Физические аспекты использования фотодинамической терапии при хроническом кандидозном вульвовагините

К.О.Асланян[1], И.А.Аполихина[1, 2], Т.А.Тетерина[2], М.Н.Холодцова[3]
[1]Кафедра акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии ИПО ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России;
[2]ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова Минздрава России;
[3]ИОФ РАН Лаборатория лазерной биоспектроскопии Universite de Lorraiene, CRAN, ENSEM, Франция

Резюме
Целью исследования являлось изучение кинетики накопления 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) – индуцированного протопорфирина IX в слизистой кожи, влагалища и вульвы у женщин с хроническим вульвовагинальным кандидозом после применения препарата 5-АЛК и выбор оптимальных временных режимов проведения флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии (ФДТ) при хроническом вульвовагинальном кандидозе. В исследовании приняли участие 60 пациенток: 20 с вульвовагинальным кандидозом, 25 – с бактериальным вагинозом и 15 – с неспецифическим вагинитом, которым проводилось по 4 сеанса ФДТ. Перед каждым сеансом ФДТ и после были сняты спектры флюоресценции фотосенсибилизатора, который накапливался во влагалище и вульве у пациенток при аппликативном применении геля 5-АЛК, индуцирующего селективное накопление протопорфирина IX. С помощью метода локальной флюоресцентной спектроскопии показано, что различие между накоплением фотосенсибилизатора до сеанса в разных тканях и между 1, 2, 3 и 4-м сеансами статистически значимо (p<0,01). Отмечается, что после 4-го сеанса не было отличий накопления фотосенсибилизатора в слизистой влагалища больных хроническим вульвовагинальным кандидозом и здоровой ткани, таким образом, возможно сделать вывод о высокой эффективности проведенной терапии.
Ключевые слова: *фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, флюоресценция, протопорфирин IX, 5-аминолевулиновая кислота, хронический вульвовагинальный кандидоз.*

Physical aspects of photodinamic therapy application to chronic vulvovaginal candidiasis

K.O.Aslanyan, I.A.Apolikhona, T.A.Teterina, M.N.Kholodtsova

Summary
The aim of the presented research was investigation of induced by 5-ALA PPIX accumulation kinetics in mucosa, vagina and vulva chronic in women with vulvovaginal candidiasis after treatment of 5-ALA and the choice of optimal time mode of fluorescence diagnosis and photodynamic therapy (PDT) in chronic vulvovaginal candidiasis. The investigation was held in group of 60 women: 20 with vulvovaginal candidiasis, 25 – bacterial vaginosis, 15 – nonspecific vaginitis. Each woman had 4 sessions of PDT. Before and after each of the sessions fluorescence diagnosis (FD) of photosensitizer accumulated in mucosa, vagina and vulva was performed. By means of local fluorescent spectroscopy difference of accumulated PPIX was estimated with statistical methods. It was obtained, that difference between accumulation of PPIX after 1, 2, 3 and 4th session is statistically significant. After the 4th session it was estimated that there is no significant statistical difference between PPIX accumulated in healthy tissue and mucosa of vagina. According to this we concluded, that PDT in this case showed high efficiency.
Key words: *photodynamic therapy, photosensitizer, fluorescence, protopotphirin IX, 5-aminolevulinic acid, chronic vulvovaginal candidiasis.*

Сведения об авторах
Асланян Кристина Овиковна – аспирант каф. акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии ИПО ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова. E-mail: k_aslanyan@inbox.ru
Аполихина Инна Анатольевна – д-р мед. наук, рук. гинекологического отд-ния восстановительного лечения ФГБУ НЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова, проф. каф. акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии ИПО ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова. E-mail: apolikhina@inbox.ru
Тетерина Татьяна Александровна – аспирант ФГБУ НЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова. E-mail: palpebra@inbox.ru
Холодцова Мария Николаевна – аспирант ИОФ РАН Лаборатория лазерной биоспектроскопии Universite de Lorraiene, CRAN, ENSEM, Франция. E-mail: m.kholodtsova@gmail.com

