

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
em. Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter  
jetziger Direktor: Prof. Dr. med. Chr. Stief

**Entwicklung und Beurteilung der Fluoreszenzurethroskopie bei  
Humanen Papillomvirus-Infektionen**

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

vorgelegt von

Peter Münch

aus Nürnberg

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Schilling

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv.- Doz. Dr. P. Schneede

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2005

## Inhaltsverzeichnis

		Seite
<b>1.</b>	<b>Einführung .....</b>	<b>5</b>
1.1	Klinische Beurteilung und Detektionsmöglichkeiten .....	5
	Humaner Papillomviren in der Urologie	
1.2	Zielsetzung der eigenen Untersuchungen.....	8
1.3	Grundlagen der Fluoreszenzdiagnostik .....	9
1.3.1	Fluoreszenz .....	9
1.3.2	Autofluoreszenz .....	9
1.3.3	Photobleaching .....	11
1.3.4	Grundprinzipien des 5-ALA-induzierten Fluoreszenz- verhaltens .....	11
1.3.5	Wirkungsweise von 5-Aminolävulinsäure.....	12
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1	Deltaaminolävulinsäure als Anregungssubstanz der .....	15
	Fluoreszenzurethroscopie	
2.1.1	Wahl der geeigneten Applikationsform .....	15
2.1.2	Dosisfindung für die 5-ALA-induzierte Fluoreszenz- urethroscopie von HPV-Läsionen .....	17
2.1.3	Klinisch standardisierte Durchführung der Fluoreszenz- urethroscopie .....	20
2.2	Fluoreszenznachweis in situ .....	21
2.2.1	Urethroscop .....	21
2.2.2	Bildgebende Fluoreszenzdetektion in der Harnröhre .....	22
2.2.3	Spektroskopische Messungen in der Harnröhre .....	23
2.2.4	Patienten und klinische Evaluationsstudien .....	24
2.3	Fluoreszenznachweis mikroskopisch .....	25
2.3.1	Aufbereitung der Biopsien .....	25
2.3.2	Mikroskopische Fluoreszenzmessung .....	25
2.3.2.1	Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops .....	25
2.3.2.2	Dokumentation .....	26
2.3.2.3	Spektroskopie .....	26
2.3.3	Laboranalyse der Biopsien .....	27
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1	Fluoreszenz in der Urethra nach PPIX Anreicherung .....	29
3.2	Spektroskopische Messungen in der Harnröhre .....	31
3.3	Lokalisation der HPV-Läsionen bei der Fluoreszenz- urethroscopiekontrolle .....	34
3.4	Effektivität der Urethralcondylomtherapie mit und ohne .....	35
	Fluoreszenzkontrolle	
3.5	Darstellung von subklinischen HPV-Läsionen der Urethra ...	38

<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>42</b>
4.1	Fluoreszenz in der Urethra nach PPIX-Anreicherung .....	44
4.2	Spektroskopische Messungen in der Harnröhre .....	45
4.3	Lokalisation der HPV-Läsionen bei der Fluoreszenz- urethrooskopiekontrolle .....	46
4.4	Effektivität der Urethralcondylomtherapie mit und ohne Fluoreszenzkontrolle .....	47
4.5	Darstellung von subklinischen HPV-Läsionen der Urethra ...	48
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>50</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>63</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>64</b>

## **1. Einführung**

### **1.1 Klinische Beurteilung und Detektionsmöglichkeiten Humaner Papillomviren in der Urologie**

Die klassischen bakteriellen sexuell übertragenen Infektionen (STD), z.B. Gonorrhoe oder Syphilis, kommen trotz einer Zunahme in Osteuropa in den westlichen Industrienationen insgesamt selten vor. Zunehmend bedeutender werden dagegen die viralen sexuell übertragenen Infektionen (STI) wie Herpes genitalis-, Hepatitis B-, HIV- und die HPV-Infektionen. Humane Papillomviren sind mit allein ca. 30 Millionen Kondylom-Erkrankten weltweit die häufigsten Erreger von sexuell übertragbaren Virusinfektionen (Schneede 2002). Bereits die Römer waren der Auffassung, dass Genitalwarzen beim Geschlechtsverkehr übertragen werden. Ciuffo erkannte erst Anfang des letzten Jahrhunderts (1907) die virale Genese von Warzen. Er konnte mittels zellfreier Filtrate von Warzenaufschwemmungen Warzen übertragen (Ciuffo 1907). Strauss und Mitarbeitern gelang es erstmals 1950 Papillomviren in Warzengewebe mittels Elektronenmikroskopie darzustellen (Strauss 1950). Anders als beispielsweise die Herpesviren lassen sich Humane Papillomviren (HPV) nicht in Zellkulturen anzüchten und sind damit schwieriger zu diagnostizieren. Erst durch die Technik der DNA-Hybridisierung gelang es zur Hausen und Mitarbeitern Mitte der 70er Jahre, HPV zu isolieren (zur Hausen 1974, Gissmann 1976). Auf Grund der heute bekannten epidemiologischen Daten zur Prävalenz von HPV-Infektionen lässt sich feststellen, dass klinische HPV-Läsionen eine Prävalenz von ca. 1% in der sexuell aktiven Bevölkerung aufweisen. Subklinische Läsionen sind bereits 4-mal häufiger und die klinisch nicht diagnostizierbaren, latenten HPV-Infektionen sollen eine Prävalenz von 10% in der Bevölkerung haben (Koutsky 1997). In Risikogruppen (STD-Ambulanz) wurden latente HPV-Infektionen labortechnisch bei bis zu 80% der Untersuchten nachgewiesen. Die in der Literatur beschriebenen Daten beziehen sich dabei im Wesentlichen auf Untersuchungen aus der Gynäkologie, während gerade in der Urologie bezüglich der Prävalenz von HPV in der Urethra nur unzureichende Studien vorliegen. Grundsätzlich jedoch werden bei ca. 5-20% der HPV-Erkrankten auch in der Urethra Condyloma

acuminata nachgewiesen (Schneede 2001). Die meisten Kondylome werden am Meatus urethrae externus und in der Fossa navicularis nachgewiesen, während die proximalen Harnröhrenabschnitte nur sehr selten betroffen sind (Schneede 2001). Bei dem Humanen Papillomvirus handelt es sich um ein karyotropes doppelsträngiges DNA-Virus aus der Familie der Papovaviren. Es verfügt über eine zirkuläre DNA, die von einer Proteinhülle, dem so genannten Kapsid, umschlossen wird. Die Infektion einer Epithelzelle führt unter anderem zu deren Transformation und Proliferation mit Bildung einer so genannten Warze. Das „reife Virus“ wird aus oberflächlichen Zellen freigesetzt und infiziert weitere Zellen. Anogenitale Infektionen durch Humane Papillomviren erfolgen in der Regel durch Mikroverletzungen während des Geschlechtsaktes, wodurch die Viren in die epitheliale Basalzellschicht gelangen. Aber auch während des Geburtsvorganges soll HPV von der Mutter auf das Kind übertragen werden können. Humane Papillomviren zeigen neben einer hohen Wirtsspezifität einen ausgesprochenen Epitheltropismus. Sie vermehren sich ausschließlich in Plattenepithelzellen von Haut und Schleimhaut. Die Subtypen haben offenbar unterschiedliche Affinitäten zu den Zellen verschiedenster Körperregionen. So können HPV-Typen, die vornehmlich in Warzen der äußeren Haut gefunden werden, von solchen unterschieden werden, die im Anogenitalbereich, in der Mundhöhle oder in dem oberen Respirationstrakt vorkommen und deshalb als mukosaassoziierte HPV-Genotypen bezeichnet werden (Grußendorf-Conen 1995). Bislang sind 88 verschiedene Genotypen bekannt, von denen mehr als 30 Typen zu Infektionen im Genitoanalbereich führen (Schneede 2001). Man unterscheidet so genannte HPV-High-risk-Genotypen von den so genannten Low-risk-Genotypen. High-risk-Typen wie HPV 16 und HPV 18 sind als Karzinogene des Gebärmutterkrebses, dem zweithäufigsten Malignom der Frau, von der WHO heute anerkannt (WHO 1995). Als gesichert gilt, dass nahezu alle Zervixkarzinome (99,7%) weltweit HPV-assoziiert sind (Walboomers JM 1999). Die Typen 31, 33, und 35 wurden als wahrscheinliche Karzinogene eingestuft (WHO 1995). Zu den so genannten HPV-Low-risk-Typen zählt man diejenigen, welche überwiegend in gutartigen Epithelläsionen nachgewiesen werden und keine Assoziation zu Präkanzerosen und Karzinomen haben. Als Hauptvertreter dieser Gruppe sind die Typen 6 und 11

zu nennen, die für mehr als 90% aller Kondylome verantwortlich sein sollen (Phelps 1995). Von klinischer Seite unterscheiden wir diagnostisch so genannte klinische, subklinische und latente HPV-Infektionen. Während die klinischen HPV-Infektionen durch einfach erkennbare Epithelläsionen, wie beispielweise Condyloma acuminata, bereits augenfällig sind, müssen subklinische HPV-Infektionen als flache Epithelläsionen im Haut-/Schleimhautniveau erst mit Testverfahren sichtbar gemacht werden. Bei latenten HPV-Infektionen fehlen virusbedingte Zellveränderungen, so dass sie weder klinisch noch lichtmikroskopisch erkennbar werden. Allein labortechnisch mit HPV-DNA-Hybridisierung können latente HPV-Infektionen nachgewiesen werden. Als anerkanntes Testverfahren zur Detektion klinischer und subklinischer Infektionen des äußeren Genitales gilt der Essigsäuretest. Dieser bereits auf das Jahr 1925 und den Gynäkologen Hinselmann zurückgehende klinische Test ist HPV-unspezifisch und weist ebenso mikrotraumatische und entzündliche Epithelläsionen nach (Schneede 2001). Hierbei wird das äußere Genitale mit einer in verdünnter Essigsäurelösung (5%) getränkten Kompresse exponiert. HPV-assoziierte Epithelläsionen demarkieren sich nach fünf Minuten durch eine Weißfärbung des Epithels gegenüber der nicht HPV-veränderten Haut. Diese einfache Möglichkeit zur Detektion von subklinischen HPV-Effloreszenzen ist jedoch nur für das äußere Genitale zulässig. In der Urethra ist die Essigsäuretestung auf Grund des unverhornten Epitheltyps nicht anwendbar. Auch höher verdünnt führt der Essigsäuretest zu schmerzhafter und diffuser unspezifischer Weißfärbung des gesamten Urethraepithels. So gesehen bestand eine entscheidende diagnostische Lücke bezüglich des klinischen HPV-Nachweises in der Urethra. Die klinischen HPV-Erkrankungen, wie Genitalwarzen, ließen sich auch in der Urethra problemlos nachweisen. Hierzu bedarf es der gründlichen Inspektion des Meatus urethrae externus und ggf. der Urethroskopie unter Weißlicht. Waren hierbei HPV-Läsionen nicht nachweisbar, in Urethraabstrichen aber so genannte Koilozyten zu finden, musste von der Existenz subklinischer HPV-Läsionen, die unter Weißlicht übersehen wurden, ausgegangen werden. Im Vergleich zum äußeren Genitale müssen des Weiteren in der Urethra besonders hohe Raten an Therapieversagern nach chirurgischen Behandlungsmethoden zur Kenntnis genommen werden. Diese

höheren Rezidivraten könnten auch an den unbefriedigenden diagnostischen Möglichkeiten in der HPV-Harnröhrendiagnostik liegen. In der Urologie, aber auch in anderen medizinischen Fachgebieten machte die 5-ALA-induzierte Fluoreszenzdiagnostik zur Markierung subklinischer flacher Epithelläsionen in den letzten Jahren von sich reden. Insbesondere neoplastische Epithelveränderungen zeichneten sich dabei durch eine höhere Akkumulation des aus 5-ALA synthetisierten Fluoreszenzfarbstoffes Protoporphyrin IX aus. Diese Anreicherung des biologischen Photosensitizers macht man sich diagnostisch durch Fluoreszenzanregung und -detektion zu Nutze. In der Urologie werden so neben exophytischen Blasentumoren insbesondere die leicht übersehbaren Carcinomata in situ der Harnblase auf Grund der Rotfluoreszenz besser erkannt.

## **1.2 Zielsetzung der eigenen Untersuchungen**

Die große morphologische Ähnlichkeit zwischen Blasentumoren und Harnröhrenkondylomen bildete die Basis für die Hypothese, dass auch HPV-veränderte Epithelzellen der Urethra vermehrt Protoporphyrin IX-Synthese zeigen könnten. Folglich würden sich klinische und subklinische Läsionen unter Anwendung der Fluoreszenztechnik gegenüber dem Normalepithel demarkieren.

Folgende Zielsetzungen wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit verfolgt:

- Entwicklung einer geeigneten Methode zur Etablierung des Fluoreszenznachweises von HPV-assoziierten Epithelläsionen der Urethra
- Darstellung auch subklinischer HPV-Läsionen der Urethra
- Mapping der HPV-Läsionen bei der Fluoreszenzurethroskopie
- Beurteilung der Effektivität der Lasertherapie mit und ohne Fluoreszenzkontrolle
- Intraoperatives Therapiemonitoring der Nd:YAG-Laserkoagulation von Kondylomen

### **1.3 Grundlagen der Fluoreszenzdiagnostik**

#### **1.3.1 Fluoreszenz**

Durch Energieabsorption können durch Photonen angeregte Moleküle ein höheres Energieniveau erreichen. Die Elektronen können sich jedoch nicht dauerhaft auf diesem Niveau halten und fallen deshalb auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Dabei setzen sie die aufgenommene Energie wieder frei und es kommt zur Emission des Fluoreszenzlichts. Allerdings wird die Energie nicht nur als Licht freigesetzt. Deshalb ist das emittierte Licht etwas energieärmer als das Anregungslicht. Energieärmere Lichtstrahlung besitzt jedoch eine größere Wellenlänge und entsprechend auch eine andere Farbe als energiereichere Lichtstrahlung. Bei der Fluoreszenzdetektion nutzt man also das Phänomen der Absorption von kurzwelligem Licht und Emission von längerwelligem Licht. Bei dem Fluoreszenzverhalten von biologischen Geweben unterscheidet man zwei Anteile. Man kennt einen von gewebeeigenen Fluorophoren ausgehenden Anteil, die sogenannte Autofluoreszenz, sowie einen auf der Gabe exogener Substanzen beruhenden Anteil. Optische Parameter wie die Eindringtiefe des Anregungslichts sowie die Intensität der angeregten Fluoreszenz haben entscheidenden Einfluss auf die Fluoreszenzbeobachtung in biologischen Geweben. Sie werden durch Streuung und Absorption stark begrenzt. So wird zum Beispiel die Beobachtung von Fluoreszenz durch Blutabsorption deutlich erschwert.

#### **1.3.2 Autofluoreszenz**

Als Autofluoreszenz wird die vom Gewebe selbst, also unabhängig von verabreichten Photosensibilatoren messbare Fluoreszenz bezeichnet. Die Auto- oder auch Eigenfluoreszenz von biologischen Geweben setzt sich aus der Fluoreszenz einer Vielzahl von endogenen Fluorophoren zusammen. Das Bindegewebe liefert mit seinen endogenen Fluorophoren Kollagen sowie Elastin den größten Anteil (Baraga 1990, Baraga 1991). Hier konnte Fluoreszenz mit Maxima bei etwa 380 nm nachgewiesen werden. In der Literatur wird eine Vielzahl verschiedener Substanzen als Quelle für die Autofluoreszenz diskutiert. Genannt wurden neben dem Elastin und Kollagen auch Tryptophan, NADH,

$\beta$ -Karotin, Flavin und Melanin (Schomacker 1992, Andersson-Engels 1991, Benson 1979, Vo-Dinh 1995).

