

**Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Univ. - Prof. Dr. med. dent. Jürgen Becker

**Multimodale Zellanalyse zur nicht-invasiven
Diagnostik oraler Präkanzerosen und Karzinome**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

**vorgelegt von
Anna Damanaki**

2015

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

gez.:

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

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Jürgen Becker

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einer prospektiven klinischen Studie zu untersuchen, ob die nicht-invasive Exfoliativzytologie (EZ) die Diagnostik von oralen Präkanzerosen und Kanzerosen verbessern kann.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die DNA-Bildzytometrie und die AgNOR-Analyse die Treffsicherheit der konventionellen Exfoliativzytologie verbessern können.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie und der AgNOR-Analyse an korrespondierenden Bürstenabstrichen und Zellvereinzlungen aus Gewebeproben zu vergleichen.

Material und Methode: Die histologischen und zytologischen Proben wurden im Rahmen der routinemäßigen Krankenversorgung von 111 Patienten mit verdächtigen Mundschleimhautrekrankungen entnommen und im Institut für Pathologie und in dem Funktionsbereich Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf untersucht.

Nach der Routinediagnostik wurden ergänzende DNA-Bildzytometrien und AgNOR-Analysen der zytologischen und histologischen Proben durchgeführt. An den histologischen Proben erfolgten die DNA-Bildzytometrie und die AgNOR-Analyse nach enzymatischer Zellvereinzlung. Die Daten wurden danach mit Hilfe des statistischen Programmsystems SPSS ausgewertet.

Ergebnisse: Die konventionelle EZ konnte in 64,7% der Fälle mit histologisch nachgewiesenen Fällen von Dysplasien diese bestätigen. Die zusätzliche DNA-Bildzytometrie führte zu einer Erhöhung der Sensitivität auf 82,4%. Durch den Einsatz der AgNOR-Analyse kam es nicht zu einer weiteren Verbesserung der Sensitivität.

Zellvereinzlungen: Die DNA-Bildzytometrie an Zellvereinzlungen aus histologischen Präparaten zeigte eine Sensitivität von 76,5% und eine Spezifität von 90%. Die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie an korrespondierenden Bürstenbiopsien und Gewebeproben zeigten eine Übereinstimmung von 89,5% und eine Signifikanz von $p < 0.001$.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zur Sensitivität und Spezifität der EZ mit adjuvanter DNA-Zytometrie bestätigen aktuelle klinische Studien. Die Ergebnisse zeigten, dass der adjuvante Einsatz der AgNOR-Analyse die Ergebnisse nicht verbesserte.

Die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie an Zellvereinzlungen verbesserten die Ergebnisse der konventionellen EZ mit DNA-Zytometrie nicht.

Abkürzungen:

AgNO₃:	Silbernitrat
AgNOR:	<i>Argyrophilic Nucleolar Organiser Regions</i>
Ca:	Cancer/Krebs
CV:	Variationskoeffizient
DNA/DNS:	Desoxyribonukleinsäure
ESACP:	<i>European Society for Analytical and Cellular Pathology</i>
EZ:	Exfoliativzytologie
GvHD:	<i>Graft versus Host Disease</i>
HIV:	<i>human immunodeficiency syndrome</i>
IARC:	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IOD:	integrierte optische Dichte
MW:	Mittelwert
NORs:	<i>Nucleolar Organiser Regions</i>
OLP:	Oral Lichen planus
OPMD:	<i>oral potentially malignant disorders/orale potentielle maligne Störungen</i>
Oral CDx:	Computer-assistierte Zytologie
PBS-Buffer:	<i>phosphate buffered saline</i>
PC:	<i>Personal Computer</i>
PE-Ca:	Plattenepithelkarzinom
rRNA:	ribosomale Ribonukleinsäure
SD:	<i>Standard Deviation/Standard Abweichung</i>
SOP:	<i>Standard Operation Procedure</i>
UKD:	Universitätsklinikum Düsseldorf
UV:	Ultraviolett
WHO:	<i>World Health Organization /Weltgesundheitsorganisation</i>
9cEE:	<i>9c Exceeding Event</i>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologische und statistische Daten der Neuerkrankungen an Krebs	1
1.1.1 Weltweite epidemiologische und statistische Daten zu Tumorerkrankungen	1
1.1.2 Epidemiologische und statistische Daten in Bezug auf Mundkrebs in Deutschland	1
1.2 Präkanzeröse Läsionen	1
1.2.1 Lichen planus	1
1.2.2 Leukoplakie	2
1.2.3 Andere präkanzeröse Läsionen	3
1.3 Risikofaktoren für Krebsentstehung	3
1.3.1 Systemische Risikofaktoren	3
1.3.2 Lokale Risikofaktoren	3
1.4 Methoden zur morphologischen Gewebsdiagnostik	4
1.4.1 Invasive diagnostische Methoden/Histologie	4
1.4.2 Nicht-invasive diagnostische Methoden/Zytologie	5
1.5 Spezielle diagnostische Methoden in der Zell- und Gewebsdiagnostik	6
1.5.1 DNA-Bildzytometrie	6
1.5.2 AgNOR-Analyse (<i>Argyrophilic nucleolar organiser region</i>)	7
2. Ziele dieser Arbeit	10
3. Material und Methoden	11
3.1 Patientenkollektiv	11
3.2 Orale Diagnostik	12
3.2.1 Bürstenbiopsie	12
3.2.2 Durchführung der histologischen Biopsie	13
3.2.3 Morphologische Diagnostik und weiteres Procedere	13
3.3 Aufarbeitung und Befundung der Proben	13
3.3.1 Zytologische Routinediagnostik nach Papanicolaou –Färbung	13
a) Färbung der zytologischen Präparate nach Papanicolaou	13
b) Begutachtung der zytologischen Präparate	14
3.3.2 Bearbeitung der histologischen Präparate	15
3.3.3 DNA-Bildzytometrie nach Feulgen-Färbung	15
a) Vorbereitung zytologischen Präparate für die Feulgen-Färbung	15
b) Gewinnung zytologischen Ausstriche aus Paraffinblöcken durch enzymatische Zellvereinzellung	16
c) Die DNA-Bildzytometrie	17
3.3.4 Silbernitrat-Färbung und AgNOR-Analyse	20
a) Silbernitrat-Färbung der zytologischen Präparate und der Zellsuspensionen nach Zellvereinzellungen der histologischen Präparate	20
b) Die AgNOR-Analyse	21
3.4 Statistik	22

4. Ergebnisse	24
4.1 Risikofaktoren und Malignität	24
4.2 Klinische Diagnostik	24
4.2.1 Lokalisation der Läsionen	24
4.2.2 Klinische Diagnosen	25
4.3 Histologische und zytologische Diagnostik	27
4.4 Adjuvante Diagnostik	31
4.4.1 DNA-Bildzytometrie	31
4.4.2 AgNOR-Analyse	35
4.5 Diagnostischer Vergleich der adjuvante Methoden	42
5. Diskussion	44
5.1 Krebsentstehung und Risikofaktoren	44
5.2 Prognostische und diagnostische Relevanz der oralen Zytologie	44
5.3 Prognostische und diagnostische Relevanz der DNA-Bildzytometrie	47
5.4 Prognostische und diagnostische Relevanz der AgNOR-Analyse	53
5.5 Der Vergleich der adjuvanten diagnostischen Methoden	56
6. Schlussfolgerungen	58
7. Literaturverzeichnis	59

1. Einleitung

1.1 Epidemiologische und statistische Daten der Neuerkrankungen an Krebs

1.1.1 Weltweite epidemiologische und statistische Daten zu Tumorerkrankungen

Nach der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) erkrankten im Jahr 2008 insgesamt 263.000 Menschen, davon 170.000 Männer und 92.000 Frauen, an Lippen- und Mundhöhlenkarzinomen. Im selben Jahr starben insgesamt 127.000 Menschen daran (83.000 Männer und 44.000 Frauen). Bei den Männern steht diese Tumorgruppe auf Platz 10 bei den Tumorfrequenzen [1].

1.1.2 Epidemiologische und statistische Daten in Bezug auf Mundkrebs in Deutschland

Gemäß dem Krebsatlas des Robert-Koch-Instituts werden alle Neuerkrankungen an Krebs in Deutschland für das Jahr 2010 mit ca. 477.300 Fällen, davon ca. 252.390 Männer und 224.910 Frauen, angegeben. Ca. 9.340 Männer und ca. 3.490 Frauen erkrankten an Mundhöhlen- und Pharynxkarzinomen, wobei bei Männern diese Krebslokalisation an der neunten Stelle und bei Frauen an der siebzehnten Stelle der Erkrankungshäufigkeit stand. Das Erkrankungsalter liegt im Durchschnitt für Männer bei 61 und für Frauen bei 65 Jahren [2].

1.2 Präkanzeröse Läsionen

Die aktuelle Definition der WHO für präkanzeröse Läsionen im Bereich der Mundhöhle lautet „*oral potentially malignant disorders*“ (OPMD), worunter alle Veränderungen subsummiert werden, die eventuell entarten können [3, 4]. Diese sollen im Folgenden dargestellt werden.

1.2.1 Lichen planus

Der orale Lichen planus (OLP) zeigt folgende klinische Verlaufsformen:

- Lichen planus reticularis
- plaquartiger Lichen planus
- bullöser Lichen planus
- erythematöser (atrophischer) Lichen planus und
- erosiver (ulzerierender) Lichen planus

Die zwei letzten Formen sind mit dem höchsten Entartungsrisiko gebunden, ohne ausschließen zu können, dass die anderen Formen auch entarten können [4-7].

Bezüglich des Entartungsrisikos des oralen Lichen planus finden sich Angaben, die von 0% bis 17,7% reichen [8-13].

1.2.2 Leukoplakie

Im Jahr 2011 haben Amagasa et al. [14] eine Übersichtsarbeit mit dem Titel „*Oral premalignant lesions: from a clinical perspective*“ publiziert und tabellarisch das Risiko der malignen Transformation der oralen Leukoplakie dargestellt (Tabelle 1):

Autor	Land	Jahr	Fallzahl	Follow-Up (Jahre)	Maligne Transformation (%)
Silverman et al.	Indien	1976	4.762	2	0,13
Gupta et al.	Indien	1980	360	1-10 (7)	0,3
Mehta et al.	Indien	1972	117	10	0,8
Gupta et al.	Indien	1980	410	1-10 (8)	2,2
Roed-Peterson et al.	Dänemark	1971	331	1≤ (4.3)	3,6
Einhorn et al.	Schweden	1967	782	1-20	4,0
Pindborg et al.	Dänemark	1968	248	1-9	4,4
Kramer et al.	England	1969	187	1-16	4,8
Silverman et al.	USA	1968	117	1-11	6,0
Banocy et al.	Ungarn	1977	670	1-30	6,0
Amagasa et al.	Japan	2006	444	1-29	7,9
Lind	Norwegen	1987	157	6≤	8,9
Gangadharan et al.	Indien	1971	626	1-19	10,0
Schepman et al.	Holland	1998	166	6 Monate-17 (2,7)	12,0
Silverman et al.	USA	1984	257	6 Monate-39 (7,2)	17,5

Tabelle 1: Maligne Transformation der oralen Leukoplakie (nach Amagasa et al., 2011 [14])

Die Tabelle 1 zeigt, dass das Transformationsrisiko zwischen 0,13 und 17,5% variiert, wobei die Häufigkeit in den meisten Studien zwischen 4% und 10% beträgt [14].

1.2.3 Andere präkanzeröse Läsionen

Die Erythroplakie, die palatinalen Läsionen bei sogenanntem „*reverse smoking*“, die orale submuköse Fibrose und die aktinische Keratose der Lippen stellen weitere präkanzeröse Läsionen dar [4].

1.3 Risikofaktoren für Krebsentstehung

Bestimmte Faktoren, sowohl systemische als auch lokale, sind mit einem erhöhten Risiko für Krebsentstehung verbunden. In diesem Kapitel, werden diese Faktoren zusammengefasst dargestellt.

1.3.1 Systemische Risikofaktoren

Zu den systemischen Faktoren, also solchen, die den Gesamtorganismus betreffen, gehören verschiedene chemische Substanzen, Virusinfektionen, Syphilis, Vitaminmangel, UV-Strahlung, HIV-Infektion und die GvHD („*Graft versus Host Disease*“) [5, 15, 16].

1.3.2 Lokale Risikofaktoren

Als lokale Risikofaktoren sind vor allem Wirkungen von Tabak, überwiegend in Kombination mit Alkoholkonsum, zu nennen.

Tabakkonsum zählt zu den wichtigsten Risikofaktoren nicht nur für Lungenkarzinome, Pankreaskarzinome und Urothelkarzinome, sondern auch für die Entstehung von oralen und oropharyngealen Karzinomen. Alle Formen von Tabakkonsum, nämlich das Rauchen von Zigaretten, Zigarren oder Pfeife, aber auch Kautabak sind karzinogen, außerdem auch Betelnüsse [17, 18]. Starke Raucher zeigen ein 5faches bis 25faches höheres Risiko für die Entwicklung der oben genannten Formen von Krebs [19]. Aus dem Kondensat des Tabaks entwickeln sich Karzinogene, wie zum Beispiel Tabak-spezifische Nitrosaminase sowie freie Radikale, die antioxidative Enzyme hemmen können und dadurch das Risiko der Entstehung von Krebs bei Rauchern erhöhen [17].

Früher gab es in der wissenschaftlichen Welt eine Meinungsverschiedenheit hinsichtlich der Frage, ob Alkohol an sich zum Krebs führen kann. Es wurde die Meinung vertreten, dass eher die Kombination von Tabak- und Alkoholkonsum karzinogene Wirkungen hat und zwar je länger der Verbrauch und je größer die Menge um so größer das Risiko [5]. Im Oktober 2009 hat allerdings die Internationale Agentur für Krebsforschung („*International Agency for Research on Cancer*“, IARC) den kausalen Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Malignität unter anderem auch in der Mundhöhle bestätigt [20]. Im Zusammenhang mit dem Alkoholkonsum gibt es verschiedene Mechanismen, die zum Krebs führen können, allerdings ist der wichtigste die Oxidation des Äthanols zu Acetaldehyd [17].

Status quo ist letzten Endes die Tatsache, dass die Kombination von Tabak- und Alkoholkonsum karzinogen wirken kann; je länger diese Gewohnheiten dauern und je größer die Menge des Konsums ist, desto größer ist auch das Risiko.

1.4 Methoden zur morphologischen Gewebsdiagnostik

1.4.1 Invasive diagnostische Methoden / Histologie

Die Entnahme einer Gewebeprobe von einer verdächtigen Läsion für die Histologie gilt bis heute als „Goldstandard“ der klinischen Diagnostik, sowohl bei der Abklärung von prämaligen, als auch von manifest malignen Läsionen der Mundschleimhaut. Bei größer flächigen oder multiplen Läsionen ist es allerdings nicht immer einfach, sich für die richtige Stelle für die Biopsie zu entscheiden, so dass auch Entnahme-bedingte Fehler nicht ausgeschlossen sind [21].

Holmstrup et al. haben im Jahr 2007 retrospektiv untersucht, ob Biopsien von prämaligen Läsionen repräsentativ für die ganze Läsion waren. Dabei hat die Arbeitsgruppe die histologischen Ergebnisse zwischen Biopsien von einem Teil und von der ganzen Läsion verglichen, wenn diese Läsion zu einem späteren Zeitpunkt in toto entfernt wurde. Von den 101 untersuchten Läsionen zeigten 35% (darunter 7% Karzinome) der in toto exzidierten Läsionen eine schwerere histopathologische Diagnose als die entsprechenden Biopsien, die im Durchschnitt 10,4 Monate vorher entnommen worden waren. Von großer Wichtigkeit ist die Tatsache, dass sieben

Karzinome erst nach der in toto Entfernung der Läsion und nicht bei der Biopsie festgestellt wurden. Interessanterweise waren drei von diesen als homogene und vier als nicht homogene Leukoplakien charakterisiert worden. Außerdem zeigten Fälle, die in den Biopsien keine, geringe oder mittlere Dysplasie enthalten hatten, im Resektat Karzinome in 8% der Fälle [22].

1.4.2 Nicht-invasive diagnostische Methoden / Zytologie

Die ersten Arbeitsgruppen, die den Nutzen der Zytologie in der Diagnostik an der oralen Mukosa untersucht haben, waren Montgomery und von Haam in den frühen 50er Jahren [23]. Heutzutage kann nicht nur die konventionelle Abstrichzytologie angewandt werden, wobei der entnehmende Arzt das Material selber auf Objektträger verteilt, sondern es kommen auch modifizierte Methoden wie zum Beispiel die flüssig-basierte computerassistierte Zytologie (oral CDx) zum klinischen Einsatz [24].

