

Aus der Klinik für Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Norbert R. Kübler

Evaluation des Stellenwertes der DNA-Zytometrie
in der Begutachtung von Schnitträndern
nach Resektion oraler Plattenepithelkarzinome

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Döne Öz

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: PD Dr. Dr. Handschel

Koreferent: Prof. Dr. Böcking

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

- 1.1 Epidemiologie des Mundhöhlenkrebses
- 1.2 Ätiologie oraler Plattenepithelkarzinome
- 1.3 Tumorlokalisation und klinisches Erscheinungsbild
- 1.4 Diagnose oraler Plattenepithelkarzinome
 - 1.4.1. TNM-Klassifikation
 - 1.4.2. Stadieneinteilung
- 1.5 Mikroskopisches Erscheinungsbild
- 1.6 Zytologische Tumorkriterien
- 1.7 Zytogenetik des Plattenepithelkarzinoms
- 1.8 Therapie oraler Plattenepithelkarzinome
- 1.9 Prognose

2 Fragestellung

3 Material und Methoden

- 3.1 Patienten und Untersuchungsmaterial
- 3.2 Präparatherstellung für die DNA-Zytometrie
 - 3.2.1 Enzymatische Zellvereinzellung
 - 3.2.2. Feulgen-Färbung
- 3.3 Standardisierte statische DNA-Zytometrie
 - 3.3.1. DNA-Zytometer
 - 3.3.2. DNA-Messungen
 - 3.3.3. Messparameter
 - 3.3.4. Diagnostische Messwertinterpretation

4 Ergebnisse

- 4.1 Referenzzellen
- 4.2 Ergebnisse der DNA-Zytometrie an Resektatrandschnitten oraler Plattenepithelkarzinome
- 4.3 Vergleich der zytometrischen und histologischen Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf

.....

4.4 Sensivität , Spezifität und Prädiktionswert der DNA-Zytometrie
hinsichtlich des Auftretens von Lokalrezidiven

5 Diskussion

6 Zusammenfassung

7 Literaturverzeichnis

8 Danksagung

9 Lebenslauf

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des Mundhöhlenkrebses

Krebs steht nach Angaben des statistischen Bundesamtes hinter den kardiovaskulären Erkrankungen an zweiter Stelle der Mortalitätsstatistik (Zahl der Verstorbenen). Aus dem Bericht der Gesellschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, der in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut erstellt wurde, geht hervor, dass allein im Jahre 2002 ca. 210.000 Menschen in Deutschland an den Folgen einer Krebserkrankung starben. Die amtliche Mortalitätsstatistik in Deutschland registriert 2002 für Mundhöhlen und Rachenkrebs insgesamt 3713 Sterbefälle bei Männern und 986 bei Frauen. Dies sind bei Männern 3,4 Prozent aller krebsbedingten Sterbefälle ($n = 109631$) und 1 Prozent bei Frauen ($n=99945$). Die Letalität (Schätzwert für krebsbedingte Sterblichkeit) als Quotient aus den jährlichen Sterbezahlen und den Neuerkrankungen ist für 2002 mit 47 Prozent ($3713/7800$) bei der männlichen bzw. 37 Prozent bei der weiblichen Bevölkerung in Deutschland angegeben. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Institutes beträgt die Zahl der Neuerkrankung für Mundhöhlen- und Rachenkrebs bei Männern mit 7800 dreimal so hoch als bei Frauen (2600). Da Deutschland über kein flächendeckendes Krebsregister verfügt, ist die Zahl der Neuerkrankungen eine Schätzung, die unter anderem auf dem saarländischen Krebsregister beruht. Dabei zeigen sich bezüglich der Inzidenz (Zahl der Neuerkrankungen) sowohl geographische als auch geschlechtsspezifische Unterschiede. Bei Männern machen Mund- und Rachenkrebs 3,6 Prozent aller bösartigen Neubildungen aus, bei Frauen ca. 1 Prozent. Damit stehen Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens für die Männer hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeit an siebter Stelle. Die bei Männer deutlich höhere Tumorzinzidenz im Vergleich zu Frauen ist unter anderem auf den bisher signifikant häufigeren Alkohol- und Tabakkonsum zurückzuführen. In den Vereinigten Staaten von Amerika ist das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle der zehnthäufigste Tumor (Casiglia et al., 2001). Nach den Schätzungen der American Cancer of Society sind in den Vereinigten Staaten von Amerika 289000 neue Fälle von Mundhöhlen- und Pharynxkrebs aufgetreten und etwa 74000 Menschen starben an dieser Erkrankung (Newille und Day, 2002). Weltweit gesehen kommt Mundkrebs in Ostasien sehr häufig vor. In Indien sind über 30 % der Männer und mehr als 13 % der Frauen von Mund-Hals-Karzinomen betrof-

fen (Sanghvi et al., 1989). Die hohe Neuerkrankungsrate von Mundhöhlenkarzinomen in asiatischen Ländern ist auf das dort gehäufte Kauen von Betelnüssen zurückzuführen (Ho et al., 2002). Der prozentuale Anteil oraler Karzinome an der Gesamtheit aller Malignome ist innerhalb Europas sehr unterschiedlich. In Frankreich, Italien und auch in Irland sind diese Tumoren drei bis viermal häufiger anzutreffen als in Deutschland (Howaldt und Schmelzeisen, 2002). Im Vergleich mit den Neubildungsraten anderer europäischer Staaten liegt die Inzidenz in Deutschland für Männer im mittleren Bereich und für Frauen im oberen Drittel. Die höchste Inzidenz in Europa sowohl für Frauen als auch für Männer weist Frankreich auf.

1.2. Ätiologie oraler Plattenepithelkarzinome

Seit mehreren Jahrzehnten ist bekannt, dass bei Krebserkrankungen der Mundhöhle sich Hauptrisikofaktoren identifizieren lassen: Plattenepithelkarzinome entstehen häufig bei Menschen, die jahrzehntelang regelmäßig rauchen und / oder regelmäßig Alkohol konsumieren. Nach Angaben der Gesellschaft für bevölkerungsbezogener Krebsregister erkranken Raucher an bösartigen Tumoren des Mundes und Rachens bis zu sechsmal häufiger als Nichtraucher. Tabakrauch enthält eine Vielzahl von Karzinogenen und Kokarzinogenen in Form von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen und Nitrosamine (Brunnemann et al., 1991; Nair et al., 1996). Zyklische Kohlenwasserstoffe bewirken durch Einbau eines falschen Nukleotids (z.B. Thymidin statt Guanidin) in den DNA-Strang ganz bestimmte Punktmutationen (Shibuya et al., 1993). Alkohol begünstigt als Solvens die Penetration von Karzinogenen in die Mundschleimhaut. Zusätzlich schädigt Alkoholkonsum die Mukosa und verändert die Barrierefunktion der Mundschleimhaut, wodurch die Empfindlichkeit gegenüber Karzinogenen erhöht wird. Ethanol wird zu Acetaldehyd metabolisiert, welches mutagene und karzinogene Eigenschaften aufweist (Homann et al., 2000).

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass besonders die Kombination von Rauchen und Alkohol die Entstehung eines Mundhöhlenkarzinoms deutlich erhöht (Miller, 1974; Vokes et al., 1993; Rodriguez et al., 2004). Tabak und Alkohol sind zusammen für fast 80-90 Prozent aller Karzinome im Kopf-Hals-Bereich verantwortlich (Rothman, 1978).

Alkohol- und Nikotinkonsum haben einen potenzierenden Effekt (Howaldt und Schmelzeisen, 2002). In vielen Studien wurde für den Tabakkonsum eine Dosisabhängigkeit nachgewiesen (Macfarlane et al., 1995; Wynder et al., 1977).

Auch der ständige Genuss von rohem Tabak wie zum Beispiel Kautabak in Südin-dien stellt ein erhöhtes Risiko dar (Vokes et al., 1993; Sanghvi et al., 1989). Darüber hinaus gibt es lokale Noxen wie etwa chronisch wunde Stellen im Bereich der Mundschleimhaut aufgrund scharfer Zahn- oder Prothesenrändern. Aber auch eine mangelnde Mundhygiene als Kofaktor kann die Entstehung von Karzinomen in der Mundhöhle begünstigen. Nach Graham et al. (1977) erhöht sich das Risiko einen Kopf-Hals-Tumor zu bekommen um das 7,7 fache, wenn neben den beiden genannten Hauptrisikofaktoren noch ein desolates Gebiss vorhanden ist.

Ein weiterer Risikofaktor ist ein zu geringer Verzehr von Obst und Gemüse (Spitz, 1994; Sanchez et al., 2003). Die Vitamine A, C und E sowie Karotinoide, die in Früchten und Gemüse enthalten sind, haben eine antioxidative Wirkung. Nancy Nairi Maserjian und Kollegen untersuchten in einer Studie den Effekt der in Nahrungsmitteln vorkommenden Vitamine in Kombination mit Tabakkonsum auf die Entstehung von Mundhöhlenkrebs. Sie stellten fest, dass in Nahrungsmitteln enthaltenes Vitamin C in 50 Prozent der Fälle der Mundhöhlenkrebsentwicklung entgegenwirkt. Auch Alpha-Karotin wirkt vorbeugend gegen Mundhöhlenkrebs (Maserejian et al., 2007).

Für die Entstehung von Lippenkarzinomen ist neben Tabakkonsum in seinen verschiedenen Formen vor allem die Exposition der Haut mit Sonneneinstrahlung ein wichtiger Auslöser (Lindquist, 1979). Untersuchungen von Molnar et al. (1974) bestätigten den Zusammenhang zwischen Lippenkarzinomen und vermehrter Sonnenstrahlenexposition. Insbesondere die kurzwellige UV-B-Strahlung mit geringer Eindringtiefe bewirkt Mutationen (Wynder et al., 1975; Spitzer et al., 1975).

Des Weiteren scheint eine Infektion der Mundschleimhaut mit Papillomviren eine Rolle bei Entstehung von Mundkrebs zu spielen. Mehrere Autoren weisen auf einen Zusammenhang zwischen Virusinfektionen (vor allem HPV-Typen 16 und 18) und Kopf-Hals-Karzinom hin (Miller, 2001; Smith et al., 2004; Hansson et al., 2005).

Bei manchen Patienten entsteht ein Tumor im Bereich der Mundhöhle ohne eine erkennbare Ursache. Dieses Risiko steigt besonders mit zunehmendem Alter. Je älter der Mensch wird, desto unzuverlässiger arbeiten die DNA-Reparaturmechanismen. Im hohen Lebensalter summieren sich genetische Schäden und überschreiten dann einen Schwellenwert. Nach Angaben der Gesellschaft bevölkerungsbezogener

.....

Krebsregister liegt das mittlere Diagnosealter für Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens für Männer bei 61 Jahren und für Frauen bei 69 Jahren. Die höchsten Erkrankungsraten liegen für Männer in den Altersgruppen zwischen 55 und 65 Jahren vor.

1.3. Tumorlokalisation und klinisches Erscheinungsbild

In folgenden Lokalisationen kommen Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle hauptsächlich vor: die Wangen- und Kieferkammschleimhaut, die Gingiva, den retromolaren Bereich, den harten Gaumen, die vorderen zwei Drittel der Zunge, den Mundboden und die Lippe. Prädilektionsstellen sind der Mundboden, der laterale Zungenrand und die Unterzungenseite mit über 50 Prozent der Fälle. Weniger häufig betroffen ist die Alveolarmukosa, die Wangenschleimhaut und das Trigenum retromolare. Der harte Gaumen sowie der Zungenrücken gehören zu den Lokalisationen mit dem geringsten Risiko.

Makroskopisch unterscheidet man zwei Formen: Karzinome imponieren sowohl als exophytisch als auch endophytisch wachsende Tumore, wobei die endophytische Form beim Mundkrebs am häufigsten vorkommt. Bei dem endophytischen Geschwulstwachstum entsteht schon in einem relativ frühen Stadium ein kraterförmiges Ulcus mit aufgeworfenen wallartigen Rand. Das exophytische (verruköse) Karzinom weist oft eine blumenkohlartige feinhöckerige Oberfläche auf. Hauptlokalisation ist die Wangenschleimhaut und die Gingiva. Zu Schmerzen und funktionellen Beeinträchtigungen kommt es erst im fortgeschrittenen Stadium, die gekennzeichnet ist durch Ulzerationen oder Infektionen.

Das Plattenepithelkarzinom der Wangenschleimhaut findet man häufiger in der beweglichen Schleimhaut der Wange, meist im retrokommissuralen Bereich und seltener in der Umschlagfalte des Ober- oder Unterkiefers. Das klinische Bild ist charakterisiert durch eine papillomatöse Wucherung mit weißlicher, zerklüfteter Oberfläche und frühzeitigem geschwürigem Zerfall. Bei Infiltration des Tumors in die Wangenmuskulatur kommt es zur Kieferklemme. Wangenschleimhautkarzinome entstehen oft auf dem Boden präkanzeröser Leukoplakien. Frauen sind häufiger von diesem

.....

Tumor betroffen als Männer. Karzinome der Wangenschleimhaut neigen zur lymphogenen Metastasierung.

Das Karzinom der Kieferkammschleimhaut bzw. der Gingiva kann in jeder Region der zahntragenden Alveolarkämme entstehen. Häufig findet man hier die verruköse Form mit blumenkohlartigem Aussehen. Betroffen ist vor allem die linguale Seite der Retromolarenregion. Die Schleimhautkarzinome des Oberkieferalveolarfortsatzes sind häufig im Bereich der Molarenregion lokalisiert und dominieren durch ein ulzerös granulierendes Aussehen. Aufgrund der dünnen Schleimhautbedeckung des Kieferkamms kommt es sehr früh zur Infiltration des Tumors in den Knochen, die später röntgenologisch nachweisbar sind. Bei fortgeschrittenem Wachstum brechen Karzinome des Oberkiefers in die Kiefer- oder Nasenhöhle ein. Bei Tumoren der zahntragenden Kieferkämme kommt es häufig aufgrund frühzeitiger Osteolyse klinisch zu schmerzlosen Zahnlockerungen. Schleimhautkarzinome des Oberkiefers metastasieren gegenüber denen des Unterkiefers später bzw. seltener in die regionalen Lymphknoten.

Plattenepithelkarzinome des weichen und harten Gaumens sind seltener. Sie kommen bevorzugt am Übergang vom harten zum weichen Gaumen vor. Während im Bereich des harten Gaumens vorwiegend die papillomatös wachsenden Karzinome auftreten, findet sich die primär ulzeröse Form am weichen Gaumen. Erst im fortgeschrittenen Stadium tritt eine lymphogene Metastasierung auf.

Einer der wichtigsten Prädilektionsstellen für Mundhöhlenkarzinome ist neben dem Mundboden die Zunge. Zungenkarzinome manifestieren sich vor allem am Zungenrand und an der Zungenunterseite. Karzinome mitten auf dem Zungenrücken und an der Zungenspitze sind eine Rarität. Auch bei den Zungentumoren treten sowohl exophytische als auch endophytische Formen auf, wobei der endophytisch wachsende primär ulzeröse Geschwulsttyp dominiert. Bei den Karzinomen des Zungengrundes handelt es sich fast immer um ulzerierende, endophytisch wachsende Tumore, die zu einem kraterförmigen Defekt führen. Nicht selten kommt es zur Ausbreitung auf den Arcus palatoglossus, den Arcus palatopharyngeus und auf die laterale Pharynxwand. Bei Infiltration des Musculus pterygoideus mediales kommt es zur Kieferklemme.

Das Mundbodenkarzinom macht 10-15 Prozent aller Mundhöhlenkarzinome der westlichen Staaten aus. Hauptsächlich ist das Karzinom im Bereich des vorderen Mundbodens lokalisiert. Aufgrund ihres schnellen Wachstums breiten Sie sich nach dorsal in den Zungenkörper oder ventral in den Unterkiefer aus. Infiltriert das Mundbodenkarzinom die Zunge von unten, so stellt man gelegentlich eine Perforation in der Zungenmitte fest. Sie wachsen entweder exophytisch papillomatös mit blumenkohlartiger weißlicher Oberfläche oder ulzerös endophytisch mit frühzeitiger Infiltration in die Muskulatur. Beide Formen metastasieren rasch in die regionalen Lymphknoten. Bilaterale Lymphknotenmetastasen sind nicht selten.

Das früher sehr häufig vorkommende Lippenkarzinom ist lokalisiert im Bereich des Lippenrots, d. h. im Saumepithel zwischen Haut und Mundschleimhaut. In 95 Prozent der Fälle handelt es sich um Unterlippenkarzinome (Pindborg, 1982). Klinisch fällt anfänglich eine Hyperkeratose oder ein nicht abheilendes Ulcus auf. Im weiteren Verlauf entsteht eine papillomalöse Wucherung mit Kraterbildung oder eine größere mit Schorf bedeckte Ulzeration. Beide Tumorformen können ineinander übergehen.

1.4. Diagnostik

Bei Verdacht auf Tumoren im Bereich der Mundhöhle wird zunächst die Anamnese erhoben, aus der sich Hinweise auf das Vorhandensein einer Tumorerkrankung ergeben kann. Aus der Anamnese können tumorspezifische Risikofaktoren, insbesondere Tabak- und Alkoholkonsum, hervorgehen. Bei der anschließenden klinischen Untersuchung werden die verdächtigen Stellen vom behandelnden Arzt inspiziert und palpirt, um die Beweglichkeit des Tumors und der umgebenden Strukturen zu beurteilen. Aus den klinischen Erscheinungsformen für Mundkrebs ergeben sich diagnostische Kriterien für die Verdachtsdiagnose. Neben der Größe und Lokalisation werden Informationen über Farbe, Oberflächenbeschaffenheit, Abgrenzbarkeit, Verschieblichkeit und Konsistenz erhoben. Die Palpation der tumorösen Veränderung ergibt fast immer eine derbe Konsistenz als die Umgebung, wobei meist eine Verschieblichkeit gegenüber der Unterlage nicht mehr gegeben ist. Die Palpation der submandibulären und zervikalen Lymphknoten ist bei Tumorverdacht zwingend erforderlich. Vor allem in Zweifelsfällen sollte ein Symmetrievergleich zwischen der ge-

.....

sunden und erkrankten Seite erfolgen. Karzinome der Mundhöhle gehen entweder de novo aus einer unauffälligen Schleimhaut hervor oder entstehen auf dem Boden einer präkanzerösen Leukoplakie. Die Differenzialdiagnose zwischen dem klinischen Erscheinungsbild der präkanzerösen Leukoplakie und einem Carcinoma in situ ist nur pathohistologisch anhand von Dysplasiekriterien verifizierbar. Unklare Läsionen der Mundschleimhaut, die innerhalb von 2-3 Wochen nach Ausschluss von Risikofaktoren nicht abheilen, sollten Anlass zur histologischen Abklärung geben. Im Frühstadium besteht oft Symptomarmut. Erst mit dem Auftreten von Nekrosen in der Mundhöhle kommt es zu schmerzhaften Superinfektionen. Diese entzündliche Überlagerung sollte nicht zu Fehldiagnosen verleiten. Erst im fortgeschrittenem Stadium kann es zur Kieferklemme, Schluckbeschwerden, Fremdkörpergefühl, persistierender Reizhusten, behinderte Nasenatmung, Störungen des Geruchs- und Geschmacksinns, Schwindel, Ohrensausen, einseitige Schwerhörigkeit, Zahnlockerungen und Schmerzen kommen.

Bei Verdacht auf das Vorliegen eines Mundhöhlenkarzinoms wird eine Biopsie (Gewebeprobe) aus dem verdächtigen Tumorareal in Lokalanästhesie entnommen. Die Gewebeprobe wird dann zur histologischen Untersuchung eingesandt, um eine eindeutige Diagnose stellen zu können bzw. um sicherzustellen, dass der Tumor vollständig entfernt wurde.

