

Aus dem Laser-Forschungslabor der Urologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

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

**UV-angeregte Autofluoreszenz:
Spektroskopische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen
zur Tumorselektivität endogener Gewebefarbstoffe**

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

vorgelegt von
Alexander Hohla
aus
München

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. P. K. Häußinger
Priv. Doz. Dr. A. E. Goetz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. H. Stepp

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

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2003

Inhaltsverzeichnis

I	EINFÜHRUNG	1
1	FLUORESZENZFRÜHDIAGNOSTIK HUMANER NEOPLASIEN	1
2	ZIELSETZUNG DIESER UNTERSUCHUNG	3
3	FLUORESZENZ / SPEKTROSKOPIE	4
4	KÖRPEREIGENE FLUOROPHORE	5
5	TUMORE UND AUTOFLUORESZENZ	6
5.1	<i>Einfluss der Konzentration endogener Fluorophore</i>	7
5.2	<i>Einfluss der Gewebeschichtung</i>	9
5.3	<i>Einfluss gewebeoptischer Parameter</i>	10
6	BILDGEBENDE FLUORESZENZDIAGNOSTISCHE VERFAHREN	14
7	ZYTOTOXIZITÄT VON UV-STRAHLUNG	16
8	NEOPLASIEN OBERFLÄCHLICHER, GESCHICHTETER SCHLEIMHÄUTE	18
8.1	<i>Urothelkarzinom</i>	18
8.1.1	<i>Histologie des gesunden Urothels</i>	18
8.1.2	<i>Histopathologie</i>	19
8.1.3	<i>Klinische Situation der intraoperativen Diagnostik</i>	21
8.2	<i>Bronchialkarzinom</i>	22
8.3	<i>Zervikale intraepitheliale Neoplasie</i>	23
8.4	<i>Malignom der Mundhöhle</i>	25
9	GLIOME	27
II	MATERIAL UND METHODEN	31
1	FLUORESZENZDETEKTION	31
1.1	<i>Anregungslichtquelle</i>	31
1.2	<i>Spektroskopie-Messsonde</i>	33
1.3	<i>Autofluoreszenz-Detektionsystem</i>	34
1.4	<i>Untersuchungsablauf und Patientenkollektiv</i>	37
1.4.1	<i>Urologie</i>	37
1.4.2	<i>Pulmologie</i>	39
1.4.3	<i>Gynäkologie</i>	39
1.4.4	<i>HNO</i>	40
1.4.5	<i>Neurochirurgie</i>	40
1.5	<i>Auswertung Weißlichtendoskopie und PPIX-Fluoreszenzdetektion / Urologie</i>	42

1.6	<i>Auswertung UV-Spektroskopie</i>	43
1.7	<i>Stabilität des auf Energieschwankungen</i>	44
2	FLUORESZENZNACHWEIS MIKROSKOPISCH	45
2.1	<i>Aufbereitung der Biopsien</i>	45
2.2	<i>Aufbau des Mikroskops</i>	45
2.3	<i>Bilddokumentation</i>	47
2.4	<i>Spektroskopie</i>	47
2.5	<i>Ausbleichen der Gefrierschnitte</i>	48
2.6	<i>Untersuchungsablauf / Fluoreszenzmikroskopie</i>	51
2.7	<i>Auswertung</i>	51
III	ERGEBNISSE	53
1	FLUORESZENZDETEKTION	53
1.1	<i>Urologie – Harnblasenkarzinom</i>	53
1.1.1	UV-angeregte Fluoreszenzspektroskopie	53
1.1.2	Unauffällige Schleimhaut	66
1.1.3	Weißlicht- und PPIX-Fluoreszenzdetektion	66
1.1.4	Vergleich UV-angeregte Fluoreszenzspektroskopie, PPIX-Bildgebung und Weißlichtdiagnostik	68
1.2	<i>Pulmologie - Bronchialkarzinom</i>	69
1.3	<i>Gynäkologie – Zervikale intraepitheliale Neoplasie</i>	77
1.4	<i>HNO – Malignom der Mundhöhle</i>	80
1.5	<i>Neurochirurgie - Gliom</i>	83
2	FLUORESZENZNACHWEIS MIKROSKOPISCH	89
2.1	<i>Urologie</i>	89
2.2	<i>HNO</i>	94
2.3	<i>Fluoreszenzmikroskopie an normalem geschichteten Gewebe</i>	96

IV	DISKUSSION.....	98
1	METHODIK.....	98
1.1	<i>UV-Anregungslichtquelle.....</i>	98
1.2	<i>Photokarzinogenität.....</i>	98
1.3	<i>Fluoreszenzdetektion : Vorrichtung und Messverfahren.....</i>	100
1.4	<i>Fluoreszenzdetektion : Auswertung.....</i>	101
1.5	<i>Fluoreszenznachweis mikroskopisch.....</i>	103
2	ERGEBNISSE.....	105
2.1	<i>Quelle der Fluoreszenz – Biochemie und Morphologie.....</i>	105
2.1.1	Biochemie.....	106
2.1.2	Morphologie.....	108
2.2	<i>Variationen der Normalgewebespektren.....</i>	111
2.3	<i>Tumor- Normalgewebekontraste in den einzelnen Fachbereichen.....</i>	114
2.3.1	Urothelkarzinom.....	114
2.3.2	Bronchialkarzinom.....	121
2.3.3	Zervikale intraepitheliale Neoplasie.....	124
2.3.4	Malignom der Mundhöhle.....	126
2.3.5	Gliom.....	127
2.4	<i>Wertigkeit der Untersuchungen für die Diagnose von Tumoren in verschiedenen Fachdisziplinen.....</i>	130
2.5	<i>Fluoreszenzmikroskopie – Korrelation zur Pathologie.....</i>	131
V	ZUSAMMENFASSUNG.....	135
VI	LITERATUR.....	137
VII	DANKSAGUNG.....	158
VIII	LEBENS LAUF.....	159

I Einführung

1 Fluoreszenzfrühdagnostik humaner Neoplasien

Die Früherkennung von Tumoren ist derzeit die bedeutendste klinische Voraussetzung zur wirksamen Behandlung von Tumoren. Sie ermöglicht es, die Heilungschancen der Patienten entscheidend zu verbessern (Koenig 01). Die Magnetresonanz- und Computertomographie hat in der Diagnostik von Tumoren einen hohen Standard erreicht und wird stetig weiterentwickelt. Allerdings sind mit diesen tomographischen Verfahren Tumore erst ab einer bestimmten Ausdehnung präoperativ darstellbar. Ein einfaches Hilfsmittel zur intraoperativen „online“-Tumordetektion und Abgrenzung zum normalen Gewebe wäre klinisch sehr hilfreich. Mit verschiedenen optischen Verfahren, wie elastischer Lichtstreuung (Bigio 97, Backman 00), Photoakustik (Kostli 01, Hoelen 01), optischer Kohärenztomographie (Fujimoto 00), konfokaler Mikroskopie (Selkin 01, Langley 01) oder Fluoreszenzdiagnostik (Wagnieres 98, Ramanujam 00) versuchen eine Vielzahl von Forschungsgruppen klinische Defizite im Bereich der Tumorfrühdagnostik zu beheben. Bei der intraoperativen Lokalisation von Tumoren und deren Frühstadien hat sich die Fluoreszenzdiagnostik am weitesten etablieren können und findet in vielen Kliniken über die Grundlagenforschung hinaus Anwendung.

Die Fluoreszenzdiagnostik unterteilt sich in zwei unterschiedliche Verfahren. Zum einen versucht man über die Gabe exogen zugeführter Photosensibilisatoren eine tumorspezifische Visualisierung zu erreichen und zum anderen wird die endogene Fluoreszenz (Autofluoreszenz) über geeignete Anregung sichtbar gemacht.

Unter der großen Anzahl verschiedener Fluorochrome hat sich in der Fluoreszenzdiagnostik von Tumoren die 5-ALA induzierte PPIX-Fluoreszenz am stärksten etablieren können (Wagnieres 98, Sibata 01). Als vom Körper eigens synthetisierte Substanz ist 5-ALA in Bezug auf Nebenwirkungen überlegen und zeichnet sich darüber hinaus durch eine hohe Tumorselektivität aus, die sich messbar in einer hohen Sensitivität auswirkt (Zaak 01, Riedl 01). Mit Hilfe der 5-ALA induzierten Fluoreszenzdiagnostik wurde ein Fluoreszenzdiagnosesystem entwickelt, das es ermöglicht, die Fluoreszenz von Protoporphyrin IX bildgebend darzustellen (Stepp 93). Eine Reihe von klinischen Untersuchungen zeigte, dass mit diesem System das Auffinden von Tumoren und Tumorfrühstadien signifikant gegenüber der konventionellen Weißlichtbetrachtung verbessert werden kann. So werden z.B. in der Urologie in Bezug auf die Früherkennung von Blasentumoren bei drei bis vier mal so vielen Patienten flache Tumorstadien erkannt (Zaak 01). Auch hochmaligne Hirntumore (WHO Grad III und IV) zeigen eine sehr intensive und selektive Rot-Fluoreszenz nach Anfärbung mit 5-ALA induziertem PPIX (Stummer 96). Durch die jetzt vollständigere und gezieltere Resektion ma-

ligner Bereiche bei diesen Patienten konnte eine signifikant erhöhte Überlebensrate der behandelten Patienten nachgewiesen werden (Stummer 00).

Die 5-ALA induzierte Fluoreszenzdiagnostik hat allerdings auch ihre Grenzen:

Die Spezifität in den verschiedenen oberflächlich zugänglichen Organen wie der Blase, der Zervix, der Mundschleimhaut oder der Haut von 50 bis 65% je nach Organ limitiert die Zuverlässigkeit des Verfahrens (Koenig 99, Hillemanns 00). Darüber hinaus sind manche Tumore wie die niedermalignen, hirneigenen Tumore (WHO Grad II), die eine inhärente Tendenz zur Entwicklung in höhermaligne Tumorklassen (WHO Grad III) besitzen, mit dieser Methodik nicht diagnostisch erfassbar (Stummer 98). Insbesondere nach lokaler Administration von 5-ALA in oberflächlich zugänglichen Hohlorganen erschwert zudem das schnelle Ausbleichen der PPIX-Fluoreszenz einen reibungslosen Operationsablauf (Heil 96).

Die Benutzung der Autofluoreszenz zur Detektion erkrankten Gewebes wurde bereits in vielen verschiedenen Organen sowohl spektroskopisch, mit Hilfe fasergestützter Katheter, als auch endoskopisch mit bildgebenden Systemen untersucht (Wagnieres 98, Ramanujam 00). Der größte Teil der für die Diagnostik relevanten endogenen Farbstoffe lässt sich in einem Wellenlängenbereich zwischen $\lambda = 305$ nm im UVB-Bereich und $\lambda = 460$ nm im blau-violetten Spektralbereich effektiv zur Fluoreszenz anregen (Wagnieres 98).

Die meisten klinischen Untersuchungen beschränken sich allerdings auf Anregungslicht aus dem blau-violetten bis zum grünen Spektralbereich (Ramanujam 00). Das generelle, zugrundeliegende Prinzip der Tumorabgrenzung über Anregung in diesem Wellenlängenbereich beruht auf der selektiven Anregung von Strukturproteinen im Bindegewebe (Zonios 96). Eine Verdickung des Tumor-Epithels und eine reduzierte Kollagenfaserdichte im tumor-nahen Bindegewebe führen zu einer reduzierten Fluoreszenzintensität des Tumorbereichs gegenüber dem umliegenden Normalgewebe.

Im UVB-Spektralbereich unterhalb von 310 nm lässt sich insbesondere die aromatische Aminosäure Tryptophan zur Fluoreszenz anregen (Baraga 90). Bisherige in der Literatur beschriebene Untersuchungen an Zellkulturen (Pradhan 95, Zhang 97) als auch in situ an verschiedenen Organen (Brancaleon 01, Kolli 95, Yang 97, Anidjar 96) zeigen eine signifikant erhöhte Tryptophanfluoreszenz bei $\lambda \sim 340$ nm in Tumorzellen als auch -geweben. Im sichtbaren Spektralbereich kommt es nach UVB-Licht-Anregung ähnlich wie unter blau-violetttem Anregungslicht zu einer Absenkung der Fluoreszenzintensität im Tumorbereich (Anidjar 96, Alfano 91). Eine tumorbedingt erhöhte Fluoreszenzintensität im ultravioletten und eine gleichzeitig reduzierte Fluoreszenzintensität im sichtbaren Spektralbereich könnten so zu einer verbesserten Diskriminierung tumorösen Gewebes führen. Insbesondere lässt sich die-

ses einfache Verfahren der Ratiobildung zwischen dem UV- und dem sichtbaren Spektralbereich gut in bildgebende Verfahren umsetzen.

Die umfangreichsten klinischen Untersuchungen zur UVB-angeregten Tumordetektion wurden an Harnblasenkarzinomen *in-vivo* bei Anregung mit Laserlicht bei $\lambda = 308$ nm (XeCl-Excimerlaser) durchgeführt (Anidjar 96). Es wurden 25 Patienten und 66 Areale aus malignen (31) und benignen (35) Bereichen mittels fasergestützter Spektroskopie untersucht. Mit einem Ratio-Algorithmus $R = I(\lambda = 360 \text{ nm})/I(\lambda = 440 \text{ nm})$ wurde eine hohe Signifikanz von $p < 0,0001$ errechnet und mit einem Schwellwert von 2 zwischen histopathologisch malignem und benignem Gewebe retrospektiv eine Sensitivität als auch Spezifität von 100% errechnet. In dieser Untersuchung wurde jedoch keine Unterteilung in schwer erfassbare flache Tumore (Carcinoma in situ und Dysplasie II) und massive Tumore (papilläre bzw. solide Tumore) vorgenommen, so dass keine Bewertung des Zugewinns in Bezug auf diese Tumorentität möglich ist.

2 Zielsetzung dieser Untersuchung

Ziel dieser Arbeit ist es, die fluoreszenzoptischen Möglichkeiten der $\lambda_{\text{ex}} = 308$ nm angeregten Autofluoreszenz in verschiedenen Fachbereichen an unterschiedlichen humanen Neoplasien zu untersuchen. Dabei soll die Methodik der Verhältnisbildung zwischen der ultravioletten und der sichtbaren Fluoreszenzintensität sowohl an Epithelgewebe unterschiedlicher Organe, als auch im Bereich der Neurochirurgie an Gehirntumoren getestet werden.

Zunächst stellt sich die Frage, in welchem Maße sich die veröffentlichten Ergebnisse zur $\lambda_{\text{ex}} = 308$ nm angeregten Fluoreszenzspektroskopie in der Blase (Anidjar 96) reproduzieren lassen. Bei bisherigen fasergestützten Untersuchungen wird die Spektroskopie-Messsonde durch den subjektiven Eindruck des Operateurs unter herkömmlicher Weißlichtendoskopie geführt (Koenig 96, Anidjar 96, Ramanujam 00). Im Gegensatz dazu soll die Messsonde nun, geführt durch die hochsensitive 5-ALA induzierte PPIX-Fluoreszenz, auf die rot fluoreszierenden Areale und die nebenliegende unauffällige Schleimhaut aufgesetzt und die Messungen durchgeführt werden.

Darüber hinaus ist die Methodik in den Bereichen Pulmologie, HNO, Gynäkologie und Neurochirurgie in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen, Malignomen der Mundhöhle, Zervixdysplasien und Astrozytomen in klinischen Pilotstudien zu testen. In der Pulmologie wird die Messsonde, ähnlich wie in der Urologie, durch das bereits klinisch eingesetzte, bildgebende Autofluoreszenzsystem (D-Light AF, Storz GmbH) auf verdächtige Areale der Bronchien aufgesetzt. Die Untersuchungen in der Neurochirurgie konzentrieren sich auf die Diagnostik niedermaligner Astrozytome (WHO Grad II), die mit der 5-ALA induzierten Fluoreszenzdiagnostik bisher nicht erfasst werden können (Stummer 98b).

Um ein besseres Verständnis der UVB-angeregten Autofluoreszenz zu erzielen und die *in-vivo* gemessenen Spektren zu interpretieren, werden über die klinischen Pilotstudien hinaus fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Gefrierschnitten durchgeführt. Die Gewebeproben sollen dabei mit $\lambda_{\text{ex}} = 308 \text{ nm}$ (XeCl-Excimerlaser) und blau-violettem Anregungslicht (D-Light) zur Fluoreszenz angeregt werden. Handelsübliche Mikroskope sind im Wellenlängenbereich unterhalb von $\lambda = 360 \text{ nm}$ nicht mehr transmittierend. Es wird hierfür ein Mikroskop aufgebaut, das den UVA-Bereich bildgebend und spektral zu erfassen erlaubt.

3 Fluoreszenz / Spektroskopie

Wird ein Molekül mit Licht bestrahlt, dessen Wellenlänge innerhalb des Absorptionsspektrums liegt, wird die Energie des Photons absorbiert und das Molekül vom Grundzustand in einen angeregten Zustand versetzt. Die Relaxation des angeregten Elektrons in den Grundzustand kann über die Emission eines Photons erfolgen, wobei dessen Emissionswellenlänge langwelliger (und damit energieärmer) als die des Anregungslichts ist (Abb. 1). Bei Atomen sind die Energiedifferenzen genau definiert. Es zeigen sich scharfe Linien im Anregungs- und Fluoreszenzspektrum. Bei Molekülen hingegen wird die Anregungsenergie durch den Prozess der „internen Konversion“ in Schwingungs- und Rotationszustände umgesetzt und an die Umgebung abgegeben. Bedingt durch ihre komplexe Struktur können Moleküle auf vielfältige Weise rotieren und schwingen. Dies wirkt sich auf die Energiedifferenzen aus und die scharfen Linien verschmieren zu mehr oder weniger breiten Banden. Durch diese strahlungslosen Übergänge innerhalb des Anregungs- bzw. Grundzustandes ist bei fluoreszierenden Molekülen die Lage der Fluoreszenzmaxima über einen großen Wellenlängenbereich (einige $\lambda = 100 \text{ nm}$) unabhängig von der exakten Anregungswellenlänge.

Die Fluoreszenz eines Moleküls wird durch seinen Quantenwirkungsgrad und die Lebensdauer charakterisiert. Der Quantenwirkungsgrad ist durch das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen definiert. Wenn es keine strahlungslosen Konkurrenzprozesse gibt, beträgt der Quantenwirkungsgrad eins. Durch strahlungslose Konkurrenzprozesse bei fluoreszierenden Molekülen liegt die Quantenausbeute typischerweise im Promillebereich (Richards 96). Die Lebensdauer, das heißt die Zeit während der sich das Molekül im angeregten Zustand befindet, beträgt einige 10^{-9} Sekunden und kann bei metastabilen Zuständen mehreren Sekunden oder Minuten dauern.

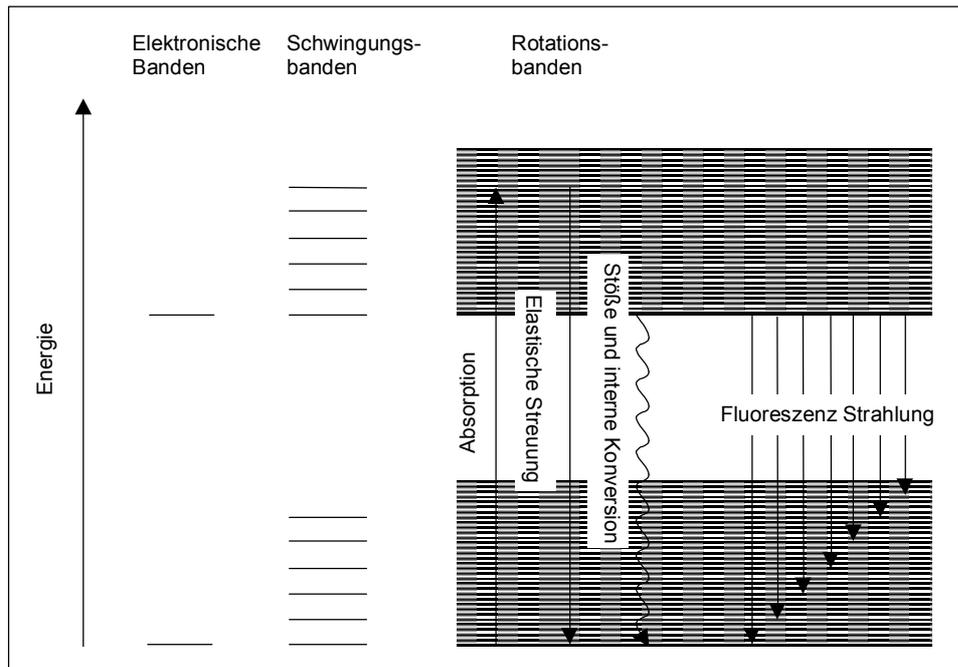


Abb. 1: Termschema der Energiebanden eines Moleküls und schematische Darstellung der strahlenden bzw. nicht-strahlenden Prozesse.
 Durchgezogene Linien: strahlende Übergänge,
 Gewellte Linie: strahlungsloser Übergang.

4 Körpereigene Fluorophore

Die gewebeeigene Fluoreszenz (auch Autofluoreszenz) setzt sich aus einer Überlagerung der Fluoreszenz verschiedener fluoreszierender, endogener Substanzen mit relativ breiten, strukturlosen Emissionsbanden zusammen (Abb. 2). Die angegebenen Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen sind allerdings in Hinblick auf ihre jeweilige biophysikalische Umgebung zu sehen (Pottier 90, Richards-Kortum 96). Unterschiede in der lokalen Konzentration, Polarität, pH - Wert und Temperatur beispielsweise können zu Verschiebungen der Maxima in der Größenordnung von einigen $\lambda = 10$ nm führen.

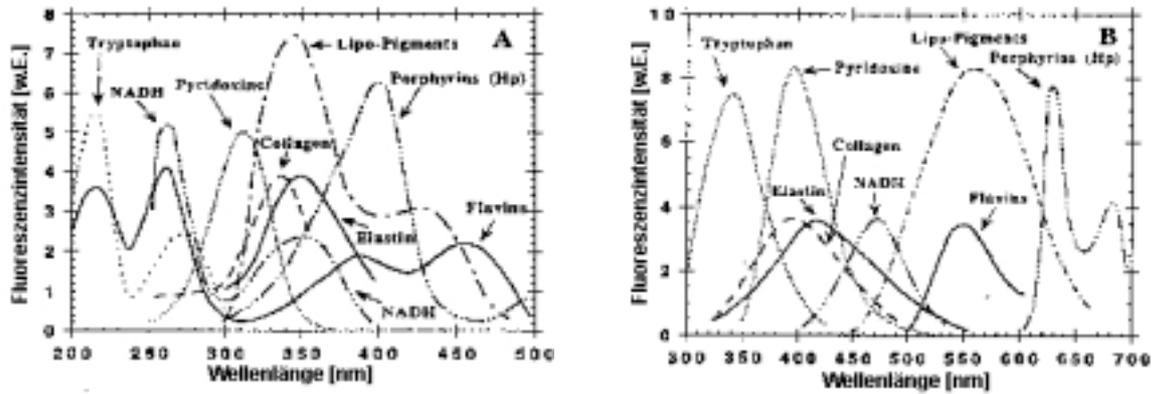


Abb. 2: A Anregungs- und B Emissionsspektren verschiedener endogener Fluorophore. Die Spektren sind jeweils für die besten Anregungs-/Emissionsbedingungen gezeigt (Wagnieres 98a).

Bei fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen kann sowohl die Anregungs- als auch Emissionswellenlänge variiert werden. Vollständige Informationen erhält man über die Aufzeichnung einer Anregungs- und Emissionsmatrix (Ramanujam 00). Bei einigen komplexer zusammengesetzten Substanzen, wie den verschiedenen Strukturproteinen oder Lipoproteinen, verändert sich die Position des Emissionsmaximums teilweise erheblich (bis zu einigen $\lambda = 100$ nm) mit der Anregungswellenlänge (Oraevsky 93, Richards-Kortum 96). Zur Unterscheidung verschiedener Gewebetypen werden geeignete Anregungs- und Emissionswellenlängen in der Regel entweder empirisch bestimmt oder die Spektren werden mit statistischen Verfahren ausgewertet. Durch die Auswertung von Intensitätsverhältnissen bei verschiedenen Wellenlängen erhält man Größen, die unabhängig von der Anregungsintensität oder dem Abstand des Detektors zum Gewebe sind.

Außer in der Tumordiagnostik wird die Autofluoreszenz spezifischer Fluorophore dazu genutzt, Alterungsprozesse auf der Netzhaut des Auges zu verfolgen (Holz 01a, Holz 01b), Aufschluss über die Stoffwechselaktivität in Folge von Ischämien zu bekommen (Cordeiro 95) oder Verkalkungen in verschlossenen Gefäßen zu diagnostizieren (Papazoglou 95).

5 Tumore und Autofluoreszenz

Zur intraoperativen Autofluoreszenzdiagnostik von Tumoren und Tumorstadien wurden bisher zahlreiche Untersuchungen mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen (vom UVB-bis in den sichtbaren Spektralbereich) oder Detektionskonfigurationen (spektral und bildgebend) in verschiedenen Organen durchgeführt (Wagnieres 98, Ramanujam 00). Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Excimerlaser bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ex} = 308$ nm lässt sich neben einer großen Anzahl verschiedener Fluorophore (Abb. 3) insbesondere die

aromatische Aminosäure Tryptophan anregen (Baraga 90). Unterhalb von $\lambda_{\text{ex}} = 308 \text{ nm}$ können darüber hinaus weitere aromatische Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin) zur Fluoreszenz angeregt werden (Chen 67, Bensasson 93).

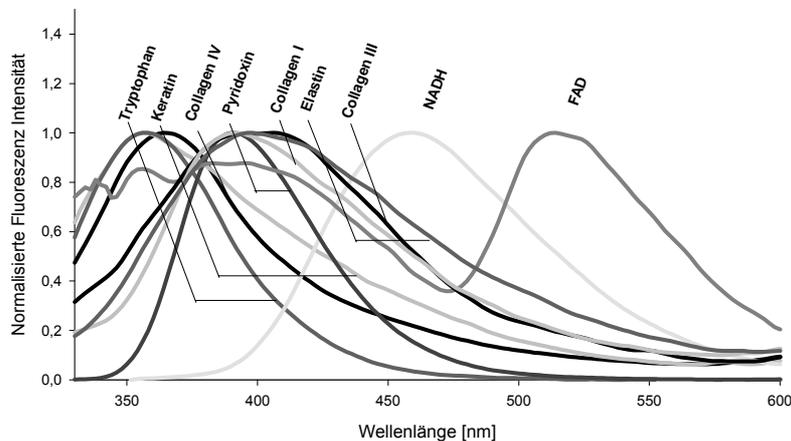


Abb. 3: Auf das Fluoreszenzmaximum normierte Emissionsspektren einiger im Gewebe vorkommender Substanzen, gelöst in PBS Substanzen (Tryptophan, Collagen IV, Keratin, Pyridoxin, NADH, FAD) bzw. als Pulver in isotonischem NaCl (Collagen I, Collagen III, Elastin). Anregung $\lambda_{\text{ex}} = 308 \text{ nm}$ (eigene Messungen).

Generell werden die Fluoreszenzspektren sowohl von der Konzentration endogener Fluorophore, der Morphologie des Gewebes und den gewebeoptischen Parametern beeinflusst. Jeder dieser voneinander unabhängigen Parameter ist bei der Beurteilung der spektralen Intensitätsverteilung in Betracht zu ziehen.

5.1 Einfluss der Konzentration endogener Fluorophore

Von der Vielzahl körpereigener Fluorophore stehen nur wenige in direkter Verbindung mit der Entwicklung malignen Gewebes und liefern gleichzeitig ausreichend starke Signale, die zur intraoperativen Diagnostik genutzt werden können. Zu diesen für die Fluoreszenzdiagnostik relevanten Fluorophoren gibt es eine Reihe von spektroskopischen Untersuchungen an extrahierten endogenen Substanzen oder Zellkulturen, die im Folgenden aufgeführt werden:

Tryptophan. In der Literatur wird die Aminosäure Tryptophan als Marker der zellulären Proliferation und der Proteindichte diskutiert (Doukas 01, Brancaleon 99, Pradhan 95, Brancaleon 01, Gillies 00, Ganesan 98, Zhang 97, Silberberg 94). In Zellkulturexperimenten konnte eine konsistent erhöhte Tryptophanfluoreszenz der vergleichbaren Zelllinien aus me-

tastasierenden gegenüber nicht-metastasierenden oder normalen Zelllinien nachgewiesen werden (Zhang 97, Pradhan 95, Heintzelman 00a). In einer vorläufigen klinischen Untersuchung an Basal- und Plattenepithelkarzinomen der Haut (18 Patienten) konnte eine $2,9 \pm 1,4$ und $2 \pm 0,9$ – fach erhöhte Tryptophanfluoreszenz (Fluoreszenz-Maximum $\lambda = 340$ nm) bei Anregung mit $\lambda = 295$ nm gegenüber der angrenzenden Haut gemessen werden (Brancaleon 01).

Als aromatische Aminosäure mit hohem Fluoreszenzquantenwirkungsgrad ($Q \sim 0.2$) ist die Tryptophanfluoreszenz und damit, an gewisse Einschränkungen gebunden, die Konzentration direkt messbar (Burstein 73, Chen 67). Unter den zwanzig natürlich vorkommenden Aminosäuren gibt es drei mit aromatischen Seitenringen: Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin (Bensasson 93). Tryptophan, mit einem Indol Seitenring, ist die Aminosäure mit der langwelligsten Absorption, die bis in den UVB-Bereich des Sonnenspektrums reicht. Im Gewebeverband ist Tryptophan bis zu einer Wellenlänge von ca. $\lambda = 310$ nm zur Fluoreszenz anzuregen (Baraga 90a).

Burstein (Burstein 73) untersuchte die Fluoreszenz von Tryptophan-Residuen in verschiedenen Proteinen. Das Maximum der Fluoreszenzintensität, die Halbwertsbreite und der Quantenwirkungsgrad schwanken je nach Bindungszustand zwischen $\lambda_{\max} = 328$ und 350 nm, $48 - 61$ nm ($\Delta\lambda$) und 0.08 und 0.44 (q). Die Lage des Fluoreszenzmaximums ist abhängig vom pH Wert des Lösungsmittels und verschiebt sich von ca. $\lambda = 350$ nm (hydrophil, NaCl) bis zu $\lambda = 328$ nm (hydrophob, 1,4 Dioxane) (Baraga 90a).

NADH/FAD. Die oxidierte Form von Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) ist nicht fluoreszierend, wohingegen die reduzierte Form NADH fluoresziert (Richards-Kortum 96). Im Gegensatz zu NADH fluoresziert im Falle der Flavine die oxidierte Form (FAD) und reduzierte ($FADH_2$) nicht. Diese Substanzen, die von den Vitaminen Niacin (NAD) und Riboflavin (FAD) abgeleitet werden, sind wichtige Koenzyme einer großen Anzahl von Enzymen, die in der zellulären Atmungskette aktiv sind. Die relativen Beiträge dieser Substanzen variieren somit mit dem oxidativen methabolischen Zustand der Zellen. Somit stellen die NADH- und die FAD-Fluoreszenz zwei direkt messbare Indikatoren für das Redox-System der Atmungskette dar (Halangk 91, Chance 62).

NADH besitzt eine erweiterte Konfiguration, wenn es an Enzyme gebunden ist. Die Bindung an ein Apoprotein der Dehydrogenase führt zu einer Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums, was mit einer erhöhten Fluoreszenzlebensdauer und -intensität (Fluoreszenz-Maximum $\lambda \sim 439$ nm) einhergeht (Croce 99, Salmon 82). In Tumorzellen wird eine erhöhte Konzentration an freien NADH gegenüber enzymatisch gebundenen NADH gemessen (Croce 99, Salmon 82, Romer 95, Pradhan 95, Schantz 97). Dies führt zu einer Verschiebung des Fluoreszenzmaximums um einige $\lambda = 5$ bis 10 nm in den roten Spektralbereich.

Eine direkte Messung der veränderten NADH-Fluoreszenz im tumorösen gegenüber normalen Gewebe ist bisher schwer möglich. Insbesondere überlagert sich die NADH-Fluoreszenz mit der Fluoreszenz von Strukturproteinen, Kollagen, Elastin und Keratin im gleichen Wellenlängenbereich der Emission und wird zudem durch die Hämoglobinabsorption im Bereich der Soret-Bande beeinflusst. Neueste Messungen, in denen die Fluoreszenz mit der Weißlicht-Remission verrechnet wird, weisen auf eine tumorspezifische Veränderung der NADH-Fluoreszenz hin (Georgakoudi 00). In dysplastischen Arealen aus dem Barrett's Esophagus zeigt sich dabei eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximum und eine Verbreiterung des Fluoreszenzpeaks um bis zu $\lambda = 40$ nm gegenüber normaler Schleimhaut.

Als eine der drei Typen der weißen Blutzellen sind eosinophile Granulozyten Teil der unspezifischen Immunantwort des Körpers. Sie sind doppelbrechend und fallen fluoreszenzmikroskopisch in der Tumorrandzone durch eine starke Fluoreszenz auf (Wang 99b, Mayeno 92). Die Fluoreszenz eosinophiler Granulozyten wird durch darin enthaltene Flavinmoleküle verursacht (Mayeno 92).

5.2 Einfluss der Gewebeschichtung

Die einzelnen Fluorophore sind in den verschiedenen Gewebeschichten wie der Mucosa, bzw. dem Epithel, der Submucosa bzw. dem Bindegewebe, den Muskelfasern, dem knorpelhaltigen Gewebe oder dem Fettgewebe in unterschiedlicher Konzentration enthalten. Mittels immunhistochemischer Färbemethoden, mikroskopischer Fluoreszenzanalysen an Gewebeschnitten, mechanischer Auftrennung verschiedener Gewebeschichten mit anschließender, spektraler Messung der Autofluoreszenz konnten histologischen Gewebetypen teilweise spezifische Fluoreszenzeigenschaften zugeordnet werden:

Tryptophan	Spektrale Messungen an humaner Haut zeigen, dass die „Tryptophanfluoreszenz“ der Epidermis gegenüber der Dermis um einen Faktor zwei bis drei erhöht ist (Gillies 00).
NADH und FAD	Die NADH-Fluoreszenz ändert sich innerhalb von Minuten nach Entnahme des Gewebes (Schomacker 92b). Eine direkte Messung und Aussagen über die strukturelle Verteilung dieser Fluoreszenz erscheinen daher nur sehr eingeschränkt möglich (Brookner 00).

Struktur-Proteine Kollagen, Elastin, Keratin	<p>Sowohl in fluoreszenzoptischen Messungen (Zonios 96, Izuishi 99, Qu 95), als auch über immunhistochemische Färbemethoden (Wilson 96) konnte eine wesentlich erhöhte Kollagen- und Elastinfaserdichte (und damit Fluoreszenz) im Bindegewebe gemessen werden. In fluoreszenzmikroskopischen Messungen in verschiedenen Organen mit geschichteten epithelialen Gewebe konnte eine konsistent reduzierte Fluoreszenzintensität im Tumorrandbereich der Lamina Propria bzw. des Stromas gemessen werden (Brancaleon 01, Drezek 01, Romer 95, Fiarman 95, Georgakoudi 00). Dies wird auf eine tumorspezifisch erhöhte Synthese an Metalloproteinasen in Fibroblasten zurückgeführt, was zu einer Reduzierung der Kollagen- und Elastinfaserdichte führen kann.</p> <p>Kollagen IV wird als einziges Kollagen auch in der Basalmembran des Epithels nachgewiesen (Kannan 94, Deen 94). Die Anregungs- und Emissionsmaxima liegen für Kollagen als auch Elastin bei $\lambda = 335$ und $\lambda = 390$ nm, $\lambda = 370$ und $\lambda = 460$ nm, und $\lambda = 440$ und $\lambda = 520$ nm (Kollias 98).</p> <p>Neben den Strukturproteinen Kollagen und Elastin trägt in plattenepithelialem Gewebe wie der Mundschleimhaut, in der Epidermis der Haut und in den Nägeln und Haaren die Hornsubstanz Keratin zur Elastizität und zum Schutz des Bindegewebes bei. Keratin wird über einen breiten Spektralbereich von $\lambda = 200$ nm bis ca. $\lambda = 400$ nm zur Fluoreszenz angeregt (Sternborg 94, Smith 85). Bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 308$ nm liegt das Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 350$ nm (siehe Abb. 3). Gegenüber Tryptophan fällt die Fluoreszenzintensität in dem langwelligen Bereich langsamer ab (FWHM Trp. $\lambda \sim 35$ nm, FWHM Keratin $\lambda \sim 80$ nm). Mit langwelligerer Anregung bis $\lambda = 400$ nm verschiebt sich das Fluoreszenzmaximum bis zu $\lambda = 470$ nm (Sternborg 94).</p>
---	--

5.3 Einfluss gewebeoptischer Parameter

Die Ausbreitung von Licht in biologischen Geweben ist durch Absorption und mehrfache Streuprozesse gekennzeichnet. Trifft Licht in Form ebener Wellen senkrecht auf ein homogenes Medium mit vernachlässigbarer Streuung, so nimmt die Raumbestrahlungsstärke im Gewebe nach dem Lambert-Beer-Gesetz exponentiell ab. In Abb. 4 ist die Absorption von Wasser, Hämoglobin, Melanin und eine (typische) Absorption von Gewebe dargestellt. Wasser hat im sichtbaren Spektralbereich eine sehr viel geringere Absorption als die anderen im Gewebe vorkommenden Substanzen. Im Falle von Hämoglobin zeigt sich eine typische

Bandenstruktur, die für die oxigenierte (HbO_2) bzw. desoxigenierte (Hb) Form in ihrer Lage unterschiedliche Absorptionsmaxima zeigt. Das größte Maximum ist jeweils die Soret-Bande bei $\lambda = 414 \text{ nm}$ für HbO_2 und $\lambda = 433 \text{ nm}$ bei Hb. Im Gegensatz zu Hämoglobin nimmt die Absorption sowohl von Melanin als auch von Fetten und Proteinen (nicht dargestellt) vom ultravioletten in den sichtbaren Spektralbereich monoton ab.

Die dargestellte, gemittelte Gewebeabsorption wurde aus Biopsien normaler Kolonschleimhaut bestimmt, wobei die Standardabweichung der Messungen bei ca. 40 % lag (Zonios 96). In der spektralen Verteilung der Gewebeabsorption zeigt sich die typische Bandenstruktur des Hämoglobins. Aufgrund der verstärkten Absorption von Fetten und Proteinen nimmt diese im Vergleich zur Blutabsorption im ultravioletten Spektralbereich unterhalb von $\lambda = 400 \text{ nm}$ deutlicher zu.

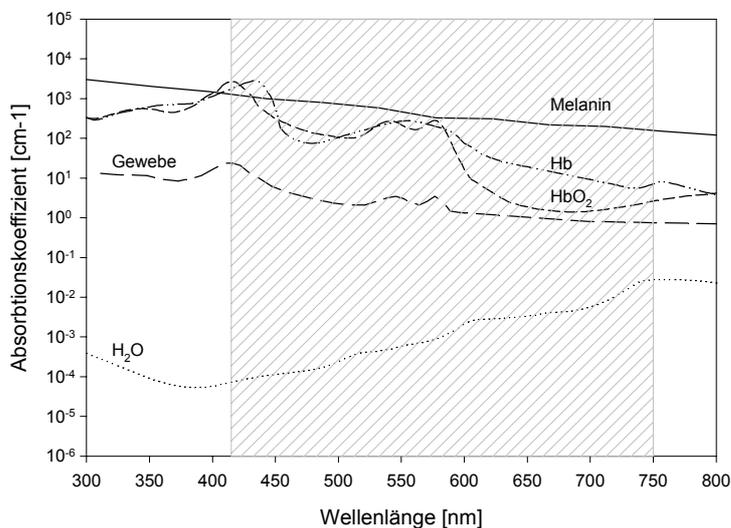


Abb. 4: Spektren der Absorptionskoeffizienten von H_2O , Melanin, oxidierten und desoxigenierten Hämoglobin (Boulnois 86, Jacques 01) und Gewebe (Zonios 96). Der grauschraffierte Bereich kennzeichnet den sichtbaren Spektralbereich.

Die Entwicklung eines Tumors geht mit einer Veränderung der zellulären Architektur einher. Im Speziellen werden die Zellkerne größer, die Dichte erhöht sich, und die Chromatisierung („Anfärbbarkeit“ bestimmter Substanzen wie DNA, RNA und Kernproteine im Karyoplasma) nimmt zu. Veränderungen in der Gewebearchitektur führen zu unterschiedlichem Streuverhalten des Lichts im Gewebe. Lichtstreuung kommt durch mikroskopische Brechungsindexsprünge zwischen extrazellulären und intrazellulären Zellstrukturen und Gewebekomponenten zustande (Jacques 96). Liegt die Größenordnung der Streupartikel (wie z. B. Blut Zellen) im Bereich der Wellenlänge des eingestrahlt Lichts, wird der Streuvorgang mathematisch durch die Mie-Theorie beschrieben (Niemz 96). Die Wellenlängen-

abhängigkeit der Mie-Streuung ($\sim \lambda^{-x}$ mit $0.4 \leq x \leq 0.5$) ist im Vergleich zur Rayleigh-Streuung (Partikelgröße $\ll \lambda$, $\sim \lambda^{-4}$) schwächer, d.h. die Streuintensität nimmt zu kürzeren Wellenlängen weniger stark zu. Zudem tritt die Mie-Streuung bevorzugt in Vorwärtsrichtung auf. Rayleigh-Streuung ist im Gegensatz dazu isotrop.

In bildgebenden und spektroskopischen Autofluoreszenzverfahren wirkt sich der Einfluss gewebeoptischer Parameter oftmals dadurch aus, dass entzündliche Veränderungen als tumorverdächtig fehlinterpretiert werden und damit zu falsch-positiven Resultaten führen. In spektroskopischen Fluoreszenzmessungen wird der Einfluss der Blutabsorption besonders deutlich. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 5 A das Fluoreszenzspektrum normaler Schleimhaut des Barrett's Esophagus abgebildet (Georgakoudi 00). Die Messungen wurden bei Anregung mit einem Stickstofflaser bei $\lambda = 337$ nm durchgeführt.

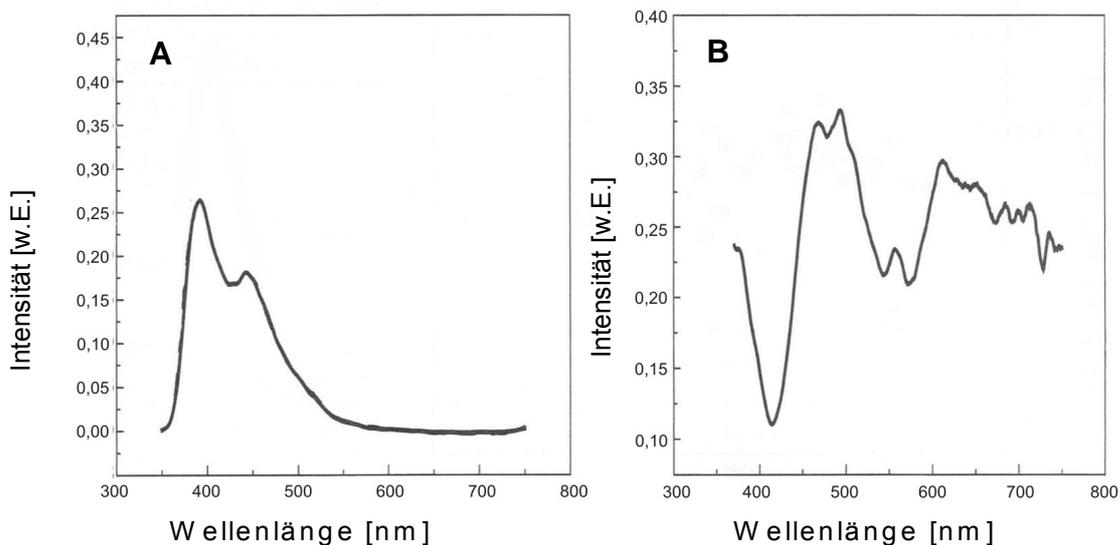


Abb. 5: (A) Fluoreszenzspektrum eines nichtdysplastischen Bereichs aus dem Barrett's Esophagus, $\lambda = 337$ nm Anregung. (B) Korrespondierendes Weißlicht-Remissionsspektrum (Georgakoudi 00).

In Abb. 5 sind zwei Fluoreszenzmaxima abgebildet, welche die Anwesenheit von zwei unterschiedlichen Fluorophoren suggerieren. Dies kann allerdings auch fehlinterpretiert werden, da die Position des Minimums zwischen den beiden Maxima der Hämoglobinabsorption im Bereich der Soret-Bande ($\lambda \sim 420$ nm) entspricht. Die Hämoglobinabsorption wird insbesondere in dem Weißlichtspektrum (Abb. 5 B) an den Minima bei $\lambda = 420, 540$ und 580 nm deutlich, die mit der Oxyhämoglobinabsorption korrespondieren. In diesen Wellenlängenbereichen erhöhter Gewebeabsorption sind Fluoreszenzmaxima nicht direkt mit der spezifischen Fluoreszenz bestimmter Fluorophore in Verbindung zu bringen. Zum

Beispiel kann der Fluoreszenzpeak bei $\lambda \sim 450$ nm (Abb. 5 A) leicht als NADH-Peak und der Fluoreszenzpeak bei $\lambda \sim 390$ nm als Kollagen-Peak fehlinterpretiert werden.

Verschiedene Arbeitsgruppen arbeiten an Methoden zur Unterdrückung gewebeoptischer Parameter, um Aufschluss über die intrinsische Fluoreszenz oder Konzentration biochemisch interessierender Moleküle wie dem NADH, den Flavinen oder den Porphyrinen zu erhalten (Wu 93, Zhang 00, Zhadin 98, Gardner 96).

Neben dem Einfluss gewebeoptischer Parameter auf die aus dem Gewebe austretende Fluoreszenz bestimmen diese zudem entscheidend die Eindringtiefe des Anregungslichts ins Gewebe und damit das Gewebevolumen, in dem das Fluoreszenzlicht erzeugt wird (Welch 97). Die Eindringtiefe ist dabei als die Entfernung definiert, nach der die Intensität des einfallenden Lichts auf $1/e$ bzw. auf 37% des ursprünglichen Wertes abgesunken ist. In ist die typische Eindringtiefe in Abhängigkeit unterschiedlicher Durchblutung bei konstanter Streuung dargestellt. Vom ultravioletten bis zum roten Spektralbereich nimmt die Eindringtiefe stetig zu und variiert dabei besonders in Bereichen erhöhter Hämoglobinabsorption (bei $\lambda = 420$, 540 und 580 nm) bis zu drei Größenordnungen. So variiert die Eindringtiefe im Bereich der Soret-Bande bei $\lambda = 420$ nm zwischen $2 \mu\text{m}$ (12% Blutanteil) und $500 \mu\text{m}$ (0,1% Blutanteil). Für eine Wellenlänge von $\lambda = 308$ nm eines XeCl-Excimerlasers ergibt sich eine Eindringtiefe zwischen 70 und $170 \mu\text{m}$.

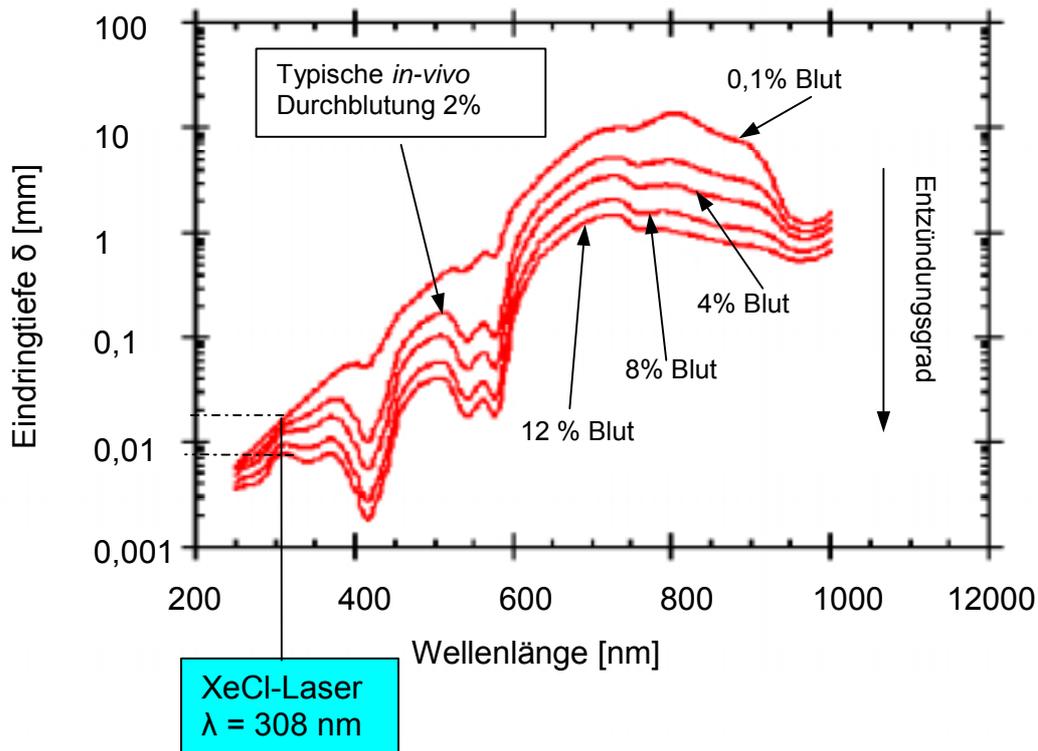


Abb. 6: Eindringtiefe in Abhängigkeit der typischen prozentualen Durchblutung in Gewebe (Bargo 01).

6 Bildgebende fluoreszenzdiagnostische Verfahren

Im ultravioletten Spektralbereich unterhalb von $\lambda = 360$ nm sind optische Gläser in handelsüblichen Endoskopen nicht mehr transmittierend, so dass sich die klinische Umsetzung bei der Entwicklung bildgebender Verfahren zunächst auf den sichtbaren Spektralbereich konzentriert hat. Für diese bildgebenden Verfahren werden typischerweise Xe-Kurzbogenlampen verwendet, die blau-violettes Licht zwischen $\lambda = 360$ und $\lambda = 460$ nm als Fluoreszenzanregungslicht produzieren. Hierbei liefert die indirekte Messung epithelialer Schichtdicken über die Anregung von Strukturproteinen im Bindegewebe (Zonios 96, Koenig 96, Schomacker 92) den Hauptbeitrag zur Unterscheidbarkeit zwischen bösartigem und gutartigem Gewebe. Die Gewebeabsorption ist im grünen stärker als im roten Spektralbereich ausgeprägt (siehe Kapitel 5.3), wodurch sich die Verdickung des Epithels zudem in einem Farbkontrast niederschlägt (Goujon 01, Betz 00). Verdächtige Tumorareale stellen sich im Vergleich zur grünen Fluoreszenz normaler Schleimhaut rot-bräunlich dar (Abb. 8).

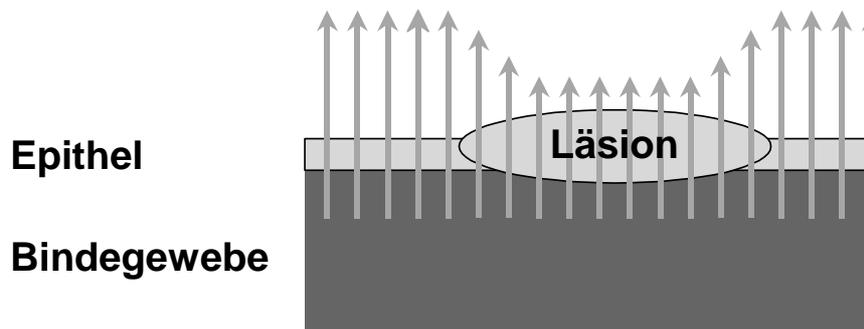


Abb. 7: Abschwächung der Autofluoreszenz durch verdicktes Epithel (Stepp 99).

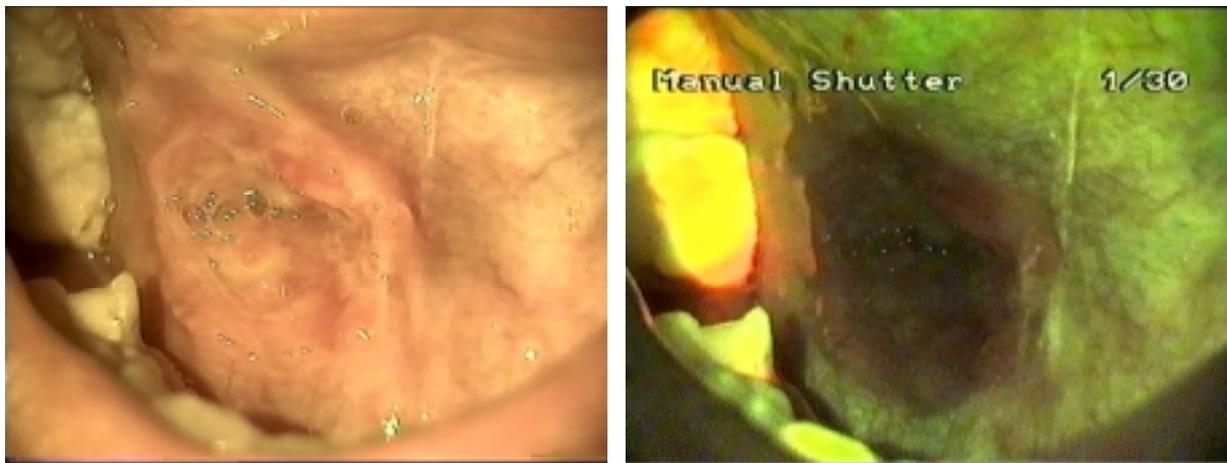


Abb. 8: Darstellung des makroskopisch sichtbaren Kontrasts in der Autofluoreszenz zwischen Tumorgewebe- und gesundem Gewebe. Weißlicht (Links) und Autofluoreszenzbild (Rechts) eines mittelgradig differenzierten Plattenepithels am Mundboden (Betz 00).

Nachteilig bei den Messungen der Absolutintensitäten wirkt sich die Geometrieabhängigkeit der Beleuchtung und Detektion aus (Wagner 00, Qu 00c, Jacques 98). So werden Inhomogenitäten in der Beleuchtung direkt auf das Autofluoreszenzbild übertragen. Auch ist das Fluoreszenzbild abhängig vom Abstand der Beleuchtungseinheit (distales Ende Endoskop) und der zur Beobachtung stehenden Schleimhaut. Es wird daher an bildgebenden Verfahren gearbeitet, die diese Geometrieabhängigkeit der Beleuchtungskonfiguration reduzieren (Qu 00a, Qu 00b, Qu 01, Profio 84, Lenz 88, Stepp 94). In diesen Verfahren wird die Remission des Fluoreszenzangeregungslichts (im blauen Farbkanal) mit dem Fluoreszenzlicht (grüner bzw. roter Farbkanal) verrechnet.

Erste Arbeiten im Bereich der UVB-angeregten Autofluoreszenz gehen auf Alfano et al. zurück (Alfano 91). Sie untersuchten eine Reihe verschiedener Organe ex-vivo und verwendeten einen Ratio-Algorithmus zwischen $\lambda = 340 \text{ nm}$ und $\lambda = 440 \text{ nm}$ um bösartiges von gutartigem Gewebe zu unterscheiden. Diese Methode der Ratio-Bildung zwischen dem UV-

und dem sichtbaren Spektralbereich wurde hier übernommen, da sie sich gut auf bildgebende Verfahren umsetzen lässt und gleichzeitig die Möglichkeit einer geometrieunabhängigen Bilderfassung bietet (Katz 00a, Katz 00b).

7 Zytotoxizität von UV-Strahlung

Das ultraviolette Spektrum wird gewöhnlich in den UVA ($\lambda = 400 - 320$ nm), UVB ($\lambda = 320 - 290$ nm) und UVC ($\lambda = 290 - 200$ nm) Bereich unterteilt (Bensasson 93). Die stratosphärische Ozon-Schicht absorbiert das meiste Sonnenlicht unterhalb von $\lambda \sim 310$ nm. UV-Strahlung unterhalb von $\lambda \sim 290$ nm kann auf Seehöhe praktisch nicht mehr gemessen werden (Kelfkens 90). In der Verursachung photobiologischer Effekte wie der Bildung von Erythemen, Tumoren oder der Schädigungen des Auges ist der UVB-Bereich um etwa vier Größenordnungen effizienter als der UVA-Bereich (de Laat 97, Parrish 82).

1985 wurden von der INIRC (International Non-Ionizing Radiation Committee) Grenzwerte für die Bestrahlung der Haut und der Augen mit Licht zwischen $\lambda = 180$ und 400 nm festgelegt (INIRC 85). Bei einer Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 308$ nm (Anregungswellenlänge) wird darin für normale kaukasische Haut ein Bestrahlungsgrenzwert von 120 mJ/cm^2 innerhalb eines Arbeitstages (8 Stunden) angegeben. Dieser Grenzwert wurde aus so genannten „Action-Spektren“ für die Erythembildung und der Photokeratoconjunktivitis (Augenbindehautentzündung) abgeleitet und gelten gleichermaßen als oberster Grenzwert für die Photokarzinogenese in allen Organen. Durch die Gewichtung bestimmter Bestrahlungsintensitäten nach ihrer relativen Effektivität und anschließender Aufsummierung der spektralen Gewichtungen erhält man für die Erzeugung eines photobiologischen Effekts die biologisch bedeutende Bestrahlung einer polychromatischen Lichtquelle. In der Photobiologie wird eine Gruppe solcher spektraler Gewichtungen als „Action-Spektrum“ bezeichnet. Zu dem Zeitpunkt der Erstellung der INIRC-Guidelines lagen noch keine Action-Spektren zur Photokarzinogenese vor.

Von de Gruijl (De Gruijl 94) wurde ein Action-Spektrum für die Photokarzinogenese von Plattenepithel und Basalzellkarzinomen bei Menschen aus einem Action-Spektrum für die Photokarzinogenese an Nacktmäusen durch ein optisches Modell abgeleitet.

