, 2006; Wülfing C et al, 2005).

1.5. Tumor-assoziiertes Trypsin-Inhibitor (TATI)

Der tumor-assoziierte Trypsin-Inhibitor (TATI) wurde ursprünglich aus dem Urin einer Patientin mit Ovarialkarzinom isoliert (Stenman UH et al., 1982). TATI ist ein Peptid, welches in hohen Konzentrationen von muzinösem Ovarialkarzinomen, aber auch von anderen Tumoren erzeugt wird. TATI ist identisch mit dem bereits früher beschriebenen Pankreas-Sekretions-Trypsin-Inhibitor (PSTI) (Huhtala ML et al., 1982), welcher auch unter dem Namen „Kazal Inhibitor“® bekannt ist (Kazal L et al, 1948). Klinisch gesehen ist TATI insbesondere geeignet für die Nachsorge von Patientinnen mit muzinösem Ovarialkarzinom, aber auch bei verschiedenen anderen Tumorarten. Beim Ovarial-, Nieren- und Harnblasenkarzinom ist TATI ein Indiz für eine schlechte Prognose. Dies wird erklärt durch das gemeinsame Auftreten von TATI und tumorassoziiertem Trypsin, von welchen man annimmt, dass sie an den tumorassoziierten Protease-Kaskaden beteiligt sind, welche die Tumordinvasion verursachen. Trypsin aktiviert gewisse Proteasen, die mit der Tumordinvasion in Verbindung gebracht werden, z.B. Pro-Urokinase (Koivunen E et al., 1991), sowie die Metallo-Proteinasen MMP-2 und -9 (Sorsa T et al., 1997).

Beim Harnblasenkarzinom hat sich TATI als aussagefähiger erwiesen als die sonst üblicherweise verwendeten Serummarker, wie z.B. CEA, AFP, β HCG, PSA, SCC-Antigen und CA 19-9 (Pectasides D et al., 1996). Abhängig vom Stadium treten erhöhte Konzentrationen in 22–70% der Fälle auf, so dass TATI für die Tumornachsorge verwendet werden kann. Vorläufige Studien deuten darauf hin, dass TATI ein markanter Prognosefaktor für einen ungünstigen Verlauf beim Harnblasenkarzinom darstellt.

1.6. Bisherige Weiterentwicklungen der Urinzytologie

Die Urinzytologie ist keine objektive Untersuchungsmethode (Brown FM, 2000; Lokeshwar VB 2001). Sie basiert weitgehend auf der Erfahrung des Untersuchers, so dass die erheblichen Unterschiede in der Beurteilung der Präparate durch verschiedene Untersucher erklärt sind. Die Diskrepanz besteht v.a. bei den gut differenzierten Tumoren. Schlecht differenzierte Tumore und das Carcinoma in situ werden normalerweise auch bei den Bundesweiten Ringversuchen der Sektion „Urinzytologie“ (Dr. von Dorp, Essen) von den Teilnehmern mit 95%iger Zuverlässigkeit diagnostiziert (Rathert P, 2003).

Weiterentwicklungen der Urinzytologie mit dem Ziel der Automatisierung, Verringerung der Subjektivität, und verbesserter Reproduzierbarkeit haben zur Entwicklung vollautomatischer Bildanalyzesysteme (Durchflusszytometrie) und zur Entwicklung der interaktiven Einzelzellphotometrie (DNA Zytometrie) geführt (Rathert P, Roth S, 1995). Die zusätzliche Nutzung von einem oder mehreren monoklonalen Antikörpern im Rahmen der Immunzytologie als Mehrparameterdurchflusszytometrie oder im Rahmen numerischer, lichtmikroskopischer Auswertung von in-situ Urinproben, bei denen mittels Fluoreszenz eine Aneuploidie der Chromosomen 3, 7 und 17 sowie der Verlust des Locus 9p21 nachgewiesen werden kann (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), beispielsweise als fertiges Testkit kommerziell erhältlich unter dem Namen *UroVysionTM*), hat sich bis jetzt in der Praxis nicht bewährt. Das *UroVysion-Testkit* sollte die Diagnose-Sicherheit verbessern, ist jedoch auch laut Hersteller nicht als Ersatz für die herkömmlichen Diagnoseverfahren, sondern als Ergänzung gedacht (UroVysion Product Description, 2006). Zu bedenken ist auch, dass diese

Diagnosemethoden sehr personal- und kostenintensiv sind. Davon abgesehen hat sich die in sie gesetzte Hoffnung, die Prognose von Patienten mit Urothelkarzinomen verbessern zu können, nicht erfüllt (Oosterlinck W , 2001).

1.7. Fluoreszenzdiagnostik

Die Fluoreszenz-Endoskopie (AFE) bzw. Fluoreszenz-Zystoskopie (AFZ) mit 5-ALA, entwickelt am Laser-Forschungs-Labor und der Klinik für Urologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, unter *Prof. Hofstetter*, ist ein noch junges Verfahren, mit welchem vor allem Präneoplasien und CIS-Tumore, die bei der Weißlichtzystoskopie nicht nachweisbar sind, dargestellt werden können. Es hat sich gezeigt, dass die 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) induzierte Fluoreszenz bei der Zystoskopie der Standard- Zystoskopie mit Weißlicht deutlich überlegen ist (Babjuk M et al, 2005).

Hexylaminolevulenat (HAL), ein Ester der 5-ALA, wurde für die Fluoreszenzdiagnose von Blasenkrebs im September 2004 von den schwedischen Behörden zugelassen, im März 2005 erfolgte die Zulassung von 25 weiteren europäischen Behörden. Die *EU Guidelines: „On the Diagnosis and Treatment of Urothelial Carcinoma in situ“*, herausgegeben von der *European Association of Urology*, sprechen folgende Empfehlung aus: „Fluoreszenz-Zystoskopie sollte in Erwägung gezogen werden, weil sie eine höhere Sensitivität aufweist als die Weißlicht-Zystoskopie“ (Van der Meijden R et al., 2005).

Bei der Fluoreszenzdiagnostik der Harnblase wird das Gewebe endoskopisch beleuchtet und bildgebend die Fluoreszenz des Gewebes untersucht. Man unterscheidet - je nachdem, ob primär körpereigene oder von außen applizierte Fluorochrome optisch angeregt werden - zwischen **Autofluoreszenz und induzierter Fluoreszenz**. Bei der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms hat sich die 5-ALA-induzierte Protoporphyrin-Fluoreszenz (PpIX-Fluoreszenz) bewährt.

1.7.1. Autofluoreszenz

Das Prinzip der Fluoreszenzdiagnostik beruht darauf, dass Licht einer bestimmten Wellenlänge mit Gewebe und dessen Fluorochromen interagiert. Wenn Licht in Gewebe eindringt, tritt neben Absorption und Streuung auch Fluoreszenz auf. Für die körpereigene Fluoreszenz in menschlichem Gewebe sind eine Vielzahl von Fluorochrome verantwortlich, die bei unterschiedlichen Wellenlängen zu unterschiedlich starker Fluoreszenz angeregt werden. Wesentliche Vertreter, die in hohen und somit leicht nachweisbaren Konzentrationen vorkommen, sind in Tab.1-8 aufgelistet.

Tab. 1 – 8 **Körpereigene Fluorochrome**

Fluorochrom	Anregung	Fluoreszenz	Ursprung
Tryptophan	275	350	Proteine
Kollagen	335	390	Bindegewebe
Elastin	360	410	Bindegewebe
NADH	340	470	Atmungskette
Flavine	450	520	Atmungskette
Porphyrin	405	635	bakt. Infektion, Hämbiosynthese

Die optimalen Anregungswellenlängen befinden sich zumeist im ultravioletten Spektralbereich. Da das menschliche Gewebe nicht nur aus eindeutig definierten chemischen Verbindungen besteht, sind sowohl die Anregungs- als auch die Emissionsbanden sehr breit. Beispielsweise können so die im Bindegewebe auftretenden Fluorochrome Kollagen und Elastin über den gesamten sichtbaren Bereich detektiert werden.

Das Prinzip der **Auto-Fluoreszenzdiagnostik** beruht darauf, dass es Unterschiede in den Intensitäten der Fluoreszenzen zwischen Tumor- und Normalgewebe gibt. Diese Unterschiede können vielfältigste Ursachen haben, z.B. stoffwechselbedingt sein. So ist bekannt, dass Veränderungen in der Atmungskette das Gleichgewicht zwischen reduziertem bzw. fluoreszierendem und oxidiertem bzw. nicht-fluoreszierendem NADH verschieben (Koenig F et al., 1996) können. Des Weiteren wird die Fluoreszenz aber auch durch morphologische und geometrische Faktoren beeinflusst.

Einen höheren Stellenwert als in der Urologie scheint die Autofluoreszenz bei der Diagnostik von Bronchialkarzinomen zu haben (Frimberger D et al., 2001, Häußinger K et al., 2005). Dort ergeben sich die Intensitätsunterschiede nicht aus Konzentrationsunterschieden, sondern aus morphologischen Gründen: An Stellen mit verdicktem Epithel, was als Verdacht auf einen Tumor gilt, ist die Abschwächung größer. Die von der Bindegewebsschicht schließlich emittierte Fluoreszenzstrahlung wird beim Durchgang durch die Epithelschicht entsprechend deren Dicke absorbiert und somit gedämpft, bevor es das Gewebe verlässt. So kommt es zu einer Verringerung der beobachtbaren Fluoreszenzintensität von Bindegewebe in Abhängigkeit der Schichtdicke des darüber liegenden Epithels (Lam S et al., 1998).

1.7.2. Fluoreszenzdiagnostik mit 5-Aminolävulinsäure

Neben der Autofluoreszenz, die auf der Anregung der o.g. endogenen Fluorophore beruht, spielen mittlerweile exogen zugeführte Photosensibilisatoren für die Diagnostik eine wesentliche Rolle.

Von den zahlreichen Vertretern ist für diagnostische Zwecke beim Harnblasenkarzinom die 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) eine mittlerweile sehr erfolgreich eingesetzte Substanz.

5-ALA ist eine Vorstufe der Hämbiosynthese, aus der im zelleigenen Häm-Zellstoffwechsel Protoporphyrin IX (PpIX) entsteht, das bei einer Fluoreszenzanregung mit energiereichem blauvioletterem Licht mit einer Wellenlänge um 405 nm eine charakteristische Rotfluoreszenz - bestehend aus 2 Banden mit Maxima bei 635 nm bzw. 705 nm - emittiert.

Zur Stimulation der Synthese fluoreszenzoptisch nachweisbarer Konzentrationen an PpIX reicht es aus, Zellen mit 5-ALA zu inkubieren. Im Rahmen des Häm-Biosynthesezyklus wird aus acht 5-ALA-Molekülen ein Protoporphyrin IX-Molekül synthetisiert. Fluoreszierendes Protoporphyrin IX wird im Rahmen der Hämbiosynthese intrazellulär gebildet und akkumuliert selektiv in Tumorzellen, wenn durch geeignete Inkubation mit 5-ALA der Rückkopplungsmechanismus außer Kraft gesetzt wird (Peng Q et al, 1997).

Tumorzellen reichern Protoporphyrin IX wesentlich stärker an als Normalzellen. Die zugrunde liegenden genauen Mechanismen sind bisher nur in Teilaspekten geklärt. Von der Verabreichung von 5-ALA bis zur Bildung des PpIX und seiner weiteren Verstoffwechslung sind viele Teilschritte nötig, die jeweils potentiell eine Tumorselektivität bewirken bzw. beeinflussen können.

Diskutiert werden u.a. eine gesteigerte Gewebepenetration und eine verstärkte Aufnahme von 5-ALA in die Karzinomzelle, eine gesteigerte Aktivität von Plasmaenzymen, insbesondere der Porphobilinogen-Deaminase (Greenbaum L et al., 2002, Greenbaum L et al., 2003), eine erniedrigte Ferrochelatase-Aktivität, eine veränderte intrazelluläre Umverteilung und Ausschleusung von PpIX, sowie die erhöhte Proliferationsrate von Karzinomzellen (Steinbach P et al., 1994).

1.7.3. ALA-induzierte Fluoreszenz-Endoskopie

Der Standard in der Urologie, der im wesentlichen an der Klinik für Urologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter *Univ. Prof. A. Hofstetter* entwickelt wurde und inzwischen auch in andere Fachgebiete Einzug gehalten hat, wurde mit dem Einsatz der 5-ALA gesetzt.

Die Fluoreszenz kann mit dem bloßen Auge unter Verwendung eines gelben Langpassfilters, welcher in das Okular der Beobachtungsoptik - beispielsweise in das Okular eines Zystoskopes - eingebaut ist, einwandfrei erkannt werden.

Die Fluoreszenz-Endoskopie (AFE) mit 5-ALA eignet sich auch zur gezielten Biopsie und Laserung bzw. Resektion flacher urothelialer Läsionen, die mit bloßem Auge schwer oder nicht erkennbar sind.

Abb. 1 - 1: Weißlicht- und Fluoreszenzbild

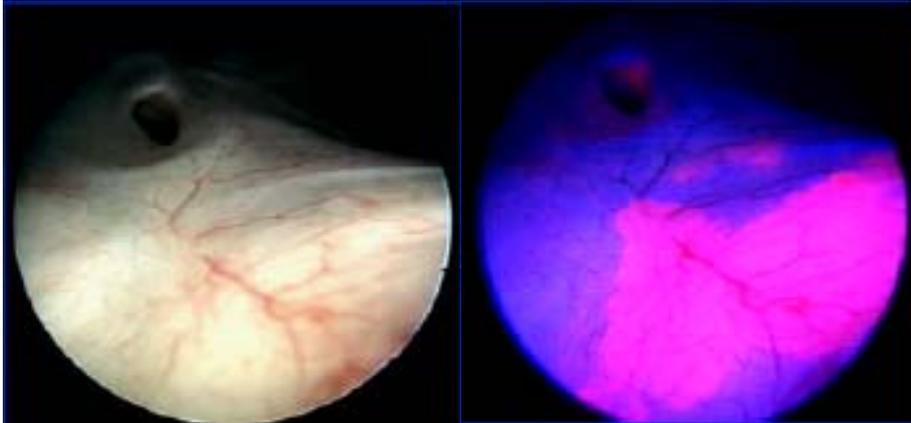


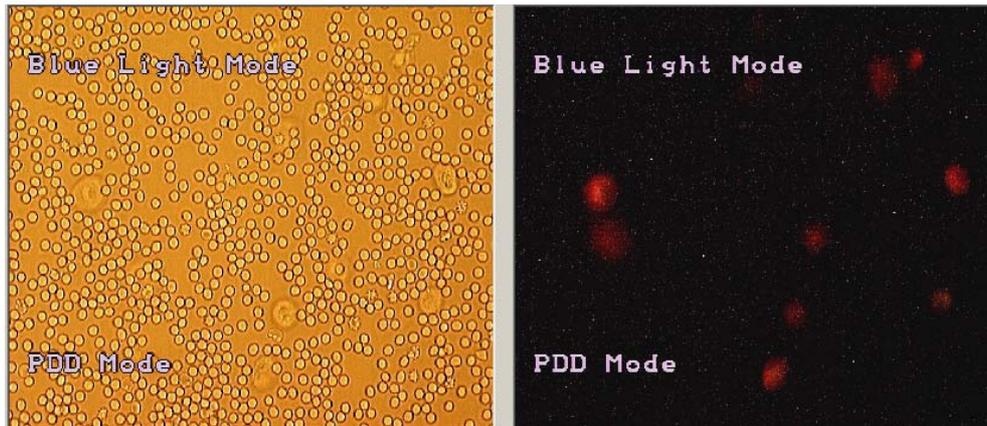
Abb. 1 - 1 zeigt, wie dem Operateur durch Fluoreszenzbildgebung das Vorhandensein von Tumorarealen angezeigt werden kann (Rotfluoreszenz). Vor allem schwer zu lokalisierende Frühstadien, wie das besonders aggressive CIS, sind somit darstellbar (Abb. 1-1). Durch die 5-ALA Fluoreszenz bei der Resektion bzw. Laserung ist zudem eine vollständigere Entfernung des Tumors möglich, was sich auch in der signifikant reduzierten Tumor-Rezidivrate niederschlägt. Denn nicht nur die flachen Tumoreläsionen, sondern auch die Tumorrandgrenzen können in der herkömmlichen Endoskopie leicht übersehen werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich 2-6 Wochen nach einer transurethralen Resektion von Harnblasentumoren in 38% bis 58% der Fälle Tumorresiduen im Resektionsareal nachweisen lassen (Köhrmann KU et al., 1994, Vögeli T et al., 1998, Klän R et al., 1991).

Verschiedene Phase II-Studien haben bewiesen, dass die Fluoreszenzdiagnostik der Weißlicht-Zystoskopie im Rahmen einer TUR signifikant überlegen ist (Jilchinski P et al., 1997, Kriegmair M et al., 1998, König F et al., 1999, Filbeck T et al., 1999, Zaak D et al., 2001, van der Meijden et al., 2005). Durch die Fluoreszenzdiagnostik können somit Residualtumor- und Rezidivrate oberflächlicher Harnblasenkarzinome statistisch signifikant gesenkt werden (Zaak et al., 2001). In einer Serie von mehr als 1400 Fluoreszenz-Endoskopien konnte der diagnostische Benefit hinsichtlich der flachen urotheliellen Neoplasien klar belegt werden (Zaak D et al., 2002).

1.7.4. 5-ALA-induzierte Fluoreszenz-Zytologie

Die bislang mit keiner anderen Methode erreichte Sensitivität bei der Diagnostik von Urothelkarzinomen war die Grundlage für die Entwicklung einer fluoreszenzgestützten Zytologie. Aus früheren Studien ist bekannt, dass sich in der Spülflüssigkeit von Patienten, denen 5-ALA instilliert wurde, rot-fluoreszierende Tumorzellen finden (Tauber S et al., 2001; Pytel A, Schmeller N, 2002).

Abb. 1 - 2: Normales Zytologie-Zellbild vs. Fluoreszenz-Zytologie-Zellbild



Für die Fluoreszenz-Zytologie werden nach der Instillation von 5-ALA in die Harnblase, vor der endoskopischen Diagnostik, Proben von Spülflüssigkeiten entnommen, zentrifugiert, resuspendiert und das Sediment fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Analog zur AFE wird ein blauviolett Anregungslicht mit 390 - 430nm Wellenlänge verwendet. Hierbei liegt der zytologisch betrachteten Einzeltumorzelle der gleiche Fluoreszenzmechanismus zu Grunde wie bei der Fluoreszenz-Endoskopie.

Durch die unterschiedliche Farbwahrnehmung des Untersuchers ist dieses Verfahren jedoch subjektiv bzw. von der Erfahrung des Untersuchers abhängig und schlecht quantifizierbar.

Die Erstbeschreibung dieses Verfahrens erfolgte auf einer urologischen Fachtagung im Februar 2001 (Tauber S et al., 2001). *Pytel et al.* bestätigten die ersten Ergebnisse, wobei diese Arbeitsgruppe Hypericin als Photosensitizer verwendete (Pytel A et al., 2002). Jüngste Studien befassen sich mit therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten von Hypericin zur photodynamischen

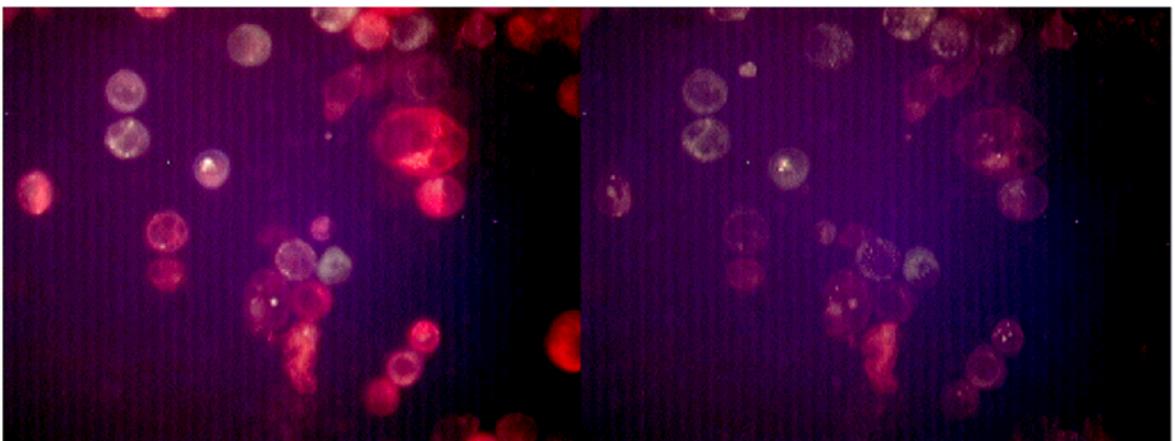
Tumorbehandlung (Kamuhabwa AR et al, 2006), nachdem bereits seit einigen Jahren in der Urologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität unter *Prof. Dr. A. Hofstetter* zur Behandlung oberflächlicher Tumore (sog. BCG resistente Rezidive) eingesetzt wird (Weidelich R, 2003).

