

Aus der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J.A. Werner  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Marburg

Bestimmung der Stoffwechselprodukte  
nach topischer und systemischer Applikation von 5-Aminolävulinsäure  
zur Fluoreszenzdiagnostik  
bei Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Margret Greßnich (geb. Klein)  
aus Saarlouis

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 30.04.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. B. Lippert

1.Korreferent: Prof. Dr. H. Renz

Von ganzem Herzen  
meinen Eltern gewidmet



## Abkürzungen

5-ALA:	5- Aminolävulinsäure
CUP:	Carcinoma of unknown primary, Karzinom bei unbekanntem Primärtumor
E1:	Erythrozytenprobe 12 Stunden nach Fluoreszenzendoskopie
E2:	Erythrozytenprobe 24 Stunden nach Fluoreszenzendoskopie
GESAMT:	Gesamtporphyrin
HPD:	Hämatoporphyrinderivate
HPTLC:	High performance thin layer chromatography
kg KG:	Kilogramm Körpergewicht
KOPRO:	Koproporphyrin
LDL:	Low density lipoprotein
PBG:	Porphobilinogen
PDD:	Photodynamische Diagnostik
PDT:	Photodynamische Therapie
PPIX:	Protoporphyrin IX
PROTO:	Protoporphyrin
U1:	Urinprobe 12 Stunden nach 5-ALA Gabe
U2:	Urinprobe 36 Stunden nach 5-ALA Gabe
URO:	Uroporphyrin

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>8</b>
1.1. Epidemiologie .....	8
1.2. Problematik der Früherkennung von Kopf-Hals-Tumoren.....	9
1.3. Historische Entwicklung der Farbstoffe .....	12
1.4. Physikalische und biochemische Grundlagen.....	16
1.5. Diagnostische und therapeutische Anwendung von 5-ALA.....	18
<b>2. Fragestellung</b> .....	<b>22</b>
<b>3. Patienten und Methoden</b> .....	<b>22</b>
3.1. Patienten.....	22
3.2. Methoden.....	25
3.2.1. Testverfahren und Statistik.....	25
3.2.2. Applikation .....	25
3.2.3. Untersuchungsablauf.....	26
3.2.4. Probengewinnung und Präanalytik.....	28
3.2.5. Biochemische Analytik .....	29
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
4.1. Prüfung auf Normalverteilung .....	30
4.2. Nachweis von Porphyrinen und Porphyrinvorläufern im Urin.....	35
4.2.1. Ergebnisse in der Kontrollgruppe.....	35
4.2.2. Quantität von ALA und PBG zum Zeitpunkt U1 und U2 .....	35
4.2.3. Quantität und Qualität der Porphyrine zum Zeitpunkt U1 und U2 .....	40
4.2.4. Vergleich der drei Applikationsverfahren.....	46
4.2.5. Korrelation zwischen applizierter Dosis und Höhe der nachgewiesenen Substanzen im Urin.....	50
4.3. Nachweis von Protoporphyrin im Blutplasma .....	50
4.4. Nachweis von Protoporphyrin in Erythrozyten.....	51
4.5. Nebenwirkungen .....	53

<b>5. Diskussion</b> .....	<b>53</b>
5.1. Stellenwert der 5-ALA Fluoreszenzendoskopie unter pharmako-kinetischen Gesichtspunkten .....	53
5.1.1. Pharmakokinetik nach topischer und systemischer Applikation.....	53
5.1.2. Dosisanpassung für die diagnostische Anwendung .....	59
5.1.3. Pharmakokinetik und Nebenwirkungen bei eingeschränkter Leberfunktion ...	60
5.2. Klinische Anwendbarkeit der Fluoreszenzendoskopie unter Berücksichtigung der eigenen Ergebnisse.....	62
5.2.1. Klinische Ergebnisse nach Inhalation .....	63
5.2.2. Klinische Ergebnisse nach Mundspülung .....	64
5.3. Optimierung der Methode .....	67
5.4. Nebenwirkungen .....	70
5.5. Ausblick .....	71
5.5.1. Langzeitschäden .....	72
5.5.2. Photodynamische Diagnostik als Screeningverfahren .....	74
5.5.3. Therapeutische Optionen.....	75
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>77</b>
<b>7. Literatur</b> .....	<b>79</b>
<b>8. Anhang</b> .....	<b>88</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1. Epidemiologie**

Maligne Tumore im Kopf-Hals-Bereich stellen aufgrund ihrer Häufigkeit sowie der Schwierigkeit der Frühdiagnostik ein bedeutendes Problem für das heutige Gesundheitssystem dar. In Deutschland beträgt die geschätzte jährliche Neuerkrankungsrate an bösartigen Veränderungen im Mund-Rachen-Kehlkopfbereich etwa 13 650 Personen pro Jahr, ca. 6200 Personen versterben jährlich an dieser Erkrankung. Laut Bericht des Robert Koch-Institutes aus dem Jahr 2006 liegt die Zahl der Krebsneuerkrankungen im Mund-Rachenraum bei Männern bei 7800 (2600 bei Frauen), entsprechende Zahlen bei Krebs im Kehlkopfbereich betragen 2800 für Männer (450 für Frauen). Hinsichtlich der jährlichen Krebsneuerkrankungen steht diese Gruppe in Deutschland an siebter Stelle. Das mittlere Erkrankungsalter ist verglichen mit anderen Krebslokalisationen niedrig und liegt für Männer bei 61, für Frauen bei 63 Jahren. Die höchsten Erkrankungsrate ergeben sich für Männer in den Altersgruppen zwischen 55 und 65 Jahren. Die Inzidenz der Krebserkrankungen des Mund- und Rachenraumes hat vor allem bei Männern in Deutschland in den 1970er und 1980er Jahren erheblich zugenommen. Seit den 1990er Jahren nimmt sie für beide Geschlechter wieder eher ab. Der Anteil an krebsbedingten Sterbefällen für Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Pharynx liegt bei 3,5 % (Robert Koch Institut, 2008).

Weltweit entfallen etwa 6% aller Krebserkrankungen auf bösartige Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich. Damit stehen sie an fünfter Stelle aller maligner Erkrankungen (Parkin 2001). Nach Geschlecht aufgeteilt ergibt sich ein Verhältnis von 7:1, das heißt Männer sind häufiger betroffen, auch wenn die Zahl der Neuerkrankungen bei Frauen in den vergangenen Jahren angestiegen ist. In Entwicklungsländern liegen die entsprechenden Zahlen bei 12 % für die männliche und 7 % für die weibliche Bevölkerung (Sankaranarayanan et al., 1998).



Trotz stetiger Verbesserung der Behandlungsmethoden und Weiterentwicklung der diagnostischen Möglichkeiten konnten die Langzeitüberlebensraten bisher nur geringfügig angehoben werden (Papadimitrakopoulou et al., 1996). Es stellt sich die Frage, warum trotz intensiver Forschung über das Wachstums- und Metastasierungsverhalten und erheblichen Fortschritten in der Therapie bisher keine Verbesserung der Langzeitüberlebensrate erzielt werden konnte.

Histologisch handelt es sich in 90 % um Plattenepithelkarzinome, deren Auftreten in engem Zusammenhang mit jahrelangem Alkohol- und Tabakabusus steht (Dietz 2004). Der Krankheitsverlauf, das Metastasierungsverhalten und somit die Prognose werden im Wesentlichen von der Lokalisation, der Entität des Primärtumors und ganz erheblich von dem Zeitpunkt der Diagnosestellung bestimmt (Kowalski et al., 2001; Sankaranarayanan et al., 1998; Welge-Lussen et al., 1996; Silverman 1988).

## **1.2. Problematik der Früherkennung von Kopf-Hals-Tumoren**

Tumoren im Kopf-Hals-Bereich bleiben oftmals lange Zeit klinisch inapparent. Eine Symptomatik stellt sich mit der Größenzunahme des Tumors, Infiltration umliegender Strukturen oder der Metastasierung ein. Die Erstvorstellung des Patienten beim Arzt erfolgt oftmals erst im fortgeschrittenen Stadium. Klinische Zeichen können Heiserkeit, Globusgefühl, Schluckbeschwerden und Atemnot sein. In einigen Fällen findet sich als erster Hinweis auf den Tumor eine Vergrößerung von Halslymphknoten. Dies deutet bereits auf eine Metastasierung des Primärtumors hin.

Die Durchführung einer kurativen Therapie ist im fortgeschrittenen Stadium schwierig und in einigen Fällen nicht mehr möglich. Das Prinzip der Radikalität der Tumorchirurgie erfordert hier oft ausgedehnte Resektionen von funktionell wichtigen Strukturen. Ist beispielsweise aufgrund von Tumorwachstum die komplette oder Teilentfernung des Kehlkopfes notwendig, so kann dies massive Einschränkungen der Lebensqualität zur Folge haben.

Die Herausforderung einer zufriedenstellenden Behandlung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich liegt in der Entwicklung effektiver Methoden zur Früherkennung, bevor es zur Infiltration funktionell wichtiger Strukturen und dem Befall von Lymphknoten kommt. Je später die Diagnose gestellt und die Behandlung eingeleitet wird, umso höher ist die Gefahr eines „*upgrading*“ des Tumorstadiums. Gleichzeitig verschlechtern sich die Behandlungsmöglichkeiten und damit die Prognose des Patienten (Kowalski et al., 2001).

Ein ebenfalls bedeutendes Problem für die Behandlung von Patienten mit Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege stellt der jahrelange Tabak- und Alkoholkonsum dar. Die Erkennung von Zweitkarzinomen oder kanzerösen Vorstufen gestaltet sich oft schwierig, da große Teile der Schleimhaut im oberen Aerodigestivtrakt vorgeschädigt sein können (Dietz 2004). In der Literatur findet sich hierfür der Begriff „*condemned mucosa*“. 10 – 15 % der Patienten mit Primärtumor im Hals- Kopf-Bereich entwickeln in dieser Region synchrone Zweitkarzinome, 5 % der Patienten metachrone Zweitkarzinome (Haughey et al., 1992).

Bei der endoskopischen Inspektion ist die Differenzierung zwischen gesunder und erkrankter Schleimhaut durch die oben genannte Vorschädigung, jedoch auch durch postoperatives Narbengewebe oder radiogene Schleimhautschädigung, als Folge einer stattgehabten Therapie, wesentlich erschwert. In der Tumornachsorge gestaltet sich die Diagnose eines Rezidiv- oder Zweitkarzinoms daher oftmals problematisch (Dhooge et al., 1996).

Entscheidende Faktoren für den Krankheitsverlauf und die Prognose des Patienten sind der Zeitpunkt der Diagnosestellung und die zur Verfügung stehenden therapeutischen Möglichkeiten (Mashberg 2000; Sciubba 2001). Silverman schrieb bereits 1988, dass die Prognose des Patienten entscheidend von einem frühen Erkennen und einer schnellen, radikalen und vollständigen Resektion des Tumors abhängt. Er ging davon aus, dass die Heilungsrate von Mundhöhlenkarzinomen durch eine frühzeitigere Detektion von 38 % auf 78 % verdoppelt werden kann (Silverman 1988). Während sich auf dem Gebiet der Therapiemaßnahmen, und hier insbesondere in der funktionserhaltenden Chirurgie,

erhebliche Fortschritte eingestellt haben, richtet sich das Augenmerk der Forschung auf die Verbesserung der diagnostischen Hilfsmittel.

Dem Arzt stehen neben Anamnese, Inspektion und Palpation, die Feinnadelpunktion, bildgebende Verfahren wie Sonografie, konventionelles Röntgen, Kontrastmitteldarstellung, Computertomografie, Magnetresonanztomografie, Positronen-Emissions-Tomographie und endoskopische Untersuchungen zur Verfügung. Bildgebende Verfahren liefern erst ab einer bestimmten Tumorgroße, abhängig vom jeweiligen räumlichen Auflösungsvermögen, zuverlässige Ergebnisse für die Diagnosestellung. Für die Früherkennung weisen sie erhebliche Mängel auf, da kleine Schleimhautveränderungen unter die Schwelle des Auflösungsvermögens fallen und röntgenologisch nicht zur Darstellung kommen. Die Entwicklung von Tumormarkern im Blut weckte die Hoffnung Neubildungen frühzeitig nachweisen zu können. Es zeigte sich aber, dass diese vor allem zur Verlaufsbeobachtung und Rezidiverkennung hilfreich sind. Für die Primärdiagnostik haben sie eine geringe Bedeutung (Lordick et al., 2008).

Mittels Weißlichtendoskopie können makroskopisch sichtbare Veränderungen aufgefunden und durch Gewebebiopsien histologisch gesichert werden. Ihre Aussagekraft über frühzeitige kleine und flache Veränderungen im Schleimhautniveau sowie die genaue Abgrenzung zwischen gesunder und pathologisch veränderter Mukosa, ist in einigen Fällen und besonders für die Frühdiagnostik unzureichend. Selbst für den erfahrenen Untersucher können asymptomatische Carcinomata *in situ* sowie frühinvasive Plattenepithelkarzinome, die oft als harmlos erscheinende kleine, gerötete Schleimhautareale imponieren, aufgrund ihres makroskopischen Erscheinungsbildes schwierig zu diagnostizieren sein.

Zur Verbesserung der Prognose von bösartigen Veränderungen der Luft- und Speisewege ist die Entwicklung zuverlässiger diagnostischer Verfahren notwendig, die frühe Veränderungen im Niveau des Plattenepithels mit einer hohen Spezifität und Sensitivität sichtbar machen. Eine gute Abgrenzung von gesunder zu neoplastisch veränderter Schleimhaut ist wünschenswert, so dass selbst durch Radiatio oder Operation veränderte Schleimhautbereiche zuverlässig von maligne entarteten Zellen abgegrenzt werden können.

Die Methoden sollten leicht durchführbar, möglichst nebenwirkungsarm, wenig belastend für den Patienten und kostengünstig sein.

Die Suche nach neuen Verfahren erfolgt gemeinsam mit anderen Fachdisziplinen. Großes Interesse zur Verbesserung der Diagnosestellung von Plattenepithelkarzinomen besteht, außer in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, auf dem Gebiet der Dermatologie, Gynäkologie, Urologie, Gastroenterologie und Pulmologie.

### **1.3. Historische Entwicklung der Farbstoffe**

Die Früherkennung von malignen Veränderungen im Kopf-Hals-Bereich und damit der Zeitpunkt der Diagnosestellung sind entscheidende Faktoren für die Prognose von Patienten mit einem Karzinom im oberen Aerodigestivtrakt. Trotz einer guten Zugänglichkeit des Gebietes für endoskopische Untersuchungen werden Vorstufen und Frühformen von Karzinomen oft nicht sicher diagnostiziert. Konventionell bildgebende Verfahren bieten keine sicheren und kostengünstigen Methoden an, frühzeitige Veränderungen im Schleimhautniveau sichtbar zu machen.

Seit mehreren Jahrzehnten werden Farbstoffe zur *in vivo* Tumormarkierung benutzt und auf ihrer Anwendbarkeit im klinischen Alltag untersucht. Erste Versuche mit Toluidinblau zur Markierung von Tumoren in der Gynäkologie erwähnt Richart im Jahre 1963 (Richart 1963). In späteren Jahren erfolgte der Einsatz des Farbstoffes auch im Kopf-Hals-Bereich. Epstein und Mitarbeiter berichten über eine Doppelfärbung von malignem Gewebe mittels Toluidinblau und Lugol'scher Lösung (Epstein et al., 1992). Die Anfärbung von malignem Gewebe mit Toluidinblau, einem metachromatischen Farbstoff aus der Thiazidgruppe, basiert auf der Eigenschaft des Toluidinblau intrazellulär DNA bzw. RNA zu binden. Neoplastisches Gewebe weist im Vergleich zu Normalgewebe einen höheren Gehalt an Nukleinsäuren auf, die Penetration des Farbstoffes in die Zelle wird durch die Zugabe von Lugol'scher Lösung erleichtert. Infolgedessen kommt es zu einer verstärkten Akkumulation von Toluidinblau in entarteten Zellen, die auf diese Weise besser sichtbar gemacht werden. Obwohl Sabes in seinen Untersuchungen mit Toluidinblau eine hohe Zahl falsch positiv

und falsch negativer Ergebnisse beschrieb, nahm er einen diagnostischen Nutzen zur Erkennung und Markierung von prämaligmem und malignem Gewebe an (Sabes et al., 1972).

Bis heute werden die Einsatzmöglichkeiten von Toluidinblau diskutiert. Portugal bestätigte 1996 der Methode eine verbesserte Beurteilbarkeit der Tumorränder nach chirurgischer Resektion von Malignomen im oberen Aerodigestivtrakt (Portugal et al., 1996). Die Gruppe um Driemel verglichen im Jahr 2007 mehrere Screening Methoden für Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und ihrer Vorstufen und wiesen der Anfärbung mit Toluidinblau eine Sensitivität von 70-100 % und Spezifität von 25-67 % zu (Driemel et al., 2007; Epstein et al., 2007).

Vielversprechende Ergebnisse zur *in vivo* Darstellung von neoplastischen Zellen bietet die Anwendung von Fluoreszenz-induzierenden Farbstoffen. Die Anfänge der Fluoreszenzdiagnostik gehen auf Policard im Jahr 1924 zurück. Nach systemischer Applikation von Hämatoporphyrin und während der Bestrahlung mit einer Wood-Lampe (UV A- Strahlen 340-450 nm) beobachtete er an malignen Tumoren eine charakteristische Rotfluoreszenz und setzte daraufhin die Methode zur Tumordetektion ein (Policard 1924). Auler beschrieb 1942 die Affinität von Tetrapyrrolen zu neoplastischem Gewebe, indem er experimentelle Untersuchungen an humanem Tumorgewebe durchführte. Durch das beobachtete Bindungsverhalten der Porphyrine an malignes Gewebe schrieben er der Methode einen hohen Nutzen zur Erkennung bösartiger Veränderungen zu (Auler 1942).

Nessel und Dunn beschrieben die Markierung bösartiger Tumoren im Kopf-Hals-Bereich mit Tetrazyklinen, die nach systemischer Gabe eine Fluoreszenz in malignen Tumoren hervorriefen (Nessel et al., 1965; Dunn et al., 1972). Dabei erreichten sie für das Erkennen von Larynx-, Pharynx- und Mundhöhlenkarzinomen eine Spezifität von 100 %, die Sensitivität lag bei 89 %. Die Tetrazyklin-induzierte Fluoreszenz stellte sich als sehr Zeit intensive und eine komplexe technische Ausstattung beanspruchende Methode heraus. Die Bedeutung für die klinische Routine war gering (Dunn et al., 1972).

Andere Arbeitsgruppen veränderten in den folgenden Jahren die Zusammensetzung der Porphyrine, indem sie Essig- und Schwefelsäure zur besseren Lösbarkeit und Penetration in die Zellen hinzu fügten. Das neu entwickelte Porphyringemisch bekam den Namen Hämatoporphyrinderivat (HPD) (Sharman et al., 1999). 1960-64 beschrieb die Arbeitsgruppe um Lipson die Verwendung von Hämatoporphyrinderivaten zur diagnostischen Darstellung neoplastischer Veränderungen. Er fand eine hohe Korrelation zwischen der beobachteten Fluoreszenz und der durch Biopsie gesicherten Malignome (Lipson et al., 1961).

Die intravenöse Applikation von HPD zur Diagnostik von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich untersuchten Leonhardt und Beck erstmals 1971. Bei Larynxkarzinomen stellte sich eine starke, sehr charakteristische Rotfluoreszenz nach Gabe von HPD ein, so dass diese mit einer hohen Zuverlässigkeit diagnostiziert werden konnten. Bedeutende Rückschläge musste die Methode durch die wochenlang anhaltende Photosensibilisierung der Haut erfahren. Patienten erlitten Verbrennungen an lichtexponierten Hautarealen und mussten sich über einige Wochen vor direkter Sonnenstrahlung schützen. Die erhebliche Einschränkung und letztlich soziale Isolierung des Patienten über zehn und mehr Wochen machte die HPD-induzierte Fluoreszenz für diagnostische Zwecke unbrauchbar (Leonard et al., 1971).

Die unzumutbaren Nebenwirkungen der HPD riefen genauere Untersuchungen über die chemische Struktur der Substanz hervor. Man fand heraus, dass sie ein komplexes Gemisch aus Di- und Oligomeren sowie Porphyrinestern darstellen. Mittels chromatographischer Auftrennung (HPLC) der HPD gelang die Herstellung weitestgehend reiner Fluoreszenzfarbstoffe. Aus dem vorher komplexen Gemisch wurden die aktiven Oligomere von den restlichen Verbindungen getrennt. Eine neue Substanz, das Photofrin<sup>®</sup>, war entwickelt und lag zu 90-95 % in aktiver Form vor (Sharman et al., 1999). Einsatzmöglichkeiten für Photofrin<sup>®</sup> ergaben sich in der Fluoreszenzdiagnostik und zu therapeutischen Zwecken, in Form der photodynamischen Therapie (PDT). Trotz chemischer Auftrennung der HPD trat weiterhin eine starke Photosensibilität nach Verabreichung von Photofrin<sup>®</sup> auf. Die Fluoreszenzdiagnostik scheiterte erneut an der

immer noch langen und unzumutbaren Photosensibilisierung der Haut. Zum Schutz vor Sonnenbrand-ähnlichen Verbrennungen mussten sich die Patienten Tage bis Wochen in abgedunkelten Räumen aufhalten, so dass sie vor Licht der Wellenlänge 400 nm (UV-A) geschützt waren. UV-A Strahlen aktivieren Photofrin<sup>®</sup>, so dass es einerseits zur Photosensibilität, andererseits jedoch auch zu phototoxischen Reaktionen mit Zerstörung von Zellen kommt. Diese Zellschädigung ermöglicht den Einsatz von Photofrin<sup>®</sup> zu therapeutischen Zwecken, da hier der Untergang entarteter Zellen erwünscht ist und das eigentliche Therapieziel darstellt.

Die Ergebnisse des therapeutischen Einsatzes von Photofrin<sup>®</sup> im Rahmen der PDT sind vielversprechend und in einigen Ländern bereits für die klinische Anwendung zugelassen. In Deutschland ist Photofrin<sup>®</sup> für die Heilbehandlung bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinomen zugelassen, die weder durch chirurgische Eingriffe noch durch Radiotherapie behandelt werden können. Die Studiengruppe um Usuda und Kato erreichte mit der Photofrin<sup>®</sup>-Therapie bei 83 % der 75 Patienten mit frühem, nicht operablem nicht kleinzelligem Lungenkarzinom eine komplette Tumoreradikation. Auch in der palliativen Therapie des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms mit Metastasen, zeigte die photodynamische Therapie mit Photofrin<sup>®</sup> eine Reduktion der tumorbedingten Symptomatik und eine Verbesserung der Lebensqualität (Usuda et al., 2006).

Als weitere Indikation scheinen sich u.a. die fortgeschrittenen, inoperablen Stadien des Gallenwegkarzinoms (Wang et al., 2007) und Neubildungen der Vulva wie Lichen sclerosus, Condylomata acuminata und zervikale intraepitheliale Neoplasien (Olejek et al., 2004) an zu bieten. Veränderungen der Speiseröhre in Form des Barrett-Ösophagus mit *high-grade* Dysplasien werden zurzeit besonders intensiv hinsichtlich ihrer Therapierbarkeit mit Photofrin<sup>®</sup> untersucht. Die Arbeitsgruppe um Overholt konnte eine deutliche Überlegenheit der photodynamischen Therapie mit Photofrin<sup>®</sup> gegenüber der alleinigen Gabe von Omeprazol nachweisen (Overholt et al., 2007). Eine Zulassung für diese Indikationen besteht in Deutschland zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht.

Die nicht akzeptablen Nebenwirkungen von Photofrin<sup>®</sup> und den HPD, insbesondere für den diagnostischen Einsatz, führten zur Weiterentwicklung der Photosensibilisatoren. Die ideale Substanz sollte möglichst nebenwirkungsarm sein, eine hohe Tumorspezifität aufweisen, starke Absorptionen im Bereich von 650 - 800 nm besitzen und schnell vom Körper ausgeschieden werden, um eine Photosensibilisierung und Toxizität durch Akkumulation zu umgehen (Sharman et al., 1999).

#### **1.4. Physikalische und biochemische Grundlagen**

Einen vielversprechenden Ansatz bietet die Fluoreszenzdiagnostik mit der Substanz 5-Aminolävulinsäure. Das Verfahren entstand aus der Idee Tumormarker zu entwickeln, die durch ihre charakteristische Fluoreszenz gut nachweisbar sind, selektiv an maligne veränderte Zellen binden und dadurch Tumorgewebe besser sichtbar machen können.

Unter Fluoreszenz versteht man die charakteristische Leuchterscheinung von Materie während der Bestrahlung mit Licht. Treffen Photonen auf die Valenz-Elektronen eines Atoms, so kommt es im Rahmen von Absorptionsprozessen zur Übertragung von Energie vom Photon auf ein äußeres Elektron des Atoms. Dadurch wird das Elektron in einen angeregten und energetisch höheren Zustand versetzt. Das angeregte, jedoch instabile Atommolekül muss zwingend wieder in den Grundzustand gelangen und gibt hierzu Energie in Form von Wärme oder Strahlung, wie beispielsweise der Emission von Fluoreszenzlicht, ab.

5-Aminolävulinsäure (5-ALA) ist eine körpereigene Substanz, die eine wichtige Rolle für die Synthese des roten Blutfarbstoffes Häm spielt. Endogen entsteht  $\delta$ -Aminolävulinat aus Glycin und Succinyl-Coenzym A durch das Enzym  $\delta$ -Aminolävulinatsynthase. Zwei Moleküle  $\delta$ -Aminolävulinat kondensieren zu Porphobilinogen. Im Folgenden kondensieren drei weitere Porphobilinogenmoleküle unter Abspaltung von Ammoniak und Bildung verschiedener Zwischenprodukte, wie beispielsweise PPIX, zu Tetrapyrrol. Der Einbau von zweiwertigem Eisen in das Tetrapyrrolsystem erfolgt durch das Enzym Ferrochelatase und vervollständigt damit die Biosynthese von Häm. Alle Enzyme arbeiten irreversibel. Eine Regulation erfolgt über die Substratverfügbarkeit und durch *feedback*-Hemmung der  $\delta$ -



Aminolävulinatsynthese, also der 5-ALA Synthese. Über diesen Syntheseschritt wird der gesamte Stoffwechselweg von Häm reguliert.

Eine Anreicherung oder überschießende Produktion von Vorstufen der Hämsynthese wird unter physiologische Bedingungen durch die *feedback*-Hemmung verhindert. Durch die externe Zufuhr von 5-ALA ist es möglich den Hemmungsmechanismus zu umgehen und die Hämsynthese künstlich in Gang zu setzen. In Folge dessen kommt es zu einer überschießenden intrazellulären Produktion von Porphyrinen und deren Vorstufen. PPIX, das letzte Zwischenprodukt kurz vor der Fertigstellung von Häm, wird vermehrt in der Zelle gebildet und weist die Eigenschaft der Fluoreszenz auf, wenn eine Bestrahlung mit langwelligem Licht erfolgt.

Das für die Fluoreszenz verantwortlich PPIX reichert sich besonders in Epithelien und Zellen mit hoher Proliferationsrate an (Kennedy et al., 1990; Peng et al., 1997; Van den Boogert et al., 1999; Langer et al., 1999). Eine selektive Anreicherung in maligne veränderten und schnell wachsenden Zellen wird durch ein verändertes Enzymaktivitätsmuster der Tumorzelle erklärt. Die Aktivität des Enzyms Ferrochelatase, das unter physiologischen Bedingungen den Einbau von Eisen in PPIX katalysiert, ist in maligne entarteten Zellen herabgesetzt. Durch die verminderte Enzymaktivität ist die Bildung des Endproduktes Häm reduziert, PPIX intrazellulär überschüssig vorhanden und somit ist eine verstärkte PPIX-induzierte Fluoreszenz nachweisbar (Dougherty 1973).

Ein weiterer Grund für die verstärkte intrazelluläre Anreicherung von PPIX in Folge exogener Zufuhr von 5-ALA ist eine erhöhte Durchlässigkeit der Tumorzellmembran. Die Tumorzelle weist eine reduzierte Zahl an Interzellularverbindungen auf und der Zellverband ist aufgelockert. Die Penetration von 5-ALA in die Zelle ist erleichtert (Kennedy et al., 1996). Darüber hinaus liegt ein erhöhter Verbrauch von Cholesterin durch das schnelle Zellwachstum und die gesteigerte Membransynthese vor. Infolgedessen kommt es zu einer verstärkten Expression des LDL-Rezeptors und einer erhöhten intrazellulären Porphobilinogen-desaminase-Aktivität. Diese ist wiederum an der Synthese

von Zwischenprodukten zu PPIX beteiligt und steigert somit ebenfalls die vermehrte Bildung von PPIX (Kennedy et al., 1996; Mehlmann et al., 1999).

### **1.5. Diagnostische und therapeutische Anwendung von 5-ALA**

Die topische Applikation von 5-ALA zur diagnostischen und therapeutischen Anwendung berichteten 1990 erstmals Kennedy und Pottier. Sie behandelten Patienten mit Basalzellkarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und aktinischer Keratose mit 5-ALA und berichteten eine selektive Anreicherung von PPIX in epidermalen Zellen. Zellen dermalen Ursprungs zeigten im Gegensatz dazu keine Anreicherung und somit auch keine Fluoreszenz. Baszell- und Plattenepithelkarzinome, die durch die Transformation epithelialer Zellen entstehen, eignen sich somit besonders für die Darstellung mittels 5-ALA induzierter Fluoreszenz. Die Untersuchungen zeigten außerdem, dass 5-ALA verstärkt Zellen mit geschädigtem Keratingerüst penetrieren kann. Lagen die veränderten Zellen unter einer intakten Keratinschicht, so war eine Penetration von 5-ALA in tiefere Schichten kaum nachweisbar. Untersuchungen zur therapeutischen Anwendung von 5-ALA in Form der photodynamischen Therapie zeigten, dass 90 % der Baszell- und Plattenepithelkarzinome eine vollständige Remission und 7,5 % ein partielles Ansprechen zeigten. Die Ergebnisse zur Behandlung der aktinischen Keratose waren entsprechend gut. Kennedy folgerte, dass die topische Applikation von 5-ALA ein sehr effektives Verfahren zur Darstellung und Therapie oberflächlicher Baszellkarzinome, frühinvasiver Plattenepithelkarzinome, Carcinoma *in situ* und der aktinischen Keratose ist (Kennedy et al., 1990).