Фотодинамическая терапия (ФДТ) в качестве метода лечения широко применяется в клинической практике на протяжении последних 25 лет. Однако основы ФДТ были известны еще несколько тысячелетий тому назад. В Древнем Египте и Индии для лечения витилиго и псориаза использовались природные фотосенсибилизаторы (ФС), которые содержались в китайском тмине, зверобое, петрушке, пастернаке и некоторых зерновых культурах. Впоследствии выяснилось, что в этих растениях содержатся природные ФС – псоралены. При дальнейшем изучении свойств ФС выявлено, что при воздействии света определенной длины волны, соответствующей пику поглощения ФС, в результате абсорбции фотоны из своего основного состояния переходят в более высокое энергетическое состояние. Из этого возбужденного состояния электроны ФС переносят свою энергию на кислород, образуя высокоактивные формы кислорода, как, например, крайне цитотоксический продукт – синглентный кислород. Вместе с ним могут образоваться и другие активные формы кислорода, такие как супероксид и гидроксирадикалы, которые также имеют существенный цитотоксический эффект. Следует отметить, что ФС без воздействия световой энергии не вызывает никакого токсического эффекта на органы и ткани и каждому значению длины волны соответствует определенная глубина проникновения ФС в ткани.

На молекулярном уровне в биологических системах целью цитотоксических реакций являются аминокислоты, липиды и нуклеиновые кислоты. Такие аминокислоты, как метионин, гистидин, триптофан, тирозин и цистеин сильно повреждаются как в свободном состоянии, так и в составе пептидов и белков [1–4]. Если данные аминокислоты находятся в активных центрах белков, то конформационные изменения могут приводить к их инактивации [5–8]. Что касается нуклеиновых кислот, то наиболее чувствительным к ФДТ является гуанин [9–12].

В ДНК это приводит к точечным мутациям, делециям, а также обрывам в молекуле [13–15]. Фотоокисление ненасыщенных жирных кислот, к примеру, в мембранах вызывает их нестабильность и разрушение [16, 17]. Это может привести, например, к нарушениям проницаемости сосудов и стазу крови в них, к ишемии в области неопластически измененных тканей, а позднее – к развитию в них селективного некроза [18, 19]. ФС в современной медицине применяются не только для лечения, но и для безопасной диагностики.

В России ФДТ начала применяться с 1992 г. Первоначально данный метод использовался при лечении опухолей кожи и внутренних органов, а затем при лечении некоторых доброкачественных заболеваний: трофических язв, псориаза, крауроза вульвы, патологии шейки матки, влагалища и др.

В онкологии ФДТ используется для таргентного лечения злокачественных опухолей [20]. Что касается неонкологического применения, ФДТ широко используется в офтальмологии, дерматологии, гастроэнтерологии, ревматологии, урологии. В гинекологии ФДТ с успехом используется при лечении рака яичников, эндометриоза, цервикальных интраэпителиальных неоплазий шейки матки, вульвы и влагалища, рака шейки матки и вульвы, склерозирующего лихена, остроконечных кондилом вульвы.

Кроме того, отмечено антимикробное и фунгицидное действие ФДТ в культуре клеток. Данная область применения ФДТ является наиболее актуальной в связи с ростом резистентности микроорганизмов к разным видам антибактериальных средств.

Необходимо отметить, что в последние годы увеличивается число больных хроническим вульвовагинальным кандидозом, который регистрируется не только как самостоятельное заболевание, но и как сопутствующее другим инфекциям, передаваемым половым путем.