Die zugrundeliegende Annahme ist folgende: Plattenepithel und Basalzellkarzinome stammen von der Epidermis ab. Epidermale Zellen werden kontinuierlich von den Keimzellen der Basalmembran produziert. Die vollständige Erneuerung der Epidermis dauert etwa 3 bis 4 Wochen. Da die Karzinogenese ein stochastischer Prozess ist, sind die wahrscheinlichsten Ziele für die UV-Strahlung die langlebigen Keimzellen der Basalmembran. Die UV-Absorption der Epidermis nimmt zwischen $\lambda = 320$ nm und $\lambda = 270$ nm deutlich zu (Bruls 84).

Die menschliche Epidermis ist dicker (~ 70 µm, Bruls 84) als die Epidermis der Maus (~ 30 µm, Sterenborg 88), was bei gleicher Bestrahlungsstärke zu einer intensiveren Bestrahlung der Basalmembran der Maus gegenüber der des Menschen führt. Eine Korrektur dieses Dickenunterschiedes führte zu dem Action-Spektrum für die Photokarzinogenese menschlicher Haut.

In Abb. 9 wird das Action-Spektrum für die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen (SCUP-m/Maus und SCUP-h/Mensch) mit dem Action-Spektrum für die Erythembildung verglichen. Das SCUP-h Action-Spektrum ähnelt demnach dem Action-Spektrum für die Erythembildung. Das Letztere liegt mehr oder weniger zwischen den SCUP-m und SCUP-h Action-Spektren. Im UVB-Bereich der XeCl-Laser-Anregungswellenlänge ($\lambda = 308 \text{ nm}$) steigt die relative Effizienz, Hauttumore zu verursachen stark an. Bei $\lambda = 308 \text{ nm}$ beträgt diese Effizienz ungefähr 30% des Maximalwertes ($\lambda = 299 \text{ nm}$).

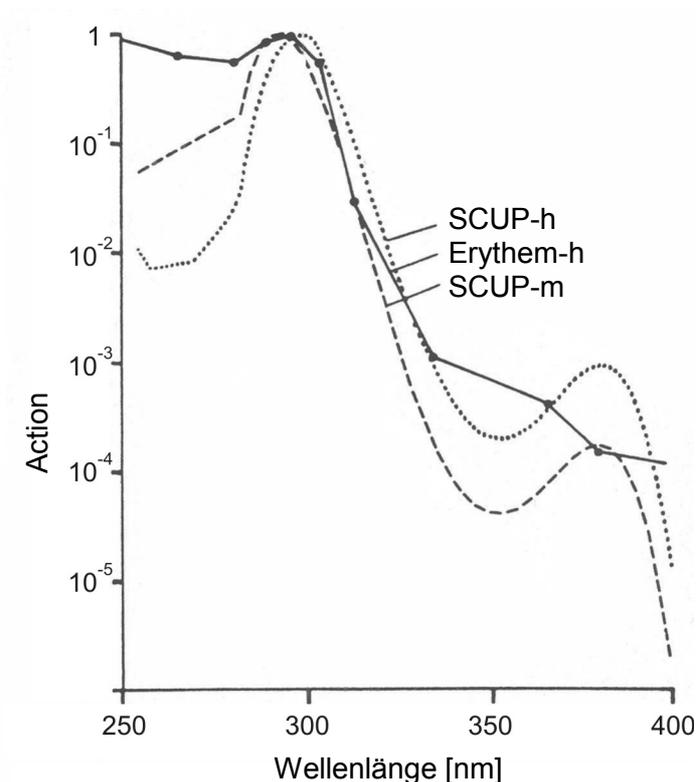


Abb. 9: Vergleich der Action-Spektren von Mäusen (SCUP-m) und Menschen (SCUP-h) mit dem Action-Spektrum für Erythembildung. Abbildung aus de Gruijl (De Gruijl 94).

8 Neoplasien oberflächlicher, geschichteter Schleimhäute

Die Untersuchungen bei geschichtetem Schleimhautgewebe konzentrierten sich in erster Linie auf die Blase und deren Neoplasien. In diesem Fachbereich wurden umfangreichere Untersuchungen vorgenommen und die verwendete Methode mit der 5-ALA induzierten Fluoreszenzdiagnostik und der Weißlichtdiagnostik verglichen. In den Fachbereichen Pulmologie, Gynäkologie und HNO wird im Wesentlichen auf die histologischen Unterschiede zur Urologie verwiesen, die im Zusammenhang mit der Fluoreszenzdiagnostik stehen.

8.1 Urothelkarzinom

Um ein besseres Verständnis des morphologischen Ursprungs der gewebeeigenen Fluoreszenz zu erhalten, wird in den folgenden Abschnitten auf die Histologie normaler Blasen-schleimhaut und die Histopathologie des Urothelkarzinoms eingegangen.

8.1.1 Histologie des gesunden Urothels

Die normale Blasenwand ist im wesentlichen in vier Schichten unterteilt (Abb. 10).

Übergangsepithel (Tunica Mucosa, Urothel). Das Übergangsepithel ist in Falten gelegt, deren Ausbildungsgrad vom Kontraktionszustand abhängt. Die großen, sehr elastischen Deckzellen zeigen oft zwei oder mehrere Zellkerne und sind gegen den Blasen-Hohlraum durch eine besonders dichte Zytoplasmazone begrenzt. Die epitheliale Dicke variiert mit dem Kontraktionszustand der Blase und wird mit 50-70 µm angegeben (Bergmann 81).

Lamina propria (Tela submucosa). Das Epithel ist durch eine gut verschiebbare, gelegentlich auch Fettzellen enthaltende Bindegewebsschicht mit der Unterlage verbunden. Sie besteht aus lockerem Bindegewebe, das aus zahlreichen elastischen Fasern aufgebaut ist. Eine Sonderstellung nimmt in der Harnblase das Trigonum Vesicae ein. Hier ist die Schleimhaut mit der Muskelschicht fest verwachsen und deshalb faltenfrei. Der schmalere, oberflächlichere Bereich der Lamina Propria, der viele dünnwandige Kapillare enthält, ist feinfasriger und zellreicher als der lamellär gebaute, tiefere Bereich.

Tunica muscularis. Unterhalb der Submucosa liegen die netzartig miteinander verbundenen, Bündel glatter Muskulatur, die innen und außen vorwiegend längs, dazwischen mehr ringförmig angeordnet sind.

Tunica adventitia. In der außerhalb der Muskelhaut verlaufenden lockeren Bindegewebschicht, der Tunica adventitia, auch Faserhaut genannt, verlaufen Blut- und Lymphgefäße sowie ein Geflecht markhaltiger und markloser Nerven.

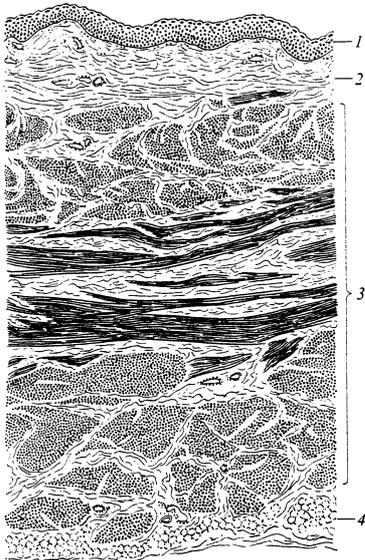


Abb. 10: Querschnitt durch eine menschliche Harnblasenwand. 40-fache Vergrößerung. Übergangsepithel (1), Lamina propia (2), Tunica muscularis (3), Tunica adventitia (4) (Bucher 89)

8.1.2 Histopathologie

Die Mehrzahl der Blasenkarzinome (90%) leiten sich aus dem Übergangsepithel ab. Neben dem Urothelkarzinom sind noch Plattenepithel- (5-6%) und Adenokarzinome (weniger als 2%) zu nennen, die beide zu einem invasiven Wachstum neigen (Kunze 98).

Das Urothelkarzinom kann exophytisch-papillär als auch infiltrierend wachsen. Das sogenannte „Staging“ gibt eine Einteilung des Urothelkarzinoms in oberflächliche nicht-invasive, sowie mittel- und hochgradig invasive Blasenkarzinome. Entsprechend dem Grad der Anaplasie der Zellen wird die Malignität in hoch-, mittel- oder niedriggradig eingeteilt („Grading“). Für eine detailliertere Festlegung der Stadieneinteilung und des Differenzierungsgrades bei invasiv wachsenden Tumoren sei auf eine Zusammenstellung des Tumorzentrum München verwiesen (Spiessel 97).

Von Bedeutung für die Tumorfürhdiagnostik sind vor allem die oberflächlich wachsenden Tumorstufen und Tumoren, die sich mit bloßem Auge nicht oder nur undeutlich von der normalen Blasenschleimhaut unterscheiden lassen. Sie treten oft gleichzeitig mit Entzündungen auf, wodurch eine Unterscheidbarkeit weiter erschwert wird.

Hyperplasie. Hyperplasien zeichnen sich durch eine fokale bzw. diffuse Verbreiterung des normalerweise dreischichtigen Urothels aus. Die Schichtung und Differenzierung des Muttergewebes bleibt erhalten. Je nach Ausprägung werden sie in gering-, mittel- und hochgradig unterteilt. Der Zusammenhang der Hyperplasie als Vorstufe eines papillären Karzinoms wird unter Pathologen kontrovers diskutiert (Epstein 98, Amin 97). Bei Patienten mit einer papillären Hyperplasie besteht noch kein notwendiges Risiko eines papillären Tumorwachstums. Dennoch werden von der WHO „follow-up“ Untersuchungen empfohlen.

Dysplasie und Carcinoma In Situ (CIS). Dysplastische Veränderungen des Urothels spielen pathologisch eine wichtige Rolle als präkanzerose Vorläuferstadien von Urothelkarzinomen. Sie sind zelluläre Atypien mit Vergrößerung, Anisomorphie und Hyperchromasie der Zellkerne und wurden je nach Ausprägung in zwei bzw. drei Schweregrade subklassifiziert. Die Dicke der dysplastischen Veränderungen des Urothels ist mit der Dicke des normalen Urothels (5 bis 7 Zelllagen) vergleichbar, kann aber auch hyperplastisch sein (Amin 97, Bergmann 81). Histologisch zeichnet sich das CIS durch die Anwesenheit von großen, irregulären, hyperchromatischen Kernen aus, die entweder über die ganze Dicke des Urothels oder einen Teil davon präsent sind. Aufgrund einer stark reduzierten Zellkohäsion tendieren die atypischen Zellen zur Ablösung und sind dadurch urinzytologisch nachweisbar. Die Desquamation kann dazu führen, dass histologisch nur noch wenige Zelllagen erkennbar sind. Die histologische Unterscheidung zwischen leicht- und hochgradigen Dysplasien ist fließend und obliegt der subjektiven Beurteilung des Pathologen. Der Begriff der schweren Dysplasie („high grade“) mit Schichtungsstörungen über die gesamte Urothelausdehnung stellt eine obligate Präkanzerose dar und wird nach der neuesten WHO-Klassifizierung dem Carcinoma in situ zugeordnet (Epstein 98). Der Trend der WHO Klassifikation will die mittelgradige Dysplasie dem CIS zuordnen und die leichtgradige Dysplasie abgrenzen.

Metaplasie. Metaplasien gehen aus einem Übergang des Urothels in ein anderes differenziertes Gewebe hervor. In der Blase treten drei Formen der Metaplasie auf: die Plattenepithel-, die Zylinderepithel- und die glanduläre Metaplasie. Am häufigsten wandelt sich das Übergangsepithel metaplastisch in ein Plattenepithel mit und ohne Verhornung um. Plattenepithelmetaplasien werden vorwiegend bei Frauen im Bereich des Trigonums beobachtet und sind meist mit einer Blasenentzündung assoziiert. Nicht verhornendes Plattenepithel zeigt häufig Glykogenabbau und sollte normales vaginales Epithel darstellen (Amin 97). Es tritt bei 75-86% der Frauen auf und ist deshalb nicht als rein metaplastisch einzustufen. Verhornende Plattenepithelmetaplasien sowie Zylinderepithelmetaplasien und glanduläre Metaplasien sind hingegen als obligate Präkanzerosen einzustufen.

Entzündungen des Urothels. Entzündungen der Harnblasenwand treten oft in Verbindung mit oder vor dem Entstehen von Blasentumoren auf (Amin 97). Sie treten nicht nur als Begleiterscheinungen von Blasentumoren (insbesondere dem CIS) auf, sondern initiieren das Tumorwachstum durch oxidative Aktivität der entzündeten Zellen. Bei der Entzündung entsteht im floriden Stadium ein Ödem der Lamina Propria, eine Hyperämie der Gefäße und eine Ansammlung von Granulozyten und Lymphozyten.

8.1.3 Klinische Situation der intraoperativen Diagnostik

Zur konventionellen endoskopischen Diagnostik urothelialer Neoplasien wird weißes Licht verwendet, das vom Gewebe je nach Beschaffenheit und Absorptionseigenschaften unterschiedlich rückgestreut wird. Schwere Dysplasien und CIS befinden sich häufig in unspezifisch entzündlich veränderter Schleimhaut. Sie können jedoch auch in völlig unauffällig erscheinender Mucosa auftreten und werden damit übersehen (Soloway 78). Fortgeschrittene CIS sind oft nur durch eine leicht vermehrte Gefäßzeichnung erkennbar.

Gegenüber Dysplasien oder Carcinoma in situ sind flachpapilläre oder exophytische Tumore, die 70% bis 80% urothelialer Neoplasien ausmachen, in der Regel leichter erkennbar. Sie zeichnen sich durch oberflächliche Unebenheiten oder „fransenförmige“ Struktur aus. Dennoch werden auch diese Tumore oft übersehen. So fanden sich 2-6 Wochen nach Ersteinriff in 38% bis 63% der Nachresektionen noch Tumorresiduen (Althausen 76, Flamm 89).

Von den verschiedenen optischen Methoden mit endogenen oder exogenen Markern hat sich bei der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms die 5-ALA induzierte Fluoreszenzdiagnostik klinisch am weitesten etablieren können. Hierzu wurde eine Vielzahl klinischer Studien durchgeführt (Filbeck 99, Cheng 00, Jichlinski 97, De Dominicis 01, Zaak 01b, Koenig 99, Jeon 01). Darin reicht die Sensitivität der Methode von 87% bis 96% und die Spezifität zwischen 57% und 67%. In einer retrospektiven Studie an 51 Patienten mit rezidivierenden Urothelkarzinomen konnte eine signifikante (Wilcoxon-Test, $p=0,005$) Reduzierung der jährlichen Rezidivrate um 50% nachgewiesen werden (Zaak 99).

Nachteilig wirkt sich bei der klinischen Durchsetzung und Akzeptanz der Methode die hohe Anzahl falsch-positiver Befunde aus. Zwischen 1995 und 1999 wurden 1012 Zystoskopien über die 5-ALA induzierter Fluoreszenzdiagnostik an der urologischen Klinik der LMU München durchgeführt (Zaak 01c, Stepp 01). In 37,9% dieser Zystoskopien wurden ausschließlich falsch-positive Befunde gefunden. Von insgesamt 2475 Biopsien wurden 49,6% (1123) als falsch-positiv eingestuft. Von diesen falsch-positiven Befunden waren 60% unspezifischen Entzündungen, 23% normaler Blasenschleimhaut und 11% den Hyperplasien zuzuordnen. Darüber hinaus wurden in einem geringeren Prozentsatz auch Metaplasien und

Dysplasien WHO Grad I als Fluoreszenzpositiv wahrgenommen. Diese Untersuchungen unterstreichen die Notwendigkeit einer Verbesserung der Spezifität der 5-ALA induzierten Fluoreszenzdiagnostik.

8.2 Bronchialkarzinom

Die Atmungsorgane untergliedern sich in luftleitende und respiratorische Abschnitte. Die luftleitenden Abschnitte beginnen bei der Nasenhöhle und enden in dem nichtrespiratorischen Anteil der Bronchioli. In der Pulmologie bei der endoskopischen Diagnostik von Bronchialkarzinomen ist besonders der luftleitende, nichtrespiratorische Anteil der Atmungsorgane von Interesse. Mit flexiblen Bronchoskopen sind Bronchien bis zu einem Durchmesser von ca. 5 mm zugänglich. Das entspricht in etwa dem vierten Verzweigungsast des Bronchialbaumes. In diesem Abschnitt finden sich ca. 90% der Bronchialkarzinome (Saccomanno 96). Das respiratorische Epithel besitzt einen gleichmäßig geschichteten Aufbau aus Epithel, Lamina Propria und Tunica Fibromusculocartilaginea. Die Dicke des normalen Epithels beträgt ca. 45 µm und nimmt mit dem Durchmesser der Bronchien kontinuierlich ab (Bucher 89, Qu 95). Die unterhalb der Lamina Propria liegende Tunica Fibromusculocartilaginea besteht aus quer zur Luftröhre verlaufenden, hufeisenförmigen Spangen aus Knorpel, die 2/3 bis 3/4 des Umfangs umgreifen und an ihren offenen Enden durch glatte Muskelfaserbündel verbunden sind. Die Knorpelspangen sind untereinander durch kollagene Bindegewebszüge und elastische Fasernetze verbunden. Die Karzinogenese von Lungentumoren ist ein langsamer Prozess der über Jahrzehnte hinweg stattfindet. Die Entwicklung eines manifesten Karzinoms dauert zwischen 20 und 25 Jahre und erstreckt sich über die Stadien der Basalzellhyperplasie, der Plattenepithelmetaplasie, der Dysplasie, des Carcinoma in situ und zuletzt des invasiven Karzinoms (Saccomanno 74, Franklin 00a, Franklin 00b). So gehen Experten von einer 5-6 Jahre langen, karzinogenen Belastung aus, bis es zur Entstehung einer Dysplasie kommt. Weitere sechs Monate dauert es dann, bis aus der Dysplasie ein Carcinoma entsteht.

Von allen malignen Erkrankungen besitzt das Bronchialkarzinom sowohl die höchste Inzidenz als auch die höchste Mortalitätsrate, die nahezu der Inzidenz entspricht (Spektrum der Wissenschaften 97). Die hohe Inzidenz ist vor allem durch den Tabakkonsum bedingt. So wird vermutet, dass 8 von 10 Tumorerkrankungen durch das Rauchen verursacht werden (Lung cancer - overview 01). Trotz weitreichender Bemühungen in der Weiterentwicklung von Diagnose und Therapie stieg die 5-Jahres-Überlebensrate in den letzten 25 Jahren nur um wenige Prozent an und liegt derzeit bei 8 – 13 %. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist eng mit dem Grad des Stadiums der malignen Erkrankung korreliert (Tab. 1).

Stadium („Stage“)	5 – Jahres-Überlebensrate
Dysplasie/CIS	95%
I	70%
II	35%
III A	20%
III B/IV	6%
Insgesamt:	8-13%

Tab. 1: Korrelation zwischen Prognose und Krankheitsstadium des Bronchialkarzinoms (Kato 92).

Erste Symptome des Bronchialkarzinoms sind unspezifisch und treten meist erst im Stadium II bis IV auf (Müller 91). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt dann bei nur 6 – 20 %. Wird dagegen ein Bronchialkarzinom im Stadium einer Dysplasie bzw. eines Carcinoma diagnostiziert beträgt die 5-Jahres Überlebensrate 95 %.

70% aller Lungenkarzinome wachsen im Bereich der zentralen Bronchien, die endoskopisch einsehbar sind. Plattenepithelkarzinome, die vorwiegend durch eine chronische Irritation wie dem Rauchen bedingt werden, treten in hohem Maße im Bereich der Karinen und im vorderen Bereich der Bronchien auf. Adenokarzinome hingegen wachsen vorwiegend in den peripheren Abschnitten der Lunge.

Bei der konventionellen Weißlichtbronchoskopie liegt die Sensitivität für die Erkennung von Dysplasien und CIS nach unterschiedlichen Untersuchungen zwischen 9 und 33% (Lam 00). Zudem lassen sich diese prämaligen Vorstufen kaum von entzündlichen Veränderungen der Schleimhaut unterscheiden. So konnte Sato (Sato 93) zeigen, dass von 447 Bronchialbiopsien aus Arealen mit geringgradiger Abnormalität nur 14% histopathologisch prämaligen Vorstufen oder Karzinomen zuzuordnen waren. Sowohl die geringe Sensitivität als auch Spezifität der endoskopischen Weißlichtdiagnostik verhindern den Einsatz klinisch adäquater Therapieansätze.

8.3 Zervikale intraepitheliale Neoplasie

Die Zervix uteri ist ein zylinderförmiges Organ, dessen unterer Teil, die Portio uteri, zapfenförmig in den Vaginalkanal reicht. Die 7-8 cm lange und 3 cm breite Zervix uteri hat eine fibromuskuläre Struktur, die gänzlich mit Schleimhaut überzogen ist. Die Zervix besteht aus zwei histologisch unterschiedlichen Bereichen: der Ektozervix und der Endozervix.

Die Schleimhaut der Ektozervix besteht aus einem geschichteten, unverhornten Plattenepithel, das dichtes faserhaltiges Stroma bedeckt (Gompel 94). Die oberflächliche Schicht besteht aus großen Zellen, die viel keratinhaltiges Zytoplasma besitzen. Das endozervikale,

einschichtige prismatische Epithel ist nicht so klar strukturiert wie das Plattenepithel des Ektozervix. In bestimmten Funktionszuständen ist es vaginalaufwärts mit Flimmerepithel bedeckt. Das Stroma der Ekto- und Endozervix ist ungeordnet und abwechselnd mit kollagenhaltigen bzw. elastischen Fasern und Muskelfasern durchzogen. Es unterliegt nicht den gleichen zyklischen histologischen Veränderungen wie die des Endometriums. Die Verbindungsstelle zwischen Ekto- und Endozervix wird als Transformationszone bezeichnet, an der die beiden Schleimhäute direkt aneinander grenzen oder an der es zu der Ausbildung eines metaplastischen Plattenepithels kommt. Während der Phase der Fruchtbarkeit der Frau liegt die Transformationszone außerhalb des Zervikalkanals und verschiebt sich mit zunehmenden Alter in den Zervikalkanal.

Unter dem Begriff der „zervikalen Neoplasie“ (CIN) sind dysplastische Veränderungen des Epithels im Bereich der Transformationszone zu verstehen. In der Begriffsbildung und Unterscheidung der Schweregrade der CIN gibt es keine einheitliche Definition unter Pathologen. In der Pathologie des Klinikum Großhaderns richtet man sich nach der schematischen Einteilung von Richart (Richart 76). Demnach werden die CIN (oder auch Dysplasien) nach dem Schweregrad der dysplastischen Veränderung in drei Stufen eingeteilt.

Im Gegensatz zur histopathologischen Einteilung der dysplastischen Veränderungen des Urothels wird die intraepitheliale Läsion des Zervix nach der Anzahl der beteiligten atypischen Zellen bewertet (Amin 97). Ein Unterschied zwischen CIN 3 und CIS ist nur insofern festzustellen, als bei dem CIN 3 noch eine Differenzierung in den oberen Schichten des Epithels erkennbar ist.

Hillemanns (Hillemanns 97) untersuchte auf Grundlage einer prospektiven Studie die Verlaufszeiten von Zervixdysplasien unter Verwendung von Zytologie und Kolposkopie. Daraus geht hervor, dass etwa 10-15% der unbehandelten Dysplasien in eine schwere Dysplasie übergehen und ungefähr 5-10% in ein invasives Karzinom. Bis zu einem Stadium CIN 2 ist mit einem Verschwinden der Läsionen in 40% der Fälle zu rechnen.

In den letzten vierzig Jahren hat sich die Inzidenz des Zervikalkarzinoms stark reduziert. Die Mortalitätsrate nahm in den USA im Zeitraum zwischen 1955 und 1992 um 74% auf ca. 4600 ab (Wright 94). Die 5-Jahres-Überlebensrate für invasive (bzw. nicht invasive) zervikale Tumore beträgt 91% (bzw. 100%), und die gesamte Überlebensrate liegt bei 70% (Cervical Cancer - Overview 01). Diese sinkende Inzidenzrate des Zervikalkarzinoms ist vor allem auf regelmäßige und systematische Vorsorgeuntersuchungen der Frauen zurückzuführen. Allerdings wird gleichzeitig mit der doch reduzierten Inzidenzrate des invasiven Zervikalkarzinoms bei Frauen unter 35 Jahren eine deutliche Zunahme der Inzidenz von prä-malignen, dysplastischen Veränderungen des Gebärmutterhalses beobachtet. Die CIN sind oftmals rezidivierend und können mit einer langen Latenz in ein Plattenepithelkarzinom übergehen.

Der zytologische Zellabstrich nach Papanicolau ist die Screening Methode erster Wahl (Koss 89). Bei einem sog. „Pap-Smear“ – Test wird eine große Anzahl von Zellen von dem zervikalen Epithel abgeschürft, auf einem Mikroskopträgerplättchen verschmiert („smear“) und für die zytologische Untersuchung fixiert und gefärbt. Die so erhaltenen „Smear“ – Präparate werden anschließend unter einem Mikroskop nach eventuellen neoplastischen Zellen untersucht und bewertet. Diese einfache Methode dient als Entscheidungshilfe für weitere diagnostische Untersuchungen. Die Sensitivität als auch die Spezifität wird mit 11 bis 80% bzw. 14 bis 97% angegeben (Fahey 95). Eine Quote von 20-30% falsch-negativen Befunden ist zu 60% auf mangelnde Entnahmetechnik und schlechte Präparation des Abstrichs und zu 40% auf Fehler bei der zytologischen Untersuchung zurückzuführen (Wilkinson 90). Gute „Pap-Smear“ Tests sind arbeitsintensiv und verlangen gut ausgebildete und erfahrene Spezialisten (Koss 89, Cramer 74).

Weist der Abstrich auf die Anwesenheit von dysplastischen Zellen im Zervikalepithel hin, folgt dieser Untersuchung die so genannte Kolposkopie (Kurman 94). Bei der kolposkopischen Untersuchung wird die Portio Uteri erst mit 3%iger Essigsäure und anschließend mit Kaliumjodid Lösung (Lugol-Lösung) benetzt und mit einem leicht vergrößernden Mikroskop betrachtet und nach der Beschaffenheit der Oberfläche bewertet. Auffällige Stellen zeichnen sich durch verschiedene charakteristische Unterschiede wie z.B. einer mosaikförmigen Verwerfung des Epithels oder einer punktierten Struktur aus (Burke 91). Die Sensitivität als auch Spezifität kolposkopischer Untersuchungen hängt entscheidend von der Erfahrung des Gynäkologen ab und liegt bei 80-90% für die Sensitivität und bei 50-60% für die Spezifität (Mitchell 98).

Eine Untersuchung am Klinikum Großhadern zur 5-ALA induzierten Fluoreszenzdiagnostik an zervikalen Dysplasien an 68 Frauen zeigte eine Sensitivität von 94% und eine Spezifität zwischen 25% und 47% je nach Applikationsdauer von 5-ALA (Hillemanns 00b, Weingandt 99). Gleichzeitig wurden Autofluoreszenzuntersuchungen mit blau-violetttem Anregungslicht durchgeführt. Dabei war die PPIX-Fluoreszenzdiagnostik der Autofluoreszenzdiagnostik insbesondere in der Sensitivität unterlegen (69%). In Bezug auf Sensitivität und Spezifität stellen weder die bildgebende Fluoreszenzdiagnostik PPIX-Fluoreszenzdiagnostik noch die Autofluoreszenzdiagnostik unter blau-violetttem Anregungslicht ein herausragendes Hilfsmittel gegenüber den konventionellen diagnostischen Möglichkeiten dar.

8.4 Malignom der Mundhöhle

Die Mundschleimhaut wird histologisch in drei Klassen unterteilt (Farbmann 88). Die „Masticatory“-Mucosa („Kauschleimhaut“) umfasst die Schleimhaut des harten Gaumens und des zahnnahe Zahnfleisches. Diese Schleimhaut ist widerstandsfähig und gewöhnlich kerati-

nisierend. Die „lining“-Mucosa („Auskleidende Schleimhaut“) ist flexibel und ist nicht-keratinisierend. Sie wird am weichen Gaumen, den Lippen, den Wangen, dem Mundboden, der Zungenunterseite und im Wundvorhof (Umschlagseite der Lippe) gefunden. Die Morphologie und die zelluläre Physiologie dieser auskleidenden Schleimhäute ist zwischen den verschiedenen Stellen sehr variabel. Neben diesen Schleimhauttypen ist noch die Zungenoberseite zu nennen, der eine spezielle Funktion zukommt, da sie aus epithelialen Papillen besteht. In Tab. 2 werden die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Lining und Masticatory Mucosa zusammengefasst.

	„Lining“ Mucosa	„Masticatory“ Mucosa
Topografische Verteilung	Weicher Gaumen, Zungenunterseite, Mundboden, Zahnfleisch (Zahnfern), Zungenumschlagseite, Lippen, Wangen	Harter Gaumen, Zahnfleisch (zahnnah)
Epithel	Nicht-keratinisierend 0,1 – 0,6 mm dick. Drei – lagig: Stratum Basale S. Filamentosum S. Distendum	Ortho / parakeratinisierend 0,25 mm dick. Vier-lagig: S. Basale S. Spinosum S. Granulosum S. Corneum
Lamina Propria	Variable Anzahl bindegelblicher Papillen (15-75/mm ²) und der elastischen Fasern, kollagenarm, loses Bindegewebe	Viele bindegewerbliche Papillen (120/mm ²), kollagenreich, dichtes Bindegewebe
Submukosa	Variables, loses Bindegewebe, Kollagen und Elastinfasern, Schleimhautdrüsen und Fettgewebe, Talgdrüsen	Dichtes, kollagenreiches Bindegewebe, Schleimhautdrüsen und Fettgewebe am Gaumen

Tab. 2: Vergleich des histologischen Aufbaus von „Lining“ und „Masticatory“-Mucosa (Farbmann 88).

In Bezug auf die Fluoreszenzdiagnostik ist neben der unterschiedlichen Keratinisierung und der Dicke auf den unterschiedlichen Grad der Kollagen- bzw. Elastinfaserdicke der Lamina Propria in der Submucosa hinzuweisen (Tab. 2).

Die häufigsten Präkanzerosen im Bereich der Lippen und der Mundhöhle sind Leukoplakien. Diese weißen Beläge unterscheiden sich morphologisch kaum von Carcinoma in-situ-Läsionen, daher wird hier immer eine Biopsieentnahme empfohlen (Silverman 94, Silverman, Jr. 88). In der Mundhöhle gibt es fast ausschließlich Plattenepithelkarzinome. 75% der Tumore treten im Drainagebereich der Mundhöhle, das heißt in der Rinne zwischen unterem Alveolarkamm und Zungenrand, auf. Nicht selten ist beim Auftreten eines Karzinoms auch die übrige Schleimhaut, die den selben karzinogenen Noxen ausgesetzt war, im Sinne einer Feldkanzerisierung mitgeschädigt (Shibuya 87). Somit besteht bei diesen Patienten eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Zweitkarzinoms.

Bei der Diagnose von Mundhöhlenkarzinomen wird in der klinischen Routine eine gründliche Untersuchung unter Weißlicht vorgenommen. Wegen des hohen Risikos einer Feldkanzerisierung (Shibuya 87) wird meist eine Endoskopie des gesamten Hals-Nasen-Ohrenbereiches unter Generalanästhesie vorgenommen. Nach einer Studie von Silverman et al. (Silverman, Jr. 88) kann die Frühdiagnostik gefolgt von radikaler Entfernung die Heilungschancen entscheidend verbessern. Von 1467 untersuchten Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen stieg die 3-Jahres-Überlebensrate von 39% auf 78% (Patienten mit Läsionen kleiner als 4 cm Durchmesser und ohne Ausbreitung in regionale Lymphknoten). Trotzdem werden auch in diesem Fachbereich Tumorfrühstadien schwer erkannt und teilweise sogar von erfahrenen Ärzten übersehen (Betz 00).

9 Gliome

In Bezug auf die Fluoreszenzdiagnostik unterscheidet sich das Gehirn grundsätzlich von der Morphologie geschichteten epithelialen Gewebes. Zudem ist in diesem Fachbereich die Diagnostik zu einer interoperativen Abgrenzung des Tumorgewebes gegenüber normalem Gewebe einzusetzen. In den beschriebenen Hohlorganen ist es vielmehr das Ziel diagnostischer Methoden, befallene Areale erst aufzufinden.

Gliome entspringen der so genannten Glia, dem Stütz- und Ernährungsgewebe des gesamten Nervensystems (Schirmer 98, Bucher 89). Im ZNS unterscheidet man verschiedene gliale Zellformen wie Astrozyten (große, zur Phagozytose befähigte, sternförmige Zellen), Oligodendrozyten (kleine Zellen, die vorwiegend in der weißen Substanz auftreten) und Hortega-Zellen (Mikrogliazellen). Im Gegensatz zu den Nervenzellen sind die Gliazellen auch nach der Pränatalperiode noch vermehrungsfähig. Allgemein befindet sich der Zellkern, bestehend aus Nukleus und Nissl-Substanz, in der Hirnrinde (Kortex) und die Neuriten zu-

sammen mit der Markscheide und den Synapsen (zu anderen Neuriten und Dendriten) im Marklager. Die erhöhte Dichte an Nervenzellkörpern und das engmaschigere Kapillarnetz des Kortex verleihen diesem Teil des Großhirns die typische gräuliche Farbe gegenüber dem weißlichen Erscheinungsbild des Marklagers.

Die Tumorentität der Gliome (auch Astrozytome) zeichnet sich durch folgende gemeinsame Charakteristika aus (Kaye 01, Tumorzentrum München 01):

- Große Spannweite histopathologischer Eigenschaften
- Diffuses Wachstum in benachbarte als auch weiter entferntere Gehirnstrukturen ungeachtet des histologischen Grades
- Inhärente Tendenz sich zu maligneren Phänotypen zu entwickeln

Die diffus infiltrierenden Gliome werden der WHO zufolge in 3 Grade unterteilt und als niedermalignen Astrozytome (Grad II), anaplastische Astrozytome (III) und Glioblastome (Grad IV) bezeichnet. Die Astrozytome Grad I umfasst die Entität der pilozytischen Astrozytome. Sie werden nicht den diffus wachsenden Astrozytomen zugeordnet, da sie enger umschrieben sind und ein anderes klinisches Verhalten aufweisen.

Niedermaligne Astrozytome (WHO Grad II) zeichnen sich durch eine geringe bis mäßige Zelldichte mit Unregelmäßigkeiten in Größe, Form und Chromatingehalt der Kerne aus. Anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) besitzen eine hohe Zelldichte mit mäßiger bis starker Zell- und Kernpolymorphie, zahlreichen, teilweise auch atypischen Mitosen. Bei Glioblastomen (WHO Grad IV) sind die einzelnen Merkmale noch ausgeprägter als bei anaplastischen Astrozytomen. Darüber hinaus imponieren sie durch ausgedehnte Nekrosen.

Trotz einer Kombination von Chirurgie, Strahlentherapie und – in geeigneten Fällen – Chemotherapie ist die Prognose für Gliompatienten schlecht. Die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit einem niedermalignen Astrozytom liegt bei 5 bis 10 Jahren und nimmt mit dem Grad der Anaplasie stetig ab bis zu einer Überlebenszeit von unter einem Jahr für Patienten, die unter einem Glioblastom leiden. Während bei den niedermalignen Astrozytomen (Grad 2) der Altersgipfel im vierten Lebensjahrzehnt liegt, entwickeln sich höhergradige Astrozytome (Grad III und IV) erst später (Tumorzentrum München 01, Schirmer 98). Wegen des infiltrierenden Wachstums der in der Regel schlecht abgrenzbaren Tumore ist eine mikroskopisch vollständige Tumorentfernung in der Regel nicht möglich. Demnach rezidivieren diffus wachsende Astrozytome, auch wenn sie in funktionell nicht bedeutsamen Arealen scheinbar vollständig entfernt wurden „in der Regel eigentlich jedoch immer“ (Schirmer 98).

Der Nachweis der Astrozytome erfolgt zu aller erst über die Computer- oder Magnetresonanztomographie. Abhängig vom Grad der Anaplasie nehmen diese Tumore mehr bzw. weniger Kontrastmittel auf, wodurch sie sich computertomografisch abbilden lassen (Schirmer

98). Niedermaligne Areale sind diagnostisch wesentlich schwieriger zu erfassen als Astrozytome höheren Grades.

Entsprechend Ihrer Natur wachsen diese hirneigenen Geschwülste fließend in das umliegende Gewebe ein. Aufgrund ihrer Abstammung aus glialem Gewebe sind diese Tumore in Konsistenz und Farbe im Grenzbereich schwer abgrenzbar. Im Gehirn ist jedoch eine großzügige „Resektion im Gesunden“, wie sie sonst in der Onkologie praktiziert wird, wegen der Gefahr neurologischer Defizite in der Regel nicht möglich. Aus diesem Grund behilft man sich bei der Operation niedermaligner Tumore oftmals zweier Verfahren. Zum einen der intraoperativen Abgrenzung und Überwachung von eloquenten Kortexarealen und Marklagerbahnen („intraoperatives Monitoring“) und zum anderen der neuropathologischen Überwachung des Resektionsfortschritts über Schnellschnitt.

Das intraoperative Monitoring (Reulen 97) erlaubt z. B. durch Stimulation von bewegungs- und sprachrelevanten Hirnarealen mit schwachen Reizströmen die Identifizierung dieser Areale, deren Anatomie variabel ist und häufig durch das Wachstum und der Masse von angrenzendem Tumorgewebe unkalkulierbar verändert sein kann. Die Kenntnis der eloquenten Areale erlaubt, das Ausmaß der Resektion entsprechend großzügig oder zurückhaltend zu gestalten.

Bei der zusätzlich eingesetzten neuropathologischen Überwachung der Resektionsränder werden wiederholt Gewebeproben aus dem Randbereich der Tumore entnommen. Diese werden entweder als Ausstrichpräparate („Smears“) vom anwesenden Neuropathologen oder als Gefrierschnitte nach Verbringen in ein neuropathologisches Labor hinsichtlich des Vorhandenseins von Tumorzellen und deren Dichte beurteilt. Das Verfahren dient dazu, dem Chirurgen Auskunft über den Fortschritt der Resektion zu geben. Es ist jedoch aufwendig und langwierig.

Bei der intraoperativen Diagnostik von anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen hat sich bisher die Diagnostik mit exogenen Fluoreszenzmarkern sehr erfolgreich erwiesen (Stummer 00, Stummer 96, Stummer 98c). Mit 5-Aminolävulinsäure induziertem Protoporphyrin IX als Fluoreszenzmarker entwickelten Ärzte am Klinikum Großhadern zusammen mit dem Laser-Forschungslabor ein fluoreszenzoptisches System zur intraoperativen Entfernung dieser Tumortypen (Stummer 98b). Mit dem bestehenden System wird eine diagnostische Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 60% erzielt. Besonders die hohe Spezifität ist in der Neurochirurgie von besonderem Interesse, da so gewährleistet ist, dass kein gesundes Gewebe markiert wird. In einer klinischen Studie konnte neben der radikaleren Tumorentfernung auch die verlängerte Überlebenszeit der Patienten belegt werden (Stummer 00). Während die Überlebenszeit von Patienten nach konventioneller Resektion ca. 40 Wochen beträgt, liegt die mittlere Überlebenszeit von Patienten nach fluoreszenzge-

stützter Resektion ohne postoperativ nachgewiesenem Resttumor in der Kernspinuntersuchung im Mittel über 100 Wochen, für solche mit kernspintomographisch nachgewiesenem Resttumor nur 54 Wochen.

Für die Operation von niedrigmalignen Astrozytomen (AII) haben Voruntersuchungen gezeigt, dass diese Methode bei der intraoperativen Abgrenzung dieses Tumortyps nicht genutzt werden kann, da bei dieser Tumorentität eine ausreichende Anreicherung bzw. Hämbiosynthesekapazität des Fluoreszenzfarbstoffes fehlt (Stummer 96, Stummer 98c).

II Material und Methoden

1 Fluoreszenzdetektion in situ

Der experimentelle Aufbau zur Messung der punktuellen Fluoreszenz ist in Abb. 11 gezeigt. Das Gesamtsystem zur Messung der in vivo-Spektren bestand aus den funktionellen Einheiten Anregungslichtquelle, Messsonde und Detektionssystem zur Messung der Fluoreszenz. Das Licht des XeCl-Excimerlasers wurde in die Quarzfaser eingekoppelt und über die Anregungsfaser der Spektroskopie-Messsonde an das zu untersuchende Gewebe geleitet. Die Spektroskopie-Messsonde wurde dabei entweder direkt oder über den Arbeitskanal eines Endoskops geführt aufgesetzt. Die erzeugte Fluoreszenz wurde über ein Detektionsfaserbündel auf den Eintrittsspalt des Spektrometers abgebildet. Im Spektrometer wird das Licht über ein Gitter in seine Spektralfarben zerlegt und auf ein CCD-Array abgebildet. Die einzelnen Komponenten des Messaufbaus werden im Folgenden im Detail beschrieben.

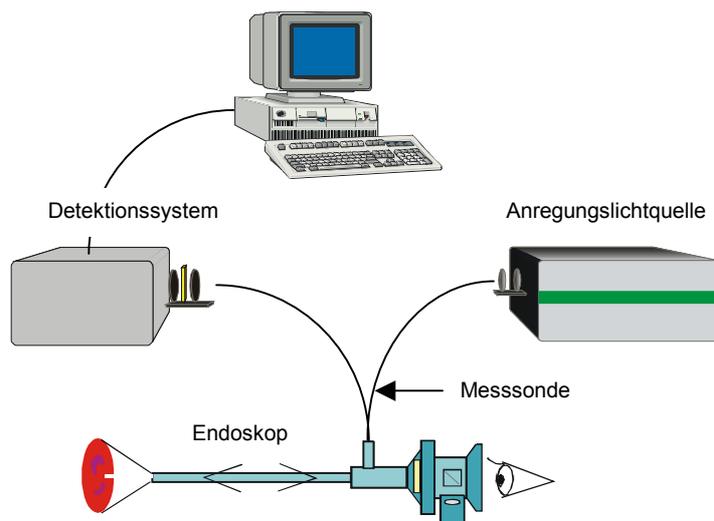


Abb. 11: Experimenteller Aufbau zur Messung der punktuellen Fluoreszenz

Anregungslichtquelle

Als Anregungslichtquelle für die in-situ-Untersuchungen wurde ein modifizierter XeCl-Excimerlaser ($\lambda_{em} = 308 \text{ nm}$) verwendet. Die Modifikationen des Lasers wurden innerhalb eines gemeinsamen Forschungsprojekts mit der Firma TuiLaser AG durchgeführt (Bayerische Forschungstiftung, Antrags-Nr. 276/98).

Die Pulsenergie des Lasers beträgt 7 mJ, die Repetitionsrate kann zwischen 1 und 100 Hz variiert werden, und die Puls zu Puls Energiefluktuationen werden mit $\sigma = 2\%$ (Standardabweichung) angegeben. Für die punktuellen Fluoreszenzmessungen wurde die Repetitionsra-

te auf 50 Hz festgesetzt. Das Strahlprofil des Lasers ist nahezu quadratisch ($3 \cdot 3 \text{ mm}^2$) und die Divergenz beträgt 1 mrad horizontal und vertikal.

Um die Bildung von Farbzentren zu vermeiden und damit eine lange Lebensdauer der Fasern zu gewährleisten, wurde der Laser von Kurz- (FWHM $\sim 10 \text{ ns}$) auf Langpulsoperation (FWHM $\sim 80 \text{ ns}$) umgerüstet (Fabian 93, Franceschini 92). Zudem wird durch den Langpulsbetrieb die Schwellenergie, ab der Schäden beim Eintritt in Quarzglasfasern auftreten, erheblich reduziert ($\sim 15 \text{ J/m}^2$ bei 10 ns Pulslänge und $\sim 35 \text{ J/m}^2$ bei 80 ns Pulslänge) (Taylor 87).

In Abb. 12 ist die Einkoppelvorrichtung des Laserstrahls in den Lichtwellenleiter dargestellt. Der aus dem Resonator austretende Laserstrahl wurde zunächst durch einen Spalt und eine Irisblende zur Grob- und Feineinstellung der Einkoppelleistung geleitet. Über eine Quarzlinse ($f = 50 \text{ mm}$) wurde der Laserstrahl auf die Faser fokussiert. Die Faser wurde in den divergierenden Teil des Laserstrahls positioniert, um eine Fokussierung innerhalb der Quarzfasern zu vermeiden (Taylor 87). Bei einem Abstand von 55 mm von der fokussierenden Linse und einer maximalen Divergenz von $\sim 2 \text{ mrad}$ (senkrecht zu den Elektroden) ergab sich ein Fokusedurchmesser von ungefähr $\sim 220 \mu\text{m}$ und eine NA 0,03. Bei einer numerischen Apertur von $N = 0,22$ der verwendeten Quarzfasern und einem Durchmesser von $400 \mu\text{m}$ der Anregungsfaser konnte eine optimale Einkopplung gewährleistet werden. Über einen X/Y-Trieb an der SMA-Steckerhalterung wurde die Faser in der Lichteinkoppelebene des Laserstrahls (hinter dem Fokus) verschoben, wodurch die Lichtleistung optimiert werden konnte. Die XeCl-Laserstrahlung wurde über die Anregungsfaser des Faserkatheters zum Gewebeareal geführt.

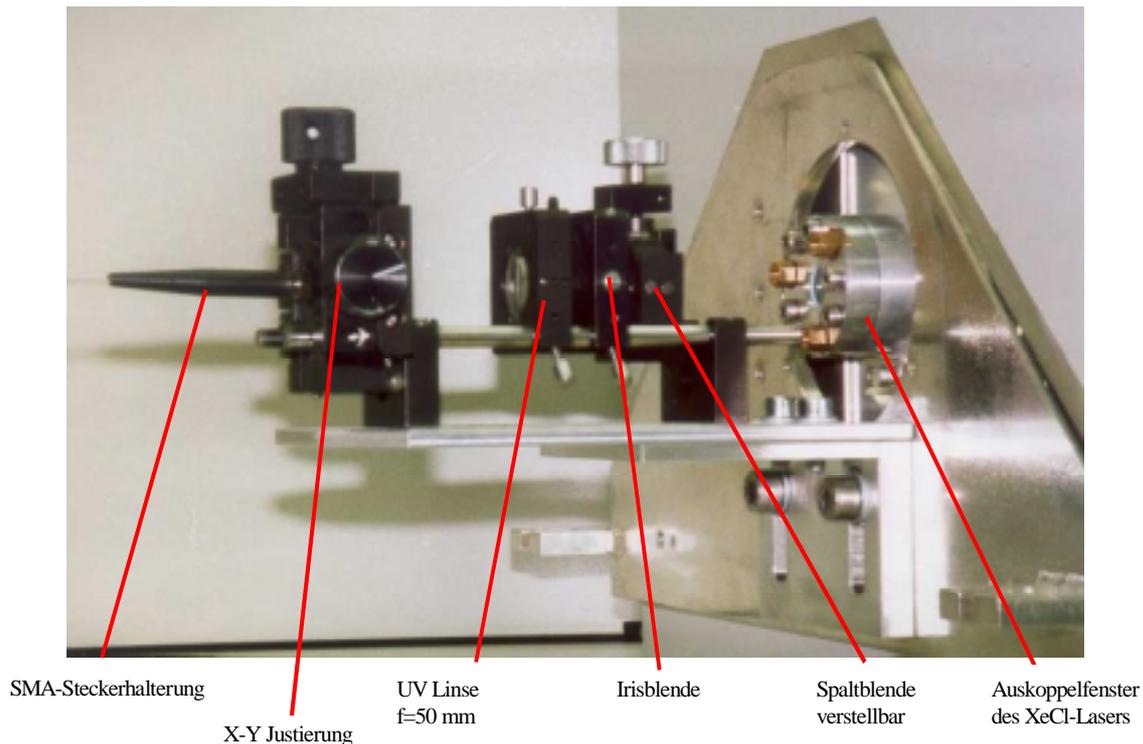


Abb. 12: UV-Einkoppelvorrichtung

1.2 Spektroskopie-Messsonde

Zur Anregung mit dem UV-Licht des Excimerlasers und zur Detektion des Fluoreszenzlichts wurde eine Faseranordnung gewählt, in der Anregungs- und Detektionslicht unterschiedliche Wege durchlaufen. Am distalen Ende der Spektroskopie-Messsonde sind um die Anregungsfaser (Kerndurchmesser 400 μm) 60 Detektionsfasern (Kerndurchmesser 100 μm) konzentrisch angeordnet (Abb. 13). Die hohe Anzahl an Detektionsfasern wurde gewählt, um möglichst viel Autofluoreszenzlicht im Bereich der Anregungsfaser zu detektieren. Die Fasern sind UV-optimierte Quarzfasern der Firma Polymicro (High OH UV Enhanced) mit einer Dämpfung von 0.2 dB/m (5 %/m bei $\lambda = 308 \text{ nm}$). Die Fasern wurden zur Halterung in einen Kunststoffschlauch gezogen und am distalen Ende mit einer Goldhülse verklebt und anschließend plan poliert ($\varnothing 1.2 \text{ mm}$). Die Goldhülse kann angiographisch online sichtbar gemacht werden. Dadurch ist eine örtliche Zuordnung des distalen Endes in nicht direkt einsehbaren Körperregionen möglich. Die Fasern, der Kleber und die Schläuche sind gänzlich aus biokompatiblen Materialien (Polyurethan (Schlauch), Polyimid (Faser-Coating), Epotek 353ND (Kleber)) gefertigt, die zur Sterilisation geeignet sind. Anregungs- und Detektionsfasern sind auf etwa drei Meter Länge verbunden und verlaufen anschließend auf etwa einen Meter getrennt. Die Anregungsfaser endet mit einem SMA-Stecker. Die Detektionsfasern sind am Lichtaustrittsende in einer dem Spektrometer angepassten Aluminiumhalterung zu

einem Spalt von 0.7 mm • 3 mm (Array 4 • 15 Fasern) angeordnet und verklebt (Abb. 13). Die Fasern sind zentrisch in einer zylinderförmigen Halterung angebracht (Durchmesser 1 cm).

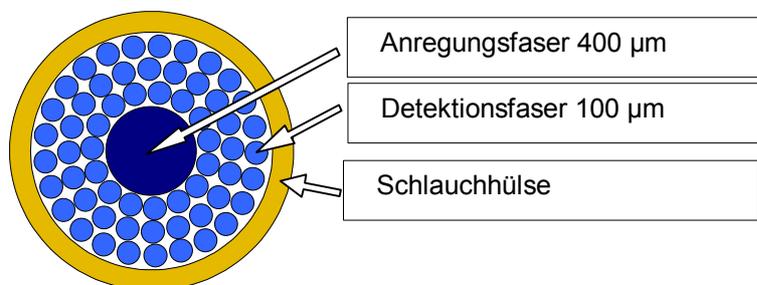


Abb. 13: Distales Ende der Spektroskopie-Messsonde.

1.3 Autofluoreszenz-Detektionssystem

Für die spektrale Vermessung des Autofluoreszenzsignals wurde ein optischer Vielkanalanalysator (OMA S2000; Ocean Optics, Eerbeek NL) mit einer speziell angepassten Einkopplung verwendet. Mit dem Spektrometer lassen sich Wellenlängen von $\lambda = 180 \text{ nm}$ bis $\lambda = 880 \text{ nm}$ in 2048 Kanälen messen. Die digitale Auflösung des Gerätes beträgt 0.4 nm/Kanal ($880 \text{ nm} - 180 \text{ nm} / 2048 \text{ Kanäle}$). Der Spektrometer ist herstellerbedingt mit einer SMA-Fasereinkoppelhalterung versehen. Die Lichtaustrittsebene der Faser entspricht der Spaltebene und der Faserdurchmesser der Spaltbreite, wodurch die spektrale Auflösung festgelegt ist. Im Spektrometer ist bei der Position der Lichtaustrittsebene ein Spalt der Breite 200 µm angebracht. Bei Ausleuchtung des Spaltes wird eine Auflösung von $\Delta\lambda = 7 \text{ nm}$ erreicht (Herstellerangaben). Um eine möglichst gute Ausleuchtung des Spaltes zu erreichen, wurde in diesem Aufbau die Einkopplung in den Spektrometer modifiziert und das rechteckig, spaltförmig angeordnete Faserende der Detektionsfaser auf die Position der SMA-Einkopplung (Zwischenbild in der Spaltebene) abgebildet (Abb. 14). Der proximale Stecker des Detektionsfaserbündels wurde so positioniert, dass dieses senkrecht zum Gehäuse steht. Die Lichtaustrittsebene wurde über zwei UV-vergütete Quarzlinen $f = 20 \text{ mm}$ (Abstand 10 mm ; Gesamtbrennweite 13 mm) auf die Spaltebene des Spektrometers abgebildet. Die Wellenlängenkalibrierung der Einkoppelvorrichtung wurde mit einer Quecksilberdampf-Kalibrationslampe vorgenommen (Ocean Optics Inc. HG-1). Um aus dem Gewebe remittiertes Anregungslicht zu dämpfen wurde in den Strahlengang des Spektrometers ein Sperrfilter für das Anregungslicht bei $\lambda = 308 \text{ nm}$ platziert ($\sim 50\%$ Transmission bei $\lambda = 330 \text{ nm}$; $0,8\%$ Transmission bei $\lambda = 308 \text{ nm}$).

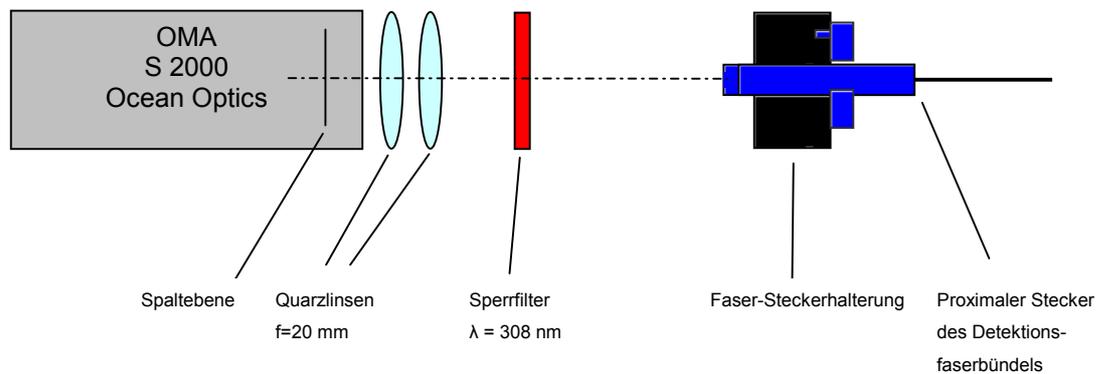


Abb. 14: Prinzipdarstellung der Einkoppelvorrichtung.

Die optischen Elemente im Strahlengang wie Filter, Linsen und die wellenlängenabhängige Empfindlichkeit des CCD Sensors des Spektrometers führen insbesondere im ultravioletten Spektralbereich zu einer Veränderung der absoluten Intensitätsverteilung der gewebeeigenen Fluoreszenz. Zum Intensitätsabgleich wurde daher eine Kalibrierung mit einer kombinierten Deuterium-Halogen-Lampe (Kalibrationslampe; DH-2000; Ocean Optics) durchgeführt. Der wellenlängenabhängige Korrekturfaktor (sog. „Flatfieldkorrektur“) ergab sich aus dem Quotienten zwischen den Absolutspektren (Herstellerangaben) und dem gemessenen Spektrum der Kalibrationslampe. In Abb. 15 ist als Beispiel ein gemessenes Spektrum der Unterlippe mit und ohne Intensitätsabgleich des Spektrometers abgebildet. Daraus ist ersichtlich, dass die Peak-Positionen der Maxima und Nebenmaxima zwischen den dargestellten Spektren erheblich variieren. Statt bei $\lambda = 370 \text{ nm}$ wird nun im Bereich um $\lambda = 340 \text{ nm}$ das Maximum der Fluoreszenzintensität gemessen. Im Bereich um $\lambda = 320 \text{ nm}$ befindet sich die Flanke der Filtertransmission des Beobachtungsfilters. Zudem nimmt in diesem Bereich die Empfindlichkeit des verwendeten Spektrometers stark ab. Die Auswertung der gemessenen Spektren wurde daher erst ab einer Wellenlänge von $\lambda = 330 \text{ nm}$ vorgenommen.

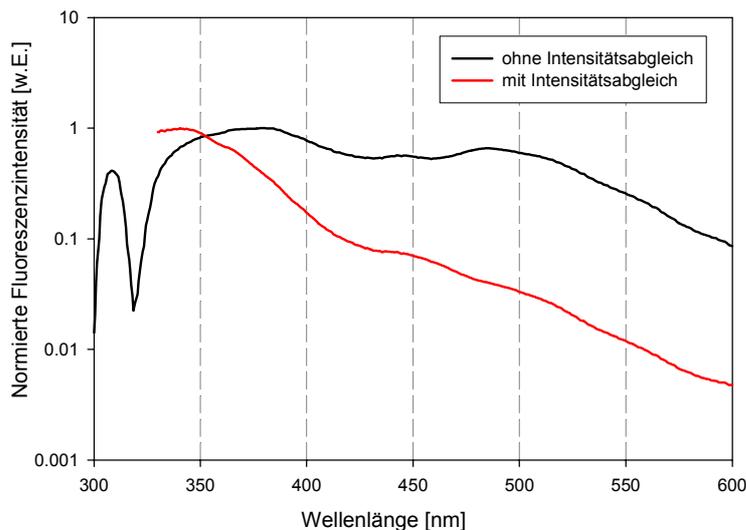


Abb. 15: Fluoreszenzspektrum aus der Blase mit und ohne Intensitätsabgleich des Spektrometers (logarithmische Darstellung). In der Kurve „ohne Intensitätsabgleich“ ist die Geweberemission des Anregungslichts bei $\lambda = 308$ nm zu sehen.