In den aktuellen Studien der weltweiten Literatur variiert die Sensitivität der oralen konventionellen EZ von 55% bis 100% und die Spezifität von 94,5% bis 100% [25-28]. In eine Studie von Navone et al. wurde auch ein Vergleich zwischen der Treffsicherheit der konventionellen Zytologie und der Flüssigkeits-basierten (computerunterstützten) Zytologie vorgenommen [24]. Hierbei zeigten sich weniger unzureichende Fälle in der flüssig-basierten als in der konventionellen Zytologie (8,8% vs. 12,4%). Die Werte für Sensitivität (95,1% vs. 85,7%), Spezifität (99% vs. 95,9%), positiven prädiktiven Wert (96,3% vs. 95,4%) und negativen prädiktiven Wert (98,7% vs. 87%) waren jeweils höher.

Die Untersuchung der Treffsicherheit der Computer-assistierten Zytologie (Oral CDx) von Mehrotra et al. zeigte eine Sensitivität von 96,3% und eine Spezifität von 100% [29]. Andererseits haben Bhoopathi et al. einen prädiktiven positiven Wert von nur 7,9% der Computer-assistierten Zytologie feststellen können [30], so dass diese Methode ebenfalls nicht allgemein in ihrer Leistungskraft anerkannt ist.

1.5 Spezielle diagnostische Methoden in der Zell- und Gewebsdiagnostik

Die im Folgenden dargestellten Methoden, die zur Verbesserung der diagnostischen Aussagen dienen, sind prinzipiell an zytologischen und histologischen Präparaten anwendbar; ihre Domäne liegt allerdings in der zytologischen Diagnostik.

1.5.1 DNA-Bildzytometrie

In einer aktuellen Darstellung wurde die DNA-Bildzytometrie wie folgt definiert: „Das Prinzip der DNA-Bildzytometrie basiert auf der mikrodensitometrischen Quantifizierung des DNA-Gehaltes von ca. 250 - 300 morphologisch auffälligen Zellen und von ca. 30 normalen Eichzellen und kann an allen Präparatearten der Zytopathologie ebenso wie an nach Zellvereinzelnung hergestellten Ausstrichen von Zellen aus Paraffinblöcken nach Applikation der DNA-spezifischen und stöchiometrischen Feulgen-Färbung angewandt werden; konventionelle Routinefärbungen hingegen sind nicht geeignet“ [31], [32].

Nach Beendigung der Messung werden aus der Verteilung der DNA-Einzelwerte Meßparameter extrahiert, aus deren Werten man auf das etwaige Vorliegen von DNA-Aneuploidie rückschließen kann. Diese wiederum wird als Anhaltspunkt für manifeste bzw. auch für prospektive Malignität angesehen.

Mit dem Einsatz der DNA-Bildzytometrie an zytologischen Präparaten, konnten Remmerbach et al. die Sensitivität an der Diagnose von oralen Karzinomen von 91,3% (nur orale Zytologie) auf 97,8% und die Spezifität von 95,1% auf 100% erhöhen. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Studie von Maraki et al. mit einer Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 97,4% bei der Untersuchung von oralen Leukoplakien und Erythroplakien mit der Kombination der zwei oben genannten Methoden [26]. In einer Studie von Kämmerer et al., bei der dem Studiendesign nach nur genau ein Ausstrich untersucht werden sollte, zeigte die DNA-Bildzytometrie eine Sensitivität von 70% und eine Spezifität von 100%; die Kombination der zytologischen und DNA-zytometrischen Ergebnisse erhöhte die Sensitivität auf 77% [27].

Handschel et al. haben die marginalen Resektionsränder von oralen Karzinomen mittels DNA-Bildzytometrie untersucht, um mögliche Rezidive der Tumore vorhersehen zu können. Die Sensitivität betrug hier 70%, die Spezifität 90% und der prädiktiver positiver Wert 87,5% [33].

Bremmer et al. haben mittels DNA-Bildzytometrie den DNA-Ploidie-Status von oralen Leukoplakien im Vergleich zum histologischen Grading untersucht. Die Autoren sind zu der Schlussfolgerung gelangt, dass DNA-aneuploide Leukoplakien mit einem signifikant erhöhten Risiko für Krebsentstehung verbunden sind, allerdings ohne ausschließen zu können, dass diploide Läsionen auch entarten können. Weiterhin, haben Bremmer et al. festgestellt, dass der DNA-Status als einziger Biomarker eine begrenzte Aussagekraft für den individuellen Leukoplakie-Patienten hat [34].

Die DNA-Bildzytometrie kann insgesamt sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität der konventionellen morphologischen Diagnostik Zytologie erhöhen und ist prinzipiell als ergänzende Methode in der Abklärung oraler Läsionen geeignet.

1.5.2 AgNOR-Analyse (*Argyrophilic nucleolar organiser region*)

„Die AgNOR-Analyse, eine Silberfärbung von intranukleären Proteinstrukturen, geht biologisch darauf zurück, dass die NORs („Nukleolus-organisierende Regionen“), bei denen es sich um große rRNA-Loops auf den Satellitenregionen der p-Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 mit Aufgaben in der Transkription der rRNA handelt, strukturellen und numerischen Veränderungen bei Zellproliferation unterliegen. Die NORs kann man durch eine Silberimprägnation durch eine kolloidale Silbernitrat-Lösung (AgNO_3) indirekt darstellen und die Produkte der Silberimprägnation, die AgNORs, mikroskopisch quantifizieren“ [31].

Per Definition sind die NORs Schlingen von DNA, die die ribosomale DNA kopieren. Jedes der oben genannten fünf Chromosomen besitzt zwei NORs, weswegen die Zahl von NORs in normalen diploiden Zellen 20 beträgt. NORs sind verbunden mit sauren argentaaffinen, nicht-histonischen Proteinen, die die eigentlichen Zielstrukturen des Silbernitrats sind. Angesichts der Tatsache, dass Zahl und Größe der AgNORs

Parameter für die Syntheseleistung der Zellen sind, werden sie heutzutage als Proliferationsmarker angesehen [23, 35-37].

Die AgNOR-Analyse wird sowohl an zytologischem als auch an histologischem Material als Proliferationsmarker verwendet, wie die unten genannten als auch andere Studien zeigen.

López-Blanc et al. haben in Jahr 2009 die Unterschiede der AgNORs in oralen Biopsien von Patienten, die Alkohol- und Tabakkonsumenten waren, im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden. Sie stellten fest, dass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich eines Formindex der AgNORs in der superfiziellen und suprabasalen epithelialen Schichten vorlag. Weiterhin, war die Anzahl der AgNORs in der Patientengruppe in der suprabasalen Schicht signifikant erhöht, und auch das Volumen der einzelnen AgNORs und das Gesamtvolumen aller AgNORs per Nukleus zeigte höhere Werte bei Alkoholikern und Rauchern, allerdings ohne einen signifikanten Unterschied zu erreichen. Diese Studie belegt, dass die AgNORs bereits Veränderungen an der oralen Mukosa bei Alkoholikern und Rauchern zeigten, die noch keinen Tumor entwickelt hatten [38].

Mehrere Arbeiten befassen sich mit der Frage, ob man aus AgNOR-Analysen Aussagen über den biologischen Charakter von Mundhöhlenläsionen gewinnen kann.

In der Studie von Elangovan et al. [36] an histologischen Präparaten ergab die quantitative Analyse der AgNOR-Zahlen folgende Ergebnisse, dargestellt als Mittelwerte (+/-Standardabweichung):

-Kontrollgruppe:	1,77 (+/- 0,02)
-pyogenes Granulom:	3,47 (+/- 0,93)
-submuköse Fibrose:	2,03 (+/- 0,62)
-Leukoplakie:	2,52 (+/- 0,50)
-gut differenziertes Plattenepithelkarzinom:	5,97 (+/- 1,20)
-mäßig differenziertes Plattenepithelkarzinom:	8,47 (+/- 0,99)

In einer Arbeit von Remmerbach et al. [37], die an zytologischen Präparaten erfolgte, wurden als AgNOR-Parameter Kluster und Satelliten (siehe unten, Kapitel 3, Material

und Methoden) erhoben und folgende Mittelwerte (+/- Standardabweichung) festgestellt:

	Klusters und Satelliten	Satelliten
-normale Epithelzellen:	2,28 (+/- 1,7)	
-entzündliche Läsionen:	3,39 (+/- 0,41)	3,35 (+/- 0,35)
-Leukoplakie:	3,88 (+/- 0,59)	3,78 (+/- 0,64)
-Karzinome:	8,99 (+/- 2,64)	8,67 (+/- 2,55)

Beide Datenverteilungen lassen erkennen, dass sich insbesondere bei Karzinomen hohe AgNOR-Werte finden lassen. In der Studie von Remmerbach et al. erwies sich (bezogen auf die Gesamtzahl von AgNORs) der Wert von 4,8 als bester Wert für die Unterscheidung zwischen benignen und malignen Zellen mit einer Sensitivität von 100% für die Diagnose von oralen Karzinomen und einer Spezifität von 100% für die Diagnose von benignen Läsionen [37].

An histologischem Material von oralen Karzinomen haben Hanemann et al. die AgNORs analysiert, um zu untersuchen, inwieweit sich die Zahl der AgNORs in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Tumoren verändert. Während gut differenzierte Karzinome mittlere AgNOR-Zahlen von 3,20 (+/-0,61) aufwiesen, betragen sie für mäßig differenzierte Karzinome 5,33 (+/-1,42), für gering differenzierte Karzinome 8,27 (+/-0,39) und für undifferenzierte Karzinome 10,08 (+/-0,27). Diese Ergebnisse waren im jeweiligen Vergleich zweier Gruppen allesamt statistisch signifikant, so dass hier die AgNORs als Indikator auch für eine unterschiedliche Tumordifferenzierung angesehen wurden [39].

2. Ziele dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden prospektiven klinischen Kohortenstudie war die diagnostische Validierung der „Multimodalen Zellanalyse“ zur nicht-invasiven Frühdiagnose oraler Präkanzerosen und Plattenepithelkarzinome an Bürstenbiopsien und histologischen Präparaten makroskopisch verdächtiger Läsionen der Mundschleimhaut. Dabei sollten an adjuvanten diagnostischen Verfahren die DNA-Bildzytometrie und die quantitative AgNOR-Analyse zusammengebracht werden, um im Kontext mit den Ergebnissen der konventionellen Zytologie und der Histologie folgende Fragen zu beantworten:

1. Welche der Zusatzmethoden zur EZ (DNA-Bildzytometrie oder AgNOR-Analyse) zeigt eine höhere diagnostische Sensitivität und Spezifität und welcher Gewinn an Treffsicherheit ist durch die DNA-Bildzytometrie und die AgNOR-Analyse gegenüber der zytologischen Diagnostik am identischen Zellmaterial zu erreichen?
2. Ist das Ergebnis einer DNA-Bildzytometrie und einer AgNOR-Analyse an histologischen Gewebeproben und korrespondierenden Bürstenbiopsien vergleichbar?

3. Material und Methoden

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Studiennummer 3409 genehmigt.

3.1 Patientenkollektiv

Einschlusskriterium in dieser Studie war das Vorhanden von klinisch auffälligen Mundschleimhautveränderungen. Insgesamt 111 Patienten wurden rekrutiert.

Die Tabellen 2 und 3 zeigen die Geschlechtsverteilung und Alter der Patienten.

Geschlecht	Patienten (n = 111)
männlich	51 (45,9%)
weiblich	60 (54,1%)

Tabelle 2: Geschlechtsverteilung der Patienten

Alter	Patienten (n = 111)
Median	60
Range	34 - 91
MW +/- SD Männer	58,2 +/- 14,0
MW +/- SD Frauen	62,1 +/- 11,1

Tabelle 3: Alter der Patienten. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Bei diesen 111 Patienten erfolgte zunächst eine exfoliativzytologische Untersuchung und im direkten Anschluss daran eine Gewebeprobe im gleichen Areal. Bei 49 der 111 Patienten erfolgten zusätzlich eine DNA-Bildzytometrie und die AgNOR-Analyse. Bei 24 Patienten war aufgrund des zytologischen Befundes mit verdächtigen Zellen eine ergänzende DNA-Bildzytometrie notwendig. Weitere 25 Patienten ohne Hinweis auf Dysplasien wurden als Kontrollgruppe durch das Zufallsprinzip einbezogen.

Zehn gesunde Probanden, allesamt Nichtraucher mit nur gelegentlichem Alkoholkonsum, die keine oralen Läsionen erkennen ließen, wurden für die Bestimmung der AgNOR-Werte zusätzlich eingeschlossen. Die individuelle Bestimmung der AgNOR-Werte für die gesunde Mundschleimhaut war notwendig, weil es keine standardisierten Angaben zur

normalen Werteverteilung von AgNOR-Parametern in der Mundschleimhaut Gesunder gibt. Auf eine DNA-bildzytometrische Messung wurde hier verzichtet, da man nach allgemeiner Erfahrung hier von einer diploiden DNA-Verteilung à priori ausgehen konnte.

3.2 Orale Diagnostik

Bei jedem der 111 Teilnehmer wurde eine ausführliche medizinische Anamnese, sowie die Medikamenteneinnahme, Allergien, Tabak- und Alkoholkonsum erhoben und dokumentiert. Danach erfolgte die Erhebung des Zahnstatus und die Mundschleimhaut wurde gründlich untersucht. Jede auffällige Mundschleimhautveränderung wurde schriftlich dokumentiert, mit einer parodontalen Sonde als Referenzkörper ausgemessen und fotografiert. Als nächstes erfolgte die Bürstenbiopsie der Läsion und im Anschluss daran erfolgte eine Gewebeprobe der untersuchenden Läsion. Die Gewebeprobe erfolgte am selben Tag bis maximal zehn Tage nach der Entnahme der Bürstenbiopsie.

3.2.1 Bürstenbiopsie

Mit einer Zytobürste (Cytobrush GT, Med-Scand Medical, Malmö, Schweden) wurde die verdächtige Läsion mehrmals unter leichtem Druck gebürstet. Danach wurden die Zellen von der Bürste auf einen Objektträger aufgetragen, indem die Bürste vier bis fünf Mal rund um ihre eigene Achse unter leichtem Druck gedreht wurde (Abb. 1 - 2). Anschließend erfolgte die unmittelbare Fixation der Zellen durch Alkoholspray (Merckofix-Spray, Merck, Darmstadt, Deutschland) [40-42].



Abb. 1:Entnahme einer Bürstenbiopsie



Abb. 2:Abrollen der Zellen von der Bürste auf einen Objektträger

3.2.2 Durchführung der histologischen Biopsie

Unter lokaler Betäubung wurde die verdächtige Läsion teilweise oder in toto spindelförmig in der Oberflächenausdehnung und keilförmig zur Tiefe entnommen und unmittelbar in 10%-igem gepuffertem Formalin fixiert (Abb. 3 - 4).



Abb. 3: Entnahme einer Biopsie vom linken Zungenrand



Abb. 4: Biopsat mit Fadenmarkierung

3.2.3 Morphologische Diagnostik und weiteres Procedere

Die Gewebeproben wurden im Institut für Pathologie (Direktor: Prof. Dr. H. E. Gabbert) und die zytologischen Proben im Funktionsbereich Cytopathologie (Leiter: Prof. Dr. S. Biesterfeld) des UKD untersucht. Nachdem die zytologischen und histologischen Gutachten vorlagen, wurden die Patienten über die Befunde aufgeklärt. Im Anschluss daran erfolgte die weitere Diagnostik im Rahmen dieser Studie. Patienten, bei denen maligne Veränderungen festgestellt wurden, wurden in die entsprechenden Fachabteilungen des Klinikums zur operativen Therapie überwiesen.

3.3 Aufarbeitung und Befundung der Proben

3.3.1 Zytologische Routinediagnostik nach Papanicolaou-Färbung

a) Färbung der zytologischen Präparate nach Papanicolaou:

Die Objektträger wurden nach Papanicolaou in einem Färbeautomaten (Tissue-Tek®, Prisma®, Sakura Finetek, Germany GmbH) gemäß der *Standard Operation Procedure*

(SOP) des Funktionsbereichs Cytopathologie gefärbt (Tabelle 4); nach der Färbung erfolgte eine Eindeckelung der Präparate mit einem üblichen Deckglas unter Verwendung des Eindeckmediums Tissue Mount.

