

■ P. Schleier<sup>1</sup>, A. Berndt<sup>2</sup>, M. Voth<sup>3</sup>, M. Herzau<sup>3</sup>, S. Kološa<sup>1</sup>, W. Zenk<sup>1</sup>, W. Dietel<sup>4</sup>, M. Gawellek<sup>1</sup>, H. Kosmehl<sup>2</sup>

# Möglichkeiten und Grenzen der Fluoreszenzdiagnostik und photodynamischen Therapie des Mundhöhlenkarzinoms

**Problemstellung:** Die Protoporphyrin IX-Fluoreszenzdiagnostik (PpIX-FD) des Mundhöhlenkarzinoms (OSCC) zeigt eine hohe Sensitivität (96%). Die Grenzen der Methode werden gegenwärtig durch falsch positive Befunde bestimmt. Möglichkeiten zur Steigerung der Spezifität sollen untersucht werden. Die nachgewiesene Selektivität der Methode mit Akkumulation im Tumorgewebe bietet theoretisch auch die Möglichkeit zur selektiven Tumorthherapie. Die Wirksamkeit der PpIX-basierten photodynamischen Therapie am OSCC soll untersucht werden.

**Material und Methoden:** Die Probanden spülten mit 0,4%-iger Aminolävulinsäure (ALA) für 20 Minuten die Mundhöhle. Nach einem Intervall von 3 Stunden wurden die Fluoreszenzbefunde mit einer speziellen CCD-Kamera aufgezeichnet.

Am Xenotransplantat wurde die ALA-PDT mit Laserlicht interstitiell durchgeführt. Der Therapieeffekt wurde histologisch bewertet. Außerdem erfolgte der Versuch der quantitativen Erfassung der Therapiewirkung mittels Fluorodesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET).

**Ergebnisse und Schlussfolgerungen:** In vivo weisen nahezu alle oralen Plattenepithelkarzinome eine ALA-induzierte Fluoreszenz auf. Es ergeben sich jedoch auch falsch positive Befunde. Ursächlich dafür identifizierten wir eine Bakterienfluoreszenz, Strahlenfolgen der Schleimhaut nach therapeutischer Radiatio, Prothesenstomatitis und fehlerhaftes Patientenmanagement.

Die experimentelle PDT des OSCC im Tiermodell zeigt eine gute Wirksamkeit. Die Grenzen für den erfolgreichen Einsatz sind jedoch hauptsächlich durch die Eindringtiefe der ALA und des Laserlichtes bestimmt. Zum Erreichen eines adäquaten Therapieerfolges in subkutan gelegenen Tumoren ergibt sich die Notwendigkeit der interstitiellen Applikation. Dies ermöglicht einen sicheren Therapieerfolg von invasiven Anteilen des OSCC. Das OSCC auf der SCID-Maus ist mit der Methode der FDG-PET sicher nachweisbar. Allerdings gelingt mit der PET der quantitative Nachweis des zytotoxischen Effektes der ALA-PDT im frühen Intervall von 24 Stunden posttherapeutisch nicht sicher.

**Schlüsselwörter:** Fluoreszenzdiagnostik, falsch positive Befunde, photodynamische Therapie, 5-Aminolävulinsäure, orales Plattenepithelkarzinom, interstielle Laserapplikation

**Boundaries and possibilities in fluorescence diagnostic and photodynamic therapy.** *Objective:* Protoporphyrin IX fluorescence diagnosis (PpIX-FD) of oral squamous cell carcinoma (OSCC) has a high sensitivity (96%). The limitations of the method are currently determined by false positive findings, the causes of which should be defined and removed prior to wide clinical application. Possible ways of increasing the sensitivity will be investigated. The sensitivity of the method demonstrated by accu-

mulation of the photodynamically active substance protoporphyrin IX (PpIX) in the tumor tissue offers the theoretic possibility of selective tumor therapy by means of photodynamic reactions. The objective was to investigate the effectiveness of the PpIX-based photodynamic therapy (PDT) on OSCC and to define the extent of its effect.

**Material and Methods:** Probandes were asked to rinse their oral cavity with 0.4% 5-aminolevulinic acid (ALA) for 20 minutes. After an interval of 3 hours the fluorescence findings were recorded with a special CCD camera. The recorded fluorescence findings were registered in a data bank and processed for statistics. OSCC xenografts in SCID mice were used to perform interstitial ALA-PDT with laser light (water-cooled applicator system). The therapeutic effect was evaluated histologically. Furthermore, it was attempted to record the therapeutic effect quantitatively by means of fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET).

**Results and Conclusions:** Almost all oral squamous cell carcinomas exhibited an ALA-induced fluorescence in vivo. However, there were also false positive findings. As causes we identified bacterial fluorescence, radiation consequences of the mucosa after therapeutic irradiation, denture stomatitis, and incorrect patient management.

The foundation of photodynamic therapy of OSCC is the reliable accumulation of protoporphyrin in the tumor tissue. Experimental PDT of OSCC in an animal model was very effective. However, the limitations for a successful use are mainly determined by the depth of penetration of both 5-aminolevulinic acid and laser light. To achieve an adequate therapeutic success in subcutaneous tumors, interstitial application of a laser stray light applicator is necessary.

Thermal effects could be excluded by using an applicator system with internal cooling. This facilitates a potential ALA-PDT of invasive portions of OSCC. Up to about 3 mm in depth, necrosis around the puncture channel of the laser fiber could be demonstrated histologically, 3 days after ALA-PDT. The OSCC xenografts on SCID mice could be positively demonstrated with the FDG-PET method. However, quantitative detection by means of PET of the cytotoxic effect of ALA-PDT in the early interval of 24 hours after therapy was not always successful.

**Keywords:** fluorescence diagnosis, false positive findings, photodynamic therapy, oral squamous cell carcinoma, interstitial application

## 1 Einleitung

Seit über acht Jahren wird die Fluoreszenzdiagnostik (FD) in unserer Klinik im Rahmen der Tumordiagnostik des Mundhöhlenkarzinoms eingesetzt. Nach der histologischen Auswertung der FD-Befunde von ca. 340 untersuchten Patienten kann die Aminolävulinsäure (ALA)-gestützte Fluores-

<sup>1</sup> Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Prof. Dr. Dr. D. Schumann),

<sup>2</sup> Institut für Pathologie (Prof. Dr. D. Katenkamp),

<sup>3</sup> Klinik für Radiologie, Abteilung für Nuklearmedizin (Prof. Dr. D. Gottschild)

<sup>4</sup> Institut für Optik und Quantenelektronik (Prof. Dr. R. Sauerbrey), Universität Jena

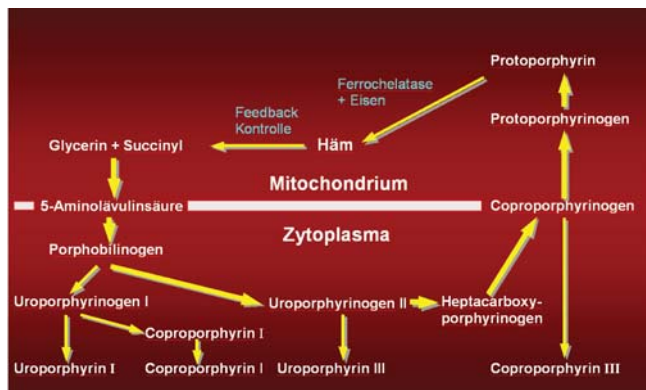


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Häm-Synthese. Die ALA ist ein Substrat auf dem Syntheseweg zum Häm über verschiedene Porphyrine.