Ab einer Wellenlänge von $\lambda = 616$ nm (Doppelte Wellenlänge der Anregung $\lambda = 308 \cdot 2$ nm) wird die zweite Beugungsordnung des Spektrometersgitters auf den CCD Chip abgebildet. Die gemessenen Spektren waren ab dieser Wellenlänge von der Intensität bei der ersten Beugungsordnung (halben Wellenlänge) überlagert. Die Auswertung der Gewebespektren erfolgte daher im roten Spektralbereich nur bis zu einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm.

Die Gesamtintensität der Spektren wurde auf die maximale Fluoreszenz ($\sim \lambda = 640$ nm) eines Fluoreszenzstandards normiert. Der Fluoreszenzstandard fluoresziert erst ab einer Wellenlänge von $\lambda \sim 580$ nm. Es kann daher im Maximum bei $\lambda \sim 640$ nm nicht zu einer Überlagerung der Fluoreszenz mit der zweiten Beugungsordnung aus kurzwelligeren Spektralbereichen bei $\lambda \sim 320$ nm kommen. Als Fluoreszenzstandard wurde eine mit Farbstoffen versetzte, ausgehärtete Silikonmasse (Elastosil Farbpaste FL „Eisenoxidrot“, Wacker Chemie Burghausen, 1 Vol% in Silikon) verwendet, die kein Ausbleichen aufweist und nur eine von der Intensität des anregenden Lichtes abhängige Fluoreszenz zeigt (Gerg 97). Die Ansteuerung des Spektrometers erfolgte über einen PC (Software Spectra Win 4.0, TOP Sensor Systems, Eerbeek NL), in den die Werte für die Integrationszeit und die Anzahl der zu mittelnden Spektren eingegeben wurden.

Für die Fluoreszenzanregung des Gewebes wurde die Energie am distalen Ende der Messsonde so eingestellt, dass die 8-Bit Dynamik des Spektrometers bei einer Integrationszeit von 200 ms voll ausgenutzt werden konnte. Die Integrationszeit wurde auf 200 ms festgesetzt, um ein Verrutschen der Faser während der in-situ-Messung am Patienten weitgehend auszuschließen. Die Voreinstellung der Lichtaustrittsenergie erfolgte auf normalem Gewebe

des jeweils zu untersuchenden Organs. Optimale Aussteuerung (bei 200 ms Integrationszeit) wurde mit einer Energie zwischen 6 – 9 $\mu\text{J}/\text{Puls}$ bei 50 Hz Repetitionsrate erreicht.

1.4 Untersuchungsablauf und Patientenkollektiv

Die spektroskopischen Untersuchungen wurden in den verschiedenen Organen nach einem einheitlichen Verfahren durchgeführt:

Für die Untersuchungen wurden abwechselnd zwei Messsonden verwendet. Die steril verpackte Messsonde wurde bei Untersuchungsbeginn dem Operateur (distales Ende zur Untersuchung, steriler Bereich) und dem Untersucher (proximales Ende Detektionsfaserbündel und Fasereinkopplung XeCl-Excimerlaser) zur Verfügung gestellt. Bei Untersuchungen in Hohlorganen wurde die Messsonde in den Arbeitskanal des entsprechenden Endoskops (Urologie, Pulmologie) geführt und mit Blickkontakt über das Endoskop direkt auf die zu untersuchende Stelle aufgesetzt. Anschließend wurde der Untersuchungsbereich abgedunkelt und die Messung durchgeführt. Die Messung erfolgte unter Beobachtung des Operateurs, der vor und nach Ausschalten der Beleuchtung die Positionsgenauigkeit der Messsonde überprüfte. Von jedem Areal wurden drei Fluoreszenzmessungen durchgeführt, die anschließend gemittelt wurden. Um Verwechslungen der Untersuchungsstellen zu vermeiden und die genaue Position der Messsonde in Erinnerung zu behalten, wurde direkt nach jeder Fluoreszenzmessung die Faser aus dem Untersuchungsbereich entfernt und eine Biopsie für die histologische Befundung entnommen. Nach Abschluss jeder Untersuchung wurde ein Normierungsspektrum mit dem Fluoreszenzstandard aufgenommen. Zu Beginn der Untersuchungen zur UVB-angeregten Spektroskopie lag noch kein geeigneter Fluoreszenzstandard vor, daher wurden die Messungen in den Fachbereichen HNO, Neurochirurgie und der erste Teil der Messungen in der Urologie ohne Fluoreszenzstandard durchgeführt.

1.4.1 Urologie

Die Untersuchungen fanden während der zystoskopischen Routinediagnostik mit 5-ALA gestützter Fluoreszenz-Endoskopie (Photodynamische Diagnostik - PDD) statt. Zu einem Zeitpunkt von 1-3 Stunden nach Applikation von 5-ALA erfolgte die Untersuchung der Patienten unter Weißlicht- und Fluoreszenzausleuchtung. Durch das Umschalten zwischen Weißlicht und Fluoreszenzbeleuchtung wurden tumor-verdächtige, rot-fluoreszierende Areale erkannt. Es wurden Biopsien aus Bereichen makroskopisch starker als auch schwacher Fluoreszenz und des unauffälligen, angrenzenden Normalgewebes entnommen. Das subjektive Erscheinungsbild unter Weißlicht (blande Schleimhaut, Ödem, vermehrte Gefäßzeichnung, Narbe, Erythem, Erosion, Ulkus, mikropapillärer Tumor, solider Tumor), Fluoreszenzanregung (Fluoreszenzbefund ja/nein) und die Lokalisation (Blasenboden, Blasen hinterwand, Blasen seitenwand links/rechts, Blasen dach, Blasen auslaß) wurde nach

tenwand links/rechts, Blasendach, Blasenaustritt) wurde nach Erhalt aller Biopsien von den Untersuchern eingeteilt.

Im Rahmen der klinischen Validierung wurden 51 Patienten mit Verdacht auf Blasenkarzinom untersucht. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Operation zwischen 49 und 89 Jahre alt (Mittelwert 70). Insgesamt wurden aus 167 Arealen Biopsien gewonnen ($3,3 \pm 1,5$ pro Patient).

Die histologischen Befunde wurden in fünf klinisch orientierte histologische Gruppen (I bis IV) unterteilt (Tab. 3). Um eine weitere, detaillierte Auswertung vornehmen zu können, wurden die einzelnen Gruppierungen ihrer histologischen Befundung entsprechend jeweils mit Kodierungen (nicht abgebildet) versehen.

	Histologische Gruppe				
	I	II	III	IV	V
Histologische Befundung	Normal	Narbe	Zystitis chronisch	Dysplasie II	TxGx
			Zystitis florid	CIS	
			Metaplasie		
			Papillom		
			Hyperplasie		
			Dysplasie I		

Tab. 3: Einteilung der histologischen Befunde in histologische Gruppen (Urologie).

Gruppe I (Normalgewebe). Die erste Gruppe betraf alle histologisch als „Normale Schleimhaut“ eingestuft Befunde.

Gruppe II (Narben). Die zweite Gruppe umfasste Narben aus früheren Resektionsarealen. Patienten mit Narben in der Schleimhaut haben eine Vorgeschichte (z.B. alte Tumorsektionsareale) und heben sich daher von Patienten mit völlig unauffälligen Schleimhäuten ab. Darüber hinaus wird dieser Gruppe ein besonderer Stellenwert in der Tumor-Frühdagnostik zugeordnet, da Tumorzidive auf narbigen Arealen allgemein schwer zu diagnostizieren sind (Baumgartner 00).

Gruppe III (benigne Neoplasien). Die dritte Gruppe umfasste alle benignen neoplastischen Schleimhautveränderungen, die keine Therapie im Sinne einer malignen Transformation erfordern, jedoch in der Regel antibiotisch therapiert als auch beobachtet werden. Diese histologische Gruppe wird des weiteren als die Gruppe der „benigen Neoplasien“ bezeichnet.

Gruppe IV (flache Tumore). Die hochgradigen Dysplasien Grad II werden der neuesten WHO Klassifikation entsprechend den CIS gleichgesetzt (Epstein 98) und sind demnach

maligne. Wegen der schlechten Prognose der CIS bzw. Dysplasien Grad II und der daraus resultierenden speziellen klinischen Behandlungsmethode wurde diese Tumorentität in eine einzelne Gruppe (Gruppe IV) aufgenommen und von höhergradigen papillären bzw. soliden Tumoren abgegrenzt (Gruppe V). Diese histologische Gruppierung ist auf das Urothel beschränkt und zeichnet sich durch eine geringe Dickenausdehnung aus. Sie wird daher unter dem Begriff der flachen Tumore zusammengefasst.

Gruppe V (massive Tumore). Die papillären und soliden Tumore wurden entsprechend des TMN-Klassifizierungsschlüssels in Ta-2G1-3 unterteilt (Spiessel 97). Diese histologische Gruppierung ist nicht zwingend auf das Urothel beschränkt und zeichnet sich durch eine gegenüber den flachen Tumoren (Gruppe IV) höhere Dickenausdehnung aus. Sie wurde daher unter dem Begriff der massiven Tumore zusammengefasst.

1.4.2 Pulmologie

Die Untersuchungen fanden in Zusammenarbeit mit der Asklepios Klinik in Gauting (Dr. Stanzel, Prof. Häußinger) statt. Die Bronchoskopie wurde unter Lokalanästhesie mit flexiblen Bronchoskopen durchgeführt. Vor den spektroskopischen Messungen wurde die Lunge mit dem Autofluoreszenzsystem (D-Light AF, Storz GmbH) im Weißlicht bzw. Autofluoreszenzmodus nach verdächtigen Arealen inspiziert. Dieses Vorgehen wird in den Untersuchungen zur Identifizierung tumorverdächtiger Areale genutzt.

Es wurden 11 Patienten mit Verdacht auf ein Bronchialkarzinom untersucht. Insgesamt wurden aus 39 Arealen Biopsien gewonnen ($3,5 \pm 0,8$ pro Patient).

Aufgrund der niedrigen Biopsiezahl in diesem Fachbereich wurde eine grobe Unterteilung der histologischen Befunde in normales, unauffälliges respiratorisches Epithel, benigne Neoplasien und Tumore vorgenommen. Die Gruppe der benignen Neoplasien umfasste ähnlich wie in der Urologie alle Entzündungen, Hyperplasien, Metaplasien, Dysplasien Grad I und II. Die Grenze zwischen gut- und bösartig wurde bei den Dysplasien Grad III gesetzt, das heißt Dysplasien Grad III wurden der malignen Gruppe, Dysplasien II wurden der benignen Gruppe zugeordnet.

1.4.3 Gynäkologie

Die Untersuchungen wurden innerhalb der gynäkologischen Sprechstunde für Vorsorgeuntersuchungen an der Gynäkologischen Klinik des Klinikums Großhadern der Universität München durchgeführt (Dr. Hillemanns). Die Messsonde wurde über den Arbeitskanal des Endoskops auf die Portio uteri aufgesetzt. Bei jeder Patientin werden mindestens zehn Spektren aufgezeichnet, vier innerhalb der Transformationszone (12,3,6 und 9 Uhr), vier außerhalb der Transformationszone (12,3,6 und 9 Uhr), sowie zwei Spektren auf beiden Sei-

ten der Scheide. Bei allen Patientinnen erfolgte ein zytologischer Abstrich (Pap-Smear Test), eine HPV-DNS Analyse sowie eine kolposkopische Untersuchung mit gezielt entnommener Knipsbiopsie. Das kolposkopische Bild, das Autofluoreszenzerscheinungsbild und die Stelle der entnommenen Biopsien werden in einem Formblatt eingetragen (nicht abgebildet).

Es wurden 8 Patientinnen mit Verdacht auf dysplastische Transformation der Portio uteri untersucht. Bei kolposkopischen Auffälligkeiten, die auf eine höhergradige Neoplasie hindeuten, wurden zusätzlich an bestimmten Stellen Biopsien entnommen, die anschließend histologisch untersucht wurden. Die histologische Einteilung der nicht biopsierten, allerdings spektral erfassten Areale wurde anschließend über das kolposkopische Bild, den Pap-Smear Test und der Histologie an ausgewiesenen Stellen vom Operateur durchgeführt. Die aufgezeichneten Areale wurden in normales Gewebe, außer- und innerhalb der Transformationszone und in die verschiedenen Schweregrade der CIN (I bis III) eingeteilt.

In bildgebenden Autofluoreszenzuntersuchungen mit blau-violetter Anregungslampe (D-Light, Storz GmbH) zeigten sich unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften des Gewebes innerhalb bzw. außerhalb der Transformationszone. Deshalb werden diese Areale getrennt aufgeführt (Gruppe I und II) (Weingandt 99). Die Einteilung III bis V erfolgte nach der histopathologischen WHO-Klassifizierung für zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN I - III).

1.4.4 HNO

Die Untersuchungen fanden in Zusammenarbeit mit der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Klinikums Großhadern (Dr. Leunig, Dr. Mehlmann) statt. Es wurden vier Patienten mit zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits histopathologisch nachgewiesenen Malignomen der Mundhöhle und drei Patienten mit Leukoplakien in die Studie aufgenommen. Aus den deutlich abgrenzbaren Leukoplakien wurde jeweils eine Biopsie entnommen. In allen drei Fällen lagen ausschließlich chronische Entzündungsreaktionen der Schleimhaut ohne Hinweise für maligne Transformationen vor. Die Aufnahme der Spektren wurde ausschließlich in visuell deutlich abgrenzbaren Gewebearealen durchgeführt. Auf diese Weise erfolgte die Einteilung in normale Schleimhaut, Entzündung (aus den Leukoplakien) und Tumor durch den Operateur.

1.4.5 Neurochirurgie

Die Untersuchungen fanden in Zusammenarbeit mit der Neurochirurgischen Klinik (Dr. Stummer) und der Neuropathologie (Dr. Bise) des Klinikums Großhadern statt. Die unterschiedliche Kontrastmittelaufnahme oder Darstellung in der Magnetresonanztomographie von nieder- und hochmalignen Tumoren ermöglicht eine Vorselektion der Patienten. Im Falle

von höhermalignen Tumorbereichen wurde dem Patienten 20 mg/kg 5-Aminolävulinsäure vor der OP verabreicht, so dass die Operation nach der beschriebenen 5-ALA gestützten Resektion unter blau-violetter Beleuchtung der Tumorareale stattfand (Stummer 98a). Die Gewebeproben wurden aus rot fluoreszierenden Arealen und in nicht fluoreszierenden Randbereichen des Tumors entnommen. Bei niedermalignen Tumoren stand dem Operateur kein zusätzliches optisches Hilfsmittel zur Verfügung. Die Biopsien wurden nach morphologischen Kriterien an die online Pathologie durch Smear-Mikroskopie im Operationssaal weitergeleitet. Direkt nach Entnahme (zwischen 2 und 10 min) und vor der pathologischen Smear-Untersuchung wurden die Biopsien *ex-vivo* fasergestützt untersucht. Kleine Biopsien ≤ 1 mm und solche mit koagulierten Blutgefäßen wurden ausgeschlossen. Oberflächliche Blutreste wurden vor der Messung mit einer NaCl-Lösung entfernt.

Über einen Zeitraum von 10 Monaten wurden Biopsien von 12 Patienten mit primären Gehirntumoren untersucht. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Operation zwischen 25 und 66 Jahren alt (Mittelwert 41 Jahre). Insgesamt wurden aus 82 Arealen Biopsien gewonnen (~ 7 pro Patient).

Die histopathologischen Befunde der Tumorpatienten wurden in vier verschiedene histologische Gruppen unterteilt: Das normale Gehirngewebe aus Kortex und Marklager wurde zu einer Gruppe zusammengefasst (Gruppe I). Diffus infiltrierende Tumorgrenzen niedermaligner Tumore (WHO Grad II), mit oftmals niedrigem Tumorzellanteil wurden von den soliden, primären Tumoren aus niedermalignen Bereichen getrennt erfasst (Gruppe II und III). Den höhermalignen Tumoren WHO Grad III und IV kommt in dieser Untersuchung ein untergeordneter Stellenwert zu. Diese wurden daher in einer gemeinsamen histologischen Gruppe getrennt aufgeführt (Gruppe IV).

1.5 Auswertung Weißlichtendoskopie und PPIX-Fluoreszenzdetektion / Urologie

In der Harnblase wurde neben der rein spektroskopischen Aufzeichnung der Areale der visuelle Eindruck unter Weißlicht (Weißlichtbefund) und der visuelle Eindruck unter blauvioletter Beleuchtung (Fluoreszenzbefund) dokumentiert. Um einen Vergleich zu den spektroskopisch erhobenen Daten durchführen zu können, wurden diese Verfahren getrennt ausgewertet.

Weißlichtendoskopie. Die Auswertung der Weißlichtbefunde nach objektiven Kriterien ist nicht möglich. Daher wurden die in dem Erfassungsbogen aufgeführten Weißlichtbilder in die Kategorien unverdächtig (0), suspekt ohne konkreten Tumorverdacht (1) und tumorverdächtig (2) unterteilt (Tab. 4).

Weißlicht Kategorie	Makroskopischer Befund – Weißlicht
Unverdächtig (0)	Blande Schleimhaut
	Narbe
Suspekt, ohne konkreten Tumorverdacht (1)	Ödem
	Vermehrte Gefäßverzeichnung
	Erythem
	Erosion
	Ulkus
Tumorverdächtig (2)	Mikropapillärer Tumor
	Papillärer Tumor
	Solider Tumor

Tab. 4: Einteilung der makroskopischen Weißlicht-Befunde.

Die Spezifität und Sensitivität der Weißlicht-Zystoskopie wurde für zwei Grenzfälle berechnet. Im ersten Fall wurde die Kategorie (1) als positiv eingestuft, im zweiten Fall als negativ.

5-ALA induzierte Fluoreszenzdiagnostik. Die Auswertung der PPIX-Fluoreszenz in Bezug auf Sensitivität und Spezifität wurde nach der subjektiven Beurteilung „Fluoreszenzbefund Positiv“ bzw. „Fluoreszenzbefund Negativ“ durchgeführt.

1.6 Auswertung UV-Spektroskopie

Die Auswertung der Spektren erfolgte in allen Fachbereichen in der gleichen Art und Weise. Die gemessenen Spektren wurden gemittelt (drei pro Areal) und auf das Fluoreszenzmaximum des Fluoreszenzstandards korrigiert. Anschließend wurde der Intensitätsabgleich (siehe Kapitel II1.3) durchgeführt.

Zur Evaluierung des besten Tumor–Normalkontrastes wurden zuerst die gesamten gemessenen Spektren in eine Tumor- und eine Normalgewebe-Gruppe unterteilt. Zu diesen Gruppen wurden die Intensitätsverhältnisse (Ratios) aller Wellenlängenkombinationen ermittelt und deren Medianwert bestimmt. Aus der Berechnung der Medianwerte aller möglichen Ratios ergibt sich eine Matrix.

Um die Wellenlängenbereiche zu ermitteln, in denen der höchste Tumor- Normalkontrast zu erwarten ist, wurden die Matrizen der Tumor-Entität durch die der Normal-Entität miteinander dividiert und in Form von Höhenliniendiagrammen dargestellt. Aus den Höhenliniendiagrammen wurde das kontrastreichste Fluoreszenz-Ratio empirisch ausgewählt. Die statistische Signifikanz der Unterscheidbarkeit der unterschiedlichen Gruppierungen wurde durch einen Mann-Whitney Test (2 unabhängige Stichproben) ermittelt (Programm SPSS, Version 10.0).

1.7 Stabilität des Ratio-Algorithmus auf Energieschwankungen

Um die Stabilität der Methode der Ratio-Bildung in den Wellenlängenbereichen des Ultravioletten und des sichtbaren Spektralbereiches zu testen, wurden eine Reihe von in-vivo-Spektren bei Variation der durchschnittlichen Bestrahlungsleistung aufgezeichnet. Dabei wurde die Repetitionsrate des XeCl-Excimerlasers konstant auf 50 Hz gehalten und die Einkoppelenergie variiert. Es wurden bei jedem Energiewert drei Spektren unterschiedlicher Bereiche der Unterlippe eines freiwilligen Probanden aufgezeichnet. Die mittlere Bestrahlungsleistung bei den spektralen Messungen wurde zwischen 100 und 780 μW variiert. Dies entspricht der mittleren Leistungs- und Energie bei der die spektralen *in-vivo*-Messungen in den verschiedenen Organen durchgeführt wurden. Zur Auswertung der Energieabhängigkeit des Ratio-Wertes wurde exemplarisch das Ratio $\lambda = 340 \text{ nm}$ zu $\lambda = 450 \text{ nm}$ herangezogen. Aus Abb. 16 ist ersichtlich, dass in einem Bestrahlungsbereich zwischen 100 und 780 μW keine Abhängigkeit des Ratio-Wertes von der mittleren Bestrahlungsleistung zu verzeichnen ist.

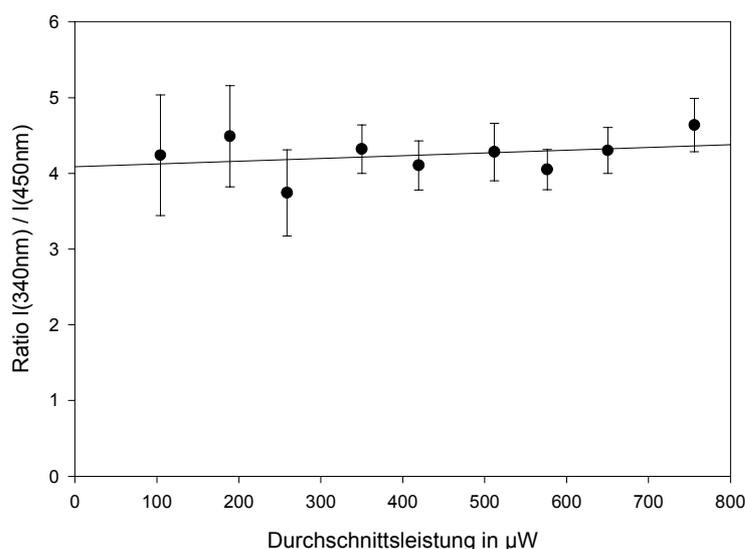


Abb. 16: Durchschnittliche Leistungsdichte aufgetragen gegen den mittleren Ratio-Wert von jeweils 3 verschiedenen Messstellen an der Unterlippe eines Probanden. Durch die Messwerte wurde eine Regressionsgerade gelegt.

2 Fluoreszenznachweis mikroskopisch

2.1 Aufbereitung der Biopsien

Im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden den Patienten Probebiopsien aus Weißlicht auffälligen bzw. unauffälligen Arealen entnommen. In der Blase erfolgte die Entnahme der Biopsien fluoreszenzgestützt. Die Biopsien wurden direkt nach der Resektion eingebettet (Medium: Tissue Tek, Miles Inc., Elkhart, IN, U.S.A.) und in flüssigem Stickstoff schock-gefroren. Zur Aufbewahrung wurden die Proben in Alufolie eingewickelt, um mögliches Ausbleichen von PPIX zu verhindern. Von jeder Probe wurde eine Serie von 6 Gefrierschnitten angefertigt. Während die ersten zwei und die letzten zwei Schnitte (Dicke: 5 μm) für eine histopathologische Bewertung HE-gefärbt wurden, dienten die mittleren Schnitte (Dicke: 10 μm) einer genauen Lokalisation der Fluoreszenz im Gewebe mittels Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie. Die HE-Schnitte werden auf Standardobjektträger und die Fluoreszenzschnitte auf die beschichtete Seite der Mikroskop-Deckgläser gelegt. Die Gefrierschnitte wurden im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und durch Bildaufnahmen dokumentiert, um diese später in Zusammenarbeit mit der Pathologie den verschiedenen fluoreszierenden Arealen die histologische Bewertung zuzuordnen.

2.2 Aufbau des Mikroskops

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Gefrierschnitten mit $\lambda = 308 \text{ nm}$ Anregung und Detektion ab ca. $\lambda = 320 \text{ nm}$ wurde ein spezielles UV-transmittierendes Fluoreszenzmikroskop aus Einzelkomponenten aufgebaut. Herkömmliche Mikroskope kommen für dies Anwendung nicht in Frage, da sie nur bis zu einer Wellenlänge von $\lambda \sim 380 \text{ nm}$ chromatisch korrigiert und lichtdurchlässig sind.

Um die UV-Tauglichkeit zu gewährleisten wurden möglichst ausschließlich Quarz-Optiken und UV-optimierte Fasern verwendet. Außerdem wurde das Mikroskop nach dem Prinzip der Durchlichtbeleuchtung aufgebaut. Über diese Beleuchtungskonfiguration und die gleichzeitige Verwendung eines $\lambda = 308 \text{ nm}$ HR-beschichteten Objektträgers wird das Objektiv vor intensiver UV-Strahlung geschützt und keine Fluoreszenz induziert.

Die Beleuchtung bzw. Fluoreszenzanregung der Gefrierschnitte erfolgte wahlweise mit UV-Laserlicht bei $\lambda = 308 \text{ nm}$ (Excimerlaser, XeCl, TuiLaser AG, Germering) oder blau-violetter Anregungslicht (D-Light, Typ 615, Karl Storz, Tuttlingen).

Das UV-Laserlicht wurde über Quarzfasern (Polymikro $\varnothing 1,5 \text{ mm}$) geleitet und mit einer Linse ($f = 5 \text{ mm}$) unter einem Winkel von 30° zur Normalen auf das Objektträgerplättchen abgebildet. Die durchschnittliche Leistungsdichte betrug $\sim 50 \text{ mW/cm}^2$ (Rep.-Rate 100 Hz).

Die Anregung mit blau-violetterem Licht erfolgte durch seitliche Beleuchtung unter einem Winkel von 45° zur Normalen mit Hilfe einer eigens dafür konzipierten Beleuchtungsvorrichtung (Plümpe 97). Das blau-violette Licht wurde mit einem Lang- und einem Kurzpassfilter (Schott BG 28/2 mm, bzw. Kurzpass 445 nm) auf einen Bereich zwischen $\lambda = 410$ nm und $\lambda = 450$ nm begrenzt. Durch einen zusätzlichen dielektrischen Filter im Strahlengang wurde der Infrarotanteil des Anregungslichts (zwischen $\lambda = 800$ und 900 nm) geblockt. Die Leistungsdichte des blau-violetten Lichts betrug 60 mW/cm^2 .

Die Ausleuchtungsfläche auf der Probe betrug sowohl für das UV-Licht als auch für das blau-violette Licht $\sim 50 \text{ mm}^2$. Der Excimerlaser und die Xenon-Lampe ließen sich über einen Fußschalter bzw. einen Shutter unterbrechen, so dass vorzeitiges Ausbleichen der Präparate verhindert werden konnte.

Die Mikroskopie-Objektträger (Dicke $170 \mu\text{m}$) sind mit einer hochreflektierenden dielektrischen MgF_2 -Beschichtung (HR $\lambda = 308$ nm) versehen. Unter einem Einstrahlwinkel von $\sim 30^\circ$ liegt die 50%-Transmission der Mikroskopie-Objektträger bei $\lambda \sim 315$ nm. Der spezielle Objektträger wurde aufrecht mit der beschichteten Seite und dem Gefrierschnitt nach oben auf einen x,y,z Tisch gelegt, unter dem sich das Objektiv befindet. Die Abbildung auf den CCD Chip einer UV-empfindlichen Kamera (SensiCam LE 12 Bit, Super VGA 1280×1024 Pixel, PCO, Kelheim) erfolgte über ein apochromatisches Immersionsobjektiv (HCX APO L $10 \times / 0.3$, LEICA, Wetzlar; 50% Transmission bei $\lambda = 340$ nm - 78%) unendlicher Bildweite und einer Quarz-Tubuslinse der Brennweite $f = 200$ mm. Durch die Aufnahme einer geeichten Strichplatte konnte ein Maßstab für die Bilder erstellt werden. Mit einer Chipgröße von $8,6 \text{ mm} \cdot 6,9 \text{ mm}$ ergibt sich ein Abbildungsmaßstab von 16/1 und eine Bildarstellungsfläche von $530 \mu\text{m} \cdot 430 \mu\text{m}$.

Zur Fluoreszenzdetektion wurden drei verschiedene Filter in folgenden Spektralbereichen genutzt: F1 - $\lambda = 325 - 370$ nm, F2 - $\lambda = 400$ bis 490 nm und F3 - $\lambda = 510 - 590$ nm (siehe Abb. 17). Der Filter F3 wurde so gewählt, dass er sich zur Aufzeichnung der Bilder unter $\lambda = 308$ nm als auch $\lambda = 440$ nm Anregung (Xenon-Lampe) eignet. Es wurden von jedem Gefrierschnitt jeweils drei Bilder mit UV-Licht-Anregung (F1 bis F3) und ein Bild mit „D-Light“-Anregung (Filter F3) aufgezeichnet. Das Umschalten der Filter erfolgte über manuelles Drehen eines Filtrerrades, das unterhalb des Objektivs positioniert wurde. Da die Tubuslinse nicht chromatisch korrigiert ist, musste zwischen der Aufnahme der Bilder in den verschiedenen Filterbereichen der Arbeitsabstand nachkorrigiert werden.

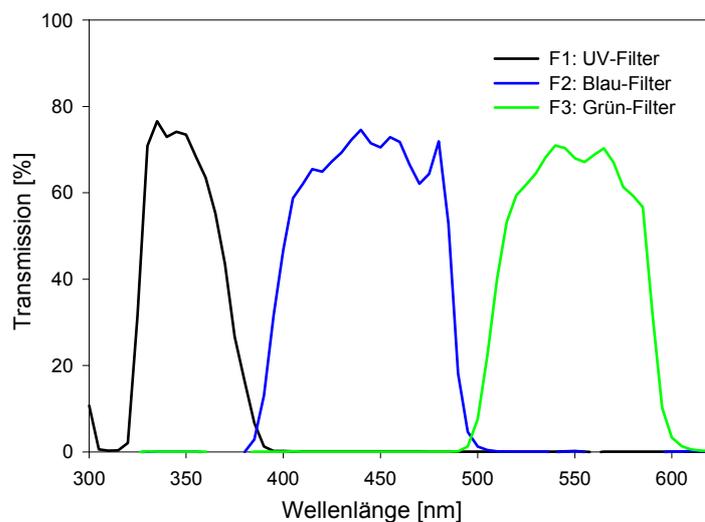


Abb. 17: Filterkennlinien der Detektionsfilter (Bildgebung).

2.3 Bilddokumentation

Ein PC mit Kamera-Software (SensiControl 4.03, PCO, Kelheim) diente der Darstellung und Speicherung der Fluoreszenzbilder. Um ein kontrastreiches Bild zu erhalten und den Großteil des gesamten 12 bit Dynamik-Bereiches der Kamera zu nutzen, wurde die Integrationszeit bei allen Filterkombinationen auf 3 Sekunden festgelegt. Zu Beginn eines jeden Messtages wurde der Hintergrund bei allen Filterkombinationen aufgezeichnet. Die Normierung und der Abgleich von Inhomogenitäten in der Beleuchtung (Shading-Korrektur) wurde über einen Fluoreszenzstandard (Kodak Gelatin Farb-Filter benutzt, #22, Kodak, Deutschland) durchgeführt.

führt.

2.4 Spektroskopie

Für die spektroskopischen Untersuchungen wurde das Fluoreszenzmikroskop mit einem zweiten Ausgang versehen. Dazu wurde in den Bereich unterhalb des Filterrades ein umklappbarer 45° Spiegel (MgF_2 beschichteter Aluminiumspiegel) integriert, der das Fluoreszenzbild in die Faserebene umlenkt. In dieser Bildebene wurde mittig eine 200 μm Quarzfaser positioniert, die das Fluoreszenzlicht in den optischen Vielkanalanalysator (Princeton Instruments, Trenton, NJ, U.S.A.) leitet. Mit dem Abbildungsmaßstab von 16 zu 1 betrug die örtliche Auflösung auf dem Gefrierschnitt $\sim 13 \mu\text{m}$. Dies reicht aus, um Strukturen wie das Epithel bzw. die Mucosa normaler Schleimhaut ($\sim 30 - 50 \mu\text{m}$) aufzulösen. Der CCD-

Chip im Spektrometer zeichnet die Spektren zwischen $\lambda = 190$ und 800 nm in Inkrementen von $\lambda = 0.63$ nm auf (200 ggr/mm; Holographisches Gitter). Um ausreichend hohe Intensitäten (zwischen 300 und 700 counts bei $\lambda = 340$ nm) zu erzielen, wurden die Spektren mit einer Spaltbreite von 250 μm und einer Integrationszeit von 1 sec aufgenommen. Die spektrale Auflösung wurde mit der XeCl-Excimerlaser-Linie bei $\lambda = 308$ nm (natürliche Linienbreite $\lambda \sim 1$ nm FWHM) überprüft und betrug $\lambda = 3.5$ nm FWHM. Von jeder Messposition wurden zwei Spektren aufgezeichnet, eines mit $\lambda = 308$ nm Anregung und ein weiteres mit „D-Light“-Anregung. Das remittierte Anregungslicht wurde bei blau-violetttem Anregungslicht durch einen in den Beobachtungsstrahlengang integrierten $\lambda = 460$ nm Langpassfilter (D-Block, Leitz, Wetzlar) unterdrückt. Vor jedem Messtag wurde ein Normierungsspektrum mit dem orangen Kodak Filter (#22; Gelatin Filter) als Fluoreszenzstandard aufgenommen. Zudem wurden Hintergrundspektren bei beiden Filterkombinationen ($\lambda = 308$ nm und Blau-Violett-Licht-Anregung) aufgezeichnet. Die Gesamtfluoreszenz des Mikroskopobjektträgers, des Mikroskopobjektivs und der Filter betrug typischerweise weniger als 20% das Gesamtsignals.

Ausbleichen der Gefrierschnitte

Die Fluoreszenz der Gefrierschnitte zeigte unter UV-Bestrahlung ein von der eingestrahlten Lichtmenge abhängiges Verhalten. Bei abnehmender Intensität der Fluoreszenz wird dieser Vorgang auch als Ausbleichen bezeichnet. Zur Bestimmung der Ausbleichgeschwindigkeit wurde bei Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 308$ nm Anregung) das Fluoreszenzspektrum von 4 Gefrierschnitten (Astrozytom Grad IV; Tumorrandbereich) in Abhängigkeit der eingestrahlten Bestrahlung gemessen (siehe Abb. 18).

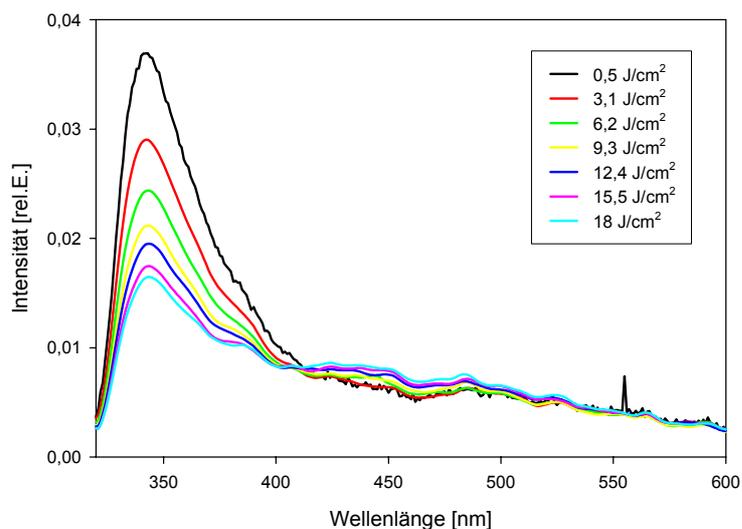


Abb. 18: Ausbleichen der Gefrierschnitte unter dem Einfluss von UV-Licht bei $\lambda = 308$ nm (Lichtleistung 62 mW/cm^2). Es wurden 4 Gefrierschnitte aus der Tumorrandzone eines Glioblastoms verwendet. Die abgebildeten Spektren sind Mittelwerte.

Im ultravioletten bei $\lambda \sim 340$ nm nimmt die Fluoreszenz stetig ab, wohingegen im blaugrünen Spektralbereich zwischen $\lambda = 420$ und 500 nm ein leichter Anstieg der Fluoreszenz beobachtet wird. Ab $\lambda \sim 550$ nm ist die gemessene Fluoreszenzintensität unabhängig von der eingestrahlten Bestrahlung. In Abb. 19-A ist die mittlere Intensität des Fluoreszenzmaximums bei $\lambda = 340 \pm 2$ nm und in Abb. 19-B die Intensität bei $\lambda = 450 \pm 2$ nm dargestellt.

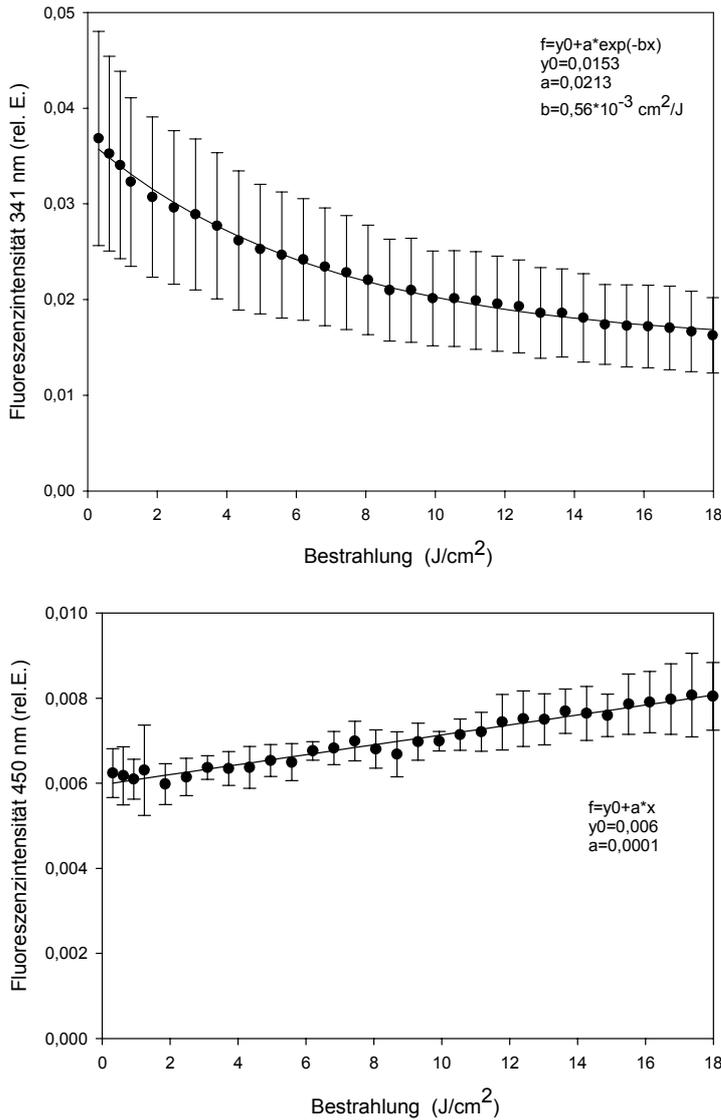


Abb. 19: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der eingestrahnten Bestrahlung. Eingestrahlte Bestrahlungsstärke 62 mW/cm². A: Fluoreszenzintensität im Maximum bei $\lambda = 341 \pm 2$ nm. B: Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 450 \pm 2$ nm.

An die exponentiell abfallenden Datenpunkte wurde ein monoexponentielle Funktion mit konstantem Untergrund in den Messverlauf eingepasst. Bei einer eingestrahnten Bestrahlung von 13,3 J/cm², ist die Fluoreszenzintensität auf die Hälfte ihres ursprünglichen Wertes abgefallen. Bei einer eingestrahnten mittleren Leistungsdichte von 50 mW/cm² (durchschnittliche Leistungsdichte zur Vermessung der Gefrierschnitte) ist demnach der UV-Peak bei $\lambda = 340$ nm nach ~ 27 sec auf die Hälfte seines ursprünglichen Wertes abgefallen. Innerhalb der Integrationszeit der Kamera (3 sec) bleicht der UV-Peak um $\sim 1,6$ % des ursprünglichen Wertes aus.

An die Fluoreszenzwerte im blau-violetten Spektralbereich bei $\lambda = 450$ nm wurde eine lineare Kurve angepasst (siehe Abb. 19). Nach 13,3 J/cm² ist die Fluoreszenz im sichtbaren Spekt-

ralbereich bei $\lambda \sim 450$ nm um ~ 22 % angestiegen. Innerhalb der Belichtungszeit der Kamera wurde kein merklicher Ansteigen der Fluoreszenzintensität gemessen.

2.6 Untersuchungsablauf / Fluoreszenzmikroskopie

Die HE-gefärbten Schnittstufen der entnommenen Biopsien wurden zur histopathologischen Untersuchung in die Pathologie übergeben. Vor den fluoreszenzmikroskopischen Messungen an dem UV-optimierten Mikroskop wurden die Fluoreszenzschnitte mit einem handelsüblichen inversen Forschungsmikroskop mit AuflichtfluoreszenzAnregungsmöglichkeit (DM IRBE, Leica, Deutschland) untersucht. Durch die visuelle Beobachtung über das Okular des Mikroskops konnten die Größe, das Aussehen und die Lokalisation der interessierenden Strukturen auf dem Fluoreszenzschnitt mit den histopathologisch beurteilten HE-gefärbten Schnittstufen verglichen werden. Mit Fluoreszenzanregung der Fluoreszenzschnitte durch das blaue Licht des Forschungsmikroskops wurde die stromale Kollagenfluoreszenz sichtbar gemacht. Durch die gleichzeitige Beleuchtung mit Weißlicht war es möglich das geringer fluoreszierende Epithel (bzw. die Mucosa) auf dem Fluoreszenzschnitt abzugrenzen. Von den Fluoreszenzschnitten wurden anschließend Farbbilder (Tricam SL PAL PDD, Karl Storz, Tuttlingen) angefertigt, die dazu dienten die ausgewählten Bildausschnitte im Fluoreszenz-Gefrierschnitt unter dem UV-Mikroskop aufzufinden.

Um keine Artefakte in der gemessenen Fluoreszenz der Gefrierschnitte durch unterschiedlich langes Belichten der Gefrierschnitte hervorzurufen, wurden die Bilder und Spektren nach einem einheitlichen Vorgehen aufgezeichnet. Die UV-angeregten Fluoreszenzbilder wurden in der Filterreihenfolge F1, F2 und F3 mit jeweils gleichbleibender Integrationszeit von 3 sec aufgenommen. Die Spektren wurden jeweils an benachbarten Parallelschnitten in ausgezeichneten Arealen aufgezeichnet.

Auswertung

Nach der histologischen Beurteilung des HE-Präparates wurde der histopathologische Befund mit der Fluoreszenzintensität an korrespondierenden Schnittstufen korreliert. Die Einteilung erfolgte für die Schnitte aus Epithelgewebe folgendermaßen:

- Fluoreszenzintensität im Areal des „Befundes“
- Fluoreszenzintensität aus dem unmittelbar benachbarten, histologisch unauffälligem Stroma
- Evtl. Fluoreszenzintensität des vom „Befund“ entfernten, histologisch unauffälligen Epithels bzw. Stromas: Diese Bewertung setzt voraus, dass die Entnahme der Probe makroskopisch im Gesunden erfolgte und im HE-Präparat kein histologisch auffälliger Befund vorhanden war.

In Biopsien ohne histologisch erkennbare Läsion wurde lediglich eine Unterscheidung zwischen Epithel und Stroma bezüglich der Fluoreszenzintensität vorgenommen.

III Ergebnisse

1 Fluoreszenzdetektion in situ

1.1 Urologie – Harnblasenkarzinom

1.1.1 UV-angeregte Fluoreszenzspektroskopie

Es wurden insgesamt 167 Areale in 51 Patienten untersucht (Tab. 5). Es wurden 35 Spektren aus histologisch als maligne nachgewiesenen Arealen und 132 aus gutartigen Gewebearalen aufgezeichnet. Unter den 35 malignen Arealen waren 9 den flachen Tumoren (Gruppe IV) und 26 den massiven Tumoren (Gruppe V) zuzuordnen (siehe histologische Gruppeneinteilung Kapitel II1.4.1).

Histologische Gruppierung	# der Biopsien	# der Patienten
I (Normalgewebe)	40	26
II (Narben)	10	8
III (Benigne Neoplasien)	82	33
IV (Flache Tumore)	9	7
V (Massive Tumore)	26	17

Tab. 5: Histopathologische Einteilung der 167 untersuchten Biopsien aus der Harnblase.

In Abb. 20 sind repräsentativ ausgewählte Fluoreszenzspektren mit Anregung bei $\lambda = 308$ nm von drei verschiedenen Patienten mit Verdacht auf Blasentumor dargestellt. Die dargestellten Beispiele waren hinsichtlich folgender Merkmale repräsentativ für die Gesamtheit der aufgezeichneten Spektren:

- Die spektrale Intensitätsverteilung histologisch gleich bewerteter Strukturen (z.B. Normalgewebe) variierte sowohl zwischen den Patienten A bis C als auch innerhalb einzelner Patienten (siehe z.B. Patient C) stark.
- Das Maximum der Fluoreszenzintensität wurde im allgemeinen im Bereich des Maximums der Tryptophanfluoreszenz bei $\lambda \sim 335$ nm gemessen.
- In manchen Spektren (z.B. der Hyperplasie Patient B) war im Bereich der Soretbande des Hämoglobins bei $\lambda \sim 420$ nm ein lokales Minimum in der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Insbesondere im sichtbaren Spektralbereich ab $\lambda \sim 400$ nm stieg bzw. fiel die Gesamtfluoreszenzintensität je nach Ausprägung dieses lokalen Minimums bei $\lambda \sim 420$ nm.

Die UV-Fluoreszenzintensität zwischen $\lambda \sim 330$ nm und $\lambda \sim 400$ nm war im Falle des malignen Gewebes in der Regel höher im Vergleich zum normalen Gewebe. Jedoch wurde bei manchen Patienten auch eine reduzierte UV-Fluoreszenz im Tumor gegenüber dem umliegenden Normalgewebe gemessen (siehe Patient B). Im sichtbaren Spektralbereich ab $\lambda \sim 400$ nm war die Fluoreszenzintensität im Tumor dagegen in der Regel niedriger als die des angrenzenden Normalgewebes.

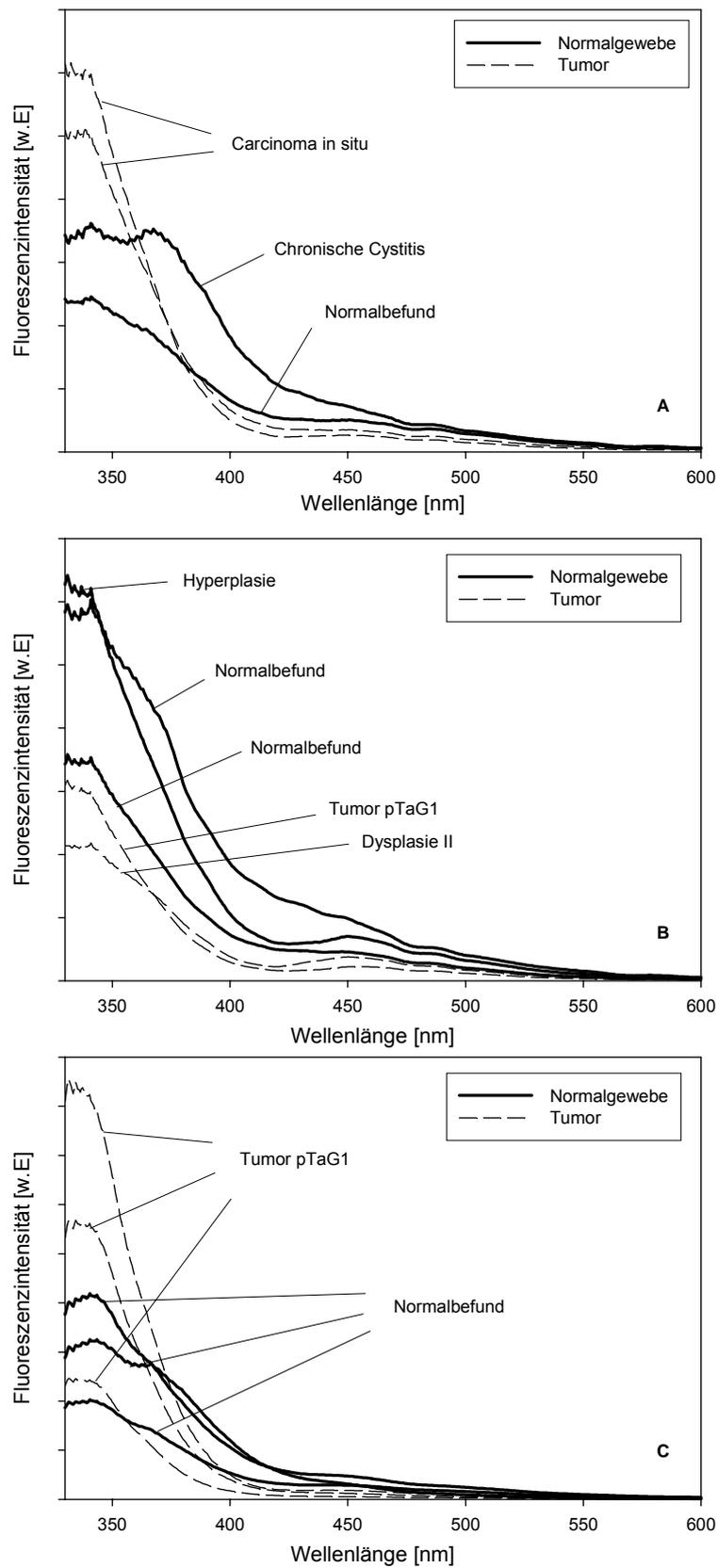


Abb. 20: Typische *in-vivo*-Autofluoreszenz-Emissionsspektren an verschiedenen Stellen der Blase. Messungen an drei Patienten (A, B, C).

In Abb. 21 sind die auf das Maximum normierten Mittelwertspektren (nach den histologischen Gruppierungen unterteilt) dargestellt. Ein Vergleich der Spektren aus benignen (Gruppe I bis III) zu solchen aus malignen (Gruppe IV und V) Gewebearealen zeigte eine reduzierte relative Fluoreszenzintensität über den gesamten Spektralbereich ab $\lambda \sim 350$ nm bis $\lambda \sim 600$ nm. Flache Tumore (Gruppe IV) zeigten dabei ein ähnlich hohe Fluoreszenzintensität im sichtbaren Spektralbereich wie benigne Neoplasien (Gruppe III) bzw. alte Resektionsareale (Gruppe II).

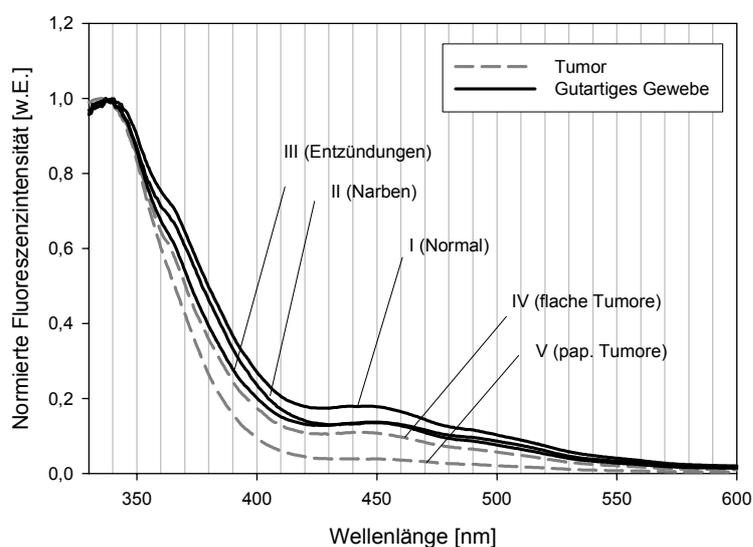


Abb. 21: Mittelwertspektren der verschiedenen histologischen Gruppierungen (I bis V). Alle Spektren wurden auf ihre Maximalintensität normiert.

Die Intensitätsmatrizen, bestehend aus den Fluoreszenzverhältnissen korrespondierender Wellenlängen, wurden getrennt berechnet für die Gruppe der gutartigen Gewebeareale (I-III), für die flachen Tumore (IV) und für die massiven Tumore (V). In Abb. 22 A und B ist der Ratio-Kontrast der massiven (papillär und solide) Tumore zu den gutartigen Gewebearealen (A) als auch der flachen Tumore zu den gutartigen Gewebearealen (B) in Form von Höhenliendiagrammen dargestellt.

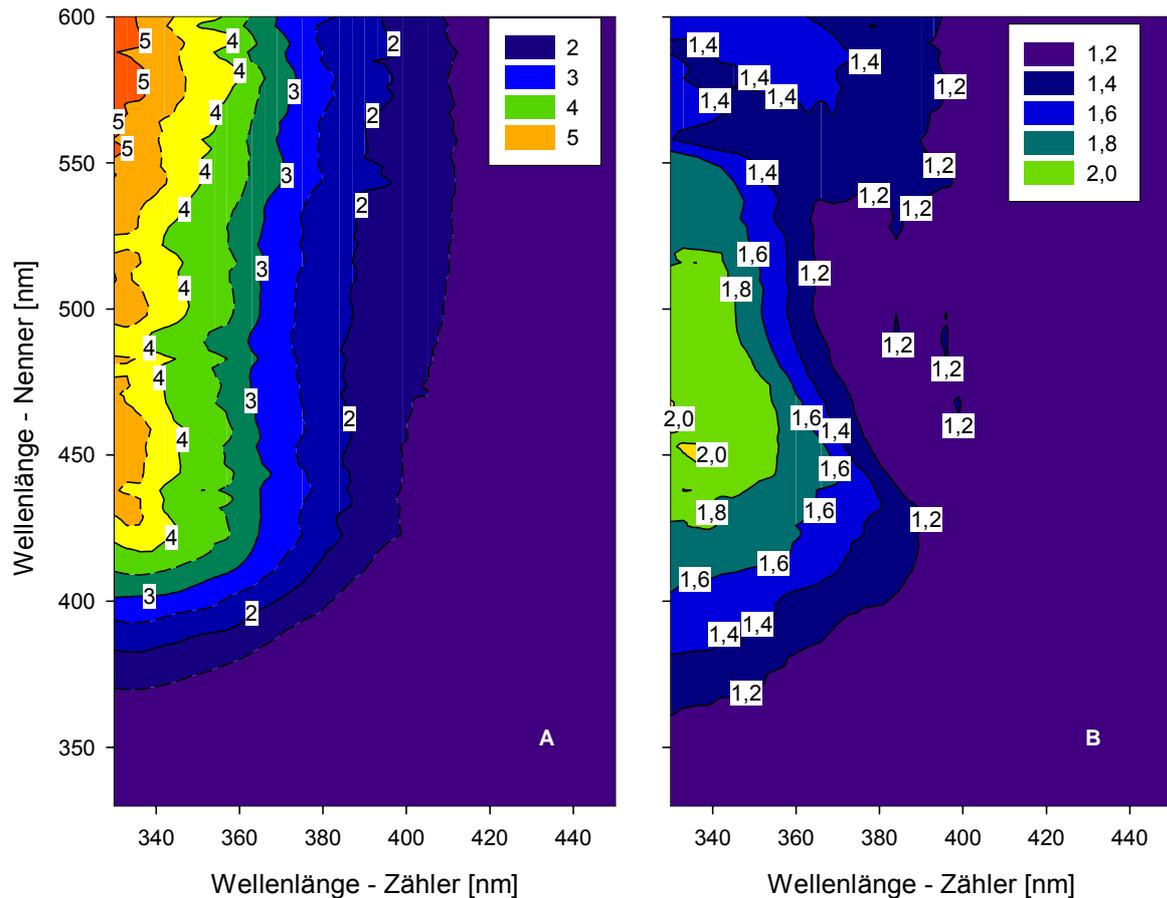


Abb. 22: Kontrast der Fluoreszenzintensitätsmatrizen dargestellt im Höhenliniendiagramm. A: Gruppe V (papilläre Tumore) zu Gruppe I-III (histologisch negative Befunde). B: Gruppe IV (CIS und Dysplasie II) zu Gruppe I-III (histologisch negative Befunde). Die Linien verbinden Punkte gleichen Kontrastes. (A) Haupthöhenlinien (durchgezogen) Unterschied 1; Nebenhöhenlinien (gestrichelt) Unterschied 0,5. (B) Haupthöhenlinien (durchgezogen) Unterschied 0,2.

Gemeinsam für beide Höhenliniendiagramme war, dass der Wellenlängenbereich für den maximalen Kontrast im Zähler (Abszisse) des Ratios im ultravioletten Spektralbereich nahe des Beginns der Aufzeichnung bei $\lambda = 330$ nm lag. Die Position der Maxima in Bezug auf den Nenner (Ordinate) des Ratios unterschied sich dagegen beträchtlich zwischen den Höhenliniendiagrammen.

Der maximale Kontrast bei massiven Tumoren wurde bei einem Fluoreszenzverhältnis von $\lambda \sim 335$ nm zu $\lambda \sim 575$ nm mit ~ 5 erreicht. Bei einer Höhenlinie von 4,5 wurde im sichtbaren Spektralbereich (Nenner; Ordinate) ein gleichbleibender Kontrast zwischen $\lambda \sim 430$ nm bis $\lambda \sim 590$ nm erreicht. Im ultravioletten Spektralbereich (Zähler; Abszisse) war die gleiche Höhenlinie auf einen Wert von $\lambda \sim 340$ nm begrenzt.

Aus Abb. 22 B ist ersichtlich, dass der maximale Kontrast für flache Tumore für den Nenner des Fluoreszenzverhältnisses bei $\lambda \sim 450$ nm bei ~ 2 lag. Um einen möglichst starken Kon-

trast für diese unter Weißlicht schwer erkennbaren Läsionen zu erzielen, wurde zur statistischen Auswertung aller gemessenen Spektren das Fluoreszenzverhältnis $\lambda = 337 \pm 3$ nm zu $\lambda = 450 \pm 3$ nm gewählt (siehe Abb. 22 B). In diesem Spektralbereich lag der Fluoreszenzkontrast für die massiven Tumore bei $\sim 4,5$.