Die interoperative Schnellschnittuntersuchung ist die Methode der Wahl, wenn das Ergebnis der histologischen Untersuchung innerhalb kurzer Zeit vorliegen soll. Sie ermöglicht dem Chirurgen auch intraoperativ eine schnelle Orientierung über den Befall von Resektionsgrenzen. Dabei wird das entnommene Gewebestück im Labor mit Kohlendioxidschnee mit Hilfe eines Kryostaten tiefgefroren und bei minus zwanzig Grad mit einem Kryotom geschnitten, auf einem Objektträger aufgefangen, ohne Fixierung eingefärbt und von einem Pathologen beurteilt. Die anhand von Schnellschnitten erhaltenen histologischen Diagnosen sind den diagnostischen Aussagen an einem Paraffinschnitt unterlegen. Die Schnellschnitte sind dicker (ca. 9 μm). Die Morphologie ist durch die Eiskristallbildung schlechter erhalten als nach Paraffineinbettung. Die Dauer der Paraffinschnitte dauert je nach Anzahl und Größe der Blöcke mindestens vier Stunden. Ausführliche Informationen zur Herstellung von Paraffinschnitten für mikroskopische Untersuchungen können aus dem Lehrbuch "Histologie," von Junqueira und Carneiro entnommen werden.

Bestätigt sich der Verdacht auf einen Tumor, so werden, je nach Verdachtsdiagnose und Tumorlokalisierung weitere Untersuchungen wie z. B. Röntgenaufnahmen, Sonographie, Positronen-Emissions-Tomographie, Szintigraphie, Endoskopie eingeleitet, um die Ausdehnung der Tumorerkrankung genauer bestimmen zu können. Durch Röntgenaufnahmen (Orthopantogramm, Computertomographie) können tumorbedingte Veränderungen an Zähnen und Knochen diagnostiziert werden. Bei spezieller Fragestellung kann zur Darstellung einer zweiten Ebene oder Schnittbilderuntersuchung die Anfertigung einer Computertomographie indiziert sein. Mit Hilfe dieser Schädelaufnahme, die Knochen und Weichgewebe abbildet, werden die Lokalisation und die Ausdehnung des Primärtumors im Bereich der Mundhöhle oder an den angrenzenden Strukturen, insbesondere den Kieferknochen beurteilt. Außerdem ist dieses Verfahren hilfreich bei der Suche nach Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen.

Die Kernspin- oder Magnetresonanztomographie (MRT) hat wie die Computertomographie einen großen Stellenwert bei der Diagnostik von Primärtumoren, lokoregionalen Metastasen und Fernmetastasen. Bei der Magnetresonanztomographie ist im Vergleich zur Computertomographie eine bessere Weichteildarstellung bei fehlender direkter Knochendarstellung möglich.

Durch die sonographische Untersuchung (Ultraschalluntersuchung) können Primärtumore im Bereich der Mundhöhle nur eingeschränkt dargestellt werden, da die zu untersuchenden Tumorareale im sogenannten Schallschatten des Unter- oder Oberkieferknochens liegen können und somit nicht abgebildet werden (Schwenzer und Ehrenfeld, 2002). Die Hauptindikation für die Sonographie ist die Weichteiluntersuchung am Hals, vor allem bei der Fahndung der Halslymphknoten nach lokoregionalen Metastasen mit einer Sensivität zwischen 70 und 92 Prozent und einer Spezifität zwischen 60 und 88 Prozent (Vogl et al., 2001).

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) macht Gewebe mit erhöhtem Glucosestoffwechsel sichtbar. Ein erhöhter Glucosestoffwechsel liegt bei Tumoren, Metastasen, aber auch bei Entzündungen vor. Dieses Verfahren findet Einsatz bei der Diagnostik von Metastasen und Rezidiven.

In der Endoskopie (Spiegelung) wird häufig in Vollnarkose mit Hilfe von Optiken die Speiseröhre, der Kehlkopf und der Nasenrachenraum untersucht, um sicherzustellen, dass keine Zweittumoren im Bereiche dieser Organstrukturen vorliegen.

1.4.1. TNM-Klassifikation

Nach Abschluss der klinischen und bildgebenden Untersuchungen muss vor jeder adäquaten Tumorthherapie der Tumor histologisch oder zytologisch diagnostiziert, klassifiziert und gradiert werden. Von der Union International Contre le Cancer (UICC) ist 1997 eine weltweit anerkannte und einheitliche Tumorklassifikation entwickelt worden, die eine getrennte Einteilung für den Tumor, die Lymphknoten und die Fernmetastasen durch das TNM-System berücksichtigt. Die Abkürzung T steht hierbei für Tumor, N für Nodus (Lymphknoten) und M für Metastase. Diese Parameter werden mit den arabischen Ziffern 0 bis 4 gewichtet. Die Tumoren werden entweder nach ihrem Durchmesser in cm oder nach Befall anatomischer Strukturen beurteilt. Die Genauigkeit der Diagnostik im TNM-System wird durch den Certainty-Index (Sicherheitsfaktor) angegeben. Werden die Befunde prätherapeutisch erhoben, so spricht man von T, N und M. Erfolgt der Befund postoperativ anhand histopathologischer Kriterien an einem Operationspräparat, so spricht man von pT, pN und pM.

Tabelle 1. TNM-Klassifikation nach UICC für Mundhöhlenkarzinome
(Quelle: UICC-Union Internationale Contre Cancer)

Beurteilungskriterium	Kurzbeschreibung	Beschreibung
Tumorgröße	Tis	Carcinoma in situ
	T0	kein Primärtumor vorhanden
	T1	Primärtumor mit einem maximalen Durchmesser von 2,0 cm
	T2	Primärtumor > 2,0 ≤ 4,0 cm im größten Durchmesser
	T3	Primärtumor > 4 cm im maximalen Durchmesser
	T4	Primärtumor mit Invasion in Nachbarorgane (z.B. Knochen, Zungenmuskulatur)
	Tx	Primärtumor nicht bestimmbar
Lymphknotenstatus	N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachweisbar
	N1	Metastasen in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten, ≤ 3 cm
	N2a	Metastasen in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten, ≤ 3 cm, ≤ 6 cm im maximalen Durchmesser
	N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, ≤ 6 cm im maximalen Durchmesser

	N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, ≤ 6 cm im maximalen Durchmesser
	N3	eine oder mehrere Lymphknotenmetastasen, > 6 cm im maximalen Durchmesser
	Nx	regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
Fernmetastasen	M0	keine Fernmetastasen nachweisbar
	M1	Fernmetastasen vorhanden
	Mx	Vorhandensein bzw. Fehlen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
Diagnostischer Sicherheitsfaktor	C1	diagnostisches Standardverfahren (einschließlich konventionellen Röntgenaufnahmen)
	C2	spezielle diagnostische Maßnahmen (z. B. CT, Sonographie, MRT, Biopsie)
	C3	chirurgische Exploration
	C4	Untersuchungsbefund beim definitiven Eingriff (einschließlich kompletter Aufarbeitung des Resektionspräparats)
	C5	Autopsie

Basierend auf die TNM-Klassifikation sollte für jeden Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom eine individuelle Tumorformel erstellt werden.

1.4.2. Stadieneinteilung

Neben der TNM-Klassifikation, die eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten zulässt, ist auch eine Stadieneinteilung von der American Joint Committee on Cancer (AJCC) entwickelt worden, die die verschiedenen Ausprägungen der T-, N-, und M-Klassifikationen in vier Stadien zusammenfasst.

Die Stadieneinteilung auf der Basis der AJCC- Kriterien gibt die folgende Tabelle wieder.

Tabelle 2. Stadieneinteilung der Mundhöhlenkarzinome nach AJCC

(Quelle: AJCC -American Joint Comitee on Cancer)

Staging nach den AJCC- Kriterien			
Stadium	Klassifikation		
	T- Klassifikation	N-Klassifikation	M-Klassifikation
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
IV	T4	N0	M0

1.5. Mikroskopisches Erscheinungsbild

Der am häufigsten vorkommende Tumor der Mundhöhle ist das Karzinom. In über 90 Prozent der Fälle handelt es sich hierbei histologisch um Plattenepithelkarzinome, die auf dem Boden einer Epitheldysplasie entstehen. Das Plattenepithelkarzinom stammt vom Epithel der Mundschleimhaut ab. Bei den Mundhöhlenkarzinomen werden verhornende, nichtverhornende und undifferenzierte unterschieden.

Die häufigste Krebsform in der Mundhöhle ist das verhornende Plattenepithelkarzinom, das den höchsten Reifungsgrad aufweist. Es wächst in Zellzapfen und Nestern. Das nichtverhornende Plattenepithelkarzinom ist gekennzeichnet durch fehlende Verhornung, aber noch erhaltene Epithelschichtung in den Tumorsträngen. Es besteht größtenteils aus Stachelzellen mit reichlichen atypischen Mitosen und zeigt einen geringen Differenzierungsgrad.

Den geringsten Reifegrad weist das anaplastische Plattenepithelkarzinom mit seinen undifferenzierten Zellen, die durch zahlreiche atypische Mitosen gekennzeichnet sind. Die Struktur des Oberflächenepithels ist nicht mehr vorhanden.

Je undifferenzierter das Tumorgewebe ist, desto größer ist seine Wachstumsgeschwindigkeit und maligne Potenz. Mit steigender Anzahl der Mitosen, mit zunehmendem Verlust der intrazellulären Hornperlen und mit zunehmender Zell- und Kernpolymorphie steigt der Malignitätsgrad des Tumors. Der Differenzierungsgrad von Plattenepithelkarzinomen wird nach Broder in vier Klassen eingeteilt: ein gut differenzierter Tumor entspricht dem Grad 1, ein mäßig differenzierter Tumor entspricht dem Grad 2, ein schlecht differenzierter Tumor dem Grad 3 und ein undifferenzierter Tumor einem Grad 4 (Broders, 1941). Bei der Gradierung des Tumors berücksichtigte Broder nur die Charakteristika der Tumorzellen wie z. B. Keratinisierung, Interzellularbrücken, Mitosen, Hyperchromasie und Polymorphismus. Damit das Malignitätsgrading von prognostischer Relevanz ist, wurden der Invasionsstyp und die entzündliche Reaktion mitberücksichtigt. Zu den wichtigsten histologischen Kriterien zählt das histologische Wachstumsmuster, die plattenepitheliale Differenzierung sowie die zelluläre Reaktion. Die Ausprägung dieser drei Kriterien wird in dem am geringsten differenzierten Tumorareal mit den Ziffern 1-3 bewertet, wobei die Bewertungsziffern für das Wachstumsmuster und die plattenepitheliale Differenzierung hinsichtlich der prognostischen Bedeutung mit dem Faktor zwei multipliziert werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Malignitätsgrading des Mundhöhlenkarzinoms

(Quelle: A. Böcking. Skriptum zum Kurs der Histopathologie für Zahnmediziner, Band 3.)

	Bewertungsziffer			Faktor
	1	2	3	
Wachstumsmuster	breite Zellstränge	schmale Zellstränge	Zelldissoziation	x 2
Plattenepitheliale Differenzierung	drei Zelltypen unterscheidbar	zwei Zelltypen unterscheidbar	nur ein Zelltyp unterscheidbar	x 2
Zelluläre Reaktion	ausgeprägt	mäßig	fehlend	x 1

.....

Eine niedrige Bewertungsziffersumme entspricht einer guten Differenzierung sowie einer geringeren Malignität. Dabei entspricht eine Bewertungsziffersumme von 5-6 dem Malignitätsgrad 1, 7-12 dem Malignitätsgrad 2 und 13-15 dem Malignitätsgrad 3.

1.6. Zytologische Tumorkriterien

Maligne Tumoren lassen sich fast immer anhand bestimmter Kriterien diagnostizieren. Die Kernkriterien gelten als Malignitätskriterien 1. Ordnung während zytoplasmatische und nukleoläre Veränderungen inkonstant sind (Malignitätskriterien 2. Ordnung). Das schnelle Wachstum eines Tumors und seine Neigung zum nekrotischen Zerfall weisen auf Malignität hin (Malignitätskriterium 3. Ordnung). Sind außer den Kriterien 1. Ordnung noch andere Kriterien zutreffend, ist die zytologische Tumordiagnose gesichert (Feichter und Dalquen, 2000). Die Kriterien 2. und 3. Ordnung sind nicht immer für die Diagnose einer malignen Neoplasie notwendig. Zu den Malignitätskriterien 1. Ordnung (Kernkriterien) gehören die veränderte Chromatinstruktur, die Kern / Plasma - Relation, die Kerngrößenvariabilität (Anisokariose) sowie die Kernform (Kernpolymorphie). Die Chromatinstruktur von Zellkernen ist das wichtigste Malignitätskriterium. Maligne Tumoren haben ein grobkörniges, teilweise verklumptes Chromatin und zeigen eine unregelmäßige Verteilung des Heterochromatins im Zellkern. Bei manchen Tumoren ist das Heterochromatin auch oft an die Kernmembran angelagert. Typisch für maligne Zellen ist eine Zunahme der Kerngröße, so dass das Verhältnis von Kern- zu Zytoplasmadurchmesser zugunsten der Zellkerne verschoben ist (Duesberg et al., 2006). Aufgrund erhöhter Stoffwechselaktivität und unkoordinierter Zunahme der DNA in den Tumorzellkernen kommt es zu stark wechselnden Kerngrößen (Anisokariose). Ein weiterer wichtiger Malignitätshinweis ist die Kernpolymorphie, die jedoch kein obligates Tumorkriterium darstellt. Zu den Malignitätskriterien 2. Ordnung zählen die Mehrkernigkeit, atypisch geformte Nukleolen, sowie vermehrte Mitosen. Bei Plattenepithelkarzinomen beobachtet man nicht selten, dass das Zytoplasma von Tumorzellen von neutrophilen Granulozyten umlagert ist (Malignitätskriterium 3. Ordnung). Nehmen die Veränderungen an der DNA während der Tumorentwicklung ein messbares Ausmaß an, so können sie mit dem statischen DNA-Zytometer gemessen werden. In der Regel geht der Grad der DNA-Anomalie

.....
mit dem Ausmaß der Kernatypie und dem Malignitätsgrad eines Tumors einher
(Feichter und Dalquen, 2000).

1.7. Zytogenetik von Plattenepitelkazinomen

Bereits vor über hundert Jahren postulierten Hansemann (1890) und Boveri (1902), dass Krebs durch spezifische Gewinne und Verluste von Chromosomen verursacht wurden. Diese chromosomale Theorie der Karzinogenese wurde in den 1960er Jahren verlassen, da die erwarteten Krebs-spezifischen Chromosomen nicht gefunden wurden.

Die Untersuchungen von Sandberg zeigen, dass die meisten benignen und malignen Tumoren des Menschen im Vergleich zu normalen oder reaktiv veränderten Zellen numerische und /oder strukturelle Chromosomenaberrationen aufweisen (Sandberg, 1990) .

Heute gilt eine von der normalen Körperzelle abweichende chromosomale Aneuploidie als ein allgemein akzeptierter Marker für Neoplasie (Böcking, 1995). Nach der Theorie des amerikanischen Molekularbiologen Peter Duesberg entsteht Krebs durch spezifische chromosomale Veränderungen, d.h. ein Gewinn oder Fehlen von Chromosomen bzw. Chromosomenbruchstücken. Die Tumorzelle ist das Resultat einer Kettenreaktion mehrfacher Aneuploidiesierungen (Mehrschritt-Karzinogenese). Demzufolge beginnen die meisten Tumoren mit relativ geringen Chromosomenveränderungen, die im Laufe der Zeit zunehmen können. Mit zunehmender Tumorprogression, gekennzeichnet durch zunehmende Chromosomenveränderungen und Variabilität der Zelle, nimmt auch die maligne Potenz (Bösartigkeit) des Karzinoms zu (Duesberg et al 2005, 2007). Hinsichtlich der zytogenetischen Tumorprogression wird zwischen primären, sekundären und tertiären Chromosomenaberrationen unterschieden (Böcking et al., 1994; Böcking, 1995). Primäre chromosomale Aberrationen, wie z.B. Deletionen oder Transkriptionen, sind die frühesten mit dem Lichtmikroskop feststellbaren tumorspezifischen Veränderungen innerhalb eines Gewebes. Den primären Aberrationen folgen meistens sekundäre und tertiäre Aberrationen. Bei sekundären Aberrationen kommt es zu Gewinnen oder Verlusten von Chromosomen, wodurch ein zytometrisch messbarer Anstieg bzw. Absinken der Tumorstammlinie (DNA-Modalwert) vorliegt. Des Weiteren kann es bei sekundären Aberrationen zu aneup-

.....

loiden Polyploidisierungen mit Bildung weiterer Tumorzellstammlinien kommen. Tertiäre Aberrationen entstehen im Verlauf zunehmender Tumorprogression aufgrund von genetischer Instabilität. Charakteristisch sind massive Chromosomenverluste als auch weitere Polyploidisierungen, was einhergeht mit einer Zunahme der malignen Potenz des Tumors. Chromosomale Aneuploidien entstehen durch Karzinogene oder durch spontane mitotische Fehler. Die Karzinogene greifen ein Funktionsnetz bestehend aus drei Gengruppen an, die das Wachstum einer Zelle regulieren: die Protoonkogene, die Tumorsuppressorgene und die Reparaturgene. Die Protoonkogene kodieren proliferationsfördernde, die Tumorsuppressorgene proliferationshemmende Moleküle

(Feichter und Dalquen 2000). Eine Schlüsselrolle besitzt das Protein p53 als sogenannter Tumorsuppressorgen bei der Überwachung der genetischen Stabilität einer Zelle. Reparaturgene kodieren Proteine, die Zellen mit Genomschäden erkennen und durch Apoptose die weitere Proliferation verhindern. Auch Tumorsuppressorgene fungieren zum Teil als Reparaturgene durch kodieren von Proteinen, die bei der Replikation des genetischen Materials entstandenen Fehler beseitigen. Während Protoonkogene stets dominant sind, sind Tumorsuppressorgene stets rezessiv, d.h. eine Wachstumsbeeinträchtigung liegt erst durch Mutation beider Allele eines Suppressorgens vor. Aufgrund einer Genmutation kommt es zur Expression von Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktorähnlichen Molekülen sowie zur Aktivierung von Rezeptoren und Produktion von Steuerproteinen. Steuerproteine können Zellen aus der G₀-Phase in eine Teilungsbereitschaft versetzen. Ist durch Karzinogeneinwirkung der Karyotyp einer transformierten Zelle bereits destabilisiert, kommt es aufgrund einer Proliferationsbeschleunigung zur sekundären Mutationen. Folglich entstehen neue Punktmutationen, Deletionen, Translokationen und Amplifikationen von Genen, wodurch die Fehlerrate bei der Transkription und Translation steigt. Zusätzlich kommt es zu Störungen der Kernteilung durch Spindelstörungen. Atypische Mitosen mit Riesenkernen und Polymorphie prägen das histologische Bild (Feichter und Dalquen, 2000).

1.8. Therapie

Eine allgemein akzeptierte Standardtherapie bei oralen Plattenepithelkarzinomen existiert derzeit nicht. Hauptsächlich stehen folgende Verfahren zur Auswahl:

Die chirurgische Therapie, die Radiotherapie, die Chemotherapie sowie die Kombination der genannten Therapieformen. Darüber hinaus gibt es neuere Therapieansätze, wie zum Beispiel die Immuntherapie mit Antikörpern oder Zytokinen, deren Einsatz in der Tumorthherapie zurzeit nur von experimenteller Bedeutung ist und somit noch eine untergeordnete Rolle spielt. Zwar sind in der Literatur zahlreiche Untersuchungen publiziert worden, die den verschiedenen Therapieverfahren ein Vorrang geben, jedoch existieren bislang keine wissenschaftlich validen Vergleichstudien hinsichtlich der verschiedenen Therapiemöglichkeiten, die eine eindeutige Überlegenheit eines Therapieverfahrens beweist. Es gibt keine Studie, die die alleinige Operation mit der alleinigen Bestrahlung vergleicht (Mohr, 1998). Letztendlich hängt das individuell erarbeitete therapeutische Konzept von der histologischen Diagnose, der Tumoralokalisation, der Tumorausdehnung sowie dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten ab. Die im Folgenden beschriebenen Therapiemöglichkeiten für Kopf- Hals-Karzinome sind aus dem „Interdisziplinäre Kurzgefasste Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft (2002, 3. Auflage) und ihrer Arbeitsgemeinschaften, der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie und der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie“ entnommen. Zu den anerkannten Therapiemodalitäten gehören demnach die chirurgische Therapie sowie die Radiotherapie.