In einer Pilotstudie erwies sich die Fluoreszenz-Zytologie mit 162 Patienten als ein erfolgversprechendes, einfaches und sicheres Verfahren zur Diagnostik von Blasenkarzinomen. Es wurde eine Sensitivität von 86% bei einer Spezifität von 75% angegeben.

1.7.5. Ausbleichphänomen

Durch die Befundbeurteilung aufgrund von Farben bzw. deren Intensitäten ist die Methode der Fluoreszenz-Zytologie subjektiv und wird durch das rasche Ausbleichen des intrazellulären PpIX im Mikroskop-Fokus erschwert. Die Analyse ist nur innerhalb von wenigen Sekunden möglich, sodass eine quantitative Auswertung oder gar ein quantitativer Vergleich mehrerer Proben nur erschwert möglich ist.

Abb. 1 - 3: Ausbleichphänomen



Als Ausbleichen wird die Abnahme der Absorption bzw. der Fluoreszenz eines Stoffes unter Lichteinwirkung bezeichnet. Die chemische Umsetzung von PpIX unter Lichteinfluss führt eine Abnahme der sichtbaren Fluoreszenz. Dies geschieht sowohl unter weißem als auch unter violetterem Licht, wobei der Ausbleicheffekt unter dem energiereichen, violetten Licht wesentlich stärker ist als im Weißlichtmodus.

Daher ist es sowohl bei der Fluoreszenz-Endoskopie als auch bei der Fluoreszenz-Zytologie von großer Bedeutung, die Untersuchungen zügig durchzuführen.

Andererseits besteht die Möglichkeit, eben diesen Ausbleicheffekt bei einer spektralen Messung zu quantifizieren, wie es auch in der vorliegenden Arbeit geschehen ist.

1.8. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wertigkeit der 5-ALA-induzierten Fluoreszenz-Zytologie (AFZ) zur Erkennung von bösartigen Veränderungen der Harnblase überprüft und durch Anwendung von spektralen Messtechniken quantifiziert und automatisiert werden. Schließlich sollte die Wertigkeit mit der Standard-Zytologie verglichen werden.

Als Bewertungskriterien wurden hierfür einerseits die Standard-Diagnostikmethoden verwendet, und andererseits die Sensitivität und Spezifität der AFZ und der AFE mit denen einer spektralen Quantifizierung der AFZ verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Untersucht wurden Patienten mit Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom (z.B. nach Hämaturie bei einem suspekten Sonographie-Befund etc.) oder bei Zustand nach transurethraler Resektion eines Urothelkarzinoms der Harnblase (TUR-B) im Rahmen der vierteljährlichen Tumornachsorge. Die Untersuchung umfasste die Zystoskopie, die AFE und die Standard-Zytologie. Bei positivem Befund wurde ggf. eine TUR-B und damit eine histologische Befundsicherung durchgeführt.

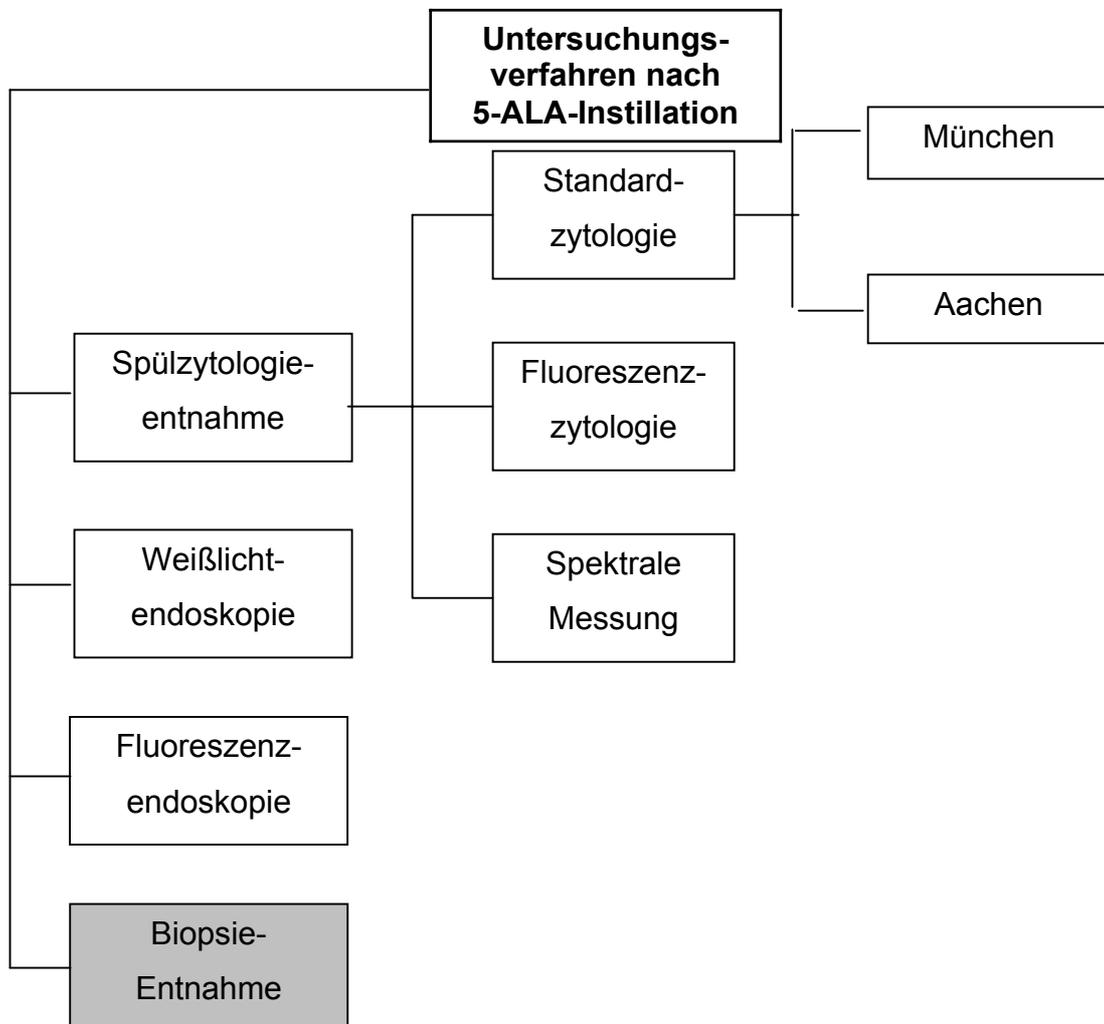
Das Patientenkollektiv setzte sich aus stationär, in der Zeit vom 3. September 2003 bis zum 12. Dezember 2003, behandelten Patienten der Urologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, zusammen.

2.2. Untersuchungsmethodik im Standardverfahren

Für die Fluoreszenzdiagnostik wurde den Patienten etwa 1-2 Stunden vor der Zystoskopie mittels sterilem Einmalkatheter 50 Milliliter 3%ige, mit Natriummonohydrogenphosphat (1,4%) gepufferte 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) in die entleerte Blase instilliert.

Vor der Fluoreszenz-Endoskopie (AFE) und der Biopsie bzw. der transurethralen Resektion wurde Spülflüssigkeit für die Standard- und für die Fluoreszenz-Zytologie entnommen. Bei der Zystoskopie wurden tumorverdächtige Areale der Harnblase reseziert. Auf einem Erhebungsbogen (PDD-Bogen) wurden vom jeweiligen Operateur der entsprechende Tumorbefund und die Lokalisation im Weißlicht- und im Fluoreszenzmodus festgehalten. Als Referenzwerte wurden die aus den Biopsaten und der Resektion gewonnenen histologischen und zellulären Grading-Kriterien verwendet.

Fig. 2 - 1: Übersicht über die Untersuchungsverfahren



2.3. Präparation zur Ex-Vivo-Fluoreszenzanalyse

2.3.1. Probenentnahme

Vor der endoskopischen Tumorbehandlung wurden den Patienten jeweils etwa 100ml Spülflüssigkeit für die Standard- (SZ) und für die Fluoreszenz-Zytologie entnommen (AFZ). Die SZ wurde verblindet sowohl von Experten des Pathologischen Instituts in Aachen (SZ AA) als auch von Experten des Zytologischen Forschungslabors der Universität München (SZ MUC) beurteilt. Die Proben für die AFZ, die auch für die spektrale Messung verwendet wurden, wurde mit den Daten des Patienten versehen und lichtgeschützt und gekühlt bei ca. 4°C aufbewahrt.

2.3.2. Probenpräparation

Die gekühlten und lichtgeschützten Proben wurden zunächst in 15ml Teströhrchen abgefüllt, mit den Patientennamen beschriftet und mit 1500U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Zur Elimination von störenden Reststoffen, z.B. von lysierten Erythrozyten oder Urin, wurden die Proben vorsichtig dekantiert, resuspendiert und mit 15ml isotonischer NaCl-Lösung erneut verdünnt. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 1500U/min wurde das Probensediment lichtgeschützt und gekühlt zwischengelagert und vor der anschließenden Messung durch Resuspension und schnelles Verteilen auf die Messbehälter homogenisiert. Zur anschließenden Beurteilung und Bilddokumentation unter dem Fluoreszenzmikroskop und zur parallelen Quantifizierung im Spektrometer wurden ca. 50µl von den Proben auf Mikroskopdeckgläser und weitere 200µl in einen speziell an das Spektrometer angepassten Behälter aufpipettiert.

2.4. Methodik der Fluoreszenz-Zytologie

Das Forschungsmikroskop (Leica DMIRB, Leica, Deutschland) ermöglicht sowohl Weißlicht- als auch Fluoreszenzuntersuchungen. Über eine angeschlossene Kamera (PDD-Tricam, Karl-Storz, Deutschland) können Bilder an den Bildverarbeitungsrechner übertragen und dort ausgewertet und gespeichert werden.

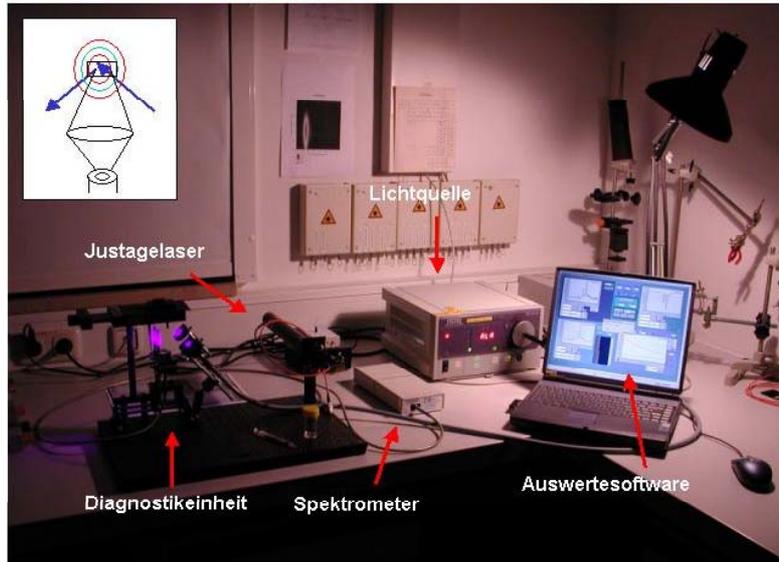
Die mit einer isotonischen NaCl-Lösung substituierte Probensuspension wurde zunächst unter Weißlicht mit einer 10-fach Objektiv, dann mit einem 20-fach Objektiv betrachtet und bilddokumentiert. Anschließend wurden zur Untersuchung der Rotfluoreszenzen die selben Gesichtsfelder mit einem 20-fach Objektiv im Fluoreszenzmikroskop bei einer blauviolettten Lichtanregung von 390-430nm (analog zur Fluoreszenz-Endoskopie) betrachtet, wobei jeweils mehrere zugehörige, repräsentative Bilder zur Bilddokumentation gespeichert wurden. Das in der Fluoreszenz-Zytologie gewonnene Bildmaterial wurde nach zytologischer Bewertung mit der parallel angefertigten spektrometrischen Messung verglichen.

2.5. Methodik und Auswertung der spektralen Messung

2.5.1. Methodik

Nach Aufpipettieren von 200µl der präparierten Proben in eine speziell angefertigte fluoreszenztaugliche Probenkammer mit 5mm Durchmesser wurde diese mit blauviolettten Licht von ca. 390-430nm mit einer Lichtintensität von ca. 80mW/cm² angeregt (D-LIGHT, Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Die durch einen Langpassfilter transmittierte Fluoreszenz der Wellenlänge ab ca. 560nm wird mittels eine Linse gesammelt und in einen Querschnittswandler (Mikropack, Deutschland) fokussiert, der das Licht in das Spektrometer weiterleitet (S2000, Ocean Optics, Dunedin, USA).

Abb. 2 - 1: Versuchsaufbau spektrale Messung



Durch diese Wahl der Anregungs- und Detektionsfilter können sowohl Teile im grünen Spektralbereich, als auch die charakteristische Emission des PpIX bei 635nm detektiert werden. Die gezielt eingestellte Transmission im (grünen) Bereich ab 560nm sorgt dafür, dass auch die Eigenfluoreszenz des Zellmaterials detektiert und so ein absolutes Maß für die Zellkonzentration in der Probe ermittelt werden kann. Ebenso ist absolut oder relativ dazu parallel eine Auswertung der gemessenen PpIX-Intensität möglich.

Die Spektren der Proben mit den ausgespülten Urothelien wurden alle 15 Sekunden über eine Gesamtdauer von 250 Sekunden gemessen, um das Ausbleichverhalten der Autofluoreszenz und der ALA-induzierten Fluoreszenzen genau evaluieren zu können.

2.5.2. Auswertung

Durch die Applikation von Licht über eine konstante Dauer (hier 250 Sekunden) lassen sich zeitabhängige von zeitunabhängigen Signalen separieren, indem das letzte Spektrum, welches für $t = 250$ sec aufgenommen wurde, vom ersten Spektrum mit $t = 0$ sec abgezogen wurde.

Ein PpIX-Reinspektrum wurde rechnerisch mittels eines experimentellen Differenzspektrums erzeugt, welches sowohl PpIX- als auch Autofluoreszenz-Banden aufwies, indem von diesem Spektrum ein reines Autofluoreszenz-Differenzspektrum subtrahiert wurde.

Die Spektralanteile der grünen Autofluoreszenz (um 590nm) und der roten PpIX-Fluoreszenz (um 635nm) wurden durch einen linearen Fit aus einer hinterlegten Komponenten-Datenbank quantifiziert.

So lassen sich aus einer Vielzahl von Reinspektren und Differenzspektren relativ wenige bereits identifizierte Komponenten beschreiben. Nach Generierung der auf diese Weise linear genäherten Spektren wurden alle diesem Algorithmus folgenden Messergebnisse skaliert, so dass die Intensitätsparameter (counts) die entsprechenden Differenzspektren widerspiegeln. So konnten auch sehr geringe PpIX-Fluoreszenzanteile quantifiziert werden, die sonst aus den Originalspektren nicht erfassbar gewesen wären.

Diese Auswertungen wurden unter Verwendung eines linearen Fit-Algorithmus der Fa. *National Instruments* durchgeführt (LS Gen Fit; LabView 7, National Instruments). Der Wert für den Fit-Parameter wurde manuell auf 0 gesetzt, wenn der gelieferte Wert aufgrund zu schwacher Signalstärken negativ war.

Im Folgenden wird unter Spektrometerdaten die Ergebnisse der auf die Autofluoreszenz normierten PpIX-Fitparameter verstanden.

2.6. Statistische Methoden

2.6.1. Festlegung der Auswertungs- und Datenbankkriterien

Abb. 2 - 2: Datenbank zur Patientendatenerfassung

Name	Vorname	Aufnahme-Nr	Geburt_am	OP-Datum	
[redacted]	[redacted]	453433634	11.07.2026	01.10.2003	
Erstdiagnose_am	Nachresektion	Rezidiv	W-Skopie-Befund	PDD-Befund	
		pos		pos	
Zyto-Befund Mü	Zyto-Befund Aa	Histo-Befund-T			
G2	G0	Ta			
Histo-Befund-G	LL-Infiltrat	Parallele-Befunde	Parallele-Befunde2		
G1					
Parallele-Befunde3	Parallele-Befunde4				
Sonstige_Befunde					
PDD-Bogen unklar	Med-Befunde-komplett	Probenalter	Zellkonzentration	Erythrozyten	
	<input checked="" type="checkbox"/>	0	1 <x< 5 Einzeln	<10	
Urin Lyse	620er-Signal	F-Zytologie_Roteleuchten	Signalstärke_635	Signalstärke_585	Bleaching_635
	<input checked="" type="checkbox"/>	deutlich	70	115	10
Bleaching_585	Untergrund_nach_Bleichen	Integral			
10	75				50
Kommentar_zur_Messung					

Datensatz: 1 von 96
Formularansicht

Zu jedem Patienten wurde die Auswertung des PDD-Erhebungsbogens, der histopathologische Befund aus Aachen, die Standard-Zytologie-Befunde aus Aachen und München/Großhadern, sowie der Ausdruck der spektralen Messung gesammelt und in die Datenbank übernommen. Ebenso wurden die Anzahl der mikroskopisch gefundenen Zellen pro Gesichtsfeld sowie deren Fluoreszenzverhalten in der AFZ neben der Bilddokumentation in der Datenbank festgehalten.

Wie aus Abb. 2 - 2 ersichtlich, wurden neben den Tumorbefunden auch weitere histologisch gesicherte Nebenbefunde, wie ödematöse Ulcera, lymphocelluläre Infiltrate und Narbengewebe gesondert registriert, um ggf. fluoreszierende Eigenschaften anderer Komponenten aufdecken zu können.

2.6.2. Entwicklung eines statistischen Auswertungsprogramms

Zur effizienten Analyse und Aufbereitung der Daten wurde eine Software erstellt, mit der auf übersichtliche Weise Thesen an den gewonnenen Daten überprüft werden können.

Die Auswertesoftware besteht aus folgenden Elementen:

Der Examiner

Der Examiner ist ein mit Visual Basic 6.0 erstelltes Statistikprogramm, das die Erfassung, Interpretierung, Auswertung und graphische Darstellung von spülzytologischen, mikroskopischen und spektralphotometrischen Untersuchungen erleichtern soll. In anschaulicher Weise wurden jedem Patienten die einzelnen Befunde und Bilddokumente zugeordnet. Dies ermöglicht die computergestützte Darstellung vieler einzelner Datenquellen in übersichtlicher und anwendungsfreundlicher Weise.

Die Funktion des Examinators ist es, die verschiedenen Beurteilungsbegriffe und Diagnosekriterien analog zu den jeweiligen Quantifizierungskonsistenzen zu vereinheitlichen, um statistisch auswertbare Daten erheben und berechnen zu können.

Der Examiner besteht aus fünf Komponenten.

- Patientenerfassung
- Interpretier
- Auswertungstabellen
- Selektierung und graphischer Darstellung
- Konfiguration

Abb. 2 - 3: Examinator



Patientenerfassung

Die Patientenerfassung ist ein Formular zur Identifizierung eines Patienten, in welches alle Daten aus der Ersterfassung der Access Datenbank übernommen worden sind. Die Funktion „Auswertungszulassung“ ermöglicht den Ausschluss eines Patienten aus der Auswertungstabelle. Zusätzlich wurden mit Hilfe eines Scannerprogramms (CannoCraft CS-P 3,7) die direkt bei der Untersuchung dokumentierten Mikroskopbefunde unter Weiß- und Blaulicht jedem Patienten zugeordnet eingelesen. Dieses Scannerprogramm ermöglicht auch die nachträgliche Bildbearbeitung. Aus Datenschutzgründen wurden die Patientennamen numerisch verschlüsselt.

