

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Zahn-Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. hc. Ulrich Joos -**

**Biomarker zur Früherkennung obligater Präkanzerosen
der Mundschleimhaut mittels „Brush“- Zytologie**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelm-Universität Münster

vorgelegt von

Ataya, Kristina

aus Wolgograd / Russland

2008

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelm-Universität Münster**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Agnes Bankfalvi

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Ralph J. Lellé

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2008

**Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie
der Westfälischen Wilhelm-Universität Münster**

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. hc. Ulrich Joos -

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Agnes Bankfalvi

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Ralph Lellé

Zusammenfassung

Biomarker zur Früherkennung obligater Präkanzerosen der Mundschleimhaut mittels „Brush“- Zytologie

Kristina Ataya

Fragestellung: Ziel der vorliegenden Studie war die Erarbeitung einer nicht- invasiven und objektiven Methode zur Risikoabschätzung für Karzinomentstehung in der Mundhöhle. Übergeordnetes Ziel war es, mögliche Biomarker zur Karzinogenese oder als Prognoseparameter für intraorale Karzinome zu identifizieren.

Material und Methode: In dieser Studie wurden zytologische und DNA- zytometrische Untersuchungen durchgeführt an mittels Brush- Biopsie gewonnenen Mundschleimhautproben von 10 gesunden Probanden, 17 Patienten mit Leukoplakien und 10 Patienten mit manifesten Mundhöhlenkarzinomen.

Ergebnisse: Die zytologische Begutachtung der Präparate erzielte eine Sensitivität von 88,8% und eine Spezifität von 98,3%. Die nachfolgend durchgeführte DNA- Bildzytometrie aller Präparate erreichte eine Sensitivität von 94,4% und eine Spezifität von 95%. Die kombinierte Auswertung der DNA- Zytometrie mit der konventionellen Zytologie konnte eine Steigerung der diagnostischen Treffsicherheit erzielen. Die Sensitivität für die Erkennung von malignen Zellen erreichte einen Wert von 97,3%. Die Spezifität hatte dann einen Wert von 99,9%. Der positive Vorhersagewert betrug 99,7%. Der negative Vorhersagewert 99,1%.

Schlussfolgerung: Die Anwendung der Brush- Biopsie mit anschließender DNA- Bildzytometrie überbrückt die Lücke zwischen invasiver Abklärung durch Exzisionsbiopsie auf der einen Seite und konservativer Behandlung und Beobachtung auf der anderen Seite, ohne den Patienten zu belasten. Die mittels DNA- Bildzytometrie ermittelte Aneuploidie (aneuploide Zellen > 5c und hochaneuploide Zellen >9c) in Dysplasien ist als Marker für Malignität anzusehen. So kann bei allen nicht sicher tumorzell-negativen Befunden, ergänzend zur reinen zytologischen Untersuchung, eine quantitative DNA- Messung erfolgen. Eine DNA- aneuploide Dysplasie gleich welchen Grades, stellt damit eine Indikation zur chirurgischen Entfernung der Veränderung mit histologischer Nachuntersuchung.

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2008

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung.....	1
1.1	Einführung	1
1.2	Epidemiologie des Oralkarzinoms	3
1.3	Ätiologie des Oralkarzinoms	7
1.4	Pathologie intraoraler Präkanzerosen.....	12
1.4.1	Klinik intraoraler Präkanzerosen.....	12
1.4.2	Histologie intraoraler Präkanzerosen.....	14
1.4.3	Differentialdiagnosen.....	14
1.5	Problematik der Frühdiagnostik	16
1.6	DNA- und zytogenetische Grundlagen	19
1.7	DNA- Bildzytometrie.....	21
1.8	Ziel der vorliegenden Studie	24
2	Material und Methode.....	25
2.1	Material und Studiendesign	25
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Die Brush- Biopsie.....	27
2.2.2	Anfertigen eines ThinPrep- Präparates.....	28
2.2.3	Die Färbung nach Papanicolaou.....	29
2.4.4	Befundung der Präparate	31
2.4.5	Die Färbung nach Feulgen	32
2.4.6	DNA- Bildzytometrie	34

3	Ergebnisse	37
3.1	Zytologische Diagnostik	37
3.2	Kriterien zur diagnostischen Beurteilung von DNA-Histogrammen	38
3.3	Ergebnisse	44
3.3.7	Diagnostische Treffsicherheit	51
4	Diskussion.....	54
4.1	Diskussion Patientenkollektiv.....	56
4.2	Diskussion Epidemiologie und Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms...	56
4.3	Diskussion Methodik.....	59
4.3.1	Diskussion Brush- Biopsie	59
4.3.2	Diskussion DNA-Aneuploidie als Biomarker für obligate Präkanzerosen	60
4.3.3	Diskussion DNA- Bildzytometrie	62
5	Schlussfolgerungen	69
6	Zusammenfassung	72
7	Literaturverzeichnis.....	73
8	Anhang	I
9	Danksagung	I
10	Lebenslauf.....	II

1 Einführung

1.1 Einführung

Weltweit ist in den letzten Jahrzehnten ein deutlicher Anstieg der Inzidenz und Mortalität von Karzinomen der Mundhöhle zu beobachten [Epidemiologisches Krebsregister Saarland 2002]. Der am häufigsten vorkommende maligne Tumor der Mundhöhle ist das Plattenepithelkarzinom mit etwa 95% [Carvalho et al. 2005]. Die jährliche Inzidenz liegt bei etwa 500.000 Neuerkrankungen weltweit [Pisani et al. 2002, Parkin et al. 2001]. Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des Mundhöhlenkarzinoms sind Tabak und Alkohol bei schlechter Mundhygiene bei Individuen mit genetischer Prädisposition [Reichart 2000]. Ein erhöhtes Risiko tritt zudem im höheren Lebensalter auf. Zwischen 11% und 67% aller Mundhöhlenkarzinome entwickeln sich aus oralen Präkanzerosen, darunter sind die meisten Leukoplakien, deren Entartungstendenz zwischen 3% bis 85% liegt je nach Form und Dysplasiegrad [Pisani et al. 2002]. Statistiken des Robert- Koch- Instituts Berlin zeigen, dass die Überlebensraten bei oralen Karzinomen trotz Einführung neuer chirurgischer, strahlen- sowie chemotherapeutischer Therapiemethoden tendenziell absinken [GEKID 2006]. Seit 40 Jahren beträgt die 5 Jahres- Überlebensrate unverändert 50% bei Tumoren der Mundhöhle aller Stadien. Eine weitergehende Analyse konnte zeigen, dass kleinere Tumoren (T1, T2) im Vergleich zu fortgeschrittenen Tumoren (T3, T4) erwartungsgemäß eine günstigere Prognose aufweisen

[Eckardt 2000]. Die 5- Jahres- Überlebensrate betrug für T1/T2 68% bzw. 63%, für T3/T4 hingegen nur 48% bzw. 31% [Eckardt 2000].

Nur durch eine frühzeitige Abklärung von Mundschleimhautveränderungen, zum Beispiel in Form von weißlichen oder rötlichen Flecken, wird es möglich sein, die Inzidenz- und Mortalitätsrate zu senken. Obwohl seit Jahren gefordert wird, dass alle im weitesten Sinne malignitätsverdächtigen Schleimhautläsionen durch Exzisionsbiopsie abgeklärt werden sollten, hat sich dieses Ziel in der Praxis wegen der Häufigkeit derartiger Läsionen nicht realisieren lassen, da dies ein invasives Verfahren bedeutet.

Die Erarbeitung einer nichtinvasiven und objektiven diagnostischen Methode zur Risikoabschätzung für Karzinomentstehung in der Mundhöhle, könnte die unakzeptabel hohe Morbidität und Mortalität des oralen Plattenepithelkarzinoms senken. Die Methode könnte zur Erstellung individueller Krebsrisikoprofile im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen angewendet werden und eventuell auch als Test für die Bestimmung möglicher therapeutischer Zielmoleküle zur Chemoprevention dienen.

Die Untersuchungen unserer Studie lehnen sich an die seit kurzem in einigen Studien eingesetzte nichtinvasive „Brush- Biopsie“ (Bürstenbiopsie) – analog zur Krebsvorsorgezytologie bei Frauen für das Gebärmutterhalskarzinom - zur Früherkennung dysplastischer Präkanzerosen in der Mundhöhle [Böcking et al. 2004; Maraki et al.2004; Remmerbach et al. 2001,2004].

In Anlehnung an die Aussagen dieser Studien, laut derer es möglich ist mittels Brush- Zytologie und anschließender DNA- Ploidie- Analyse maligne Entartung im Plattenepithel der Mundschleimhaut nachzuweisen, wurden in der

vorliegenden Arbeit Mundschleimhautproben mittels Brush- Biopsie von 10 gesunden Probanden, 17 Patienten mit Leukoplakien und 10 Patienten mit manifesten Mundhöhlenkarzinomen genommen und sowohl zytologisch als auch mittels DNA- Zytometrie untersucht.

1.2 Epidemiologie des Oralkarzinoms

Global gehört das orale Plattenepithelkarzinom zu den zehn häufigsten malignen Erkrankungen des Körpers [Remmerbach et al. 2001], in der Mundhöhle macht es über 90% der Malignome aus [Böcking et al. 2004].

Epidemiologische Daten aus Krebsregistern verschiedener geographischer Bereiche zeigen signifikante Unterschiede in der Inzidenz und Prävalenz weltweit, innerhalb Europas und bundesweit [Reichart 2000].

International finden sich sehr hohe Inzidenzen des oralen Plattenepithelkarzinoms im Bas Rhin- Gebiet Nordfrankreichs, insbesondere für Männer (49.4/100.000 Männer), gefolgt von Südindien (über 20/100.000 Männer) und einigen Regionen Osteuropas und Lateinamerikas [Reichart 2001]. Die Statistik zeigt, dass weltweit Männer deutlich häufiger an Mundhöhlen- und Rachenkrebs erkranken als Frauen. Die Ausnahme ist in Indien im Gebiet Bangalore, wo Frauen häufiger betroffen sind (Abb.1).

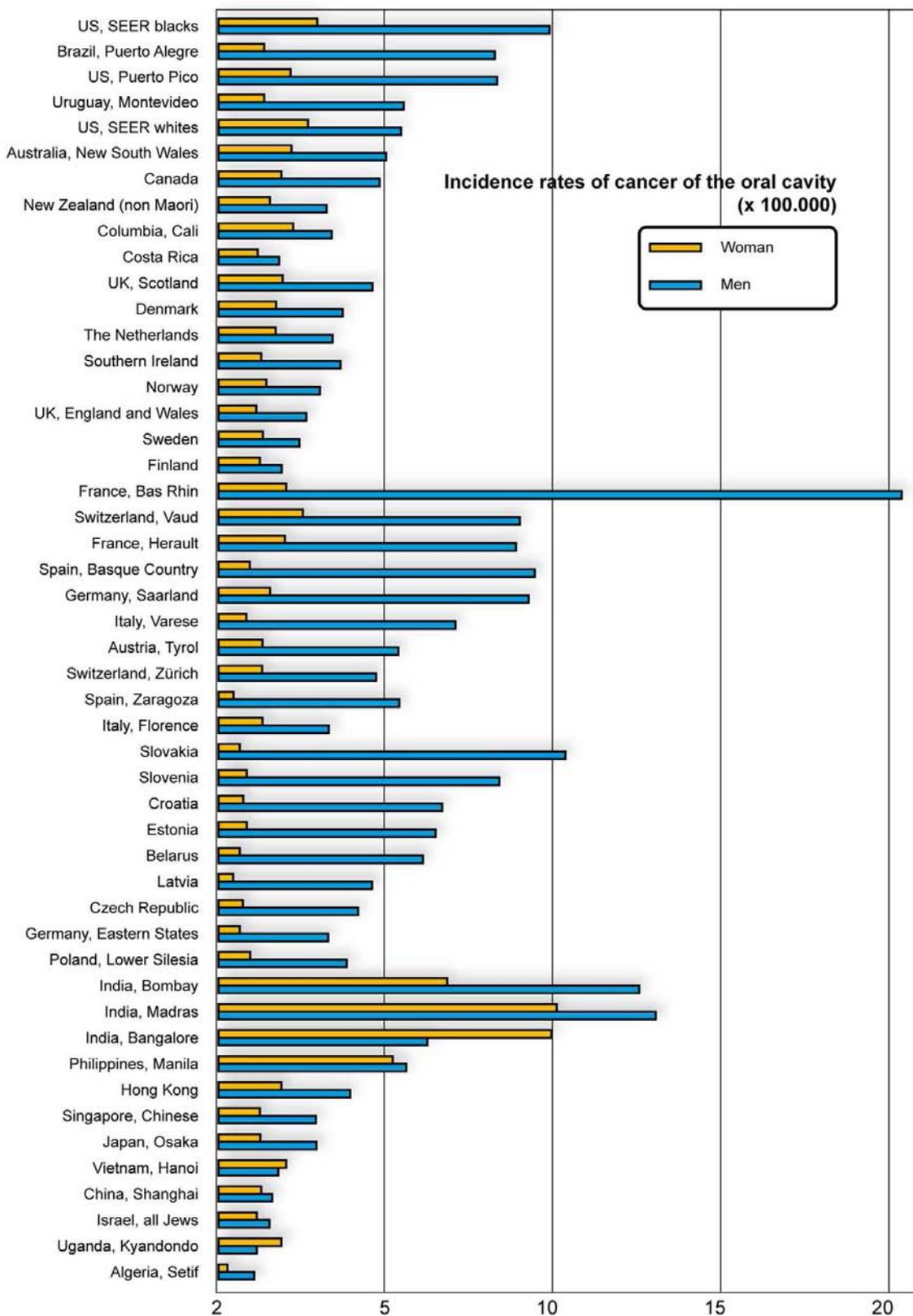


Abb. 1: Altersstandardisierte Inzidenzraten des oralen Plattenepithelkarzinoms
[Franceschi et al. 2000]

Verglichen mit den Erkrankungsrate der Länder der Europäischen Union liegt die Inzidenz in Deutschland für Männer und für Frauen im mittleren Bereich (Abb.2). Höhere Erkrankungsrate werden bei den Männern in Ungarn, Frankreich, der Slowakei, Portugal und Luxemburg gezählt. Ebenso bei den Frauen die höchsten Erkrankungsrate in Ungarn und Frankreich, gefolgt von Luxemburg, Dänemark, den Niederlanden, Belgien und Schweden. Die niedrigste Inzidenz in den EU- Ländern wird für Männer in Griechenland und für Frauen in Lettland errechnet. Die Statistik zeigt, dass in allen europäischen Ländern Männer deutlich häufiger an Mundhöhlen- und Rachenkrebs erkranken als Frauen [GEKID 2006].

Altersstandardisierte Neuerkrankungsrate in der Europäischen Union 2002

Neuerkrankungen pro 100.000 (Weltstandard)

Quelle: GLOBOCAN-Schätzung 2002, RKI-Schätzung für Deutschland 2002

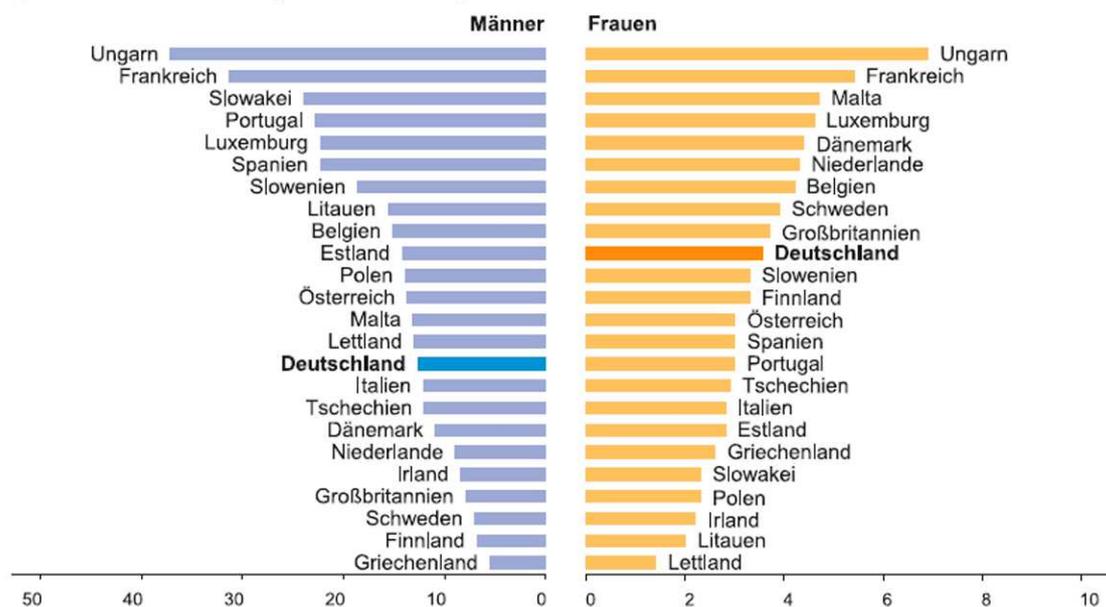


Abb. 2: Altersstandardisierte Erkrankungshäufigkeit in der Europäischen Union 2002 [GEKID 2006]

In der Bundesrepublik Deutschland stehen die Krebsneuerkrankungen der Mundhöhle und des Rachens bei Männern an siebter Stelle, bei den Frauen an fünfzehnter Stelle. Die Zahl der jährlich registrierten Neuerkrankungen in Deutschland ist somit bei Männern mit etwa 7.800 fast dreimal so hoch als bei den Frauen mit knapp 2.600 [GEKID 2006].

Ihr Anteil an den durch Krebs bedingten Sterbefällen beträgt bei Männern 3,4%, bei den Frauen etwa 1% [GEKID 2006]. Das Auftreten von Krebs korreliert mit dem Alter. Nach dem 40. Lebensjahr steigt die Häufigkeit stark an und erreicht einen Höchststand bei einem Alter von ca. 60 Jahren.

Im Hinblick auf das Erkrankungsalter sind ebenfalls deutliche Geschlechtsunterschiede zu sehen. Das mittlere Erkrankungsalter für Männer liegt bei vergleichsweise niedrigen 61, für Frauen bei 69 Jahren (Abb. 3).

Schätzung der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland 2002
Neuerkrankungen pro 100.000 in Altersgruppen

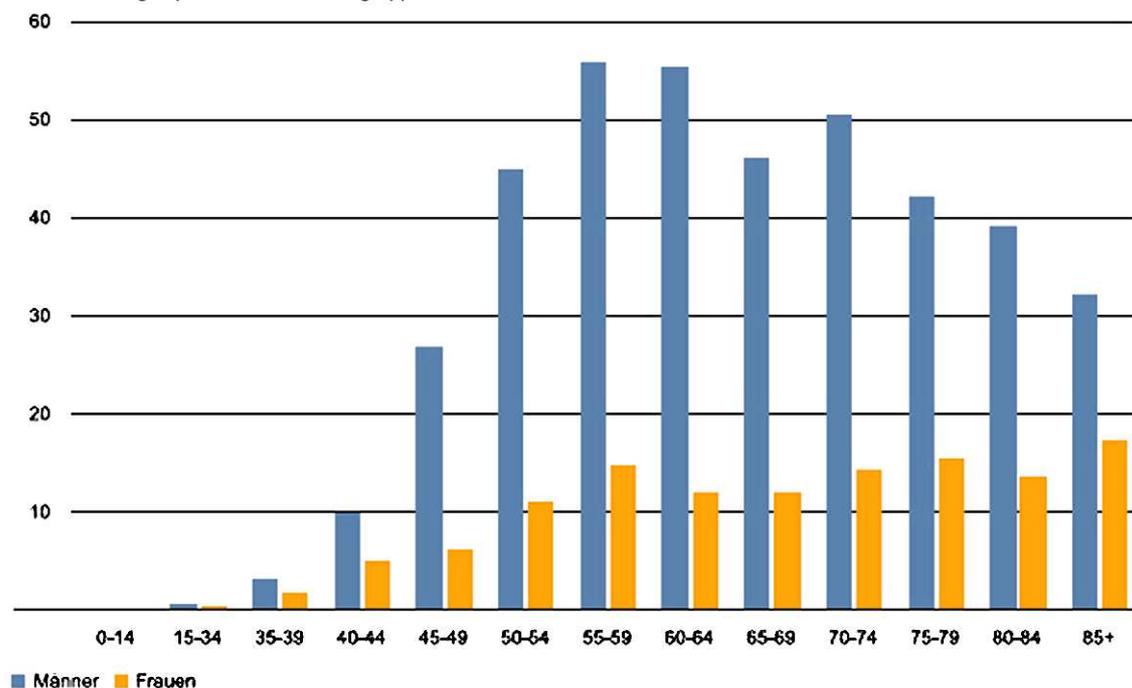


Abb. 3: Schätzung der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland 2002 [GEKID 2006]

Die höchste Erkrankungsrate für Männer liegt im Alter von 55 bis 65 Jahren. Das ist mehr als viermal höher als die entsprechende Erkrankungsrate der Frauen [GEKID 2006].