Papanicolaou Färbung			
1	96% Ethanol	2	Minuten
2	80% Ethanol	1	Minute
3	70 % Ethanol	1	Minute
4	50% Ethanol	1	Minute
5	Aqua dest.	1	Minute
6	gebrauchsfertiges Hämatoxylin	2	Minuten
7	Leitungswasser	3	Minuten
8	Leitungswasser	3	Minuten
9	NH ₂ OH	1	Minute
10	70% Ethanol	1	Minute
11	70% Ethanol	1	Minute
12	80% Ethanol	1	Minute
13	96% Ethanol	1	Minute
14	gebrauchsfertiges Orange II 2b	2	Minuten
15	96% Ethanol	1	Minute
16	96% Ethanol	1	Minute
17	Polychrom 3b	2	Minuten
18	96% Ethanol	1	Minute
19	96% Ethanol	1	Minute
20	99,5% Ethanol	2	Minuten
21	Xylol	1	Minute
22	Xylol	1	Minute
23	Voclear	1	Minute
24	Voclear	1	Minute

Tabelle 4: Färbung nach Papanicolaou-Methode (vgl. Quelle [40])

b) Begutachtung der zytologischen Präparate:

Die Begutachtung der zytologischen Präparate erfolgte nach den üblichen Kriterien der diagnostischen Zytopathologie. Für die Klassifikation der Befunde wurde die von Böcking und Freudenberg vorgeschlagene Nomenklatur aus dem Jahr 1998 verwendet [41, 43]:

- unzureichend: Abstriche, die keine Zellen oder nur autolytische Zellen enthalten,
- negativ / bösartige Zellen nicht nachweisbar: Abstriche, die ausschließlich unauffällige, reaktive oder entzündliche Zellen enthalten,
- zweifelhaft / bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen: Abstriche mit abnormen Zellveränderungen (z.B. mit leichten oder mäßigen Dysplasien),

- dringender Verdacht / bösartige Zellen wahrscheinlich: Abstriche mit nur wenigen atypischen Zellen oder bei noch nicht sicher erfüllten Malignitätskriterien auffälliger Zellen (insbesondere schwere Dysplasien)
- positiv / bösartige Zellen nachweisbar: Abstriche mit eindeutig malignen Zellen“.

3.3.2 Bearbeitung der histologischen Präparate

Die Gewebeproben lagen in 10%iger gepufferter Formalinlösung fixiert vor und wurden im Institut für Pathologie aufgearbeitet.

3.3.3 DNA-Bildzytometrie nach Feulgen-Färbung

DNA-bildzytometrische Messungen nach vorheriger Feulgen-Färbung [44] sind nur an ganzen Zellen möglich, so dass zytologische Ausstriche hierfür verwendet werden können, histologische Routineschnitte von eingebettetem Gewebe hingegen nicht. Bei letzterer Anwendung muss vor der eigentlichen Färbung ein präparatorischer Zwischenschritt erfolgen, nämlich eine enzymatische Zellvereinzelnung. Die anschließende Färbung wiederum ist vom Prinzip her derjenigen an zytologischen Präparaten gleich.

a) Vorbereitung zytologischer Präparate für die Feulgen-Färbung

Um die zytologischen Präparate nach Feulgen umfärben zu können, mussten sie zunächst entdeckelt werden. Hierzu wurden die Objektträger in eine Küvette mit Xylol gestellt, welches nach und nach das Eindeckmedium in Lösung bringt, so dass sich das Deckglas von selber vom Präparat löst. Hierfür sind, je nach Alter der Präparate, ein bis sieben Tage zu veranschlagen. Der gesamte Vorgang muss dabei passiv erfolgen, da bei aktivem „Nachhelfen“, beispielsweise durch Ziehen an einem noch teilweise haftenden Deckglas, ein unkalkulierbarer Verlust an Zellen zu befürchten ist.

Will man bestimmte Stellen des zytologischen Präparates gezielt messen, so kann man vor der Entdeckung des Präparates dessen Konturen mit einem Kopierer auf ein Papier bringen, um so Markierungen auf dem Präparat (üblicherweise Filzstiftkreise etc.) rekonstruieren zu können. Diese Vorbereitungsschritte für die Feulgen-Färbung erfolgten nach internen Regelungen des Schwerpunktes für Cytopathologie.

b) Gewinnung zytologischer Ausstriche aus Paraffinblöcken durch enzymatische Zellvereinzelung

Auf histologischen Schnitten ist zwar die Zell- und Gewebemorphologie beurteilbar, jedoch steht der Quantifizierung der Kerneigenschaften die Tatsache entgegen, dass die Zellkerne geschnitten sind. Deswegen kann eine DNA-Bildzytometrie an histologischem Material nur erfolgen, wenn zuvor an dicken Schnitten ein enzymatisches Zellvereinzelungsverfahren angewendet wird.

Auf den histologischen Schnitten wurde die zur Untersuchung mittels DNA-Bildzytometrie geeignete Stelle markiert. Die markierten Stellen wurden dann auf den Paraffinblock übertragen. Aus dem markierten Bereich wurden nun ca. 5-6 Schnitte vom Paraffinblock abgenommen, deren Dicke ca. 50-100 μm betrug, und in einen Nylongazebeutel gegeben. Der Beutel wurde verschweißt und in verchromte Biopsiekassetten abgelegt (Abb. 5) [45].

Entparaffinierung	
Xylol	30 Minuten
Xylol	30 Minuten
Rehydrierung	
100% Ethanol	30 Minuten
96% Ethanol	30 Minuten
70% Ethanol	30 Minuten
Aqua dest.	30 Minuten
Aqua dest.	30 Minuten



Tabelle 5: Entparaffinierung und Rehydrierung der Zellvereinzelungen

Abb. 5: Verchromte Biopsiekassette mit Nylongazebeutel, verwendet für die Zellvereinzelung

Hieran schloss sich (siehe Tabelle 5) die Entparaffinierung in Xylol und die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe an, jeweils durchgeführt auf einem Schüttler. Danach erfolgte die enzymatische Pepsinverdauung; hierzu wurde der Nylongazebeutel mit dem Material in eine auf 37 °C vorgewärmte Pepsinlösung (25mg Pepsin Porcine ad 5ml 0,07M HCl) überführt und für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml kaltem PBS-Puffer gestoppt. Diese Inkubationen erfolgten in einem Reagenzglas; die nunmehr ausgelösten Zellkerne, die die Maschen der Gaze nunmehr passierten konnten, befanden sich sedimentiert in der

vorgelegten Flüssigkeit. Nach Entfernung des Überstandes wurde die Restflüssigkeit in mit einer Zytozentrifuge nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 400g auf zwei Objektträger aufgebracht. Nach Lufttrocknung schloss sich dann die Feulgen-Färbung an [45].

Der Ablauf der Feulgen-Färbung, die in einem modifizierten Färbeautomaten Varistain 24-4 erfolgte, ist in Tabelle 6 beschrieben.

Feulgen-Färbung		
1	Xylol	15 Minuten
2	99,5% Ethanol	5 Minuten
3	96% Ethanol	5 Minuten
4	10% gepuffertes Formalin	50 Minuten
5	Aqua dest.	10 Minuten
6	Aqua dest.	5 Minuten
7	5 N HCl 27 °C in Heizkuvette	60 Minuten
8	Aqua dest.	2 Minuten
9	Aqua dest.	2 Minuten
10	Aqua dest.	2 Minuten
11	Schiff's Reagenz	60 Minuten
12	SO ₂ -Wasser	5 Minuten
13	SO ₂ -Wasser	5 Minuten
14	SO ₂ -Wasser	5 Minuten
15	Aqua dest.	1 Minute
16	Aqua dest.	1 Minute
17	70% Ethanol	3 Minuten
18	96% Ethanol	3 Minuten
19	99,5% Ethanol	3 Minuten
20	Xylol	15 Minuten

Tabelle 6: Feulgen-Färbung nach Quelle: [40]^{1, 2}

Nach der Färbung erfolgte die Eindeckelung der Objektträger mit dem Eindeckmedium Entellan und einem üblichen Deckglas.

c) Die DNA-Bildzytometrie:

Die DNA-bildzytometrischen Messungen wurden unter Beachtung der international konsentierten messmethodischen Anforderungen mit einem PC-gestützten Bildanalysestystem MotiCyte-DNA (Xianmin / Wetzlar) vorgenommen [46]. Hierbei

¹ Die Färbung für die Zellvereinzelnung beginnt ab dem Schritt 2, also mit 99,5%-igem Ethanol.

² Die nach Feulgen gefärbten Präparate sind lichtempfindlich, deswegen müssen diese im Dunkeln aufbewahrt werden.

wird ein konventionelles Lichtmikroskop, das mit einer Farb-Videokamera ausgestattet ist, mit einem Computer mit entsprechender Software verbunden. Diese erlaubt nach einer technischen Kalibrierung beim eigentlichen Messvorgang die manuelle Auswahl und Klassifikation der individuellen Zellen als Eichzellen bzw. Messzellen. Ferner sind verschiedene Bildkorrekturen bei unvollständiger oder nicht optimaler Kerndetektion möglich. Außerdem erfolgt Software-unterstützt auch die Auswertung des Messfiles an einem Histogramm und unter Bereitstellung verschiedener grundlegender Daten der DNA-Verteilung (Abb. 6) [23].

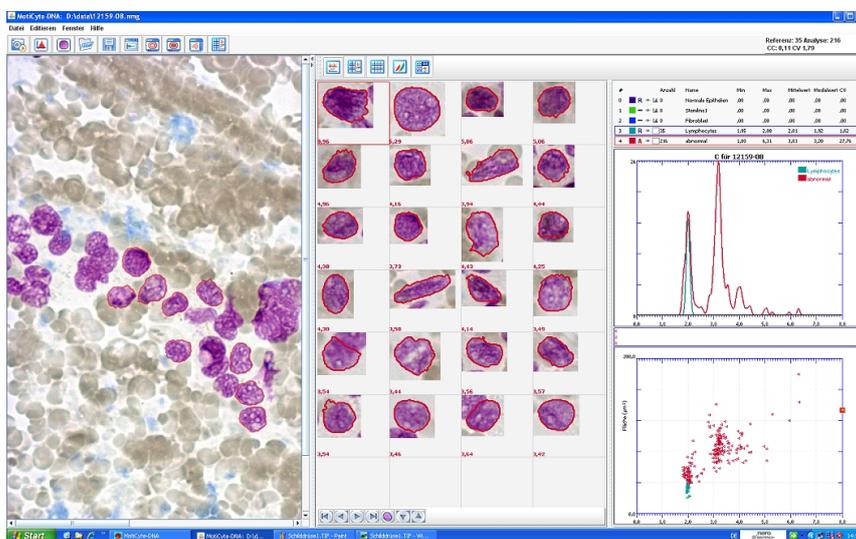


Abb. 6: Interaktiver Monitor bei der DNA-Bildzytometrie [47]

Vor Beginn der Messung musste das System kalibriert werden. Das heißt, auf dem PC-Bildschirm wurde eine Zellgruppe lokalisiert und scharf gestellt. Danach wurde an einer Präparatstelle, die keine Zellen enthielt, ein sogenannter Weißabgleich durchgeführt. Nach dieser Kalibrierung konnte die eigentliche Messung von Eichzellen und Messzellen beginnen [23, 45, 48], die mit der 40 fachen Objektivvergrößerung erfolgt.

Da das Färberesultat der Feulgen-Färbung als stöchiometrisch und somit proportional zum DNA-Gehalt erfasst wird, wurde bei der eigentlichen Messung die integrierte optische Dichte (IOD) aller ausgewählten Feulgen-gefärbten Zellkerne erfasst [23, 40, 49]. Hierzu wurde automatisiert nach Anwahl der Zelle über einen Mausklick eine schmale Maske um den Zellkern gelegt und die Farbintensität, ermittelt an den einzelnen Bildpunkten, aufaddiert.

Voraussetzung für die Auswertung der Messung war die Bestimmung des DNA-Gehaltes von mindestens 30 Referenzzellen als normaler diploider $2c$ -Wert [50, 51]. Bei den Mundschleimhautabstrichen werden üblicherweise normale Plattenepithelien als Referenzzellen verwendet. Für den Fall, dass nicht genügend normale Plattenepithelien vorhanden sind, kann man sich mit Fibroblasten oder Lymphozyten behelfen. Granulozyten sind häufig weniger geeignet, weil ihre Segmente zu klein und zu dunkel bzw. pyknotisch sind. Der Variationskoeffizient (CV) der Messwerte für die Eichzellpopulation, d.h. die Standardabweichung in Prozent vom Mittelwert, sollte $\leq 5\%$ sein [51].

Idealerweise sollen mindestens 300 Analysezellen vorhanden sein. Als Analysezellen wurden hier diejenigen Plattenepithelien definiert, die vom Normalen nach den üblichen Kriterien der Zytologie signifikant abwichen und somit die Grundlagen für die Zuordnung der Läsion in die zytologischen Kategorien „zweifelhaft“, „dringender Verdacht“ bzw. „positiv“ darstellten.

DNA-zytometrische Meßparameter

Die Auswertung der Messfiles richtete sich nach den seitens der ESACP („*European Society for Analytical and Cellular Pathology*“) akzeptierten Auswertealgorithmen zur Detektion von numerischer DNA-Aneuploidie, welche auf der Darstellung einer aneuploiden DNA-Stammlinie als Nachweis einer chromosomalen abnormen klonalen Zellpopulation oder von Einzelzellaneuploidie beruhen [50].

Eine DNA-Stammlinie ist dabei als die G_0/G_1 -Fraktion einer proliferierenden Zellpopulation in einem DNA-Histogramm definiert und wird als aneuploid interpretiert, wenn sie außerhalb des Bereiches von $2c \pm 0,2c$ bzw. außerhalb von $4c \pm 0,4c$ liegt. Alle anderen DNA-Stammlinienlagen zeigen keine Aneuploidie und können als diploid, tetraploid bzw. ggfls. auch als polyploid benannt werden. Bei der Einzelzellaneuploidie wird das Auftreten *seltener Events* berücksichtigt, wobei diejenigen Zellen erfasst werden, die oberhalb der höchsten, bei gutartigen Zellpopulationen vorkommenden Polyploidisierungsstufe liegen. Im Falle der Plattenepithelien der Mundhöhle geht man von einer möglichen Polyploidisierung bis $8c$ aus, so dass unter Berücksichtigung eines Sicherheitsabstandes Zellen oberhalb von $9c$ ($9cEE$, „*9c Exceeding Event*“) als aneuploid akzeptiert werden [49-51].

Interpretation des DNA-Histogramms:

Als DNA-aneuploid wurden diejenigen Präparate eingestuft, die mindestens eine aneuploide DNA-Stammlinie aufwiesen oder mindestens eine Zelle oberhalb von 9c ($9cEE \geq 1$) aufwiesen.

Als verdächtig auf DNA-Aneuploidie wurden Präparate interpretiert, die nicht beweisbar DNA-aneuploid waren, deren DNA-Verteilung sich aber deutlich vom Normalen unterschied; feste internationale Kriterien hierfür gibt es nicht. Entsprechend bewertet wurden Präparate mit breiter Verdopplungszone einer diploiden Stammlinie im 4c-Bereich oder mit einer originär tetraploiden, also bei 4c gelegenen höchsten Stammlinie.

Alle übrigen Präparate wurden als nicht DNA-aneuploid angesehen.

Als Sonderfall nicht DNA-aneuploider Ergebnisse ist noch die DNA-Polyploidie abzugrenzen. Sie wird angenommen, wenn sich bei einer diploiden DNA-Stammlinie nicht nur eine Verdoppelung bei ca. 4c darstellt, sondern auch Zellen bis zum 8c-Bereich nachweisbar sind.

3.3.4 Silbernitrat-Färbung und AgNOR-Analyse

- a) Silbernitrat-Färbung der zytologischen Präparate und der Zellsuspensionen nach Zellvereinzellung der histologischen Präparate

Für die AgNOR-Analyse wurden die nach Feulgen gefärbten Präparate nach DNA-Bildzytometrie umgefärbt. Die 20 Präparate der 10 gesunden Probanden, bei denen ja keine DNA-Bildzytometrie vorgenommen wurde, wurden aus der Papanicolaou-Färbung in die AgNOR-Analyse überführt.

Nach Entdeckung der zytologischen Präparate durch Einstellen in Xylol erfolgte die Silbernitrat-Färbung, wie sie in der Tabelle 7 beschrieben ist.

1	Xylol	5	Minuten
2	99,5% Ethanol	5	Minuten
3	96% Ethanol	5	Minuten
4	70% Ethanol	5	Minuten
5	50% Ethanol	5	Minuten
6	Aqua bidest.	5	Minuten
7	1 ml Silbernitratlösung	20 bis 25	Minuten
8	Silbernitrat ablaufen lassen		
9	Aqua bidest.	3x	spülen
10	10% Natriumthiosulfat	10	Minuten
11	Spülen mit fließendem Leitungswasser	5	Minuten
12	50% Ethanol	5	Minuten
13	70% Ethanol	5	Minuten
14	96% Ethanol	5	Minuten
15	99,5% Ethanol	5	Minuten
16	Xylol	5	Minuten

Tabelle 7: Silbernitrat-basierte AgNOR-Darstellung, nach Quelle: [40]^{3, 4}

Für die Silbernitrat-Färbung wurde eine 50%-ige wässrige Lösung verwendet; hierzu wurden 10 g kristallines Silbernitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 20 ml Aqua bidest. gelöst. Für die Silbernitrat-Gebrauchslösung wurde ein Teil Gelatine-Ameisensäure-Lösung mit zwei Teilen 50% Silbernitrat Lösung gemischt [40].

b) Die AgNOR-Analyse:

Die AgNOR-Analyse erfolgte manuell auf einen konventionellen Mikroskop (Zeiss-Mikroskop) mit 100x Vergrößerung und mit Anwendung von Öl, wobei pro Präparat mindestens 100 auffällige plattenepitheliale Zellkerne (wenn so viele vorhanden) begutachtet wurden.