Кандидозный вульвовагинит – одна из наиболее частых причин обращения женщин за медицинской помощью. Частота его за последние 10 лет почти удвоилась и составляет 30–45% в структуре инфекционных поражений вульвы и влагалища. Внедрение современных технологий в клиническую микробиологию позволило расширить исследования и показать, что отрицательное воздействие факторов внешней среды на микрофлору макроорганизма разной локализации, в том числе влагалища, ведет к разнообразной патологии как воспалительного, так и невоспалительного генеза. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в диагностике, терапии и профилактике дисбактериозов влагалища, их частота не имеет отчетливой тенденции к снижению [3–5, 10]. Последнее связано также с ростом иммунодефицитных состояний на фоне ухудшения экологической обстановки, неправильного питания, частых стрессов, фармакологического бума с бесконтрольным применением лекарственных средств, в первую очередь антибиотиков и др. Чаще всего инфекция полового тракта бывает обусловлена несколькими патогенными факторами – бактериями, грибами, простейшими, вирусами, которые вызывают похожие по клиническому течению, но разные по патогенезу и методам лечения заболевания [1, 3, 7, 8, 11].

Селективность действия ФДТ заключается, с одной стороны, в локальном и прецизионном использовании лазерного облучения, а также в избирательном накоплении ФС в инфицированных клетках – с другой. В основе избирательного накопления ФС в инфицированных тканях лежат скудный лимфоотток, повышенная васкуляризация, снижение pH, наличие большого количества рецепторов к липопротеинам низкой плотности, измененная структура стромы, повышенная активность ряда ферментов (5-аминолевулинатдегидратаза, порфобилиногендезаминаза, уропорфириногендекарбоксилаза и др.) [21, 22].

Рис. 1. Светодиодный осветитель АФС с длиной волны 400 нм (ООО «Полироник»).

Рис. 2. Спектр поглощения и флюоресценции протопорфирина IX.

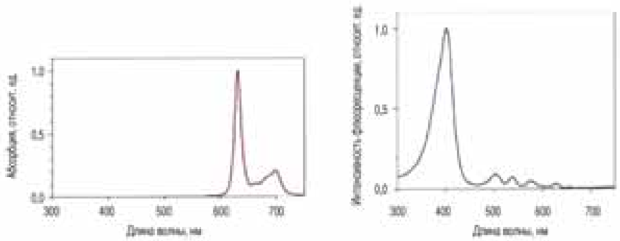
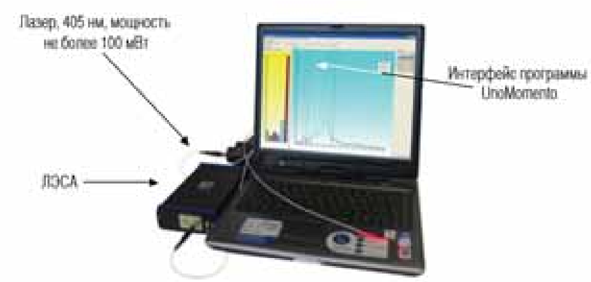


Рис. 3. Установка «ЛЭСА-01-Биоспек» для флюоресцентной диагностики.



В настоящее время в гинекологии наиболее перспективно применение 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) в качестве ФС. В нормальных тканях она синтезируется в митохондриях из сукцинил-КоА-промежуточного продукта цитратного цикла и глицина и является первым продуктом в синтезе гема. Данная реакция катализируется 5-аминолевулинсинтазой и определяет скорость реакции для всего процесса синтеза гема.

Протопорфирин IX является промежуточным продуктом в синтезе гема (рис. 1), хелатирование его с железом приводит к образованию пигмента крови – гема [23, 24].

Инфицированные клетки переводят в большей или меньшей степени экзогенно вводимую 5-АЛК во флюоресцирующие порфирины, такие как протопорфирин IX [25, 26].

Таким образом, в лечении разных инфекционных заболеваний, в том числе и вульвовагинального кандидоза, возможно выделить следующие преимущества ФДТ:

1. Селективное накопление порфиринов, образующихся в результате эндогенного назначения (5-АЛК) в инфицированных тканях.
2. Быстрая фармакокинетика даже при использовании больших дозировок 5-АЛК.
3. Отсутствие выраженных фототоксических повреждений здоровых тканей.
4. Возможность проведения повторных курсов лечения.