Szeimies bestätigte 1994 die gute diagnostische Anwendbarkeit von 5-ALA. Er verglich die Fluoreszenz von veränderter mit gesunder Haut nach Applikation von 20 %iger 5-ALA. Bei den Hautveränderungen handelte es sich um oberflächliche Baszellkarzinome, Morbus Bowen und kutane T-Zell-Lymphome. Alle Veränderungen zeigten erhöhte Fluoreszenzwerte im Bereich von 9:1 (Morbus Bowen) bis 15:1 (T-Zell-Lymphome) gegenüber der unveränderten Haut. Diese Ergebnisse bestätigten das Konzept der selektiven Anreicherung von PPIX in maligne verändertem Gewebe nach topischer 5-ALA

Applikation (Szeimies et al., 1994). Die Arbeitsgruppe um Wang bestätigte 1995 nochmals die guten Ergebnisse auf dem Gebiet der Dermatologie (Wang 1995).

Ein gutes und zum Teil bereits etabliertes Einsatzgebiet von 5-ALA stellt die Behandlung von Krebsvorstufen und Frühstadien durch die photodynamische Therapie (PDT) dar. Die PDT ist ein Verfahren zur Behandlung von Gewebeeränderungen und Tumoren nach Gabe eines Photosensibilisators wie beispielsweise 5-ALA. Nach Applikation von 5-ALA und einer gewissen Wartezeit erfolgt die Bestrahlung des Tumorgewebes mit Licht der Wellenlänge 630 – 635 nm. Durch Interaktion von Photosensibilisator, Licht und dem im Gewebe vorhandenem Sauerstoff werden durch photophysikalische Prozesse toxische Substanzen erzeugt, die aufgrund der Tumorselektivität des Sensibilisators gezielt den Tumor schädigen und zerstören. Zum jetzigen Zeitpunkt befindet sich die 5-ALA-induzierte PDT noch in unterschiedlichen klinischen Erprobungsphasen. Mögliche therapierbare Erkrankungen sind die Psoriasis, aktinische (solare) Keratose, Akne, Condylomata acuminata, oberflächliche Basalzellkarzinome und Plattenepithelkarzinome, Gorlin-Goltz-Syndrom, Morbus Bowen, Erythroplasie Queyrat und kutane T-Zell-Lymphome (Fritsch et al., 1996; Sharman et al., 1999). Eine klinische Zulassung von 5-ALA zur Behandlung der aktinischen Keratose, oberflächlichen und dünnen nodulären Basalzellkarzinomen und Morbus Bowen existiert in Deutschland, Kanada und den USA (Braathen et al., 2007; De Haas et al., 2007). Für welche dermatologischen Erkrankungen die 5-ALA induzierte PDT darüber hinaus dauerhaft eingesetzt werden darf, bleibt abzuwarten und wird von Langzeitergebnissen und randomisierten Studien abhängig sein.

In der Urologie hat sich die Fluoreszenzdiagnostik mit 5-ALA für die klinische Anwendung auch in Deutschland durchgesetzt. Das Präparat HEVIX<sup>®</sup> erhielt 2006 die Zulassung für den klinischen Einsatz zur Darstellung von Harnblasenkarzinomen. Die Fluoreszenz-induzierte Diagnostik bietet gegenüber der konventionellen Endoskopie den Vorteil einer verbesserten und frühzeitigeren Detektion oberflächlicher urothelialer Neoplasien. In einer Untersuchung an 875 Patienten diagnostizierten Hunghuber und Mitarbeiter Malignome der Blase in 92 % der Fälle mittels photodynamischer Diagnostik, in nur 76,3 % mittels Weißlichtendoskopie (Hungerhuber et al., 2007). Die scharfe

Abgrenzung zum umliegenden, gesunden Gewebe ermöglicht eine erhöhte Sicherheit der vollständigen Resektion und infolgedessen eine Verringerung der Residualtumorraten. Die Früherkennung von Harnblasenkarzinomen kann verbessert und die Rezidivrate gesenkt werden (Kriegmair et al., 1996; Hungerhuber et al., 2007).

Weitere Einsatzgebiete erschließen sich in der Gynäkologie und Gastroenterologie. Einerseits sollen hier die diagnostischen Methoden zur Erkennung von Plattenepithelkarzinomen verbessert werden, andererseits weist die PDT mit 5-ALA vielversprechende Therapiemöglichkeiten auf. Untersuchungen zur Endometriumbiopsie, Behandlung zervikaler und vulvärer intraepithelialer Neoplasien bestätigen dies. Darüber hinaus gibt es Bestrebungen die 5-ALA induzierte PDT bei Frühstadien des Speiseröhrenkrebs, Barrett-Ösophagus und Karzinomen des Gastrointestinaltraktes einzusetzen (Messmann et al., 1999; Pech et al., 2005).

In der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde ließ die Entwicklung eines sensitiven Fluoreszenzmarkers zur *in-vivo* Darstellung von Plattenepithelkarzinomen Hoffnung zur Vorverlagerung des Diagnosezeitpunktes aufkommen. Die Schwächen der bisher angewandten diagnostischen Verfahren sollten ausgeglichen werden und Frühstadien von Plattenepithelkarzinomen, Carcinoma in situ, präkanzerösen und dysplastischen Veränderungen zuverlässiger diagnostiziert werden. Eine schonendere und gleichzeitig effektivere Therapie könnte durch die Vorverlegung des Diagnosezeitpunktes ermöglicht werden. Ebenso könnte die Rezidivrate durch die frühe und vollständige Resektion des Tumors sinken. Die Interpretation von Schleimhautveränderungen ist nicht mehr alleine von den Erfahrungen des Klinikers, sondern auch vom Nachweis charakteristischer Fluoreszenz abhängig. Zusätzlich dienen die fluoreszierenden Areale als Anhaltspunkte und Hilfe für die unverzichtbare Entnahme von Gewebeprobe zur histologischen Diagnosesicherung.

Interessante Perspektiven bietet die Anwendung von 5-ALA für Patienten mit metastasierten Halslymphknoten aber unbekanntem Primärtumor (CUP-Syndrom). Die Fluoreszenzdarstellung kann das Auffinden kleiner Neubildungen, die makroskopisch noch

nicht sichtbar sind und bisher, wenn überhaupt, nur nach zahlreichen Blindbiopsien gefunden werden konnten, erleichtern. Durch die systemische Verabreichung von 5-ALA kann die Tumorsuche im gesamten Aerodigestivtrakt, sprich allen für die Endoskopie zugänglichen Arealen, erleichtert und die Anzahl der Probiopsien verringert werden. Das Auffinden von Primär- und Zweitkarzinomen im Aerodigestivtrakt kann dadurch erleichtert werden. Der Untersuchungsablauf, die benötigte Zeit und das Operationsrisiko sind für den Patienten unwesentlich verändert. Für den Arzt ist die Durchführung der Untersuchung und Handhabung der Geräte einfach möglich.

Im Vergleich zu anderen Photosensibilisatoren berichten Patienten nach niedrigdosierter Einnahme von 5-ALA über nur geringe oder keinerlei Nebenwirkungen. Weitere Vorteile bestehen in der Möglichkeit zur Auswahl verschiedener Applikationswege. Je nach Lokalisation des suspekten Areals ist die systemische oder topische Gabe, auf dem Wege einer Inhalation oder Mundspülung, möglich. Setzt sich sowohl die Fluoreszenzdiagnostik wie auch die PDT mittels 5-ALA in der klinischen Anwendung durch, so könnte in einem Untersuchungsgang die Diagnose gestellt und zeitgleich therapiert werden.

Bevor es zur Verwirklichung dieser Vorstellung kommt, sind weitere Untersuchungen zur Erprobung des Photosensibilisators notwendig. Unterschiedliche Fragestellungen ergeben sich aus dem momentanen Stand der Entwicklung. Gegenstand der Diskussion sind die Vor- und Nachteile der topischen gegenüber der systemischen Applikation, die Frage nach der Höhe der notwendigen Dosierung und Akkumulationsmechanismen. Für welche Tumoren ist eine systemische Gabe von 5-ALA erforderlich und welche werden ausreichend über eine topische Applikation dargestellt. Langfristiges Ziel sollte die Optimierung der 5-ALA Dosierung zum diagnostischen Einsatz und der PDT, unter spezieller Berücksichtigung von Nebenwirkungen und Langzeitschäden, sein. Die Pharmakokinetik und -dynamik benötigt weiterer Aufklärung, damit Anreicherungs- und Ausscheidungsmechanismen besser verstanden, Nebenwirkungen erklärt und 5-ALA in der Diagnostik gezielter eingesetzt werden kann.

## **2. Fragestellung**

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel Abbauprodukte von 5-ALA qualitativ und quantitativ in Urin und Blutplasma nachzuweisen, um daraus Schlussfolgerungen für eine mögliche Anreicherung im Körper zu ziehen. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der Herausarbeitung von Unterschieden in Abhängigkeit von der Applikationsform.

1. Bestehen qualitative oder quantitative Unterschiede hinsichtlich der Ausscheidung von 5-ALA Abbauprodukten zwischen den topischen Verfahren (Inhalation, Mundspülung) oder zwischen der einzelnen topischen gegenüber der systemischen Applikation?
2. Werden die Normgrenzwerte für 5-ALA Abbauprodukte im Urin und Blutplasma überschritten und wie liegen die Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe, wann ist mit einer Normalisierung zu rechnen?
3. Beeinflusst die applizierte Dosis an 5-ALA die Höhe der Ausscheidungsprodukte im Urin?

Ziel ist es mit den Ergebnissen Schlussfolgerungen über die Dosierung von 5-ALA zu diagnostischen Zwecken zu ziehen, unter Berücksichtigung der zu erwartenden Nebenwirkungen durch Akkumulation von Abbauprodukten im Körper.

## **3. Patienten und Methoden**

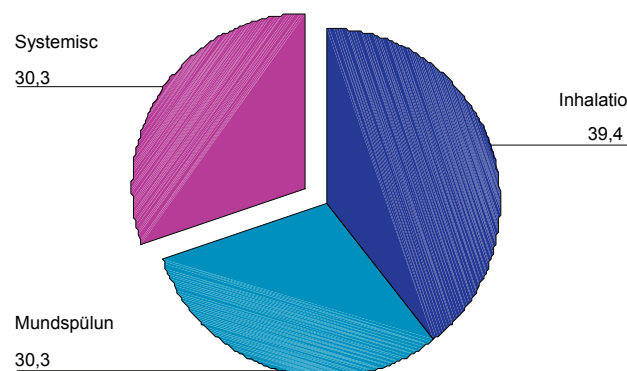
### **3.1. Patienten**

Die Datenerhebung erfolgte an einer Gruppe von Patientinnen und Patienten, die sich zwischen Februar und August 2000 in der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Philipps-Universität Marburg stationär behandeln ließen und ihr schriftliches Einverständnis zur Untersuchung gaben. Bei allen Patienten wurde eine Mikrolaryngoskopie oder Panendoskopie wegen des Verdachts oder einer bereits bekannten Neoplasie im Kopf-Hals-Bereich durchgeführt. Zusätzlich zu der herkömmlichen Weißlichtendoskopie wurde die Fluoreszenzendoskopie

nach Gabe von 5-ALA durchgeführt. Die Daten basieren auf der Untersuchung von Urinproben, die 12 Stunden (U1) und 36 Stunden (U2) nach Gabe von 5-ALA abgenommen wurden. Zusätzlich wurden Blutproben 12 Stunden und 24 Stunden postoperativ entnommen.

Insgesamt wurden Urin- und Plasmaproben von 66 Patienten im Zentrallaboratorium der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Marburg, Direktor Prof. Dr. Renz untersucht.

26 Patienten führten eine Inhalation mit 250 mg 5-ALA und 20 Patienten eine Mundspülung mit 200 mg 5-ALA durch. Die systemische Gabe von 20 mg/kg KG 5-ALA erfolgte bei 20 Patienten über eine Magensonde. Die prozentuale Verteilung der Patienten auf die unterschiedlichen Applikationsgruppen ist der folgenden Grafik zu entnehmen.



Grafik 1: Prozentuale Verteilung der Patienten auf die verschiedenen Applikationsformen (Inhalation, Mundspülung, Systemisch).

Die Aufteilung der Patienten in drei Gruppen mit jeweils unterschiedlicher Applikationsform erfolgte aufgrund der Lokalisation der bereits gesehenen oder vermuteten Schleimhautveränderung. Patienten, bei denen der Verdacht auf eine tumoröse Neubildung im Bereich des Oropharynx oder der Tonsillen bestand, führten eine Mundspülung mit 5-ALA durch. Lagen die potentiell malignen oder bereits gesicherten Veränderungen im

Larynx oder Hypopharynx, so erfolgte die 5-ALA Gabe per Inhalation. Die systemische Applikation erfolgte über eine Magensonde. Die genauen Daten über Alter und Geschlecht der Patienten sowie die Lokalisation der Tumoren können der Tabelle 1 entnommen werden.

In der Gruppe der Mundspülungen kam es bei zwei Patienten zur unvollständigen Urinprobensammlung. Einer der beiden verließ vorzeitig das Krankenhaus. In dem anderen Fall fehlte der 24-Stunden-Sammelurin, so dass eine Bestimmung der Porphyrinvorläufer und Porphyrine im Urin aufgrund der fehlenden Gesamtmenge nicht möglich war. In allen Blutplasmaproben wurde Protoporphyrin bestimmt. Zusätzlich erfolgte in einigen Erythrozytenproben stichprobenartig die Bestimmung von Protoporphyrin. Aufgrund der geringen Fallzahl können diese Ergebnisse allenfalls eine Tendenz für das Ausscheidungs- und Akkumulationsverhalten anzeigen. 12 Stunden nach Applikation (E1) wurden in der Gruppe der Inhalationen elf Erythrozytenproben untersucht, nach 24 Stunden (E2) vierzehn Proben. Bei den Mundspülungen wurden sechs Erythrozytenproben 12 Stunden und sieben Proben 24 Stunden postoperativ untersucht.

Als Kontrollgruppe diente ein Kollektiv von 20 Patienten, die für eine Studie von Prof. Doss zur hereditären Koproporphyrinurie in Deutschland untersucht und dort ebenfalls als Vergleichsgruppe herangezogen wurde. Das Kollektiv setzte sich aus 20 gesunden Personen zusammen, die genauen Daten können Tabelle 1 entnommen werden. Urin und Plasmaproben wurden ohne die Applikation von 5-ALA oder anderen Stoffen untersucht (Kuhnel et al., 2000). Prof. Doss hat uns diese Daten freundlicherweise im Rahmen der Zusammenarbeit zur Verfügung gestellt.



	Kontrollgruppe	Inhalation	Mundspülung	Systemisch
Geschlecht	9:11 (m:w)	24:2 (m:w)	14:6 (m:w)	19:1 (m:w)
Mittler. Alter	39 Jahre (von 25 – 53 J.)	61 Jahre (von 46 – 78 J.)		
Lokalisation des Tumors (Anzahl der Patienten)	kein Tumor	Stimmrippe (16) Taschenband (3) Epiglottis (4) Hypopharynx (3)	Mundboden (2) Zunge (3) Tonsille (12) Weichgaumen (3)	Larynx (11) Hypopharynx (4) Oropharynx (5)

Tab. 1: Verteilung von Geschlecht, mittlerem Alter und Lokalisation des Tumors für jede Patientengruppe

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Testverfahren und Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgt deskriptiv sowie durch analytische Testverfahren für nicht normalverteilte Variablen. Die Hypothesenprüfung fand an einer zahlenmäßig kleinen Stichprobe von 20 Patienten pro Gruppe statt, so dass auf Grund der stärker auftretenden Streuung in kleinen Stichproben nichtparametrische Tests zur Auswertung angewandt wurden. Als Vergleichswert für die nachgewiesenen Porphyrine und –vorläufer wurde der Median herangezogen, da er gegenüber Ausreißern stabil ist und somit ein geeignetes Instrumentarium darstellte.

### 3.2.2. Applikation

Die Applikation von 5-ALA bei Veränderungen im Kopf-Hals-Bereich erfolgte nach in vorangegangenen Studien bewährten Schema und Dosierungen (Leunig et al., 2000a, 2000b; Mehlmann et al., 1999).

Zwei Stunden vor der geplanten Mikrolaryngoskopie oder Panendoskopie wurde 5-ALA (Medac GmbH, Hamburg, Deutschland) per Inhalation, Mundspülung oder systemisch über eine Magensonde verabreicht. Unmittelbar vor der 5-ALA Mundspülung erfolgte eine Desinfektion der Mundhöhle mit Chlorhexidin (Chlorhexamed® Fluid 0,1 %ig). Die

Patienten spülten den Mundraum über 5 min mit der Desinfektionslösung, um einer bakteriellen Besiedlung des Mund-Rachenraumes entgegen zu wirken. Erst kurz vor der Mundspülung mit 5-ALA wurden 200 mg der Trockensubstanz in 50 ml Wasser gelöst, um einen Zerfall des Produktes und dadurch induzierte Verfälschungen der Untersuchung zu vermeiden. Die Mundspülung mit 5-ALA erfolgte anschließend über einen Zeitraum von 10 min.

Die 5-ALA-Inhalation fand unter Zuhilfenahme eines Überdruckverneblers (mit O<sub>2</sub>-Zufuhr) statt. 250 mg 5-ALA Trockensubstanz wurden in 2 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst und in das Reservoir des Verneblers gegeben. Die Patienten waren angehalten über den Mund ein- und die Nase auszutmen. Die Inhalation wurde fortgesetzt bis die Lösung vollständig aufgebraucht war. Die durchschnittliche Dauer der Inhalation betrug 10 min. Zur systemischen Applikation wurde passager eine Magensonde gelegt und darüber eine 5-ALA Lösung von 20 mg/kg KG appliziert. Die Trockensubstanz wurde ebenfalls erst unmittelbar vor Applikation in 50 ml Wasser gelöst. Durch die direkte gastrale Applikation konnte eine Aufnahme von 5-ALA über die Schleimhäute der oberen Luftwege vermieden und eine rein systemische Verteilung und Anreicherung induziert werden.

### **3.2.3. Untersuchungsablauf**

Die Durchführung der Fluoreszenzendoskopie erfolgte unter Verwendung von speziell für die Fluoreszenzdiagnostik hergestellten und besonders aufeinander abgestimmten Geräten. Als Lichtsystem diente das D-Light-System der Firma Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland. Hierbei handelt es sich um eine Hochleistungslichtquelle, bestehend aus einer Xenonkurzbogenlampe und eines Fluidlichtleiters zur Optimierung der Lichtübertragung. Die Xenonkurzbogenlampe diente als Anregungslicht. Durch einen speziellen, im System integrierten, Filter wird nur violett-blaues Licht der Wellenlänge 440 nm emittiert. Dieses regt PPIX zur charakteristischen Rotfluoreszenz an. Diese charakteristische Rotfluoreszenz grenzt maligne verändertes Gewebe mit erhöhtem PPIX Gehalt gegenüber gesundem, PPIX „armen“ Gewebe, das blau erscheint, ab. Ein einfacher Wechsel zwischen Weiß- und Blaulicht ist ohne Überstrahlungsphänomene möglich, da die Geräte speziell auf die Anforderungen der Fluoreszenzendoskopie eingestellt sind. Als fluoreszenztaugliches

Kamerasystem wurde die Tricam-SL-PDD Kamera (Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland) benutzt. Sie ist mit jeweils einem Sensorchip pro Grundfarbe ausgestattet, wodurch eine sehr gute Farb- und Ortsauflösung möglich wird. Die Farben rot, grün und blau werden anhand ihres Wellenlängenbereiches scharf getrennt. Das reflektierte Anregungslicht wird im Blaukanal registriert, die Porphyrinfluoreszenz im Rotkanal und der Grünkanal bietet besonders gute Möglichkeiten zur Erfassung der Autofluoreszenz. Durch die getrennte Farberfassung ist eine Modifizierung der Empfindlichkeit der einzelnen Kanäle möglich. Im Bereich der PPIX-Fluoreszenz (635–705 nm) lässt das System eine hohe Lichttransmission zu, so dass die Sensitivität des Rotkanals gegenüber der einer Standardkamera deutlich erhöht ist. Die rötliche PPIX-Fluoreszenz kann somit besser von blau leuchtendem gesundem Gewebe abgegrenzt werden. Ein weiterer Vorteil besteht in der Optimierung der Verstärkungseinstellungen der Kamera, wodurch eine verbesserte Anpassung an die entsprechenden Lichtverhältnisse möglich ist. Speziellen Optiken (Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland) mit einem Blickwinkel von 0° oder 30° stehen dem Untersucher zur Verfügung. Ein in der Kamera integrierter Beobachtungsfiter ermöglicht die optimale Darstellung der Fluoreszenzareale, indem er einen Teil des Anregungslichtes abfiltert. Der Filter bestimmt die Intensität des zurückgestreuten blauen Anregungslichtes und erreicht ein Angleichen der Intensität von Anregungs- und Fluoreszenzlicht. Der optimale Kontrast zwischen fluoreszierendem und nicht fluoreszierendem Gewebe wird durch Verringerung der unterschiedlichen Lichtintensitäten hergestellt. Weitere Systemkomponenten sind der Monitor, der Steuerrechner und zur Videodokumentation ein Videorekorder (Panasonic, Osaka, Japan).

Zur praktischen Durchführung der Untersuchung setzt man den Tricam-SL-PDD-Kamerakopf auf die starre Endoskopoptik und stellt den gewünschten Modus (Weißlicht, Blaulicht) ein. Das Fluidlichtkabel wird mit der Optik verbunden und der gewünschte Lichtmodus über den Fußschalter oder direkt am Kamerakopf gewählt. Der zu Beginn notwendige Weißabgleich passt die Farbwiedergabe des Kamerasystems an die Farbtemperatur der verwendeten Kaltlichtquelle an. Hierzu wird die Kamera mit angeschlossener Optik bei eingeschalteter Lichtquelle auf eine weiße Fläche gerichtet und der Weißabgleich per Tastendruck durchgeführt. Als Einstellung der Belichtungszeit

werden 15 sec gewählt, dies erlaubt eine Darstellung auf dem Monitor in Echtzeit, so dass die Bilder ohne Verzögerung auf dem Monitor erscheinen.

Die Inspektion der oberen Luft- und Speisewege erfolgte zunächst unter Weißlicht, danach im Fluoreszenzmodus. Zur histologischen Diagnosesicherung erfolgten Gewebeprobenentnahmen aus verschiedenen Arealen. Die histologische Aufarbeitung diente der Klassifikation und Bestimmung der Tumorentität des suspekten Befundes.

#### **3.2.4. Probengewinnung und Präanalytik**

Die quantitative Messung von Porphyrinen und deren Vorstufen wurde an Blut- und Urinproben durchgeführt. Pro Patient erfolgten zwei Blutentnahme, die Erste 12 Stunden, die Zweite 24 Stunden nach durchgeführter Fluoreszenzendoskopie. Zur Blutentnahme wurden NH<sub>4</sub>-Heparin-Monovetten (10 ml) verwandt. Die Aufarbeitung der Blutproben erfolgte zunächst durch eine Trennung in Blutplasma und korpuskuläre Bestandteile, dazu zentrifugierte man die mit NH<sub>4</sub>-Heparin versetzten Blutproben 10 min bei 4000 g. Das in der oberen Phase liegende Blutplasma wurde in ein separates Gefäß abpipettiert und bei -28 °C tiefgefroren. Die verbleibenden Proben aus korpuskulären Blutbestandteilen durchliefen zwei Reinigungsgänge mit je 5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung. Hierbei erfolgte die Zentrifugation jeweils für 10 min bei 4000 g. Das Blutzellkonzentrat wurde somit von übrig gebliebenen Plasmaresten gereinigt. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und verworfen, das vom Plasma gereinigte Erythrozytenkonzentrat bei -28 °C tiefgefroren.

Urinproben wurden 12 Stunden und 36 Stunden nach der 5-ALA Applikation gewonnen. Die Patienten sammelten in einem lichtgeschützten Gefäß über zwei Tage Urin. Die Urinmenge eines Tages wurde nach 24 Stunden abgelesen und dem 24 Stunden-Sammelurin zweimal je eine 20 ml Urinprobe entnommen und in einem lichtdichten Behälter bei -28 °C tiefgefroren. Während der gesamten Aufbereitung wurden die Proben vor Licht geschützt.

### **3.2.5. Biochemische Analytik**

Die Durchführung der biochemischen Analytik erfolgte durch das Zentrallaboratorium der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikum Marburg, Direktor Prof Dr. Renz. Im Folgenden werden die analytischen Verfahren zur Bestimmung der Porphyrine und Porphyrinvorläufer im Urin und Blutplasma beschrieben.

#### **3.2.5.1. Nachweis von Porphobilinogenen im Urin (Hoesch-Test)**

Porphobilinogene wurden durch die sogenannte umgekehrte Ehrlich'sche Reaktion bzw. umgekehrte Urobilinogen-Reaktion (Hoesch, 1947) mit dem Ehrlich's Reagenz nachgewiesen. Zur Durchführung des Tests wurde 1 ml Ehrlich's Reagenz in ein Reagenzglas vorgelegt und 2-3 Tropfen des vorher durchgeschüttelten Urins hinzugegeben. Nach Rotfärbung des Gemisches, was einem positiven Nachweis von Porphobilinogen entsprach, erfolgte der quantitative Nachweis durch Ionenaustauschchromatographie. Zur negativen Kontrolle wurde eine Probe Normalurin, mit Ehrlich's Reagenz versetzt, verwandt. Eine positive Kontrolle erfolgt durch Vergleich mit einer Urinprobe eines Patienten mit intermittierender Porphyrie. Bei positivem Ausfall des Hoesch-Tests wurde zusätzlich zur Identifikation des Porphobilinogen-Ehrlich's-Aldehyd-Komplexes eine spektrophotometrische Messung mit Licht der Wellenlänge zwischen 500 und 600 nm durchgeführt.

#### **3.2.5.2. Quantitative Bestimmung der Porphyrinvorläufer im Urin durch Ionenaustauschchromatographie**

Die spezifische Bestimmung der Porphyrinvorläufer (ALA und PBG) im Urin erfolgt nach der Methode von Mauzerall und Granick (1956). Diese quantitative Technik nutzt die Eigenschaft der Porphyrinvorläufer mit ihren Carboxylgruppen an Austauschharze zu binden, wodurch eine Isolierung der Stoffe entsprechend der Anzahl ihrer Carboxylgruppen möglich wird. Die Porphyrinvorläufer ALA und PBG wurden durch zwei miteinander kombinierte Ionenaustausch-Chromatographie-Säulen isoliert. Anschließend erfolgte die

Elution der Porphyrinvorläufer von den Säulen und die spektrophotometrische Quantifizierung (Mauzerall 1956; Doss 1974).

### **3.2.5.3. Porphyrinanalytik und spektrophotometrische Bestimmung**

Urin-, Plasma- und Erythrozytenproben wurden zunächst lyophilisiert, danach erfolgte die Veresterung der Proben. Zur Veresterung wurden die Plasmaprobe gemäß der Methode nach Doss mit Methanolschwefelsäure (95:5 v/v) inkubiert. Das Herauslösen der veresterten Porphyrine (Porphyrin-Methylester) erfolgte mittels Chloroform. Die getrockneten und als reines Gemisch vorliegenden Porphyrin-Methylester wurden dann durch die Dünnschichtchromatographie (HPTLC) in Abhängigkeit von der Anzahl ihrer Carboxylgruppen getrennt. Die eigentliche Trennung der Porphyrinmethylester entsprechend der Carboxylgruppen der Porphyrine von Uro- bis Protoporphyrin fand in dem Benzolsystem statt. In Abhängigkeit von der Anzahl der Carboxylgruppen liegen die Porphyrine an charakteristischer Position auf der Dünnschichtplatte. Anschließend wurden sie eluiert und in dem letzten Schritt der Bestimmungen spektrophotometrisch zwischen 380 und 650 nm, gemäß ihrer spezifischen Soret Maxima, quantifiziert (Doss 1974).

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Prüfung auf Normalverteilung**

Die Prüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte unter Berechnung von Mittelwert, Median, Standardfehler des Mittelwertes und der Standardabweichung. Die Auswertung der errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen zeigte eine hohe Standardabweichung, was auf eine starke Streuung sowie auf eine Vielzahl von Ausreißern im Bereich der jeweiligen Gruppe schließen ließ. Der Median kam unterhalb des Mittelwerts zu liegen, was charakteristisch für nach links verschobene Normalverteilungskurven ist.

Betrachtete man die Mediane für ALA und PBG, so waren die Werte nach systemischer Applikation zum Zeitpunkt 1 über das 100fache gegenüber den topischen Applikationsverfahren erhöht. Zum Zeitpunkt 2 waren die Unterschiede deutlich geringer, die Werte der systemischen Gruppe lagen noch gering über dem Median von Inhalation, Mundspülung und Vergleichsgruppe. Sie waren jedoch bereits in den Normbereich zurückgekehrt. Der Mittelwert, Median, Standardabweichung des Mittelwertes sowie die Standardabweichung können für die Porphyrinvorläufer ALA und PBG zu den Zeitpunkten 1 und 2 in der Tabelle 2 abgelesen werden.