Abb. 2 - 4: Patientenerfassung

Name Vorname Patient 01	Name	Vorname	Aufnahmenummer	Geburtsdatum	Alter	Operationsdatum	Pr. alter	<input checked="" type="checkbox"/> Auswertungszulassung
Name Vorname Patient 02	Name Patient 01	Vorname Patient 01	453433634	11.11.1926	79	01-Okt-03	0	
Name Vorname Patient 03	Zytologie München	Path. Aa. Zytologie	Path.Aa. Hist T-Bef.	Path. Aa. Hist G-Bef.	Path. Aa. LL- Infiltrat	Pat. Aa. Par. Bef. 1	Path.Aa. Par. Bef. 2	Path. Aa. Par. Bef. 3
Name Vorname Patient 04	G2	G0	Ta	G1	pos			
Name Vorname Patient 05	Path.Aa. Par. Bef. 4	Endo. Mü.W-Skop	Endo.Mü. PDD-Bef.	Endo.Mü.PDD-B.un.	Mikro. Mü. Zellkonz.	Mikro. Mü. Erys	Mikro. Mü. F-Zyt.	Geschlecht
Name Vorname Patient 06		pos	pos	neg	1 bis 5 Einzeln	0 bis 10	deutlich	weiblich
Name Vorname Patient 07	Spek.Mü. PPIX	Spek.Mü. Auto	Spek.Mü. 620er	Spek.Mü PPIX/Auto	leer	leer	leer	Spektren-Komm.
Name Vorname Patient 08	4	16	13					nicht auswertbar
Name Vorname Patient 09	Längere Kommentare (min 6 Zeichen)		Sonstige Befunde					
Name Vorname Patient 10								
Name Vorname Patient 11	<input checked="" type="checkbox"/> Geschützt Interpretiert <input type="checkbox"/>							
Name Vorname Patient 12	<input type="checkbox"/> Normal							
Name Vorname Patient 13	w20.bmp	b20.bmp						
Name Vorname Patient 14	w20-2.bmp	b20-2.bmp						
Name Vorname Patient 15	w20-3.bmp	b20-3.bmp						
Name Vorname Patient 16	w20-4.bmp	b20-4.bmp						
Name Vorname Patient 17	w20-5.bmp	b20-5.bmp						
Name Vorname Patient 18	Alexevia - Spectra.txt Alexevia - Transients.txt Alexevia2 - Spectra.txt Alexevia2 - Transients.txt							
Name Vorname Patient 19	Blue Light Mode Diagnostic mode							
Name Vorname Patient 20	Blue Light Mode Diagnostic mode							
Name Vorname Patient 21	b20-2.bmp							

Interpreter

Der Interpreter ist ein frei konfigurierbarer Begriffsübersetzer mit logischer Verknüpfung der einzelnen Daten. Ziel ist es, die unterschiedlichen Termini der verschiedenen Quellen zu vereinheitlichen und so die Bewertungen vergleichbar zu machen.

Hierzu werden die Ergebnisse der fünf Untersuchungsquellen (Zytologie München, Pathologie Aachen, Endoskopie München, Mikroskopie München und Spektroskopie München) kategorisiert, wobei jede einzelne Untersuchungsquelle über sechs Interpretationslisten verfügt.

Jede Liste kann wiederum mehrere (max. 64) Begriffe beinhalten, die miteinander eine Vereinigungsmenge bilden, also ODER-verknüpft sind. Jeder Liste wird außerdem ein frei wählbarer Begriff zugeordnet, wie z.B. „pos“, „neg“, „keinMat“.

Stimmt einer aus dem Originaldatensatz stammender Begriff mit einer ODER-verknüpften Eintragung in der Liste überein, so wird diese Untersuchungs-

bezeichnung, beispielsweise „G1“, durch einen frei wählbaren Einheitsbegriff ersetzt und in die Auswertungstabelle zur weiteren Selektierung eingetragen.

Abb. 2 - 5: Interpretier

The screenshot displays the 'Interpreter' configuration window, organized into four main sections, each with a grid of 'Optionalen Quantifizierungsbegriffe' (Optional Quantification Concepts) and a set of 'OK' and 'C' (Cancel) buttons.

- Zytologie München (Cytology):** The grid includes categories like 'keinMat', 'neg', and 'pos'. The 'pos' column lists terms: G1, G2, G3, and 'suspekt'.
- Mikroskopie München (Microscopy):** The grid includes categories like 'neg', 'pos', 'Zellkonz. gerin', 'wenig Erys', and 'viel Erys'. The 'pos' column lists terms: 'kein geringfügig', 'deutlich stark', '0 bis 1', '0 bis 10', and '10 bis 50 50 bis'.
- Pathologie Aachen (Pathology):** The grid includes categories like 'keinMat', 'neg', and 'pos'. The 'pos' column lists terms: G1, G2, G3, Cis, T1, T>=2, and Ta.
- Endoskopie München (Endoscopy):** The grid includes categories like 'W-Skopie-Bef', 'PDD-Befund', and 'PDD-Bogen-u'. The 'pos' column lists terms: 'pos', 'neg', and 'nichts'.

At the bottom right, there is a 'Eigenschaften' (Properties) dialog box with the following fields:

- Dateiname max 8 Z.:** STANDARD
- abgespeichert am:** 06.06.2005
- um:** 10:33:35
- Bemerkungen:** Besp 16.11.2004
- Buttons:** Clear

Auswertungstabelle

In die Auswertungstabelle werden die interpretierten Ergebnisse, zu den einzelnen Patienten zahlenmäßig verschlüsselt, übernommen, sofern für die Originaldatensätze ein Eintrag im Interpretier und dieser in der Konfigurationsmaske aktiviert ist. Diese interpretierte Auswertungstabelle dient als Matrix für alle weiteren selektiven Statistiken (siehe Anhang).

Durch Anklicken der Patientenummer kann die jeweilige Patientenmaske mit den dazugehörigen Datensätzen angezeigt werden.

Folgende Anwendungsoptionen können im Funktionsmenü aufgerufen werden:

- „Selektieren“: zur weiteren statistischen Auswertung (s.u.)
- „Liste drucken“: Ausdruck der gesamten Tabelle im A4-Format
- „Excel“: Datentransfer in eine Excel-Tabelle
- „Bildschirm kopieren“: Kopieren der Bildschirmseite in den Zwischenspeicher
- „Schließen“: Beenden des Moduls

Abb.2 - 6: Auswertetabellen

Pat. Nr.	Prob. alter	München Zytologie	Pathologie Aa. Zytologie	Pathologie Aa. Histo T - Bef.	Pathologie Aa. Histo G - Bef.	Pathologie Aa. LL-Infiltrat	Pathologie Aa. Par. Befund 1	Pathologie Aa. Par. Befund 2	Pathologie Aa. Par. Befund 3	Pathologie Aa. Par. Befund 4	Endoskopie Mü. W-Skopie. Bef.	Endoskopie Mü. PDD-Befund
0001	0	pos	neg	pos	pos	pos					pos	pos
0002	21	pos	neg	pos	pos	neg					pos	pos
0003	4	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis				pos	pos
0004	7	pos	keinMat	neg	neg	pos	Zystitis	Ödem			neg	pos
0005	7	neg	neg	neg	neg	pos		Ödem			pos	pos
0006	8	neg	keinMat	neg	neg	pos	Zystitis	Ödem	NG/Ulcus		pos	pos
0007	7	neg	pos	pos	pos	neg			NG/Ulcus		neg	pos
0008	9	neg	neg	neg	neg	pos	Zystitis	Ödem			neg	neg
0009	5	keinMat	pos	pos	pos	pos			NG/Ulcus		pos	pos
0010	8	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis	Ödem		Hämaturie	pos	pos
0011	9	pos	keinMat	pos	pos	pos	Zystitis	Ödem			pos	pos
0012	5	keinMat	neg	neg	neg	pos	Zystitis	Ödem		Hämaturie	pos	neg
0013	1	pos	neg	pos	pos	neg	Zystitis				pos	pos
0014	8	neg	keinMat	neg	neg	pos			NG/Ulcus		pos	neg
0015	2	neg	neg	keinMat	keinMat	neg					neg	neg
0016	1	pos	neg	neg	neg	pos	Zystitis				neg	neg
0017	6	neg	keinMat	pos	pos	pos					pos	pos
0018	7	pos	keinMat	pos	pos	neg					pos	pos
0019	8	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis			Hämaturie	pos	pos
0020	6	neg	neg	neg	neg	neg	Zystitis				neg	neg
0021	9	pos	neg	pos	pos	neg				Hämaturie	pos	pos
0022	13	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis		NG/Ulcus		pos	pos
0023	8	neg	neg	neg	neg	pos	Zystitis	Ödem	NG/Ulcus		neg	pos
0024	7	pos	keinMat	neg	neg	neg		Ödem	NG/Ulcus		neg	neg
0025	4	neg	neg	keinMat	keinMat	neg					nichts	nichts
0026	7	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis		NG/Ulcus	Hämaturie	pos	pos
0027	6	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis				pos	pos
0028	0	keinMat	neg	pos	pos	pos		Ödem			pos	pos
0029	1	neg	pos	pos	pos	pos	Zystitis				pos	pos
0030	6	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis			Hämaturie	pos	pos
0031	4	neg	pos	keinMat	keinMat	neg					neg	neg
0032	16	neg	neg	keinMat	keinMat	neg				Hämaturie	nichts	nichts
0033	7	pos	keinMat	pos	pos	pos	Zystitis		NG/Ulcus	Hämaturie	pos	pos
0034	7	neg	neg	neg	neg	pos	Zystitis		NG/Ulcus		neg	neg
0035	1	pos	pos	neg	neg	pos	Zystitis		NG/Ulcus		pos	pos
0036	9	neg	neg	neg	neg	pos	Zystitis	Ödem			neg	pos
0037	1	neg	neg	keinMat	keinMat	pos	Zystitis				neg	neg
0038	8	neg	neg	neg	neg	pos	Zystitis	Ödem	NG/Ulcus		neg	pos
0039	4	keinMat	neg	neg	neg	neg	Zystitis		NG/Ulcus		pos	pos
0040	6	pos	pos	pos	pos	neg	Zystitis			Hämaturie	pos	pos

Selektierung und graphische Darstellung

Es wurde eine Selektierungstabelle („freie Selektierung“) konzipiert, die über eine Selektionstiefe von acht UND-verknüpften Spalten verfügt, in die bis zu sechs ODER-verknüpfte Selektionskriterien eingetragen werden können.

In die darunter stehenden zugehörigen acht Selektionslisten werden entsprechend den gewählten Selektionskriterien die selektierten Patientennummern angezeigt.

In die parallel angeordneten UND-verknüpften Selektionslisten werden die Ergebnisse nach dem linearen Annäherungsverfahren berechnet, wobei jeweils die

selektierten Patientennummern dargestellt werden. Durch Aufrufen des Registers „selektierte Patienten“ kann die endgültige Ergebnisliste angezeigt werden. In Form eines Balkendiagramms können die Ergebnisse relativ oder absolut graphisch dargestellt werden:

Abb. 2 - 7: Balkendiagramm



Abb. 2 - 8: Selektion

Pat. Nr.	Prob. alter	München Zytologie	Pathologie Aa. Zytologie	Pathologie Aa. Histo T - Bef.	Pathologie Aa. Histo G - Bef.	Pathologie Aa. LL-Infiltrat	Pathologie Aa. Par. Befund 1	Pathologie Aa. Par. Befund 2	Pathologie Aa. Par. Befund 3	Pathologie Aa. Par. Befund 4	Endoskopie Mü. W-Skopie. Bef.	Endoskopie Mü. PDD-Befund
0001	0	pos	neg	pos	pos	pos					pos	pos
0002	21	pos	neg	pos	pos	neg					pos	pos
0003	4	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis				pos	pos
0004	7	pos	keinMat	neg	neg	pos	Zystitis	Ödem			neg	pos
0005	7	neg	neg	neg	neg	pos		Ödem			pos	pos
0006	8	neg	keinMat	neg	neg	pos	Zystitis	Ödem	NG/Ulcus		pos	pos
0007	7	neg	pos	pos	pos	neg			NG/Ulcus		neg	pos
0008	9	neg	neg	neg	neg	pos	Zystitis	Ödem			neg	neg
0009	5	keinMat	pos	pos	pos	pos	Zystitis		NG/Ulcus		pos	pos
0010	8	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis	Ödem		Hämaturie	pos	pos
0011	9	pos	keinMat	pos	pos	pos	Zystitis	Ödem			pos	pos
0012	5	keinMat	neg	neg	neg	pos	Zystitis	Ödem		Hämaturie	pos	neg
0013	1	pos	neg	pos	pos	neg	Zystitis				pos	pos
0014	8	neg	keinMat	neg	neg	pos			NG/Ulcus		pos	neg

Pat. Nr.	Prob. alter	Pathologie Mü. Zytologie	Pathologie Aa. Zytologie	Pathologie Aa. Histo T - Bef.	Pathologie Aa. Histo G - Bef.	Pathologie Aa. LL-Infiltrat	Pathologie Aa. Par. Befund 1	Pathologie Aa. Par. Befund 2	Pathologie Aa. Par. Befund 3	Pathologie Aa. Par. Befund 4	Endoskopie Mü. W-Skopie. Bef.
0003	4	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis				pos
0010	8	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis	Ödem		Hämaturie	pos
0019	8	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis			Hämaturie	pos
0022	13	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis		NG/Ulcus		pos
0026	7	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis		NG/Ulcus	Hämaturie	pos
0027	6	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis				pos
0030	6	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis			Hämaturie	pos
0035	1	pos	pos	neg	neg	pos	Zystitis		NG/Ulcus		pos
0040	6	pos	pos	pos	pos	neg	Zystitis			Hämaturie	pos
0061	1	pos	pos	neg	neg	pos	Zystitis	Ödem	NG/Ulcus		neg
0066	1	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis	Ödem			pos
0072	6	pos	pos	pos	pos	neg	Zystitis				pos
0079	1	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis				pos
0080	21	pos	pos	pos	pos	neg				Hämaturie	pos
0087	6	pos	pos	pos	pos	pos					pos
0092	14	pos	pos	pos	pos	pos					nichts
0094	6	pos	pos	pos	pos	pos	Zystitis		NG/Ulcus		pos

Konfiguration

Die Funktion Konfiguration ermöglicht es, für jede der genannten Untersuchungsmethoden mittels des Moduls Interpreter die reinen oder die interpretierten Daten zuzulassen.

Fazit

Mit diesem Programm ist es schnell und einfach möglich, die Einträge der Vierfeldertafeln zur Ermittlung von Sensitivitäten und Spezifitäten zu ermitteln. Eine Aussage über die Signifikanz der Resultate muss jedoch dann über statistische Standardtests, in diesem Fall mittels SPSS, ermittelt werden. So wurden für die Auswertung des Spektrometriverfahrens folgende gebräuchliche Darstellungen verwendet.

2.6.3. Anwendung weiterer statistischer Methoden

Zur Einführung in die statistischen Methoden siehe u.a. *Bortz J, Lienert GA, 2003* und *Devore JL, 1995*.

Vierfeldertafeln

Vierfeldertafeln stellen den einfachsten Fall einer Kontingenztafel dar. In einer Kontingenztafel werden die Ausprägungen (Werte) des einen Merkmals denen des anderen Merkmals gegenübergestellt.

Für den Fall einer Vierfeldertafel besteht die Kontingenztafel aus 2 Zeilen und 2 Spalten, rechts und unten sind dann die Summen der jeweiligen Zeilen und Spalten notiert:

Tab. 2 - 1: Vierfeldertafel für die Merkmale A und B

	B	\bar{B}
A	wert ab	wert $\bar{b}a$
\bar{A}	wert $\bar{a}b$	wert $\bar{b}a$

Man vergleicht - allgemein ausgedrückt - das Zusammentreffen eines Merkmals A mit einem anderen Merkmal B. Bei 2 Merkmalen entspricht dieses also den Möglichkeiten A/B , \bar{A}/B , A/\bar{B} und \bar{A}/\bar{B} .

Berechnung der Sensitivität und Spezifität

Aus den Daten der Vierfeldertafeln wurden die klinisch gebräuchlichen statistischen Parameter nach folgenden Formeln berechnet:

mit TP: true positive
FN: false negative
TN: true negative
FP: false positive

$$\begin{aligned} \text{Sensitivität} &= TP / [TP + FN] = \\ &= [\text{Anzahl der richtig-positiven Befunde}] / \\ &\quad [\text{Anzahl der richtig-pos. Bef.} + \text{Anzahl der falsch-neg. Bef.}] = \\ &= [\text{Anzahl Personen mit pos. Test UND hist. ges. Tumor}] / \\ &\quad [\text{Anzahl aller Personen mit histologisch gesichertem Tumor}] \end{aligned}$$

Die Sensitivität oder auch Richtig-Positiv-Rate oder einfach Trefferquote beschreibt die Fähigkeit eines diagnostischen bzw. statistischen Tests, Personen mit einer Krankheit auch als solche vollständig herauszufinden. Die Sensitivität gibt also den Anteil der richtig als positiv erkannten (richtig-positiv) Ergebnisse relativ zur Gesamtheit der in Wirklichkeit positiven Ergebnisse an.

$$\begin{aligned} \text{Spezifität} &= TN / [TN + FP] \\ &= [\text{Anzahl der richtig-negativen Befunde}] / \\ &\quad [\text{Anzahl der richtig-neg. Bef.} + \text{Anzahl der falsch-pos. Bef.}] = \\ &= [\text{Anzahl Personen mit neg. Test UND hist. ges. tumorneg.}] / \\ &\quad [\text{Anzahl aller Personen, die hist. ges. tumorneg. sind}] \end{aligned}$$

Die Spezifität beschreibt die Fähigkeit eines diagnostischen bzw. statistischen Tests, ausschließlich Personen mit einer Krankheit zu erfassen bzw. Gesunde richtig auszuschließen.

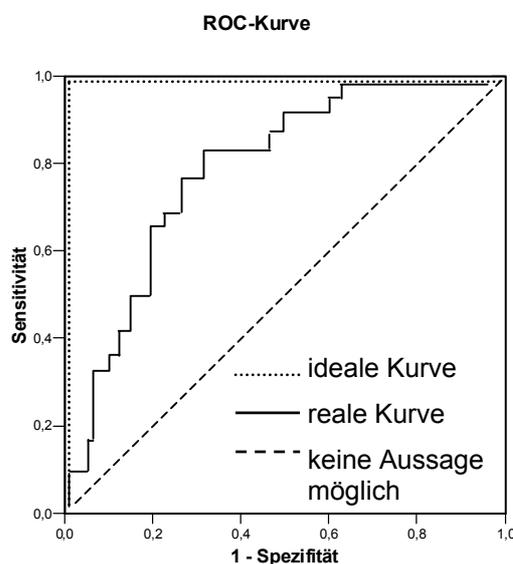
ROC-Kurve (Receiver Operating Characteristic)

Diese Prozedur stellt einen sinnvollen Weg zur Beurteilung von Klassifikationsschemata dar, bei denen eine Variable mit zwei Kategorien verwendet wird, um Subjekte zu klassifizieren. Im vorliegenden Fall wird für die spektrale Untersuchung zu jedem Sensitivitätswert zwischen 0 und 1 die korrespondierende Spezifität aufgetragen.

Mit Hilfe von ROC-Kurven kann beurteilt werden, wie gut ein Verfahren im Hinblick auf die jeweilig erreichte Spezifität und Sensitivität ist:

Sensitivität und Spezifität sind abhängig von sogenannten Referenzgrenzen oder Diskriminanzschwellen (operating point, cut-off point). Die Referenzgrenze legt einen Wert fest, ab welchem ein bestimmtes Ereignis klar definiert ist, z.B. Krankheit oder Gesundheit. Dieser Wert kann beispielsweise eine bestimmte Höhe eines Laborwertes sein. Für jeden Referenzwert werden zunächst die zugehörige Sensitivität und Spezifität bestimmt. Diese Wertepaare werden dann in einem Diagramm als Sensitivität gegen (1 minus Spezifität) aufgetragen, so dass man die so genannte ROC-Kurve erhält, aus deren Kurvenverlauf bzw. aus deren Fläche unter der Kurve (Area under the Curve, AUC) sich Aussagen über die Güte eines Tests ableiten lassen.

Fig. 2 - 2: ROC-Kurve



Weitere Auswertung der ROC-Kurve

Die ROC-Kurve kann außerdem dazu verwendet werden, um verschiedene Tests bezüglich ihrer Güte auf einfache, graphische Weise vergleichen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu in die ROC-Kurve der aus den Spektrometerdaten gewonnenen Fitparameter und zusätzlich die Sensitivität und (1-Spezifität)-Wertepaare der anderen Untersuchungsmethoden von Hand eingezeichnet. Liegt der entsprechende Punkt oberhalb der Kurve, so bedeutet dies, dass die zugehörige Untersuchungsmethode besser für die Diagnose des Harnblasenkarzinoms geeignet ist als die Fluoreszenz-Spektroskopie.

