

**MINIMAL-INVASIVE DIAGNOSTIK DES UROTHELKRZINOMS MIT
DEM SCHWERPUNKT ANWENDUNG NEUER BILDGEBENDER
TECHNIKEN IN DER ENDOSKOPIE**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Urologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. med. Frank König

geboren am 20.10.1964 in Belzig

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht: September 2001

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrags: 23.04.2002

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dieter Jocham

2. Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Alfons Hofstetter

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Vorbemerkungen	3
2. Einleitung	5
3. Orientierende Verfahren	7
3.1. Urindiagnostik	7
3.2. ALS- Fluoreszenzzystoskopie	9
3.3. Autofluoreszenz	11
3.4. Reflektion	13
4. Staging- Verfahren	16
4.1. Intravesikale Sonographie	16
4.2. Optische Kohärenztomographie (OCT)	17
5. Grading- Verfahren	19
5.1. Konfokale Laserrastermikroskopie (CLSM)	19
5.2. Konfokale Fluoreszenz-Laserrastermikroskopie (CFM)	20
6. Schlussfolgerung	21
7. Literatur	23
7.1. Eigene Artikel als Erstautor	23
7.2. Eigene Artikel als Koautor	24
7.3. Fremdliteratur	25
8. Danksagung und eidesstattliche Versicherung	27

1. VORBEMERKUNGEN

Die innerhalb dieser Habilitationsschrift dargestellten Ergebnisse basieren auf Untersuchungen, die ich an der Klinik für Urologie der Charité sowie während eines 3-jährigen Forschungsaufenthaltes an der *Harvard Medical School (Wellmann Laboratories of Photomedicine, Department of Urology, Massachusetts General Hospital, Boston, USA)* gemeinsam mit Doktoranden sowie wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern der jeweiligen Einrichtungen durchgeführt habe. Alle Wissenschaftler, die einen substantiellen Beitrag zu dem jeweiligen Projekt geleistet haben, sind als Koautoren in den dazugehörigen Veröffentlichungen genannt (siehe Literaturverzeichnis). Hervorgehoben seien an dieser Stelle folgende Personen, welche die Forschungen in besonderer Weise unterstützt und gefördert haben:

Prof. Dr. Stefan A. Loening	Direktor der Urologischen Klinik der Charité
Prof. Dr. Dietmar Schnorr	stellv. Direktor der Urologischen Klinik der Charité
Prof. Dr. Klaus Jung	Leiter der Urologischen Forschungsabteilung
Prof. W. Scott McDougal, MD	<i>Chief, Department of Urology, MGH, Boston</i>
Francis J. McGovern, MD	<i>Senior Urologist, MGH, Boston</i>
Alex F. Althausen, MD	<i>Senior Urologist, MGH, Boston</i>
Prof. Thomas F. Deutsch	Physiker, Wellmann Labs., MGH, Boston
Prof. Kevin T. Schomacker	Physiker, Wellmann Labs., MGH, Boston

Im Mittelpunkt meiner Forschungstätigkeit steht die minimal- invasive Diagnostik des Urothelkarzinoms. Dabei beschäftige ich mich zum überwiegenden Teil mit der Grundlagenforschung und klinischen Anwendung neuer bildgebender Verfahren in der Endoskopie. Weiterhin ist die Evaluierung neuer Techniken auf dem Gebiet der Urin- Diagnostik Bestandteil meiner wissenschaftlichen Arbeit. Die Ergebnisse von Untersuchungen auf diesen Gebieten in den Jahren von 1995-2001 sind Gegenstand dieser Habilitationsschrift und wurden in *peer reviewed* Zeitschriften publiziert und auf internationalen Kongressen vorgetragen. Auf Grund der Publikationstätigkeit auf dem Gebiet innovativer bildgebender Verfahren in der Endoskopie wurde mir von den Herausgebern des „Urologen B“ (Zeitschrift der

Deutschen Gesellschaft für Urologie- DGU) der Auftrag erteilt, einen Übersichtsartikel zu Strategien in der bildgebenden Diagnostik des Harnblasenkarzinoms zu verfassen (Artikel Nr. E8). Diese Veröffentlichung sowie 10 weitere Artikel und eine Patentschrift, welche ich als Erstautor in den letzten Jahren publiziert bzw. zur Veröffentlichung eingereicht habe, sind Hauptbestandteil der vorliegenden Habilitationsschrift. Die genannten Publikationen sind als Literaturzitate E1 bis E12 aufgeführt. Des weiteren habe ich dem Thema entsprechend 5 Artikel mit relevantem Inhalt ausgewählt, bei denen ich als Koautor genannt bin. Diese sind mit K1 bis K5 gekennzeichnet.

Die einzelnen Kapitel der vorliegenden Habilitationsschrift beschreiben nach einer kurzen Einleitung die wesentlichen Ergebnisse der o.g. Veröffentlichungen. Dabei wurde bewusst auf eine Wiederholung der detaillierten Darstellung von Methoden, Ergebnissen und deren Diskussion verzichtet. Hierzu sei auf die entsprechenden Publikationen im Anhang verwiesen. Der Schwerpunkt wurde vielmehr auf die Zusammenfassung und Diskussion der Einzelergebnisse im Rahmen des Gesamtkonzepts einer minimal- invasiven Diagnostik des Urothelkarzinoms gelegt.

Als Ergebnis der Forschung zur Gewebeeigenfluoreszenz (siehe Kapitel zur Autofluoreszenz) konnte in den USA ein Patent auf ein bildgebendes Verfahren angemeldet werden (Literaturzitat E12). Zur Erläuterung der Patentschrift, wurde zusätzlich eine schematische Abbildung eingefügt.

Die in der Habilitationsschrift verwendeten Abkürzungen sind jeweils bei erstmaliger Verwendung im Text erläutert.

2. EINLEITUNG

Trotz vielversprechender neuer Ansätze in der Urin-Diagnostik zur Identifizierung von Patienten mit einem Karzinom der ableitenden Harnwege hat sich neben der Urinzytologie bisher kein neues diagnostisches Verfahren in der klinischen Routine etabliert. Eigene Untersuchungen an Urin von Patienten mit Urothelkarzinomen weisen auf eine mögliche diagnostische und/oder prognostische Bedeutung der Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 (MMP 2 und 9) sowie der Cathepsine B, H und L hin.