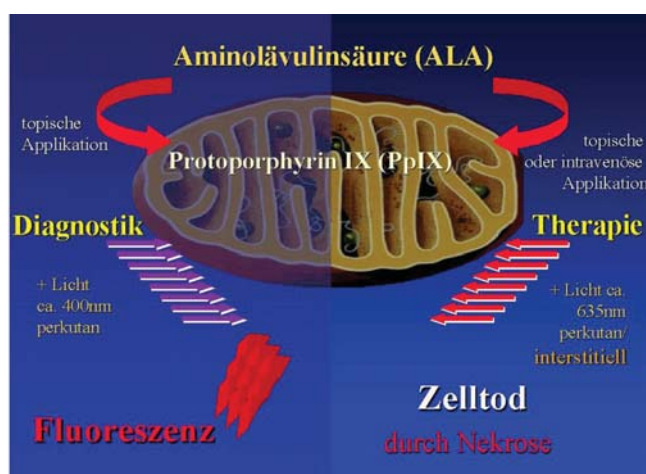


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Wirkweisen der photodynamischen Therapie und Fluoreszenzdiagnostik auf der Basis der ALA-induzierten Protoporphyrin IX-Akkumulation im Tumorgewebe.

zenzdiagnostik durch den weitestgehenden Ausschluss falsch positiver Befunde [48] als ein sicheres Verfahren zum Nachweis von Mundhöhlentumoren auch in geringer Größe und in einem frühen Stadium gelten. Die Prinzipien der Anreicherung verschiedener Sensibilisatoren in pathologischem Gewebe, photobiologische Grundlagen der Zellzerstörung bei der Bestrahlung mit Licht sowie deren Folgen als auch die Nebenwirkungen der Therapie sind in jüngster Zeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [1,2,6,7,13].

#### Wirkungsmechanismus der Fluoreszenzdiagnostik

ALA wird im Zytosol der Eukaryotenzelle über Porphobilinogen, Uroporphyrinogen in Coproporphyrinogen umgewandelt. Der weitere Syntheseweg erfolgt im intermembranösen Raum der Mitochondrien, wo Coproporphyrinogen in Protoporphyrinogen überführt wird. Die Oxidation in PpIX erfolgt an der inneren Mitochondrienmembran. Mit Hilfe des Enzyms Ferrochelatase wird durch die Bindung von Eisen(II) im Porphyrinring der Blutfarbstoff Häm gebildet. Unter physiologischen Bedingungen werden durch den negativen ‚feed back‘ nur geringe Mengen PpIX synthetisiert. Bei externer Gabe von ALA kommt es in Zellen mit geeignetem Enzymprofil unter Umgehung des Rückkopplungsmechanismus jedoch zur Akkumulation von PpIX (siehe Abb.1). Die zur Anreicherung besonders befähigten Gewebe sind

Oberflächenepithelien und Tumorgewebe [13,17], aber auch entzündlich verändertes (viral, bakteriell) oder physikalisch geschädigtes Gewebe. Der signifikante Kontrast der Akkumulation des Photosensibilisators PpIX zwischen Tumorgewebe und gesunder Umgebung macht die Nutzung der Idee einer visuellen Tumordiagnostik interessant.

Probleme treten mit der verhältnismäßig geringen Spezifität der Methode auf. Dem Ausschluss falsch positiver Befunde, insbesondere bedingt durch ALA-stimulierte Fluoreszenz von Bakterien [37] wurde in den meisten klinischen Studien wenig Bedeutung beigemessen. Der Bakterienfluoreszenz und ihre sichere Eliminierung bei dem Tumorscreening in der Mundhöhle kommt eine besondere Bedeutung zu [49].

In eigenen Untersuchungen konnten über 96% der histologisch nachgewiesenen Mundhöhlenkarzinome präoperativ über ALA-induzierte Fluoreszenz visualisiert werden. Denkbar ist daher die ALA-induzierte Akkumulation von Protoporphyrin IX (PpIX) bei Mundhöhlenkarzinomen auch als Grundlage für eine selektive photodynamische Therapie (PDT) einzusetzen (vergl. Abb. 2).

#### Photodynamische Therapien

Die photodynamische Therapie bietet die Möglichkeit der selektiven Gewebsschädigung durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge [32]. Voraussetzung ist der Einsatz eines entsprechenden Photosensibilisators, der eine hohe Spezifität zum zu schädigenden Gewebe aufweist [19]. Die PDT hat in den letzten Jahren durch die Entwicklung neuer Photosensibilisatoren an Bedeutung gewonnen. Das therapeutische Interesse ist groß [1,2,35].

Vor allem im Uro-Genitalbereich sowie im Gastro-Intestinaltrakt kam die PDT unter Verwendung von neuartigen Photosensibilisatoren gegenwärtig bis zu klinischen Anwendungsstudien [26,28,44].

Bei der Behandlung von Tumoren sind mit Photofrin (Fa. Meduna, Isernhagen, Deutschland) umfassende Erfahrungen gesammelt worden. Der entscheidende Nachteil bei der Verwendung von Photofrin liegt jedoch in der langen posttherapeutischen Lichtsensibilisierung der Haut [16,35]. Dieser Umstand fesselt den photodynamisch behandelten Patienten bis zu 6 Wochen an relative Dunkelheit. Das ist mit ein wichtiger Grund, weshalb der Methode bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt der breite Einzug in die Klinik versagt geblieben ist.

Der erfolgreiche klinische Einsatz des Photosensibilisators Foscan (Fa. Biolitec AG, Jena, Deutschland) fand in den letzten Monaten durch Zulassung in der Behandlung von Kopf-Halstumoren Bestätigung. Die Lichtsensibilisierung der Patienten verkürzt sich auf zwei Wochen. Der geringe Kontrast der Foscan-Anreicherung zwischen Tumorgewebe und der gesunden Haut macht ein aufwendiges Shielding zum Schutz der den Tumor umgebenden gesunden Haut notwendig [1,22].

Die Verwendung körpereigener Substrate wie z.B. 5-Aminolävulinsäure (ALA) vermeidet diesen offensichtlichen Nachteil. ALA unterliegt dem physiologischen Zellstoffwechsel. Die exogene Gabe von ALA induziert im Tumorgewebe eine erhöhte Anreicherung des fluoreszierenden Photosensibilisators Protoporphyrin IX (PpIX) [6,31,39]. Strahlt man mit einer geeigneten Lichtwellenlänge in das Gewebe ein, kommt es selektiv im Tumorgewebe zum Zelluntergang [14].

Die zytotoxischen Wirkungsmechanismen der PDT zur selektiven Schädigung der Tumorzelle sind physikochemisch weitgehend geklärt [33,45]. Durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge können Photonen von PpIX

absorbiert werden und den Sensibilisator anregen (sog. Singulettzustand  $S_1$ ). Beim Zurückkehren in den Ausgangszustand ( $S_0$ ) wird Energie in Form von Fluoreszenz abgegeben. Die Deaktivierung erfolgt aber auch vorzugsweise über den langlebigen Triplettzustand. Dieser ist für therapeutische Zwecke von Bedeutung, da von hier aus die photochemischen Prozesse ausgelöst werden, die zytotoxische Reaktionen nach sich ziehen [30]. Bei diesen zellzerstörenden Prozessen unterscheidet man Mechanismen von Typ I und II. Besondere Bedeutung kommt dabei dem als Typ II-Mechanismus bezeichneten Energietransferprozess zu. Der Sensibilisator PpIX deaktiviert dabei unter Energieabgabe und Bildung des zelltoxischen Singulett-Sauerstoffs zum Grundzustand  $S_0$  [17].