Цель исследования – оценка эффективности и безопасности проведения ФДТ с 5-АЛК (препаратом Аласенс) у женщин с хроническим вульвовагинальным кандидозом.

Задачи исследования

1. Проведение спектрального мониторинга для оценки накопления АЛК-индуцированного протопорфирина IX в оптимальных количествах для проведения ФДТ.
2. Оценка эффективности ФДТ с использованием 5-АЛК у женщин с хроническим вульвовагинальным кандидозом.
3. Выявление возможных побочных эффектов и осложнений при проведении ФДТ с использованием 5-АЛК, разработка методов коррекции побочных реакций и их предупреждение.
4. Оценка динамики изменений микрофлоры влагалища до и после сеанса ФДТ.
5. На основании проведенных исследований определение роли и места ФДТ с 5-АЛК в лечении хронических вульвовагинальных кандидозов.

Материалы и методы

В исследование были включены 60 пациенток: 20 с вульвовагинальным кандидозом, 25 – с бактериальным вагинозом и 15 – с неспецифическим вагинитом.

Флюоресцентная диагностика является объективным методом определения накопления ФС в биологической ткани.

Перед каждым сеансом ФДТ и после были сняты спектры флюоресценции ФС, который накопился во влагалище и вульве у пациенток при аппликативном применении геля 5-АЛК, индуцирующего селективное накопление протопорфирина IX.

Через 2 ч после введения тампона с 1,5% гелем 5-АЛК во влагалище была проведена флюоресцентная диагностика с помощью установки «ЛЭСА-01-Биоспек». Визуальная оценка накопления протопорфирина IX в тканях вульвы была проведена с использованием диодного лазера с длиной волны 400 нм (ООО «Полироник»). Статистическая оценка спектральных данных всех пациенток показала накопление протопорфирина IX преимущественно в пораженных участках слизистой влагалища и вульвы.

Всем пациенткам проводилось 4 сеанса ФДТ лазером синего света (длина волны 400 нм), 1 сеанс в 3 дня. Эффективность лечения оценивалась на основании микроскопии мазков по Грамму, полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Фемофлор), результатов бактериального исследования и спектрального анализа данных, т.е. флюоресцентной диагностики.

Выбор ФС и источника возбуждающего излучения

В данной работе исследовалось накопление ФС протопорфирина IX, который имеет определенные спектральные характеристики (рис. 2).

Для возбуждения ФС на небольшой глубине необходимо лазерное излучение с малой длиной волны, которое проникало бы не более чем на ≈1 мм. Таким образом, для возбуждения флюоресценции был выбран диодный лазер с длиной волны 405 нм (ЗАО «Биоспек», мощность 30 мВт), который попадает в полосу поглощения Соре (400 нм) и проникает не глубже чем на 1 мм.

Оборудование для ФДТ

1. ФД проводилась с помощью установки «ЛЭСА-01-Биоспек» (рис. 3).

Лазерное излучение подается через Y-образное диагностическое волокно к участку исследуемой ткани, при этом волокно находится в легком контакте с тканью. Каждый спектр регистрируется в течение 100 мс. У каждой из пациенток были получены спектры от 3 типов тканей: кожа бедра, слизистая влагалища и вульвы.

Количество спектров составило не менее 3 для каждой из выбранных точек. Мощность лазерного излучения для диагностики составила менее 30 мВт.

2. Оборудование для ФДТ представлено на рис. 1.

Методика измерений

Протопорфирин IX, находящийся в ткани, при подаче возбуждающего излучения испускает флюоресцентные фотоны, которые затем поступают через диагностическое волокно к лазерному электронному спектроанализатору

Рис. 4. Спектры ОДО и флюоресценции, нормированные на спектр белого света, отраженного от $BaSO_4$.