Substanz	Funktion	Anregung [nm]	Emission [nm]
Kollagen	Bindegewebe	450	530
Elastin	Bindegewebe	410, 500	500, 520
Lipofuszin	gealterte Zellen	340-395	540-640
NADH	Atmungskette	340	450
oxidierte Flavine	Atmungskette	450	515

Tabelle 1: Fluorophore, die im betrachteten Wellenlängenbereich einen Beitrag zur Autofluoreszenz liefern (Benson 1979, Campbell 1984, Lakowicz 1985, Richards-Kortum 1990)

Auch Faktoren wie die Gewebestruktur, Blutfluss und Streuung des angeregten Lichtes durch das Gewebe haben Einfluss auf die Autofluoreszenz (Vo-Dinh 1995, Schomacker 1992). Eine häufig beobachtete Abschwächung von Autofluoreszenz in malignen Arealen (Betz 1999a) kann mitunter dadurch erklärt werden, dass im Bereich von Neoplasien ein Teil der Fluoreszenz bzw. des Anregungslichtes durch eine Verdickung des Epithels absorbiert wird (siehe Abb.1).

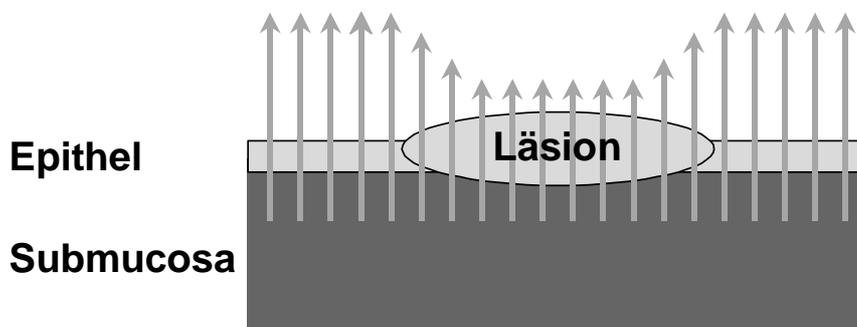


Abbildung 1: Abschwächung der Autofluoreszenz durch verdicktes Epithel (Baumgartner 1999)

Unter den gewählten Anregungs- und Detektionswellenbereichen kommt es zu einer Überlagerung der Fluoreszenz von endogenen Substanzen (Auto-fluoreszenz) und dem exogenen Fluorochrom. Bei einer spektralen Auflösung der Fluoreszenz können die jeweiligen Anteile diskriminiert werden.

### **1.3.3 Photobleaching**

Als Photobleaching (Ausbleichen) wird die Abnahme der Fluoreszenz eines Stoffes unter Lichteinwirkung bezeichnet. Durch den Lichteinfluss wird die Struktur des Protoporphyrin IX (PPIX) verändert. Dadurch kommt es zu einer Abnahme der sichtbaren Fluoreszenz. Dieser Ausbleicheffekt wird sowohl mit weißem als auch mit violetterem Licht ausgelöst. Während der Fluoreszenz-endoskopie ist jedoch der Ausbleicheffekt im Fluoreszenzmodus wesentlich stärker als im Weißlichtmodus, da eine höhere Lichtleistung im Bereich des PPIX eingestrahlt wird (Stepp, Baumgartner 1994).

### **1.3.4 Grundprinzipien des 5-ALA-induzierten Fluoreszenzverhaltens**

Die photodynamische Diagnostik beruht grundsätzlich auf einer im Vergleich zum Normalgewebe erhöhten Synthese und Akkumulation von Protoporphyrin IX nach Applikation von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA). Erste Hinweise auf eine mögliche Selektivität der Porphyrinakkumulation nach Verabreichung von 5-ALA ergaben sich aus Zellkulturstudien mit Leukämiezellen (Malik 1987) und klinisch an Hautbasaliomen (Kennedy 1990). Der diagnostische Zugewinn nach 5-ALA-Applikation zog die klinische Einführung in verschiedenen Fachbereichen nach sich. So ist heutzutage die Fluoreszenzdiagnostik unter Verwendung von 5-ALA zum Beispiel im Fachbereich HNO bei Neoplasien in Mundhöhle und Larynx eine große diagnostische Hilfe. Auch in anderen Fachbereichen, wie z.B. in der Gynäkologie bei Zervixdysplasien und bei der Endometriose, in der Gastroenterologie bei Dysplasien der Colitis ulcerosa sowie beim Barrett-Ösophagus, in der Pulmologie beim Bronchialkarzinom sowie in der Neurochirurgie bei dem malignen Gliom setzte sich das Verfahren der Fluoreszenzdiagnostik durch. An der Urologischen Klinik des Klinikums Großhadern wurde 1992 die tumorselektive Akkumulation von Protoporphyrin IX in Harnblasenkarzinomen nachgewiesen (Kriegmair 1992). Die starke

morphologische Ähnlichkeit zwischen Blasentumoren und den Urethra-Kondylomen bildete die Basis für die Hypothese, dass auch HPV assoziierte, stoffwechseleränderte Epithelzellen der Urethra vermehrte Protoporphyrin IX-Synthese und -Akkumulation zeigen und damit sowohl klinische als auch subklinische Läsionen bildgebend mit der Fluoreszenztechnik gegenüber dem Normalepithel demarkiert werden können.

### **1.3.5 Wirkungsweise von 5-Aminolävulinsäure**

5-Aminolävulinsäure (5-ALA),  $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-COOH}$ , ist die Ausgangssubstanz der intramitochondrial lokalisierten Hämbiosynthese und wird mit Hilfe der 5-ALA-Synthetase aus Succinyl-CoA, einem Zwischenprodukt des Zitrat-Zyklus, und aus der Aminosäure Glycin gebildet. Verschiedene Untersuchungen belegen, dass zahlreiche epitheliale Gewebe die farblose Aminolävulinsäure (5-ALA) in das stark fluoreszierende Porphyrin IX umwandeln und akkumulieren (Peng 1997a, Peng 1997b, Kennedy 1992). In der Hämbiosynthese werden Vorläufer von Porphyrinen und Protoporphyrin IX (PPIX) gebildet. Protoporphyrin IX, ein Fluorchrom, ist das letzte Zwischenprodukt der Hämbiosynthese und wird durch seine fluoreszierenden Eigenschaften bei der Fluoreszenzdiagnostik genutzt. Die zentrale Stellung von  $\text{Fe}^{2+}$  in PPIX erfolgt durch die mitochondriale Ferrochelatase und schließt die Hämbiosynthese ab. Da die kernhaltigen Zellen für ihren Stoffwechsel hämhaltige Enzyme zum Elektronentransport verwenden, kann man davon ausgehen, dass diese Zellen eine gewisse Kapazität zur Produktion von PPIX besitzen (Kennedy 1992). Um die Synthese von fluoreszenzoptisch nutzbarem PPIX in nachweisbaren Konzentrationen zu stimulieren, genügt es, Zellen mit 5-ALA zu inkubieren. Nach intrazellulärer Aufnahme von 5-ALA werden hierbei Zytoplasma-Konzentrationen erreicht, die wegen einer inhibitorischen Rückkopplung unter physiologischen Bedingungen nicht zu beobachten sind. Die Syntheseschritte im weiteren Verlauf der Hämbiosynthese laufen ungeregelt mit ihrer jeweils maximalen Rate ab. Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt stellt die Umwandlung von PPIX in Häm dar (Peng 1997a, Peng 1997b). Bei ausreichendem Angebot von 5-ALA wird somit PPIX akkumuliert. Diese

vermehrte Aufnahme von Protoporphyrin IX ist die Basis der Fluoreszenzdiagnostik.

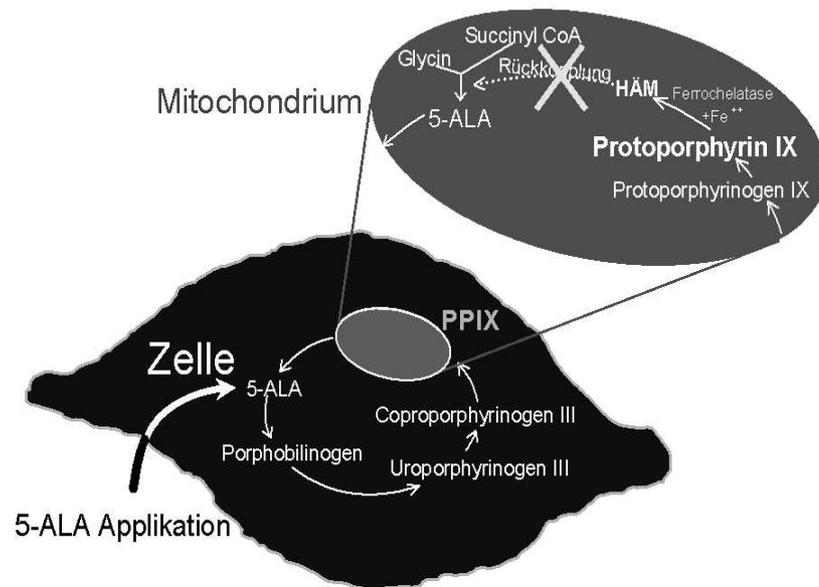


Abbildung 2: Hämbiosynthese (Baumgartner 1999)

PPIX emittiert Fluoreszenz bei 635 und 705 nm im roten Spektralbereich und kann mit einer starken Lichtquelle dargestellt werden. Die Mechanismen, welche eine Selektivität in HPV-infiziertem Gewebe bewirken, sind vielschichtig und bisher nur teilweise geklärt. Im Bereich der Malignome wurde als Grund für eine erhöhte Aufnahme von 5-ALA eine erhöhte Membranpermeabilität gesehen (Kennedy 1990, Peng 1997a, Peng 1997b, Ackermann 1998). Bei Tumoren wurde als weiterer Grund ein verändertes Enzymaktivitätsmuster diskutiert. Anscheinend kann die im Vergleich zum Normalgewebe verringerte Aktivität der Ferrochelatase, welche PPIX in Häm umwandelt, zu einer verstärkten PPIX-Aufnahme in Tumoren führen (Rasetti 1966, Dailey 1984, Schoenfeld 1988, El-Sharabasy 1992, van Hillegersberg 1992, del Batlle 1993). Auch konnte eine Anreicherung von PPIX im Epithel, nicht jedoch in

subepithelialen Schichten beobachtet werden (Divaris 1990, Bedwell 1992, Loh 1993a, Loh 1993b, Steinbach 1994, Kriegmeier 1995). Dieser Unterschied in der Synthesekapazität für PPIX wird auf den unterschiedlichen Häm-Bedarf der Gewebeschichten zurückgeführt (Loh 1993b). Zellen mit höherer Stoffwechselaktivität, so möglicherweise auch HPV-infizierte Zellen im Epithel der Urethra, reichern PPIX vermehrt an. Diese Mehranreicherung von PPIX und dessen fluoreszierende Eigenschaft können unter einer Beleuchtung im blauen Spektralbereich bei 390-420 nm genutzt werden. In der Fluoreszenz-endoskopie sollten sich somit rot fluoreszierende HPV-infizierte Epithelläsionen zeigen, die sich scharf von einer weniger protoporphyrinhaltigen blauen Normal-schleimhaut abgrenzen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Deltaaminolävulinsäure als Anregungssubstanz der Fluoreszenz-urethroscopie**

#### **2.1.1 Wahl der geeigneten Applikationsform**

Bereits in den verschiedenen Fachdisziplinen wie Urologie, Dermatologie, Gynäkologie sowie in der HNO-Heilkunde wurden HPV-assoziierte Epithel-läsionen fluoreszenztechnisch untersucht. Auf Grund der unterschiedlichen Lokalisationen der HPV-Läsionen sowie der unterschiedlichen Verhornungs-zustände der verschiedenen Epitheltypen müssen Applikationsmedien, Konzen-trationen und Expositionsintervalle spezifisch modifiziert und optimiert werden. In der Gynäkologie wurden bei Condylomata acuminata des äußeren Genitale wegen der starken Verhornung der Effloreszenzen 2,5%ige 5-ALA-Salbe und 20%ige 5-ALA-Creme verwendet. Hiermit wurde nach 90 Minuten eine selektive Darstellung der Kondylome erreicht (Fehr 1996). Andere benutzten bei der topischen 5-ALA-Applikation spezielle Trägersubstanzen wie DMSO (Peng 1997) oder Ferrochelatoren (Smetana 1997), um die Photosensibilität zu verstärken. Um 5-ALA in der Urethra anwenden zu können, musste ein geeignetes Applikationsmedium gefunden werden. Das Medium (NaCl-Lösung) sollte sich im Vergleich zur Darreichungsform für die Harnblase wesentlich visköser verhalten. Bei einem zu flüssigen Medium kommt es zu einem frühzeitigen Ausfließen der ALA-Lösung aus der Harnröhre. Die Arbeitsgruppe de Blois et al. (de Blois 2002) erforschte den Einfluss des pH-Wertes sowie der Osmolarität auf die 5-ALA-Stabilität. Sie fand heraus, dass die Stabilität der Verbindung entscheidend vom pH-Wert abhängig ist. Der Einfluss der Osmolarität hingegen kann als gering und nicht signifikant gesehen werden. Bei alkalischen Medien wird die 5-ALA-Verbindung instabil. Die stabilste Form fand sich im sauren Milieu bei einem pH-Wert von 5. Dies erklärt sich unter anderem durch die beiden Säuregruppen in der Verbindung (de Blois 2002). Für unsere Zwecke erwies sich handelsübliches Instillagel® als besonders geeignet. Durch die Gelform konnte ein vorzeitiges Ausfließen aus der Harnröhre verhindert werden. Des Weiteren trug der mit 5,5 leicht saure pH-Wert der Lösung zur Stabilität der ALA-Moleküle bei und verhinderte deren Ausfällung. Auch der

lokanästhetische Effekt des Instillagels wirkte sich positiv auf die Verträglichkeit und Patientencompliance aus. So konnte die ansonsten bekanntlich leicht brennende und stechende Nebenwirkung bei der 5-ALA-Applikation auf ein kaum wahrnehmbares Maß gemindert werden. Wichtig ist die absolut sterile Herstellung des ALA-Instillationsgemisches, das frisch und lichtgeschützt verpackt beim Patienten angewendet werden muss.

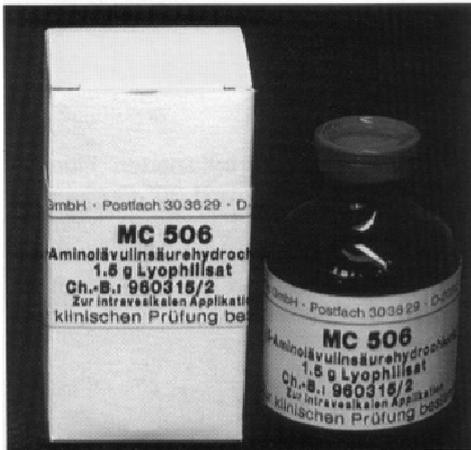


Abbildung 3: 5-ALA (Fa. Medac, Wedel)

Der Originalapplikator des Instillagels kann problemlos wieder verwendet werden, um das sterile ALA-Instillationsgemisch aufzunehmen und gefahrlos in die Urethra zu applizieren. Die spezielle Applikationsspritze ermöglicht dabei eine ausreichend tiefe Applikation des Gels in die Urethra, ohne eine Katheterisierung des Patienten notwendig zu machen. Dabei wird die Applikationsspritze der Instillagel-Spritze bis in die Fossa navicularis eingeführt und der Meatus bei gestrecktem Penis leicht komprimiert. So fließt die Lösung einfach in die Urethra und füllt mit 10 ml des Gels die gesamte Harnröhre bis zum Schließmuskel. Der Patient spürt die Füllung der Urethra ohne Druck. Nach Entfernung der Applikationskatheterspritze aus der äußeren Urethralöffnung verhindert der Patient das vorzeitige Ausfließen, indem er nun mit Zeigefinger und Daumen den Meatus zart komprimierend verschließt. So angefüllt kann die ALA-Instillationsgellösung gleichmäßig alle Urethralbereiche erreichen, in denen HPV-Läsionen zu erwarten sind. Der Musculus sphinkter externus verhindert dabei auch ein Abfließen in Richtung Harnblase. Die

Harnblase muss und sollte nicht gefüllt werden. Das Urothel der Harnblase ist für die HPV-Vermehrung primär ungeeignet und lässt die Entstehung von HPV-Läsionen nur in Ausnahmefällen (Immunsupprimierte) zu.