Als Auswertvariablen wurden nach der Arbeitsgruppe von Crocker *Kluster* und *Satelliten* erfasst. „Als *Kluster* werden diejenigen Silbernitrat-gefärbten Strukturen angesehen, die in Gruppen in dem Nukleus liegen.“ „Die *Satelliten* sind die

³ Die Schritte 7 bis 10 erfolgen in einer Dunkelkammer.

⁴ Die Zeit der Färbung mit Silbernitrat wurde im Vergleich zu dem Standardprotokoll modifiziert und nach zahlreichen Versuchen an den Bedarf der vorliegenden Präparate angepasst. Die nach Feulgen gefärbten zytologischen Abstriche wurden 20 Minuten und die nach Feulgen gefärbten Zellvereinzelnungen 25 Minuten gefärbt. Bei Bedarf wurden die Präparate nachgefärbt, wenn die NORs nicht ausreichend auswertbar waren.

individuellen Punkte, die außerhalb der Kluster liegen“ [52, 53]. Dokumentiert wurden jeweils pro Zelle die Anzahl von *Klustern*, *Satelliten* und ihre Summe, benannt als *Kluster+Satelliten*. Die jeweilige Anzahl wurde mit der Anzahl der Kerne multipliziert, summiert und der Mittelwert errechnet [23, 52].

3.4. Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SPSS Statistics 19. In der SPSS-Datenbank wurden die verschiedenen Variablenarten der Erhebung (nominale, qualitative und quantitative Variablen) sowie die „*Missing-Werte*“ bestimmt. Darüber hinaus wurde in manchen Fällen eine Recodierung der Daten vorgenommen, so dass dadurch neue Variablen entstanden sind.

Auf der Ebene der deskriptiven Statistik und sofern es sich um qualitative Variablen handelte, wurden Tabellen mit monovariablen Häufigkeitsverteilungen sowie mit Korrelationen angefertigt. Im Falle der quantitativen Variablen wurden darüber hinaus der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. In manchen Fällen wurden ergänzend die Variationsbreite der Werte (kleinster und größter Messwert) und der Median dokumentiert.

Folgende Testverfahren kamen zur Anwendung:

- a) Um die Korrelation zwischen zwei qualitativen Variablen zu prüfen, wurde der *Pearson Chi²-Test* angewandt. Falls die Daten die statistischen Grundvoraussetzungen nicht erfüllten, wurden die Werte der einen oder beider Variablen recodiert und /oder alternativ der *Fisher's Exact Test* durchgeführt.
- b) Für die Prüfung des Zusammenhangs zwischen einer qualitativen Variablen mit zwei Kategorien und einer quantitativen Variable wurde der *t-Test* für unabhängige Stichproben verwendet. Im Falle von heterogenen Streuungen der quantitativen Variablen wurde auf einen angepassten *t-Test-Wert* für ungleiche Streuungen zurückgegriffen.

- c) Außerdem wurde zur Prüfung des Zusammenhangs zwischen zwei quantitativen Variablen (bivariate linear correlation) der *Pearson's r Korrelationskoeffizient* errechnet.

In allen Fällen, in denen die statistische Korrelation zwischen zwei Variablen geprüft wurde, wurde statistische Signifikanz ab $p < 0.05$ angenommen.

Die statistischen Auswertungen wurden, da manche Patienten mehr als eine Läsion der Mundschleimhaut gezeigt haben, für die gesamte Anzahl der Läsionen durchgeführt. Für die 111 Patienten mit insgesamt 135 Läsionen, standen 134 Präparate zur Auswertung zur Verfügung. Ein zytologisches Präparat, das sich als unzureichend erwies, wurde nicht einbezogen.

Für die 49 Patienten standen für die DNA-Bildzytometrie 60 zytologische und 60 histologische Präparate zur Verfügung, nachdem die Ausschlusskriterien (Anzahl der Zellen, Qualität des Präparats usw.) überprüft worden sind. Für die AgNOR-Analyse und nach Überprüfung der Ausschlusskriterien, standen 60 zytologische und 61 histologische Präparate zur Verfügung.

Beim statistischen Vergleich mehrerer Methoden konnten die unvollständigen Fälle nicht berücksichtigt werden. Für solche Vergleiche standen daher 57 Präparate zur Verfügung.

4. Ergebnisse

4.1 Risikofaktoren und Malignität

Beim Vergleich zwischen Krebs-/Dysplasie Patienten auf der einen Seite und Patienten ohne Malignität auf der anderen Seite zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied bzgl. der Menge des täglichen Tabakkonsums; die Patienten mit Malignität hatten statistisch signifikant ($p=0.019$) mehr geraucht als die Patienten ohne Malignität. Die Krebs-/Dysplasie Patienten rauchten durchschnittlich 43,4 Jahre und die Patienten ohne Malignität 31,56 Jahre, wobei allerdings diese Zeitdifferenz statistisch nicht signifikant war ($p=0.068$).

Zwischen Alkoholkonsum und Krebs beziehungsweise Dysplasie wurde kein statistisch signifikanter Zusammenhang gefunden.

4.2 Klinische Diagnostik

4.2.1 Lokalisation der Läsionen

Insgesamt wurde 135 Läsionen untersucht, deren Lokalisation in der Tabelle 8 und der Abbildung 7 dargestellt sind. Die meisten Läsionen fanden sich an der Wangenschleimhaut (61 oder 45,2%) oder der Gingiva (35 oder 25,9%).

Lokalisation	Läsionen	
	Anzahl	%
Planum buccale rechts	32	23,70%
Planum buccale links	29	21,50%
Oberkiefer Gingiva	13	9,70%
Unterkiefer Gingiva	22	16,30%
Gaumen	7	5,20%
Zungenrand rechts	8	5,90%
Zungenrand links	8	5,90%
Mundboden	10	7,40%
Pharynx	2	1,50%
Zungenrücken	2	1,50%
Oberlippe	1	0,70%
Unterlippe	1	0,70%
Gesamt	135	100%

Tabelle 8: Lokalisation der Läsionen

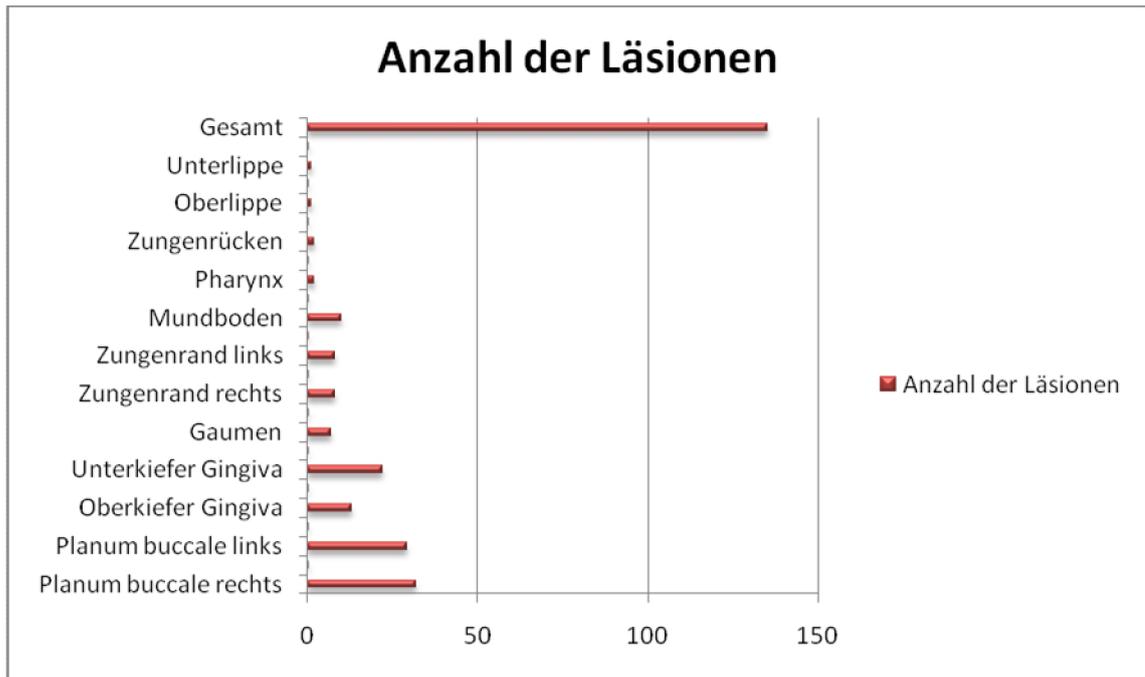


Abb. 7: Lokalisation der Läsionen

4.2.2 Klinische Diagnosen

Von den 135 Läsionen wurden klinisch die meisten als Leukoplakie (64 Läsionen bzw. 47,4%) (Abb. 8) und als Lichen planus (51 Läsionen bzw. 37,7%) (Abb. 9) - in allen seinen Formen und deren Kombinationen - diagnostiziert. Weiterhin wurden ein *Carcinoma in situ* (0,7%) und 12 Karzinome (8,8%) (Abb. 10 u. 11) festgestellt.



Abb. 8: Leukoplakie der Zunge



Abb. 9: Lichen planus reticularis des linken Planum buccale



Abb. 10: Plattenepithelkarzinom auf dem Boden eines erosiven Lichens



Abb. 11: Plattenepithelkarzinom am rechten Kieferkamm und Mundboden

Die Tabelle 9 und die Abbildung 12 zeigen die Verteilung der klinischen Diagnosen.

Klinische Diagnose	Anzahl der Läsionen	%
Lichen	51	37,8%
Leukoplakie	65	48,1%
Cond. acum.	2	1,5%
GvHD	3	2,2%
Ca	14	10,4%
Gesamt	135	100%

Tabelle 9: Verteilung der klinischen Diagnosen (n=135)

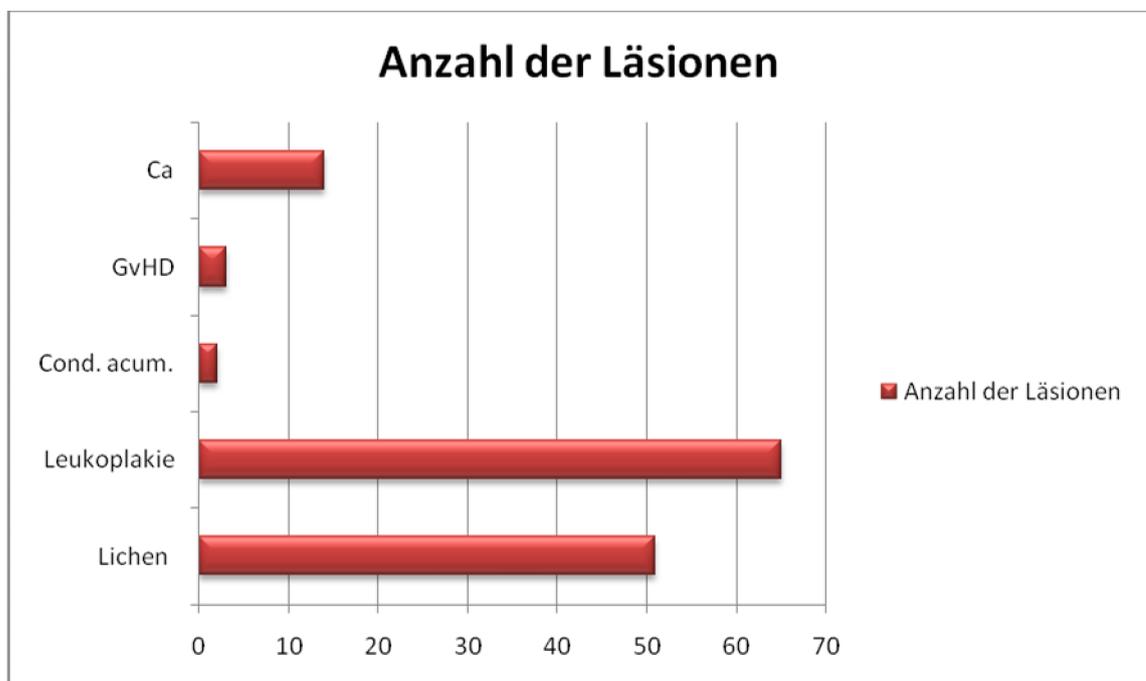


Abb. 12: Verteilung der klinischen Diagnosen, zusammengefasst nach der Diagnose

4.3 Histologische und zytologische Diagnostik

Insgesamt wurden an den 135 Läsionen der Patienten folgende histologischen Diagnosen erhalten: (zu Details der Diagnosen siehe Tabelle 10)

32 Fälle mit Lichen planus

65 Fälle mit Leukoplakie

11 Fälle mit Karzinomen (Abb. 13)

9 Fälle mit Dysplasie (Abb. 14)

18 Fälle mit einer anderen histologischen Diagnose, z.B: Hyperkeratose, chronische Entzündung usw.

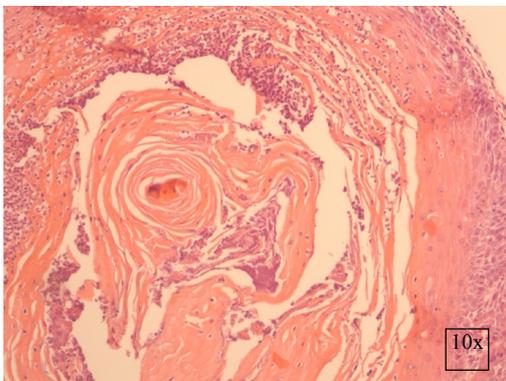


Abb. 13: Plattenepithelkarzinom auf dem Boden eines erosiven Lichens-Histologie (10x Vergrößerung)

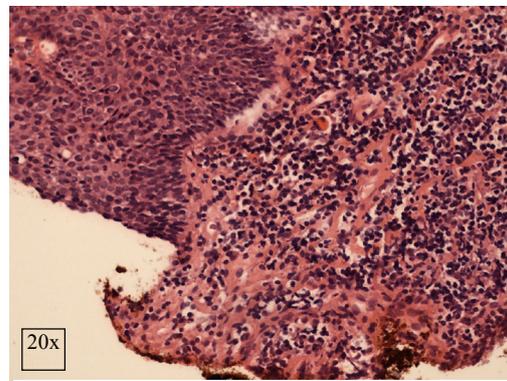


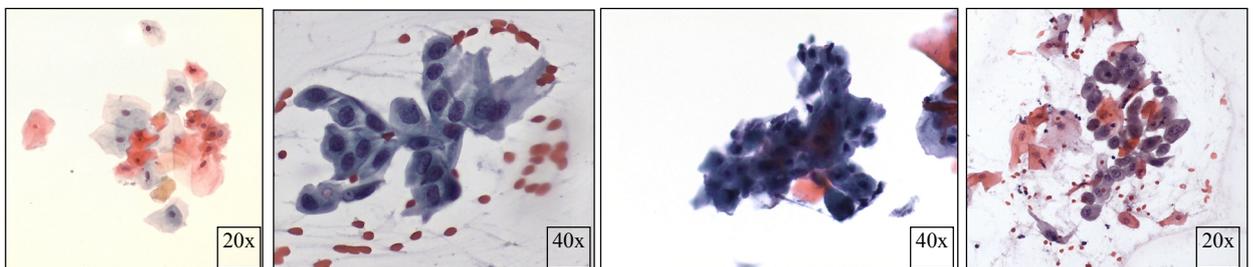
Abb. 14: Hochgradige Dysplasie (20x Vergrößerung)

Histologische Diagnose	Läsionen	
	Anzahl	%
Lichen	32	23,7
Leukoplakie	65	48,1
Condyloma acuminatum mit geringer, mittlerer oder schwerer Dysplasie	2	1,5
Dysplasie	7	5,2
Ca	11	8,2
andere histologische Diagnose	18	13,3
Gesamt	135	100

Tabelle 10: Histologische Diagnosen (n=135)

Die Bürstenbiopsien zeigten zusammengefasst folgende Ergebnisse, deren Details in der Tabelle 11 wiedergegeben sind:

- 1 unzureichend
- 114 negativ (Abb. 15)
- 12 zweifelhaft (Abb. 16)
- 3 dringend verdächtig (Abb. 17)
- 5 positiv (Abb. 18)



Von links nach rechts:

Abb. 15: Nach Papanicolaou gefärbtes negatives zytologisches Präparat (20x Vergrößerung)

Abb. 16: Nach Papanicolaou gefärbtes zweifelhaftes zytologisches Präparat (40x Vergrößerung)

Abb. 17: Nach Papanicolaou gefärbtes dringend verdächtiges zytologisches Präparat (40x Vergrößerung)

Abb. 18: Nach Papanicolaou gefärbtes positives zytologisches Präparat (20x Vergrößerung)

Zytologie -Ergebnisse	Läsionen	
	Anzahl	%
insuffizientes Material	1	0,8%
negativ	114	84,4%
zweifelhaft	12	8,9%
dringender Verdacht	3	2,2%
positiv	5	3,7%
Gesamt	135	100%

Tabelle 11: Zytologische Diagnosen (n=135)

Im Folgenden soll schließlich die Beziehung zwischen den histologischen Diagnosen und den zytologischen Diagnosen dargestellt werden (Tabelle 12).