#### Zusammenfassung von Fällen

Applikation		U1 ALA	U2 ALA	U1 PBG	U2 PBG
Inhalation	N	26	26	26	26
	Mittelwert	2590	2027	724	547
	Median	2064	1832	484	452
	Standardfehler des Mittelwertes	507	262	183	78
	Standardabweichung	2583	1336	936	397
Mundspülung	N	19	19	19	19
	Mittelwert	2669	2269	1468	691
	Median	2048	2229	805	647
	Standardfehler des Mittelwertes	416	313	359	111
	Standardabweichung	1812	1362	1564	484
Systemisch	N	20	20	20	20
	Mittelwert	299126	3521	46025	1665
	Median	270550	2940	28226	1631
	Standardfehler des Mittelwertes	49755	626	11088	251
	Standardabweichung	222509	2801	49586	1121

Tab. 2: Übersicht über die Anzahl der Fälle (N), Mittelwert, Median, Standardfehler des Mittelwertes und Standardabweichung für die drei Applikationsverfahren (Inhalation, Mundspülung, Systemisch)

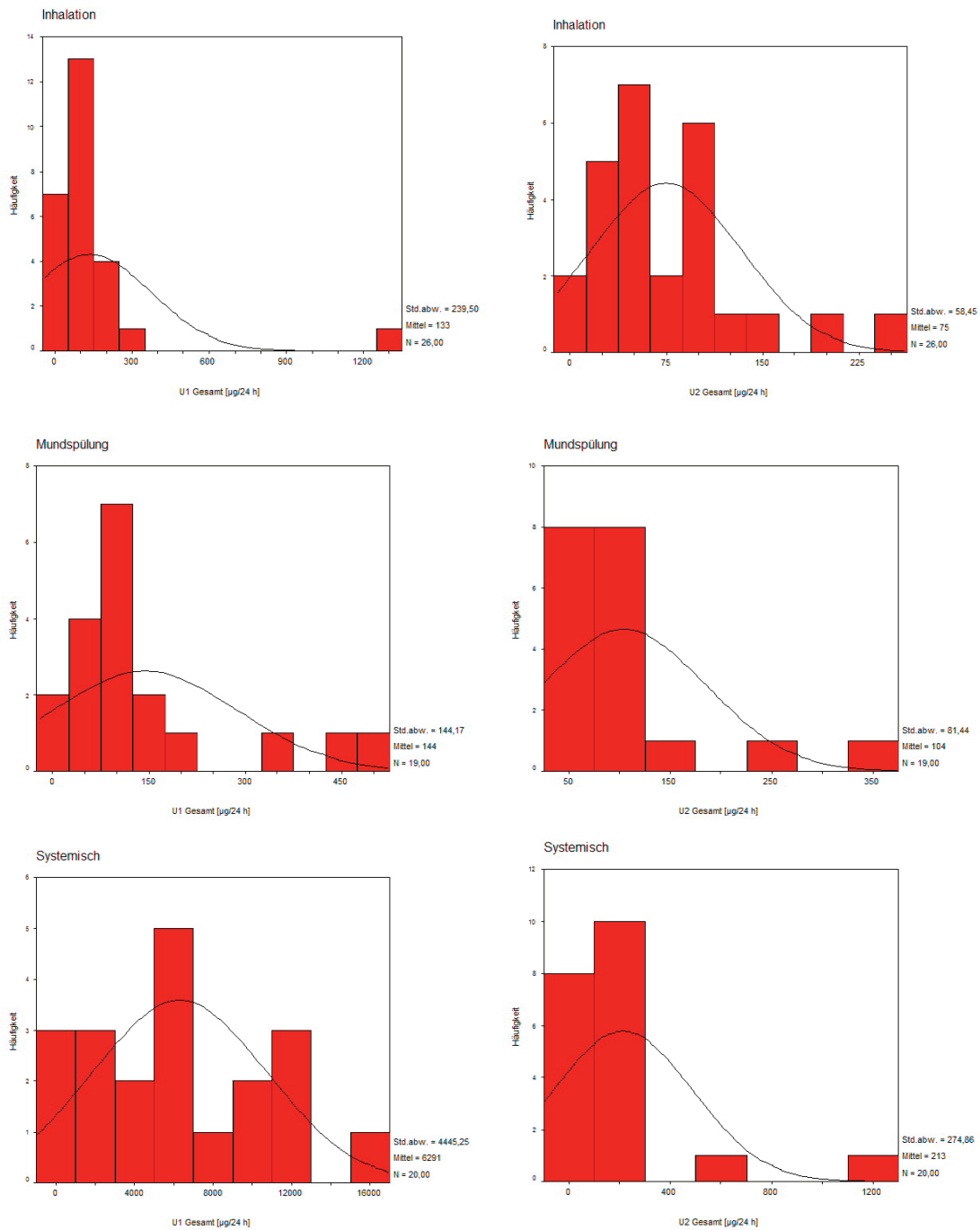
Mittelwert, Median und Standardabweichung für Uroporphyrin (URO), Koproporphyrin (KOPRO) und Gesamtporphyrin (GESAMT) zeigten ein ähnliches Bild, wie die zuvor beschriebenen Porphyrinvorläufer ALA und PBG. Die Werte zum Zeitpunkt 1 lagen für alle Porphyrine um ein Vielfaches über dem Wert zum späteren Zeitpunkt. Für U1 URO ergaben sich in der Gruppe der systemischen Applikation extrem hohe Werte ( $x_{\text{sys}}=4823 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ ) im Vergleich zu den beiden topischen Gruppen ( $x_{\text{inhal}}=8 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ ,  $x_{\text{mundsp}}=0 \mu\text{g}/24$

h). Vergleich man die Werte für KOPRO und GESAMT nach systemischer und topischer Applikation, so fand man eine Erhöhungen für  $KOPRO_{\text{sys}}$  bis auf das siebenfache und für die Gesamtporphyrine bis auf das 74fache des Wertes der Inhalationen. Zum Zeitpunkt 2 näherten sich die Porphyrinwerte der drei Gruppen wieder einander an. Die systemischen Gesamtporphyrine waren maximal um den Faktor zwei gegenüber den beiden topischen Stichproben erhöht ( $x_{\text{sys}}=116 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ ,  $x_{\text{inhal}}=54 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ ,  $x_{\text{mundsp}}=96 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ ). Die vollständigen Ergebnisse für Mittelwert, Median und Standardabweichung für alle Applikationsgruppen und Variablen können den Tabellen im Anhang entnommen werden.

Die Gesamtporphyrinmenge im Urin setzte sich nicht nur aus Uro- und Koproporphyrin zusammen, Zwischenstufen wie Penta-, Hexa- und Heptaporphyrin fallen ebenfalls im Rahmen des Porphyrinstoffwechsels an und müssten zu KOPRO und URO hinzu addiert werden, um die korrekte Menge an Gesamtporphyrin zu erhalten. In der vorliegenden Untersuchung wurden nur die Einzelwerte für Uro- und Koproporphyrin sowie die Menge an Gesamtporphyrinen erfasst und ausgewertet. Zwischenstufen in Form von Penta-, Hexa- und Heptaporphyrin wurden nicht berücksichtigt.

Die nachgewiesenen Metaboliten im Urin zum Zeitpunkt 1 und 2 wurden auf ihre Normalverteilung geprüft. Am Beispiel von GESAMT wurde in den folgenden Abbildungen die Verteilung der Werte grafisch dargestellt. Es zeigte sich eine Normalverteilung für den Zeitpunkt 1 nur nach systemischer Applikation, wohingegen zum Zeitpunkt 2 normalverteilte Werte für alle drei Applikationsverfahren vorlagen.





Grafik 2-7: Angabe der Häufigkeit des gemessenen Wertes der Gesamtporphyrinen (in  $[\mu\text{g}/24\text{h}]$ ). Getrennte Darstellung für die Zeitpunkte U1 und U2 sowie aufgedgliedert nach den unterschiedlichen Applikationsverfahren.

Zur Überprüfung der Variablen auf ihre Normalverteilung wurden Signifikanztests zur Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten

unter Zuhilfenahme des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests, wie der Tabelle 3 entnommen werden kann.

Asymptotische Signifikanz p		Inhalation	Mundspülung	Systemisch
URIN 1	ALA	0,193	0,712	0,683
	PBG	0,063	0,126	0,396
	URO	0,275	0,282	0,900
	KOPRO	<b>0,014</b>	<b>0,029</b>	<b>0,023</b>
	GESAMT	<b>0,002</b>	<b>0,043</b>	0,849
URIN 2	ALA	0,752	0,064	<b>0,042</b>
	PBG	0,299	0,618	0,652
	URO	<b>0,000</b>	<b>0,032</b>	<b>0,003</b>
	KOPRO	0,355	0,318	0,626
	GESAMT	0,432	0,222	0,081

Tab. 3: Kolmogorov-Smirnov Anpassungstest mit Angabe der asymptomatischen Signifikanz p (2-Seitig) für die Urinproben U1 und U2, aufgeteilt nach Applikationsform. Fettgedruckt sind die Werte mit signifikanter Abweichung von der Normalverteilung ( $p < 0,05$ ).

Eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung bestand bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ . Für die erhobenen Werte nach Inhalation, Mundspülung sowie der systemischen Gabe ergaben sich überwiegend hinreichend normalverteilte Werte. Die Variablen U1 KOPRO sowie U2 URO zeigten allerdings für alle Applikationsformen eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung. Die Variable U1 GESAMT war alleine für die systemische Applikation normalverteilt, für die topischen Applikationsformen ergaben sich signifikante Abweichungen von der Normalverteilung.

## 4.2. Nachweis von Porphyrinen und Porphyrinvorläufern im Urin

### 4.2.1. Ergebnisse in der Kontrollgruppe

Als Vergleichsgruppe diente eine Gruppe von 20 gesunden Probanden (11:9; w:m; Alter 25-53 Jahre). Die Probanden waren im Rahmen einer Studie zur hereditären Koproporphyrinurie in Deutschland im Jahr 2000 in der Abteilung für Klinische Biochemie, Universitätsklinikum Marburg, Direktor Prof. Doss untersucht worden (Kühnel et al., 2000). Die Daten der Kontrollgruppe stellte Prof. Doss für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung und sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Die angegebenen Normwerte in Urin und Plasma entsprechen den von Prof. Doss mitgeteilten und in der Abteilung für Klinische Biochemie, Klinikum der Philipps-Universität Marburg geltenden Normbereichen.

Urin Metabolite	Kontrollgruppe (n=20) Median ( $X_{\min}$ - $X_{\max}$ )	Normbereich
$\delta$ -Aminolävulinsäure ( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )	2884 (917 - 5899)	< 6424
Porphobilinogen ( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )	678 (452 - 1131)	< 1810
Uroporphyrin ( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )	14 (10 - 22)	< 24
Koproporphyrin ( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )	69 (40 - 78)	< 78
Gesamtporphyrin ( $\mu\text{g}/24\text{ h}$ )	112 (71 - 131)	< 186

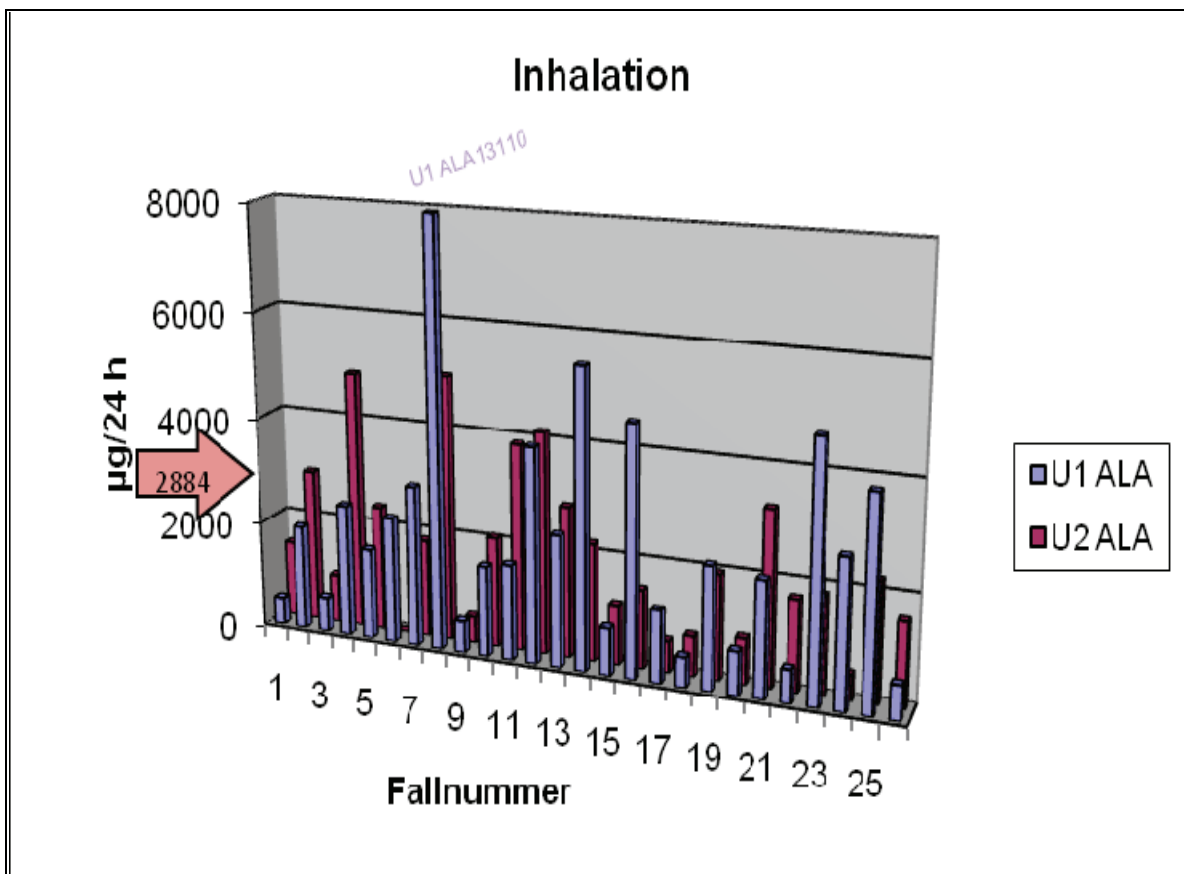
Tab. 4: Nachweis der verschiedenen Metabolite im Urin bei 20 gesunden Probanden. Die Werte entsprechen dem Median, mit Angabe des Minimum- und Maximumwertes in der Einheit [ $\mu\text{g}/24\text{ h}$ ]. Ebenso Angabe der Normwerte in [ $\mu\text{g}/24\text{ h}$ ].

### 4.2.2. Quantität von ALA und PBG zum Zeitpunkt U1 und U2

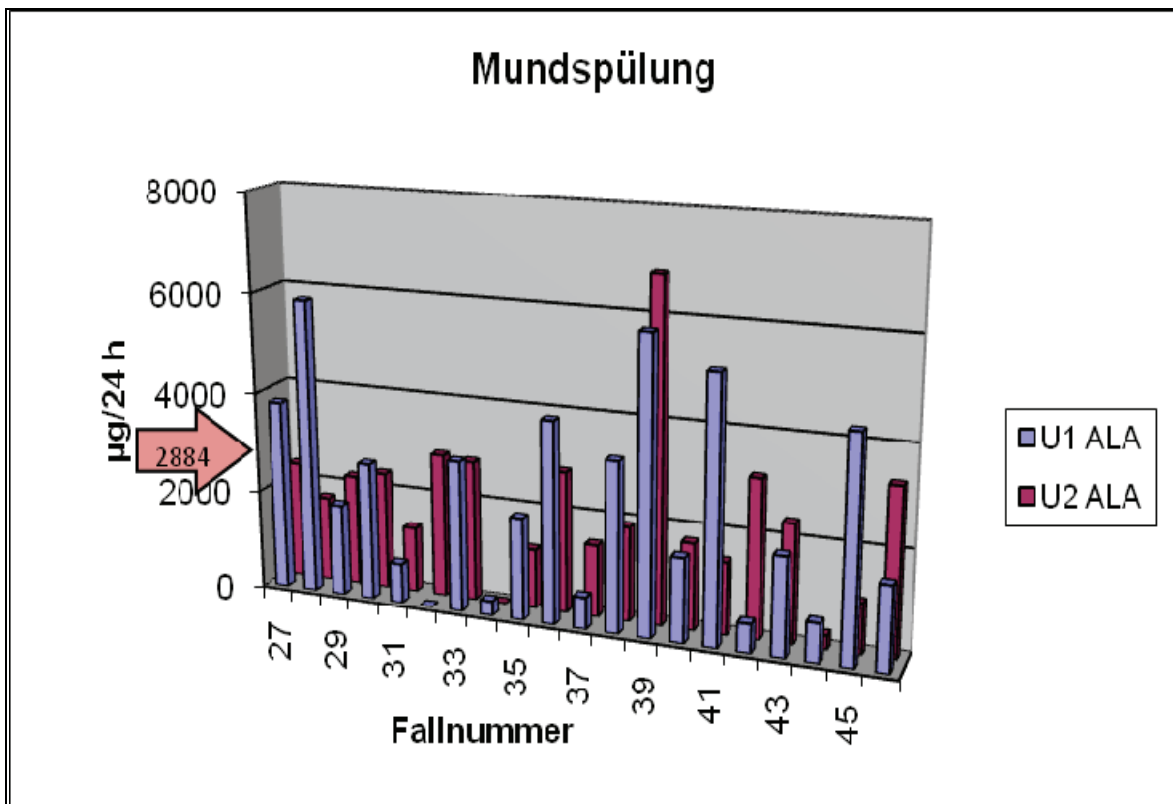
Wie verändert sich die nachgewiesene Menge ALA und PBG im Urin vom Zeitpunkt 1 zum Zeitpunkt 2?

Vergleicht man die Fälle der Applikationsgruppe Inhalation untereinander, so kam es abgesehen von einem Fall, weder zum Zeitpunkt 1 noch 2 zu einer Überschreitung des Normwertes für ALA. Der Median für ALA zum Zeitpunkt 1 lag in dieser Gruppe bei  $x_{\text{inhal}} = 2064\ \mu\text{g}/24\text{ h}$ , zum Zeitpunkt 2 sank er auf  $x_{\text{inhal}} = 1832\ \mu\text{g}/24\text{ h}$  ab. Die Werte lagen

weder oberhalb derer der Kontrollgruppe, noch wurde der Normbereichs von 6424  $\mu\text{g}/24\text{ h}$  überschritten. Selbst bei einem Patienten mit ausgesprochen hohen Werten zum Zeitpunkt 1 und Überschreitung der Normwerte, befanden sich die nachgewiesenen ALA Konzentrationen 36 Stunden nach Applikation wieder im Normbereich. Ähnlich sah es bei der Gruppe der Mundspülungen aus. Die Mediane zum Zeitpunkt 1 ( $x_{\text{mundsp}} = 2048\ \mu\text{g}/24\text{ h}$ ) und 2 ( $x_{\text{mundsp}} = 2229\ \mu\text{g}/24\text{ h}$ ) waren von der oberen Normwertgrenze weit entfernt und lagen sehr nahe bei den Werten der Kontrollgruppe. Lediglich in einer Probe wurde zum Zeitpunkt 1 ALA knapp oberhalb des Normwertes nachgewiesen, 36 Stunden nach Applikation war der Werte wieder in den Normbereich gesunken.

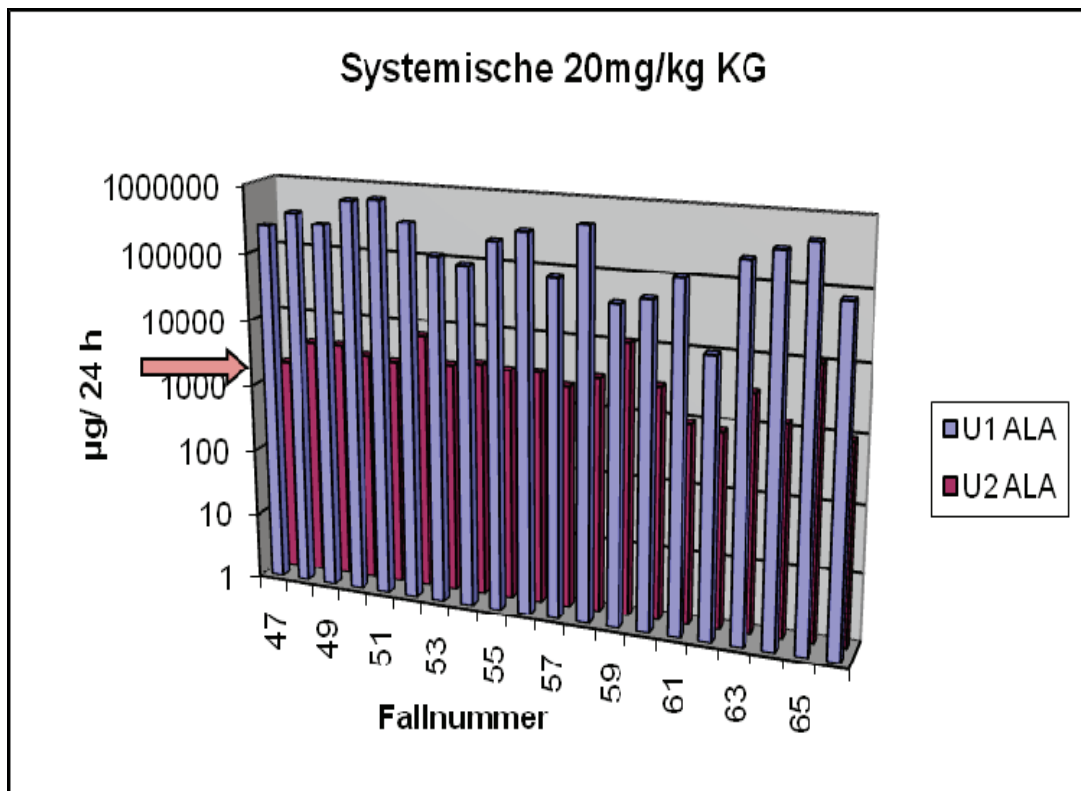


Grafik 8: Absolutwerte für ALA im Urin in [ $\mu\text{g}/24\text{ h}$ ] zum Zeitpunkt U1 (blau) und U2 (violett) für die jeweilige Fallnummer nach Inhalation. Bei Fallnummer acht liegt der U1 ALA Wert außerhalb der Grafik, daher ist der Wert einzeln in [ $\mu\text{g}/24\text{ h}$ ] angegeben. Der rosafarbene Pfeil markiert den Median der Kontrollgruppe.



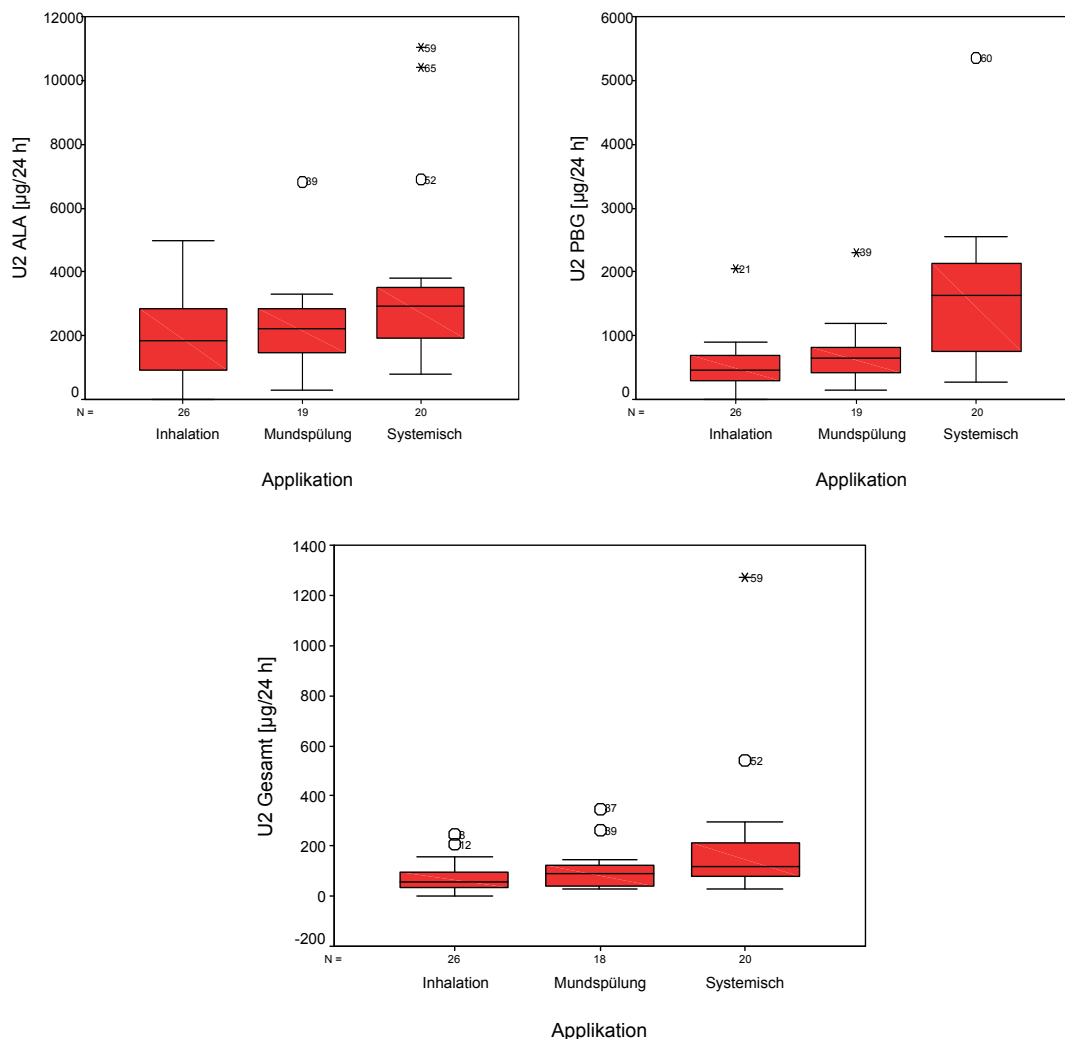
Grafik 9: Absolutwerte für ALA im Urin in [ $\mu\text{g}/24\text{ h}$ ] zum Zeitpunkt U1 (blau) und U2 (violett) für jede Fallnummer nach Mundspülung. Der rosafarbene Pfeil markiert den Median der Kontrollgruppe.

In der Gruppe der systemischen Applikationen war ein sichtbarer Unterschied zu vermerken. Die nachgewiesene Menge von ALA im Urin zum Zeitpunkt 1 überschritt den oberen Normgrenzwert von  $6424\ \mu\text{g}/24\text{ h}$  um mehr als das 40fache. Der Median für U1 ALA nach systemischer Applikation lag bei  $x_{\text{sys}} = 270550\ \mu\text{g}/24\text{ h}$  und war somit fast um das 130fache gegenüber den beiden anderen (topischen) Stichproben erhöht. In Relation zur Kontrollgruppe war der Wert um das 94fache erhöht. Bei einer durchschnittlich applizierten Dosis von  $1400\text{ mg ALA}$  in der Gruppe der systemischen Applikation - gerechnet für einen durchschnittlich  $70\text{ kg}$  schweren Erwachsenen mit einer Dosis von  $20\text{ mg ALA}/\text{kg KG}$ - stand der 130fachen Erhöhung von ALA im Urin die nur siebenfach höher applizierte Menge gegenüber. Aufgrund der erheblichen Unterschiede der ALA Konzentration zum Zeitpunkt 1 und 2 wurde zur besseren graphischen Darstellung im Folgenden (Grafik 10) eine logarithmische Skalierung gewählt.



Grafik 10: Absolutwerte für ALA im Urin in [ $\mu\text{g}/24\text{ h}$ ] zum Zeitpunkt U1 (blau) und U2 (violett) für die einzelnen Fallnummern nach systemischer Applikation. Die Y-Achse ist aufgrund der großen Schwankungsbreite der Absolutwerte **logarithmisch skaliert**. Der rosa Pfeil markiert den Median der Vergleichsgruppe (entspricht  $2884\mu\text{g}/24\text{ h}$ ).

Vergleich man die nachgewiesene Menge PBG im Urin zu den Zeitpunkten 1 und 2, so konnten Parallelen zur nachgewiesenen ALA gezogen werden. Auch hier fand sich nach Inhalation und Mundspülung keine Erhöhung des Medians über den der Kontrollgruppe oder außerhalb des Normbereiches. Anhand der grafischen Darstellung (Grafik 12) lässt sich feststellen, dass die PBG-Werte der Mundspülungen leicht oberhalb derer der Inhalationen lagen. Dieser Unterschied war nicht signifikant, wie später nachgewiesen wird. Die Grafiken 11-13 zeigen die geringen Unterschiede der Werte ALA, PBG und GESAMT zum Zeitpunkt U2 nach systemischer und topischer Applikation.