Chirurgische Therapie

Das Ziel der chirurgischen Therapie von malignen Kopf-Hals-Tumoren ist die vollständige Entfernung des Tumors mit Sicherheitsabstand und eventuell vorhandener Lymphknotenmetastasen (R0-Resektion). Die Operation der Rezidivtumoren erweist sich schwieriger als die des Ersttumors. Eine chirurgische Therapie ist auch bei inoperablen Rezidivtumoren zu Verbesserung der Lebensqualität des Patienten angezeigt. Somit hat dieser Palliativeingriff die Zielsetzung, das Tumorleiden und die damit verbundenen Funktionseinschränkungen für den Patienten erträglicher zu machen. Die durch Tumorresektion bzw. Blockresektion bei T3- und T4-Tumoren entstandene Gewebedefekte werden durch unterschiedliche plastisch-rekonstruktive

Maßnahmen (Lappenplastik, Gewebetransplantation) verschlossen, um so die Ästhetik und Funktion dieser Körperregionen wiederherzustellen.

Oftmals ist es notwendig mit der operativen Entfernung des Primärtumors gleichzeitig oder zeitversetzt eine Lymphknotenausräumung (Neck-Dissection) durchzuführen.

Die kurative Neck-Dissection erfolgt bei bereits vorliegenden Lymphknotenmetastasen. Das Ausmaß der chirurgischen Entfernung des lokoregionalen Lymphabstromgebietes wird bestimmt von der Anzahl, der Größe und der Lokalisation der Lymphknotenmetastasen sowie der Lage des Primärtumors. Bei metastasefreien Halslymphknoten (N0) hängt es von der Größe und Lokalisation des Primärtumors ab, ob eine elektive Neck-Dissection, eine Radiotherapie oder nur eine abwartende Haltung mit engmaschiger Beobachtung sinnvoll ist.

Basierend auf den fünf Ebenen der Lymphknotenstationen am Hals erfolgt die Einteilung der Neck-Dissection in folgende Formen:

- Radikale Neck-Dissection:

Bei diesem Verfahren werden alle fünf Lymphknotengruppen (submental und submandibulär, tiefe kranijuguläre Lymphknoten, tiefe mediojuguläre Lymphknoten, tiefe kaudojuguläre Lymphknoten, Lymphknoten des posterioren Halsdreiecks, sog. Accessoriusgruppe) sowie wichtige nicht-lymphatische Strukturen wie z.B. M. sternocleidomastoideus, V. jugularis interna und N. accessorius resiziert.

- Modifizierte radikale Neck-Dissektion:

Hierbei werden alle fünf Lymphknotengruppen entfernt, wobei eine oder mehrere nichtlymphatische Strukturen belassen werden.

- Selektive Neck-Dissection:

Die selektive Neck-Dissection beinhaltet die Entfernung von mindestens zwei aber weniger als fünf Lymphknotengruppen mit Erhalt von mindestens einer nichtlymphatischen Struktur.

- Erweiterte radikale Neck-Dissection:

Bei der erweiterten radikalen Neck-Dissection werden noch zusätzliche Lymphknotengruppen (z.B. intraparotidale Lymphknoten) oder nichtlymphatische Strukturen wie z.B. Glandula parotis oder Schilddrüse resiziert.

Bei einem Lymphknotenstatus von N1 und N2 ist entweder eine selective Neck-Dissection oder eine modifizierte radikale Neck-Dissection die Therapie der Wahl.

.....

Liegt bereits eine N3-Lymphknotenmetastase vor, so ist eine radikale Neck-Dissection, eventuell auch eine modifizierte oder erweiterte radikale Neck-Dissection in Erwägung zu ziehen.

Radiotherapie

Die Radiotherapie kann grundsätzlich als alleinige Behandlungsmethode oder in Kombination mit einer Operation im Sinne einer präoperativen oder postoperativen Radiatio durchgeführt werden.

Entsprechend der chirurgischen Therapie kann auch die Radiotherapie kurative oder palliative Intention haben. Die alleinige primäre Radiotherapie mit kurativer Intention kommt als Alternative zur chirurgischen Therapie bei Tumoren in den ersten beiden Stadien (T1N0 bzw. T2N0) zum Einsatz. Wenn bei Tumoren im fortgeschrittenen Stadien (III, IV) eine Operation nicht möglich oder nicht sinnvoll ist, kann alternativ zur primären Radiotherapie auch eine Radiochemotherapie erfolgen.

Eine postoperative Bestrahlung (adjuvante Radiotherapie) ist indiziert bei R1- und R2-Tumoren, wenn eine Nachresektion nicht möglich ist sowie bei ausgedehnten Tumoren ($>pT2$) und Lymphknotenmetastasen ($>pN2$). Bei Tumoren im Stadium T2 und klinisch nicht nachweisbaren Lymphknotenmetastasen ist zur Radiotherapie die klinisch engmaschige Kontrolle eine Alternative. Fakultativ kann bei histologisch festgestelltem N1-Stadium eine postoperative Nachbestrahlung durchgeführt werden.

Die kombinierte Radiotherapie und Chemotherapie findet hauptsächlich Anwendung bei praktisch oder funktionell inoperablen Kopf-Hals-Tumoren. Ziel der Kombination von Strahlentherapie mit bestimmten chemotherapeutischen Substanzen ist es durch Steigerung der Strahlenwirkung bessere Ergebnisse hinsichtlich der lokoregionären Tumorfreiheit und Organerhaltung zu erreichen als mit der alleinigen Radiotherapie. Eine randidomisierte Studie innerhalb des Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen Arbeitskreises für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich konnte eine Prognoseverbesserung von 4,5 Prozent nach einem Jahr und 8,3 Prozent nach zwei Jahren mit dem Konzept der präoperativen Radiochemotherapie für fortgeschrittene Plattenepithelkarzinome gegenüber der alleinigen Radikaloperation nachweisen (Mohr et al., 1994).

Als wirksame Zytostatika werden vor allem 5-Fluorouracil, aber auch Cisplatin, Carboplatin, Mitomycin und Taxane verabreicht. Zu den Folgenden der Strahlentherapie

.....
zählen unter anderem die Strahlenosteomyelitis, Osteoradionekrose des Kieferknochens sowie Mukositis.

Zytostatische Chemotherapie

Eine rein medikamentöse Behandlung von Mundhöhlenkarzinomen erfolgt als alleinige Therapiemaßnahme nur in palliativer Intention, wenn der weit fortgeschrittene Tumor inoperabel ist (z. B. lokoregionärer Rezidiv mit Fernmetastasen). Ziel dieses Therapieansatzes ist es, dass weitere Tumorstadium aufzuhalten. Folgende Zytostatika kommen bei Plattenepithelkarzinomen zum Einsatz: Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil, Methotrexat, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Vincaalkaloide und Paclitaxel. Die höchsten Remissionsraten haben die Kombinations-Chemotherapie mit Cisplatin bzw. Carboplatin und einer 5-Fluorouracil-Dauerinfusion (Hennemann, 2006).

Eine neue Methode zur palliativen Behandlung von fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren stellt die photodynamische Therapie dar. Bei diesem Therapieverfahren werden dem Patienten lichtempfindliche Substanzen, sog. Photosensibilisatoren verabreicht, welche sich insbesondere im Tumorgewebe anreichern. Durch Bestrahlung des Tumorgewebes mit Licht spezifischer Wellenlänge entstehen aggressive Sauerstoff-Moleküle, die als Zellgift fungieren und Tumorgewebe zerstören (Kübler und Reuter, 2007).

1.9. Prognose

Die Prognose von Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom ist abhängig von verschiedenen Faktoren, die eine unterschiedlich große Relevanz auf die Überlebenschancen der Patienten haben.

Neben tumorabhängigen Faktoren, wie z.B. Alter, Geschlecht und Allgemeinzustand des Patienten, gibt es tumorassoziierte Kriterien. Da Krebs meist eine altersabhängige Erkrankung ist, haben ältere Patienten eine schlechtere Prognose als jüngere. Jones et al. stellten 1998 bei einem Gesamtkollektiv von 2647 Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen fest, dass die 80-100 Jahre alten Patienten eine signifikant schlechtere Fünf-Jahres-Überlebensrate von 44 Prozent aufweisen als die 30-70 jährigen Patienten mit 54 Prozent (Jones et al., 1998). Des Weiteren kann ein allgemein

..... schlechter Allgemeinzustand des Patienten eine adäquate Behandlung im Sinne einer Operation des Primärtumors einschränken.

Zu den tumorassoziierten Kriterien zählen beispielsweise Tumorlokalisation, Tumorausdehnung, Tumorhistologie und Lymphknotenstatus (N-Kategorie). Die Prognose des Mundkrebses schwankt stark je nach Lokalisation des Primärtumors. Die Malignität von Mundschleimhautkarzinomen nimmt von ventral nach dorsal und von kranial nach kaudal zu. Patienten mit Lippenkarzinomen weisen unter den verschiedenen Tumoren der Mundhöhle die weitaus beste Überlebenschance. Ein wahrscheinlicher Faktor, der die Prognose beeinflusst, ist der Grad der histologischen Differenzierung des Tumors (Kademani et al., 2005; Huang et al., 2007). Beim Grading unterscheiden einige Autoren zwischen dem Grading des Primärtumors und dem der Tumorfront (Bryne et al., 1989). Eine schlechtere Prognose zeigen undifferenzierte Plattenepithelkarzinome sowie das Plattenepithelkarzinom vom Spindeltyp.

Zu den gesichertesten Faktoren für die Überlebenswahrscheinlichkeit gehören neben dem T- und N-Stadium der R-Status (Residualtumor). Der Erfolg einer Tumorthherapie wird durch die Fünf-Jahres-Überlebensrate definiert. Diese Zahl gibt an, wieviel Prozent der an Tumor erkrankten Patienten fünf Jahre nach Diagnosestellung am Leben sind. Nach einer Statistik des DÖSAK -Tumorregisters weisen Patienten mit primären Mundhöhlenkarzinomen eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 65 Prozent für Tumorgröße T1 und 50 Prozent für die T2-Tumoren (Howaldt et al., 1999). Prognostisch relevant ist neben der Größe des Tumors der Zustand der regionalen Lymphknoten in Bezug auf Metastasen, die die Prognose beträchtlich verschlechtern (Jones, 1993; Wennerberg, 1996; Noguchi et al., 1999). Ein weiterer bedeutender Faktor ist die R1-Situation, d.h. die chirurgische Therapie eines Tumors ohne Anhalt auf mikroskopische Tumorreste. Das Auftreten von Lokalrezidiven senkt die Überlebensrate signifikant (Sessions et al., 2000). Diesen Zusammenhang bestätigte Binahmed et al. mit seiner 2006 publizierten Studie. Während Patienten mit einem R0-Status (kein Residualtumor) eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 69 Prozent haben, reduzierte sich diese bei Patienten mit R1-Status, d.h. mit histologisch nachgewiesenem Residualtumor auf 38 Prozent (Binahmed et al., 2007).

2. Fragestellung

Bei der Behandlung von Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen steht nach wie vor die sichere Resektion des Tumors „im Gesunden“ im Vordergrund. Aktuell werden die operativ resezierten Gewebeblöcke und Randschnitte „konventionell“ histologisch bezüglich der Tumorfreiheit beurteilt. Leider werden trotz R0-Resektionen in vielen Fällen noch Lokalrezidive beobachtet (Stupp et al., 1994). Es stellt sich nun die Frage, ob die DNA-Bildzytometrie, die bisher kaum zur Diagnostik von Mundhöhlenkarzinomen eingesetzt wurde, als ergänzende Untersuchung diesbezüglich hilfreich ist. Anders formuliert: Verbessert die zusätzliche Verwendung der DNA-Zytometrie bei der Beurteilung der Resektionsgrenzen hinsichtlich des Auftretens von Lokalrezidiven die diagnostische und prognostische Aussagekraft? Hierzu werden bei 40 Patienten mit histologisch verifizierten R0-Resektionen, die jeweils mindestens über drei Jahre nach der chirurgischen Operation nachbeobachtet wurden, die Randschnitte mittels DNA-Zytometrie nachuntersucht. Die zytometrische Untersuchung erfolgt „verblindet“. Die Ergebnisse werden mit dem klinischen Verlauf (Lokalrezidive) verglichen.

3. Material und Methoden

3.1. Patienten und Untersuchungsmaterial

Gegenstand der zytometrischen Untersuchung waren 185 histologisch gesicherte tumorfreie Resektatrandschnitte von 40 Patienten, die aufgrund eines histologisch verifizierten oralen Plattenepithelkarzinoms im Zeitraum von 1991 bis 2004 in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie an der Westdeutschen Kieferklinik Düsseldorf radikal operiert wurden. Von den 185 Resektatrandschnitten waren 173 Randschnitte histologisch dysplasie- und tumorfreie Mundschleimhautexcisate, 11 Resektatrandschnitte wiesen eine leichte Plattenepitheldysplasie auf und in einem Randschnitt wurde eine mittelgradige Plattenepitheldysplasie im Schnellschnitt nachgewiesen (siehe Tabelle 7). Die Diagnose Plattenepithelkarzinom wurde jeweils durch Exisionsbiopsie und mikroskopische Untersuchung von intraoperativen Schnell- und Paraffinschnitten bestätigt. Die Patienten wurden derart ausgewählt, dass alle Patienten tumorfreie Resektionsränder im Schnellschnitt hatten (R0), aber die Hälfte dieser Patienten innerhalb von 3-5 Jahren ein Lokalrezidiv entwickelte. Alle Patienten wurden mindestens drei Jahre postoperativ bezüglich des Auftretens von Lokalrezidiven klinisch beobachtet, da aus der Literatur bekannt ist, dass Lokalrezidive häufig (d.h. zu 80 %) in den ersten zwei darauffolgenden Jahren nach Resektion auftreten (Hemprich und Müller, 1989).

Die für die Studie vorgesehenen Paraffinblöcke und die korrespondierenden Routine-schnitte von den Resektatrandschnitten und dem Tumor, die zur histologischen Diagnostik verwendet worden waren, stammten aus den Archiven des Institutes für Pathologie der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Voraussetzung war, dass die Paraffinblöcke noch ausreichend Gewebe zu Zellver-einzelung enthielten. Von den ursprünglich 44 Patienten wurden 4 Patienten wegen diagnostisch unzureichendem Material (zu wenig Zellen nach der Zellvereinzelung) nicht bei der Auswertung berücksichtigt.

Die 184 Resektatrandschnitte stammten von 31 männlichen und 9 weiblichen Patienten, somit war fast jeder dritte Patient weiblichen Geschlechtes. Die prozentuelle Geschlechterverteilung ist in Abbildung 1 dargestellt.



Abbildung 1. Prozentuale Geschlechtsverteilung der Patienten

Die Risikofaktoren regelmäßiger Alkohol- und Tabakkonsum konnte bei 80 Prozent der Patienten nachgewiesen werden.

Das Alter der Patienten lag zwischen 38 und 80 Jahren, im Mittel bei 64 Jahren.

Die Darstellung der Altersverteilung der Patienten mit primären Plattenepithelkarzinomen zum Zeitpunkt der Diagnoseerstellung bzw. Primäroperation erfolgt in Abbildung 2.

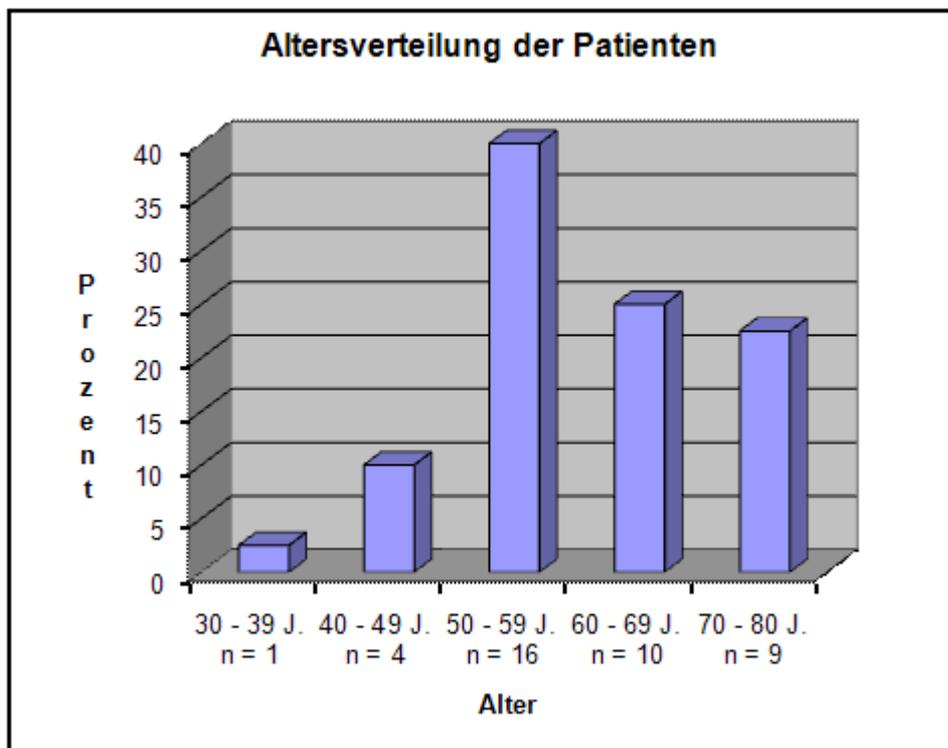


Abbildung 2. Prozentuale Altersverteilung der Patienten

Die Einteilung des Patientengutes entsprechend der Lokalisation der Primärtumoren und ihr jeweiliger Anteil an der Gesamtmenge ist in Tabelle 4 dargestellt.

In dieser Studie gehören zu den am häufigsten von den Tumoren besetzten Regionen vor allem der Mundboden und die Zunge.

Tabelle 4: Primärtumorverteilung der oralen Plattenepithelkarzinome

Lokalisation des Primärtumors	Anzahl	%
Mundboden	10	25
Zungenrand/Zungengrund/Zungenkörper	8	20
Zunge und Mundboden	7	17,5
Alveolarfortsatz des Ober- und Unterkiefers	10	25
Unterlippe	4	10
Wangenschleimhaut	1	2,5

Entsprechend der Größe des Primärtumors sind die T1/ T2-Tumoren am häufigsten vertreten. Aufgeteilt nach den einzelnen Tumorstadien waren dies für Stadium I 35 Prozent, Stadium II 40 Prozent, Stadium III 2,5 Prozent und Stadium IV 22,5 Prozent. Von 40 Patienten wiesen 20 Patienten in der postoperativen Beobachtungszeit von mindestens drei Jahren ein Rezidiv des Primärtumors auf.

Einen Überblick über die Größe des Primärtumors gibt die Abbildung 3 wieder.