Der selektive zytotoxische Effekt der PDT unter Verwendung von systemisch applizierten Photosensibilisatoren (wie z.B. Photofrin, Foscan) ist an einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen [15,17,28,51]. Vor allem aber die langanhaltende posttherapeutische Lichtempfindlichkeit der äußeren Haut limitiert den klinischen Einsatz [16]. Die zytotoxische Wirkung der ALA-vermittelten photodynamischen Therapie (ALA-PDT) auf Mundhöhlentumoren zeigt klinisch praktisch keine relevanten Nebenwirkungen und ist auch in rascher Folge wiederholbar.

Kenntnisse über Wirkungsmechanismen der ALA-PDT am OSCC sowie über die Art des Zelluntergangs sind für die Optimierung der Therapiestrategie und das Monitoring des Therapieerfolges von Interesse [37,46]. Ob Mechanismen wie Apoptose und/ oder Nekrose zum Tod der Karzinomzelle führen, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Unterschiedliche Zell- und Tiermodelle (Colon-, Mamma-, Adeno- und Bronchialkarzinomzelllinien) führen gegenwärtig zu einer hohen Diversität in den Ergebnissen [3,14,31,36,45].

Aufgrund der guten Zugänglichkeit und Möglichkeit der topischen ALA-Applikation sind oberflächliche Haut- oder Schleimhautkarzinome als Modell für die ALA-induzierte PDT besonders geeignet.

Subkutan oder in tieferen Gewebsschichten gelegene Tumoren lassen sich therapeutisch durch eine perkutane Laserlichtapplikation auch bei ausreichender Akkumulation vom Photosensitizer im Gewebe nicht wirkungsvoll beeinflussen [33].

Eine Alternative stellt die intratumorale (interstitielle) Therapie mit geeigneter Wellenlänge im langwelligsten Absorptionsmaximum des Photosensibilisators dar [43]. Dieser Ansatz wird als Behandlungskonzept zur additiven Tumorthherapie diskutiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Fluoreszenzdiagnostik

#### 2.1.1 Patienten

Vom Juli 1996 bis zum August des Jahres 2001 untersuchten wir aus dem Patientengut der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie 333 Patienten mit dem Verdacht auf ein Mundhöhlenkarzinom (Geschlechtsverteilung: 119 weiblich, 214 männlich). Das Durchschnittsalter betrug 60,6 Jahre.

#### 2.1.2 Präparation und Applikation von ALA

Mindestens ein Tag vor der ALA-Applikation wird die Mundhöhle der Patienten professionell gereinigt und für den Zeitraum vor der Fluoreszenzmessung nach den Mahlzeiten mit Chlorhexidinlösung gespült.

Die ALA (Fa. MEDAC, Hamburg, Deutschland) wird als 0,4%ige wässrige Lösung eingesetzt. Unmittelbar vor ihrer Anwendung wird sie frisch zubereitet. Der pH-Wert liegt bei 2,6. Die Spülung der Mundhöhle erfolgt unter Aufsicht für die Dauer von 20 Minuten.

#### 2.1.3 Visualisierung der Tumoren

Das nach der ALA-Spülung in der Mundschleimhaut des Patienten gebildete PpIX wird mit blau-violetttem Licht (380-440 nm) zur Fluoreszenz angeregt. Diese kann im roten Spektralbereich (Fluoreszenzmaxima von PpIX bei 635 nm und 705 nm) über einen Filter mit bloßem Auge wahrgenommen werden. Die spektrale Zusammensetzung des Anregungslichtes ist so gewählt, dass das Intensitätsmaximum mit dem Absorptionsmaximum des PpIX (Maximum der Absorptionsbande bei ca. 400 nm) zusammenfällt und Rotanteile der Strahlungsquelle, die eine falsche Gewebefluoreszenz vortäuschen würden, weitestgehend unterdrückt werden (D-Light-System, Fa. Storz, Tuttlingen, Deutschland). Mit Hilfe eines Lichtleitkabels oder Endoskopes kann das Anregungslicht bequem an die zu untersuchenden Areale der Mundhöhle herangeführt werden. Die zur Beobachtung der roten Fluoreszenz gewählte Filterkombination schwächt das blau-violette Anregungslicht ab und lässt die rote PpIX-Fluoreszenz sowie die Autofluoreszenz von gesundem Gewebe (im grünen Spektralbereich) passieren, so dass die rot fluoreszierenden Areale auf einem blauen bzw. blaugrünen Hintergrund deutlich hervortreten.

Drei Stunden nach ALA-Spülung wird die Fluoreszenzuntersuchung durchgeführt. Mit einer Farb-CCD-Videokamera inklusive des entsprechenden Filtersystems erfolgt die Aufnahme der Fluoreszenzbefunde. Im Anschluss werden die analogen Bilddaten mittels Framegrapper digitalisiert und in einer Datenbank patientenbezogen gespeichert. Die Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgten immer von derselben Person.

#### 2.1.4 Probeexzision und Histologie

24 Stunden nach positiver Fluoreszenzdiagnostik wurden Probeexzisionen aus den klinisch suspekt erscheinenden Schleimhautarealen sowie den durch Fluoreszenz positiv markierten Arealen gewonnen. Die Entnahme von Schleimhaut aus den fluoreszierenden Bereichen erfolgte entsprechend dem videodokumentierten Fluoreszenzbefund. Die histologische Untersuchung der Präparate erfolgte im Institut für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Direktor: Prof. Dr. D. Katenkamp).

Alle Patienten-Bilddaten und -Befunde wurden in einer speziell konfigurierten Datenbank (MS Excel) zusammengeführt und gespeichert.

### 2.2 Photodynamische Therapie

#### 2.2.1 Xenotransplantation der OSCC

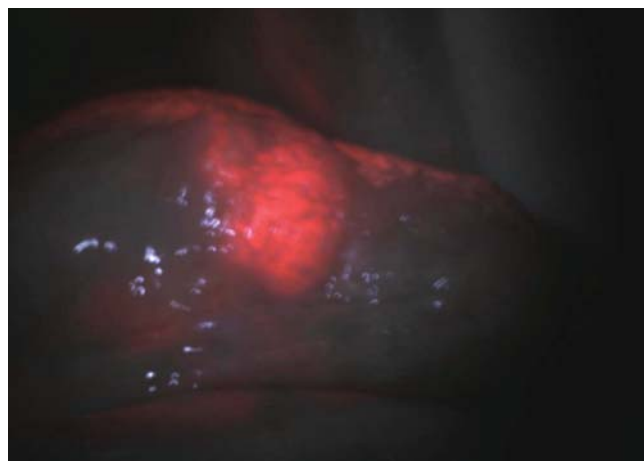
Zur Induktion von Xenotransplantaten auf der SCID-Maus wurden ca.  $5 \times 10^7$  Zellen der etablierten Zelllinien (PE/CA-PJ 34, 41 und 46) in 0,4 ml isotonischer Kochsalzlösung subkutan injiziert. Die Haltung der Tiere erfolgte unter strengen Barrierebedingungen; Futter und Wasser ad libitum.

#### 2.2.2 Experimentelle In-vivo-PDT am OSCC-SCID-Mausmodell

Bei einer Tumorgroße von 0,5 – 1cm erfolgte eine intraperitoneale Applikation von 200 mg/kg Körpergewicht ALA.



**Abbildung 3a** Intraoraler Befund eines 53-jährigen Patienten mit dem typischen Bild eines Plattenepithelkarzinoms. Es lässt sich das exulzierende Wachstum am Tumorrand von den zentral nekrotischen Arealen deutlich unterscheiden.



**Abbildung 3b** Derselbe Bildausschnitt des intraoralen Befundes in der Fluoreszenzdarstellung. Es lassen sich deutlich die Zonen des Karzinoms mit aggressivem Tumowachstum differenzieren.