Diese auf früheren Datenbasen beruhenden Zahlen dürften sich schätzungsweise in den nächsten Jahren nach unten angleichen.

1.3 Ätiologie des Oralkarzinoms

Nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung handelt es sich bei der Entstehung von oralen Plattenepithelkarzinomen um ein multifaktorielles Geschehen [Becher et al. 2002]. Verschiedene Risikofaktoren für die Karzinogenese wurden beschrieben, wobei die Ursachen für das Mundhöhlenkarzinom und die oralen Präkanzerosen identisch sind.

Der primäre Risikofaktor ist der chronische Tabakkonsum [Reichart 2000, 2001]. Zusammenhänge zwischen dem Rauchen und der Entstehung maligner Tumoren der Mundhöhle konnten bereits 1957 von Wynder und Mitarbeitern in einer detaillierten Studie beschrieben werden. 1988 stellten Blot und Mitarbeiter in einer weiteren Studie fest, dass über 90% der Patienten, die an Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinomen erkrankten, Raucher waren. Tabakgenuss ist jedoch in jeder Form ein Risiko, sei es das Rauchen der Zigarette, Zigarre, Pfeife oder der orale Genuss von Tabak, wie zum Beispiel Kautabak oder oral applizierter Schnupftabak [Reichart 2000]. Die häufigste Form des Tabakgenusses ist aber die Zigarette. 1997 publizierte die World Health Organisation (WHO) unter dem Titel „Tabak oder Gesundheit“ einen weltweiten

Status Report. Die WHO schätzte, dass weltweit von 1990 bis 1992 jährlich 6.05×10^{12} Zigaretten konsumiert wurden. Das bedeutet jährlich wurden ca. 1650 Zigaretten pro Erwachsenen im Alter von über 15 Jahren geraucht. In den Industrieländern wurde der jährliche Zigarettenkonsum weitaus höher geschätzt (2590 Zigaretten pro Erwachsenen) im Vergleich zu den Entwicklungsländern (1410 Zigaretten pro Erwachsenen) [Reichart 2000].

Tabakprodukte enthalten toxische, tumorigene und karzinogene Substanzen [Reichart 2002]. Die wichtigsten im Tabak enthaltenen Karzinogene, die eine Initiation bewirken können sind tabakspezifische N-nitrosamine (TSNA) bzw. polyzyklische Wasserstoffe (PAH), radioaktives Polonium und Thorium sowie das giftige Schwermetall Cadmium [Brunnemann et al. 1996, Moreno-Lopez et al. 2000]. Einige dieser Substanzen werden nach Resorption über die Schleimhaut durch verschiedene Enzymsysteme bzw. durch freie Radikale in ihre Epoxidform überführt, in der sie mit DNS- und RNS- Molekülen interagieren und damit genotoxisch wirksam werden können [Becher et al. 2002].

Je früher mit dem Rauchen begonnen wird, umso höher ist das Risiko, ein orales Plattenepithelkarzinom zu entwickeln. Nach aktuellen epidemiologischen Datenlagen ist davon auszugehen, dass erst 10 Jahre nach Rauchende das Risiko auf ein ähnliches Niveau wie das von Nichtrauchern sinkt [Ahrens et al. 1989, Tuyns et al. 1988].

Als zweitwichtigster Faktor der oralen Karzinogenese wird der chronische Alkoholkonsum gesehen [Becher et al. 2002]. Ob er auf direktem oder indirektem Wege diese fördert, ist nicht mit Sicherheit geklärt. Alkohol ermöglicht durch physiko- chemische Veränderungen der Zellmembran eine

gesteigerte Penetration karzinogener Substanzen [Seitz et al. 1988]. Neben lokalen Mechanismen führt Alkoholismus zu Erkrankungen wie Leberzirrhosen und chronische Gastritiden. Meist mit einer Fehl- und Mangelernährung kombiniert, die wiederum den Allgemeinzustand und die Immunabwehr herabsetzten und somit indirekt die Entstehung eines Mundhöhlenkarzinoms begünstigen. Zusätzlich bewirkt chronischer Alkoholkonsum, sowohl in der Leber als auch in der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes, eine Induktion mikrosomaler Enzyme. Diese Enzyme sind in der Lage, in die Schleimhaut aufgenommene Prokarzinogene zu aktivieren [Weisburger 1975].

Während starkes Rauchen oder starkes Trinken als Einzelfaktor allein schon das Risiko einer Mundkrebserkrankung erhöht, ist bei der Kombination beider nicht ein additiver, sondern ein multiplikativer Effekt festzustellen [Howaldt, Schmelzeisen 2002]. Alkohol erhöht die Permeabilität der Mundschleimhaut, wodurch der karzinogene Effekt der Tabakprodukte direkt verstärkt wird [Reith et al. 2002]. Darüber hinaus besteht eine deutliche Dosisabhängigkeit [Reichart 2002].

Neben diesen Erscheinungen wirken sich weitergehende lokale Noxen krebserregend aus. Dieses ist gegeben bei mangelnder Mundhygiene, aber auch bei chronischen Reizungen durch scharfkantige Füllungs-, Kronen- oder Prothesenränder sowie abstehende Zahnklammern [Howaldt, Schmelzeisen 2002].

Das Zusammenwirken der Trias Alkohol-, Zigarettenkonsum und schlechte Mundhygiene kann mit einem achtfach erhöhten Krebsrisiko einhergehen [Howaldt, Schmelzeisen 2002].

Bei der Ätiologie des Zervixkarzinoms spielen humane Papillomaviren HPV unumstritten eine zentrale Rolle [zur Hausen 1996]. Analog zu den Tumoren des Genitaltraktes setzt auch die Mehrzahl der Tumoren des Kopf- Hals-Bereiches eine Entartung der epithelialen Mukosa voraus [Becher et al. 2002]. Durch den Einbau viraler Protoonkogene und Ausschaltung bestimmter Supressorgene in der Wirtszelle kann es zu einer Initiierung kommen [Epidemiologisches Krebsregister Saarland 2002]. Von den mehr als 70 Typen der epitheliotopen humanen Papillomaviren sind HPV 6 und 11 als so genannte „low risk“ sowie 16, 18, 31, 33 und 35 als die häufigsten „high- risk (Hochrisiko)- HPV- Typen klassifiziert. In mehreren unabhängigen Studien wurden die HPV- Subtypen 16 und 18 in oralen Plattenepithelkarzinomen und Präkanzerosen nachgewiesen, jedoch selten in der gesunden Mundschleimhaut [Reichart 2002].

Auch eine chronische Candidiasis, die bei Rauchern häufiger auftritt, spielt möglicherweise eine weitere Rolle. Sie stellt einerseits einen wichtigen Hinweis auf eine geschwächte Immunabwehr dar, andererseits können bestimmte Candida albicans- Arten karzinogene N- Nitrosobenzylmethylamine bilden [Epidemiologisches Krebsregister Saarland 2002]. Im Zigarettenrauch vorkommende aromatische Hydrokarbonate können durch das Enzymsystem

bestimmter Candida- Biotypen in Karzinogene umgewandelt werden [Epidemiologisches Krebsregister Saarland 2002].

Ein weiterer Risikofaktor ist das höhere Lebensalter. Nach dem 40. Lebensjahr steigt die Häufigkeit stark an und erreicht einen Höchststand bei einem Alter von ca. 60 Jahren [GEKID 2006].

1.4 Pathologie intraoraler Präkanzerosen

1.4.1 Klinik intraoraler Präkanzerosen

Der Begriff Tumorstadium oder auch Präkanzerose ist definiert als potentiell bösartige Zell- bzw. Gewebeveränderung, die bei genügend langem Bestehen und weiterem Einwirken der zugrunde liegenden Schädlichkeit oft zu einer Krebsentstehung führt [Schwenzer, Ehrenfeld 2000]. Dabei unterscheidet man Veränderungen, die gelegentlich und spät (fakultative Präkanzerosen) und solche, die regelmäßig und frühzeitig (obligate Präkanzerosen) maligne entarten [Pschyrembel 1994].

Klinisch imponieren diese Krebsvorstufen häufig als Leukoplakien. Die orale Leukoplakie ist eine vorwiegend weiße Veränderung der Mundschleimhaut, die weder klinisch noch histopathologisch als eine andere definierbare Schleimhautveränderung charakterisiert werden kann [Axell et al. 1996]. Orale Leukoplakien können isoliert oder multipel auftreten [Reichart 2007]. Sie werden in allen Bereichen der Mundhöhle beobachtet. Typische Lokalisationen sind aber die retroanguläre Mundschleimhaut, die Mukosa des Alveolarfortsatzes, der Mundboden und der laterale Zungenrand [Reichart 2002]. Orale Leukoplakien können als homogene und inhomogene Variante auftreten oder als Mischform [Remmerbach 2004]. Die homogene orale Leukoplakie wird als vorwiegend weiße Veränderung definiert, die meist asymptomatisch ist. Sie hat ein einheitliches flaches und dünnes Erscheinungsbild. Flache Furchen können auftreten. Die Oberfläche ist glatt, faltig oder wellig und zeigt eine weitgehend konsistente Textur [Reichart 2007].

Die nicht homogene orale Leukoplakie ist häufig als weiße oder als weiße und rote Veränderung (Erythroleukoplakie) definiert. Ihre Oberfläche kann unregelmäßig flach, nodulär oder exophytisch sein (verruköse Leukoplakie) [Reichart 2007].

Inhomogene Leukoplakien unterliegen einer hohen Transformationsbereitschaft. Klinische Symptome können leichte Beschwerden wie Schmerzen oder Brennen der Mundschleimhaut sein [Reichart 2007]. Eine Sonderform ist die idiopathische Leukoplakie, die vor allem bei nicht rauchenden, älteren Frauen zu beobachten ist [Reichart 2002]. Diese Form ist zunächst auch homogen, kann aber im Laufe der Jahre inhomogen werden und hat eine besonders hohe Transformationsneigung [Reichart 2002]. Als weitere besondere Form ist die proliferative verruköse Leukoplakie beschrieben [El Naggar 2005, Reichart 2003], die auch als floride orale Papillomatose bezeichnet wird [Reichart 2002]. Hierbei handelt es sich um eine raue, von der Oberfläche eher zottige Form mit papillären Veränderungen, die eine starke Tendenz zur Ausbreitung und Erfassung von großen Arealen hat, einschließlich der Gingiva. Diese aggressive Form der oralen Leukoplakie transformiert in fast allen Fällen maligne [Reichart 2002]. Eine seltene, aber ebenfalls mit hoher Entartungsrate aufweisende Veränderung ist die Erythroplakie. Sie erscheint als rundliche oder ovale, scharf begrenzte dunkelrote Veränderung mit samtartiger oder körniger Oberfläche [Schwenzer, Ehrenfeld 2000]. Meist im Bereich des Mundbodens oder der Wangenschleimhaut lokalisiert. Die Entwicklung zu einem Carcinoma in situ oder zu einem Plattenepithelkarzinom ist häufig nicht zu vermeiden.

Bei der Candida- infizierten oralen Leukoplakie scheint eine höhere Entartungsrate vorzuliegen [Reichart 2007]. Es ist jedoch bis heute unklar, ob die Candida- Infektion die Ursache der Leukoplakie ist oder, ob es sich um eine Superinfektion einer präexistenten Schleimhautveränderung handelt.

1.4.2 Histologie intraoraler Präkanzerosen

Histologisch erweist sich die Leukoplakie als ein Areal verdickten Plattenepithels (Akanthose), mit vermehrter (Hyperkeratose) oder abnormer Verhornung. Diese Verhornungsstörung, bei der pyknotische Kernreste in der Hornschicht erhalten bleiben, ist als Parakeratose definiert. Solange keine Schichtungsanomalien und zelluläre bzw. nukleäre Atypien nachzuweisen sind, handelt es sich um eine einfache Leukoplakie. Treten Leukoplakien mit Dysplasie auf, also mit irregulärer Schichtung und Zell- bzw. Kern- Atypien bis hin zum Carcinoma in situ, sind sie dagegen als Präkanzerosen einzuordnen [Herbst, Hübner 2007].

1.4.3 Differentialdiagnosen

Das Spektrum weißer Veränderungen der Mundschleimhaut ist groß und somit müssen folgende Erkrankungen differentialdiagnostisch mit eingeschlossen werden: das Wangen und Lippenkauen (Morsicatio), die Friktionskeratose, oraler Lichen planus mit allen klinischen Varianten, Lupus erythematodes, Leuködem, orale Candidiasis, weißer Schwammnävus, orale Haarleukoplakie

bei Immunsuprimierten, lichenoiden Reaktionen, weiße Haarzunge, Rauchergeraumen und Verätzungen [Schwenzer, Ehrenfeld 2000; Reichart 2007].

1.5 Problematik der Frühdiagnostik

Die Mundhöhle ist wie keine andere Körperöffnung direkten Untersuchungen zugänglich. Dennoch werden dort entstehende Karzinome meistens erst in fortgeschrittenem Entwicklungsstadium diagnostiziert. Dies kann zum einen an der Zeitspanne, die der Patient vom Zeitpunkt seiner ersten Wahrnehmung bis zur ärztlichen Untersuchung vergehen lässt liegen, weil viele Patienten scheuen die Gewebeentnahme mit örtlicher Betäubung, Ausschneidung mit dem Skalpell, Naht und Nachkontrolle, welches die Voraussetzung für eine feingewebige Nachkontrolle ist. Zum anderen schließt sich noch immer zu häufig eine Verschleppung durch den ärztlichen bzw. zahnärztlichen Untersucher an, der pathologische Veränderungen fehldeutet oder sie erst gar nicht wahrnimmt, weil mindestens ein Drittel oraler Karzinome aus klinisch gesund imponierender Mundschleimhaut ohne jegliche Symptome entsteht. So kann es beispielsweise zur Fehldiagnose einer Läsion kommen, die Druckschmerzhaftigkeit infolge einer Superinfektion vorgibt. Aufgrund des „entzündlichen Prozesses“ wird eine Antibiotikatherapie eingeleitet, die anfangs zu einer Verkleinerung der Läsion führt infolge der Rückbildung der entzündlichen Begleitinfiltration (Verschleppung der Symptomatik). Durch eine verzögerte Diagnose können so bis zu sechs Monate vergehen bis das Mundhöhlenkarzinom zur Behandlung kommt!

Das Ziel ist jedoch nicht erst die Diagnose des Karzinoms, sondern bereits die frühe Erkennung obligater präkanzeröser Dysplasien des Plattenepithels, um die Prognose entscheidend zu verbessern. Klinische Versuche, die

dysplastischen Schleimhautareale durch vitale Anfärbung (Jodlösung, Toluidinblau, Toloniumchlorid) darzustellen, konnten das Problem bisher nicht lösen. Diese färben die Kern- DNA und die mitochondrale DNA in dysplastischen und malignen Zellen an. Derartige Tests werden auch kommerziell angeboten, wie der ORA- Test und OraScan. Beim OraScan- Test werden manifeste Karzinome zuverlässig durch Anfärbung mit Toluidinblau dargestellt. Dieser Test versagte jedoch bei präkanzerösen Veränderungen, bei denen sich eine geringe Spezifität (62%) und hohe Falsch- Negativ- Raten ergaben [Warnakulasuriya et al. 1996]. Eine Studie mit Toloniumchlorid, dem aktiven Bestandteil des ORA- Tests, ergab 64% Fehldiagnosen, wiederum wurden manifeste Karzinome und Carcinomata in situ am zuverlässigsten dargestellt [Epstein et al. 2003]. Ram und Siar (2005) konnten mit Chemilumineszenz (Vizilite^(R)) und Toloniumchloride eine Sensitivität von 14,2% bzw. 25% erreichen. Möglicherweise bieten diese Methoden eine Hilfe bei der Ermittlung einer geeigneten Gewebeentnahmestelle oder zur Bestimmung malignen Gewebes in Abgrenzung zu gesundem Gewebe während einer Operation. Jedoch ersetzt es keinesfalls eine sorgfältige (zahn)ärztliche Untersuchung mit einer speziellen histopathologischen Gewebeuntersuchung.

Ein weiteres Verfahren beruht auf einer Aminolaevulinsäure (ALA) gestützten Fluoreszenzdiagnostik bei der die ALA in Form einer 0,4%igen Mundspüllösung eingesetzt wird. Diese Methode erzielte eine Sensitivität von 96%, aber eine geringe Spezifität, wegen Fluoreszenz von Bakterien, entzündlich oder

physikalisch geschädigter Mundschleimhaut, wie zum Beispiel nach Strahlentherapie.

Der Nachweis zirkulierender Tumorzellprodukte im Blut oder von RNA-Biomarkern und Telomerase im Speichel bietet sich in einigen Fällen als Methode für den Nachweis von manifesten Karzinomen und Tumorrezidiven an [Rajpura et al. 2005, Zhong et al. 2004], ihre Bedeutung für die Frühdiagnostik von Mundhöhlenkarzinomen ist aber noch nicht genügend untersucht.

Der Röntgenaufnahme ist bei der Früherkennung des Mundhöhlenkarzinoms eine nur geringe Rolle beizumessen. In der Regel tritt erst in einem späteren Erkrankungsstadium eine Osteolyse der betreffenden Knochenabschnitte auf, wobei eine tumoröse Infiltration des Knochens durch ein Plattenepithelkarzinom selten auftritt. Liegt jedoch eine tumoröse Infiltration vor, ist diese häufig weiter fortgeschritten als es das Röntgenbild vermuten lässt. Die bildgebende Diagnostik dient somit der Orientierung.

Auch die histologisch- morphologische Diagnostik, die in Bezug auf die Karzinomdiagnose, insbesondere der Bestimmung des invasiven Wachstums den Goldstandard bei der Abklärung darstellt, erfüllt bei der Diagnostik von präkanzerösen Veränderungen nicht die in sie gesetzten absoluten Erwartungen.

Präkanzeröse Dysplasien sind histologische oder zytologische Abweichungen von der Norm, welche verdächtig sind, aber nicht eindeutig als gutartige oder bösartige Epithelveränderungen zu identifizieren sind. Bei der subjektiven zytologischen oder histologischen Diagnostik werden drei Grade der Dysplasien

unterschieden: leicht, mittel und schwer. Die ansteigenden Gradzahlen der epithelialen Dysplasien entsprechen der zunehmenden Wahrscheinlichkeit, dass sich die betreffenden Läsionen in ein In-situ- oder noch zu einem invasiven Karzinom entwickeln können. In der Mundhöhle können fakultative präkanzeröse Dysplasien zum Beispiel in Form von Leukoplakien, Erythroplakien, Lichen etc. auftreten. Dysplasien stellen also morphologische Veränderungen dar, deren Erscheinungsbild zwar eine Abweichung von der Norm darstellt, aber nicht beweisend für Krebs ist. Die klinische Konsequenz hierbei ist oft eine Unsicherheit bezüglich des weiteren Vorgehens im Einzelfall: Handelt es sich um eine Dysplasie, die regelmäßiger Kontrollen bedarf oder um eine veränderte Mundschleimhautstelle, die exzidiert werden muss? Dieser Umstand erschwert die Diagnose von Dysplasien, weshalb nach weiteren Untersuchungsmethoden gesucht werden muß, die die Beurteilung des Karzinomrisikos verbessern können.

1.6 DNA- und zytogenetische Grundlagen

Menschliche Zellkerne, abgesehen von den Zellen der Gonaden, enthalten jeweils 2×23 Chromosomen, entsprechend einem doppelten Chromosomensatz. Der DNA- Gehalt (c) des menschlichen haploiden Chromosomensatzes beträgt $1c$. Der DNA- Gehalt einer diploiden menschlichen Zelle beträgt $2c$ [Speckmann, Wittkowski 1998].