Histologische Diagnose	Zytologische Diagnose					
	unzureichend	negativ	zweifelhaft	dringender Verdacht	positive	Total
Lichen	0	30	2	0	0	32
Leukoplakie	0	61	4	0	0	65
Karzinom	0	3	3	1	4	11
Condyloma acuminatum mit Dysplasie	0	1	1	0	0	2
Dysplasie	1	2	1	2	1	7
andere	0	17	1	0	0	18
Total	1	114	12	3	5	135
	unzureichend	negativ	zweifelhaft	dringender Verdacht	positive	Total
gutartig	0	108	7	0	0	115
Dysplasie	1	3	2	2	1	9
Karzinom	0	3	3	1	4	11
Total	1	114	12	3	5	135

Tabelle 12: Vergleich der Übereinstimmung zwischen den histologischen und den zytologischen Diagnosen aller Fälle; oben im Detail, unten nach biologischer Wertigkeit der Histologie geordnet (n=135)

Die Tabelle 12 lässt, unter Weglassung des zytologisch nicht auswertbaren Falles, erkennen, dass von den 19 histologisch gesicherten Dysplasien und Karzinomen in acht Fällen zytologisch mindestens ein dringender Verdacht auf Tumorzellen erhoben wurde und in weiteren fünf Fällen ein zweifelhafter Befund vorlag, wohingegen sechs Ausstriche negativ waren. Dies entspricht abhängig davon, ob man die zweifelhaften Einstufungen als noch „negativ“ oder als bereits „positiv“ wertet, einer Sensitivität von 42,1% (8/19) bzw. 68,4% (13/19).

Von den 115 histologisch negativen Fällen wurden 108 auch zytologisch als unverdächtig, also gutartig, beurteilt; sieben wurden als zweifelhaft eingestuft, keiner als dringend verdächtig oder positiv. In Abhängigkeit von der Frage, ob man die zweifelhaften Diagnosen bereits als „positiv“ oder noch als „negativ“ definiert, ergibt sich eine Spezifität der zytologischen Untersuchung von 100% bzw. 93,9% (108/115).

Da sich die späteren Untersuchungen mit DNA-Bildzytometrie und AgNOR-Analyse auf ein kleineres Kollektiv beschränkten, sollen nun deren Daten gleichartig dargestellt werden. Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die Datenverteilung.

Histologische Diagnose	Zytologische Diagnose					
	unzureichend	negativ	zweifelhaft	dringender Verdacht	positive	Total
Lichen	0	9	2	0	0	11
Leukoplakie	0	19	4	0	0	23
Karzinom	0	3	3	1	4	11
Condyloma acuminatum mit Dysplasie	0	1	1	0	0	2
Dysplasie	0	2	1	0	1	4
andere	0	5	1	0	0	6
Total	0	39	12	1	5	57
	unzureichend	negativ	zweifelhaft	dringender Verdacht	positive	Total
gutartig	0	33	7	0	0	40
Dysplasie	0	3	2	0	1	6
Karzinom	0	3	3	1	4	11
Total	0	39	12	1	5	57

Tabelle 13: Vergleich der Übereinstimmung zwischen den histologischen und den zytologischen Diagnosen; oben im Detail, unten nach biologischer Wertigkeit der Histologie geordnet (n=57)

Die Tabelle 13 lässt ebenfalls erkennen, dass von den 17 histologisch gesicherten Dysplasien und Karzinomen in sechs Fällen mindestens ein dringender Verdacht auf Tumorzellen erhoben wurde und in weiteren fünf Fällen ein zweifelhafter Befund vorlag, wohingegen sechs Ausstriche negativ waren. Dies entspricht abhängig davon, ob man die zweifelhaften Einstufungen als noch „negativ“ oder als bereits „positiv“ wertet, einer Sensitivität von 35,3% (6/17) bzw. 64,7% (11/17).

Von den 40 histologisch negativen Fällen wurden 33 auch zytologisch als unverdächtig, also gutartig, beurteilt; sieben wurden als zweifelhaft eingestuft, keiner als dringend verdächtig oder positiv. In Abhängigkeit von der Frage, ob man die zweifelhaften Diagnosen bereits als „positiv“ oder noch als „negativ“ definiert, ergibt sich eine Spezifität der zytologischen Untersuchung von 100% bzw. 82,5% (33/40).

4.4. Adjuvante Diagnostik

4.4.1 DNA-Bildzytometrie

Allgemeine Ergebnisübersicht

Von den 60 zytologischen Abstrichen, die mittels DNA-Bildzytometrie ausgewertet wurden, waren 44 (73,3%) non-aneuploid (Abb. 19 u. 21), 4 (6,7%) verdächtig auf Aneuploidie und 12 (20%) aneuploid (Abb. 20 u. 22).

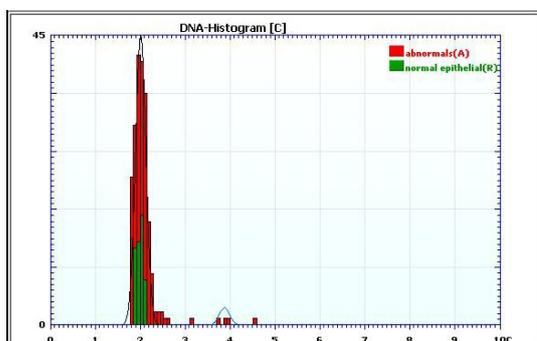


Abb. 19: non-aneuploides DNA-Histogramm eines zytologischen Präparates

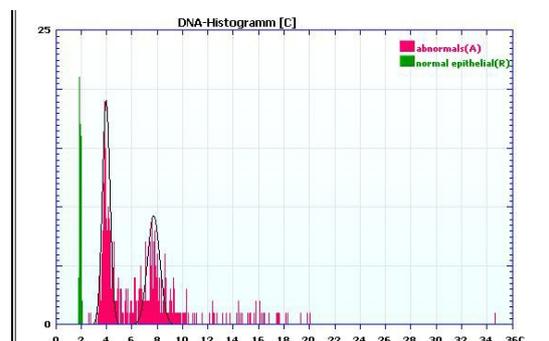


Abb. 20: aneuploides DNA-Histogramm eines zytologischen Präparates

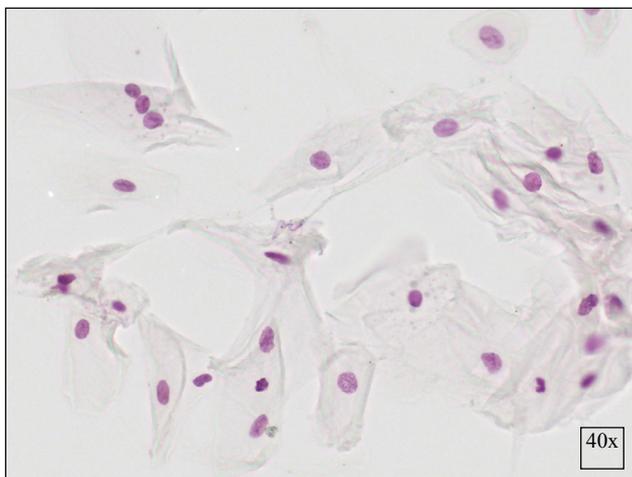


Abb. 21: Nach Feulgen gefärbtes negatives zytologisches Präparat (40x Vergrößerung)

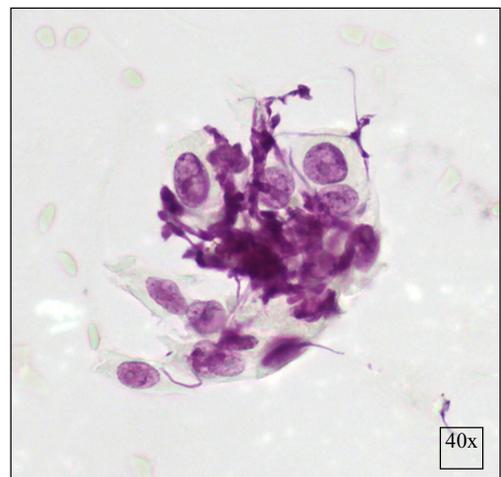


Abb. 22: Nach Feulgen gefärbtes positives zytologisches Präparat (40x Vergrößerung)

Die Auswertung der DNA-Bildzytometrie nach Zellvereinzelung von den histologischen Präparaten ergab in 41 (68,3%) als Ergebnis non-aneuploid, in drei Fällen (5%) den Verdacht auf Aneuploidie und in 16 Fällen (26,7%) Aneuploidie (Abb. 23).

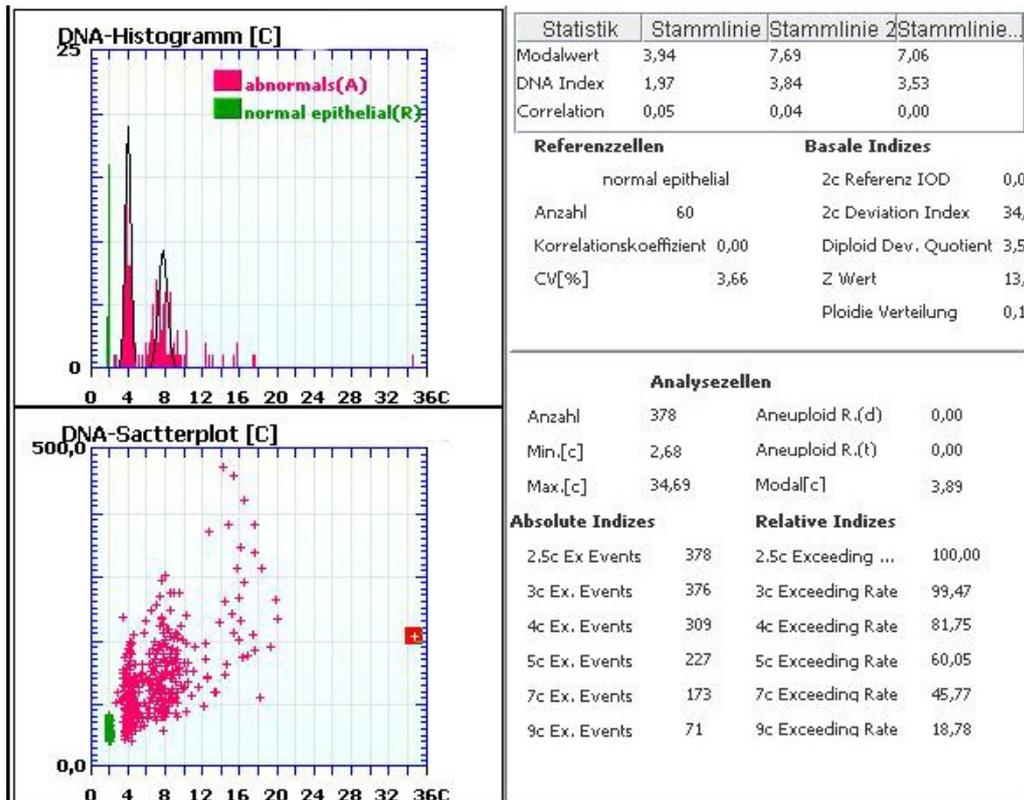


Abb. 23: Beispiel eines aneuploides DNA-Histogramms eines histologischen Präparates; 9cEE > 1

Die Ergebnisse sind noch einmal in der Tabelle 14 zusammengefasst.

DNA-Bildzytometrie	60 Läsionen		
	Ergebnisse	Anzahl	%
Zytologie	<i>non-Aneuploid</i>	44	73,3%
	<i>d.V.auf Aneuploidie</i>	4	6,7%
	<i>Aneuploid</i>	12	20,0%
Histologie	<i>non-Aneuploid</i>	41	68,3%
	<i>d.V.auf Aneuploidie</i>	3	5,0%
	<i>Aneuploid</i>	16	26,7%

Tabelle 14: Verteilung der Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie der Zytologie und der Histologie (n=60)

Von den insgesamt 12 aneuploiden Befunden der DNA-Bildzytometrie der Zytologie waren zwei (16,7%) aneuploid wegen Zellen $\geq 9c$ und drei (25%) wegen aneuploiden Stammlinien. Sieben Fälle zeigten beiden Veränderungen.

Von den insgesamt 16 aneuploiden Befunden der DNA-Bildzytometrie der Histologie wiesen acht (50%) ausschließlich eine aneuploide auf, weitere acht zeigten eine aneuploide Stammlinien und Zellen $\geq 9c$.

Diagnostische Auswertung der DNA-Bildzytometrie

Nachfolgend werden die Ergebnisse der DNA-bildzytometrischen Messungen vorgestellt. Die Resultate der histologischen Biopsien werden als Standard herangezogen.

In der Tabelle 15 ist die Verteilung der Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie als Korrelationsmatrix zwischen Histologie und Zytologie wiedergegeben. Die Analyse bezieht sich auf die 57 Präparate, die für den Vergleich der Methoden zur Verfügung standen.

DNA-Bildzytometrie Histologie	DNA-Bildzytometrie Zytologie			
	nicht aneuploid	V.a. Aneuploidie	Aneuploidie	Total
57 Läsionen				
nicht aneuploid	38	2	0	40
V.a. Aneuploidie	2	0	1	3
Aneuploidie	2	2	10	14
Total	42	4	11	57

Tabelle 15: Verteilung der Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie als Korrelationsmatrix zwischen Histologie und Zytologie (n=57)

Bezogen auf alle 57 untersuchten Fälle ergab sich eine Übereinstimmung der DNA-bildzytometrischen Analyse mit der Histologie in 48 Fällen (= 84,2 %). Vergleicht man die Einordnung als „nicht aneuploid“ mit den anderen beiden Gruppen gemeinsam, so erhöht sich die Zahl gleichartig eingestufte Messpaare auf 51 (= 89,5%). Vier Inkongruenzen gehen auf Fälle zurück, bei denen das zytologische Messergebnis nicht aneuploid war, das histologische aber mindestens einen Verdacht auf Aneuploidie zeigte; in zwei Fällen war es umgekehrt.

Die Tabellen 16 und 17 stellen die Verteilung der Ergebnisse der konventionellen histologischen Beurteilung mit der DNA-Bildzytometrie der Histologien und der Zytologien dar.

Histologische Beurteilung	DNA-Bildzytometrie aus histologischen Präparaten			
	nicht aneuploid	V.a. Aneuploidie	Aneuploidie	Total
regelrechte Schleimhaut	0	0	0	0
Lichen	11	0	0	11
Leukoplakie	20	2	2	24
Karzinom	3	0	8	11
Condyloma acuminatum mit Dysplasie	0	1	1	2
Dysplasie	1	0	5	6
andere	6	0	0	6
gutartig	37	2	2	41
Dysplasie	1	1	6	8
Karzinom	3	0	8	11
Total	41	3	16	60

Tabelle 16: Verteilung der Ergebnisse der histologischen Beurteilung mit der DNA-Bildzytometrie nach Zellvereinzelung von histologischem Gewebe (n=60)

Insgesamt zeigte sich, dass unter den auf Aneuploidie verdächtigen oder manifest aneuploiden Läsionen 15 der 19 Dysplasien bzw. Karzinome befindlich waren (Sensitivität: 78,9%), wohingegen vier keine erkennbare Aneuploidie aufwiesen. Von den 41 als gutartig eingestuften histologischen Veränderungen wiesen vier Hinweise auf Aneuploidie oder manifeste Aneuploidie auf (Spezifität: 90,2%). Für die 57 Fälle, die für den Vergleich der Methoden verwendet wurden, betrug die Sensitivität 76,5% und die Spezifität 90%.