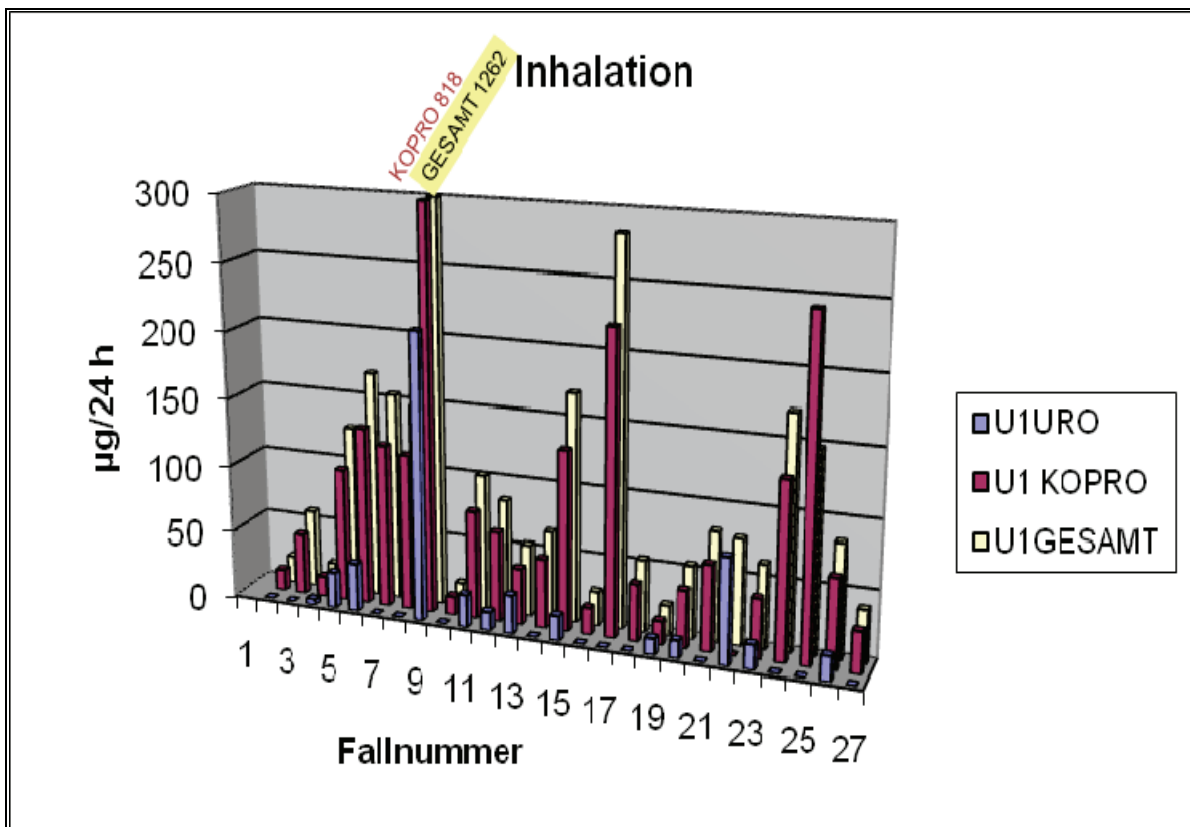
Grafik 11-13: Vergleich der drei Applikationsverfahren zum Zeitpunkt U2 hinsichtlich der Konzentration von ALA (Grafik 11), PBG (Grafik 12) und GESAMT (Grafik 13) im Urin.

Es zeigte sich, dass die gemessenen Urinwerte für PBG 12 Stunden nach systemischer Gabe um das 15,6fache gegenüber dem oberen Normwert und um das 42fache gegenüber der Kontrollgruppe erhöht waren. 36 Stunden nach Applikation erreichten die PBG-Werte in allen drei Gruppen wieder den Normbereich. Jedoch war zu diesem Zeitpunkt der Medianwert von PBG in der systemischen Gruppe noch um das 2,4fache gegenüber dem Median der Kontrollgruppe erhöht. Der Median von ALA<sub>sys</sub>t lag 36 Stunden nach Applikation nur geringgradig über dem der Kontrollgruppe, der Normgrenzwert wurde nicht überschritten. Die einzelnen Werte können den Tabellen im Anhang entnommen werden. Eine Akkumulation der Porphyrinvorläufer in Form von ALA und PBG konnte für

die topischen Verfahren ausgeschlossen werden, da die Werte nicht nur im Normbereich lagen, sondern auch die der Kontrollgruppe nicht überschritten. Nach systemischer Applikation von 5-ALA in der Dosis von 20 mg/kg KG lagen die Werte leichtgradig über denen der Kontrollgruppe, jedoch innerhalb der Normgrenzen. Eine Akkumulation von ALA und PBG ist nach Applikation von 20 mg/kg KG 5-ALA sehr unwahrscheinlich.

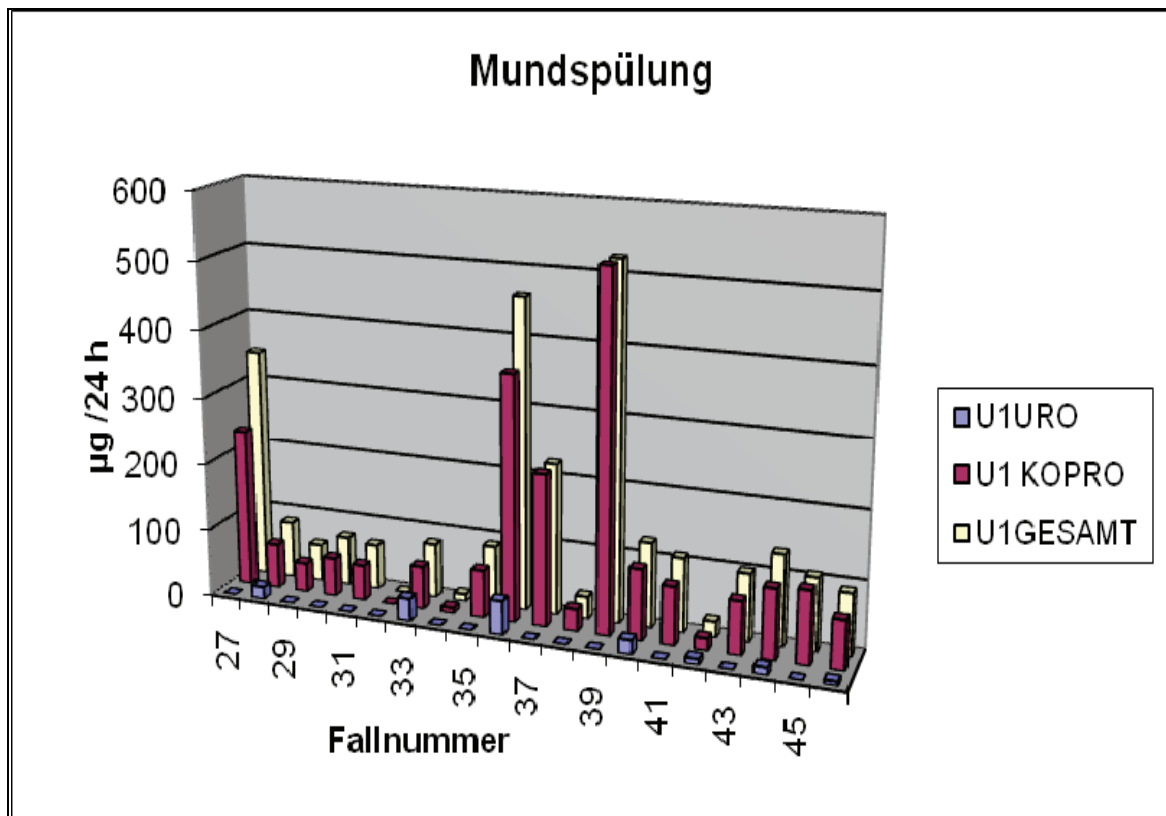
#### 4.2.3. Quantität und Qualität der Porphyrine zum Zeitpunkt U1 und U2

Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung und Menge an ausgeschiedenen Porphyrinen (KOPRO, URO, GESAMT) zu den Zeitpunkten U1 und U2 werden in den folgenden Grafiken dargestellt. In allen drei Applikationsgruppen erreichten die Gesamtporphyrine die höchsten Werte, da sie die Summe aus Uro- und Koproporphyrin sowie einem Anteil an nicht berücksichtigtem Penta-, Hexa- und Heptaporphyrinen, bilden.



Grafik 14: Quantitativer Vergleich von Uro-, Kopro- und Gesamtporphyrin zum Zeitpunkt U1 in der Einheit [µg/24 h] für die Fälle der Inhalationen.





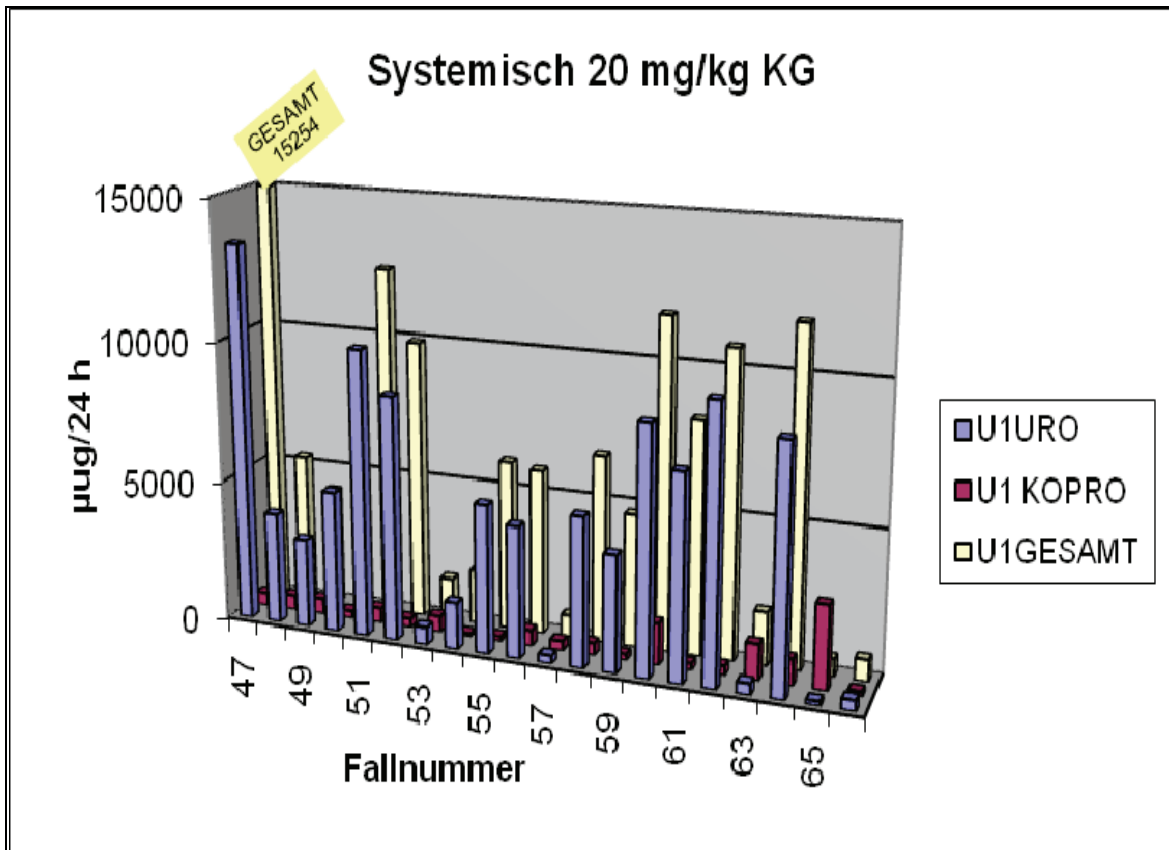
Grafik 15: Quantitativer Vergleich von Uro-, Kopro- und Gesamtporphyrin zum Zeitpunkt U1 in der Einheit [ $\mu\text{g}/24\text{ h}$ ] für die Fälle der Mundspülungen.

Die Mediane für URO und KOPRO lagen zum Zeitpunkt 1 sowohl nach Inhalation, wie auch nach Mundspülung innerhalb des Normbereichs und wiesen keine entscheidenden Unterschiede zur gesunden Vergleichsgruppe auf. Der Median von URO kam nach Inhalation von 5-ALA bei  $x_{\text{inhal}} = 2\ \mu\text{g}/24\text{ h}$  zu liegen, nach Mundspülung bei  $x_{\text{mundsp}} = 0\ \mu\text{g}/24\text{ h}$  ( $x_{\text{kontr}} = 14\ \mu\text{g}/24\text{ h}$ ). Die entsprechenden Werte für KOPRO und GESAMT können den Tabellen im Anhang entnommen werden. Die Vergleichsgruppe kam auf einen Gesamtporphyrinwert von  $x_{\text{kontr}} = 112\ \mu\text{g}/24\text{ h}$ . Die Werte für GESAMT und URO nach topischer Applikation zum Zeitpunkt 1 lagen nicht nur innerhalb des Normbereichs sondern überschritten auch die Werte der Kontrollgruppe nicht. KOPRO lag hingegen nach Mundspülung zwar im Normbereich, jedoch geringgradig über dem Median der Kontrollgruppe. Unterschiede hinsichtlich der anteilmäßigen Verteilung von URO und KOPRO zwischen der Stichprobe und der Vergleichsgruppe bestanden nicht. In allen

Proben bildete die nachgewiesene Menge URO den geringsten Anteil an der Gesamtporpyhrinmenge.

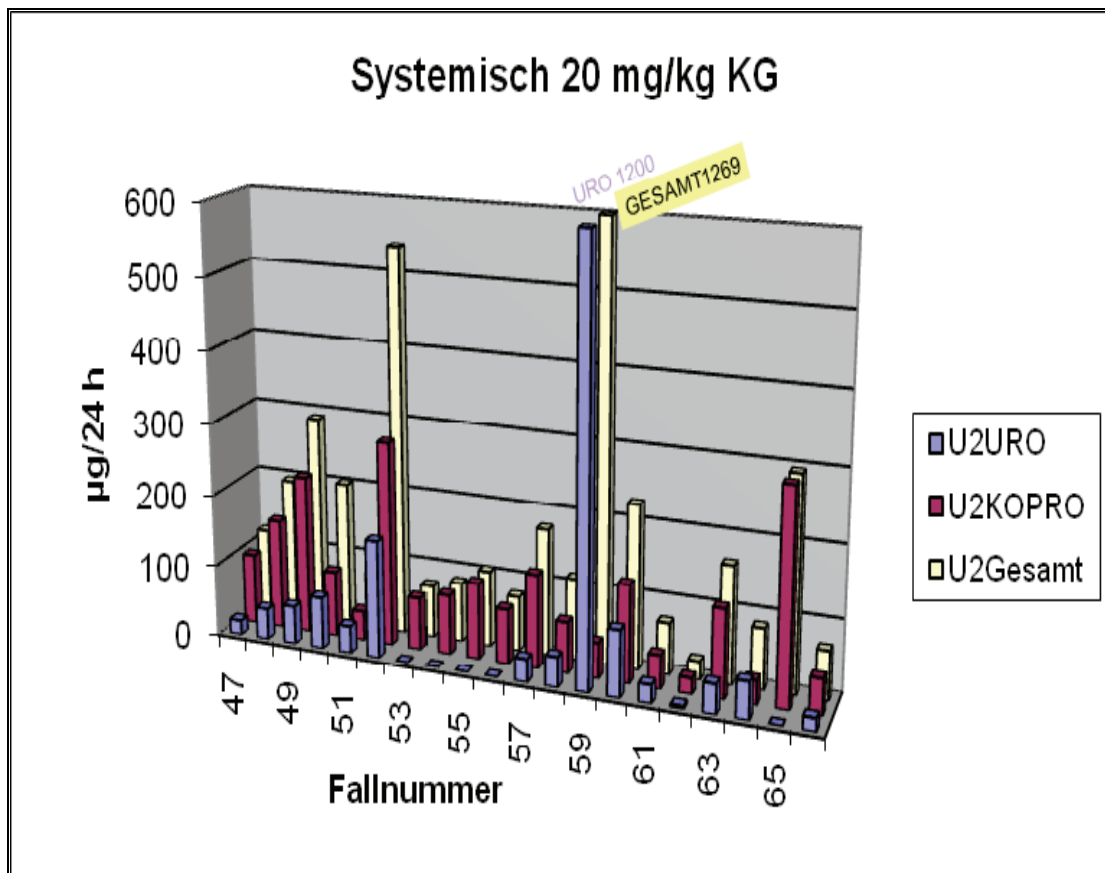
Betrachtete man die Höhe an ausgedehntem URO und KOPRO zum Zeitpunkt 2, so lagen die Mediane der Gruppe Inhalation im Normbereich. Für URO errechnete sich ein Wert von  $x_{\text{inhal}} = 0 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ , für KOPRO  $x_{\text{inhal}} = 43 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ . Bei den Mundspülungen entsprach dies  $0 \mu\text{g}/24 \text{ h}$  für URO und  $82 \mu\text{g}/24 \text{ h}$  für KOPRO. Somit lagen die Werte für KOPRO geringgradig über dem oberen Normgrenzwert von  $78 \mu\text{g}/24 \text{ h}$  und auch oberhalb des Wertes der Kontrollgruppe ( $x_{\text{kontr}} = 69 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ ). In ihrer Summe als Gesamtporphyrine befanden sich die Werte für beide topischen Applikationsverfahren zum Zeitpunkt 2 im Normbereich und waren auch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht erhöht.

Nach systemischer Gabe von 5-ALA überschritten die Werte für alle gemessenen Porphyrine den oberen Normgrenzwert. Die Gesamtporphyrine waren 12 Stunden nach Applikation um das 50fache des oberen Normgrenzwertes erhöht, wobei URO zu diesem Zeitpunkt anteilmäßig stärker vertreten war als KOPRO. Bei den beiden topischen Applikationen lagen hingegen die Werte von KOPRO in aller Regel oberhalb des nachgewiesenen URO (Ausnahme bildet Fallnummer 22 bei den Inhalationen; Grafik 14). 36 Stunden nach systemischer Verabreichung von 5-ALA sanken die Porphyrinwerte stark ab, dabei war KOPRO im Verhältnis zu URO wieder stärker vertreten (KOPRO:  $x_{\text{sys}} = 87 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ , URO:  $x_{\text{sys}} = 35 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ ).



Grafik 16: Quantitativer Vergleich von Uro-, Kopro- und Gesamtporphyrin [ $\mu\text{g}/24\text{ h}$ ] zum Zeitpunkt U1 für die systemische Applikation für die einzelnen Fallnummern. Der U1 GESAMT-Wert für Fallnummer 47 liegt außerhalb der Grafik und ist als Einzelwert angegeben.

Anders als nach topischer Applikation wurden 36 Stunden nach systemischer Applikation weiterhin erhöhte Urinwerte an URO und KOPRO nachgewiesen. Sie reichten sowohl über die Werte der Kontrollgruppe als auch den Normbereich hinaus. Die nachgewiesene Menge an GESAMT lag zu diesem Zeitpunkt hingegen bereits innerhalb des Normbereiches und nur noch unwesentlich oberhalb des Wertes der Kontrollgruppe ( $x_{\text{kontr}} = 112\ \mu\text{g}/24\text{ h}$ ). Es konnte festgestellt werden, dass URO und KOPRO über den Normwert erhöht vorlagen, die Gesamtporphyrine 36 Stunden nach systemischer Applikation ( $x_{\text{sys}} = 116\ \mu\text{g}/24\text{ h}$ ) jedoch bereits unter den Normgrenzwert von  $186\ \mu\text{g}/24\text{ h}$  abgefallen waren. Eine Akkumulation der Porphyrine konnte weitestgehend ausgeschlossen werden konnte.



Grafik 17: Quantitativer Vergleich von Uro-, Kopro- und Gesamtporphyrin in [µg/24 h] zum Zeitpunkt U2 für die einzelnen Fallnummern nach systemische Applikation. Die Werte für U2 URO und U2 GESAMT der Fallnummer 59 liegen außerhalb des Grafikbereichs und werden einzeln angegeben.

Nachdem quantitative Unterschiede zwischen U1 und U2 festgestellt wurden, stellte sich die Frage, ob diese Unterschiede für die jeweiligen Substanzen signifikant waren. Dazu wurde der in Tabelle 5 aufgeführte Wilcoxon Test zum nichtparametrischen Vergleich zweier abhängiger Variablen durchgeführt. Die abhängigen Variablen waren dabei die Messungen des jeweiligen Produkts zum Zeitpunkt 1 und 2. Durch Auflisten von positiven und negativen Rängen wurde deutlich, dass für die Mundspülungen und systemischen Gaben in allen Proben eine Abnahme der Werte vom Zeitpunkt 1 zu 2 auftrat, d.h. die Menge an nachgewiesenen Porphyrinvorläuferprodukten gesunken war. Signifikante Unterschiede in der Gruppe der Mundspülungen konnten lediglich für PBG nachgewiesen werden. In der Gruppe der Inhalationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der ausgeschiedenen Menge an ALA oder PBG. Im Gegensatz dazu ergaben sich

für die Gruppe der systemischen Applikation höchst signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten 1 und 2 sowohl für ALA wie auch für PBG.

Wilcoxon Test						
	Inhalation		Mundspülung		Systemisch	
	U2 ALA – U1 ALA	U2 PBG – U1 PBG	U2 ALA – U1 ALA	U2 PBG – U1 PBG	U2 ALA – U1 ALA	U2 PBG – U1 PBG
Z	-0,483	-0,715	-0,958	-2,689	-3,920	-3,733
Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	0,629	0,475	0,338	0,007	0,000	0,000

Tab. 5: Wilcoxon Test zum nichtparametrischen Vergleich zweier abhängiger Variablen (U1 und U2) für die Porphyrinvorläufer (ALA und PBG) getrennt nach Applikationsverfahren

Die Konzentrationsunterschiede zwischen Zeitpunkt 1 und 2 für URO, KOPRO und GESAMT glichen den zuvor errechneten Unterschieden von ALA und PBG. Die Gruppen Inhalation und Mundspülung zeigten hinsichtlich der ausgeschiedenen Porphyrine keinen signifikanten Unterschied zwischen U1 und U2. Anders verhielt es sich nach systemischer Applikation. Hier ergaben sich für alle nachgewiesenen Porphyrine höchst signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten 1 und 2 wie in Tabelle 6 abgelesen werden kann. Die Verteilung zwischen positiven und negativen Rängen zeigte für alle Patienten eine Abnahme der Porphyrine von der ersten zur zweiten Messung.

Wilcoxon Test (systemisch Applikation)			
	U2 Uro – U1 Uro	U2 Kopro – U1 Kopro	U2 Gesamt – U1 Gesamt
Z	<b>-3,920<sup>a</sup></b>	<b>-3,920<sup>a</sup></b>	<b>-3,920<sup>a</sup></b>
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>

<sup>a</sup> = basiert auf positiven Rängen basiert

Tab. 6: Wilcoxon Test zum nichtparametrischen Vergleich zweier abhängiger Variablen (U1 und U2) für die Porphyrine (URO, KOPRO, GESAMT) nach systemischer Applikation.

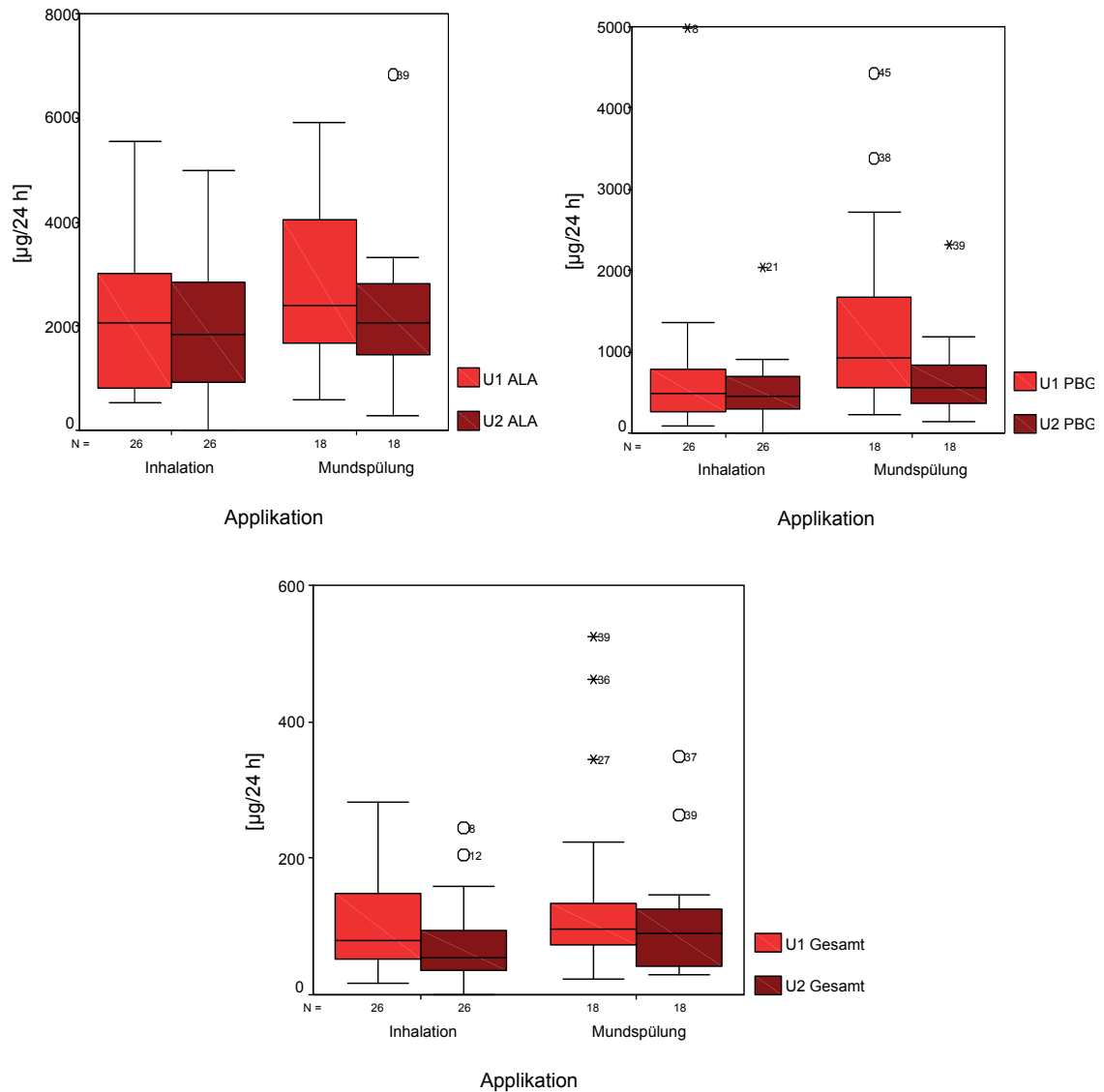
#### 4.2.4. Vergleich der drei Applikationsverfahren

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass die Porphyrine und deren Vorläufer innerhalb von 36 Stunden nach Applikation des Photosensibilisators in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle in den Normbereich zurückkehrten. Bereits 12 Stunden nach topischer Gabe unterschieden sich die Urinwerte von denen der Kontrollgruppe nicht. 36 Stunden nach systemischer Applikation lagen die Werte noch leichtgradig über denen der Kontrollgruppe, jedoch wieder weit im Normbereich. Eine Anreicherung von 5-ALA konnte für die topischen Verfahren ausgeschlossen werden und ist für die systemische Applikation sehr unwahrscheinlich. Für die Gruppe der systemischen Applikation konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der Abnahme von Zeitpunkt 1 zu 2 nachgewiesen werden. Bei den topischen Applikationen war dies nicht der Fall, allerdings lagen sowohl die Werte zum Zeitpunkt 1 wie auch 2 im Normbereich. Zur Beurteilung der drei Applikationsverfahren hinsichtlich einer Erhöhung von 5-ALA-Abbauprodukten im Urin sollte geklärt werden, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Applikationsverfahren besteht.

Zur Gegenüberstellung der Verfahren wurde der U-Test nach Mann und Whitney für unabhängige Stichproben bei nichtnormalverteilten Variablen durchgeführt. Zunächst erfolgte ein Vergleich der beiden topischen Verfahren gegeneinander, anschließend jedes topische Verfahren gegen die systemische Gabe von 20 mg 5-ALA/kg KG. Die Nullhypothese wurde vor Untersuchungsbeginn so definiert, dass beide zu testenden Gruppen der gleichen Grundgesamtheit entstammen, d.h. Unterschiede zwischen den Gruppen rein zufällig zustande gekommen sind. Die Alternativhypothese beinhaltet die Aussage, dass nachgewiesene Unterschiede nicht zufällig entstanden sind und die Stichproben somit verschiedenen Grundgesamtheiten entstammen. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  gewählt.

In den Grafiken 18, 19 und 20 erkennt man, dass die Werte ALA, PBG und GESAMT für beide topischen Verfahren sehr eng beisammen lagen. Signifikante Unterschiede traten

nicht auf, auch wenn ALA und PBG nach Mundspülung im Urin in etwas höherer Menge nachweisbar war.



Grafik 18, 19, 20: Vergleich der topischen Verfahren hinsichtlich der Werte U1 und U2 für ALA (Grafik 18) und PBG (Grafik 19) und GESAMT (Grafik 20). Ausreißer innerhalb der Normabweichung werden durch einen Kringel (°), außerhalb der Normabweichung mit einem Stern (\*) und der entsprechenden Fallnummer gekennzeichnet.

In Tabelle 7 zeigt der Test nach Mann-Whitney-U, dass zwischen den beiden topischen Verfahren keine signifikanten Unterschiede bestanden. Einzig für PBG zum Zeitpunkt 1

ergab sich eine asymptotische Signifikanz von  $p = 0,036$ , was einen signifikanten Unterschied bedeutet.

**Mann-Whitney-U Test für Inhalation vs. Mundspülung**

	U1 ALA	U2 ALA	U1 PBG	U2 PBG	U1 Gesamt	U2 Gesamt
Mann-Whitney-U	225,000	214,000	156,000	194,000	208,500	182,500
Wilcoxon-W	576,000	565,000	507,000	545,000	559,500	533,500
Z	-0,506	-0,759	-2,093	-1,220	-0,885	-1,482
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,613	0,448	<b>0,036</b>	0,222	0,376	0,138

Tab. 7: Mann-Whitney-U Test für ALA, PBG und GESAMT zur Darstellung signifikanter Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den topischen Applikationsverfahren

Trotz des einen signifikanten Wertes musste die Nullhypothese angenommen werden, d.h. Unterschiede waren nur zufällig entstanden. Die beiden Applikationsverfahren Inhalation und Mundspülung unterscheiden sich im Hinblick auf die Urinausscheidungsprodukte nicht signifikant.