Im Verlauf eines Zellzyklus unterliegt der DNA- Gehalt einer Zelle typischen Veränderungen. So findet sich in der Synthesephase (S- Phase), unmittelbar

vor der Zellteilung in der G₂- Phase ein tetraploider Chromosomensatz (4c) [Löffler 1999].

Erfolgt nach der Synthesephase keine regelrechte Mitose oder schließen sich mehrere Synthesephasen aneinander, entstehen polyploide Zellen (4c, 8c, 16c). Peridiploide Zellen kennzeichnen lediglich eine Schwankung der Chromosomenzahl um den diploiden Wert.

Sowohl diploide als auch poly- und peridiploide Chromosomensätze gelten als euploid [Böcking 1998].

Numerische oder strukturelle Abweichungen euploider Chromosomensätze, messbar am veränderten DNA- Gehalt der Zellen, sind als Aneuploidie definiert [Böcking 1998, Böcking et al.2004].

Zellbiologisch gilt der Nachweis von chromosomaler DNA- Aneuploidie als Beleg für Neoplasie, wobei der Nachweis eines jeweils tumorspezifischen Ausmaßes ein Maß für Malignität darstellt [Heim 1987]. Ist DNA- Aneuploidie jedoch nicht nachweisbar, erlaubt dies keinen Umkehrschluß [Böcking 1998].

Die meisten Tumoren, auch gutartige, zeigen von den übrigen Körperzellen abweichende numerische und/oder strukturelle Chromosomenabberationen, welche nicht in normalen oder reaktiv veränderten Zellen vorzufinden sind [Böcking et al. 1999].

Insbesondere Plattenepithelkarzinome weisen konstant aneuploide Zellkern-DNA-Gehalte auf [Knüchel et al. 1986]. Es besteht grundsätzlich aber kein Unterschied zwischen den Plattenepithelien verschiedener Lokalisationen hinsichtlich der Krebsdiagnostik: Verschiedene Studien zeigen, dass Dysplasien des Plattenepithels des Kehlkopfs [Böcking et al. 1985], der Lunge [Auffermann

et al. 1985], der Cervix uteri [Böcking et al. 1986] oder der Mundschleimhaut [Remmerbach et al. 2004] ohne Aneuploidie keinen Krebs entwickelten. Diejenigen mit Aneuploidie ließen nach genauer histologischer Aufarbeitung zur selben Zeit oder bis zu vier Jahre später ein Plattenepithelkarzinom erkennen.

Bei den Prostatakarzinomen oder den malignen Lymphomen beispielsweise, weisen nur 80% der Tumoren für Malignität beweisende aneuploide DNA-Gehalte auf [Knüchel et al. 1986].

Diese Befunde stellen die Grundlage für die Hypothese dar, dass diejenigen plattenepithelialen Dysplasien obligate Präkanzerosen darstellen, welche DNA-Aneuploidie aufweisen.

1.7 DNA- Bildzytometrie

Die Grundlage der DNA- Bildzytometrie stellt die Exfoliativzytologie dar. In den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts führte Papanicolaou (1943) diese Methode in die gynäkologische Karzinomdiagnostik ein. Bei diesem Verfahren werden abgeschilferte Epithelzellen oder Zellverbände von der Zervixoberfläche mit einem geeigneten Zellkollektor gewonnen, auf einen Glasobjektträger übertragen und zytopathologisch untersucht. Die Früherkennung des Zervixkarzinoms der Frau durch die nichtinvasive zytologische Abstrichuntersuchung erzielte große Erfolge. Da das Plattenepithelkarzinom der Zervix uteri und das der Mundschleimhaut in ihrer zytologischen und histologischen Erscheinung identisch sind, fehlte es nicht an Versuchen dieses Verfahren auf die Mundhöhle zu übertragen.

Erste Untersuchungen bezüglich der Bedeutung der DNA- Zytometrie wurden bereits in den Siebziger- und Achtzigerjahren des vorherigen Jahrhunderts vorgelegt [Ehlres 1972, Pfitzer und Pape 1975, Winkler et al. 1984].

Remmerbach und Mitarbeiter hatten 1999 die ersten Ergebnisse zur Treffsicherheit der Bürstenbiopsie einschließlich der statischen DNA-Zytometrie vorgestellt. Eine aktuelle Studie bestätigte die Ergebnisse [Remmerbach et al. 2004]. Mit Hilfe der sogenannten nicht- invasiven Bürstenbiopsie konnte eine der histologischen Diagnostiken ebenbürtigen Sensitivität von 97,8% bei 100%iger Spezifität zur Abklärung von oralen Leukoplakien und Erythroplakien erreicht werden [Remmerbach et al. 2004]. Boecking und Mitarbeiter (2004) erzielten in ihrer ebenfalls prospektiv angelegten Studie eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 97,4% unter Anwendung der DNA- Zytometrie.

Die Methode der Brush- Biopsie ist nicht invasiv, erspart dem Patienten eine unangenehme Gewebeentnahme für die Histologie und bietet auch die Möglichkeit der DNA- zytometrischen Untersuchung zur Abklärung der Dignität von Dysplasien. Dies ist nämlich an Gewebeproben mit nur sehr großem technischem Aufwand möglich.

Mit Hilfe der DNA- Bildzytometrie kann dann mittels DNA- Messung eine Aneuploidie (grobe Abweichung von normalem, diploidem DNA- Gehalt) festgestellt werden. Solche Veränderungen kommen in der Regel nur bei Tumoren, manchmal auch bei Gutartigen vor. Dabei ist die Häufigkeit von DNA- Aneuploidie bei Plattenepithelkarzinomen sehr hoch. Bei benignen Veränderungen der Mundschleimhaut dagegen null. Deshalb kann die DNA-

Aneuploidie als Marker zur Identifikation maligner Zellen in Abstrichen der Mundhöhle angesehen werden.

Das Verfahren der DNA- Bildzytometrie ermöglichte es, die gemessenen Zellen morphologisch zu beurteilen und durch Messung der Gesamtmenge der DNA eine genetische Malignitätsgradierung vorzunehmen.

Im Prinzip handelt es sich um eine Messung der Lichtabsorption: diese ist nach dem Lambert- Beer'schen Gesetz der DNA- Menge proportional, so dass durch Vergleich mit normalen Referenzzellen ein so genanntes DNA- Histogramm aufgenommen werden kann.

Die Messung der integrierten, optischen Dichte der gefärbten Zellkerne erfolgte interaktiv am Monitor eines TV- Bildanalysesystems, welches mit einem konventionellen Mikroskop gekoppelt wurde.

Daraus ergaben sich DNA- Histogramme, bei denen auf der y- Achse die Anzahl der Zellkerne lag, zu denen ein jeweiliger DNA- Gehalt (x- Achse) gehörte. Das DNA- Histogramm stellt somit eine Häufigkeitsverteilung der optischen Dichte speziell angefarbter Zellkerne dar. Die Einheit, in der gemessen wurde, ist c (c= einem einfachen Chromosomensatz entsprechender DNA-Gehalt).

1.8 Ziel der vorliegenden Studie

Ziel der vorliegenden Studie war es, die diagnostische Treffsicherheit der Zytologie und der DNA- Bildzytometrie zur Früherkennung von obligaten Präkanzerosen der Mundschleimhaut zu ermitteln. Dabei wurde die Methode der flüssigkeitbasierten Zytologie verwendet.

Übergeordnetes Ziel war es, mögliche Biomarker zur Karzinogenese oder als Prognoseparameter für intraorale Karzinome zu identifizieren.

2 Material und Methode

2.1 Material und Studiendesign

In dieser Studie wurden Mundschleimhautproben von 10 gesunden Probanden, von 17 Patienten mit Leukoplakien und von 10 Patienten mit manifesten Mundhöhlenkarzinomen mittels Brush- Biopsie entnommen. Von den Erstgenannten wurden 50 Abstriche genommen. Von den Zweitgenannten 69 Abstriche und von den Letztgenannten 36 Abstriche.

Die Schleimhautproben der gesunden Probanden stammten aus fünf verschiedenen Lokalisationen der Mundhöhle: Die rechte und linke Seite der Wangenschleimhaut, ebenfalls beide Seiten des Zungenrandes und vom Mundboden. Bei den Patienten mit Leukoplakie oder mit manifestem Mundhöhlenkarzinom wurde eine Abstrichprobe vom Areal der morphologischen Gewebeveränderung bzw. malignen Entartung genommen, zusätzlich vom Übergang zwischen gesundem und befallenem Gewebe und von der jeweiligen gegenüber liegenden gesunden Seite.

Die Aufbereitung der Präparate erfolgte im zytologischen Labor der Gynäkologie des Universitätsklinikums Münster (Leiter: Prof. Dr. R. J. Lellé) mit der Methode der Flüssigkeitszytologie (liquid based cytology).

Es wurden pro Lokalisation mindestens 5 ThinPreps angefertigt. Das erste Präparat wurde für die zytologische Begutachtung nach Papanicolau gefärbt. Anschließend erfolgte eine Umfärbung des Präparats nach Feulgen für die

spezifische Anfärbung der DNA, deren Menge in den Zellkernen mit einem computerunterstützten Bildanalyse-System gemessen wurde.

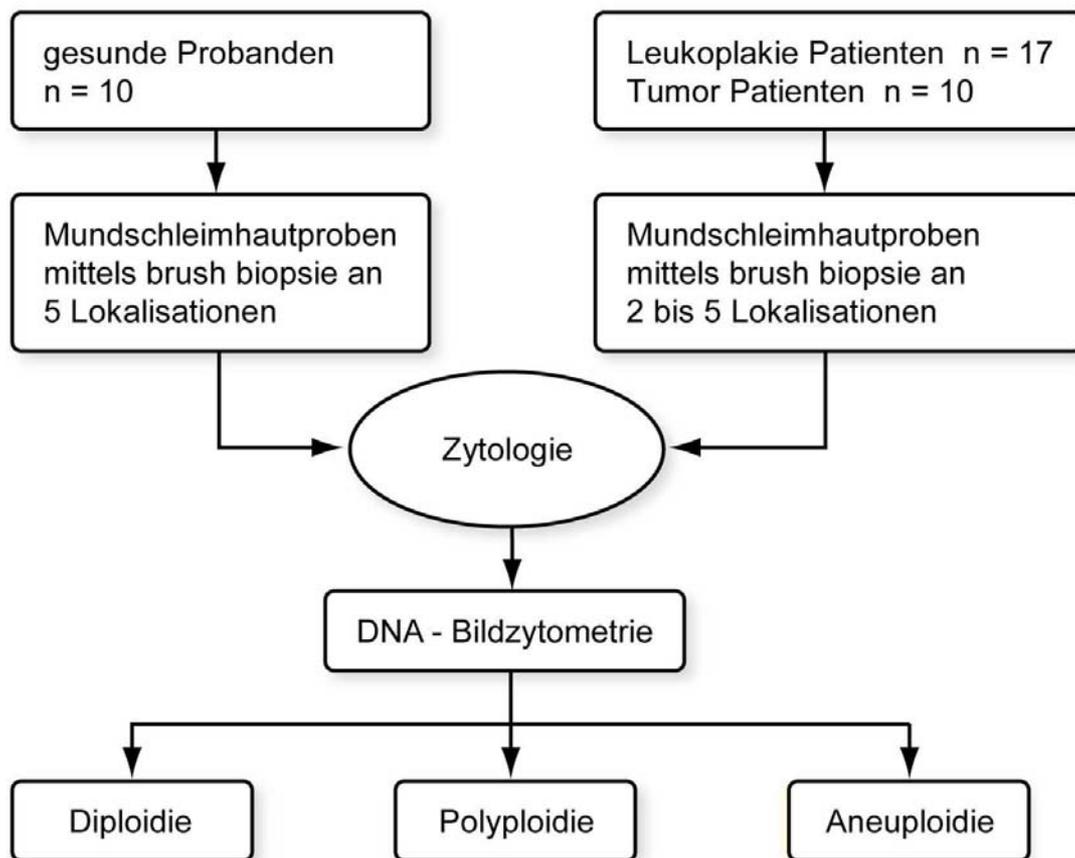


Abb. 4: Studiendesign

2.2 Methoden

2.2.1 Die Brush- Biopsie

Die Patienten wurden in der Tumorsprechstunde der Poliklinik für Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie im Universitätsklinikum Münster vorstellig.

Nach Erhebung der Anamnese (Familien-, Allgemein- und Spezieller Anamnese), folgte die extraorale Inspektion des Kopf- Hals- Bereiches und die peri- und intraorale Untersuchung. Bei unklarem Schleimhautbefund wurde die nicht invasive Brush- Biopsie zur Dignitätsabklärung angewandt. Für die o. g. fünf verschiedenen Lokalisationen der Mundhöhle wurde jeweils eine spezielle Abstrichbürste verwendet. Diese wurde unter leichtem Druck mehrmals um die eigene Achse auf der entsprechenden Läsion im Mund gedreht. Die gewonnenen abgeschilferten Plattenepithelzellen wurden in je einen Behälter mit PreservCyt- Lösung (Alkohol- Fixativ) zur Herstellung eines ThinPrep- Abstriches ausgewaschen.

Die Aufbereitung der Präparate erfolgte im zytologischen Labor der Gynäkologie des Universitätsklinikums Münster (Leiter: Prof. Dr. R. J. Lellé). Hier wurden aus den Lösungen mit Hilfe des ThinPrep 2000 Prozessors pro Lokalisation mindestens 5 ThinPreps angefertigt.

2.2.2 Anfertigen eines ThinPrep- Präparates

Der von der Firma Cytec Corp. (USA) hergestellte ThinPrep 2000 Prozessor erlaubt die automatische Präparateherstellung in Dünnschichttechnik aus einer Zellsuspension(Abb.5).



Abb. 5: Der ThinPrep 2000 Prozessor

Ein haftungsbeschichteter Objektträger wurde in den ThinPrep 2000 Prozessor eingespannt und der Behälter mit dem suspendiertem Zellmaterial hinein gestellt. Ein Kunststoffzylinder, an dessen Boden eine Filtermembran (TransCyt- Filter) gespannt war, taucht beim Starten des Programms in den Behälter mit dem suspendierten Zellmaterial und schafft eine rotierende

Bewegung. Das Zellmaterial wurde dispergiert, so dass Zelldetritus, Erythrozyten, Leukozyten und Schleim ausgeschieden wurden. In der nächsten Phase bildete sich im Kunststoffzylinder ein niedriges Vakuum und die Zellen wurden an die Außenfläche der Filtermembran gesogen. Danach wurde die sich im Zylinder befindliche Fixierlösung abgesaugt. Die Zellen auf dem Filter wurden leicht auf den ThinPrep- Objektträger gedrückt, so dass ein Zellpräparat in einer dünnen Schicht (Mono-Layer- Präparat) in Form eines kreisrunden Areal erzeugt wurde. Anschließend wurde der Objektträger zur Konservierung der Zellen sofort in ein Alkoholbad getaucht. Nun konnte das Präparat im Färbeautomaten nach Papanicolaou gefärbt werden.

2.2.3 Die Färbung nach Papanicolaou

Die von Papanicolaou (1928) erarbeitete Färbetechnik wird heute in ihrer standardisierten Form routinemäßig bei gynäkologisch- zytologischen Untersuchungen zur Krebsdiagnostik verwendet. Die zytologische Präparate-Färbung nach Papanicolaou beruht auf einer Kernfärbung mit Hämatoxylin und anschließenden alkoholischen Zytoplasmafärbungen. Die Papanicolaou-Färbung zeichnet sich durch eine sehr feine Anfärbung der Zellkerne und einer hohen Transparenz des Zytoplasmas aus, so dass auch bei in Abstrichen häufig vorkommenden Zellüberlagerungen die einzelnen Zellen gut zu beurteilen sind.

Das ThinPrep- Präparat wurde wie folgt mit Hilfe eines Färbeautomaten nach Papanicolaou gefärbt:

benötigte Lösungen:

- Hämatoxylin nach Harris
- Orange G Lösung
- Polychromlösung EA 31 oder EA 50
- Polychromlösung EA 65
- 0,5%ige HCl Lösung
- Lithiumcarbonatlsg.
3 Tropfen gesättigte Li_2CO_3 - Lsg. auf 100ml destilliertes Wasser
- Fixierlösung
50ml 95%ig EtOH und 50ml 95% Diethylether mischen

Durchführung:

- Ausstriche sofort nach Entnahme 5-10min in Fixierlösung geben
- absteigende EtOH-Reihe (80%ig, 70%ig, 50%ig) je kurz schwenken
- 6 min Eisenhämatoxylin nach Harris
- in destilliertem Wasser spülen
- differenzieren in Salsäure-Alkohol
- 1 min Lithiumcarbonatlsg.
- 3 min fließendes Leitungswasser
- aufsteigende Alkoholreihe
- 30 sec. 50% EtOH
- 30 sec. 70% EtOH
- 30 sec. 80% EtOH
- 30 sec. 100% EtOH

- 3 min Orange G Lösung
- 4x in 96% EtOH spülen
- 5 min Polychromlösung EA 31, 50 oder EA 65 je nach Probenmaterial, siehe oben
- 2x in 96% EtOH spülen
- 4 min Ethanol-Xylol-Gemisch (1:1)
- in Xylol spülen
- mit Eukitt eindecken

Färbeergebnis:

- Kerne: blau - blauviolett
- azidophile Zellen : Plasma rosa bis orangerot
- basophile Zellen : Plasma grün bis grünblau
- Leukozyten : blassrosa bis hellviolett
- Erythrozyten : rotorange bis rotbraun

2.2.4 Befundung der Präparate

Die zytologische Begutachtung der Präparate wurden gemäß den allgemein anerkannten diagnostischen Kriterien nach der Münchener Nomenklatur II von einer zytologisch- technischen Assistentin durchgeführt (s. Anhang). Anschließend wurden alle Präparate von Frau Prof. Dr. A. Bankfalvi bewertet.

2.2.5 Die Färbung nach Feulgen

Die Färbung nach Feulgen ist zurzeit die Methode der Wahl für die Bestimmung von DNA in histologischen und zytologischen Proben. Sie färbt spezifisch die DNA an und setzt sich aus zwei Schritten zusammen:

Zuerst werden durch milde, saure Hydrolyse die Purinbasen von der doppelsträngigen DNA abgetrennt und freie Aldehydgruppen erzeugt. Hierbei ist es wichtig konstant eine Temperatur von 27°C einzuhalten, da ansonsten große Abweichungen in der Farbintensität (integrated optical density, IOD) resultieren. Im zweiten Schritt werden die freigelegten Aldehydgruppen mit Schiffischem Reagenz färberisch dargestellt. Nun kann die Intensität des Farbstoffs im einzelnen Zellkern (IOD) photometrisch bestimmt werden.

Bei unseren Untersuchungen wurde das Papanicolaou gefärbte Präparat zuerst mit Xylol behandelt, damit sich das Deckglas lösen lässt. Die Färbung wurde mit Hilfe eines speziellen Färbeautomaten durchgeführt.

Reagenzien

Bestandteile im DNA Färbekit nach Feulgen

Reagenz 1: 5 M Salzsäure 2 x 250 ml

Reagenz 2: Schiff- Reagenz 2 x 250 ml

Reagenz 3: Natriumdisulfit- Konzentrat 1 x 250 ml

Vorbereitung:

Natriumdisulfit- Waschlösung

Zur Herstellung von ca. 100 ml Lösung werden folgende Lösungen gemischt:

- Natriumdisulfit-Konzentrat (Reagenz 3) 5 ml
- Aqua dest. 95 ml
- HCl (Reagenz 1) 1 ml

Vorbereitung der Proben:

- Lufttrocknen für 1 Stunde
- Fixierung in phosphatgepuffertem (pH = 7,0) 4%igem Formaldehyd für 1 Stunde
- Waschen in fließendem Leitungswasser für 10 Minuten

Durchführung:

- HCl (Reagenz 1) bei 22°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) 50 min
- Aqua dest. 2 min
- Aqua dest. 2 min
- Schiff- Reagenz (Reagenz 2) bei Raumtemperatur 60 min
- Natriumdisulfit-Spüllösung 3 min
- Natriumdisulfit-Spüllösung 3 min
- Aqua dest. 2 min
- Aqua dest. 2 min
- Ethanol 50% 1 min
- Ethanol 70% 1 min

- Ethanol 80% 1 min
- Ethanol 99% 1 min
- Xylol 1 min
- Mit Deckglas eindecken

Färbeergebnis:

Zellkerne: rot-violett

Zytoplasma und Hintergrund: sollten ungefärbt sein

Nach durchgeführter Feulgen- Färbung ist eine Rückfärbung der Präparate nach Papanicolaou ohne wesentlichen Qualitätsverlust möglich, so dass die Präparate wieder konventionell mikroskopisch beurteilbar sind.