Histologische Beurteilung	DNA-Bildzytometrie Zytologie			
	nicht aneuploid	V.a. Aneuploidie	Aneuploidie	Total
regelrechte Schleimhaut	0	0	0	0
Lichen	11	0	0	11
Leukoplakie	23	0	1	24
Karzinom	2	3	6	11
Condyloma acuminatum mit Dysplasie	0	0	2	2
Dysplasie	2	1	3	6
andere	6	0	0	6
gutartig	40	0	1	41
Dysplasie	2	1	5	8
Karzinom	2	3	6	11
Total	44	4	12	60

Tabelle 17: Verteilung der Ergebnisse der histologischen Beurteilung mit der DNA-Bildzytometrie von zytologischen Ausstrichen (n=60)

Unter den zumindest auf Aneuploidie verdächtigen oder manifest aneuploiden Läsionen waren auch hier 15 der 19 später histologisch gesicherten Dysplasien bzw. Karzinome (Sensitivität: 78,9%), vier Proben wurden als nicht aneuploid eingestuft. Von den 41 später gutartigen histologischen Läsionen war eine zytologisch aneuploid (Spezifität:

97,6%). Für die 57 Fälle, die für den Vergleich der Methoden verwendet wurden, betrug die Sensitivität 82,4% und die Spezifität 97,5%.

4.4.2 AgNOR-Analyse

Allgemeine Ergebnisübersicht

In diesem Kapitel erfolgt die Darstellung der Ergebnisse der AgNOR-Analyse (Abb. 24). Zunächst wurden, da es keine Literaturangaben über eine normale AgNOR-Ausstattung unauffälliger Plattenepithelien gibt, die Daten von 20 Kontrollabstriche vom Planum buccale links bzw. vom linken Zungenrand, entnommen jeweils bei zehn gesunden Probanden, ausgewertet (Tabelle 18).

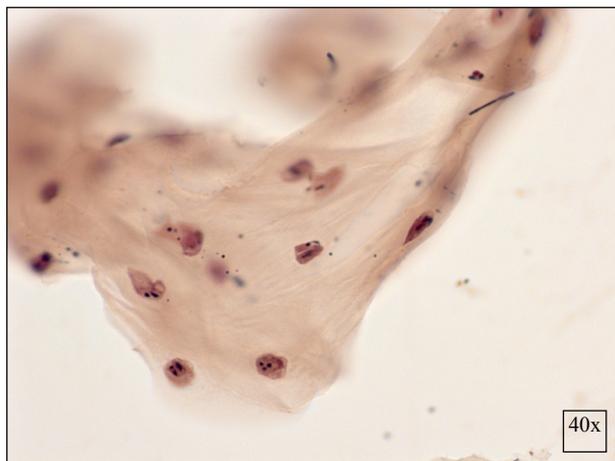


Abb. 24: Mit kolloidaler Silbernitrat- lösung gefärbtes zweifelhaftes zytologisches Präparat (40x Vergrößerung)

Zytologische Diagnose		AgNOR Cluster Zytologie	AgNOR Satelliten Zytologie	AgNOR Cluster+Satelliten Zytologie
Normale Mundschleimhaut	Anzahl	20	20	20
	Mittelwert	2,081	1,61	2,383
	Median	1,935	1,6	2,125
	Std. Abweichung	0,41	0,328	0,652
	Minimum	1,67	1,09	1,82
	Maximum	3,29	2,35	4,07

Tabelle 18: AgNOR-Datenverteilung an zytologischen Präparaten der 10 gesunden Probanden

In der Tabelle 19 sind die Ergebnisse der AgNOR-Analyse für die zytologischen Präparate anhand der histologischen Diagnose für die 60 Proben zusammen dargestellt.

Histologische Diagnose		AgNOR Cluster Zytologie	AgNOR Satelliten Zytologie	AgNOR Cluster+Satelliten Zytologie
Lichen	Anzahl	11	11	11
	Mittelwert	2,659	1,947	2,975
	Median	2,562	2	3,089
	Std. Abweichung	0,451	0,311	0,3713
	Minimum	2,065	1,4	2,157
	Maximum	3,386	2,333	3,46
Leukoplakie	Anzahl	23	23	23
	Mittelwert	2,892	1,753	3,153
	Median	2,933	1,823	3,13
	Std. Abweichung	0,717	0,655	0,792
	Minimum	1,7	0	1,769
	Maximum	4,3	3	4,69
Ca	Anzahl	11	11	11
	Mittelwert	2,937	2,251	3,431
	Median	2,67	2,125	3,16
	Std. Abweichung	0,764	0,814	0,993
	Minimum	2,16	1	2,2
	Maximum	4,63	4,347	5,63
Cond.acum. mit Dysplasie	Anzahl	2	2	2
	Mittelwert	3,636	2,193	4,197
	Median	3,636	2,193	4,197
	Std. Abweichung	0,348	0,368	0,0459
	Minimum	3,39	1,933	4,165
	Maximum	3,883	2,454	4,23
Dysplasie	Anzahl	7	7	7
	Mittelwert	3,190	2,047	3,689
	Median	3,57	2	3,737
	Std. Abweichung	0,689	0,420	0,897
	Minimum	2,23	1,3	2,36
	Maximum	3,872	2,483	5,19
andere	Anzahl	6	6	6
	Mittelwert	3,179	2,241	3,486
	Median	3,127	2,171	3,510
	Std. Abweichung	0,520	0,744	0,487
	Minimum	2,492	1,375	2,753
	Maximum	3,91	3,4	4,025
Gesamt	Anzahl	60	60	60
	Mittelwert	2,946	1,978	3,302
	Median	2,934	2	3,173
	Std. Abweichung	0,666	0,631	0,779
	Minimum	1,7	0	1,769
	Maximum	4,63	4,347	5,63

Tabelle 19: AgNOR-Datenverteilung der zytologischen Präparate, bezogen auf die histologische Enddiagnose (n=60)

Fasst man die 40 Fälle „negativer“ Diagnosen (Lichen, Leukoplakie, andere) ergänzend tabellarisch zusammen, so ergibt sich folgende Datenverteilung (Tabelle 20).

Histologische Diagnose		AgNOR Cluster Zytologie	AgNOR Satelliten Zytologie	AgNOR Cluster+Satelliten Zytologie
negativ	Anzahl	40	40	40
	Mittelwert	2,871	1,88	3,154
	Median	2,931	1,888	3,13
	Std. Abweichung	0,636	0,607	0,668
	Minimum	1,7	0,0	1,769
	Maximum	4,3	3,4	4,69

Tabelle 20: AgNOR-Datenverteilung der negativen zytologischen Präparate, bezogen auf die histologische Enddiagnose (n=40)

Analoge Tabellen für die AgNOR-Verteilung in den histologischen Präparaten sind in den Tabellen 21 und 22 wiedergegeben.

Histologische Diagnose		AgNOR Cluster Histologie	AgNOR Satelliten Histologie	AgNOR Cluster+Satelliten Histologie
Lichen	Anzahl	11	11	11
	Mittelwert	1,567	1,185	1,708
	Median	1,457	1,25	1,48
	Std. Abweichung	0,279	0,51	0,419
	Minimum	1,208	0	1,252
	Maximum	1,936	1,971	2,55
Leukoplakie	Anzahl	24	24	24
	Mittelwert	1,916	1,47	2,086
	Median	1,789	1,55	1,9215
	Std. Abweichung	0,619	0,617	0,719
	Minimum	1,228	0	1,228
	Maximum	4,014	2,857	4,492
Ca	Anzahl	11	11	11
	Mittelwert	2,55	2,32	3,056
	Median	2,646	2,285	2,8
	Std. Abweichung	0,479	0,622	0,759
	Minimum	1,916	1,5	2,176
	Maximum	3,359	3,5	4,4
Cond.acum. mit Dysplasie	Anzahl	2	2	2
	Mittelwert	2,847	2,059	3,241
	Median	2,847	2,059	3,241
	Std. Abweichung	0,05	0,387	0,012
	Minimum	2,812	1,785	3,233
	Maximum	2,883	2,333	3,25
Dysplasie	Anzahl	7	7	7
	Mittelwert	2,425	1,901	3,068
	Median	2,51	2,21	3,23
	Std. Abweichung	0,687	0,899	0,817
	Minimum	1,428	0	1,703
	Maximum	3,48	2,838	4,28
andere	Anzahl	6	6	6
	Mittelwert	2,03	1,491	2,177
	Median	1,967	1,702	2,175
	Std. Abweichung	0,363	0,757	0,313
	Minimum	1,557	0	1,757
	Maximum	2,5	2	2,622

Gesamt	Anzahl	61	61	61
	Mittelwert	2,068	1,642	2,352
	Median	1,936	1,714	2,21
	Std. Abweichung	0,624	0,731	0,826
	Minimum	1,208	0	1,228
	Maximum	4,014	3,5	4,492

Tabelle 21: AgNOR-Datenverteilung der histologischen Präparate, bezogen auf die histologische Enddiagnose (n=61)

Histologische Diagnose		AgNOR Cluster Histologie	AgNOR Satelliten Histologie	AgNOR Cluster+Satelliten Histologie
negativ	Anzahl	41	41	41
	Mittelwert	1,839	1,396	1,997
	Median	1,789	1,5	1,93
	Std. Abweichung	0,534	0,61	0,621
	Minimum	1,208	0,0	1,228
	Maximum	4,014	2,857	4,492

Tabelle 22: AgNOR-Datenverteilung der negativen histologischen Präparate, bezogen auf die histologische Enddiagnose (n=41)

Zur Darstellung der statistischen Beziehungen zwischen den einzelnen Krankheitsgruppen sind die Ergebnisse des „*Independent Samples T-Test*“ in Tabelle der 23 wiedergegeben.

Sie enthalten auch die Untersuchungen zur Korrelation von für die jeweils gleichen Krankheitsgruppen erhobenen AgNOR-Daten für Histologie und Zytologie. Hierbei zeigten sich circa in der Hälfte der paarweisen Vergleiche statistisch signifikante Unterschiede, so dass sich nur eine bedingte Vergleichbarkeit der ermittelten AgNOR-Werte ergab. Dieses gilt insbesondere beim Lichen und bei den Leukoplakien, im wesentlichen auch bei der Gruppe der „anderen Diagnosen“, während sich bei den Karzinomen, der Dysplasie und der histologischen Diagnose des Condyloma acuminatum keine signifikanten Unterschiede nachweisen ließen.

AgNOR-Kluster							
Zytologie	Histologie						
	Normal	Lichen	Leukoplakie	Ca.	Cond. acum.	Dysplasie	andere
Normal	---	---	---	---	---	---	---
Lichen	0.001	< 0.001	<i>n.s.</i>	<i>< 0.001</i>	<i>n.s.</i>	<i>0.002</i>	<i>n.s.</i>
Leukoplakie	<i>< 0.001</i>	<i>n.s.</i>	< 0.001	<i>0.005</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Ca.	<i>< 0.001</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	n.s.	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Cond. acum.	<i>< 0.001</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	n.s.	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Dysplasie	<i>0.004</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	n.s.	<i>n.s.</i>
andere	<i>< 0.001</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	0.001

AgNOR-Satelliten							
Zytologie	Histologie						
	Normal	Lichen	Leukoplakie	Ca.	Cond. acum.	Dysplasie	andere
Normal	---	---	---	---	---	---	---
Lichen	0.01	0.002	<i>n.s.</i>	<i>< 0.001</i>	<i>n.s.</i>	<i>0.045</i>	<i>n.s.</i>
Leukoplakie	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	< 0.001	<i>0.001</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Ca.	<i>0.004</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	n.s.	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Cond. acum.	<i>0.027</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	n.s.	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Dysplasie	<i>0.009</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	n.s.	<i>n.s.</i>
andere	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	< 0.001

AgNOR-Kluster+Satelliten							
Zytologie	Histologie						
	Normal	Lichen	Leukoplakie	Ca.	Cond. acum.	Dysplasie	andere
Normal	---	---	---	---	---	---	---
Lichen	0.01	< 0.001	<i>n.s.</i>	<i>< 0.001</i>	<i>n.s.</i>	<i>< 0.001</i>	<i>n.s.</i>
Leukoplakie	<i>0.001</i>	<i>n.s.</i>	n.s.	<i>0.001</i>	<i>n.s.</i>	<i>0.004</i>	<i>n.s.</i>
Ca.	<i>0.001</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	n.s.	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Cond. acum.	<i>0.001</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	n.s.	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Dysplasie	<i>< 0.001</i>	<i>0.031</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	n.s.	<i>n.s.</i>
andere	<i>0.001</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	n.s.

Tabelle 23: Darstellung der Ergebnisse des „Independent Samples T-Test“ im Vergleich mehrerer Krankheitsgruppen für die AgNOR-Analyse an Zytologie (normal), Histologie (*kursiv*) sowie für den Vergleich zwischen Histologie und Zytologie an identischen Krankheitsgruppen (**fett**). n.s. = nicht signifikant ($p > 0.05$)

Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich die AgNOR-Datenverteilung zwischen normaler Schleimhaut und den jeweiligen Läsionen am zytologischen Präparat in aller Regel als signifikant unterschiedlich erwies. Innerhalb der Krankheitsgruppen ergaben sich für die zytologischen Präparate hingegen keine Signifikanzen, von einem einzigen (Dysplasie vs. Lichen bei Bestimmung von AgNOR Klustern + Satelliten: $p = 0.031$) bei insgesamt 45 Vergleichen abgesehen. Bei der Analyse der histologischen Präparate fanden sich ebenfalls relativ wenige signifikante Unterschiede, die sich vor allem auf die Krankheitspaare Lichen - Karzinom, Leukoplakie - Karzinom und Lichen - Dysplasie fokussierten.

Diagnostische Interpretation

In der Tabelle 24 sind die AgNOR-Daten der Läsionen, als „positiv“ bzw. „negativ“ eingeteilt.

Histo- logische Diagnose		AgNOR Kluster Zytologie	AgNOR Satelliten Zytologie	AgNOR Kluster + Satelliten Zytologie	AgNOR Kluster Histologie	AgNOR Satelliten Histologie	AgNOR Kluster + Satelliten Histologie
positiv	Mittelwert	3,095	2,174	3,598	2,536	2,147	3,079
	Median	3,105	2,081	3,695	2,651	2,23	3,075
	SD	0,716	0,649	0,911	0,534	0,712	0,719
	Minimum	2,16	1	2,2	1,428	0	1,703
	Maximum	4,63	4,347	5,63	3,48	3,5	4,4
	Anzahl	20	20	20	20	20	20
negativ	Mittelwert	2,871	1,88	3,154	1,839	1,396	1,997
	Median	2,931	1,888	3,13	1,789	1,5	1,93
	SD	0,636	0,607	0,668	0,534	0,61	0,621
	Minimum	1,7	0	1,769	1,208	0	1,228
	Maximum	4,3	3,4	4,69	4,014	2,857	4,492
	Anzahl	40	40	40	41	41	41
Gesamt	Mittelwert	2,946	1,978	3,302	2,068	1,642	2,352
	Median	2,934	2	3,173	1,936	1,714	2,21
	SD	0,666	0,631	0,779	0,624	0,731	0,826
	Minimum	1,7	0	1,769	1,208	0	1,228
	Maximum	4,63	4,347	5,63	4,014	3,5	4,492
	Anzahl	60	60	60	61	61	61

Tabelle 24: AgNOR-Datenübersicht für alle 60 bzw. 61 zytologischen und histologischen Präparate

Mit dem „*Independent Samples T-Test*“ wurden die Mittelwerte der AgNORs zwischen positiven und negativen histologischen Befunden verglichen. Statistische Signifikanz zeigte sich dabei bei den zytologischen Präparaten nur für Cluster + Satelliten ($p = 0.037$), bei den histologischen hingegen sowohl für Cluster ($p < 0.001$), als auch für Satelliten ($p = 0.001$) und Cluster + Satelliten ($p < 0.001$).

Um zu Aussagen über Sensitivität und Spezifität zu gelangen, sind bei primär nicht gestuften Parametern Grenzwertsetzungen notwendig. In dieser Arbeit wurde zur besseren Übersichtlichkeit ein Modell herangezogen, das einen Grenzwert pro Parameter jeweils bei einer Spezifität von 95% festsetzt - damit setzt man die Rate der zu akzeptierenden falsch-positiven Diagnosen im Vorfeld der statistischen Untersuchungen als feste Größe voraus. Die Tabelle 25 zeigt die entsprechenden Werte. Für die AgNOR-Kluster in der Zytologie lagen zwei Werte genau auf die Grenze, weswegen der eine Fall als positiv und der andere als negativ gewertet wurde.

	AgNOR-Grenzwerte bei 95% Spezifität	negativ	positiv
Zytologie	AgNOR Cluster	$\leq 4,068$	$> 4,068$
	AgNOR Satelliten	$\leq 3,399$	$> 3,399$
	AgNOR Cluster+Satelliten	$\leq 4,458$	$> 4,458$
Histologie	AgNOR Cluster	$\leq 3,018$	$> 3,018$
	AgNOR Satelliten	$\leq 2,199$	$> 2,199$
	AgNOR Cluster+Satelliten	$\leq 3,058$	$> 3,058$

Tabelle 25: Bestimmung der Grenzwerte der diagnostischen AgNOR-Auswertung bei vorausgesetzter Spezifität von 95%

In der Tabelle 26 ist die darauf basierende Sensitivität der Methode wiedergegeben.