Die Zystoskopie stellt neben dem Ausscheidungsurogramm nach wie vor das wichtigste bildgebende Verfahren in der Erstdiagnostik und Nachsorge beim Blasenkarzinom dar. Der optische Aufbau des Zystoskops ist seit Einführung der HOPKINS-Stablinsen kaum verändert worden. Die Anwendung von hochauflösenden Kameras erlaubt heute eine exzellente bildliche Darstellung der Blasenoberfläche und damit die Diagnostik selbst kleinster papillärer Urothelveränderungen. Trotz sofortiger adäquater Resektion des Primärtumors ist jedoch die Rezidivrate beim Urothelkarzinom mit bis zu über 70% ungewöhnlich hoch. Dies ist nachweislich zum Teil durch eine inkomplette Resektion des Primärtumors bedingt. Außerdem wird vermutet, dass im Rahmen einer pan-urothelialen Erkrankung flache maligne/dysplastische Veränderungen während der initialen Zystoskopie übersehen und erst zu einem späteren Zeitpunkt auf Grund des vorangeschrittenen Wachstums erkannt werden. Insbesondere das Carcinoma in situ (CIS) ist trotz seines hohen Malignitätsgrades von normalem oder entzündlich verändertem Urothel kaum zu unterscheiden. Die Bedeutung einer durch die Erstresektion mit der Elektroschlinge oder durch die Biopsie ausgelösten Dissemination (syn. Implantation, Migration) von Tumorzellen des Primärtumors in andere Regionen der Blase und ableitenden Harnwege wird derzeit kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien haben jedoch den klonalen Ursprung von einem Großteil der Rezidivtumore nachgewiesen, welches die Implantationstheorie unterstützt und zum Überdenken derzeitiger Therapiestrategien zwingen sollte. Dem Einsatz schonenderer Verfahren wie der Resektion mit dem Laser wurde bisher mit großer Zurückhaltung begegnet. Dies geschah vor allem mit dem Hinweis auf die thermische Schädigung des gewonnenen Gewebematerials. Daran haben auch Untersuchungen nichts

geändert, welche eine gute histologische Beurteilbarkeit des „Laser-geschädigten“ Gewebes nachwiesen.

Die histologische Untersuchung der während der Zystoskopie entnommenen Gewebeprobe gilt als sog. „Goldener Standard“ und bildet die Grundlage für die Einschätzung des Differenzierungsgrades (*Grading*, G1-G3) sowie für die Klassifizierung im Rahmen des TNM- Systems (*Staging*). Voraussetzung für ein exaktes *Staging* ist jedoch die tiefe Biopsie bzw. Resektion, welche die *Muscularis propria* der Blasenwand mit erfasst. Eine Muskelinfiltration des Tumors lässt sich jedoch im histologischen Präparat oft nicht nachweisen oder ausschließen, da das Gewebe entweder thermisch geschädigt ist oder bei dem Risiko einer Blasenperforation nicht ausreichend tief reseziert wurde. Des Weiteren ist es möglich, dass der Tumor nicht an der Stelle seiner tiefsten Invasion erfasst wurde. Dies führt z.B. bei über 30% der Hoch- Risiko- Tumoren (G3) zu einem *Understaging*, d.h. zu einer Unterschätzung der wahren Eindringtiefe des Tumors mit möglicherweise fatalen Konsequenzen für den Patienten.

Auf Grund der oben beschriebenen Schwierigkeiten, welche in anderen Fachgebieten ähnlich sind (z.B. Chirurgie, Pulmonologie, HNO), besteht ein großes Interesse an neuen bildgebenden Verfahren, welche zu einer verbesserten Diagnostik von Karzinomen und Dysplasien führen. Die klinische Umsetzung dieser Techniken mit Inkorporation in ein Endoskop würde möglicherweise in der Zukunft die sog. „Optische Biopsie“ erlauben, d.h. eine *in vivo* Diagnostik von Neoplasien ohne die Notwendigkeit der Gewebeentnahme bzw. in deutlich reduziertem Umfang. Der Verzicht auf die Biopsie würde jedoch an das dafür eingesetzte diagnostische System Anforderungen stellen, welche nicht durch ein einziges bildgebendes Verfahren erfüllt werden können. Wahrscheinlich ist die Kombination eines sensitiven **orientierenden Verfahrens** mit einem **Staging-Verfahren** (ausreichende Eindringtiefe) und einem **Grading- Verfahren** (mikroskopische Auflösung) notwendig.

3. ORIENTIERENDE VERFAHREN

3.1. URIN- DIAGNOSTIK

Urin ist leicht zu gewinnen und stellt somit ein ideales Medium zur nicht- invasiven Diagnostik und Nachkontrolle von Patienten mit Karzinomen der ableitenden Harnwege dar.

Die zytologische Untersuchung gilt derzeit nach wie vor als Standardverfahren in der Urin- Diagnostik des Urothelkarzinoms, an welchem alle neuen Methoden gemessen werden. Die abgeschilferten Urothelzellen, welche im Urin erscheinen, werden durch den Zytologen hinsichtlich ihrer morphologischen Abnormalitäten analysiert. Dabei spielen u.a. Zellform, Größe, Chromatinstruktur, prominente Nucleoli, Mitosefiguren und Kern- Plasma- Relationen eine wesentliche Rolle. Da diese Abnormalitäten bei hoch-differenzierten G1- Zellen jedoch kaum nachweisbar sind, schwankt die Detektionsrate von Urothelkarzinomen zwischen 50% und 90% in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zellen. Hochmaligne niedrig- und entdifferenzierte Zellen einschließlich das CIS werden mit einer bis zu 90%igen Sicherheit durch die Urin- Zytologie erfasst. Die Flow- Zytometrie, welche den DNA- Gehalt und dadurch den Anteil von aneuploiden Zellen im Urin bestimmt, zeigt keine signifikanten Vorteile gegenüber der konventionellen Zytologie. Hochdifferenzierte oberflächliche Urothelkarzinome sind oft diploid und führen daher zu falsch negativen Ergebnissen. Ob mit der Bestimmung weiterer Parameter das diagnostische Potential der Flowzytometrie verbessert werden kann, bleibt abzuwarten.

Auf Grund der unbefriedigenden Situation in der Urin- Diagnostik ist die Bestimmung von neuen Tumormarkern Gegenstand einer weltweiten intensiven Forschung. Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass bisher keiner der neuen Marker in der klinischen Routinediagnostik angewendet wird [Artikel E1]. Trotz vielversprechender Ansätze und Ergebnisse liegen meist nur kleine Fallzahlen eines selektierten Patientengutes vor bzw. es fehlen vergleichende prospektiv- randomisierte Studien. Oft sind die entsprechenden Tests für den täglichen Gebrauch zu teuer und/oder zu aufwendig. Zusätzlich erschwert die fehlende Standardisierung der einzelnen Verfahren (Präanalytik, verwendete Antikörper und Reagenzien, Testablauf, Interpretation der Ergebnisse) den

Vergleich der zahlreichen Studien. Bevor ein Verfahren in der Routinediagnostik eingesetzt werden kann, sollte die neue Methode verschiedenen Anforderungen genügen. Der Urintest sollte

- eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen,
- robust sein und reproduzierbare Ergebnisse in kurzer Zeit liefern,
- wenig Kosten verursachen und
- eine Kontamination des Urins mit Blut und normalen Zellen tolerieren.

Prinzipiell können am zentrifugierten Urin der Überstand und das Zellsediment analysiert werden. Als Methoden stehen z.B. die Immunhistochemie, die DNA-Sequenzanalyse und die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Verfügung. Bestimmt werden u.a. Tumor- assoziierte Antigene; Blutgruppenantigene; Proliferationsmarker; Gene und Genprodukte, welche den Zellzyklus und die Apoptose regulieren sowie Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren [Artikel E1]. In eigenen Studien untersuchten wir im Urin die potentiellen Tumormarker MMP 2 und 9 sowie die Cathepsine B,H,L [Artikel K1-K3].