2.2.6 DNA- Bildzytometrie

Nach der spezifischen Anfärbung der Zellkern-DNA nach Feulgen folgte die photometrische Messung der integrierten optischen Dichte (IOD) der Zellkerne.

Die DNA- Bildanalyse wurde mit der Software Quick Auto Cyte der Firma Tripat (Burlington, USA) in Kombination mit einem Lichtmikroskop der Firma Zeiss (Jena) durchgeführt. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines PC-basierten Bild-Analysesystems. Das Lichtmikroskop ist mit einer entsprechenden Farbkamera ausgestattet und somit wurde das mikroskopische Bild auf den Monitor des Computers übertragen.

Vor Beginn des eigentlichen Meßvorgangs wurde das Mikroskop nach dem Köhler'schen Beleuchtungsprinzip justiert. Die Lichteinstellung wurde an einem leeren, d.h. zell- und artefaktfreien, Feld des Objektträgers durchgeführt. Für die DNA-Messungen wurde nur das Objektiv mit der 40-fachen Vergrößerung verwendet. Vor jeder Bildanalyse musste das System erneut kalibriert werden.

Das gesamte Präparat wurde dann unter dem Lichtmikroskop durchgemustert, um geeignete Meßareale mit den für die Analyse relevanten Tumorzellkernen aufzusuchen. Nach entsprechender Funktionsauswahl aus der Menüleiste des Computerprogramms wurde das mikroskopische Bild auf dem Monitor „eingefroren“.

Innerhalb der Zellpopulation wurden, sofern vorhanden, mindestens 100 Zellkerne nach Zufallskriterien gemessen. Als Referenzzellen wurden ca. 30 im selben Präparat befindlichen, morphologisch unauffällige diploide Zellen gemessen. Mit Hilfe des mittleren IOD-Wertes der Referenzzellen kann der DNA-Gehalt von $2c$ ($c = \text{“content“}$) ruhenden normalen Epithelien festgelegt werden. Die doppelte integrierte optische Dichte zum Beispiel einer Tumorzelle in Relation zu einer Referenzzelle ergab einen DNA-Gehalt von $4c$. Zur Qualitätssicherung musste der Variationskoeffizient (CV) der Referenzzellpopulation kleiner als 5% sein.

Die Abbildungen aller gemessenen Zellkerne (Image- Zytometrie) wurden zum Zwecke einer nachträglichen Qualitätskontrolle und für die endgültige diagnostische Interpretation in einer so genannten „Image Gallery“ des TV-Bildanalysesystems gespeichert. So ließ sich auch die Messung nicht gewünschter Zelltypen oder von Artefakten ausschließen.

Die ermittelten Meßdaten eines jeden Präparates wurden gespeichert. Die Software erstellte ein DNA- Histogramm mit der Verteilung des DNA- Gehalts der gemessenen Tumorzellen im Verhältnis zu den Referenzzellen. Anschließend wurden für jedes Präparat das Histogramm und die Zahlenwerte ausgedruckt.

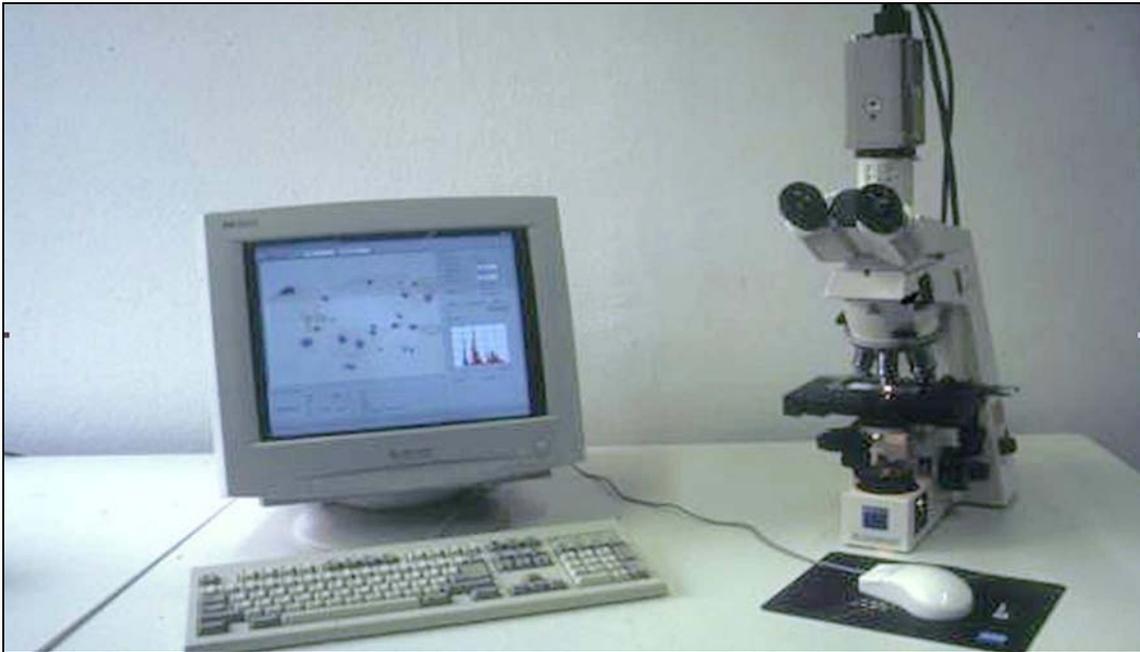


Abb. 6: TV-Bildanalysesystem AutoCyte QUIC-DNA zur diagnostischen DNA- Bildzytometrie

3 Ergebnisse

3.1 Zytologische Diagnostik

Die zytologische Auswertung der nach Papanicolaou gefärbten Präparate wurden gemäß den allgemein anerkannten, diagnostischen Kriterien nach der Münchener Nomenklatur II von einer zytologisch-technischen Assistentin durchgeführt (s. Anhang).

Anschließend wurden alle Präparate von Frau Prof. Dr. A. Bankfalvi begutachtet, standardisiert und nach der Nomenklatur für die extragenitale Zytologie der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und Zytologie bewertet. Die extragenitalen zytologischen Diagnosen wurden in folgende vier Kategorien eingeteilt:

„sicher negativ“:

Bösartige Zellen sind nicht nachweisbar. Es liegen ausschließlich normale und/oder proliferierte und/oder reaktiv veränderte Zellen (entzündlich oder degenerativ) vor. Die Malignitätswahrscheinlichkeit beträgt 0%.

„zweifelhaft“:

Bösartige Zellen sind nicht sicher auszuschließen, in Fällen mit abnormen Zellveränderungen (zum Beispiel mit leichten oder mäßigen Dysplasien).

„dringender Verdacht“:

Bösartige Zellen liegen wahrscheinlich vor bei nur wenigen atypischen Zellen oder bei nicht sicheren Malignitätskriterien atypischer Zellen (schwere Dysplasie).

„sicher positiv“:

Bösartige Zellen sind nachweisbar beim Vorliegen eindeutig maligner Zellen. Die Malignitätswahrscheinlichkeit beträgt 100%.

3.2 Kriterien zur diagnostischen Beurteilung von DNA-Histogrammen

Die Kriterien zur diagnostischen Beurteilung von DNA- Histogrammen lassen sich qualitativ in den Kategorien DNA- diploid, DNA- polyploid und DNA- aneuploid auflisten (Tab. 1).

DNA - diploid	$STL > 1,80c < 2,20c$
DNA - polyploid	$STL > 1,80c < 2,20c$ und $> 3,60c < 4,40c$
DNA - aneuploid	abnorme $STL < 1,80c > 2,20c$ oder $< 3,60c > 4,40c$

Tab. 1: Kriterien zur diagnostischen Beurteilung von DNA- Histogrammen
(STL = DNA- Stammlinie; 1c = DNA- Menge eines einfachen Chromosomensatzes)

Die folgenden Grafiken zeigen DNA- Histogramme aus unserer Studie zur Veranschaulichung der genannten Kriterien.

Eine normale Population proliferierender diploider Zellen zeigt in einem DNA-Histogramm einen ersten Häufigkeitsgipfel bei $2c$, entsprechend der G₀/1-Phase des Zellzyklus, und einen zweiten bei $4c$, entsprechend der G₂/M-Phase (Abb.7).

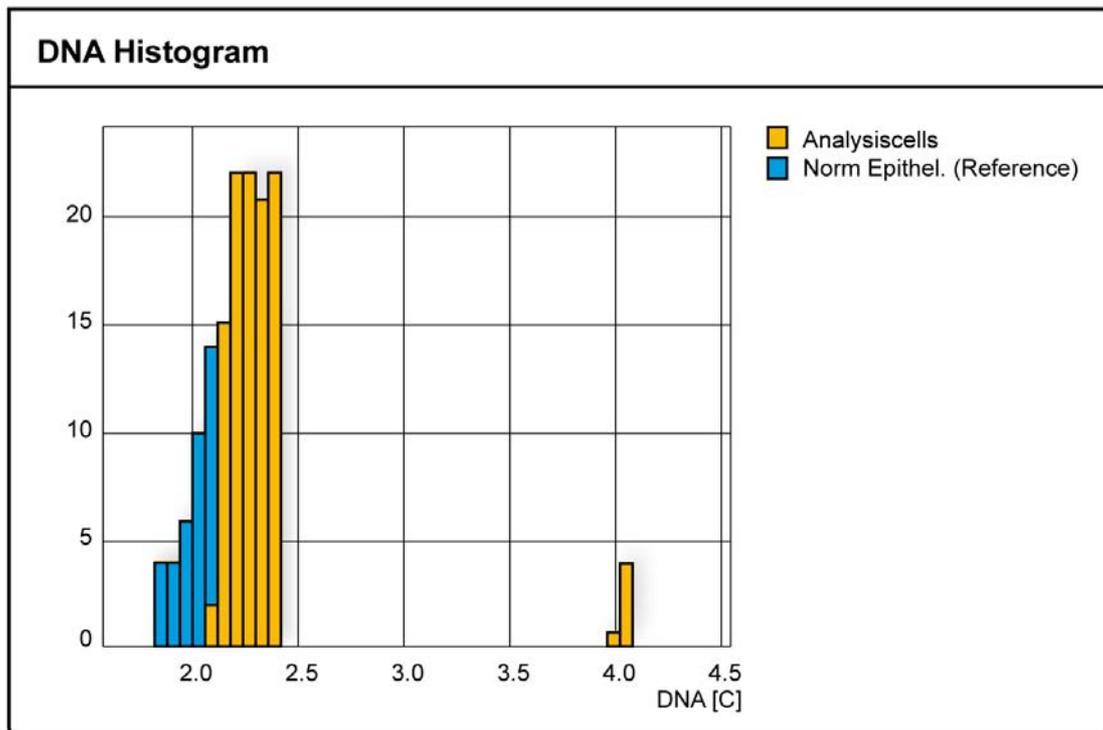


Abb. 7: DNA- Histogramm eines Abstriches von einer histologisch gesicherten Leukoplakie ohne Dysplasie; gezeigt wird die Anzahl der gemessenen Zellen ($n = y$ -Achse) und ihr korrespondierender DNA- Gehalt ($c = x$ - Achse) mit einer normalen, diploiden Stammlinie bei $2c$ und einzelnen Werten bei $4c$

Der Bereich zwischen beiden Gipfeln ist der Synthesephase zugeordnet. Zellen, deren DNA-Menge zwischen $2c$ und $4c$ liegen, werden also nicht als aneuploid gewertet, da nicht auszuschließen ist, dass es sich hierbei um euploide Zellen in der S-Phase handelt. In einigen Geweben kann es physiologischerweise zu

einer Vervielfachung des normalen Chromosomensatzes, entsprechend den ganzzahligen Potenzen des normalen 2c- Gehaltes kommen (4c, 8c, 16c, 32c, usw.). Diese euploide Polyploidisierung kann auch beispielsweise durch HPV-Infekte verursacht werden (Abb.8).

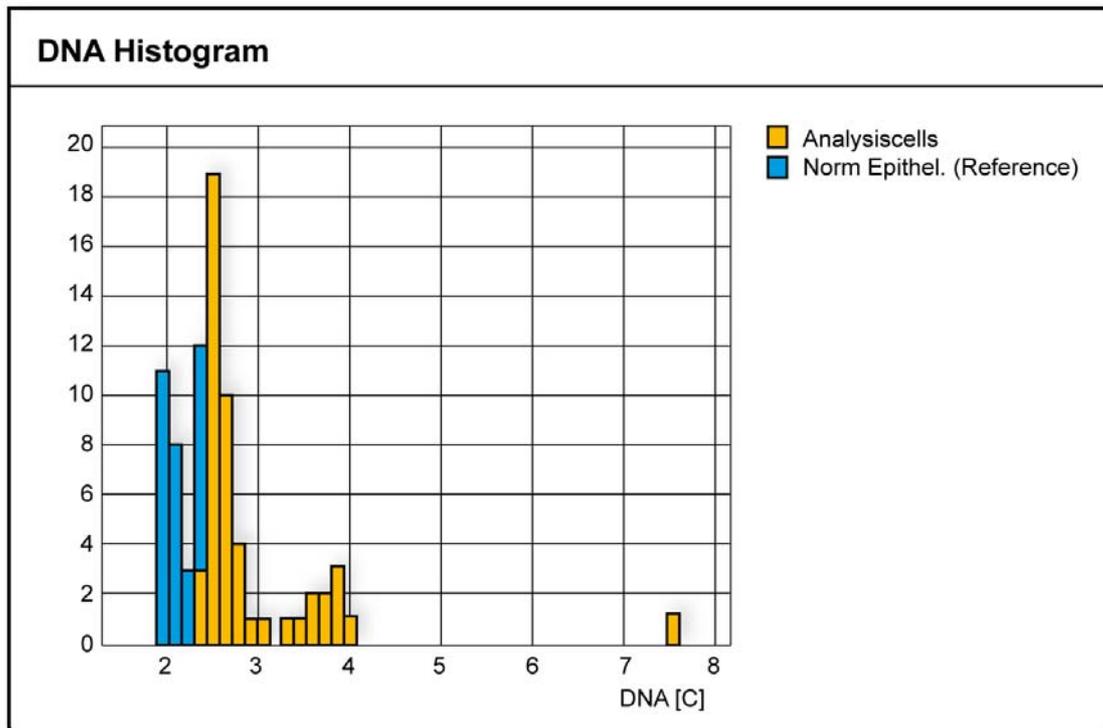


Abb. 8: DNA- Histogramm einer chronischen, teils floriden Entzündung mit reaktiver Akanthose und Hyperkeratose . Gezeigt wird eine euploid- polyploide DNA- Verteilung mit Stammlinien bei 2c und 4c, sowie einzelne Werte bei 8c

Man spricht von Aneuploidie in der DNA- Zytometrie, wenn ein Zellkern keinem euploiden oder polyploiden Chromosomensatz entspricht. Als sicher aneuploid gelten also Zellen, deren DNA- Gehalt höher als 5c ist und nicht im Bereich ganzzahliger Potenzen liegt (Böcking 1990). Ein DNA- Gehalt von >5c ist

diagnostisch relevant (Böcking et al. 1984). Entsprechend liegt der DNA- Gehalt hochaneuploider Zellen in einem Bereich von $>9c$ (Abb.9).

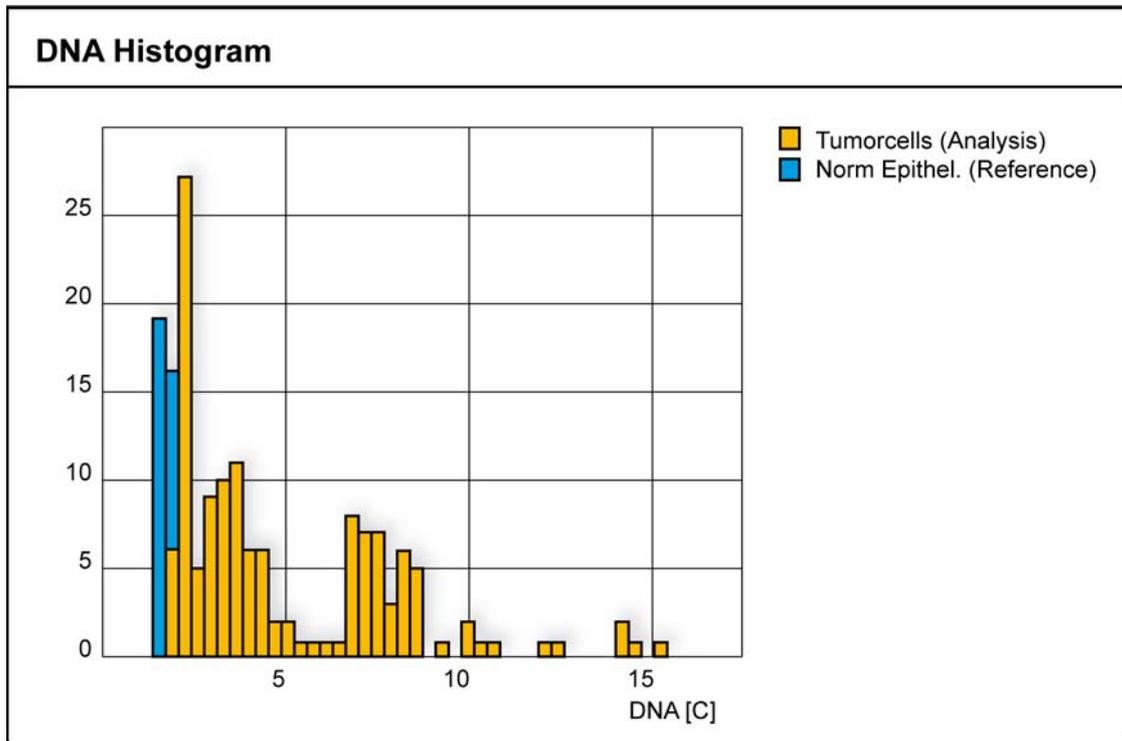


Abb. 9: DNA- Histogramm eines histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinoms der Zunge. Verschiedene Aspekte von DNA- Aneuploidie werden gezeigt: abnorme Stammlinien bei 2,4c; 4,8c; 7,5c und 12 Zellen $> 9c$ (9c Ex.Event)

Nach selektiver Zellkernmessung erlauben bei der Histogrammanalyse zwei Interpretationsmethoden, die Stammlinien- und die Einzelzellinterpretation, die diagnostische Beurteilung. Anhand dieser beiden Interpretationsmethoden ist es möglich je nach vorliegendem Gewebe, eine Dignitätsdiagnose zu stellen oder eine Malignitätsgraduierung vorzunehmen.

Die Stammlinie beschreibt die am häufigsten vorkommenden Werte im DNA-Histogramm. In der Stammlinie wird die G0/G1-Phase der gemessenen

Zellpopulation dargestellt. Obwohl die Stammlinieninterpretation als sehr spezifisch anzusehen ist, setzt sie jedoch voraus, dass ein Großteil der Zellen durch Chromosomenabberation verändert ist. Das bedeutet, dass eine geringfügige Abweichung der Zellkern- DNA im Vergleich mit Referenzzellen nur durch Messung von mindestens Hundert verdächtiger Zellen bewiesen werden kann. Lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied aufzeigen, so kann DNA- Aneuploidie angenommen werden. Dieser Prozess kennzeichnet die Stammlinieninterpretation.

Die Einzelzellinterpretation ist im Vergleich zwar unspezifisch, aber deutlich sensitiver. Dieser Interpretationsmodus schließt die so genannten rare Events, wenige, aber eindeutig Malignität- beweisende Zellen, mit ein. Zellen mit einem DNA- Gehalt $\geq 5c$ dürfen in einem Präparat regelrecht gesucht werden. Besonders sollten morphologische oder von der Farbintensität auffällige Zellen ausgewählt werden. Sowohl um eine letale Mutation dieser Einzelzelle auszuschließen, als auch den DNA- Gehalt von $4c$ bei Zellen in der Mitosephase zu berücksichtigen. Für den Nachweis von Aneuploidie wird ein Vorliegen von mindestens drei $5c$ exceeding events gefordert.