Wie verhält es sich mit dem Vergleich zwischen Inhalation und systemischer Gabe von 5-ALA? Nach Anwendung des Mann-Whitney-U Test in Tabelle 8, zeigten sich für alle Abbauprodukte signifikante Unterschiede, zum größten Teil sogar höchstsignifikante Unterschiede mit einer asymptotischen Signifikanz  $p < 0,001$ . Das geringste Signifikanzniveau wurde für U2 ALA mit  $p = 0,021$  erreicht, gefolgt von U2 KOPRO mit  $p = 0,009$  und U2 GESAMT mit  $p = 0,002$ . Für alle übrigen Werte ergab sich eine Signifikanz von  $p = 0$ . Somit wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen. D.h. die Unterschiede zwischen Inhalation und systemischer Gabe waren nicht zufällig entstanden.



**Mann-Whitney-U Test für Inhalation vs. Systemisch**

	U1 ALA	U2 ALA	U1 PBG	U2 PBG	U1 Gesamt	U2 Gesamt
Mann-Whitney-U	1,000	156,000	36,500	78,000	3,000	120,000
Wilcoxon-W	352,000	507,000	387,500	429,000	354,000	471,000
Z	-5,739	-2,305	-4,953	-4,034	-5,695	-3,102
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<b>0,000</b>	<b>0,021</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>

Tab. 8: Mann-Whitney-U Test für ALA, PBG und GESAMT zur Darstellung signifikanter Unterschiede zwischen Inhalation und systemischen Applikation

Der Vergleich zwischen Mundspülung und systemischer Gabe fiel ähnlich zum Vorgegangenen aus. Die einzelnen Werte können der Tabelle 9 entnommen werden. Auch hier zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Stichproben, allerdings waren die Werte U2 ALA ( $p=0,54$ ), U2 KOPRO ( $p=0,204$ ) und U2 GESAMT ( $p=0,72$ ) nicht mehr signifikant. Somit ergaben sich für den Zeitpunkt 1 in allen Werten signifikante Unterschiede, zum Zeitpunkt 2 jedoch nur für PBG und URO. Die Nullhypothese wurde für den Zeitpunkt 1 verworfen und die Alternativhypothese angenommen, d.h. Unterschiede zum Zeitpunkt 1 waren nicht zufällig entstanden. Für den Zeitpunkt 2 wurde die Nullhypothese angenommen.

**Mann-Whitney-U Test für Mundspülung vs. Systemisch**

	U1 ALA	U2 ALA	U1 PBG	U2 PBG	U1 Gesamt	U2 Gesamt
Mann-Whitney-U	0,000	121,000	48,000	72,000	0,000	126,000
Wilcoxon-W	190,000	311,000	238,000	262,000	190,000	316,000
Z	-5,339	-1,939	-3,990	-3,317	-5,339	-1,798
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<b>0,000</b>	0,053	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	0,072
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,000 <sup>a</sup>	0,054 <sup>a</sup>	0,000 <sup>a</sup>	0,001 <sup>a</sup>	0,000 <sup>a</sup>	0,074 <sup>a</sup>

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

Tab. 9: Mann-Whitney-U-Test für ALA, PBG und GESAMT zur Darstellung signifikanter Unterschiede zwischen Mundspülung und systemischer Applikation

#### **4.3.5. Korrelation zwischen applizierter Dosis und Höhe der nachgewiesenen Substanzen im Urin**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich die Verfahren teils signifikant voneinander unterscheiden, soll im Folgenden geklärt werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der verabreichten 5-ALA Dosis und den nachgewiesenen Substanzen im Urin gab. Dazu wurde der Spearman sowie Kendall-Tau Test durchgeführt. Die applizierte Dosis 5-ALA wurde mit den jeweiligen Urinwerten zum Zeitpunkt 1 und 2 korreliert. Zur Inhalation wurde 250 mg 5-ALA und zur Mundspülung 200 mg verabreicht. Bei den systemischen Applikationen wurde durchschnittlich 1400 mg 5-ALA pro Patient gegeben, entsprechend einer Dosis von 20 mg/kg KG. Für die Porphyrinvorläufer ALA und PBG ergaben sich nach dem Kendall-Tau Test zu beiden Zeitpunkten allenfalls geringe Korrelationen mit der verabreichten Dosis. Einzelne Werte können den Tabellen im Anhang entnommen werden. Die stärkste Korrelation für U1 zeigte ALA mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,502 auf. Von der Tendenz wiesen die Werte zum Zeitpunkt 1 höhere Korrelationen zur verabreichten Dosis, als zum späteren Zeitpunkt auf. Bei den Porphyrinen fand sich ein ähnliches Bild. Die Korrelationskoeffizienten der Messung zum Zeitpunkt U1 zeigten höhere Werte, als die zum Zeitpunkt U2. Die Gesamtporphyrine korrelierten für U1 mit einem Koeffizienten von 0,48, was einer geringen Korrelation entspricht. 36 Stunden nach Applikation lag ein Korrelationskoeffizient von 0,164 vor, was ebenfalls eine sehr geringe Korrelation aufzeigt. Hieraus wurde geschlossen, dass die applizierten Dosen 5-ALA allenfalls einen geringen Einfluss auf die Höhe der ausgeschiedenen Porphyrine und deren Vorstufen hatten.

#### **4.3. Nachweis von Protoporphyrin im Blutplasma**

Nach topischer Applikation von 5-ALA gelang in keiner Blutplasmaprobe der Nachweis von Protoporphyrin (PROTO). Weder 12 Stunden noch 36 Stunden nach Applikation konnte Protoporphyrin nach Inhalation oder Mundspülung nachgewiesen werden. Lediglich in einer Blutprobe nach Inhalation wurden Gesamtporphyrine im Blutplasma gefunden. Zum Zeitpunkt 1 war es 1,6 µg/100 ml, zum späteren Zeitpunkt 0,8 µg/100 ml. Der Median

der Gruppe kam dabei jedoch unverändert im Normbereich zu liegen, vergleichbare Daten aus der Kontrollgruppe gab es nicht. Nach systemischer Applikation konnte zum Zeitpunkt 1 immerhin in sieben Plasmaproben Protoporphyrin nachgewiesen werden. Alle positiven Proben lagen oberhalb des Normwerts von 0,8 µg/100 ml, viermal wurde ein Wert von 1,9 µg/100 ml und jeweils einmal ein Werte von 1,8 µg/100 ml, 1,0 µg/100 ml und 0,96 µg/100 ml nachgewiesen. Trotzdem lag auch der Median bei 0 µg/100 ml und somit für die Gesamtheit der Stichprobe im Normbereich. 36 Stunden nach systemischer Applikation sanken alle Plasmaproben auf einen Wert von 0 µg/100 ml ab, PROTO wurde zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen. Für die Gesamtporphyrine im Plasma zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier wurde zusätzlich zu den sieben Proben mit Protoporphyrin in einer weiteren Probe Gesamtporphyrin in Höhe von 0,9 µg/100 ml zum Zeitpunkt 1 nachgewiesen, innerhalb der nächsten 24 Stunden sank der Wert auf 0 µg/100 ml. Die Gesamtporphyrinwerte von vier Proben waren identisch mit den für sie nachgewiesenen Protoporphyrinen. In den verbliebenen drei Fällen wurde eine höhere Menge Gesamtporphyrin gemessen, die Werte bewegten sich zwischen 3,7 µg/100 ml und 2,6 µg/100 ml. In zwei von diesen Fällen war zum Zeitpunkt 2 noch 0,9 µg/100 ml Gesamtporphyrin im Blutplasma nachweisbar. In den restlichen Proben wurden 24 Stunden nach Applikation keine Porphyrine mehr nachgewiesen. Der Median lag somit für alle drei Applikationsverfahren und zu beiden Zeitpunkten bei 0 µg/100 ml. Hieraus wurde geschlossen, dass die Porphyrinspiegel im Blutplasma bereits 12 Stunden nach Inhalation, Mundspülung und systemischer Gabe von 5-ALA wieder im Normbereich lagen.

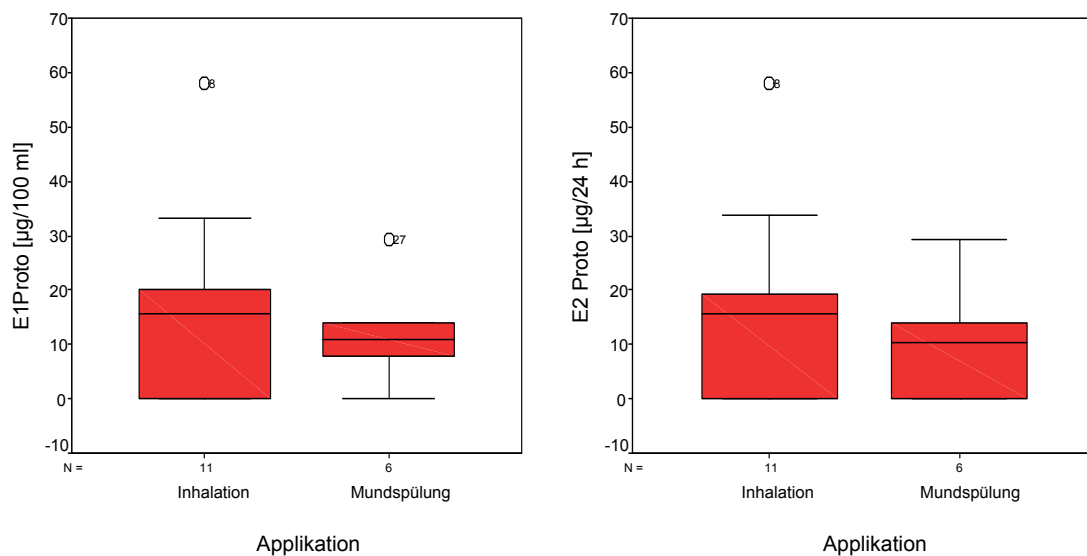
#### **4.4. Nachweis von Protoporphyrin in Erythrozyten**

Abschließend werden die Ergebnisse für die versuchsmäßig untersuchten Erythrozytenproben dargestellt. Eine Übersicht über die Gesamtzahl der untersuchten Proben kann der Tabelle 10 entnommen werden. In der Gruppe der Inhalationen wurden elf Proben, bei den Mundspülungen sechs Proben untersucht. Der Nachweis erfolgte für Protoporphyrin, der Normbereich liegt bei  $x < 36$  µg/100 ml.

### Erythrozytenproben

Applikation		Fälle					
		Gültig		Fehlend		Gesamt	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
E1Proto	Inhalation	11	42,3%	15	57,7%	26	100,0%
	Mundspülung	6	30,0%	14	70,0%	20	100,0%
E2 Proto	Inhalation	11	42,3%	15	57,7%	26	100,0%
	Mundspülung	6	30,0%	14	70,0%	20	100,0%

Tab. 10: Übersicht über gültige und fehlende Erythrozytenproben bei den topischen Applikationsverfahren (in absoluten und prozentualen Zahlen)



Grafik 21, 22: Vergleich der topischen Verfahren hinsichtlich der Protoporphyrinwerte zum Zeitpunkt E1 und E2. Ausreißer innerhalb der Normabweichung werden mit einem Kreis (°) und der entsprechenden Fallnummer gekennzeichnet.

Die aus den Protoporphyrinwerten errechneten Mediane zum Zeitpunkt 1, lagen bei 16 µg/100 ml für die Gruppe der Inhalationen und 11 µg/100 ml für die Mundspülung, somit lagen beide im Normbereich. Zum späteren Zeitpunkt veränderten sich die Mediane kaum, für die Inhalationen lag er unverändert bei 16 µg/100 ml, bei den Mundspülungen, nur unwesentlich verändert zum Zeitpunkt 1, bei 10 µg/100 ml. Aufgrund der geringen Fallzahl konnten Schlussfolgerungen, die für eine größere Stichprobe gültig wären, nicht gezogen werden.

## **4.5. Nebenwirkungen**

Während der Untersuchungen wurden bei keinem Teilnehmer Nebenwirkungen in Form von Photosensibilisierung, Juckreiz, Übelkeit oder Erbrechen beobachtet. Die Gabe von 5-ALA wurde in allen Applikationsformen gut vertragen, keine Applikation musste aufgrund von Unverträglichkeit der Substanz oder Schwierigkeiten während der Applikation abgebrochen werden.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Stellenwert der 5-ALA Fluoreszenzendoskopie unter pharmakokinetischen Gesichtspunkten**

#### **5.1.1. Pharmakokinetik nach topischer und systemischer Applikation**

##### **5.1.1.1. Abbauprodukte im Urin**

In der vorliegenden Untersuchung stellte sich die 5-ALA induzierte Fluoreszenzdiagnostik als nebenwirkungsarme Methode heraus. Die Konzentration der Gesamtporphyrine sowie der Porphyrinvorläufer ALA und PBG war 12 Stunden nach Inhalation und Mundspülung gegenüber der Kontrollgruppe nicht erhöht (Lippert et al., 2003). 36 Stunden nach Gabe des Photosensibilisators lagen die Ausscheidungswerte für ALA, PBG und Gesamtporphyrin für alle hier verwandten Dosierungen im Normbereich. Eine langfristige Anreicherung von 5-ALA Abbauprodukten in Urin, Blutplasma oder Erythrozyten war weder für die topische noch systemische Applikation nachweisbar.

Eine bereits 1999 veröffentlichte Studie von Battle zeigte an Mäusen, dass Porphyrine und deren Vorläufer im Urin innerhalb der ersten 24 Stunden nach topisch applizierter 5-ALA Lotion (10 mg) und Creme (15 mg) nachweisbar waren. Die Gesamtporphyrine waren um das 20fache erhöht, sanken innerhalb der folgenden 24 Stunden jedoch auf Ausgangsniveau. Entsprechend waren auch die Vorläufer ALA und PBG innerhalb der

ersten 24 Stunden erhöht (Casas et al., 1999). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die tierexperimentellen Untersuchungen von Battle und Mitarbeitern. Auch wenn unterschiedliche Applikationsarten und Dosierungen untersucht wurden, so konnte übereinstimmend eine Akkumulation von 5-ALA Abbauprodukten nach topischer Anwendung ausgeschlossen werden. In der Literatur finden sich bisher keine Angaben, dass nach topischen Applikationen von 5-ALA bis 250 mg eine längerfristige Anreicherung von Porphyrinen oder deren Vorstufen im Plasma oder Urin nachweisbar waren (Baumgartner et al., 1996; Rick et al., 1997; Casas et al., 1999; Webber et al., 1997; Egger et al., 1996; Lippert et al., 2003).

Signifikante Unterschiede traten für die systemische Applikation auf. Zum Zeitpunkt 1 wurden im Urin bis zu 100fach erhöhte Werte für ALA, PBG und Gesamtporphyrine im Vergleich zur topischen Applikation nachgewiesen. Innerhalb von weiteren 24 Stunden sanken die Werte für ALA, PBG und GESAMT in den Normbereich. Lediglich die Uro- und Koproporphyrine waren zu diesem Zeitpunkt noch leichtgradig oberhalb des Wertes der Kontrollgruppe nachweisbar.

Egger bestimmte mit seiner Arbeitsgruppe die Urinausscheidungsprodukte ALA, PBG und Porphyrin nach Gabe von 100 mg/kg KG 5-ALA. Die Untersuchung erfolgte an sieben Hunden. Höchstwerte wurden für ALA zwei bis vier Stunden und für PBG vier bis acht Stunden nach Applikation nachgewiesen. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich nur über zehn Stunden, so dass in dieser Untersuchung keine Aussage über die Urinwerte nach 24 Stunden oder 36 Stunden getroffen werden konnten und ein Vergleich mit den hier vorgestellten Daten nicht möglich ist. Ebenso bestehen methodische Unterschiede zwischen den Ergebnissen, da einerseits punktuell Urin entnommen, andererseits ein 24 Stunden Sammelurin auf die Gesamtmenge an Abbauprodukten untersucht wurde (Egger et al., 1996). Die Höhe der jeweils gemessenen Werte ist somit nicht vergleichbar.

In einer weiteren tierexperimentellen Studie von Vaidyanathan wurde die PPIX-Konzentration im Urin nach intravenöser 5-ALA Gabe von 100 mg/kg KG 24 Stunden nach Applikation untersucht. Die Messungen zeigten, dass lediglich 0,2 % der zugeführten

Menge 5-ALA als PPIX im Urin ausgeschieden wurden. Daher wurde vermutet, dass Organe mit hohem metabolischem Umsatz 5-ALA aufnehmen und intrazellulär verstoffwechseln. Unsere Untersuchungen erbrachten den Nachweis von Uro- und Koproporphyrin im Urin, so dass neben PPIX weitere Abbauprodukte zur absoluten Menge an ausgeschiedener und verstoffwechselter 5-ALA hinzugerechnet werden müssen. Eine Gegenüberstellung der absoluten Zahlen für die nachgewiesene Porphyrin-Menge im Urin, im Vergleich zum applizierten 5-ALA führten wir, im Unterschied zu Vaidyanathan nicht durch (Vaidyanathan et al., 2000).

Hinsichtlich der verschiedenen im Urin nachweisbaren 5-ALA Abbauprodukte nach systemischer Applikation finden sich in der Literatur keine vergleichbaren Ergebnisse. Kritisch anzumerken ist, dass vor Applikation von 5-ALA in der vorliegenden Arbeit keine individuellen Ausgangswerte im Urin bestimmt wurden, somit kann keine Aussage über den Rückgang der Werte auf das persönliche Ausgangsniveau getroffen werden. Der Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe zeigte jedoch, dass auch nach systemischer Applikation die Stoffwechselprodukte von 5-ALA spätestens nach 36 Stunden weitestgehend auf das Niveau der Kontrollgruppe absinken. Darüberhinaus wären begleitende Blutuntersuchungen, wie die Bestimmung von Transaminasen, Gamma-Glutamyl-Transferase und Cholinesterasen, zur Einschätzung der Leberfunktion sinnvoll gewesen. Hierdurch hätten hohe Anreicherungswerte im Urin mit einer möglichen Leberfunktions- und Stoffwechselstörung in Zusammenhang gebracht werden können. Es bleibt unklar, inwiefern hohe Ausscheidungswerte alleine von der gewählten Dosierung beeinflusst werden und in welcher Weise sich eine hepatische oder renale Stoffwechselstörung, wie beispielsweise ein äthyltoxischer Leberschaden, auf die Verstoffwechslung von 5-ALA auswirkt.

#### **5.1.1.2. Abbauprodukte in Blutplasma und Erythrozyten**

Der Nachweis von PPIX in den Plasma- und Erythrozytenproben nach topischer Gabe war für alle untersuchten Patienten negativ. 12 Stunden nach systemischer Applikation zeigte

sich bei sieben Patienten leicht erhöhte PPIX-Werte im Blutplasma, der Median für diese Gruppe lag jedoch ebenfalls im Normwertbereich.

Aus physiologischer Sicht ist eine langfristige Erhöhung der Porphyrin-Konzentration im Plasma nicht zu erwarten, da in der Leber eine schnelle Verstoffwechslung von 5-ALA zu PPIX erfolgt, PPIX zügig über die Niere eliminiert wird und im Urin nachgewiesen werden kann. Die Ausscheidungskinetik von PPIX ist durch einen schnellen Anstieg im Plasma bis etwa drei Stunden nach Applikation und eine anschließende schnelle Elimination über die Nieren charakterisiert (Egge et al., 1996; Rick et al., 1997; Webber et al., 1997; Casas et al., 1999; Vaidyanathan et al., 2000). Die von uns gewählten Bestimmungszeitpunkte wurden auf 12 Stunden und 36 Stunden nach Applikation festgelegt, um eine längerfristige Erhöhung im Sinne einer Akkumulation ausschließen zu können.

Die Konzentration von Ausscheidungsprodukten im Blut sowie das Erreichen von Höchstwerten scheint vom Applikationsweg und der Dosis abhängig zu sein. Unterschiedliche Arbeitsgruppen um Baumgartner, Rick und Webber konnten erhöhte PPIX Plasmakonzentrationen nach 3,5 Stunden, 6,7 Stunden und 8-12 Stunden nachweisen, wobei unterschiedlich hohe Dosen 5-ALA appliziert wurden. Keine der genannten Arbeitsgruppen konnte eine Erhöhung der Werte über 36 Stunden hinaus nachweisen. Eine vollständige Elimination ist anzunehmen, was durch die hier vorgestellten Ergebnisse bestätigt wurde (Egger et al., 1996; Rick et al., 1997; Baumgartner et al., 1996; Webber et al., 1997).

Zum Nachweis von PPIX im Blutplasma sind wiederholte Blutentnahmen in den ersten 12 Stunden nach Applikation sinnvoll. An den von uns gewählten Zeitpunkten konnte bestätigt werden, dass keine erhöhten Plasmawerte 12 und 24 Stunden nach dem Eingriff mehr vorlagen, eine Aussage über die absolute Höhe des Anstiegs und Eliminationskinetik von PPIX im Plasma konnte aufgrund der Untersuchungszeitpunkte nicht getroffen werden.

Im Einklang mit den vorgestellten Daten stehen die Ergebnisse der Untersuchung von Baumgartner und seinen Mitarbeitern an Patienten im Frühstadium des Lungenkrebses.



Sieben Patienten mit positivem Befund im Sputum und negativem Befund in der Weißlichtendoskopie wurden auf die Pharmakokinetik von 5-ALA nach Inhalation sowie einem Zusammenhang zwischen Atemzugvolumen und Anreicherung in der tracheobronchialen Schleimhaut untersucht. Die Plasmakonzentration von PPIX wurde einmal vor Applikation und nach unterschiedlichen Zeiten innerhalb der nächsten 24 Stunden bestimmt. Zunächst verabreichte man 500 mg 5-ALA, die letzten drei Patienten erhielten nur noch 250 mg, da sich bei der höheren Konzentration ein Anfärben der gesamten Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes einstellte und eine Differenzierung schlecht oder gar nicht möglich war (Baumgartner et al., 1996). Die Ergebnisse ließen zwei Schlussfolgerungen zu. Einerseits war die Anreicherung von 5-ALA in der tracheobronchialen Schleimhaut unabhängig vom Atemzugvolumen, andererseits ergaben die PPIX Messungen im Plasma eine Maximalkonzentration von 5,5 ng nach 3,5 Stunden und einen vollständigen Abbau 24 Stunden nach Applikation. Der Anstieg der PPIX Konzentration im Plasma zeigte keine klinische Relevanz, was durch unsere Ergebnisse bestätigt wurde (Baumgartner et al., 1996).

Rick und Mitarbeiter testeten verschiedene Applikationswege von 5-ALA auf eine Veränderung der PPIX Werte im Blutplasma. Sie verglichen dabei die Inhalation von 500 mg und die systemische Applikation mit 40 mg/kg KG. Höchste PPIX Konzentrationen im Plasma wurden 4,1 Stunden nach topischer und 6,7 Stunden nach systemischer Applikation gemessen. Nach 24 Stunden waren nur noch sehr geringe Mengen nachweisbar, nach 34 Stunden konnte PPIX nicht mehr nachgewiesen werden. Nach systemischer Applikation wurden PPIX-Maximalwerte bereits nach 30 min nachgewiesen. Sie kehrten innerhalb von 8 Stunden auf Normalwerte zurück (Rick et al., 1997). Die vorgestellte Arbeit zeigte übereinstimmend, dass bereits 12 Stunden nach systemischer Applikation der Medianwert der Protoporphyrine im Blutplasma im Normbereich lag und 36 Stunden nach systemischer Applikation keinerlei erhöhte Werte mehr nachweisen waren.

Webber und Mitarbeiter untersuchten die Pharmakokinetik von PPIX im Blut nach oraler Gabe von 60 mg/kg KG 5-ALA an vier Patienten, die keinerlei hepatische Dysfunktion aufwiesen. Nach einer kurzen Verteilungsphase, sanken die Plasmawerte für PPIX langsam

und nach 48 Stunden waren sie weitestgehend nicht mehr nachweisbar. 8-12 Stunden nach Applikation erreichte PPIX Höchstwerte im Plasma, in den zweiten 24 Stunden nach Applikation fielen die Konzentrationen erheblich und waren 55 Stunden nach Gabe nur noch schwer nachweisbar. Parallel wurden die Leberwerte der Patienten erfasst, hier waren bei drei von vier Patienten vorübergehend erhöhte Leberwerte nachweisbar, die maximal das Doppelte der Normalwerte erreichten und sich innerhalb von einer Woche normalisierten. Keiner der Patienten berichtete über Nebenwirkungen in Form von Übelkeit, Erbrechen oder phototoxischen Reaktionen (Webber et al., 1997). Aufgrund der schnellen Elimination von PPIX aus dem Körper, ist nur für eine kurze Zeit eine Photosensibilisierung der Haut durch Einlagerung von PPIX im Gewebe zu erwarten, was das übereinstimmende Ergebnis verschiedener Autoren ist (Egger et al., 1996; Webber et al., 1997; Rick et al., 1997; Vaidyanathan et al., 2000).

Die Fluoreszenz-induzierende Substanz 5-ALA ist dem Produkt Photofrin® und anderen Hämatoporphyrinderivaten aufgrund seiner geringen Phototoxizität und hinsichtlich der einfachen Anwendbarkeit im klinischen Alltag überlegen (Webber et al., 1997).

Einige tierexperimentelle Studien untersuchten die systemische Gabe von 5-ALA. Egger beobachtete im Tiermodell an sieben Hunden nach Gabe von 100 mg/kg KG 5-ALA einen schnellen Anstieg der Porphyrinkonzentration im Plasma innerhalb der ersten Stunde, gefolgt von einer langsamen Reduzierung des Plasmaspiegels. Die Plasmaporphyrin-Höchstwerte wurden nach einer Stunde erreicht und betragen das 50fache des Normalwertes. Im Unterschied zu unseren Untersuchungen erstreckte sich der Beobachtungszeitraum über zehn Stunden, so dass keine vergleichende Aussage über die Plasmawerte nach 24 oder 36 Stunden getroffen werden kann (Egger et al., 1996). Unter Berücksichtigung der eigenen und fremden Daten kann jedoch vermutet werden, dass die Werte innerhalb von 12-24 Stunden auf ein Normalniveau zurückkehren (Webber et al., 1997; Baumgartner et al., 1996; Rick et al., 1997; Vaidyanathan et al., 2000).

Egger konnte aufgrund von Gewebemessungen nachweisen, dass es zu einem signifikanten Anstieg von 5-ALA in Pankreas, Prostata, Blase und Muskel kommt. Im Gegensatz dazu

waren nur sehr geringe und nicht signifikante Anstiege der Porphyrinkonzentration in der Haut nachweisbar. Hierdurch ist von einer allenfalls geringen, wenn überhaupt bestehenden, Photosensitivität der Haut nach systemischer Gabe von 5-ALA in der Dosierung von 100 mg/kg KG auszugehen (Egger et al., 1996).

Vaidyanathan machte interessante Beobachtungen hinsichtlich der Nebenwirkungen nach systemischer 5-ALA Gabe. Er untersuchte die intravenöse 5-ALA Gabe an fünf Hunden mit Dosen von 5, 25, 50, 75, 100 mg/kg KG bezüglich der PPIX- Konzentration im Plasma und bei zwei Hunden im Urin. Die PPIX-Konzentration im Plasma, nach Gabe von 100 mg/kg KG, erreichte nach 24 Stunden das Ausgangsniveau. Bei Gabe geringerer Dosen (25 mg/kg KG) stellten sich die Ausgangswerte bereits nach acht Stunden wieder ein. In Übereinstimmung mit dem Verlauf der Plasmawerte war nachweisbar, dass die Gewebefluoreszenz 31 Stunden nach Applikation von 100 mg/kg KG das Ausgangsniveau wieder erreicht hatte. Bezüglich der Nebenwirkungen zeigte sich eine Zunahme der Häufigkeit des Erbrechens mit Steigerung der Dosis. Eine Applikation von 5 mg/kg KG zeigte keinerlei Erbrechen, ab einer Dosis von 25–100 mg/kg KG stieg die Häufigkeit des Erbrechens proportional an (Vaidyanathan et al., 2000).

Ein Zusammenhang zwischen Dosis und auftretenden Nebenwirkungen scheint zu bestehen und muss an einem größeren Kollektiv und insbesondere am Menschen genauer untersucht werden (Mlkvy et al., 1995a und 1995b; Regula et al., 1995).

### **5.1.2. Dosisanpassung für die diagnostische Anwendung**

Aus pharmakokinetischer Sicht lässt sich die gute Anwendbarkeit der topischen und niedrigdosierten systemischen 5-ALA Applikation bestätigen. Dosen im Bereich von 200-250 mg sowie die systemische Gabe von 20 mg/kg KG können bei Patienten mit funktionstüchtiger Leber und Niere aufgrund der eigenen Ergebnisse ohne Bedenken verabreicht werden. Das Applizieren von geringen 5-ALA Dosen bis 25 mg/kg KG scheint auch in anderen Studien keine, bisher nachweisbaren, abnormen oder langanhaltenden Leberenzym erhöhungen oder Anreicherungen von 5-ALA Abbauprodukten hervorzurufen

(Webber et al., 1997; Vaidyanathan et al., 2000). Eine längerdauernde Anreicherung von Porphyrinen kann weitestgehend ausgeschlossen werden. 36 Stunden nach 5-ALA Gabe waren weder im Blut noch im Urin 5-ALA Abbauprodukte in erhöhten Konzentrationen nachweisbar. Alle Werte kehrten auf das Referenzniveau zurück.