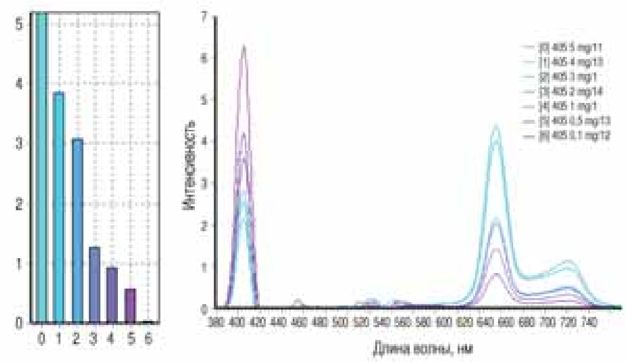


Рис. 5. Калибровочная кривая для определения концентрации протопорфирина IX в ткани при возбуждении длиной волны 405 нм.

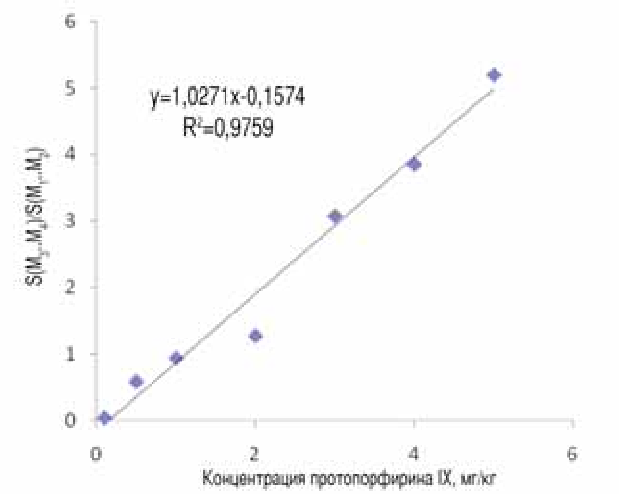
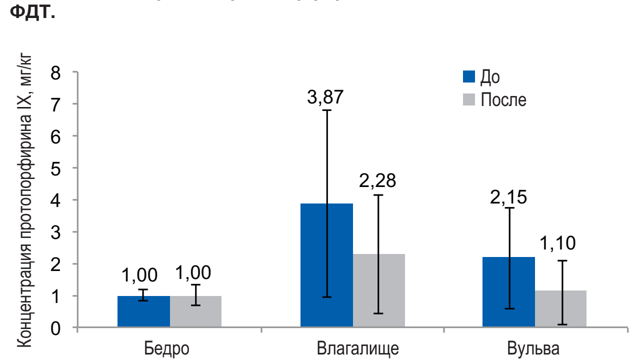


Рис. 6. Концентрация протопорфирина IX до и после 1-го сеанса ФДТ.



(ЛЭСА) и обрабатываются, на экран программы UnoMomento выводится зависимость интенсивности излучения на каждой длине волны в выбранном диапазоне.

В данном исследовании диапазон излучения составил 380–800 нм ввиду того, что пик лазерного излучения находится на длине волны 405 нм, а протопорфирин IX флюоресцирует на длинах волн 635 и 705 нм. Во избежание влияния внешних источников излучения измерения проводились в темноте.

Обработка спектров

Перед сеансом ФДТ были сняты спектры флюоресценции и обратноотраженного лазерного излучения от кожи бедра, затем вульвы и влагалища, в том же порядке измерения производились и после сеанса ФДТ.

Полученные спектры обрабатывались следующим образом:

1. Анализировалось отношение площади под пиками флюоресценции в диапазоне 590–720 нм к площади под лазерным пиком в диапазоне 395–415 нм (индекс флюоресценции – ИФ).
2. Спектры флюоресценции были поделены на обратно-отраженный сигнал источника белого света (галогеновая лампа) от $BaSO_4$, чтобы избежать влияния аппаратной функции на полученные данные.