### **2.1.2 Dosisfindung für die 5-ALA-induzierte Fluoreszenzurethroscopie von HPV-Läsionen**

Wie bereits in Kapitel 2.1.1 erklärt, sind für eine optimale Beurteilung der Fluoreszenzdiagnostik verschiedene Faktoren wichtig. So sind neben den Trägersubstanzen auch die 5-ALA-Konzentrationen sowie die 5-ALA-Expositionsintervalle von entscheidender Bedeutung. Diese Variablen müssen für die jeweiligen diagnostischen Indikationen der Fluoreszenztechnik spezifisch modifiziert und optimiert werden. Als Orientierung bei der Dosisfindung für die 5-ALA-induzierte Fluoreszenzurethroscopie von HPV-Läsionen diente mir die 5-ALA-gestützte Diagnostik des Harnblasenkarzinoms. Der klinische Aspekt dieser unterschiedlich verursachten und in verschiedenen Epithelien nachweisbaren Tumore ist verblüffend ähnlich. Es mussten jedoch die ALA-Konzentrationen sowie die 5-ALA-Expositionsdauer an die Schleimhautverhältnisse der Urethra angepasst werden. Eine zu hoch konzentrierte ALA-Lösung führte zu unspezifischer Fluoreszenz, da auch die nicht HPV-infizierten Normalzellen die ALA-Lösung aufnahmen und schließlich PPIX akkumulierten. Bei der Urethroscopie zeigte sich dem Untersucher in diesen Fällungen eine unspezifische Grundfluoreszenz der gesamten Harnröhre. Eine eindeutige Abgrenzung HPV-infizierter Zellen gegenüber Normalzellen war somit nicht ausreichend möglich. Auch eine zu lange Expositionsdauer optimal dosierter ALA-Lösung in der Urethra brachte keine verwertbaren Ergebnisse. Auch hier war eine brauchbare Diskriminierung HPV-assoziiierter Schleimhautveränderungen gegenüber dem Normalepithel nicht möglich. In weiteren grundlegenden klinischen Versuchen konnte schließlich die optimale ALA-Konzentration gefunden werden. Auch die notwendige Expositionsdauer konnte klar definiert werden. Um eine klinisch eindeutige Demarkierung der HPV-Läsionen zu ermöglichen, wurde die PPIX-Synthesezeit bis zur Durchführung der Fluoreszenzurethroscopie eingegrenzt. Dadurch wurden die Patienten psychisch und zeitlich kaum belastet.

In der Dosisfindung wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen der 5-ALA-Instillagellösung gearbeitet. Instillagel hatte sich durch seine zähe Viskosität als handelsübliche Lösung für Urethra-Instillationen und auf Grund seines idealen pH-Wertes, der das Ausfällen der ALA-Moleküle verhindert, bewährt. Während 5-ALA in 1%iger Konzentration in der Kochsalzlösung nach Instillation in die Blase vor der Blasentumordiagnostik für mindestens 1-2 Stunden verbleibt, führte in meiner Untersuchung die gleiche Konzentration bei gleicher ALA-Expositionszeit in der Urethra zu dem erwarteten unerwünscht ausgeprägten Grundfluoreszenz-Phänomen des gesamten Epithels.

	1 Std.	3 Std.	5 Std.
0,1 %	negativ	positiv	positiv
0,5 %	positiv	positiv	positiv
1 %	positiv	positiv	positiv

Tabelle 2: Feststellung klinisch unbrauchbarer, ubiquitärer Grundfluoreszenz nach verschiedenen PPIX-Syntheseintervallen und 5-ALA-Konzentrationen in der Urethra (Messung an der Normalschleimhaut)

Auch wegen der klinischen Unverwendbarkeit sollte die 5-ALA-Expositionsdauer so kurz wie möglich gehalten werden. 15-minütige Kompression der äußeren Urethra-Öffnung nach Instillation der ALA-Instillagellösung und ALA-Exposition in der Urethra stellten sich als praktikabel heraus. Versuchsreihen mit unterschiedlich konzentrierten 5-ALA-Instillagellösungen zeigten, dass nur eine niedrig konzentrierte Lösung (0,1% ALA-Instillagel) eine unspezifische Grundfluoreszenz verhindern konnte. Aber selbst bei dieser Konzentration bildete das Normalepithel der Urethra noch störend viel PPIX, wenn mehr als eine Stunde zwischen der 5-ALA-Instillation und der Fluoreszenzuntersuchung lag.

	1 Std.	3 Std.	5 Std.
0,1 %	positiv	positiv	positiv
0,5 %	positiv	positiv	positiv
1 %	positiv	positiv	positiv

Tabelle 3: Feststellung von PPIX-Fluoreszenz (Messung in HPV-assoziierten Epithelveränderungen der Urethra)

Im Gegensatz zur Fluoreszenzdiagnostik der Harnblase bedarf es bei der Fluoreszenz-urethroscopie von HPV-Tumoren nicht nur einer geringeren ALA-Konzentration, sondern es musste auch das diagnostische Zeitfenster wesentlich strenger beachtet werden. Wurden diese Vorgaben allerdings eingehalten, ermöglichte die Fluoreszenztechnik, eine klinisch scharfe Demarkierung aller HPV-Läsionen in der Urethra zu reproduzieren.

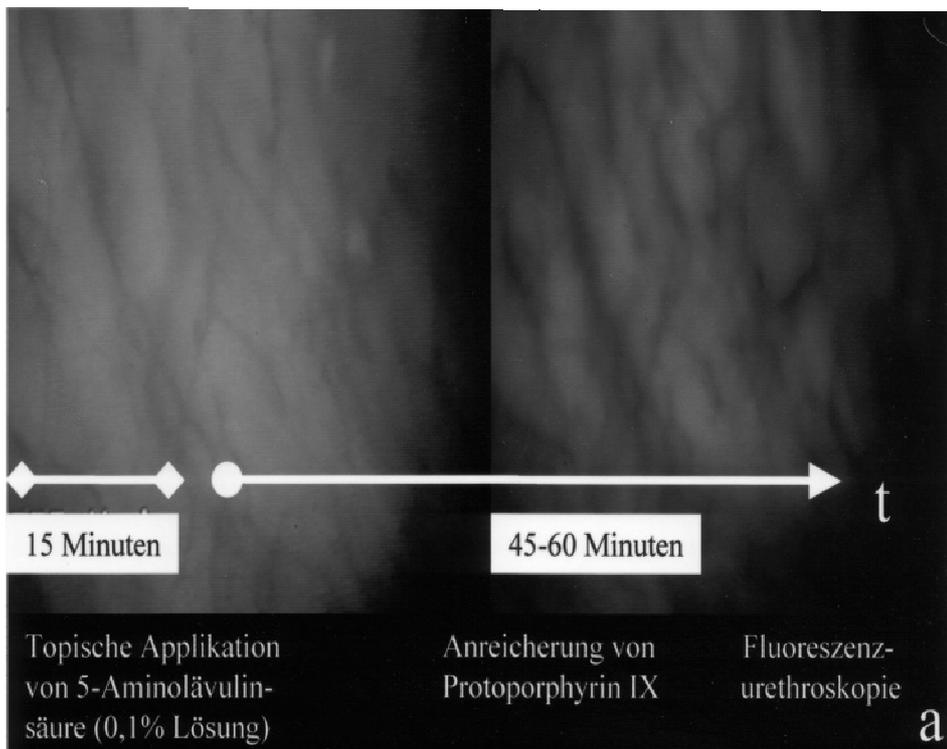


Abbildung 4: Synthese von PPIX nach 15-minütiger Exposition von 0,1%iger ALA-Lösung ermöglicht die Diskriminierung von HPV-Läsionen in der Urethra

### **2.1.3 Klinisch standardisierte Durchführung der Fluoreszenzurethroscopie**

Nach Desinfektion des äußeren Genitales mit üblichen Desinfektionsmitteln wird eine Stunde vor Beginn der geplanten Urethroscopie dem Patienten eine sterile 0,1%ige Lösung aus 5-Aminolävulinsäure (ALA) und Instillagel® (Farco-Pharma, Köln, Germany) in die Harnröhre instilliert. Die Harnblase des Patienten sollte nach Möglichkeit zuvor nicht entleert sein, um später ein Ausspülen der Lösung gewährleisten zu können. Als günstig für den Patienten ergab sich eine liegende Position. Der Patient wird aufgefordert, durch manuelle Kompression der Glans penis ein vorzeitiges Ausfließen der Lösung aus der Urethra zu verhindern. Dazu komprimiert der Patient mit Zeigefinger und Daumen die äußere Harnröhre leicht. Die Instillation und Exposition der ALA-Instillagellösung ist für den Patienten schmerzlos, da in der Lösung ein Lokalanästhetikum enthalten ist. Der Patient muss die Dauer der Exposition von ALA-Instillagel kontrollieren können. Die Auswertung der klinischen Untersuchungen hat ergeben, dass die optimale Expositionszeit in der Harnröhre für die ALA-Lösung 15 Minuten beträgt. Nach den eigenen Fluoreszenzspektralmessungen wird hierbei eine 17,8fach höhere Konzentration von Protoporphyrin IX in den HPV-infizierten Zellen erreicht. Dieser Unterschied in der PPIX-Konzentration gegenüber Normalzellen reicht für eine klinisch selektive Darstellung der HPV-Läsionen. Der Patient wird nun aufgefordert, durch Miktion die ALA-Lösung aus der Harnröhre zu spülen, um eine unspezifische PPIX-Akkumulation im Normalgewebe zu verhindern. Anschließend kann nach einer Stunde die Fluoreszenzurethroscopie durchgeführt werden. In dieser Zeit erfolgt die PPIX-Synthese.

## **2.2 Fluoreszenznachweis in situ**

### **2.2.1 Urethroskop**

Für die Spiegelung der Urethra stehen heute verschiedene starre und flexible Endoskope zur Verfügung. Unterschiedlich sind auch Abwinklungsgrade der Optiken in diesen Geräten und die Durchmesser der Endoskope. Grundsätzlich ermöglichen dabei Endoskopschäfte mit größerem Durchmesser durch größere Spülkanäle sowie das Einführen größerer Arbeitselemente in speziellen Arbeitskanälen bessere Sicht. Die bei Zystoskopien in der Regel bei sechs Uhr ausgeschnittenen Schäfte eignen sich für Urethroskopien weniger, da zur Beurteilung des Meatus und der distalen Urethra der Spülstrom außerhalb der Urethra austritt. Das ideale Urethroskop sollte damit einen geraden oder minimal schrägen Schaftabschluss besitzen und über einen ausreichend weiten Arbeitskanal und Spülkanal verfügen. Wir machten mit 20 Charriere großen Schäften 0-Grad- und 30-Grad-Optiken die besten Erfahrungen. Um den Meatus unter Wasserspülung optimal einstellen zu können, wurde gelegentlich ein so genannter Nickel-Trichter verwendet, der über den Urethroskopschaft gestülpt wurde, um eine Wasserkammer mit Trichterabschluss zur Glans penis erzeugen zu können. Der Arbeitskanal des Urethroskopes muss eine 400 µm/600 µm Lichtleiterfaser des Nd:YAG-Lasers aufnehmen können. Biopsien aus der Urethra wurden mit speziellen Zangeneinsätzen für das Urethroskop durchgeführt. Die Endoskopie bei HPV-Erkrankten erfolgte entweder unter direkter Sichtkontrolle durch die Optiken des Endoskops oder über Videotechnik (CCD-Kamera und Videomonitor). Durch die technische Bildverarbeitung waren insbesondere schwache Fluoreszenzunterschiede der Urethralschleimhaut deutlicher zu detektieren. Ein weiterer Vorteil der videogestützten Fluoreszenzendoskopie ist die Möglichkeit zur Befunddokumentation und damit zur reproduzierbaren Bildauswertung. Dies kann insbesondere bei schwacher Fluoreszenz und raschem Ausbleichen (bleaching) der Schleimhautbefunde in der Urethra sehr wichtig sein. Bei ambulanter Urethroskopie wurden kleinere Endoskope (Kinderzystoskope) verwendet, um die Urethroskopie für die Patienten möglichst atraumatisch zu gestalten.

### 2.2.2 Bildgebende Fluoreszenzdetektion in der Harnröhre

Für die Durchführung der Fluoreszenzurethroscopie benötigt man zusätzlich zu einem handelsüblichen Urethroskop eine spezielle leistungsstarke Lichtquelle, die besonders im blauen Spektralbereich ihr Maximum aufweist und somit die Fluoreszenz in Protoporphyrin IX-haltigen Zellen anregen kann. Ich verwendete das so genannte D-LIGHT (Firma Karl Storz GmbH, Tuttlingen) als Hochleistungslichtquelle.

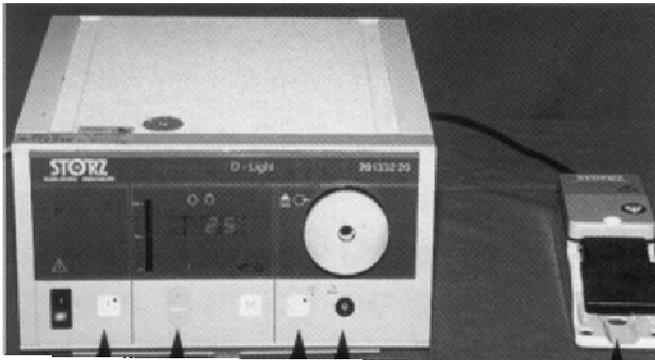


Abbildung 5: Fluoreszenzanregungslichtquelle „D-Light“ der Firma Karl Storz, Tuttlingen (Baumgartner 1999)

Der Fluoreszenzfarbstoff Protoporphyrin IX als biologischer Photosensitizer absorbiert besonders im blauen Spektralbereich das Anregungslicht, dessen Energie in Form von rotem Fluoreszenzlicht wieder abgegeben wird. Um einen effizienten Farbkontrast im Videobild zu erhalten, wird der Kamera ein BeobachtungsfILTER vorgeschaltet. Dieser Filter reduziert das diffus vom Gewebe zurückstrahlende blaue Anregungslicht, transmittiert jedoch das für die Fluoreszenz entscheidende rote Licht. Der Farbkontrast wird somit bildgebend optimiert. Des Weiteren ist ein so genannter Anregungsfilter der Weißlichtquelle vorgeschaltet. Dieser Anregungsfilter bewirkt eine hohe Transmission im violetten Spektralbereich und gleichzeitig eine hohe Blockung des übrigen Spektralbereiches. Eine leistungsstarke Lichtquelle, das D-Light, der BeobachtungsfILTER und der Anregungsfilter bestimmen die Intensität des vom Beobachter wahrgenommenen Kontrastes zwischen dem fluoreszierenden und dem nicht fluoreszierenden Gewebe. Die Endoskop-Optik mit entsprechenden Filtersystemen wird einem handelsüblichen Urethroskop aufgesetzt. Mit einem

einfachen Fußschalter kann zwischen dem konventionellen Weißlicht und dem blauvioletten Anregungslicht umgeschaltet werden. Im D-Light-Modus demarkieren sich die HPV-assoziierten Läsionen rötlich fluoreszierend gegenüber der blauvioletten Normalschleimhaut auf Grund unterschiedlichen Gehaltes an Protoporphyrin IX. So konnten erstmals neben klinischen HPV-Läsionen, wie Condylomata acuminata, auch die subklinischen HPV-Läsionen in der Harnröhre dargestellt werden. Für eine intraoperative Videodokumentation bei der Fluoreszenzurethroscopie ist eine spezielle CCD-Endokamera (Charge-Coupled-Device) nötig, da handelsübliche Endoskopkameras zur Aufnahme der relativ lichtschwachen Fluoreszenzbilder nicht geeignet sind. Die Videokamera wird mit der Lichtquelle am Kamerakopf verbunden, so dass der Operateur jederzeit entsprechende Aufnahmen machen kann.