Eine Bestimmung der Blut- und Urinwerte vor der Applikation wurde nicht durchgeführt, wie bereits zuvor kritisch angemerkt wurde, so dass der absolute Vergleich für den einzelnen Patient fehlt. Stattdessen verglichen wir die erhobenen Werte nach Applikation von 5-ALA mit einer gesunden Kontrollgruppe, die uns entsprechende Ausgangs- und Referenzwerte lieferte. Aufgrund des Erreichens von Normalwerten 36 Stunden nach Applikation und keinen entscheidend höheren Werten im Vergleich zur Kontrollgruppe kann davon ausgegangen werden, dass auch vor Applikation bei keinem unserer Patienten erhöhte Werte für Porphyrine oder deren Vorstufen vorhanden waren.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine Applikation von 5-ALA bis zu einer Dosis von 20 mg/kg KG allenfalls einen geringen Einfluss auf die im Urin ausgeschiedene Menge an Porphyrinen und deren Vorläufern hat. Die Verabreichung von 5-ALA bis 20 mg/kg KG kann hinsichtlich der Akkumulation im Körper bei Patienten mit regelrechter Leber- und Nierenfunktion unbedenklich durchgeführt werden.

### **5.1.3. Pharmakokinetik und Nebenwirkungen bei eingeschränkter Leberfunktion**

Unklar bleibt das Akkumulationsverhalten bei eingeschränkter Leber- oder Nierenfunktion. Patienten mit Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich weisen oftmals eine Vorgeschichte mit Alkohol- und teilweise Drogenabusus auf. Leberfunktionsstörungen in Form von Steatosis hepatis, Hepatitis oder Leberzirrhose sind häufig anzutreffen. Die Indikation zur photodynamischen Diagnostik sowie im speziellen die Dosierung und das Applikationsverfahren müssen sorgfältig überdacht und von der Funktionstüchtigkeit der Organe abhängig gemacht werden.

Im Rahmen der vorgelegten Untersuchung wurden Urin- und Plasmaproben eines Patienten mit bekannter Hepatitis B und C nach Inhalation von 250 mg 5-ALA untersucht. Deutlich erhöhte Werte gegenüber den Normalwerten zeigten sich in allen untersuchten Proben 12 Stunden nach Applikation, eine Ausnahme bildete lediglich der Porphyringehalt der Erythrozyten. 36 Stunden nach Applikation waren nur noch Uro-, Kopro- und Gesamtporphyrine in der Urinprobe erhöht, es war jedoch eine deutliche Verringerung der Konzentrationen zu verzeichnen. Leberfunktionswerte wurden nicht erfasst, so dass der Grad der Funktionseinschränkung nicht quantifiziert und keine allgemeingültigen Schlussfolgerungen gezogen werden können.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass selbst bei verminderter Leberfunktion die Ausscheidung von 5-ALA Abbauprodukten nach topischer Gabe suffizient erfolgt und keine wesentlich verlängerten Anreicherungsintervalle zu erwarten sind.

Die Arbeitsgruppe um Rick untersuchte den Zusammenhang zwischen PPIX Fluoreszenz und Photosensibilität der Haut und wies nach, dass das höchste Risiko für phototoxische Reaktionen acht Stunden nach oraler Gabe von 40 mg/kg KG 5-ALA bestand. Spätestens 40 Stunden nach Verabreichung von 5-ALA war keine PPIX-induzierte Photosensibilität mehr nachweisbar. Bei zwei Patienten, die eine erhöhte Morbidität aufzeigten, kam es zu Nebenwirkungen in Form von Übelkeit, Erbrechen und neurologischen Symptomen (Rick et al., 1997; Vaidyanathan et al., 2000). Aufgrund dessen sollte bei multimorbiden Patienten oder Patienten mit stark eingeschränkter Leber- oder Nierenfunktion die topische Applikation von 5-ALA bevorzugt angewandt werden. Im Falle der systemischen Anwendung sollte die Dosierung möglichst niedrig gewählt werden und 20 mg/kg KG nicht überschreiten. Eine klinisch relevante Akkumulation von Stoffwechselprodukten bei Patienten ohne hepatische oder renale Dysfunktion oder erhöhte Morbidität ist bis zu einer Dosis von 40 mg/kg KG 5-ALA nicht zu erwarten.

Bei eingeschränkter Leber- und Nierenfunktion sollte somit ein besonderes Augenmerk auf die 5-ALA und PBG Konzentrationen im Urin gerichtet werden. Nebenwirkungen in Form akuter Attacken einer exogen herbeigeführten Porphyrie sind für die diagnostische und

therapeutische Anwendung nicht akzeptabel. Sie sind bisher auch nicht berichtet worden. Zur Festigung der Hypothese sollten bei Patienten mit beeinträchtigter Leberfunktion Untersuchungen zur Ausscheidung von 5-ALA Abbauprodukten nach topischer und systemischer Applikation unter spezieller Berücksichtigung der Leber- und Nierenwerte durchgeführt werden.

## **5.2. Klinische Anwendbarkeit der Fluoreszenzendoskopie unter Berücksichtigung der eigenen Ergebnisse**

Die vorliegenden Daten konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Eliminationskinetik von 5-ALA nach Inhalation und Mundspülung aufweisen. Aus pharmakokinetischer Sicht stehen beide Methoden gleichwertig nebeneinander. Die Entscheidung für oder gegen eines der Verfahren zur Durchführung der Fluoreszenz-induzierten Diagnostik wird in die Hände des Klinikers gelegt.

Für den Bereich der oberen Luft- und Speisewege hat sich die topische Applikation besonders bewährt (Lippert 2000; Lippert 2001; Betz et al., 2002b; Leunig et al., 2002; Klahr 2003; Arens et al., 2007; Hautmann et al., 2007).

Die Applikationsform wird je nach Lokalisation des zu untersuchenden Areals gewählt. Veränderungen im Oropharynx und Ösophagus werden durch die Mundspülung auf direktem Weg erreicht, wohingegen die Inhalation für Neubildungen des Larynx und der Trachea Vorteile bietet. Die lokale 5-ALA Gabe ist in der klinischen Routineuntersuchung einfach durchführbar. Die Handhabung und der zeitliche Aufwand sind sowohl für den Patienten als auch ärztliches bzw. pflegerisches Personal einfach.

Als Alternative zur topischen Applikation steht für alle suspekten Areale im oberen Aerodigestivtrakt die systemische Gabe von niedrigdosiertem 5-ALA zur Verfügung. Hier zeigte sich ebenfalls eine unbedenkliche Anwendung hinsichtlich einer zügigen Elimination aus dem Körper innerhalb von 36 Stunden.

### **5.2.1. Klinische Ergebnisse nach Inhalation**

In Übereinstimmung mit zahlreichen anderen Autoren wurden sehr zufriedenstellende Ergebnisse für die Fluoreszenzdarstellung nach Inhalation von 5-ALA beobachtet. Die Anreicherung von PPIX in veränderten Schleimhautarealen war gegenüber der gesunden Schleimhaut gut erkennbar und deutlich abzugrenzen. Für die Entnahme von Gewebebiopsien stellte die Fluoreszenzmarkierung ein gutes Hilfsmittel und sinnvolle Ergänzung zur Weißlichtendoskopie dar (Leunig et al., 1996b und 2002; Arens et al., 1999; Mehlmann et al., 1999; Betz et al., 2002b; Csanady et al., 2004; Arens et al., 2007; Hautmann et al., 2007). Die Sicherung der Diagnose und Verifizierung des endoskopischen Befundes erfolgte durch die histologische Aufarbeitung und ist unverzichtbar.

Eine vorangegangene Untersuchung der Arbeitsgruppe um Lippert konnte für die topisch applizierte 5-ALA Fluoreszenzdiagnostik eine Spezifität von 68,82 % bei einer Sensitivität von 91,61 % nachweisen. Hier erfolgte die Applikation von 5-ALA entweder als Mundspülung oder Inhalation (Klahr 2003). Ähnliche Angaben für die Spezifität und Sensitivität finden sich in weiteren Literaturmitteilungen (Leunig et al., 1996a; Mehlmann et al., 1999; Betz et al., 2002b; Csanady et al., 2004; Hautmann et al., 2007). Nach Aufsplitten der Ergebnisse für Veränderungen im Larynx und Hypopharynx zeigte sich eine Überlegenheit der Methode für den Larynx, hier ergaben sich eine Spezifität von 70 % und eine Sensitivität von 98 % (Klahr 2003).

Eine Erklärung für die bessere Darstellung der Veränderungen nach Inhalation, können die Beobachtungen von Baumgartner liefern. Er stellte fest, dass die Verteilung des Photosensibilisators in der Trachealschleimhaut unabhängig vom Atemzugvolumen und der Lungenfunktion ist. Speziell durchgeführte Atemübungen und -techniken nehmen keinen Einfluss auf die Verteilung von 5-ALA in der Bronchialschleimhaut (Baumgartner et al., 1996). Somit bietet das Inhalationsverfahren große Vorteile aufgrund seiner einfachen Durchführbarkeit, des geringen personellen Aufwands und einer zuverlässigen Verteilung des Photosensibilisators unabhängig von der Atemtechnik und Mitarbeit des Patienten.

### **5.2.2. Klinische Ergebnisse nach Mundspülung**

Nach Mundspülung mit 5-ALA zeigte sich in den hier untersuchten Fällen oftmals eine unzureichende Fluoreszenzdarstellung. Die Differenzierung und Abgrenzbarkeit des Tumors zum umliegenden Gewebe war teilweise nur schlecht möglich. Bei dem vorgestellten Patientenkollektiv handelte es sich überwiegend um Patienten mit bereits weit fortgeschrittenen Tumoren des Oropharynx. Nach Mundspülung mit 5-ALA erfolgt das Eindringen des Farbstoffs nur in die obersten Epithelschichten. Tiefere Schichten wurden mit zunehmender Tumordicke nicht ausreichend penetriert (Kennedy et al., 1996; Kriegmair et al., 1996; Grant et al., 1997). Folglich ist eine Erhöhung der, per Mundspülung, applizierten 5-ALA Dosis notwendig, was andererseits eine verstärkte Anfärbung der umgebenden gesunden Schleimhaut und damit Reduzierung des Kontrastes hervorrufen kann (Loh et al., 1993). Die Arbeitsgruppe um Leunig war hingegen mit den Dosierungen von 0,4 %iger 5-ALA hinsichtlich der Fluoreszenzdarstellung sehr zufrieden, was in den folgenden Abschnitten das Thema der Diskussion sein wird (Leunig et al., 2000). Alternativ bietet sich bei fortgeschrittenen oder exophytisch wachsenden Tumoren die systemische Applikation an (Kennedy et al., 1996).

Einen Nachteil der Methode stellt bei großen Tumoren die begrenzte Eindringtiefe des Anregungslichtes ins Gewebe dar. PPIX wird bei einer Wellenlänge von 400-410 nm optimal zur Fluoreszenz angeregt. Gleichzeitig dringt das Licht dieser Wellenlänge nur zwei Millimeter tief in das Gewebe ein und erreicht somit nur oberflächliche Hautschichten (Dougherty et al., 1998; Kriegmair et al., 1996; Van Hillegersberg et al., 1992; Kennedy et al., 1996). Diese Eigenschaft kann zur photodynamischen Diagnostik von kleinen oberflächlich wachsenden Frühkarzinomen ausgenutzt werden, ist jedoch bei großen fortgeschrittenen Tumoren von Nachteil.

Fortgeschrittene Karzinome der oberen Luft- und Speisewege weisen eine hohe Gewebefragilität und damit erhöhte Blutungsneigung auf. Trotz vorsichtiger Manipulation im Rahmen der Endoskopie ließen sich Blutungen nicht immer vermeiden, so dass eine



Fluoreszenzdarstellung nicht mehr möglich und ein Wechsel zur Weißlichtendoskopie notwendig war. Die Differenzierung des Tumors zu gesundem Gewebe mittels Fluoreszenzdiagnostik war durch die Überlagerung des Blutes und die Absorptionseigenschaften des Hämoglobin unmöglich. Das die Schleimhaut bedeckte Blut löscht die Fluoreszenz vollständig aus. Andere Arbeitsgruppen berichten ähnliche Erfahrungen (Leunig et al., 1996a; Lippert 2000). Ogasawara kommt zu dem Schluss, dass die systemisch-orale 5-ALA Applikation das am besten geeignete Verfahren zur Darstellung von Zungentumoren ist. Seine Beobachtungen beziehen sich jedoch auf tierexperimentelle Untersuchungen an Mäusen (Ogasawara et al., 2006).

Nichtsdestotrotz verzeichnen die Arbeitsgruppen um Schleier und Leunig sehr gute Ergebnisse mit der topischen Applikation von 5-ALA in Form einer Mundspüllösung (Schleier 2000; Leunig et al., 2000). Vor der Applikation von 5-ALA führte Schleier eine professionelle Mundreinigung durch, so dass eine sorgfältige Reinigung des Mundraums gewährleistet war. Die Spülung mit 5-ALA erfolgte anschließend unter Kontrolle über 20 min. Das Verfahren erreichte bei ihm eine Sensitivität von 96 % (Schleier 2000). Leunig beschrieb die quantitative Gewebefluoreszenzmessung bei bösartig veränderter Mundschleimhaut nach 15 minütiger 0,4 %iger 5-ALA Mundspülung. Nach histologischer Diagnosesicherung erreichte die Fluoreszenzdiagnostik eine Sensitivität von 99 % und Spezifität von 60 % (Leunig et al., 2000). Die unterschiedliche Dauer der Mundspülung (10 Minuten gegenüber 15 bzw. 20 Minuten) in den verschiedenen Arbeitsgruppen bietet eine mögliche Erklärung für die bessere Anreicherung von PPIX im Bereich der Mundschleimhaut, ebenso scheint die Durchführung einer professionellen Mundreinigung eine erhebliche Verbesserung der selektiven Anfärbung von Tumoren hervorzurufen (Schleier 2000).

Mit Hilfe der Fluoreszenz wurden Areale dargestellt, die unter Weißlichtbeobachtung unerkant geblieben wären. Für das Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis von Tumor zu gesundem Gewebe zeigten sich Werte von 12,5:1, so dass eine gute Darstellung mit 0,4 %iger 5-ALA erreicht wurde. Leunig konnte veränderte Schleimhautareale bei 13,8 % der Patienten alleine durch die Fluoreszenzdarstellung detektieren (Leunig et al., 2000).

Schleier fand in sieben von insgesamt 143 Fällen Malignome die ohne die Fluoreszenzendoskopie zu diesem Zeitpunkt nicht entdeckt worden wären. Er gab die Sensitivität der Methode mit 96% an (Schleier 2000).

Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten zeigten sich für verschiedene Gewebsarten. Besonders starke Fluoreszenz war am Zungenrücken, den gingivalen Plaques und an bakterienbesiedelten nekrotischen Tumoren nachzuweisen (Leunig et al., 2000; Klahr 2003). Bei zahlreichen anderen fluoreszierenden Arealen fand sich nach der histologischen Aufarbeitung kein Anhalt für Malignität. Diese falsch positiven Befunde konnten durch Nichteinhaltung der Nahrungskarenz, schlechte Mundhygiene, Veränderungen wegen einer laufenden oder abgeschlossenen Radiatio, Bakterien- und Pilzbesiedlung erklärt werden (Leunig et al., 1996b; Zenk et al., 1999; Leunig et al., 2000; Klahr 2003).

Durch die professionelle Mundreinigung wurde eine signifikante Reduktion der Bakterienfluoreszenz erreicht (Schleier 2000). Auch eine Bestrahlung des betroffenen Gebietes veränderte, unabhängig vom Intervall zwischen Bestrahlung und Untersuchung, das Gewebe so stark, dass es zu einer kräftigen PPIX-Fluoreszenz im gesamten Bestrahlungsfeld kam. Eine Differenzierung zwischen suspekten und gesunden Arealen war mittels Fluoreszenzendoskopie nicht möglich (Zenk et al., 1999; Leunig et al., 2000; Klahr 2003).

Während der Untersuchung berichteten einige Patienten über ein leichtes Kribbeln oder Brennen (Schleier 2000), was auf zytotoxische Reaktionen während der Lichtexposition zurückzuführen ist. Es kam allerdings zu keinen größeren Einschränkungen der Patienten, eine Behandlung war nicht notwendig. Nach Angaben von Leunig beklagt keiner der behandelten Patienten Nebenwirkungen, weder in Form von Photosensibilität noch von Zeichen einer systemischen Resorption (Leunig et al., 2000).

In der Literatur finden sich übereinstimmende Angaben, dass die Applikation von niedrigdosiertem 5-ALA bis zu einer Dosis von 20 mg/ kg KG ohne das Auftreten von Nebenwirkungen erfolgen kann. Bei Verabreichung höherer systemischer Dosen ist mit

dem Auftreten von Nebenwirkungen zu rechnen (Rick et al., 1997; Vaidyanathan et al., 2000; Mlkvy et al., 1995a und 1995b; Regula et al., 1995; Webber et al., 1997; Ackroyd et al., 1999).

Schleier und Leunig kommen zu der Schlussfolgerung, dass die Früherkennung von Mundhöhlenkarzinomen mit der 5-ALA-induzierten Fluoreszenzdiagnostik einfach realisierbar und der reinen Weißlichtendoskopie überlegen ist. Die lokale Applikation ist gegenüber der systemischen Applikation nebenwirkungsfrei und ermöglicht den frühzeitigen Nachweis von malignen Veränderungen und Zweitkarzinomen in der Mundhöhle. Weiterer Vorteile liegen in der Möglichkeit zur genauen Bestimmung der Tumorränder und der guten Anwendbarkeit in der ambulanten Patientenbetreuung als nichtinvasive Methode. Insbesondere als Screening-Methode wird die Fluoreszenzdiagnostik empfohlen (Schleier, 2000; Leunig et al., 2000).

Zur Verbesserung der Sensitivität der Methode wird eine professionelle Zahn- und Mundreinigung empfohlen, da hierdurch Störfaktoren, wie Bakterien reduziert werden können (Schleier 2000). Die Durchführung weiterer klinischer Studien ist notwendig, damit qualitativ hochwertige Studien den Nutzen des Verfahrens beweisen und die Akzeptanz der 5-ALA-induzierten Fluoreszenzdiagnostik steigern.

### **5.3. Optimierung der Methode**

Aufgrund der eigenen Erfahrungen wird die Inhalation von 5-ALA als besonders geeignetes Verfahren zur Darstellung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich angesehen. Die einfache Applikation über einen Vernebler und die nachgewiesenen Unabhängigkeit von Atemzugvolumen und Lungenfunktion des Patienten (Baumgartner et al., 1996) machen eine standardisierte Applikation möglich. Veränderungen im Bereich der oberen Luftwege sind sehr gut über die lokale Applikation erreichbar. Nebenwirkungen sind aufgrund der schnellen Elimination nicht zu beobachten (Kennedy et al., 1990). Zur Darstellung kommen ebenso primär gutartige Papillomen, da diese Zellen eine hohe Proliferationsrate aufweisen, wie auch Frühstadien von Plattenepithelkarzinomen, Carcinoma *in situ* oder

Präkanzerosen. Sie werden aufgrund der hohen Selektivität von 5-ALA auf epitheliale Zellen und der direkten Penetration des Photosensibilisators über die Schleimhaut dargestellt. Besonders kleine in der Weißlichtendoskopie nicht darstellbare Ausläufer von Papillomen sowie frühe epitheliale Veränderungen der Schleimhaut können durch die charakteristische Fluoreszenz aufgefunden werden (Gillenwater et al., 1998; Arens et al., 1999; Kennedy et al., 1990; Zargi et al., 2000; Lippert 2001; Leunig et al., 2002; Arens et al., 2007; Hautmann et al., 2007).

Mehlmann und Mitarbeiter berichten hingegen von einer inhomogenen Verteilung der Fluoreszenz im Larynx nach Inhalation von 5-ALA, die zu falsch-positiven und falsch-negativen Befunden, führte. Eine Verbesserung der Anfärbung konnte durch intermittierende Vokalisationen während der Inhalation erzielt werden. Dieses Applikationsschema hatte in vorangegangenen Studien zu einer Maximierung der im Larynx angereicherten Aerosolmenge nach Inhalation geführt (Mehlmann et al., 1999).

Im Vergleich zu den bereits erwähnten Untersuchungen von Baumgartner (Baumgartner et al., 1996) über die Unabhängigkeit von Lungenfunktion und Atemzugvolumen gegenüber der, über die tracheobronchiale Schleimhaut aufgenommenen, 5-ALA Menge stellt sich erneut die Frage welchen Einfluss unterschiedliche Applikationsschema auf die Verteilung und Aufnahme von 5-ALA haben. Zu berücksichtigen ist die von Mehlmann gewählte, sehr niedrig dosierte Dosierung von nur 30 mg 5-ALA, die ebenfalls für die ungleiche Fluoreszenzintensität und Anreicherung verantwortlich sein könnte. Trotz dieser vergleichsweise geringen Dosierung berichtet er jedoch über gute Ergebnisse bezüglich der Abgrenzbarkeit von Tumoren zu gesunder Schleimhaut. Nach histologischer Untersuchung der Gewebeproben stellten sich für die Fluoreszenzdiagnostik eine Spezifität von 80 % und eine Sensitivität von 95 % ein (Mehlmann et al., 1999).

Die Arbeitsgruppen um Wang und Loh vermuten einen Schwellenwert, der überschritten werden muss, damit PPIX überhaupt in gesunden Zellen gebildet wird (Loh et al., 1993; Wang et al., 1999). Sollte sich diese Vermutung bestätigen könnte die Gabe von 5-ALA weiter reduziert werden, so dass lediglich eine PPIX Akkumulation in maligne

transformierten Zellen stattfindet und es in gesunden Zellen zu keiner Anreicherung kommt. Diese Vermutung von Wang könnte die Ergebnisse von Baumgartner mit der geringen Dosierung von 5-ALA und trotzdem guter Anreicherung im Larynx erklären.

Die Möglichkeit zur weiteren Reduzierung der Dosis bestätigten Wang und Mitarbeiter 1999 mit einer Studie über die Gabe von 5 oder 15 mg 5-ALA/kg KG und der daraus resultierenden Gewebefluoreszenz. Beobachtet wurde die Abhängigkeit der PPIX Anreicherung von der applizierten Dosis. Die Fluoreszenzintensität in normalen Zellen stieg und fiel proportional zur 5-ALA Dosierung. Maximale Anreicherungswerte von PPIX erreichte gesundes Gewebe 3-4 Stunden nach Applikation, wohingegen maligne Zellen eine frühere Anreicherung von PPIX zeigten. In Tumorgewebe zeigte sich eine schnelle Abnahme der Gewebefluoreszenz, die nach 24 Stunden kaum mehr nachzuweisen war. Wang stellte auch die unterschiedlich gute Darstellung von Tumoren in Abhängigkeit von ihrem Keratingerüst fest. So zeigte nicht keratinisiertes Plattenepithel der bukkalen und nasalen Schleimhaut eine stärkere Anreicherung von PPIX als keratinisiertes Epithel der Haut. Das von den Tumorzellen emittierte Fluoreszenzlicht wird durch die überlagernde Schicht der Keratinozyten absorbiert und verliert dadurch an Intensität. Eine Manifestation von Nebenwirkungen in Form einer Photosensibilisierung der Haut trat bei keinem der untersuchten Patienten auf. Beide Dosierungen ermöglichten eine gute und ausreichende klinische Darstellung epithelialer Veränderungen im Kopf-Hals-Bereich (Loh et al., 1993; Wang et al., 1999).

Rick führte mit seinen Mitarbeitern spektroskopische und pharmakokinetische Untersuchungen zu unterschiedlichen Applikationsformen von 5-ALA durch. Dabei konnten sie unterschiedliche Plasmakonzentrationen von PPIX nach oraler (40 mg/kg KG) und inhalativer (500 mg) Gabe von 5-ALA nachweisen. Trotz unterschiedlicher PPIX-Plasmawerte zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich des Kontrastes zwischen den fluoreszierenden Tumorealen und normaler Haut. Bezüglich einer besseren Fluoreszenzdarstellung und Kontrastierung von Tumorgewebe ergab sich hieraus keine Überlegenheit der systemischen Applikation (Rick et al., 1997). Es steht die Vermutung nahe, dass selbst geringe Dosen von 5-ALA ausreichen, um gute Fluoreszenzdarstellungen

zu erreichen. Weitere Bemühungen sollten auf die Klärung der Zusammenhänge zwischen applizierter Dosis und Verhältnis der PPIX Fluoreszenz zwischen Tumor- und Normalgewebe zielen.

Es bleibt zu diskutieren inwiefern die, für den diagnostischen Einsatz, notwendige 5-ALA Dosis verringert und trotzdem ein zufriedenstellendes und zuverlässiges Ergebnisse erreicht werden kann. Zwischen den von Mehlmann empfohlenen und in den eigenen Untersuchungen verwandten und als unbedenklich eingestuften Dosierungen besteht ein großer Spielraum, der zur Anpassung der diagnostisch erforderlichen Dosis ausgenutzt werden sollte.

Die Anpassung der Dosierung muss ebenfalls für die systemische Applikation überdacht werden. Im Ergebnisteil dieser Arbeit wird die Elimination von 20 mg 5-ALA/kg KG innerhalb von 36 Stunden bestätigt, ohne dass Nebenwirkungen zu erwarten sind. Während der fluoreszenzendoskopischen Untersuchung entstand jedoch auch der Eindruck, dass „zu viel“ Fluoreszenz vorhanden war und eine Differenzierung zwischen Tumor und gesunder Schleimhaut nicht mehr möglich war. Auch dieses Phänomen könnte durch das Vorhandensein eines Schwellenwertes erklärt werden (Loh et al., 1993; Wang et al., 1999).

#### **5.4. Nebenwirkungen**

Keiner der untersuchten Patienten berichtete über Nebenwirkungen in Form von Übelkeit, Erbrechen, erhöhter Photosensibilität oder Kopfschmerz, was auch als Bestätigung einer schnellen Elimination der 5-ALA Abbauprodukte gesehen werden kann. Diese klinischen Beobachtungen stehen im Einklang mit den quantitativen Bestimmungen der Porphyrine und deren Vorstufen nach topischer und systemischer Applikation.

Andere Arbeitsgruppen berichten hingegen von Nebenwirkungen nach systemischer Applikation von 5-ALA (Rick et al., 1997; Webber et al., 1997; Ackroyd et al., 1999; Vaidyanathan et al., 2000). Die verabreichten Dosierungen lagen jedoch über 20 mg/kg KG. Die Gruppe von Ackroyd applizierte 50 mg/kg KG auf oralem Weg, was

Nebenwirkungen in Form von Krankheitsgefühl, Kopfschmerz, Photosensitivität, Alopezie, zeitweilige Leberfunktionsstörung, Übelkeit und Erbrechen hervorrief. Demgegenüber zeigte eine Verringerung der Dosis auf 30 mg/kg KG eine geringere Hepatotoxizität und weniger Nebenwirkungen (Ackroyd et al., 1999).

Rick applizierte 40 mg/kg KG 5-ALA und berichtete über Nebenwirkungen in Form von Übelkeit und Erbrechen an zwei Patienten, die jedoch auch eine erhöhte Morbidität aufwiesen (Rick et al., 1997). Webber behandelte hingegen vier Patienten mit 60 mg/kg KG 5-ALA, ohne dass Nebenwirkungen auftraten (Webber et al., 1997). In einer tierexperimentellen Studie an Hunden wurden Nebenwirkungen in Abhängigkeit von der Dosierung beobachtet. Dabei traten Nebenwirkungen in Form von Erbrechen ab einer Dosis über 5 mg/kg KG 5-ALA auf. Die Häufigkeit der Erbrechens stieg proportional zur Steigerung der Dosis (Vaidyanathan et al., 2000).

Kritisch anzumerken bleibt bei der vorgestellten Untersuchung die jeweils geringe Fallzahl pro Applikationsgruppe sowie das Fehlen eines standardisierten Verfahrens und festgelegten Zeitraums zur Erfassung von Nebenwirkungen. Die gleichzeitige Kontrolle der Nieren- und Leberwerte im Blut sollte in zukünftige Untersuchungen einbezogen werden, so dass Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit von Leber und Niere gezogen werden können.

## **5.5. Ausblick**

Die 5-ALA induzierte Fluoreszenzdiagnostik hat sich als effektives Hilfsmittel zur konventionellen Weißlichtendoskopie und Biopsieentnahme herausgestellt. Epitheliale Veränderungen können durch die selektive Anreicherung von PPIX frühzeitiger dargestellt und zu gesundem Gewebe besser abgegrenzt werden. Hierdurch wird einerseits die Früherkennung von Veränderungen im Schleimhautniveau, die makroskopisch noch nicht sichtbar sind, ermöglicht. Andererseits dient die charakteristische Fluoreszenz dem

Untersucher als Hilfsmittel für die Biopsieentnahme und zur Festlegung von Tumorresektionsgrenzen. Die Anzahl der notwendigen Biopsien zur Diagnosestellung kann wesentlich verringert und aufgrund des früheren Diagnosezeitpunktes können die Therapiemaßnahmen früher eingeleitet werden.

Ein großer Vorteil der 5-ALA Fluoreszenzdiagnostik liegt in der Wahl verschiedener Applikationsformen, topisch oder systemisch, und kann abhängig von der Lokalisation des Tumors ausgewählt werden. Dosierungen in Höhe von 200-250 mg für die topische Anwendung und 20 mg/kg KG für die Systemische können im Hinblick auf eine zügige Elimination aus dem Körper unbedenklich angewandt werden. Spätestens nach 36 Stunden sind keine 5-ALA Abbauprodukte im Urin oder Blut mehr nachweisbar. Nebenwirkungen in Form einer anhaltenden Sensibilisierung der Haut, Übelkeit oder Erbrechen können nach topischer und niedrigdosierter systemischer Applikation ausgeschlossen werden.