	AgNOR-Parameter	Sensitivität
Zytologie	AgNOR Cluster	5,90%
	AgNOR Satelliten	5,90%
	AgNOR Cluster+Satelliten	11,80%
Histologie	AgNOR Cluster	17,60%
	AgNOR Satelliten	52,90%
	AgNOR Klusters+Satelliten	47,10%

Tabelle 26: Sensitivität AgNOR-Analyse bei vorausgesetzter Spezifität von 95% (n=57)

Aus der Tabelle ist zu ersehen, dass bei einer konstanten Spezifität von 95% die Sensitivität der Methode insbesondere für die Zytologie sehr niedrig ist und auch für die Histologie nur Werte von höchstens 52,9% erreicht, so dass selbst bei höchster Sensitivität im Grunde nur jeder zweite positive Fall erkannt wurde.

4.5 Diagnostischer Vergleich der adjuvanten Methoden

Unter der Annahme, sowohl für die Zytologie als auch für die DNA-Bildzytometrie, dass „negativ“ nur die negativen Abstriche waren und alle anderen „positiv“, war die Sensitivität der Zytologie 64,70% und der DNA-Bildzytometrie 82,40%. Die DNA-Bildzytometrie hat also die Sensitivität der konventionellen Zytologie um 17,70% erhöht. Die Spezifität war entsprechend 82,50% und 97,50%, d.h. die Spezifität der Zytologie ist um 15% gestiegen.

Unter der Annahme, dass die zweifelhaften Diagnosen der Zytologie „negativ“ sind, war die Sensitivität der Zytologie 35,30% und der DNA-Bildzytometrie 82,40%; es handelt sich also um eine Steigerung der Sensitivität von 46,90 Prozentpunkte. Umgekehrt, die Spezifität der Zytologie (100%) ist durch die ergänzende DNA-Bildzytometrie (97,50%) um 2,50 Prozentpunkte gesunken.

Bezüglich der AgNOR-Analyse für die histologischen Präparate zeigte sich, keine Steigerung der Sensitivität im Vergleich zu der DNA-Bildzytometrie. Im Gegenteil, die Methode zeigte eine geringere Sensitivität verglichen mit der konventionellen Zytologie und die DNA-Bildzytometrie und konnte die Treffsicherheit der oralen Zytologie nicht erhöhen.

Das Flussdiagramm (Abb. 25) verschafft einen Überblick hinsichtlich der Ergebnisse der einzelnen Methoden zur konventionellen Zytologie.

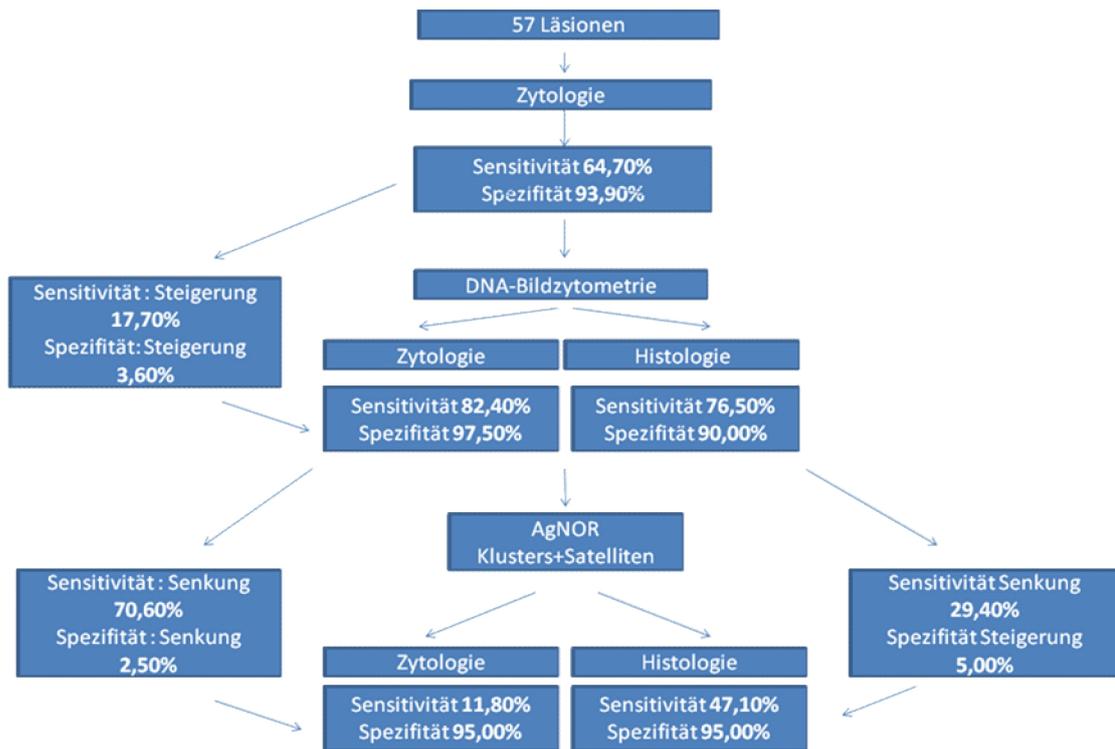


Abb. 25: Flussdiagramm mit den Ergebnissen der einzelnen Methoden im Vergleich zur konventionellen Zytologie

5. Diskussion

5.1 Krebsentstehung und Risikofaktoren

Gemäß der Literatur zählt das Rauchen zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von oralen und oropharyngealen Karzinomen [17, 54] und erhöht generell das Risiko für Krebsentwicklung [19]. Eine statistische Signifikanz ($p = 0.019$) hinsichtlich der Menge des Tabakkonsums zwischen Patienten mit Malignität und ohne Malignität hat sich in dieser Studie nachweisen lassen. Die Dauer des Rauchens hat sich hingegen nicht als signifikant unterschiedlich erwiesen ($p=0.068$), obwohl die Patienten mit Malignität durchschnittlich circa zwölf Jahre länger als die Patienten ohne Malignität geraucht haben.

5.2 Prognostische und diagnostische Relevanz der oralen Zytologie

Die konventionelle Zytologie mittels Bürstenbiopsie ist eine gut etablierte und weltweit anerkannte Methode, die dem Zahnarzt für das „Screening“ von Mundschleimhautveränderungen zur Verfügung steht und eine gute Ergänzung zu der Gewebeprobe anbietet. Die Vorteile der konventionellen Zytologie bestehen in der einfachen Durchführbarkeit, der Wiederholbarkeit, der fehlenden Invasivität und fehlenden Schmerzen für den Patienten sowie in der Tatsache, dass die Methode wenig Zeit in Anspruch nimmt [23, 55]. Wenn die visuelle Begutachtung einer Läsion nicht ausreichend ist, kann der Zahnarzt die Zytologie als diagnostische Methode hinzuziehen. Auch bei histologisch gesicherten Läsionen bietet die Methode eine gute Möglichkeit für Nachkontrollen [49].

Es liegen heute zahlreiche Publikationen zur Sensitivität und Spezifität der konventionellen Zytologie vor. Böcking berichtete über eine Sensitivität von 97,5% [26], Remmerbach fand in seiner Arbeit eine Sensitivität der Methode von 91,3% und eine Spezifität von 95,5% [56]. Koch et al. haben eine Sensitivität von 88,5% bis 95,2% und eine Spezifität von 94,5% bis 95%, abhängig von der Auswertungsmethode, festgestellt [28]. Kämmerer et al. fanden eine Sensitivität von 55% und eine Spezifität von 100% [27]. Babshet et al. haben eine Sensitivität von 77% und eine Spezifität von 100% gefunden [25]. In unserer Studie betrug die Sensitivität für die 134 analysierten

Proben 68,4% und die Spezifität 93,9%. Für die 57 Proben, die zusätzlich mittels DNA-Bildzytometrie und AgNOR analysiert wurden, lagen die Sensitivität bei 64,7% und die Spezifität bei 82,5%.

Der Vergleich der Werte hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität soll in unmittelbarem Zusammenhang mit dem methodologischen Vorgehen betrachtet werden.

Remmerbach et al. haben bei der Berechnung der Sensitivität (91,3%) und Spezifität (95,5%) die zytologisch negativen und zweifelhaften Ergebnisse als „negativ“ und die dringend verdächtigen und positive als „positiv“ betrachtet. Weiterhin haben sie nur histologisch gesicherte Karzinome als positiv eingestuft. Außerdem haben sie auch Läsionen in die Studie einbezogen, die laut WHO nicht zu dem OPMD gehörten (wie z.B. Ulzera (n=32), Aphthen (n=27), Glossitis rhombica mediana (n=5), Fibrome (n=2), Granulationsgewebe (n=4) usw.). In unserer Studie dagegen wurden nur Karzinome, Dysplasien und OPMD eingeschlossen [56]. Darüber hinaus wurden auch die Dysplasien als histologisch „positiv“ und nur die „negativen“ Abstriche als solche kategorisiert. Diese Vorgehensweise führte zu geringeren Werten für die Sensitivität der Methode und zu ähnlichen für die Spezifität. Wäre das methodische Vorgehen unserer Studie identisch mit dem von Remmerbach et al., so wäre in unserer Studie eine Sensitivität von 45,5% und eine Spezifität von 97,8% erreicht worden, d.h. die Sensitivität würde sinken und die Spezifität steigen.

Koch et al. haben 182 Läsionen histologisch und zytologisch untersucht, von diesen zeigten 115 eine Dysplasie oder ein Karzinom. Die Abstriche, pro Fall jeweils einer, wurden nach Hämatoxylin und Eosin gefärbt und bei der Begutachtung wurde auch die Ljubljana- und die Bethesda-Klassifikation angewendet. Je nach histologischer und zytologischer Kategorisierung der Befunde, variierte die Sensitivität der konventionellen Zytologie von 86,4% bis 95,2% und die Spezifität von 83,3% bis 98,5% [28]. In unserer Studie wurden die Präparate nach Papanicolaou gefärbt und die Böcking-Klassifikation benutzt [57]. Weiterhin wurden alle nicht negativen Abstriche als positiv eingestuft. Dies führte zu einer geringeren Sensitivität und einer ähnlichen Spezifität der Methode.

Kämmerer et al. haben insgesamt 88 Läsionen in ihre Studie eingeschlossen, nachdem sie die klinisch eindeutigen Karzinome ausgeschlossen hatten. Es wurden somit nur klinisch unklare, aber suspekta Läsionen untersucht. Von diesen waren 51 benigne und 37 maligne. Die Färbung der zytologischen Abstriche erfolgte mit Hämatoxylin und Eosin. Kämmerer et al. fanden eine Sensitivität von 55% und eine Spezifität von 100% unter der Annahme, dass negative und zweifelhafte Abstriche „negativ“ sind und dringend verdächtige und positive Abstriche „positiv“. Histologisch hat die Arbeitsgruppe die benignen Läsionen und die geringe Dysplasie als „negativ“ und die mittlere und schwere Dysplasien und die Karzinome als „positiv“ bewertet [27]. Wäre unsere Studie mit der Einstufung von Kämmerer et al. sowohl für die Zytologie als auch für die Histologie durchgeführt, so wäre die Sensitivität 42,9% und die Spezifität 100%. Auch bei einer leichten Modifikation der Einstufungen in unserer Studie sind die hier vorgestellten Ergebnisse den Daten von Kämmerer et al. vergleichbar.

Unter der Annahme, dass nur die negativen Abstriche „negativ“ waren und alle andere „positiv“, betrug in unserer Studie die Sensitivität für die 134 Proben 68,4% und die Spezifität 93,9%. Unter der Annahme, dass negative und zweifelhafte Befunde „negativ“ waren und alle andere „positiv“, ergaben sich eine Sensitivität von 42,1% und eine Spezifität von 100%. Für die 57 Proben, die weiter mittels DNA-Bildzytometrie und AgNOR analysiert wurden, lagen für die beiden Annahmen die Sensitivität der Methode bei 64,7% bzw. 35,3% und die Spezifität bei 82,5% bzw. 100%. Je strenger die zytologischen Ergebnisse betrachtet werden, d.h. alle Ergebnisse, die nicht negativ sind als positiv und damit als abklärungsbedürftig mittels Histologie eingestuft werden, desto höher ist die Sensitivität der Methode. Die zweite Annahme (nämlich, dass alle nicht negative Befunde als „positiv“ betrachtet werden) wurde bevorzugt, weil auch die zweifelhaften Abstriche nicht nur abnorme Regeneratepithelien, sondern auch gering oder mäßig dysplastische Zellen enthalten können. Durch diese Annahme wird das Risiko, eine Dysplasie zu übersehen, minimiert.

Bezüglich der Einstufung der histologischen Ergebnisse hat sich unsere Studie an der Übersichtsarbeit von Fleskens und Slootweg vom Jahr 2009 orientiert, gemäß derer auch eine geringe Dysplasie sich weiter entwickeln und zu einem Karzinom führen kann, auch wenn das Risiko hierfür gering ist. Die Autoren stützen sich auf Arbeiten anderer Gruppen, die sich mit dem Entartungsrisiko speziell von oralen Dysplasien

befasst haben [58]. Die für unsere Arbeit relevanten Daten werden hier zum Teil rezipiert. Silvermann et al. berichten über eine in 36% auftretende maligne Transformation der oralen Dysplasien, ohne allerdings den Grad der Dysplasie zu erwähnen [59]. Schepman et al. fanden in 12% der Fälle von Leukoplakien eine maligne Transformation, im Median 32 Monate nach Erstdiagnose der leukoplakischen Veränderung [60].

Lumerman et al. haben bei 44 Patienten mit Dysplasie unterschiedlichen Grades den Verlauf mit einem durchschnittlichen Follow-Up von 18,4 Monaten untersucht. Sieben Patienten (16%) hatten ein Plattenepithelkarzinom entwickelt. Von diesen sieben Patienten litten bei der Erstdiagnose einer (14,28%) an geringer Dysplasie, zwei (28,57%) an mäßiger Dysplasie, einer (14,28%) an hochgradiger Dysplasie und zwei (28,57%) an verruköser Hyperplasie mit geringer Dysplasie [61]. Diese Häufigkeit der malignen Transformation der oralen Dysplasien unterstützt die Überlegung, in der Kategorisierung eher „streng“ vorzugehen.

Aus den oben genannten Studien ergibt sich eine sehr breite Variation sowohl hinsichtlich der Sensitivität als auch der Spezifität der oralen Zytologie. Dies kann daran liegen, dass jede Arbeitsgruppe methodisch anders vorgegangen ist und zum Teil auch verschiedene klinische Ansätze betrachtet wurden. Dies bedeutet nicht unbedingt, dass die eine oder andere Methode besser ist.

5.3 Prognostische und diagnostische Relevanz der DNA-Bildzytometrie

Das Ergebnis der konventionellen Zytologie von einer verdächtigen Läsion, das dem Behandler bereits eine richtungweisende Diagnose gibt, kann bei „zweifelhaften“, „dringend verdächtigen“ und in einigen Fällen auch bei „positiven“ Ergebnissen sinnvoll um eine DNA-bildzytometrische Untersuchung an demselben Material ergänzt werden. Der Vorteil sowohl für den Patient als auch für den Zahnarzt liegt darin, dass eine erneute invasive Untersuchung nicht mehr notwendig ist. Somit stellt die DNA-Bildzytometrie eine hilfreiche adjuvante Methode dar, die am selben Material durchgeführt werden kann und die sowohl in der genitalen, als auch in der extragenitalen zytologischen Diagnostik angewendet werden kann.

Wie in den Ergebnissen unserer Studie dargestellt wurde, betrug die Sensitivität der DNA-Bildzytometrie an den zytologischen Präparaten 82,4% und die Spezifität 97,5%, basierend auf der Einstufung aller histologisch gesicherten Dysplasien und Karzinome als „positiv“ bezüglich der Morphologie sowie der als „verdächtig auf Aneuploidie“ oder „aneuploid“ eingestuften DNA-bildzytometrischen Messungen als „positiv“. Als „negativ“ andererseits wurden alle negativen Morphologien und alle als „nicht aneuploid“ eingestuften DNA-bildzytometrischen Messungen angesehen.

Im Vergleich mit anderen Studien, die im Folgenden diskutiert werden sollen, muss bedacht werden, dass unsere Grenzziehung, ab wann ein Fall als „positiv“ für Zytologie oder DNA-Bildzytometrie angenommen werden soll, nicht verpflichtend ist, so dass bei der Besprechung der Arbeiten der anderen Gruppen stets deren Kriterien mitgenannt werden müssen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden eigenen Daten jeweils entsprechend modifiziert berechnet.