Nach einer Retentionszeit von 3 Stunden wurde eine intratumorale Bestrahlung mit Laserlicht (635 nm, Diodenlaser der Fa. Biolitec AG, Jena, 750 mW, 10 min, kühlbares Applikatorsystem, 1 cm diffuser Streuapplikator, Somatex, Deutschland) unter Narkose durchgeführt. (Tierversuchsantrag Nr. 02-26/00, Thüringen). Einen therapeutischen Effekt durch evtl. auftretende Temperaturänderung an der Laserfaser Spitze wurde durch die Kontrolle der Spülflüssigkeitstemperatur ( $DT < 1^\circ K$ ) ausgeschlossen. Als Kontrolle dienten tumortragende Tiere, die ohne Gabe von ALA bestrahlt wurden. Nach 24 Stunden sowie nach 7 Tagen erfolgte die Entnahme des Tumorgewebes. 5x5x5 mm große Gewebeprobe wurden in Stickstoff-gekühltem Flüssigpropan schockgefroren und bei  $-70^\circ C$  gelagert. Korrespondierendes Tumormaterial wurde in 5% gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

### 2.2.3 Immunhistochemie

Die Bewertung des Therapieeffektes erfolgt über eine histomorphologische Analyse des Gewebes nach Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE), über eine Bestimmung der Proliferationsaktivität durch immunhistochemischen Nachweis des proliferationsassoziierten Ki-67-Antigens.

### 2.2.4. FDG-PET

Die Untersuchungen des Tumorstoffwechsels wurden am PET-Scanner Ecat Exact 922/47 (CTI/ Siemens, Knoxville, TN, USA) 24 Stunden vor und nach photodynamischer Therapie durchgeführt. Für die 2D-Messungen wurde ein Kollimator aus dünnen Wolframlamellen in das Gesichtsfeld gefahren. Zur Durchführung der Transmissionsmessung verfügt der PET-Scanner über drei Ge-68-Linienquellen mit einer Aktivität zum Zeitpunkt der Messung von jeweils etwa 150 MBq. Die quantitative PET-Untersuchung wurde 60 bis 90 Minuten nach Gabe von ca. 600 Bq F-18-Fluorodesoxyglukose unter Narkosebedingungen und vorheriger Katheterisierung durchgeführt. Für eine axiale Position wurden Emissionsdaten über einen Zeitraum von 20 Minuten und Transmissionsdaten über 5 Minuten im zweidimensionalen Modus gewonnen. Die Messung der Transmission erfolgte im Anschluss an die Emissionsmessung. Die Aktivitätswerte wurden in Bq/ injizierte Dosis/ Gewicht umgerechnet.

## 3 Ergebnisse

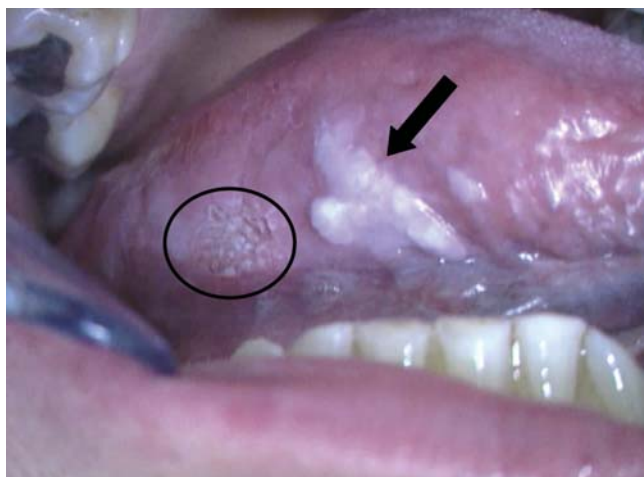
### 3.1 Fluoreszenzdiagnostik

Nahezu alle Patienten ( $n=327$ ), die mit Verdacht auf ein Mundhöhlentumor untersucht wurden, zeigten im Bereich der klinisch suspekten Schleimhautareale rote Fluoreszenzen mit dem für PpIX charakteristischen Spektrum (vergl. Abb.3a und b). Bei 104 Patienten der untersuchten Gruppe konnte die rote Fluoreszenz im klinisch suspekten Bereich histologisch als Leukoplakie differenziert werden. Die aus der markierten Schleimhaut gewonnenen Probeexzidate zeigten bei 223 Patienten histologisch ein OSCC. Es wurde eine Spezifität des Nachweises von 96% ermittelt.

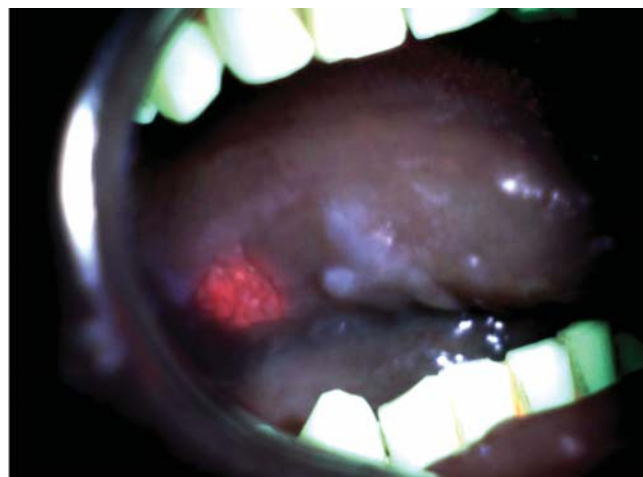
Im Ergebnis unserer Untersuchungen kann festgestellt werden, dass eine optimale Darstellung der Tumorfloreszenz im Durchschnitt 3 Stunden nach ALA-Inkubation erreicht wird. Die Fluoreszenz war bei Lichteinstrahlung über einen Beobachtungszeitraum von einigen Minuten hinreichend stabil, nimmt aber bei längerer Lichtexposition kontinuierlich ab (Photobleaching).

Bei der fluoreszenzdiagnostischen Inspektion der Mundhöhle wurden außerhalb (!) der klinisch suspekt erscheinenden Schleimhautareale weitere Gebiete mit PpIX-Fluoreszenz beobachtet. Durch nachfolgende Probeexzisionen konnte in mehreren Fällen ( $n=7$ ) bestätigt werden, dass es sich hier tatsächlich um orale Plattenepithelkarzinome handelte. Damit gewährleistet die Methode der ALA-gestützten Fluoreszenzdiagnostik das Auffinden von Tumoren, die ansonsten wegen ihrer frühen Entwicklungsphase oder ihrer geringen Ausdehnung nicht diagnostiziert werden können (vergl. Abb.4a und b).

Häufig ergab jedoch die histologische Untersuchung rot fluoreszierender Areale ohne klinisch suspekten Befund keinen Hinweis auf ein malignes Geschehen. Hierbei waren Regionen wie der Zungenrücken, der Gingivasaum von parodontal geschädigten Zähnen und die Tonsillen auffällig. Die falsch positiven Befunde, die hauptsächlich der Bakterienfluoreszenz zuzuordnen waren, zeigten eine um das Vielfache erhöhte Intensität der PpIX-Fluoreszenz im Vergleich zum Tumorgewebe [48]. Diese kann durch geeignete antiseptische Vorbehandlungen der Mundhöhle unterdrückt werden. Einem mit der Methode der FD vertrauten Untersucher ist anhand des optischen Eindrucks eine Differenzierung zwischen malignen Fluoreszenz-



**Abbildung 4a** Intraoraler Befund eines 46-jährigen Patienten mit dem typischen Bild einer erosiven Leukoplakie des rechten Zungenrandes (Pfeil). Distal der Leukoplakie ist ein flaches Ulkus bei genauer Betrachtung erkennbar (Kreis).



**Abbildung 4b** Im Fluoreszenzbild tritt der klinisch unscheinbare Befund deutlich ins Blickfeld. Eine Abgrenzung der in der histologischen Untersuchung nach Exzision als Karzinom bewerteten Schleimhaut von der Leukoplakie ist sicher möglich.

befunden und entzündlichen Schleimhautveränderungen möglich.