Die klinischen Ergebnisse der topischen Anwendung in den Bereichen Urologie, Dermatologie, Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde und Pulmologie sind hervorragend und als Früherkennungsverfahren für Harnblasenkarzinome und oberflächliche Hautveränderungen bereits klinisch etabliert. Die Anerkennung des Verfahrens als anerkannte Screeningmethode in weiteren Disziplinen bleibt zu hoffen. Weiterführende klinische Studien sind hierzu erforderlich.

#### **5.5.1. Langzeitschäden**

Das Auftreten von Langzeitschäden, die durch die Verabreichung von 5-ALA möglicherweise induziert werden, bleibt weiterhin zu klären. Durch die Anregung von PPIX zur Fluoreszenz werden zytotoxische Reaktionen in Gang gesetzt, die einerseits in Form der PDT genutzt werden, andererseits Schäden auf zellulärer Ebene hervorrufen können, deren Konsequenz abgeschätzt und auf ihr karzinogenes Potential untersucht werden müssen. Gerade der vielversprechende Einsatz von 5-ALA zur PDT macht weitere



Untersuchungen über die Langzeiteffekte und eine mögliche Karzinominduktion notwendig.

Erste tierexperimentelle Studien über das karzinogene Potential von 5-ALA berichten, dass die topische Applikation von 5-ALA kein erhöhtes Risiko für Hautkrebs bei Mäusen induziert. Untersuchungen an Patienten mit erhöhten 5-ALA Gewebekonzentrationen, wie bei der Porphyrria cutanea tarda oder der kongenitalen erythropoetischen Porphyrrie, zeigen, dass diese Patienten ein generell erhöhtes Risiko für die Entstehung von Tumoren aufweisen. Die kausalen Zusammenhänge hierfür sind noch nicht geklärt. Es findet sich in der Literatur bisher kein Nachweis für eine erhöhte Inzidenz für Hautmalignome bei diesen Patienten. Die momentan vorliegenden Daten gehen von einem niedrigen Risiko zur Entstehung von Zweitkarzinomen der Haut nach topischer 5-ALA PDT aus (Fuchs et al., 2000).

Zenzen und Zankel untersuchten 2004 das zytotoxische und mutagene Potential von 5-ALA-Hexylester im Rahmen einer *in vitro* Studie an Tumorzelllinien. 5-ALA-Hexylester ist deutlich lipophiler als reine 5-ALA und weist eine verbesserte Membranpermeabilität auf, so dass höhere intrazelluläre Konzentrationen von 5-ALA erreicht werden. Gemessen wurde der, durch die PDT hervorgerufene, zytotoxische Effekt unter Errechnung des Mitotischen- und Zellkernteilungs-Index. Ebenso erfasste man Chromosomenaberrationen und Mikronuklei. Ein mutagenes Potential konnte im Rahmen dieser Untersuchung für 5-ALA-Hydroxylester ausgeschlossen werden (Zenzen et al., 2004). Mit dieser Arbeit übereinstimmend, legten Chu und Mitarbeiter im Jahr 2006 weitere Ergebnisse bezüglich der Genotoxizität von 5-ALA vor. Ein genotoxisches Potential von 5-ALA-Hexylester für Lymphozyten konnte in der Dosierung 10  $\mu$ M ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu wurde die Genotoxizität von 5-ALA in einer Konzentration von 0,75 mM für Lymphozyten als hoch eingeschätzt (Chu et al., 2006).

Weiterführende Studien zur Geno- und Zytotoxizität von 5-ALA in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen sind zur Abschätzung von Langzeitschäden und für die

weitere Zulassung von 5-ALA, insbesondere zu therapeutischen Zwecken, dringend erforderlich.

### **5.5.2. Photodynamische Diagnostik als Screeningverfahren**

Die einfache Handhabung der Geräte, die unkomplizierte Applikation des Photosensibilisators und die niedrige Nebenwirkungsrate ermöglichen die Durchführung der 5-ALA Fluoreszenzdiagnostik im ambulanten Bereich. Patienten mit dem Verdacht auf eine maligne Veränderung im Kopf-Hals-Bereich sowie Patienten in der Tumornachsorge oder mit erhöhtem Zweitkarzinomrisiko können ohne entscheidenden Mehraufwand fluoreszenzendoskopisch untersucht werden. Die charakteristische Rotfluoreszenz von veränderten Zellen ermöglicht ein gutes Auffinden im Kontrast zur blauen Fluoreszenz des umgebenden gesunden Epithels. Einige Berichte über die ambulante Durchführung der Fluoreszenzdiagnostik existieren bereits und zeigen sehr gute, erfolgversprechende Ergebnisse (Vermylen et al., 1999; Leunig et al., 2000 und 2002; Schleier 2000; Arens et al., 2007).

Anzustreben ist die Einführung der Fluoreszenzendoskopie als Standardverfahren in Kombination mit der Weißlichtendoskopie (Arens 2004; Hungerhuber et al., 2007). In der Urologie ist die 5-ALA induzierte Fluoreszenzzystoskopie als klinisches Verfahren etabliert. Das Präparat HEXVIX<sup>®</sup> wurde 2006 für die Fluoreszenzzystoskopie bei Verdacht auf Harnblasenkarzinomen in Deutschland zugelassen.

Speziell für Patienten mit einem CUP-Syndrom hat die Weiterentwicklung und Einführung der Fluoreszenzdiagnostik in die Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde eine besondere Bedeutung. Die systemische Applikation von 5-ALA bietet die Möglichkeit zur Inspektion des gesamten Aerodigestivtraktes zunächst unter Weiß- und anschließend unter Blaulicht. Durch die systemische Gabe kann eine gleichmäßige Verteilung des Photosensibilisators und die selektive Darstellung von maligne veränderten Zellen der Schleimhaut angenommen werden. Bereits frühe Veränderungen in Form mäßiger und schwerer Dysplasien, Carcinoma *in situ* und maligne transformierte Zellen im Schleimhautniveau,

die makroskopisch nicht sichtbar sind, könnten durch die PPIX-Fluoreszenz diagnostiziert werden. Der Zeitraum bis zur Sicherung der Diagnose und das Auffinden des Primarius könnte erheblich verkürzt werden.

Die Effektivität von 5-ALA und 5-ALA-Hexylester im Rahmen der PDT bei Nasopharynxkarzinomen wurde durch *in vitro* Studien bereits gezeigt (Betz et al., 2002a; Wu et al., 2006). Weitere Untersuchungen zur *in vivo* Anwendung am Tiermodell und Menschen stehen noch aus.

### **5.5.3. Therapeutische Optionen**

Durch die Fluoreszenzmarkierung maligner Zellen ist eine deutlichere Abgrenzung der Tumorränder zum umliegenden gesunden Gewebe möglich. Die Kombination der Fluoreszenzdarstellung mit der laserchirurgischen Resektion des Tumors bietet die Möglichkeit zur intraoperativen Kontrolle der Resektionsränder auf Tumorfreiheit. Durch das gleichzeitige Schneiden und Koagulieren im Operationsgebiet können größere Blutungen vermieden werden. Die Fluoreszenzendoskopie ist somit auch nach Entfernung des Tumors zur Kontrolle der Resektionsränder möglich. Hiermit steigt intraoperativ die Wahrscheinlichkeit für eine R<sub>0</sub>-Resektion.

5-ALA bietet nicht nur für diagnostische Zwecke gute Anwendungsmöglichkeiten, sondern auch im therapeutischen Bereich liefert die PDT mit 5-ALA sehr zufriedenstellende Ergebnisse. Vorteile liegen hier ebenfalls in der hohen Selektivität von 5-ALA an Tumorzellen, der nebenwirkungsarmen Anwendung und der einfachen Durchführung. Zeitgleich mit der Anregung zur Fluoreszenz werden zytotoxische Reaktionen in Gang gesetzt, so dass es zur Zerstörung der Zelle kommt.

Ein großes Potential der PDT bei fortgeschrittenen Tumorstadien im Kopf-Hals-Bereich liegt im therapeutischen Bereich, wenn etablierte Verfahren wie die chirurgische Resektion, Radio- oder Chemotherapie nicht mehr in Frage kommen (Lorenz et al., 2008). Für die betroffenen Patienten kann die PDT mit 5-ALA eine zusätzliche Therapieoption darstellen.

Fortgeschrittene Tumoren, können im Sinne eines Debulking reduziert werden, kleinere Tumoren mit einer verminderten Morbidität und funktionellen Einschränkung für den Patienten behandelt werden (Jerjes et al., 2007). Gerade multimorbide und ältere Patienten könnten von der geringeren Morbidität und dem höheren Funktionserhalt profitieren. Auch im Falle eines Rezidivkarzinoms kann die PDT mit 5-ALA eine letzte Therapieoption darstellen, wenn andere Verfahren wie die chirurgische Resektion und Radiatio bereits ausgeschöpft sind. Hinsichtlich der Langzeitergebnisse fehlen bisher noch aussagekräftige Untersuchungen, die Effizienz der Methode muss in klinischen Studien überprüft werden.

In der Dermatologie zeigen sich gute und etablierte Einsatzmöglichkeiten für 5-ALA. Die photodynamische Therapie eignet sich besonders zur Behandlung von Krebsvorstufen, wie der aktinischen Keratose, oberflächlichen und dünnen nodulären Basalzellkarzinomen und Morbus Bowen (Braathen et al., 2007; De Haas et al., 2007). Für diese Indikationen existiert eine Zulassung für 5-ALA in Deutschland, Kanada und den USA. Zahlreiche andere Krankheiten auf dem Gebiet des Dermatologie und Gynäkologie könnten ebenfalls mit 5-ALA effektiv behandelt werden (Olejek et al., 2004; Braathen et al., 2007). Der wissenschaftliche Wirkungsnachweis für diese Anwendungen steht noch aus.

## 6. Zusammenfassung

Bösartige Tumoren im Kopf-Hals-Bereich stehen in Deutschland an siebter Stelle der jährlichen Krebsneuerkrankungsrate. Trotz Weiterentwicklung der diagnostischen und therapeutischen Methoden bleiben die Langzeitüberlebensraten über die letzten Jahrzehnte unverändert. Eine zufriedenstellende Behandlung und Verbesserung der Prognose ist durch die Entwicklung effektiver Methoden zur Früherkennung möglich. Ein neues, diagnostisch und therapeutisch anwendbares, Verfahren ist die 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) induzierte Fluoreszenzendoskopie. 5-ALA ist eine körpereigene Substanz, die zur Synthese des roten Blutfarbstoffes Häm notwendig ist. Als Zwischenprodukt der Häm-Synthese entsteht Protoporphyrin IX, das die Eigenschaft der Fluoreszenz besitzt und selektiv in Tumorzellen anreichert. In Deutschland ist die 5-ALA Fluoreszenzdiagnostik zur Detektion von Harnblasenkarzinomen und zur Behandlung oberflächlicher Hauttumoren und Präkanzerosen klinisch zugelassen. Weitere diagnostische und therapeutische Anwendungen werden im Rahmen klinischer Studien geprüft.

Ziel dieser Arbeit war es Stoffwechselprodukte von 5-ALA qualitativ und quantitativ in Urin und Blutplasma nachzuweisen, um Rückschlüsse auf eine mögliche Akkumulation zu ziehen. Ein besonderes Augenmerk wurde auf pharmakokinetische Unterschiede zwischen topischer und systemischer Applikation gerichtet.

Von Februar bis August 2000 wurden 66 Patienten unter dem Verdacht eines Malignoms im Hals-Kopf-Bereich mikrolaryngoskopisch untersucht. Präoperativ wurde 5-ALA inhalativ (250 mg), als Mundspülung (200 mg) oder systemisch (20 mg/kg KG) verabreicht. Postoperativ wurden Urin- und Plasmaproben gesammelt. Die biochemische Analytik erfolgte durch das Zentrallaboratorium der Klinischen Chemie, Universität Marburg.

Die Urinwerte für ALA, PBG und GESAMT lagen nach topischer Applikation überwiegend bereits nach 12 Stunden, spätestens nach 36 Stunden im Normbereich. Nach systemischer Applikation überschritten alle nachgewiesenen Metabolite den oberen Normgrenzwert um ein Vielfaches, nach 36 Stunden waren nur noch URO und KOPRO

leichtgradig erhöht. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden topischen Verfahren traten nicht auf. Zwischen Mundspülung und systemischer Gabe zeigten sich signifikante Unterschiede für den Zeitpunkt 1, höchst signifikante Unterschiede zwischen der systemischen Applikation und Inhalation waren zu beiden Zeitpunkten nachweisbar. Im Blutplasma lag der Porphyrinwert bereits 12 Stunden nach 5-ALA Gabe, unabhängig vom Applikationsverfahren, im Normbereich. Eine Akkumulation von 5-ALA Abbauprodukten konnte ausgeschlossen werden, Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet.

In Übereinstimmung mit anderen Autoren zeigte sich, dass die topische Applikation von 5-ALA in Höhe von 200 mg bis 250 mg, sowie die systemische Applikation von 20 mg/kg KG zu keiner langfristigen Anreicherung von Porphyrinen oder deren Vorstufen im Plasma und Urin führt. Es bleibt unklar, inwiefern renale oder hepatische Stoffwechselstörungen den 5-ALA Abbau beeinflussen. Nebenwirkungen in Form von Erbrechen zeigten sich in tierexperimentellen Untersuchungen ab einer Dosis von 25 mg/kg KG mit einer Steigerung der Häufigkeit direkt proportional zur Erhöhung der Dosis bis auf 100 mg/kg KG. Ein direkter Zusammenhang zwischen Dosis und Nebenwirkungen scheint zu bestehen, weiterführende Untersuchungen sind erforderlich. Aus pharmakokinetischer Sicht stehen beide topische Verfahren gleichwertig nebeneinander. Unterschiede bestehen hinsichtlich der klinischen Anwendbarkeit. Die Inhalation bietet den Vorteil der, von Atemzug und Lungenfunktion unabhängigen, gleichmäßigen Verteilung des Photosensibilisators in der Trachealschleimhaut. Zur Verbesserung der Ergebnisse nach Mundspülung ist eine professionelle Mundreinigung zur Verringerung der oralen Bakterienzahl empfehlenswert. Weitere Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen applizierter Dosis und Verhältnis der PPIX Fluoreszenz in Tumor- und Normalgewebe sind nötig, um eine Optimierung der diagnostisch und therapeutisch notwendigen Dosierung voranzutreiben. Ebenso sind Studien über die Induktion von Langzeitschäden unerlässlich, da einerseits der zytotoxische Effekt der PPIX-Fluoreszenz, im Rahmen der PDT, zur Zerstörung von Krebszellen eingesetzt wird, andererseits das Risiko von Langzeitschäden zuverlässig abgeschätzt werden muss.

## 7. Literatur

- Ackroyd R, Brown N, Vernon D, Roberts D, Stephenson T, Marcus S, Stoddard C, Reed M: 5-Aminolevulinic acid photosensitization of dysplastic Barrett's esophagus: a pharmacokinetic study. *Photochem Photobiol* (1999); 70: 656-662
- Arens C, Malzahn K, Dias O, Andrea M, Glanz H: Endoscopic imaging techniques in the diagnosis of laryngeal carcinoma and its precursor lesions. *Laryngorhinootologie* (1999); 78: 685-691
- Arens C: Early diagnosis of laryngeal cancer. *Laryngorhinootologie* (2004); 83: 768-770
- Arens C, Reussner D, Woenkhaus J, Leunig A, Betz CS, Glanz H: Indirect fluorescence laryngoscopy in the diagnosis of precancerous and cancerous laryngeal lesions. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2007); 264: 621-626
- Auler H, Banzer G: Untersuchung über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Z Krebsforschung* (1942): 65-68
- Baumgartner R, Huber RM, Schulz H, Stepp H, Rick K, Gamarra F, Leberig A, Roth C: Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer. *J Photochem Photobiol B* (1996); 36: 169-174
- Betz CS, Lai JP, Xiang W, Janda P, Heinrich P, Stepp H, Baumgartner R, Leunig A: In vitro photodynamic therapy of nasopharyngeal carcinoma using 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol Sci* (2002a); 1: 315-319
- Betz CS, Stepp H, Janda P, Arbogast S, Grevers G, Baumgartner R, Leunig A: A comparative study of normal inspection, autofluorescence and 5-ALA-induced PPIX fluorescence for oral cancer diagnosis. *Int J Cancer* (2002b); 97: 245-252
- Braathen LR, Szeimies RM, Basset-Seguín N, Bissonnette R, Foley P, Pariser D, Roelandts R, Wennberg AM, Morton CA: Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. *International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005. J Am Acad Dermatol* (2007); 56: 125-143
- Casas A, Fukuda H, Batlle AM: Tissue distribution and kinetics of endogenous porphyrins synthesized after topical application of ALA in different vehicles. *Br J Cancer*

- (1999); 81: 13-18
- Chu ES, Wu RW, Yow CM, Wong TK, Chen JY: The cytotoxic and genotoxic potential of 5-aminolevulinic acid on lymphocytes: a comet assay study. *Cancer Chemother Pharmacol* (2006); 58: 408-414
- Csanady M, Kiss JG, Ivan L, Jori J, Czigner J: ALA (5-aminolevulinic acid)-induced protoporphyrin IX fluorescence in the endoscopic diagnostic and control of pharyngo-laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2004); 261: 262-266
- De Haas ER, de Vijlder HC, Sterenborg HJ, Neumann HA, Robinson DJ: Fractionated aminolevulinic acid-photodynamic therapy provides additional evidence for the use of PDT for non-melanoma skin cancer. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (2007)
- Dhooge IJ, De Vos M, Albers FW, Van Cauwenberge PB: Panendoscopy as a screening procedure for simultaneous primary tumors in head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (1996); 253: 319-324
- Dietz A: Epidemiology of laryngeal cancer. *Laryngorhinootologie* (2004); 83: 771-772
- Doss M: Porphyrins and Porphyrin Precursors. In: *Clinical Biochemistry - principles and methods* (1974); Editors: H. Ch. Curtis; M. Roth: 1323-1371
- Doss M: Classification of porphyrias and secondary coproporphyrinurias. In: Strik, J and Koeman, J H (Hrsg): *Chemical porphyrias in man*, Elsevier, Amsterdam (1979): 223
- Doss M: Krankheiten und Störungen der Porphyrin- und Hämsynthese. In: *Lehrbuch der Inneren Medizin*, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York (1987): 849-862
- Dougherty TJ: Photoradiation therapy. In: *Abstract of the American Chemical Society Meeting*; (1973)
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q: Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* (1998); 90: 889-905
- Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Muller-Richter U, Kosmehl H, Reichert TE: Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *J Dtsch Dermatol Ges* (2007); 5: 1095-1100
- Dunn RJ, Devine KD: Tetracycline-induced fluorescence of laryngeal, pharyngeal, and oral cancer. *Laryngoscope* (1972); 82: 189-198
- Egger NG, Motamedi M, Pow-Sang M, Orihuela E, Anderson KE: Accumulation of



- porphyrins in plasma and tissues of dogs after delta-aminolevulinic acid administration: implications for photodynamic therapy. *Pharmacology* (1996); 52: 362-370
- Epstein JB, Scully C, Spinelli J: Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. *J Oral Pathol Med* (1992); 21: 160-163
- Epstein JB, Sciubba J, Silverman S Jr., Sroussi HY: Utility of toluidine blue in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma: continuing research and implications for clinical practice. *Head Neck* (2007); 29: 948-958
- Fritsch C, Verwohlt B, Bolsen K, Ruzicka T, Goerz G: Influence of topical photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid on porphyrin metabolism. *Arch Dermatol Res* (1996); 288: 517-521
- Fuchs J, Weber S, Kaufmann R: Genotoxic potential of porphyrin type photosensitizers with particular emphasis on 5-aminolevulinic acid: implications for clinical photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med* (2000); 28: 537-548
- Gillenwater A, Jacob R, Richards-Kortum R: Fluorescence spectroscopy: a technique with potential to improve the early detection of aerodigestive tract neoplasia. *Head Neck* (1998); 20: 556-562
- Grant WE, Speight PM, Hopper C, Bown SG: Photodynamic therapy: an effective, but non-selective treatment for superficial cancers of the oral cavity. *Int J Cancer* (1997); 71: 937-942
- Haughey BH, Gates GA, Arfken CL, Harvey J: Meta-analysis of second malignant tumors in head and neck cancer: the case for an endoscopic screening protocol. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (1992); 101: 105-112
- Hautmann H, Pichler JP, Stepp H, Baumgartner R, Gamarra F, Huber RM: In-vivo kinetics of inhaled 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in bronchial tissue. *Respir Res* (2007); 8: 33
- Hungerhuber E, Stepp H, Kriegmair M, Stief C, Hofstetter A, Hartmann A, Knuechel R, Karl A, Tritschler S, Zaak D: Seven years' experience with 5-aminolevulinic acid in detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* (2007); 69: 260-264
- Jerjes W, Upile T, Betz CS, El Maaytah M, Abbas S, Wright A, Hopper C: The application

- of photodynamic therapy in the head and neck. *Dent Update* (2007); 34: 478-480, 483-474, 486
- Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC: Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B* (1990); 6: 143-148
- Kennedy JC, Marcus SL, Pottier RH: Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results. *J Clin Laser Med Surg* (1996); 14: 289-304
- Klahr N: Protoporphyrin IX Fluoreszenz nach topischer 5-ALA Applikation: klinische Evaluation eines neuen Diagnoseverfahrens für Kopf-Hals Karzinome. Dissertation, Marburg (2003)
- Kowalski LP, Carvalho AL: Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. *Oral Oncol* (2001); 37: 94-98
- Kriegmair M, Baumgartner R, Knuchel R, Stepp H, Hofstadter F, Hofstetter A: Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence. *J Urol* (1996); 155: 105-109; discussion 109-110
- Kuhnel A, Gross U, Doss MO: Hereditary coproporphyrin in Germany: clinical-biochemical studies in 53 patients. *Clin Biochem* (2000); 33: 465-473
- Langer S, Abels C, Botzlar A, Pahernik S, Rick K, Szeimies RM, Goetz AE: Active and higher intracellular uptake of 5-aminolevulinic acid in tumors may be inhibited by glycine. *J Invest Dermatol* (1999); 112: 723-728
- Leonard JR, Beck WL: Hematoporphyrin fluorescence: an aid in diagnosis of malignant neoplasms. *Laryngoscope* (1971); 81: 365-372
- Leunig A, Rick K, Stepp H, Goetz A, Baumgartner R, Feyh J: Photodynamic diagnosis of neoplasms of the mouth cavity after local administration of 5-aminolevulinic acid. *Laryngorhinotologie* (1996a); 75: 459-464
- Leunig A, Rick K, Stepp H, Gutmann R, Alwin G, Baumgartner R, Feyh J: Fluorescence imaging and spectroscopy of 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX for the detection of neoplastic lesions in the oral cavity. *Am J Surg* (1996b); 172: 674-677

- Leunig A, Betz CS, Mehlmann M, Stepp H, Arbogast S, Grevers G, Baumgartner R: Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence. *Laryngoscope* (2000); 110: 78-83
- Leunig A, Betz CS, Heinrich P, Janda P, Baumgartner R: Fluorescence staining of oral and laryngeal cancer after application of 5-aminolevulinic acid. *Laryngorhinotologie* (2002); 81: 807-814
- Lippert BM, Kùlkens C, Klahr, N, Folz, BJ, Werner, JA: 5-Delta Aminolävulinsäure induzierte Fluoreszenzdiagnostik bei Karzinomen der oberen Luft- und Speisewegeerste Ergebnisse. In: Lippert, B.M., Schmidt, S., Werner, J.A. (Hrsg.): Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie. Shaker Verlag, Aachen (2000), S.: 65-73
- Lippert BM, Folz BJ, Kùlkens C, Werner JA: 5-ALA induzierte Fluoreszenzendoskopie zur Diagnostik der rezidivierenden Papillome des oberen Aerodigestivtraktes. *Endoskopie heute* (2001); 14: 49
- Lippert BM, Gross U, Klein M, Kùlkens C, Klahr N, Brossmann P, Teymoortash A, Ney M, Doss MO, Werner JA: Excretion measurement of porphyrins and their precursors after topical administration of 5-aminolaevulinic acid for fluorescence endoscopy in head and neck cancer. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* (2003); 113-114: 75-85
- Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM: Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* (1961); 42: 623-629
- Loh CS, MacRobert AJ, Bedwell J, Regula J, Krasner N, Bown SG: Oral versus intravenous administration of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. *Br J Cancer* (1993); 68: 41-51
- Lordick F, Krauss J, Jager D: Tumor markers and biomarkers in squamous cell cancer of the head and neck. *HNO* (2008); 56: 881-885
- Lorenz KJ, Maier H: Squamous cell carcinoma of the head and neck. Photodynamic therapy with Foscan. *HNO* (2008); 56: 402-409
- Mashberg A: Diagnosis of early oral and oropharyngeal squamous carcinoma: obstacles and their amelioration. *Oral Oncol* (2000); 36: 253-255

- Mauzerall D, Granick S: The occurrence and determination of  $\delta$ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J Biol Chemistry* (1956); 219: 435
- Mehlmann M, Betz CS, Stepp H, Arbogast S, Baumgartner R, Grevers G, Leunig A: Fluorescence staining of laryngeal neoplasms after topical application of 5-aminolevulinic acid: preliminary results. *Lasers Surg Med* (1999); 25: 414-420
- Messmann H, Knuchel R, Baumler W, Holstege A, Scholmerich J: Endoscopic fluorescence detection of dysplasia in patients with Barrett's esophagus, ulcerative colitis, or adenomatous polyps after 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX sensitization. *Gastrointest Endosc* (1999); 49: 97-101
- Mlkvy P, Messmann H, Debinski H, Regula J, Conio M, MacRobert A, Spigelman A, Phillips R, Bown SG: Photodynamic therapy for polyps in familial adenomatous polyposis--a pilot study. *Eur-J-Cancer* (1995a) Jul-Aug; 31A (7-8): 1160-5
- Mlkvy P, Messmann H, Regula J, Conio M, Pauer M, Millson CE, MacRobert AJ, Bown SG: Sensitization and photodynamic therapy (PDT) of gastrointestinal tumors with 5-aminolaevulinic acid (ALA) induced protoporphyrin IX (PPIX). A pilot study. *Neoplasma* (1995b); 42(3): 109-13
- Nessel E, Wiggermann W: The tetracycline fluorescence test in surgery of malignant tumors; rhinolaryngologic experiences. *HNO* (1965); 13: 346-349
- Ogasawara T, Miyoshi N, Sano K, Kitagawa Y, Yamada T, Ogawa T, Miyauchi K, Kinoshita H: Influence of administration methods on the accumulation of ALA-induced Pp-IX in mouse tongue tumors. *Oral Dis* (2006); 12: 415-419
- Olejek A, Rembielak-Stawecka B, Kozak-Darmas I, Biniszkiewicz T, Sieron A: Photodynamic diagnosis and therapy in gynecology--current knowledge. *Ginekol Pol* (2004); 75: 228-234
- Overholt BF, Wang KK, Burdick JS, Lightdale CJ, Kimmey M, Nava HR, Sivak MV, Jr., Nishioka N, Barr H, Marcon N, Pedrosa M, Bronner MP, Grace M, Depot M: Five-year efficacy and safety of photodynamic therapy with Photofrin in Barrett's high-grade dysplasia. *Gastrointest Endosc* (2007); 66: 460-468
- Papadimitrakopoulou VA, Shin DM, Hong WK: Molecular and cellular biomarkers for field cancerization and multistep process in head and neck tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* (1996); 15: 53-76

- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS: Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* (2001); 37 Suppl. 8: S4-66
- Pech O, Gossner L, May A, Rabenstein T, Vieth M, Stolte M, Berres M, Ell C: Long-term results of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for superficial Barrett's cancer and high-grade intraepithelial neoplasia. *Gastrointest Endosc* (2005); 62: 24-30
- Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, Nesland JM: 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer* (1997); 79: 2282-2308
- Policard A: Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinées á la lumière de Wood. *Cr Soc Biol* (1924); 91: 1423-1424
- Portugal LG, Wilson KM, Biddinger PW, Gluckman JL: The role of toluidine blue in assessing margin status after resection of squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* (1996); 122: 517-519
- Regula J, MacRobert AJ, Gorchein A, Buonaccorsi GA, Thorpe SM, Spencer GM, Hatfield AR, Bown SG: Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal, and colorectal tumors using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX--a pilot study. *Gut* (1995) Jan; 36(1): 67-75
- Richart RM: A clinical staining test for the in vivo delineation of dysplasia and carcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol* (1963); 86: 703-712
- Rick K, Sroka R, Stepp H, Kriegmair M, Huber RM, Jacob K, Baumgartner R: Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood. *J Photochem Photobiol B* (1997); 40: 313-319
- Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2003–2004, Häufigkeiten und Trends. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 6. überarbeitete Auflage, (2008)
- Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S: Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res* (1998); 18: 4779-4786
- Schleier P, Zenk W, Dietel W: Diagnostik von Frühformen des Mundhöhlenkarzinoms durch Stimulierung der Synthese von fluoreszierendem Protoporphyrin IX. *DFZ* (2000); 5: 32-39