MMP's gehören zu einer Gruppe von Enzymen, welche am Abbau und der Neuformierung extrazellulärer Matrix beteiligt sind. In verschiedenen Studien konnte ihre Bedeutung beim Invasions- und Metastasierungsprozess von Tumoren (Brust, Ovar, Magen, Lunge, Gehirn) nachgewiesen werden.¹⁻⁴ Für Tumore der Blase konnte eine erhöhte Urin- Expression für MMP 2 und 9 nachgewiesen werden.⁵⁻⁷ Unserer Kenntnis nach wurde jedoch bisher keine vergleichende Studie von MMP 2 und 9 bei Patienten mit Tumoren, Entzündungen und gesunden Probanden durchgeführt.

Cathepsine sind lysosomale proteolytische Enzyme, welche zur Gruppe der Cystein- Proteinase gehören. Sie bauen u.a. Bestandteile von Basalmembranen ab, wie z.B. Laminin, Collagen oder Elastin. Cathepsine wurden verstärkt bei invasiven und metastasierten Tumoren in verschiedenen Organen einschließlich Prostata und Niere gefunden.⁸⁻¹¹ In einer kleinen Studie mit 22 Blasen-tumor-Patienten wurde lediglich Cathepsin B im Urin untersucht und eine erhöhte Expression bei Karzinomen festgestellt.¹²

In der eigenen Studie zu den MMP's wurden insgesamt 85 Patienten mit Blasentumoren unterschiedlichen Stadiums oder entzündlichen Veränderungen der Blase (43 x Ta-1, 18 x T2, 10 x T3-4, 14 Blasenentzündungen) sowie 44 Probanden ohne Blasenläsionen untersucht. In die Studie zu den Cathepsinen wurden 43 Patienten mit oberflächlichen Tumoren (Ta/1) und 27 Patienten mit muskelinvasiven Tumoren ($\geq T2$) eingeschlossen. Zum Vergleich wurden auch 14 Urinproben von Patienten mit entzündlichen Veränderungen und 43 gesunde Probanden untersucht. Im Ergebnis der Studien zeigte sich, dass die Expression von MMP 2 und 9 sowie Cathepsin L im Urin deutlich mit der Invasionstiefe (*Staging*) und dem Differenzierungsgrad (*Grading*) der untersuchten Tumore korrelierte. Dies weist auf eine mögliche Bedeutung als Progressionsmarker hin. Weitere prospektive Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv sind jedoch nötig, um das diagnostische Potential dieser Urin-Marker zu bestätigen.

3.2. ALS- FLUORESZENZZYSTOSKOPIE

Die auf der 5-Aminolävulinsäure (ALS)- induzierten Protoporphyrin IX (PPIX)-Fluoreszenz basierende Fluoreszenzzystoskopie ist ein vielversprechendes sehr sensitives diagnostisches Verfahren, welches an mehreren Zentren bereits klinisch routinemäßig eingesetzt wird. Dieses Verfahren wurde erstmals 1993 durch *BAUMGARTNER* et al. beschrieben und beruht auf der Anreicherung von PPIX in neoplastischen Zellen nach intravesikaler Instillation einer ALA-Lösung.¹³ ALA und PPIX sind körpereigene Substanzen und Vorstufen des roten Blutfarbstoffs Häm. Die Methode ist dadurch praktisch frei von Nebenwirkungen. Dies ist auch darauf zurückzuführen, dass die PPIX- Anreicherung nachweislich (fluoreszenzmikroskopisch, [Artikel K4]) auf das Urothel beschränkt ist und somit keine systemischen phototoxischen Reaktionen auftreten. Im Gegensatz zu ALS ist PPIX ein sog. *Photosensitizer*, welcher unter Bestrahlung mit blauem Licht rot fluoresziert und dadurch für die Photodiagnostik nicht nur des Blasenkarzinoms eingesetzt werden kann. Der technische Aufwand ist vergleichsweise gering und bedarf einer modifizierten Xenon-Lichtquelle mit eingebauten Filtern für die wahlweise Benutzung von Weiß- oder Blaulicht. Zusätzlich ist der Einsatz spezieller Optiken notwendig, welche durch eingebaute Filter die Ausblendung des

größten Teils des intensiven blauen Anregungslichtes bei gleichzeitiger Durchlässigkeit für die schwache Rotfluoreszenz erlauben [Artikel E2].

Kürzlich veröffentlichten ZAAK et al. Untersuchungen mit insgesamt 2.475 Blasenbiopsien (1.012 Fluoreszenzzystoskopien in 605 Patienten), welche zeigten, dass in 34% der Zystoskopien neoplastische Läsionen durch die Standard- Weißlichtzystoskopie übersehen und nur aufgrund der PPIX-Fluoreszenz entdeckt wurden.¹⁴

Eigene Untersuchungen bestätigten das diagnostische Potential dieser Methode [Artikel E3]. Das Anliegen dieser initialen Zulassungsstudie in den USA war die Bestimmung der diagnostischen Validität von 5-ALS-induzierter PPIX-Fluoreszenz für die Früherkennung des Blasenkarzinoms.

In die Studie wurden 55 Patienten mit bekanntem oder mit Verdacht auf ein Blasenkarzinom eingeschlossen. Bei allen Patienten wurden präoperativ 50 ml einer 3% ALS- Lösung intravesikal appliziert. Die nachfolgende Zystoskopie wurde unter weißem (Standard) sowie unter blauem Licht mittels einer modifizierten Xenon- Lichtquelle durchgeführt. Bei 49 Patienten wurden insgesamt 130 Blasenbiopsien durchgeführt. Die Gewebeproben wurde in Formalin fixiert und zur pathologischen Untersuchung eingesandt.

Fluoreszenzuntersuchungen wurden an 63 nichtmalignen sowie an 67 malignen/dysplastischen Blasenarealen durchgeführt. Zehn maligne/dysplastische Läsionen (4 Karzinome, 2 CIS, 4 Dysplasien) wurden während der Weißlichtzystoskopie übersehen und konnten nur mit Hilfe der Fluoreszenzmethode gefunden werden. Die Fluoreszenzzystoskopie verbessert damit im Vergleich zur Standard- Weißlichtzystoskopie die Diagnostik von malignen/ dysplastischen Läsionen um 18%. Betrachtet man ausschließlich dysplastische Veränderungen und das CIS, so wird die Diagnostik dieser Läsionen um 50% verbessert. Insgesamt hat das Verfahren bezüglich der Detektion von malignen/ dysplastischen Blasenveränderungen eine Sensitivität von 87% und eine Spezifität von 59%. Bei kombinierter Anwendung von Weiß- und Blaulichtzystoskopie erhöht sich die Sensitivität auf 99%. Nach intravesikaler Instillation von ALS wurden keine systemischen Nebenwirkungen beobachtet. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit der vorgestellten Methode die

Diagnostik des Blasenkarzinoms deutlich verbessert werden kann. Die Vorteile des Verfahrens sind:

- die hohe Sensitivität mit Detektion z.T. nicht sichtbarer Läsionen wie dem CIS und mikropapilläre Tumore,
- das schnelle Auffinden kleiner Satellitentumore auch für unerfahrene Untersucher und
- die komplette Resektion flächenhafter Tumore.