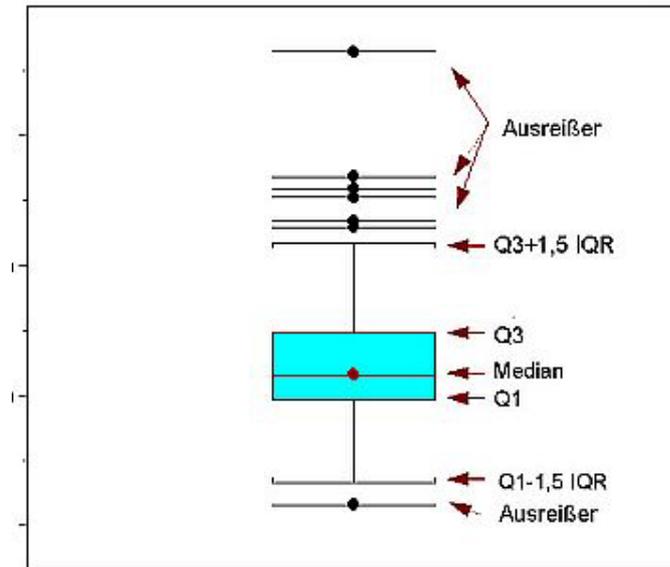
Box-Plot

Im Boxplot werden Median, Häufung der Werte (Interquartilbereich, IQR), Ausreißer und Extremfälle einzelner Variablen angezeigt. Ein Boxplot ist eine geeignete Darstellung, um den Wertebereich einer Variablen mit dem „Schwerpunkt“ und den Ausreißern zu veranschaulichen:

Als "Box" wird das durch die untere und die obere Quartile Q1 bzw. Q3 bestimmte Rechteck bezeichnet. Dieses Rechteck umfasst 50% der Daten. Aus der Länge der Box kann der Interquartilsabstand abgelesen werden. Der Interquartilsabstand ist ein Maß für die Streuung, welches durch die Differenz des oberen und unteren Quartils bestimmt ist. Des Weiteren ist der Median in der Box eingezeichnet, welcher durch seine Lage innerhalb der Box einen Eindruck von der Schiefe der den Daten zugrunde liegenden Verteilung vermittelt.

Der Vorteil bei der Betrachtung des Medians gegenüber dem Mittelwert besteht darin, dass die Lage des Medians in erster Näherung nicht von den Ausreißern und den Extremwerten beeinflusst wird, was bedeutet, dass der Median auch bei stärker streuenden Messwerten am ehesten dem „wahren Wert“ entspricht.

Fig. 2 - 3: Boxplot



3. Ergebnisse

Patientenkollektiv

In dieser Studie wurden konsekutive Proben von 94 Spülzytologien bei 92 Patienten im Alter von 29 bis 89 Jahren mikroskopisch und spektrometrisch untersucht. Von der Auswertungszulassung wurden zwei Proben ausgeschlossen, die zwar einen positiven PDD-Befund aufwiesen, für die in der „Histologie Aachen“ allerdings kein auswertbares Material eingetroffen ist. Es wurden somit 92 Proben von 90 Patienten untersucht, bei denen im Zeitraum vom 3. September 2003 bis zum 12. Dezember 2003 Proben von Spülzytologien nach 5-ALA-Instillation entnommen worden waren. Von den Patienten waren 63 männlichen und 29 weiblichen Geschlechts. Von einem Patienten und einer Patientin wurden jeweils zwei Proben zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

Es wurden die Spezifitäten und die Sensitivitäten der zunächst 92 Proben berechnet. Um alle Diagnoseverfahren bei identischem Patientengut vergleichen zu können, wurden von den ursprünglich genommenen 92 Proben - wie in Fig. 3 - 1 gezeigt - die Proben mit unvollständigem Datensatz ausgeschlossen, so dass 43 Proben mit vollständigem Standard-Diagnoseverfahren-Datensatz übrig blieben. Von diesen 43 Proben enthielten 30 Proben auch zugleich auswertbare Spektrometer-Daten. Folglich wurden für die Gesamtauswertung die Spezifitäten und die Sensitivitäten dieser 30 Proben mit histologisch gesichertem Befund und mit jeweils komplettem Ergebnissatz berechnet.

Fig. 3 - 1: Probenübersicht

Je 92 Proben:	
Standard-Diagnoseverfahren (WLE, AFE, SZ AA, SZ MUC, AFZ)	Spektrometrie
49 Proben eliminiert: unvollständiger Datensatz	36 Proben eliminiert: Fit-Parameter der Intensität von (PpIX + Autofluoreszenz) kleiner 20 oder Fit-Wert nicht nachvollziehbar
43 Proben mit vollständigem Datensatz	56 auswertbare Proben
\cap	
30 Proben mit vollständigem Datensatz und auswertbaren Spektrometriedaten	

3.1. Korrelation der Diagnostikmethoden

3.1.1. Häufigkeit der Befunde

Den einzelnen histologischen Befunden, wobei wir das Grading des Tumors betrachteten (G1, G2, G3, CIS, G0), wurden mit Hilfe des Visual-Basic-Statistikprogramms die Ergebnisse des jeweiligen Diagnoseverfahrens (SZ, WLE, AFE, AFZ) gegenübergestellt und die daraus folgenden Sensitivitäten und Spezifitäten berechnet. Untersuchungen ohne Biopsieentnahme oder ausreichendem Biopsiegewebe (Material) wurden zu G0 gezählt (in Klammern dargestellt). So liegt in 11 Fällen von 92 Proben kein histologisches Material bei gleichzeitig negativem PDD- oder Weißlicht-Endoskopiebefund vor.

Gab es in der Endoskopie keine Auffälligkeiten, so wurde auch keine Biopsie entnommen.

Durch die hohe Sensitivität der PDD (Zaak D, 2001) darf der Befund „keinMat“ in der Referenzhistologie zu den negativen Befunden gerechnet werden, weil postuliert wurde, dass in diesen Fällen bzw. das Vorliegen eines malignen Befundes mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen ist. Eine Biopsieentnahme wäre nicht sinnvoll gewesen.

Für die Ermittlung der Sensitivität und Spezifität in Tab. 3 - 4 wurden für die Berechnung des Nenners jeweils die Daten des histologisch gesicherten Befunds verwendet, so dass zum einen die Daten der jeweiligen Untersuchungsmethoden

mit dem Ergebnisse „keinMat“ unberücksichtigt bleiben konnten, dafür aber eine gewisse Ungenauigkeit bei den Zahlenwerten für die Sensitivitäts- und die Spezifitätsermittlung in Kauf genommen werden musste.

Die Diagnoseverfahren, die miteinander verglichen werden, sind im Einzelnen:

- die Weißlicht-Endoskopie (WLE)
- die Fluoreszenz-Endoskopie (AFE)
- die Standard-Zytologie (SZ)
- die Fluoreszenz-Zytologie (AFZ)

sowie die Spektrometrie, die gesondert behandelt wird.

Tab. 3 - 1: Häufigkeit der Befunde bei allen 92 Proben

Untersuchungs- verfahren	Kriterien	G1	G2	G3	CIS	Alle TU	G0+keinMat	ges.
Histologie		10	4	16	8	38	43(+11) = 54	92
WLE positiv	Positiv	10	3	16	7	36	19	55
WLE negativ	Negativ	0	0	0	1	1	33	34
WLE nichts	KeinMat	0	1	0	0	1	2	3
AFE positiv	Positiv	9	3	15	8	35	26	61
AFE negativ	Negativ	0	0	1	0	1	25	26
AFE nichts	KeinMat	1	1	0	0	2	3	5
SZ MUC positiv	suspekt/G1/G2/G3	7	3	13	7	30	20	50
SZ MUC negativ	G0	2	1	3	1	7	32	39
SZ MUC keinMat	KeinMat	1	0	0	0	1	2	3
SZ AA positiv	G1/G2/G3	0	2	13	4	19	5	24
SZ AA negativ	G0	10	0	0	2	12	41	53
SZ AA keinMat	KeinMat	0	2	3	2	7	8	15
AFZ positiv	deutlich/stark	5	2	11	4	22	12	34
AFZ negativ	gering/kein	3	2	3	2	10	25	35
AFZ keinMat	kein Zellmaterial	2	0	2	2	6	17	23

Anm. zu Tab. 3 - 1:

„keinMat“ bei der WLE := keine Angaben zum Endoskopiebefund

„keinMat“ bei der AFE := keine Angaben zum PDD-Befund

„kein Zellmaterial“ := weniger als eine Zelle pro Gesichtsfeld (0 bis 1)

3.1.2. Berechnung von Sensitivitäten und Spezifitäten

Aus diesen in der Tabelle dargestellten Absolutwerten wurden nun mittels der Vierfeldertafel die einzelnen Sensitivitäten und Spezifitäten berechnet, wobei sich Folgendes ergab:

Sensitivität (SZ AA): 61,3%

Spezifität (SZ AA): 89,1 %

Tab. 3 - 2: Vierfeldertafel für die Sensitivitäts- und Spezifitätsberechnung der SZ AA

	„Goldstandard“	
	Biopsie positiv	Biopsie negativ
SZ AA positiv	19 (TP)	5 (FP)
SZ AA negativ	12 (FN)	41 (TN)

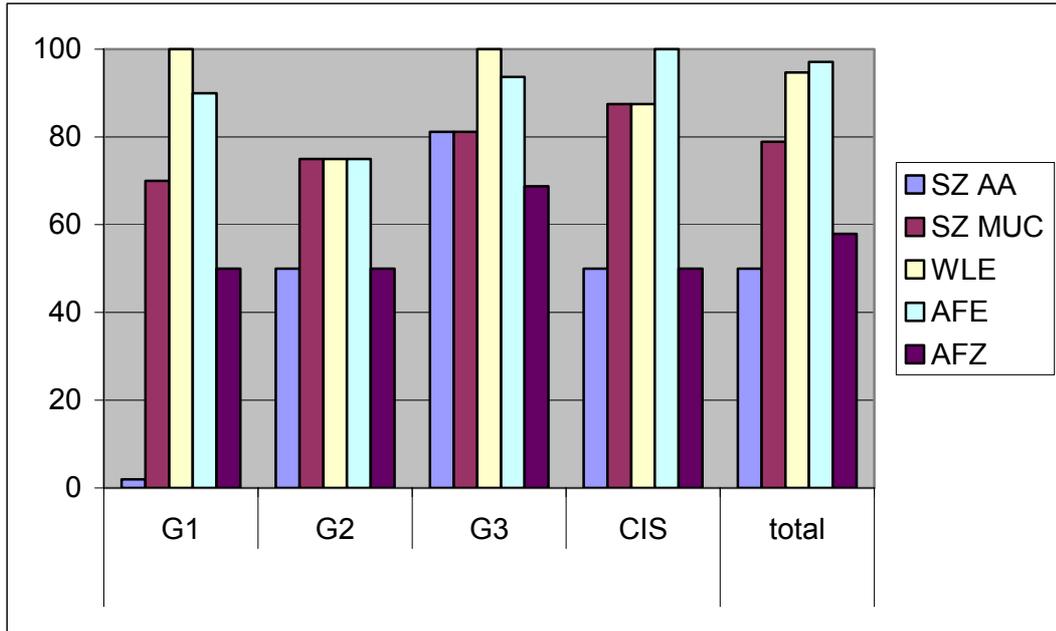
Analog wurden die Sensitivitäten und Spezifitäten für die weiteren Standarddiagnoseverfahren ermittelt. Die in dieser Arbeit selbst untersuchte Fluoreszenz-Zytologie wurde fett markiert:

Tab. 3 - 3: Sensitivitäten und Spezifitäten der Standarddiagnoseverfahren der 92 Proben

	Sensitivität [%]					Spezifität [%]
	G1	G2	G3	CIS	Total	Total
WLE	100	75	100	87,5	94,7	61,1
AFE	90	75	93,7	100	92,1	46,3
SZ MUC	70	75	81,2	87,5	78,9	59,3
SZ AA	0	50	81,2	50	50	75,9
AFZ	50	50	68,7	50	57,9	46,3

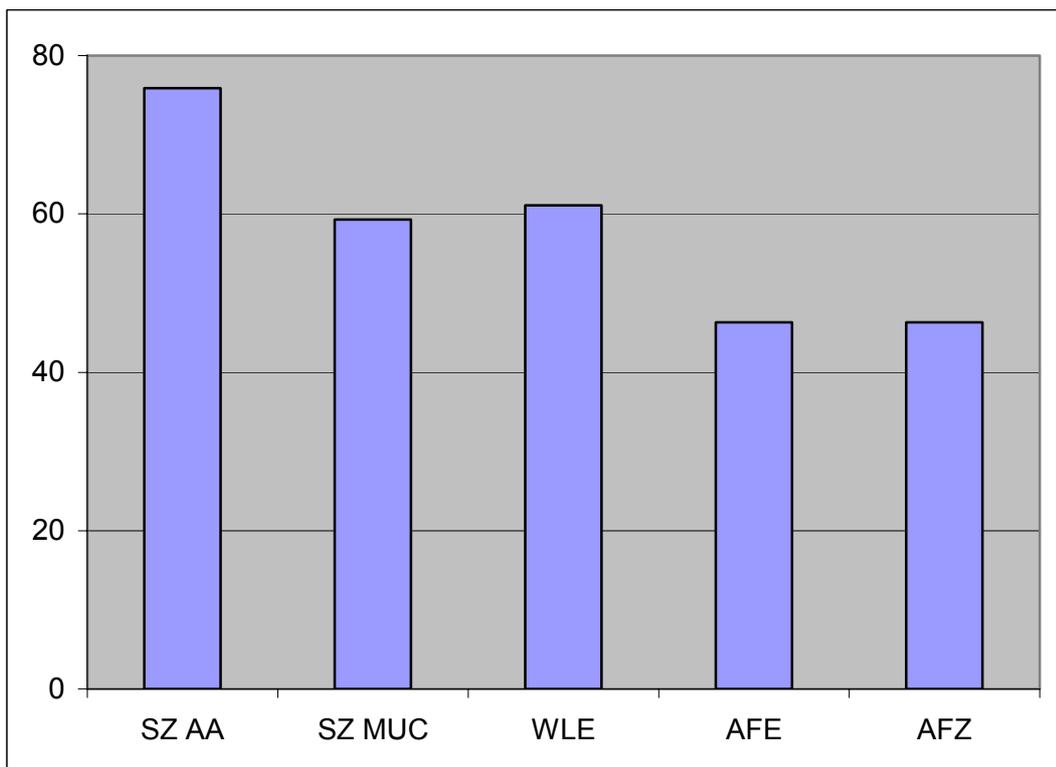
Anm.: 0 bei SZ Aa siehe Kap. 3.1.4.

Fig. 3 - 2: Sensitivitäten der Standarddiagnoseverfahren der 92 Proben [%]



Anm.: Für 0% sind in der Darstellung willkürlich 2% eingetragen.

Fig. 3 - 3: Spezifitäten der Standarddiagnoseverfahren der 92 Proben [%]



3.1.3. Detailergebnisse der Weißlicht-Endoskopie und der AFE

Die häufig erreichten Sensitivitäten von 100% in der Weißlicht- und in der Fluoreszenz-Endoskopie erklären sich aus der Tatsache, dass Biopsien nur dann entnommen wurden, wenn auch Auffälligkeiten in der Endoskopie gesehen wurden.

Wie oben aus Tab. 3 - 3 ersichtlich, zeigt die **Weißlicht-Endoskopie** eine Gesamtsensitivität von 94,7%, jedoch nur einer Spezifität von 61,1%.

Als weitere Untersuchungsmethode zur Erkennung eines Harnblasenkarzinoms wurde die **Fluoreszenz-Endoskopie** mit den histologisch gesicherten Befunden verglichen. Dabei wurden 9 von 10 G1-Tumore, 3 von 4 G2-Tumoren, 15 von 16 G3-Tumore und alle CIS-Tumore erkannt, wobei lediglich 26 von 54 negativen Befunden tatsächlich als negativ erkannt wurden (siehe Tab. 3 - 2). Auch hier wird die Voraussetzung erfüllt, dass bei allen 11 Befunden, die histologisch nicht beurteilt wurden, der fluoreszenz-endoskopische Befund entweder negativ oder nicht vorhanden, d.h. der OP-Bericht nicht entsprechend ausgefüllt war.

3.1.4. Detailergebnisse der Standardzytologie (MUC – AA)

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der zytologischen Untersuchungen, die in Aachen und München parallel aus den gleichen spülzytologischen Proben vorgenommen wurden, müssen zunächst terminologische und weitere Beurteilungskriterien näher erläutert werden:

Als positive Befunde wurden in Anlehnung an die Terminologie der Zytologie München / Großhadern folgende zusammengefasst:

G1, G2, G3, suspekt ↔ positiver Befund

Bei den in Aachen vorgenommen zytologischen Untersuchungen wurde der Begriff „suspekt“ nicht verwendet. Gemäß der Aachener Terminologie gelten die Befunde G1, G2 und G3 als „positiver Befund“, was entsprechend bei den Berechnungen berücksichtigt wurde. Die Zytologie in Aachen konnte in 15 Fällen aufgrund

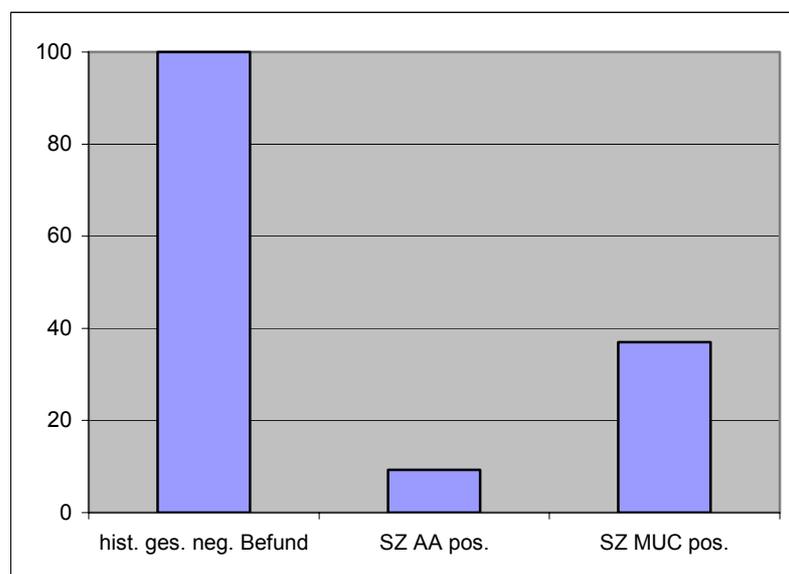
unzureichenden Probematerials keine Bewertung vornehmen, während in München / Großhadern dies nur dreimal der Fall war.

Wie aus der Tab. 3-3 ersichtlich, ergeben sich in München für den Gesamttumornachweis und die Diagnostik des Carcinoma in situ höhere Sensitivitäten, während die Zytologie Aachen mit 75,9% eine höhere Spezifität im Vergleich zur SZ München mit 59,3% besitzt, d.h. eine geringere Anzahl falsch-positiver Befunde liefert. Demgemäß wurden in der Aachener Zytologie nur 5 von 54 histologisch negativen Befunden falsch-positiv bewertet (11,3%), während in Großhadern 20 von 54 (46,5%) falsch-positiv befundet wurden (vgl. Tab. 3 – 1).

Tab. 3 - 4: Falsch-positive Befunde der SZ AA und SZ MUC der 92 Proben

Hist. ges. Neg. Befund	SZ AA positiv	SZ MUC positiv	
54	5	20	Anzahl Proben
100	9,3	37,0	Anzahl in [%]

Fig. 3 - 4: Falsch-positive Befunde der SZ München und SZ Aachen der 92 Proben [%]



Diese Ergebnisse verweisen eindrucksvoll auf die Problematik der Standard-Zytologie da diese bekanntermaßen subjektiv und vielfach nicht reproduzierbar sind. Die zytologischen Malignitätskriterien der unterschiedlich differenzierten Urotheltumoren - also G1 bis G3 - sind nicht immer so deutlich ausgeprägt, als dass in jedem Falle zweifelsfrei eine entsprechende Typisierung vorgenommen werden könnte oder sie für eine valide zytologische Interpretation ausreichen. Die

Standard-Uinzytologie stellt ein sehr subjektives und vom Untersucher abhängiges Verfahren dar, das lediglich eine Reproduzierbarkeitsrate von 60-70% aufweist (Brown FM, 2000; Lokeshwar VB, 2001.).