In Abb. 23 ist das Fluoreszenzintensitätsverhältnis (Ratio) zwischen $I(\lambda = 337$ nm) und $I(\lambda = 450$ nm) für die einzelnen Gruppierungen in einem Box-Plot dargestellt.

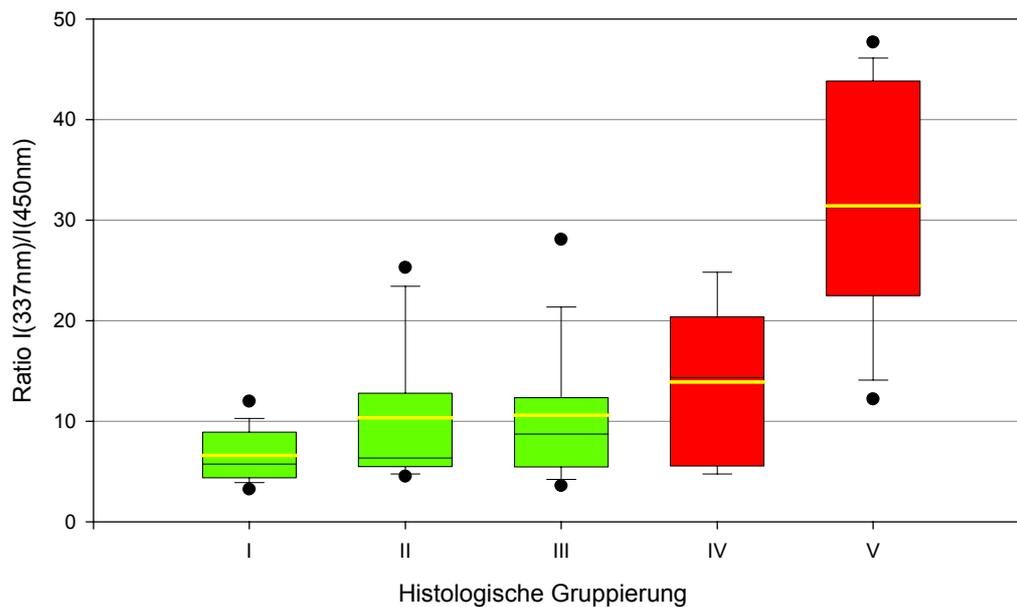


Abb. 23: Box-Plot Diagramm des Ratios $R=I(\lambda = 337\text{nm})/I(\lambda = 450\text{ nm})$. Gruppe I: 40 normale Gewebeareale; Gruppe II: $n = 10$ Narben; Gruppe III: $n = 82$ benigne Neoplasien; Gruppe IV: $n = 9$ flache Tumore; Gruppe V: $n = 26$ massive Tumore. Im Box-Plot ist neben dem Median (durchgezogene schwarze Linie) der Mittelwert (durchgezogene gelbe Linie) angegeben.

Die Ratios der gutartigen Areale (Gruppe I-III) unterschieden sich signifikant ($p < 0,0001$) von der Gruppe der massiven Tumoren (Gruppe V). Flache Tumore (Gruppe IV) wurden nicht signifikant ($p = 0,082$) von gutartigen Arealen (Gruppe I-III) unterschieden. Tumore unterschiedlichen „Stagings“ bzw. „Gradings“ konnten nicht signifikant voneinander unterschieden werden. Allerdings war es möglich, flache Tumore (Gruppe IV) mit diesem Algorithmus signifikant ($p < 0,0001$) von massiven Tumoren (Gruppe V) zu unterscheiden. Aus Abb. 23 ist ersichtlich, dass der Median und der Mittelwert der Ratios der gutartigen Areale (Gruppe I-III) um ca. 30% - 100% voneinander abwichen. Dies lag an der großen Anzahl an „Ausreißern“ mit hohen Ratio-Werten. Die Ratios von vier der flachen Tumoreareale lagen innerhalb des 50% Perzentile-Bereichs der Ratios der gutartigen Areale (Gruppe I-III). Eine empirische

Festlegung eines Schwellwertes, der die Spektren gutartiger und bösartiger Läsionen trennt, erscheint daher nicht sinnvoll.

Um dennoch eine Bewertung des Ratio-Algorithmus hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität durchführen zu können, wurde der Schwellwert variiert und gegen die Sensitivität bzw. Spezifität aufgetragen (Abb. 24).

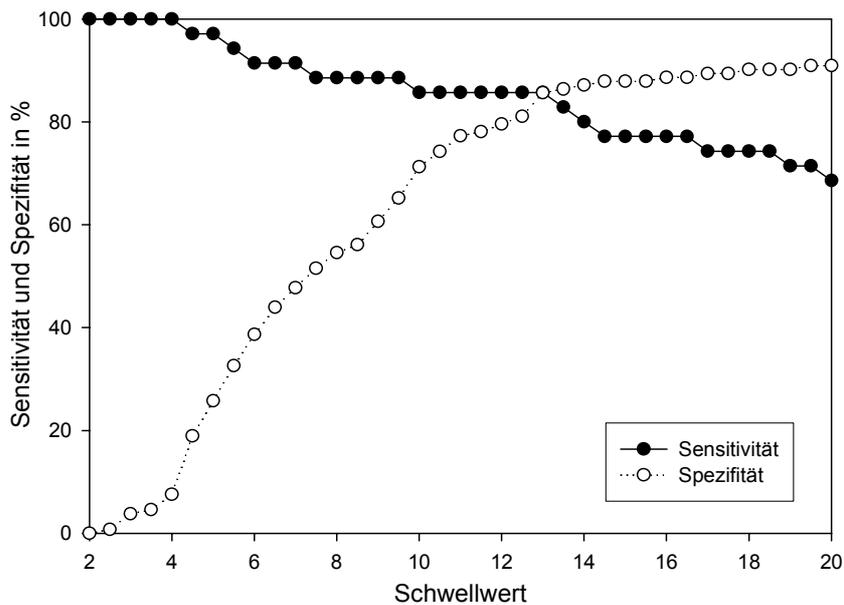


Abb. 24: Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit des Schwellwertes.

Für Schwellwerte von 7,5 bis 9,5 blieb die Sensitivität auf gleichbleibendem Niveau von 88,6%. Gleichzeitig nahm die Spezifität von 52% auf 65% zu. Die falsch-negativen Werte in diesem Bereich umfassten 2 Carcinoma in-situ-Läsionen, eine Dysplasie II und einen mikro-papillären Tumor pTaG1.

Bei 20 der 51 Patienten wurden neben den Spektren aus malignen Bereichen in der jeweils gleichen Harnblase auch Spektren aus normalen Gewebearealen aufgezeichnet. Bei diesen Patienten wurden die Ratio-Werte für malignes und benignes Gewebe patientenindividuell miteinander verglichen und in Abb. 25 in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

Abb. 25 A zeigt eine Gegenüberstellung der Messwerte von 7 der 20 Patienten, in denen flache Tumore gefunden wurden. Die gleichzeitig gefundenen massiven Tumore sind in diesem Balkendiagramm nicht mit aufgeführt.

Ein Vergleich der dargestellten Ratio-Werte untereinander zeigt, dass in allen bis auf zwei Patienten mit Frühstadien patientenindividuell erhöhte Tumor-Ratio-Werte gegenüber dem normalen umliegenden Gewebearealen gemessen wurden. Es konnte jedoch keine statistische Signifikanz für die Unterscheidbarkeit dieser abhängigen Gruppen ($p > 0,05$) berechnet werden. Die Tumor- als auch die Normal Ratio-Werte schwankten zwischen den Patienten erheblich um $\pm 250\%$. In den Abbildungen A und B ist jeweils der Schwellenwert bei 9,5 eingezeichnet. Bei zwei der Patienten aus Gruppe A (Abb. 25) wird deutlich, dass auch das Normalgewebe oberhalb der Schwelle von 9,5 lag und somit gleichermaßen mit diesem Schwellenwert falsch zugeordnet wurden. Bei drei der sieben Patienten mit flachen Tumoren konnten durch diesen Algorithmus maligne und gutartige Areale jeweils richtig zugeordnet werden.

In Abb. 25 B sind ausschließlich massive Tumore dargestellt (13 von 20). Bei dieser Tumor-entität wurden konsistent erhöhte Ratio-Werte des malignen gegenüber dem gutartigen Gewebe gemessen ($p < 0,001$). Bei 7 der 13 Patienten lagen auch normale Gewebeareale über dem Schwellenwert von 9,5 und wurden damit als falsch-positive Areale erfasst.

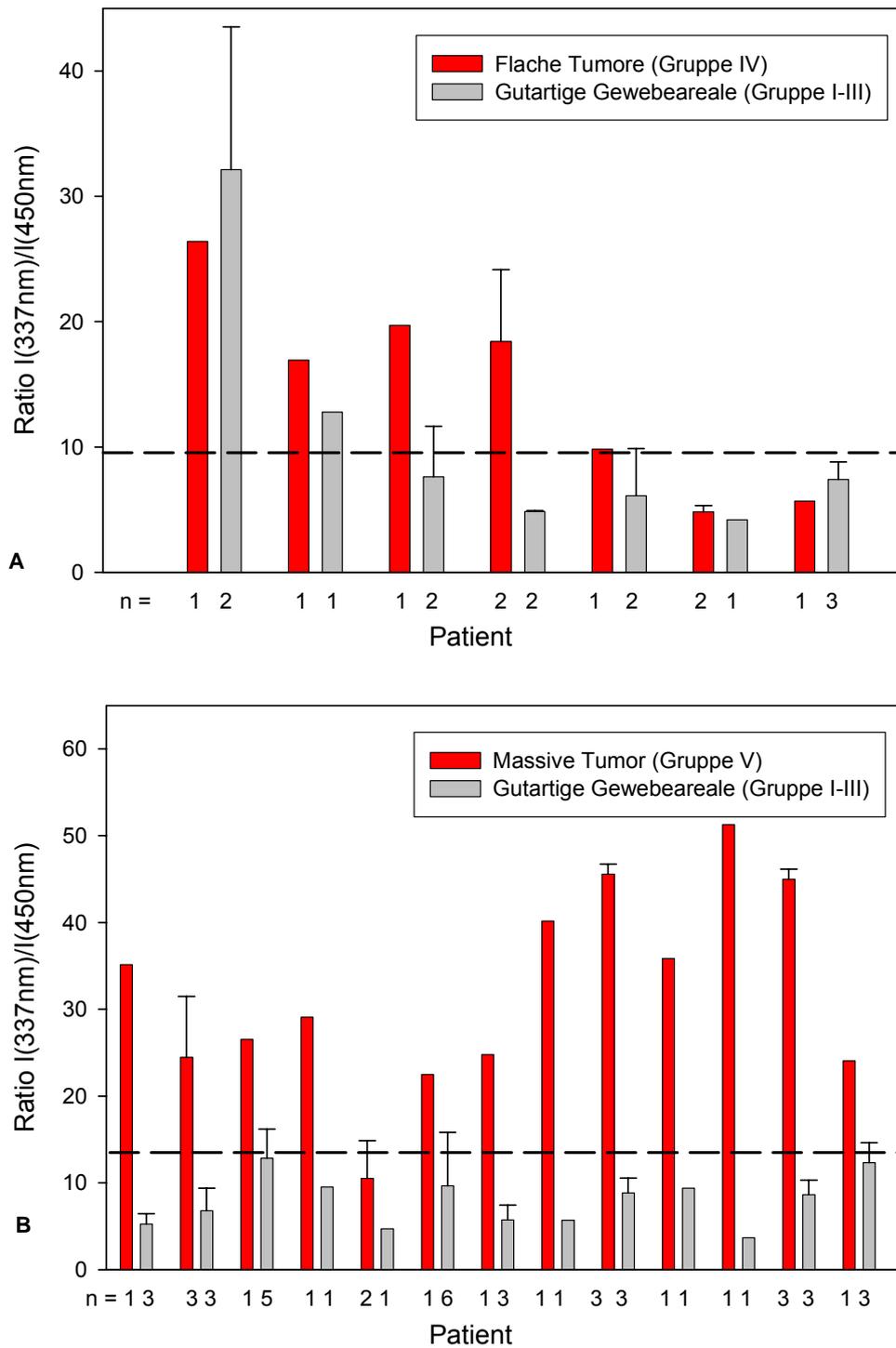


Abb. 25: Balkendiagramm der patientenindividuellen Ratio-Werte. Es werden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung angegeben. Auf der Abszisse ist die Anzahl n der gemessenen Areale angegeben. A: Patienten mit flachen Tumoren (Gruppe IV ohne Gruppe V). B: Patienten mit massiven Tumoren (Gruppe V ohne Gruppe IV). Der Schwellwert 9,5 ist gestrichelt eingezeichnet.

Eine Bewertung der absolut gemessenen Fluoreszenzintensität konnte an 59 der 167 untersuchten Areale durchgeführt werden. Bei dieser Untergruppe wurden anschließend an die

Messungen der Gewebeareale die Fluoreszenz des Fluoreszenzstandards aufgezeichnet. Fünf der Areale waren den flachen Tumoren (Gruppe IV) und neun den massiven Tumoren (Gruppe V) zuzuordnen. Von den 45 gutartigen Gewebearealen stammten 32 aus benignen, neoplastischen Gewebearealen und 13 aus normaler, blander Schleimhaut.

In Abb. 26 A sind die Mittelwertspektren der in die verschiedenen histologischen Gruppierungen unterteilten Spektren dargestellt. Aus Gruppe II wurde nur ein altes Resektionsareal gemessen. Dieses wurde nicht in die Darstellung mit aufgenommen. Ein Vergleich der Spektren aus malignen (Gruppe IV und V) zu solchen aus benignen (Gruppe I und III) Gewebearealen zeigte eine reduzierte Fluoreszenzintensität der malignen Areale über den gesamten Spektralbereich ab $\lambda \sim 400$ nm bis $\lambda \sim 600$ nm.

Um die Spektren in Relation zu dem Normalgewebe besser vergleichen zu können, wurde für jedes Mittelwertspektrum (Gruppe III bis V) die Differenz zum Normalgewebe (Gruppe I) berechnet und auf das Mittelwertspektrum des Normalgewebes normiert (Abb. 26 B). Das so für die Gruppen III-V berechnete Spektrum wird im Folgenden als Residuumspektrum bezeichnet. Im ultravioletten Spektralbereich bis ca. $\lambda \sim 360$ nm wurde eine Zunahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des Schweregrades der Neoplasien (benigne Neoplasien, flache Tumore, und massive Tumore) gemessen. In dem Residuumspektrum der massiven Tumore wurden die typischen Hämoglobinabsorptionsmaxima bei $\lambda = 420, 540$ und 580 nm sichtbar (siehe auch Kapitel 15.3). Aus einem Vergleich der Spektren von flachen Tumoren und benignen Neoplasien wird deutlich, dass die Fluoreszenzintensität im sichtbaren Spektralbereich für benigne Neoplasien im Mittel niedriger war als für flache Tumore.

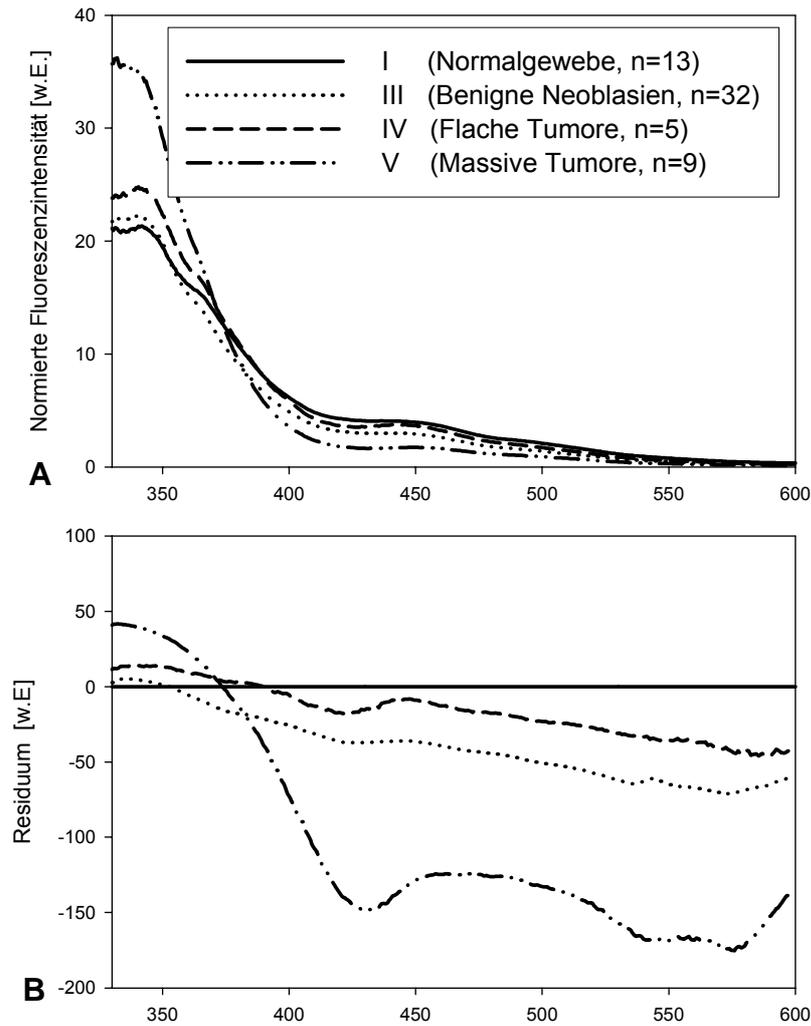


Abb. 26: Mittelwertspektren (A); Residuumspektren (B) in Prozent. Das Residuumspektrum berechnet sich aus der Differenz zwischen dem Mittelwertspektrum der Gruppierung III – V und dem Normalgewebe (Gruppe I) und anschließender Division durch das Normalgewebespektrum (Gruppe I). Die Spektren wurden alle auf den Fluoreszenzstandard normiert.

In Abb. 27 (A bis C) werden in Box-Plots die absoluten Intensitätswerte bei $\lambda = 337 \text{ nm}$ (A), $\lambda = 450 \text{ nm}$ (B) und das Ratio der beiden Intensitätswerte (C) gegen die histologischen Gruppierungen (I-V) aufgetragen.

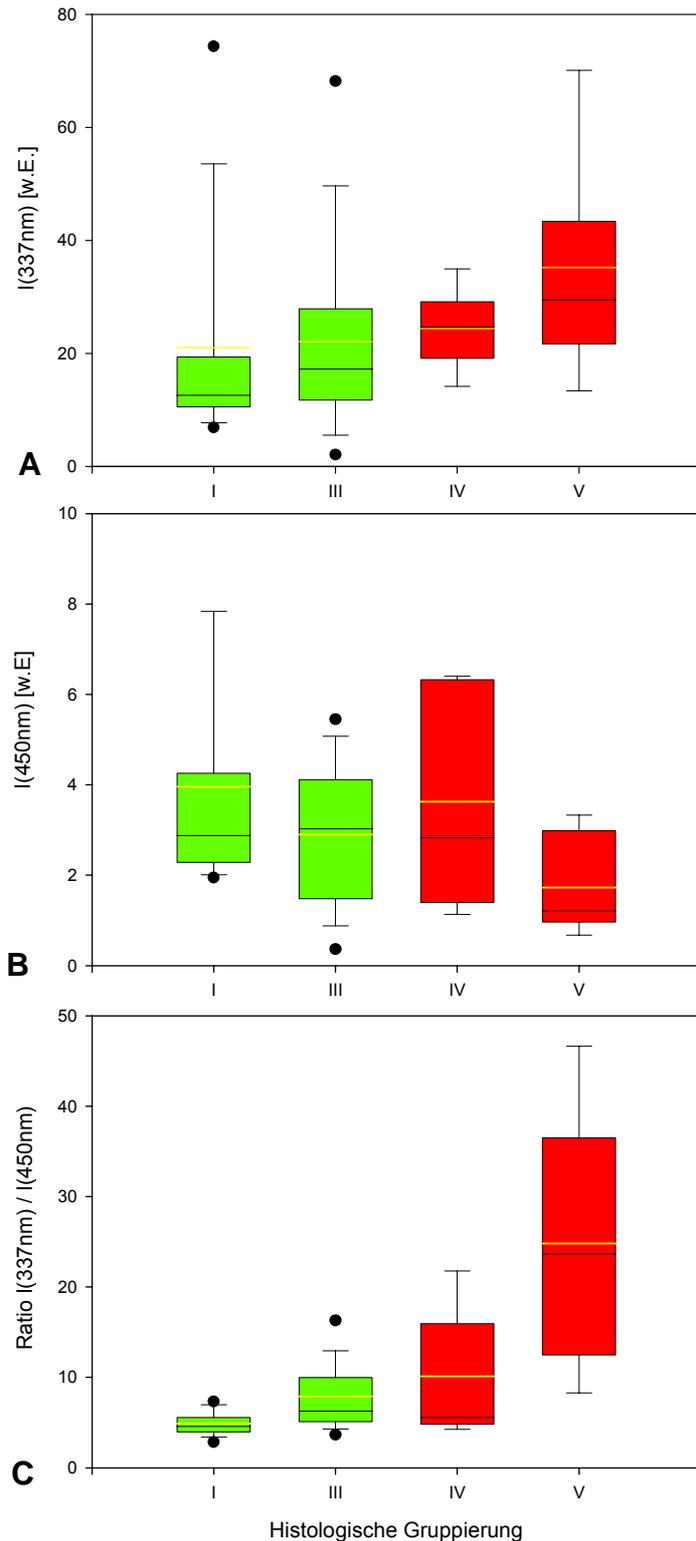


Abb. 27: Box-Plot-Darstellungen. Absolute Intensitätswerte bei A: $I(\lambda = 337 \text{ nm})$ und B: $I(\lambda = 450 \text{ nm})$. C: Ratio $I(\lambda = 337 \text{ nm}) / I(\lambda = 450 \text{ nm})$. Es sind hier ausschließlich Ratios und Absolutwerte von Spektren aufgetragen, bei denen eine Normierung auf den Fluoreszenzstandard möglich war. Gruppe I: 13 normale Gewebearealen, Gruppe III: 32 benigne Neoplasien, Gruppe IV: 5 flache Tumore, Gruppe V: 9 massive Tumore. Im Box-Plot ist neben dem Median (durchgezogene schwarze Linie) der Mittelwert (durchgezogene gelbe Linie) angegeben.

Zur statistischen Auswertung wurde die Signifikanz der Differenzierung zwischen den unterschiedlichen histologischen Gruppierungen durch die absoluten Intensitätswerte und Ratios berechnet (Tab. 6).

Gegenüberstellung	I ($\lambda = 337 \text{ nm}$)	I ($\lambda = 450 \text{ nm}$)	Ratio
IV zu (I bis III)	0,159	0,851	0,593
V zu (I bis III)	0,017	0,024	0,000
(IV und V) zu (I bis III)	0,009	0,107	0,001

Tab. 6: Statistische Signifikanz p zur Unterscheidbarkeit zwischen verschiedenen histologischen Gruppierungen (I bis V).

Flache Tumore (Gruppe IV) konnten mit keiner der Methoden (sowohl Absolutwerte als auch Ratios) signifikant von Tumorgewebe unterschieden werden. Papilläre Tumore wurden durch die absoluten Intensitätswerte signifikant ($p < 0,05$) und durch die Ratio-Bildung hoch signifikant ($p < 0,0001$) von gutartigen Gewebearealen unterschieden.

1.1.2 Unauffällige Schleimhaut

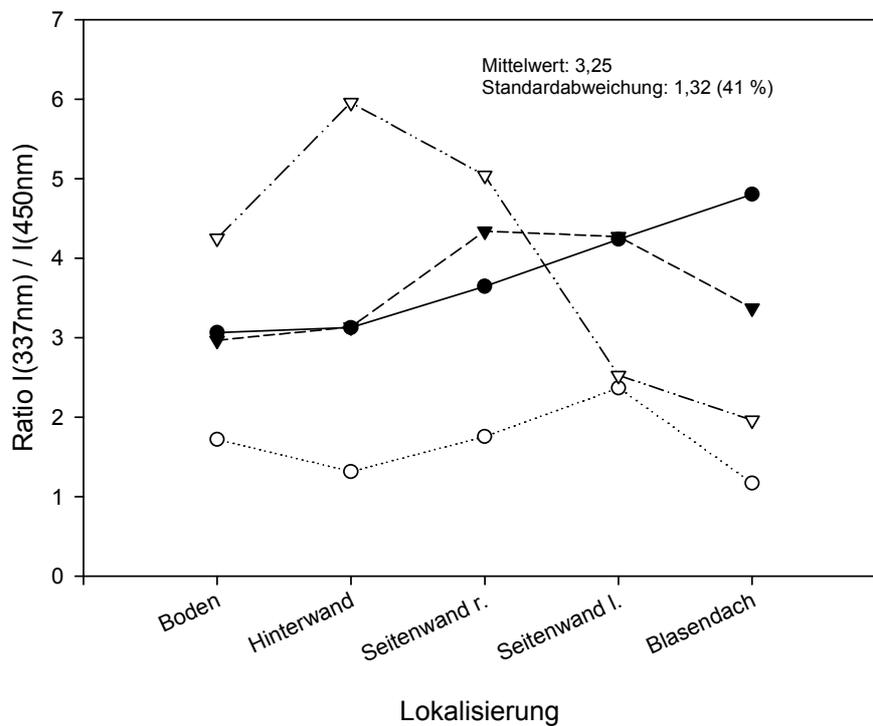


Abb. 28: Ratio-Bildung auf unauffälliger Schleimhaut an fünf repräsentativen Lokalisationen der Blase von 4 Patienten.

Zur Evaluierung der Lokalisationsabhängigkeit und Abschätzung der individuellen Variationen der Ratios in völlig unauffälliger Schleimhaut wurden Messungen an vier Patienten vorgenommen. Das Ratio zeigte dabei keine Abhängigkeit von der Messposition innerhalb der Harnblase. Es ergab sich insgesamt ein Mittelwert von 3,25 mit einer relativen Standardabweichung von 41%.

1.1.3 Weißlicht- und PPIX-Fluoreszenzdetektion

Bei allen 51 untersuchten Patienten war nach erfolgter Inkubation von 5-ALA PPIX-Fluoreszenz in der Blase nachweisbar. Die unspezifische Fluoreszenz des Blasenauslasses diente dabei als Kontrolle für die ordnungsgemäße Verabreichung von 5-ALA.

Die Bewertung der subjektiven Erkennbarkeit der Befunde unter Weißlicht- und Fluoreszenzausleuchtung (blau-violettes Licht) ist in Tab. 7 der histopathologischen Gruppeneinteilung gegenübergestellt.

Histologie	Biopsien	Weißlichtendoskopie			PPIX-Fluoreszenz	
		Unverdächtig (0)	Suspekt (1)	T-Verdacht (2)	Positiv	Negativ
Gruppe I-III	132	77	31	24	61	71
Gruppe IV	9	1	3	5	8	1
Gruppe V	26	0	0	26	24	2
Total	167	78	34	55	93	74

Tab. 7: Makroskopische Weißlicht- und Fluoreszenzbeurteilung durch den Operateur. Vergleich zwischen Weißlicht- und Fluoreszenzendoskopie

Von den unter Weißlicht völlig unauffälligen Läsionen war nur eine maligne (CIS). Diese wurde auch im Fluoreszenzmodus nicht erkannt. Sie befand sich neben einer zweiten, allerdings wahrnehmbar fluoreszierenden CIS-Läsion, die unter Weißlicht als suspekt eingestuft wurde. Innerhalb der suspekten Areale (Kategorie 1), wurden 3 maligne Areale aufgefunden, die sich alle in der PPIX-Fluoreszenz positiv darstellten. Zwei papilläre Tumore pTaG1 fluoreszierten nicht im Fluoreszenzmodus, waren allerdings im Weißlichtmodus als tumorverdächtig erkannt worden.

In Tab. 8 ist die Sensitivität und Spezifität der Weißlichtendoskopie und Fluoreszenzendoskopie aufgeführt.

	Sensitivität	Spezifität
Weißlichtendoskopie (0) gegen (1)-(2) – WL1	97%	58%
Weißlichtendoskopie (0)-(1) gegen (2) – WL2	89%	82%
PPIX – Fluoreszenz- endoskopie (AFE)	91%	54%
Kombination aus WL1 und AFE	91%	63%

Tab. 8: Sensitivität der Weißlicht- und Fluoreszenzendoskopie

Die Sensitivität der Weißlichtendoskopie schwankt je nach subjektiver Bewertung der Läsionen in einem Bereich zwischen 89% und 97%, wohingegen die Spezifität zwischen 58% und 82% variiert. Zudem sind in Tab. 8 die Werte einer UND-Kombination aus Weißlichtendoskopie (WL1) und 5-ALA induzierter Fluoreszenzendoskopie (AFE) dargestellt. Bei dieser UND-Kombination wird eine Läsion nur dann positiv gewertet, wenn sie unter beiden Methoden als positiv eingeteilt wurde. Ohne Verlust an Sensitivität der AFE konnte im vorliegenden Patientengut durch diese Kombination die Spezifität der AFE um 17% verbessert werden.

1.1.4 Vergleich UV-angeregte Fluoreszenzspektroskopie, PPIX-Bildgebung und Weißlichtdiagnostik

Die Möglichkeiten maligne Läsionen zu erkennen werden verbessert, wenn man die verschiedenen Erkennungsmethoden miteinander kombiniert. Eine untersuchte Stelle wurde als positiv gewertet, wenn wenigstens 2 der 3 Bewertungskriterien konsistent waren (Tab. 9).

	Sensitivität	Spezifität
Weißlichtendoskopie (0)-(1) gegen (2) – WL1	89%	82%
PPIX-Fluoreszenzendoskopie (PFE)	91%	54%
UV-angeregte Fluoreszenzspektroskopie (UVF)	88%	65%
Kombination WL1, PFE und UVF	94%	71%

Tab. 9: Gegenüberstellung der Sensitivität und Spezifität der verschiedenen diagnostischen Verfahren.

Durch eine Kombination aus Weißlichtendoskopie (WL1), PPIX-Fluoreszenzendoskopie (PFE) und UV-angeregter Fluoreszenzspektroskopie (UVF) ließ sich in diesem Patientengut eine Sensitivität von 94% und eine Spezifität von 71% erzielen. Dabei wurden zwei CIS A-reale eines Patienten negativ gewertet.

1.2 Pulmologie - Bronchialkarzinom

Von 39 untersuchten Arealen wurden insgesamt 9 Spektren aus histopathologisch nachgewiesenen, malignen Arealen und 30 aus gutartigen Gewebearealen aufgezeichnet. Von den 30 gutartigen Gewebearealen waren insgesamt 20 den benignen Neoplasien zuzuordnen.

In Abb. 29 sind repräsentativ ausgewählte Fluoreszenzspektren mit Anregung bei $\lambda = 308$ nm von zwei Patienten mit Verdacht auf ein Bronchialkarzinom dargestellt. Die dargestellten Beispiele sind hinsichtlich folgender Merkmale repräsentativ für die Gesamtheit der aufgezeichneten Spektren:

- Das Maximum der Fluoreszenzintensität wurde im Allgemeinen im Bereich des Maximums der Tryptophanfluoreszenz bei $\lambda \sim 340$ nm gemessen.
- In manchen Spektren (z.B. Tumor Abb. 29 A) war im Bereich der Soretbande des Hämoglobins bei $\lambda \sim 420$ nm ein lokales Minimum in der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Insbesondere im sichtbaren Spektralbereich ab $\lambda \sim 400$ nm stieg bzw. fiel die Gesamtfluoreszenzintensität je nach Ausprägung dieses lokalen Minimums bei $\lambda \sim 420$ nm.
- Die UV-Fluoreszenzintensität zwischen $\lambda \sim 330$ nm und $\lambda \sim 400$ nm war im Falle des malignen Gewebes in der Regel höher im Vergleich zum normalen Gewebe. Im sichtbaren Spektralbereich ab $\lambda \sim 400$ nm war die Fluoreszenzintensität im Tumor dagegen in der Regel niedriger als die des angrenzenden Normalgewebes.

In einem nekrotischen Tumorareal (Abb. 29 A) wurde gegenüber dem umliegenden Gewebe eine über den gesamten Spektralbereich reduzierte Fluoreszenzintensität gemessen.

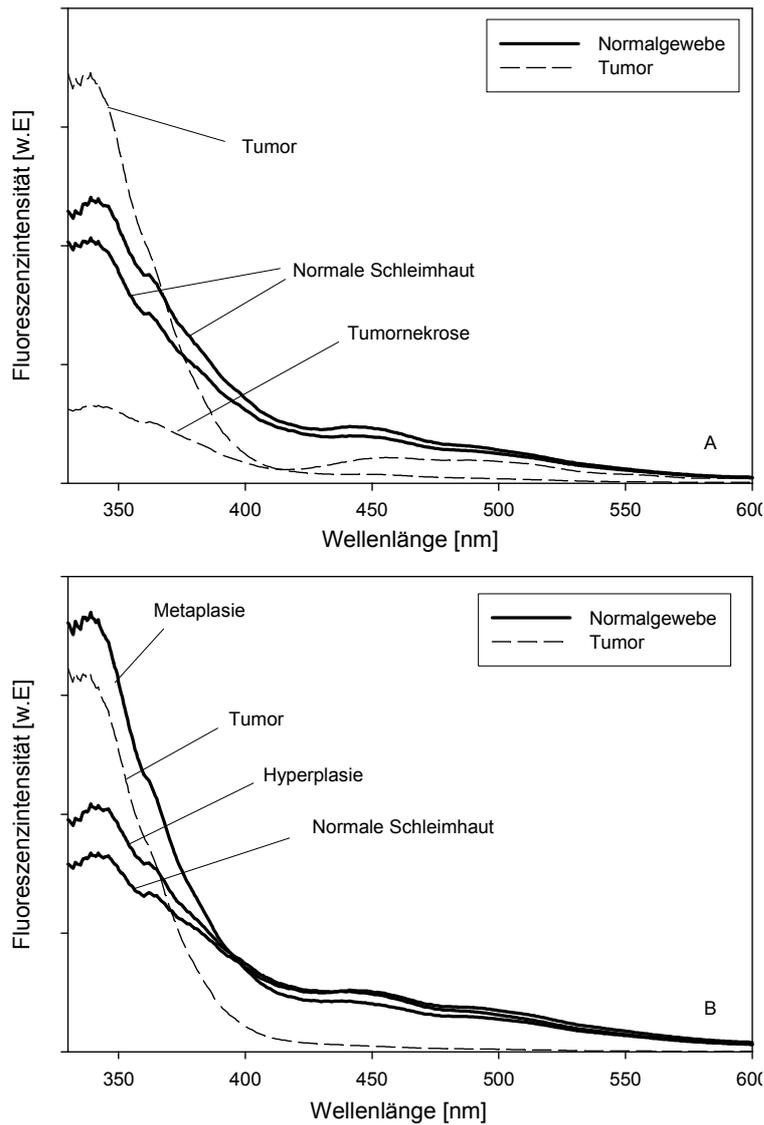


Abb. 29: Typische in-vivo-Autofluoreszenz-Emissionsspektren an verschiedenen Stellen zweier Patienten (A und B).

In Abb. 30 sind die auf das Maximum normierten Mittelwerte aller Tumor- und gutartigen Gewebeareale dargestellt. Ein Vergleich der Spektren aus gutartigen Gewebearealen zu solchen aus malignen Läsionen zeigt eine reduzierte Fluoreszenzintensität maligner Areale über den gesamten Spektralbereich ab $\lambda \sim 360$ nm bis $\lambda \sim 600$ nm. Über einen breiten Spektralbereich von $\lambda \sim 360$ nm bis $\lambda \sim 500$ nm besaßen gutartige Neoplasien eine erhöhte Fluoreszenzintensität gegenüber den Tumoren.

III Ergebnisse

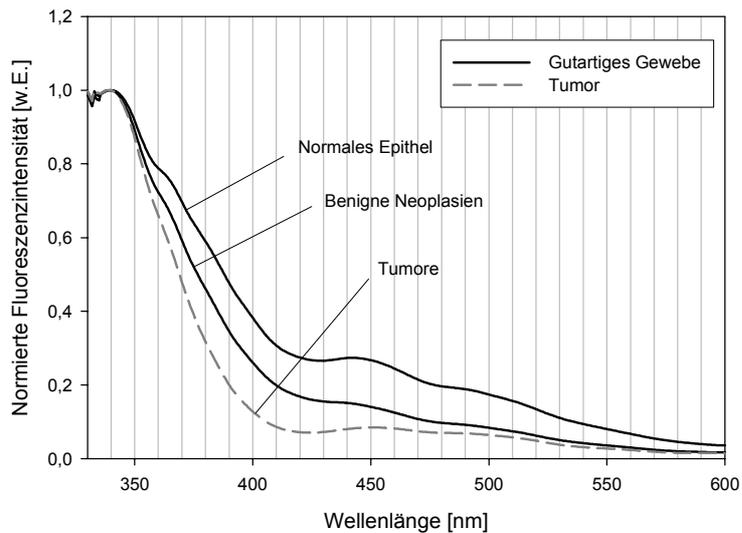


Abb. 30: Mittelwertspektren der verschiedenen histologischen Gruppierungen. Normales Epithel: n = 10. Benigne Neoplasien: n = 20. Tumore: n = 9. Alle Spektren wurden auf ihre Maximalintensität normiert.

Zur Berechnung der Kontrast-Ratio-Matrizen wurden die Spektren aus gutartigen Gewebearealen zusammengefasst. In Abb. 31 ist der Ratio-Kontrast der Tumore zu den gutartigen Gewebearealen in Form eines Höhenliniendiagramms dargestellt.

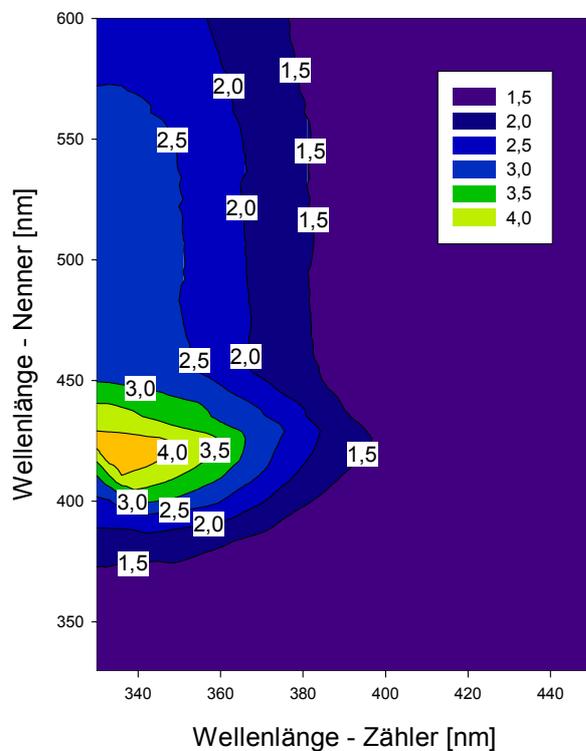


Abb. 31: Kontrast der Fluoreszenzintensitätsmatrizen aus Tumor zu Normalgewebe dargestellt im Höhenliniendiagramm. Die Linien verbinden Punkte gleichen Kontrastes.

Der maximale Kontrast zwischen malignen- und gutartigen Gewebearealen wird bei einem Ratio von $\lambda \sim 340$ nm zu $\lambda = 425$ nm mit $\sim 4,2$ erreicht. Ein hoher Kontrast von ~ 4 wurde in einem eng umschriebenen Bereich von ± 10 nm (Abszisse) * ± 5 nm (Ordinate) um das Maximum gemessen. Zur Auswertung wurde das Ratio $\lambda = 340 \pm 3$ nm zu $\lambda = 425 \pm 3$ nm gewählt und die dazugehörigen Werte aus malignen- und gutartigen Gewebearealen in Abb. 32 in einem Box-Plot gegenübergestellt.

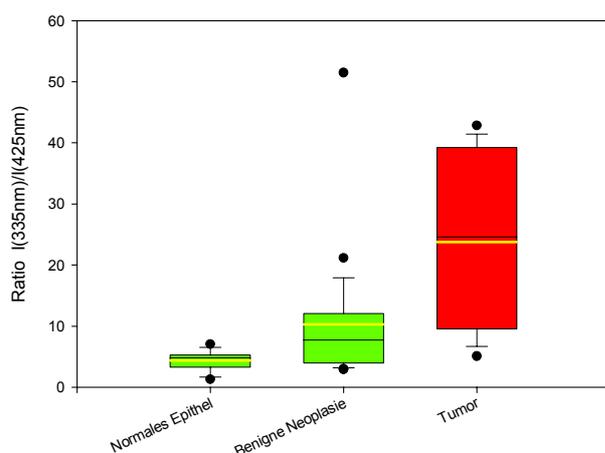


Abb. 32: Box-Plot-Diagramm des Ratios $I(\lambda = 340\text{nm}) / I(\lambda = 425\text{nm})$. Normales Epithel: $n=10$, benigne Neoplasie: $n=20$, Tumor: $n=9$. Im Box-Plot ist neben dem Median (durchgezogene schwarze Linie) der Mittelwert (durchgezogene gelbe Linie) angegeben.

Die Ratios der gutartigen Areale unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$) von der Gruppe der Tumore. Der Ratio-Wert aus einem nekrotischen Tumorareal lag innerhalb des 50% Perzentile-Bereichs der Ratios der benignen Neoplasien (Abb. 23).

Um eine Bewertung des Ratio Algorithmus in Bezug auf Sensitivität und Spezifität durchführen zu können, wurde der Schwellenwert variiert und in Abb. 33 gegen die Sensitivität bzw. Spezifität aufgetragen.

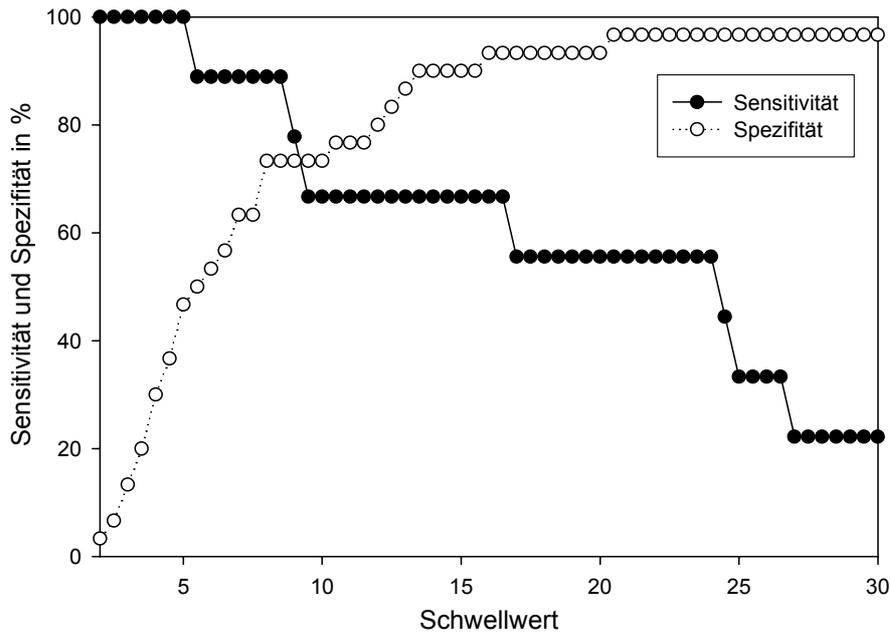


Abb. 33: Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit des Schwellenwertes.

Für einen Schwellwert von 5,5 bis 8,5 bleibt die Sensitivität auf gleichbleibendem Niveau von 89%. Gleichzeitig nimmt die Spezifität von 50% auf 74% zu. Es wurde nur eine Läsion, ein nekrotisches Tumorareal, falsch-negativ erfasst.

Bei 4 der 11 Patienten wurden sowohl Spektren aus malignen als auch benignen Gewebearealen aufgezeichnet. Bei diesen Patienten wurden die Ratio-Werte für malignes und benignes Gewebe patientenindividuell berechnet und im Balkendiagramm gegenübergestellt (Abb. 34). Bei einem der vier Patienten wurde ein hochgradig dysplastisches Areal neben einem hyperplastischen Areal gefunden. Dieses maligne Areal zeigt gegenüber dem benachbarten verdächtigen, allerdings gutartigen Areal (Mikropapillomatose) einen niedrigeren Ratio-Wert. Bei den restlichen drei Patienten konnten die Tumor-Areale mit Hilfe des Ratio-Algorithmus und einem Schwellenwert von 8,5 von den gutartigen Gewebearealen unterschieden werden.

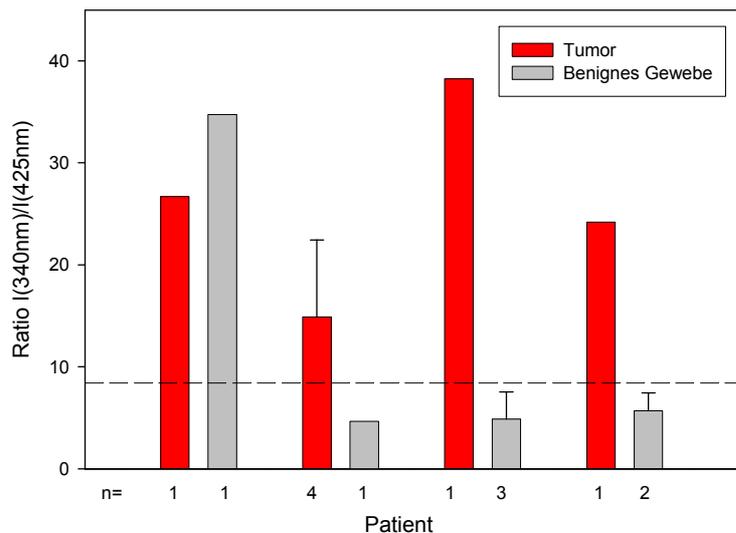


Abb. 34: Balkendiagramm der patientenindividuellen Ratio-Werte. Es werden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung angegeben. Auf der Abszisse ist die Anzahl n der gemessenen Areale angegeben. Der Schwellwert 8,5 ist gestrichelt eingezeichnet.

In Abb. 35 A sind die Mittelwertspektren der in die verschiedenen histologischen Gruppierungen (normales Gewebe, benigne Neoplasien, Tumore) unterteilten Spektren dargestellt. Die Spektren maligner zeigten gegenüber den Spektren gutartiger Areale (benigne Neoplasien und Normalgewebe) eine deutlich niedrige Fluoreszenzintensität über den gesamten Spektralbereich ab $\lambda \sim 380$ nm bis zum Ende der Aufzeichnung bei $\lambda \sim 600$ nm. In Abb. 35 B sind die Residuen zum Normalgewebe dargestellt. Daraus geht hervor, dass Tumore eine im Mittel erhöhte Fluoreszenzintensität bis $\lambda \sim 380$ nm besaßen. Die Gruppe der benignen Neoplasien zeigte eine ähnlich hohe UV-Fluoreszenzintensität wie die Tumore. Ab $\lambda \sim 380$ nm ist die Fluoreszenzintensität der malignen Areale dagegen reduziert gegenüber den normalen Gewebearealen.

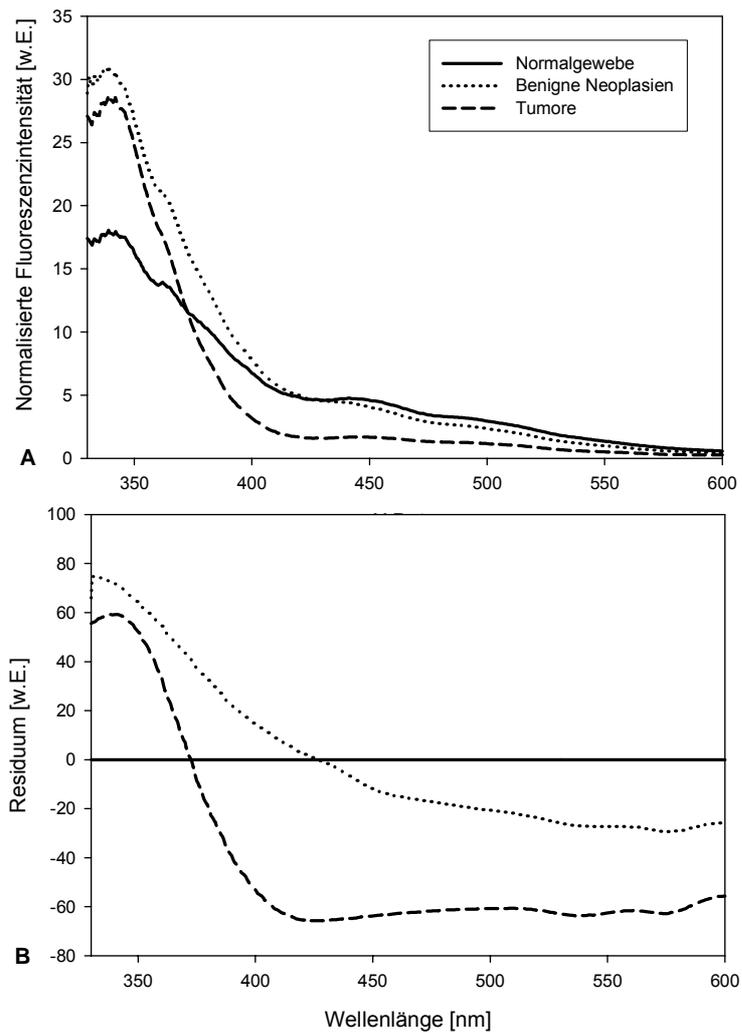


Abb. 35: Mittelwertspektren (A), Residuumspektren (B) in Prozent. Das Residuumspektrum berechnet sich aus der Differenz zwischen dem Mittelwertspektrum der benigne Neoplasien (und Tumore) und dem Normalgewebe und anschließender Division durch das Normalgewebespektrum. Die Spektren wurden alle auf den Fluoreszenzstandard normiert.

In Abb. 36 werden in Box-Plots die absoluten Intensitätswerte bei $\lambda = 335$ nm (A) und $\lambda = 425$ nm (B) gegen die histologischen Gruppierungen (Normalgewebe, benigne und maligne Neoplasien) aufgetragen.

III Ergebnisse

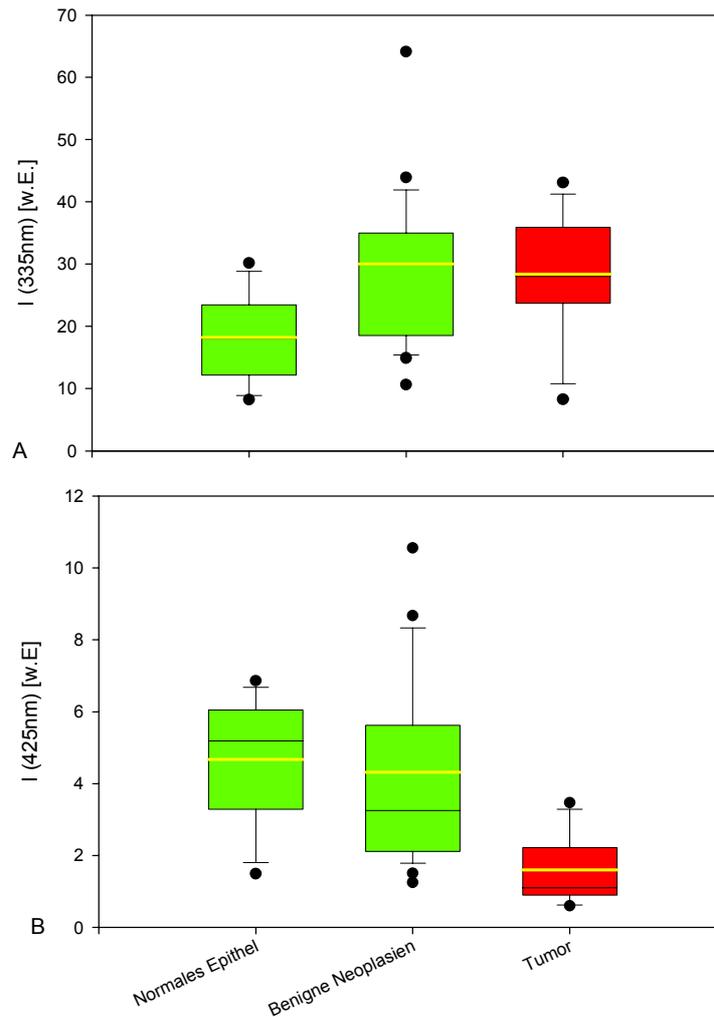


Abb. 36: Box-Plot-Darstellung der absoluten Intensitätswerte bei A: $I(\lambda = 335 \text{ nm})$ und B: $I(\lambda = 425 \text{ nm})$. Im Box-Plot ist neben dem Median (durchgezogene schwarze Linie) der Mittelwert (durchgezogene gelbe Linie) angegeben.

Zur Auswertung der verschiedenen Verfahren (absolute Intensitätswerte und Ratio-Bildung) wurde die statistische Signifikanz zur Unterscheidbarkeit zwischen malignen und gutartigen Gewebearealen berechnet (Tab. 10).

Gegenüberstellung	I (337 nm)	I (450 nm)	Ratio
T zu N	0,658	0,0001	0,001

Tab. 10: Statistische Signifikanz p zur Unterscheidbarkeit zwischen malignen und gutartigen Gewebearealen (Normalgewebe und benigne Neoplasien).

Tumore konnten durch die absoluten Intensitätswerte bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ hochsignifikant ($p < 0,0001$) von gutartigen Gewebearealen unterschieden werden. Der absolute Intensi-

tätswert bei $\lambda = 335$ nm lieferte keine signifikante Diskriminierungsmöglichkeit. Insbesondere zeigte ein Vergleich zwischen benignen und malignen neoplastischen Arealen eine in etwa gleich große Schwankungsbreite (50% Perzentile, Abb. 36).

1.3 Gynäkologie – Zervikale intraepitheliale Neoplasie

Von 48 untersuchten Arealen wurden insgesamt 13 Spektren aus histopathologisch nachgewiesenen dysplastischen Arealen (CIN I bis III) und 35 aus gutartigen Gewebearealen innerhalb und außerhalb der Transformationszone aufgezeichnet. Abb. 37 zeigt die Autofluoreszenz der Portio uteri einer Patientin mit einem CIN III Befund. Die Autofluoreszenz äußert sich als ein kontinuierlich mit zunehmender Wellenlänge in der Intensität abnehmendes Spektrum mit einem Maximum bei $\lambda = 340$ nm. Innerhalb der Transformationszone wurden an zwei Stellen Biopsien entnommen, die sich histopathologisch als CIN III erwiesen. Außerhalb der Transformationszone stellt sich das Gewebe kolposkopisch unauffällig dar und wurde vom Operateur als normal gewertet. Die Autofluoreszenz der CIN III liegt in ihrer Intensität unterhalb der Autofluoreszenz der histologisch negativen Areale.

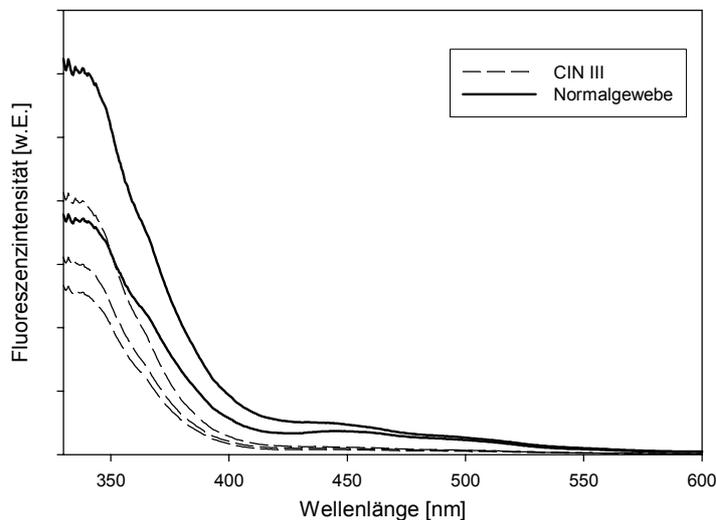


Abb. 37: Typisches *in-vivo*-Autofluoreszenz-Emissionsspektren einer Patientin mit einer ausgedehnten CIN III, die sich über die gesamte Transformationszone erstreckt.

In Abb. 30 sind die auf das Maximum normierten, gemittelten Spektren zervikaler Neoplasien (CIN I bis III) und die des normalen Gewebes innerhalb und außerhalb der Transformations-

zone abgebildet. Es zeigten sich keine größeren Unterschiede zwischen den dargestellten Mittelwertspektren.

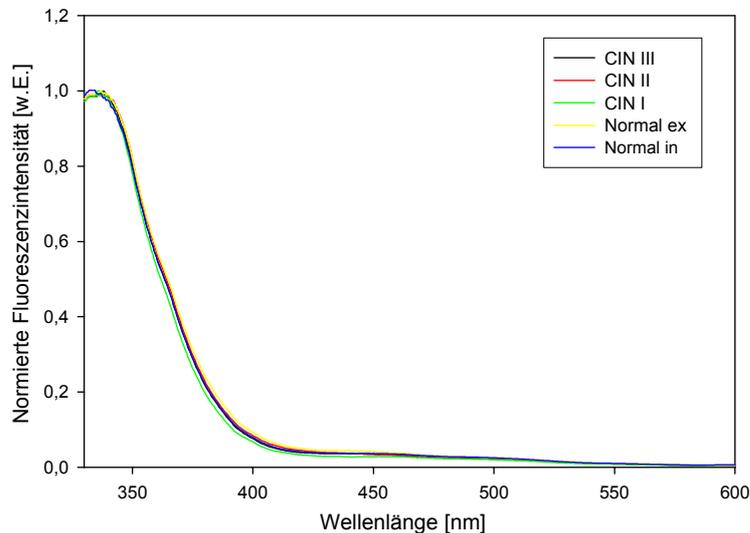


Abb. 38: Mittelwertspektren aus malignen Arealen (CIN I bis III) und normalen Arealen außerhalb (Normal ex) und innerhalb (Normal in) der Transformationszone. Alle Spektren wurden auf ihre Maximalintensität normiert.

Entsprechend der geringen Unterschiede der Mittelwertspektren in Abb. 38 ergeben sich nur geringe Kontrast zwischen dysplastischen (CIN I-III) und normalen Epithel (innerhalb und außerhalb der Transformationszone). In Abb. 39 ist das entsprechende Höhenliniendiagramm dargestellt.