Damit stellt die ALS- induzierte PPIX- Fluoreszenzzystoskopie ein hoch-sensitives orientierendes bildgebendes Verfahren dar, welches derzeit die einzige klinisch anwendbare Alternative zur Standard- Weißlichtzystoskopie ist. In einer derzeit laufenden prospektiv- randomisierten Studie konnte für die Fluoreszenzmethode im Vergleich zur Standard- TURB bereits eine Senkung der Residualtumorraten um 59% gezeigt werden [Artikel K5]. Erste Auswertungen 3 und 6 Monate nach primärer Fluoreszenzresektion lassen auch eine deutliche Senkung der Rezidivrate erwarten.

3.3. AUTOFLUORESZENZ

Bestimmte Biomoleküle im Gewebe sog. Fluorophore sind nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge in der Lage, die aufgenommene Energie wieder als Licht abzustrahlen (Autofluoreszenz). Die Wellenlänge dieses Fluoreszenzlichtes ist charakteristisch für das angeregte Molekül. Die Intensität der abgestrahlten Gewebefluoreszenz ist von der Konzentration der Fluorophore sowie von der Blutabsorption abhängig. Bekannte Fluorophore des menschlichen Organismus sind z.B. Kollagen, NADH (reduzierte Form des Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid), Flavine, Porphyrine oder Tryptophan. In der Blase wird vor allem Kollagen und NADH eine Bedeutung beigemessen. Licht im Wellenlängenbereich von 300-365 nm (ultraviolettes Licht) entspricht dem Absorptionsverhalten dieser Biomoleküle und ist daher zur Anregung der Autofluoreszenz von Blasengewebe geeignet. Es stellt sich die Frage, ob die im Rahmen der Tumorentwicklung möglicherweise auftretenden Konzentrationsänderungen von Fluorophoren oder morphologische Veränderungen des

Blasengewebes durch Messung der Autofluoreszenz nachweisbar sind.

In eigenen Untersuchungen haben wir das diagnostische Potential der Laser-induzierten Autofluoreszenz (LIF) unter Verwendung eines N₂ - Lasers bei 130 verdächtigen Zystoskopiefunden getestet [Artikel E4, E5]. Nach Etablierung eines diagnostischen Algorithmus während einer initialen Studie [Artikel E4] erfolgte die Validierung in einer prospektiven Studie [Artikel E5]. Bei den untersuchten Blasenarealen war intraoperativ mit der Standard-Weißlichtzystoskopie keine eindeutige Zuordnung (maligne, nichtmaligne) möglich, so dass Biopsien durchgeführt wurden.

Der histologischen Untersuchung zufolge waren über 80% der unter Weißlicht verdächtigen Läsionen gutartige Veränderungen des Urothels. Die gemittelten LIF-Spektren von normalem Urothel, CIS und Karzinomen zeigten signifikante Unterschiede. Der berechnete Mittelwert der Fluoreszenzmaxima normaler Schleimhaut liegt bei 385 nm und der von Karzinomen bei 455 nm. Aufgrund der gefundenen Ergebnisse wurde der Quotient der Fluoreszenzintensitäten (LIF-Quotient) bei den o. g. Wellenlängen (I₃₈₅/I₄₅₅) als Parameter zur Differenzierung der verschiedenen Gewebeveränderungen verwendet. Die Mittelwerte der LIF-Quotienten von nichtmalignen Arealen unterscheiden sich signifikant ($p < 0.001$) von denen der malignen Bezirke. Der Unterschied zwischen Karzinomen und CIS war nicht signifikant ($p = 0.47$). Es fand sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen CIS und nichtmalignem Gewebe ($p < 0.005$), zwischen CIS und akut/chronischen Entzündungen der Blase ($p < 0.003$) sowie zwischen CIS und proliferativen nichtmalignen Arealen ($p < 0.05$). Die statistische Analyse der Daten zeigte, dass 95% der malignen Blasenareale LIF- Quotienten unter 1.78 aufwiesen. Bei der Anwendung dieses Wertes als diagnostisches Kriterium zur Differenzierung von malignen und nichtmalignen Läsionen könnte die Zahl der Biopsien von nichtmalignen Arealen um 72% verringert werden.

Es handelt sich bei der Methode um einen simplen quantitativen Test, welcher Daten in Echtzeit während der Zystoskopie liefert. Damit steht dem Untersucher ein objektiver Parameter zur Verfügung, welcher die Entscheidung zur Biopsie eines verdächtigen Areals erleichtert. Da der diagnostische Algorithmus lediglich auf zwei Wellenlängen basiert, ist die Entwicklung eines bildgebenden Verfahrens

möglich. Die praktische Umsetzung eines patentierten optischen Systems (siehe Abbildung S.14) ist zur Zeit Gegenstand der Forschung [Zitat E12]. Auch die LIF könnte als orientierendes bildgebendes Verfahren zur Diagnostik von epithelialen Tumoren eingesetzt werden; ob als alleiniges diagnostisches System oder in Verbindung mit der ALS- Fluoreszenzmethode müssen zukünftige klinische Studien zeigen.

3.4. Reflektion

In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass sich normales Blasengewebe sowie entzündliche und maligne Blasenläsionen hinsichtlich ihres Blutgefäßmusters und ihrer Durchblutung deutlich voneinander unterscheiden.¹⁵⁻¹⁷ Des weiteren konnte eine Korrelation zwischen Gefäßdichte des Tumors und dem Risiko von Fernmetastasen nachgewiesen werden.¹⁸ Durch spektroskopische Messung der diffusen Reflektion von Weißlicht im Bereich von 450 nm bis 700 nm können verschiedene Parameter der Gewebedurchblutung auf einfache Weise gemessen werden. Dazu gehören die Blutabsorption, die Gesamtblutmenge, die Lichtstreuung, die Hämoglobinkonzentration und die Sauerstoffsättigung.

Zur Einschätzung des diagnostischen Potentials der o.g. Parameter für die Detektion des Urothelkarzinoms haben wir erstmals *in-vivo*- Untersuchungen in der humanen Blase durchgeführt [Artikel E6]. Als Lichtquelle diente Standard-Weißlicht, welches üblicherweise zur Ausleuchtung der Blase während der Zystoskopie genutzt wird. Über eine Quarzfasern (0.6 mm im Durchmesser), welche über den Arbeitskanal des Zystoskopes in die Blase eingeführt wurde, erfolgte die spektroskopische Analyse des von der Blasenschleimhaut reflektierten Weißlichtes.

Insgesamt wurden 14 Patienten mit bekannten Blasentumoren in die Studie eingeschlossen. Untersucht wurden 26 verschiedene Blasenareale, von welchen nach der Messung Gewebeproben entnommen worden sind. Der histologischen Analyse zu Folge erfolgten die spektroskopischen Messungen an 6 normalen und 7 entzündlich veränderten Arealen sowie an 2 Plattenepithelmetaplasien, 2 Dysplasien und 9 Karzinomen (2xTaG2, 1xT1G3, 2xT2G3, 4xCIS). Von allen untersuchten Parametern der Durchblutung zeigte lediglich die Gesamtblutmenge

signifikante Unterschiede ($p=0.005$) beim Vergleich von malignen und nicht-malignen Veränderungen der Blasenschleimhaut.