### 3.2 SCID-Mausmodell

Von den für die In-vitro-Versuche ausgewählten Zelllinien zeigte PE/CA-PJ34 eine reproduzierbare Tumorigenität auf der Nacktmaus. Ein Tumorwachstum der xenotransplantierten Zelllinien war nach 3 bis 6 Wochen zu beobachten. Die histologische Aufarbeitung der Tumoren zeigte das typische Muster von Plattenepithelkarzinomen: in Nestern und Strängen wachsende dysplastische Plattenepithelien mit plumper Invasion in das umgebende Muskel- und Fettgewebe. Bei einem Tumordurchmesser von ca. 1 cm wurde die Therapie begonnen. 24 h nach intratumoraler Bestrahlung xenotransplantierte ALA-inokulierter OSCC der Versuchstiere fanden sich keine deutlichen histomorphologischen Veränderungen im (HE)-Schnitt. Gegenüber den Kontrollen war eine leichte Abnahme der Zahl proliferierender Zellen zu verzeichnen. Während die Tumoren der Kontrolltiere multinodal weiter wuchsen und keine Abnahme der Proliferationsaktivität aufwiesen, zeigten die Tumoren der behandelten Tiere auch 7 Tage nach Bestrahlung keine Größenzunahme. Histologisch war das Resttumorgewebe durch ausgedehnte Nekroseareale charakterisiert.

### 3.3 FDG-PET

In den prä- und posttherapeutischen FDG-PET-Untersuchungen konnte eine deutliche Zuordnung der Xenotransplantate auf den Tieren, als Ausdruck eines erhöhten Zuckerstoffwechsels der OSCC-Tumoren erfolgen. Die Messwerte sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Der Nachweis der Xenotransplantate auf den Tieren gelang und war sicher reproduzierbar. Die quantitativen Analysen der PDT-Wirkung durch Vergleich der 24 Stunden prä- und posttherapeutisch durchgeführten FDG-PET lieferten jedoch keine signifikanten Änderungen im Zuckerstoffwechsel der untersuchten Tiere. Im frühen Intervall 24 Stunden nach der ALA-PDT konnte ein Therapieeffekt durch die FDG-PET noch nicht nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

Der pathologisch erhöhte Stoffwechsel einer maligne entarteten Zelllinie führt bei lokaler (topischer) oder systemischer

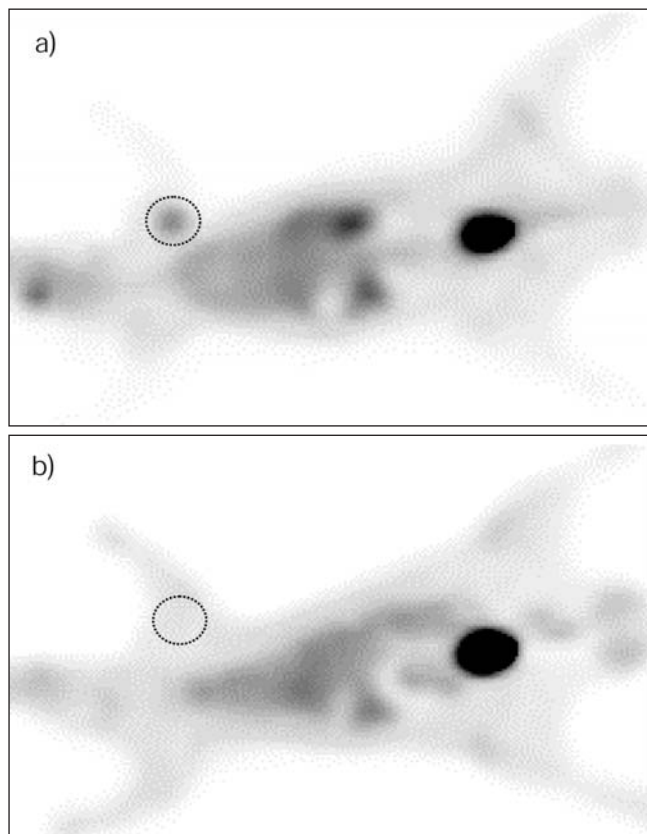
Gabe von dem körpereigenen Substrat ALA zu einer Anreicherung von PpIX. Dabei ist ein deutlich sichtbarer Kontrast zwischen gesundem und malignem Gewebe vorhanden [39]. Das Maximum der Gewebefluoreszenz kann nach drei Stunden beobachtet werden. Ein Grund für eine vermehrte Aufnahme von ALA in die Tumorzelle ist in der veränderten Tumorzelloberfläche und dem umgebenden Stroma zu finden [13].

Alternativ wurde in der Vergangenheit versucht, suspekta Schleimhautareale mit tumorselektiven Farbstoffen zu markieren. *Silverman* färbte 1987 Mundhöhlenkarzinome mit 1%igem Toluidin-Blau [38]. Es können nach einmaligem Anfärben falsch positive Ergebnisse in bis zu 24% der Fälle auftreten. Parakeratosen und submuköse Veränderungen können mit dieser Methode nicht differenziert werden. Entzündliche Veränderungen färben sich genau so wie Ulzera blau an. Bei einer Wiederholung der Untersuchung nach 2 Wochen muss mit 11% falsch positiven Ergebnissen gerechnet werden [34].

*Epstein* und Mitarbeiter versuchten 1992 mittels tumorselektiven Farbstoffen bei 59 Patienten Tumoren oder Präkanzerosen der Mundhöhle anzufärben. Dabei verwendeten sie eine Kombination von Lugolscher Lösung und Toluidin-Blau. Diese Methode besitzt eine relativ hohe Sensitivität von 95%. Die ungenügende Spezifität von 57% ist wohl die Ursache dafür, dass dieses Verfahren bis heute kaum Anwendung in der Praxis findet [10].

	Tumor	Laser 635 nm	ALA-Applikation	1.FDG-PET Aktivität(Bq)/inj.	2.FDG-PET Dosis/Gewicht
Maus 1	ZL 34	+	+	37,9	34,4
Maus 2	ZL 34	+	+	27,2	25,5
Maus 3	ZL 34	+		20,1	21,3
Maus 4	ZL 34	+	+	30,3	tot
Maus 5	ZL 34	+		24,4	tot
Maus 6	ZL 34	+		26,8	tot
Maus 7		+	+	14,1	17,0
Maus 8		+	+	13,6	16,4
Maus 9		+		14,6	21,9
Maus 10		+		15,2	18,1

**Tabelle 1** FDG-PET-Messdaten der prä- und posttherapeutischen Untersuchungen



**Abbildung 5** Die Abbildungen zeigen FDG-PET-Befunde einer SCID-Maus vor der ALA-PDT (a) und 4 Wochen nach der Therapie (b).

Eine Akkumulation von PpIX nach ALA-Applikation findet sich auch in anderweitig pathologisch verändertem Gewebe und ist zum Teil für falsch positive Befunde verantwortlich. Wir fanden falsch positive Befunde bei Patienten mit

1. schlechter Mundhygiene,
2. bei Patienten, die nach der ALA-Spülung die Nahrungskarenz nicht eingehalten hatten, sowie
3. bei Patienten, bei denen eine Strahlentherapie im orofazialen Bereich vorausgegangen war.