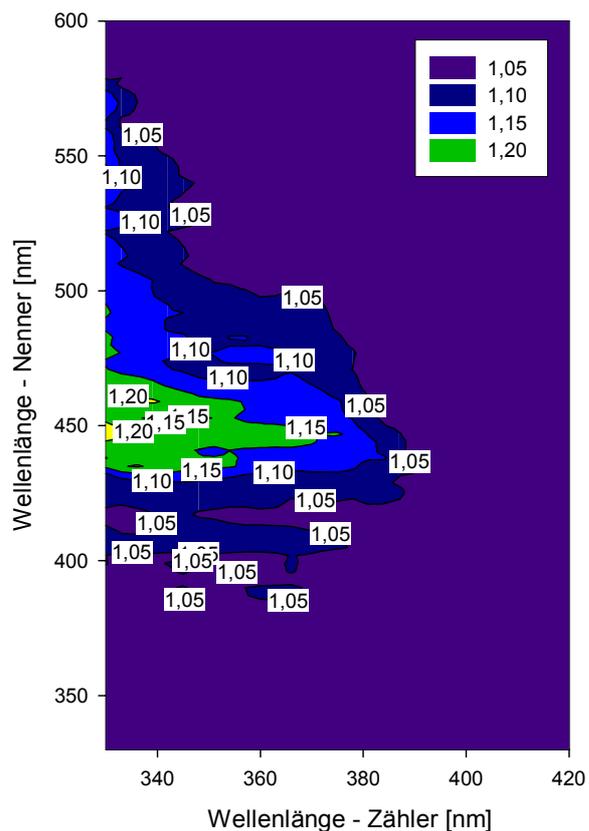


Abb. 39: Kontrast der Fluoreszenzintensitätsmatrizen aus zervikalen Neoplasien (CIN I bis III) zu Normalgewebe (innerhalb und außerhalb der Transformationszone) dargestellt im Höhenliniendiagramm. Die Linien verbinden Punkte gleiches Kontrastes. (A) Haupthöhenlinien (Durchgezogen) Unterschied 0,05.

Der maximale Kontrast zwischen zervikalen Neoplasien und Normalgewebearealen wird bei einem Fluoreszenzverhältnis von $\lambda = 333 \text{ nm}$ zu $\lambda = 450 \text{ nm}$ mit $\sim 1,2$ erreicht. Abb. 40 gibt das Ratio $I(\lambda = 333 \text{ nm})/I(\lambda = 450 \text{ nm})$ der Areale, in denen Spektren aufgezeichnet wurden, geordnet nach Histologie (CIN I bis III, Normal, innerhalb und außerhalb der Transformationszone) wieder.

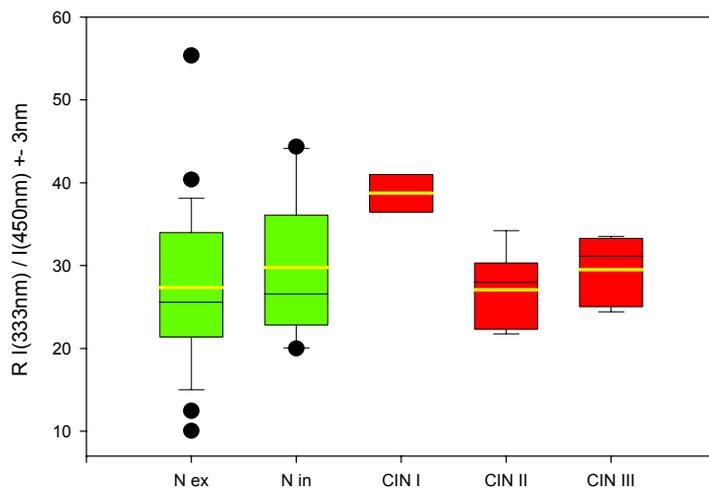


Abb. 40: Box-Plot-Diagramm des Ratios $I(\lambda = 333 \text{ nm})/I(\lambda = 440 \text{ nm})$. Normalgewebe außerhalb der Transformationszone: $n = 23$. Normalgewebe innerhalb der Transformationszone: $n = 12$. CIN I: $n = 3$. CIN II: $n = 5$. Cin III: $n = 5$. Im Box-Plot ist neben dem Median (durchgezogene schwarze Linie) der Mittelwert (durchgezogene gelbe Linie) angegeben.

Zwischen dem normalen Gewebe innerhalb bzw. außerhalb der Transformationszone und den dysplastischen Transformationen (CIN I bis III) ergab sich keine signifikante Diskriminierung ($p > 0,05$).

1.4 HNO – Malignom der Mundhöhle

Von sieben Patienten wurden insgesamt 41 Spektren aufgezeichnet. Es wurden 27 normale, 4 entzündete (aus Leukoplakien) und 9 maligne Areale mit nachgewiesenen Plattenepithelkarzinomen ($n = 7$) oder Carcinoma in situ ($n = 2$) untersucht.

In Abb. 41 sind typische Fluoreszenzspektren mit Anregung bei $\lambda = 308 \text{ nm}$ von einem Patienten mit einer Carcinoma in situ Läsion am Gaumenbogen dargestellt. Besonders im sichtbaren Spektralbereich ab $\lambda \sim 400 \text{ nm}$ war die Fluoreszenzintensität der malignen Läsion niedriger als die des umliegenden Normalgewebes. Im UVA-Spektralbereich zeichnete sich hier keine erhöhte Autofluoreszenzintensität ab.

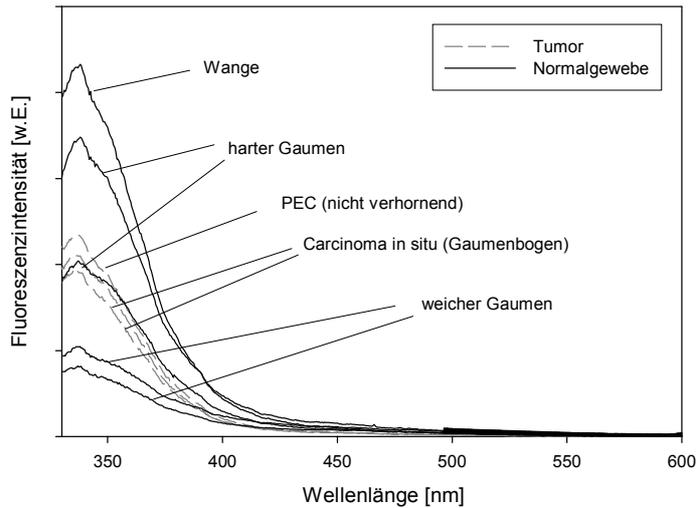


Abb. 41: Typische in-vivo-Autofluoreszenz-Emissionsspektren eines Patienten mit einer ausgedehnten CIS Läsion am Gaumenbogen.

In Abb. 42 sind die auf das Maximum normierten Mittelwerte der normalen Schleimhaut (n = 27), der Entzündungen (n = 4) und der Tumore (n = 9) abgebildet. Die Spektren aus Entzündungen zeigen einen ähnlichen Verlauf in der Fluoreszenzintensität wie diejenigen von Tumoren. Der Mittelwert aus dem Normalgewebe ist sowohl gegenüber den tumorösen Arealen als auch gegenüber den Entzündungen leicht erhöht.

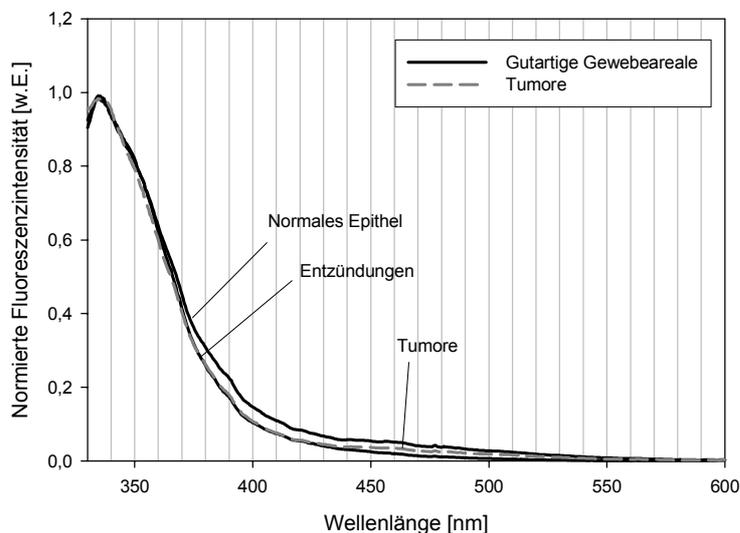


Abb. 42: Mittelwertspektren aus malignen Arealen und gutartigen Gewebearealen (Entzündungen und normale Schleimhaut). Alle Spektren wurden auf ihre Maximalintensität normiert.

Zur Berechnung der Kontrast-Ratio-Matrizen wurden die Spektren aus normalen Gewebearealen und Entzündungen zusammengefasst. In Abb. 43 ist der Ratio-Kontrast der Tumore zu den gutartigen Gewebearealen in Form von Höhenliniendiagrammen dargestellt.

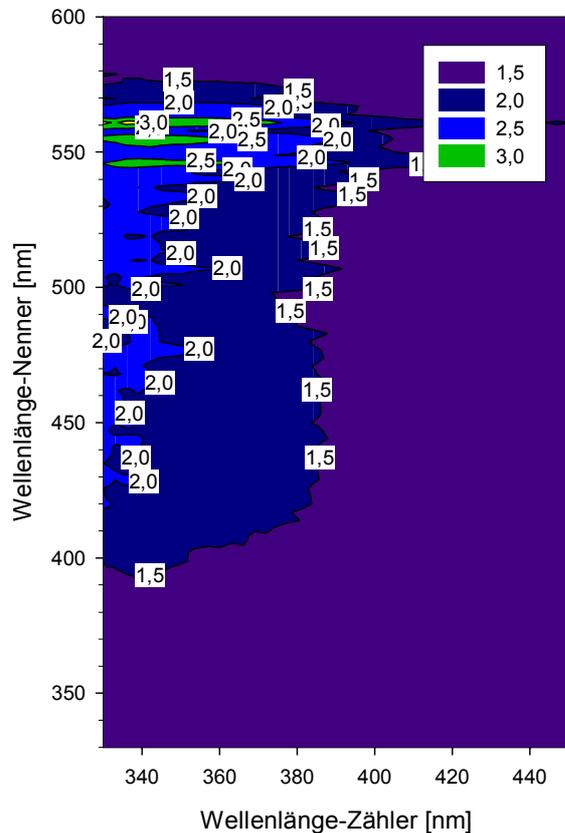


Abb. 43: Kontrast der Fluoreszenzintensitätsmatrizen aus Tumor zu gutartigem Gewebe, dargestellt im Höhenliniendiagramm. Die Linien verbinden Punkte gleichen Kontrastes. (A) Haupthöhenlinien (Durchgezogen) Unterschied 0,5.

Der maximale Kontrast zwischen malignen und gutartigen Gewebearealen wird in einem eng umschriebenen Bereich bei einem Fluoreszenzverhältnis von $\lambda \sim 340$ nm zu $\lambda \sim 560$ nm mit $\sim 3,5$ erreicht. Zur Auswertung wurde das Ratio $\lambda = 340 \pm 3$ nm zu $\lambda = 560 \pm 3$ nm gewählt und die dazugehörigen Werte aus Tumor- und gutartigen Gewebearealen in Abb. 44 in einem Box-Plot gegenübergestellt.

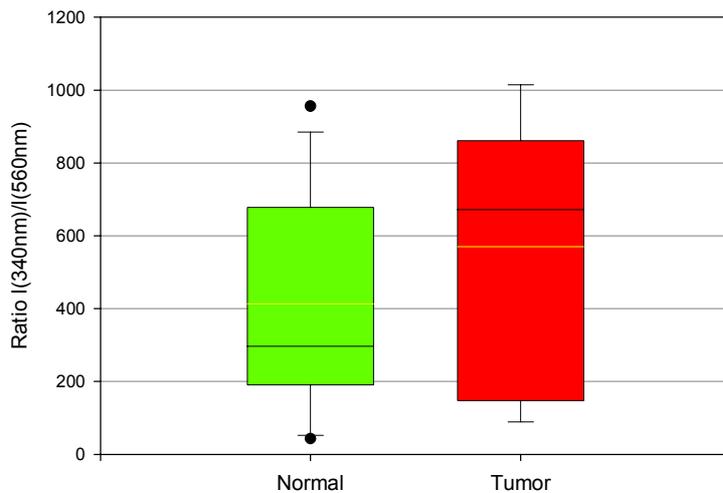


Abb. 44: Box-Plot-Diagramm des Ratios $I(\lambda = 340 \text{ nm})/I(\lambda = 560 \text{ nm})$. Gutartiges Gewebe: 31 Arealen, Tumor: 9 Areale. Im Box-Plot ist neben dem Median (durchgezogene schwarze Linie) der Mittelwert (durchgezogene gelbe Linie) angegeben.

Im Mittel und im Median konnten erhöhte Ratio-Werte des malignen Gewebes gemessen werden. Allerdings konnte keine signifikante Diskriminierung erzielt werden ($p > 0,05$).

1.5 Neurochirurgie - Gliom

Von 82 untersuchten Arealen wurden insgesamt 50 Spektren aus histopathologisch nachgewiesenen malignen Arealen und 32 aus gutartigen Arealen aufgezeichnet. 60% (bzw. 19 Proben) des Normalgewebes stammten aus dem Ödem des Tumorrandbereichs. Die histopathologische Aufteilung der Befunde ist in Tab. 11 dargestellt.

Kategorie	# der Biopsien	# der Patienten
Normal	32	11*
Diffus infiltrierender Tumor – WHO Grad II	22	} 8
Solider Tumor – WHO Grad II	14	
Tumore - WHO Grad III – IV	14	4

* von Patienten mit niedermalignen Astrozytom, anaplastischem Astrozytom und Glioblastom

Tab. 11: Histopathologische Aufteilung der 82 untersuchten Biopsien.

Von den 12 untersuchten Patienten hatten 8 niedermaligne Tumore, von denen jedoch zwei auch anaplastische Anteile (WHO Grad III) aufwiesen. Zudem wurden zwei weitere Patienten mit ausschließlich hochmalignem Gliomgewebe (WHO Grad IV) untersucht.

Abb. 45 zeigt die typischen Autofluoreszenzspektren von verschiedenen Biopsien eines Patienten mit einem Astrozytom WHO Grad II. Die Autofluoreszenz äußert sich als ein kontinuierlich mit zunehmender Wellenlänge in der Intensität abnehmendem Spektrum mit einem Maximum bei $\lambda = 340$ nm. Die Spektren aus malignen Biopsien zeigten typischerweise eine erhöhte UV-Fluoreszenzintensität gegenüber Spektren aus den Normal-Gewebe-Arealen. Im sichtbaren Spektralbereich war die Fluoreszenzintensität maligner Areale dagegen niedriger als die normalen Gewebes.

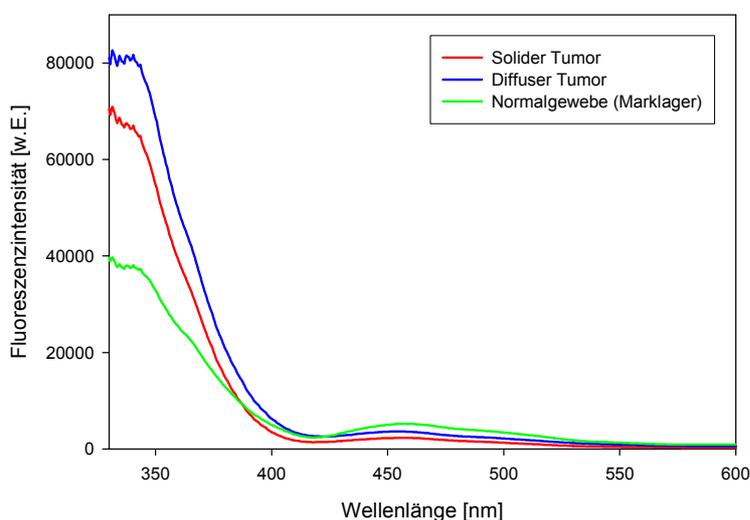


Abb. 45: Typische in-vivo-Autofluoreszenz-Emissionsspektren eines Patienten mit einem Astrozytom WHO Grad II. Nur drei der 11 aufgezeichneten Spektren dieses Patienten sind abgebildet.

Dies äußert sich auch in den normierten Mittelwertspektren der einzelnen Kategorien (Abb. 46). Die Spektren zeigten im Bereich der Blutabsorption bei $\lambda = 420$ nm eine reduzierte Fluoreszenzintensität gegenüber den normierten Mittelwertspektren des Normalgewebes. Bei den hochmalignen Arealen (WHO Grad III und IV) ließ sich ab $\lambda \sim 520$ nm kein Unterschied zum normalen Gewebe aus den Mittelwertspektren ableiten.

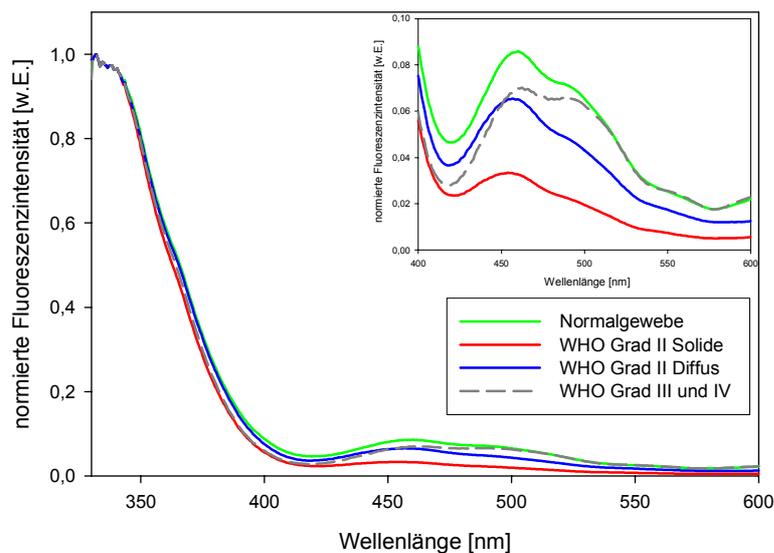


Abb. 46: Mittelwertspektren der einzelnen histologischen Kategorien: Normalgewebe (grüne Linie); diffusen Tumor-Bereich (WHO Grad II; blaue Linie); solider Tumor (WHO Grad II; rote Linie); hochmaligne Areale (WHO Grad III und IV; grau gestrichelt). Der Wellenlängenbereich zwischen $\lambda = 400$ nm und $\lambda = 600$ nm ist oben rechts im Bild vergrößert dargestellt.

Da sich diese Untersuchung in erster Linie auf die Abgrenzbarkeit niedermaligner Tumore WHO Grad II konzentrierte und sich die hochmalignen Tumore WHO Grad III/IV in den Spektren im langwelligen Spektralbereich ($\lambda > \sim 500$ nm) nicht vom normalen Gewebe unterscheiden, beschränkt sich die weitere Auswertung auf niedermaligne Tumore (WHO Grad II). Zu den histologischen Kategorien Tumor WHO Grad II und Normalgewebe wurden die Intensitätsmatrizen bestehend aus den Median-Ratio-Werten korrespondierender Wellenlängen berechnet und der Kontrast (Tumor zu Normal) ermittelt. Das dazugehörige Höhenliniendiagramm ist in Abb. 47 dargestellt

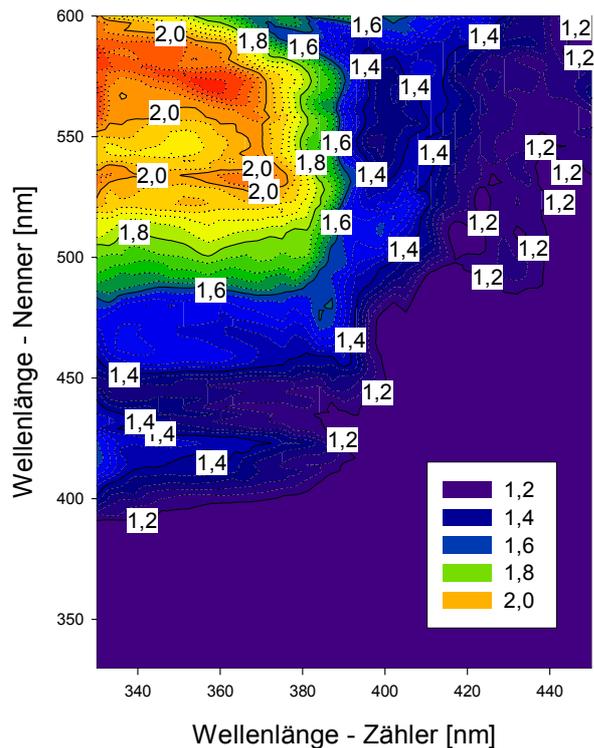


Abb. 47: Kontrast der Median-Ratio-Werte aus Tumor (WHO Grad II) zu Normalgewebe, dargestellt im Höhenliniendiagramm. Die Linien verbinden Punkte gleichen Kontrastes. Haupthöhenlinien (Durchgezogen) Unterschied 0,2. Nebenhöhenlinien (punktierte Haarlinie) Unterschied 0,05.

Der maximale Kontrast zwischen Tumor (WHO Grad II) und Normalgewebe wurde bei einem Ratio zwischen $\lambda = 360$ nm und $\lambda = 575$ nm mit $\sim 2,2$ bestimmt. Die Höhenlinie 2 wird in einem Bereich zwischen $\lambda = 330$ nm bis $\lambda = 370$ nm für den Zähler und $\lambda = 510$ nm und $\lambda = 590$ nm für den Nenner überschritten. Im Bereich der Soret-Bande des Hämoglobins bei $\lambda = 420$ nm für den Nenner wurde ein Nebenmaximum (Ratio-Kontrast $\sim 1,4$) ermittelt. Zur Auswertung wurde das Ratio $\lambda = 360 \pm 5$ nm zu $\lambda = 575 \pm 3$ nm gewählt.

Zu den histologischen Kategorien wurden die Ratio-Werte berechnet und in einem Box-Plot gegenübergestellt (Abb. 48). Die Tumore WHO Grad III/IV wurden zur Übersicht mit in diese Darstellung aufgenommen.

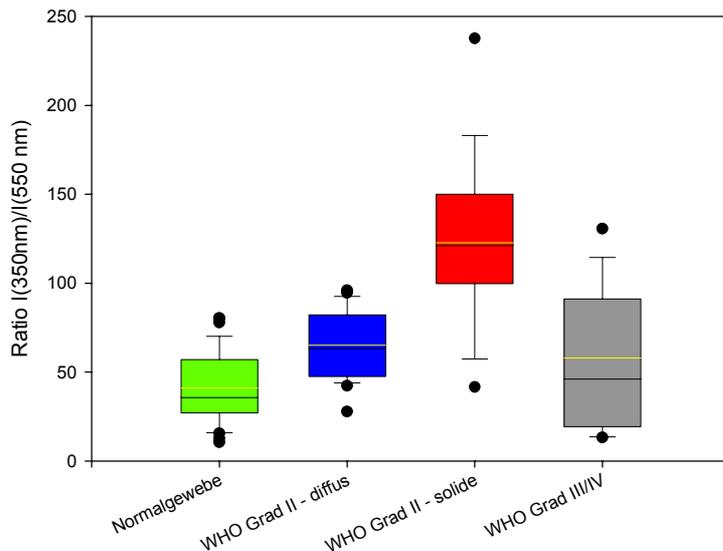


Abb. 48: Box-Plot-Diagramm des Ratios $I(\lambda = 350 \text{ nm})/I(\lambda = 550 \text{ nm})$. Im Box-Plot ist neben dem Median (durchgezogene schwarze Linie) der Mittelwert (durchgezogene gelbe Linie) angegeben.

Die Ratio-Werte der malignen soliden Areale WHO Grad II unterschieden sich signifikant ($p=0,007$) von den gutartigen Gewebearealen. Auch diffuse Bereiche des Tumors WHO Grad II konnten signifikant ($p=0,013$) von normalem Gewebe unterschieden werden. Diffuse und solide Bereiche (WHO Grad II) zusammen konnten jedoch nicht signifikant ($p=0,731$) von normalem Gewebe unterschieden werden. Befunde höherer Malignität (Astrozytome WHO Grad III und IV) konnten durch diesen Algorithmus nicht signifikant ($p=0,242$) von normalem Gewebe unterschieden werden. Da für die hochmalignen Areale mit diesem Algorithmus keine signifikante Diskriminierung möglich erscheint, wurde eine Bewertung des Ratio-Algorithmus in Bezug auf Sensitivität und Spezifität nur für niedermaligne Tumore gegenüber dem normalen Geweben durchgeführt (siehe Abb. 49).

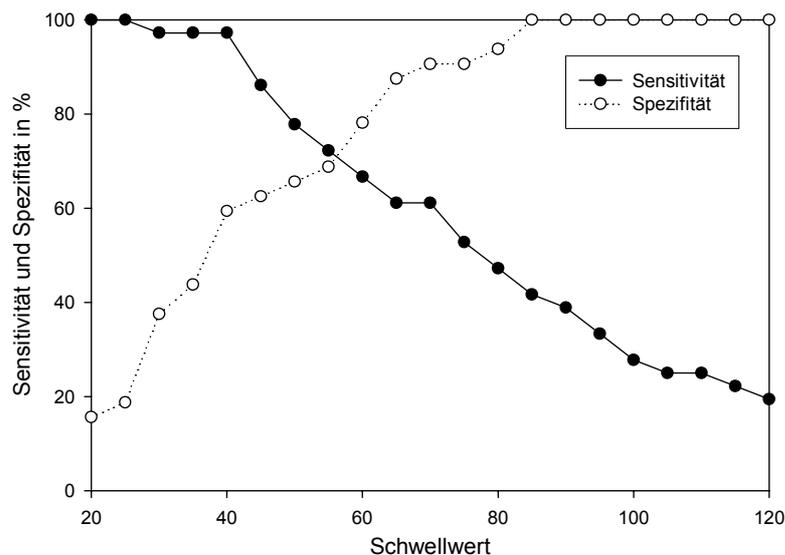


Abb. 49: Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit des Schwellenwertes.

Besonders in der Neurochirurgie bei der Resektion von Tumoren muss gewährleistet sein, dass durch ein diagnostisches Verfahren kein normales Gewebe entfernt werden kann (siehe Kapitel I.9). Aus diesem Grund wurde der Schwellenwert so gelegt, dass sich 100% Spezifität ergibt. Für einen Schwellenwert von 85 errechnete sich für die Gesamtheit (diffuse und solide Tumore WHO Grad II) eine Sensitivität von 42% (bei 100% Spezifität). Mit diesem Schwellenwert konnten 11 der 14 soliden Tumorbiopsien (79%) erfasst werden.

Bei 6 der 8 Patienten mit niedermalignen Tumorarealen konnte über den malignen Bereich hinaus angrenzendes normales Gewebe untersucht werden. Bei diesen Patienten wurden die Ratio-Werte für malignes (solides und diffuses) und Normalgewebe patientenindividuell in einem Balkendiagramm aufgetragen (Abb. 50).

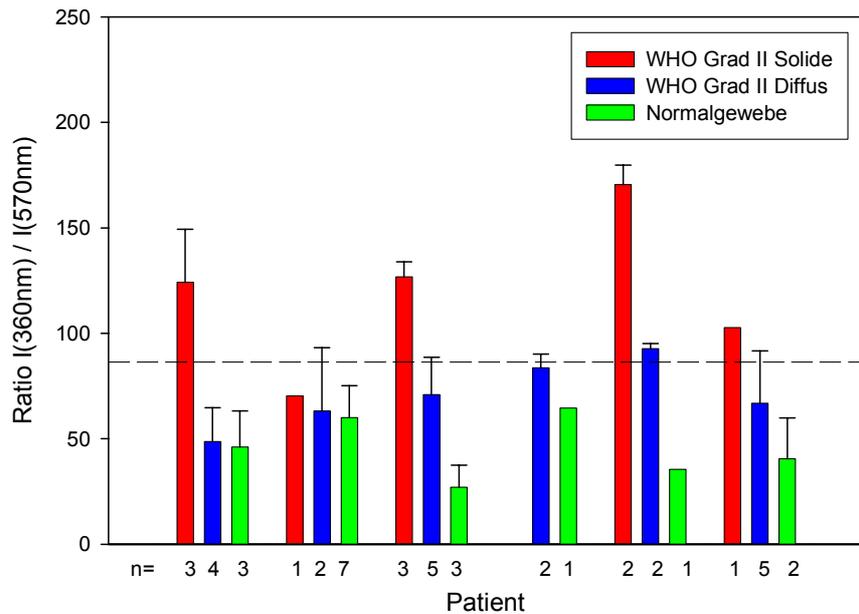


Abb. 50: Balkendiagramm der patientenindividuellen Ratio-Werte. Es werden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung angegeben. Auf der Abszisse ist die Anzahl n der in der gemessenen Biopsie angegeben. Der Schwellwert 85 ist gestrichelt eingezeichnet.

Patientenindividuell wird im Mittel ein erhöhter Tumor-Ratio-Wert gegenüber dem Normalgewebe-Ratio-Wert errechnet. Aus dem Balkendiagramm ist ersichtlich, dass im wesentlichen solide Tumorbereiche oberhalb des Schwellwertes von 85 liegen.

Fluoreszenznachweis mikroskopisch

2.1 Urologie

Im Fachbereich der Urologie wurden Gefrierschnitte von 5 Gewebeproben aus der Harnblase angefertigt und jeweils mikroskopische Fluoreszenzbilder in den verschiedenen Wellenlängenbereichen (Filter F1 bis F3) aufgezeichnet (siehe Kapitel II.2). Von den 5 Gewebeproben stammten zwei aus Tumorealen (pTaG1) und drei aus normaler unauffälliger Schleimhaut. Zudem wurden aus dem jeweiligen Parallelschnitt Spektren aus Stroma und Normalgewebe aufgezeichnet. Neben diesen Gewebeproben wurden bei vier weiteren Gefrierschnitten Spektren aus Urothel und Stroma aufgezeichnet.

Abb. 51 zeigt exemplarisch das Fluoreszenzbild eines hochdifferenzierten Blasen Tumors (pTaG1) in den verschiedenen Filterbereichen F1 bis F3 und den Anregungswellenlängen $\lambda = 308 \text{ nm}$ (Bilder A bis C, Filter F1 bis F3) und blau-violettes Licht (Bild D, Filter F3). Im ultravioletten Spektralbereich zeigte sich eine gleichmäßige Intensitätsverteilung über das Epithel und Stroma. In der obersten Deckzellschicht wurde an verschiedenen Stellen eine etwas erhöhte UV-Fluoreszenzintensität gegenüber der Fluoreszenzintensität des Stromas er-

kennbar. Im blauen bzw. grünen Spektralbereich wurde eine erhöhte Autofluoreszenz des bindegeweblichen Stroma gegenüber dem Epithel gemessen. Der Kontrast zwischen Urothel und Stroma war im Falle des „blauen“ Fluoreszenzbildes (Abb. 51, B) höher als im Falle des „grünen“ (Abb. 51, C).

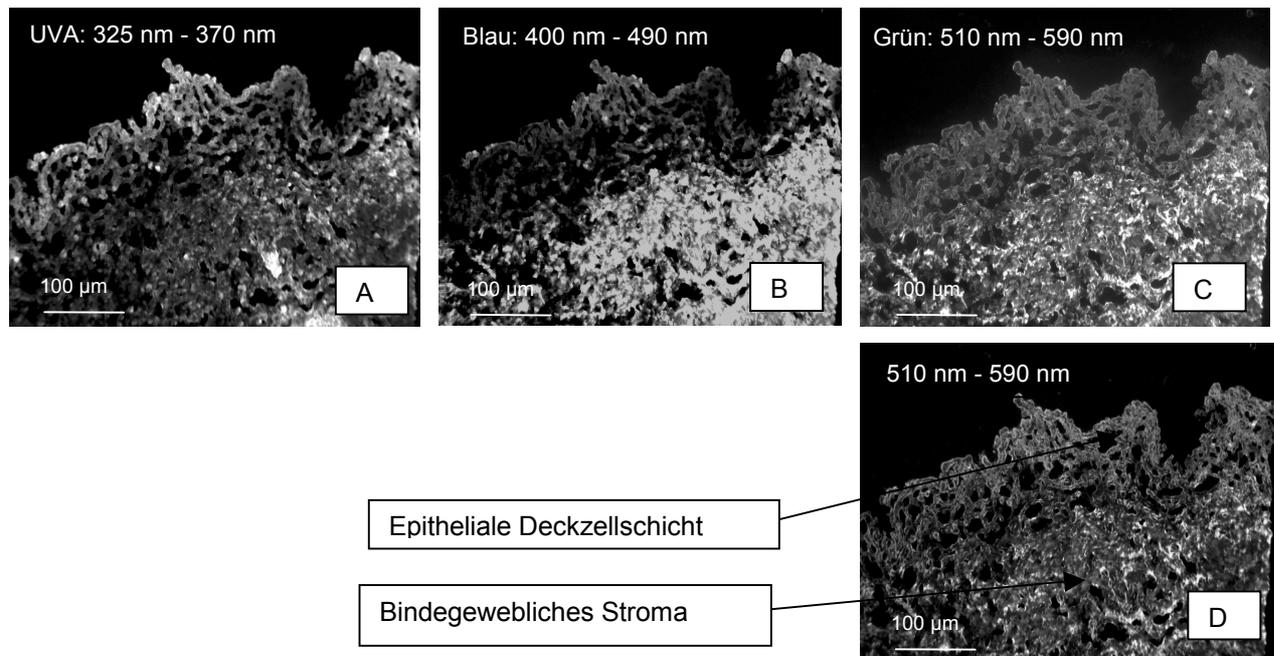


Abb. 51: Repräsentatives Fluoreszenzbild eines Blasentumors (pTaG1) in den Wellenlängenbereichen F1 bis F3. Die Bilder A bis C wurden mit $\lambda = 308$ nm Anregung angefertigt. Bild D wurde mit Anregung durch blau-violettes Licht angefertigt (Detektion: Filter F3).

In Abb. 52 sind die Intensitätswerte (innerhalb der „regions of interest“ - ROI) aus den Fluoreszenzbildern aus Urothel und Stroma bei Anregung mit dem UV-Licht ($\lambda = 308$ nm) und blau-violettem Licht zusammengefasst. Die ROI-Intensitätswerte wurden aus fünf Gefrierschnitten (3 Normal-Gefrierschnitte, 2 Tumor-Gefrierschnitte pTaG1) ermittelt.

III Ergebnisse

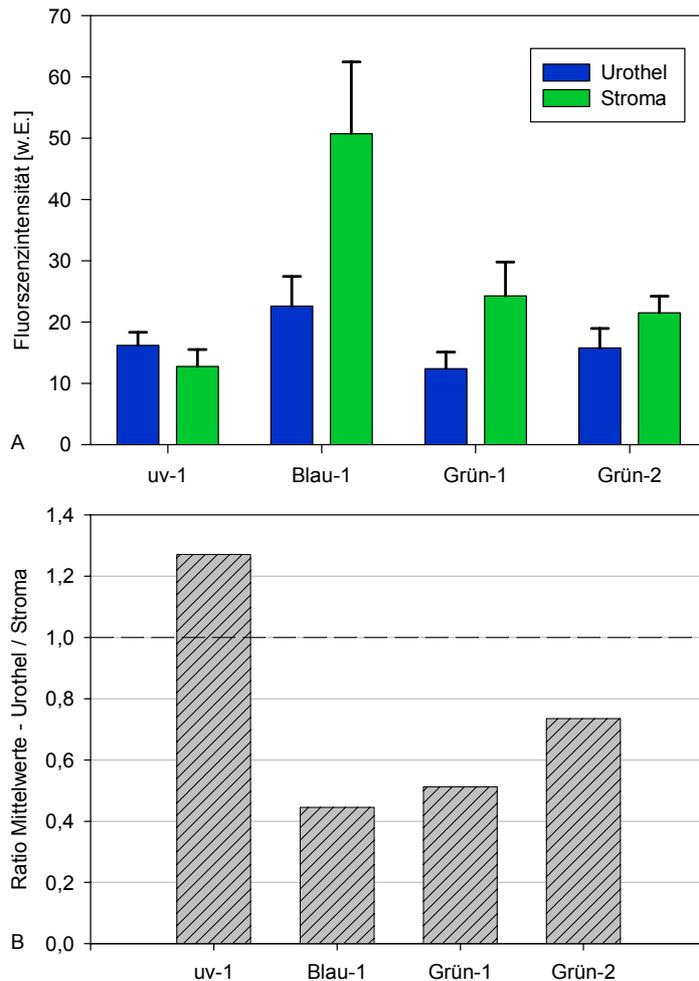


Abb. 52: A: Balkendiagramm der Intensitätswerte aus den ROI-Arealen der Fluoreszenz-Bilder. Mittelwerte und Standardabweichung von fünf Bildern. B: Verhältnis der ROI-Mittelwerte (aus A) aus Urothel zu Stroma. Erste drei Gruppen UV, Blau und Grün-1: $\lambda = 308$ nm Anregung. Letzte Gruppe Grün-2: Anregung Blau-Violett-Licht.

Im UVA-Spektralbereich wurden im Mittel um ca. 30% erhöhte Intensitätswerte des Urothels gegenüber dem Stroma gemessen. Im blauen und grünen Spektralbereich (UV- und Blau-Violett-Licht-Anregung) lassen sich im Mittel um 30% bis 55% reduzierte Intensitätswerte des Stromas gegenüber dem Urothel ableiten. Im blauen Spektralbereich (unter Anregung mit $\lambda = 308$ nm) wurde ein größerer Kontrast zwischen Urothel und Stroma im Vergleich zum Grünen (Anr. $\lambda = 308$ nm und Blau-Violett-Licht) gemessen (siehe Abb. 52).

Aus den Fluoreszenzbildern wurden die ROI-Intensitätswerte aus Tumor- (2 Gefrierschnitte) und Normalurothel (3 Gefrierschnitte) getrennt ermittelt und in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 53).

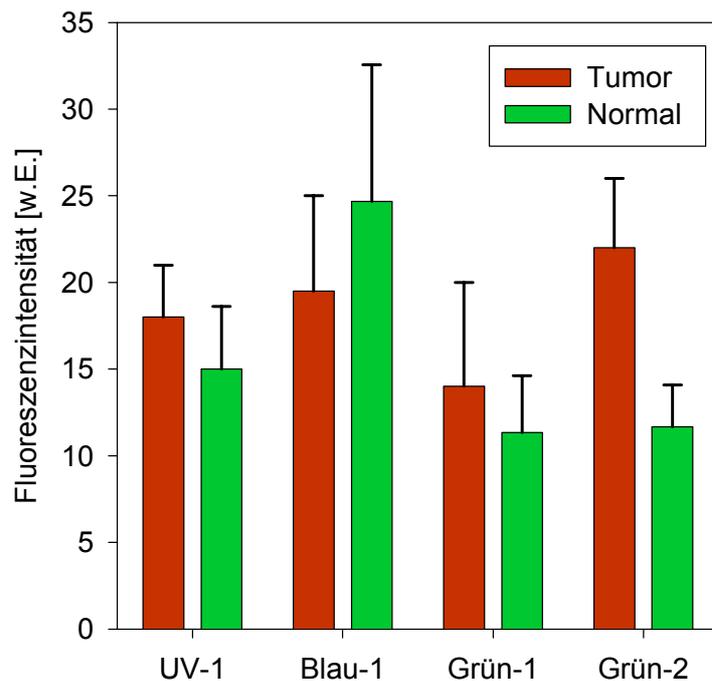


Abb. 53: Balkendiagramm der Intensitätswerte aus ROI-Bereichen des Urothels der Fluoreszenz-Bilder. Mittelwerte und Standardabweichung von 2 Tumor-ROI-Bereichen und 3 Normal-ROI-Bereichen der mikroskopischen Fluoreszenzbilder. Erste drei Gruppen UV, Blau und Grün-1: $\lambda = 308$ nm Anregung. Letzte Gruppe Grün-2: Anregung Blau-Violett-Licht.

Für die Anregungswellenlänge $\lambda = 308$ nm ergaben sich in keinem der Spektralbereiche signifikante Unterschiede zwischen normalem und malignem Urothel. In Abb. 54 sind die Spektren aus 9 Gefrierschnitten (5 Normal-Gefrierschnitte, 4 Tumor-Gefrierschnitte pTaG1) zusammengefasst. Dabei wurden sowohl die Spektren mit $\lambda = 308$ nm Anregung als auch diejenigen mit blau-violettem Anregungslicht an exakt den gleichen Stellen abgegriffen. In der oberen Hälfte (Abb. 54, Bild A bzw. B) werden die Spektren aus Urothel bzw. Stroma für die verschiedenen Anregungswellenlängen miteinander verglichen, und in der unteren Hälfte sind die korrespondierenden Kontrast-Ratios zwischen Urothel und Stroma dargestellt. Im Urothel bzw. Stroma wurden die Spektren in der äußersten Deckzellschicht bzw. innerhalb des bindegeweblichen Fasernetzes abgegriffen.

III Ergebnisse

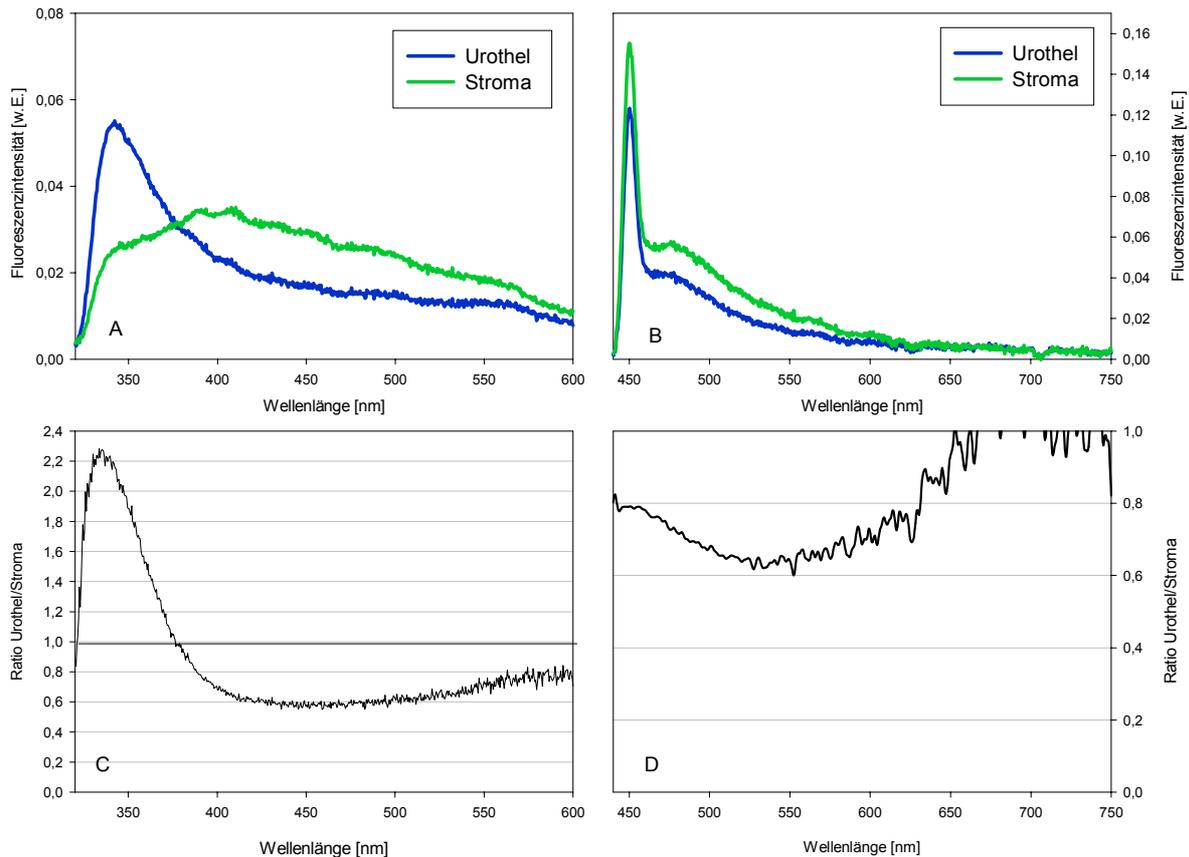


Abb. 54: Mittelwertspektren aus A (Anregung $\lambda = 308$ nm) bzw. B (Anregung Blau-Violett-Licht), Epithel (blau) bzw. Stroma (grün). Ratio aus Urothel zu Stroma C (Anr. $\lambda = 308$ nm) bzw. D: (Anr. Blau-Violett-Licht). Die Spektren wurden aus 9 Gefrierschnitten (5 Normal und 4 Tumor) aufgezeichnet.

Die Fluoreszenzintensität im UVA-Bereich ($\lambda = 320-400$ nm) des Urothels ist in etwa doppelt so hoch wie die Fluoreszenzintensität des Stromas (Abb. 54, A). Das Maximum des Kontrastes zwischen Urothel und Stroma im ultravioletten Spektralbereich wurde bei $\lambda \sim 335$ nm mit ca. 2,2 gemessen (Abb. 54, B). Im sichtbaren Spektralbereich wurde eine erhöhte Fluoreszenz des Stromas gegenüber dem Urothel gemessen, wobei der größte Kontrast im Bereich um $\lambda = 450$ nm (0,6) gemessen wurde.

Der maximale Unterschied zwischen stromaler und urothelialer Fluoreszenzintensität bei Anregung mit blau-violett Licht lag bei ca. $\lambda = 530$ nm mit einem Ratio von $\sim 0,65$. Der Unterschied zwischen stromaler und urothelialer Fluoreszenzintensität wurde mit zunehmender Wellenlänge immer geringer, so dass sich ab $\lambda \sim 650$ nm kein erkennbarer Unterschied mehr abzeichnete.

Analog zu den Fluoreszenzbildern der Gefrierschnitte (siehe Abb. 53, Seite 92) werden in Abb. 55 die Spektren aus Tumor- und Normalurothel bei den verschiedenen Anregungswellenlängen miteinander verglichen.

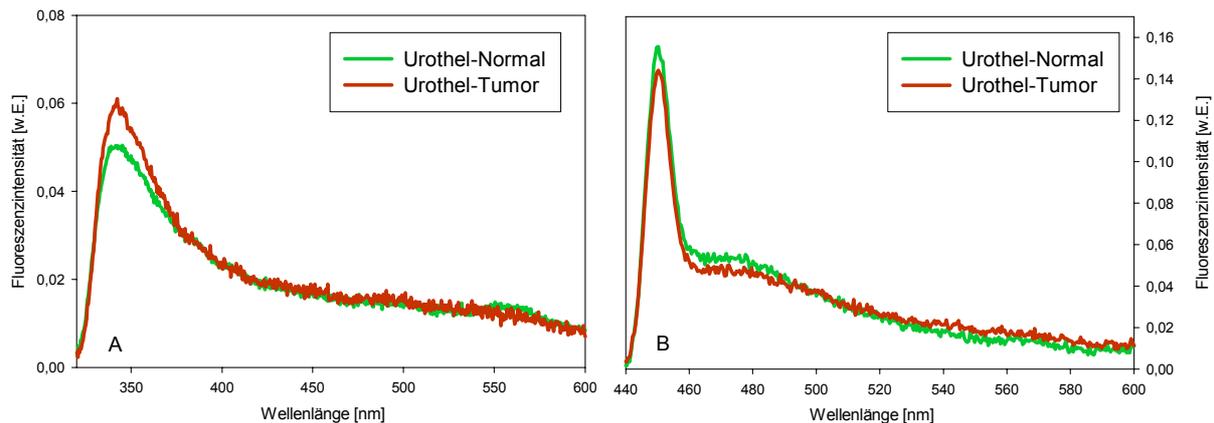
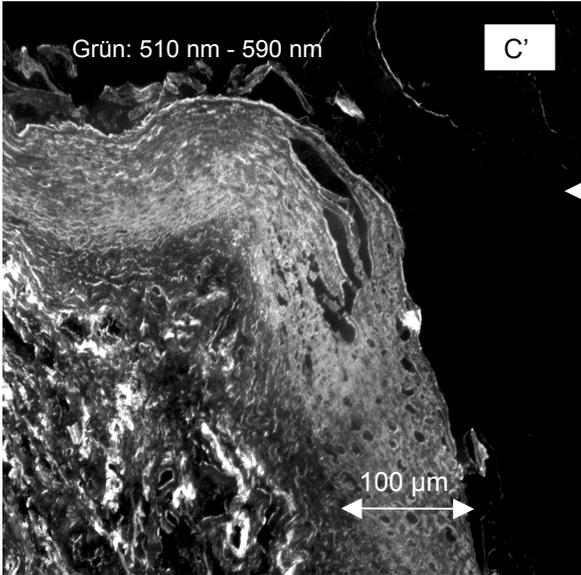
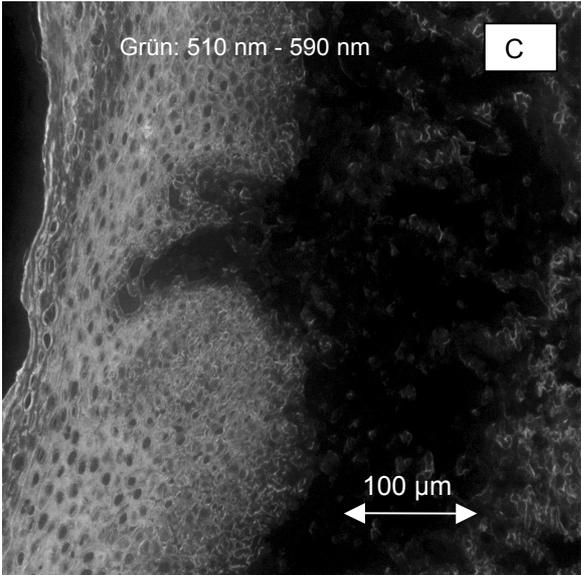
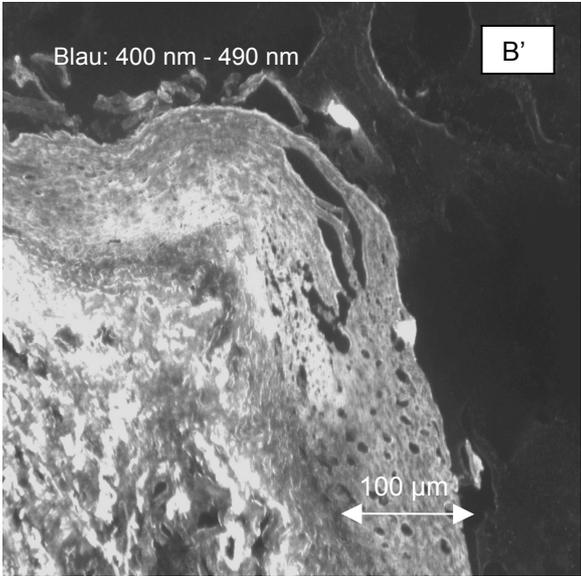
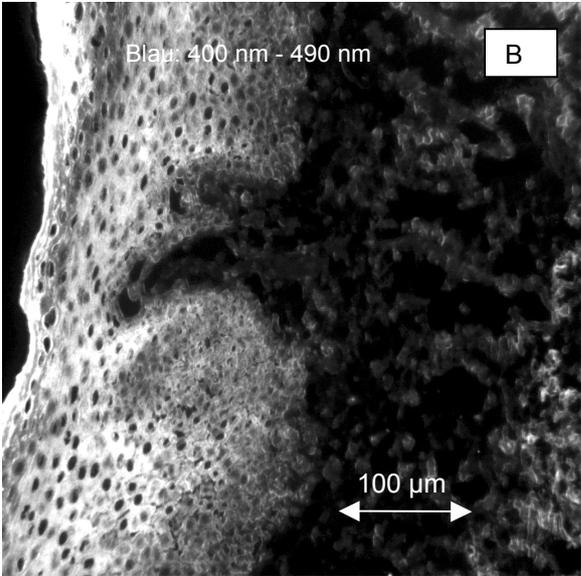
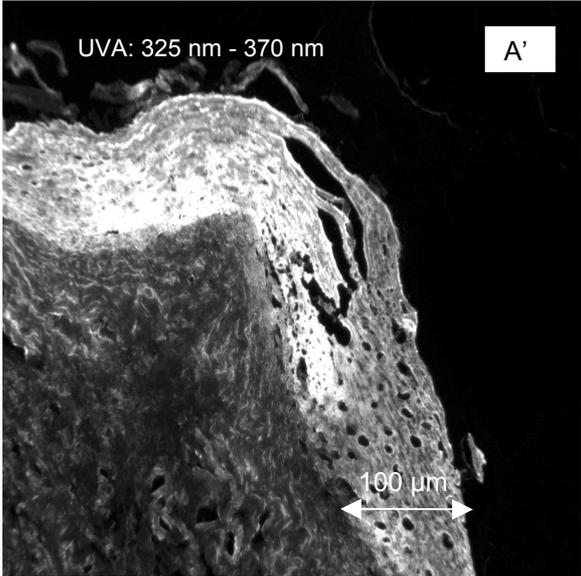
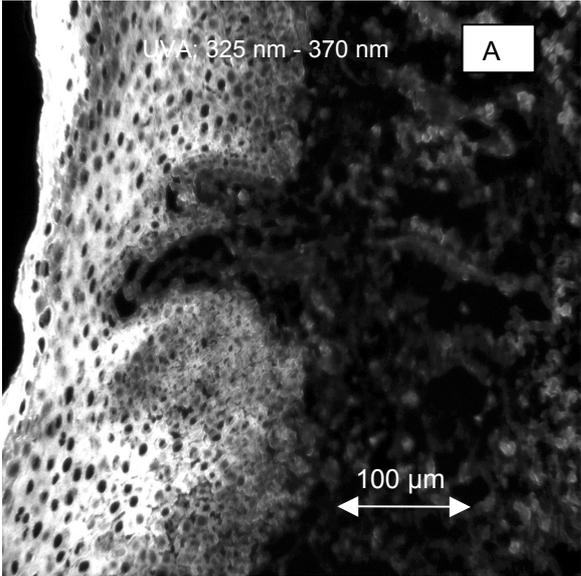


Abb. 55: Mittelwertspektren aus A (Anr. $\lambda = 308 \text{ nm}$) bzw. B (Anr. Blau-Violett-Licht), Tumoruothel (rot) bzw. Normalurothel (grün). Die Spektren wurden aus 9 Gefrierschnitten (5 Normal und 4 Tumor) aufgezeichnet.

Die Fluoreszenzintensität des Tumoruothels war gegenüber dem Normalurothel bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ geringfügig ($\sim 15\%$) erhöht (Abb. 55, A). Sonst zeigen sich keine Unterschiede. Unter Anregung mit blau-violett Licht zeichnete sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen Tumor- und Normalurothel (Abb. 55, B) ab.

2.2 HNO

Aus dem Fachbereich der HNO wurden von einem Patienten mit einem geringgradig verhorrenden Plattenepithelkarzinom auf dem Mundboden zwei Biopsien, eine aus dem Tumorbereich und eine weitere aus dem angrenzenden Normalgewebe, ausgewertet. In Abb. 56 sind die Fluoreszenzbilder in den verschiedenen Filterbereichen F1 bis F3 und den Beleuchtungskonfigurationen $\lambda = 308 \text{ nm}$ (Bilder A bis C, A' bis C') und Blau-Violett-Licht (Bild D, D') nebeneinander abgebildet. Aufgrund der wenigen auswertbaren Bilder werden diese rein qualitativ beschrieben.



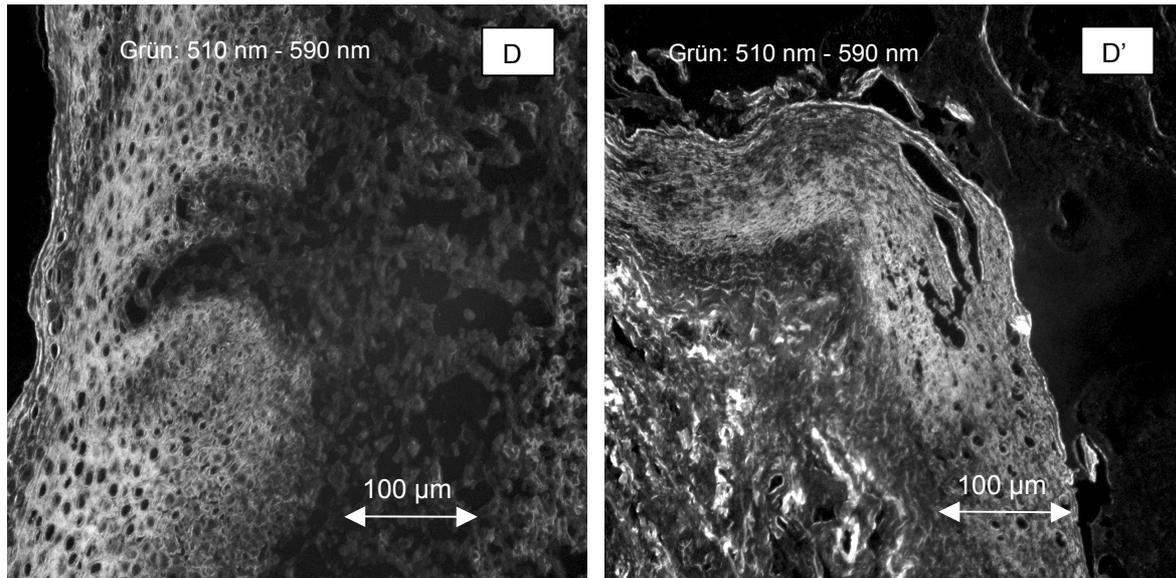


Abb. 56: Fluoreszenzbilder eines Plattenepithelkarzinoms (A bis D) und danebenliegender normaler Schleimhaut (A' bis D') aufgenommen in den verschiedenen Wellenlängenbereichen (F1 bis F3,) und Anregungslichtkonfigurationen – $\lambda = 308$ nm Anregung (A'') – C'') und Blau-Violett-Licht (D'').