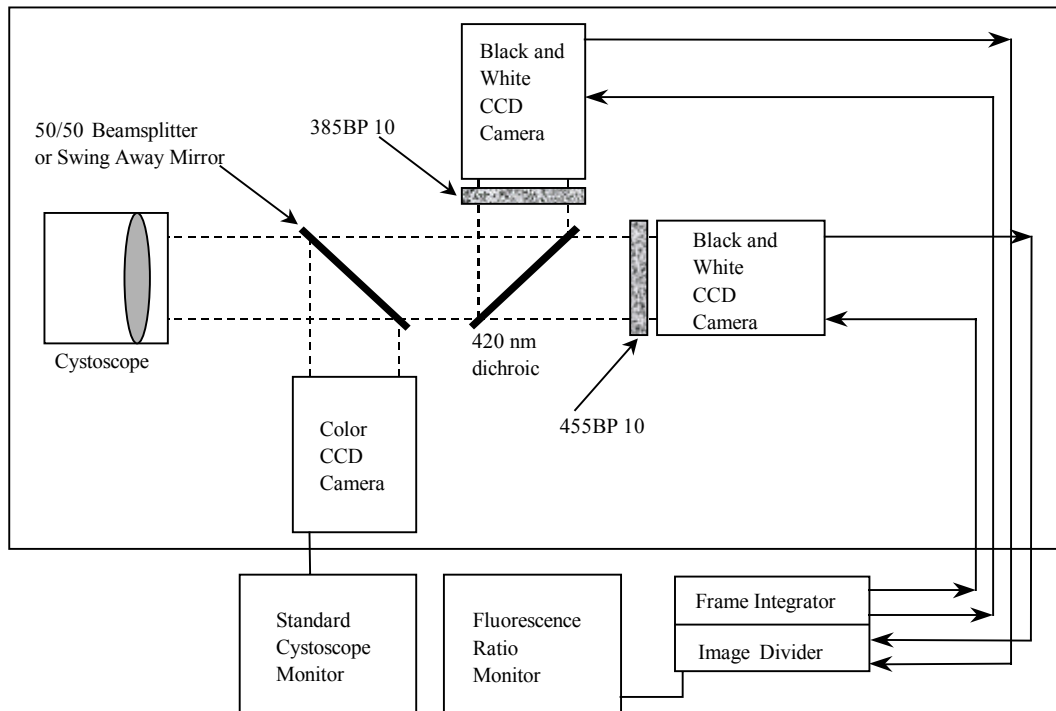


Abbildung 1: Schematische Abbildung eines bildgebenden LIF- Systems bestehend aus zwei Schwarz- Weiss- CCD (charged coupled device)- Kameras zur getrennten Aufnahme der Fluoreszenzbilder bei 385 nm und 455 nm und einer dritten Farb- CCD- Kamera für das normale Zystoskopiebild. Der *Frame Integrator* und der *Image Divider* dienen zur Integration (syn. Ratio, Quotient) der beiden Fluoreszenzbilder zu einem resultierendem LIF- Bild (aus Publikation E12).

In der Gruppe der malignen Läsionen zeigten muskelinvasive Karzinome ($\geq T2$) und das CIS erwartungsgemäß eine signifikant höhere Blutkonzentration im Vergleich zu oberflächlichen Tumoren (Ta, T1). Keine signifikanten Unterschiede ergab der Vergleich von Karzinomen und entzündlichen Veränderungen.

Die spektroskopische Analyse von reflektiertem Weißlicht ist einfach und ohne größeren technischen Aufwand während der zystoskopischen Untersuchung durchzuführen. Die Ergebnisse stehen in Echtzeit zur Verfügung und können

somit noch im OP in den diagnostischen Entscheidungsprozess einfließen. In unserer Studie konnten 10 von 11 malignen Tumoren als solche durch die Messung der Blutkonzentration identifiziert werden. Das CIS konnte in jedem der vier Fälle als maligne eingestuft werden. Auf Grund der kleinen Fallzahl, kann derzeit nicht beurteilt werden, inwiefern eine Differenzierung von flachen malignen und entzündlichen Blasenveränderungen möglich ist. Basierend auf unseren Ergebnissen und der leichten technischen Durchführbarkeit der Reflektionsmessungen sollte in größeren prospektiven Studien die klinische Anwendbarkeit der Methode überprüft werden. Dies schließt auch die Evaluierung der möglichen prognostischen und prediktiven Aussagekraft hinsichtlich des Auftretens von Fernmetastasen ein.

4. STAGING-VERFAHREN

4.1. INTRAVESIKALE SONOGRAPHIE

Bereits 1974 begann die Entwicklung einer intravesikalen Anwendung der Sonographie zum intraoperativen Staging von Blasentumoren. Bis Ende 1980 wurden Ultraschallscanner mit 7.5 MHz und einem Durchmesser von 7 mm verwendet. Diese Instrumente waren auf Grund ihrer Größe nur separat einsetzbar. Erst 1990 wurde der erste flexible Scanner (7.5 MHz) mit einem Durchmesser von 3 mm entwickelt, welcher über den Arbeitskanal des Zystoskopes eingeführt und unter direkter optischer Kontrolle in Position gebracht werden konnte. Die Bildqualität und Anwendbarkeit der intravesikalen Sonographie wurde 1994 mit der Entwicklung von flexiblen 20 MHz Scannern mit einem Durchmesser von 2.4 mm noch einmal deutlich verbessert. Neuere Sonden welche seit 1997 erhältlich sind, haben nur noch einen äußeren Durchmesser von 2 mm. Durch die Miniaturisierung der Ultraschallsonden ist auch der Einsatz mit flexiblen Endoskopen möglich.

UCHIDA et al. untersuchten von 1994 bis 1997 in einer klinischen Studie insgesamt 52 Blasentumore (33xTa/T1-Tumore, 14xT2-Tumore, 5xT3-Tumore) in 51 Patienten mit Hilfe einer intravesikalen Ultraschallsonde.¹⁹ Ziel war die intraoperative Differenzierung zwischen oberflächlichen und muskelinvasiven Tumoren. Zum Einsatz kamen 20 MHz- Scanner in Verbindung mit einem flexiblen Zystoskop. Eingeschlossen wurden ausschließlich Tumore, bei denen am histologischen Präparat eine eindeutige Aussage hinsichtlich einer möglichen Muskelinvasion getroffen werden konnte. In 48 der 52 Fälle (92%) erfolgte eine korrekte Zuordnung mit Hilfe des Ultraschalls. Lediglich 2 Tumore wurden nach Ultraschallkriterien als oberflächlich eingeschätzt, obwohl eine Muskelinvasion vorlag. Je ein T3- und Ta/T1- Karzinom wurden als T2- Tumor klassifiziert. Eine Differenzierung von Ta- und T1-Tumoren war nicht möglich.

Die intravesikale Sonographie stellt demzufolge ein potentielles Verfahren zum intraoperativen *Staging* von epithelialen Tumoren dar. Zukünftige prospektive Studien müssen jedoch das diagnostische Potential der Methode bestätigen.