- Sciubba JJ: Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol* (2001); 2: 239-251
- Sharman WM, Allen CM, van Lier JE: Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* (1999); 4: 507-517
- Silverman S Jr.: Early diagnosis of oral cancer. *Cancer* (1988); 62: 1796-1799
- Szeimies RM, Sassy T, Landthaler M: Penetration potency of topical applied delta-aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. *Photochem Photobiol* (1994); 59: 73-76
- Usuda J, Kato H, Okunaka T, Furukawa K, Tsutsui H, Yamada K, Suga Y, Honda H, Nagatsuka Y, Ohira T, Tsuboi M, Hirano T: Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers. *J Thorac Oncol* (2006); 1: 489-493
- Vaidyanathan VV, Rastegar S, Fossum TW, Flores P, van Der Breggen EW, Egger NG, Jacques SL, Motamedi M: A study of aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence kinetics in the canine oral cavity. *Lasers Surg Med* (2000); 26: 405-414
- Van den Boogert J, Houtsmuller AB, de Rooij FW, de Bruin RW, Siersema PD, van Hillegersberg R: Kinetics, localization, and mechanism of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin accumulation in normal and Barrett's-like rat esophagus. *Lasers Surg Med* (1999); 24: 3-13
- Van Hillegersberg R, Van den Berg JW, Kort WJ, Terpstra OT, Wilson JH: Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats. *Gastroenterology* (1992); 103: 647-651
- Vermynen P, Pierard P, Roufosse C, Bosschaerts T, Verhest A, Sculier JP, Ninane V.: Detection of bronchial preneoplastic lesions and early lung cancer with fluorescence bronchoscopy: a study about its ambulatory feasibility under local anaesthesia. *Lung Cancer* (1999); 25: 161-168
- Wang I, Clemente LP, Pratas RM, Cardoso E, Clemente MP, Montan S, Svanberg S, Svanberg K: Fluorescence diagnostics and kinetic studies in the head and neck region utilizing low-dose delta-aminolevulinic acid sensitization. *Cancer Lett* (1999); 135: 11-19
- Wang IS, K, Andersson-Engels S, Berg R, Svanberg P: Photodynamic therapy of non-

- melanoma skin malignancies with topical delta-aminolevulinic acid: diagnostic measurements. In: 5th International Photodynamic Association Biennial Meeting (1995): 243-252
- Wang JB, Liu LX: Use of photodynamic therapy in malignant lesions of stomach, bile duct, pancreas, colon and rectum. *Hepatogastroenterology* (2007); 54: 718-724
- Webber J, Kessel D, Fromm D: Plasma levels of protoporphyrin IX in humans after oral administration of 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B* (1997); 37: 151-153
- Welge-Lussen A, Glanz H, Arens C, Oberholzer P, Probst R: Multiple biopsy in diagnosis of laryngeal carcinoma. *Laryngorhinootologie* (1996); 75: 611-615
- Werner JA, Dünne AA; Lippert BM: Indikation zur Halsoperation bei nicht nachweisbaren Lymphknotenmetastasen; Teil I: Grundlagen zum lymphogenen Metastasierungsverhalten von Kopf-Halskarzinomen. *HNO* (2002); 50: 253-262
- Wu RW, Chu ES, Yow CM, Chen JY: Photodynamic effects on nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells with 5-aminolevulinic acid or its hexylester. *Cancer Lett* (2006); 242: 112-119
- Zargi M, Fajdiga I, Smid L: Autofluorescence imaging in the diagnosis of laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2000); 257: 17-23
- Zenk W, Dietel W, Schleier P, Gunzel S: Visualizing carcinomas of the mouth cavity by stimulating synthesis of fluorescent protoporphyrin IX. *Mund Kiefer Gesichtschir* (1999); 3: 205-209
- Zenzen V, Zankl H: In vitro evaluation of the cytotoxic and mutagenic potential of the 5-aminolevulinic acid hexylester-mediated photodynamic therapy. *Mutat Res* (2004); 561: 91-100

## 8. Anhang

### 8.1. Mittelwert, Median, Standardabweichung für alle Applikationen

Zusammenfassung von Fällen

Applikatio		U1	U1	U1	U1	U1 Gesamt
Inhalation	N	2	2	2	2	2
	Mittelwert	259	72	1	10	13
	Median	206	48	2	5	7
	Standardfehler des Mittelwertes	507	18	8	3	4
	Standardabweichung	258	93	4	15	23
	Spannweite	1258	488	21	81	124
	Schief	2,89	4,02	3,96	3,97	4,54
Mundspülung	N	1	1	1	1	1
	Mittelwert	266	146	8	12	14
	Median	204	80	0	7	9
	Standardfehler des Mittelwertes	416	35	3	3	3
	Standardabweichung	181	156	1	13	14
	Spannweite	560	578	5	51	51
	Schief	,48	1,77	2,10	2,15	1,81
Systemisch 20 mg kg/KG	N	2	2	2	2	2
	Mittelwert	29912	4602	505	61	629
	Median	27055	2822	482	45	585
	Standardfehler des Mittelwertes	4975	1108	86	14	99
	Standardabweichung	22250	4958	388	65	444
	Spannweite	77142	18445	1323	283	1465
	Schief	,71	1,39	,38	2,71	,39



### Zusammenfassung von Fällen

Applikation		U2 ALA	U2 PBG	U2 Uro	U2 Kopro	U2 Gesamt
Inhalation	N	26	26	26	26	26
	Mittelwert	2027	547	3	60	75
	Median	1832	452	0	43	54
	Standardfehler des Mittelwertes	262	78	2	9	11
	Standardabweichung	1336	397	9	45	58
	Spannweite	4982	2046	31	161	244
	Schiefe	,766	2,215	2,626	1,020	1,412
Mundspülung	N	19	19	19	19	19
	Mittelwert	2269	691	6	80	104
	Median	2229	647	0	82	96
	Standardfehler des Mittelwertes	313	111	2	13	19
	Standardabweichung	1362	484	8	58	81
	Spannweite	6545	2169	22	245	319
	Schiefe	2,048	2,213	,779	1,827	1,925
Systemisch 20 mg kg/KG	N	20	20	20	20	20
	Mittelwert	3521	1665	95	109	213
	Median	2940	1631	35	87	116
	Standardfehler des Mittelwertes	626	251	59	17	61
	Standardabweichung	2801	1121	263	78	275
	Spannweite	10233	5082	1201	273	1243
	Schiefe	1,889	1,763	4,314	1,377	3,344

### Zusammenfassung von Fällen

Applikation		P1 Proto	P2 Proto
Inhalation	N	26	26
	Mittelwert	,0000	,0000
	Median	,0000	,0000
	Standardfehler des Mittelwertes	,0000	,0000
	Standardabweichung	,0000	,0000
	Spannweite	,00	,00
	Schiefe	,	,
Mundspülung	N	20	20
	Mittelwert	,0000	,0000
	Median	,0000	,0000
	Standardfehler des Mittelwertes	,0000	,0000
	Standardabweichung	,0000	,0000
	Spannweite	,00	,00
	Schiefe	,	,
Systemisch 20 mg kg/KG	N	20	20
	Mittelwert	,5680	,0000
	Median	,0000	,0000
	Standardfehler des Mittelwertes	,1860	,0000
	Standardabweichung	,8319	,0000
	Spannweite	1,90	,00
	Schiefe	,922	,
Insgesamt	N	66	66
	Mittelwert	,1721	,0000
	Median	,0000	,0000
	Standardfehler des Mittelwertes	6,414E-02	,0000
	Standardabweichung	,5210	,0000
	Spannweite	1,90	,00
	Schiefe	2,883	,

## 8.2. Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

### 8.2.1. Inhalation

#### Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		U1 ALA	U1 PBG	U1 Uro	U1 Kopro	U1 Gesamt	U2 ALA	U2 PBG	U2 Uro	U2 Kopro	U2 Gesamt
N		26	26	16	26	26	26	26	16	26	26
Parameter der Normalverteilung	Mittelwert	589,7385	723,9231	13,3813	102,9488	133,3905	027,1000	546,5154	3,7875	59,6750	74,7312
	Standardabweichung	582,6860	935,5617	19,7293	158,5920	239,4989	336,3162	396,7975	10,3526	44,7058	58,4473
Extremste Differenz	Absolut	,212	,258	,249	,310	,361	,132	,191	,518	,182	,171
	Positiv	,208	,258	,214	,310	,361	,132	,191	,518	,182	,171
	Negativ	-,212	-,250	-,249	-,258	-,289	-,087	-,138	-,357	-,101	-,100
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,081	1,316	,995	1,578	1,840	,675	,974	2,071	,928	,372
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,193	,063	,275	,014	,002	,752	,299	,000	,355	,432

a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.

b. Aus den Daten berechnet.

c. Applikation = Inhalation

## 8.2.2. Mundspülung

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

	U1 ALA	U1 PBG	U1 Uro	U1 Kopro	U1 Gesamt	U2 ALA	U2 PBG	U2 Uro	U2 Kopro	U2 Gesamt
N	19	19	13	19	19	19	19	12	19	19
Parameter der Normalverteilung										
Mittelwert	669,0920	468,1263	9,9292	121,4968	143,7816	269,1790	690,8632	5,1400	80,2247	103,9695
Standardabweichung	11,7262	564,0972	15,7504	130,4715	144,1692	362,2031	483,7777	7,6933	57,7852	81,4437
Extremste Differenz Absolut	,161	,270	,274	,334	,318	,170	,173	,415	,220	,240
Positiv	,161	,270	,274	,334	,318	,170	,173	,415	,220	,240
Negativ	-,095	-,190	-,264	-,192	-,177	-,123	-,128	-,252	-,139	-,182
Kolmogorov-Smirnov-Z	,700	1,175	,989	1,455	1,385	,742	,756	1,436	,957	1,048
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,712	,126	,282	,029	,043	,640	,618	,032	,318	,222

- a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.  
b. Aus den Daten berechnet.  
c. Applikation = Mundspülung

## 8.2.3. Systemisch

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

	U1 ALA	U1 PBG	U1 Uro	U1 Kopro	U1 Gesamt	U2 ALA	U2 PBG	U2 Uro	U2 Kopro	U2 Gesamt
N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Parameter der Normalverteilung										
Mittelwert	99125,6	46025,08	55,2275	17,1760	291,3228	20,7549	65,0699	94,6445	108,7905	212,5030
Standardabweichung	22509,3	49585,67	384,5554	351,9511	445,2495	300,6272	20,8457	263,2570	77,6147	274,8629
Extremste Differenz Absolut	,160	,201	,128	,335	,137	,311	,164	,404	,168	,283
Positiv	,160	,201	,128	,335	,137	,311	,164	,404	,168	,283
Negativ	-,099	-,178	-,121	-,214	-,100	-,165	-,106	-,360	-,131	-,249
Kolmogorov-Smirnov-Z	,717	,897	,571	1,497	,611	1,389	,735	1,808	,750	1,266
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,683	,396	,900	,023	,849	,042	,652	,003	,626	,081

- a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.  
b. Aus den Daten berechnet.  
c. Applikation = Systemisch 20 mg kg/KG

## 8.3. Wilcoxon Test

### 8.3.1 Inhalation

Deskriptive Statistiken<sup>a</sup>

	N	Perzentile		
		25.	50. (Median)	75.
U1 ALA	26	772,8750	2063,8750	3244,7250
U1 PBG	26	247,9500	483,6000	804,1000
U2 ALA	26	900,9000	1832,0750	2843,3625
U2 PBG	26	292,6000	452,4000	727,1000

- a. Applikation = Inhalation

**Ränge<sup>g</sup>**

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
U2 ALA - U1 ALA	Negative Ränge	11 <sup>a</sup>	17,68	194,50
	Positive Ränge	15 <sup>b</sup>	10,43	156,50
	Bindungen	0 <sup>c</sup>		
	Gesamt	26		
U2 PBG - U1 PBG	Negative Ränge	12 <sup>d</sup>	13,46	161,50
	Positive Ränge	11 <sup>e</sup>	10,41	114,50
	Bindungen	3 <sup>f</sup>		
	Gesamt	26		

- a. U2 ALA < U1 ALA
- b. U2 ALA > U1 ALA
- c. U1 ALA = U2 ALA
- d. U2 PBG < U1 PBG
- e. U2 PBG > U1 PBG
- f. U1 PBG = U2 PBG
- g. Applikation = Inhalation

**Statistik für Test<sup>b,c</sup>**

	U2 ALA - U1 ALA	U2 PBG - U1 PBG
Z	-,483 <sup>a</sup>	-,715 <sup>a</sup>
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,629	,475

- a. Basiert auf positiven Rängen.
- b. Wilcoxon-Test
- c. Applikation = Inhalation

**Deskriptive Statistiken<sup>a</sup>**

	N	Perzentile		
		25.	50. (Median)	75.
U1 Uro	26	,0000	2,0450	19,7750
U1 Kopro	26	28,0925	57,6400	123,3975
U1 Gesamt	26	49,7700	79,4200	149,1525
U2 Uro	26	,0000	,0000	,0000
U2 Kopro	26	27,3700	42,7900	75,9600
U2 Gesamt	26	34,7425	54,3550	96,4325

- a. Applikation = Inhalation

Ränge<sup>j</sup>

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
U2 Uro - U1 Uro	Negative Ränge	12 <sup>a</sup>	7,50	90,00
	Positive Ränge	1 <sup>b</sup>	1,00	1,00
	Bindungen	13 <sup>c</sup>		
	Gesamt	26		
U2 Kopro - U1 Kopro	Negative Ränge	16 <sup>d</sup>	15,31	245,00
	Positive Ränge	10 <sup>e</sup>	10,60	106,00
	Bindungen	0 <sup>f</sup>		
	Gesamt	26		
U2 Gesamt - U1 Gesamt	Negative Ränge	16 <sup>g</sup>	15,50	248,00
	Positive Ränge	10 <sup>h</sup>	10,30	103,00
	Bindungen	0 <sup>i</sup>		
	Gesamt	26		

- a. U2 Uro < U1 Uro
- b. U2 Uro > U1 Uro
- c. U1 Uro = U2 Uro
- d. U2 Kopro < U1 Kopro
- e. U2 Kopro > U1 Kopro
- f. U1 Kopro = U2 Kopro
- g. U2 Gesamt < U1 Gesamt
- h. U2 Gesamt > U1 Gesamt
- i. U1 Gesamt = U2 Gesamt
- j. Applikation = Inhalation

Statistik für Test<sup>b,c</sup>

	U2 Uro - U1 Uro	U2 Kopro - U1 Kopro	U2 Gesamt - U1 Gesamt
Z	-3,110 <sup>a</sup>	-1,765 <sup>a</sup>	-1,841 <sup>a</sup>
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,002	,078	,066

- a. Basiert auf positiven Rängen.
- b. Wilcoxon-Test
- c. Applikation = Inhalation

### 8.3.2. Mundspülung

#### Ränge<sup>g</sup>

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
U2 ALA - U1 ALA	Negative Ränge	10 <sup>a</sup>	10,75	107,50
	Positive Ränge	8 <sup>b</sup>	7,94	63,50
	Bindungen	0 <sup>c</sup>		
	Gesamt	18		
U2 PBG - U1 PBG	Negative Ränge	12 <sup>d</sup>	10,00	120,00
	Positive Ränge	4 <sup>e</sup>	4,00	16,00
	Bindungen	2 <sup>f</sup>		
	Gesamt	18		

- a. U2 ALA < U1 ALA
- b. U2 ALA > U1 ALA
- c. U1 ALA = U2 ALA
- d. U2 PBG < U1 PBG
- e. U2 PBG > U1 PBG
- f. U1 PBG = U2 PBG
- g. Applikation = Mundspülung

#### Statistik für Test <sup>b,c</sup>

	U2 ALA - U1 ALA	U2 PBG - U1 PBG
Z	-,958 <sup>a</sup>	-2,689 <sup>a</sup>
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,338	,007

- a. Basiert auf positiven Rängen.
- b. Wilcoxon-Test
- c. Applikation = Mundspülung

#### Deskriptive Statistiken<sup>a</sup>

	N	Perzentile		
		25.	50. (Median)	75.
U1 Uro	19	,0000	,0000	10,7300
U1 Kopro	19	52,4000	72,0000	106,9500
U1 Gesamt	19	66,6400	91,2000	133,5700
U2 Uro	19	,0000	,0000	14,7000
U2 Kopro	19	32,7500	81,8800	98,2500
U2 Gesamt	19	41,6500	95,8500	124,6500

- a. Applikation = Mundspülung

### Statistik für Test<sup>b,c</sup>

	U2 Uro - U1 Uro	U2 Kopro - U1 Kopro	U2 Gesamt - U1 Gesamt
Z	-,663 <sup>a</sup>	-1,851 <sup>a</sup>	-1,328 <sup>e</sup>
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,508	,064	,184

a. Basiert auf positiven Rängen.

b. Wilcoxon-Test

c. Applikation = Mundspülung

### Ränge

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
U2 Uro - U1 Uro	Negative Ränge	6 <sup>a</sup>	5,67	34,00
	Positive Ränge	4 <sup>b</sup>	5,25	21,00
	Bindungen	8 <sup>c</sup>		
	Gesamt	18		
U2 Kopro - U1 Kopro	Negative Ränge	12 <sup>d</sup>	10,67	128,00
	Positive Ränge	6 <sup>e</sup>	7,17	43,00
	Bindungen	0 <sup>f</sup>		
	Gesamt	18		
U2 Gesamt - U1 Gesamt	Negative Ränge	11 <sup>g</sup>	10,55	116,00
	Positive Ränge	7 <sup>h</sup>	7,86	55,00
	Bindungen	0 <sup>i</sup>		
	Gesamt	18		

a. U2 Uro < U1 Uro

b. U2 Uro > U1 Uro

c. U1 Uro = U2 Uro

d. U2 Kopro < U1 Kopro

e. U2 Kopro > U1 Kopro

f. U1 Kopro = U2 Kopro

g. U2 Gesamt < U1 Gesamt

h. U2 Gesamt > U1 Gesamt

i. U1 Gesamt = U2 Gesamt

j. Applikation = Mundspülung

### 8.3.3. Systemisch

#### Deskriptive Statistiken <sup>a</sup>

	N	Perzentile		
		25.	50. (Median)	75.
U1 ALA	20	103425,0	270550,0000	414750,0
U1 PBG	20	5087,5000	28226,0000	81378,00
U2 ALA	20	1832,2500	2940,0000	3640,8750
U2 PBG	20	742,5000	1631,3000	2202,7500

a. Applikation = Systemisch 20 mg kg/KG

#### Ränge<sup>g</sup>

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
U2 ALA - U1 ALA	Negative Ränge	20 <sup>a</sup>	10,50	210,00
	Positive Ränge	0 <sup>b</sup>	,00	,00
	Bindungen	0 <sup>c</sup>		
	Gesamt	20		
U2 PBG - U1 PBG	Negative Ränge	19 <sup>d</sup>	10,79	205,00
	Positive Ränge	1 <sup>e</sup>	5,00	5,00
	Bindungen	0 <sup>f</sup>		
	Gesamt	20		

a. U2 ALA < U1 ALA

b. U2 ALA > U1 ALA

c. U1 ALA = U2 ALA

d. U2 PBG < U1 PBG

e. U2 PBG > U1 PBG

f. U1 PBG = U2 PBG

g. Applikation = Systemisch 20 mg kg/KG



### Ränge<sup>j</sup>

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
U2 Uro - U1 Uro	Negative Ränge	20 <sup>a</sup>	10,50	210,00
	Positive Ränge	0 <sup>b</sup>	,00	,00
	Bindungen	0 <sup>c</sup>		
	Gesamt	20		
U2 Kopro - U1 Kopro	Negative Ränge	20 <sup>d</sup>	10,50	210,00
	Positive Ränge	0 <sup>e</sup>	,00	,00
	Bindungen	0 <sup>f</sup>		
	Gesamt	20		
U2 Gesamt - U1 Gesamt	Negative Ränge	20 <sup>g</sup>	10,50	210,00
	Positive Ränge	0 <sup>h</sup>	,00	,00
	Bindungen	0 <sup>i</sup>		
	Gesamt	20		

- a. U2 Uro < U1 Uro
- b. U2 Uro > U1 Uro
- c. U1 Uro = U2 Uro
- d. U2 Kopro < U1 Kopro
- e. U2 Kopro > U1 Kopro
- f. U1 Kopro = U2 Kopro
- g. U2 Gesamt < U1 Gesamt
- h. U2 Gesamt > U1 Gesamt
- i. U1 Gesamt = U2 Gesamt
- j. Applikation = Systemisch 20 mg kg/KG

### Statistik für Test <sup>b,c</sup>

	U2 Uro - U1 Uro	U2 Kopro - U1 Kopro	U2 Gesamt - U1 Gesamt
Z	-3,920 <sup>a</sup>	-3,920 <sup>a</sup>	-3,920 <sup>a</sup>
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,000

- a. Basiert auf positiven Rängen.
- b. Wilcoxon-Test
- c. Applikation = Systemisch 20 mg kg/KG

## 8.4. Korrelation nach Spearman und Kendall-Tau

### Korrelationen

			U1 ALA	U2 ALA	U1 PBG	U2 PBG	Dosis ALA
Kendall-Tau-	U1 ALA	Korrelationskoeffi	1,000	,308**	,560**	,444**	,502*
		Sig. (2-seitig)	,	,000	,000	,000	,000
		N	65	64	65	64	65
	U2 ALA	Korrelationskoeffi	,308**	1,000	,355**	,537**	,165
		Sig. (2-seitig)	,000	,	,000	,000	,091
	N	64	65	64	65	65	
	U1 PBG	Korrelationskoeffi	,560**	,355**	1,000	,538**	,324*
		Sig. (2-seitig)	,000	,000	,	,000	,001
		N	65	64	65	64	65
	U2 PBG	Korrelationskoeffi	,444**	,537**	,538**	1,000	,292*
		Sig. (2-seitig)	,000	,000	,000	,	,003
		N	64	65	64	65	65
	Dosis AL	Korrelationskoeffi	,502**	,165	,324**	,292**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	,091	,001	,003	,
		N	65	65	65	65	66
Spearman-R	U1 ALA	Korrelationskoeffi	1,000	,449**	,759**	,626**	,656*
		Sig. (2-seitig)	,	,000	,000	,000	,000
		N	65	64	65	64	65
	U2 ALA	Korrelationskoeffi	,449**	1,000	,510**	,723**	,223
		Sig. (2-seitig)	,000	,	,000	,000	,074
	N	64	65	64	65	65	
	U1 PBG	Korrelationskoeffi	,759**	,510**	1,000	,738**	,445*
		Sig. (2-seitig)	,000	,000	,	,000	,000
		N	65	64	65	64	65
	U2 PBG	Korrelationskoeffi	,626**	,723**	,738**	1,000	,389*
		Sig. (2-seitig)	,000	,000	,000	,	,001
		N	64	65	64	65	65
	Dosis AL	Korrelationskoeffi	,656**	,223	,445**	,389**	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	,074	,000	,001	,
		N	65	65	65	65	66

\*\*-Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig).

### Korrelationen

	U1 Uro	U2 Uro	J1 Kopro	J2 Kopro	J1 Gesam	J2 Gesam	Dosis ALA		
Kendall-Tau	U1 Uro	Korrelationskoeff	1,000	,515*	,429*	,232*	,608*	,300*	,624*
		Sig. (2-seitig)	,	,000	,000	,010	,000	,001	,000
		N	65	64	65	64	65	64	65
	U2 Uro	Korrelationskoeff	,515*	1,000	,375*	,303*	,434*	,447*	,357*
		Sig. (2-seitig)	,000	,	,000	,001	,000	,000	,001
		N	64	65	64	65	64	65	65
	U1 Kopro	Korrelationskoeff	,429*	,375*	1,000	,308*	,819*	,336*	,401*
		Sig. (2-seitig)	,000	,000	,	,000	,000	,000	,000
		N	65	64	65	64	65	64	65
	U2 Kopro	Korrelationskoeff	,232*	,303*	,308*	1,000	,274*	,854*	,124
		Sig. (2-seitig)	,010	,001	,000	,	,001	,000	,202
		N	64	65	64	65	64	65	65
	U1 Gesar	Korrelationskoeff	,608*	,434*	,819*	,274*	1,000	,328*	,480*
		Sig. (2-seitig)	,000	,000	,000	,001	,	,000	,000
		N	65	64	65	64	65	64	65
	U2 Gesar	Korrelationskoeff	,300*	,447*	,336*	,854*	,328*	1,000	,164
		Sig. (2-seitig)	,001	,000	,000	,000	,000	,	,092
		N	64	65	64	65	64	65	65
Dosis AL	Korrelationskoeff	,624*	,357*	,401*	,124	,480*	,164	1,000	
	Sig. (2-seitig)	,000	,001	,000	,202	,000	,092	,	
	N	65	65	65	65	65	65	66	
Spearman-F	U1 Uro	Korrelationskoeff	1,000	,637*	,605*	,330*	,735*	,400*	,746*
		Sig. (2-seitig)	,	,000	,000	,008	,000	,001	,000
		N	65	64	65	64	65	64	65
	U2 Uro	Korrelationskoeff	,637*	1,000	,487*	,394*	,567*	,555*	,433*
		Sig. (2-seitig)	,000	,	,000	,001	,000	,000	,000
		N	64	65	64	65	64	65	65
	U1 Kopro	Korrelationskoeff	,605*	,487*	1,000	,426*	,930*	,476*	,532*
		Sig. (2-seitig)	,000	,000	,	,000	,000	,000	,000
		N	65	64	65	64	65	64	65
	U2 Kopro	Korrelationskoeff	,330*	,394*	,426*	1,000	,389*	,938*	,162
		Sig. (2-seitig)	,008	,001	,000	,	,002	,000	,196
		N	64	65	64	65	64	65	65
	U1 Gesar	Korrelationskoeff	,735*	,567*	,930*	,389*	1,000	,462*	,637*
		Sig. (2-seitig)	,000	,000	,000	,002	,	,000	,000
		N	65	64	65	64	65	64	65
	U2 Gesar	Korrelationskoeff	,400*	,555*	,476*	,938*	,462*	1,000	,218
		Sig. (2-seitig)	,001	,000	,000	,000	,000	,	,081
		N	64	65	64	65	64	65	65
Dosis AL	Korrelationskoeff	,746*	,433*	,532*	,162	,637*	,218	1,000	
	Sig. (2-seitig)	,000	,000	,000	,196	,000	,081	,	
	N	65	65	65	65	65	65	66	

\*\*Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig).

### Korrelationen

			P1 Proto	P2 Proto	E1Proto	E2 Proto	Dosis ALA
Kendall-Tau-b	P1 Proto	Korrelationskoeffizient	1,000	,	,	,	,410**
		Sig. (2-seitig)	,	,	,	,	,000
		N	66	66	17	21	66
	P2 Proto	Korrelationskoeffizient	,	,	,	,	,
		Sig. (2-seitig)	,	,	,	,	,
		N	66	66	17	21	66
	E1Proto	Korrelationskoeffizient	,	,	1,000	,850**	,110
		Sig. (2-seitig)	,	,	,	,000	,611
		N	17	17	17	17	17
	E2 Proto	Korrelationskoeffizient	,	,	,850**	1,000	,167
		Sig. (2-seitig)	,	,	,000	,	,385
		N	21	21	17	21	21
Dosis ALA	Korrelationskoeffizient	,410**	,	,110	,167	1,000	
	Sig. (2-seitig)	,000	,	,611	,385	,	
	N	66	66	17	21	66	
Spearman-Rho	P1 Proto	Korrelationskoeffizient	1,000	,	,	,	,442**
		Sig. (2-seitig)	,	,	,	,	,000
		N	66	66	17	21	66
	P2 Proto	Korrelationskoeffizient	,	,	,	,	,
		Sig. (2-seitig)	,	,	,	,	,
		N	66	66	17	21	66
	E1Proto	Korrelationskoeffizient	,	,	1,000	,951**	,127
		Sig. (2-seitig)	,	,	,	,000	,627
		N	17	17	17	17	17
	E2 Proto	Korrelationskoeffizient	,	,	,951**	1,000	,194
		Sig. (2-seitig)	,	,	,000	,	,399
		N	21	21	17	21	21
Dosis ALA	Korrelationskoeffizient	,442**	,	,127	,194	1,000	
	Sig. (2-seitig)	,000	,	,627	,399	,	
	N	66	66	17	21	66	

\*\* · Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig).

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

### **Meine Akademischen Lehrer waren die Damen und Herrn Professoren und Dozenten:**

In Magdeburg:

Fröhlich, Hoffmann, Pape, Reiser, Schwegler, Von Specht, Wendler, Wolf, Zlatner

In Marburg:

Arnold, Barth, Baum, Christiansen, Czubayko, Daut, Doss, Görg, Gotzen, Griss, Happle, Hellinger, Hesse, Höffken, Hofmann, Junclas, Klenk, Kretschmer, Krieg, Kroh, Lange, Leonhardt, Leppek, Lippert, Maisch, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Oertel, Remschmidt, Renz, Richter, Rothmund, Rosenow, Schachtschabel, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Seyberth, Vohland, von Wichert, Wilke, Werner

In Wolhusen:

Gräni

In Paris:

Parc

In Fulda:

Draf, Fassbinder, Kälble, Töllner

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. J.A. Werner, Direktor der HNO-Klinik der Philipps-Universität Marburg, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Durchführung der vorgelegten Arbeit an seiner Klinik.

Herrn Prof. Dr. B.M. Lippert für die Überlassung des Themas, die Betreuung während der Untersuchungen und Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit, darüberhinaus für das Wecken der Begeisterung für die Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde.

Herrn Prof. Dr. M.O. Doss ehemaliger Leiter des Funktionsbereiches Klinische Biochemie der Universität Marburg und seinem Mitarbeiter Herrn Dr. U. Gross für die Beratung in Fragen des Porphyrinstoffwechsels, des Photosensibilisators ALA sowie die Bereitstellung der Daten der Kontrollgruppe.

Herrn Prof. Dr. Renz, Herrn Dr. M. Ossendorf und den Mitarbeiter/innen des Zentrallaboratoriums für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Marburg danke ich besonders für die praktische Durchführung der Porphyrinbestimmung.

Abschließend möchte ich mich bei all meinen Freunden und meiner Familie bedanken, besonders bei meinen Mitdoktoranden Herrn M. Ney und Frau Dr. N. Klahr für die Zusammenarbeit und Unterstützung in Marburg und meiner Schwester Anne für die Durchsicht der Arbeit und wertvollen Korrekturvorschläge.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich auf meinem Weg immer unterstützt haben und meinem Mann Markus, der mir hilfreich und geduldig bei der Fertigstellung der Arbeit zur Seite stand, für seine Unterstützung und Liebe.