3.1.5. Detailergebnisse der Fluoreszenz-Zytologie

Bei den 38 Patienten mit einem durch die transurethrale Resektion histologisch gesicherten Urothelkarzinom der Harnblase fand sich in 22 Fällen in der 5-ALA induzierten Fluoreszenz-Zytologie eine positive Fluoreszenz mit ausreichendem Zellmaterial. Als positiv wurde hier einerseits die subjektive Beurteilung des Untersuchers gewertet, der sowohl mit dem 10-fach Objektiv als auch mit dem 20-fach Objektiv unter dem Fluoreszenzmikroskop die bekannte Rotfluoreszenz des Protoporphyrin IX bei ausreichendem Zellmaterial, d.h. mehr als 1 Zelle pro Gesichtsfeld, mit „deutlich“ oder „stark“ beurteilte.

Die Beurteilungskriterien für die Rotfluoreszenz wurden vor der Untersuchung wie folgt festgelegt: keine – geringfügige – deutliche – starke Rot-Fluoreszenz.

Abb. 3 - 1: Beispiel für „deutliche“ Rot-Fluoreszenz:

The screenshot displays a medical software interface for patient data and laboratory results. The patient information includes Name (Name Patient 01), Vorname (Vorname Patient 01), Aufnahme- und Geburtsdatum (11.11.1926, 79), and Operationsdatum (01-Okt-03). The lab results table shows various tests and their outcomes, such as Zytologie München (G2), Path. Aa. Zytologie (G0), Path. Aa. Hist T-Bef. (Ta), Path. Aa. Hist G-Bef. (G1), Path. Aa. LL- Infiltrat (pos), Path. Aa. Par. Bef. 1 (pos), Path. Aa. Par. Bef. 2 (pos), Path. Aa. Par. Bef. 3 (pos), Endo. Mü. W-Skop (pos), Endo. Mü. PDD-Bef. (pos), Endo. Mü. PDD-B. un. (neg), Mikro. Mü. Zellkonz. (1 bis 5 Einzel), Mikro. Mü. Erys (0 bis 10), Mikro. Mü. F-Zyt. (deutlich), Geschlecht (weiblich), Spek. Mü. PPIX (4), Spek. Mü. Auto (16), Spek. Mü. 620er (13), Spek. Mü. PPIX/Auto (leer), Spek. Mü. Erys (leer), Spek. Mü. F-Zyt. (leer), and Spek. Mü. F-Zyt. (nicht auswertbar). The microscopy images show 'Blue Light Mode' and 'Diagnostic mode' with a red spot indicating fluorescence.

Zytologie München	Path. Aa. Zytologie	Path. Aa. Hist T-Bef.	Path. Aa. Hist G-Bef.	Path. Aa. LL- Infiltrat	Pat. Aa. Par. Bef. 1	Path. Aa. Par. Bef. 2	Path. Aa. Par. Bef. 3
G2	G0	Ta	G1	pos			

Path. Aa. Par. Bef. 4	Endo. Mü. W-Skop	Endo. Mü. PDD-Bef.	Endo. Mü. PDD-B. un.	Mikro. Mü. Zellkonz.	Mikro. Mü. Erys	Mikro. Mü. F-Zyt.	Geschlecht
	pos	pos	neg	1 bis 5 Einzel	0 bis 10	deutlich	weiblich

Spek. Mü. PPIX	Spek. Mü. Auto	Spek. Mü. 620er	Spek. Mü. PPIX/Auto	Spek. Mü. Erys	Spek. Mü. F-Zyt.	Spek. Mü. F-Zyt.	Spek. Mü. F-Zyt.
4	16	13	leer	leer	leer	leer	nicht auswertbar

Es wurde jedoch nur in 8 Untersuchungen die Rot-Fluoreszenz als „stark“ beurteilt:

Abb. 3 - 2: Beispiel für „starke“ Rot-Fluoreszenz:

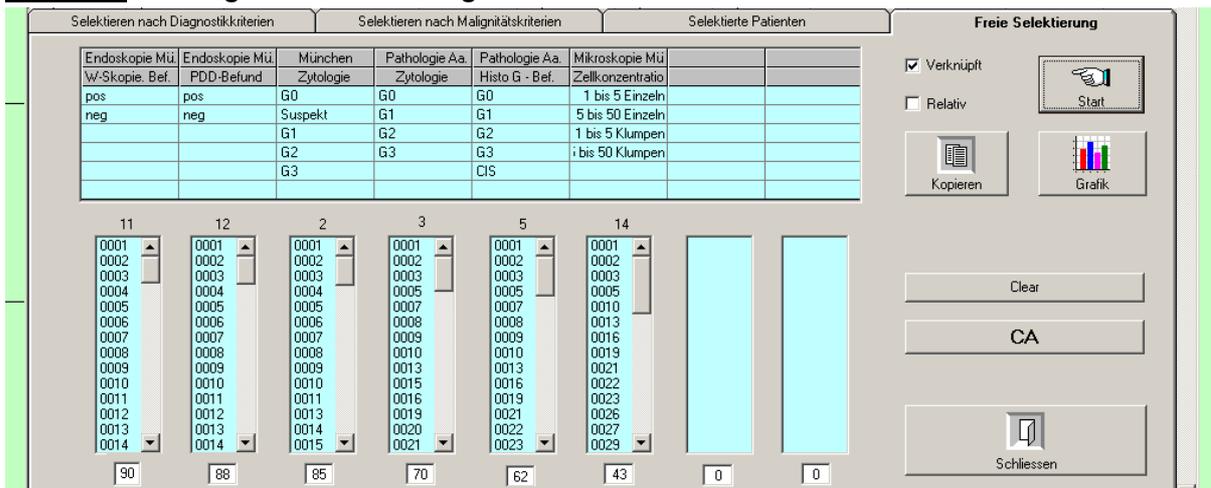
Name	Vorname	Aufnahmenummer	Geburtsdatum	Alter	Operationsdatum	Pr. alter				
Name Patient 19	Vorname Patient 19	453663065	17-Nov-36	70	04-Nov-03	8	<input checked="" type="checkbox"/> Auswertungszulassung			
Zytologie München	Path. Aa. Zytologie	Path.Aa. Hist T-Bef.	Path. Aa. Hist G-Bef.	Path. Aa. LL- Infiltrat	Pat. Aa. Par. Bef. 1	Path.Aa. Par. Bef. 2	Path. Aa. Par. Bef. 3			
G3	G3	T1	G3	pos	Zystitis					
Path.Aa. Par. Bef. 4	Endo. Mü.W-Skop	Endo.Mü. PDD-Bef.	Endo.Mü.PDD-B.un	Mikro. Mü. Zellkonz.	Mikro. Mü. Erys	Mikro. Mü. F-Zyt	Geschlecht			
Hämaturie	pos	pos	neg	1 bis 5 Einzel	10 bis 50	stark	männlich			
Spek.Mü. PPIX	Spek.Mü. Auto	Spek.Mü. 620er	Spek.Mü PPIX/Auto	leer	leer	leer	Spektr.en-Komm.			
44	17	47					PP?			
Längere Kommentare (min 6 Zeichen)				Sonstige Befunde						

3.1.6. Sensitivität und Spezifität der Befunde mit vollständigem Datensatz

Zusammenfassend werden nun die eindeutig positiven und negativen Ergebnisse dieser fünf Diagnoseverfahren (Spülzytologien aus Aachen und München, Weißlicht- und Fluoreszenz-Endoskopie, sowie die Fluoreszenz-Zytologie) in Korrelation zum histologischen „Goldstandard“ betrachtet. Es wird demnach die Schnittmenge aller positiven und negativen Befunde unter Berücksichtigung einer ausreichenden Zellkonzentration bei der Fluoreszenz-Zytologie dargestellt.

Aus den histologisch gesicherten Ergebnissen verbleiben 43 Proben, die durch **jedes** der o.g. Diagnoseverfahren auch eindeutig verfügbar sind, d.h. bei 43 von den ursprünglich 92 Proben liegen in allen fünf Diagnoseverfahren vollständige Befunde vor.

Abb. 3 - 3: Ergebnisse der 5 Diagnoseverfahren – Screen Shot Examinator



Hier ist nun die Berechnung der Sensitivität und Spezifität aller Verfahren im direkten Vergleich bei **denselben** Patienten, also am identischen Patientengut, möglich.

Tab. 3 - 5: Untersuchungsergebnisse mit vollständigem Datensatz (43 Proben)

Untersuchungs- verfahren	Kriterien	G1	G2	G3	CIS	Alle TU	G0	ges.
Histologie		7	1	11	3	22	21	43
WLE positiv	positiv	7	1	11	3	22	7	29
WLE negativ	negativ	0	0	0	0	0	14	14
AFE positiv	positiv	7	1	10	3	21	12	33
AFE negativ	negativ	0	0	1	0	1	9	10
SZ MUC positiv	suspekt/G1/G2/G3	6	1	10	3	20	9	29
SZ MUC negativ	G0	1	0	1	0	2	12	14
SZ AA positiv	G1/G2/G3	0	1	11	2	14	2	16
SZ AA negativ	G0	7	0	0	1	8	19	27
AFZ positiv	deutlich/stark	4	1	9	2	16	9	25
AFZ negativ	gering/kein	3	0	2	1	6	12	18

Aus diesen Absolutwerten ergeben sich folgende Sensitivitäten und Spezifitäten am identischen Patientengut bzw. mit vollständigem Datensatz:

Tab. 3 - 6: Sensitivitäten und Spezifitäten mit vollständigem Datensatz (43 Proben)

	Sensitivität [%]					Spezifität [%]
	G1	G2	G3	CIS	Total	Total
WLE	100	100	100	100	100	66,7
AFE	100	100	90,9	100	95,4	42,8
SZ MUC	85,7	100	90,9	100	95,4	57,1
SZ AA	0	100	100	66,7	63,6	90,4
AFZ	57,1	100	81,8	66,7	72,7	57,1

Anm.: 0 bei SZ Aa siehe Kap. 3.1.4.

3.2. Ergebnisse des Spektrometrieverfahrens

3.2.1. Sensitivität und Spezifität der Spektrometrie

Von den 92 Proben, die spektrometrisch gemessen wurden, mussten 36 Fällen ausgeschlossen werden, bei denen entweder der Fit-Wert nicht nachvollziehbar war oder die Signalstärke zu gering war. Festgelegt wurde hierbei, dass das Spektrum verworfen wird, wenn der

Fit-Parameter der Signalintensität (PpIX + Autofluoreszenz) < 20

war.

Nicht nachvollziehbare Fit-Werte waren bei extrem blutigen Proben zu beobachten; z.B. war in einem Fall das PpIX-Maximum zwar deutlich erkennbar, aber nicht vollständig ausgeblichen oder die Maxima lagen in einem anderen Wellenlängenbereichen (z.B. 610nm).

Es verbleiben 56 zu beurteilende Proben. Aus diesen 56 sind 9 Proben ohne eindeutigen histologischen Befund, 23 eindeutig benigne (G0) und 24 maligne (davon 6 G1-Befunde, 2 G2-Befunde, 11 G3-Befunde und 5 CIS-Befunde).

In den folgenden Abbildungen werden nun ausschließlich in Abhängigkeit des histologischen Befundes „benigne versus maligne“ die Stärke des spektrometrisch gemessenen PpIX-Signals, d.h. des entsprechenden Fit-Wertes aufgetragen.

Signifikanz der PpIX-Intensität

Zunächst sei darauf hingewiesen, dass im Fall der benignen Proben zumindest theoretisch für die PpIX-Fluoreszenz ein Wert von 0 zu erwarten wäre. Die von 0 abweichende und in der Praxis beobachtete PpIX-Fluoreszenz wird von weiterem, in der Probe enthaltenem, fluoreszierendem Material verursacht.

Dargestellt sind jeweils der vollständige Boxplot zur Übersicht, sowie ein vergrößerter Ausschnitt des Interquartilbereichs (Zoom). Zu den Ausreiß- und Extremwerten wurden außerdem die Patientennummern in den Boxplots eingetragen, um einzelne Proben bei Bedarf identifizieren zu können.

a) 56 Proben mit histologisch gesicherten Befunden

Fig. 3 - 5: Ergebnis der 56 Proben mit histologisch gesicherten Befunden - vollständiger Boxplot

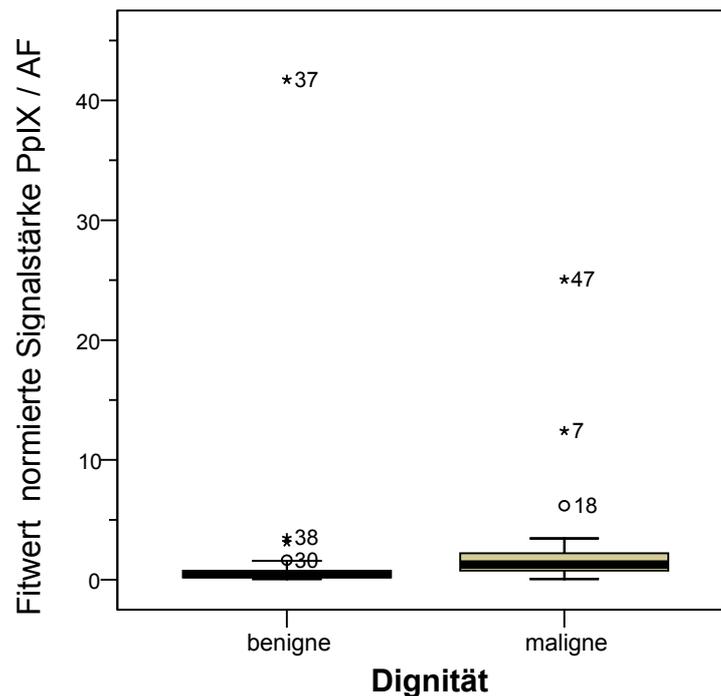
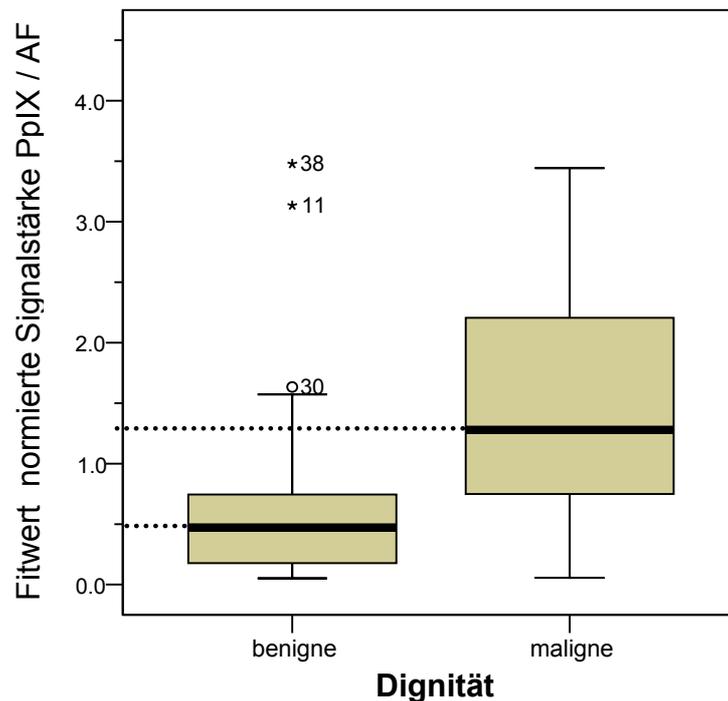


Fig. 3 - 6: Ergebnis der 56 Proben mit histologisch gesicherten Ergebnissen - Interquartilsbereich (Zoom)



Die größere Spannweite des Interquartilbereichs der Fit-Werte der malignen Proben spiegelt das Zusammenfassen der Beurteilungskriterien G1, G2, G3 und suspekt zu „positivem Befund“ wieder, da die unterschiedlichen Stadien unterschiedlich starke Rot-Fluoreszenz aufweisen.

In Bezug auf die 56 Proben mit histologisch gesicherten Ergebnissen und dem Fit-Wert der normierten Signalstärke PpIX/AF beträgt die berechnete asymptotische Signifikanz (2-seitig) $p = 0,001$.

Es wird als Sicherheitsschwelle bzw. Signifikanzniveau eine Wahrscheinlichkeit von 5% festgelegt, was einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ entspricht.

Die berechnete asymptotische, zweiseitige Signifikanz liefert den Wert $p = 0,001$, was gleichbedeutend mit einem Signifikanzwert $p = 0,0005$ beim einseitigen Test ist. Für die Analyse der 56 Proben bedeutet dies, dass die Nullhypothese H_0 mit einem Risiko kleiner 5% zurückgewiesen werden darf bzw. dass bei den 56 Proben mit einer Sicherheit von mehr als 95% ein signifikanter Unterschied zwischen den Fitwerten der malignen und denen der benignen Proben besteht.

b) 30 Proben mit histologisch gesicherten Befunden

Fig. 3 - 7: Ergebnis der 30 Proben im direkten Vergleich mit den Spektrometerdaten - vollständiger Boxplot

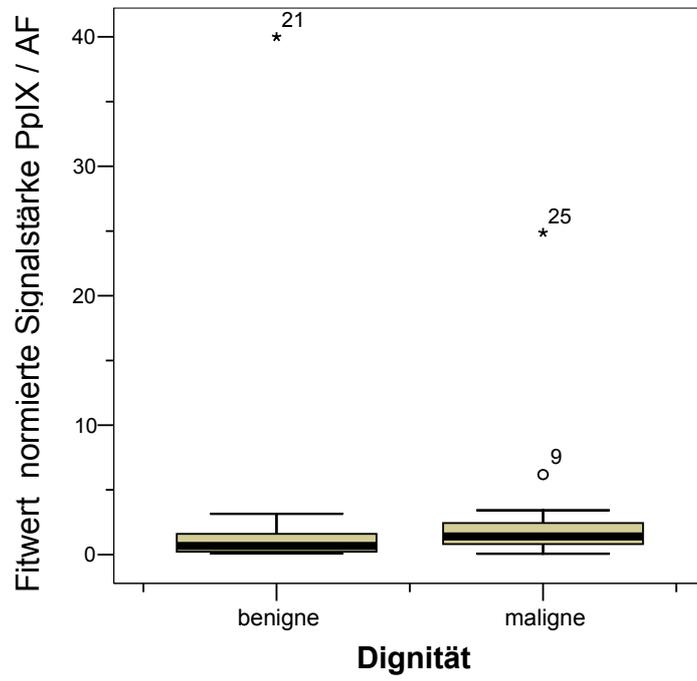
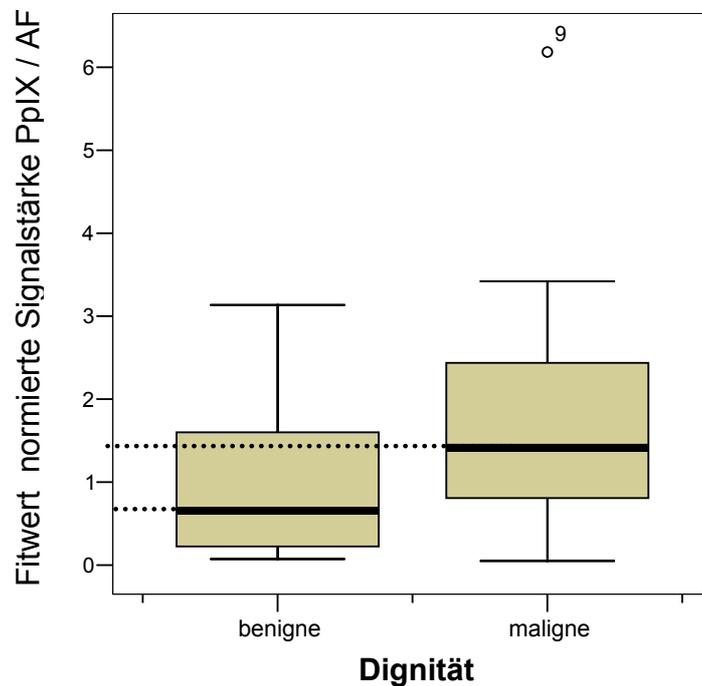


Fig. 3 - 8: Ergebnis der 30 Proben im direkten Vergleich mit den Spektrometerdaten - Interquartilsbereich (Zoom)



Tab. 3 - 7: Mann-Whitney-U-Test der 30 Proben im direkten Vergleich mit den Spektrometerdaten

	Fitwert der normierten Signalstärke PpIX / AF
Mann-Whitney-U-Test	73.000
asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.105
exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	.110

a Gruppenvariable: benigne_maligne Befunde

i) Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

Aus $p = 0,105$ bzw. $0,110$ ergibt sich für die einseitige Signifikanz der Wert $p = 0,0525$, bzw. der Wert $p = 0,055$, falls die exakte Signifikanz zugrunde gelegt wird. Beide Werte liegen knapp über dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$, so dass für die 30 Proben die Hypothese, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Fit-Werten der malignen und denen der benignen Proben besteht, nicht mehr mit einer Sicherheit von 95% angenommen werden darf.

ii) Signifikanzniveau $\alpha = 0,1$

Die Werte der einseitigen Signifikanz $p = 0,0525$, bzw. $p = 0,055$ (exakte Signifikanz), liegen jedoch unter dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,1$, so dass für die 30 Proben die Hypothese, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Fitwerten der malignen und denen der benignen Proben besteht, zumindest mit einer Sicherheit von 90% angenommen werden darf.