Bedingt durch den unterschiedlichen histologischen Aufbau war eine deutliche Abgrenzung zwischen Epithel und Stroma möglich. Auch zeigen die maßstabsgetreuen Bilder die unregelmäßigere Dickenverteilung und insgesamt erhöhte Dicke des Karzinoms. Für das Tumorepithel ist eine in allen Wellenlängenbereichen erhöhte Fluoreszenzintensität des Epithels gegenüber dem Stroma zu erkennen. Im Normalepithel wird hingegen in den Bildern B' bis D' („Blauer“ bzw. „Grüner“ Spektralbereich) eine insgesamt gleichmäßigere Verteilung der Fluoreszenzintensität zwischen Epithel und Stroma beobachtet. In den faserähnlichen Strukturen des Normalstromas sind Stellen vergleichsweise hoher Intensität („hot-spots“) zu erkennen. Tumorfrem ab ~ 200 μm von Epithel entfernt wird wieder eine homogenere und stärkere Fluoreszenzintensität des Stromas als im tumornahen Bereich beobachtet.

Fluoreszenzmikroskopie an normalem geschichtetem Gewebe

Aus den Organen Lunge, Mundhöhle und aus dem Zervix wurden exemplarisch Biopsien aus normaler Schleimhaut aufgearbeitet und sowohl Bilder als auch Spektren aufgezeichnet. Um einen Überblick der spektralen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gewebetypen zu erhalten, wurden die Spektren aus normalem Epithel und korrespondierendem bindegeweblichen Stroma gegenübergestellt (Abb. 57). Das untersuchte Schleimhautgewebe des Zervix stammt aus einer normalen Transformationszone einer 29 Jahre alten Frau. Das Mundschleimhautgewebe wurde einem 63 Jahre alten Mann im Bereich des Mundbodens entnommen. Die untersuchte Biopsie aus der Lunge stammte aus dem tiefen Bronchialbe-

reich. Die dargestellten Spektren aus der Urologie stellen die Mittelwertspektren aus sechs normalen Biopsien dar (siehe Kapitel 2.1).

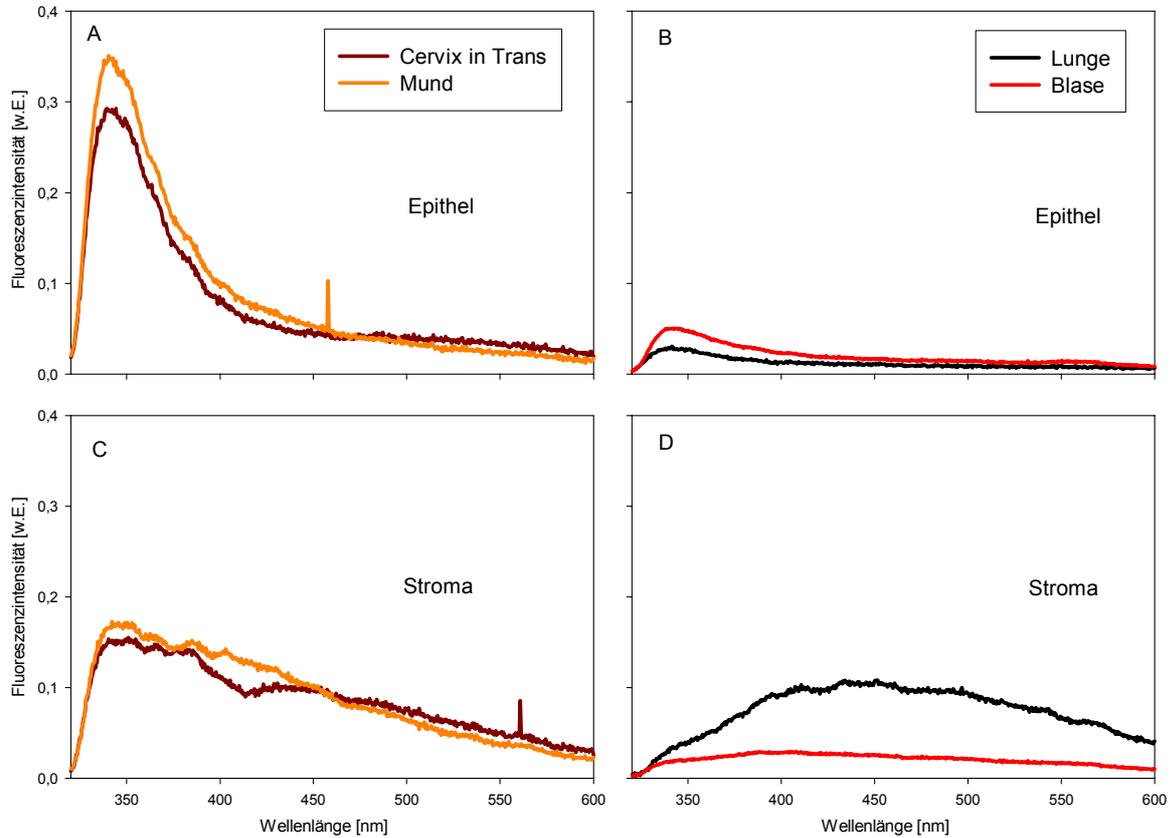


Abb. 57: Spektren von Gefrierschnitten bei Anregung $\lambda = 308$ nm. A, B: Epithel. C, D: Stroma.

Es zeigten sich Gemeinsamkeiten in den Spektren der unterschiedlichen Schleimhauttypen, daher sind die Spektren (in Abb. 57) aus Blase und Lunge (Gruppe I, Bilder A und C) als auch Zervix und Mundschleimhaut (Gruppe II, B und D) zusammengefasst und getrennt dargestellt. Sowohl in den Epithelien aus Gruppe I als auch aus Gruppe II wurde ein Maximum der Fluoreszenzintensität im ultravioletten gemessen. Im Stroma wurde jedoch die maximale Fluoreszenzintensität in Gruppe II im ultravioletten, in Gruppe I im sichtbaren Spektralbereich gemessen. Die Ultraviolettfluoreszenzintensität im Spektralbereich bis $\lambda \sim 380$ nm ist sowohl im Epithel als auch im Stroma für die Epithelien aus Gruppe II (Zervix und Mundschleimhaut) wesentlich erhöht.

IV Diskussion

1 Methodik

1.1 UV-Anregungslichtquelle

Die Tryptophanfluoreszenz im Gewebe kann mit dem in dieser Arbeit verwendeten XeCl-Excimerlaser bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 308$ nm effektiv zur Fluoreszenz angeregt werden (Baraga 90b). Ab einer Wellenlänge von $\lambda = 310$ nm hebt sich die Tryptophan-Fluoreszenz nicht mehr wesentlich vom Autofluoreszenzuntergrund durch andere im Gewebe vorkommende Fluorophore ab. Dies wird auf die steile Flanke im Anregungsspektrum von Tryptophan im Wellenlängenbereich um $\lambda = 308$ nm zurückgeführt. Unterhalb von $\lambda = 308$ nm steigt die relative spektrale Wirksamkeit, mutagene Effekte zu verursachen, deutlich an (siehe Kapitel IV1.2). Eine schmalbandige Lichtquelle wie ein Laser stellt daher eine sinnvolle Wahl zur Anregung der Tryptophanfluoreszenz dar.

Die Verwendung auf $\lambda \sim 308$ nm gefilterter Lampensysteme wäre gegenüber dem Laser vorteilhaft, da keine speziellen Laserschutzvorschriften zur Anwendung kommen. Insbesondere ist keine spezielle Ausbildung des Personals notwendig. Jedoch erfordert eine schmalbandige Filterung eine hohe Gesamt-Ausgangsleistung der Lichtquelle. Als Lichtquellen kommen insbesondere Xe-Kurzbogen-Blitzlampen in Frage. Diese sind gegenüber den CW Xe-Kurzbogen-Lampen leistungsstärker im ultravioletten Spektralbereich. Allerdings sind diese Lampen aufgrund ihrer hohen numerischen Apertur und schlechten Abstrahlcharakteristik für die Einkopplung in lichtleitende Quarzfasern geringer numerischer Apertur ($NA=0,22$) anzupassen und zu optimieren. Mit bis zu ca. 700 mW (100 Hz bei 7 mJ) Ausgangsleistung steht mit dem verwendeten XeCl-Laser eine Anregungslichtquelle zur Verfügung, mit der zudem ausreichend hohe Durchschnittsleistungen für bildgebende Autofluoreszenzsysteme erreicht werden.

Photokarzinogenität

Die Anregung von Gewebe mit UVB-Strahlung birgt immer ein Problem in sich: die Photokarzinogenese.

Für die Bestrahlung von inneren Organen mit (und ohne) Epithel mit UV-Licht existieren keine gesonderten Grenzwerte seitens der ICNIRP (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection). Auch wurden zu dieser Thematik bisher keine tierexperimentellen Voruntersuchungen publiziert. Abschätzungen über das relative Krebsrisiko können daher

nur sehr grob und über die Grenzwerte für die Bestrahlung normaler Haut vorgenommen werden.

Ausgehend vom maximalen Bestrahlungsgrenzwert für kaukasische Haut (120 mJ/cm^2 innerhalb von 8 Stunden täglicher Bestrahlungsdauer) kann Haut mit einer Anregungsbestrahlungsstärke von 50 mW/cm^2 (typische Bestrahlungsstärke zur visuellen Erkennung der Autofluoreszenz) täglich 2,4 sec lang bestrahlt werden (INIRC 85). Dieses Maß ist allerdings keine gute Annäherung für die Verwendung der $\lambda = 308 \text{ nm}$ Strahlung, da bei dieser Applikation von höchstens einer bzw. zwei Bestrahlungssequenzen im Jahr auszugehen ist, so dass die applizierbare Bestrahlung eventuell höher angesetzt werden kann.

Sterenborg et al. (Sterenborg 91) machten zur Bestrahlung von Haut mit $\lambda = 308 \text{ nm}$ eine Abschätzung zum relativen Krebsrisiko bei Bestrahlungssequenzen, die unter normalen Laborbedingungen durch Bedienungsfehler in der Arbeit mit XeCl-Excimerlasern auftreten könnten. Zur Berechnung des relativen Risikos wurden epidemiologische und tierexperimentelle Daten herangezogen. Als Bestrahlungssequenz wurde eine Lichtleistung von 2 Watt bei jeweils 3 Sekunden direkter wöchentlicher Bestrahlung angesetzt. Bei diesen Bestrahlungswerten wird bei $\lambda = 308 \text{ nm}$ das relative Risiko, Plattenepithelkarzinome zu entwickeln, um 17% erhöht. Dies entspricht einer jährlichen zusätzlichen Bestrahlung von 740 mJ/cm^2 und ist vergleichbar mit dem Risiko eines weiteren Tages Sonnenbaden pro Jahr. Unterhalb von $\lambda = 308 \text{ nm}$ steigt das relative Krebsrisiko deutlich an und entspricht (bei der gleichen applizierten Bestrahlungssequenz – 2 Watt/3 Sekunden pro Woche) bei $\lambda = 302 \text{ nm}$ bereits dem Krebsrisiko, dem ein Arbeiter im Freien ausgesetzt ist.

Im Vergleich zu der Bestrahlungssequenz von Sterenborg wurden in unserer Untersuchung $\sim 60 \text{ mJ/cm}^2$ pro Messstelle appliziert (siehe Kapitel II.1.3). Maximal wurden pro Patient an 10 Messstellen (Untersuchungen in der Gynäkologie) Spektren aufgezeichnet, so dass die maximale Gesamtbestrahlung generell unterhalb des Wertes von 740 mJ/cm^2 lag.

De Gruijl (De Gruijl 94) brachte die relative Kapazität, Hauttumore (Plattenepithel bzw. Basalzellkarzinome) zu entwickeln, mit der Dicke des bestrahlten Epithels in Verbindung (siehe Kapitel I7). Durch UVB-Strahlung werden in dünneren Epithelien demnach schneller, in dicken langsamer Tumore induziert. Folglich sollten in der Mundhöhle und auf dem Zervix (epitheliale Schichtdicke zwischen $\lambda = 100$ und $600 \mu\text{m}$) maligne Transformationen erst nach längerer UV-Bestrahlung entstehen als in der Blase oder der Lunge (epitheliale Dicke zwischen $50\text{-}70 \mu\text{m}$; siehe dazu auch Kapitel IV.2.1.2).

1.3 Fluoreszenzdetektion in situ: Vorrichtung und Messverfahren

Die spektrale Messung der Fluoreszenz wurde mit Hilfe einer kombinierten Anregungs- und Detektionsfaser durchgeführt, die durch den Arbeitskanal eines Endoskops auf die Untersuchungsstelle aufgesetzt werden kann. Die Ausführung der Messsonde gewährleistet eine minimale Integrationszeit ($5 \cdot 100 \text{ ms} = 500 \text{ ms}$) bei gleichzeitig hohem Signal zu Rausch Verhältnis ($S/N=100-1000$). Die Aufnahme der Spektren erfolgte nach Abdunklung des Untersuchungsbereichs durch manuelles Ausschalten der endoskopischen Weißlichtbeleuchtung. Innerhalb dieser Zeitspanne ($\sim 5 - 10 \text{ sec}$) kann es zu Verschiebungen des distalen Endes der Messsonde kommen, so dass die Spektren nicht an der beabsichtigten Position aufgezeichnet werden. In Zukunft könnte während der Messprozedur die Weißlicht- oder Fluoreszenz-Beleuchtungseinheit elektronisch synchron mit der Aktivierung der Spektrenaufzeichnung abgeschaltet werden, wodurch zudem der Untersuchungsablauf weniger beeinträchtigt wird.

Die Entnahme der Biopsien wurde nach der spektroskopischen Messung durchgeführt, wobei erst die Faser aus dem Arbeitskanal entfernt werden musste, um anschließend die Biopsiezange einzuführen und die Biopsie zu entnehmen. Messposition und Biopsiestelle sind dadurch nicht zwingend gleich. Um diesen behandlungsbedingten Fehler zu verhindern, könnten spezielle Biopsiezangen zum Einsatz kommen, in deren Mitte eine lichtleitende Fasersonde zu spektroskopischen Messungen platziert ist (Spectra-Science Inc., *wav*TMSTAT System, Mineapolis; U.S.A.). Die Spektroskopie-Messsonde ist dabei so ausgeführt, dass sich mit dem Schließen bzw. Öffnen der Schneidebacken die Spektroskopie-Messsonde vor- bzw. zurückbewegt und so eine exakte Übereinstimmung der Biopsie mit der spektralen Messposition erreicht werden kann.

In dem hier verwendeten Aufbau wurden die Detektions- und Anregungsfasern nebeneinander positioniert. Die Eigenfluoreszenz der Fasern bei $\lambda = 308 \text{ nm}$ erlaubt keine Verwendung einer einzigen Faser zur Anregung und Detektion. Experimentell (Wagnieres 98a) und theoretisch (Avrillier 98, Qu 95) wurde gezeigt, dass die spektrale Charakteristik von fasergestützten Punktmessungen entscheidend von der Geometrie der verwendeten Messanordnung abhängt. Der Abstand zwischen Anregungs- und Detektionsfaser hat einen erheblichen Einfluss auf das Fluoreszenz- und Detektionssignal. Je größer der Abstand zwischen Anregungs- und Detektionsfaser ist, desto weitere Wege legen die Photonen im Gewebe zurück. Dabei werden langwellige Photonen z.B. rotes Licht weniger stark gedämpft als kurzwellige Strahlung im UV (siehe Kapitel 15.3). Bei den hier interessierenden geschichteten Gewebetypen liegt die Schleimhautdicke im Bereich von 30 bis 600 μm . Um möglichst viel UV-Fluoreszenz der Schleimhaut zu detektieren, wäre eine Anordnung mit einer gemeinsamen Detektions- und Anregungsfaser zu bevorzugen. Um das Problem der Eigenfluoreszenz der Faser zu umgehen, könnte die Fasersonde mit einem kleinen Ab-

oreszenz der Faser zu umgehen, könnte die Fasersonde mit einem kleinen Abstandshalter aus Quarzglas am distalen Ende der Messsonde ausgerüstet werden, der so kurz ist, dass die Eigenfluoreszenz dieses Quarzglasstückchens nicht merklich zum Fluoreszenzuntergrund beiträgt (Cothren 86, Ramanujam 96b, Zangaro 96). Vorteilig wirkt sich allerdings bei der hier verwendeten Anordnung aus, dass die Fasersonde auch zur Messung der diffusen Rückstreuung verwendet werden kann, da hierbei kein direkt oberflächlich reflektiertes Licht detektiert wird. Durch die Verwendung eines Abstandshalters vor der Spektroskopiemesssonde ist dies nicht mehr möglich, da das reflektierte Licht nach der Transmission durch den Abstandshalter zum Teil in die Detektionsfasern eingekoppelt wird.

Im Gegensatz zu der hier verwendeten spektroskopischen Messung der Fluoreszenz gibt es alternativ Messaufbauten, bei denen die Detektionsfaser seitwärts über einen Strahlteilerwürfel an den Bildleiter des Endoskops angebunden ist (Stepp 97, Qu 00d). Die Fluoreszenz-Anregung erfolgt hierbei direkt durch die Endoskopbeleuchtung. Diese Meßmethode kommt hier nicht in Frage, da Endoskopoptiken nur bis $\sim \lambda = 380$ nm Licht transmittieren.

1.4 Fluoreszenzdetektion in situ: Auswertung

Aus den aufgezeichneten Spektren wurde für jeden Fachbereich (und dem entsprechenden Tumorphänotyp) eine Ratio-Matrix berechnet, die Auskunft über die Wellenlängenbereiche liefert, in denen gute Diskriminierungsmöglichkeiten zwischen Tumor- und Normalgewebe zu erwarten sind. Aus den Höhenliniendiagrammen (der Ratio-Matrizen) lassen sich Filterkennlinien ableiten, mit denen bildgebende Ratio-Autofluoreszenzverfahren aufgebaut werden können. Insbesondere kann aus den Höhenliniendiagrammen die optimale Bandbreite der Filterkennlinie für den ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich abgeschätzt werden. Das Verfahren der Ratio-Bildung von Bildern aus verschiedenen Spektralbereichen bietet gegenüber herkömmlichen bildgebenden Verfahren, bei denen Absolutintensitäten gemessen werden, den Vorteil, unabhängig von der Beleuchtungs- und Detektionsgeometrie zu sein (siehe Kapitel I6).

Bisher veröffentlichte Auswertemethoden der UVB-Fluoreszenz orientieren sich an dem Auftreten bestimmter Fluoreszenzmaxima in Wellenlängenbereichen, die exemplarisch aus Spektren von bösartigem und gutartigem Gewebe ermittelt wurden (Anidjar 96, Alfano 91, Wang 99a, Kolli 95c, Majumder 99). In der Untersuchung von Anidjar et al. (Anidjar 96) zeigte sich an repräsentativ gewählten Fluoreszenzspektren für malignes Gewebe ein scharf umgrenztes Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 360$ nm und für benignes Gewebe ein gleichmäßiges Fluoreszenzspektrum ohne UV-Peak bei $\lambda = 360$ nm mit einer Maximalfluoreszenz im Bereich um $\lambda \sim 440$ nm. Diese beiden Maxima wurden anschließend zur Ratio-Auswertung

herangezogen. In dieser Untersuchung wurde keine Korrektur der Spektrometerempfindlichkeit durchgeführt, wodurch die spektrale Intensitätsverteilung nicht der Realität entspricht (Intensitätsabgleich des Spektrometers siehe Kapitel II.1.3). Die Vorgehensweise von Anidjar et al. (Anidjar 96), wonach die Wellenlängenbereiche (zur Ratio-Auswertung) aus exemplarisch gewählten Spektren bestimmt wurden, erklärt somit auch den Unterschied zu den hier ermittelten Wellenlängenbereichen (Ratio-Auswertealgorithmus Urologie $R = I(\lambda = 335 \text{ nm})/I(\lambda = 450 \text{ nm})$). Durch den hohen Anteil der Tryptophanfluoreszenz zur Gesamtfluoreszenz bei $\lambda = 360 \text{ nm}$ ($\sim 75\%$ der Maximalfluoreszenzintensität bei $\lambda = 335 \text{ nm}$) und des im wesentlichen gleichen Fluoreszenzmessbereichs im sichtbaren Spektralbereich ($\lambda = 450 \text{ nm}$ bzw. $\lambda = 440 \text{ nm}$) sollte dennoch ein weitgehender Vergleich der Ergebnisse möglich sein (siehe dazu Kapitel IV.2.1.1 und IV.2.3.1).

Auf ähnliche Weise wie in den Untersuchungen von Anidjar et al. (Anidjar 96) erfolgte die Auswertung der Spektren in den Untersuchungen von Wang (Wang 99a) für die Diagnostik von Malignomen der Mundhöhle, worin die lokalen Fluoreszenzmaxima im kurzwelligen $\lambda < 420 \text{ nm}$ als auch langwelligen Spektralbereich $\lambda \geq 420 \text{ nm}$ ermittelt wurden und deren Ratio ($R = I(\lambda = 330 \text{ nm})/I(\lambda = 470 \text{ nm})$) zur Auswertung der Spektren verwendet wurde.

Alfano et al. (Alfano 91) als auch Majumder (Majumder 99) und Kolli (Kolli 95c) wählten die Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 340$ und $\lambda = 440 \text{ nm}$ zur Auswertung, da die Blutabsorption in diesem Wellenlängenbereichen in etwa gleich groß ist, wodurch der Einfluss variabler Blutabsorption reduziert werden soll. Unberücksichtigt bleibt jedoch bei dieser Argumentation der Einfluss variabler Streuung auf die aus dem Gewebe austretende Fluoreszenz, die in diesem Wellenlängenbereichen im Gegensatz zur Blutabsorption nicht deckungsgleich ist, sondern je nach Konzentration und Größe der Streupartikel unterschiedlich sein kann ($\sim \pm 15\%$ zwischen $\lambda = 340 \text{ nm}$ und $\lambda = 440 \text{ nm}$, Zonios 99).

Neben dieser Auswertemethodik der Verhältnisbildung bestimmter Spektralbereiche eines Spektrums gibt es eine Reihe anderer Verfahren, die zur Auswertung von Fluoreszenzspektren verwendet werden können.

Bei der multivarianten linearen Regression wird das Vorhandensein bestimmter Fluorophore vorausgesetzt und diese Reinsubstanzspektren an die erhaltenen Spektren angepasst (Schomacker 92b, Kapadia 90). Problematisch erweist sich dabei die Berücksichtigung gewebeoptischer Parameter wie der Blutabsorption und Streuung, die in diese Auswertung nur näherungsweise einbezogen werden können. Auch ist die Auswahl der Fluorophore fehlerbehaftet, da die Gesamtzahl der körpereigenen Fluorophore sehr groß ist und nur einige wenige isoliert vom Gewebe nachgewiesen werden können (siehe Kapitel I.5.1).

Die „Principal Component Analysis“ (PCA) ist ein statistisches Verfahren, in das als Eingangsparameter keine Fluoreszenzspektren bestimmter ausgewählter Fluorophore eingehen

(Ramanujam 96a). Die Fluoreszenzspektren werden dabei durch Eigenvektoranalyse in ihrer Dimension reduziert, wodurch die relevantesten Wellenlängenbereiche ausgewählt werden können. Die anschließende Einteilung der Auswerteparameter wird entweder binär (benigne/maligne) oder über statistische Klassifizierungsmethoden wie dem Bayes Theorem vorgenommen.

Neben den linearen Auswertemethoden (PCA und der multivarianten linearen Regression) wird in der Literatur noch die Verwendung von neuronalen Netzen (nichtlineare Auswertemethode) beschrieben (van Staveren 00, Tumer 98, Gindi 91, Wallace 00). Mit einem Trainingsset an Daten wird das neuronale Netzwerk trainiert. Erst mit einem Validationsset lässt sich anschließend die Leistungsfähigkeit des verwendeten Netzwerkes überprüfen. Als Eingangsdatensatz kann dabei entweder das gesamte Spektrum (van Staveren 00) oder eine Vorauswahl aus Anregungs- und Emissionswellenlängenpaaren (Tumer 98) dienen.

In der Publikation von Tumer (Tumer 98) wurde gezeigt, dass die Leistungsfähigkeit eines radialen neuronalen Netzwerkes etwas über der Leistungsfähigkeit des multivarianten Auswerteverfahrens (PCA in Kombination mit Bayes Theorem) liegt. Der Vergleich wurde an einem Datensatz von Spektren aus 117 dysplastischen und 242 gutartigen Arealen durchgeführt. Bei etwa gleich hoher Spezifität (67%, bzw. 68%) wurde für die nichtlineare Auswertung eine etwas verbesserte Sensitivität von 91% gegenüber 82% des multivarianten Auswerteverfahrens berechnet.

Diese zu unserer Ratio-Auswertung alternativen statistischen Verfahren wurden hier nicht eingesetzt, da deren Vorteil insbesondere bei der Verwendung mehrerer Anregungswellenlängen (und korrespondierender Emissionsspektren) und damit einer hohen Datenmenge zum Tragen kommt.

1.5 Fluoreszenznachweis mikroskopisch

Die technischen Möglichkeiten des eigens für diesen Zweck aufgebauten UV-Fluoreszenzmikroskops wurden durch die erzielten Ergebnisse gut demonstriert. Es konnten Fluoreszenzbilder in drei aufeinanderfolgenden Spektralbereichen UVA ($\lambda = 320 - 380$ nm), Blau ($\lambda = 420 - 490$ nm) und Grün ($\lambda = 510 - 590$ nm) aufgezeichnet werden. Durch das UV-transmittierende Immersionsobjektiv konnten $530 \mu\text{m} \times 430 \mu\text{m}$ große Bildausschnitte der Gefrierschnitte abgebildet werden. Die hohe Auflösung des Chips von 1280×1024 Pixel (Super VGA, digitale Auflösung $\sim 0,4 \mu\text{m} / \text{Pixel}$) erlaubte auch eine Darstellung von Strukturen wie dem Epithel tieferer Bronchien, dessen Ausdehnung nur ungefähr $\sim 20 \mu\text{m}$ beträgt.

Nachteilig bei dem hier vorgestellten UV-Mikroskop wirkte sich die nicht chromatisch korrigierte Quarz-Tubuslinse aus. Dadurch musste bei jedem Filterwechsel der Arbeitsabstand

nachjustiert werden. Die Verwendung einer chromatisch korrigierten, UV-tauglichen Tubuslinse (z.B. Ibis-Tubuslinse / Schnittweite $\lambda = 340$ nm Leica GmbH) wäre daher sinnvoll. Für die bildgebende Darstellung von UV-Fluoreszenzbildern bietet sich der Bodenausgang eines herkömmlichen Forschungsmikroskops an, wodurch zudem ein einfaches Wechseln der Objektive und eine visuelle Beobachtung und damit „komfortable“ Eingrenzung des Bildausschnittes möglich ist.

Durch den hier skizzierten Auflicht-Beleuchtungs-Aufbau in Kombination mit den $\lambda = 308$ nm antireflex beschichteten Objektträgerplättchen können UV-Fluoreszenzbilder ohne einen merklichen Fluoreszenz-Untergrund (durch Objektiv und Objektträger) dargestellt werden (siehe Kapitel II.2.2).

Mit ausschließlich aus Quarzglas aufgebauten Mikroskopen ist es möglich, Fluoreszenzbilder im herkömmlichen Durchlichtmodus zu erzeugen (Baraga 91). Hiermit können insbesondere auch stark vergrößernde Objektive (40 bzw. 100 fache Vergrößerung) zur Verwendung kommen, wodurch interessante Strukturen wie einzelne Kollagen- und Elastinfasern, aber auch zelluläre Strukturen aufgelöst werden könnten. Der Auflichtmodus verhindert bisher die Verwendung stark vergrößernder Objektive, da der Arbeitsabstand so gering ist, dass leicht Anregungslicht in das Objektiv gelangt, welches einen hohen Fluoreszenzuntergrund erzeugt. Eine sorgfältige Einstellung des Anregungswinkels oder eine Art „Dunkelfeldbeleuchtung für UV-Fluoreszenzanregung“ könnte diesen Nachteil kompensieren.

Die Zuordnung der groben Strukturen war bei den geschichteten Schleimhaut-Gewebetypen relativ leicht möglich. Durch die visuelle Beobachtung des Fluoreszenzschnittes unter Weißlicht und dem stufenlosen Zuschalten des Fluoreszenzanregungslichts konnte das Epithel bzw. die Mukosa gut von dem bindegeweblichen Stroma abgegrenzt werden. Ein Auffinden der interessanten Bereiche unter dem UV-Fluoreszenz-Mikroskop war durch die Orientierung an groben Strukturen wie an Blutgefäßen oder unregelmäßigen Oberflächenstrukturen möglich.

Probleme bereitete der teilweise stark unregelmäßig geschichtete bzw. verworfene Aufbau der Gefrierschnitte, wodurch die Interpretation der H&E Schnitte durch den Pathologen teilweise erschwert wurde.

Diese unregelmäßige Architektur wird auf die Zerstörungen des Gewebes bei der Entnahme der Biopsien und auf das „Kochen“ im Moment des Einfrierens auf -220°C (flüssiger Stickstoff) zurückgeführt.

Die Zerstörung der Mikroarchitektur durch die Entnahme wurde insbesondere an den Schnitten aus der Urologie deutlich, worin oftmals eine sehr unregelmäßige Verformung des Gewebes beobachtet wurde. Zudem wurden im Stroma teilweise keine gleichmäßige Verteilung der Kollagenfasern beobachtet, was durch unterschiedlich große Löcher im Stroma deutlich

wurde (nicht im Ergebnisteil beschrieben). Die Biopsien wurden in der Blase meist durch Elektroresektion entnommen, wodurch die Gefrierschnitte besonders an den Rändern stark koaguliert wurden. Zu einer Eiweißdenaturierung kommt es dabei meist über die ganze entnommene Biopsie hinweg, daher ist nur der mittlere Teil für Gefrierschnitte eingeschränkt nutzbar. Diese starke Erhitzung könnte zu dem teilweise beobachteten löchrigen Aufbau des Stromas führen.

„Kalte“ Knipsbiopsien sind in der Regel besser zur Entnahme der Biopsien in unzugänglichen Körperöffnungen, wie der Blase, der Zervix oder der Lunge geeignet. Allerdings gibt es auch hier größere Schwierigkeiten bei der Zuordnung, da sich vor allem bei den kleinen Biopsien (0,5 – 1 mm) die 10 µm dicken Gefrierschnitte an den Rändern leicht überlappen und verwerfen. Für die Verwendung der Biopsien zu fluoreszenzmikroskopischen Zwecken wird daher eine Auswahl möglichst großer (und scharfer) Biopsiezangen empfohlen.

Die Gefrierartefakte beim Einfrieren können durch eine sorgfältige Auswahl des Einbettmediums reduziert werden. So wird berichtet, dass durch Verwendung von Isopentane als Einbettmedium die Gefrierartefakte gegenüber dem in dieser Arbeit verwendeten „Tissue-Tek“ reduziert werden (Bise 01).

Trotz dieser beschriebenen Probleme erscheint eine qualitative Beschreibung und semi-quantitative Auswertung (Urologie) der Fluoreszenzbilder und Spektren möglich, da in allen Schnitten eine gute Abgrenzung des Stromas vom Epithel möglich war.

2 Ergebnisse

2.1 Quelle der Fluoreszenz – Biochemie und Morphologie

In diesem Abschnitt sollen zuerst an Hand der Normalgewebespektren aus den untersuchten Organen die möglichen „Verursacher“ der Fluoreszenzpeaks in den verschiedenen Spektralbereichen und anschließend die Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gewebetypen in Bezug auf ihre spektrale Intensitätsverteilung diskutiert werden.

In Abb. 58 sind die Normalgewebespektren aus den untersuchten Organen dargestellt. Die Spektren aus dem Urothel, dem Bronchialepithel und der zervikalen Schleimhaut wurden dem Ergebnisteil entnommen (siehe Kapitel III.1.1, III.1.2 und II.4.3). Die aufgezeichneten Spektren aus der Mundhöhle (Kapitel III.1.4) und dem Gehirn (Kapitel III.0) eigneten sich nicht für diesen Vergleich, da die Untersuchungen in der Mundhöhle ohne das Aufzeichnen eines Fluoreszenzstands durchgeführt wurden und die Untersuchungen in der Neurochirurgie an *in-vitro*-Proben stattfanden. Deshalb wurden eigens für diese Gegenüberstellung *in-*

in-vivo Spektren aus der Mundhöhle eines Probanden und Spektren aus dem Marklager eines Patienten ohne nachweislichen Gehirntumor aufgezeichnet.

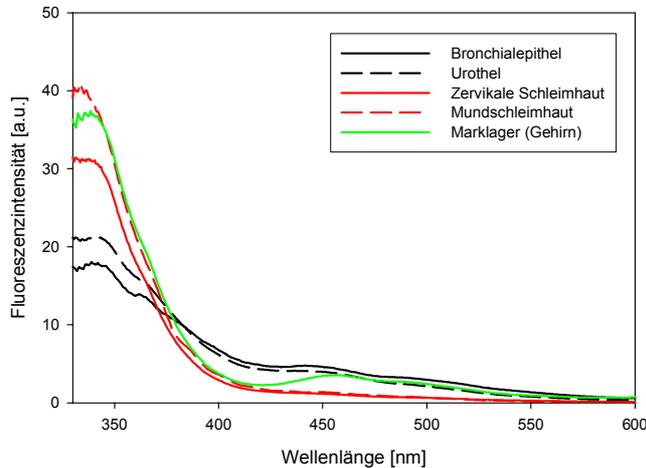


Abb. 58: Gegenüberstellung der gemessenen *in-vivo* Spektren aus histologisch normalem Urothel (n=13) , Bronchialepithel (n=10), Plattenepithel des Ektozervix (n=6), Mundschleimhaut (n=6)* und Marklager (n=6)**.

* Mittelwertspektren eines Probanden von verschiedenen Stellen innerhalb der Mundhöhle (Mundboden, harter Gaumen, Wangeninnenseite, Umschlagseite-Lippe)

** Mittelwertspektren von einem Patienten ohne Gehirntumor

2.1.1 Biochemie

Das Maximum der Fluoreszenzintensität trat bei allen Gewebetypen im Mittel bei $\lambda \sim 335$ nm auf. Dass Tryptophan der wahrscheinlichste „Verursacher“ für den Emissionspeak in diesem Wellenlängenbereich ist, lässt sich wie folgt begründen: In spektroskopischen Untersuchungen an humanen Aortawänden (Baraga 90b) wurde die Anregungswellenlänge im Bereich zwischen $\lambda = 306$ nm und $\lambda = 312$ nm variiert und gleichzeitig Spektren aufgezeichnet. Der deutliche Abfall der Fluoreszenz um $\lambda = 335$ nm bei sukzessiver Änderung der Anregungswellenlänge von $\lambda = 306$ nm bis $\lambda = 312$ nm wies darauf hin, dass der Fluoreszenzpeak bei $\lambda = 335$ nm direkt auf Tryptophan zurückzuführen war, da Tryptophan in diesem Wellenlängenbereich eine steile Flanke im Anregungsspektrum aufweist. Aus Abb. 2 (Seite 6) ist zwar zu erkennen, dass außer Tryptophan, auch NADH und Flavine eine steile Flanke im Anregungsspektrum bei $\lambda \sim 308$ nm zeigen. Diese Moleküle fluoreszieren allerdings wesentlich langwelliger und können somit nicht in Verbindung mit dem Fluoreszenzpeak bei $\lambda = 335$ nm gebracht werden. Andere Fluorophore mit einer steilen Flanke im Anregungsspektrum bei

$\lambda = 308$ nm und korrespondierender Fluoreszenz bei $\lambda = 335$ nm sind aus der Literatur nicht bekannt.

Abb. 3 (Seite 7) zeigt, dass reines Tryptophan ein Emissionsmaximum bei $\lambda \sim 353$ nm besitzt, wohingegen das Maximum der Fluoreszenz in Zellkulturen (Pitts 01, Heintzelman 00a, Burstein 73) bei kürzeren Wellenlängen zwischen $\lambda = 330$ und $\lambda = 335$ nm gemessen wird. Unsere Messungen an humanem Gewebe zeigen ebenfalls, je nach Gewebetyp, ein Fluoreszenzmaximum im Wellenlängenbereich zwischen $\lambda \sim 330$ und $\lambda = 340$ nm. Diese wohlbekannte Verschiebung resultiert aus Veränderungen in der chemischen Umgebung und Konformationsbedingungen von proteingebundenem gegenüber freiem Tryptophan (Lakowicz 99). Verschiebungen des Fluoreszenzmaximums zu kürzeren Wellenlängen resultieren aus einer Orientierungs-Zwangsbedingung der Aminosäure, da begrenzte molekulare Rückorientierung zu einer Erhöhung der Dipolwechselwirkungen führt.

Von den Strukturproteinen, die den Hauptanteil der in den äußeren Hautschichten vorkommenden Substanzen ausmachen, fluoreszieren nur Keratin und Kollagen IV im Spektralbereich um $\lambda = 340$ nm (siehe Abb. 3 Seite 7), Kollagen I und III als auch Elastinfasern nicht. Diese Beobachtungen decken sich auch mit der Analyse der Aminosäuresequenz von Strukturproteinen, woraus hervorgeht, dass Keratin und Kollagen IV tryptophanreiche Proteine enthalten (Marshall 82, Brinker 85), Kollagen I und III jedoch nicht (Yannas 72, Sage 79). An Keratin von Eidechsenkrallen konnte gezeigt werden, dass tryptophanreiche Proteine in etwa 1/3 der Masse des Keratins ausmachen (Marshall 82).

Die Fluoreszenzintensität nimmt von dem Maximum des Tryptophanpeaks ($\lambda \sim 335$ nm) kontinuierlich zu längeren Wellenlängen ab. Durch die hohe Halbwertsbreite von Tryptophan (siehe Kapitel I.5.1) werden Fluoreszenzpeaks anderer Fluorophore, deren Fluoreszenzmaxima im Spektralbereich zwischen $\lambda = 340$ und $\lambda = 420$ nm liegen, von der Tryptophanfluoreszenz überlagert. Dies wird an der Schulter der Spektren aus Urothel und Bronchialepithel deutlich. Dieses Nebenmaximum weist auf die Anwesenheit von Kollagen (I und III) und Elastinfasern hin, die Emissionspeaks bei $\lambda = 380$ nm (Kollagen I und III) und $\lambda = 400$ nm (Elastin) zeigen (Abb. 3 Seite 7, Baraga 90b).

Im sichtbaren Spektralbereich wird im Bereich der Soret-Bande der Hämoglobinabsorption bei $\lambda \sim 420$ nm teilweise (siehe zum Beispiel Mittelwertspektrum Marklager, Abb. 58) ein lokales Minimum der Fluoreszenzintensität gemessen. Die Interpretation der Spektren in Bezug auf die in diesem Spektralbereich fluoreszierenden Substanzen kann daher aus den vorliegenden Spektren nicht vorgenommen werden. Als mögliche Kandidaten für die Fluoreszenz in diesem Spektralbereich kommen die verschiedenen Strukturproteine (Kollagen, Elastin und Keratin) als auch Lipopigmente, Pyridoxin, NADH und FAD in Frage (siehe Kapitel I.5.1).

2.1.2 Morphologie

Im Folgenden sollen ausgehend von den Normalgewebsspektren und den Ergebnissen aus den fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen die spektralen Intensitätsunterschiede zwischen den untersuchten Organen auf Basis des morphologischen Ursprungs der Fluoreszenz diskutiert werden. Aus einer Betrachtung der Mittelwertspektren in Abb. 58 ist erkennbar, dass die spektralen Intensitätsverteilungen der Blasen- und Lungenspektren als auch der Mund- und Zervixspektren jeweils untereinander vergleichbar sind. Diese vier unterschiedlichen Schleimhauttypen werden daher zur Diskussion in zwei Gruppen unterteilt:

Gruppe I: Übergangsepithel der Blase und Bronchialepithel der Lunge.

Gruppe II: Plattenepithel der Mundhöhle und des Zervix.

Die Spektren aus Gruppe I zeigen jeweils eine reduzierte UV-Fluoreszenzintensität gegenüber den Spektren aus Gruppe II. Gegenüber den Spektren aus Gruppe II wurde im sichtbaren Spektralbereich eine vier- bis fünffach erhöhte Fluoreszenzintensität gemessen. Ausschließlich in den Spektren aus Gruppe I ist ein Nebenmaximum bei $\lambda \sim 380$ nm erkennbar. Neben diesen Unterschieden in den *in-vivo* Spektren konnten Parallelen durch die Auswertung der Gefrierschnitte abgeleitet werden. So zeigte sich in den Epithelien als auch im Stroma aus Gruppe I jeweils eine deutlich niedrigere UV-Fluoreszenzintensität (Epithel: 7 bis 8 fach, Stroma 2-3 fach) als bei den Epithelien aus Gruppe II (siehe Kapitel III.2.3).

Die verschiedenen Epithelien unterscheiden sich erheblich in Ihrer Dicke. Die Dicke des Urothels variiert mit dem Kontraktionszustand der Blase und wird mit 50-70 μ m angegeben (Bergmann 81). Die epitheliale Dicke normaler menschlicher Bronchialschleimhaut wurde an 30 Biopsien bestimmt und beträgt 46 ± 3 μ m (zwischen 34 μ m und 54 μ m) (Qu 95). Das Plattenepithel innerhalb der Transformationszone des Zervix wurde im Mittel zu ~ 380 μ m bestimmt und variiert dabei je nach Alter und menopausalem Zustand der Frau zwischen 250 und 600 μ m (Brookner 00). Das Plattenepithel der Mundschleimhaut wird in keratinisierende (harter Gaumen, Zahnfleisch-Schleimhaut) und nicht-keratinisierende Schleimhaut (weicher Gaumen, Mundboden, Lippen, Backen, Zungenoberfläche) unterteilt (siehe Kapitel I.8.4). Die Dicke nicht-keratinisierender Schleimhaut variiert und liegt im Mittel bei ~ 100 μ m. Die Dicke keratinisierender Schleimhaut wird dagegen mit ~ 250 μ m angegeben.

Demnach unterscheiden sich die Epitheldicken aus Gruppe I und II um fast eine Größenordnung (Gruppe I – 40 – 70 μ m, Gruppe II – 100 – 600 μ m). Die Eindringtiefe des Anregungslichts wurde *in-vitro* an normaler Blasenschleimhaut zu 120 μ m bestimmt (Hohla 99). Dies ist vergleichbar mit akustooptischen Messungen an atherosklerotischen Blutgefäßen, wonach die Eindringtiefe bei $\lambda = 308$ nm 80 \sim 100 μ m beträgt (Esenaliev 93). Durch die geringe Ein-

dringtiefe des Anregungslichts kann insbesondere bei den Plattenepithelien (Gruppe II) kaum mehr Anregungslicht bis zum Bindegewebe gelangen und dort die Kollagen- und Elastinfasern zur Fluoreszenz anregen. Dadurch ist die Fluoreszenzintensität im sichtbaren Spektralbereich bei diesen Epithelien im Vergleich zu den Epithelien aus Gruppe I (Urothel und Bronchialepithel) geringer und die typischen Fluoreszenz-Nebenmaxima von Kollagen und Elastinfasern bei $\lambda \sim 380$ nm sind ebenfalls nicht mehr zu sehen (siehe Abb. 58 und Kapitel I.6).

Die Hypothese, dass epitheliale Dickenunterschiede zu einer veränderten UV-Fluoreszenzintensität beitragen, wird dadurch gestützt, dass bei allen untersuchten Epithelien im Mittel eine zwei bis drei mal so hohe UV-Fluoreszenzintensität im Epithel gegenüber dem Stroma gemessen wurde (siehe Kapitel III.2.3), wodurch im Falle der Plattenepithelien im Bereich des Anregungs-Gewebevolumens mehr Epithel zur Fluoreszenz angeregt werden kann.

Zur insgesamt erhöhten Tryptophanfluoreszenzintensität in den Spektren aus Gruppe II könnte auch die Keratinisierung des Plattenepithels beitragen, da im Epithel und Stroma der Gefrierschnitte aus Gruppe II eine deutlich (sieben- bis achtfach) höhere Tryptophanfluoreszenzintensität gegenüber dem Epithel und Stroma der Gefrierschnitte aus Gruppe I gemessen wurde (siehe Kapitel III.2.3).

Prinzipiell neigt Plattenepithel der Mundschleimhaut und des Zervix (Transformationszone und Ektozervix) in unterschiedlich ausgeprägtem Maße zur Keratinisierung (siehe Kapitel I.8.4). In immunohistochemischen Untersuchungen kann auch bei histopathologisch als nicht-keratinisierendes Plattenepithel bezeichnetem Epithel eine Keratinisierung nachgewiesen werden (Loning 83, Reibel 89, Cintonino 90), was dazu führen könnte, dass durch die $\lambda = 308$ nm angeregte Autofluoreszenzdetektion auch geringe Verhornungsgrade gemessen werden können.

Untersuchungen an humaner Haut zur Abgrenzung maligner Neoplasien mittels Autofluoreszenzanregung bei $\lambda = 365$ nm weisen auf einen hohen Autofluoreszenzeinfluss des Keratins im Plattenepithel der Haut hin (Sternborg 94). In dieser Publikation wird die hohe und gleichzeitig stark schwankende Keratinisierung als Hauptursache für mangelhafte Abgrenzbarkeit von Hauttumoren mittels Autofluoreszenz diskutiert. So wurde argumentiert, dass das gemessene Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 435$ nm ziemlich genau mit dem Fluoreszenzmaximum von Keratin bei $\lambda = 435$ nm übereinstimmt. Es zeigte sich darüber hinaus, dass die Fluoreszenzintensität nach Entfernung der obersten Hautschichten durch das Abziehen mit einem Klebeband („Tape-Stripping“) deutlich abnimmt.

Diese von Sternborg et al. aufgestellte Hypothese wird durch die in dieser Arbeit durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Plattenepithelien der Mundschleim-

haut aus dem Mundboden erhärtet (siehe Kapitel III.2.2). So zeigte sich vor allem in den fluoreszenzmikroskopischen Bildern auch mit Anregung mit blau-violetter Licht eine vergleichbar hohe Fluoreszenzintensität des Epithels wie des Stromas. Dies weist darauf hin, dass in Plattenepithelien nicht systematisch von einer reduzierten Fluoreszenzintensität nach Anregung mit blau-violetter Licht im Epithel gegenüber dem Stroma ausgegangen werden kann. Darüber hinaus konnte Betz (Betz 00) zeigen, dass mittel bis stark keratinisierende Malignome im Mundhöhlenbereich im Mittel schlechter durch die Autofluoreszenz von normalem Gewebe abgegrenzt werden können als nicht-keratinisierende Tumore. Stark verhornende Tumore zeigten sogar oftmals eine erhöhte grüne Autofluoreszenz gegenüber dem umliegenden normalen Gewebe.

Zusammenfassend lässt sich anmerken, dass die Keratinisierung bzw. Verhornung bei der Bewertung verschiedener Verfahren in der Autofluoreszenzdiagnostik in Betracht gezogen werden sollte.

Die Spektren aus dem Gehirn lassen sich nicht auf Basis der gleichen biochemischen und morphologischen Zusammenhänge diskutieren. In den Normalspektren aus dem Marklager lässt sich kein deutliches, abgrenzbares Nebenmaximum im Bereich um $\lambda \sim 380$ nm erkennen (Abb. 58). Im normalen Hirngewebe befindet sich interstitielles Kollagen (I, III und IV) ausschließlich in den Leptomeningen und in den faserhaltigen Schichten großer Blutgefäße (Chintala 96). Kollagen IV wird darüber hinaus in der extrazellulären Matrix von Gliomen gefunden (Chintala 96). In den untersuchten Gehirngewebeproben befinden sich keine großen Blutgefäße, was das Fehlen der Nebenmaxima (Abb. 58) erklären könnte. An dem Mittelwertspektrum des Normalhirns lässt sich im Vergleich zu den anderen Spektren ein stärker ausgeprägtes lokales Minimum im Bereich der Soret-Bande der Hämoglobinabsorption $\lambda = 420$ nm erkennen. Dieses Minimum weist auf eine hohe Blutkonzentration hin, die durch das Einbluten in den Untersuchungsbereich unterhalb des Faserendes verursacht worden sein könnte. Dieses Problem bei *in-vivo* optischen Messungen im Gehirn wurde auch von Lin et al. (Lin 01) in Betracht gezogen und lässt sich nur durch eine sorgfältige Spülung des Untersuchungsbereichs verhindern.

Aus dem Vergleich der *in-vivo*-Spektren und den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an normalen Gewebearealen ließen sich folgende Zusammenhänge ableiten:

- Epitheliale Dickenunterschiede zwischen den verschiedenen Schleimhauttypen führen zu einer variablen Tryptophanfluoreszenzintensität.
- Bedingt durch die im Mittel dickere Schleimhaut des Plattenepithels der Mundhöhle und des Zervix wird hier weniger stromales Kollagen und Elastin zur Fluoreszenz angeregt, was sich in einer gegenüber dem Urothel und dem Bronchialepithel reduzierten Peakintensität bei $\lambda = 380$ nm und einer insgesamt niedrigeren Fluoreszenzintensität im sichtbaren Spektralbereich bemerkbar macht.
- Zudem wurde die Keratinisierung bzw. Verhornung des Plattenepithels als möglicher Verursacher der deutlich erhöhten Tryptophanfluoreszenzintensität in Epithel und Stroma des Plattenepithels diskutiert.

Variationen der Normalgewebespektren

Bei der spektralen Untersuchung des normalen Gewebes der verschiedenen Organe wurde eine hohe Variation der Ratios festgestellt. In Tab. 12 sind die Variationen der Ratios aus den entsprechenden Normalgewebearealen zusammengefasst.

Untersuchungsorgan	Anzahl der Areale	Ratio	Rel. Stabw. in %
Blase	41	335 nm / 450 nm	51
Lunge	9	340 nm / 425 nm	40
Zervix*	23	333 nm / 450 nm	37
Mundhöhle	27	340 nm / 560 nm	79
Gehirn	32	360 nm / 575 nm	49

* Spektren aus dem Ektozervix

Tab. 12: Gegenüberstellung der relativen Standardabweichung der verschiedenen Ratios in den untersuchten Organen

Demnach wurden in den verschiedenen Organen Variationen im Bereich zwischen 37% (Zervix / Ektozervix) und 79% (Mundschleimhaut) gemessen. Die Variationen können aus unterschiedlichen Mechanismen resultieren.

Zuerst wird deutlich, dass in der Mundschleimhaut größere Variationen (79%) gemessen wurden als in den restlichen Organen (37 – 51%). Diese starke Abhängigkeit könnte an dem unterschiedlichen Verhornungsgrad der verschiedenen Lokalisationen innerhalb der Mundhöhle liegen. So ist der Bereich stärker beanspruchten Gewebes wie dem Zahnfleisch oder dem hartem Gaumen stärker verhornt als der Bereich des Mundbodens oder der Zungenun-

terseite (siehe Kapitel I.8.4). Hohe Variationen der Autofluoreszenzintensität zwischen den verschiedenen Lokalisationen wurden bereits bei Autofluoreszenzuntersuchungen von Betz (Betz 00) gemessen, wobei die Fluoreszenzintensität des harten Gaumens und der Zungenunterseite im Mittel doppelt bis dreifach so hoch war wie die der inneren Lippenschleimhaut oder des Mundbodens. Diese deutlichen Unterschiede verhornender und nicht-verhornender Schleimhäute in der Mundhöhle werden auch durch unsere Messungen bestätigt. Exemplarisch wurden die Ratios des harten (verhornend) und weichen (nicht-verhornend) Gaumens eines Patienten an jeweils zwei Messstellen miteinander verglichen (nicht im Ergebnisteil beschrieben). Die Ratios für den weichen und harten Gaumen waren um einen Faktor 6 unterschiedlich, wobei das verhornende Plattenepithel (harter Gaumen) eine höhere Tryptophanfluoreszenzintensität und gleichzeitig niedrigere Fluoreszenzintensität im sichtbaren Spektralbereich aufwies.

In der Blase wurden ebenfalls hohe Variationen von $\sim 50\%$ gefunden. Eine deutliche Lokalisationsabhängigkeit kann hier nahezu ausgeschlossen werden. Messungen an den verschiedenen Seiten der Blase (Blasenboden, Blasendach, linke Blasenseitenwand, rechte Blasenseitenwand und Blasen hinterwand) konnten keine Abhängigkeit des Ratios von den verschiedenen Messpositionen zeigen (siehe Kapitel III.1.1.2).

Aus den Untersuchungen in der Urologie und Pulmologie ist ersichtlich, dass eine erhöhte Durchblutung maligner Bereiche in Einzelfällen zu einer verbesserten Diskriminierung von massivem tumorösem Gewebe führen kann (siehe z.B. Abb. 26, Seite 63). Generell jedoch können Variationen in der Durchblutung als auch der Streuung verhindern, dass insbesondere frühe maligne Neoplasien von durchbluteten Entzündungen unterschieden werden können (siehe Kapitel I.5.3). Spektroskopische Algorithmen (Zhang 00, Zhadin 98), bei denen die diffuse Geweberückstreuung von weißem Licht mit in die Auswertung einbezogen wird, könnten diese Einflüsse reduzieren und somit reproduzierbarere Ergebnisse mit geringeren Schwankungen für Normalgewebe erzielen.

Als weitere mögliche Quelle für Intensitätsvariationen ist der Druck zu nennen, der durch das Aufsetzen der Faser auf das Gewebe ausgeübt wird (Sinichkin 98). Durch die Applikation von Druck auf Gewebe kann es insbesondere zu einer Minderdurchblutung kommen. Ein einfacher Test auf der Unterlippe eines Probanden zeigte allerdings, dass das gemessene Ratio $R = I(\lambda = 335 \text{ nm})/I(\lambda = 450 \text{ nm})$ durch den unterschiedlichen Druck nur wenig variiert ($\pm 5\%$) (Messungen nicht im Ergebnisteil beschrieben).

Verschiedene Untersuchungen an humaner Haut (Sternborg 94, Leffell 88) oder ektozervikaler Schleimhaut (Brookner 00) konnten eine systematische Korrelation der gemessenen Autofluoreszenzintensität (Anregung zwischen $\lambda = 337$ und 480 nm) mit dem Alter zeigen. Um diese Altersabhängigkeit auf die hier angewandte Ratio-Auswertemethode zu verifizie-

ren, ist in Abb. 59 das Ratio der normalen Schleimhautareale von Patienten mit Verdacht auf Blasen tumor gegen das Alter aufgetragen. Es zeigte sich ein leichter Anstieg des Ratios mit dem Alter ($y=ax+b$; $b=-0,361$ und $a=0,107$; $r^2=0,091$). Der ansteigende Verlauf lässt sich aufgrund der hohen Schwankungen nur erahnen. Dies wird auch an dem niedrigen Korrelationskoeffizienten r^2 deutlich. In mikroskopischen Untersuchungen von Brookner et al. (Brookner 00) an normalen zervikalen Schleimhäuten mit verschiedenen Anregungswellenlängen ($\lambda = 337$ nm, $\lambda = 380$ nm und $\lambda = 480$ nm) wurde eine mit dem Alter zunehmende stromale Fluoreszenzintensität gemessen. Dies wird auf die erhöhte Dichte an Kollagen „cross-links“ bei älteren Menschen zurückgeführt (Bailey 98). Zudem wurde eine altersbedingte Abnahme der epithelialen Schichtdicke beobachtet. Dies wird mit einer altersbedingten Atrophie der zervikalen Schleimhaut begründet. Nach diesen Überlegungen sollte das Ratio älterer Menschen, bedingt durch eine einerseits dünnere Schleimhaut und eine andererseits erhöhte Kollagenfaserdichte, im Mittel ein geringeres Ratio als das jüngerer Menschen zeigen. Dies zeigt sich an den eigenen Daten jedoch nicht. Es muss einschränkend erwähnt werden, dass die Messungen nicht an gesunden Patienten durchgeführt wurden. Außerdem fanden diese Messungen im Gegensatz zu den Messungen von Brookner et al. (Brookner 00) mit $\lambda = 308$ nm Anregung statt, so dass hier eventuell andere altersbedingte Mechanismen zum tragen kommen. Für altersbedingte Einflüsse auf das Tryptophansignal kommen zum Beispiel eine mit dem Alter abnehmende epidermale Proliferation als auch veränderte Keratinisierung des Epithels in betracht (Engelke 97).

(flache und massive Tumore) den jeweils signifikantesten Kontrast lieferte. Allerdings konnten massive Tumore für einen Wellenlängenbereich von $\lambda = 420 \text{ nm}$ bis $\lambda = 600 \text{ nm}$ für den Nenner des Ratios gleichbleibend gut (~ 4) von normalem Gewebe unterschieden werden, wohingegen flache Tumore nur in einem eng umgrenzten Bereich für den Nenner des Ratios bei $\lambda \sim 450 \text{ nm}$ deutlich abgegrenzt werden konnten. Aufgrund der klinischen Relevanz flacher maligner Neoplasien wurde das Ratio $R = I(\lambda = 335 \text{ nm})/I(\lambda = 450 \text{ nm})$ für alle Läsionen zur Auswertung herangezogen.

Mit diesem Ratio wurde für massive Tumore eine hochsignifikante ($p \leq 0,0001$) und für flache Tumore eine nahezu signifikante ($p = 0,08$) Unterscheidung zum gutartigem Gewebe (normale Schleimhaut, gutartige Neoplasien und Narben) möglich. Eine Unterscheidung zwischen flachen Tumoren und dem Ensemble aus gutartigen Neoplasien und Narben erscheint jedoch mit diesem Ratio-Algorithmus nicht möglich ($p > 0,05$). Dennoch zeigten die Ratios flacher Tumore im Mittel- und Medianwert um $\sim 60\%$ erhöhte Ratio-Werte gegenüber gutartigen Neoplasien als auch Narben (siehe Abb. 23, Seite 58). Eine Erhöhung der Fallzahl von derzeit neun flachen malignen Neoplasien wäre daher angezeigt.