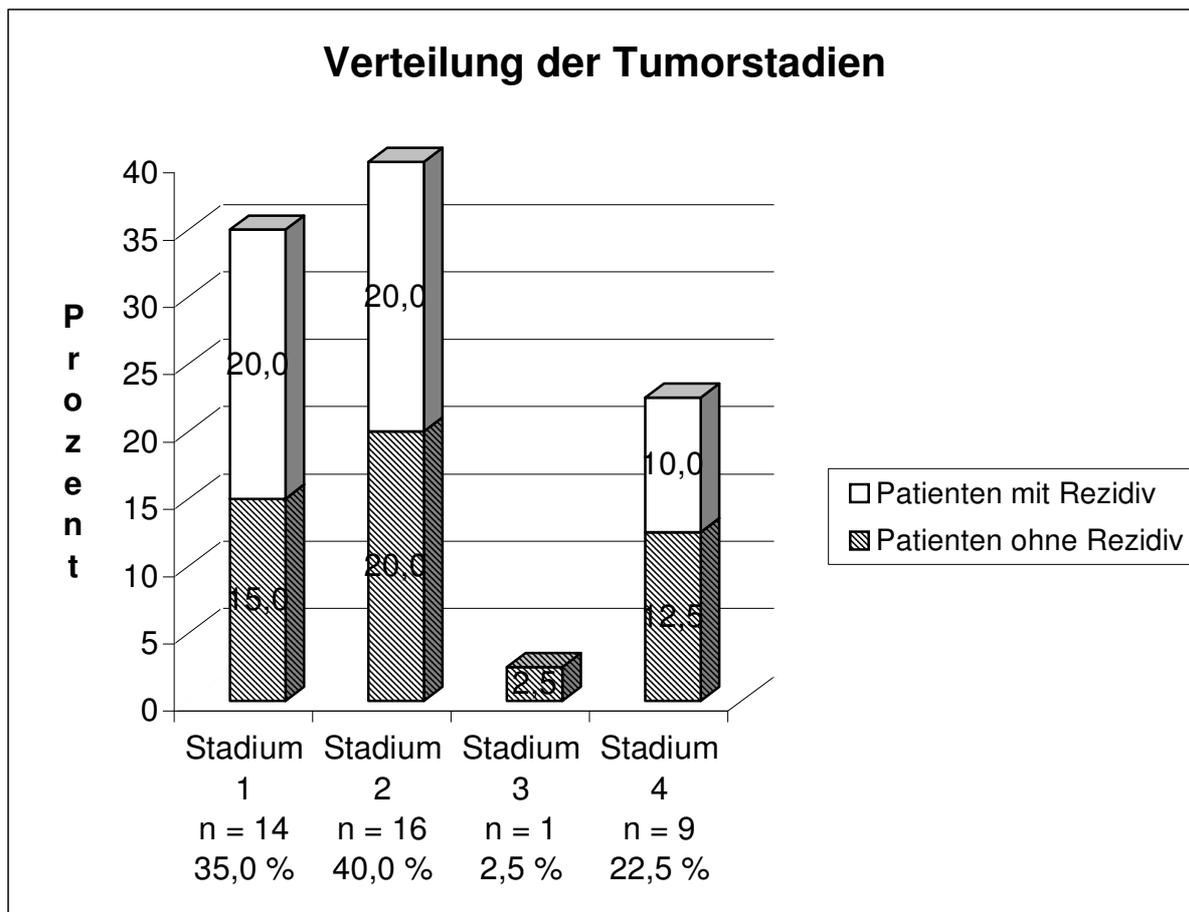


Abbildung 3. Verteilung der Tumorstadien bei Patienten mit und ohne Rezidiv.

In der folgenden Tabelle ist der pathohistologische Parameter Malignitätsgrading und sein jeweiliger Anteil an der Gesamtmenge dargestellt:

Tabelle 5. Malignitätsgrading der Plattenepithelkarzinome

G / Anzahl	N	Prozent
G1	3	7,5
G2	27	67,5
G3	10	25

G1: gut differenziertes Karzinom mit geringer Malignität

G2: mäßiggradig differenziertes Karzinom

G3: schlecht differenziertes Karzinom

3.2. Präparatherstellung für die DNA-Zytometrie

3.2.1. Enzymatische Zellvereinzellung

Für die DNA-Zytometrie wurden aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebestücken Zellvereinzellungspräparate hergestellt.

Die enzymatische Zellvereinzellung ist ein Verfahren zur Gewinnung einzelnen, morphologisch intakten Zellen aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebe. Die so gewonnenen Zellen werden später nach Feulgen für die digitale DNA-Messung gefärbt. Als Ausgangsmaterial für die Zellvereinzellung dienten die in Paraffin eingebetteten Gewebelöcke und die korrespondierenden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Routineschnitte.

Zunächst wurden die Randschnitte unter dem Mikroskop durchmustert und die in Frage kommenden Areale mit einem Filzstift markiert, um so gezielt diese Gewebereiche zur Untersuchung zu gewinnen.

Das entsprechende Areal wurde auf dem korrespondierenden Paraffinblock übertragen und mit einem Skalpell circa 0,5 mm tief umschnitten.

Aus dem Paraffinblock wurden zwei bis drei 50 - 100 µm dicke Schnitte mit dem Mikrotom angefertigt.

Anschließend wurden die markierten Gewebereiche vom Rest des Schnittes gelöst und in einen zuvor hergestellten Nylongazebeutel gegeben und eingeschweißt. Zur Herstellung des Nylongazebeutels (Porengröße 50 µm) wurden aus der Gaze 5,0 x 4,0 cm große Stücke ausgeschnitten, in der Mitte gefaltet und deren drei Kanten an ein Bunsenbrennerflamme verschweißt.

Anschließend wurden die mit Gewebsschnitten gefüllten Gazebeutel in verchromte Biopsiekassetten gegeben.

Die Entparaffinierung des Gewebes erfolgte in zwei 30minütigen Xylobädern.

Daran schloss sich die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe mit 100%, 96% und 70% Ethanol zu jeweils 30 Minuten sowie die zweimal 30minütige Spülung in Aqua dest. an.

Die Entparaffinierung und Rehydrierung sollte bei Raumtemperatur auf einem Schüttler erfolgen. Nun wurde der Inhalt der Gazebeutel in Reagenzgläser überführt.

In jedes Reagenzglas wurde 5ml 37 Grad C warme Pepsinlösung gegeben und im auf 37 Grad C erwärmten Wasserbad für 30 Minuten unter leichtem Schütteln incubiert.

Durch diesen Vorgang wurden die Zellkerne aus ihrem Gewebeverband enzymatisch herausgelöst. Diese Reaktion wurde nach 30 Minuten durch Zugabe von je 5 ml kaltem PBS-Puffer dadurch abgestoppt, dass ihre pH- und Temperatur-Optima verlassen werden. Nun befanden sich die Zellkerne in Lösung und die Gazebeutel konnten verworfen werden.

Die Reagenzgläser wurden 10 Minuten bei 400g zentrifugiert. Das Sediment wurde nochmals in der Cytozentrifuge zentrifugiert und anschließend auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger ausgestrichen. Zur Beschichtung der Objektträger mit Poly-L-Lysin wurden zwei Tropfen auf einen Objektträger gegeben und die Flüssigkeit mehrfach vertrieben. Danach konnten sie im Wärmeschrank getrocknet werden.

Reagenzien für die Zellvereinzellung:

Zur Herstellung der PBS-Puffer wurden 8,0 g Natriumchlorid, 1,15 g Dinatriumhydrogenphosphat, 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat und 0,2 g Kaliumchlorid benötigt. Diese vier Reagenzien wurden auf 1000 ml Aqua dest. aufgefüllt. Der pH-Wert musste bei 7,6 +/- 0,1 liegen und sollte gegebenenfalls mit 1 N HCL bzw. 1N NaOH vorsichtig korrigiert werden.

Bei der Anfertigung der Pepsinlösung wurde 7ml 1N HCL mit 1000 ml Aqua dest. verdünnt und in einem Wasserbad auf 37 Grad Celsius erwärmt.

Unter Einsatz eines Magnetrührers wurde langsam pro Präparat 25 mg Pepsin Porcine (Hersteller Serva Nr. 31820) in 5 ml verdünnte Salzsäure zugegeben (Delgado et al., 1984; Haedley et al., 1983; van Driel-Kulker et al., 1985; Hedley et al 1985).

3.2.2. Feulgen-Färbung

Der erstmals 1924 von Feulgen und Rosenbeck beschriebene spezifische Nachweis von DNA bildet die Voraussetzung für die heutige quantitative DNA-Messung durch die statische DNA-Messung .

Um auf den DNA-Gehalt von Zellkernen schließen zu können, erfolgte eine Feulgen-Färbung der Erbsubstanz mit dem Farbstoff Pararosanilin.

Die Färbung der Präparate erfolgte automatisch in einem temperaturkontrollierten Färbeautomaten Varistain 23-4 (Fa. Shandon, Runcorn, Großbritannien; Abbildung 4).



Abbildung 4 : Färbeautomat Varistain 23-4 (Fa. Schadon, Rucorn, Großbritannien).

Für den Färbeablauf wurde ein von Böcking et al. überarbeitetes Färbeschema verwendet (Böcking 1995, Böcking et al., 1995).

Tabelle 6: Schematischer Ablauf des Färbeprogramms im Färbeautomaten (modifiziert nach Böcking)

Küvette	Zeit [min]	Substanz
1	15	Xylol
2	5	Ethanol 100 %
3	5	Ethanol 96 %
4	50	10 % gepuffertes Formalin
5	10	Aqua dest.
6	5	Aqua dest.
7	60	5 N HCl, 27 °C
8	2	Aqua dest.
9	2	Aqua dest.
10	2	Aqua dest.
11	60	Schiff`s-Reagenz
12	5	SO ₂ -Wasser

13	5	SO ₂ –Wasser
14	5	SO ₂ –Wasser
15	1	Aqua dest.
16	1	Aqua dest.
17	3	Ethanol 70 %
18	3	Ethanol 96 %
19	3	Ethanol 100 %
20	10	Xylol
Schiff´s Reagenz:		Parafuchsin

Vorgefärbte Präparate (HE) wurden für 15 Minuten in Xylol zur Entfernung des Eindeckmittels Entellan gelegt. Anschließend wurden die Präparate in absteigender Alkoholreihe rehydriert und in 10% gepuffertem Formalin fixiert.

Die saure Hydrolyse der DNA verlief bei 27 Grad Celsius für eine Stunde in 5 N HCl. Durch die saure Hydrolyse wurde die Bindung zwischen Desoxyribose und der Base Purin gespalten. Die so entstandenen freien Aldehydgruppen an den Desoxyriboseanteilen der DNA konnten mit dem Schiffschenschen Aldehydreagenz farbig markiert werden. Zur Entfernung der restlichen Salzsäure wurden die Präparate in Aqua dest. gespült und die freien Aldehydgruppen für eine Stunde mit der Schiff-Reagenz angefärbt. Der nicht an Aldehydgruppen gebundene Farbstoff wurde mit Sulfitwasser gespült. Anschließend wurden die Objektträger nach aufsteigender Alkoholreihe erneut dehydriert und über Xylol mit Entellan sowie einem Deckglas verschlossen. Die Aufbewahrung der Präparate bis zur photometrischen DNA-Messung erfolgte unter Ausschluss von Licht.

Reagenzien für die Feulgen-Färbung:

10% gepuffertes Formalin

100 ml Formalin

900 ml Aqua-dest.

4g NaH₂PO₄

6,5 g Na₂HPO₄

5N HCl

414 ml 37 % rauchende HCl

586 ml Aqua-dest.

SO₂-Wasser

Stammlösung: 100 g Kaliumdisulfid K₂S₂O₅

900 ml Aqua-dest.

Gebrauchslösung : 50 ml Stammlösung

50 ml 1 N HCl

900 ml Aqua-dest.

Da der Bedarf an SO₂-Wasser relativ hoch ist, sollte man eine hochkonzentrierte Stammlösung ansetzen und sie für den täglichen Färbebedarf weiter verdünnen (Gebrauchslösung). Die Stammlösung sollte in einer dunklen Flasche aufbewahrt werden.

Schiff's Reagenz

5 g Parafuchsin

150 ml 1N HCl

5 g Kaliumdisulfit K₂SO₅

850 ml Aqua-dest.

3 g Aktivkohle

Das Schiff'sche Reagenz kann auch als gebrauchsfertige Lösung über die Apotheke (Merk Bestell-Nr. 9033) bezogen werden.

3.3. Standardisierte statische DNA-Zytometrie

3.3.1. Das statische DNA-Zytometer

Für die photometrische Messung der integrierten optischen Dichte (IOD) der feulgefärbten Zellkerne wurde die AutoCyte Quick-DNA-Workstation (AutoCyte, Burlington, N.C., USA) eingesetzt, die in Abbildung 5 zu sehen ist. Dieses PC-gestützte Bildanalyse-System besteht aus einem Durchlichtmikroskop (Axioplan 2) mit einem manuell beweglichen Kreuztisch (Zeiss, Jena, BRD), einem 40/0,75 n. A. Objektiv, einem 560 nm Interferenzfilter +/- 10 nm Halbwertsbreite sowie einer am Mikroskop angeschlossenen Schwarzweiß-Videokamera (VarioCam, Modell CCIR, PCO Computer Optics, Kehlkeim, BRD). Der zur Messung eingelegte Interferenzfilter entspricht dem Adsorptionsmaximum der mit Pararosanilin angefärbten Zellkerne. Die Analyse der TV-Kamerabilder des Mikroskops erfolgte mittels eines PC Pentium I Prozessors, welcher mit einem Monitor, einer Maus sowie einem Laserdrucker ausgestattet war. Dieses TV-Bild-Analyse-System erfüllte die Richtlinien des Consensus Reports of the European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) über die Standardisierung der diagnostischen DNA-Bildzytometrie (Haroske et al., 1998, 2001; Böcking et al., 1995).



Abbildung 5. Messeinheit für die DNA-Zytometrie, bestehend aus Mikroskop, Kamera, PC und der Software Quick AutoCyte

3.3.2. DNA-Messungen

Zunächst wurde das Mikroskop für die Messung vorbereitet. Nach dem Einlegen des Interferenzfilters entsprechend dem Adsorptionsmaximum der mit Pararosanilin gefärbten Zellkerne wurde das gefärbte Präparat auf dem Kreuztisch des Mikroskops einspannt.

Dann wurde das Mikroskop und die Software Quick AutoCyte auf das zu messende Präparat kalibriert. Hierfür wurde ein zellreicher Ausschnitt aus dem Präparat exakt fokussiert, welcher gleichzeitig auf dem Monitor des Computers erschien. Nach Einstellung von Blende und Kondensator sowie Justierung des Mikroskops nach dem Köhler'schen Beleuchtungsprinzip zur Streulichtreduktion erfolgte eine Leerwertmessung, wofür ein leeres Feld aus dem Präparat aufgesucht wurde und sein mittlerer Grauwert berechnet wurde. Vor jeder Messung eines Präparates musste eine erneute Kalibrierung am Mikroskop erfolgen. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellkerne wurde die integrierte optische Dichte (IOD), das heißt die Summe der Grauwerte aller Pixel des Zellkernbildes gemessen. Die integrierte optische Dichte ist äquivalent der DNA-Menge. Als Referenzzellen wurden in jedem Präparat mindestens 30 Lymphozyten auf dem Monitor interaktiv per Mausklick farbig umrandet, wonach deren DNA über Bestimmung des IOD-Wertes automatisch innerhalb dieser Messmaske gemessen und gespeichert wurde.

Die mittlere integrierte optische Dichte der Referenzzellen wurde als 2c-Wert (d. h. normaler doppelter Chromosomensatz) festgesetzt. 1c entspricht dem DNA-Gehalt eines gesunden, haploiden Zellkerns.

Bei der Referenzzellmessung musste zur Sicherstellung des Qualitätsstandards der Variationskoeffizient der IOD's (CV) unter 5% liegen, damit die Messungen zur Kalibrierung eines DNA-Histogramms verwendet werden konnte (Böcking et al., 1995; Haroske et al., 1998). Des Weiteren durfte keine Abhängigkeit der IOD normaler Referenzzellen von der Fläche der Zellkerne bestehen, d. h. dass der Korrelationskoeffizient zwischen IOD und der Fläche der Referenzzellen gemäß den internationalen Konsens unterhalb von 0,4 liegen musste (Haroske et al., 2001).

Als Analysezellen wurden mindestens 300 Epithelzellen nach dem Zufallprinzip gemessen. Die Messung erfolgte interaktiv, d. h. zu jedem Zeitpunkt der Messung konnte eingegriffen werden und eine Korrektur vorgenommen werden.

Durch die sogenannte „Bildgalerie“ auf dem Monitor war es auch möglich, einzelne Zellkerne, die sich als Färbeartefakte, überlagert oder autolytisch aufwiesen, gezielt zu eliminieren.

Nach Abschluss der Messung lieferte die Software ein sog. „DNA-Histogramm“, welches die Verteilung des DNA-Gehaltes der Epithelzellen im Vergleich zu den Referenzzellen darstellte.

3.3. Messparameter

In dieser Studie wurden folgende Messparameter ausgewertet:

DNA-Stammlinie (STL):

Sie ist definiert als eine G₀/G₁ - Phase - Fraktion des DNA-Histogramms einer proliferierenden Zellpopulation. Unter einer DNA-Stammlinie versteht man einen „Häufigkeitsgipfel“ (Modalwert), der DNA-Werte im Histogramm, welchem ein zweiter Verdopplungsgipfel (entsprechend der G₂/M-Phase des Zellzyklus) zugeordnet werden kann.

5c exceeding events (5cEE):

Sie gibt die Zahl der Kerne an, die über 5c lag.

9 c exceeding events (9cEE):

Alle Zellen mit einem DNA-Gehalt größer als 9c werden als 9cEE bezeichnet (Chantelain et al., 1998; Horoske et al., 2001).

3.3.4. Diagnostische Messwertinterpretation

Eine Abweichung des DNA-Gehaltes von der Norm kann mittels DNA-Zytometrie gemessen werden. Dabei stellt DNA-Aneuploidie das zytometrisch messbare Äquivalent chromosomaler Aneuploidie dar. Der Nachweis von DNA-Aneuploidie, d.h. eine Mengenveränderung der DNA, gilt international als Marker für das Vorliegen von Tumorzellen (Böcking et al., 1986; Böcking, 1995).

Das Fehlen von DNA-Aneuploidie schließt jedoch das Vorliegen von Malignität nicht aus. Normale Zellen besitzen in der G₀/1-Phase des Zellzyklus einen diploiden DNA-

.....

Gehalt, genannt 2c. Während der DNA-Synthesephase nimmt die DNA-Menge zu und erreicht in der G2/M-Phase (vor der Zellteilung) den doppelten Wert (4c).

Eine DNA-Aneuploidie liegt vor, wenn abnorme Stammlinien identifiziert wurden (Stammlinien-Interpretation) oder wenn abnorm hohe DNA-Einzelwerte, sog. Exceeding Events gemessen wurden (Einzellzellinterpretation).

Gemäß der DNA-Stammlinieninterpretation nach Böcking wird DNA-Aneuploidie angenommen, wenn der Anteil der Zellpopulationen der in der G0/1-Phase liegt, sich hochsignifikant ($p < 0,001$) von dem der Referenzzellpopulation unterscheidet (Böcking, 1998). Eine abnorme DNA-Stammlinie (oder Aneuploidie) liegt vor, wenn der DNA-Modalwert der G0/G1-Fraktion einer Zellpopulation um mehr als 10 Prozent vom normal 2c-Gehalt abweicht (Haroske et al., 2001).

Unter Berücksichtigung der Messpräzision werden DNA-Stammlinien kleiner 1,80 c und größer 2,20 c als signifikant Aneuploid identifiziert. Eine aneuploide Stammlinie liegt auch außerhalb des Bereichs von 3,60 c bis 4,40 c vor (Böcking 1995; Böcking et al., 1993; Haroske et al., 1998).

Werden einzelne Zellkerne mit einem DNA-Gehalt größer 9 c gemessen, handelt es sich um Einzelzellaneuploidie, sofern keine euploide Polyploidisierung vorliegt (Chatalein et al., 1989).

Der Nachweis von DNA-Aneuploidie hängt von verschiedenen Faktoren ab (Böcking et al., 1995; Haroske et al., 2001):

- der Messpräzision,
- der Anzahl der gemessenen Zellen,
- dem Betrag, mit dem der Kern-DNA-Gehalt der Zellen von normalen Zellen abweicht.

Die Durchführung und diagnostische Interpretation der DNA-Bildzytometrie ist durch vier internationale Konsensus-Reports hoch standardisiert (Böcking et al., 1995; Haroske et al., 1997; Giroud et al., 1997; Haroske et al., 2001).