### **2.2.3 Spektroskopische Messungen in der Harnröhre**

Mit einem Spektrometer wird Licht auf seine verschiedenen spektralen Bestandteile untersucht. Damit ist es möglich, die Protoporphyrin IX-Fluoreszenz und die Gewebeeigenfluoreszenz quantitativ zu ermitteln. Über einen Strahlteiler wird ein Teil des durch das Okular aus dem Endoskop tretenden Lichtes über eine Optik auf das Ende einer Glasfaser (Quarzlichtleiter mit 400 µm Kerndurchmesser) abgebildet. Die Glasfaser leitet das Licht zu einem Spektrometer (S2000-3L, Mikropack, Ostfildern, Deutschland), welcher an einen Computer angeschlossen ist. Mit Hilfe einer sensitiven Endoskopkamera (Tricam SL, K. Storz, Tuttlingen) sowie eines Bildverarbeitungssystems (Optimas, Stemmer, Puchheim) werden die Fluoreszenzbilder erfasst und digitalisiert. Die Optik wurde so konzipiert, dass eine Urethralfläche von ca. 1 mm Durchmesser auf den Lichtleiter abgebildet wird. Für die Messung muss der Untersucher unter visueller Kontrolle das Endoskop in das zu untersuchende anatomische Areal positionieren. Der Abstand zum Urothel sollte bei der Messung ca. 1 cm betragen. Bei einer nun anschließenden Aufnahme der PPIX-Fluoreszenzintensität mittels eines Spektrometers wird die Gesamtfluoreszenz, d.h. die Summe von Autofluoreszenz und PPIX-Fluoreszenz bestimmt. Die Autofluoreszenz macht sich hier jedoch als Untergrund, der die PPIX-Fluoreszenzintensität überlagert,

bemerkbar. Um das reine PPIX-Fluoreszenzsignal zu erhalten, muss die Autofluoreszenzintensität bei 635 nm von der Gesamtfluoreszenz abgezogen werden. Durch die Division des PPIX-Fluoreszenzsignals durch das Signal der reinen Autofluoreszenz erhält man die dimensionslose Ratio. Sowohl die Leistungsschwankung der Anregungslichtquelle als auch die Veränderung der geometrischen Faktoren wie Abstand und Beobachtungswinkel werden somit korrigiert (Wagner 2000). Mit dem Spektrometer wurde so Fluoreszenz der Normalschleimhaut als auch die Fluoreszenz der HPV-Effloreszenz gemessen.

#### **2.2.4 Patienten und klinische Evaluationsstudien**

Zum Thema der Fluoreszenzurethroscopie wurden bereits verschiedene Fragestellungen an unterschiedlich großen Kollektiven untersucht. In einer retrospektiven Studie (Zaak, Hofstetter 2003) wurden 168 Patienten ausgewertet, die im Zeitraum von 1988 bis 2000 im Klinikum Großhadern an Condylomata acuminata der Harnröhre mittels Nd:YAG-Laser behandelt wurden. Von 1988 bis 1995 wurden 93 Patienten unter Weißlichtbedingungen mit dem Nd:YAG-Laser wegen Harnröhrenkondylomen therapiert. Im Zeitraum von 1995 bis 2000 erfolgten bei 75 Patienten bei gleicher Indikation Nd:YAG-Laserbehandlungen unter Fluoreszenzkontrolle. Die Patienten beider Gruppen wurden engmaschig nach erfolgter Operation in einem Abstand von zwei Wochen, zwei Monaten, sechs Monaten und einem Jahr auf eventuelle Rezidive von Condyloma acuminata urethroscopiert. Rezidivhäufigkeit und Lokalisation der Rezidive in der Harnröhre wurden dokumentiert. Eine andere Studie (Schneede, Münch 2001) befasste sich mit der klinischen Evaluation der Fluoreszenzurethroscopie. Hier wurden 84 Patienten, die an Condyloma acuminata erkrankten, untersucht. Bei 43 dieser Patienten konnten Kondylome der Harnröhre nachgewiesen werden. Patienten, die klinische Effloreszenzen der Harnröhre aufwiesen, wurde zur histologischen Sicherung eine Gewebeprobe entnommen. Ließen sich mit Hilfe der PDD-Methode subklinische Effloreszenzen vermuten, wurden Proben der auffälligen Schleimhaut sowie auch der angrenzenden unauffälligen Schleimhaut entnommen. Zur weiteren Analyse wurden diese für eine HPV-DNA-Sequenzierung in ein Referenzlabor geschickt. Ein weiterer Teil der Proben wurde nach spezieller Färbung

histologisch untersucht. Bei beiden Studien war ich an den Follow-up-Kontrollen und Auswertungen maßgeblich beteiligt .

## **2.3 Fluoreszenznachweis mikroskopisch**

### **2.3.1 Aufbereitung der Biopsien**

Für eine histologische und labortechnische Korrelation der HPV-Befunde wurden einigen Patienten Probebiopsien aus fluoreszenzpositivem Gewebe entnommen. Die Biopsien wurden nach Entnahme in zwei Teile getrennt. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren und um einem Ausbleichen vorzubeugen gegen Licht geschützt. Für eine weitere Aufbereitung wurde nun der eine Probesteil in ein spezielles Medium eingebettet (TissueTek, Miles Inc., Elkhart, IN, U.S.A). Von dieser Probe wurden anschließend Gefrierschnitte angefertigt und für eine histopathologische Bewertung Hämatoxylin-Eosin-Färbungen durchgeführt. Der andere Teil der Probe wurde zur Laboranalyse in ein Referenzlabor nach Hamburg verschickt und dort wie in Punkt 2.3.3 beschrieben ausgewertet.

### **2.3.2 Mikroskopische Fluoreszenzmessung**

#### **2.3.2.1 Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops**

Für die fluoreszenzmikroskopische Messung der Gefrierschnitte verwendete ich ein inverses Forschungsmikroskop (DM IRBE, Leica, Deutschland) mit einem 1,6 fachen Objektiv. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte durch seitliche Bestrahlung des Objektträgers unter einem Winkel von 45 Grad. Als Anregungslichtquelle wurde eine Xenon Lampe (Typ 615, Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland) verwendet, deren Emissionsspektren durch zwei Filter (Schott BG28/2 nm und Kurzpass 445 nm) auf einen Bereich zwischen 390 nm und 450 nm begrenzt wurde. Um ein vorzeitiges Photobleaching der Präparate zu verhindern, wurde in die Bestrahlungsvorrichtung ein Shutter integriert. Somit konnte die Fluoreszenzanregung auf den Beobachtungszeitraum begrenzt werden.

Für die Unterdrückung des remittierenden Anregungslichtes wurde ein 460 nm Langpass Detektionsfilter (D-Block, Leitz, Wetzlar, Deutschland) in den Strahlengang des Mikroskops eingebracht.

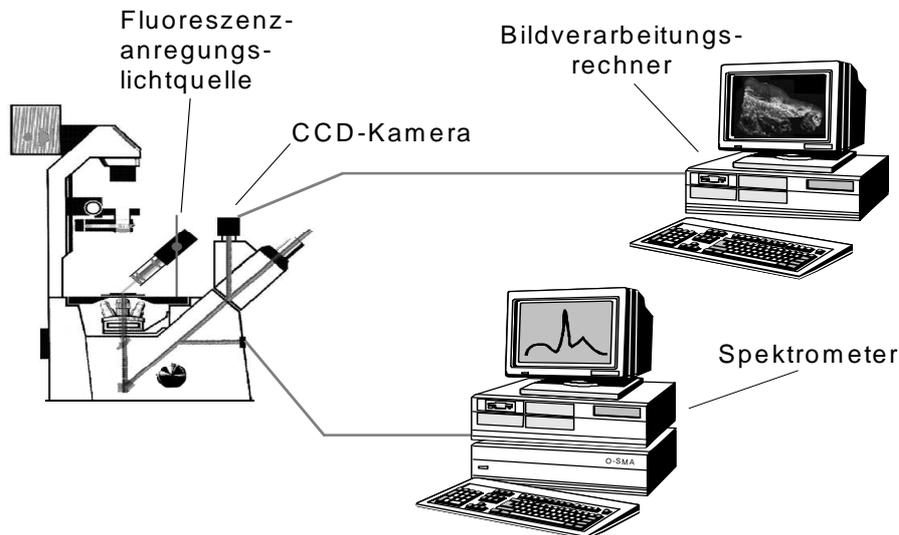


Abbildung 6: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Fluoreszenzmikroskopie

### 2.3.2.2 Dokumentation

Zur Dokumentation des mikroskopischen Fluoreszenzbildes wurde eine Drei-Chip CCD Kamera (Tricam SL PAL PDD, Karl Storz, Tuttlingen Deutschland) am Kameraausgang des Mikroskops angeschlossen. Für eine Kontrasterhöhung wurden die RGB-Verstärkerfolien an die Kamera angepasst und Integrationszeiten von 0,5 bis 2 Sekunden verwendet. Zur Darstellung und Speicherung der Fluoreszenzbilder wurde ein PC mit Framegrabber-Karte verwendet. Als Bildbearbeitungssoftware verwendeten wir das Programm Optimas (Optimas 6.2, Media Cybernetics, Silver spring, MD, U.S.A.).

### 2.3.2.3 Spektroskopie

Um die mikroskopisch beobachtete Fluoreszenz spektroskopisch untersuchen zu können, wurde ein optischer Vierkanalanalysator (Princeton Instruments, Trenton, NJ, U.S.A.) über ein Faserbündel an den Kameraausgang des

Mikroskops angeschlossen. Das Fluoreszenzanregungslicht wurde mit einem 450 nm Langpass-Filter unterdrückt. Die Spektren wurden mit einer Spaltbreite von 250 µm und einer Integrationszeit von vier Sekunden aufgenommen. Die spektrale Auflösung betrug 2 nm.

### **2.3.3 Laboranalyse der Biopsien**

Die HPV-Typisierung wurde in einem Hamburger Kooperationslabor (IPM, Hamburg) mit speziellen Polymerasekettenreaktions-Verfahren (PCR) durchgeführt. Die HPV-Analyse des Probenmaterials erfolgte durch PCR sowie nested-PCR, wodurch HPV-DNA mit größtmöglicher Sensitivität nachgewiesen werden konnte. Durch die anschließende HPV-Typbestimmung mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) und Hybridisierung mit gentechnischen HPV-Sonden konnte eine spezifische Identifikation nahezu fast aller bis zu diesem Zeitpunkt bekannter HPV-Genotypen erfolgen. Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde in einer multizentrischen Studie 1998 validiert (Nindl 1999). Für den Nachweis von HPV-DNA muss als erster Schritt die HPV-DNA isoliert werden. Hierzu wird ein Teil der DNA aus dem Probenmaterial extrahiert und anschließend denaturiert. Als nächster Schritt erfolgt eine Amplifizierung der HPV-DNA mittels PCR. Die Amplifikation von HPV-DNA erfolgt in Abhängigkeit vom klinischen Material mit unterschiedlichen Primern. Diese Primer amplifizieren ein genau definiertes DNA-Segment. Für den Nachweis genitaler HPV-DNA verwendet man primär die Konsensus-Primer MY09 und MY11 und die Primer CP66 und CP69. Um die Sensitivität der MY-PCR zu erhöhen, wird bei einem negativen Ergebnis eine nested-PCR mit den Primern MYN9 und MYN10 durchgeführt. Eine PCR umfasst insgesamt 40 Zyklen. Die PCR-Produkte werden anschließend gelelektrophoretisch analysiert. Die anschließende HPV-Typisierung erfolgt mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) und anschließender Hybridisierung mit HPV-genus-spezifischen Sonden. Bei der RFLP-Analyse schneiden Enzyme die DNA an bestimmten Basenkombinationen. Verwendet man mehrere Enzyme, die an genau definierten Stellen schneiden, ergibt die Kombination der Schnittmuster für jeden HPV-Typ ein spezifisches Bild. Anhand dieses Bildes kann nun der zugrundeliegende HPV-Typ bestimmt

werden. Die durch RFLP gewonnenen Bandenmuster können jedoch beim Vorhandensein größerer Mengen an Restriktionsfragmenten, wie sie durch unspezifische PCR-Produkte oder mehrerer enthaltener HPV-Typen vorkommen können, unklar sein. Um nun die Spezifität sowie die Sensitivität zu erhöhen, erfolgt die Hybridisierung mit HPV-genus-spezifischen Sonden. Diese Sonden binden an definierte Basensequenzen der zuvor amplifizierten HPV-DNA. Hierdurch wird das Restriktionsfragment sichtbar, das mit der Sonde hybridisiert hat. Durch diesen Vorgang reduziert sich die Anzahl der sichtbaren Fragmente je Restriktionsenzym auf eins pro vorhandenen HPV-Typ. Anhand des Musters der mit Hilfe der Sonden hybridisierten Fragmente kann schließlich der HPV-Typ genau definiert werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Fluoreszenz in der Urethra nach PPIX Anreicherung

Nach erfolgter Inkubation mit 5-ALA war bei allen Patienten PPIX-Fluoreszenz in der Urethra makroskopisch nachweisbar. Die klinisch unter Weißlicht sichtbaren HPV-Läsionen zeigten eine erhöhte Anreicherung von PPIX. Je nach verwendetem Filtersystem erschien das Normalgewebe blau-violett oder grünlich in der Betrachtung. Neben den klinischen HPV-Läsionen konnten auch subklinische HPV-Läsionen mit dieser Technik dargestellt werden. Die in Abbildung 7b markierten, im Epithelniveau gelegenen, subklinischen Satellitenherde wären unter normaler Weißlichtbeleuchtung (Abbildung 7a) sehr leicht übersehen worden. Bei der Fluoreszenzausleuchtung nach 5-ALA-Applikation konnte die auf Grund der PPIX-Fluoreszenz rot gefärbte und kontrastreich vom blau-violetten Längenwellenbereich des Anregungslichtes erscheinende HPV-Läsion klar vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden.

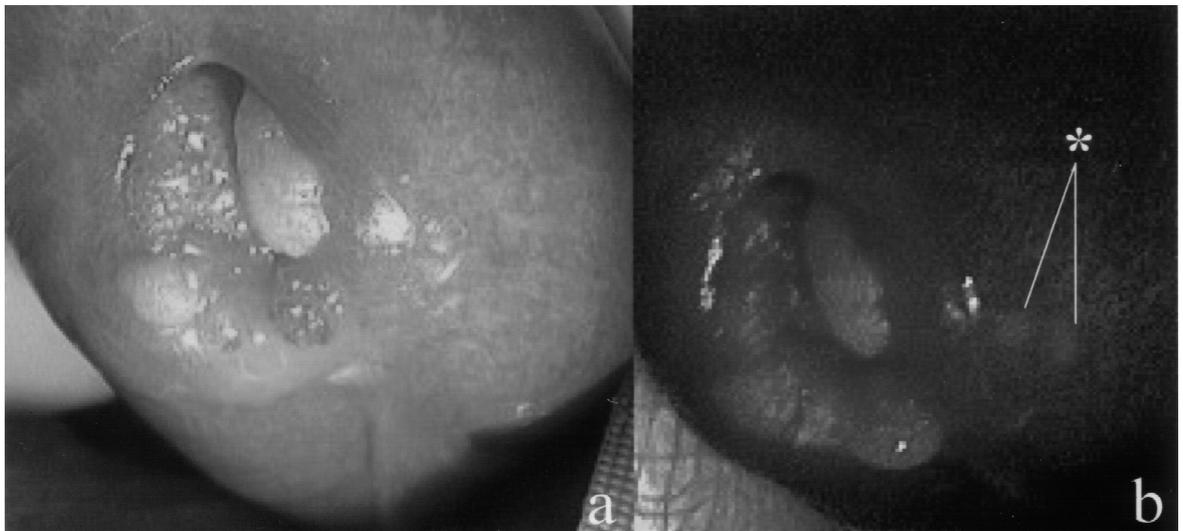


Abbildung 7a und 7b: Klinische und subklinische Satellitenherde unter Weißlichtbeleuchtung und nach PPIX-Fluoreszenz

In Abbildung 8 demarkiert sich ein intraurethral gelegenes Harnröhrenkondylom, welches sich analog durch die vermehrte PPIX-Anreicherung leuchtend rot darstellt. Die Normalschleimhaut stellt sich blau-violett dar.