Die absolute Zahl gefundener Zellen mit einem DNA- Gehalt $>5c$ heißt $5c$ - exceeding event und wird als Einzelzellinterpretation bezeichnet.

Als $5c$ - exceeding-rate wird der prozentuale Anteil der Zellen mit einer DNA Menge von mehr als $5c$, als $9c$ -exceeding-rate von mehr als $9c$ (hochaneuploide Zellen) gewertet [Böcking 1990].

Weiterhin wird der DNA- Index (DI) zur Bestimmung der Ploidie herangezogen. Der DI errechnet sich aus dem Quotienten des DNA- Gehaltes der gemessenen

Zellpopulation zu dem der euploiden Referenzzellen. Der DNA- Index definiert somit die Lage der so genannten Stammlinie. Ein DI von 1 entspricht somit einer Stammlinie bei 2c, ein DI von 2,5 einer Stammlinie bei 5c.

3.3 Ergebnisse

Das Untersuchungsgut bestand aus insgesamt 78 zytologischen Präparaten von 25 Patienten. Die endgültigen Diagnosen der 78 Fälle ergaben 15 histologisch gesicherte orale Plattenepithelkarzinome (Abb. 10), 3 Carcinoma in situ, 27 Leukoplakien nach WHO- Kriterien [WHO 1997] (Abb. 11) sowie 33 entzündliche oder andere gutartige Veränderungen (Abb. 12).

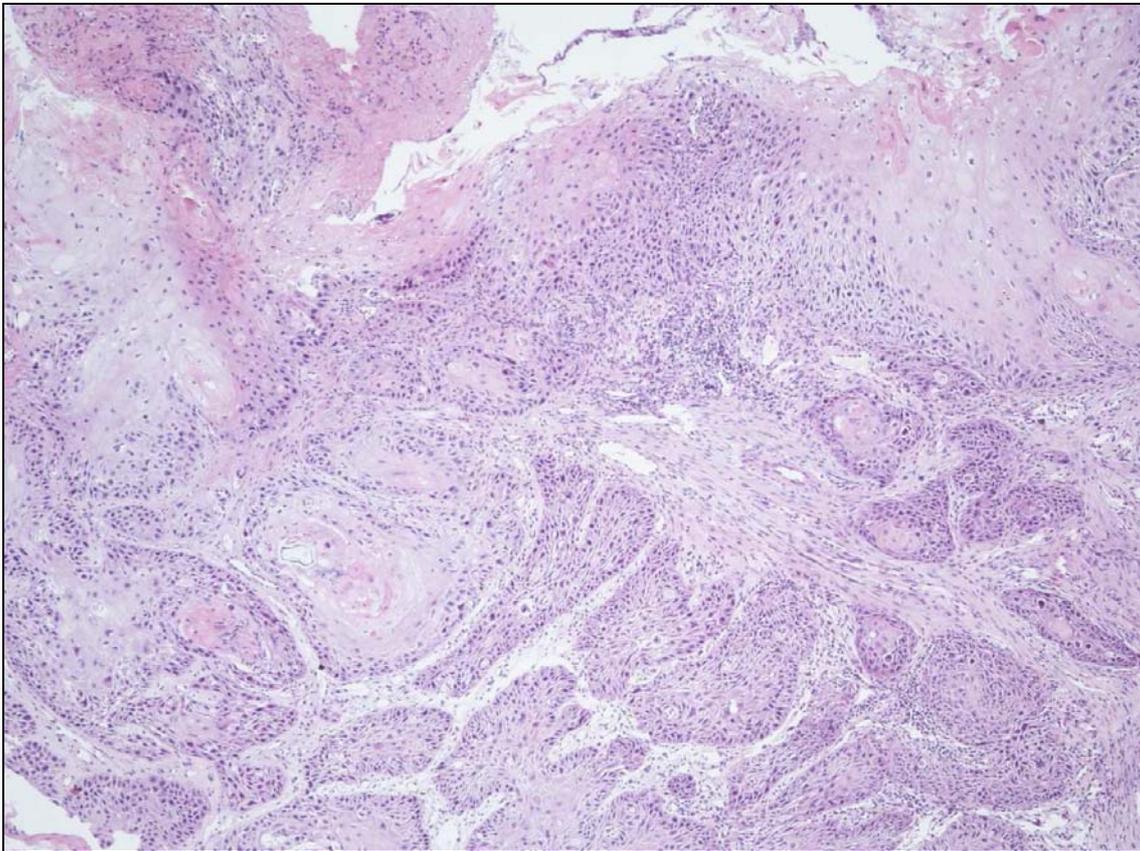


Abb. 10: Histologiepräparat.

Diagnose: Plattenepithelkarzinom

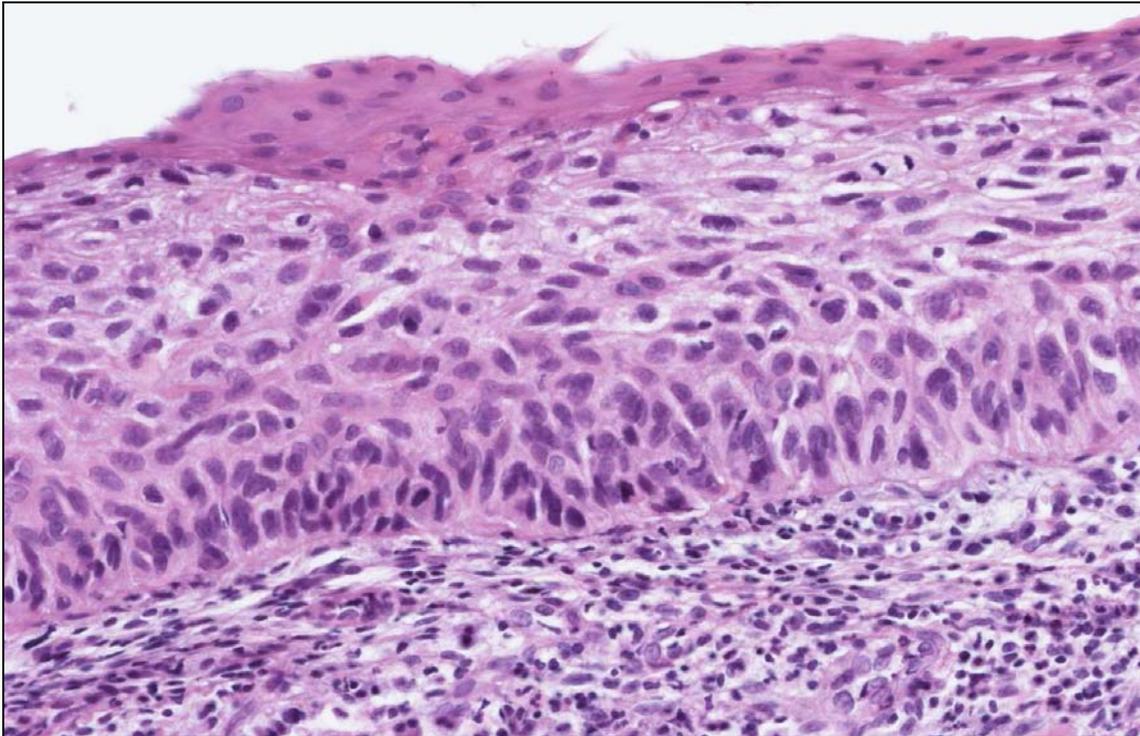


Abb. 11: Histologiepräparat.

Diagnose: Leukoplakie mit Dysplasie Grad 2

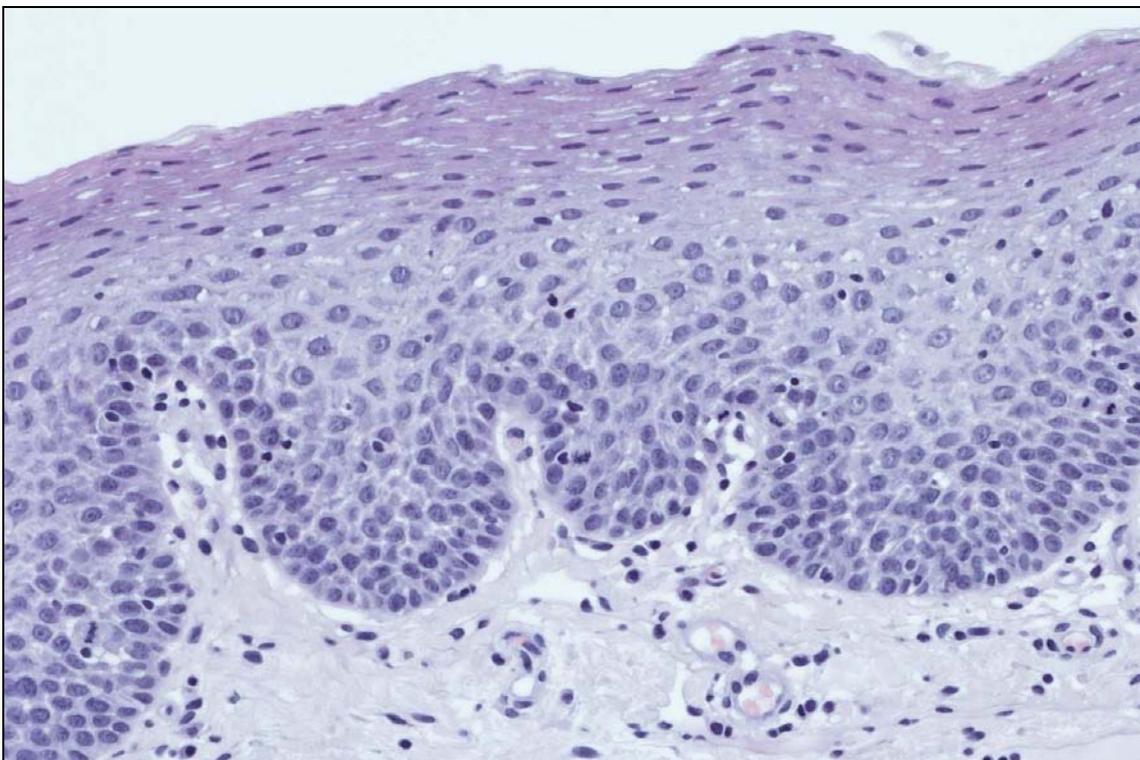


Abb. 12: Histologiepräparat.

Diagnose: normale Mundschleimhaut

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 12 Männern und 13 Frauen zusammen. Das Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt der Untersuchung zwischen 31 und 73 Jahren. Das Durchschnittsalter aller Patienten betrug 61,2 Jahre. Mit einem mittleren Alter von 68,3 waren die Frauen bei der Diagnosestellung durchschnittlich 15,4 Jahre älter als die Männer. Das mittlere Alter der Männer war 52,9 Jahre.

Das Durchschnittsalter der Tumorpatienten lag bei 58,5 Jahre. Die Frauen waren mit einem mittleren Alter von 60,1 im Schnitt 2 Jahre jünger als die Männer. Das mittlere Alter der Männer betrug im Durchschnitt 58,1 Jahre.

Die zytologischen Diagnosen der 60 Präparate gutartiger Veränderungen der Mundschleimhaut (Abb. 13) setzen sich wie folgt zusammen (Tab. 2): 54 Fälle mit der Diagnose „sicher negativ“, 5 Fälle „zweifelhaft“ und 1 Fall mit „dringendem Verdacht“.

Die Ergebnisse der DNA- Bildzytometrie (Abb. 14) ergaben in 57 Fällen „DNA-diploid/polyploid“ und in 3 Fällen „DNA- aneuploid“.

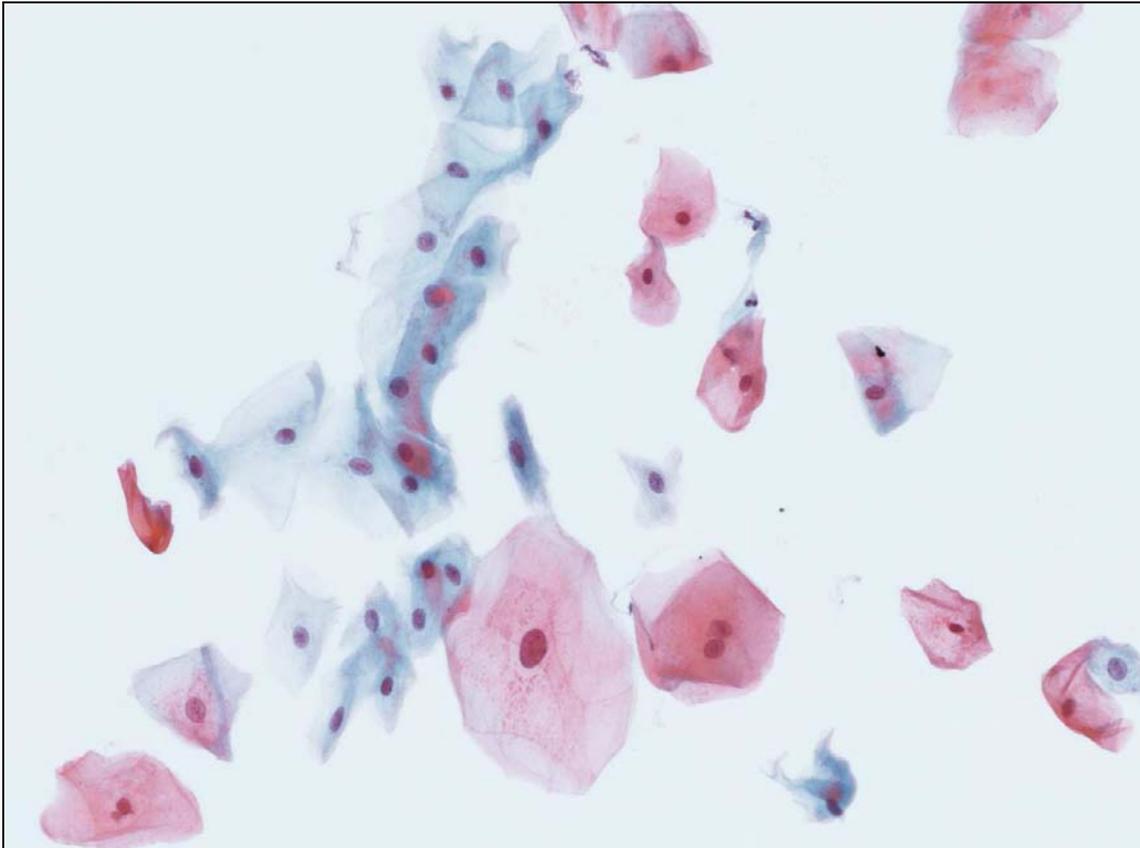


Abb. 13: Pap- ThinPrep-Präparat normaler Mundschleimhaut.
Diagnose des zytologischen Gutachten: „sicher negativ“.

DNA - Bildzytometrie	Zytologie			
	sicher positiv	dringender Verdacht	zweifelhaft	sicher negativ
DNA - aneuploid	—	1	—	2
DNA - diploid, polyploid	—	—	5	52

Tab. 2: Ergebnisse der Zytologie und der DNA- Bildzytometrie der Präparate mit gutartigen Veränderungen (n = 60)

Bei diesen 3 Präparaten, können wir mit großer Wahrscheinlichkeit von Messungenauigkeiten durch Zellkernüberlagerung, Gewebenekrose,

Degeneration oder Leukozyteninfiltration ausgehen. Bei den 5 Fällen, die nach der zytologischen Befundung die Diagnosen „zweifelhaft“ und „dringender Verdacht“ ergaben, ist das Vorliegen eines malignen Tumors weniger wahrscheinlich, denn hier ließ die DNA- Messung keine chromosomale Aneuploidie nachweisen, welche bei Malignomen häufig vorkommt. Daher können wir bei diesen Fällen mit großer Wahrscheinlichkeit von reaktiven Veränderungen im Zellkern ausgehen. Eine histologische Absicherung der Diagnose bei dem Fall mit der Diagnose „dringender Verdacht“ wurde empfohlen.

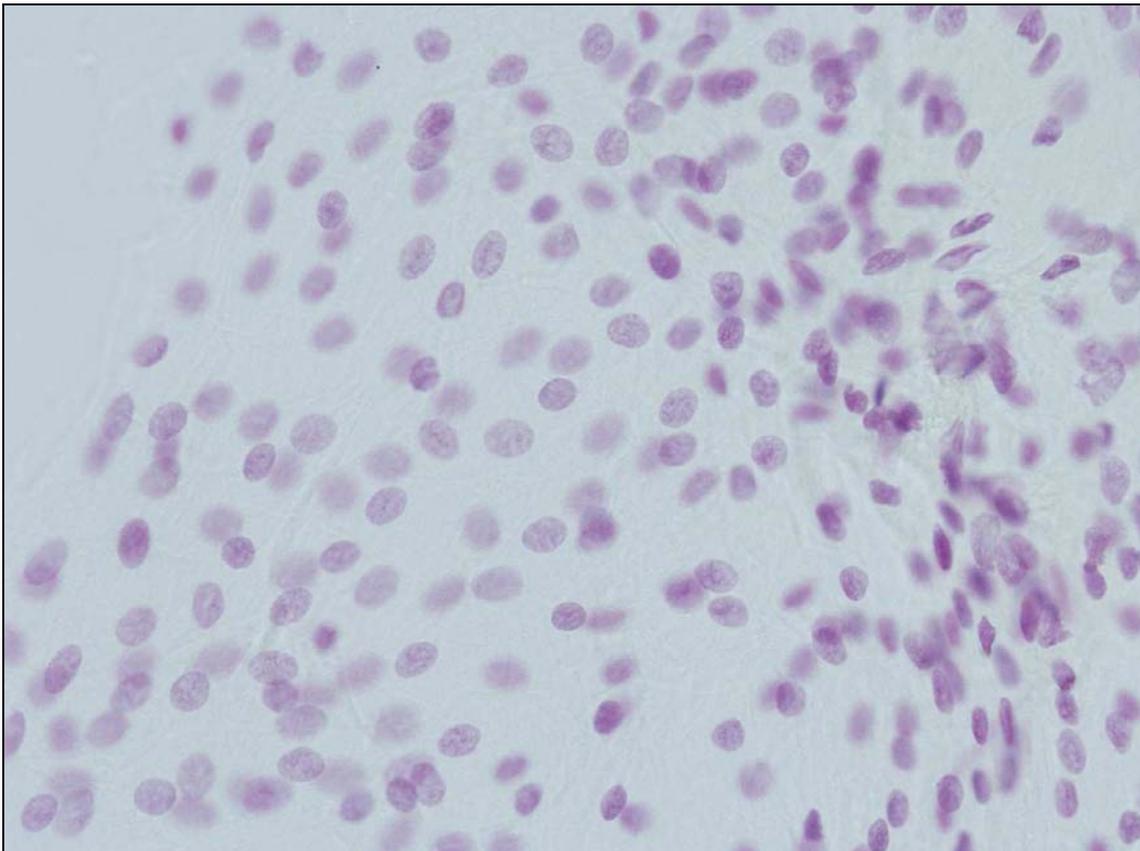


Abb. 14: Feulgen- ThinPrep- Präparat normaler Mundschleimhaut.
Ergebnis der DNA- Bildzytometrie: „DNA- diploid“.

Die zytologischen Gutachten der Präparate mit bösartigen Veränderungen (Abb. 16) lieferten folgende Ergebnisse (Tab. 3): 10 Fälle „sicher positiv“, 6 Fälle „dringender Verdacht“ und 2 Fälle „zweifelhaft“.