4. Ergebnisse

4.1. Referenzzellen

Zur Auswahl der geeigneten Referenzzellen wurde in jedem Präparat die integrierte optische Dichte (IOD) von Lymphozyten bestimmt. Hierzu wurden in jedem Präparat mindestens 30 interne Lymphozyten als Referenzzellen gemessen, deren Mittelwert als $2c$ gesetzt wurde.

Die gemessenen Lymphozyten stammten aus dem gleichen Präparat um störende Einflüsse, die durch Lagerung, Präparatherstellung und Fixation der Zellen entstehen können, zu eliminieren. Gemäß den Empfehlungen der European Society für Analytical Cellular Pathology (ESACP) lag für jede Messung der Variationskoeffizient (CV) der Referenzzellen unter fünf Prozent und der Korrelationskoeffizient der Kernfläche versus IOD's der Referenzzellen unter 0,4.

4.2. Ergebnisse der DNA-Zytometrie an Resektatrandsnitten oraler Plattenepithelkarzinome

Die Epithelzellen der histologisch tumorfreien Resektatrandsnitte wurden bezüglich ihres DNA-Gehaltes untersucht. Die Messergebnisse der DNA-Bildzytometrie wurden in einem sog. DNA-Histogramm graphisch dargestellt. Daraus kann man den am häufigsten vorkommenden DNA-Gehalt der Präparate ersehen. Auf der Abszisse ist der DNA-Gehalt der Zellkerne und auf der Ordinate die Anzahl der gemessenen Zellkerne aufgetragen. Zu diagnostischen Zwecken wurden die Histogramme in den Kategorien DNA-aneuploid und DNA-euploid eingeteilt, wobei DNA-Diploidie und DNA-Polyploidie als DNA-euploid gelten. Das Histogramm eines normalen (gesunden) Gewebes weist eine Stammlinie bei $2c \pm 10$ Prozent (diploid) auf. DNA-Polyploidie liegt vor, wenn DNA-Stammlinien in den Verdopplungsregionen diploider Stammlinien (d.h. $4c$, $8c$, $16c$) vorkommen. Im Folgenden werden drei Histogramme beispielhaft für euploide und aneuploide DNA-Verteilungen an den gemessenen Epithelzellen der Mundschleimhaut aus Tumorrandschnitten vorgestellt.

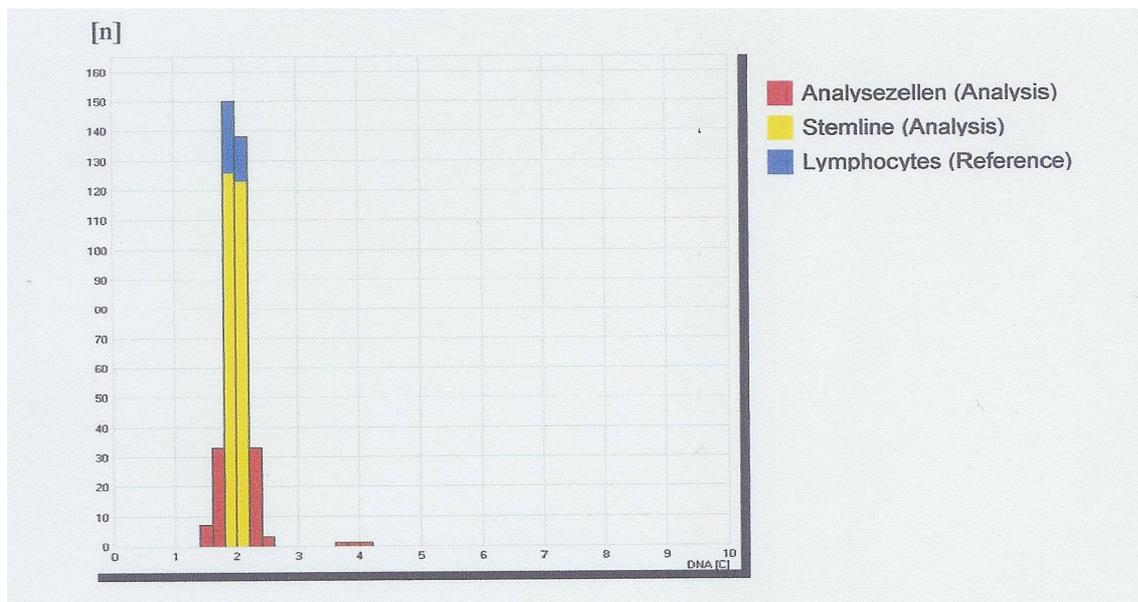


Abbildung 6 (Material: 600 I-93):

DNA-Histogramm mit einer euploiden (diploiden) DNA-Verteilung von 328 Epithelzellen der Mundschleimhaut aus dem Tumorrandschnitt mit einer Stammlinie (Häufigkeitsgipfel) bei 2c und einzelnen Werten bei 4c (Referenzzellen: 39 Lymphozyten).

Blau sind die Werte der Referenzzellen, rot die der untersuchten Plattenepithelien und gelb die Stammlinie dargestellt.

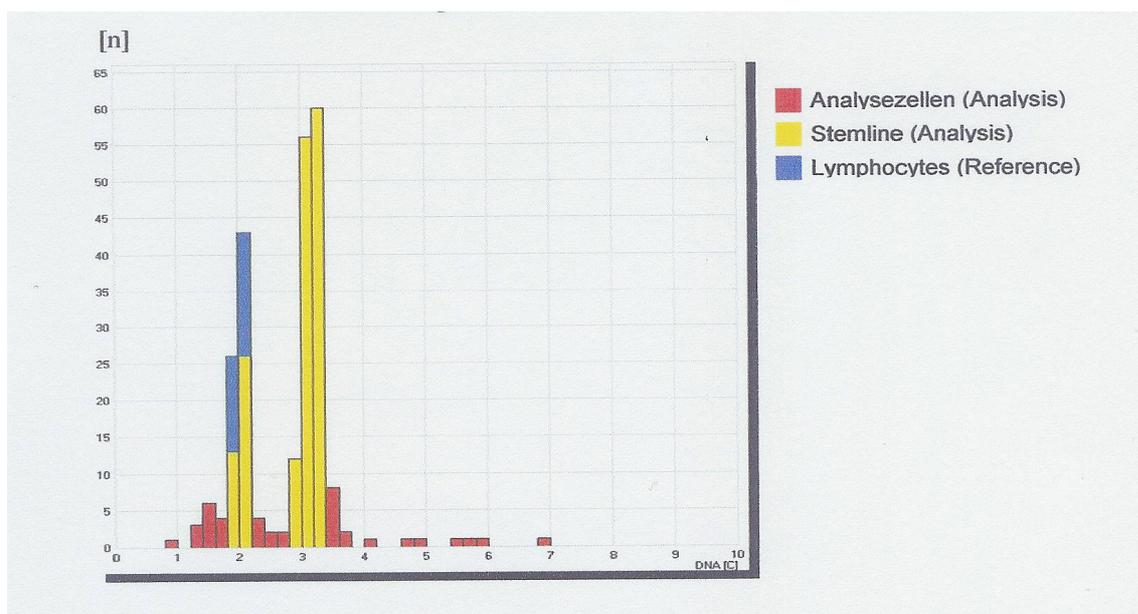


Abbildung 7 (Material 10036 IX-92):

Die DNA-Zytometrie zeigt ein abnormes DNA-Histogramm von Plattenepithelien der Mundschleimhaut aus Tumorrandschnitten mit einer aneuploiden DNA-Stammlinie mit einem Modalwert von 3,24 c (Referenzzellen: 30 Lymphozyten).

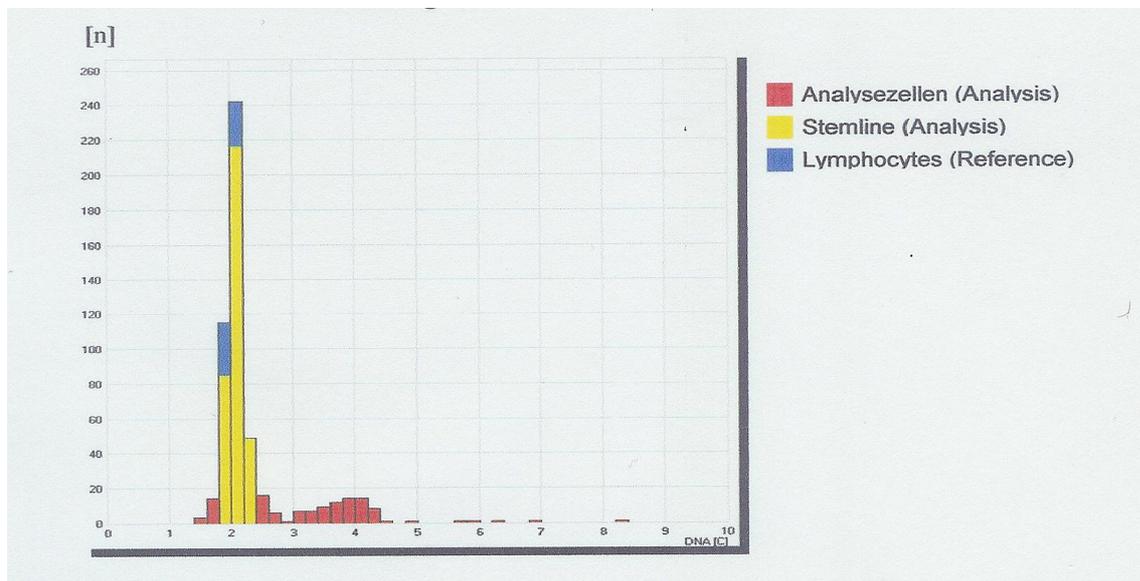


Abbildung 8 (Material 3446 lh-02):

Einzellzellaneuploidie mit mehreren Zellen mit einem DNA-Gehalt größer 5c bei 469 gemessenen Epithelzellen der Mundschleimhaut aus Tumorrandschnitten (Referenzzellen: 55 Lymphozyten).

Die DNA-Messung an Resektatrand schnitten ergab lediglich bei einem Patienten eine alleinige aneuploide Stammlinie, bei 10 Patienten eine alleinige Einzellzellaneuploidie (5cEE) und bei 5 Patienten sowohl eine Stammlinienaneuploidie als auch Einzellzellaneuploidien. Kern-DNA-Werte über 5c (5cEE) traten insgesamt bei 14 (5cEE) traten insgesamt bei 14 Patienten auf und repräsentieren somit das am häufigsten vertretene Kriterium für DNA-Aneuploidie. Tabelle 7 zeigt, mit welcher Häufigkeit die verschiedenen Kriterien für DNA-Aneuploidie auftraten.

Tabelle 7: Kriterien für die DNA-Aneuploidie in Tumorrandschnitten und ihre Häufigkeit bei den Patienten

Stammlinienaneuploidie	Anzahl der Patienten	%
alleinige Stammlinienaneuploidie	1	6,25
alleinige Einzellzellaneuploide (5cEE)	10	62,5
Kombination Stammlinienaneuploidie und Einzellzellaneuploidie	5	31,25

Mehrere aneuploide Stammlinien kamen bei drei Patienten zur Darstellung. Die genauen Messwerte der zytometrischen Untersuchung der 184 Präparate sind in Tabelle 8 (siehe Anhang) zusammengestellt.

4.3. Vergleich der zytologischen und histologischen Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf

Während des Beobachtungszeitraumes von mindestens drei Jahren hinsichtlich des Auftretens von Lokalrezidiven zeigten 20 der insgesamt 40 Patienten ein Lokalrezidiv. Die Tumorgröße (T-Status) von Patienten, die ein Lokalrezidiv bekamen, ist vergleichbar mit denen ohne Lokalrezidiv.

In Tabelle 9 wird die Tumorgröße der Rezidivpatienten denen der Nicht-Rezidivpatienten gegenübergestellt.

Tabelle 9: Tumorgröße bei Patienten mit und ohne Rezidiv.

Tumorgröße	Patienten mit Lokalrezidiv	Patienten ohne Lokalrezidiv
T1	6	8
T2	8	8
T3	1	0
T4	5	4

Wie aus der Tabelle 10 hervorgeht, treten die meisten Lokalrezidive in den ersten beiden Jahren nach der chirurgischen Therapie (Radikaloperation des Primärtumors) auf.

Tabelle 10: Postoperativer Beobachtungszeitraum bis zum Auftreten des lokoregionären Tumorrezidives.

Beobachtungszeitraum bis zum Rezidiv	Anzahl der Patienten	Prozent
< 1 Jahr nach Operation	9	45%
1-2 Jahre nach Operation	6	30%
2-3 Jahre nach Operation	2	10%
3-4 Jahre nach Operation	2	10%
4-5 Jahre nach Operation	1	5%

Die Zytometrie ergab bei 14 Rezidivpatienten eine DNA-Aneuploidie, wobei 6 Patienten eine Stammlinienaneuploidie aufweisen. Bei 8 Patienten wurde eine Einzellellaneuploidie nachgewiesen. 5c exceeding events repräsentieren somit das am häufigsten vertretene Kriterium für DNA-Aneuploidie. Lediglich bei 2 rezidiv-freien Patienten kam auch eine Einzellellaneuploidie zur Darstellung. Da die Einzellellaneuploidie zu 40 % bei Rezidivpatienten vertreten ist, dient sie als sensitiver Parameter für die Identifikation von Rezidiven. Die histologische Begutachtung der Schnellschnitte hinsichtlich der Tumorfreiheit stimmt in 90 Prozent der Fälle mit der Wertung der Paraffinschnitte überein. Nur in vier Fällen ergab die Wertung der zuvor im Schnellschnitt tumorfreien Resektatränder in der Paraffinschnittuntersuchung Tumorausläufer in den tieferen Schichten. In drei dieser Fälle kam es zu einem Lokalrezidiv, wobei bei einem Patienten auch eine DNA-Aneuploidie gemessen wurde. Eine Gegenüberstellung der klinischen Resultate (Rezidiv) mit denen der zytometrischen Messungen (DNA-Aneuploidie) gibt die Vierfelder-Tafel in Tabelle 11 wieder.

Tabelle 11: Vierfelder-Tafel für DNA-Aneuploidie und Non-Aneuploidie in Tumorschnittschnitten

	Patient mit Rezidiv	Patient ohne Rezidiv	Summe
Test positiv: DNA-Aneuploidie	14	2	16
Test negativ: Non-Aneuploidie	6	18	24
Summe	20	20	40

.....

Stellt man die zytometrischen Ergebnisse dem klinischem Verlauf gegenüber, so muss man schlussfolgern, dass mittels der adjuvanten DNA-Zytometrie 14 von insgesamt 20 Rezidivpatienten als R1 eingestuft worden wären.

4.4 Sensivität, Spezifität und Prädiktionswert der DNA-Zytometrie hinsichtlich des Auftretens von Lokalrezidiven

Die diagnostische Spezifität ist definiert als der Prozentsatz richtig erkannter Gesunder unter allen Gesunden, anders formuliert: Wie groß ist die Wahrscheinlichkeit, das Gesunde auch als solche erkannt werden? In dieser zytometrischen Untersuchung wurden 18 von den 20 rezidivfreien Patienten auch als solche erkannt.

Lediglich bei zwei rezidivfreien Patienten wurde eine Einzellaneuploidie gemessen. Die Spezifität der diagnostischen DNA-Zytometrie beträgt somit 90 Prozent.

Die diagnostische Sensivität gibt an, bei wie viel Prozent der Patienten mit der Erkrankung (Rezidiv des Primärtumors) die Untersuchung ein positives Resultat ergab. Anders ausgedrückt: Wie groß ist die Wahrscheinlichkeit, dass Kranke (Rezidivpatienten) auch als solche erkannt werden? In der vorliegenden Studie wurde bei 14 Patienten, die während der Beobachtungszeit ein Lokalrezidiv bekamen auch eine DNA-Aneuploidie nachgewiesen, so dass die Sensivität 70 Prozent betrug.

Der positive Prädiktionswert gibt die Wahrscheinlichkeit an, bei wieviel Prozent der Patienten mit positivem Testresultat die gesuchte Erkrankung (Lokalrezidiv) vorliegt. Der positive Prädiktionswert zum Nachweis von DNA-Aneuploidie an Resektatrand-schnitten betrug 87,5 Prozent. Dieser Wert berechnet sich aus dem Verhältnis von DNA-zytometrisch richtig tumorzellpositiv (DNA-Aneuploid) diagnostizierten Fällen (n =14) zu allen DNA-zytometrisch positiven Diagnosen (n =16).

Der negative Prädiktionswert ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der die DNA-Zytometrie das Fehlen von Tumorzellen richtig nachwies. Er berechnet sich aus dem Verhältnis von DNA-zytometrisch richtig tumorzellnegativ (DNA-Euploid) diagnostizierten Fällen (n=18) zu allen Fällen mit DNA-zytometrisch negativer Diagnose

(n=24). In dieser Studie erhielten wir für den Nachweis von DNA-Aneuploidie an Resektatrandschnitten einen negativen Prädiktionwert von 75 Prozent.

Ein Zusammenhang zwischen dem histologischen Typ des Primärtumors sowie der Tumorgroße und den verschiedenen Kriterien von DNA-Aneuploidie konnte nicht nachgewiesen werden.

5. Diskussion

Plattenepithelkarzinome sind mit 90 Prozent die häufigsten malignen Tumore im Kopf-Hals-Bereich. Die meisten Tumoren werden ohne weiteres durch lichtmikroskopische Malignitätskriterien diagnostiziert, jedoch versagen in einigen Fällen die üblichen lichtmikroskopischen Kriterien, so dass es trotz sogenannter R0-Resektion häufig zu Lokalrezidiven kommt (Abbey et al., 1995; Karabulut et al., 1995). Die Angaben in der Literatur zu Lokalrezidiven differieren, Werte zwischen 3,5 Prozent bis 60 Prozent werden gefunden (Ravasz et al., 1991). Daher stellt sich die Frage, inwieweit die zusätzliche Anwendung der DNA-Zytometrie bei der Beurteilung der Resektionsgrenzen die diagnostische und prognostische Aussagekraft verbessert. Die meisten gutartigen und bösartigen Tumoren weisen chromosomale Aberrationen auf, welche nicht in normalen oder reaktiv veränderten Zellen vorkommen und für die Tumordiagnose verwendet werden können (Atkin et al., 1990; Sandberg, 1990). Anstelle der Messung der Chromosomenzahl kann auch die DNA-Menge bestimmt werden. DNA-Aneuploidie ist das quantitative zytometrische Äquivalent chromosomaler Aneuploidie. DNA-Aneuploidie liegt dann vor, wenn der quantitative Effekt numerischer und / oder struktureller Chromosomenaberration zytometrisch messbar ist, d.h. bereits mehr als 10 Prozent des Chromosomenmaterials pro Zellkern hinzugekommen oder verlorengegangen ist. Mit wenigen Ausnahmen gilt der Nachweis der DNA-Aneuploidie in den meisten Geweben als Marker für Malignität (Böcking et al., 1994; Böcking, 1997). In Plattenepithelien ist DNA-Aneuploidie nur in malignen Zellen nachgewiesen worden (Sandritter et al., 1961; Hillemann, 1964; Wright et al., 1994). Duesberg und Kollegen (2005) postulierten kürzlich in ihrer Theorie der chromosomalen Karzinogenese, dass Krebs durch chromosomale Aneuploidie entsteht, welche entweder durch spontane mitotische Fehler oder durch Karzinogene hervorgerufen werden. Da es im Sinne einer Kettenreaktion mit jeder neuen Zellteilung im Rahmen der Tumorprogression nach Darwinschen Gesetzen zu immer neuen und stärkeren Chromosomenaberrationen kommt, entstehen auch neuartige Krebszellen mit höherem Malignitätspotential. Die Autoren beschreiben, dass die Entstehung einer neuen Zell-Spezies ein seltenes Ereignis ist und daher die Karzinogenese zeitaufwändig ist.

Durch die Assoziation von Aneuploidie mit nachfolgend auftretendem Krebs verdeutlicht die Theorie einen Schwachpunkt der histologischen Krebsdiagnostik, da prä-neoplastische Aneuploidie zur frühen Krebsdiagnostik eingesetzt werden könne.