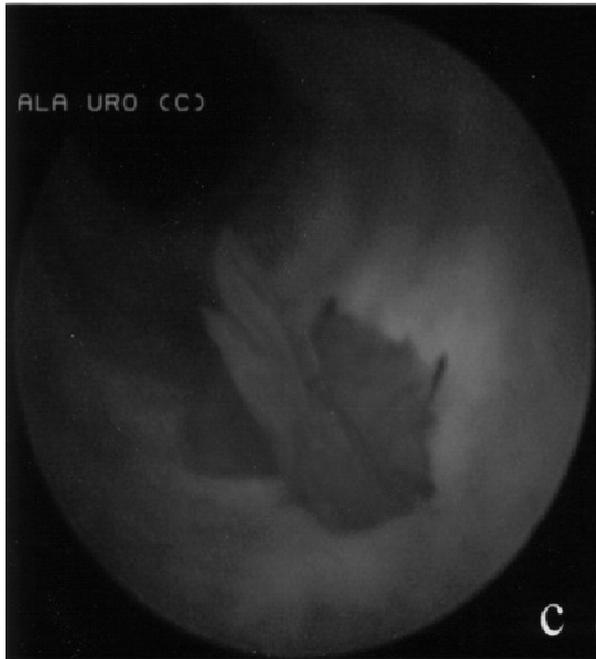


Abbildung 8: Harnröhrenkondylom nach PPIX Anreicherung

In der Fluoreszenzmikroskopie dieses Befundes (Abbildung 9) wird deutlich, dass die Protoporphyrin IX-Anreicherung auf das Epithel der Harnröhrenkondylome beschränkt ist und nicht das subepitheliale Stoma der Kondylome erreicht.

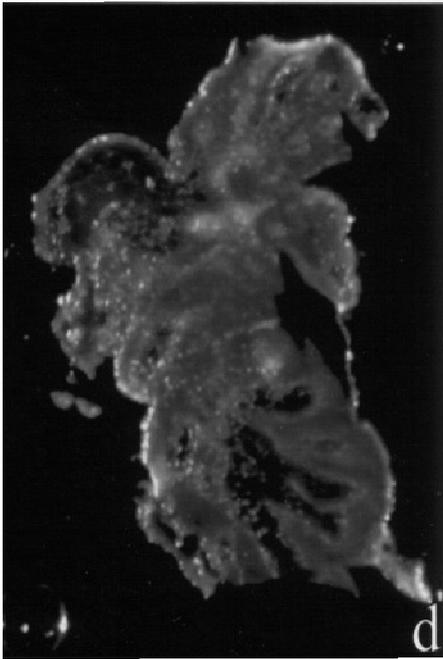


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopischer Befund eines Harnröhrenkondyloms

### 3.2 Spektroskopische Messungen in der Harnröhre

In Abbildung 10 ist ein typisches Fluoreszenzbild einer HPV-Läsion dargestellt. Man erkennt deutlich das intensiv rot fluoreszierende HPV-Gewebe, das sich vom blau-violetten Normalgewebe abgrenzt. Das Fluoreszenzspektrum hierzu (Abbildung 11) weist in der HPV-Läsion bei 635 nm einen deutlich höheren PPIX-Peak auf als im Normalgewebe. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität für den PPIX-Peak bei 635 nm zur Autofluoreszenz ergab eine bis zu 17,7-mal höhere Ratio von PPIX in der Läsion im Vergleich zum Normalgewebe. Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich, dass der Fluoreszenzuntergrund je nach Lokalisation in der Harnröhre stark variierte. Um dies zu untersuchen, wurde bei vier Patienten mit kleinen HPV-Läsionen in der Urethra lokalisationsabhängige Spektralmessungen der makroskopisch sichtbaren Fluoreszenz durchgeführt. Abbildung 12 zeigt das Ratio bei einer Fluoreszenz von 635 nm/550 nm in Abhängigkeit von der Lokalisation in der Urethra. In der proximalen Harnröhre lag das Ratio bei 1,5. In der Fossa navicularis konnte ein Ratio von 3,2 errechnet werden. Die größten Werte mit einem Ratio von 4,2 wurden am Meatus urethrae gemessen. Es konnte somit gezeigt werden, dass die

Grundfluoreszenz von der proximalen Harnröhre bis zum Meatus urethrae stark zunimmt.

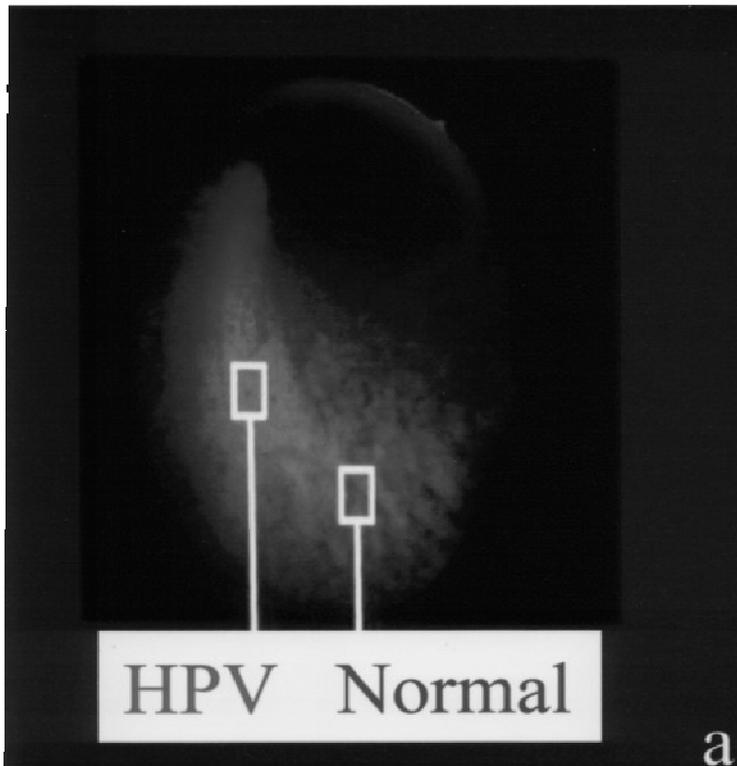


Abbildung 10: Fluoreszenzbild einer HPV-Läsion

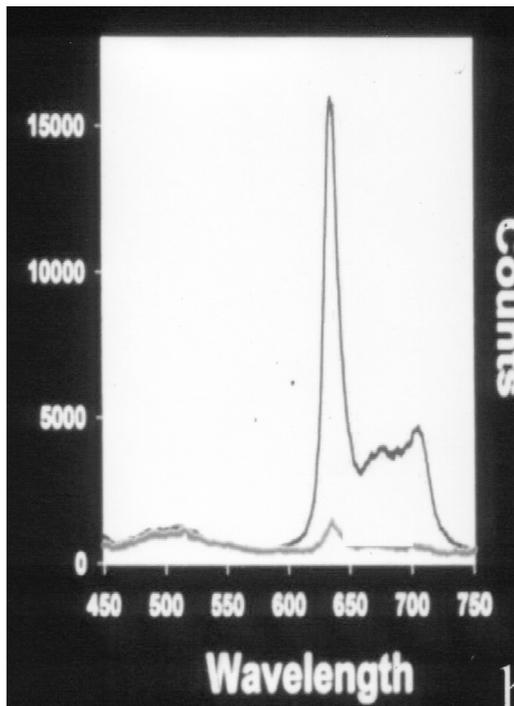


Abbildung 11: Fluoreszenzspektrum einer HPV-Läsion

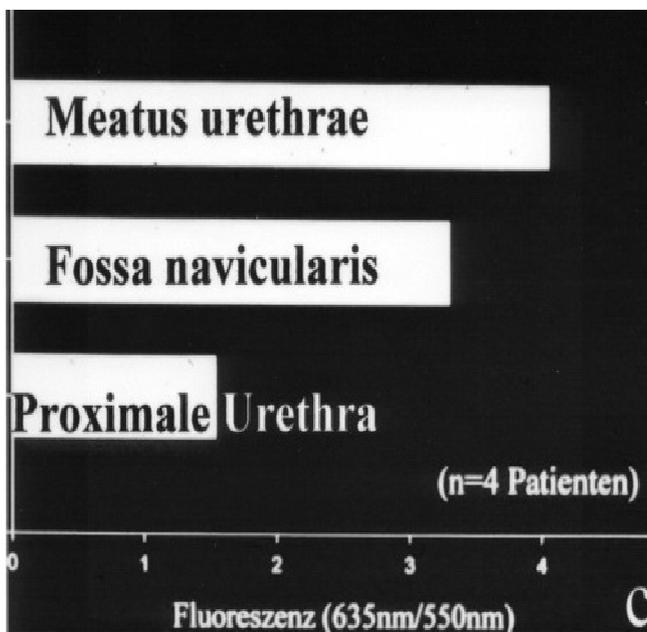


Abbildung 12: Ratio in der Urethra

### **3.3 Lokalisation der HPV-Läsionen bei der Fluoreszenzurethroscopie-kontrolle**

Von 1988 bis 2000 wurden im Klinikum Großhadern insgesamt 168 Patienten im Alter von 18-59 Jahren (Median 27 Jahre) an Condylomata acuminata der Harnröhre mit dem Nd:YAG-Laser behandelt. Von 1988 bis 1995 waren es 93 Patienten, die unter Weißlicht-Urethroscopie mit dem Nd:YAG-Laser therapiert wurden. Von 1995–2000 wurden 75 Patienten intraurethral unter Kontrolle der Methode der Photodynamischen Diagnostik nach Applikation von 5-ALA mit dem Nd:YAG-Laser behandelt. Insgesamt konnten bei 155 von 168 Patienten die Kondylome mit nur einer Laserbehandlung, das heißt ohne Auftreten weiterer Befunde innerhalb eines Jahres, klinisch saniert werden. Bei 13 Patienten musste in weiteren Sitzungen nochmals gelasert werden. 8 Patienten benötigten zwei spätere Laserungen, 4 Patienten wurden dreimalig und ein Patient wurde insgesamt viermal gelasert. Bei den insgesamt durchgeführten 187 Nd:YAG-Laserbehandlungen wurden in einem Zeitraum von einem Jahr alle Patienten saniert. Die Patienten wurden engmaschig, nach erfolgter Operation, in einem Abstand von zwei Wochen, zwei Monaten, sechs Monaten und einem Jahr auf eventuelle Rezidive von Condyloma acuminata urethroscopiert. Dabei lag die Rezidivhäufigkeit der insgesamt gelaserten Patienten bei 35,7%. Diese Patienten wurden in weiteren Sitzungen mit dem Nd:YAG-Laser behandelt. Die Verteilung der Rezidive in der Urethra war unterschiedlich. Bei 100 von insgesamt 168 (59,5%) Patienten traten Rezidive nur am Meatus urethrae externus auf. Bei 13 (7,7%) Patienten konnten Rezidive nur in der Fossa navicularis gezeigt werden. 47 (28%) Patienten zeigten Rezidive am Meatus urethrae externus sowie in der Fossa navicularis auf. In der distalen Harnröhre traten bei 8 (4,8%) Patienten Rezidive auf.

### 3.4 Effektivität der Urethralcondylomtherapie mit und ohne Fluoreszenzkontrolle

Tabelle 4 zeigt das postoperative Follow-up über ein Jahr von den Patientengruppen A (konventionelle Weißlichttechnik) und Patientengruppen B (PDD-unterstützte Technik).

postoperatives Follow-up nach Untersuchung	2 Wochen	2 Monate	6 Monate	1 Jahr
Gruppe A Σ=44 Rezidive	11	16	14	3
Gruppe B Σ=16 Rezidive	0	9	6	1

Tabelle 4: Zeitliches Auftreten und Anzahl der Rezidive dargestellt in den Patientengruppen A und B

In Gruppe A wurden die Patienten zusammengestellt, die von 1988 bis 1995 mit der konventionellen Weißlichttechnik urethroskopiert und anschließend gelasert wurden. Die Gruppe B zeigt die Patienten, die seit 1995 mit Hilfe der Fluoreszenzendoskopie gelasert wurden. Insgesamt konnten bei 60 (35,7%) der Patienten Rezidive in der Harnröhre nach Laserbehandlung festgestellt werden. Es zeigt sich eine signifikant niedrigere Rezidivhäufigkeit bei den Patienten, bei denen eine PDD-unterstützte Lasertherapie im Gegensatz zu einer Lasertherapie mit normalem Weißlicht durchgeführt wurde ( $p < 0,0001$ ; Chi-Quadrat-Test). Bei beiden Gruppen traten die Rezidive meistens innerhalb der ersten zwei bis sechs Monate auf. Rezidive nach einem Jahr traten zwar auf, können jedoch als eher selten eingestuft werden.

Tabelle 5 gibt Auskunft über die Ausdehnung der Erstbefunde der Kondylome in der Harnröhre. Die meisten Effloreszenzen (58,3%) waren klein und unifokal auftretend. Die zweitgrößte Gruppe mit 33,9% stellten die zwar auch kleinen, aber multifokal auftretenden Effloreszenzen dar. Einen kleinen Anteil mit 4,8%

machten die semizirkulär wachsenden großen Kondylome aus. Nur in 3% der Fälle fanden sich große zirkulär wachsende Kondylome. Man kann also sehen, dass der überwiegende Teil (92,2%) der Harnröhrenkondylome eher kleine unifokal, bzw. multifokal auftretende Kondylome waren. Semizirkulär bzw. zirkulär wachsende Kondylome stellten eine Seltenheit dar.

Gruppe	Ausdehnung der HPV- Läsionen	Anzahl
I	Unifokal kleiner als $\frac{1}{4}$ der Zirkumferenz	n= 98 (58,3%)
II	Multifokal kleiner als $\frac{1}{4}$ der Zirkumferenz	n=57 (33,9%)
III	Semizirkuläre, extensive HPV-Läsion der Urethra	n=8 (4,8%)
IV	Zirkulär, extensive HPV-Läsion der Urethra	n=5 (3%)

Tabelle 5: Ausdehnung der urethralen Kondylome bei 168 Patienten

Tabelle 6 zeigt die Anzahl der Rezidive in der Patientengruppe A und B in Bezug auf die Lokalisation der Befunde in der Harnröhre. In beiden Gruppen waren orthotopisch kontralaterale Rezidive sowie orthotopisch ipsilaterale Befunde am häufigsten.

Lokalisation der Rezidive	Rezidive Gruppe A	Rezidive Gruppe B
orthotopisch ipsilateral	17	3
orthotopisch contralateral	15	9
heterotopisch proximal	10	3
heterotopisch distal	2	1

Tabelle 6: Lokalisation der Rezidive verglichen mit dem erstmaligen Auftreten in den Patientengruppen A und B

In Tabelle 7 wird die Häufigkeit der Rezidive nach Nd:YAG-Laserung in den Patientengruppen A (Weißlichturethroscopie) und B (PDD-gestützte Urethroscopie) in Relation zur Ausdehnung der Kondylome gegenübergestellt. In den Gruppen III und IV, den größeren Kondylomen, war die Rezidivhäufigkeit in beiden Patientengruppen sehr hoch und unterschieden sich nicht signifikant. Diese Patienten der Gruppe III und IV mussten auf Grund der ausgedehnten Befunde mehrfach nachbehandelt werden. Dagegen konnte bei den eher kleinen Kondylomen (Gruppe I und II) in der Fluoreszenzgruppe eine deutlich geringere Rezidivhäufigkeit festgestellt werden. Die Rezidivhäufigkeit war hier signifikant geringer ( $p=0,007$  und  $p=0,028$ ; Fischer's-exakt-Test).