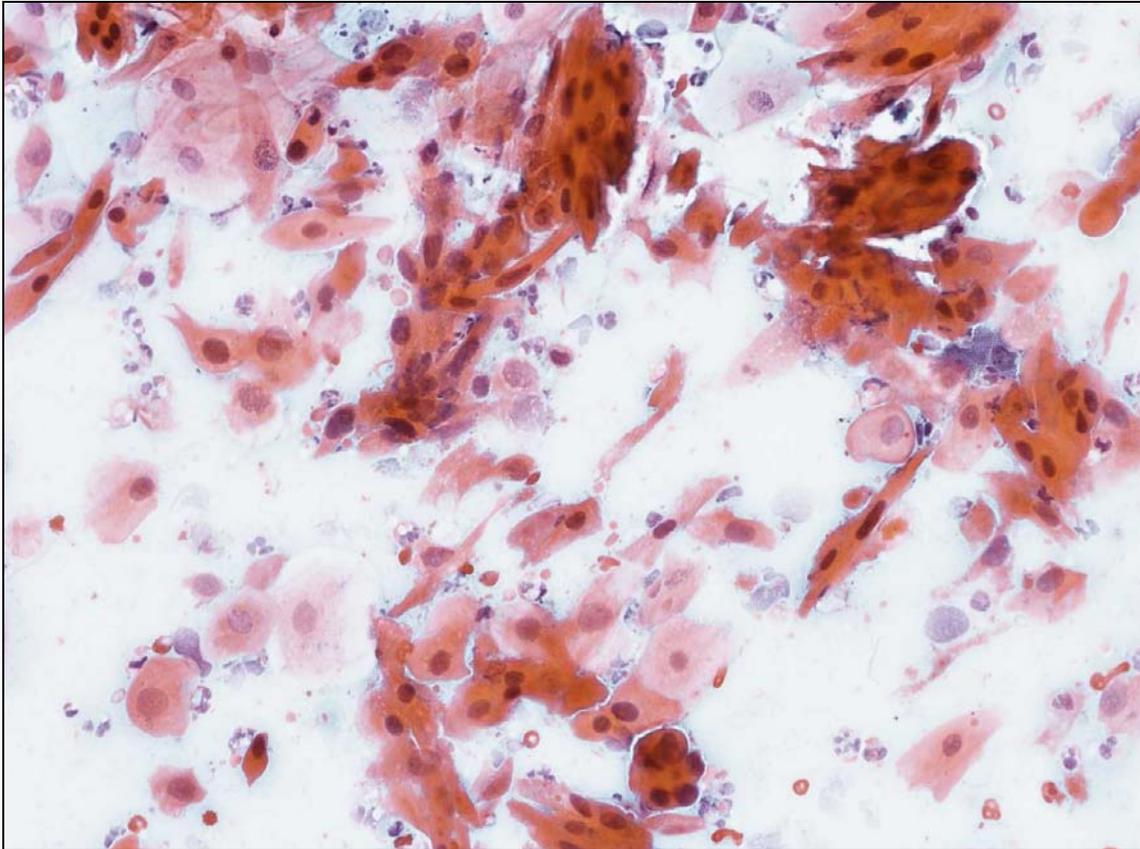


Abb. 15: Zytologieabstrich eines Plattenepithelkarzinoms.

Diagnose des zytologischen Gutachten: „sicher positiv“.

DNA - Bildzytometrie	Zytologie			
	sicher positiv	dringender Verdacht	zweifelhaft	sicher negativ
DNA - aneuploid	9	6	2	—
DNA - diploid, polyploid	1	—	—	—

Tab.3: Ergebnisse der Zytologie und der DNA- Bildzytometrie der Präparate mit bösartigen Veränderungen (n = 18)

Die Ergebnisse der DNA- Bildzytometrie (Abb. 16) wiesen in 17 Fällen DNA-Aneuploidie auf und in einem Präparat wurde diploider DNA-Gehalt gemessen.

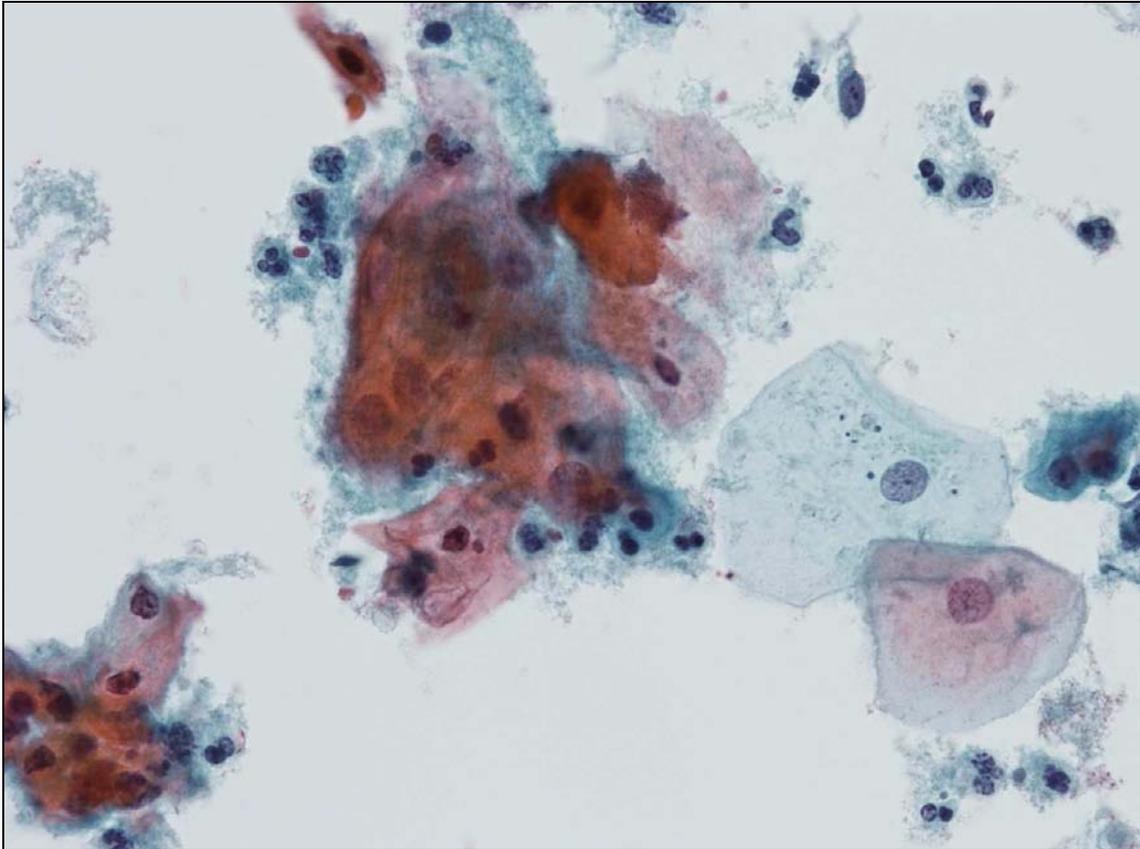


Abb. 16: Zyto- ThinPrep- Präparat eines Plattenepithelkarzinoms.
Ergebnis der DNA- Bildzytometrie: „DNA- aneuploid“.

Das letzte Präparat wies wegen Kernüberlagerung Mängel auf und konnte somit diagnostisch nicht zuverlässig beurteilt werden. Trotz dieser selten vorkommenden Unsicherheit, wurden solche Präparate mit in die Studie einbezogen.

In den Fällen bei denen die Diagnosen zwischen der konventionellen Zytologie und der DNA- Bildzytometrie differierten, gab die Histologie Aufschluss darüber, welche Diagnose zutraf.

3.3.7 Diagnostische Treffsicherheit

Um die Zuverlässigkeit der hier angewandten Methoden zu beurteilen, bedienen wir uns der verschiedenen Maßzahlen der diagnostischen Treffsicherheit.

Die konventionelle Zytologie von 78 Präparaten, gewonnen an 25 Patienten in dieser Studie, ergaben zusammenfassend eine Sensitivität von 88,8% und eine Spezifität von 98,3%.

Die nachfolgend durchgeführte DNA- Bildzytometrie aller Präparate erreichte eine Sensitivität von 94,4% und eine Spezifität von 95%.

Die Sensitivität der Zytologie gegenüber der Histologie lag bei 88,8% (95% Konfidenzintervall: 65,2% bis 98,6%) und die Spezifität bei 98,3% (95% Konfidenzintervall: 91% bis 99,9%). Der positive prädiktive Wert betrug 94,1% (95% Konfidenzintervall: 71,3% bis 99,8%) und der negative prädiktive Wert 96,7% (95% Konfidenzintervall: 88,6% bis 99,6%) (Tab. 4).

Zytologie	Histologie		Summe
	Negativ	Positiv	
Positiv	1	16	17
Negativ	59	2	61
Summe	60	18	78

Tab. 4: Sensitivität und Spezifität der Zytologie gegenüber der Histologie (n = 78)

Die Sensitivität der DNA- Bildzytologie beträgt im Vergleich zur Histologie 94,4% (95% Konfidenzintervall: 72,7% bis 99,8%) und die Spezifität 95% (95% Konfidenzintervall: 86% bis 98,9%). Der positive prädiktive Wert ergab 85% (95% Konfidenzintervall: 62,1% bis 96,7%) und der negative Wert 98,2% (95% Konfidenzintervall: 90,7% bis 99,9%) (Tab. 5).

DNA- Bildzytometrie	Histologie		Summe
	Negativ	Positiv	
Positiv	3	17	20
Negativ	57	1	58
Summe	60	18	78

Tab. 5: Sensitivität und Spezifität der DNA- Bildzytometrie gegenüber der Histologie (n =78)

Die kombinierte Auswertung der DNA- Bildzytometrie mit der konventionellen Zytologie konnte eine Steigerung der diagnostischen Treffsicherheit erzielen. Die Sensitivität für die Erkennung von malignen Zellen erreichte einen Wert von 97,3% (95% Konfidenzintervall: 73,9% bis 99,8%). Die Spezifität hatte dann einen Wert von 99,9% (95% Konfidenzintervall: 92,3% bis 99,9%). Der positive Vorhersagewert betrug 99,7% (95% Konfidenzintervall: 77% bis 99,9%). Der negative Vorhersagewert 99,1% (95% Konfidenzintervall: 91,2% bis 99,9%) (Tab. 6).

DNA- Bildzytometrie und Zytologie	Histologie		Summe
	Negativ	Positiv	
Positiv	0	18	18
Negativ	60	0	60
Summe	60	18	78

Tab. 6: Sensitivität und Spezifität der DNA- Bildzytometrie und Zytologie gegenüber der Histologie (n = 78)

4 Diskussion

Fast 11.000 Fälle von Mundhöhlen- und Pharynxkarzinomen werden in Deutschland jedes Jahr neu diagnostiziert [Burkhardt et al. 2006]. 5000 bis 6000 betroffene Patienten sterben jährlich an dieser Erkrankung [Burkhardt et al. 2006]. Das orale Plattenepithelkarzinom ist mit einem Anteil von 95% der häufigste maligne Tumor des Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereichs und gehört weltweit zu den sechs häufigsten Tumoren des Menschen [Reichart 2000].

Obwohl die Mundhöhle ohne operativen Aufwand einsehbar ist und somit ideale Bedingungen für leicht durchführbare Vorsorgeuntersuchungen gegeben sind, werden die Möglichkeiten der Früherkennung nicht genügend genutzt. 70% der Karzinome haben bereits eine Ausdehnung von über drei Zentimeter, wenn sie zur Behandlung in eine Fachklinik kommen [Pape 1981]. Das späte Erkennen und die Diagnose führen zu einer konstant hohen Mortalitätsrate. Hiermit verbunden ist meist im Endstadium eine extrem belastende Erkrankung mit Gesichtsentstellung und psychosozialer Belastung für Patient und Angehörige. Während die Fünfjahresüberlebensrate bei einer frühen Diagnose und lokalisiertem Befund bei etwa 80% liegt, sinkt diese Rate in der gleichen Beobachtungszeit bei Patienten mit bereits vorhandenen Metastasen oder bei T4- Tumoren ohne Metastasen auf 20% [Sciubba 1999]. Daraus ist ersichtlich, dass nur bei frühzeitiger Erkennung und Abklärung von unklaren Schleimhautveränderungen es langfristig möglich sein wird, die unakzeptabel hohe Mortalitäts- und Morbiditätsrate des oralen Plattenepithelkarzinoms entscheidend zu senken.

In der Regel gehen dem manifesten Krebs jahrelang präkanzeröse Veränderungen oft in ausgedehnten Schleimhautarealen voraus. Diese können zum Beispiel in Form von Leukoplakien, Erythroleukoplakien oder Erythroplakien auftreten. Seit Jahren wird gefordert, dass alle im weitesten Sinne malignitätsverdächtigen Schleimhautläsionen durch eine invasive Exzisionsbiopsie abgeklärt werden sollten [Maerker und Burkhardt 1998, 2005; Maerker et al. 2005]. Dies ist aber in Anbetracht der Häufigkeit derartiger Läsionen und der Tatsache, dass die überwiegende Zahl der Läsionen harmlos ist, nicht nur unverhältnismäßig, sondern auch unrealistisch jeden Mundschleimhautbefund der invasiven Biopsie zuzuführen. Insofern bestand bisher eine Lücke zwischen invasiver Abklärung durch Exzisionsbiopsie auf der einen Seite und der `Warten- und Beobachtungshaltung auf der anderen Seite zum Nachteil des Patienten.

Auch die histologisch- morphologische Diagnostik, die den Goldstandard für die Abklärung der Karzinomdiagnose darstellt, erfüllt bei der Diagnostik von präkanzerösen Veränderungen nicht absolut die in sie gesetzten Erwartungen. Insbesondere sind es die begleitende entzündliche Reaktion, Lokalisation und die Biopsie Technik, welche die Zuverlässigkeit der histologischen Diagnostik negativ beeinflussen [Fischer et al. 2004].

Die Brush- Zytologie ist eine hoffnungsvolle, minimalinvasive Methode zur Diagnose von Vorläuferläsionen des Mundhöhlenkarzinoms und des Mundhöhlenkarzinoms selbst. Mit diesem Verfahren ist es einfach, schnell und sicher zu bestimmen, ob eine suspekta Mundschleimhautläsion harmlos,

präkanzerös oder karzinomatös ist. Die Brush- Zytologie überbrückt die Lücke zwischen invasiver Abklärung durch Exzisionsbiopsie auf der einen Seite und konservativer Behandlung und Beobachtung auf der Anderen, ohne den Patienten zu belasten.

4.1 Diskussion Patientenkollektiv

Die in der Studie untersuchten Patienten stellen mit ihren unterschiedlichen Mundschleimhauterkrankungen ein repräsentatives Patientenkollektiv dar. Dabei handelt es sich nicht um ein selektives Patientengut, sondern um ein zufällig ausgewähltes Patientenkollektiv in Form einer Stichprobe, deren prozentuale Verteilung hinsichtlich ihrer Tumorcharakteristika mit denen der Literatur übereinstimmt [Remmerbach et al.2004, Böcking et al. 2004, Maraki et al. 2004].

4.2 Diskussion Epidemiologie und Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms

Das Patientengut der hier präsentierten Studie ist vergleichbar mit jenen anderer Autoren [Remmerbach et al. 2001, 2004; Böcking et al. 2004; Maraki et al. 2004, 2006]. So überwogen in dieser Studie die männlichen Tumorpatienten mit 66,6% gegenüber den weiblichen mit 33,4%. Das mittlere Alter aller Patienten betrug im Durchschnitt 61,2 Jahre. Das Durchschnittsalter der Tumorpatienten lag bei 58,5 Jahren. Mit einem mittleren Alter von 60,1 Jahren waren die Frauen bei der Diagnosestellung „Plattenepithelkarzinom“

durchschnittlich 2 Jahre jünger als die Männer. Das mittlere Alter der Männer war 58,1 Jahre. Das Patientengut von Remmerbach et al. (2004) bestand aus 127 Männern und 78 Frauen. Das Durchschnittsalter aller Patienten betrug 59,3 Jahre. Das Durchschnittsalter der Tumorpatienten lag bei 60,3. Mit einem mittleren Alter von 62,4 Jahren waren die Frauen durchschnittlich 5,1 Jahre älter als die Männer (mittleres Alter 58,9 Jahre). Kosicki et al. (2007) berichten in ihrer Studie mit 63 Männern und 37 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 55,6 Jahren. Die weiblichen Tumorpatienten waren mit einem mittleren Alter von 57,3 Jahre im Schnitt 3,4 Jahre älter als die männlichen (mittleres Alter 53,9 Jahre). Die Alters- und Geschlechtsverteilung der eigenen Patienten entsprechen also den anderer Studien.

Eine mögliche Ursache für die höhere Männerquote bei der Erkrankung des Plattenepithelkarzinoms könnte darin liegen, dass das Geschlechtsverhältnis Männer zu Frauen bei den Alkoholikern etwa 3 zu 1 beträgt [Herold 1998]. Chronischer Alkoholkonsum führt zu morphologischer Veränderung der Mundschleimhaut [Reichart 2000]. Neben dem Einfluß des Alkohols ist auch das Tabakrauchen bei den Männern von größerer Bedeutung als bei den Frauen [Homann et al. 2000, Muscat et al. 1996]. Frauen zeigen allgemein ein besseres Gesundheitsverhalten.

Der Tabakgenuss in all seinen Formen sowie der Alkohol gelten als Hauptrisikofaktoren bei der Entstehung präkanzeröser Läsionen und den Mundhöhlenkarzinomen [Reichart 2000]. In unserer Studie lag der Anteil der Raucher bei 60%. Die rauchenden Frauen waren mit 53,8% etwas schwächer

vertreten als die rauchenden Männer mit 66,6%. Dieser hohe Rauchanteil findet sich auch in anderen Studien [Remmerbach et al. 2001, Kosicki et al. 2007]. Alle Patienten mit der Diagnose eines manifesten Plattenepithelkarzinoms gaben an seit Jahren mindestens 20 Zigaretten täglich zu rauchen. 83,3% dieser Männer konsumierten auch täglich Alkohol, bei den Frauen waren es nur 25%. Alkohol und Tabak agieren in der Entstehung des Mundhöhlenkarzinoms synergistisch, da die Permeabilität der Mundhöhlenschleimhaut durch den chronischen Alkoholkonsum erhöht wird und so die tabakassoziierten Kanzerogene in tiefere Gewebeschichten diffundieren können [Squier et al. 2003].

In unserer Studie wurden auch Ergebnisse bezüglich Zahnstatus und Mundhygiene eruiert. Ein einziger Patient war vollständig bezahnt. Dies sei auf das junge Alter des Probanden von 31 Jahren zurückzuführen. Bei 54% der Frauen und bei 84,3% der Männer wurde die Mundhygiene schlecht beurteilt. Es zeigte sich also insgesamt aufgrund der eigenen Patientendaten, dass analog zu den Literaturangaben die Patienten mit malignen Präkanzerosen oder mit manifestem oralem Plattenepithelkarzinom typischerweise rauchen, trinken und eine schlechte Mundhygiene aufweisen.

.

4.3 Diskussion Methodik

4.3.1 Diskussion Brush- Biopsie

Die Grundlage der in unsere Studie angewandten Methode stellt die seit Jahren in der Früherkennung des Zervixkarzinoms etablierte Exfoliativzytologie dar. Der Mundhöhle angepasst verwenden wir speziell hierfür entwickelte Bürsten zur Gewinnung repräsentativer Zellen. Der Entnahmevorgang sollte pro Läsion mindestens vier- bis fünfmal wiederholt werden, damit eine ausreichende Anzahl von Epithelzellen zur zytopathologischen Untersuchung gelangen. Dabei sollte die Bürste mit leichtem Druck und gleichzeitiger Rotation um 360° über die Läsion geführt werden, um für die Diagnosestellung oberflächlich abgeschilferte Zellen, sowie mittlere und tiefe Zellverbände des Gesamtepithels, zu erfassen. Untersuchungen mit nur einem Entnahmevorgang führten häufig zu insuffizienten Präparaten mit ungenügendem Zellmaterial [Scheifele et al. 2004, Poate et al. 2004, Slater, 2004].

Die Exzisionsbiopsie verbarg immer ein gewisses Risiko der Krebszelldissemination. Da aber bei der Brush- Biopsie die Basalmembran erhalten bleibt, ist die Gefahr der Krebszelldissemination ausgeschlossen [Kusukawa et el. 2000].

Im Gegensatz zur klassischen Exsisionsbiopsie ist die Brush- Biopsie ein nicht invasives, schmerzarmes Verfahren, das im Regelfall keine Infiltrationsanästhesie und keinen Wundverschluss erfordert [Zunt 2001]. Durch diese Technik wird dem Patienten die Angst vor Spritze und Skalpell genommen und verhilft dem Arzt zu einer schnellen und kostengünstigen

Methode der Probengewinnung [Remmerbach et al 2007, Hullmann et al. 2007]. Diese Methode ermöglicht engmaschige Kontrollen oraler Präkanzerosen und eine frühzeitige Erkennung maligner transformierter Zellen [Christian 2002].