Так как у оптических параметров, т.е. рассеяния и поглощения, существует некая флуктуация от пациентки к пациентке, то для их учета каждый ИФ, снятый от влагалища и вульвы, был поделен на медиану (среднее значение для данных, распределенных со сдвигом среднего значения, т.е. по распределению Пуассона) ИФ кожи бедра (нормальной ткани).

ИФ выражается следующим образом:

$$I_f = (S(M_3..M_4)/S(M_1..M_2))i/(S(M_3..M_4)/S(M_1..M_2))n,$$

где Mi – маркеры, ограничивающие площадь S.

Маркеры были выставлены следующим образом: M_1 – 395 нм, M_2 – 415 нм, M_3 – 590 нм, M_4 – 720 нм.

i – индекс – обозначает отношение площади под пиком флюоресценции ($S(M_3..M_4)$) к площади под пиком обратно-отраженного лазерного излучения ($S(M_1..M_2)$) для ткани влагалища или вульвы, n – аналогичное I отношение, но для нормальной ткани, т.е. кожи бедра.

Калибровка спектрометра «ЛЭСА-01-Биоспек»

В ходе исследования нами была получена калибровочная кривая для определения концентрации протопорфирина IX в ткани. Приготовлены флюоресцентные образцы: раствор Интралипида 1,2% в дистиллированной воде (что соответствует реальной биологической ткани, т.е. в нашем случае – коже) и протопорфирин IX в разной концентрации (5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1 и 0 мг/кг).

Полученные спектры были также нормированы на обратное диффузное отражение (ОДО) белого света от раствора Интралипида 1,2% в дистилированной воде и на ОДО лазерного излучения в том же растворе Интралипида, что в принципе исключает влияние рассеяния и поглощения лазерного излучения в ткани, т.е. позволяет сравнивать спектры ОДО лазерного излучения и флюоресцентного со спектрами, полученными от ткани пациентов, где таким же образом было исключено влияние флуктуаций рассеяния и поглощения от одной ткани к другой (т.е. от пациента к пациенту) (рис. 4, 5).

При анализе полученной кривой можно заключить, что ИФ, полученные в результате обработки, можно принять равными концентрации протопорфирина IX (в мг/кг) в ткани с ошибкой не более 3%.

Результаты и выводы

Был проведен статистический анализ для ИФ (т.е. для концентрации ФС) среди разных групп. Среди каждых двух групп анализ проводился с помощью критерия Манна–Уитни, среди трех групп – с помощью критерия Краскела–Уоллиса.

Группы разделены по следующим признакам:

1. По сеансам (рис. 6–9).

При анализе полученных данных очевидно, что различия между накоплением ФС до сеанса в разных тканях и между 1, 2, 3 и 4-м сеансами статистически значимы ($p<0,01$). Отмечается, что после 4-го сеанса не было отличий накопления ФС в слизистой влагалища больных хроническим вульвовагинальным кандидозом и здоровой ткани, таким образом, возможно сделать вывод о высокой эффективности проведенной терапии.

2. По изменению накопления ФС в тканях до сеанса ФДТ.
3. По изменению накопления ФС в тканях после сеанса ФДТ.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что именно 4 сеанса ФДТ, проводимые 1 раз в 3 дня, являются достаточными для достижения лечебного эффекта. Эффективность терапии составила 95% ($p\leqslant0,01$). Кроме того, при долговременном наблюдении пациенток в течение 18 мес было выявлено снижение рецидивов до 5 раз.

Рис. 7. Накопление протопорфирина IX до и после 2-го сеанса ФДТ.

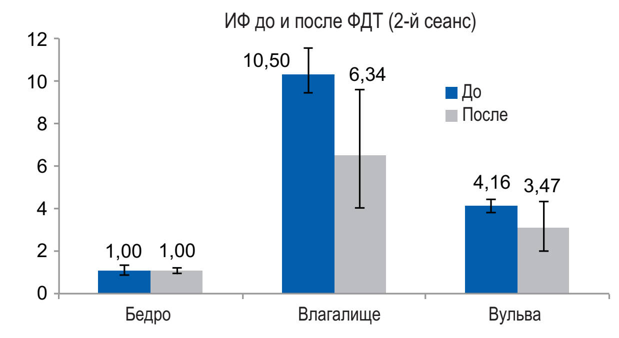


Рис. 8. Накопление протопорфирина IX до и после 3-го сеанса ФДТ.