Aus den Regionen mit starker Fluoreszenz bei fehlendem klinischen Korrelat konnte über die Untersuchungen der mikrobiologischen Abstriche ein breites Keimspektrum von bekannten Mikroorganismen (Plaque) differenziert werden [49]. Bei Anregung mit blauem Licht zeigten eine Reihe von Mikroorganismen eine rote Fluoreszenz, die spektroskopisch als Porphyrin-Fluoreszenz identifiziert werden konnte. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Doss [8], dass sich durch ALA-Inkubation bei verschiedenen Bakterienstämmen die Bildung von unterschiedlichen Porphyrinen beobachten lässt. Auch ohne ALA-Inkubation konnte von Bakterien verursachte Porphyrin-Fluoreszenz in der Mundhöhle von anderen Autoren nachgewiesen werden [9,21]. Diese Untersuchungen unterstreichen unsere Feststellung, dass Mikroorganismen der Mundflora nach ALA-Inkubation PpIX bilden können und somit auch für falsch positive Fluoreszenzbefunde verantwortlich gemacht werden können [48]. Zur Reduzierung des Einflusses der Bakterienflora wurde die Mundhöhle der Patienten ca. 1 Stunde vor der ALA-Applikation professionell gereinigt und desinfiziert.

Die durch diese Maßnahmen erzielte signifikante Reduktion der PpIX-Bakterienfluoreszenz veranlasst dazu, mindestens 24 Stunden vor jeder fluoreszenzdiagnostischen Unter-

suchung die Patienten mit Chlorhexidinlösung spülen zu lassen. Nach der Eliminierung der Bakterienfluoreszenz werden die Infiltrationszonen des Tumors mit den besonders stoffwechselaktiven Zellkomplexen deutlich markiert [48].

Die zweite Ursache für falsch positive Fluoreszenzbefunde, die Nahrungsaufnahme im Intervall zwischen der ALA-Spülung und der Fluoreszenzdiagnostik lässt sich durch sachliche Aufklärung der Patienten und ein straffes Patientenmanagement vermeiden. Bereits eine geringe Menge Glukose kann den Stoffwechsel in den Zellen beeinflussen [7]. Damit ist eine verstärkte Bildung von PpIX in der normalen Mundschleimhaut und auch in Mikroorganismen der Mundflora möglich.

Eine dritte Ursache für eine falsch positive Fluoreszenz stellt nach unseren Untersuchungen der Einfluss ionisierender Strahlung dar. Bei therapeutisch im orofazialen System bestrahlten Patienten beobachteten wir für die gesamte im Strahlungsfeld liegende Schleimhaut eine kräftige, gleichmäßige Fluoreszenz mit einem typischen PpIX-Fluoreszenzspektrum. Das durch die Strahlen geschädigte Gewebe hat grundlegende Veränderung erfahren, die offensichtlich zu einer verstärkten PpIX-Fluoreszenz führen. Die erhöhte Anreicherung von PpIX könnte einerseits durch entzündliche Veränderung des Gewebes verursacht sein. Denkbar ist zum Beispiel, dass eine Hyperpermeabilität der Blutkapillaren und der gesteigerte Zellstoffwechsel zu einer verstärkten Aufnahme von ALA führen. Andererseits spielt sicherlich das Sikkasyndrom mit der veränderten Keimflora nach Radiatio eine Rolle. Aus diesem Grund ist die Methode der Fluoreszenzdiagnostik aus unserer Sicht gegenwärtig nicht für eine Rezidivdiagnostik bei zuvor bestrahlten Patienten tauglich [49].

Die Darstellung von submukösen Tumorausläufern ist abhängig von ihrer Tiefe und auch der Wellenlänge des Anregungslichtes [16]. Gewöhnlich wird die Fluoreszenz mit blauem Licht angeregt (Einstrahlung ins Absorptionsmaximum von PpIX).

Die Eindringtiefe des Lichtes, definiert als die Gewebetiefe, bei der die eingestrahelte Lichtintensität auf  $1/e \approx 0,368$  d.h. auf ca. 37% der Ausgangsintensität abgefallen ist, beträgt für Licht der Wellenlänge 635 nm ca. 2–2,5 mm [40], während die Eindringtiefe des blauen Anregungslichtes (ca. 400 nm) nur noch Bruchteile von Millimetern beträgt. Die Eindringtiefe des Lichtes dieser Wellenlängen erlaubt demnach keine Darstellung subdermal-/mukös gelegener Tumoren.

Die zuverlässige Markierung von Mundhöhlentumoren durch exogene Gabe von ALA auf der Basis der spezifischen Akkumulation von PpIX im Tumorgewebe bildet die Grundlage zur Anwendung der photodynamischen Therapie [48]. Sie könnte sich als additive Methode in das Therapieprotokoll der Mundhöhlenkarzinome eingliedern [11].

Bei topischer Applikation von ALA in die Mundhöhle wird eine Bildung von PpIX nur in Gewebetiefen von weniger als 1 mm gefunden [25]. Die lokale Applikation von lipophileren ALA-Estern hingegen zeigt bei 16%iger Konzentration im Basalzellkarzinom eine PpIX-Formation bis zu einer Tiefe von maximal 2 mm [33].

Proportional zur Gewebetiefe nimmt die Intensität des Lichtes ab und unterschreitet bei konstanter Applikationszeit je nach Photosensibilisator und eingestrahelter Wellenlänge in wenigen Millimetern Tiefe die Wirkdosis [28]. Deshalb wird eine wirkungsvolle photodynamische Therapie gegenwärtig hauptsächlich bei oberflächlich gelegenen Tumoren der äußeren Haut und Schleimhaut erfolgreich praktiziert [26,35,42,46]. Die von uns ermittelte maximale

Nekrosentiefe nach der ALA-PDT wurde mit 2 mm bestimmt und stellt damit die Grenze für den sicheren Therapieerfolg dar [4].

Bei indikationsgerechter Anwendung der ALA-PDT wird generell über sehr gute Ergebnisse berichtet [11,15]. Eine interessante Anwendungsmöglichkeit bei topischer Applikation der ALA findet sich vor allem bei Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand oder häufig rezidivierenden Tumoren der äußeren Haut mit genetisch determiniertem Tumorwachstum (z.B. Gorlin-Goltz-Syndrom). Die konventionelle chirurgische Therapie stößt hier an ihre Grenzen. Weiterhin sehen wir bei Patienten, die nach einer Organtransplantation einer immunsuppressiven Therapie unterworfen sind, die Indikation für die ALA-PDT der häufig schnell wachsenden und multifokal auftretenden Tumoren der äußeren Haut.

Betroffen sind bei dieser Patientenklientel besonders Hautbereiche, die der UV-Strahlung ausgesetzt sind, in erster Linie das Gesicht. Wegen der geringen Infiltrationstiefe der Tumoren eignen sich diese Patienten besonders für eine ALA-PDT.

Die Vorteile der ALA-PDT liegen neben der topischen Applikationsform in der fehlenden Photosensibilisierung, dem einfachen Patientenmanagement und der Freiheit von Nebenwirkungen.

Die weit überwiegende Mehrheit der oralen Karzinome weist ein invasives Wachstum in die Tiefe auf und gelangt in einer fortgeschrittenen T-Kategorie zur chirurgischen Therapie. Die große Invasionsstiefe schließt bei der Mehrzahl der oralen Karzinome und topischer Gabe des Photosensibilisators bei oberflächlicher Bestrahlung eine alleinige kurative ALA-PDT aus [47,16].

Alternativ eröffnet sich bei der interstitiellen Anwendung der ALA-PDT ein breiteres therapeutisches Spektrum.