4.3.2 Diskussion DNA- Aneuploidie als Biomarker für obligate Präkanzerosen

Der Zellkern- DNA- Gehalt als Malignitätsmarker wird heute allgemein anerkannt [Böcking et al. 1985, 1998]. Weicht der DNA- Gehalt in einer bestimmten Anzahl von Zellen von der Norm ab, aufgrund von Gewinn oder Verlust einzelner Chromosomen, spricht man von DNA- Aneuploidie. Die meisten Tumoren, auch gutartige, weisen von den übrigen Körperzellen abweichende numerische und/oder strukturelle Chromosomenabberationen auf, die nicht in normalen oder reaktiv veränderten Zellen vorkommen [Sandberg, 1990]. Der amerikanische Molekularbiologe Peter Duesberg beschreibt die Entstehung einer Tumorzelle als Kettenreaktion mehrfacher Aneuploidisierungen [Duesberg et al. 2004]. Dementsprechend nehmen die meisten Tumoren ihren Anfang mit einer relativ geringen Chromosomenveränderung, die dann im Laufe der Jahre zunehmen kann. So wurde die chromosomale Aneuploidie auch von Böcking und Motherby [1999] als wesentlicher kausaler Faktor für neoplastische Transformation beschrieben. Weißt man zum Beispiel in Prostatazellen DNA- Aneuploidie nach, dann liegt zweifelsfrei ein Prostatakarzinom vor [Baretton et al. 1993].

Für eine regelmäßige Routine- Tumordiagnostik sind solche zytogenetischen Untersuchungen jedoch zu zeitaufwendig und zu kostenintensiv. Daher bietet sich alternativ an, den Nettoeffekt der chromosomalen Abberation auf den DNA-Gehalt der Zellkerne als diagnostischen Marker zu nutzen [Remmerbach et al. 2004, 2007]. DNA- Aneuploidie ist das quantitative zytometrische Äquivalent chromosomaler Aneuploidie [Knüchel et al. 1986]. Die Aneuploidie kann mit Hilfe der stöchiometrischen Darstellung der DNA durch die Feulgen- Färbung im Zellkern gemessen werden mittels der in unserer Studie angewandten DNA-Bildzytometrie.

Schon in den Achtzigerjahren des vorigen Jahrhunderts wurden erste Untersuchungen vorgelegt, die zeigten, dass die DNA- Bildzytometrie an Zellen der Lunge [Auffermann und Böcking 1985], des Larynx [Böcking et al 1985] oder der Cervix uteri [Böcking et al. 1986] deutlich früher krebserkrankte Zellen erkennen kann als dies in der Histopathologie möglich ist. Neuere Untersuchungen belegen: In der Mundhöhle oder der Cervix uteri konnte durch Nachweis von DNA- Aneuploidie in Abstrichen Krebs gut zwei Jahre früher als mit der histologischen Untersuchung von Biopsien nachgewiesen werden [Remmerbach et al. 2001, 2003; Maraki et al. 2004, 2005; Grote et al. 2003].

Dem Nachweis einer chromosomalen Aneuploidie in Dysplasien kommt damit die Funktion eines Biomarkers für obligate Präkanzerosen zu. Neue Entwicklungen machten es möglich, dass die DNA- Bildzytometrie an zytologischen Standardpräparaten durchgeführt werden kann. Sie kann also im Rahmen der zytologischen Routinediagnostik erfolgen und erspart dem Patienten bei histologischer Aufarbeitung und Umfärbung nach Feulgen weitere

Gewebeentnahmen. Remmerbach fand 2002 heraus, dass die von Untersucher zu Untersucher schwankenden Ergebnisse auf die Entnahmetechnik der erkrankten Zellen zurückzuführen waren. Und so wurden in den letzten Jahren deutlich bessere und aussichtsreichere Daten vorgelegt [Bockmühl und Petersen 2002; Duesberg et al. 2004; Remmerbach et al. 2004,2007].

4.3.3 Diskussion DNA- Bildzytometrie

Die histologisch- morphologische Diagnostik, die den Goldstandard für die Abklärung der Karzinomdiagnose darstellt, erfüllt bei der Diagnostik von präkanzerösen Veränderungen nicht absolut die in sie gesetzten Erwartungen. In einer Studie von Burkhardt und Maerker (1978) entwickelten Läsionen, die als geringgradige Dysplasie eingestuft wurden, in einem Beobachtungszeitraum von fünf Jahren in 3% ein Karzinom, solche mit mittelgradiger Dysplasie in 4% und hochgradige Dysplasien und Carcinoma in situ in 43%. Abbey und Mitarbeiter (1995) zeigten in ihrer klinischen Studie an 120 oralen Biopsiepräparaten, dass die histologische Diagnostik, bis zu einem gewissen Grade eine subjektive Untersuchung ist, die keine prognostische Aussage im Einzelfall gestattet. Auch Giunta und Mitarbeiter (1969) stellten fest, dass 2,5% der chirurgischen Probeentnahme durch den Pathologen histologisch falsch begutachtet wurden. Das ergab eine Sensitivität von 97,5%. Die Sensitivität für die Histologie lag in unserer Studie für die Erkennung von obligaten Präkanzerosen oder Karzinomen bei 88,8%, die Spezifität bei 100%. In unserer Studie ergab die chirurgische Probeentnahme an zwei Lokalisationen unklarer

Mundschleimhautveränderung nach histologischer Begutachtung keinen Anhalt für Malignität. Die Brush- Biopsie und nachfolgende Auswertungen der Zytologie und DNA- Bildzytometrie konnten eindeutig bösartige Zellen bzw. DNA- Aneuploidie feststellen. Eine weitere Biopsie bzw. die vollständige Entfernung der Läsionen wurden dringend empfohlen.

Mit den Erfolgen des Pap- Abstriches bei der Früherkennung des Zervixkarzinoms der Frau seit den 50er- Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde die einfache Exfoliativzytologie auch bei Mundschleimhautläsionen angewendet. Die Zellen werden dabei auf abnorme Morphologien und Keratinisierungen untersucht, welche charakteristisch für Dysplasien oder auch Karzinome sind. Sie konnte sich jedoch trotz zahlreicher Versuche für die Mundschleimhaut nicht als geeignete Methode zur Krebsfrüherkennung behaupten, da die stärker verhornte Mundschleimhaut ohne Umwandlungszone einen negativen Vorhersagewert von 30- 60% erbrachte [Becker et al. 1966; Dabelsteen et al. 1971; Folsom et al. 1972; Pape 1973]. Auch Studien die in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts eine verbesserte Sensitivität und Spezifität mit dieser Technik präsentierten, konnten keine Beachtung finden [Kaugars et al.1989; Ogden et al. 1992,1994]. So gilt die konventionelle Exfoliativzytologie heutzutage als eine mögliche Ergänzung zur klassischen histopathologischen Untersuchung von oralen Geweben [Sciubba 1999].

Sciubba et al. (1999) stellten ein Verfahren zur computergestützten zytologischen Analyse (Oral CDx) vor, das speziell zur Erkennung von epithelialen präkanzerösen und kanzerösen Zellen entwickelt wurde. Die Beurteilung der Präparate erfolgt nicht direkt am Mikroskop. Bei diesem

Verfahren filtert ein computergesteuertes Sortiersystem die am stärksten von der Norm abweichenden Zellen heraus. Diese werden dem Pathologen zur Begutachtung in einer Bildergalerie am Bildschirm präsentiert. In der Literatur wird jedoch eine hohe Zahl von inadäquaten Präparaten für die Oral CDx-Methode angegeben. So müssen zwischen 2% und 7% der Bürstenbiopsate wiederholt werden, was zu einem vermeidbaren Zeitverzug in der Diagnosestellung führt [Sciubba 1999, Scheiffele et al. 2004]. In unserer Studie lag die Quote für insuffiziente Präparate unter 3%. Die mit dem Oral- CDx Verfahren erreichbare Sensitivität wird mit Werten zwischen 71,4% und 100% angegeben [Sciubba 1999, Poate et al. 2004, Scheiffele et al. 2004, Kosicki et al. 2007]. Kritisch ist die Spezifität dieser Methode zu betrachten, die in den Studien bis hinunter zu 32% angegeben wird [Poate et al. 2004] und in Übersichten pathologischer Institute bisweilen unter 25% [Slater 2004]. Daraus resultiert eine hohe Zahl von chirurgisch entfernten Läsionen mit zytologischen Atypien, die gutartige histologische Diagnosen darstellten und nicht hätten operativ entfernt werden müssen. Zu diesen nicht viel versprechenden Zahlen des Oral CDx- Verfahrens sei noch erwähnt, dass der Laborautomat zum Vorsortieren der zytologischen Präparate hochpreisig ist. Und außerdem erschwert die verwendete Nomenklatur der OralCDx- Methode die Vergleichbarkeit mit internationalen Studien.

In der hier präsentierten Studie wurde mittels der DNA- Bildzytometrie die Menge an Erbsubstanz (DNA) pro Zellkern computerunterstützt am Mikroskop quantitativ gemessen und analysiert. Die Möglichkeit der subjektiven Auswahl

der zu analysierenden Zellen bietet den Vorteil gezielt Zellen in Gebieten auffälliger Epithelarchitektur suchen zu können. Mögliche Fehlerquellen für Messungenauigkeiten können Überlappungen von Kernen sein. Tumoröses Gewebe hat nämlich die Tendenz zur Bildung von Zellkernhaufen mit Kernkappungsfehlern. Dieses Problem kann aber zumindest teilweise durch aufmerksames Durchmustern der Präparate, im Gegensatz zu dem automatisierten Messverfahren Oral CDx, reduziert werden. In unsere Studie lag die Quote für Präparate mit Kernüberlagerungen bei 2,5%. Die Arbeitsgruppe Remmerbach und Böcking hatte bereits 1999 erstmalig in Europa ihre Ergebnisse zur Treffsicherheit der Brush- Biopsie einschließlich der statischen DNA- Bildzytometrie vorgestellt. Eine weitere Studie dieser Arbeitsgruppe bestätigte die Ergebnisse [Remmerbach et al. 2004]: Die routinemäßige zytologische Begutachtung von 304 Fällen mit insgesamt 1328 Mundschleimhautabstrichen von 205 Patienten, erzielte eine Sensitivität von 91,3% und eine Spezifität von 95,1%. Die nachfolgende Bestimmung des DNA-Gehalts mit der Methode der DNA- Bildzytometrie erreichte eine Sensitivität von 95,5% und eine Spezifität von 100%. Durch die kombinierte Auswertung der zytologischen Befunde und der DNA- Bildzytometrie konnte eine Steigerung der diagnostischen Treffsicherheit erzielt werden: die Sensitivität ergab 97,8% und die Spezifität 100%.

Die Auswertungen der Brush- Biopsien unserer Studie mit dem Verfahren der konventionellen Zytologie und DNA- Bildzytometrie bestätigen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Remmerbach und Böcking.

Die konventionelle Zytologie von 78 Präparaten, gewonnen an 25 Patienten in dieser Studie, ergaben zusammenfassend eine Sensitivität von 88,8% und eine Spezifität von 98,3%. Die nachfolgend durchgeführte DNA- Bildzytometrie aller Präparate erreichte eine Sensitivität von 94,4% und eine Spezifität von 95%.

In der hier präsentierten Studie werteten wir die zytologischen Diagnosen „sicher positiv“ und „mit dringendem Verdacht“ als Beweis für das Vorhandensein bösartiger Zellen. Die nachfolgende histologische Begutachtung bestätigte das Vorliegen von Tumorzellen und somit die Diagnose für ein Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Zwei weitere histologisch gesicherte schwere Dysplasien bzw. Carcinoma in situ wurden zytologisch als „zweifelhaft“ bewertet. Die nachfolgende Untersuchung dieser Präparate mittels DNA- Bildzytometrie konnte in beiden Präparaten DNA- Aneuploidie feststellen. Diese Auswertung macht deutlich, dass bei allen nicht sicher tumorzell-negativen Befunden, ergänzend zur reinen zytologischen Untersuchung, eine quantitative DNA- Messung erfolgen sollte [Remmerbach et al. 2004; Maraki et al. 2004, 2006]. In Übereinstimmung mit anderen Studien [Remmerbach et al. 2001,2004; Maraki et al. 2004], konnten auch unsere Untersuchungen durch eine Kombination beider Verfahren, der zytologischen Untersuchung und der DNA- Bildzytometrie, eine Steigerung der diagnostische Treffsicherheit und Reproduzierbarkeit zur Erkennung entarteter Zellen erzielen. Die Sensitivität betrug dann 97,3% bei einer Spezifität von 99,9%. Der positive Vorhersagewert betrug 99,7%, der negative Vorhersagewert lag bei 99,1%.

Die DNA- Bildzytometrie ermöglicht durch das gezielte Aufsuchen der Tumorzellen in gemischten Populationen die Ermittlung von höheren

Aneuploidieraten. Die kombinierte Anwendung beider Algorithmen bei der DNA-Histogramm- Analyse, die Stammlinieninterpretation (abnorme Lage) und die Einzelzellinterpretation („rare events“), konnte die Erkennungsrate von Karzinomen zusätzlich erhöhen. Die DNA- Bildzytometrie erlaubt somit eine Krebsdiagnostik nicht nur sehr früh sondern gelegentlich auch an sehr wenigen Zellen [Remmerbach et al. 2001, 2003; Maraki et al. 2004, 2005]. Die hohe Prävalenz von DNA- Aneuploidie lässt so auf eine hohe Präzision der DNA-Messung schließen. Da die Prävalenz von messbarer DNA- Aneuploidie bei Plattenepithelkarzinomen sehr hoch ist, bei benignen Mundschleimhautveränderungen dagegen gleich null ist [Remmerbach et al. 2004], scheint dieser Biomarker geeignet für die Identifikation von obligaten Präkanzerosen. Eine DNA- aneuploide Dysplasie gleich welchen Grades, stellt somit eine Indikation zur chirurgischen Entfernung der Veränderung mit histologischer Nachuntersuchung [Remmerbach et al. 2007].

Die orale nichtinvasive, schmerzarme Brush- Biopsie in Kombination mit der DNA- Bildzytometrie ist als adjuvante Untersuchungstechnik zur Überwachung von fakultativen Präkanzerosen sowie zur Ermittlung von obligaten Präkanzerosen bzw. Plattenepithelkarzinomen angezeigt.

Die DNA- Bildzytometrie ist sensitiv, reproduzierbar und Unterschiede bezüglich der Dignität können herausgearbeitet werden. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht in der Möglichkeit der Messung von Routinepräparaten. Die Überprüfung der Messergebnisse sowie ein Nachmessen der Präparate durch vorheriges Abspeichern der gemessenen Bilder ist zu jeder Zeit möglich. Die Brush- Biopsie in Kombination mit der DNA- Bildzytometrie ist ein

gebührenordnungsmäßig anerkanntes, preiswertes, weitestgehend untersucherunabhängiges Verfahren zur Verbesserung der Treffsicherheit der zythopathologischen Diagnostik, dass sich zudem mit der histologischen Beurteilung messen und unnötige Probeexzisionen vermeiden kann.

5 Schlussfolgerungen

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle zählt weltweit zu den zehn häufigsten Tumoren. Im Kopf- Halsbereich macht es über 90% aller Malignome aus. Die jährliche Inzidenz liegt bei etwa 500.000 Neuerkrankungen weltweit. Die Statistik zeigt, dass die Erkrankungshäufigkeit weiterhin tendenziell ansteigt; ein Rückgang der Mortalität ist derzeit nicht erkennbar.

Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des Mundhöhlenkarzinoms sind Tabak und Alkohol bei schlechter Mundhygiene bei Individuen mit genetischer Prädisposition. Die Primärprävention sollte darin bestehen, Risikofaktoren wie den Tabak- und/oder Alkoholkonsum zu reduzieren. Ein erhöhtes Risiko tritt zudem mit höherem Lebensalter auf. Zu empfehlen wäre bei solchen Risikopatienten ein jährliches Screening der Mundhöhlenschleimhaut durchzuführen.

Die Früherkennung von Präkanzerosen oder bereits manifesten Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle scheint bis heute der einzige Weg zu sein, die hohe Mortalitäts- und Morbiditätsrate bei Mundhöhlentumoren entscheidend zu senken. Durch die Entfernung von Tumorfrühstadien oder sogar von prämaligen Veränderungen können die betroffenen Patienten geheilt werden. Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle hat sich bisher aber einer wirksamen Früherkennung entzogen. Die Abklärung verdächtiger Mundschleimhautläsionen forderte bisher eine invasive Exzisionsbiopsie. Dies ist aber in Anbetracht der Häufigkeit derartiger Läsionen und der Tatsache, dass die überwiegende Zahl der Läsionen harmlos ist, nicht nur unverhältnismäßig, sondern auch unrealistisch jeden Mundschleimhautbefund

der invasiven Biopsie zuzuführen. Dies führt zu einer Verschleppungszeit bis zur endgültigen Diagnose einerseits durch den Patienten, und andererseits durch die Unsicherheit und damit 'Warten und Beobachten Haltung' des Arztes.

Das in der vorliegenden Arbeit angewandte Verfahren der Brush- Biopsie mit anschließender DNA- Bildzytometrie überbrückt die Lücke zwischen invasiver Abklärung durch Exzisionsbiopsie auf der einen Seite und konservativer Behandlung und Beobachtung auf der anderen Seite, ohne den Patienten zu belasten. Die mittels DNA- Bildzytometrie ermittelte Aneuploidie (aneuploide Zellen $> 5c$ und hochaneuploide Zellen $>9c$) in Dysplasien ist als Marker für Malignität anzusehen. Da die Prävalenz von messbarer DNA- Aneuploidie bei Plattenepithelkarzinomen sehr hoch ist, bei benignen Mundschleimhautveränderungen dagegen gleich null ist, scheint dieser Biomarker geeignet für die Identifikation von obligaten Präkanzerosen. So sollte bei allen nicht sicher tumorzell-negativen Befunden, ergänzend zur reinen zytologischen Untersuchung, eine quantitative DNA- Messung erfolgen. Eine DNA- aneuploide Dysplasie gleich welchen Grades, stellt damit eine Indikation zur chirurgischen Entfernung der Veränderung mit histologischer Nachuntersuchung.

Durch eine Kombination der Verfahren, der zytologischen Untersuchung und der DNA- Bildzytometrie konnte in unserer Studie eine Steigerung der diagnostischen Treffsicherheit und Reproduzierbarkeit zur Erkennung entarteter Zellen erzielt werden.

Die orale nichtinvasive, schmerzarme Brush- Biopsie in Kombination mit der DNA- Bildzytometrie ist als adjuvante Untersuchungstechnik zur Überwachung von fakultativen Präkanzerosen sowie zur Ermittlung von obligaten Präkanzerosen bzw. Plattenepithelkarzinomen angezeigt.

6 Zusammenfassung

Fragestellung: Ziel der vorliegenden Studie war die Erarbeitung einer nicht- invasiven und objektiven Methode zur Risikoabschätzung für Karzinomentstehung in der Mundhöhle. Übergeordnetes Ziel war es, mögliche Biomarker zur Karzinogenese oder als Prognoseparameter für intraorale Karzinome zu identifizieren.

Material und Methode: In dieser Studie wurden zytologische und DNA- zytometrische Untersuchungen durchgeführt an mittels Brush- Biopsie gewonnenen Mundschleimhautproben von 10 gesunden Probanden, 17 Patienten mit Leukoplakien und 10 Patienten mit manifesten Mundhöhlenkarzinomen.

Ergebnisse: Die zytologische Begutachtung der Präparate erzielte eine Sensitivität von 88,8% und eine Spezifität von 98,3%. Die nachfolgend durchgeführte DNA- Bildzytometrie aller Präparate erreichte eine Sensitivität von 94,4% und eine Spezifität von 95%. Die kombinierte Auswertung der DNA- Zytometrie mit der konventionellen Zytologie konnte eine Steigerung der diagnostischen Treffsicherheit erzielen. Die Sensitivität für die Erkennung von malignen Zellen erreichte einen Wert von 97,3%. Die Spezifität hatte dann einen Wert von 99,9%. Der positive Vorhersagewert betrug 99,7%. Der negative Vorhersagewert 99,1%.