4.2. OPTISCHE KOHÄRENZTOMOGRAPHIE (OCT)

In den letzten Jahren rückt ein neues bildgebendes Verfahren zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses, die optische Kohärenztomographie (OCT). OCT kann mit der Sonographie verglichen werden, mit dem Unterschied, dass an Stelle von reflektierten akustischen Wellen Infrarotlicht zur Bildgebung verwendet wird. Dieses Infrarotlicht hat zusätzlich die Eigenschaft, dass es im Unterschied zum Laserlicht Kohärenz nur in einem engen Bereich aufweist. Die Methode wird deshalb auch als Kurzkohärenzinterferometrie bezeichnet. Durch die besondere Charakteristik des Lichts ist es in Verbindung mit einem beweglichen Referenzspiegel möglich, reflektiertes Licht aus verschiedenen Tiefen des Gewebes zu detektieren und Strukturen bildlich darzustellen. Die Eindringtiefe ins Gewebe ist mit OCT auf etwa 4 mm begrenzt. Dagegen liegt das Auflösungsvermögen den bisher veröffentlichten Studien zufolge zwischen 4 und 20 µm. Dies wäre bis um den Faktor 25 höher als bei Untersuchungen mit dem hochfrequentem Ultraschall, der Magnetresonanztomographie (MRT) oder der Computertomographie (CT). OCT ist besonders attraktiv für den diagnostischen Einsatz in Verbindung mit Endoskopen, da zur Lichtübertragung Millimeter- dünne optische Fasern verwendet werden können und die Bilder in schneller Abfolge (bis zu 8 Bilder pro Sekunde) zur Verfügung stehen. OCT wurde zunächst für die Diagnostik am Auge und an der Haut entwickelt. Später sind weitere Organe in experimentellen Studien untersucht worden, wie z.B. Knochen, Herz, Blutgefäße, Darm, Nervengewebe, Lunge, Ösophagus und Trachea.

In *ex vivo* Studien sind durch *TEARNY* et al. auch Gewebe des Urogenitaltraktes; Hoden, Prostata, Ureter und Blase mit OCT bildlich dargestellt worden.²⁰ Hinsichtlich der gesunden Blasen- und Ureterwand konnte gezeigt werden, dass eine Differenzierung zwischen Urothel, Lamina propria und Muskel möglich ist. In einer kürzlich durchgeführten Pilotstudie in Zusammenarbeit mit dem medizinischen Laserzentrum Lübeck (OCT- Arbeitsgruppe unter Leitung von Dipl. Phys. Ralf Engelhardt) untersuchten wir *ex vivo* erstmals Blasentumore. Am Zystektomiepräparat ließ sich mit OCT die Eindringtiefe von muskelinfiltrierenden Karzinomen bildlich darstellen [Artikel E7, E8]. Die Ergebnisse von derzeit laufenden *in vivo* Untersuchungen zum intraoperativen *Staging* von Blasentumoren mit OCT werden zeigen, welches diagnostische Potential die

Methode besitzt. Es kann jedoch noch eine erhebliche Verbesserung der Bildqualität erwartet werden, wie vergleichende *ex vivo* und *in vivo* Untersuchungen an der Haut gezeigt haben. Der an unserer Klinik im Rahmen einer Studie geplante Vergleich mit der intravesikalen Sonographie wird von entscheidender Bedeutung für die klinische Akzeptanz des OCT- Verfahrens sein.

5. GRADING- VERFAHREN

5.1. KONFOKALE LASERRASTERMIKROSKOPIE (CLSM)

Keines der bisher vorgestellten Verfahren würde eine „optische Biopsie“ des Blasentumors erlauben, da ein *Grading* der Karzinomzellen, welches neben dem *Staging* unverzichtbar für die pathologische Diagnose ist, nur mit mikroskopischer Bildauflösung möglich wäre. Man ist daher seit längerer Zeit am Einsatz der konfokalen Laserrastermikroskopie (CLSM) zur *in vivo* Diagnostik von Gewebeveränderungen interessiert. Auf Grund der einfachen Zugänglichkeit wurde auch hierbei zunächst die Haut untersucht. Später folgten Studien an der Niere, der Leber, der Mundschleimhaut und am Auge.

RAJADHYAKSHA et al. konnten zeigen, dass der Einsatz von CLSM an der Haut *in vivo* die bildliche Darstellung von Zellen einschließlich des Zellkerns, Bindegewebestrukturen und Blutgefäßen in der Epidermis sowie der darunterliegenden Dermis erlaubt.²¹ Mit Hilfe eines neu entwickelten CLSM-Systems gelang die bildliche Darstellung erstmals in Echtzeit mit einer Eindringtiefe zwischen 200 und 500 µm bei einer lateralen Auflösung von 0.5-1 µm und einer axialen Auflösung von 3-5 µm. Als Anregungsquellen wurden Laser mit Wellenlängen zwischen 400 und 1064 nm verwendet.

Mit dem oben beschriebenen CLSM- System führten wir auch Untersuchungen an der Rattenblase durch [Artikel E9]. Für diese Studie wurden ein Nd:YAG-Laser (1064 nm) sowie Wasserimmersionsobjektive (30x/0.9NA und 100x/1.2NA) verwendet. Am lebenden anästhesierten Tier wurden die Untersuchungen an der intakten Blasenwand durchgeführt. Ähnlich wie bei der Haut ließen sich die einzelnen Zellen des Urothels einschließlich des Zellkerns abgrenzen. Unmittelbar unterhalb des Urothels konnte das dichte Netz der subepithelialen Kapillargefäße einschließlich der Blutzellen beobachtet werden. Auf Grund der *video-rate*-Bildfolge war eine Observation des Blutflusses und damit die Differenzierung von Flussrichtung bzw. Flussgeschwindigkeit möglich. In den tieferen Blasenwandschichten können Kollagenfasern des Bindegewebes von einzelnen Fasern der Blasenmuskulatur differenziert werden. Die abschließende Serosa ist durch ein dichtes Netz von feinen Kollagenfasern gekennzeichnet.

5.2. KONFOKALE FLUORESZENZ-LASERRASTERMIKROSKOPIE (CFM)

Neuere Untersuchungen von *KNITTEL* et al. (Forschungsgruppe des Zentrums für Minimal Invasive Chirurgie der Universität Tübingen) am Darm zeigen, dass durch die *in vivo* Gabe von Fluoreszenzmarkern (FM) die Bildqualität noch erheblich gesteigert werden kann.²² Die dadurch gewonnenen Bilder von der Darmschleimhaut sind hinsichtlich ihrer Detailgenauigkeit von H/E- Schnitten, wie sie der Pathologe verwendet, kaum noch zu unterscheiden. Initiale gemeinsam mit dieser Forschungsgruppe durchgeführte Untersuchungen an der gesunden Rattenblase zeigen eine ähnliche Bildqualität [Artikel E10]. Ca. 120 Minuten nach intravesikaler Instillation eines FM (SYTO 17, Molecular Probes, Eugene, USA) am anästhesierten Tier erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der vorher entfernten aber intakten eröffneten Blase unter einem konfokalen Standardmikroskop (CLSM von *LEICA*).