Die Idee der interstitiellen Lichtapplikation in der Tumorthherapie ist etabliert [12,41]. Ein therapeutischer Effekt ist jedoch noch oft mit einem thermischen Effekt verbunden, der unkontrollierte Nekrosen verursachen kann [24,17]. Durch Kühlung des Applikatorsystems lässt sich eine Thermokoagulation des Gewebes wirkungsvoll ausschließen. Dies ist hauptsächlich für die experimentelle Therapie notwendig, um den Therapieeffekt der photodynamischen Reaktion zu bestimmen. Die thermischen Effekte der Laserlichtapplikation führten ohne Kühlung zur Ausbildung einer Karbonisierungsschicht um die Laserfaser. Durch permanente Faserkühlung konnte der alleinige photodynamische zytotoxische Effekt der interstitiellen PpIX-vermittelten Therapie in unseren Untersuchungen am OSCC-Nacktmausmodell histologisch belegt werden. Die 7 Tage nach ALA-PDT ausgeführte histologische Therapiekontrolle bestätigt eine ausgedehnte Zone avitalen Tumorgewebes und eine Reduktion der Proliferation im verbliebenen strukturel erhaltenen Tumorrestgewebe. Für die auf der Nacktmaus etablierten Tumoren konnte gezeigt werden, dass die zytotoxischen Mechanismen der PDT zu einem Zelltod über Nekrose und nicht zur Apoptose führen. Es sind die OSCC-Zellen in ihrer therapeutischen Antwort somit anderen Karzinomzelltypen, wie verschiedene gynäkologische Tumoren, Kolonkarzinom [29] und Blasenkarzinom [18] vergleichbar. Damit ist der Nachweis des therapeutischen Effektes der ALA-interstitiellen-PDT für das OSCC erbracht.

In der Auswertung der Ergebnisse aller PET-Untersuchungen zum Monitoring der PDT-Effektivität konnte ein deutlicher Nachweis der Xenotransplantate auf den Tieren erbracht werden (vergl. Abb.5a und b). Vergleichbare tierexperimentelle Untersuchungen am OSCC finden sich

gegenwärtig nicht. Jedoch sind andere Tumoren (Colon-, Mamma-, Adeno- und Bronchialkarzinomzelllinien) als Transplantate auf Wirtstieren mit verschiedenen Radioisotopen nachgewiesen worden [20,27,50]. Die quantitativen Analysen der PDT-Wirkung im Befund der Positronen-Emissions-Tomographie konnten allerdings keine reproduzierbaren Aussagen über den Effekt der PDT liefern. Das widerspricht deutlich den Erwartungen und Aussagen anderer Autoren [5,23] und den oben dargestellten histologischen Befunden. Eine Korrelation zum histologischen Bild mit ausgedehnten Tumornekrosen war nicht zu finden. Ursächlich dafür sehen wir den sehr frühen Zeitpunkt der posttherapeutischen Untersuchung. Eine Überlagerung des Therapieeffektes hervorgerufen durch Entzündungsreaktionen erscheint möglich. Die Schwierigkeit ergibt sich in der posttherapeutischen Gewebsreaktion, die als lokale Entzündung vom Tumor schwer zu differenzieren ist [50]. Weitere Untersuchungen zur Klärung dieses Problems unter Verwendung anderer sensitiver Radioisotope sind in Vorbereitung.

## 5 Literatur

- Andrejevic Blant, S., Woodtli, A., Wagnieres, G., Fontollet, C., van den Bergh, H., Monnier, P.: Interstitial photodynamic therapy with tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin: tumor versus striated muscle damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42, 403 (1998)
- Barriere, H., Dreno, B., Patrice, T.: The laser in dermatology. *Critical study of 63 cases.* *Sem Hop* 599, 628 (1983)
- Bech, O., Phillips, D., Moan, J., MacRobert, A.J.: A hydroxypyridone (CP94) enhances protoporphyrin IX formation in 5-aminolevulinic acid treated cells. *J Photochem Photobiol B* 41 (1-2), 136 (1997)
- Berndt, A., Hyckel, P., Könneker, A., Katenkamp, D., Kosmehl, H.: Oral squamous cell carcinoma is associated with a laminin-5 matrix re-organization but independent of basement membrane and hemidesmosome formation. Clues from an in vitro invasion model. *Invas Metast* 17, 251 (1997)
- Coleman, R., DeGrado, T., Wang, S., Baldwin, S., Orr, M., Reiman, R., Price, D.: Preliminary Evaluation of F-18 Fluorocholine (FCH) as a PET Tumor Imaging Agent. *Clin Positron Imaging*, Jul 3(4),147 (2000)
- de Blois, A.W., Thissen, M.R., de Bruijn, H.S., Grouls, R.J., Dutrieux, R.P., Robinson, D.J., Neumann, H.A.: In vivo pharmacokinetics of protoporphyrin IX accumulation following intracutaneous injection of 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B* 61 (1-2), 21 (2001)
- Dietel, W., Bolsen, K., Dickson, E., Fritsch, C., Pottier, R., Wendenburg, R.: Formation of water-soluble porphyrins and protoporphyrin IX in  $\delta$ -Aminolevulinic acid-incubated carcinoma cells. *J Photochem Photobiol B* 33(3), 225 (1996)
- Doss, M., Philipp-Dormstrom, W.K.: Porphyrin and heme biosynthesis from endogenous 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter metalcaligenes*. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* 352, 725 (1971)
- Doss, M., Philipp-Dormstro, W.: Comparison of Porphyrin and Heme biosynthesis in various heterotrophic. *Enzym* 16, 57 (1973)
- Epstein, J., Scully, C., Spinelly, J.: Toluidine blue and Lugols iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. *J Oral Pathol Med* 21,160 (1992)
- Fan, K.F., Hopper, C., Speight, P.M., Buonaccorsi, G., MacRobert, A.J., Bown, S.G.: Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid for premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Cancer* 78, 1374 (1996)
- Fielding, D.I., Buonaccorsi, G.A., MacRobert, A.J., Hanby, A.M., Hetzel, M.R., Bown, S.G.: Fine-needle interstitial photodynamic therapy of the lung parenchyma: photosensitizer distribution and morphologic effects of treatment. *Chest* 11(2), 502 (1999)
- Fritsch, C., Lehmann, P., Stahl, W., Schulte, K.W., Blohm, E., Lang, K., Sies, H., Ruzicka, T.: Optimum porphyrin accumulation in epithelial skin tumours and psoriatic lesions after topical application of delta-aminolevulinic acid. *Br J Cancer* 79, 1603 (1999)
- Gad, F., Viau, G., Boushira, M., Bertrand, R., Bissonnette, R.: Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induces apoptosis and caspase activation in malignant T cells. *J Cutan Med Surg* 5, 8 (2001)
- Gossner, L., Stolte, M., Sroka, R., May, A., Hahn, E.G., Ell, C.: Photodynamic therapy of early squamous epithelial carcinomas and severe squamous epithelial dysplasias of the esophagus with 5-aminolevulinic acid. *Z Gastroenterol* 36, 19 (1998)
- Herzog, M., Horch, H.H., Senekowitsch, R., Schröder, E.: Experimentelle Untersuchung zur Laser-Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms nach tumorselektiver Photosensibilisierung mit Hämatoporphyrin-Derivat (HpD)-Vorläufige Mitteilung. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 11, 18 (1987)
- Herzog, M., Moser, J., Wagner, B., Broecker, J.: Shielding effect and hypoxia in photodynamic therapy. *Int J Oral Maxillofac Surg* 23, 406 (1992)
- Jocham, D.: Photodynamic procedures in urology. *Urologe A* 33, 547 (1994)
- Kennedy, J.C., Pottier, R.H., Pross, D.C.: Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *Photochem Photobiol* 6, 143 (1990)