ROC-Kurven der normierten PpIX-Intensität und Area under the Curve (AUC)

a) 56 Proben mit histologisch gesicherten Befunden

Aus Tab. 3 – 6 wurden zunächst die folgenden Wertepaare erzeugt, die dann zum Vergleich der Diagnosemethoden von Hand in Fig. 3 – 9 eingetragen wurden:

Tab. 3 - 8: AUC der 56 Proben mit histologisch gesicherten Befunden

Fläche	Standardfehler (a)	asymptotische Signifikanz (b)	asymptotisches 95%-Konfidenzintervall	
			Untergrenze	Obergrenze
0,76	0,067	0,001	0,613	0,874

(a): unter der nichtparametrischen Annahme

(b): Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0.5

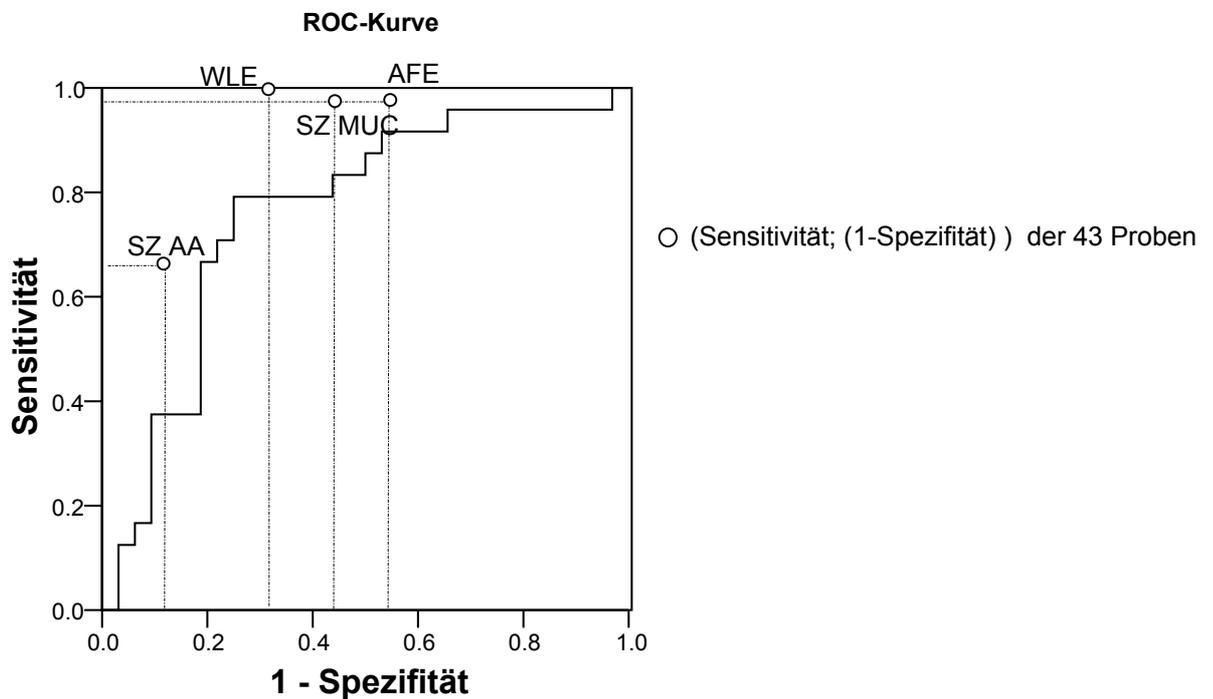
Allgemein formuliert weist ein diagnostischer Test Trennschärfe auf, wenn sich die Kurve signifikant von der Diagonalen (links unten - rechts oben) unterscheidet. Im Idealfall (100%ige Trennschärfe) liegt die Kurve auf der linken bzw. oberen Begrenzungs-Seite des umschließenden Quadrates.

Analog zur SPSS-Analyse der Fit-Werte ergibt sich bei der AUC die asymptotische, zweiseitige Signifikanz mit dem Wert $p = 0,001$, was wiederum gleichbedeutend mit einem Signifikanzwert $p = 0,0005$ ist. Für ein $\alpha = 0,05$ besitzt die Fluoreszenz-Spektrometrie als Diagnosemethode bei den 56 Proben eine statistisch signifikante Trennschärfe.

Tab. 3 - 9: Sensitivität und (1-Spezifität) der 43 Proben mit vollständigem Datensatz

	1-Spezifität Total	Sensitivität Total
WLE	0,333	1
AFE	0,572	0,954
SZ MUC	0,429	0,954
SZ AA	0,096	0,636

Fig. 3 - 9: ROC-Kurve der normierten PplX-Intensität der 56 Proben mit histologisch gesicherten Ergebnissen und mit Werten von WLE, SZ, AFE der 43 Proben mit vollständigem Datensatz



b) 30 Proben mit histologisch gesicherten Befunden

Aus Tab. 3 – 13 wurden wiederum zum Vergleich mit den Ergebnissen in Fig.3 - 10 die folgenden Wertepaare erzeugt:

Tab. 3 - 10: AUC der 30 Proben mit Spektrometerdaten und mit WLE, AFE, SZ MUC, SZ AA

Fläche	Standardfehler (a)	asymptotische Signifikanz (b)	asymptotisches 95%-Konfidenzintervall	
			Untergrenze	Obergrenze
0,674	0,104	0,105	0,471	0,877

(a): unter der nichtparametrischen Annahme

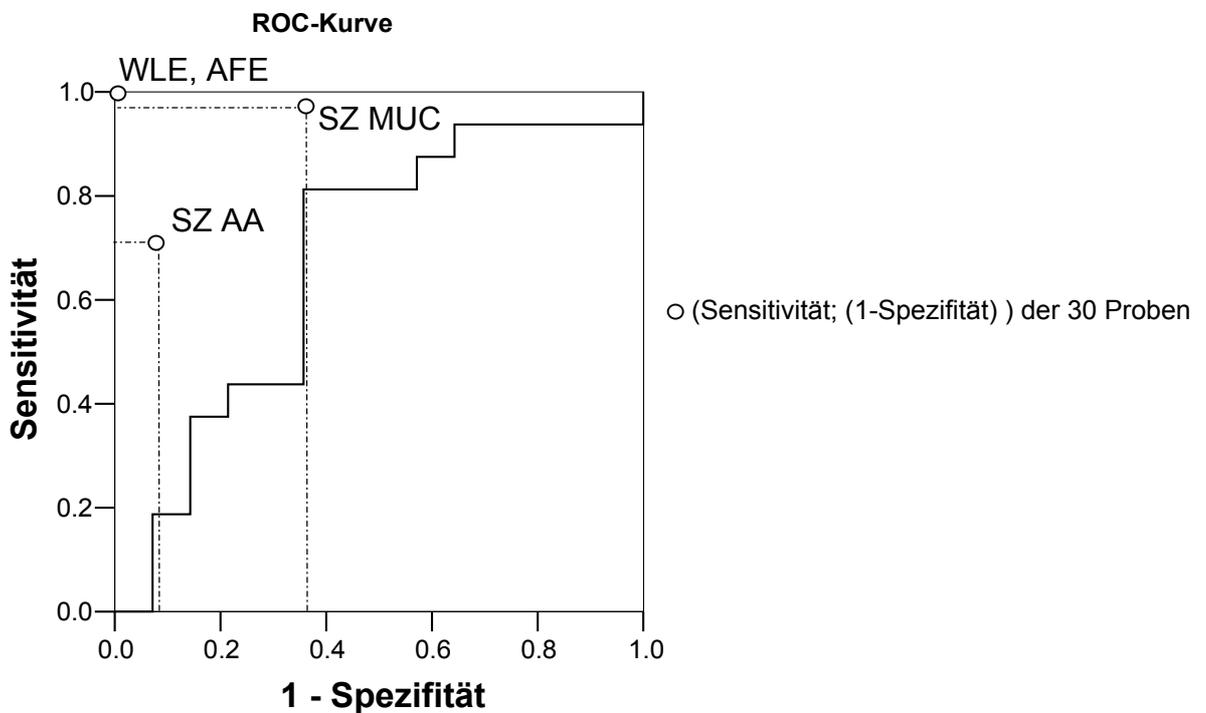
(b): Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0.5

Hier gilt ebenfalls das Gleiche wie bei der Auswertung der Fit-Werte: Aus $p = 0,105$ ergibt sich für die einseitige Signifikanz der Wert $p = 0,0525$, welche knapp über dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ liegt, so dass für die 30 Proben die Hypothese, dass die Fluoreszenz-Spektrometrie als Diagnosemethode auch bei den 30 Proben eine statistisch signifikante Trennschärfe besitzt, nicht mehr mit einer Sicherheit von 95% angenommen werden darf.

Tab. 3 - 11: Sensitivität und (1-Spezifität) der 30 Proben mit Spektrometerdaten und mit WLE, AFE, SZ MUC, SZ AA

	1-Spezifität	Sensitivität
	Total	Total
WLE	0	1
AFE	0	1
SZ MUC	0,357	0,937
SZ AA	0,072	0,687

Fig. 3 - 10: ROC-Kurve der normierten PpIX-Intensität der 30 Proben mit Spektrometerdaten und mit Werten von WLE, SZ, AFE



3.2.2. Die Standarddiagnoseverfahren - Proben mit vollständigem Datensatz und auswertbaren Spektrometriedaten

Nun wurden mittels des Visual-Basic-Satistikprogramms als Untermenge alle vollständigen Daten extrahiert. Dies erlaubt nun alle Verfahren direkt miteinander zu vergleichen. Dieses Kriterium ist bei 30 Proben erfüllt:

Abb.3 - 4: Extraktion der vollständigen Datensätze

Endoskopie Mü W-Skopie. Bef.	Endoskopie Mü PDD-Befund	München Zytologie	Pathologie Aa Zytologie	Pathologie Aa Histo G - Bef.	Mikroskopie Mü Zellkonzentration
pos	pos	G0	G0	G0	1 bis 5 Einzel
neg	neg	Suspekt	G2	G1	5 bis 50 Einzel
		G1	G3	G2	1 bis 5 Klumpen
		G2		G3	i bis 50 Klumpen
		G3		CIS	

Anm.: i heißt 5, G1 bei Zyto-AA ist bei den 56 nicht mehr vorhanden.

Tab. 3 - 12: Häufigkeit der Befunde bei den 30 Proben im direkten Vergleich mit den Spektrometerdaten

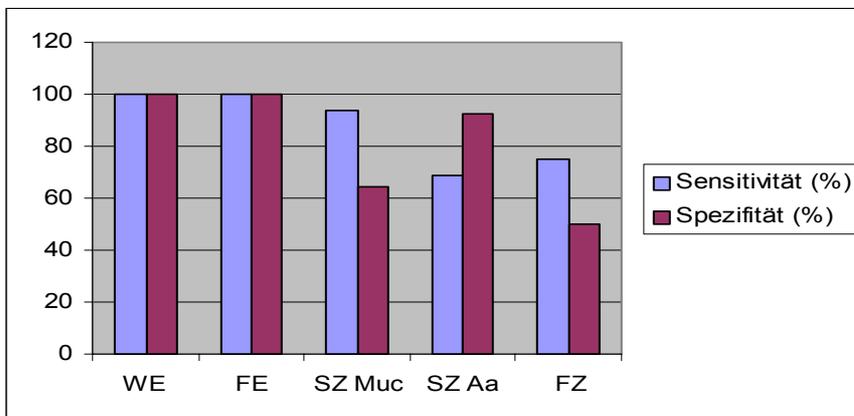
Untersuchungs- verfahren	Kriterien	alle TU	G0	Gesamt
Histologie		16	14	30
WLE positiv	Positiv	16	6	22
WLE negativ	Negativ	0	8	8
AFE positiv	Positiv	16	9	25
AFE negativ	Negativ	0	5	5
SZ MUC positiv	suspekt/G1/G2/G3	15	5	20
SZ MUC negativ	G0	1	9	10
SZ AA positiv	G1/G2/G3	11	1	12
SZ AA negativ	G0	5	13	18
AFZ positiv	deutlich/stark	12	7	19
AFZ negativ	gering/kein	4	7	11

Anm.: G1 gibt es in der SZ München und Aachen bei den 30 nicht mehr

Tab. 3 - 13: Sensitivität und Spezifität der 30 Proben im direkten Vergleich mit den Spektrometerdaten

Vollständiger Datensatz aller Untersuchungsverfahren	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
WLE	100	100
AFE	100	100
SZ MUC	93,7	64,3
SZ AA	68,7	92,8
AFZ	75	50

Fig. 3 - 11: Sensitivität und Spezifität der 30 Proben im direkten Vergleich mit den Spektrometerdaten - Balkendiagramm



4. Diskussion

4.1. Patientenauswahl und Ablauf

Zur Diagnostik des Harnblasenkarzinoms werden derzeit verschiedene Verfahren, z.B. immunologische Tumormarker, untersucht und entwickelt, um die Probleme der Invasivität der Zystoskopie und die Subjektivität der Urinzytologie zu umgehen (siehe Kap. 1.6.). Diese Arbeit untersucht die Wertigkeit der spektralen Analyse von Blasenspülzytologien nach Instillation von 5-Aminolävulinsäure und vergleicht die Ergebnisse mit herkömmlichen Methoden. Das Ziel ist ein einfaches, sensitives, objektives und minimal invasives Verfahren zur Erkennung von Blasentumoren und zur Verlaufskontrolle zu finden.

Bei der ex vivo Diagnostik ist eine Standardisierung, die sorgfältige Probeentnahme sowie die Lagerung des Untersuchungsmaterials sehr wichtig. Blutbeimengungen und Entzündungszellen können Ungenauigkeiten hervorrufen. Ein weiteres Problem bei unserer Patientenklientel war das gehäufte Auftreten von degenerativen, entzündlichen und dysplastische Zellveränderungen nach Instillationsbehandlung, die die Sensitivität und Spezifität beeinflussen.

Bei unseren Untersuchungen war die zystoskopische Blasenspülung Voraussetzung zur Gewinnung einer zellreichen Spülflüssigkeit, die eine effiziente spektroskopische Auswertung gestattete.

Zur präventiven Früherkennungsdiagnostik wäre allerdings eine Weiterentwicklung des Verfahrens mit Spontanurin wegen der geringeren Invasivität sinnvoll.

Durch die endoskopische Uringewinnung kommt es häufig zu einer Mikrohämaturie, d.h. es finden sich im Untersuchungsmaterial zahlreiche rote Blutkörperchen, die die optische Auswertung weiter erschweren.

4.2. Vergleich der beiden Standardverfahren WLE und AFE

Die Wertigkeit der 5-ALA induzierten Fluoreszenzdiagnostik wurde in den letzten Jahren in einer Reihe von klinischen Studien untersucht.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Sensitivitäten und Spezifitäten von Weißlicht-Endoskopie und Fluoreszenz-Endoskopie unterscheiden sich von den Daten, welche bisher von anderen Arbeitsgruppen publiziert wurden:

Tab. 4 - 1: Bisher ermittelte Sensitivitäten und Spezifitäten der WLE und AFE

Name	Jahr	Sensitivität WLE [%]	Spezifität WLE [%]	Sensitivität AFE [%]	Spezifität AFE [%]
Kriegmair	1996	72,7	68,5	97	67
Jichlinski	1997	---	---	89	57
Filbeck	1999	67	66	96	67
Koenig	1999	84	89	87	59
Ehsan	2001	---	---	98	65
Dominicis	2001	18	82	87	63
Zaak	2002	---	---	97	65

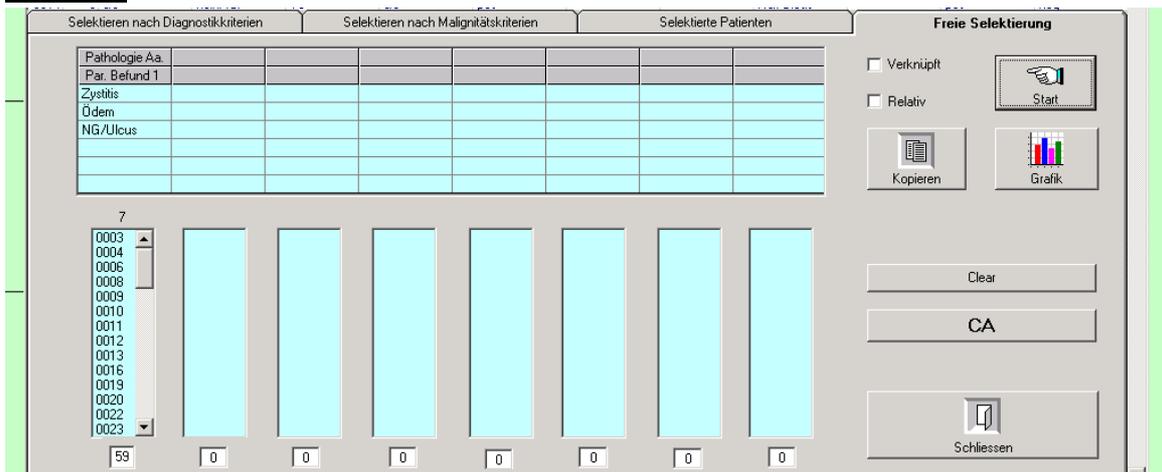
Tab. 4 - 2: Sensitivitäten und Spezifitäten der WLE und AFE gemäß der vorl. Arbeit

vorliegende Arbeit:		Sensitivität WLE [%]	Spezifität WLE [%]	Sensitivität AFE [%]	Spezifität AFE [%]
92 Proben	2002	94,7	61,1	92,1	46,3
43 Proben	2002	100	66,7	95,4	42,8
30 Proben	2002	100	100	100	100

So lagen die Sensitivitäten der Weißlicht- und der Fluoreszenz-Endoskopie deutlich über dem Durchschnitt der übrigen Studien. Die bei unserer Untersuchung erreichten **Sensitivitäten** von nahezu 100% in der Weißlicht- und insbesondere in der Fluoreszenz-Endoskopie erklären sich aus der Tatsache, dass Biopsien nur dann entnommen wurden, wenn auch Auffälligkeiten in der Endoskopie gesehen wurden.

Die **Spezifitäten** der Weißlicht- und der Fluoreszenz-Endoskopie lagen bei unserer Untersuchung jedoch unter den Werten der in der Tab. 4-1 aufgeführten Ergebnissen. So fand sich bei der von uns untersuchten Klientel eine hohe Anzahl (64%) von Nebenbefunden wie Entzündungen, Ödeme, Ulcera und Narbengewebe, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können.

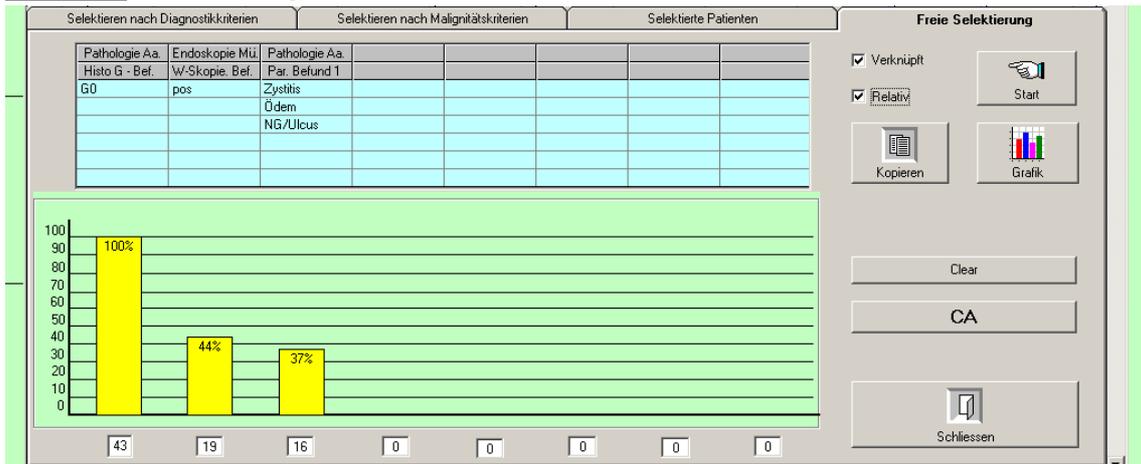
Abb. 4 - 1: Anzahl aller Nebenbefunde der 92 Proben



Beispielsweise gab es in der Weißlichtendoskopie 19 falsch-positive Befunde bei histologisch gesichertem G0-Befund, ausgehend von den ursprünglich genommenen 92 Proben.