Präneoplastische Aneuploidie kann somit mittels DNA- Zytometrie diagnostiziert werden (Duesberg et al., 2000; Fabarius et al., 2002). Dies würde bedeuten, dass prämaligne Aneuploidie die Vorstufe der Tumor-spezifischen Aneuploidie ist.

Die Bedeutung der DNA-Zytometrie zur Diagnostik dieser prämaligen Zellen wurde durch verschiedene Studien untersucht:

Abdel-Salam et al. (1988) waren imstande mit 87,5 prozentiger Wahrscheinlichkeit unter 16 Dysplasien der Mundschleimhaut diejenigen acht zu identifizieren, welche in einem 10-15 jährigen Beobachtungszeit zu Krebs entarteten.

In einer prospektiv angelegten Studie erzielten Remmerbach et al. (2001) bei der Abklärung von oralen Leukoplakien und Erythroplakien an 181 Patienten mit Hilfe der Bürstenbiopsie eine Sensivität von 94,6 %, eine Spezifität von 99,5 %, einen positiven prädiktiven Wert von 98,1% und einen negativen Vorhersagewert von 98,5 %.

Wurde bei zweifelhaften zytologischen Diagnosen zusätzlich die DNA-Bildzytometrie durchgeführt, so erhielten sie eine Sensivität von 98,2 %, eine Spezifität von 100 %, einen positiven Prädiktionswert von 100 % und einen negativen Vorhersagewert von 99,5 %. Die Autoren kommen zu dem Fazit, dass die zusätzliche Anwendung der DNA-Bildzytometrie mit DNA-Aneuploidie als Marker für neoplastische Transformationen in Mundschleimhautabstrichen die zytologische Diagnose sichert.

Eine aktuellere Untersuchung von Remmerbach und Kollegen aus dem Jahre 2004 bestätigt die Ergebnisse hinsichtlich der Treffsicherheit. In dieser Studie wurden prospektiv 1328 Mundschleimhautabstriche von 205 Patienten mit insgesamt 92 histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen und 240 benignen Mundschleimhautläsionen zytologisch begutachtet und anschließend mit Hilfe der DNA-Bildzytometrie geprüft. Die zytologische Begutachtung der Präparate erzielte eine Sensivität von 91,3 % und eine Spezifität von 95,1 %. Die nachfolgende DNA-Messung aller Präparate führte zu einer Sensivität von 95,5 % und einer Spezifität von 100 %. Somit konnte durch die kombinierte Auswertung der Zytologie und DNA-Bildytometrie eine Steigerung der diagnostischen Treffsicherheit erreicht werden: die Sensivität lag bei 97,8 % und die Spezifität bei 100 Prozent.

Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten Maraki et al. in ihrer 2004 publizierte Studie. Sie ermittelten in ihrer prospektiv angelegten Studie an 98 Mundschleimhautabstrichen durch Bürstenbiopsie einschließlich DNA-Zytometrie eine Sensivität von 100 % und eine Spezifität von 97,4 %. Mit Hilfe der adjunktiven zytometrischen Untersu-

.....
chung konnten sie maligne Transformationen bis zu ein Jahr vor der histologischen Diagnose vorhersagen.

Remmerbach et al. (2003) konnten sogar mit Hilfe der Bürstenbiopsie und adjuvanter zytomertischer Untersuchung an vier Fällen mit oralen Präkanzerosen bereits bis zu 15 Monaten vorher nachweisen, dass diese in Plattenepithelkarzinome übergingen. Während die zytologische Untersuchung Tumorzellen in drei von vier Fällen sicherte, wurde DNA-Aneuploidie als Marker für Neoplasie in allen vier Fällen gemessen. In allen vier Fällen ergab die endgültige histologische Diagnose im Follow-up ein Plattenepithelkarzinom.

Auch in der gynäkologischen Diagnostik hat sich die DNA-Aneuploidie als sicherer Marker für Neoplasie und zur Dignitätsabklärung bewährt (Wright et al., 1994).

Mit Hilfe der diagnostischen DNA-Bildzytometrie kann an konventionellen zytologischen Abstrichen das Progressionsrisiko von mittleren und geringeren Dysplasien der Plattenepithelien zu einem Zervixkarzinom sicher beurteilt werden (Böcking und Motherby 1999).

Bereits 1982 konnten Fu et al. (1982) nachweisen, dass alle untersuchten zervikalen Dysplasien, welche sich im Follow-up in ein invasives Plattenepithelkarzinom weiterentwickelten, DNA-Aneuploid waren.

Böcking et al. (1986) stellten fest, dass von 37 DNA-Aneuploiden Gebärmutterhalsabstrichen der zytologischen Gruppe III D im histologischen Follow-up 30 ein Carcinoma in situ aufweisen. Dies entspricht einem positiven Prädiktionwert der DNA-Zytometrie von 81 Prozent für die richtige Vorhersage eines Plattenepithelkarzinoms. Der negative Prädiktionwert für die Vorhersage reaktiver Veränderungen lag bei 86 Prozent.

Durch eine Untersuchung an 90 dysplastischen Gebärmutterhalsabstrichen von 18 Patienten konnte Chatelain et al. (1989) nachweisen, dass alle Fälle mit nachgewiesener Epithelaneuploidie 26 Monate später im Follow-up ein Plattenepithelkarzinom aufweisen. Somit ergab die Untersuchung einen positiven Prädiktionwert von 100 Prozent und einen negativen Prädiktionwert von 83 Prozent.

Kashyap et al. (1990) berechneten an 42 Patienten mit geringer und mittlerer Dysplasie der Cervix uteri einen positiven Prädiktionwert der DNA-Aneuploidie an Abstrichpräparaten für die Vorhersage eines Plattenepithelkarzinoms im Follow-up von

93 Prozent, der negative Prädiktionswert von DNA-Euploidie für morphologisch nachgewiesene Regression betrug 67 Prozent.

Bollman und Böcking (1996) konnten bei 497 Patientinnen mit Gebärmutterhalsabstrichen der zytologischen Gruppe Pap III D einen positiven Prädiktionswert der DNA-Aneuploidie von 95 Prozent und einen negativen Prädiktionswert der DNA-Euploidie von 98 Prozent ermitteln.

Nennig et al. (1997) erhielten bei 193 Patientinnen mit Gebärmutterhalsabstrichen der Gruppe III D einen positiven Prädiktionswert von 87 Prozent und der negative Prädiktionswert betrug 89 Prozent.

Auch für andere Organe wurde der Nutzen der DNA-Aneuploidie als Marker für Malignität mit Hilfe der statischen Bildzytometrie überprüft (Böcking et al., 1984 und 1985; Cohen, 1996; Nordemar et al., 2004; Osterheld et al., 2005). Die Arbeitsgruppe um Bahram et al. (1999) untersuchten Abstriche der Konjunktiva und Kornea mit klinischem Verdacht auf Carcinoma in situ, malignes Melanom oder Rezidivtumor. Sie erhielten folgende Vorhersagewerte: der positive Prädiktionswert für den Nachweis von Tumorzellen bei Verwendung der DNA-Bildzytometrie war 100 Prozent, der negative Vorhersagewert für reaktive (nonaneuploide) Veränderungen betrug 70,9 Prozent.

Weitere Einsatzbereiche für die DNA-Bildzytometrie entstanden bei der Untersuchung von Larynx-, Bronchial- und Prostatakarcinomen. Böcking et al. (1985) konnten bei einer zytometrischen Untersuchung von 15 Kehlkopfschleimhautdysplasien an vier Dysplasien eine DNA-Aneuploidie messen. Bei diesen vier aneuploiden Läsionen wurde in Follow-up innerhalb von zwei Jahren ein Larynxkarzinom diagnostiziert. Somit erhielten diese Autoren einen positiven Prädiktionswert von 100 Prozent für die Vorhersage eines Karzinoms.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Munck-Wikland et al. (1990) und Bjelenkrantz et al. (1983). Sie folgerten, dass abnorme Plattenepithelien, deren Dignität nicht sicher beurteilt werden kann, sich zur DNA-zytometrischen Abklärung eignen.

Eine Studie von Auffermann und Böcking (1995) untersucht dysplastische Bronchialschleimhaut mittels DNA-Zytometrie. Die Autoren berichten über einen positiven Prädiktionswert von DNA-Aneuploidie in dysplastischen Epithelien aus Sputen für die Vorhersage eines Bronchialkarzinoms von 89,5 Prozent. Die Sensivität lag bei 91,7

Prozent für den Nachweis von Bronchialkarzinomen und die Spezifität für die negativen Fälle bei 100 Prozent.

Tribukait (1993) konnte in seiner Studie eine hohe prognostische Validität (Vorhersagekraft) des DNA-Malignitätsgradings für das Prostatakarzinom nachweisen. Er stellte für 287 unbehandelte Prostatakarzinome statistisch hochsignifikante Unterschiede hinsichtlich der Überlebenszeit von Patienten mit diploider und aneuploider DNA-Verteilung ihres Tumors fest. Die Zehnjahres-Überlebensrate betrug für 150 Patienten mit diploiden Tumoren über 80 Prozent, d.h. Patienten mit diploiden Prostatakarzinom lebten genauso lange wie Männer ohne dieses Karzinom. Patienten mit tetraploiden Tumoren hatten eine geringere Zehnjahres-Überlebensrate von 70 Prozent. Eine hochsignifikante Korrelation der DNA-Verteilung im Tumor mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten fanden auch andere Autoren (al-Abadi und Nagel, 1994; Ahlgren et al., 1997).

In unserer Studie erhielten wir durch zytometrische DNA-Messungen von Gewebe aus Resektionsgrenzen bei intraoralen Plattenepithelkarzinomen eine Sensivität von 70 % und eine Spezifität von 90 % für die diagnostische DNA-Zytometrie. Der negative Prädiktionswert, mit der die DNA-Zytometrie das Fehlen von Tumorzellen in den Absetzungsrandern von rezidivfreien Patienten richtig nachwies, lag bei 75 %. Lediglich in zwei Fällen erhielten wir ein falsch-positives Ergebnis. Der von uns ermittelte positive Prädiktionswert lag bei 87,5 %. Die differierenden Angaben in der Literatur hinsichtlich der diagnostischen Treffsicherheit sind wahrscheinlich zurückzuführen auf die unterschiedlich hohe Fallzahl und die verschieden angewandten Parameter für DNA-Aneuploidie. Die meisten Untersucher nutzen sowohl die Stammlinie als auch 9c exceeding events zur diagnostischen Interpretation als Kriterium für DNA-Aneuploidie. Da in reaktiv proliferierenden benignen Plattenepithelien keine Zellkerne jenseits von 5c vorkommen und fast alle Plattenepithelkarzinome Zellen mit einem DNA-Gehalt über 5 c aufweisen (Böcking et al., 1989), verwenden wir neben den beiden genannten Markern auch das Auftreten von 5 c exceeding events in den Randschnitten als weiteren Parameter zur Identifikation von DNA-Aneuploidie. Unserer Meinung nach ist das ein akzeptables Kriterium für DNA-Aneuploidie, da orale Plattenepithelien keine euploiden Polyploidiesierungen durchlaufen. Der direkte Vergleich mit dem klinischen Verlauf verdeutlicht unter zusätzlicher Berücksichtigung der Zellen mit einem DNA-Gehalt über 5 c, dass die Erkennungsrate von Rezidiven deut-

lich steigt. Da 5cEE in 40 % der Fälle mit dem Auftreten von Rezidiven korreliert, nehmen wir an, dass 5cEE ein sensitiver und spezifischer Marker für Malignität darstellt. Ein direkter Vergleich der Sensivität, Spezifität und Prädiktionswerten unserer Untersuchung mit den Angaben aus den erwähnten Studien ist jedoch nicht zulässig, da es sich einerseits um unterschiedliche Fragestellungen handelt und andererseits ist die Auswahl der Ausgangspräparate nicht identisch. Während die meisten angeführten Studien DNA-bildzytometrische Untersuchungen an Abstrichen der Mundschleimhaut oder der Zervix uteri durchführen, bedienen wir uns an Paraffinblöcken der Resektionsgrenzen. Es fällt jedoch auf, dass in allen bildzytometrischen Untersuchungen die Autoren zu dem gleichen Schluss kommen, dass die DNA-Zytometrie als adjuvantes zytologisches Verfahren zu einer erhöhten Sensivität und Spezifität führt. Auch die Ergebnisse unserer Arbeit bestätigen dies. Mit Hilfe der DNA-Zytometrie konnten wir 14 von 20 Patienten, bei denen im Beobachtungszeitraum histologisch ein Lokalrezidiv des Plattenepithelkarzinoms nachgewiesen wurde, identifizieren. Dies würde bedeuten, dass diese Patienten mit Hilfe der DNA-Zytometrie als R1 eingestuft worden wären. Diese R1-Patienten wären dann einer entsprechenden Therapie z. B. Nachresektion oder Radiatio zugeführt worden. Dies hat letztendlich auch eine bessere Prognose für diese Patienten zur Folge. Noch ist jedoch unklar, ob diese aneuploiden Zellen Lokalrezidive verursachen. Eine nachfolgende klinische Untersuchung mit größeren Fallzahlen könnte darüber Ausschluss geben, ob die zusätzliche oder geänderte Therapie von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen zu einer verlängerten rezidivfreien Zeit geführt hätte. Anbetracht unserer Daten können wir zusammenfassend schlussfolgern, dass in Kombination mit der konventionellen Histologie die DNA-Zytometrie das postoperative Staging und somit die Prognose dieser Patienten verbessern kann. Allerdings schließt DNA-Euploidie die Existenz von Malignität in Randschnitten nicht vollständig aus.

6. Zusammenfassung

Bei der Behandlung von oralen Plattenepithelkarzinomen steht nach wie vor die sichere Resektion des Tumors „im Gesunden“ im Vordergrund. Leider kommt es in vielen Fällen trotz sogenannter R0-Resektion häufig zu Lokalrezidiven, so dass die Fünfjahres-Überlebensrate von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen nur bei ca. 50 Prozent liegt und somit unbefriedigend ist.

Ziel unserer Studie war es zu überprüfen, ob die zusätzliche Verwendung der DNA-Bildzytometrie bei der Beurteilung der Resektionsgrenzen einen höheren prädiktiven Wert hinsichtlich des Auftretens von Lokalrezidiven hat als die Histologie alleine.

Bei 40 Patienten mit histologisch verifizierten R0-Resektionen, die jeweils über drei Jahre nachbeobachtet worden waren, wurde der DNA-Gehalt von Zellkernen nach Feulgen-Färbung mittels DNA-Zytometrie untersucht. DNA-Aneuploidie wurde angenommen, wenn atypische DNA-Stammlinien mit einem DNA-Gehalt kleiner 1,80 c größer 2,20 c bzw. kleiner 3,60 c oder größer 4,40 c identifiziert wurden und / oder Zellen mit einem DNA-Gehalt größer 5c (Einzellzellaneuploidie) gemessen wurden. Die Zytometrie erfolgte „verblindet“: Die histologischen und zytometrischen Ergebnisse wurden mit der klinischen Entwicklung (Lokalrezidiv) verglichen. Von den 40 in sano operierten Patienten hatten 20 Patienten trotz R0-Resektion innerhalb von drei bis fünf Jahren ein Lokalrezidiv. Bei 14 Rezidivpatienten wurde in den Randschnitten eine DNA-Aneuploidie (8 Einzellzellaneuploidie, 6 Stammlinienaneuploidie) gemessen. Auch bei 2 rezidivfreien Patienten ergab die zytometrische Messung eine Einzellzellaneuploidie (5cEE).

Der positive Prädiktionswert als Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der die DNA-Zytometrie das Vorliegen von Tumorzellen in den Randschnitten korrekt nachwies, lag bei 87,5 Prozent und der negative Prädiktionswert betrug 75 Prozent. Wir ermittelten eine Spezifität von 90 Prozent und eine Sensitivität von 70 Prozent.

Somit stellt die DNA-Bildzytometrie eine sensitive und hoch spezifische zusätzliche Methode zur Identifikation von Tumorzellen in den Resektionsrädern dar. Durch den Einsatz der adjuvanten DNA-Bildzytometrie kann die Beurteilung der Tumorsektionsgrenzen und so auch das postoperative Staging verbessert werden.

Tabellarischer Anhang

Tabelle 7:

Lfd. Nr.	Histolog. Diagnose des Hauptbefundes/ Lokalisation	Anzahl der Schnittträger/ E-Nummer	Zytologische Diagnose (DNA-Aneuploidie)	erste STL [c]	weitere STL [c]	5cEE	Histolog. Diagnose der Randschnitte	Rezidiv
1	mäßig differenziertes verhornendes Plattenepithelkarzinom des anterioren Mundbodens rechts	<ul style="list-style-type: none"> ■ 22309 Ia-04 ■ 22309 Ib-04 ■ 22309 IIa-04 ■ 22309 IIb-04 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → nein → nein 	<ul style="list-style-type: none"> 2.09 1.96 1.91 1.92 			SS und PS: alle Mundschleimhautexzisate tumorfrei	Ja Aug. 05
2	gering differenziertes leicht verhornendes Plattenepithelkarzinom des lateralen Zungenrandes rechts	<ul style="list-style-type: none"> ■ 26598 V-93 ■ 26598 VI-93 ■ 26598 VII-93 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → nein 	<ul style="list-style-type: none"> 2.15 2.01 2.10 			SS: tumorfreie Randschnitte 26598V, 26598VII: leichte Epitheldysplasie, 26598 VI: mittelgradige Epitheldysplasie	Ja Dez.95
3	mittelgradig differenziertes verhornendes Plattenepithelkarzinom im Bereich Zungengrund und Mundboden rechts	<ul style="list-style-type: none"> ■ 33318 Ia-94 ■ 33318 Ib-94 ■ 33318 Ic-94 ■ 33318 Id-94 ■ 33318 If-94 ■ 33311 I-94 ■ 33311 II-94 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → nein → nein → nein → Einzelzellaneuploidie → STL-Aneuploidie 	<ul style="list-style-type: none"> 2.09 1.98 2.07 1.87 1.86 2.31 2.87 		2 2	SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Ja März 04

<p>4 mäßig differenziertes nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom des UK-Alveolarfortsatzes mit Zungeninfiltration</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 10320 III-95 ■ 10320 IV-95 ■ 10320 V-95 ■ 10320 VII-95 	<p>→ nein → Einzelzell-aneuploidie → STL- Aneuploidie → nein</p>	<p>2.08 2.01 2.58 1.95</p>	<p>1</p>	<p>SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei mit geringer Epitheldysplasie</p>	<p>Ja Feb.98</p>
<p>5 gering differenziertes nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom des Zungenrandes und des Mundbodens links</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 15647 VII a1-94 ■ 15647 VII b2-94 ■ 15647 VII b3-94 ■ 15647 VII d-94 ■ 15629 II-94 ■ 15629 III-94 ■ 15629 IV-94 ■ 15629 V-94 ■ 15629 VI-94 	<p>→ nein → nein → nein → nein → nein → nein → nein → Einzelzell-aneuploidie → nein</p>	<p>1.90 1.87 1.86 1.81 1.86 1.99 1.96 1.92 1.88</p>	<p>1</p>	<p>SS: alle Randschnitte tumorfrei PS: 15647-94 enthält Tumorfiltrate in tieferen Schichten</p>	<p>Ja Jan. 95</p>
<p>6 mittelgradig differenziertes verhornendes Alveolarfortsatzkarzinom mit Einbruch in die Nase</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 19506 XIV-94 ■ 19506 X-94 ■ 19506 XV-94 	<p>→ nein → nein → nein</p>	<p>1.84 1.93 1.99</p>		<p>SS: alle Randschnitte tumorfrei PS: 19506 X – 94 enthält Tumorfiltrate in tieferen Schichten</p>	<p>Ja Jan. 95</p>
<p>7 gering differenziertes Plattenepithelkarzinom des linken Planum buccale</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 5780 a1-93 ■ 5780 a9-93 ■ 5780 a10-93 ■ 5780 a11-93 ■ 5780 a12-93 	<p>→ nein → STL- Aneuploidie → nein → nein → Einzelzell-aneuploidie</p>	<p>1.88 1.70 1.91 2.00 2.05</p>	<p>1</p>	<p>SS und PS: alle Absetzungsränder tumorfrei</p>	<p>Ja Jan.94</p>