Schlussfolgerung: Die Anwendung der Brush- Biopsie mit anschließender DNA- Bildzytometrie überbrückt die Lücke zwischen invasiver Abklärung durch Exzisionsbiopsie auf der einen Seite und konservativer Behandlung und Beobachtung auf der anderen Seite, ohne den Patienten zu belasten. Die mittels DNA- Bildzytometrie ermittelte Aneuploidie (aneuploide Zellen $> 5c$ und hochaneuploide Zellen $>9c$) in Dysplasien ist als Marker für Malignität anzusehen. So kann bei allen nicht sicher tumorzell-negativen Befunden, ergänzend zur reinen zytologischen Untersuchung, eine quantitative DNA- Messung erfolgen. Eine DNA- aneuploide Dysplasie gleich welchen Grades, stellt damit eine Indikation zur chirurgischen Entfernung der Veränderung mit histologischer Nachuntersuchung.

Die orale nichtinvasive, schmerzarme Brush- Biopsie in Kombination mit der DNA- Bildzytometrie ist als adjuvante Untersuchungstechnik zur Überwachung von fakultativen Präkanzerosen sowie zur Ermittlung von obligaten Präkanzerosen bzw. Plattenepithelkarzinomen angezeigt.

7 Literaturverzeichnis

Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, Burns JC, Page DG, Svirsky JA, Eisenberg E, Krutchkoff DJ, Cushing M. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 80,2:188-91(1995).

Ahrens W, Jöckel KH, Patzak W, Elsner G. Fall-Kontrollstudie zu beruflichen Risikofaktoren des Larynxkarzinoms. Kongressbericht der 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin (1989).

Auffermann W, Böcking A. Early detection of precancerous lesions in dysplasias of the lung by rapid DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 7,3:218-26 (1985).

Axell T, Pndborg JJ, Smith CJ, van der Waal I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden. May 18-21 1994. International Collaborative Group on oral white lesions. *Oral Pathol Med* 25, 2:49-54 (1996).

Baretton G, Vogt T, Valina C, Schneiderbanger K, Löhns U. Prostate cancers and potential precancerous conditions: DNA cytometric investigations and interphase cytogenetics. *Verh Dtsch Ges Pathol* 77:86-92 (1993).

Bauer TW, Tubbs RR, Edinger MG, Suit PF, Gebhardt GN, Levin HS. A prospective comparison of DNA quantitation by image analysis and flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 93:322-326 (1990).

Becher H, Dietz A. Epidemiologische Fall- Kontroll- Studie mit molekulargenetischen bzw. toxikologischen Zusatzuntersuchungen zur Ätiologie des Larynxkarzinoms 13-21 (2002).

Becker R, Erwig R, Lorscheich G, Schmidseher R. Vergleichende zytologische und histologische Untersuchungen zur Tumordiagnostik. *Dtsch Zahnärztl Z* 21:145-148 (1966).

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Berstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48,11:3282-7 (1988).

Bockmühl U, Petersen I. DNA ploidy and chromosomal alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 441,6:541-50 (2002).

Böcking A, Becker J, Remmerbach TW. Bürstenbiopsie zur Mundkrebsfrüherkennung. *Zahnärztliche Mitteilungen* 9:24-28 (2004).

Böcking A, Auffermann W, Vogel H, Schlöndorff G, Göbbels R. Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA-cytophotometry. *Cancer* 56,7:1600-4 (1985).

Böcking A, Hilgarth M, Auffermann W, Hack- Werdier C, Fischer- Becker D, von Kalkreuth G. DNA- cytometric diagnosis of prospective malignancy in borderline lesions of the uterine cervix. *Acta Cytol* 30,6:608-15 (1986).

Böcking A. DNA- Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik. *Beitr Onkol* 38:298-347 (1990).

Böcking A. Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA- Bildzytometrie. *Deutsches Ärzteblatt* 12:658-662 (1998).

Böcking A, Motherby H. Abklärung zervikaler Dysplasien mittels DNA- Zytometrie. *Der Pathologe*. Springer Verlag 25-33 (1999).

Böcking A, Samsel W. Prognostische und therapeutische Bedeutung der DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom: Wissenschaftlicher Bericht über das Experten-Symposium an der Universität Bremen vom 12.Mai 2005. 1:46-97 (2006).

Böcking A. DNA- Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik. *Verh Dtsch Ges Pathol* 74: 176-185 (1990).

Böcking A. Präzisere Krebsdiagnostik durch Zytometrie. Sonderdruck aus dem Wirtschaftsmagazin RWTH- Themen (1993).

Brunnemann KD, Prokopczyk B, Djordevic MV, Hoffmann D. Formation and analysis of tobacco-specific N-nitrosamines. *Crit Rev Toxicol* 26,2:121-37 (1996).

Burkhardt A, Burkhardt AM, Aklan T. Die Bürstenbiopsie- Grundlagen und Ergebnisse einer neuen Methode zur Abklärung von Mundschleimhautläsionen. *Thüringer Zahnärzteblatt tzb* 4:22-29 (2006).

Burkhardt A. Die Bürstenbiopsie- Theorie und Praxis einer neuen Methode zur Früherkennung des Mundhöhlenkarzinoms- Teil 1. *Oralchirurgie* 6: 28-35 (2006).

Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer* 114,5:806-16 (2005).

Christian DC. Computer-assisted analysis of oral brush biopsies at an oral cancer screening program. *J Am Dent Assoc* 133,3:357-62 (2002).

Dabelsteen E, Roed-Petersen B, Smith CJ, Pindborg JJ. The limitations of exfoliative cytology for the detection of epithelial atypia in oral leukoplakias. *Br J Cancer* 25,1:21-4 (1971).

Dietz A, Becher H. Epidemiologische Fall- Kontroll- Studie mit molekulargenetischen bzw. toxikologischen Zusatzuntersuchungen zur Ätiologie des Larynxkarzinoms 13-21 (2002).

Duesberg P, Li R, Rasnick D: Aneuploidy Approaching a Perfect Score in Predicting and Preventing Cancer. *Cell Cycle* 3,6:823-828 (2004).

Eckardt A. Therapie des Mundhöhlenkarzinoms (2000). <http://www.mh-hannover.de/institut/7720/FESTSCH/PEC.HTM> Ausdruck vom 17.07.2000

Ehlers G, Stephan T. Quantitative histochemical studies on the DNA-content of facultative and obligatory precanceroses of the skin. The DNA-content of so-called facultative precanceroses. *Arch Dermatol Forsch* 243,2:114-32 (1972).

El Naggar A, Reichart PA. Proliferative verrucous leukoplakia and precancerous conditions. In: Pathology and Genetics: Head and Neck Tumors. Barnes L, Eveson J W, Reichart P A, Sidransky D (eds.), IARC Press Lyon, 180- 181 (2005).

Epidemiologisches Krebsregister Saarland. Ministerium für Frauen, Arbeit, Gesundheit und Soziales. Krebs im Mund- und Rachenraum 1-9 (2002).

Epstein JB, Feldmann R, Dolor RJ, Porter SR. The utility of tolonium chloride rinse in the diagnosis of recurrent or second primary cancers in patients with prior upper aerodigestive tract cancer. *Head Neck* 25,11:911-21 (2003).

Fischer DJ, Epstein JB, Morton Jr TH, Schwartz SM. Interobserver reliability in the histopathologic diagnosis of oral pre-malignant and malignant lesions. *J Oral Pathol Med* 33,2:65-70 (2004).

Folsom TC, White CP, Bromer L, Canby HF, Garrington GE. Oral exfoliative study. Review of the literature and report of a three-year study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 33,1:61-74 (1972).

Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Muñoz N. Comparison of cancer of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral Oncol* 36,1:106-15 (2000).

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (GEKID), Robert- Koch- Institut. Krebs in Deutschland 20-23 (2006).

Giunta J, Meyer I, Shklar G. The accuracy of the oral biopsy in the diagnosis of cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 28,4:552-6 (1969).

Gorsky M, Epstein JB, Levi H, Yarom N. Oral white lesions associated with chewing khat. *Tabacco induces diseases Vol. 2, No. 3:145-150* (2004).

Grote HJ, Schmiemann V, Saarbja M, Böcking A. DNA extraction from bronchial aspirates for molecular cytology: which method to take? *Anal Cell Pathol* 25,2:83-8 (2003).

Heim S, Mitelman F. Nineteen of 26 cellular oncogenes precisely localized in the human genome map to one of the 83 bands involved in primary cancer-specific rearrangements. *Hum Genet* 75,1:70-2 (1987).

Herbst H, Hübner JH. Pathologie-Online, Spezielle Pathologie: Mundhöhle. <http://www.pathologie-online.de/sp/4/index.php> (2007).

Herold G. Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Gelbe Reihe, Stuttgart 435-436; 728-729 (1998).

Hilgarth M, Sprenger E. Zellkern- DNS- Messung als Diagnostikhilfe bei unklarem zytologischem Befund. *Arch Gynakol* 219,1-4:64-6 (1975).

Homann N, Tillonen J, Meurman JH, Rintamäki H, Lindqvist C, Rautio M, Jousimies-Somer H, Salaspuro M. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a micro- biological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis* 21:663-668 (2000).

Howaldt HP, Schmelzeisen R. Tumoren und tumorähnliche Veränderungen des Knochens und Osteopathien. Einführung in die Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie. Urban& Fischer 97-112 (2002).

Hullmann M, Reichert TE, Dahse R, von Eggeling F, Pistner H, Kosmehl H, Driemel O. Oral cytology: historical development, current status, and perspectives. *Mund Kiefer Gesichtschir* 11,1:1-9 (2007).

Knüchel R, Mittermayer C, Böcking A. Tumorstadien der Mundschleimhaut- Mögliche Identifizierung obligater Präkanzerosen . *HNO* 34,6:223-8 (1986).

Kaugars GE, Silverman S Jr, Ray AK, Page DG, Burns LM, Svirsky JA. The use of exfoliative cytology for the early diagnosis of oral cancers: is there a role for it in education and private practice? *J Cancer Educ* 13,2:85-9 (1998).

Kosicki DM, Riva C, Pajarola GF, Burkhardt A, Grätz KW. CDx-Bürstenbiopsie- Ein Hilfsmittel zur Früherkennung des Mundhöhlenkarzinoms. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 117,222-227 (2007).

Kusukawa J, Suefuji Y, Ryu F, Noguchi R, Iwamoto O, Kameyama T. Dissemination of cancer cells into circulation occurs by incisional biopsy of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 29,7:303-7 (2000).

Löffler G. Biologische Informationen. DNA und Gentechnik. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Springer Verlag 331-71 (1999).

Maerker R, Burkhardt A. Erkrankungen der Mundschleimhaut und Lippen. Praxis der Zahnheilkunde, Band 10/II, Urban u. Schwarzenberg (1998).

Maerker R, Burkhardt A. Früherkennung von Mundschleimhauterkrankungen. Praxis der Zahnheilkunde, Band1, 4. Aufl. Urban und Fischer. 165-195 (2005).

Maraki D, Becker J, Böcking A. Cytologic and DNA- cytometric very early diagnosis of oral cancer . *J Oral Pathol Med* 33,7:398-404 (2004).

Moreno-Lopez LA, Esparza-Gomez GC, Gonzalez-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, Gonzalez-Hernandez MJ, Dominguez-Rojas V. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* 36,2:170-4 (2000).

Muskat JE, Richie JP, Thompson S, Wynder EL. Gender differences in smoking and risk for oral cancer. *Cancer Res* 56:5192-5197 (1996).

Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. A comparison. *Acta Cytol* 36,5:706-10 (1992).

Ogden GR, Cowpe JG, Chisholm DM, Lane EB. DNA and keratin analysis of oral exfoliative cytology in the detection of oral cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 30B,6:405-8 (1994).

Pape HD, Pfitzer P. The nuclear DNA-content of turnover cells in the oral cavity. *J Maxillofac Surg* 1,2:117-21 (1973).

Pape HD. Größe der malignen Mundschleimhauttumoren zum Zeitpunkt der Primärdiagnostik. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 36,11:689-92 (1981).

Parkin DM, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94,2:153-6 (2001).

Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world- wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 97,1:72-81(2002).

Pfitzer P, Pape HD. Investigation of DNA-content of leukoplakia cells or oral mucosa. *J Maxillofac Surg* 3,2:119-24 (1975).

Poate T W, Buchanan J A, Hodgson T A, Speight P M, Barrett A W, Moles DR, Scully C, Porter S R. An audit of the efficacy of the oral brush biopsy technique in a specialist Oral Medicine unit. *Oral Oncol* 40,8:829-34 (2004).

Pschyrembel W. *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Nikol Verlagsgesellschaft mbH Hamburg. 257. Aufl. 1236 (1994).

Rajpura KB, Patel PS, Chawda JG, Shah RM. Clinical significance of total and lipid bound sialic acid levels in oral pre-cancerous conditions and oral cancer. *J Oral Pathol Med* 34,5:263-7 (2005).

Ram S, Siar CH. Chemiluminescence as a diagnostic aid in the detection of oral cancer and potentially malignant epithelial lesions. *Int J Oral Maxillofac Surg* 34,5:521-7 (2005).

Reibel J. Diagnosis of oral cancer. *Dtsch Zahnärztl Z* 55: 307-312 (2000).

Reichart PA. Primärprävention des Mundhöhlenkarzinoms und oraler Präkanzerosen. *Mund Kiefer GesichtsChir* 4:357-364 (2000).

Reichart PA. Identification of risk groups for oral precancers and cancer and preventive measures. *Clin Oral Invest* 5:207-213 (2001).

Reichart PA. Früherkennung des Mundhöhlenkarzinoms und oraler Präkanzerosen. *Zahnärztliche Mitteilungen* 22:58-60 (2002).

Reichart P A, Philipsen H P. Proliferative verruköse Leukoplakie: Bericht über 5 Fälle. *Mund Kiefer GesichtsChir* 7, 3:164-70 (2003).

Reichart P A. Orale Leukoplakie/ Erythroplakie. Wissenschaftliche Stellungnahme der DGZMK. V1.0,1-7 (2007).

Reith A, Sudbo J. Impact of genomic instability in risk assessment and chemoprevention of oral premalignancies. *Int J Cancer* 101,3:205-9 (2002).

Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, Böcking A. Cytologic and DNA- cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol* 22,4:211-21 (2001).

Remmerbach TW. Mundkrebsfrüherkennung rettet Leben-mit der Bürstenbiopsie! *Oral Chirurgie Journal* 4:26-29 (2004).

Remmerbach TW, Mathes SN, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A. Nichtinvasive Bürstenbiopsie als innovative Methode in der Früherkennung des Mundhöhlenkarzinoms. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8:229-236 (2004).

Remmerbach TW, Hemprich A, Böcking A. Minimally invasive brush-biopsy: innovative method for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 117,9:926-40 (2007).

Sandberg A. The chromosomes in human cancer and leukemia. New York, Amsterdam, Oxford: Elsevier (1990).

Scheifele C, Schmidt-Westhausen AM, Dietrich T, Reichart PA. The sensitivity and specificity of the oral CDx technique: evaluation of 103 cases. *Oral Oncol* 40,8: 824-28 (2004).

Schwenzer N, Ehrenfeld M. Erkrankungen der Mundschleimhaut- klinische Erscheinungsbilder. *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde III* 3.Aufl. 241-44 (2000).

Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer assisted analysis of the oral brush biopsy. US Collaborative Oral CDX Study Group. *J Am Dent Assoc* 130:445-1457 (1999).

Seitz HK, Simanowski UA. Alcohol and carcinogenesis. Annual Rev Nutr 8,99-119 (1988).

Slater L J. Oral brush biopsy: false positives redux. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 97,4:419 (2004).

Speckmann EJ, Wittkowski W. Zellen und Gewebe. Bau und Funktionen des menschlichen Körpers 37-53 (1998).

Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Effect on ethanol on lipid metabolism and epithelial permeability barrier skin and oral mucosa in the rat. J Oral Pathol Med 32:595-599 (2003).

Tuyns AJ, Esteve J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, Boffette P, Crosignant P, del Moral A, Lehmann W, Merletti F, Pequignot G, Riboli E, Sancho-Garnier H, Terracini B. Cancer of the pharynx/hypopharynx, tobacco and alcohol. Int J Cancer 41,483-91 (1988).

Warnakulasuriya KA, Johnson NW. Sensitivity and specificity of OraScan (R) toluidine blue mouthrinse in the detection of oral cancer and precancer. J Oral Pathol Med 25,3:97-103 (1996).

Weisburger JH. Chemical carcinogens. Macmillan, New York, 333-378 (1975).

Winkler B, Crum CP, Fujii T, Ferenczy A, Boon M, Braun L, Lancaster WD, Richart RM. Koilocytotic lesions of the cervix. The relationship of mitotic abnormalities to the presence of papillomavirus antigens and nuclear DNA content. Cancer 53,5:1081-7 (1984).

WHO: collaborating center for oral precancerous lesions. Definition of leukoplakia and related lesions. An aid to studies on oral precancer. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol 4: 518-539 (1978).

World Health Organization (WHO). Tobacco or health: a global status report. WHO, Geneva (1997).

Wynder EL, Wright G. A study of tobacco carcinogenesis. I. The primary fractions. *Cancer* 10,2:255-71 (1957).

Zhong KB, Jiang XZ, Peng CY. Uroflowmetry and its influence factors in benign prostate hyperplasia patients. *Zhon Nan Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 30,1:99-101 (2005).

Zunt SL. Transepithelial Brush Biopsy: an adjunctive diagnostic procedure. *J Indiana Dent Assoc* 80,2:6-8 (2001).

zur Hausen H. Papillomavirus infections- a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288:F55-F78 (1996).

8 Anhang

Münchener Nomenklatur II

Klassifikation zytologischer Befunde

Gruppe	Befund	Empfehlung
I	Normales Zellbild, dem Alter entsprechend, einschließlich leichter entzündlicher und degenerativer Veränderungen sowie bakterieller Zytolyse.	Kontrolle in einem Jahr.
II	Deutlich entzündliche Veränderungen an Zellen des Plattenepithels. Zellen aus Regenerationsepithel, unreife metaplastische Zellen, stärkere degenerative Zellver-änderungen, Para- und Hyperkeratose-zellen. Zellveränderungen bei IUP, Zeichen einer HPV-Infektion ohne wesentliche Kernver-änderungen. Zeichen einer Herpes- oder Zytomegalievirusinfektion.	Eventuell zytologische Kontrolle.
III	Unklarer Befund: - Schwere entzündliche, degenerative oder iatrogene Zellveränderungen, die eine sichere Beurteilung zwischen gut- und bösartig nicht zulassen. - Auffällige Zellen eines Drüsenepithels, deren Herkunft aus einem Karzinom nicht sicher auszuschließen ist.	Je nach klinischen Befund kurzfristige zytologische Kontrolle oder histologische Abklärung.
III D	Zellen einer Dysplasie leichten bis mäßigen Grades (Zeichen einer HPV-Infektion sollten besonders erwähnt werden).	Kontrolle in 3 Monaten.
IV a	Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ (Zeichen einer HPV-Infektion sollten besonders erwähnt werden).	Histologische Klärung, ausnahmsweise zytologische Kontrollen.
IVb	Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ. Zellen eines invasiven Karzinoms nicht auszuschließen.	Histologische Klärung.
V	Zellen eines malignen Tumors - Zellen eines Plattenepithelkarzinoms (verhornend oder nicht verhornend) - Zellen sonstiger maligner Geschwülste.	Histologische Klärung.

9 Danksagung

Frau Univ. Prof. Dr. med. A. Bankfalvi danke ich für die die Überlassung des Themas und den dadurch mir ermöglichten Zugang zum wissenschaftlichen Arbeiten. Für die hervorragende Betreuung der Arbeit, die Unterstützung und Anregungen bei der Bearbeitung der Promotion danke ich ihr ebenfalls sehr.

Herrn Univ. Prof. Dr. R. J. Lellé danke ich für die Bereitstellung des zytologischen Labors der Gynäkologie der UKM zur Aufbereitung und Befundung der Präparate.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. med. J. Piffko danke ich für die Hilfe bei der Befundung der Patienten, sowie die Überlassung der histologischen Daten.

Danken möchte ich auch den Menschen, die mir während dieser Zeit auf ganz unterschiedliche Art geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir während meines gesamten Studiums in jeglicher Beziehung zur Seite standen und mich immer wieder motivierten. Ihre ermutigende Unterstützung hatte maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.