Gruppe	insgesamt	Rezidivhäufigkeit in Patientengruppe A	Rezidivhäufigkeit in Patientengruppe B
I	29/98	23/56	6/42 p=0,007
II	21/57	16/32	5/25 p=0,028
III	5/8	3/3	2/5 nicht signifikant
IV	5/5	2/2	3/3 nicht signifikant

Tabelle 7: Häufigkeit der Rezidive in den Patientengruppen A und B nach Nd:YAG-Laserung in Relation zur Größe der Erstbefunde

### 3.5 Darstellung von subklinischen HPV-Läsionen der Urethra

Die Studie umfasste 84 Patienten im Alter von 17–42 Jahren (Median 24). Alle Patienten erkrankten an Condyloma acuminata und wurden von Kollegen unterschiedlicher Fachrichtungen zur Lasertherapie in die Urologische Universitätsklinik des Klinikums der LMU Großhadern überwiesen. 43 Patienten wiesen Condyloma acuminata der Urethra auf, weitere 41 Männer erkrankten an Kondylomen des äußeren Genitales. Ein Teil der Patienten (58 von insgesamt 84 Patienten) wurde bereits mit den unterschiedlichsten Methoden vorbehandelt. Hierunter fanden sich Behandlungen mit Podophyllotoxin, Podophyllin, Excision, Elektroresektion und CO<sub>2</sub>-Laserbehandlungen. Die Patienten wiesen bis zu fünf Rezidive auf, bevor sie an unserer Studie teilnahmen. Alle Patienten wurden mit einer Lupe (fünffache Vergrößerung) vor und nach Essigsäureapplikation am äußeren Genitale auf klinische und subklinische Condylomata acuminata untersucht. Anschließend wurde nach der bereits beschriebenen Methode 5-ALA in die Harnröhre instilliert und eine Urethroskopie unter Weißlicht und mit dem Verfahren der PDD durchgeführt. Bei allen Patienten, die klinische Effloreszenzen der Harnröhre aufwiesen, wurde eine Gewebeprobe zur histologischen Sicherung entnommen. Bei den Patienten, bei denen sich unter Hilfe der PDD-Methode subklinische Effloreszenzen der Harnröhre demarkierten, wurden Proben der auffälligen

Schleimhaut und einer nicht demarkierten unauffällig wirkenden Schleimhaut entnommen. Die Hälfte der Proben wurde nach Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff konserviert. Anschließend wurden die Proben zur weiteren Analyse in ein Referenzlabor für eine Sequenzierung nach Hamburg geschickt. Die andere Hälfte der Proben wurde in Formalin fixiert, anschließend mit HE gefärbt und schließlich histologisch untersucht.

	Condylomata acuminata	subklinische HPV-Läsionen
Meatus urethrae externus	31	7
Fossa navicularis	9	5
Proximal urethra	3	1
	<b><math>\Sigma=43</math></b>	<b><math>\Sigma=13</math></b>

Tabelle 8: Lokalisation klinischer und subklinischer HPV-Läsionen unter konventioneller- und Fluoreszenzsurethroscopie

Tabelle 8 fasst die Befunde der Weißlicht- und der Fluoreszenzsurethroscopie zusammen. Der überwiegende Teil (92,8%) der klinischen und subklinischen Effloreszenzen fand sich am Meatus und in der Fossa navicularis, dem distalen Teil der Harnröhre. Bei 7,2% der Befunde lagen die Effloreszenzen in der proximalen Harnröhre. Alle histologisch bestätigten klinischen HPV-Effloreszenzen der Urethra (n=43) zeigten in der Fluoreszenzsurethroscopie deutliche Porphyrinanreicherungen und eine exakte Abgrenzung zur Normalschleimhaut. Bei 13 Patienten konnten subklinische Läsionen nur mit Hilfe der Fluoreszenzsurethroscopie nach Applikation von 5-ALA gefunden werden. In den histologischen Untersuchungsbefunden konnten die subklinischen HPV-Läsionen verifiziert sowie eine Typisierung durchgeführt werden.

Abbildung 13 zeigt die deutlich (17,7-fach) höhere Porphyrinanreicherung der subklinischen HPV-Effloreszenzen im Vergleich zur normalen Urethral-schleimhaut. Bei 13 Fällen fanden sich mit der Fluoreszenzendoskopie

subklinische HPV-Effloreszenzen, die mit der herkömmlichen Weißlicht-urethroscopie nicht erkennbar waren.

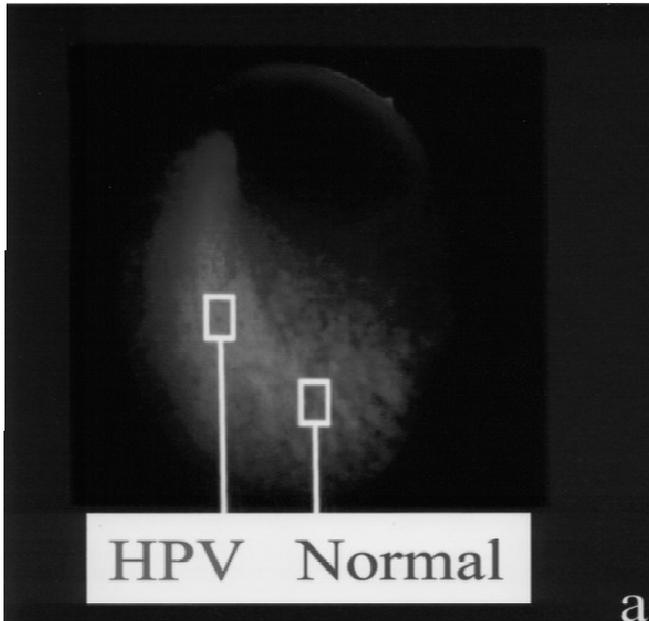


Abbildung 13: Subklinische HPV-Effloreszenz im Vergleich zur normalen Urethral Schleimhaut

Bei einem Patienten, der ausschließlich Genitalwarzen aufwies, konnte mit Hilfe der PDD eine subklinische Urethraläsion beobachtet werden. Zwölf Patienten mit histologisch gesicherten urethralen HPV-Effloreszenzen zeigten subklinische Läsionen bei der Fluoreszenzurothroscopie. Bei 3 der 13 fluoreszenzendooskopisch nachgewiesenen subklinischen Läsionen konnten histologisch einzelne Koilozyten identifiziert werden. Des Weiteren wurden lediglich gering bis mittelgradige Epitheldysplasien ohne charakteristische Anzeichen einer HPV-Infektion nachgewiesen. Die durchgeführten Kontrollbiopsien der benachbarten unauffälligen Schleimhaut wurden auch histologisch als unauffällig befundet. Dennoch konnte in einer Kontrollbiopsie der gleiche HPV-Typ wie in der unmittelbar benachbarten subklinischen HPV-Läsion gefunden werden. In Tabelle 9 werden die Ergebnisse der Analysen subklinischer HPV-Läsionen der Urethra gezeigt. Es fanden sich häufiger (9 von 13) HPV-Low-risk-

Typen (HPV 6, 11, 34) als High-risk-Typen (HPV 18, 31, 52, 58) in den subklinischen HPV-Läsionen der Urethra.

HPV-Typen in subklinischen HPV-Läsionen der Urethra	Anzahl ( $\Sigma=13$ )
HPV 6	6
HPV 11	2
HPV 18	1
HPV 31	1
HPV 34	1
HPV 52	1
HPV 58	1

Tabelle 9: Anzahl verschiedener HPV-Typen in subklinischen Läsionen der Urethra

## 4. Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung und Beurteilung der Fluoreszenzurothroskopie bei HPV-Infektionen. Es besteht großes Interesse an einer Verbesserung der Diagnostik und der Therapie urethraler HPV-Infektionen, da Humane Papillomviren, wie bereits in der Einführung erwähnt, die häufigsten Erreger von sexuell übertragbaren Virusinfektionen darstellen. Bei der Diagnostik und Therapie von Harnröhrenkondylomen orientierte man sich bisweilen an den HPV-Infektionen des äußeren Genitales (Schneede 2001). Mit diesen Verfahren konnten jedoch in der Urethra nur Kondylome am Meatus urethrae externus behandelt und detektiert werden. Weiter proximal gelegene bzw. subklinische Effloreszenzen konnten bisweilen nicht klar abgegrenzt und diagnostiziert werden. In der Literatur werden vereinzelt Möglichkeiten zur Diagnostik von Harnröhrenkondylomen beschrieben. Bei Urinuntersuchungen von Patienten mit HPV-infizierten Sexualpartnern konnten in einer Studie von Nahhas (Nahhas, 1986) keine cytologischen Veränderungen gefunden werden. Von Omar wurde 1991 der „PAP-TEST“ für Männer vorgestellt. Auch hier konnten in Abstrichen nach Papanicolau von Patienten mit dysurischen Beschwerden keine HPV-Infektionen nachgewiesen werden. Jedoch wurden Zellen mit koilozytären Veränderungen beschrieben. Erst bei der anschließenden DNA-Hybridisierung konnte eine Infektion mit HPV belegt werden. Dieser Test ist eine aufwendig durchzuführende und kostenintensive Möglichkeit, HPV in der Urethra nachzuweisen ohne anschließend behandeln zu können. Für die Diagnostik und Behandlung von Harnröhrenkondylomen gab es bis vor einigen Jahren keine einheitlichen Richtlinien. Erst 2000 erschienen von internationalen (European Course on HPV associated pathology 2000) und nationalen Gremien (Deutsche STD-Gesellschaft) therapeutische Richtlinien zur Therapie von HPV-Infektionen der Anogenitalregion. In der vorliegenden Arbeit wird nun erstmalig eine Demarkierung von subklinischen HPV-Effloreszenzen mit Hilfe der Fluoreszenzurothroskopie in der Urethra vorgestellt. Hierzu musste im Vorfeld ein Applikationsmedium und eine Substanz zur in vivo Markierung gefunden werden.

Erstmals wurde 1994 in der Urologie beim Harnblasenkarzinom die Methodik der topischen Applikation von 5-Aminolävulinsäure zur in vivo Markierung urethelialer Neoplasien erfolgreich eingesetzt. Die Gruppe um Kriegmaier arbeitete mit einer dreiprozentigen NaCl-Lösung beim Harnblasenkarzinom (Kriegmaier 1994a, Kriegmaier 1994b, Jichlinski 1995). Die ersten erfolglosen Versuche zur in vivo Markierung urethelialer Neoplasien wurden bereits 1966 von Whitmore und Mitarbeitern mit Tetracyclinen unternommen. Da jedoch damals eine Probenentnahme unter Fluoreszenzlicht nicht möglich war, wurde der vielversprechende Ansatz nicht weitergeführt. Um 5-Aminolävulinsäure in der Harnröhre anwenden zu können, wählten wir als Applikationsmedium handelsübliches Instillagel. In systematischen Versuchsreihen stellte sich die 0,1%ige Instillalösung bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten als optimal heraus. Hierunter konnte eine scharfe Demarkierung der HPV-Läsionen erzielt werden. HPV-Läsionen sowie subklinische Läsionen konnten kontrastreich vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden. Jedoch müssen die Konzentrationsvorgaben sowie die Zeitvorgaben genau eingehalten werden, um eine unspezifische Grundfluoreszenz der gesamten Harnröhre zu minimieren. Für den Fluoreszenznachweis in situ bedienten wir uns der Technik der Fluoreszenzdiagnostik. Erste Pilotstudien und Versuche zur Fluoreszenzdiagnostik von HPV-assoziierten Epithelveränderungen erfolgten in der urologischen Abteilung im Klinikum Grosshadern bereits 1994. Ab 1995 wurde die Technik dann in die Routinediagnostik bei allen HPV-Eingriffen, insbesondere in der Urethra, eingeführt. Hiermit etablierte sich für die klinische Routine ein schnelles und unkompliziertes Verfahren. Zur Fluoreszenzdetektion verwendete man optimierte Kameras mit der notwendigen hohen Lichtempfindlichkeit und Endoskope mit guter Lichtausbeute. Eine semiquantitative Analyse der beobachteten Fluoreszenz wurde durch den zusätzlichen Einsatz eines Spektrometers erreicht. An Hand der spektralen Charakteristik konnte unterschieden werden, welcher Anteil der beobachteten Rotfluoreszenz auf Protoporphyrin IX zurückzuführen war und welchen Anteil die Autofluoreszenz zum Gesamtbild lieferte. Für die Auswertung der Spektren wurden sogenannte Ratios gebildet. Diese geben entweder das Verhältnis der Intensität bei zwei Wellenlängen innerhalb eines Spektrums oder das Verhältnis der Intensität bei

einer bestimmten Wellenlänge im HPV-infizierten Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe des gleichen Patienten wieder. Neben der Korrelation zwischen Histologie und beobachteter Fluoreszenz entnommener Biopsien wurde eine subjektive Bewertung der Qualität der Erkennbarkeit der Befunde unter Weißlicht und Fluoreszenzanregung durchgeführt. Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit, neben einer feinen Abstufung der Beurteilung auch zusätzliche Kriterien wie zum Beispiel die Schärfe der Abgrenzung zu berücksichtigen, und erlaubt einen direkten Vergleich zwischen Weißlicht- und Fluoreszenzbetrachtung. Um die Lokalisation von 5-ALA-induzierter PPIX-Fluoreszenz im Gewebe zu bestimmen, bedienen wir uns des bildgebenden Verfahrens der Fluoreszenzmikroskopie. Diese Methodik wurde bereits von einigen anderen Arbeitsgruppen angewendet (Steinbach 1994, Fehr 1996, Fan 1996, Pahernik 1998, van den Boogert 1998, Stummer 1998). Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte sichergestellt werden, dass die beobachtete Rotfluoreszenz von PPIX stammt. Zur Befundverifizierung wurde eine HPV-Typisierung in einem Hamburger Kooperationslabor durchgeführt.

#### **4.1 Fluoreszenz in der Urethra nach PPIX-Anreicherung**

Nach Instillation von 5-ALA in die Harnröhre konnte eine gute visuelle Demarkierung der HPV-assoziierten Zellen erzielt werden (siehe Abbildung 8). Ähnliche Beobachtungen wurden bei Kriegmaier et al. beschrieben. Auch hier konnte bei normalem Urothel eine geringere PPIX-Fluoreszenzintensität als bei dysplastischem oder malignem Gewebe gefunden werden (Kriegmaier 1995a). Die PPIX-Anreicherung zeigte nach erfolgter Applikation eine hohe Gewebespezifität. Zellen der Epidermis und des auskleidenden Epithels sind in der Lage große Mengen an PPIX zu synthetisieren. Die Anreicherung von PPIX von Zellen mesodermalen Ursprungs ist deutlich geringer (Divaris 1990; Kennedy und Pottier 1992; Kennedy 1990; Loh 1993b; Steinbach 1994). Bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an ungefärbten Gefrierschnitten humaner Blasengewebeproben konnte an der Universität Regensburg die 5-ALA-induzierte Fluoreszenz nahezu ausschließlich auf das Urothel begrenzt werden (Steinbach 1994). In der Submukosa konnte hier, ebenso wie im Epithel, keine Rotfluoreszenz festgestellt werden. In meinen Untersuchungen

stellten sich die Harnröhrenkondylome durch die vermehrte PPIX-Anreicherung je nach verwendetem Filtersystem rot fluoreszierend gegenüber der blauviolettten Normalschleimhaut dar. In dieser Arbeit konnten neben den klinischen HPV-Läsionen erstmals auch subklinische HPV-Läsionen gezeigt werden (siehe Abbildung 7b). Die subklinischen Läsionen wären in der Weißlicht-urethroscopie höchstwahrscheinlich übersehen worden (siehe Abbildung 7a). Bei genauerer Betrachtung der Abbildung 7b kann man weiterhin neben den Kondylomen die schwächere diffuse Grundfluoreszenz des Normalepithels betrachten. Dieser Effekt findet sich bei zu hoher 5-ALA-Konzentration des Instillationsgemisches ( $>0,1\%$ ) oder bei einer zu langen Expositionsdauer ( $>60$  min) der Lösung. Diese als störend wirkende diffuse Grundfluoreszenz ist gerade für den Nachweis subklinischer Effloreszenzen problematisch. Die subklinischen Effloreszenzen können unter Umständen nicht mehr erkennbar sein. Auch entzündliche Begleiterkrankungen der Urethra, wie zum Beispiel bei einer Urethritis, können durch die erhöhte unspezifische Grundfluoreszenz subklinische HPV-Läsionen verdecken. Ebenso können Hyperkeratosen sowie eventuelle Blutungen falsch-negative Ergebnisse nach sich ziehen. Wie bei Kennedy beschrieben, können Hyperkeratosen zu einer verminderten Oberflächenpenetration von 5-ALA führen und somit eine unzureichende PPIX-Akkumulation bewirken (Kennedy 1992). Grundsätzlich ist festzustellen, dass die Sensitivität der Methode sehr hoch ist, die Spezifität jedoch eher eingeschränkt ist.