8	mäßig differenziertes verhornendes Alveolarfortsatzkarzinom links	<ul style="list-style-type: none"> ■ 600 I-93 ■ 600 II-93 ■ 600 III-93 ■ 600 IV-93 ■ 600 V-93 ■ 600 VI-93 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → nein → nein → nein → Einzelzell-aneuploidie 	<p>1.97 2.03 1.94 1.84 1.79 1.90</p>	1		SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Ja Mai 93
9	mäßig differenziertes verhornendes Plattenepithelkarzinom im Bereich des vorderen Mundbodens links	<ul style="list-style-type: none"> ■ 26961 a-94 ■ 26961 d-94 ■ 27024 VII-94 ■ 27024 XIII-94 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → nein → Einzelzell-aneuploidie 	<p>1.99 2.10 1.87 2.10</p>	1		SS und PS: alle Absetzungsränder tumorfrei	Ja März 98
10	mittelgradig differenziertes verhornendes Plattenepithelkarzinom des vorderen Mundbodens links	<ul style="list-style-type: none"> ■ 11075 I-02 ■ 11075 II-02 ■ 11075 III-02 ■ 11075 VI-02 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → STL-aneuploidie → nein → nein 	<p>1.97 2.02 1.87 1.90</p>	3.4 1		SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Ja Apr. 05
11	mäßig differenziertes verhornendes Plattenepithelkarzinom des Sulcus glossolabialis links	<ul style="list-style-type: none"> ■ 20696 II-94 ■ 20696 III-94 ■ 20696 IV-94 ■ 20696 V-94 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → nein → nein 	<p>2.20 2.19 2.17 2.18</p>			SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Ja Feb. 96
12	mäßig differenziertes verhornendes Plattenepithelkarzinom submandibulär rechts (Mundboden)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 17636 Ia-02 ■ 17636 Ib-02 ■ 17636 II-02 ■ 17636 III-02 ■ 17673 IV-02 ■ 17673 V-02 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → nein → Einzelzell-aneuploidie → nein → nein 	<p>1.94 2.04 1.91 1.96 1.98 1.88</p>	2		SS alle Randschnitte tumorfrei 17636I:Plattenepitheldysplasie geringen Grades	Ja 2004

13	mittelgradig differenziertes verhornendes Plattenepi- thelkarzinom Zungengrund und Zungenrand rechts /Mundboden	<ul style="list-style-type: none"> ■ 22094 II-03 ■ 22094 III-03 ■ 22094 IV-03 ■ 22094 V-03 	<ul style="list-style-type: none"> →nein →nein →Einzelzell- aneuploidie →nein 	<p>2.00</p> <p>2.13</p> <p>2.16</p> <p>1.90</p>		2		SS: alle Randschnitte tumorfrei	Ja Jan. 04
14	mittelgradig differenziertes verhornendes Plattenepi- thelkarzinom der Zungen und des Mundbo- dens	<ul style="list-style-type: none"> ■ 3446 Ia-02 ■ 3446 Ib-02 ■ 3446 Ic-02 ■ 3446 Id-02 ■ 3446 Ie-02 ■ 3446 If-02 ■ 3446 Ih-02 ■ 3446 Ii-02 ■ 3446 Ij-02 	<ul style="list-style-type: none"> →nein →STL- Aneuploidie →nein →Einzelzell- aneuploidie →Einzelzell- aneuploidie →nein →Einzelzell- aneuploidie →nein →nein 	<p>1.82</p> <p>2.19</p> <p>1.99</p> <p>1.87</p> <p>1.87</p> <p>2.02</p> <p>2.12</p> <p>1.87</p> <p>2.15</p>	<p>3.7 /</p> <p>4.6</p>	4	1	SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Ja Jan. 04
15	wenig differenziertes ver- hornendes Plattenepithel- karzinom im Bereich des dorsalen Zungenrandes links	<ul style="list-style-type: none"> ■ 28596 I-94 ■ 28596 II-94 ■ 28596 III-94 ■ 28596 IV-94 ■ 28596 V-94 	<ul style="list-style-type: none"> →nein →nein →nein →nein →nein 	<p>2.07</p> <p>2.07</p> <p>2.12</p> <p>2.19</p> <p>2.12</p>				SS: alle Randschnitte tumorfrei PS: 28596 IV-94 enthält Tumor- ausläufer in tieferen Schichten	Ja Mai 95
16	mittelgradig differenziertes verhornendes schwach Plat- tenepithelkarzinom des vor- deren Mundbodens mit Infil- trationen in den Unterkiefer	<ul style="list-style-type: none"> ■ 10036 III-92 ■ 10036 IV-92 ■ 10036 VI-92 ■ 10036 VII-92 ■ 10036 IX-92 	<ul style="list-style-type: none"> →nein →nein →nein →Einzelzell- aneuploidie →STL- Aneuploidie 	<p>1.18</p> <p>2.12</p> <p>2.02</p> <p>2.09</p> <p>2.00</p>	<p>3.24</p> <p>4</p>	2	4	SS und PS: alle Absetzungsränder tumor- frei	Ja Mai 97

17	mittelgradig differenziertes gering verhornendes Plattenepithelkarzinom des Oberkiefers links	<ul style="list-style-type: none"> ■ 26570 Ia-02 ■ 26570 Ib-02 ■ 26570 III-02 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → Einzelzell-aneuploidie 	<p>2.08</p> <p>2.02</p> <p>1.07</p>		2	SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Ja Nov. 03
18	mittelgradig differenziertes partiell verhornendes Plattenepithelkarzinom. des Unterkiefers links	<ul style="list-style-type: none"> ■ 32601 II-03 ■ 32601 IV-03 ■ 32601 V-03 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → nein 	<p>2.02</p> <p>1.09</p> <p>1.94</p>			SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Ja Nov. 03
19	mittelgradig differenziertes nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom des Unterkiefers rechts	<ul style="list-style-type: none"> ■ 7347 a1-02 ■ 7347 a2-02 ■ 7347 a3-02 ■ 7347 a4-02 ■ 7231 II-02 ■ 7231 IV-02 ■ 7231 V-02 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → Einzelzell-aneuploidie → nein → nein → nein → nein → nein 	<p>1.92</p> <p>1.94</p> <p>2.13</p> <p>1.97</p> <p>1.98</p> <p>1.84</p> <p>1.91</p>		3	SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Ja Okt. 04
20	mäßig differenziertes gering verhornendes Plattenepithelkarzinom der linken Zunge	<ul style="list-style-type: none"> ■ 24089 a-92 ■ 24089 b-92 ■ 24089 c-92 ■ 24089 d-92 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → Einzelzell-aneuploidie → nein 	<p>2.19</p> <p>2.15</p> <p>2.00</p> <p>2.02</p>		1	SS und PS: alle Absetzungsränder tumorfrei	Ja Sept. 93
21	mäßig differenziertes schwach verhornendes Plattenepithelkarzinom linker Zungenkörper	<ul style="list-style-type: none"> ■ 1002 VII-93 ■ 1002 VIII-93 ■ 1002 IX-93 ■ 1002 X-93 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → nein → nein 	<p>1.87</p> <p>2.08</p> <p>1.88</p> <p>1.91</p>			SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Nein

22	gut differenziertes verhornendes Plattenepithelkarzinom der rechten Unterlippe	<ul style="list-style-type: none"> ■ 14880 a-92 ■ 14880 b-92 ■ 14934 Ia-92 ■ 14934 II-92 ■ 14934 III-92 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → nein → nein → nein 	<p>2.11</p> <p>2.07</p> <p>1.81</p> <p>2.13</p> <p>2.10</p>			<p>SS: alle Absetzungsränder tumorfrei</p> <p>PS: 14934 Ia-92 enthält <u>Karzinom</u>-<u>ausläufer</u> in tieferen Schichten</p>	Nein
23	weit fortgeschrittenes mäßig differenziertes verhornendes Plattenepithelkarzinom der linken Kieferhöhle/Gaumen	<ul style="list-style-type: none"> ■ 23755 VI-92 ■ 23755 VII-92 ■ 23755 VIII-92 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → nein 	<p>1.92</p> <p>2.16</p> <p>1.96</p>			<p>SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei</p>	Nein
24	gut differenziertes verhornendes Plattenepithelkarzinom der Unterlippe rechts	<ul style="list-style-type: none"> ■ 27999 a-92 ■ 27999 b-92 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein 	<p>1.98</p> <p>2.00</p>			<p>SS und PS: alle Absetzungsränder tumorfrei</p>	Nein
25	gering differenziertes gering verhornendes Plattenepithelkarzinom des rechten Zungenrandes	<ul style="list-style-type: none"> ■ 23670 I-92 ■ 23670 II-92 ■ 23670 III-92 ■ 23670 IV-92 ■ 23670 V-92 ■ 23670 VI-92 ■ 23670 VII-92 ■ 23670 IX-92 ■ 23670 X-92 ■ 23670 XI-92 ■ 23670 XII-92 ■ 23670 XIV-92 ■ 23670 XV-92 	<ul style="list-style-type: none"> → Einzelzellaneuploidie → nein 	<p>1.89</p> <p>1.86</p> <p>2.03</p> <p>1.96</p> <p>1.99</p> <p>1.95</p> <p>2.04</p> <p>1.85</p> <p>2.08</p> <p>1.96</p> <p>1.98</p> <p>2.01</p> <p>1.81</p>	1		<p>SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei</p>	Nein
26	ulceriertes gering differenziertes schwach verhornendes Plattenepithelkarzinom im Bereich der Plica pterygomandibulare rechts	<ul style="list-style-type: none"> ■ 9837 II-92 ■ 9837 III-92 ■ 9837 IV-92 ■ 9837 V-92 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → nein → nein 	<p>2.00</p> <p>1.90</p> <p>2.06</p> <p>1.94</p>			<p>SS und PS: alle Absetzungsränder tumorfrei</p>	Nein

27	mittelgradig differenziertes verhornendes Plattenepi- thelkarzinom des vorderen Mundbodens links	■ 11471 II-91 ■ 11471 IV-91	→nein →nein	2.08 2.05			SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei 11471 IV-91:geringgradige Plattenepitheldysplasie	Nein
28	mäßig differenziertes ver- hornendes Plattenepithel- karzinom im Bereich des rechten Alveolarkammes	■ 8034 III-92 ■ 8034 IV-92	→nein →nein	2.09 2.19			SS: alle Randschnitte tumorfrei 8034 III-92: Plattenepithel- dysplaie leichten Grades	Nein
29	mäßig differenziertes unver- hornetes Plattenepithelkarzi- nom des vorderen Mundbo- dens	■ 8043 V-94 ■ 8043 VI-94 ■ 8043 IX-94	→nein →nein →nein	2.01 2.09 2.11			SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Nein
30	mäßig differenziertes ver- hornendes Plattenepithel- karzinom linker Zungenrand, linker Zungengrund	■ 18050 III-91 ■ 18050 IV-91	→nein →nein	2.09 2.13			SS und PS: alle Absetzungsråder tumor- frei	Nein
31	gering bis mäßig differen- ziertes nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom im Bereich des linken Mundbo- dens auf die Zunge übergrei- fend	■ 17963 II-93 ■ 17963 II a1-93 ■ 17963 II a2-93 ■ 17963 II a3-93 ■ 17316 e-93	→nein →nein →nein →nein →nein	2.07 1.88 2.12 1.87 1.97			SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Nein
32	mittelgradig differenziertes nicht verhornendes Platten- epithelkarzinom der lin- kenUnterlippe	■ 12935 b-94 ■ 12935 c-94 ■ 12994 II-94 ■ 12994 III-94	→nein →nein →nein →nein	2.03 1.86 1.83 1.87			SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei 12994 II-94:im SS leichte Plat- tenepitheldysplasie (in tieferen PS nicht mehr nachweisbar)	Nein

33	hoch differenziertes gering verhornendes Plattenepi- thelkarzinom des vorderen linken Mundbodens	<ul style="list-style-type: none"> ■ 16799 a-93 ■ 16799 b-93 ■ 16799 c-93 ■ 16799 d-93 ■ 16799 e-93 ■ 16678 III-93 ■ 16678 IV-93 	<ul style="list-style-type: none"> →nein →nein →nein →nein →nein →nein →nein 	<p>1.88</p> <p>1.94</p> <p>1.74</p> <p>1.86</p> <p>1.85</p> <p>1.97</p> <p>1.87</p>			SS und PS: alle Absetzungsränder tumor- frei	Nein
34	mäßig differenziertes ver- hornendes Plattenepithel- karzinom. der Zunge und des linken Mundbodens	<ul style="list-style-type: none"> ■ 11204 I-96 ■ 11204 II-96 ■ 11204 III-96 ■ 11204 V-94 	<ul style="list-style-type: none"> →nein →nein →nein →nein 	<p>1.87</p> <p>1.99</p> <p>1.96</p> <p>1.98</p>			SS und PS: alle Absetzungsränder tumor- frei	Nein
35	Gering differenziertes ana- plastisch es Plattenepithel- karzinom der linken Tuber maxillae	<ul style="list-style-type: none"> ■ 6401 III-96 ■ 6401 V-96 ■ 6401 VI-96 ■ 6401 VII-96 ■ 6401 VIII-96 	<ul style="list-style-type: none"> →nein →nein →nein →nein →nein 	<p>1.93</p> <p>1.96</p> <p>2.02</p> <p>1.96</p> <p>2.05</p>			SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Nein
36	mittelgradig differenziertes verhornendes Plattenepi- thelkarzinom des Unterkieferalveolarfortsatzes	<ul style="list-style-type: none"> ■ 2142 III-96 ■ 2142 IV-96 ■ 2142 VI-96 ■ 2142 VII-96 ■ 2142 VIII-96 ■ 2142 IX-96 	<ul style="list-style-type: none"> →nein →nein →nein →nein →nein 	<p>2.09</p> <p>2.17</p> <p>1.99</p> <p>2.05</p> <p>2.13</p> <p>2.06</p>			SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Nein
37	mittelgradig differenziertes verhornendes Plattenepi- thelkarzinom des vorderen und seitlichen Mundbodens rechts	<ul style="list-style-type: none"> ■ 8660 II-96 ■ 8660 III-96 ■ 8660 IV-96 ■ 8660 VII-96 	<ul style="list-style-type: none"> →nein →nein →nein →nein 	<p>1.95</p> <p>1.94</p> <p>2.02</p> <p>2.05</p>			SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Nein

38	gering differenziertes un- hornites Plattenepithelkarzi- nom des linken Zungenran- des und des Velums rechts	<ul style="list-style-type: none"> ■ 30762 IV-93 ■ 30762 V-93 ■ 30762 VI-93 ■ 30762 IX-93 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein → nein → nein 	<ul style="list-style-type: none"> 1.95 1.95 1.98 1.94 				SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Nein
39	entdifferenziertes Plattenepi- thelkarzinom der Unterlippe rechts	<ul style="list-style-type: none"> ■ 11955 II-96 ■ 11955 III-96 	<ul style="list-style-type: none"> → nein → nein 	<ul style="list-style-type: none"> 2.10 2.05 				SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Nein
40	wenig differenziertes verhor- nendes Plattenepithelkarzi- nom des Zungenrandes links	<ul style="list-style-type: none"> ■ 3005 XIIIa-96 ■ 3005 XIIId-96 ■ 2987 VII-96 ■ 2987 VIII-96 ■ 2987 IX-06 	<ul style="list-style-type: none"> → Einzelzell- aneuploidie → nein → nein → nein → nein 	<ul style="list-style-type: none"> 1.97 1.88 1.85 1.81 1.87 	1			SS und PS: alle Randschnitte tumorfrei	Nein

Legende:

SS = Schnellschnitt

PS = Paraffinschnitt

STL = Modalwert der DNA-Stammlinie

5cEE = Anzahl der Zellkerne mit einem DNA-Gehalt größer 5 c

7. Literatur

Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC et al.

Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelia dysplasia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995; 80: 188 - 91.

Abdel-Salam M, Mayall B, Chew K, Silvermann S, Greenspan JS.

Prediction of malignant transformation in oral epithelial lesions by image cytometry. Cancer 1988; 62: 1981 - 1987.

Ahlgren G, Lindholm K, Falkmer U, Abrahamsson PA.

A DNA cytometric proliferation index improves the value of the DNA ploidy pattern as a prognosticating tool in patients with carcinoma of the prostate. Urology. 1997; 50(3): 379-84.

Al-Abadi H, Nagel R.

Deoxyribonucleic acid content and survival rates of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol. 1994; 151(1): 37-42.

Atkin NB, Baker MC.

Are human cancers ever diploid.- or often trisomic? Conflicting evidence from direct preparations and cultures. Cytogenet Cell Genet 1990; 53: 58 - 60.

Auffermann W, Böcking A.

Early detection of precancerous lesions in dysplasias of the lung by rapid DNA image cytometry. Analyt Quant Cytol Histol 1995; 7: 219 - 226.

Bahram N, Kersten A, Roß B, Motherby H, et al.

Cytologic and DNA Cytometric diagnosis and therapy monitoring of squamous cell carcinoma in situ and malignant melanoma of the cornea and conjunctiva. Analyt Quant Cytol Histol 1999; 21: 387 – 396.

Binahmed A, Nason RW, Abdoh AA.

.....
The clinical significance of the positive surgical margin in oral cancer. *Oral Oncol* 2007; 43(8): 780-4.

Bjelkenkrantz K, Lundgren J, Olofsson J.

Single-cell DNA measurements in hypoplastic, dysplastic, and carcinomatous laryngeal epithelia, with special reference to the occurrence of hypertetraploid cell nuclei. *Analyt Quant Cytol* 1983; 5: 1984 – 1988.

Bollmann R, Böcking A.

Prognostische Validität der DNA-Bildzytometrie bei Dysplasien in Gebärmutterhalsabstrichen. *Verh Dtsch Ges Path* 1996; 80: 577.

Boveri, T.

On multipolar mitosis as a means of analysis of the cell nucleus. In: *Foundation of Experimental Embryology*, B. H. Wilier und J. M. Oppenheimer. 1902/1964; 74 – 97.

Boveri T.

Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1914.

Böcking A.

DNA Measurements. When and why? In: *Compendium on quality assurance, proficiency testing and workload limitations in clinical cytology. Tutorials of Cytology*. Edited by Wied L., Keebler CM, Rosenthal DL, Schenck U, Somrak TM, Vooijs GP, Chicago, Illinois, USA, 1995:170-188.

Böcking A.

Biologische Grundlagen und Anforderungen an die Methodik der statischen DNA-Zytometrie. In: *Fortschritt und Fortbildung in der Medizin, Band 21*, Köln. Dt. Ärzte Verlag 1997; 21 – 49.

Böcking A.

Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA-Bildzytometrie. *Deutsches Ärzteblatt*. 1998; 95: A658 – 662.

.....
Böcking A, Adler CP, Common HD, Hilgarth M, Granzen B, Auffermann W.
Algorithm for a DNA cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Analyt Quant Cytol* 1984; 6: 1-7.

Böcking A, Auffermann W, Vogel H, Schlöndorff G, Goebbels R.
Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA cytophotometry. *Cancer* 1985; 56: 1660 – 1604.

Böcking A, Chatelain R, Salterberg A, Hagedorn M, Gross G.
Bowenoid papulosis: Classification as a low-grade in situ carcinoma of the epidermis on the basis of histomorphologic and DNA ploidy studies. *Analyt Quant Cytol Histol* 1989; 11(6): 419 - 425.

Böcking A, Füzezi L, Striepecke E.
Indikationen und tumorzytogenetische Grundlagen der diagnostischen DNA-Zytometrie. *Verh Dtsch Ges Zyt.* 1993;18: 70–82.