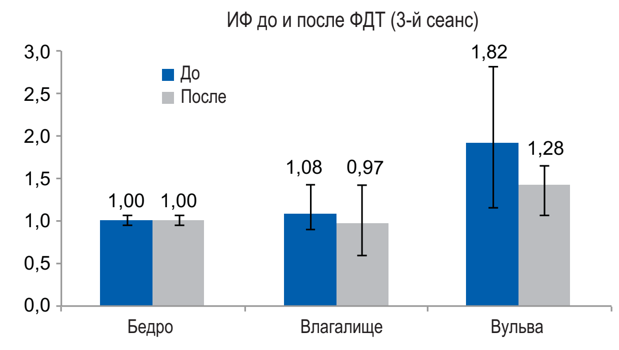
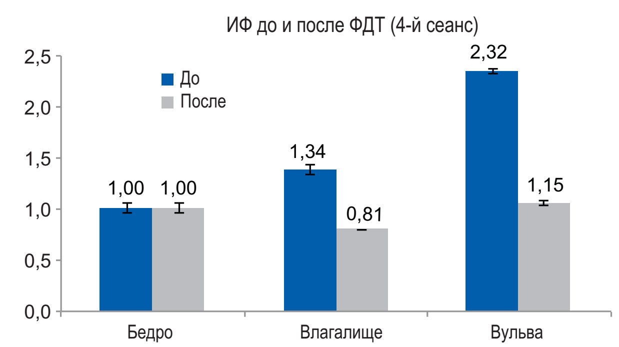


Рис. 9. Накопление протопорфирина IX до и после 4-го сеанса ФДТ.



Важно также отметить высокую эффективность ФДТ в лечении бактериального вагиноза и устойчивых к другим видам терапии неспецифических кольпитов. При анализе мазков по Граму и посевов отделяемого влагалища на питательные среды отмечен значимый рост лактобактерий. Подробный анализ лабораторных исследований будет изложен в дальнейших публикациях.

В настоящее время применение ФДТ-технологий для селективной деструкции микроорганизмов и грибов находится в начале развития, однако анализ зарубежной и отечественной литературы, а также наш личный опыт показывает их огромный потенциал. ФДТ является также и альтернативным методом лечения бактериальной и грибковой инфекции.

Принципиальными отличиями ФДТ от иных методов являются:

- Бесконтактность (невозможность инфицирования пациента).
- Безболезненность и бескровность лечебной процедуры.
- Снижение рецидивов в 5 раз.
- Эффективность лечения 95%.

Особую актуальность данному направлению придают наблюдаемое в последнее десятилетие резкое увеличение резистентности многих штаммов микроорганизмов и грибов к антибиотикам и антимикотикам, а также разная чувствительность *Candida* spp. к современным антимикотическим препаратам. Поэтому терапия кандидозных вульвовагинитов, в том числе устойчивых к традиционным методам терапии, с помощью ФДТ в настоящее время является наиболее актуальной и перспективной.