Die Diskussion der $\lambda = 308 \text{ nm}$ angeregten Autofluoreszenzdetektion in Bezug auf Sensitivität und Spezifität soll hier auf Basis einer Schwellenwertfestlegung von 9,5 durchgeführt werden. Bei diesem Schwellenwert wurde eine Sensitivität von 89% und eine Spezifität von 65% ermittelt (siehe Abb. 24, Seite 59). Eine Verbesserung der Sensitivität könnte durch einen noch geringeren Schwellenwert erzielt werden, allerdings nimmt dabei die Spezifität sehr stark ab.

Mit der $\lambda = 308 \text{ nm}$ angeregten Autofluoreszenzdetektion (Schwellenwert 9,5, Abkürzung: AF-308) wurden zwei Carcinoma in-Situ-Läsionen (eines Patienten), eine Dysplasie Grad II und ein mikropapillärer Tumor als falsch-negativ diagnostiziert. Die Fehlinterpretation des mikropapillären Tumors könnte hier auf das Abrutschen des distalen Endes der Messsonde vom Tumor in den Normalgewebereich zurückgeführt werden, da sich das Ratio in diesem Fall mit dem Mittelwertratio aus benachbartem normalen Gewebe deckte (nicht im Ergebnisteil dargestellt).

Bei der 5-ALA induzierten PPIX-Fluoreszenzdiagnostik wurde eine Sensitivität von 91% und eine Spezifität von 54% errechnet. Die falsch-negativen Areale waren zwei massive Tumore und ein flaches Tumoreal (CIS). Bei etwa gleich hoher Gesamtsensitivität werden also mit der AFE im Vergleich zur AF-308 weniger falsch-negative Areale detektiert.

Mit der Auswertung der Weißlichtbefunde unter der Maßgabe, dass geringfügig alterierte Areale als positiv eingestuft wurden (WL1), konnte eine hohe Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 58% errechnet werden. Nur ein flaches Tumoreal (CIS / AFE und AF-308

falsch-negativ) wurde damit nicht erfasst. Die gegenüber der AFE höhere Sensitivität der Weißlichtdiagnostik ist im Vergleich zu bisherigen Studien auffällig und wird im Folgenden noch diskutiert.

Neben der statistischen Evaluierung der einzelnen Methoden wurden unterschiedliche logische Verknüpfungen der Methoden getestet. Insbesondere wurde eine Kombination aus AFE und der AF-308 (als auch Weißlichtdiagnostik) getestet, wodurch die Spezifität der AFE verbessert werden könnte. Durch eine UND-Verknüpfung der AFE mit der AF-308 werden ausschließlich Läsionen als maligne eingestuft, die sowohl unter AFE als auch unter AF-308 positiv waren. Es errechnete sich eine Sensitivität von 83% und eine Spezifität von 80% (nicht im Ergebnisteil beschrieben). Dies bedeutet, dass nur durch eine Reduktion der Sensitivität eine Verbesserung der Spezifität der AFE von 54% auf 80% möglich war. Unter die sechs falsch-negativen Befunden (Kombination aus AFE und AF-308) fallen dann drei flache, maligne, neoplastische Läsionen. Eine Kombination dieser Methoden mit dem Ziel der Verbesserung der Spezifität der AFE sollte allerdings wegen der geringen Anzahl an flachen malignen Läsionen (9) dennoch nicht verworfen werden. Ein weiterführender Test unterschiedlicher Kombinationen aus AFE, AF-308 und Weißlichtbefundung (WL1 und WL2) konnte keine deutliche Verbesserung der AFE in Bezug auf die Spezifität ohne einen Verlust an Sensitivität für die maligne Frühstadien erzielen (siehe Kapitel III.0).

Gegenüber der AFE hat die Weißlichtdiagnostik (WL1) in unserer Untersuchung eine höhere Sensitivität von 97%. Der 5-ALA induzierten Fluoreszenzdiagnostik in der Blase wird allerdings in verschiedenen unabhängigen Untersuchungen und Studien (Cheng 00, Jichlinski 97, De Dominicis 01, Zaak 01b, Koenig 99, Jeon 01) eine deutlich bessere Sensitivität, als der Weißlichtdiagnostik, insbesondere in Bezug auf neoplastische Frühstadien (CIS und Dysplasien II), zugeschrieben. Schneeweiss (Schneeweiss 99) kam bei einer patientenbezogenen, statistischen Analyse von 328 Fluoreszenzendoskopien auf eine Sensitivität der Fluoreszenzendoskopie von 93,4% (Konfidenzintervall 90 – 97,3%) im Vergleich zu 46% (39,4% - 54%) für die Weißlichtendoskopie (1999). Die hohe Sensitivität der Weißlichtdiagnostik in dieser hier durchgeführten Untersuchung (WL1 97% bzw. WL2 89%) deutet daher auf ein nicht repräsentatives Ensemble an Patienten und Biopsien hin.

Um die Unterschiede zu einem repräsentativen Patientengut zu evaluieren, wurden die hier ausgewerteten Untersuchungsdaten (AF-308) mit den zystoskopischen Untersuchungen des Klinikums Großhadern im Zeitraum zwischen Januar 1995 und Juli 2001 (Uro-KG) verglichen. In diesem Zeitraum wurden 1434 Untersuchungen an 726 Patienten durchgeführt, wovon 3316 Biopsien histologisch ausgewertet wurden. Auffällig ist, dass bei den Uro-KG Daten wesentlich weniger Untersuchungen an Patienten mit ausschließlich benignen Neoplasien oder Narben (Gruppe II und III) ohne histopathologisch nachgewiesenem Tumor

vorgenommen wurden (27%/Uro-KG gegenüber 51%/AF-308). Das erklärt auch, warum in der AF-308 Untersuchung mehr benigne Neoplasien und Narben entnommen wurden (55%/AF-308 gegenüber 45%/Uro-KG). Auch wurden in unserer Untersuchung ~ 50% weniger Tumorfrühstadien im Verhältnis zur Anzahl der benignen Neoplasien und Narben gefunden (10%/AF-308 zu 22%/Uro-KG).

Eine hohe Sensitivität der Weißlichtdiagnostik ist immer dann zu erwarten, wenn die Tumore leicht erkennbar sind. Da aber flache Tumore in der Regel schwer unter Weißlicht zu erkennen sind, sollte sich bei einem verhältnismäßig hohen Anteil dieser Tumorentität die Wahrscheinlichkeit reduzieren, diese aufzufinden, wodurch sich die Sensitivität verschlechtert. Der Vergleich zu den URO-KG Daten könnte erklären, warum in der AF-308 Untersuchung eine hohe Sensitivität (biopsiebezogen) der Weißlichtdiagnostik (WL1) für das Auffinden von flachen Tumoren berechnet wurde (Uro-KG/Sens. 73% - AF-308/Sens. 89%).

Durch die Normierung auf einen Fluoreszenzstandard konnten bei 59 der 167 untersuchten Areale die absolut gemessenen Spektren der verschiedenen histologischen Gruppen ausgewertet und miteinander verglichen werden. An diesen Spektren kann insbesondere überprüft werden, ob es zu einer absoluten Intensitätserhöhung der Tryptophanfluoreszenz und einer gleichzeitigen Intensitätsabsenkung im sichtbaren Spektralbereich bei den Tumorspektren im Vergleich zu den Normalspektren kommt. Dies lässt sich qualitativ besonders gut an Hand der Residuen diskutieren (siehe Abb. 26; Seite 63). Das Residuum der Mittelwertspektren zum histologisch normalen Gewebe zeigte, dass die UV-Fluoreszenzintensität in der Reihenfolge benignes neoplastisches Gewebe (~ +5%), flache Tumore (~ +20%) und zuletzt massive Tumore (~ +40%) stetig zunimmt. Dies weist darauf hin, dass eventuell durch die absolute UV-Fluoreszenzintensität eine Trennung der malignen von den benignen Arealen möglich wäre.

Die Fluoreszenzintensität im sichtbaren Spektralbereich nahm dagegen nicht in der gleichen Reihenfolge wie die Fluoreszenzintensität im ultravioletten Spektralbereich, vom normalen Gewebe bis zum massiven Tumorgewebe, ab. Die Residuen der Mittelwertspektren der benignen Neoplasien zum normalen Gewebe waren deutlicher niedriger (~ -30% bei $\lambda = 450$ nm) als für flache Tumore (-10% bei $\lambda = 450$ nm). Im sichtbaren Spektralbereich wurde eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zum normalen Gewebe bis zu -160% bei massiven Tumoren gemessen. In Bereichen erhöhter Blutabsorption bei $\lambda = 420, 540$ und 580 nm wurden für massive Tumore Minima im Residuum festgestellt, was auf eine deutlich erhöhte Durchblutung dieser Gewebetypen gegenüber dem normalen Gewebe hinweist. Diese erhöhte Durchblutung wirkt sich somit indirekt förderlich auf eine Tumorunterscheidung im sichtbaren Spektralbereich aus, da sie mit einer Reduktion des Kollagensignals im

Tumor einhergeht (Zonios 96). Im ultravioletten Spektralbereich ist eine erhöhte Durchblutung allerdings hinderlich, da die Reabsorption der UV-Photonen, dem tumorbedingt erhöhten Tryptophansignal, entgegenwirkt.

Unter der Annahme, dass die Fluoreszenzintensität im sichtbaren Spektralbereich ein Indikator für die epitheliale Schichtdicke ist, zeigt dieser Vergleich, dass die fünf untersuchten flachen Tumore im Mittel im Bereich der Schichtdicke des normalen Gewebes liegen könnten. Die UV-Fluoreszenzintensität hingegen könnte evtl. darüber hinaus zusätzliche Informationen liefern, da sich dort ein deutlicherer Unterschied zum normalen Gewebe zeigte.

Zur Abschätzung des Potentials der Ratio-Bildung gegenüber der Auswertung der absoluten Intensitätswerte wurde die statistische Signifikanz für die Unterscheidbarkeit zwischen Tumor- und Normalgewebe (flache und massive Tumore zu normalem Gewebe und gutartigen Neoplasien) berechnet. Die Auswertung des Ratios zeigte gegenüber der Auswertung der absoluten Intensitätswerte eine signifikantere Unterscheidung (Ratio R: $p \leq 0,001$; $I(\lambda = 335 \text{ nm})$: $p \leq 0,05$; $I(\lambda = 450 \text{ nm})$: $p > 0,05$). Damit konnte gezeigt werden, dass sich für die Untergruppe der auf den Fluoreszenzstandard normierten Spektren ($n=59$) Vorteile durch die Ratio-Bildung ergeben.

In der Literatur findet sich nur eine weitere Untersuchung zur UVB (bzw. $\lambda = 308 \text{ nm}$) – angeregten Fluoreszenzspektroskopie an Urothelkarzinomen (Anidjar 96). Die Untersuchung wurde an 25 Patienten mit bereits nachgewiesenen Tumoren durchgeführt. Neben $\lambda = 308 \text{ nm}$ wurde noch $\lambda = 337 \text{ nm}$ und $\lambda = 480 \text{ nm}$ zur Anregung der jeweils gleichen Gewebeareale benutzt. Sowohl bei $\lambda = 337 \text{ nm}$ Anregung als auch bei $\lambda = 480 \text{ nm}$ Anregung wurde eine niedrigere Gesamtfluoreszenzintensität der malignen (CIS und papillären Tumore) Areale gegenüber den normalen Gewebearealen gemessen. Maligne Areale konnten bei diesen beiden Verfahren über die maximale Autofluoreszenzintensität mit einer statistischen Signifikanz von $p \leq 0,05$ von benignen Läsionen unterschieden werden. Zur Auswertung der $\lambda = 308 \text{ nm}$ angeregten Fluoreszenzemission wurde das empirisch gewählte Ratio $R = I(\lambda = 360 \text{ nm}) / I(\lambda = 440 \text{ nm})$ mit einem Schwellenwert von 2 zur Diskriminierung zwischen Spektren aus malignen und benignen Arealen herangezogen (siehe auch Kapitel IV.1.4). Mit diesem Schwellenwert wurden keine falsch-negativen, bzw. falsch-positiven Areale detektiert, was einer Sensitivität und Spezifität von 100% gleichbedeutend ist. Die Ergebnisse von Anidjar sind mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit vergleichbar, da ebenfalls erhöhte Ratio-Werte für Tumore (3,04) gegenüber normalen bzw. entzündeten Gewebe (0,87 und 1,28) gemessen wurden. Eine Bewertung des Algorithmus in Bezug auf frühe flache Tumore (CIS oder Dysplasie Grad II) ist nicht möglich, da sie nicht von massiven Tumoren getrennt aufgeführt wurden. Hinsichtlich der absoluten Intensitäts- und Ratio-Werte ist nur ein näherungsweise Vergleich möglich, da kein Intensitätsabgleich des Spektrometers

durchgeführt wurde und im ultravioletten eine längerwellige Fluoreszenzemission bei $\lambda = 360$ nm zur Auswertung herangezogen wurde (siehe auch Kapitel IV.1.4). Allerdings wurde hier ebenfalls, wie in der Untersuchung von Anidjar, durch die Ratio-Bildung eine signifikantere Diskriminierung ($p < 0,001$; von Tumor zu Normalgewebe) als durch die Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 440$ nm ($p \leq 0,05$) möglich.

Die deutlichen Unterschiede zwischen den Untersuchungen in Bezug auf Sensitivität und Spezifität könnten auf das sehr unterschiedliche Patienten- und Biopsiegut zurückgeführt werden (Tab. 13).

	Anidjar et al.	Hohla et. al.
Normal	22 (33%)	40 (24%)
Narben	0	10 (6%)
Benigne Neoplasien	13 (20%)	82 (49%)
Tumor	31 (47%)	35 (21%)
Total	66	167

Tab. 13: Vergleich der histopathologischen Zuordnung der untersuchten Areale.

In den Untersuchungen von Anidjar et al. stand ein Vergleich der verschiedenen Autofluoreszenzverfahren ($\lambda = 308$ nm, $\lambda = 337$ nm und $\lambda = 480$ nm Anregung) im Vordergrund, so dass ausschließlich Patienten mit bereits nachgewiesenen Tumoren in diese Untersuchung einbezogen wurden. In unserer Untersuchung wurde keine Vorauswahl der Patienten vorgenommen, so dass nur bei 21 der 51 Patienten maligne Läsionen in der Blase festgestellt wurden. In den restlichen 30 Patienten wurden zu 90% benigne neoplastische Läsionen gefunden. Dies könnte begründen, warum in unserer Untersuchung eine wesentlich größere Anzahl von benignen Neoplasien und Narben gefunden wurden ($6\% + 49\% = 55\%$ in unserer Untersuchung gegenüber 20% bei Anidjar et al.) und sich dadurch auch eine geringere Spezifität der Methode ergab. Unsere Untersuchung zeigt deutlich, dass mit der $\lambda = 308$ nm angeregten Spektroskopie und Ratio-Auswertung unter realistischen Bedingungen keine 100%-ige Sensitivität und insbesondere Spezifität erreicht werden kann.

Der Großteil der spektroskopischen Autofluoreszenzuntersuchungen in der Blase wurde mit Anregungslicht zwischen $\lambda = 337$ nm und $\lambda = 480$ nm durchgeführt (Anidjar 96, D'Hallewin 94, Baert 93, Koenig 96). Mit diesen Anregungswellenlängen kann die Tryptophanfluoreszenz nicht mehr angeregt werden, allerdings lassen sich wie unter $\lambda = 308$ nm Anregung Strukturproteine aus dem Stroma zu Fluoreszenz anregen (siehe Kapitel I.5.2 und (Zonios 96).

Baert et al. (Baert 93) haben die Fluoreszenzemissionsspektren bei $\lambda = 337$ nm und $\lambda = 405$ nm Anregung gemessen. Bei Anregung mit $\lambda = 337$ nm und einem Ratio $R = I(\lambda = 460 \text{ nm})/I(\lambda = 400 \text{ nm})$ konnten sichtbare papilläre Tumore gut von normalem Gewebe unterschieden werden. Bei $\lambda = 405$ nm Anregung war die Fluoreszenzintensität in manchen Fällen niedriger als die Fluoreszenzintensität normalen Gewebes.

D'Hallewin et al. (D'Hallewin 94) untersuchten die Fluoreszenzemission von normalem und malignem neoplastischem Urothel bei $\lambda = 355$ nm und $\lambda = 365$ nm Anregung. Die Fluoreszenzintensitätsverteilung von malignem (massive Tumore als auch CIS) Gewebe war identisch zu dem des normalen Blasengewebes. Jedoch konnte als Unterscheidungsmerkmal sowohl für Carcinoma in situ als auch für papilläre Tumore eine jeweils reduzierte Fluoreszenzintensität (2,6 fach bei Carcinoma in situ und 3,2 fach bei papillären massiven Tumoren) gegenüber normalem Gewebe gemessen werden.

Aus den Messungen von Anidjar et al., D'Hallewin et al. und Baert et al. geht eine konsistent niedrigere Autofluoreszenzintensität des Tumorgewebes gegenüber dem normalen Gewebe hervor. Flache Tumore unterscheiden sich in der Autofluoreszenzintensität weniger von normalem Gewebe als massive Tumore. Im sichtbaren Spektralbereich ab $\lambda \sim 420$ nm außerhalb der Tryptophanemission wurde auch bei unseren Messungen eine Absenkung der Autofluoreszenzintensität gemessen (siehe Kapitel III.1.1.1). Daher ist davon auszugehen, dass ähnliche Mechanismen bei der Diskriminierung in diesem Spektralbereichen eine Rolle spielten (siehe Kapitel I.6).

Koenig et al. (Koenig 96) benutzten die Wellenlängen $\lambda = 337$ nm zur Anregung der Autofluoreszenz von 35 Zystitiden (25 chronische und 11 akute), 42 normalen Arealen, 28 Karzinomen und einer Carcinoma in-situ-Läsion. Ein Vergleich der Spektren von normalem entzündetem und malignem Gewebe zeigte, dass Tumorgewebe im Gegensatz zu normalem als auch entzündetem Gewebe nur ein Maximum bei $\lambda = 455$ nm aufweist, normales Gewebe und entzündetes Gewebe dagegen ein weiteres bei $\lambda = 385$ nm. Über ein binäres Auswerteverfahren mit einem Ratio $R = (I(\lambda = 385 \text{ nm})/I(\lambda = 455 \text{ nm}))$ konnte eine Sensitivität und Spezifität von 97% und 98% erzielt werden. Dysplasien (7, keine Stadienangabe) konnten nicht von normalem Gewebe differenziert werden. Eine weitere Untersuchung an 130 Biopsien aus unter Weißlicht tumorverdächtigen Arealen wurde daran angeschlossen (Koenig 98), wobei der gleiche Auswertalgorithmus verwendet wurde. In dieser Untersuchung wurde keine biopsiebezogene Auswertung der Sensitivität und Spezifität durchgeführt. Aus einer Box-Plot-Auftragung der nicht-malignen Läsionen, der massiven Tumore und der CIS geht vergleichbar mit unseren Messungen (siehe Abb. 23, Seite 58) eine deutliche Überlappung der Ratio-Werte der CIS Läsionen (6) und der nicht-malignen Läsionen (107) hervor.

Die umfangreichen Untersuchungen von König et al. (Koenig 96, Koenig 98) und unsere Messungen, die jeweils bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen ($\lambda = 337 \text{ nm}$ und $\lambda = 308 \text{ nm}$) durchgeführt wurden, machen die prinzipiellen Grenzen spektroskopischer Verfahren in der Blase deutlich. Insbesondere neoplastische, flache Läsionen können nicht immer von benignen Läsionen unterschieden werden. Dies wird in der Blase noch durch einen weiteren Aspekt erschwert: die Abschilferung maligner Zellen (Hudson 95, Amin 97). Die Abschilferung maligner Zellen oder Zellverbände führt oft dazu, dass punktuell innerhalb des Tumoreals die Anzahl der Zelllagen teilweise im Bereich normalen Epithels oder sogar darunter liegt. Auch gibt es oft größere Bereiche, in denen das Urothel gänzlich abgelöst ist. Daraus wird deutlich, dass man in der Diagnostik der Blasenschleimhaut nicht um ein sensibles bildgebendes Verfahren umhinkommt. Bildgebende Verfahren bieten im Gegensatz zu spektroskopischen Verfahren die Möglichkeit der Mustererkennung, wodurch zum Beispiel Inhomogenitäten, wie teilweise abgeschilferte Carcinoma in-situ-Bereiche durch den Gesamteindruck des Bildes trotzdem abgegrenzt werden können und das übergeordnete Areal und dessen Grenzen besser wahrgenommen werden. Die UVB-angeregte Autofluoreszenzdiagnostik mit der Ratio-Auswertung verschiedener Spektralbereiche kann prinzipiell auch als eigenständiges bildgebendes Verfahren umgesetzt werden. Mit UV-transmittierender Endoskopoptik, einem UV-empfindlichen Kamerasystem und einer intensiven UVB-Lichtquelle lässt sich ein Diagnose-System realisieren (Sedlmeier 00). Jedoch ist in Hinblick auf die nicht grundsätzlich wesentlich bessere Spezifität dieser Methode gegenüber der AFE der technologisch hohe Aufwand in Frage zu stellen.

Eine Ergänzung bildgebender Verfahren (wie der AFE) durch punktuelle spektroskopische Verfahren (wie der 308 nm angeregten Autofluoreszenzdiagnostik mit Hilfe von Fasersonden) zur Verbesserung der Spezifität ist prinzipiell vorstellbar. Allerdings sollte die Sensitivität des spektroskopischen Verfahrens im Bereich der Sensitivität der bildgebenden Diagnostik liegen. In dieser Untersuchung konnte dies nicht gezeigt werden. Durch das Problem der Zellabschilferung in malignen Bereichen sollte ein spektroskopisches Autofluoreszenzverfahren möglichst unabhängig von Schichtdickeneffekten sein. Allerdings hat sich in der Autofluoreszenzdiagnostik noch kein Verfahren etablieren können, das biochemische Veränderungen innerhalb des Tumorzellverbandes sichtbar macht.

2.3.2 Bronchialkarzinom

In der Lunge wurden 39 (9 maligne und 30 benigne) Areale von 11 Patienten spektroskopisch untersucht. Mit einem Ratio $R = I(\lambda = 340 \text{ nm})/I(\lambda = 425 \text{ nm})$ ergab sich die beste Diskriminierungsmöglichkeit zwischen Tumor- und Normalgewebe. Mit diesem Ratio konnten

maligne Areale hoch signifikant ($p < 0,0001$) von benignen unterschieden werden. Mit einem binären Auswertalgorithmus und einem Schwellenwert von 8,5 wurde eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 75% bestimmt. Bei der Berechnung der Sensitivität wurde ein falsch-negatives nekrotisches Gewebeareal unterschlagen. Nekrotische Tumorareale sind im allgemeinen unter Weißlicht deutlich erkennbar, und die Verbesserung der Diagnostizierbarkeit besitzt daher klinisch keinen besonders hohen Stellenwert. In der Untersuchung waren auch zwei dysplastische Areale (Grad I und III) enthalten. Sie wurden beide mit der AF-308 positiv diagnostiziert (im Ergebnisteil nicht beschrieben).

Aus der Literatur ist nur eine *in-vitro*-Messung bekannt, in der exemplarisch zwei Biopsien, eine Tumor- und eine Normalgewebebiopsie der Lunge, spektroskopisch mit UVB-Licht-Anregung untersucht wurden (Alfano 91). Vergleichbar mit unseren Messungen wurde im Tumor im Vergleich zum Normalen Gewebe eine erhöhte Tryptophan- und gleichzeitig reduzierte Fluoreszenzintensität im sichtbaren Spektralbereich gemessen. *In-vivo*-Messungen zur UVB-angeregten Autofluoreszenzmessungen wurden bisher nicht publiziert.

Die bisher umfangreichsten Untersuchungen zur Autofluoreszenzdiagnostik in der Pulmologie wurden mit bildgebenden Verfahren vorgenommen. Diese bildgebenden Autofluoreszenzverfahren mit schmal- bzw. breitbandigem Anregungslicht zwischen $\lambda = 370$ nm und $\lambda = 460$ nm wurden bereits von mehreren Firmen (Storz GmbH, Deutschland (D-Light AF-System); Xillix Technologies Corp., Kanada (LIFE-System), Pentax GmbH, Deutschland (Safe1000 Autofluorescence-System)) aufgegriffen und technisch umgesetzt. Die umfangreichste Auswertung einer multizentrischen Studie wurde 1998 von Lam et al. (Lam 98) publiziert. Sie umfasste 173 Patienten und 700 Biopsien. Darin wurde die Weißlichtdiagnostik (WLD) mit einer Kombination aus Weißlichtdiagnostik und Autofluoreszenzdiagnostik (WLD + AF) verglichen. Auf Basis einer biopsiebezogenen Auswertung konnte die Sensitivität für die Diagnostik von Tumorfrühstadien (CIS und Dysplasien Grad II, bzw. III; Anzahl der Biopsien $n=102$) von 8,8% (WLD) auf 56% (WLD + AF) verbessert werden.

Die relative Sensitivitätsverbesserung von 8,8% auf 56% (Faktor 6,8) stellt eine erhebliche Verbesserung für die Diagnostik der Bronchialkarzinome gegenüber der herkömmlichen Weißlichtdiagnostik dar. Allerdings wurden über Randombiopsien außerhalb tumorverdächtiger Areale („verdächtig“ unter WLD + AF) ein beachtlicher Anteil an 45 CIS und Dysplasien Grad II und III gefunden.

Die Anwendung der $\lambda = 308$ nm angeregten Autofluoreszenzdiagnostik könnte hier eventuell eine Verbesserung der Sensitivität erzielen. Die Ergebnisse aus der Urologie weisen darauf hin, dass die Ratio-Bildung insbesondere bei der Diagnostik von Tumorfrühstadien gegenüber der Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität im sichtbaren Spektralbereich

deutlichere Unterschiede liefert (siehe Kapitel IV.2.3.1). Weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Tumorfrühstadien aus den Bronchien sollten dies erhärten.

Darüber hinaus könnte sich durch die kurzweilige Anregung ein weiterer Vorteil gegenüber der Anregung mit blau-violettem Licht ergeben:

In der bildgebenden Autofluoreszenzbronchoskopie wird ein längs gestreiftes Bild der normalen Bronchien beobachtet (Goujon 01). Als Grund für dieses streifenförmigen Bild wird der geschichtete Aufbau der Bronchien mit den längs zur Luftröhre verlaufenden Knorpelspangen diskutiert. Die Knorpelspangen, die ungefähr 700 – 800 μm unterhalb der Oberfläche liegen, fluoreszieren stärker als die Kollagen und Elastinfaserbündel dazwischen (Qu 95). Durch die hohe Eindringtiefe des blau-violetten Lichts von bis zu $\sim 1,5$ mm bei $\lambda = 460$ nm (siehe Kapitel I.5.3) werden die Knorpelspangen zur Fluoreszenz angeregt, die sich dann bei der Autofluoreszenzbildgebung deutlich heller als die dazwischenliegenden Abschnitte darstellen.

Mit $\lambda = 308$ nm könnte durch die vergleichsweise geringe Eindringtiefe von 80 – 100 μm nur die oberste Schicht bis knapp unterhalb des Epithels und damit keine Knorpelstangen mehr zur Fluoreszenz angeregt werden. Dies hätte den Vorteil, dass Schwankungen der Fluoreszenzintensität innerhalb des Normalgewebes bei $\lambda = 308$ nm Anregung niedriger als bei Anregung mit blau-violettem Licht ausfallen würden. In dieser Arbeit wurde dazu allerdings kein konkreter Vergleich der Variationen der verschiedenen Anregungskonfigurationen am normalen Bronchialepithel durchgeführt. Ein indirekter Vergleich der Normalgewebeschwankungen des Bronchialepithels mit den Normalgewebeschwankungen des Urothels könnte allerdings einen Hinweis auf die Richtigkeit der Behauptung geben, da das Urothel der Blase im Gegensatz zum Bronchialepithel keine strukturellen Unterschiede (z.B. Knorpelspangen) im Bindegewebe zeigt. Im normalen Bronchialepithel wurden Variationen von $\pm 35\%$ ($n=9$) und im Urothel von $\pm 45\%$ ($n=13$) gemessen (Vergleich bei Emissionswellenlänge $\lambda = 450$ nm; nicht im Ergebnisteil dargestellt). Die Schwankungen im Bronchialepithel fallen demnach statistisch sogar geringer als im Urothel aus, obwohl dort sehr wahrscheinlich Bereiche mit und ohne Knorpelspangen vermessen wurden. In bildgebenden und spektroskopischen Verfahren bei $\lambda = 308$ nm Anregung würden durch die geringere Eindringtiefe des Anregungslichtes kleinere Schwankungen im Normalgewebe auftreten. Dies würde bedeuten, dass bei einem binären, schwellenwertbezogenen Algorithmus bessere Ergebnisse bezüglich der Sensitivität und Spezifität zu erwarten sind.

Bei der Diagnostik von Bronchialkarzinomen wurden im Vergleich zu den Untersuchungen aus den anderen Organen die besten Ergebnisse in Bezug auf Sensitivität und Spezifität erzielt. Die UVB-angeregte Autofluoreszenzdiagnostik mit der Ratio-Auswertung verschiedener Spektralbereiche wäre infolgedessen insbesondere in diesem Fachbereich in Erwägung zu

ziehen. Jedoch sollten in Hinblick auf den hohen technologischen Aufwand erst umfangreichere spektroskopische Untersuchungen, vor allem an vielen Patienten mit Tumorfrühstadien, durchgeführt werden.

2.3.3 Zervikale intraepitheliale Neoplasie

In der Gynäkologie wurden bei 8 Patientinnen insgesamt 48 Areale im Bereich der Transformationszone untersucht. Die Auswertung der Höhenliniendiagramme ergab im Mittel ein minimal ($\sim +20\%$) erhöhte Ratio $R = I(\lambda = 335 \text{ nm})/I(\lambda = 450 \text{ nm})$ maligner gegenüber benigner Areale. Die Diskriminierung war dabei nicht signifikant ($p > 0,05$). Eine Auftragung der gemessenen Ratios gegen die unterschiedlichen Schweregrade der CIN ergab auch keine systematische Korrelation des Ratios zum Schweregrad der CIN. Auch in einer Auftragung der Absolutwerte der Fluoreszenzemission bei $\lambda = 333 \text{ nm}$ und $\lambda = 450 \text{ nm}$ ließen sich keine Unterschiede zwischen gut- und bösartigem Gewebe ableiten (nicht im Ergebnisteil dargestellt). Insbesondere scheinen hohe Schwankungen der Ratios des normalen Gewebes innerhalb und außerhalb der Transformationszone eine Unterscheidung zu verhindern.

In unserer Untersuchung wurden nur bei wenigen Patientinnen stichprobenartig Biopsien entnommen. Die histologische Zuordnung der nicht biopsierten Areale zu den Spektren wurde anhand dieser Referenz und des kolposkopischen Befundes durch den behandelnden Arzt durchgeführt. Unklare und fragwürdige Bereiche wurden nicht in die Untersuchung aufgenommen. Die Sensitivität und Spezifität der kolposkopischen Diagnostik hängt entscheidend von der Erfahrung des behandelnden Arztes ab, wodurch die hier vorgenommene Einteilung subjektiv fehlerbehaftet ist (siehe Kapitel I.8.3). Die hier durchgeführten, vorläufigen Untersuchungen dienten allerdings vielmehr der Abschätzung des diagnostischen Potentials der $\lambda = 308 \text{ nm}$ angeregten Autofluoreszenzdiagnostik. Unterschiede zwischen dysplastischem und benignem Gewebe sollten sich aber aufgrund der großen Erfahrung von Herrn Dr. Hillemanns bei der Kolposkopie und seiner Sicherheit in der Diagnosestellung nach dieser vorläufigen Untersuchung dennoch abzeichnen.

Glassmann et al. (Glassman 92) haben die Fluoreszenz-Emissionsspektren von normalem gynäkologischem Gewebe und Karzinomgewebe aus unterschiedlichen Bereichen des Uterus, Zervix und der Ovarien *in-vitro* bei Anregung mit $\lambda = 300 \text{ nm}$ gemessen. Für ein Ratio $R = I(\lambda = 340 \text{ nm})/I(\lambda = 440 \text{ nm})$ wird berichtet, dass malignes Gewebe höhere Ratios gegenüber normalem Gewebe zeigt. Die Untersuchungen an den Zervixbiopsien wurden an vier benignen und vier malignen Gewebeproben von ausschließlich okkulten Tumoren durchgeführt. Der relative Kontrast der Mittelwerte der Ratios betrug $\sim 1,8$. Diese Untersuchung zeigt, dass es eventuell möglich ist, höhermaligne Bereiche durch die UV-angeregte

Ratio-Methode von normalem Gewebe zu unterscheiden. Allerdings lassen sich *in-vitro* gewonnene Ergebnisse nur eingeschränkt auf die *in-vivo*-Situation übertragen (siehe Kapitel IV.1.3).

In der Diagnostik der zervikalen Dysplasie mittels Autofluoreszenzspektroskopie wurden und werden die umfangreichsten Untersuchungen von Richards-Kortum und Mitarbeitern durchgeführt. Für eine ausführliche Darstellung der Literatur zur spektroskopischen Diagnostik der CIN sei hier auf die Publikation von Ramanujam verwiesen (Ramanujam 00).

In den neuesten Untersuchungen von Ramanujam et al. (Ramanujam 96b) wurden mit einer Reihe verschiedener Anregungswellenlängen $\lambda = 337 \text{ nm}$, 380 nm und 460 nm und unter Verwendung eines aufwändigen Auswertalgorithmus über Bayes-Theorem und PCA (Principal Component Analysis) eine Sensitivität und Spezifität von 82% und 68% auf prospektiver Basis erreicht. Wegen hoher inter- und intraindividuelle Variationen wurden auch hier die spektroskopischen Daten vorbehandelt. Dies geschieht über eine zweifache Normierung. Erst wurden die Daten auf die maximale Fluoreszenz normiert. Anschließend wurde der Mittelwert dieser Spektren gebildet und das Residuum aus den einzelnen Spektren zu diesem Mittelwert berechnet. Ausschließlich dieses Residuum wurde für die weitere Auswertung durch die PCA genutzt.

Mit der bildgebenden Autofluoreszenzdarstellung (Weingandt 99) unter Fluoreszenzanregung im blau-violetten Wellenlängenbereich konnte bisher keine signifikante Unterscheidung zervikaler Neoplasien erzielt werden. Die Autofluoreszenzintensität außerhalb der Transformationszone ist höher als innerhalb der Transformationszone. Zudem wurden hohe Schwankungen (bis zu 400%) schon in normalem Gewebe gemessen, wodurch sich eine geringere Fluoreszenzintensität in den Neoplasien erst ab einer CIN III bemerkbar machte.

Die Untersuchungen von Weingandt et al. (Weingandt 99) und Ramanujam et al. (Ramanujam 96b) zeigen ähnlich zu unseren Untersuchungen, dass bereits in der normalen Zervix hohe inter- und intraindividuelle Schwankungen der absoluten Fluoreszenzintensität gemessen werden. Bei der Entwicklung neuerer bildgebende Verfahren sollten diese Variationen daher besonders in diesem Anwendungsgebiet von vorneherein in Betracht gezogen werden. Abgesehen von den Variationen zeichnen sich nach unserer Auswertung mit der $\lambda = 308 \text{ nm}$ angeregten Autofluoreszenzspektroskopie keine Unterschiede zwischen dysplastischem und benignem zervikalem Gewebe ab.

2.3.4 Malignom der Mundhöhle

In der Mundhöhle wurden insgesamt 41 (9 maligne und 32 benigne) Areale von 7 Patienten spektroskopisch untersucht. Die Auswertung der Höhenliniendiagramme ergab das signifikanteste Ratio bei $R = I(\lambda = 340 \text{ nm})/I(\lambda = 560 \text{ nm})$ mit einem T/N Kontrast von $\sim 3,5$. Trotz dieses hohen Kontrastes konnten die Tumor- von den Normalgeweberatios nicht signifikant unterschieden werden ($p \geq 0,05$). Auch hier werden hohe Schwankungen der Ratios innerhalb des normalen Gewebes (79%) als Ursache für das schlechte Resultat gewertet (siehe Kapitel IV.2.2). Auf Basis eines binären Schwellwertauswerteschemas erscheint daher auch keine Diskriminierung zwischen gut- und bösartigem Gewebe möglich.

Kolli et al. (Kolli 95d, Kolli 95a) haben als erste Fluoreszenzemissions- und Anregungsspektren von normaler und tumoröser Mucosa der Mundschleimhaut von 31 Patienten *in-vivo* mit untersucht. Mit Anregungslicht bei $\lambda = 300 \text{ nm}$ und einem Ratio von $R = I(\lambda = 340 \text{ nm})/I(\lambda = 440 \text{ nm})$ wurde patientenindividuell durch einen „paired student t-test“ eine signifikante Diskriminierung ($p < 0,05$) zwischen dem Tumor- und dem Normalgewebe bestimmt. Für die Normalgewebespektren errechnete sich ein Ratio von $17,6 \pm 1,6$ und für die Tumorgewebespektren ein Ratio von $21,1 \pm 1,68$. Aufgrund dieser deutlichen Überlappung der Normal- und Tumorgewebespektren wurde keine Sensitivität und Spezifität ausgerechnet. Die Spektren normaler als auch maligner Mundschleimhaut zeigten einen mit unseren Messungen vergleichbaren spektralen Intensitätsverlauf. Die patientenindividuell signifikanten Unterschiede zwischen den Tumor- und Normalgeweberatios könnten darauf zurückgeführt werden, dass in dieser Untersuchung das Normalgewebespektrum aus dem jeweils vom Tumor aus gesehen gegenüberliegenden Areal in der Mundhöhle gemessen wurde. Hohe Schwankungen der Ratios innerhalb der Mundhöhle fallen dadurch nicht so stark ins Gewicht, da die gegenüberliegenden Areale in ihrem histologischen Aufbau vergleichbar sind (siehe Kapitel IV.2.2).

Ähnlich wie in der Diagnostik der CIN wurden bei den neuesten spektroskopischen Untersuchungen in der Mundhöhle eine Reihe von Anregungswellenlängen benutzt, wodurch bessere Ergebnisse bezüglich Sensitivität und Spezifität gegenüber der Verwendung von ausschließlich einer Anregungswellenlänge erzielt wurden (Heintzelman 00b, Gillenwater 98, Dhingra 96).

Die Untersuchung von Heintzelman et al. (Heintzelman 00b) diente dazu, mit statistischen Verfahren die optimalen Anregungs- und Detektionswellenlängenbereiche zu ermitteln. Die Anzahl der möglichen Anregungswellenlängen wurden dabei von 17 auf zwei ($\lambda_{\text{ex}}=350 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{ex}}=400 \text{ nm}$) reduziert. Als Detektionswellenlänge diente ausschließlich die Wellenlänge $\lambda = 472 \text{ nm}$. In einem Validationsset von 53 freiwilligen Probanden ohne Tumoren und drei

Patienten mit Karzinomen oder Verdacht auf Karzinomen wurde eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 98% bestimmt.

Zur bildgebenden Diagnose von Malignomen in der Mundhöhle gibt es zwei größer angelegte Untersuchungen (Kulapaditharom 98, Betz 99) mit breit- ($\lambda = 380 - 450 \text{ nm}$, Betz 99) und schmalbandigem ($\lambda = 442 \text{ nm}$, (Kulapaditharom 98) Anregungslicht. Gemeinsam ist diesen Untersuchungen, dass im Bereich des Tumors geringere Autofluoreszenzintensitäten im Vergleich zum umliegenden Normalgewebe gemessen werden.

Auf Basis der bisher umfangreichsten Untersuchung an insgesamt 85 tumorverdächtigen Patienten kamen Betz et al. (Betz 99, Betz 00) zu der abschließenden Bewertung, dass die Autofluoreszenzbildgebung subjektiv (durch ein Drei-Klassen-Bewertungssystem) und objektiv (durch Auswertung der spektral gemessenen Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 511 \text{ nm}$) der Weißlichtdiagnostik klar unterlegen ist. Als Grund dafür werden in erster Linie die ebenfalls hohen inter- und intraindividuellen Variationen hinsichtlich der Autofluoreszenzintensitäten und -verteilungen im normalen Gewebe angegeben.

Der Vergleich der *in-vivo*- (Spektroskopie) und *in-vitro*- (Fluoreszenzmikroskopie) Spektren zeigte, dass die Fluoreszenzintensitätsverteilung von Gewebe aus der Mundhöhle und der Zervix miteinander vergleichbar zu sein scheint. In der Mundhöhle sowie auf der Zervix wurden stark variable Fluoreszenzratios ermittelt. Allerdings wurden in der Mundhöhle insbesondere okkulte Tumore und keine Tumorfrühstadien wie intraepitheliale, zervikale Neoplasien untersucht. Dies könnte einen Grund dafür darstellen, dass bedingt durch die starken morphologischen und biochemischen Unterschiede okkulte Tumore im Vergleich zum Normalgewebe dennoch im Mittel einen deutlichen Kontrast zwischen Tumor- und Normalgewebe besitzen.

2.3.5 Gliom

Es wurden insgesamt 82 Biopsien von Patienten mit größtenteils niedermalignen Tumoren (8 Patienten), Patienten mit hochmalignen Tumoren (2 Patienten) und Patienten ohne nachweisbaren Tumoren ($n=2$) unmittelbar nach der Biopsie-Entnahme *in-vitro*-spektroskopisch untersucht. In der Auswertung wurde der Schwerpunkt auf die Frage der Abgrenzbarkeit niedermaligner Tumore von normalen Gewebe gelegt. Die beste Diskriminierungsmöglichkeit ergab sich für ein Fluoreszenzemissions-Ratio $R = I(\lambda = 360 \text{ nm})/I(\lambda = 575 \text{ nm})$ mit einem Maximalwert des Kontrastes von $\sim 2,2$. Mit diesem Ratio konnten sowohl Biopsien mit soliden als auch diffus infiltrierenden Anteilen niedermaligner Tumore (WHO Grad II) signifikant von normalem Gewebe unterschieden werden.

Eine Unterscheidung hochmaligner Tumore von normalem Gewebe mit diesem Ratio erscheint nicht möglich ($p > 0,05$). Dies bestätigt sich auch durch eine im Mittel etwa gleich hohe Fluoreszenzintensität hochmaligner Tumor-Biopsien wie auch normaler Biopsien im Emissionswellenlängenbereich ab $\lambda \sim 500$ nm. Allerdings wird im blau-violetten Spektralbereich ebenfalls eine Reduktion der Fluoreszenzintensität gegenüber normalem Gewebe gemessen. Dies zeigt sich besonders ausgeprägt im Bereich der Soret-Bande des Hämoglobins bei $\lambda \sim 420$ nm. Eine Auswertung in anderen Spektralbereichen für den Nenner des Ratios könnte daher ebenfalls eine Diskriminierung dieser Tumorentität möglich machen. Aufgrund der niedrigen Anzahl an Biopsien dieser Tumorklasse ($n=14$) und dem Schwerpunkt auf niedermaligne Tumore wurde in diesem Fall von einer gesonderten Auswertung abgesehen. Gründe für diese Unterschiede zu den Ergebnissen für niedermaligne Tumore könnten in der unterschiedlichen biochemischen Zusammensetzung der Gliome liegen. Bei hochmalignen Tumoren wird im Gegensatz zu niedermalignen Tumoren eine erhöhte Exprämierung an Kollagen IV in der extrazellulären Matrix (ECM) gemessen (Chintala 96). Darüber hinaus ist bei dieser Tumorklasse von einer im Schnitt höheren Stoffwechselaktivität auszugehen (Mangiardi 90).

Die schwellenwertbezogene Auswertung der Spektren von diffusen als auch soliden niedermalignen Biopsien ergab eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 42% (bei Schwellwert 85). Die hohe Spezifität ist von Interesse, da in der Neurochirurgie die Entnahme normalen Gewebes aus eloquenten Bereichen zu vermeiden ist (siehe Kapitel I.9). Solide Bereiche konnten sogar mit einer gegenüber diffusen Bereichen verbesserten Sensitivität von $\sim 79\%$ von normalem Gewebe unterschieden werden. Bei sechs Patienten mit niedermalignen Tumoren wurde neben dem Tumorgewebe auch normales Gewebe entnommen und spektroskopisch untersucht. In dieser patientenindividuellen Auswertung wurden konsistent erhöhte Ratios für niedermaligne Tumore (solide und diffus) gegenüber normalem Gewebe gemessen ($p \leq 0,05$).

Diese Untersuchungen wurden im Gegensatz zu den Untersuchungen in den anderen Fachbereichen an *in-vitro*-Biopsien durchgeführt. Die *in-vitro*-Spektroskopie an Biopsien ist gegenüber der *in-vivo*-Untersuchungen stärker fehlerbehaftet, da bei der Entnahme die Blutzufuhr (Zuluaga 99) unterbrochen wird und sich die Gewebeoxidation (Schomacker 92a) innerhalb kurzer Zeit ändern kann. Aufgrund der begrenzten Größe der Biopsien können wellenlängenabhängige Verluste entstehen, wodurch die detektierten Spektren nicht der *in-vivo*-Situation entsprechen (Welch 97). Diese *in-vitro*-Untersuchungen können daher nur eine Abschätzung über die diagnostischen Möglichkeiten der UVB-angeregten Fluoreszenzspektroskopie an Gehirngewebe liefern, und die erzielten Ergebnisse sollten an weiteren *in-vivo*-Untersuchungen erhärtet werden.

Zur UVB-angeregten Fluoreszenzspektroskopie *in-vitro* an Biopsiematerial wurde auch eine limitierte Untersuchung an Biopsien von 5 Patienten von Avrillier et al. (Avrillier 93) vorgenommen. In dieser Publikation wird von drei verschiedenen, schmalbandigen Fluoreszenzpeaks bei $\lambda = 352, 362$ und 383 nm berichtet, die nicht mit den hier aufgezeichneten Spektren in Einklang zu bringen sind. Vor allem die Schmalbandigkeit des Fluoreszenzpeaks bei $\lambda = 362$ nm (FWHM ~ 10 - 15 nm) weist auf Messartefakte hin, da bisher keine endogenen Fluorophore mit solch scharfen Emissionspeaks bekannt sind.

Spektroskopische, interoperative Autofluoreszenzmessungen (Montan 87) nach Anregung mit $\lambda_{\text{ex}}=337$ nm zeigen eine spektrale Differenzierbarkeit von Meningeomen, nicht aber diffuser Astrozytome gegenüber dem normalen Kortex.

Spektroskopische Messungen an Resektionsgrenzen von diffusen Astrozytomen am Kortex, dem Marklager und in neoplastischen Läsionen *in-vivo* nach Anregung bei $\lambda_{\text{ex}}=366$ nm weisen im Gegensatz dazu auf eine verringerte Fluoreszenzintensität und eine spektrale Rotverschiebung um ca. $\lambda = 20$ nm des malignen Gewebes im Vergleich zum Normalgewebe hin (Bottiroli 98). Von den fünf untersuchten Patienten besaß einer nieder- als auch hochmaligne Tumorareale. Die niedermalignen Tumorareale zeichneten sich gegenüber dem höhermalignen Tumorarealen (WHO Grad III) durch eine im Mittel doppelt so hohe Fluoreszenzintensität aus, konnten aber dennoch vom normalen Kortex und Marklager differenziert werden.

Erst kürzlich wurde eine klinische Studie an 26 Patienten veröffentlicht (Lin 01), in der tumorverdächtige Areale fasergestützt spektroskopisch sowohl mit UV-Licht bei $\lambda = 337$ nm als auch mit Weißlicht ($\lambda = 350$ nm – 700 nm) *in-vivo* untersucht wurden. Mit Hilfe eines empirisch ermittelten Auswertalgorithmus, der das Intensitätsverhältnis der Fluoreszenz und der Remission bei $\lambda = 460$ nm und zusätzlich die absolute Intensität des remittierten Lichtes bei $\lambda = 635$ nm einbezieht, wurde eine Sensitivität von 100% bei einer Spezifität von 76% erreicht. In dieser Untersuchung wurde nicht zwischen hoch- und niedermalignen Tumoren differenziert, so dass keine konkreten Aussagen über die Möglichkeiten der Diskriminierung dieser klinisch bedeutenden Tumorphänotypen vorgenommen werden kann.

Bei den hier zitierten Arbeiten anderer Arbeitsgruppen wurde keine Differenzierung in hoch- bzw. niedermaligne Tumore vorgenommen. Niedermaligne Tumore wurden nur in Einzelfällen mit in die Untersuchung aufgenommen (Lin 01, Bottiroli 98), jedoch nicht getrennt ausgewertet. Da die 5-ALA induzierte Fluoreszenzdiagnostik bei niedermalignen Tumoren nicht angewendet werden kann und diese Tumore gegenüber den hochmalignen Tumoren in der Regel noch schwieriger unter Weißlicht zu erfassen sind, kommt dieser Tumorentität ein besonders hoher Stellenwert zu (siehe Kapitel I9). In dieser Untersuchung wurden zum ersten mal niedermaligne Tumore systematisch über die Autofluoreszenzspektroskopie untersucht.

Mit einer hohen Spezifität von 100% zusammen mit einer Sensitivität von 42% für diffuse und 79% für solide Tumore könnte die UVB-angeregte Autofluoreszenzspektroskopie daher eine sinnvolle Ergänzung zu der bisherigen Weißlichtdiagnostik darstellen. Allerdings sollten die Ergebnisse durch weitere *in-vivo*-Untersuchungen erhärtet werden. Der einfache Ratio-Algorithmus der UVB-angeregten Autofluoreszenz bietet gegenüber dem komplexen Auswerteverfahren von Lin et al. darüber hinaus eine spätere Umsetzung in ein bildgebendes Verfahren.

2.4 Wertigkeit der Untersuchungen für die Diagnose von Tumoren in verschiedenen Fachdisziplinen

In diesem Abschnitt sollen anhand einer Gegenüberstellung (Tab. 14) die wichtigsten Ergebnisse aus den verschiedenen Fachdisziplinen in Bezug auf Ihre Wertigkeit miteinander verglichen werden.

	Patienten Auswertalgorithmus Kontrast T/N	Signifikanz Sens. + Spez.
Blase <i>Urothelkarzinom</i>	167 Biopsien von 51 Patienten <u>bestes Ratio:</u> $R = I(\lambda = 337 \text{ nm})/I(\lambda = 450 \text{ nm})$ T/N (flache Tumore) = 2,2 T/N (pap. + sol. Tumore) = 4,5	Tumore (flach) zu Normal $p=0,08$ Tumore (pap. + sol.) zu Normal $p<0,0001$ Sensitivität 95%; Spezifität 64%
Lunge <i>Bronchialkarzinom</i>	39 Biopsien von 11 Patienten <u>bestes Ratio:</u> $R = I(\lambda = 340 \text{ nm})/I(\lambda = 425 \text{ nm})$ T/N = 4	Tumor zu Normal $p<0,001$ Sensitivität 100% Spezifität 74%
Portio uteri <i>Zervikale intraepitheliale Neoplasie</i>	48 Areale von 8 Patienten <u>bestes Ratio:</u> $R = I(\lambda = 333 \text{ nm})/I(\lambda = 450 \text{ nm})$ CIN(I-III) / N = 1,2	CIN(I-III) zu Normal $p>0,05$
Mundhöhle <i>Malignom</i>	41 Areale von 7 Patienten <u>bestes Ratio:</u> $R = I(\lambda = 340 \text{ nm})/I(\lambda = 560 \text{ nm})$ T/N = 3	Tumor zu Normal $p>0,05$

	Patienten Auswertalgorithmus Kontrast T/N	Signifikanz Sens. + Spez.
Gliome <i>Niedermaligne Astrozytome (WHO Grad II)</i>	82 Biopsien von 12 Patienten <u>bestes Ratio:</u> $R = I(\lambda = 360 \text{ nm})/I(\lambda = 575 \text{ nm})$ T/N = 2,2	Tumor zu Normal $p < 0,05$ Sensitivität 42% Spezifität 100%

Tab. 14: Zusammenstellung der Ergebnisse aus den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen in situ.

In der Urologie bei der Diagnostik von Harnblasenkarzinomen wurden die mit Abstand umfangreichsten Untersuchungen durchgeführt. Dort wurden in etwa doppelt (verglichen zur Neurochirurgie) bis drei mal (verglichen zur Pulmologie, Gynäkologie und Hals-Nasen-Ohrenheilkunde) so viele Areale spektroskopisch untersucht. Insbesondere für flache neoplastische Läsionen, die in den anderen Fachbereichen nur vereinzelt untersucht wurden, haben die Ergebnisse aus der Urologie die höchste Aussagekraft.

Der maximale Kontrast zwischen Tumor und Normalgewebe wurde in der Urologie und der Pulmologie gemessen. In den anderen Fachbereichen war der maximale Kontrast teilweise erheblich schlechter (z.B. Gynäkologie) und auch nicht signifikant. In der HNO wurde trotz eines vergleichsweise hohen Kontrastes von 3 zwischen Tumor- und Normalgewebe kein signifikanter Unterschied gemessen. Als Grund hierfür wurden die vergleichsweise hohen intra- und interindividuellen Ratio-Variationen im Normalgewebe von 79% (siehe Tabelle 12) angeführt.

Bei der Ermittlung der Wellenlängenbereiche die zum besten Kontrast führten, war der kurzwellige Bereich des Ratios im ultravioletten Spektralbereich nahe beieinander bei $\lambda \sim 340 \text{ nm}$, der langwellige Bereich des Ratios variierte hingegen stark zwischen den Fachdisziplinen. In der Urologie, Pulmologie und Gynäkologie lag der langwellige Bereich bei $\lambda \sim 440 \text{ nm}$. In der HNO und der Neurochirurgie hingegen wurde der signifikanteste Ratio-Wert im Langwelligen bei $\lambda \sim 560 \text{ nm}$ gemessen.

Des weiteren lässt sich noch aus den Daten ablesen, dass eine geringe Fallzahl nicht zwingend in einer schlechteren Signifikanz resultierte. Dies wird vor allem in der Pulmologie deutlich, wo schon bei 39 Arealen eine hohe Signifikanz erzielt wurde.

2.5 Fluoreszenzmikroskopie – Korrelation zur Pathologie

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen in der Urologie zeigten deutliche Intensitätsunterschiede zwischen Urothel und Stroma. Zu den verschiedenen Bildern und Spektren

wurde der Unterschied zwischen Urothel und Stroma in Form eines Ratios berechnet, das den Kontrast zwischen Epithel und Stroma angibt. Dies ist für die Interpretation der *in-vivo*-Spektren von Interesse, da sich in den Wellenlängenbereichen erhöhten Kontrastes morphologische Unterschiede in den *in-vivo*-Spektren am stärksten auswirken sollten.

Die Auswertung der Bilder als auch der Spektren ergab eine erhöhte Fluoreszenzintensität des Urothels im Emissionswellenlängenbereich des Tryptophans bei $\lambda \sim 335$ nm. Aus den Spektren ließ sich ein maximaler Kontrast zwischen Urothel und Stroma von 2,2 bei $\lambda \sim 335$ nm ableiten. Die Bilder zeigten im Vergleich dazu einen wesentlich geringeren Kontrast in der UV-Fluoreszenzintensität von 1,25. Aus den Bildern wurde ersichtlich, dass der Bereich der Deckzellschicht des Urothels heller als der direkt unterhalb liegende Bereich innerhalb des Urothels war. Die UV-Fluoreszenzintensität aus den Bildern wurde aus einer Mittelung über einen größeren Bereich innerhalb des Urothels bestimmt, die Spektren hingegen wurden ausschließlich in der Deckzellschicht des Urothels abgegriffen. Aus dieser Feststellung lässt sich der Unterschied im Kontrast für Bilder bzw. Spektren ableiten. Die ungleichmäßige Fluoreszenzverteilung innerhalb des Urothels ist schwierig zu verstehen. In den Bildern aus der Mundschleimhaut oder den anderen Organen wurden keine entsprechenden Effekte beobachtet. Hier war die Fluoreszenzverteilung innerhalb des Epithels wesentlich gleichmäßiger. Es wird daher vermutet, dass dies Artefakte sind, die aus der Entnahmetechnik der Elektroresektion resultieren (siehe Kapitel IV.1.5).

Bei Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 308$ nm) wird im sichtbaren Spektralbereich ein breites Maximum des Kontrastes (Urothel/Stroma = 3/5) zwischen dem Urothel und dem Stroma im Bereich von $\lambda \sim 450$ nm registriert (siehe Abb. 54, Seite 93). Zu längeren Wellenlängen nimmt der Kontrast stetig ab. Dies spiegelt sich auch in der Auswertung der Bilder wieder, wonach der höchste Kontrast mit der blauen Filtereinstellung gemessen wurde (Ratio $\sim 0,45$).

Außer einer Untersuchung an humanen Arterienwänden zur UVB-angeregten „Mikrospektrofluorometrie“ an Gewebe (Baraga 91) (Anregungswellenlänge $\lambda = 308$ nm) sind aus der Literatur keine weiteren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen vor allem im Zusammenhang mit der Tumorerkennung bekannt. Die von Baraga et al. (Baraga 91) gemessenen Spektren sind vergleichbar mit den Spektren in den verschiedenen Schichten der Schleimhaut der Blase. In der Intima wird ein Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 340$ nm gemessen, ähnlich dem Urothel. In der Media wird ein breites Fluoreszenzmaximum bei $\lambda \sim 390$ nm gemessen, vergleichbar dem Stroma.

Neben der Anregung mit dem Excimerlaser wurde die Fluoreszenz auch mit dem blauviolettten Licht des D-Lights angeregt. Es konnte eine um ca. 40-50% erhöhte Fluoreszenzintensität des Stromas gegenüber der Epithelfluoreszenz gemessen werden. Der deutlichste Kontrast in den Spektren (0,6) zwischen Urothel und Stroma konnte hierbei im Bereich um

ca. $\lambda = 530$ nm detektiert werden. Zu längeren Wellenlängen nimmt der Kontrast immer weiter ab. Ab $\lambda \sim 650$ nm wurde kein Unterschied mehr zwischen Urothel und Stroma gemessen. Diese Feststellungen decken sich mit den Untersuchungen von Wagner (Wagner 00), wonach die stromale Fluoreszenzintensität bei Anregung mit blau-violettem Licht doppelt so stark ist wie die Fluoreszenzintensität des Epithels.