Böcking A, Giroud F, Reith A.
Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *Analyt Quant Cytol Histol* 1995; 17: 1 – 7

Böcking A, Hilgarth M, Auffermann W, Hack-Werdier C, Fischer-Becker D, et.al.
DNA-cytometric diagnosis of prospective malignancy in borderline lesions of the uterine cervix. *Acta Cytol* 1986; 30: 608 - 615.

Böcking A, Motherby H.
Abklärung zervikaler Dysplasien mittels DNA-Bild-Zytometrie. *Pathologe.* 1999; 20:25–33

Böcking A, Striepecke E, Füzezi L.
Zytogenetische und proliferationskinetische Grundlagen der diagnostischen DNA-Zytometrie. *Verh Dtsch Ges Ges. Pathol.*1994;78: 552-554.

Brunnemann KD, Hoffmann D.

.....
Analytical studies on tobacco-specific N-nitrosamines in tobacco and tobacco smoke.
Crit Rev Toxicol 1991, 21 (4): 235 – 40.

Broders AC.

The microscopic grading of cancer. Surg Clin North Am 1941; 21: 947-962.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stehe T, Bang G, Dabelsteen E.

New malignancy grading is a better prognostic indicator than Borders' grading in oral squamous cell carcinomas. 1989; 18 (8): 432 – 7.

Calais G, Alfonsi M, Bardet E, Sire C, Germain T, Bergerot P, Rhein B, et al.

Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. J Natl Cancer Inst. 1999; 91 (24): 2081 – 6.

Casiglia J, Woo SB.

A comprehensive review of oral cancer. Gen Dent 2001; 49 (1): 72 – 82.

Chatelain R, Schmuck T, Schindler EM, Schindler AE, Böcking A.

Diagnosis of prospective malignancy in koilocytic dysplasia of the cervix with DNA cytometry. J Reprod Med 1989; 34:505–510.

Chatelain R, Willms A, Biesterfeld S, Auffermann W, Böcking A.

Automated Feulgen staining with a temperature-controlled staining machine. Analyt Quant Cytol 1989; 11: 211-217.

Cohen C.

Image cytometric analysis in pathology. Hum Pathol 1996; 27 (5):482—493.

Dalquen P, Feichter G.

Zytopathologie, Kapitel 2: Zytologische Tumorkriterien. Springer-Verlag: Berlin, 2. Auflage, 2000.

Delgado R, Mikuz G, Hofstädter F.

.....
DNA-Feulgen-cytometric analysis of single cells isolated from paraffin embedded tissue. Path. Res. Pract. 1984; 179: 92-94.

Deutsche Krebsgesellschaft (Hrsg.)

Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2002, Interdisziplinäre Kurzgefasste Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie und der Deutschen Gesellschaft für Mund-Kiefer – und Gesichtschirurgie. 3. Auflage.

Duesberg P, Li R, Rasnick D, et al.

Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis. Cancer Genet. Cytogenet 2000; 119: 83–93.

Duesberg P, Li R, Fabarius A, Hehlmann R.

The chromosomal basis of cancer, Cell. Oncol. 2005; 27: 293–318.

Duesberg P

Chromosomal chaos and cancer. Sci Am. 2007; 296(5):52-9.

Duesberg P, Li R, Fabarius A, Hehlmann R.

Aneuploidy and cancer: from correlation to causation. Contrib Microbiol. 2006; 13: 16-44.

Fabarius A, Willer A, Yerganian G, Hehlmann R, Duesberg P.

Specific aneusomies in Chinese hamster cells at different stages of neoplastic transformation, initiated by nitrosomethylurea. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 6778 - 83.

Fu YW, Reagan JW, Fu AS, Janiga KE.

Adenocarcinoma and mixed carcinoma of the uterine cervix, 2: prognostic value of nuclear DNA analysis. Cancer 1982; 49: 2571 – 2577.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. in Zusammenarbeit mit dem RKI: Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends, 5. Ausgabe, 2006, Saarbrücken.

Giroud F, Haroske G, Reith A, Böcking A.

1997 ESACP consensus report on diagnostic. DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for Quality Assurance. *Analyt Cell Pathol* 1998; 17: 201 – 207.

Graham G.

Dentitio, diet, tobacco and alkohol in the epidemiology of oral cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1977; 59: 1611-8.

Hansemann D.

Über asymmetrische Zellteilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 1890; 119: 299 – 326.

Hansson BG, Rosenquist K, Anatonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, et al.

Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population – based case – control study in southern sweden. *Acta otolaryngol.* 2005; 125 (12): 1337 – 44.

Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A.

1997 ESACP Consensus Report on Diagnostic DNA Image Cytometry. Part I: Basis Considerations and Recommendations for Perparation, Measurement and Interpretation. *Analyt Cell Pathol* 1998; 17: 189 – 200.

Haroske G, Baak JPA, Danielsen H, Giroud F, Gschwendtner A, Oberholzer M, Reith A, Spieler P, Böcking A.

Fourth updated ESACP Consensus Report on Diagnostic DNA Image Cytometry. *Analyt Cell Pathol* 2001; 23:89 – 95.

Headley DW, Friedlander M, Taylor IW.

Application of DNA flow cytometry to paraffin – embeddet archival material for study of aneuploidy an its clinical significance. *Cytometry* 1985; 6:327 – 33.

Headley DW, Friedlander M, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA.

Method for analysis of cellular DNA content of paraffin – embedded pathological material using flow cytometry. *J. Histochem.* 1983; 31:1333 – 5.

Hemprich A, Müller R.

Long-term results in treating squamous cell carcinoma of the lip, oral cavity, and oropharynx. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1989; 18: 39-42.

Hennemann B.

Palliative chemotherapy of head and neck cancer: Present status and future development. *Laryngo-Rhino-Otol* 2006; 85:172-178.

Hillemanns, HG.

Entstehung und Wachstum des Zervixkarzinoms, Basel, New York: S. Karger, 1964.

Ho PS, KO YC, Yang YH.

The incidence of oropharyngeal cancer in Taiwan: an endemic betel quid chewing area. *J Oral Pathol Med* 2002; 31:213 – 219.

Homann N., Tillonen J., Meurman JH., Rintamäki H., Lindqvist C, Rautio M, et al.

Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *carcinogenesis* 2000; 21 (4): 663 – 668.

Howaldt HP, Kainz M, Euler B, Vorast H.

Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. *DOSAK. J. Craniomaxillofac Surg.* 1999; 27:275 – 88.

Howaldt, HP.; Schmelzeisen, R.

Einführung in die Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Urban & Fischer Verlag: München, 1. Auflage, 2002.

Huang CH, Chu ST, Ger LP, Hou YY, Sun CP.

Clinicopathologic evaluation of prognostic factors for squamous cell carcinoma of the buccal mucosa. *J Chin Med Assoc.* 2007; 70 (4): 164 – 70.

Jones AS.

Prognosis in mouth cancer: tumor factors. Eur J Cancer, B Oral Oncol. 1994; 30 B (1): 8 – 15.

Jones AS, Beasley N, Houghton D, Husband DJ.

The Effects of Age on survival and other parameters in squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx and larynx. Clin Otolaryngol Allied Sci. 1998; 23 (1): 51 – 6.

Junqueira LC, Carneiro J.

Histologie, Kapitel 24: Methoden, Springer-Verlag: Berlin, 6. Auflage, 2005.

Kadmani D, Bell RB, Bagheri SC, Holmgren E, Dierks E, Potter BE, Homer L.

Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. J Oral Maxillofac Surg. 2005; 63 (11): 1599 – 605.

Karabulut A, Reibel J, Therkildsen MH, Praetorius F, Nielsen HW, Dabelsteen E.

Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. J. Oral Pathol Med 1995; 24: 198-200.

Kashyap V, Das DK, Luthra UK.

Microphotometric nuclear DNA analysis in cervical dysplasia of the uterine cervix: Its relation to the progression to malignancy and regression to normalcy. Neoplasma 1990; 37: 497-500.

Kübler A, Reuter T.

Photodynamische Therapie. Möglichkeiten und Grenzen bei Kopf-Hals-Karzinomen. Der Onkologe 2007; 13: 158-164.

Lindquist C.

Risk factors in lip cancer: a questionnaire survey. Am J Epidemiol. 1979;109 (5) :521-30.

Macfarlane GJ, Zheng T, Marshall JR, Boffetta P, Niu S, Brasure J, Merletti F, et al.

Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. Eur J cancer B Oral Oncol. 1995; 31 (3): 181 – 7.

Maraki D, Becker J, Böcking A.

Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 398-404.

Maserejian NN, Giovannucci E, Rosner B, Joshipura K.

Prospective study of vitamins C, E, and A and carotenoids and risk of oral premalignant lesions in men. *Int J Cancer*. 2007; 120(5): 970-7.

Merlano M, Benasso M, Corvò R, Rosso R, Vitale V, Blengio F, Numico G et.al.

Five-year update of a randomized trial of alternating radiotherapy and chemotherapy compared with radiotherapy alone in treatment of unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88(9): 583-9.

Miller AB.

The epidemiology of oral cancer. *Dent J*. 1974; 40 (3): 211 – 217.

Miller CS, Johnstone BM.

Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982–1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 97 (6): 622 – 35.

Mohr C.

Der heutige Stellenwert adjuvanter Verfahren im Behandlungskonzept des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle. und/oder des Oropharynx. In: Esser E (Hrsg.). *Mundhöhlen-Oropharynxkarzinom. Prognose und Radikalität*. Deutsche Gesellschaft für Mund-,Kiefer-und Gesichtschirurgie. Osnabrück, 1998;105-34.

Mohr C, Bohndorf W, Carstens J, Härle F, Hausamen JE, Hirche H, Kimmig H, et al. Preoperative radiochemotherapy and radical surgery in comparison with radical surgery alone. A prospective, multicentric, randomized DOSAK study of advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx (a 3-year follow-up). *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1994; 23(3): 140-8.

.....
Molnar L, Ronay P, Tapolcsanyi L.

Carcinoma of the lip. Analysis of the material of 25 years. *Oncology* 1974;29: 101-112.

Munck-Wikland E, Kuylenstierna R, Lindholm J, Auer G.

Image cytometry DNA analysis of dysplastic squamous epithelial lesions in the larynx. *Anticancer Res.* 1990; 11: 597-600.

Nair J, Ohshima H, Nair UJ, Bartsch H.

Endogenous formation of nitrosamines and oxidative DNA-damaging agents in tobacco users. *Crit Rev Toxicol.* 1996; 26(2): 149-61.

Nenning H, Horn LC, Kühndel K, Bilek K.

False positive cervical smears: a cytometric and histological study. *Anal Cell Pathol.* 1995; 9(1): 61-8.

Neville BW, Day TA.

Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002; 52(4): 195-215.

Noguchi M, Kido Y, Kubota H, Kinjo H, Kohama G.

Prognostic factors and relative risk for survival in N1-3 oral squamous cell carcinoma: a multivariate analysis using Cox's hazard model. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1999; 37(6): 433-7.

Nordemar S, Tani E, Högmo A, Jangard M, Auer G, Munck-Wikland E.

Image cytometry DNA-analysis of fine needle aspiration cytology to aid cytomorphology in the distinction of branchial cleft cyst from cystic metastasis of squamous cell carcinoma: a prospective study. *Laryngoscope.* 2004; 114(11): 1997-2000.

Osterheld MC, Andrejevic Blant S, Caron L, Braunschweig R, Dorta G, et al.

Digital image DNA cytometry: a useful tool for the evaluation of malignancy in biliary strictures. *Cell Oncol.* 2005; 27(4): 255-60.

Pindborg JJ.

.....
Krebs und Vorkrebs der Mundhöhle. Quintessenz, Berlin 1982.

Ravasz LA, Slootweg PJ, Hordijk GJ, Smit F, van der Tweel I.

The status of the resection margin as a prognostic factor in the treatment of head and neck carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg.* 1991; 19(7): 314-8.

Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, et al.

Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol.* 2001; 22(4): 211-21.

Remmerbach TW, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A.

Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases. *Anal Cell Pathol.* 2003; 25(4): 159-66.

Remmerbach TW, Mathes SN, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A.

Nichtinvasive Bürstenbiopsi als innovative Methode in der Früherkennung des Mundhöhlenkarzinoms. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2004; 8(4): 229-36.

Rodriguez T, Altieri A, Chatenoud L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, Franceschi S, et al.

Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol.* 2004; 40(2): 207-13.

Rothman KJ.

Epidemiology of head and neck cancer. *Laryngoscope.* 1978; 88(3): 435-8.

Sánchez MJ, Martínez C, Nieto A, Castellsagué X, Quintana MJ, Bosch FX, et al.

Oral and oropharyngeal cancer in Spain: influence of dietary patterns. *Eur J Cancer Prev.* 2003; 12(1): 49-56.

Sandberg AA.

Chronic myelocytic leukemia. In: Sandberg AA (Hrsg.). *The Chromosomes in Human Cancer Leukemia.* Second edition. New York: Elsevier; 1990: 458-514.

Sandritter W, Fischer R.

Der DNS-Gehalt des normalen Plattenepithels und des invasiven Carcinoms der Portio. Proceedings of the First International Congress of Exfoliative Cytology. Lippincott, Philadelphia; 1961: 189-195.

Sanghvi LD, Rao DN, Joshi S.

Epidemiology of head and neck cancers. *Semin Surg Oncol.* 1989; 5(5): 305-9.

Schwenzer N, Ehrenfeld M.

Spezielle Chirurgie. 3. Auflage. Thieme Verlag: Stuttgart, 2002.

Semrau R, Mueller RP, Stuetzer H, Staar S, Schroeder U, Guntinas-Lichius O, et al. Efficacy of intensified hyperfractionated and accelerated radiotherapy and concurrent chemotherapy with carboplatin and 5-fluorouracil: updated results of a randomized multicentric trial in advanced head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 64(5): 1308-16.

Sessions DG, Spector GJ, Lenox J, Parriott S, Haughey B, Chao C, Marks J, et al. Analysis of treatment results for floor-of-mouth cancer.

Laryngoscope. 2000;110(10): 1764-72.

Shibuya T, Morimoto K.

A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. *Mutat Res.* 1993; 297(1): 3-38.

Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(6): 449-55.

Spitz MR.

Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol.* 1994 Jun; 21(3): 281-288.

Spitzer WO, Hill GB, Chambers LW, Helliwell BE, Murphy HB.

The occupation of fishing as a risk factor in cancer of the lip. *N Engl J Med.* 1975; 293(9): 419-24.

.....

Statisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland. Gesundheitswesen, Fachserie 12, Reihe 4, Stuttgart: Metzler Poeschel.

Stupp R, Weichselbaum RR, Volkes EE.

Combined modality therapy of head and neck cancer. *Semin Oncol* 1994; 21: 394-58.

Tribukait B.

Nuclear deoxyribonucleic acid determination in patients with prostate carcinomas: clinical research and application.

Eur Urol. 1993;23 Suppl 2:64-76.

van Driel-Kulker AM, Mesker WE, van Velzen I, Tanke HJ, Feichtinger J, Ploem JS. Preparation of monolayer smears from paraffin-embedded tissue for image cytometry. *Cytometry.* 1985; 6(3): 268-72.

Vogl TJ, Mack MG, Gstöttner W.

Kopf-Hals-Karzinom, *Onkologe* 2001; 7: 477-90.

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK.

Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 1993; 328(3): 184-94.

Wennerberg J.

Predicting response to therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck (review). *Anticancer Res.* 1996; 16(4C): 2389-96.

Wynder EL, Bross IJ, Feldman RM.

A study of the etiological factors in cancer of the mouth. *Cancer.* 1957; 10(6): 1300-23.

Wynder EL, Stellman SD.

Comparative epidemiology of tobacco-related cancers. *Cancer Res.* 1977; 37(12): 4608-22.

Wright TC, Kurmann RG, Ferenczy A: Precancerous lesions of the uterine cervix. In: Blaustein's pathology of the femals genital tract. Kurmann R (Hrsg.), New York:Springer Verlag 1994: 229-277.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Priv.- Doz. Dr. Dr. Jörg Handschel für die freundliche Überlassung des Themas und die vorzügliche Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Des weiteren möchte ich mich auch bei Herrn Univ - Prof. Dr. med. A. Böcking und Frau Dr. Pomjanski für die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung und Auswertung der Messungen sowie für die vielen fachlichen und praktischen Ratschläge bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. S. Braunstein, der freundlicherweise die Tumorböcke und Resektatrandschnitte der Patienten zur Verfügung stellte bzw. mir erlaubte, diese im Archiv des Instituts für Pathologie der HHU zu recherchieren.

Ich danke auch Frau Buckstegge, die als Mitarbeiterin des Instituts für Zytopathologie der HHU mir mit Rat und Tat bei der labortechnischen Einarbeitung in die DNA-Bildzytometrie zur Seite stand.

Lebenslauf

Name	Öz, Döne
Anschrift	Isarstraße 4 41469 Neuss
Geburtsdatum	15. April 1977
Geburtsort	Gölsehir (Türkei)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
1994 - 1997	Nelly - Sachs - Gymnasium in Neuss Abschluss: Abitur
Okt. 1999	Immatrikulation zum Zahnmedizinstudium an der Heinrich - Heine - Universität in Düsseldorf
Juni 2005	Abschluss des Zahnmedizinstudiums mit der zahnärztlichen Prüfung
Juni 2005	Approbation als Zahnärztin
Aug. 2005 - Dez. 2007	Assistenz Zahnärztin in der Praxis Dr. Stevelmans in Mönchengladbach
seit Jan. 2007	angestellte Zahnärztin in der Praxis Dr. Strosek in Düsseldorf

Abstract

Evaluation des Stellenwertes der DNA-Zytometrie in der Begutachtung von Schnitträndern nach Resektion oraler Plattenepithelkarzinome

von Döne Öz

Bei der Behandlung von oralen Plattenepithelkarzinomen steht nach wie vor die sichere Resektion des Tumors „im Gesunden“ im Vordergrund. Leider kommt es in vielen Fällen trotz sogenannter RO-Resektion häufig zu Lokalrezidiven, so dass die Fünfjahres-Überlebensrate von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen nur bei ca. 50 Prozent liegt und somit unbefriedigend ist.

Ziel unserer Arbeit war es zu überprüfen, ob die zusätzliche Verwendung der DNA-Bildzytometrie bei der Beurteilung der Resektionsgrenzen einen höheren prädiktiven Wert hinsichtlich des Auftretens von Lokalrezidiven hat als die Histologie alleine.

Hierzu wurden die Resektatrandsschnitte von 40 histologisch RO resezierten Patienten, die jeweils mindestens über drei Jahre nach der chirurgischen Operation nachbeobachtet wurden, mittels DNA-Zytometrie nachuntersucht. Mit dem DNA-Bildzytometer wurde der DNA-Gehalt der nach Feulgen gefärbten Zellkerne gemessen.

DNA-Aneuploidie wurde angenommen, wenn atypische DNA-Stammlinien mit einem DNA-Gehalt kleiner 1,80 c größer 2,20 c bzw. kleiner 3,60 c oder größer 4,40 c identifiziert wurden und / oder Zellen mit einem DNA-Gehalt größer 5c (Einzellaneuploidie) gemessen wurden.

In unserer Studie erhielten wir durch zytometrische DNA-Messungen von Gewebe aus Resektionsgrenzen bei intraoralen Plattenepithelkarzinomen eine Sensivität von 70 % und eine Spezifität von 90 % für die diagnostische DNA-Zytometrie. Der negative Prädiktionswert, mit der die DNA-Zytometrie das Fehlen von Tumorzellen in den Absetzungsändern von rezidivfreien Patienten richtig nachwies, lag bei 75 %. Der von uns ermittelte positive Prädiktionswert lag bei 87,5 %.

Die statische DNA-Bildzytometrie erweist sich daher als ein sensitives und hochspezifisches zusätzliches Diagnostikverfahren zum Nachweis von Tumorzellen in den Resektionsrändern. Durch den Einsatz der adjuvanten DNA-Bildzytometrie kann die Beurteilung der Tumorsektionsgrenzen und so auch das postoperative Staging verbessert werden.