Литература

1. Прилепская В.Н. Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы. М., 2000.
2. Abdel-Hady E, Hirsch P, Keen M et al. Immunological and viral factors associated with the response of vulval intraepithelial neoplasia to photodynamic therapy. Cancer Res 2001; 61: 192–6.
3. Batlle AM. Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy – a model for carcinogenesis. J Photochem Photobiol 2005; 20: 5–22.
4. Bernard H, Chan S, Manos M. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. J Infect Dis 1998; 170: 1077–85.
5. Boegheim JPJ, Lagerberg JWM, Dubbelman TMAR et al. Photodynamic effects of hematoporphyrin derivative on the uptake of rhodamine 123 by mitochondria of intact murine L929 fibroblasls and Chinese hamster ovary Kl cells. Photochem Photobiol 1988; 48: 613–20.
6. Bonnet R, Berenbaum ML. Porphyrins as photosensitizers. In: Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use (Eds.: Bock G, Harnett S.), John Wiley & Sons, Chichester, 1989; 40–9.
7. Bottiroli G, Croce AC, Ramponi R, Vaghi P. Distribution of di-sulfonated aluminium phthalocyanine and photofrin II in living cells: a comparative fluorometric study. Photochem Photobiol 1992; 55: 575–85.
8. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. Lancet Oncology 2004; 497–508.
9. Coppleson M. The origin and nature of premalignant lesions of the cervix uteri. Intl J Gynecol Obstet 1970; 8: 539.
10. Dougherty TJ. Yearly Review: Photosensitizers: Therapy and detection of malignant tumors. Photochem Photobiol 1987; 45; 879–89.
11. Fehr M, Hornung R, Degen A et al. Phodynamic therapy of vulvar and vaginal condyloma and intraepithelial neoplasia using topically applied 5-aminolevulenic acid. Lasers Surg Med 2002; 20: 273–9.
12. Fukuda H, Batlle MC, Riley PA. Kinetics of porphyrin accumulation in cultured epithelial cells exposed to ALA. Int J Biochem 1993; 25: 1407–10.
13. Gissmann L, Zur Hausen H. Partial: characterisation of viral DNA from genital warts. Inst J Cancer 1980; 25; 605–9.
14. Goff BA, Bachor R, Kollias N, Hasan T. Effects of photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid on normal skin of hairless guinea pigs. J Photochem Photobiol B 1992; 15: 239–51.
15. Gross G, Ikenberg H, Gissmann L, Hagedorn M. Papillomavirus infection of the anogenital tract: con-elation between histology, clinical picture and virus type. Proposal of new nomenclature. J Invest Dermatol 1985; 85: 147–52.
16. Gross G, Pfister H, Hagedorn M, Gissmann L. Correlation between human papillomavirus type and histology of warts. J Invest Dermatol 1982; 78; 160–4.
17. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? Photochem Photobiol 1992; 55: 145–57.
18. Henderson BW, Bellnier DA. Tissue localisation of photosensitizers and the mechanism of photodynamic tissue destruction. In: Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use, (Eds.: Bock, G., Harnett, S.), John Wiley & Sons, Chichester, 2005; 112–30.
19. Hillemanns P, Landsmann H, Künmig R. Behandlung der Zervixdysplasien. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Zervixkarzinom, 2004; 31–40.
20. Hillemanns P, Thaler C, Kimmig R. Epidemiologie und Diagnostik der zervikalen intraepithelialen Neoplasie: 1st das derzeitige Konzept von Screening und Diagnostik noch aktuell? Gynakol Geburtshilfliche Rundsch 1997; 37: 179–90.
21. Jones H. Cone biopsy and hysterectomy in the management of cervical intraepithelial neoplasia. Clin Obstet Gyneacol 2005; 9; 221–36.
22. Lin C. Photodynamic Therapy of malignant tumours – recent developments. Cancer Cells 1991; 3: 437–44.
23. MacRobert AJ, Bown SG, Phillips D. What are the ideal photoproperties for a sensitizer? In: Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use, (Eds.: Bock G, Harnett S), John Wiley & Sons, Chichester, 2004; 4–16.
24. Michaeli A, Feitelson J. Reactivity of singlet oxygen toward ammo acids and peptides. Photochem Photobiol 2001; 59: 284–9.
25. Moan J, Berg K. Photochemotherapy of cancer: experimental research. Photochem Photobiol 2001; 55: 931–48.
26. Modrow S, Falke D. Aufbau der Papillomviren, in Spectrum: Molekulare Virologie. Spectrum 2001; 374–90.