Innerhalb des Urothels war eine klare Differenzierung von großen flachen Umbrellazellen und kleineren intermediären sowie basalen Urothelzellen möglich. Weiterhin konnten subepitheliale Kapillargefäße, Erythrozyten und Bindegewebszellen sowie Kollagenfasern der Lamina propria beobachtet werden. Mit der vorgestellten Methode scheint eine *in vivo* Untersuchung des Blasengewebes mit mikroskopischer Auflösung möglich. Mit dem Ziel der Entwicklung der endoskopischen Mikroskopie konnte am Darm bereits eine fasergestützte Bildübertragung vom Gewebe zum Mikroskop demonstriert werden [Artikel E11].²²

Weitere in der Planung befindliche Studien müssen nun nachweisen, inwieweit eine Differenzierung von neoplastischen und gutartigen Läsionen des Urothels möglich ist. Der Forschungsschwerpunkt für die Zukunft wird vor allem in der Entwicklung von geeigneten FM's sowie einer endoskopischen Anwendung der CLSM für die Blase bestehen. Trotz dieser anspruchsvollen Aufgabe scheint die technische Umsetzung auf Grund vielversprechender Ansätze (neue Bildleiter, miniaturisierte Mikroskope, etc.) möglich.

6. SCHLUSSFOLGERUNG

Die Verbesserung der Früherkennung des Urothelkarzinoms ist derzeit der einzige Weg zur Senkung der Mortalität dieser Tumorentität. Bisher fehlen Screeningparameter für das Blasenkarzinom vergleichbar dem Prostata-spezifischen Antigen (PSA) zur Diagnostik des Prostatakarzinoms. Jedoch scheint auf Grund vielversprechender diagnostischer Ansätze und einer Vielzahl potentieller Urin- und Serummarker die Entwicklung eines Screeningverfahrens in der Zukunft möglich.

Zur Bestätigung eines Tumorverdachts (z.B. bei schmerzloser Makrohämaturie) erscheint die ALS- Fluoreszenzzystoskopie trotz der aktuellen Diskussionen derzeit als die einzige diagnostische Alternative zur Standardweißlichtzystoskopie. Der klinische Wert eines zukünftigen ausschließlich auf der LIF basierenden bildgebenden Verfahrens ist derzeit unklar. Vorstellbar wäre auch eine Kombination aus LIF- und ALS- Fluoreszenzzystoskopie mit Erhöhung der Spezifität der Fluoreszenzmethode.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der in dieser Habilitation vorgestellten Untersuchungen belegen, dass eine nicht- bzw. minimal-invasive Diagnostik des Blasenkarzinoms möglich ist. Es konnte auch gezeigt werden, dass nur die Kombination der verschiedenen diagnostischen Verfahren eine den klinischen Erfordernissen entsprechende Charakterisierung des Tumors erlaubt.

Als Vision für die Zukunft wäre die Möglichkeit einer „optischen Biopsie“, d.h. die *in vivo* Diagnostik ohne die Notwendigkeit der Gewebeentnahme, ein neuer Ansatz und hätte mehrere entscheidende Vorteile [Artikel E11]:

1. Es findet keine Zerstörung des Urothels bzw. des Karzinoms statt. Bei gleichzeitigem Einsatz schonender Therapieverfahren (z.B. Lasertherapie) bestünde kaum die Gefahr einer Tumorzellstreuung.
2. Es könnte eine unbegrenzte Anzahl von „Biopsien“ durchgeführt werden mit möglicher Verbesserung der diagnostischen Sensitivität.

3. Im Gegensatz zur herkömmlichen Endoskopie und Mikroskopie erlaubt der kombinierte Einsatz der oben beschriebenen bildgebenden Verfahren erstmals eine dreidimensionale Begutachtung des Gewebes.
4. Die Diagnostik erfolgt *in vivo* ohne Biopsie-, Fixierungs- oder Färbungsbedingte Artefakte.
5. Der diagnostische und auch der finanzielle Aufwand (Fixierung, H/E-Färbung, Personal etc.) wären geringer.
6. Die Diagnosestellung erfolgt intraoperativ. Dies hat z.B. den Vorteil, dass bei der Diagnose eines muskelinvasiven Tumors und entsprechender Indikation für die radikale Zystektomie auf eine vorherige TURB verzichtet werden könnte.
7. Durch Automatisierung könnte der diagnostische Prozess objektiviert und beschleunigt werden. Die Ergebnisse wären erstmals vergleichbar und reproduzierbar.

Nach Meinung des Autors ist die „optische Biopsie“ zur Diagnostik maligner Epithelveränderungen in der Zukunft möglich. Sinnvoll erscheint die Kombination aus einem sensitiven orientierenden Verfahren (z.B. ALA/LIF), einer *Staging*-Methode mit ausreichender Eindringtiefe (z.B. Sonographie oder OCT) und einer *Grading*-Methode mit mikroskopischer Bildauflösung (z.B. CLSM). Am Ende der Entwicklung sollte ein Multisensorendoskop stehen, welches die verschiedenen bildgebenden Verfahren in sich vereint. Der Einsatzbereich eines solchen Gerätekonzepts geht weit über den Bereich der Urologie hinaus und wird die Diagnostik und Therapie von Neoplasien in der Zukunft maßgeblich beeinflussen.

7. LITERATUR

7.1. EIGENE ARTIKEL ALS ERSTAUTOR

- E1 Koenig F, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Urinary markers of malignancy. *Clin Chim Acta* 2000, 297:191-205
- E2 Koenig F, McGovern FJ. Fluorescence detection of bladder carcinoma. *Urology* 1997, 50:778-779
- E3 Koenig F, McGovern FJ, Larne R, Enquist H, Schomacker KT, Deutsch TF. Diagnosis of bladder carcinoma using protoporphyrin IX fluorescence induced by 5-aminolevulinic acid. *Brit J Urol* 1999, 83:129-135
- E4 Koenig F, McGovern FJ, Althausen AF, Deutsch TF, Schomacker KT. Laser-induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer. *J Urol* 1996, 156:1597-1601
- E5 Koenig F, McGovern FJ, Enquist H, Larne R, Althausen AF, Deutsch TF, Schomacker KT. Autofluorescence guided biopsies for early detection of bladder carcinoma. *J Urol* 1998, 159:1871-1875
- E6 Koenig F, Larne R, Enquist H, McGovern FJ, Schomacker KT, Kollias N, Deutsch TF. Spectroscopic measurement of diffuse reflectance for enhanced detection of bladder carcinoma. *Urology* 1998, 51:342-345
- E7 Koenig F, Tearney GJ, Bouma BE. Optical coherence tomography in urology. Chapter 28 in: Tearney GJ, Bouma BE, editors. *Handbook of Optical Coherence Tomography*. Marcel Dekker, Inc. 2001, pp 725-737
- E8 König F, Loening SA. Strategien in der bildgebenden Diagnostik des Harnblasenkarzinoms. *Urologe B* 1999, 39:303-306
- E9 Koenig F, Gonzalez S, White WM, Lein M, Rajadhyaksha M. Near-infrared confocal laser scanning microscopy of bladder tissue in vivo. *Urology* 1999, 53:853-857
- E10 Koenig F, Knittel J, Schnieder L, George M, Lein M, Schnorr D. Confocal laser scanning microscopy of the urinary bladder following intravesical instillation of a fluorescent dye. *Urology* 2001 (submitted)

E11 Koenig F, Knittel J, Stepp H. Diagnosing cancer in vivo. *Science* 2001, 292:1401-1402

E12 Koenig F, Schomacker KT, McGovern FJ, Deutsch TF. United States Patent, Patent No: U.S. 6,289,236 B1 (date of patent: September 11th, 2001). Methods and apparatus for distinguishing inflamed and tumorous bladder tissue.