20. Kern, K.A.: [<sup>14</sup>C]deoxyglucose uptake and imaging in malignant melanoma. *J Surg Res* 50(6), 643 (1991)
21. König, K., Flemming, G., Hibst, R.: Laser-induced autofluorescence spectroscopy of dental caries. *Cell Mol Biol* 44(8), 1293 (1998)
22. Kübler, A.C., de Carpentier, J., Hopper, C., Leonard, A.G., Putnam, G.: Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30, 504 (2001)
23. Lapointe, D., Brasseur, N., Cadorette, J., La Madeleine, C., Rodrigue, S., van Lier, J.E., Lecomte, R.: High-resolution PET imaging for in vivo monitoring of tumor response after photodynamic therapy in mice. *J Nucl Med* 40(5), 876 (1999)
24. Lee, L.K., Whitehurst, C., Pantelides, M.L., Moore, J.V.: An interstitial light assembly for photodynamic therapy in prostatic carcinoma. *Br J Urol Int. Nov* 84(7), 821 (1999)
25. Leunig, A., Mehlmann, M., Betz, C., Stepp, H., Arbogast, S., Grevers, G., Baumgartner, R.: Fluorescence staining of oral cancer using a topical application of 5-aminolevulinic acid: fluorescence microscopic studies. *J Photochem Photobiol B* 60, 44 (2001)
26. Lippert, B.M., Werner, J.A., Gorogh, T.: Anthracycline derivatives as photosensitizing agents in photodynamic laser therapy. *Laryngorhinologie* 72, 63 (1993)
27. Lorke, D.E., Kruger, M., Buchert, R., Bohuslavizki, K.H., Clausen, M., Schumacher, U.: In vitro and in vivo tracer characteristics of an established multidrug-resistant human colon cancer cell line. *J Nucl Med* 42(4), 646 (2001)
28. Messmann, H., Geisler, M., Gross, U., Abels, C., Szeimies, R.M., Steinbach, P., Knuche, R., Doss, M., Scholmerich, J., Holstege, A.: Influence of a haemato-porphyrin derivative on the protoporphyrin IX synthesis and photodynamic effect after 5-aminolevulinic acid sensitization in human colon carcinoma cells. *Br J Cancer* 76, 878 (1997)
29. Mlkvy, P., Messmann, H., Regula, J., Conio, M., Pauer, M., Millson, C.E., MacRobert, A.J., Bown, S.G.: Sensitization and photodynamic therapy (PDT) of gastrointestinal tumors with 5-aminolevulinic acid (ALA) induced protoporphyrin IX (PPIX). A pilot study. *Neoplasma* 42, 109 (1995)
30. Nauta, J.M., Van Leengoed, H.L., Star, W.M., Roodenburg, J.L., Witjes, M.J., Vermey, A.: Photodynamic therapy of oral cancer. A review of basic mechanisms and clinical applications. *Eur J Oral Sci* 104, 69 (1996)
31. Noodt, B.B., Berg, K., Stokke, T., Peng, Q., Nesland, J.M.: Apoptosis and necrosis induced with light and ALA-derived protoporphyrin IX. *Br J Cancer* 74, 22 (1996)
32. Pass, H.I.: Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst* 85, 443 (1993)
33. Peng, Q., Soler, A.M., Warloe, T., Nesland, J.M., Giercksky, K.E.: Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B* 62, 140 (2001)
34. Reichart, P.A.: Toluidinblau-Lösung kann die Diagnose unterstützen. *Zahnärztl Mitt* 88 (4), 55 (1998)
35. Savery, J.F., Monnier, C.H., Fontolliet, J., Mizeret, G., van den Bergh, H.: Photodynamic therapy of early squamous cell carcinomas of oesophagus, bronchi and mouth with a second generation photosensitizer, meta-tetrahydroxyphe-nyl-chlorin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123, 162 (1997)
36. Schleier, P., Berndt, A., Berndt, Angela, Dahse, R., Zenk, W., Hycckel, P., Kosmehl, H.: Experimentelle 5-Aminolävulinsäure-induzierte photodynamische Therapie (ALA-PDT) oraler Karzinome: Ein Verfahren zur Behandlung solider Tumoren und Aufklärung des Zelltodes. *Mund Kiefer GesichtsChir* 2, 76 (2001)
37. Schleier, P., Zenk, W., Dietel, W.: Stellenwert der ALA-induzierten Protoporphyrin-Fluoreszenz in der Diagnostik des Mundhöhlenkarzinoms. *Dtsch Zahnärztl Z* 54, Supplement 23 (1999)
38. Silverman, S.: Early diagnosis of oral cancer. *Cancer* 62, 1796 (1988)
39. Sroka, R., Beyer, W., Gossner, L., Sassy, T., Stocker, S., Baumgartner, R.: Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic-acid-induced porphyrins in tumour-bearing mice. *J Photochem Photobiol B* 34(1), 13 (1996)
40. Stolik, S., Delgado, J.A., Perez, A., Anasagasti, L.: Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human "ex vivo" tissues. *J Photochem Photobiol B* 57(2-3), 90 (2000)
41. Suhr, M.A., Hopper, C., MacRobert, A.J., Speight, P.M., Kübler, A.C., Kunz, L.: Klinische Pilotstudie zur interstitiellen photodynamischen Therapie für die Behandlung von fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren. *Mund Kiefer GesichtsChir* 5, 277 (2001)
42. Tan, W.C., Fulljames, C., Stone, N., Dix, A.J., Shepherd, N., Roberts, D.J., Brown, S.B., Krasner, N., Barr, H.: Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid for oesophageal adenocarcinoma associated with Barrett's metaplasia. *J Photochem Photobiol B* 53, 75 (1999)
43. Tanaka, H., Hashimoto, K., Yamada, I., Masumoto, K., Ohsawa, T., Murai, M., Hirano, T.: Interstitial photodynamic therapy with rotating and reciprocating optical fibers. *Cancer* 91(9), 1791 (2001)
44. van Hillegersberg, R., Marijnissen, J.P., Kort, W.J., Zondervan, P.E., Terpstra, O.T., Star, W.M.: Interstitial photodynamic therapy in a rat liver metastasis model. *Br J Cancer* 66, 1005 (1992)
45. Webber, J., Luo, Y., Crilly, R., Fromm, D., Kessel, D.: An apoptotic response to photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin in vivo. *Photochem Photobiol* 35, 209 (1996)
46. Wenig, B.L., Kurtzman, D.M., Grossweiner, L., Mafee, M.F., Harris, D.M.: Photodynamic therapy in the treatment of squamous cell carcinoma of head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 116, 1267 (1990)
47. Wolf, P.: Photodynamische Therapie - Grundlagen und klinische Anwendung in der Dermatologie. *Dtsch Ärztl Z* 22, 1493 (1999)
48. Zenk, W., Dietel, W., Schleier, P., Günzel, S.: Visualisierung von Karzinomen der Mundhöhle durch Stimulierung der Synthese von fluoreszierendem Protoporphyrin IX. *Mund Kiefer GesichtsChir* 3, 205 (1999)
49. Zenk, W., Schleier, P.: Laserfluoreszenzdiagnostik steigert Überlebensrate. Grundlagen, praktisches Vorgehen, Fallbeispiele. *Laser J* 1, 6 (2001)
50. Zhuang, H., Pourdehnad, M., Lambright, E.S., Yamamoto, A.J., Lanuti, M., Li, P., Mozley, P.D., Rossman, M.D., Albelda, S.M., Alavi, A.: Dual time point (18)F-fdg pet imaging for differentiating malignant from inflammatory processes. *J Nucl Med* 42(9), 1412 (2001)
51. Ziolkowski, P., Symonowicz, K., Osiecka, B.J., Rabczinski, J.: 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy of transplantable Colon adenocarcinoma in BALB/c mice. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 46, 301 (1998)

Manuskript eingegangen: 7.09.03  
 Manuskript angenommen: 11.01.04

■ **Korrespondenzadresse:**

**OA Dr. P. Schleier,**  
 Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
 der Friedrich-Schiller-Universität,  
 An der alten Post 4,  
 D-07740 Jena  
 E-mail: Peter.Schleier@med.uni-jena.de