Untersucht man diese falsch-positiven Befunde näher, so zeigt sich, dass bei 16 der 19 bzw. bei 84% der Patienten eine Zystitis, Ödeme oder Ulcera der Blasenwand nebenbefundlich diagnostiziert wurden (s. Abb. 4 - 1), was u.a die niedrige Spezifität erklärt.

Abb. 4 - 2: Falsch-positive Befunde und Nebenbefunde der 92 Proben bei der WLE



Analog werden die falsch-positiven AFE-Befunde bezüglich der ausschließlichen G0-Befunde in Abhängigkeit der o.g. Nebenbefunde dargestellt (s. Abb. 4 - 3). Deutlich erkennbar ist auch hier die hohe prozentuale Korrelation zwischen Entzündungszeichen und falsch-positiven Befunden. Auch hier liegt bei 22 von 26 falsch-positiven Befunden nebenbefundlich eine Zystitis, Narbengewebe oder Ulcera vor.

Es ist bekannt, dass sich ein lymphozytäres Entzündungsinfiltrat im Urothel PpIX-positiv darstellen kann (Zaak et al.,2002), womit die geringere Spezifität bei den o.g. nicht-tumorösen Nebendiagnosen erklärbar wäre.

Dies wurde auch durch die Untersuchungen von *Tauber* bestätigt (Tauber S et al.,2005).

Abb.4 - 3: Falsch-positive Befunde und Nebenbefunde der 92 Proben bei der AFE

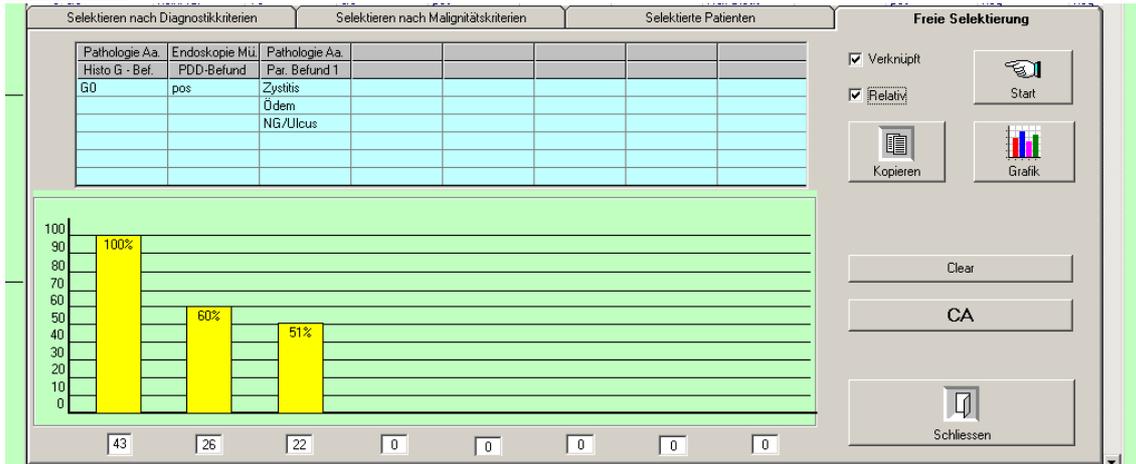


Abb. 4 - 4: Richtig-negative Befunde und Nebenbefunde der 92 Proben bei der WLE



Abb. 4 - 5: Richtig-negative Befunde und Nebenbefunde der 92 Proben bei der AFE



Die relative Häufigkeit der Entzündungen bei den falsch positiven Befunden beträgt sowohl bei der WLE als auch bei der AFE 84%, während bei den richtig negativen Befunden der WLE der Entzündungsanteil bei 70% und bei der AFE bei 64%, liegt.

4.3. Ergebnisse der Fluoreszenz-Zytologie (AFZ)

4.3.1. Störgrößen

Eine Schwäche der Fluoreszenz-Zytologie in unserer Untersuchung liegt in der nicht-standardisierten Probeentnahme und subjektiven Beurteilung der Fluoreszenz-Bilder.

Erschwerend kommt hinzu, dass das Einordnen aufgrund des raschen Ausbleichens der PpIX Fluoreszenz relativ schnell geschehen muss. Unter dem Mikroskop ist, abhängig von der Beleuchtungsstärke, unter Umständen bereits nach wenigen Sekunden die Intensität des Signals auf etwa die Hälfte abgesunken, wobei die Ausbleichgeschwindigkeit von verschiedenen, weiteren, noch nicht näher untersuchten Faktoren abzuhängen scheint (Stepp H et al., 1994).

Eine weitere Fehlerquelle ist das Ausbleichen der Zellen in situ durch die Weißlicht-Endoskopie und die AFE, wenn die Untersuchung der Blasenspülflüssigkeit nicht sofort durchgeführt wurde.

Wird die Spülflüssigkeit außerdem nicht lichtgeschützt gelagert und transportiert kann es insbesondere unter dem im OP eingesetzten Neonlicht zu einer Ausbleichung des Zellmaterials kommen.

Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass in der zu untersuchenden Spülflüssigkeit eine unterschiedliche Anzahl und unterschiedliche Arten von Entzündungszellen zu finden sind, was das Untersuchungsergebnis ebenfalls erheblich beeinträchtigt, da diese Zellen, sowie auch Verunreinigungen in der Probe unterschiedlich fluoreszieren können.

4.3.2. Ergebnisse der Fluoreszenz-Zytologie im Vergleich

Unter Berücksichtigung des vollständigen Datensatzes (43 Proben) ergab unsere Untersuchung zur Erkennung maligner Zellen für die Fluoreszenz-Zytologie eine Sensitivität von 57,1% und eine Spezifität von 57,1%. Im Vergleich erreichten *Pytel* und *Schmeller* eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 75% (Pytel A et al., 2002). *Tauber* ermittelte eine Sensitivität von 86% und eine Spezifität von 75% (Tauber S. et al., 2003). Diese Werte liegen deutlich höher als die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Werte für die Sensitivität bzw. die Spezifität der AFZ. Dies ist wahrscheinlich auf die o.g. Störgrößen zurückzuführen.

4.4. Quantitative Spektrometrie

4.4.1. Allgemeines

Während *Pytel* und *Schmeller*, wie auch *Malini*, Hypericin als Photosensitizer aufgrund der längeren Ausbleichzeit bevorzugten (Malini O. et al., 2003) und den Ausbleicheffekt vernachlässigten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Quantifizierung des Ausbleicheffekts genutzt, um mittels einer quantitativen, spektralen Diagnostik bereits eine geringe Anzahl von Tumorzellen identifizieren zu können.

In der eigenen Arbeitsgruppe waren bereits Voruntersuchungen auf der Basis fluoreszenzmikroskopischer und subjektiver Auswertung spülzytologischer Proben durchgeführt worden (Tauber S. et al., 2005).

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Versuch zur Quantifizierung und damit Objektivierung fluoreszenzmarkierter Spülzytologieproben untersucht werden. Neben der Objektivierung war auch eine höhere Nachweisempfindlichkeit und Reproduzierbarkeit erwartet worden.

Durch die spektrale Messung ist es möglich, die Fluoreszenz des gesamten zellulären Probenmaterials zu erfassen, zu differenzieren und zu quantifizieren, während die Beurteilung der fluoreszierenden Zellen unter dem Mikroskop auf wenige Zellen innerhalb einzelner Gesichtsfelder beschränkt bleibt.

Ausgehend von spektralen Voruntersuchungen zur Analyse der Fluoreszenz der PpIX-positiven Zellen, gelangten wir zu dem Schluss, dass eine wellenlängen-spezifische Auswertung nötig ist, um die verschiedenen spektralen Einflussgrößen zuverlässig trennen bzw. identifizieren zu können. Diese wellenlängen-spezifische quantitative Auswertung der Fluoreszenzspektren war u.a. Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

Der zugrunde gelegte Fit-Algorithmus mit drei Fit-Parametern zur Auswertung eines unter Ausnutzung des Ausbleicheffekts generierten Differenzspektrums, basierend auf der grünen Autofluoreszenz, auf einer roten Bande mit Maximum bei 620nm und auf der PpIX-Fluoreszenzbande bei 635nm, erscheint beim jetzigen Stand der Forschung ausreichend, um das Ausbleichverhalten der fluoreszierenden Tumorzellen darstellen zu können. Dabei beschreiben die jeweiligen Fit-Parameter quantitativ den absoluten Betrag bzw. die Intensität einer jeden Bande.

So konnte aus den Spektren mit einem starken PpIX-Signal geschlossen werden, dass eine Bestrahlung mit $20\text{J}/\text{cm}^2$ das PpIX-Signal auf unter 10% ausbleicht. Unter der Annahme, dass der Betrag der ausbleichenden Komponente des Autofluoreszenzpeaks proportional zur gesamten Zelldichte ist, wurde dieses Signal verwendet, um das Porphyrin-Signal bezüglich der Zelldichte zu normieren.

4.4.2. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Es wurden 92 Proben spektrometrisch vermessen. Von diesen Spektren wurden 36 verworfen, weil entweder der Fit-Wert nicht nachvollziehbar (6 Proben) oder die Signalstärke zu gering war (30 Proben), so dass 56 zu beurteilende Proben verblieben, wovon wiederum nur für 30 Proben die vollständige Datensätze mit den Ergebnissen aller 6 Untersuchungsmethoden (WLE, AFE, SZ MUC, SZ AA, AFZ, spektrale FZ) zur Verfügung standen.

Zunächst wurde zu der ROC-Kurve der Spektrometerdaten der 56 Proben mit histologisch gesicherten Ergebnissen per Hand die Sensitivitäts- und

Spezifitätsdaten der 43 Proben mit vollständigem Datensatz – aber nicht am identischen Patientengut – eingetragen, um die verschiedenen diagnostischen Methoden beurteilen zu können.

Sowohl aus Fig. 3 – 9 als auch aus der Betrachtung der Fläche unter der Kurve (Area under the Curve) können zum jetzigen Zeitpunkt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die folgenden Schlüsse gezogen werden:

- die Aussagekraft der AFZ bewegt sich in der Nähe der AFE
- AFZ (im jetzigen Stadium) ist WLE und SZ unterlegen
- die AUC liegt an der Grenze, an welcher ein Test im allgemeinen noch als klinisch relevant bzw. brauchbar angesehen wird

Die Ergebnisse der 30 Proben mit vollständigem Datensatz und Spektrometriedaten werden im Folgenden diskutiert.

Unter den 30 Proben befanden sich aufgrund des histologischen Befunds 16 positive Proben. Von diesen 16 Proben zeigten 12 Proben bei der AFZ starke Fluoreszenz bzw. die charakteristischen Porphyrin-Banden, bei den verbleibenden 4 malignen Proben konnte keine entsprechende Fluoreszenz gemessen werden, was bisher nicht befriedigend erklärt werden kann. Die 16 positiven Befunde mittels AFE stimmen mit den positiven 16 Befunden der histologischen Untersuchung überein.

Die Ergebnisse der spektrometrischen Auswertung der 56 und der 30 Proben sehen wie folgt aus: Für die Analyse der 56 Proben bedeutet dies, dass die Nullhypothese H_0 mit einem Risiko kleiner 5% zurückgewiesen werden darf bzw. dass bei den 56 Proben mit einer Sicherheit von mehr als 95% ein signifikanter Unterschied zwischen den Fit-Werten der malignen und denen der benignen Proben besteht.

Die Auswertung der 56 Proben mit histologisch gesicherten Befunden lässt mit $p = 0,0005$ ein Signifikanzniveau von mehr als 95% für das Zurückweisen der Nullhypothese zu. Es besteht eindeutig ein signifikanter Unterschied zwischen den Medianen der malignen und denen der benignen Proben.

Die Auswertung der 30 Proben im direkten Vergleich mit den Spektrometriedaten ergab ein p-Wert von 0,0525 bzw. 0,055. Mathematisch exakt betrachtet liegen beide Werte über 0,05, somit ist es nicht mehr möglich, die Nullhypothese mit einer Sicherheit von mehr als 95% zurückzuweisen.

Es kann aber davon ausgegangen werden, dass auch für die 30 Proben ein signifikanter Unterschied zwischen den Medianen der malignen und benignen Proben besteht und dass die entsprechende Sicherheit etwas kleiner sein sollte als 95%: Betrachtet man das Signifikanzniveau $\alpha = 0,10$, so sind die ermittelten p-Werte für die 30 Proben deutlich kleiner, so dass man daraus eine Art obere Grenze bestimmen könnte: Die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Mediane von malignen und benignen Proben unterscheiden, liegt über 90%, in etwa bei 95%.

4.4.3. Ergebnisse und Vergleich mit anderen Diagnosemethoden

Obwohl der Unterschied der PpIX-Signale von malignen gegenüber benignen Proben signifikant war ($p=0,0005$ / 56 Proben bzw. $p=0,05$ / 30 Proben), gibt es eine erhebliche Überlappung bei den Werten, was die Werte für die Fläche unter der Kurve (area under the curve) im ROC-Plot von 0.76 bei den 56 Proben und 0.674 bei den 30 Proben ergab.

Unsere Testergebnisse für die quantitative Spektrometrie mit einem AUC-Wert von 0.760 zumindest bei den 56 Proben mit histologisch gesicherten Ergebnissen sind als positiv einzustufen: Die ROC-Kurve liegt im Sensitivitätsbereich von mehr als 75%, die Diagnosemethode ist daher als klinisch verwertbar zu beurteilen.

Der AUC-Wert von 0,674 bei den 30 Proben mit Spektrometerdaten liegt dagegen etwas niedriger, was aber auch durch die deutlich geringere Stichprobenzahl bedingt sein könnte. Trotz der geringen Stichprobenzahl liegt die ROC-Kurve jedoch deutlich über dem unteren Grenzbereich einer Sensitivität von 50%, unterhalb dessen die Diagnosemethode als klinisch nicht relevant zu verwerfen wäre.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst an insgesamt 90 Patienten (92 Proben) fünf verschiedene Diagnoseverfahren (WLE, AFE, SZ MUC, SZ AA, AFZ) beim Harnblasenkarzinom verglichen. Als Bezugsgröße dienten die histologischen Befunde.

Tabelle 5-1 zeigt die berechneten Daten bezogen auf die Tumorstadien:

Tab. 5 - 1: Sensitivitäten und Spezifitäten der Standarddiagnoseverfahren der 92 Proben

	Sensitivität [%]					Spezifität [%]
	G1	G2	G3	CIS	Total	Total
WLE	100	75	100	87,5	94,7	61,1
AFE	90	75	93,7	100	92,1	46,3
SZ MUC	70	75	81,2	87,5	78,9	59,3
SZ AA	0	50	81,2	50	50	75,9
AFZ	50	50	68,7	50	57,9	46,3

Anm.: 0 von 10 G1-Tumoren wurden durch die SZ Aachen erkannt, vgl. Kap. 3.1.4.

Diese und die nachfolgend angeführten Werte variieren, da aufgrund der Nichtverfügbarkeit von Daten für verschiedene Fragestellungen unterschiedliche Untermengen isoliert werden mussten.

49 Proben mit unvollständigen Daten wurden ausgeschlossen, so dass 43 eindeutig zu beurteilende Proben, also mit negativen oder positiven Befunden, verblieben. Es wurden nun die Werte bei vollständigem Datensatz berechnet (Tab.5-2):

Tab. 5 - 2: Sensitivitäten und Spezifitäten mit vollständigem Datensatz (43 Proben)

	Sensitivität [%]					Spezifität [%]
	G1	G2	G3	CIS	Total	Total
WLE	100	100	100	100	100	66,7
AFE	100	100	90,9	100	95,4	42,8
SZ MUC	85,7	100	90,9	100	95,4	57,1
SZ AA	0	100	100	66,7	63,6	90,4
AFZ	57,1	100	81,8	66,7	72,7	57,1

Anm.: 0 von 7 G1-Tumoren wurden durch die SZ Aachen erkannt, vgl. Kap. 3.1.4.

Nachdem die AFZ keine Überlegenheit zu den übrigen zytologischen Untersuchungen zeigte – was wir eigentlich erwartet hätten – überprüften wir die ursprünglich 92 5-ALA induzierten Fluoreszenz-Proben zusätzlich spektrometrisch. Dabei mussten 36 Proben ausgeschlossen werden, bei denen der Fit-Wert nicht nachvollziehbar oder die Fluoreszenz-Signalstärke zu gering war (siehe Kap. 3.2.1.).

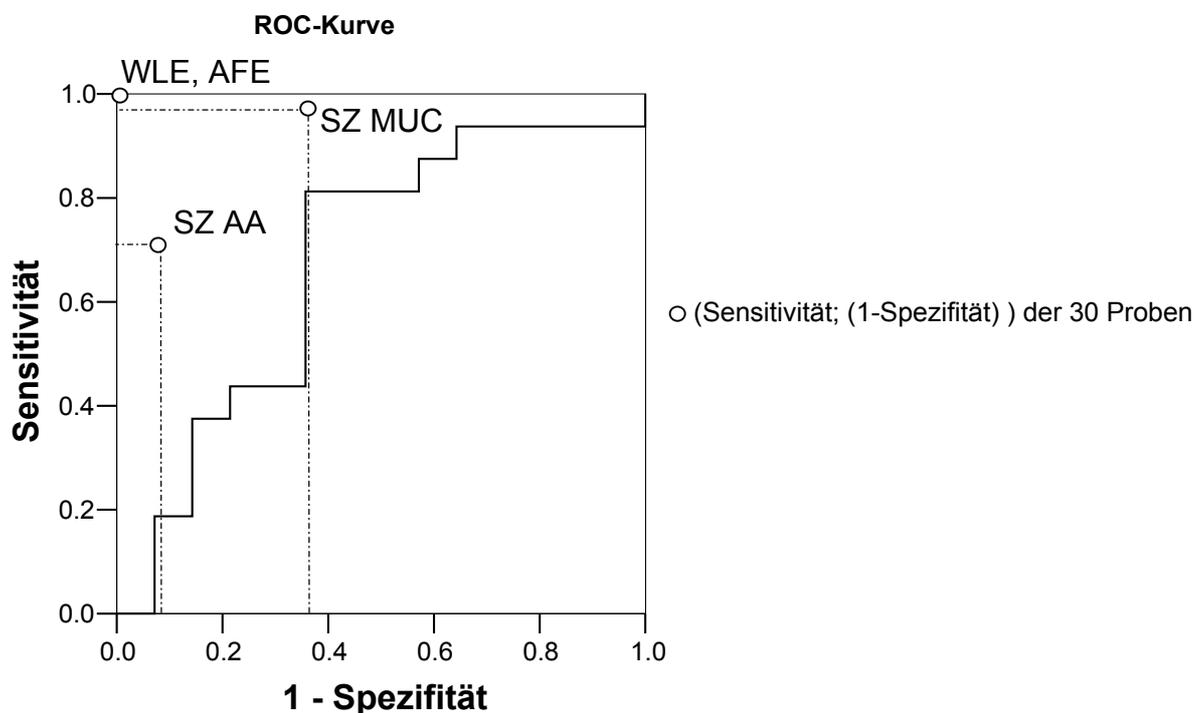
Die Ergebnisse der Spektrometrie wurden im direkten Vergleich den berechneten Daten der fünf anderen Untersuchungsverfahren gegenübergestellt (Tab. 5-3). Von den 56 eindeutigen Ergebnissen der Spektrometrie, d.h. die Fitwerte waren nachvollziehbar und genügend intensiv, lagen bei 30 Proben vollständige Datensätze zu allen anderen Verfahren vor.

Tab. 5 - 3: Sensitivitäten und Spezifitäten im direkten Vergleich (30 Proben)

Vollständiger Datensatz aller Untersuchungsverfahren	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
WLE	100	100
AFE	100	100
SZ MUC	93,7	64,3
SZ AA	68,7	92,8
AFZ	75	50

Anhand der ROC-Kurven (Fig. 5-1) wurden die Sensitivitäten und Spezifitäten aller Untersuchungsverfahren mit der quantitativen Spektrometrie verglichen.