7.2. EIGENE ARTIKEL ALS KOAUTOR

K1 Gerhards S, Jung K, Koenig F, Daniltchenko D, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA. Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with high stage and grade bladder carcinoma. *Urology* 2001, 57:675-679

K2 Gerhards S, Jung K, Koenig F, Daniltchenko D, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA. Letter to the editor re: C.F.M. Sier et al., Enhanced urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) are associated with early-stage bladder carcinoma: a comparison with clinically used tumor markers. *Clin Cancer Res* 2001, 7:445-446

K3 Staak A, Koenig F, Daniltchenko D, Hauptmann S, Loening SA, Schnorr D, Jung K. Cathepsin B, H and L activities in urine of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2002, 59:308-312

K4 Ebeling V, König F, Loening SA. Biodistribution von 5-Aminolävulinsäure (ALA) induziertem Protoporphyrin IX (PPIX) in Zystektomiepräparaten. *Urologe A* 1999; 38:S102 (Suppl.)

K5 Riedl CR, Daniltchenko D, Koenig F, Simak R, Loening SA, Pflüger H. Fluorescence endoscopy with 5-aminolevulinic acid (ALA) reduces early recurrence rate in superficial bladder cancer. *J Urol* 2001, 165:1121-1123

7.3. FREMDLITERATUR

- 1 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999, 43 Suppl: S42-S51
- 2 Zucker S, Lysik RM, DiMassimo BI, et al. Plasma assay of gelatinase B: tissue inhibitor of metalloproteinase complexes in cancer. *Cancer* 1995, 76: 700-708
- 3 Naylor MS, Stamp GW, Davies BD, et al. Expression and activity of MMPS and their regulators in ovarian cancer. *Int J Cancer* 1994, 58: 50-56
- 4 Forsyth PA, Wong H, Laing TD, et al. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer* 1999, 79: 1828-1835
- 5 Margulies IM, Hoyhtya M, Evans C, et al. Urinary type IV collagenase: elevated levels are associated with bladder transitional cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 1992, Prev 1: 467-474
- 6 Özdemir E, Kakehi Y, Okuno H, et al. Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinomas. *J Urol* 1999, 161: 1359-1363
- 7 Hanemaaijer R, Sier CF, Visser H, et al. MMP-9 activity in urine from patients with various tumors, as measured by a novel MMP activity assay using modified urokinase as a substrate. *Ann N Y Acad Sci* 1999, 878: 141-149
- 8 Campo E, Munoz J, Miquel R, et al. Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Pathol* 1994, 145: 301-309
- 9 Ebert W, Knoch H, Werle B, et al. Prognostic value of increased lung tumor tissue cathepsin B. *Anticancer Res* 1994, 14: 895-899
- 10 Friedrich B, Jung K, Lein M, et al. Cathepsins B, H, L and cysteine protease inhibitors in malignant prostate cell lines, primary cultured prostatic cells and prostatic tissue. *Eur J Cancer* 1999, 35: 138-144
- 11 Jung K, Friedrich B, Turk I, et al: Cathepsins B, H, L and cysteine proteinase inhibitors in renal cell carcinoma: no evidence for dysregulated proteolytic balance. *J Cancer Res Clin Oncol* 124: 60-61, 1998
- 12 Ueda M. A study on cathepsin B-like substance in cancer of the urinary tract. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1995, 86: 1429-1434
- 13 Baumgartner R, Kriegmair M, Stepp HG, et al. Photodynamic diagnosis following intravesical instillation of aminolevulinic acid (ALA): first clinical experiences in urology. In Dougherty TJ editor, *Optical methods for tumor treatment and detection, Mechanisms and techniques in photodynamic therapy II*, Vol. 1881. *Proc SPIE* 1993: 20-25

- 14 Zaak D, Stepp H, Oberneder R, et al. Endoscopic detection of transitional cell carcinoma with 5-Aminolevulinic acid - Results of 1012 fluorescence endoscopies. *Urology* 2001, 57: 690-694
- 15 Tatematsu M, Cohen SM, Fukushima S, et al. Neovascularization in benign and malignant urinary bladder epithelial proliferative lesions of the rat observed in situ by scanning electron microscopy and autoradiography. *Cancer Res* 1978, 38: 1792-1800
- 16 Cohen SM, Tatematsu M, Shinohara Y, et al. Neovascularization in rats during urinary bladder carcinogenesis induced by N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide. *JNCI* 1980, 65: 145-148
- 17 Lurie AG, Tatematsu M, Nakatsuka T, et al. Anatomical and functional vascular changes in hamster cheek pouch during carcinogenesis induced by 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. *Cancer Res* 1983, 43: 5986-5994
- 18 Jaeger TM, Weidner N, Karen C, et al. Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. *J Urol* 1995, 154: 69-71
- 19 Uchida K, Akaza H. Intraluminal ultrasonography in urology; development of endoscopic ultrasonography using flexible miniature probe. *J Urol* 1999, 161: 92 (Suppl.)
- 20 Tearney GJ, Brezinski ME, Southern JF, Bouma BE, Boppart SA, Fujimoto JG. Optical biopsy in human urologic tissue using optical coherence tomography. *J Urol* 1997, 157: 1915
- 21 Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides the strongest contrast. *J Invest Dermatol* 1995, 104: 946
- 22 Knittel J, Schnieder L, Buess G, Messerschmidt B, and Possner T: Endoscope-compatible confocal microscope using a gradient index-lens system. *Opt Com* 2001, 188: 267-273

8. DANKSAGUNG UND EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Herrn Prof. Dr. S. A. Loening bin ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die gewährte Unterstützung insbesondere bei der Überwindung administrativer Hürden zu großem Dank verpflichtet. Herrn Prof. Dr. D. Schnorr danke ich für seine Hilfe sowie die Motivation und Beratung bei der Durchführung der Forschungsarbeiten.

Herrn Prof. Dr. K. Jung schulde ich für seine Unterstützung großen Dank. Auf Grund seiner wissenschaftlichen Qualifikation und Erfahrung war seine Hilfe bei den wissenschaftlichen Untersuchungen von unschätzbarem Wert.

Besonderer Dank gilt meinen amerikanischen Kollegen Prof. T. F. Deutsch und Prof. K. T. Schomacker. Ohne ihre Anleitung und Hilfe wären viele Projekte auf dem Gebiet der Grundlagenforschung nicht möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern der Forschungsabteilung sowie meinen Kollegen aus der Klinik für ihre Hilfe und ihr Verständnis danken.

Nicht zuletzt danke ich allen Koautoren der publizierten Arbeiten.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

(gemäß Habilitationsordnung der Charité)

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 16.09.2001

Dr. Frank König