#### **4.2. Spektroskopische Messungen in der Harnröhre**

Bei den Auswertungen der Fluoreszenzspektren konnten die bildgebenden Untersuchungen bestätigt werden. Sowohl bildgebend als auch spektral aufgelöst konnte eine eindeutige, kontrastreiche Differenzierung von HPV-infiziertem Gewebe und angrenzendem Normalgewebe erzielt werden. Es konnte eine Ratio von 17,7 errechnet werden. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Studie von Forrer et al. an 8 Patienten überein (Forrer 1994). Hier wurden nach intravesikaler Instillation einer 3%igen 5-ALA-Lösung und Anregung mit einem Laser ähnlich hohe T/N Ratios zwischen 1,5 und 20 beschrieben. Auch in einer Studie von Chang et al. am Rattenmodell lag die PPIX-Fluoreszenzintensität

gemessen am Urothel nach intravesikaler Instillation einer 1%igen 5-ALA-Lösung im Mittel um den Faktor 11 über den Werten der Muskularis (Chang 1996). Der hohe Kontrast der Fluoreszenzintensität kann auf die selektive Anreicherung von PPIX im HPV-veränderten Urothel zurückgeführt werden. Die gesteigerte Anzahl fluoreszierender Zellschichten im Bereich der verdickten Läsion im HPV-assoziierten Gewebe verstärkt des Weiteren den Fluoreszenzkontrast. In Abb. 12 wurde die unterschiedliche Grundfluoreszenz in der Urethra dargestellt. Es zeigte sich eine Zunahme der Grundfluoreszenz von der proximalen Urethra hin zum Meatus urethrae externus. Dies liegt sehr wahrscheinlich an der unterschiedlichen epithelialen Auskleidung der Urethra, die eine zunehmende plattenepitheliale Differenzierung in den distalen Urethraabschnitten aufweist. Dies würde auch erklären, weshalb am äußeren Genitale das Fluoreszenz-Verhältnis HPV-assoziiierter Epithelveränderungen zum Normalepithel grundsätzlich ungünstigere Werte aufweist. Je verhornter das Epithel, desto schlechter ist generell die Protoporphyrin IX Anreicherung im Epithel und desto ungünstiger die Differenzierbarkeit HPV-assoziiierter Epithel-läsionen gegenüber dem Normalgewebe.

#### **4.3 Lokalisation der HPV-Läsionen bei der Fluoreszenzurethroscopie-kontrolle**

Bei der Auswertung der Daten zur Lokalisation der HPV-Effloreszenzen nach erfolgter Nd:YAG-Laserbehandlung konnte man sehr deutlich ein Verteilungsmuster der Rezidive in der Harnröhre feststellen. Mit fast 60% waren die meisten Rezidive direkt am Meatus urethrae externus gelegen, also an dem Teil der Harnröhre, den man auch durch eine Meatusspreizung einsehen könnte. Die von uns gezeigten subklinischen Befunde gerade am Meatus könnten jedoch mit dieser Technik nicht aufgespürt werden und wären somit auch nicht therapiert worden. Erst mit der fluoreszenzgestützten Technik konnten diese Befunde bereits bei der Erstuntersuchung diagnostiziert werden. Wahrscheinlich wurden viele dieser subklinischen Läsionen bei der Erstuntersuchung übersehen und entwickelten sich bis zur Urethroscopiekontrolle zu Kondylomen. Wenn man noch die Befunde in der Fossa navicularis mit einbezieht, so konnten in der distalen Harnröhre nahezu 95% der Rezidive

beobachtet werden. Als weitere Ursache für die hohen Rezidivraten ist in der Literatur eine Verschleppung der Viruslast zum Beispiel durch das Untersuchungsinstrumentarium beschrieben worden (Ferenczy, Bergeron, Richart 1989). Daher sollte grundsätzlich eine endoskopische Abklärung der proximalen Harnröhre erst nach Therapie der meatalen Effloreszenzen vorgenommen werden, um eine weitere iatrogene Infektausbreitung möglichst zu verhindern.

#### **4.4 Effektivität der Urethralcondylomtherapie mit und ohne Fluoreszenzkontrolle**

Augenscheinlich wird die hohe Rezidivhäufigkeit bei den HPV-Infektionen von der Untersuchungsmethode sowie von der Lokalisation und Größe der Erstbefunde beeinflusst. Eine Sanierung nach Erstbehandlung kann als eher selten eingestuft werden (Clinical Effectiveness Group 1999). Eine Ursache für die hohen Rezidivraten kann darin gesehen werden, dass neben den behandelbaren klinischen Kondylomen auch subklinische Befunde bestehen, die unter einer Weißlichturethroscopie übersehen wurden. Später entstehen hieraus klinische Befunde, die dann fälschlicherweise als Rezidive nach Kondylomtherapie gedeutet werden. Auch könnte ein direkter Epithelkontakt, zum Beispiel durch extensive Läsionen wie in den Gruppen III und IV der Tabelle 5 beschrieben, mit dem gegenüberliegenden Gewebe als Infektionsweg gesehen werden. Hier profitieren die Patienten nicht signifikant von einer fluoreszenzgestützten Urethroscopie. Der in unseren Untersuchungen gefundene hohe Prozentsatz von 40% orthotop contralateraler Rezidive belegt diese These. Wenn man die Ergebnisse der Tabelle 4 gegenüberstellt, fällt auf, dass in der Gruppe der unter Weißlichttechnik gelaserten Patienten nahezu bei einem Viertel der Patienten in den ersten vierzehn Tagen Rezidive auftraten. In der anderen Gruppe, mit der PDD-unterstützten Technik, konnten in den ersten vierzehn Tagen überhaupt keine Rezidive gesehen werden. Diese Läsionen wurden anscheinend mit der Weißlichturethroscopie übersehen. Auch in weiteren Follow-up-Untersuchungen profitierten die Patienten deutlich von der fluoreszenzgestützten Urethroscopie. Die Rezidivhäufigkeit lag signifikant niedriger. Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass durch die

Anwendung einer Fluoreszenzkontrolle die Effektivität der Urethrakondylomtherapie gesteigert werden kann.

#### **4.5 Darstellung von subklinischen HPV-Läsionen der Urethra**

Die Darstellung subklinischer Effloreszenzen war bisweilen nur am äußeren Genitale beschrieben worden. Hier konnten neben den augenfälligen klinischen Effloreszenzen mit einem Essigsäuretest auch subklinische Effloreszenzen gesehen und anschließend behandelt werden. Ohne eine weiterreichende Endoskopie können jedoch die übrigen Harnröhrenabschnitte nicht beurteilt werden. Möglicherweise sind die nachweislich hohen Rezidivraten von Kondylomen in der Urethra auf diese diagnostische Lücke zurückzuführen. Der zytologische Koilozytennachweis im Urin und Ejakulat (Nindl, Jacobs, Walboomers 1999 sowie Koyo, Inoue, Koyama 1994) von Männern ohne erkennbare Urethrakondylome deutete bereits darauf hin, dass analog dem äußeren Genitale subklinische und latente HPV-Infektionsverläufe auch in der Urethra existieren mussten. Das ursprünglich für die Blasentumordiagnostik entwickelte Verfahren der 5-Aminolävulinsäure-induzierten Photodynamischen Diagnostik (Kriegmaier, Baumgartner 1996) bildete die Grundlage für die Fluoreszenzurethroscopie zum Nachweis von HPV-Effloreszenzen. Die Ergebnisse dieser Technik beziehen sich auf 43 Männer mit gesicherten Urethrakondylomen und 41 Männer mit unauffälliger Weißlichturethroscopie. Zwar wurden die meisten Urethrakondylome in den distalen Urethralabschnitten mit der Technik der Meatusspreizung nachgewiesen, 8 Effloreszenzen (18,6%) konnten jedoch mit dieser Technik von außen nicht gesehen werden. Diese konnten erst mit der Urethroscopie gesichert werden. Signifikant häufiger ( $p < 0,001$ ; Vierfeldertest) wurden subklinische HPV-Läsionen der Urethra diagnostiziert, wenn sich auch mit konventioneller Weißlichtendoskopie Kondylome in der Urethra nachweisen ließen. Nur einer von 41 Männern ohne Harnröhrenkondylome zeigte nebenbefundlich eine subklinische HPV-Infektion der Urethra. Da die histologische Untersuchung der biopsierten subklinischen urethralen HPV-Läsionen nur in drei Fällen koilozytäre Zellveränderungen als Hinweis für eine HPV-Infektion aufwies, erfolgte eine zusätzliche HPV-Analyse der subklinischen HPV-Läsionen. In

allen Fällen wurde eine HPV-Infektion dadurch nachgewiesen. Eine Bewertung der HPV-Analyse bezüglich der durch nachgewiesenen High risk- und Low risk-Typen ausgehenden Gefahr einer späteren Entartung der Urethra ist auf Grund dieser Daten nicht möglich. Bekanntlich sind Urethrankarzinome außerdem extrem selten und meist in der proximalen Urethra lokalisiert, so dass kausale Zusammenhänge mit HPV-Infektionen bislang nicht bewiesen werden konnten (Wiener, Lin 1992). Dennoch kommen nicht nur in der Regel mit HPV-Low risk-Typen assoziierten Urethrankondylome, sondern auch die subklinischen HPV-Läsionen der Urethra als Erregerreservoir für Partnerinfektionen in Frage. Die in den subklinischen urethralen Läsionen festgestellten HPV-Typen 18, 31, 52, 58 sind mit intraepithelialen Neoplasien und dem Zervix-Karzinom assoziiert (Ferency 1995, Walboomers und Jacobs 1999). Es zeigt sich also, dass bei äußerlich bereits erkennbaren Urethrankondylomen eine weitreichende endoskopische Abklärung der proximalen Urethralabschnitte notwendig ist. Die Fluoreszenzurethroscopie nach topischer Applikation von 5-Aminolävulinsäure kann also als wertvolle Ergänzung der HPV-Diagnostik in der Urethra gesehen werden. Mit dieser Technik werden nicht nur kleinere und flache klinische Effloreszenzen seltener übersehen, sondern subklinische HPV-Läsionen der Urethra generell erst sichtbar.

## 5. Zusammenfassung

Weltweit erkranken jährlich ca. 30 Millionen Patienten an klinischen HPV-Infektionen in Form von Genitalwarzen. Diese Genitalwarzen sind jedoch nur ein kleiner Anteil an HPV-Infektionen. Der weitaus größere Anteil verläuft entweder subklinisch oder latent. Die Virulenz klinischer und subklinischer HPV-Infektionen ist epidemiologisch gesichert. Für die hohen Rezidivraten und damit für eine zunehmende Verbreitung der HPV-Erkrankungen werden diagnostisch und therapeutisch übersehene subklinische HPV-Infektionen verantwortlich gemacht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Fluoreszenzurethroscopie eine Methode zur Detektion von subklinischen HPV-Läsionen in der Urethra vorgestellt. Zur Durchführung der Fluoreszenzurethroscopie wurde eine spezielle Applikationsmethode eingeführt. Durch die Verwendung der Fluoreszenzdiagnostik in der Urethra nach topischer Applikation von 5-Aminolävulinsäure konnte eine verbesserte Erkennbarkeit von Harnröhrenkondylomen erzielt werden. Mit dieser Technik werden nicht nur kleinere und flache klinische Effloreszenzen seltener übersehen, sondern subklinische HPV-Läsionen der Urethra generell erst sichtbar gemacht. Der Fluoreszenznachweis erfolgte in situ, mikroskopisch und spektroskopisch. Des Weiteren erfolgten Biopsien mit anschließender PCR- sowie nested-PCR-Analyse zum Nachweis von HPV-DNA mit größtmöglicher Sensitivität. An Hand von zwei retrospektiven Studien konnte der Erfolg dieser Methode bestätigt werden. Durch die Verwendung der fluoreszenzgestützten Diagnostik nach Instillation von 5-ALA in die Harnröhre wurden neben den klinischen Befunden auch subklinische Effloreszenzen dargestellt. Mit der Fluoreszenzurethroscopie konnte gezeigt werden, dass die PPIX-Anreicherung auf das Epithel der Harnröhrenkondylome beschränkt ist. Spektroskopisch konnte eine 17,7-mal höhere Anreicherung im Vergleich zum Normalgewebe bestimmt werden. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der entnommenen Proben konnte eine HPV-Infektion in allen Befunden lokalisiert werden. An Hand der retrospektiven Untersuchungen wurde belegt, dass Patienten von der PDD-unterstützten Lasertherapie im Vergleich zur konventionellen Lasertherapie profitieren. Die Rezidivhäufigkeit war signifikant niedriger.

Die Fluoreszenzurethrooskopie nach topischer Applikation von 5-ALA hat sich als wertvolle Ergänzung der HPV-Diagnostik in der Urethra erwiesen. Ich hoffe, dass die Ergebnisse und Folgerungen meiner Arbeit hierzu einen großen Beitrag leisten. Der hohe technische Aufwand der fluoreszenzdiagnostisch gestützten Lasermethoden ist bei Problemfällen mit Rezidiven und zur Vermeidung von therapieresistenten Komplikationen sicher gerechtfertigt, bleibt aber wohl spezialisierten Zentren auch aus Kostengründen vorbehalten.