Fig. 5 - 1: ROC-Kurve der normierten PpIX-Intensität der 30 Proben mit Spektrometerdaten und mit Werten von WLE, SZ, AFE



Tab. 5 - 4: AUC der 30 Proben mit Spektrometerdaten und mit WLE, AFE, SZ MUC, SZ AA

Fläche	Standardfehler (a)	asymptotische Signifikanz (b)	asymptotisches 95%-Konfidenzintervall	
			Untergrenze	Obergrenze
0,674	0,104	0,105	0,471	0,877

(a): unter der nichtparametrischen Annahme
 (b): Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0.5

Bei den 30 Proben zeigte sich, dass die quantitative Spektrometrie beim jetzigen Entwicklungsstand den Standard-Diagnosemethoden geringfügig unterlegen zu sein scheint. Betrachtet man aber die AUC-Werte (Tab. 5-4) kann man feststellen, dass die quantitative Spektrometrie, insbesondere auch aufgrund der Nichtinvasivität des Diagnoseverfahrens, eine vielversprechende Methode zur Diagnostik des Harnblasenkarzinoms darstellt.

6. Ausblick und Verbesserungsvorschläge

Weltweit wird an Methoden gearbeitet, die in der Lage sind, objektiv und weniger invasiv als die derzeitige Zystoskopie Harnblasentumore zu diagnostizieren. Die in dieser Arbeit untersuchte spektrale Analyse von Spülzytologien nach 5-ALA-Instillation stellt einen Versuch dar, diesem Ziel näher zu kommen. Aufgrund der vorläufigen Ergebnisse könnte die von uns entwickelte Fluoreszenz-Zytologie in Kombination mit der PPIX-Spektrometrie ein einfaches, wirtschaftliches und nicht-invasives Verfahren zur Erkennung und Verlaufskontrolle von Harnblasenkarzinomen sein.

Eine Standardisierung der Probenentnahme und -aufbereitung, sowie eine weitere Modifizierung der technischen Apparatur wären allerdings Voraussetzung.

Die relativ geringen Sensitivitäts- und Spezifitätsergebnisse sind wahrscheinlich u.a. auf die Tatsache zurückzuführen, dass es sich in dieser Studie bei den meisten Kranken um Nachsorgepatienten handelte, die durch Vorbehandlung mit Zytostatika Artefakte im Untersuchungsmaterial aufwiesen.

Eine Reduzierung der aufwändigen und invasiven Zystoskopie-Kontrollen in der Nachsorge wäre ein nicht zu unterschätzender Fortschritt. Davon abgesehen werden bei den Standard-Zystoskopien 10-15% Prozent der Tumore ohnehin nicht erkannt. Hierunter fallen v.a. die inversen Tumore und das aggressive Carcinoma in situ, das zu Frühmetastasierung neigt und die Prognose für den Patienten deutlich verschlechtert. Gerade hier könnte die Fluoreszenz-Zytologie kombiniert mit der PPIX-Spektrometrie rasch und nicht invasiv eine Klärung bringen. Mit dem von uns entwickelten spektrometrischen Verfahren wäre u.U. auch eine automatisierte Diagnostik möglich, bei der die Subjektivität des Untersuchers weitgehend eliminiert werden könnte.

7. Verzeichnis der Abkürzungen

ALA	5-Aminolävulinsäure
AFE	5-Aminolävulinsäure (5-ALA) – induzierte Fluoreszenz-Endoskopie
AFZ	5-Aminolävulinsäure (5-ALA) – induzierte Fluoreszenz-Zytologie
AUC	Area under the Curve
CIS	Carzinoma in situ
CT	Computertomographie
MRT	Magnetresonanztomographie
PDD	Photodynamische Diagnostik
PpIX	Protoporphyrin IX
PSTI	Pankreas-Sekretions-Trypsin-Inhibitor
SZ	Standardzytologie
SZAA	Standardzytologie /Pathologisches Institut Aachen
SZMUC	Standardzytologie/ Urologisches Forschungslabor Uni München/Großhadern
TATI	Tumor-assoziiertes-Trypsin-Inhibitor
TUR-B	Transurethrale Resektion der Blase
WLE	Weißlichtendoskopie

8. Literaturverzeichnis

- Babjuk M, Soukup V, Petrik R, Pavlik I, Jirsa M, Dvoracek J, Pecen L: Fluorescence cystoscopy in the diagnostics and treatment of superficial urinary bladder tumors. In: *Cas Lek Cesk* 144 Suppl 2:15-8, 2005.
- Bortz J, Lienert GA: *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung*. Springer, Berlin, 2003. ISBN: 3-540-00069-0.
- Brown FM: Urine Cytology. Is it still the gold standard for screening? In: *Urol Clin North Am* 27(1): 25-37, 2000.
- Carmack AJ, Soloway MS: The diagnosis and staging of bladder cancer: from RBCs to TURs. In: *Urology* 67(3 Suppl 1):3-8; discussion 8-10, 2006.
- Cohen SM, Johansson: Epidemiology and etiology of bladder cancer. In: *Urologic Clinics of North America* 19(3): 421-428, 1992.
- De Dominicis, C., Lieberti, M., Perugina, G., De Nunzio, C., Sciobic, F., Zuccala, A., Sarkozy, A., Iori, F. In: *Urologie* 57: 1059-1062, 2001.
- Devonec M, Lenz P, Bouvier R, Blanc-Brunat N, Dubernard JM : Clinically occult bladder cancer diagnosis. Trial using ultraviolet cystoscopy. In: *Cancer* 55: 468-471, 1985.
- Devore JL: *Probability and Statistics for engineering and the Sciences*. Fourth Edition, Duxbury Press, Belmont, 1995. ISBN: 0-534-24264-2.
- Ehsan, A., Sommer, F., Haupt, G., Engelmann, U.: Significance of Fluorescence Cystoscopy for Diagnose of Superficial Bladder Cancer after Intravesical Instillation of Delta Aminolevulinic. In: *Urologie Internationalis* 67: 298-304, 2001.
- Filbeck T, Roessler W, Knüchel R, Straub M, Kiel HJ, Wieland WF: Clinical results of the transurethral resection and evaluation of superficial bladder carcinomas by means of fluorescence diagnosis after intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. In: *J Endourol.* 13/2: 117-121, 1999.
- Frimberger D, Zaak D, Stepp H, Knüchel R, Baumgartner R, Schneede P, Schmeller N, Hofstetter A: Autofluorescence imaging to optimize 5-ALA-induced fluorescence endoscopy of bladder carcinoma. In: *Urology* 58/3, 372-375, 2001
- Fukui, I., Yokokawa, M., Mitani, G., Ohwada, F., Wakui, M., Washizuka, M., Tohama, T., Igarashi, K., Yamada, T.: In vivo staining test with methylene blue for bladder cancer. In: *J Urol* 130: 1083-1086, 1983
- Gaber K, Harréus UA, Matthias C, Kleinsasser NH, Richter E: o-Toluidine-hemoglobin adducts from prilocain, to be published 2006

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? In: British Journal of Cancer 86 (6):
1006-1011, 2002.

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. In: Oncogene 22 (34):
5221-5228, 2003.

Häußinger K, Becker H, Stanzel F, Kreuzer A, Schmidt B, Strausz J, Cavaliere S,
(...), Bolliger ChT: Autofluorescence bronchoscopy with white light bronchoscopy
compared with white light bronchoscopy alone for the detection of precancerous
lesions: A European randomised controlled multicentre trial
In: Thorax 60 (6): 496-503, 2005.

Helpap B: Zur neuen WHO-Klassifikation urothelialer Harnblasenkarzinome. In:
Verhandlungen der Deut. Gesellschaft für Pathologie; VOL: 86; p. 57-66, 2002.

Huhtala ML, Pesonen K, Kalkkinen N, Stenman UH. Purification and
characterization of a tumor-associated trypsin inhibitor from the urine of a patient
with ovarian cancer. In: J Biol Chem 257: 13713-13716, 1982.

Jichlinski, P., Forrer, M., Mizeret, J., Glanzmann, T., Braichotte, D., Wagnieres, G.,
Zimmer, G., Guillou, L., Schmidlin, F., Graber, P., van-den-Bergh, H., Leisinger,
H.J.: Clinical evaluation of a method for detecting superficial surgical transitional
cell carcinoma of the bladder by light-induced fluorescence of protoporphyrin IX
following the topical application of 5-aminolevulinic acid: preliminary results. In:
Lasers Surg. Med. 20/4: 402-408, 1997.

Jocham D, Baumgartner R, Fuchs N, Kenz H, Stepp, H, Unsold E: Fluorescence
diagnosis of porphyrin-marked urothelial tumors. Status of experimental
development. In: Urologe A 28: 59-64, 1989.

Kamuhabwa AR, Huygens A, Roskams T, De Witte PA: Enhancing the
photodynamic effect of hypericin in human bladder transitional cell carcinoma
spheroids by the use of the oxygen carrier, perfluorodecalin. In: Int J Oncol.
28(3):775-80, 2006.

Kazal L, Spicer D, Brahinsky R. Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-
anticoagulant protein from pancreas. In: J Am Chem Soc 70: 3034-3040, 1948.

Khalbuss W, Goodison S: Immunohistochemical detection of hTERT in urothelial
lesions: a potential adjunct to urine cytology. In: Cytojournal 10;3(1):18, 2006.

Klän, R. , Loy, V., Hiland, H.: Residual tumor discovered in routine second
transurethral resection in patients with stage T1 transitional cell carcinoma of the
bladder. In: J Urol 146: 316-318, 1991.

Koivunen E, Ristimäki A, Itkonen O, Osman S, Vuento M, Stenman UH. Tumor-associated trypsin participates in cancer cell-mediated degradation of extracellular matrix. In: *Cancer Res* 51: 2107-2112, 1991.

Köhrmann, KU., Woeste, M., Kappes, J., Rassweiler, J., Alken, P.: Der Wert der transurethralen Nachresektion beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom. In: *Aktuelle Urologie* 25: 208-213, 1994.

König F, McGovern FJ, Althausen AF, Deutsch TF, Schomacker KT: Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer. In: *J Urol* 156, 1597-1601, 1996.

König, F., McGovern, F.J., Larne, R., Enquist, H., Schomacker, K.T., Deutsch, T.F.: Diagnosis of bladder carcinoma using protoporphyrin IX fluorescence induced by 5-aminolaevulinic acid. In: *BJU.Int.* 83/1: 129-135, 1999.

Kriegmair M, Baumgartner A, Hofstetter A: Eine Alternative in Diagnose und Therapie des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms? In: *Aktuelle Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms*, In: *Aktuelle Onkologie* 80, 89, 1994.

Kriegmair, M., Baumgartner, R., Knuchel, R., Stepp, H., Hofstadter, F., Hofstetter, A.: Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence [see comments]. In: *J.Urol.* 155/1: 105-109, 1996.

Kriegmair, M. und Mitglieder der AFE-Studiengruppe: Die transurethrale Elektroresektion von Harnblasentumoren mit und ohne 5-Aminolävulinsäure induzierter Endoskopie (AFE). In: *Urologe A* 37: 15, 1998.

Lam S, Kennedy T, Unger M, Miller YE, Gelmont D, Rusch V, Gipe B, Howard D, Leriche JC, Coldman A, Gazdar AF: Localisation of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy. In: *Chest* 113 (3), 696-702, 1998.

Lokeshwar VB, and Soloway MS: Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity? In: *J Urol* 165(4): 1067-77, 2001.

Malini O, Weber L, Vanaja M, Bhuvaneshwari R, Zheng W, Khee C, Soo CC, Puay HT: Novel photodynamic diagnosis of bladder cancer: Ex vivo fluorescence cytology using hypericin. In: *Singapore General Hospital*, Singapore, 2003.

Norpoth K, Weitowitz HJ: *Beruflich verursachte Tumoren*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 1994. ISBN 3-7691-0304-1.

Oosterlink W: The management of superficial bladder cancer. In: *BJU International* 87: 135-140, 2001.

Parker SL, Tong T, Colden S, Wingo PA: Cancer Statistics, 1996. In: *A Cancer Journal for Clinicians*: 46: (1)5-27, 1996.

Pectasides D, Bafaloucos D, Antoniou F, Gogou L, Economides N, Varthalitis J, et al. TPA, TATI, CEA, AFP, β -HCG, PSA, SCC, and CA 19-9 for monitoring transitional cell carcinoma of the bladder. In: *Am J Clin Oncol* 19: 271-277, 1996.

Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM: 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. In: *Principles and experimental research, Photochem Photobiol* 65(2), 235-251, 1997.

Pytel A, Schmeller N: New aspect of photodynamic diagnosis of bladder tumors. In: *Fluorescence cytology, In: Urology* 59/2 : 216-9, 2002.

Rathert, P: Urinzytologie beim Harnblasenkarzinom. In: *Urologe [A]* 42: 908–911, 2003.

Rathert P, Roth S: *Urinzytologie. Praxis und Atlas*, 3. Aufl., Springer, Berlin, 1995. ISBN: 3-540-59248-2.

Rübber H, Otto T: Harnblasenkarzinom. In: *Uroonkologie*, 1998.

Shariat SF, Herman MP, Casella R, Lotan Y, Karam JA, Stenman UH: Urinary levels of tumor-associated trypsin inhibitor (TATI) in the detection of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. In: *Eur Urol.* (9): 48(3): 24-31, 2005.

Soloway MS, Murphy W, Rao MK, Cox C: Serial multiple-site biopsies in patients with bladder cancer. In: *J Urol* 120: 57-59, 1978.

Sorsa T, Salo T, Koivunen E, Tyynelä J, Kontinen YT, Bergmann U, et al. Activation of type IV procollagenases by human tumor-associated trypsin-2. *J Biol Chem* 272: 21067-21074, 1997.

Stenman UH, Huhtala ML, Koistinen R, Seppälä M: Immunochemical demonstration of an ovarian cancer-associated urinary peptide. In: *Int J Cancer* 30:53-57, 1982.

Stenman UH, Koivunen E, Itkonen O. Biology and function of tumor-associated trypsin inhibitor, TATI. In: *Scand J Clin Lab Invest* 51(Suppl 207): 5-9, 1991.

Stenman U-H: Tumor-associated Trypsin Inhibitor. In: *Clin. Chem.* 48: 1206-1209, 2002.

Steinbach P, Kriegmair M, Baumgartner R, Hofstädter F, Knüchel R: Intravesical instillation of delta-aminolevulinic acid (ALA): The fluorescent metabolite is limited to urothelial cells. In: *Urology* 44/5, 676-681, 1994.

Stepp H, Baumgartner R, Beyer W, Knüchel R, Rick K, Steinbach P, Stepp HG, Kriegmair M: Bladder Tissue Diagnostics Utilizing Protoporphyrin IX Fluorescence detection. In: Cubeddu R, et al.: *Optical Biopsy and Fluorescence Spectroscopy and Imaging*. Lille, France: Proc. SPIE 2324, 20-31, 1994.

Tauber S, Kriegmair M, Schmeller N, Hofstetter A, Stieber P, Mahnert B: Die Bedeutung des quantitativen NMP-22-Tests in der Nachsorge von Blasen Tumoren. In: Der Urologe (A) 37:14, 2000.

Tauber S, Liedl B, Schneede P, Ließmann F, Waidelich R, Hofstetter A: Fluoreszenzzytologie der Harnblase. In: Der Urologe (A), 40: 217-221, 2001.

Tauber S, Stepp H, Meier R, Bone A, Hofstetter A, Stief C: Integral-Spectrophotometric Analysis of 5-Aminolevulinic Acid Induced Fluorescence Cytology of the Urinary Bladder. To be published, 2005.

UroVysion: Product Description [online]. Vysis Inc., 2006. Im Internet: <URL: http://www.urovysion.com/ProductDescription_354.asp>.

Van der Meijden R, Sylvester R, Oosterlink w, Solsona E, Boehle A, Lobel B, Rintala E: EU guidelines on the diagnosis and treatment of urothelial carcinoma in situ. In: Eur. Urol. 48: 363-371, 2005.

Vicente J, Chechile G, Algaba F: Value of in vivo mucosa-staining test with methylene blue in the diagnosis of pretumoral and tumoral lesions of the bladder. In: Eur. Urol. 13: 15-16, 1987.

Vögeli, TA., Grimm, MO., Ackermann, R.: Prospective study for quality control of TUR of bladder tumors by routine 2nd TUR. In: J Urol 159 No. 5, Suppl.:143, 1998
Whitmore WF, Bush IM: Ultraviolet cystoscopy in patients with bladder cancer. In: J Urol. 95: 201-207, 1966.

Weidelich R: Photodynamische Therapie des Harnblasenkarzinoms. In: A.G.Hofstetter, Lasergestützte Operationsverfahren in der Urologie, Thieme Stuttgart, 2003.

Witjes JA, Moonen PM, van der Heijden AG: Review pathology in a diagnostic bladder cancer trial: effect of patient risk category. In: Urology 67(4):751-5. Mar 29, 2006.

Witjes JA: Bladder carcinoma in situ: state of the art. In: Eur. Urology 45:142-146, 2004.

Wülfing C; von Struensee D; Bierer S; Bögemann M; Hertle L; Eltze E: Expression of Her2/neu in locally advanced bladder cancer: implication for a molecular targeted therapy. In: Aktuelle Urologie; VOL: 36 (5); p. 423-9, 2005.

Zaak D, Kriegmair M, Stepp H, et al.: Endoscopic detection of transitional cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid – results of 1012 fluorescence endoscopies. In: Urology 57 (4): 690-694, 2001.

Zaak, D., Frimberger, D., Wagner, S., Stepp, H., Baumgartner, R., Schneede, P., Siebels, M., Kriegmair, M., Hofstetter, A. G., Knüchel, R.: Quantification of 5-Aminolevulinic Acid Induced Fluorescence Improves the Specificity of Bladder Cancer Detection. In: The Journal of Urology, Vol. 166: 1665-1669, 2001.

Zaak D, Hungerhuber E, Schneede P, Stepp H, Frimberger D, Corvin S, Schmeller N, Kriegmair M, Hofstetter A, Knüchel R: Role of 5-aminolevulinic acid in the detection urothelial premalignant lesions. In: Cancer 95(6): 1234-8, 2002.

Zaak D, Weiss M: Harnblasenkarzinom. In: Tumorzentrum München - Manual: Urogenitale Tumoren, 2003.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, mit deren Hilfe diese Studie durchgeführt werden konnte und die meine Arbeit unterstützt haben.

Herrn Univ. Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter, Direktor der urologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilian-Universität München sowie des Laserforschungslabors am Klinikum Großhadern, danke ich für die Überlassung dieses hochaktuellen Themas.

Ganz herzlich danke ich an dieser Stelle Herrn Dr. hum. biol. Herbert Stepp, Herrn Richard Meier und Herrn Dr. med. Stephan Tauber für die ausgezeichnete Unterstützung und Betreuung für die Erstellung dieser Arbeit.

Während der Durchführung des klinisch-experimentellen Teils im Laserforschungslabor erhielten wir von allen Mitarbeitern großzügige, auch interdisziplinäre Unterstützung, ohne die eine so klinisch orientierte Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei Frau Barbara Ganzmann und Frau Dr. rer. nat. Stephanie Radeck bedanke ich mich in persönlicher Weise für die von ihnen geleistete Hilfestellung sowie bei meinem Vater Wilhelm Bone, der ein individuell auf diese Arbeit zugeschnittenes Statistikprogramm entwickelt hat.

10. Lebenslauf

Name: Agneta Bone
Geburtsdatum: 13.11.1970, Arad
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

1977 bis 1981 Balan-Grundschule München
1981 bis 1990 Pestalozzi-Gymnasium München
1990 Allgemeine Hochschulreife
1990 bis 1995 Studium der Betriebswirtschaftslehre, Studiengang
Tourismus an der Fachhochschule München
Februar 1995 Diplomprüfung erfolgreich abgelegt
1998 bis 2005 Studium der Humanmedizin, LMU München
Mai 2005 Dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung erfolgreich
abgelegt

Berufstätigkeit:

1995 angestellt als Vertriebsassistentin/ Chefsekretärin bei
der Firma Herlitz International Trading AG
1995 bis 1996 angestellt als Assistentin der Geschäftsführung und
Dozentin bei der AHT Private Akademie für Hotel und
Tourismus GmbH
1996 bis 1998 selbständige Unternehmens-/Außenwirtschaftsberaterin
Schwerpunkt Finanzierung und Joint-Venture
1997 bis 1999 angestellt als Einsatzbetreuerin bei der medizinischen
Notrufzentrale Mercur Assistance, München
Juli 2005 bis Dez. 2005 freiberufliche Weiterbildungsassistentin im Bereich
psychotherapeutische Medizin und Psychoanalyse;
Praxis Dr. Madert
Sept. 2005 bis April 2006 angestellt als Assistenzärztin in der internen Klinik
Dr. Argirov, Abteilung Psychosomatik;
Ab Mai 2006 angestellt als Assistenzärztin bei der Simsee-Klinik, Bad
Endorf , Abteilung Psychosomatik