Neben dem Vergleich zwischen Urothel und Stroma wurde zudem in den Spektren als auch in den Fluoreszenzbildern malignes und benignes Epithel miteinander verglichen. Daraus leitet sich eine im Tumor um 15 und 20% geringfügig erhöhte Tryptophanfluoreszenzintensität ab. Die bildgebenden als auch spektralen Untersuchungen wurden am Epithel von 4 verschiedenen Patienten durchgeführt, wobei nur zwei Biopsien aus unterschiedlichem, malignem Epithel vorlagen.

Um zuverlässigere Aussagen über die tumorspezifische Änderungen der Tryptophanfluoreszenz machen zu können, ist wegen der zu erwartenden geringen Unterschiede eine wesentlich größere Anzahl von Biopsien, vor allem von entzündetem Urothel und von flachen malignen Neoplasien, zu untersuchen.

Außer in der Urologie wurden Bilder und Spektren eines geringgradig verhornenden Plattenepithelkarzinoms sowie benachbarter normaler Schleimhaut ausgewertet. Es zeigte sich als wesentlicher Unterschied zwischen dem normalen und dem Tumorepithel eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität im tumornahen Stroma gegenüber dem weiter entfernten Stroma als auch dem Stroma des Normalepithels. Diese Unterschiede könnten durch tumorbedingte Veränderungen im Bindegewebe hervorgerufen werden:

Erst kürzlich veröffentlichte Untersuchungen von Brancalion et al. (Brancalion 01) zeigen ebenfalls eine reduzierte Fluoreszenzintensität im tumornahen Stroma von NMSC – Tumoren („Non Melanoma Skin Cancer“). Mit Anregungslicht bei $\lambda = 360$ nm wurde in 78% (bzw. 60%) der Gefrierschnitte von Basalzellkarzinomen ($n=28$) (bzw. Plattenepithelkarzinomen ($n=5$)) eine mindestens 20% reduzierte Fluoreszenzintensität gegenüber normalem, tumornahem Kontrollgewebe gemessen. In dieser Publikation wird dieser Effekt auf eine Erosion des Bindegewebes zurückgeführt, die mit einer höheren Synthese der Metalloproteinasen der Fibroblasten zusammenhängt (Varani 00, Charoenrat 01, Nagase 99). Die Aktivität der Metalloproteinasen reduziert die Menge an Kollagen und Elastin-Verbindungen und somit auch die Fluoreszenz des Bindegewebes.

Ebenfalls Drezek et al. (Drezek 01) konnten bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von dysplastischem und normalem zervikalen Gewebe mit Anregungswellenlängen von $\lambda = 380$ nm und $\lambda = 460$ nm den gleichen Effekt bestätigen. In ihren Untersuchungen an insgesamt 34 Patienten konnte eine um $\sim 50\%$ signifikant reduzierte Fluoreszenzintensität des Stromas des dysplastischen Gewebes gegenüber Stroma des normalen Gewebe nachge-

wiesen werden. Auch hier wird dieser Effekt auf eine Erosion des Bindegewebes zurückgeführt, da durch die Aktivität der Metalloproteinasen die Kollagenverbindungen aufgelöst werden, wodurch sich die Kollagenfluoreszenz reduziert.

Diese erst kürzlich publizierten Ergebnisse und unsere Untersuchungen machen deutlich, dass dieser Effekt auch in anderen Organen außer der Mundhöhle beobachtet wird und sich präinvasive Veränderungen im Stroma unterhalb dysplastischen Epithels eventuell durch autofluoreszenzoptische Methoden nachweisen und untersuchen lassen.

Aus den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Tumor- und Normalgewebebiopsien des Urothels und Plattenepithels ließen sich folgende Zusammenhänge ableiten:

- Hohe Kontraste zwischen Urothel und Stroma wurden einerseits im Ultravioletten bei $\lambda \sim 340$ nm und andererseits im Sichtbaren bei $\lambda \sim 450$ nm gemessen. Im sichtbaren Spektralbereich war der Kontrast zwischen $\lambda \sim 400$ nm und $\lambda \sim 600$ nm in etwa gleichbleibend gut. Im Ultravioletten wurde dagegen ein scharfes Maximum des Kontrastes bei $\lambda \sim 335$ nm gemessen. Die Maxima des Kontrastes zwischen Urothel und Stroma (Ergebnisse aus den fluoreszenzmikroskopischen Messungen) entsprechen im wesentlichen den Wellenlängenbereichen für die Ratio-Auswertung ($\lambda = 337$ nm und $\lambda = 450$ nm) der *in-vivo* gemessenen Spektren aus der Urologie.
- Die UV-Fluoreszenzintensität im Tumorepithel ist nur geringfügig höher als im Normalepithel. Im Sichtbaren zeichneten sich keine Veränderungen in der Fluoreszenzspektren zwischen Tumor- und Normalepithel ab. Daher sollten epitheliale Dickenunterschiede den Hauptbeitrag der Unterscheidbarkeit zwischen den Tumor- und Normalgewebespektren liefern.
- Zudem wurden in den Fluoreszenzbildern und Spektren des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle deutlich geringere Fluoreszenzintensitäten im tumornahen Stroma als im benachbarten Stroma des Normalgewebes beobachtet. Diese Erosion des tumornahen Bindegewebes aufgrund erhöhter Metalloproteinaseaktivität wurde als weitere Ursache für die beobachteten spektralen Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe diskutiert.

V Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Stellenwert der Autofluoreszenzdiagnostik bei Anregung mit einem Excimerlaser bei $\lambda = 308$ nm in verschiedenen Organen und Tumor-Phänotypen zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde ein Spektroskopie-System aufgebaut, das für die *in-vivo* Messungen im Operationssaal genutzt werden konnte. Das Spektroskopie-System bestand aus einem optimierten XeCl-Excimerlaser, einem computergesteuerten Spektrometer (Optical Multichannel Analyser) und einer Faser-Messsonde. Der XeCl-Excimerlaser wurde von Kurz- (10-20 ns) auf Langpulsbetrieb (80-100 ns) umgerüstet, so dass das Licht ohne Farbzentrenbildung und anderer Zerstörartefakte in lichtleitende Fasern auch mit hohen Energiedichten eingekoppelt und geleitet werden konnte.

Zur Analyse und Bewertung der aufgezeichneten Spektren wurde ein statistisches Auswerteverfahren etabliert, das basierend auf dem aufgezeichneten Datensatz das signifikanteste Fluoreszenzemissionsverhältnis aus zwei Wellenlängenbereichen (Ratio) zur Diskriminierung zwischen malignem und benignem Gewebe ermittelt. Anschließend wurde im Falle einer signifikanten Diskriminierung die Sensitivität und Spezifität auf Basis eines binären Schwellwertalgorithmus berechnet.

Die zu Beginn aufgestellte Hypothese, dass Tumore gegenüber normalem Gewebe eine erhöhte UV-Fluoreszenzintensität und eine zugleich reduzierte Fluoreszenzintensität im sichtbaren Spektralbereich aufweisen, konnte in allen Organen und Tumorphänotypen bestätigt werden. Allerdings konnte ausschließlich für die Diagnostik des Urothelkarzinoms, Bronchialkarzinoms und in der Neurochirurgie an niedermalignen Astrozytomen eine signifikante Diskriminierung zwischen Tumor- und Normalgewebe erzielt werden.

In der Urologie konnten die Ergebnisse von Anidjar et al. (100 % Sensitivität und Spezifität; Anidjar 96) nicht bestätigt werden. Insbesondere Carcinoma in situ und Dysplasien sind schwierig von normalem Gewebe und vor allem von Entzündungsgewebe zu unterscheiden.

In den vorläufigen Untersuchungen in der Pulmologie konnte eine hohe Sensitivität und Spezifität erzielt werden. Neben 8 Arealen von okkulten Tumoren wurden ein moderates und ein hochgradig dysplastisches Areal in die Untersuchung aufgenommen. Die okkulten Tumore und die dysplastischen Areale konnten alle durch den Schwellwertalgorithmus richtig zugeordnet werden.

Auf der Zervix und in der Mundhöhle ließ sich zwischen Tumor- und Normalgewebe keine signifikante Unterscheidung erzielen. Die Ergebnisse wurden auf beachtliche inter- und intraindividuelle Variationen in den Autofluoreszenzintensitäten und Ratios zurückgeführt.

In der Neurochirurgie konnte eine signifikante Unterscheidung der niedermalignen Tumorbiospien im Vergleich zu den normalen Gewebebiopsien erzielt werden. Dabei wurde in dem

binären Auswerteverfahren der Schwellwert so gelegt, dass kein normales Gewebe durch den Algorithmus als positiv gewertet wird, das heißt eine 100%-ige Spezifität erzielt wird. Solide Tumorbereiche WHO Grad II konnten mit einer Sensitivität von 72% diskriminiert werden. Hochmaligne Tumore WHO Grad III und IV konnten mit diesem Algorithmus nicht abgegrenzt werden.

Um die gewonnenen Ergebnisse aus der in-situ-Fluoreszenzspektroskopie mit der Morphologie des Gewebes und der mikroskopischen Verteilung der verschiedenen endogenen Farbstoffe zu korrelieren, wurden im Anschluss fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde ein speziell auf die UVB-angeregte Autofluoreszenz abgestimmtes Fluoreszenzmikroskop aufgebaut. Mit diesem Mikroskop war es sowohl möglich, in drei verschiedenen Spektralbereichen, vom ultravioletten (ab $\lambda \sim 320$ nm) bis in den grünen Spektralbereich, Bilder aufzuzeichnen als auch Spektren von einzelnen mikroskopischen Strukturen abzugreifen.

Die Auswertung der Spektren aus den „geschichteten“ Gewebetypen zeigte an den verschiedenen Schleimhäuten eine gleichermaßen deutlich erhöhte Tryptophanfluoreszenzintensität (zwischen 2 und 8 fach) im Epithel gegenüber dem Stroma. In den Fluoreszenzintensitätsverteilungen zwischen Epithel und Stroma wurden deutliche Parallelen zwischen dem Plattenepithelschleimhäuten aus Zervix und Mundschleimhaut einerseits und aus dem Urothel und der Bronchialschleimhaut andererseits festgestellt.

Die Auswertung der Gefrierschnitte aus der Urologie weisen auf eine geringfügig erhöhte Tryptophanfluoreszenzintensität im Tumorepithel hin. In den längerwelligen Spektralbereichen zeichnen sich keine tumorspezifischen Veränderungen in der Fluoreszenzintensität ab.

Diese ersten interdisziplinär durchgeführten Untersuchungen zur UV-angeregten Autofluoreszenz zeigten das Potential und die Grenzen der Methode auf. Aus der Diskussion geht hervor, dass eine Weiterverfolgung der Forschung in den klinischen Fachbereichen Neurochirurgie und Pulmologie als sinnvoll erachtet wird. Insbesondere dienen die gewonnenen Ergebnisse als Basis für den Aufbau eines bildgebenden Systems, das mit einer schmalbandigen Anregungslichtquelle und einem UV-tauglichen Kamerasystem eine intraoperative Bildgebung größerer tumorverdächtiger Areale erlaubt.

VI Literatur

Alfano, R. R., Das, B. B., Cleary, J., Prudente, R., and Celmer, E. J.: Light sheds light on cancer-distinguishing malignant tumors from benign tissues and tumors. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 67 (1991) 143-150

Althausen, A. F., Prout-GR, J., and Daly, J. J.: Non-invasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. *J. Urol.* 116 (1976) 575-580

Amin, M. B. and Young, R. H.: Intraepithelial lesions of the urinary bladder with a discussion of the histogenesis of urothelial neoplasia. *Semin. Diagn. Pathol.* 14 (1997) 84-97

Anidjar, M., Ettori, D., Cussenot, O., Meria, P., Desgrandchamps, F., Cortesse, A., Teillac, P., Le-Duc, A. et al.: Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder tumors: dependence on the excitation wavelength. *J. Urol.* 156 (1996) 1590-1596

Avrillier, S., Hor, F., Desgeorges, M., Ettori, D., and Sitbon, J. R.: XeCl excimer laser-induced autofluorescence spectroscopy for cerebral tumours diagnosis: preliminary study. *SPIE.* 1894 (1993) 177-186

Avrillier, S., Tinet, E., Ettori, D., Tualle, J. M., and Gelebart, B.: Influence of the emission-reception geometry in laser-induced fluorescence spectra from turbid media. *Applied Optics* 37 (1998) 2781-2787

Backman, V., Wallace, M. B., Perelman, L. T., Arendt, J. T., Gurjar, R., Muller, M. G., Zhang, Q., Zonios, G. et al.: Detection of preinvasive cancer cells. *Nature* 406 (2000) 35-36

Baert, L., Berg, R., van Damme, B., D'Hallewin, M. A., Johansson, J., Svanberg, K., and Svanberg, S.: Clinical fluorescence diagnosis of human bladder carcinoma following low-dose Photofrin injection. *Urology* 41 (1993) 322-330

Bailey, A. J., Paul, R. G., and Knott, L.: Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech. Ageing Dev.* 106 (1998) 1-56

Baraga, J. J., Rava, R. P., Fitzmaurice, M., Tong, L. L., Taroni, P., Kittrell, C., and Feld, M. S.: Characterization of the fluorescent morphological structures in human arterial wall using ultraviolet-excited microspectrofluorimetry. *Atherosclerosis* 88 (1991) 1-14

Baraga, J. J., Rava, R. P., Taroni, P., Kittrell, C., Fitzmaurice, M., and Feld, M. S.: Laser induced fluorescence spectroscopy of normal and atherosclerotic human aorta using 306-310 nm excitation. *Lasers Surg. Med.* 10 (1990) 245-261

Bargo, P. R., Goodell, T., Slevin, R., Kovall, G., Blair, and Jacques, S. L. Optical measurements for quality control during photodynamic therapy. Plenary Talk at Intl. Photodynamic Association Meeting, June 7, 2001, Vancouver BC, Canada, (2001)

Baumgartner, R. und Häussinger, K.: Persönliche Mitteilung (2001)

Bensasson, R. V., Land, E. J., and Truscott, T. G. Excited states and free radicals in biology and medicine. Oxford University Press (1993)

Bergmann, H. The Urether. 2ed. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin (1981)

Betz, C. S.: Combined fluorescence diagnosis for the detection and delimitation of oral carcinomas: fluorescence imaging, spectral analysis and kinetics. Dissertation an der Med. Fak. der LMU München (2000)

Betz, C. S., Mehlmann, M., Rick, K., Stepp, H., Grevers, G., Baumgartner, R., and Leunig, A.: Autofluorescence imaging and spectroscopy of normal and malignant mucosa in patients with head and neck cancer. *Lasers Surg Med.* 25 (1999) 323-334

Bigio, I. J. and Mourant, J. R.: Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy. *Phys. Med. Biol.* 42 (1997) 803-814

Bise, K.: Persönliche Mitteilung (2001)

Bottiroli, G., Croce, A. C., Locatelli, D., Nano, R., Giombelli, E., Messina, A., and Benericetti, E.: Brain tissue autofluorescence: an aid for intraoperative delineation of tumor resection margins. *Cancer Detect. Prev.* 22 (1998) 330-339

Boulnois, J.-L.: Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. *Lasers Med. Sci.* 1 (1986) 47-66

Brancaleon, L., Durkin, A. J., Tu, J. H., Menaker, G., Fallon, J. D., and Kollias, N.: In vivo fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer. *Photochem. Photobiol.* 73 (2001) 178-183

Brancaleon, L., Lin, G., and Kollias, N.: The in vivo fluorescence of tryptophan moieties in human skin increases with UV exposure and is a marker for epidermal proliferation. *J. Invest. Dermatol.* 113 (1999) 977-982

Brinker, J. M., Gudas, L. J., Loidl, H. R., Wang, S. Y., Rosenbloom, J., Kefalides, N. A., and Myers, J. C.: Restricted homology between human alpha 1 type IV and other procollagen chains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 (1985) 3649-3653

Brookner, C. K., Follen, M., Boiko, I., Galvan, J., Thomsen, S., Malpica, A., Suzuki, S., Lottan, R. et al.: Autofluorescence patterns in short-term cultures of normal cervical tissue. *Photochem. Photobiol.* 71 (2000) 730-736

Bruls, W. A., Slaper, H., van der Leun, J. C., and Berrens, L.: Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem. Photobiol.* 40 (1984) 485-494

Bucher, O. and Wartenberg, H. *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.* 11ed. Bern, Stuttgart, Toronto: Hans Huber Verlag (1989)

Burke, L. and Ducatman, B. S. *Colposcopy, Text and Atlas.* Nawark, CT: (1991)

Burstein, E. A., Vedenkina, N. S., and Ivkova, M. N.: Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem. Photobiol.* 18 (1973) 263-279

Cervical Cancer - Overview. Cervical Cancer Resource Center. <http://www3.cancer.org> (2002)

Chance, B., Cohen, P., Jobsis, F., and Schoener, B.: Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science* 137 (1962) 499-508

Charoenrat, P., Rhys-Evans, P. H., and Eccles, S. A.: Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 127 (2001) 813-820

Chen, R. F.: Fluorescence quantum yields of tryptophan and tyrosine. *Analytical Letters* 1 (1967) 35-42

Cheng, C. W., Lau, W. K., Tan, P. H., and Olivo, M.: Cystoscopic diagnosis of bladder cancer by intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence--the Singapore experience. *Ann. Acad. Med. Singapore* 29 (2000) 153-158

Chintala, S. K., Sawaya, R., Gokaslan, Z. L., Fuller, G., and Rao, J. S.: Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in human glioma, both in vivo and in vitro. *Cancer Lett.* 101 (1996) 107-114

Cintorino, M., Petracca, R., Vindigni, C., Tripodi, S. A., and Leoncini, P.: Topography-related expression of individual cytokeratins in normal and pathological (non-neoplastic and neoplastic) human oral mucosa. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Histopathol.* 417 (1990) 419- 426

Cordeiro, P. G., Kirschner, R. E., Hu, Q. Y., Chiao, J. J., Savage, H., Alfano, R. R., Hoffman, L. A., and Hidalgo, D. A.: Ultraviolet excitation fluorescence spectroscopy: a noninvasive method for the measurement of redox changes in ischemic myocutaneous flaps. *Plast. Reconstr. Surg.* 96 (1995) 673-680

Cothren, R. M., Hayes, G. B., Kramer, J. R., Sacks, B., Kittrell, C., and Feld, M. S.: A multifiber catheter with an optical shield for laser angiosurgery. *Lasers. Life. Sci.* 1 (1986) 1-12

Cramer, D. W.: The role of cervical cytology in the declining morbidity and mortality of cervical cancer. *Cancer* 34 (1974) 2018-2027

Croce, A. C., Spano, A., Locatelli, D., Barni, S., Sciola, L., and Bottiroli, G.: Dependence of fibroblast autofluorescence properties on normal and transformed conditions. Role of the metabolic activity. *Photochem. Photobiol.* 69 (1999) 364-374

D'Hallewin, M. A., Baert, L., and Vanherzeele, H.: In vivo fluorescence detection of human bladder carcinoma without sensitizing agents. *J. Am. Paraplegia. Soc.* 17 (1994) 161-164

De Dominicis, C., Liberti, M., Perugia, G., De Nunzio, C., Sciobica, F., Zuccala, A., Sarkozy, A., and Iori, F.: Role of 5-aminolevulinic acid in the diagnosis and treatment of superficial bladder cancer: improvement in diagnostic sensitivity. *Urology* 57 (2001) 1059-1062

De Gruijl, F. R. and van der Leun, J. C.: Estimate of the wavelength dependency of ultraviolet carcinogenesis in humans and its relevance to the risk assessment of a stratospheric ozone depletion. *Health Phys.* 67 (1994) 319-325

de Laat, A., van der Leun, J. C., and De Gruijl, F. R.: Carcinogenesis induced by UVA (365-nm) radiation: the dose-time dependence of tumor formation in hairless mice. *Carcinogenesis* 18 (1997) 1013-1020

Deen, S. and Ball, R. Y.: Basement membrane and extracellular interstitial matrix components in bladder neoplasia--evidence of angiogenesis. *Histopathology* 25 (1994) 475-481

Dhingra, J. K., Perrault, D. F., Jr., McMillan, K., Rebeiz, E. E., Kabani, S., Manoharan, R., Itzkan, I., Feld, M. S. et al.: Early diagnosis of upper aerodigestive tract cancer by autofluorescence. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 122 (1996) 1181-1186

Doukas, A. G., Soukos, N. S., Babusis, S., Appa, Y., and Kollias, N.: Fluorescence excitation spectroscopy for the measurement of epidermal proliferation. *Photochem. Photobiol.* 74 (2001) 96-102

Drezek, R., Brookner, C., Pavlova, I., Boiko, I., Malpica, A., Lotan, R., Follen, M., and Richards-Kortum, R.: Autofluorescence microscopy of fresh cervical-tissue sections reveals alterations in tissue biochemistry with dysplasia. *Photochem. Photobiol.* 73 (2001) 636-641

Engelke, M., Jensen, J. M., Ekanayake-Mudiyanselage, S., and Proksch, E.: Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation. *Br. J. Dermatol.* 137 (1997) 219-225

Epstein, J. I., Amin, M. B., Reuter, V. R., and Mostofi, F. K.: The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am. J. Surg. Pathol.* 22 (1998) 1435-1448

Esenaliev, R. O., Oraevsky, A. A., Letokhov, V. S., Karabutov, A. A., and Malinsky, T. V.: Studies of acoustical and shock waves in the pulsed laser ablation of biotissue. *Lasers Surg. Med.* 13 (1993) 470-484

Fabian, H., Grzesik, U., Hillrichs, G., and Neu, W.: Optical fibers with enhanced performance for excimer laser power transmission at 308 nm. *SPIE*. 1893 (1993) 24-32

Fahey, M. T., Irwig, L., and Macaskill, P.: Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am. J. Epidemiol.* 141 (1995) 680-689

Farbmann, A. I.: The oral cavity. In: *Cell and tissue biology: a textbook of histology*, Weiss, L. (eds.), Urban und Schwarzenberg, Baltimore, Munich (1988) 574-593

Fiarman, G. S., Nathanson, M. H., West, A. B., Deckelbaum, L. I., Kelly, L., and Kapadia, C. R.: Differences in laser-induced autofluorescence between adenomatous and hyperplastic polyps and normal colonic mucosa by confocal microscopy. *Dig. Dis. Sci.* 40 (1995) 1261-1268

Filbeck, T., Roessler, W., Knuechel, R., Straub, M., Kiel, H. J., and Wieland, W. F.: 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy applied at secondary transurethral resection after conventional resection of primary superficial bladder tumors. *Urology* 53 (1999) 77-81

Flamm, J. and Dona, S.: The significance of bladder quadrant biopsies in patients with primary superficial bladder carcinoma. *Eur. Urol.* 16 (1989) 81-85

Franceschini, M. A., Pini, R., Salimbeni, R., and Vannini, M.: Auto-prepulse operation of a long-pulse XeCl laser. *Applied. Physics. B (Photophysics and Laser Chemistry)*. B54 (1992) 259-264

Franklin, W. A.: Diagnosis of lung cancer: pathology of invasive and preinvasive neoplasia. *Chest* 117 (2000a) 80-89

Franklin, W. A.: Pathology of lung cancer. *J. Thorac. Imaging* 15 (2000b) 3-12

Fujimoto, J. G., Pitris, C., Boppart, S. A., and Brezinski, M. E.: Optical coherence tomography: an emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy. *Neoplasia* 2 (2000) 9-25

Ganesan, S., Sacks, P. G., Yang, Y., Katz, A., Al-Rawi, M., Savage, H. E., Schantz, S. P., and Alfano, R. R.: Native fluorescence spectroscopy of normal and malignant epithelial cells. *Cancer Biochem. Biophys.* 16 (1998) 365-373

Gardner, C. M., Jacques, S. L., and Welch, A. J.: Fluorescence spectroscopy of tissue: recovery of intrinsic fluorescence from measured fluorescence. *Applied Optics* 351 (1996) 1780-1792

Georgakoudi, I., Jacobson, B. C., van Dam, J., Backman, V., Wallace, M. B., Muller, M. G., Zhang, Q., Badizadegan, K. et al.: Fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for evaluating dysplasia in patients with Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 120 (2000) 1620-1629

Gerg, T.: Erstellung eines gewebeoptischen Modells für die Fluoreszenz-Tumor-Diagnostik. Diplomarbeit an der FH München (1997)

Gillenwater, A., Jacob, R., Ganeshappa, R., Kemp, B., El-Naggar, A. K., Palmer, J. L., Clayman, G., Mitchell, M. F. et al.: Noninvasive diagnosis of oral neoplasia based on fluorescence spectroscopy and native tissue autofluorescence. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 124 (1998) 1251- 1258

Gillies, R., Zonios, G., Anderson, R. R., and Kollias, N.: Fluorescence excitation spectroscopy provides information about human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 115 (2000) 704-707

Gindi, G. R., Darken, C. J., O'Brien, K. M., Stetz, M. L., and Deckelbaum, L. I.: Neural network and conventional classifiers for fluorescence-guided laser angioplasty. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 38 (1991) 246-252

Glassman, W. S., Liu, C. H., Tang, G. C., Lubicz, S. S., and Alfano, R. R.: Ultraviolet excited fluorescence spectra from non-malignant tissues of the gynecological tract. *Lasers Life Sci.* 5 (1992) 49-58

Gompel, C. and Silverberg, S. G.: The Cervix. In: *Pathology in gynecology*, Lippincott, J. B. (eds.), Philadelphia (1994) 72-116

Goujon, D., Zellweger, M., van den Bergh, H., and Wagniere, G.: Autofluorescence imaging in the tracheobronchial tree. *Photodynamics News* 3 (2001) 11-14

Halangk, W. and Kunz, W. S.: Use of NAD(P)H and flavoprotein fluorescence signals to characterize the redox state of pyridine nucleotides in epididymal bull spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta* 1056 (1991) 273-278

Heil, P.: Fluoreszenzspektroskopische In-vivo-Untersuchungen der Pharmakokinetik und des Ausbleichens von 5-Aminolävulinsäure-induzierten Porphyrinen. Dissertation an der Med. Fak. der LMU München (1996)

Heintzelman, D. L., Lotan, R., and Richards-Kortum, R. R.: Characterization of the autofluorescence of polymorphonuclear leukocytes, mononuclear leukocytes and cervical epithelial cancer cells for improved spectroscopic discrimination of inflammation from dysplasia. *Photochem. Photobiol.* 71 (2000a) 327 -332

Heintzelman, D. L., Utzinger, U., Fuchs, H., Zuluaga, A., Gossage, K., Gillenwater, A. M., Jacob, R., Kemp, B. et al.: Optimal excitation wavelengths for in vivo detection of oral neoplasia using fluorescence spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 72 (2000b) 103-113

Hillemanns, P., Thaler, C., and Kimmig, R.: Epidemiologie und Diagnostik der zervikalen intraepithelialen Neoplasie: Ist das derzeitige Konzept von Screening und Diagnostik noch aktuell? *Gynakol. Geburtshilfliche Rundsch.* 37 (1997) 179-190

Hillemanns, P., Weingandt, H., Baumgartner, R., Diebold, J., Xiang, W., and Stepp, H.: Photodetection of cervical intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Cancer* 88 (2000b) 2275-2282

Hoelen, C. G., Dekker, A., and de Mul, F. F.: Detection of photoacoustic transients originating from microstructures in optically diffuse media such as biological tissue. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 48 (2001) 37-47

Hohla, A. H. and Wagner, S.: *Gemeinsame Messungen* (1999).

Holz, F. G.: Autofluorescence imaging of the macula. *Ophthalmologe* 98 (2001a) 10-18

Holz, F. G., Bellman, C., Staudt, S., Schutt, F., and Volcker, H. E.: Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (2001b) 1051-1056

Hudson, M. A. and Herr, H. W.: Carcinoma in situ of the bladder. *J. Urol.* 153 (1995) 564-572

INIRC: Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 nm and 400 nm (incoherent optical radiation). The International Non-Ionizing Radiation Committee of the International Radiation Protection Association. *Health Phys.* 49 (1985) 331-340

Izuishi, K., Tajiri, H., Fujii, T., Boku, N., Ohtsu, A., Ohnishi, T., Ryu, M., Kinoshita, T. et al.: The histological basis of detection of adenoma and cancer in the colon by autofluorescence endoscopic imaging. *Endoscopy* 31 (1999) 511-516

Jacques, S. L.: Origins of tissue optical properties in the UVA, Visible, and NIR Regions. *OSA TOPS on advances in Optical Imaging and Photon Migration 2* (1996) 364-371

Jacques, S. L.: Light distributions from point, line and plane sources for photochemical reactions and fluorescence in turbid biological tissues. *Photochem. Photobiol.* 67 (1998) 23-32

Jacques, S. L. Optical properties spectra. <http://omlc.ogi.edu/spectra/>. (2001)

Jeon, S. S., Kang, I., Hong, J. H., Choi, H. Y., and Chai, S. E.: Diagnostic efficacy of fluorescence cystoscopy for detection of urothelial neoplasms. *J. Endourol.* 15 (2001) 753-759

Jichlinski, P., Forrer, M., Mizeret, J., Glanzmann, T., Braichotte, D., Wagnieres, G., Zimmer, G., Guillou, L. et al.: 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. *Lasers Surg. Med.* 20 (1997) 402-408

Kannan, S., Balaram, P., Chandran, G. J., Pillai, M. R., Mathew, B., Nalinakumari, K. R., and Nair, M. K.: Alterations in expression of basement membrane proteins during tumour progression in oral mucosa. *Histopathology* 24 (1994) 531-537

Kapadia, C. R., Cutruzzola, F. W., O'Brien, K. M., Stetz, M. L., Enriquez, R., and Deckelbaum, L. I.: Laser-induced fluorescence spectroscopy of human colonic mucosa. Detection of adenomatous transformation. *Gastroenterology* 99 (1990) 150-157

Kato, H., Horai, T., and Barron, J. Color Atlas of Endoscopic diagnosis in early stage lung cancer. Toronto: Mosebly year book (1992)

Katz, A. and Alfano, R. R.: Non invasive fluorescence-based instrumentation for cancer and precancer detection and screening. SPIE. 3913 (2000a) 223-226

Katz, A., Savage, H. E., Yang, Y., Zeng, F., Rome, J., McCormick, S. A., Cocker, R. S., Yu, Y. et al.: Ultraviolet and blue 2-D fluorescence mapping of gynecological tissues. SPIE. 3917 (2000b) 200-203

Kaye, A. H. and Laws JR, E. Brain Tumors. 2. Ausgabeed. Livingstone: Cnurchill (2001)

Kelfkens, G., De Gruijl, F. R., and van der Leun, J. C.: Ozone depletion and increase in annual carcinogenic ultraviolet dose. Photochem. Photobiol. 52 (1990) 819-823

Koenig, F., Knittel, J., and Stepp, H.: Diagnosing cancer in vivo. Science 292 (2001) 1401-1403

Koenig, F., McGovern, F. J., Althausen, A. F., Deutsch, T. F., and Schomacker, K. T.: Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer. J. Urol. 156 (1996) 1597-1601

Koenig, F., McGovern, F. J., Enquist, H., Larne, R., Deutsch, T. F., and Schomacker, K. T.: Autofluorescence guided biopsy for the early diagnosis of bladder carcinoma. J. Urol. 159 (1998) 1871-1875

Koenig, F., McGovern, F. J., Larne, R., Enquist, H., Schomacker, K. T., and Deutsch, T. F.: Diagnosis of bladder carcinoma using protoporphyrin IX fluorescence induced by 5-aminolaevulinic acid. BJU. Int. 83 (1999) 129-135

Kolli, V. R., Savage, H. E., Yao, T. J., and Schantz, S. P.: Native cellular fluorescence of neoplastic upper aerodigestive mucosa. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 121 (1995a) 1287-1292

Kolli, V. R., Shaha, A. R., Savage, H. E., Sacks, P. G., Casale, M. A., and Schantz, S. P.: Native cellular fluorescence can identify changes in epithelial thickness in-vivo in the upper aerodigestive tract. Am. J. Surg. 170 (1995b) 495-498

Kollias, N., Gillies, R., Moran, M., Kochevar, I. E., and Anderson, R. R.: Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitative markers of aging and photoaging. *J. Invest. Dermatol.* 111 (1998) 776-780

Koss, L. G.: The Papanicolaou test for cervical cancer detection. *JAMA* 261 (1989) 737-743

Kostli, K. P., Frenz, M., Bebie, H., and Weber, H. P.: Temporal backward projection of opto-acoustic pressure transients using fourier transform methods. *Phys. Med. Biol.* 46 (2001) 1863-1872

Kulapaditharom, B. and Boonkitticharoen, V.: Laser-induced fluorescence imaging in localization of head and neck cancers. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 107 (1998) 241-246

Kunze, E.: Formale Pathogenese des Harnblasenkarzinoms. In: *Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms*, Bichler, K. H., Wilbert, D., Wechsel, H. W., and Strohmaier, W. L. (eds.), Einhorn-Press Verlag, Reinbeck (1998) 14-42

Kurman, R. J., Henson, D. E., Herbst, A. L., Noller, K. L., and Schiffman, M. H.: Interim guidelines for management of abnormal cervical cytology. The 1992 National Cancer Institute Workshop. *JAMA* 271 (1994) 1866-1869

Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum (1999)

Lam, S., Kennedy, T., Unger, M., Miller, Y. E., Gelmont, D., Rusch, V., Gipe, B., Howard, D. et al.: Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy. *Chest* 113 (1998) 696 -702

Lam, S., MacAulay, C., LeRiche, J. C., and Palcic, B.: Detection and localization of early lung cancer by fluorescence bronchoscopy. *Cancer* 89 (2000) 2468-2473

Langley, R. G., Rajadhyaksha, M., Dwyer, P. J., Sober, A. J., Flotte, T. J., and Anderson, R. R.: Confocal scanning laser microscopy of benign and malignant melanocytic skin lesions in vivo. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45 (2001) 365-376

Leffell, D. J., Stetz, M. L., Milstone, L. M., and Deckelbaum, L. I.: In vivo fluorescence of human skin. A potential marker of photoaging. *Arch. Dermatol.* 124 (1988) 1514-1518

Lenz, P.: Endoscopic fluorometer detector. *Review of Scientific Instruments* 59 (1988) 930-933

Lin, W. C., Toms, S. A., Johnson, M., Jansen, E. D., and Mahadevan-Jansen, A.: In vivo brain tumor demarcation using optical spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 73 (2001) 396-402

Loning, T., Kuhler, C., Caselitz, J., and Stegner, H. E.: Keratin and tissue polypeptide antigen profiles of the cervical mucosa. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2 (1983) 105-112

Lung cancer - overview. American Cancer Society, <http://www3.cancer.org> (2002)

Majumder, S. K., Gupta, P. K., Jain, B., and Uppal, A.: UV excited autofluorescence spectroscopy of human breast tissues for discriminating cancerous tissue from benign tumor and normal tissue. *Lasers Life Sci.* 8 (1999) 249-264

Mangiardi, J. R. and Yodice, P.: Metabolism of the malignant astrocytoma. *Neurosurgery* 26 (1990) 1-19

Marshall, R. C. and Gillespie, J. M.: The tryptophan-rich keratin protein fraction of claws of the lizard *Varanus gouldii*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 71 (1982) 623-628

Mayeno, A. N., Hamann, K. J., and Gleich, G. J.: Granule-associated flavin adenine dinucleotide (FAD) is responsible for eosinophil autofluorescence. *J. Leukoc. Biol.* 51 (1992) 172-175

Mitchell, M. F., Schottenfeld, D., Tortolero-Luna, G., Cantor, S. B., and Richards-Kortum, R.: Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet. Gynecol.* 91 (1998) 626-631

Montan, S. and Strömblad, L. G.: Spectral characterization of brain tumors utilizing laser-induced fluorescence. *Lasers Life Sci.* 1 (1987) 275-285

Müller, K. M. and Gonzales, S.: Präneoplasien und Frühkarzinom der Lunge - Histologische Aspekte des Bronchialkarzinoms. *Pneumologie* 45 (1991) 971-976

Nagase, H. and Woessner, J. F., Jr.: Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 21491-21494

Niemz, H. N. *Laser-Tissue Interactions (Fundamentals and Applications)*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag (1996)

Oraevsky, A. A., Jacques, S. L., Pettit, G. H., Sauerbrey, R. A., Tittel, F. K., Nguy, J. H., and Henry, P. D.: XeCl laser-induced fluorescence of atherosclerotic arteries. Spectral similarities between lipid-rich lesions and peroxidized lipoproteins. *Circ. Res.* 72 (1993) 84-90

Papazoglou, T. G.: Malignancies and atherosclerotic plaque diagnosis--is laser induced fluorescence spectroscopy the ultimate solution? *J. Photochem. Photobiol. B.* 28 (1995) 3-11

Parrish, J. A., Jaenicke, K. F., and Anderson, R. R.: Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem. Photobiol.* 36 (1982) 187-191

Pitts, J. D., Sloboda, R. D., Dragnev, K. H., Dmitrovsky, E., and Mycek, M. A.: Autofluorescence characteristics of immortalized and carcinogen-transformed human bronchial epithelial cells. *J. Biomed. Opt.* 6 (2001) 31-40

Plümpe, R.: Aufrüsten eines Fluoreszenzmikroskops zur quantitativen Auswertung von Fluoreszenzbildern und -spektren. Diplomarbeit an der FH München (1997)

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

Pradhan, A., Pal, P., Durocher, G., Villeneuve, L., Balassy, A., Babai, F., Gaboury, L., and Blanchard, L.: Steady state and time-resolved fluorescence properties of metastatic and non-metastatic malignant cells from different species. *J. Photochem. Photobiol. B.* 31 (1995) 101-112

Profio, A. E., Doiron, D. R., and Sarnaik, J.: Fluorometer for endoscopic diagnosis of tumors. *Med. Phys.* 11 (1984) 516-520

Qu, J., MacAulay, C., Lam, S., and Palcic, B.: Laser-induced fluorescence spectroscopy at endoscopy: tissue optics, Monte Carlo Modeling, and *in vivo* Measurements. *Optical Engineering* 34 (1995) 3334-3343

Qu, J. Y., Hua, J., and Huang, Z.: Combination of diffuse-reflectance and fluorescence imaging of turbid media. *Proceedings of the SPIE*. 3917 (2000a) 56-61

Qu, J. Y., Huang, Z., and Jianwen, H.: Excitation-and-collection geometry insensitive fluorescence imaging of tissue-simulating turbid media. *Applied Optics* 39 (2000b) 3344-3356

Qu, J. Y. and Jianwen, H.: Calibrated fluorescence imaging of tissue in vivo. *Applied Physics Letters* 78 (2001) 4040-4042

Qu, J. Y., Jianwen, H., and Zhijian, H.: Correction of geometrical effects on fluorescence imaging of tissue. *Optics Communications* 176 (2000c) 319-326

Qu, J. Y., Wing, P., Huang, Z., Kwong, D., Sham, J., Lee, S. L., Ho, W. K., and Wei, W. I.: Preliminary study of in vivo autofluorescence of nasopharyngeal carcinoma and normal tissue. *Lasers Surg. Med.* 26 (2000d) 432 -440

Ramanujam, N.: Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia* 2 (2000) 89-117

Ramanujam, N., Mitchell, M. F., Mahadevan, A., Thomsen, S., Malpica, A., Wright, T., Atkinson, N., and Richards-Kortum, R.: Development of a multivariate statistical algorithm to analyze human cervical tissue fluorescence spectra acquired in vivo. *Lasers Surg. Med.* 19 (1996a) 46-62

Ramanujam, N., Mitchell, M. F., Mahadevan, J. A., Thomsen, S. L., Staerckel, G., Malpica, A., Wright, T., Atkinson, N. et al.: Cervical precancer detection using a multivariate statistical algorithm based on laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths. *Photochem. Photobiol.* 64 (1996b) 720-735

Reibel, J., Clausen, H., Dale, B. A., and Thacher, S. M.: Immunohistochemical analysis of stratum corneum components in oral squamous epithelia. *Differentiation* 41 (1989) 237-244

Reulen, H. J., Schmid, U. D., Ilmberger, J., Eisner, W., and Bise, K.: [Tumor surgery of the speech cortex in local anesthesia. Neuropsychological and neurophysiological monitoring during operations in the dominant hemisphere]. *Nervenarzt* 68 (1997) 813-824

Richards-Kortum, R. and Sevick-Muraca, E.: Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 47 (1996) 555-606

Richards, K. R. and Sevick, M. E.: Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 47 (1996) 555-606

Richart, R. M.: Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol. Obstet. Invest.* 10 (1976) 748-751

Riedl, C. R., Daniltchenko, D., Koenig, F., Simak, R., Loening, S. A., and Pflueger, H.: Fluorescence endoscopy with 5-aminolevulinic acid reduces early recurrence rate in superficial bladder cancer. *J. Urol.* 165 (2001) 1121-1123

Romer, T. J., Fitzmaurice, M., Cothren, R. M., Richards-Kortum, R., Petras, R., Sivak, M. V. J., and Kramer, J. R. J.: Laser-induced fluorescence microscopy of normal colon and dysplasia in colonic adenomas: implications for spectroscopic diagnosis. *Am. J. Gastroenterol.* 90 (1995) 81-87

Sacomanno, G., Archer, V. E., Auerbach, O., Saunders, R. P., and Brennan, L. M.: Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells. *Cancer* 33 (1974) 256-270

Sacomanno, G., Auerbach, O., Kuschner, M., Harley, N. H., Michels, R. Y., Anderson, M. W., and Bechtel, J. J.: A comparison between the localization of lung tumors in uranium miners and in nonminers from 1947 to 1991. *Cancer* 77 (1996) 1278-1283

Sage, H. and Gray, W. R.: Studies on the evolution of elastin--I. Phylogenetic distribution. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 64 (1979) 313-327

Salmon, J. M., Kohen, E., Viallet, P., Hirschberg, J. G., Wouters, A. W., Kohen, C., and Thorell, B.: Microspectrofluorometric approach to the study of free/bound NAD(P)H ratio as metabolic indicator in various cell types. *Photochem. Photobiol.* 36 (1982) 585-593

Sato, M., Saito, Y., Nagamoto, N., Sagawa, M., Kanma, K., Takahashi, S., Usuda, K., Endo, C. et al.: Diagnostic value of differential brushing of all branches of the bronchi in patients with sputum positive or suspected positive for lung cancer. *Acta Cytol.* 37 (1993) 879-883

Schantz, S. P., Savage, H. E., Sacks, P., and Alfano, R. R.: Native cellular fluorescence and its application to cancer prevention. *Environ. Health Perspect.* 105 Suppl 4 (1997) 941-944

Schirmer, B. *Neurochirurgie*. 9ed. München Wien Baltimore: Urban & Schwarzenberg (1998)

Schneeweiss, S., Kriegmair, M., and Stepp, H.: Is everything all right if nothing seems wrong? A simple method of assessing the diagnostic value of endoscopic procedures when a gold standard is absent. *J. Urol.* 161 (1999) 1116-1119

Schomacker, K. T., Frisoli, J. K., Compton, C. C., Flotte, T. J., Richter, J. M., Nishioka, N. S., and Deutsch, T. F.: Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential. *Lasers Surg. Med.* 12 (1992) 63-78

Sedlmeier, T.: Entwicklung eines bildgebenden Systems zur Tumordiagnose durch UV-angeregte Autofluoreszenz. Diplomarbeit an der FH München (2000)

Selkin, B., Rajadhyaksha, M., Gonzalez, S., and Langley, R. G.: In vivo confocal microscopy in dermatology. *Dermatol. Clin.* 19 (2001) 369-375

Shibuya, H., Hisamitsu, S., Shioiri, S., Horiuchi, J., and Suzuki, S.: Multiple primary cancer risk in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 60 (1987) 3083-3086

Sibata, C. H., Colussi, V. C., Oleinick, N. L., and Kinsella, T. J.: Photodynamic therapy in oncology. *Expert. Opin. Pharmacother.* 2 (2001) 917-927

Silberberg, M. B., Savage, H. E., Tang, G. C., Sacks, P. G., Alfano, R. R., and Schantz, S. P.: Detecting retinoic acid-induced biochemical alterations in squamous cell carcinoma using intrinsic fluorescence spectroscopy. *Laryngoscope* 104 (1994) 278-282

Silverman, S.: Oral cancer. *Semin. Dermatol.* 13 (1994) 132-137

Silverman, S., Jr.: Early diagnosis of oral cancer. *Cancer* 62 (1988) 1796-1799

Sinichkin, Y. P., Utz, S. R., Mavliutov, A. H., and Pilipenko, H. A.: *In Vivo* fluorescence spectroscopy of human skin: experiments and models. *J. Biomed. Opt.* 3 (1998) 201-211

Smith, G. J. and Melhuish, W. H.: Fluorescence and phosphorescence of wool keratin excited by UVA radiation. *Text. Res. J.* 55 (1985) 304-307

Soloway, M. S., Murphy, W., Rao, M. K., and Cox, C.: Serial multiple-site biopsies in patients with bladder cancer. *J. Urol.* 120 (1978) 57-59

Spektrum der Wissenschaften. Sonderband Krebsmedizin. Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft (1997)

Spießel, B., Beahrs, O. H., Hermanek, P., Hutter, R. V. P., Scheibe, O., Sobin, L. H., and Wagner, G. TNM-Klassifikation maligner Tumore. 5. Auflage. Berlin, Heidelberg, New-York: Springer-Verlag (1997)

Stepp, H.: Entwicklung und Optimierung eines computergestützten Tumorfrühdiaagnoseverfahrens durch bildgebende Detektion tumorselektiver Fluoreszenzmarker. Dissertation an der Med. Fak. der LMU München (1993)

Stepp, H.: Auswertung von 1012 Zystoskopen. Persönliche Mitteilung (2001).

Stepp, H., Baumgartner, R., Betz, C. S., Häussinger, K., Hillemanns, P., Huber, R. M., Knüchel, R., Leunig, A. et al.: New developments in fluorescence detection of ALA-induced protoporphyrin IX for cancer localization. *SPIE.* 3197 (1997) 68-74

Stepp, H., Baumgartner, R., Beyer, W., Knüchel, R., Rick, K., Steinbach, P., Stepp, H. G., and Kriegmair, M.: Bladder tissue diagnostics utilizing Protoporphyrin IX fluorescence detection. *SPIE.* 2324 (1994) 20-31

Stepp, H., Wagner, S., Zaak, D., and Knüchel, R. Fluoreszenzdiagnostik des Harnblasenkarzinoms mit 5-Aminolävulinsäure - Grundlagen und Ergebnisse. Tuttlingen: Endo. Press (1999)

Sterenborg, H. J., de-Gruijl, F. R., Kelfkens, G., and van-der-Leun, J. C. : Evaluation of skin cancer risk resulting from long term occupational exposure to radiation from ultraviolet lasers in the range from 190 to 400 nm. *Photochem. Photobiol.* 54 (1991) 775-780

Sterenborg, H. J. and van der Leun, J. C.: Change in epidermal transmission due to UV-induced hyperplasia in hairless mice: a first approximation of the action spectrum. *Photodermatol.* 5 (1988) 71-82

Sterenborg, H. J. C. M., Motamedi, M., Wagner, R. F., Jr., Duvic, M., Thomsen, S., and Jacques, S. L.: In vivo fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumours. *Lasers. Med. Sci.* 9 (1994) 191-201

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

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

Stummer, W., Stocker, S., Baumgartner, R., Stepp, H., Goetz, C., and Reulen, H. J.: Intraoperative fluorescence detection of malignant glioma by 5-ALA induced Protoporphyrin IX. *Neurosurgery* 42 (1996) 518-525

Stummer, W., Stocker, S., Wagner, S., Stepp, H., Fritsch, C., Goetz, C., Goetz, A. E., Kiefmann, R. et al.: Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Neurosurgery* 42 (1998b) 518-525

Svelto, O. *Principles of lasers.* New York: Plenum Press (1989)

Taylor, R. S., Leopold, K. E., and Mihailov, S.: Damage Measurements of fused silica fibers using long optical pulse XeCl Lasers. *Optics Communications* 63 (1987) 26-31

Tumer, K., Ramanujam, N., Ghosh, J., and Richards, K. R.: Ensembles of radial basis function networks for spectroscopic detection of cervical precancer. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 45 (1998) 953-961

Tumorzentrum München. *Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks.* Bern Wien New York: W. Zuckschwerdt Verlag München (2001)

van Staveren, H. J., van Veen, R. L., Speelman, O. C., Witjes, M. J., Star, W. M., and Roodenburg, J. L.: Classification of clinical autofluorescence spectra of oral leukoplakia using an artificial neural network: a pilot study. *Oral Oncol.* 36 (2000) 286-293

Varani, J., Hattori, Y., Chi, Y., Schmidt, T., Perone, P., Zeigler, M. E., Fader, D. J., and Johnson, T. M.: Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *Br. J. Cancer* 82 (2000) 657-665

Wagner, S.: Fluoreszenzquantifizierung beim Harnblasenkarzinom nach Instillation von 5-Aminolävulinsäure. Dissertation an der Med. Fak. der LMU München (2000)

Wagnieres, G. A., Star, W. M., and Wilson, B. C.: In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem. Photobiol.* 68 (1998) 603-632

Wallace, V. P., Bamber, J. C., Crawford, D. C., Ott, R. J., and Mortimer, P. S.: Classification of reflectance spectra from pigmented skin lesions, a comparison of multivariate discriminant analysis and artificial neural networks. *Physics in Medicine and Biology* 45 (2000) 2859-2871

Wang, C. Y., Chiang, H. K., Chen, C. T., Chiang, C. P., Kuo, Y. S., and Chow, S. N.: Diagnosis of oral cancer by light-induced autofluorescence spectroscopy using double excitation wavelengths. *Oral Oncol.* 35 (1999a) 144-150

Wang, H. W., Willis, J., Canto, M. I., Sivak, M. V. J., and Izatt, J. A.: Quantitative laser scanning confocal autofluorescence microscopy of normal, premalignant, and malignant colonic tissues. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 46 (1999b) 1246-1252

Weingandt, H.: Photodynamische Diagnostik der zervikalen intraepithelialen Neoplasie. Dissertation an der Med. Fak. der LMU München (1999)

Welch, A. J., Gardner, C., Richards-Kortum, R., Chan, E., Criswell, G., Pfefer, J., and Warren, S.: Propagation of fluorescent light. *Lasers Surg. Med.* 21 (1997) 166-178

Wilkinson, E. J.: Pap smears and screening for cervical neoplasia. *Clin. Obstet. Gynecol.* 33 (1990) 817-825

Wilson, C. B., Leopard, J., Cheresch, D. A., and Nakamura, R. M.: Extracellular matrix and integrin composition of the normal bladder wall. *World J. Urol.* 14 (1996) S30-S37

Wright, T. C., Kurman, R. J., and Ferency, A.: Cervical intraepithelial neoplasia. In: *Pathology of the female genital tract*, Blaustein, A. (eds.), New York: Springer-Verlag, (1994) 156-177

Wu, J., Feld, M. S., and Rava, R. P.: Analytical model for extracting intrinsic fluorescence in turbid media. *Applied Optics* 32 (1993) 3585-3595

Yang, Y., Katz, A., Celmer, E. J., Zurawska, S. M., and Alfano, R. R.: Fundamental differences of excitation spectrum between malignant and benign breast tissues. *Photochem. Photobiol.* 66 (1997) 518-522

Yannas, I. V.: Collagen and Gelatin in Solid State. *J. Macromol. Sci. Revs. Macromol. Chem.* C7 (1972) 49-104

Zaak, D., Hofstetter, A., Baumgartner, R., Stepp, H., Stepp, H. G., Wagner, S., Knüchel, R., Schmeller, N. et al.: Die 5-Aminolävulinsäureinduzierte Fluoreszenzendoskopie des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms. *Urologe B.* 39 (1999) 113-120

Zaak, D., Kriegmair, M., Stepp, H., Baumgartner, R., Oberneder, R., Schneede, P., Corvin, S., Frimberger, D. et al.: Endoscopic detection of transitional cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid: results of 1012 fluorescence endoscopies. *Urology* 57 (2001) 690-694

Zangaro, R. A., Silveira, L., Jr., Manoharan, R., Zonios, G., Itzkan, I., Dasari, R. R., van Dam, J., and Feld, M. S.: Rapid multiexcitation fluorescence spectroscopy system for in vivo tissue diagnosis. *Applied Optics* 351 (1996) 5211-5219

Zhadin, N. N. and Alfano, R. R.: Correction of the internal absorption effect in fluorescence emission and excitation spectra from absorbing and highly scattering media: theory and experiment. *Journal of Biomedical Optics* 3 (1998) 171-186

Zhang, J. C., Savage, H. E., Sacks, P. G., Delohery, T., Alfano, R. R., Katz, A., and Schantz, S. P.: Innate cellular fluorescence reflects alterations in cellular proliferation. *Lasers Surg. Med.* 20 (1997) 319-331

Zhang, Q., Müller, M. G., Wu, J., and Feld, M. S.: Turbidity-free fluorescence spectroscopy of biological tissue. *Optics Letters* 25 (2000) 1451-1453

Zonios, G., Perelman, L. T., Backman, V., Manoharan, R., Fitzmaurice, M., van Dam, J., and Feld, M. S.: Diffuse reflectance spectroscopy of human adenomatous colon polyps in vivo. *Applied Optics* 38 (1999) 6628-6637

Zonios, G. I., Cothren, R. M., Arendt, J. T., Wu, J., van Dam, J., Crawford, J. M., Manoharan, R., and Feld, M. S.: Morphological model of human colon tissue fluorescence. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 43 (1996) 113-122

Zuluaga, A., Utzinger, U., Durkin, A. J., Fuchs, H., Gillenwater, A., Jacob, R., Kemp, B., Fan, J. et al.: Fluorescence excitation emission matrices of human tissue; a system for in vivo measurement and method of data analysis. *Applied Spectroscopy* 53 (1999) 302-311

VII Danksagung

Allen, die durch ihre Hilfe und Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglichen, sei hiermit herzlich gedankt. Insbesondere möchte ich auch allen danken, die sich Zeit nahmen, meine Fragen zu beantworten.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Alfons Hofstetter, Direktor der Urologischen Klinik, für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit im hochinteressanten interdisziplinären Umfeld des Laser-Forschungslabors durchführen zu können.

Ein herzliches Dankeschön gebührt Herrn Dr. Reinhold Baumgartner. Ob im freundlichen Gespräch oder in anregenden Diskussionen, er war immer bereit, mir mit Rat und Tat zu Seite zu stehen.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. Herbert Stepp, bedanken, der mir mit großem Sach- und Fachverstand immer zur Seite stand und von dem ich vieles für die Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen lernen konnte.

Ganz herzlich möchte ich mich für die intensive interdisziplinäre Zusammenarbeit und Unterstützung durch die Herren PD Dr. W. Stummer, Dr. D. Zaak, Dr. P. Hillemanns, Dr. F. Stanzel und Dr. A. Leunig bedanken, ohne die eine so klinisch orientierte Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für die vielen hilfreichen Diskussionen und die freundliche Unterstützung danke ich Frau Dr. S. Stocker, Herrn Dr. R. Sroka, Dr. W. Beyer, Herrn T. Pongratz, M. Heide, sowie allen weiteren Mitarbeitern des Laser-Forschungslabors.

Bedanken möchte ich mich für die stets freundliche Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der TuiLaser AG. Bei Herrn Herrn Gunther Leipert und Herrn Gregor Popko möchte ich mich besonders bedanken, die mir bei der Herstellung der Lichtapplikatoren sehr geholfen haben. Auch möchte ich mich bei Herrn Thomas Dickenhorst bedanken, der mir immer schnell und hilfsbereit bei Problemen mit dem Excimerlaser zur Seite stand.

Danken möchte ich der „Bayerischen Forschungsstiftung“ für die finanzielle Unterstützung unter der Antrags- Nr. 276/98.

VIII Lebenslauf

Name	Alexander Heinz Hohla
geboren am	02.10.1968
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Wehrdienst

1988 – 1989 Panzergrenadier in München

Studium

1989 – 1990 Fachhochschule München; 8/1990 Vordiplom Fachrichtung Feinwerktechnik

1990 – 1996 Ludwig Maximilians- Universität München; Studienrichtung Physik

Diplomarbeit "Durchstimmbare, kompakte Dauerstrichlaserquellen im infraroten und blauen Spektralbereich" bei Prof. Dr. Dr. h.c.mult. T.W. Hänsch, Sektion Physik der LMU München

7.3.1996 **Diplom Physik** (Gesamtnote 1.4)

Seit 4/99 **Promotionarbeit** " UV-angeregte Autofluoreszenz: Spektroskopische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Tumorselektivität endogener Gewebefarbstoffe" bei Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Hofstetter am Laser—Forschungslabor, Klinikum Großhadern der LMU München

Praktische Tätigkeiten

- 2/92 – 8/92 Praktikum bei der Firma SIS (Spektrale Identifikationssysteme GmbH)
Entwicklung einer Lagerhaltungsdatenbank unter Open Access
- 2/93 – 5/93 Praktikum am Institut für Umweltanalytik, Prof. Dr. Nießner, Chemie-
Department der TUM,
Untersuchung von polizyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffen
- 7/93 – 11/93 Praktikum am “Beckman Laser Institute” in Irvine, USA
Experimenteller Aufbau und Erstellung eines mathematischen Modells
zur optischen Kohärenztomographie in der Dermatologie

Berufstätigkeit

- 1993 – 1995 **Servicetechniker** der Firma Chiron Technolas GmbH, Gräfelfing
- Wartung und Überprüfung von Excimer – Laser Systemen, insbesondere in Südamerika, den USA und innerhalb Europas
- Seit 4/96 **Mitarbeiter der F&E Abteilung** der TuiLaser AG, Gräfelfing
- Entwicklung einer geeigneten Spalllampenanbindung für die photodynamische Therapie der altersbedingten Makuladegeneration in Kooperation mit der Firma Ciba Geigi AG, Basel, Schweiz
 - Entwicklung eines XeCl Langpuls – Excimerlaser für die Transmyokardiale Revascularisation in Kooperation mit USSC, USA
 - Produktmanager XeCl Excimerlaser
 - Leitung der Patentabteilung der TuiLaser AG