## 6. Literaturverzeichnis

Ackermann , G., Abels, C., Bäumlner, W., Langer, S., Landthaler, M., Lang, E.W., Szeimies, R.M.: Simulations on the selectivity of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in vivo. *J. Photochem. Photobiol. B.* 47 (1998): 121-128

Andersson Engels, S., Klinteberg, C., Svanberg, K., Svanberg, S.: In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics. *Phys. Med. Biol.* 42/5 (1991): 815-824

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

Baraga, J., Rava, R., Taroni, P., Kittrell, C., Fitzmaurice, M., Feld, M.S.: Laser induced fluorescence spectroscopy of normal and atherosclerotic human aorta using 306-310 nm excitation. *Lasers. Surg. Med.* 3 (1990): 245-261

Baumgartner, R., Kriegmair, M., Hofstetter, A.: *Fluoreszenzdiagnostik des Harnblasenkarzinoms.* Endo-Press, Tuttlingen (1999)

Bedwell, J., MacRobert, A. J., Phillips, D., Bown, S.: Fluorescence distribution and photodynamic effect of ALA-induced PPIX in the DMH rat colonic tumor model. *Br. J. Cancer* 65/6 (1992): 818-824

Benson, R., Meyer, R., Zaruba, M., McKhann, G.: Cellular autofluorescence is it due to flavins? *J. Histochem. Cytochem.* 27/1 (1979): 44-48

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

Campbell, I., Dwek, R.: *Biological Spectroscopy*. Benjamin Cummings, Menlo Park, CA (1984)

Chang, S., MacRobert, A., Bown, S.: Biodistribution of protoporphyrin IX in rat urinary bladder after intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *J. Urol.* 155 (1996): 1744-1748

Chubeddu, R., Marchesini, R., Mordon, S.R., Svanberg, K., Rinneberg, H. H., Wagnieres, G.(eds): *Progress in biomedical optics*. Proc. SPIE (1994): 84-88

Clinical effectiveness Group (Association of Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases): National guidelines for the Management of anogenital warts. *Sex. Transm. Inf.* 75 (1999): 71-75

Cuiffo, G.: Investo posito con filtrato di verruce vulgare. *Giornale italiano delle malattie veneree.* 48 (1907): 7-12

Dailey, H. A., Smith, A.: Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. *Biochem. J.* 223/2 (1994): 441-445

de Blois, A., Grouls, R., Ackerman, E., Wijdeven, W.: Development of a Stable Solution of 5-Aminolaevulinic Acid for Intracutaneous Injection in Photodynamic Therapy. *Laser Med. Sci.* 17 (2002): 208-215

del C.Battle, A.: Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy-a model for carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B.* 20/1 (1993): 5-22

Divaris, D., Kennedy, J., Pottier, R.: Phototoxic damage to sebaceous glands and hair follicles of mice after systemic administration of 5-aminolevulinic acid correlates with localized protoporphyrin IX fluorescence. *Am. J. Pathol.* 136/4 (1990): 891-897

El-Sharabasy, M., El-Waseef, A., Hafez, M., Salim, S.: Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Br. J. Cancer* 65/3 (1992): 409-412

Fan, K., Hopper, C., Speight, P., Buonaccorsi, G., MacRobert, A., Bown, S.: Photodynamic therapy using 5-Aminolevulinic acid for premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Cancer* 78/7 (1996): 1374-1383

Fehr, M., Chapman, C., Krasieva, T., Tromberg, B., McCullough, J., Berns, M., Tadir, Y.: Selective photosensitizer distribution in vulvar condyloma acuminatum after topical application of 5-aminolevulinic acid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174/3 (1996): 951-957

Ferency, A., Bergeron, C., Richart, R.: Human papillomavirus DNA in fomites on objects used for the management of patients with genital human papillomavirus infections. *Obstet. Gynecol.* 74 (1989): 950-954

Ferency, A.: Epidemiology and clinical pathophysiology of condylomata acuminata. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172 (1995): 1331-1339

Forrer, M., Glanzmann, T., Mizeret, J., Braichotte, D., Wagniere, G., Van den Bergh, H., Jjichlinski, P., Leisinger, H.: Fluorescence excitation and emission spectra of ALA induced protoporphyrin IX in normal and tumoral tissue of the human bladder. In: *Optical biopsy and fluorescence spectroscopy and imaging*, Chubeddu, R., Marchesini, R., Mordon, S., Svanberg, K., Rinneberg, H., and Wagnieres, G. (eds). *Progress in biomedical optics. Proc. SPIE* (1994): 84-88

Gissmann, L., zur Hausen, H.: Human papilloma virus DNA, physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976): 1310-1313

Gross, G., Korting, H., Schöfer, H.: Leitlinie der Deutschen STD-Gesellschaft (DSTDG). Condylomata acuminata und andere HPV-assoziierte Krankheitsbilder des Genitale und der Harnröhre

Grußendorf-Conen, E., Schwarz, E.: Viruswarzen an Haut und Schleimhaut: Erreger, Klinik, Therapie. Berlin, Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 1995

Jichlinski, P., Mizeret, J., Forrer, M., Wagniere, G., van den Bergh, H., Schmidlin, F., Graber, P., Leisinger, H.J.: Les tumeurs superficielles de la vessie. Rappel pathologique et clinique, et presentation une nouvelle methode diagnostique: la photodetection par fluorescesce des caecinomes a epithelium de tranststion basee sur l induction de protoporphyrine IX par l acide delta-aminolevulinique (5-ALA). Rev. Med. Suisse. Romande. 115/3 (1995): 233-237

Kennedy, J., Nadeau, P., Petryka, Z., Pottier, R., Weagle, G.: Clearance times of porphyrin derivattives from mince as measured by in vivo fluorescence spectroscopy. Photochem. Photobiol. 55 (1992): 729-734

Kennedy, J., Pottier, R., Pross, D.: Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. J. Photochem. Photobiol. B 6 (1990): 143-148

Kennedy, J. und Pottier, R.: Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. J. Photochem. Photobiol. B 14 (1992): 275-292

Koutsky, L.: Epidemiology of genital human papillomavirus infection. Am. J. Med. 102 (1997): 3-8

Kriegmair, M., Baumgartner, R., Knüchel, R., Ehsan, A., Steinbach, P., Lumper, W., Hofstädter, F., Hofstetter, A.: Photodynamische Diagnose urothelialer Neoplasien nach intravesikaler Instillation von 5-Aminolävulinsäure. Urologe. A. 33/4 (1994a): 270-275

Kriegmair, M., Baumgartner, R., Knüchel, R., Steinbach, P., Ehsan, A., Lumper, W., Hofstädter, F., Hofstetter, A.: Fluorescence photodetection of neoplastic

urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *Urology*. 44/6 (1994b): 836-841

Kriegmaier, M., Stepp, H., Steinbach, P., Lumper, W., Ehsan, A., Stepp, H. G., Rick, K., Knüchel, R., Baumgartner, R., Hofstetter, A.: Fluorescence cytoscropy following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid: a new procedure with high sensittivity for detection of hardly visible urothelial neoplasias. *Urol. Int.* (1995a): 190-196

Kriegmair, M., Baumgartner, R., Knüchel R et al.: Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *J. Urol.* 155 (1996): 105-110

Kriegmair, M., Baumgartner, R.: Intravesikuläre Instillation von Delta-Aminolävulinsäure (ALA): Eine neue Methode zur photodynamischen Diagnostik und Therapie. *Lasermedizin* 8 (1992): 83

Kyo, S., Inoue, M., Koyama, M et al.: Detection of high-risc human papillomavirus in the cervix and semen of sex partners. *J. Infect. Dis.* 170 (1994): 682-685

Lokowicz, J.: Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum. New York (1985)

Loh, C., MacRobert, A., Bedwell, J., Regula , J., Krasner, N., Bown, S.: Oral versus intravenous administration of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy. *Br. J. Cancer* 68/1 (1993b): 41-51

Loh, C., Veron, D., MacRobert, A., Bedwell, J., Bown, S., Brown, S.: Endogenous porphyrin distribution induced by 5-aminolaevulinic acid in the tissue layers of the gastrointestinal tract. *J. Photochem. Photobiol. B.* 20/1 (1993a): 47-54

Loh, C., MacRobert, A., Bedwell, J., Regula, J., Brown, S.: Oral versus intravenous administration of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy. *Br. J. Cancer* 68/1 (1993b): 41-51

Malik, Z., Lugaci, H.: Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. *Br. J. Cancer* 56 (1987): 589-595

Nahhas, W., Marshal, M., Ponziani, J., Jagielo, J.: Evaluation of urinary cytology of male sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Gyneco. Oncol.* 24 (1986): 279

Nindl, I., Jacobs, M., Walboomers, J. et al.: Interlaboratory agreement of different human papillomavirus DNA detection and typing assays in cervical smears. *Int. J. Cancer* 81 (1999): 666-668

Omar, R., Choudhury, M., Fischer, J., Ezpeleta, C.: A "PAP" Test for men? *Urology* 37/2 (1991): 110-114

Pahernik, S., Botzlar, A., Hillemanns, P., Dellian, M., Kirschstein, M., Abels, C., Korell, M., Mueller, H., Untch, M., Goetz, A.: Pharmacokinetics and selectivity of aminolevulinic acid-induced porphyrin synthesis in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer* 78/3 (1998): 310-314

Peng, Q., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Nesland, J.: 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem. Photobiol.* 65/2 (1997a): 235-251

Peng, Q., Warloe, T., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, Giercksky, K., Nesland, J.: 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer* 79/12 (1997b): 2282-2308

Phelps, W., Alexander, K.: Antiviral therapy for human papillomaviruses: rationale and prospects. *Intern. Med.* 123 (1995): 368-382

Rasetti, L., Rubino, G., Drago, W.: Ferrochelatase, ALA-dehydrase and ALA-synthetase activity in human tumor tissues. *Minerva. Med.* 57/70 (1966): 2834-2837

Richards-Kortum, R., Rava, R., Baraga, J., Fitzmaurice, M., Kramer, J., Feld, M.: *Optronic techniques in diagnostic and therapeutic medicine.* Hrsg.: Pratesi, R., Plenum, New York (1990)

Schomacker, K., Frisoli, J., Compton, C., Flotte, T., Richter, J., Nishioka, N., Deutsch, T.: *Ultraviolet Laser-Induced Fluorescence of Colonic Tissue: Basic Biology and Diagnostic Potential.* *Laser-Surg-Med* 12 (1992): 63-78

Schönfeld, N., Epstein, O., Lahav, M., Mamet, R., Shaklai, M., Atsmon, A.: The heme biosynthetic pathway in lymphocytes of patients with malignant lymphoproliferative disorders. *Cancer Lett.* 43/1-2 (1988): 43-48

Smetana, Z., Malik, Z., Orenstein, E., Ben-Hur, E.: Treatment of Viral Infections with 5-Aminolevulinic Acid and light. *Laser in Surgery and Medicine* 21 (1997): 351-358

Schneede, P.: Genital human papillomavirus infections. *Curr. Opin. Urol.* 12 (2002): 57-61

Schneede, P., Hofstetter, A.: Diagnostik und Therapie von Genitalerkrankungen durch Humane Papillomviren (HPV). Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU). *Urologe A* 40 (2001): 511-520

Schneede, P., Münch, P., Ziller, F., Hofstetter, A.: Harnröhrenkondylome eine therapeutische Herausforderung. *Hautarzt* 52 (2001): 411-416

Schneede, P., Münch, P., Wagner, S., Meyer, T., Stockfleht, E., Hofstetter, A.: Fluorescences urethroscopy following instillation of 5-aminolevulinic acid: A new

procedure for detecting clinical and subclinical HPV lesions of the urethra. *European Academy of Dermatology and Venerology* 15 (2001): 121-125

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

Stepp, H., Baumgartner R., Beyer W., Knüchel, R., Rick, K., Steinbach, P., Stepp, H.P., Kriegmair, M.: Bladder tissue diagnostics utilizing protoporphyrin IX fluorescence detection, In Cubeddu, R., Marchesini, R., Mordon, S.R., Svanberg, K., Rinneberg, H.H., Wagnieres, G.: *Optical biopsy and fluorescence spectroscopy and imaging*. Lille, France: Proc. Spie 2324 (1994): 20-31

Strauss, M., Bunting, M., Melnick, J.: Virus-like particles and inclusion bodies in skin papillomas. *J. Invest. Dermatol.* 15 (1950): 433-444

Stummer, W., Stocker, S., Novotny, A., Heimann, A., Sauer, O., Kempfski, O., Plesnila, N., Wietzorrek, J., Reulen, H.: In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid. *J. Photochem. Photobiol. B* 45/2-3 (1998): 160-169

van-den-Boogert, J., van-Hillegersberg, R., de-Rooij, F., de-Bruin, R., Edixhoven, B., Houtsmuller, A., Siersema, P., Wilson, J., Tilanus, H.: 5-Aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tissues: pharmacokinetics after oral or intravenous administration. *J. Photochem. Photobiol. B* 44/1 (1998): 29-38

van Hillegersberg, R., van den Berg, J., Kort, W., Terpstra, O., Wilson, J.: Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats. *Gastroenterology* 103/2 (1992): 647-651

Vo-Dinh, T., Panjehpour, M., Overholt, B., Farris, C., Buckley, F., Sneed, R.: In Vivo Cancer Diagnosis of the Esophagus Using Differential Normalized Fluorescence (DNF) Indices. *Laser-Surg-Med* 16 (1995): 41-47

Von Krogh, G., Lacey, C., Gross, G., Barasso, R., Schneider, A.: european course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. *Sex. Transm. Inf.* 76 (2000): 162-168

Wagner, S., Stepp, H.: Fluoreszenzquantifizierung beim Harnblasenkarzinom nach Instillation von 5-Aminolävulinsäure. *Typoskript-Edition* (2000): 32-37

Wiener, J., Lin, E., Walther, P.: Oncogenic human papillomavirus type 16 is associated with squamous cell cancer of the male urethra. *Cancer Res.* 52 (1992): 5018-5023

Walboomers, J., Jacobs, M., Manos M. et al.: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189 (1999): 12-15

Walboomers, J., Jacobs, M., Manos, M., Bosch, F., Kummer, J., Shah, K., Snijders, P., Peto, J., Meijer, C.J., Munoz, N.: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189 (1999): 1-3

World Health Organisation. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: human papillomaviruses. Lyon, France: IARC. 64(1995): 277-282

Zaak, D., Hofstetter, A., Frimberger, D., Schneede, P.: Recurrence of condylomata acuminata of the urethra after conventional and fluorescence-controlled Nd:YAG laser treatment. *Urology* 61 (2003): 1011-1015

zur Hausen, H., Meinhof, W., Schreiber, W., Bornkamm G.: Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridisation with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer* 13 (1974): 650-656

## 7. Abkürzungen

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
CCD-Kamera	Charge-Coupled-Device-Kamera
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
D-Light	Diagnose-Lichtsystem
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Fe <sup>2</sup>	Eisen-Ionen
Häm	Metallporphyrin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HPV	Humanes Papillomvirus
n	Anzahl
NaCl	Natrium Chlorid
NADH	reduziertes Nicotinsäureamid-adenin- dinucleotid
Nd:YAG	Neodymium:Yttrium-Aluminium-Granat
nm	Nanometer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PC	Personal Computer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPIX	Protoporphyrin IX
RFLP	Restriktionsfragment- Längenpolymorphismus
Succinyl-CoA	Succinyl-Coenzym-A
T/N Ratio	Verhältnis der Fluoreszenzintensität zwischen angrenzendem Tumorgewebe und Normalgewebe
STD	Sexual transmitted disease
STI	Sexual transmitted infection
WHO	World Health Organisation

## **8. Danksagung**

Nach Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter, Direktor der Urologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, der es mir ermöglichte, an diesem hoch interessanten Thema zu forschen.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. P. Schneede, der mir immer als hervorragender Betreuer mit großer Sach- und Fachkompetenz zur Seite stand. Als guter Freund gelang es ihm, mich in schwierigen Phasen zur Weiterarbeit anzuspornen.

Herrn Dr. S. Wagner, Herrn Dipl.-Ing. H. Stepp sowie allen anderen Mitarbeitern des Laser-Forschungszentrums der Urologie danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und für die freundliche Unterstützung.

Frau Dr. S. Stocker danke ich für die histopathologische Beurteilung der Präparate.

Meiner Ehefrau Alexandra und meinem Sohn Valentin danke ich für die Geduld und für das Verständnis während der Fertigstellung meiner Arbeit.

Vielen herzlichen Dank an meine Eltern, die in schwierigen Phasen meiner Dissertation ein steter Rückhalt waren.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Peter Münch  
 Anschrift: Schlehenweg 14a  
 91174 Spalt  
 Geburtsdatum: 13.02.1970  
 Geburtsort: Nürnberg  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Familienstand: verheiratet  
 Eltern: Peter Münch, Apotheker  
 Helga Münch

### Daten zur Ausbildung:

Schule: 1977-1981 Luitpoldschule, Schwabach  
 1981-1990 Wolfram-von-Eschenbach-  
 Gymnasium, Schwabach  
 1990 Allgemeine Hochschulreife

Studium: 1992-1995 Studium der Humanmedizin an  
 der Universität Hamburg  
 1995 Ärztliche Vorprüfung  
 1995-2000 Studium der Humanmedizin an  
 der LMU-München  
 1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen  
 Prüfung  
 1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen  
 Prüfung  
 1999-2000 Praktisches Jahr an den Kliniken  
 der LMU-München  
 (Wahlfach Urologie)  
 2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen

	Prüfung
2000	AiP der Chirurgie im Krankenhaus Schwabach
2001	AiP der Inneren Medizin im Krankenhaus Roth
2002	Approbation als Arzt
2002-2004	Assistenzarzt der Inneren Medizin im Krankenhaus Schwabach
2004	Weiterbildungsassistent bei Dr. A. Groh (Allgemeinarzt) in Schwabach

Wernfels, den 03.01.2005