Remmerbach et al. geben eine Sensitivität von 95,5% und eine Spezifität von 100% an. Die Befundung der DNA-Histogramme erfolgte in derselben Art und Weise wie in unserer Studie, allerdings haben sie nur histologisch gesicherte Karzinome als positiv eingestuft und präkanzeröse Veränderungen entsprechend nicht [56]. Wären in unserer Studie die histologischen Diagnosen wie Remmerbach et al. im Sinne von „positiv“ und „negativ“ klassifiziert, so wären entsprechende Werte von 81,8% und 87% errechnet. Insgesamt reichen somit unsere prospektiv ermittelten Zahlen nicht an diejenigen von Remmerbach heran, obgleich sowohl die Zytologie, als auch die DNA-Bildzytometrie in der gleichen Einrichtung durchgeführt worden sind.

Maraki et al. fanden bei der DNA-Bildzytometrie eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 97,4%. Obwohl die Befundung der Histogramme genau wie in unserer Studie erfolgte, wurden in das untersuchte Kollektiv auch Läsionen einbezogen, die keine orale prämaligne Erkrankung (OPMD) darstellten, z.B. Pemphigoid / Gingivitis desquamativa (n=17), Lineare IgA Erkrankung (n=1) oder Asthma-Spray-Stomatitis (n=2). Außerdem wurden die geringen und mittleren Dysplasien als „negativ“ betrachtet [41]. Bei Anwendung der Interpretationsmodi von Maraki et al. hätte unsere Studie eine Sensitivität von 86,7% und eine Spezifität von 95,2% erreicht.

In der Studie von Kämmerer et al. wiederum zeigte die DNA-Bildzytometrie eine Sensitivität von 70% und eine Spezifität von 100% [27]. Ähnlich wie für die Zytologie, wurden in unserer Studie diese Werte für die DNA-Bildzytometrie gemäß den Vorgaben von Kämmerer et al. berechnet, indem zytologisch negative und zweifelhafte Abstriche als „negativ“ und dringend verdächtige und positive Abstriche als „positiv“ gewertet werden. Bezogen auf die Histologie wurden dort benigne Läsionen und die geringen Dysplasien als „negativ“ und die mittleren und schweren Dysplasien sowie die Karzinome als „positiv“ gewertet. Auf diese Weise wäre in unserer Studie die Sensitivität 85,7% und die Spezifität 93%. Sieht man die DNA-Bildzytometrie als Suchtest, wie unser Ansatz war, so wäre eine höhere Sensitivität in unserer Studie herauszustellen.

Ma et al. haben die Sensitivität und Spezifität der DNA-Bildzytometrie von zytologischen Präparaten für OPMD untersucht und kamen zu den Werten von 86,4% bzw. 90%. Diese Werte sind höher als unsere, allerdings auf der Basis eines anderen methodologischen Vorgehens. Bezüglich der Malignitätseinstufung wurden dort nur die schweren Dysplasien und manifest malignen Veränderungen als „positiv“ betrachtet. Weiterhin, haben sie in die Analysen Abstriche von gesunder Mundschleimhaut und Läsionen, die laut WHO nicht zu den OPMD gehörten, einbezogen [4]. Der größte Unterschied liegt allerdings an der Tatsache, dass die Arbeitsgruppe als DNA-aneuploid die Histogramme beurteilt hat, die eine Stammlinie außerhalb 2c und 4c und/oder 5c Exceeding Events > 0 zeigten [62]. Es handelt sich um einen gravierenden Unterschied zu unserem Vorgehen. Wären in unserer Studie die DNA-Histogramme mit nur einer singulären Zelle $\geq 5c$ bereits als aneuploid eingestuft, so wäre eine Sensitivität von 100% erreicht, aber eine Spezifität von nur 11,9%. Wären in unserer Studie drei Zellen $\geq 5c$ als Grenze für Aneuploidie genommen worden, so wären entsprechende Werte von 100% und 19% erreicht. Dies bedeutet, dass auf diese Weise viele falsch positive Befunde generiert worden wären. Die Entscheidung, Histogramme mit Zellen $\geq 5c$ als aneuploid zu befunden, muss am Plattenepithel der Mundhöhle sehr kritisch betrachtet werden. Laut der internationalen Leitlinien der ESACP hängt die Entscheidung, ob 5c oder 9c als „Threshold“ für Einzelzellaneuploidie überhaupt genommen werden kann, vom Auftreten von euploiden Polyploidisierungen in dem untersuchten Gewebe ab [50]. Es ist bereits bekannt, dass der Lichen planus, der in der Arbeit von Ma et al. einbezogen wurde, häufig eine euploide Polyploidisierung bis in den 8c-Bereich in der

DNA-Bildzytometrie erkennen lässt [63]; deswegen sollte man den „Threshold“ eher auf 9c und nicht auf 5c setzen.

Pektas et al. haben sich ebenfalls mit der Ploidie von prämaligen und malignen Läsionen der Mundhöhle befasst. Nach der Untersuchung mittels DNA-Bildzytometrie von insgesamt 22 prämaligen und malignen Läsionen (12 Karzinome, 10 präkanzeröse Läsionen) fanden sie, dass 90,9% diploid und 9,1% aneuploid waren. Von den 12 in der Studie eingeschlossenen Karzinomen waren 11 diploid (83,3%) und nur eines aneuploid (16,7%) [64]. Die Arbeit von Pektas et al. ist kritisch zu betrachten und deren Ergebnisse mit unseren nicht zu vergleichen, weil die Methodologie und die Ergebnisse sich zu sehr widersprechen. Im Kapitel über Material und Methoden der Arbeit von Pektas et al. werden nämlich die Definitionen für die Zuordnung von DNA-Histogrammen als „diploid“, „tetraploid“, „polyploid“ und „aneuploid“ gegeben, die nicht uneingeschränkt den internationalen Kriterien der ESACP [50] entsprechen. Folgerichtig werden im Ergebnissteil der Arbeit eigentlich aneuploide Befunde als diploid interpretiert. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse der Arbeit von Pektas et al. mit jenen unserer Arbeit nicht vergleichbar.

Unsere Ergebnisse bezüglich der Sensitivität und Spezifität der DNA-Bildzytometrie für zytologische Präparate liegen nahe denen von Remmerbach et al. (2004), Maraki et al. (2004) und Kämmerer et al. (2013). Ein Vergleich mit den Arbeiten von Ma et al. und Pektas et al. ist aufgrund der methodischen Unterschiede nicht möglich.

Im Rahmen unserer Arbeit wurde auch das Ergebnis der DNA-Bildzytometrie nach Zellvereinzulung des histologischen Materials untersucht. Die Sensitivität betrug 76,5% und die Spezifität 90% für die 57 Proben, die in allen Analysen einbezogen wurden. Alle histologisch gesicherten Dysplasien und Karzinome wurden als „positiv“ bezüglich der Morphologie eingestuft, ebenso die als „verdächtig auf Aneuploidie“ oder „aneuploid“ eingestuften DNA-bildzytometrischen Messungen. Als „negativ“ andererseits wurden alle negativen Morphologien und alle als „nicht aneuploid“ eingestuften DNA-bildzytometrischen Messungen angesehen.

Torres-Rendon et al. haben 86 dysplastische Läsionen DNA-bildzytometrisch untersucht, von denen sich in einem Zeitraum von 6 - 200 Monaten 42 zu Karzinomen

entwickelt haben und 44 nicht. Nach Zellvereinzelung und Feulgen-Färbung erfolgte die DNA-Bildzytometrie. Auch hier galten Histogramme mit 1% der Gesamtzellen $\geq 5c$ bereits als aneuploid. 74% der aneuploiden Fälle und 42% der diploiden erwiesen sich am Ende des Beobachtungszeitraumes als maligne transformiert. Aus dieser Arbeit ist zu ersehen, dass die Sensitivität der DNA-Bildzytometrie in der Erkennung von epithelialen Dysplasien, die maligne transformieren, 33% ist und die Spezifität 88% [65]. Es handelt sich somit um vielversprechende Ergebnisse für die Frühdiagnose von oralen Karzinomen.

Schließlich sind noch vier Arbeiten zu nennen, die sich nicht mit der diagnostischen Perspektive der DNA-Zytometrie im Allgemeinen, sondern mit speziellen Aspekten befasst haben.

Santos-Silva et al. haben festgestellt, dass Patienten mit Zungenkarzinomen, die jünger als 40 Jahre waren, signifikant häufiger eine DNA-Aneuploidie der Histologie zeigten als Patienten, die älter als 50 Jahre waren (86,5% vs. 64,3%) [66]. Da das DNA-Histogramm chromosomalen Aberrationen darstellt, könnten diese Ergebnisse bedeuten, dass bei jüngeren Patienten das Auftreten von Zungenkarzinomen eher mit genetischen Ursachen verbunden ist. Gesichert ist diese Hypothese aber nicht.

In einer Arbeit an verrukösen Läsionen wurde DNA-Bildzytometrie an histologischen Schnitten durchgeführt, was üblicherweise aufgrund schwerwiegender methodischer Probleme nicht empfohlen wird [67]. Die Arbeit von Gouvêa et al. ergab eine DNA-Aneuploidie in 85,7% der Fälle mit leichter Dysplasie und 100% der Fälle mit mittlerer und schwerer Dysplasie oder Karzinom. Andererseits wurde auch in Fällen, die nur Hyperkeratose und Akanthose, hingegen keine Dysplasien aufwiesen, in 66,7% eine DNA-Aneuploidie beschrieben [68].

Eine mit Durchflusszytometrie durchgeführte DNA-Analyse an mittels Kürettage gewonnenem Material von OPMD, die von Pentenero et al. (2009) durchgeführt wurde, zeigte eine Sensitivität von 13,3% und eine Spezifität von 60%. Von den 60 untersuchten Läsionen zeigten 18 eine Dysplasie. Von den nicht dysplastischen OPMDs waren 86% DNA-diploid und von den dysplastischen OPMDs 44% aneuploid.

Insgesamt 14 dysplastische und non-dysplastische Läsionen zeigten DNA-Aneuploidie [69].

Handschel et al. schließlich haben in 40 Fällen von oralen Karzinomen die seitlichen Resektionsränder der exziierten Tumoren mittels DNA-Bildzytometrie untersucht, um mögliche Rezidive der Tumoren vorhersehen zu können. Von diesen 40 Fällen zeigten 20 in dem dreijährigen Follow-Up ein Rezidiv, und von diesen 20 Fällen wiederum zeigten 14 eine DNA-Aneuploidie. Zwei weitere Fälle, die kein Rezidiv hatten, wiesen allerdings ebenfalls Aneuploidie auf. Die Sensitivität für die Vorhersage eines Rezidivs war somit 70% und die Spezifität 90%, wobei die Grundlage für die Aneuploidiediagnose das Vorhandensein einer aneuploiden Stammlinie oder von Zellen $\geq 5c$ war [33]. Wären die 11 Karzinome unserer Studie ebenfalls beim reinen Vorhandensein von Zellen $\geq 5c$ bereits auf Aneuploidie erkannt, so wäre die Sensitivität 90,9%, also in 10 von 11 Fällen, erzielt. Die Spezifität der Methode würde aber nur 41,3% erreichen.

Bezogen auf die Frage, inwieweit die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie an histologischen Gewebeproben und korrespondierenden Bürstenbiopsien vergleichbar sind, ergab sich in unserer Arbeit eine Übereinstimmung der Ergebnisse von 89,5%. In der Literatur ließen sich zu diesem Aspekt der Diagnostik von oralen prämaligen und malignen Läsionen keine entsprechenden Publikationen finden.

Die einerseits hohe Sensitivität (76,5%) und Spezifität (90%) der DNA-Bildzytometrie der Histologie und andererseits die hohe Übereinstimmung der Ergebnissen der DNA-Bildzytometrie an den korrespondierenden histologischen und zytologischen Proben unserer Studie eröffnen neue Forschungswege.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigten, dass die DNA-Bildzytometrie für die Diagnostik oraler prämaligen und malignen Läsionen auch an dem histologischen Material angewendet werden kann. Das heißt, in Fällen wo klinisch der Verdacht auf eine Malignität vorliegt, aber histologisch keine Auffälligkeit erkennbar ist, könnte der Behandler eine DNA-Bildzytometrie der Histologie anfordern. Angenommen, die Läsion würde auch zytologisch und/oder DNA-zytometrisch eine Auffälligkeit zeigen,

dann wäre die Anforderung einer DNA-Bildzytometrie der Histologie noch sinnvoller, um frühzeitig eine eventuelle Aneuploidie diagnostizieren zu können.

5.4 Prognostische und diagnostische Relevanz der AgNOR-Analyse

Die AgNOR-Analyse gehört im Gegensatz zu der konventionellen Zytologie und der ergänzenden DNA-Bildzytometrie nicht zu den standardisierten und weltweit anerkannten diagnostischen Methoden für orale Läsionen, insbesondere weil es auch keine standardisierte Nomenklatur für ihre Auswertung bei oralen Läsionen gibt. In der Literatur findet man nur relativ wenige Arbeiten, die sich mit der Auswertung der AgNORs an zytologischen Präparaten befasst haben, und noch weniger Arbeiten, die die Sensitivität und Spezifität der Methode berechnet haben. Die meisten Arbeitsgruppen haben sich vornehmlich mit den Mittelwerten und Streuungen der AgNORs zwischen verschiedenen Untersuchungsgruppen befasst. Das heißt, sie haben die Grenzwerte der AgNORs bestimmt, um zwischen benignen und malignen Veränderungen zu unterscheiden. Im Folgenden soll die Sensitivität und Spezifität der Methode, die in unseren Analysen gefunden wurde, mit der vorhandenen Literatur verglichen werden.

In der Studie von Remmerbach, in der Treffsicherheiten berechnet worden sind, zeigte die AgNOR-Analyse der oralen Zytologie eine Sensitivität von 100% für die Diagnose von oralem Krebs und ebenfalls eine Spezifität von 100% für die Diagnose von benignen Läsionen [37]. Remmerbach et al. betrachteten dabei nur die Karzinome als „positiv“. Wäre der beste „cut-off“ von 4,8 in unseren Analysen benutzt, so wäre für die Kluster+Satelliten der Zytologie eine Sensitivität von gerade 9,1% und eine Spezifität von 100% erreicht worden; also niedriger als die Sensitivität, die bei einer konstanten Spezifität von 95% in unserer Studie gefunden wurde. Entsprechend konnten die Ergebnisse unserer Arbeit hier nicht bestätigt werden.

Auch Rajput et al. haben ihre AgNOR-Analyse an zytologischen Abstriche auf die Treffsicherheit hin untersucht. Sie fanden bei einem optimierten „cut-off“ für Kluster+Satelliten von 4 eine Sensitivität und eine Spezifität von jeweils 100%. In der Arbeit wurden 20 Abstriche von 10 gesunden Probanden und 68 Abstriche von 34

Probanden mit histologisch gesicherten Karzinome einbezogen [53]. Wäre der beste „cut-off“ von 4 in unseren Analysen benutzt, so wäre für die Cluster+Satelliten der Zytologie eine Sensitivität von nur 27,3% und eine Spezifität von 82,2% erreicht worden. Auch die Ergebnisse der Arbeit von Rajput et al. erwiesen sich somit in dem Ansatz unserer Studie als nicht reproduzierbar.

Ergänzend zu den beiden Arbeiten über die Sensitivität und Spezifität der AgNOR-Analyse an zytologischen Präparaten stellt Tabelle 27 einige Mittelwerte der AgNORs für die Zytologie dar. Diese Werte beziehen sich entweder an oralen Läsionen oder an Gewohnheiten bezüglich des Tabaks- und Alkoholkonsums. Von der Tabelle ist die Vielfalt der Werte zu erkennen; weiterhin erkennt man, dass die Werte unserer Studie für die normale Mukosa diese von Fontes et al.[70] und Rajput et al. [53] nahe liegen. Diese Feststellung ist wichtig, weil sich dadurch eine Tendenz für die Standardisierung der Werte für die gesunde Mukosa ableiten lässt.

AgNOR MW Cluster + Satelliten						
Autor	Land/Jahr	normale Mukosa (Nicht-raucher)	Tabak-konsum / <i>Tabak-kauen</i>	Alkohol-konsum / <i>Crack / Kokain</i>	verruköses Karzinom	PE-Ca
Fontes et al.	Brasilien 2008	2,732 (+/- 0,236)	3,372 (+/- 0,375)	-	-	-
Rajput et al.	Indien 2010	2,568 (+/- 0,318)	-	-	4,223 (+/- 0,19)	5,384 (+/- 0,344)
Jindal et al.	Indien 2013	-	4,162 (+/- 0,53)	3,98 (+/- 0,758)	-	-
Mohan et al.	Indien 2013	1,95 (+/- 0,4)	3,09 (+/- 0,75)	-	-	-
Thiele et al.	Brasilien 2013	3,38 (+/- 1,02)	-	5,18 (+/- 1,83)	-	-
Damanaki	Deutschland 2014	2,125 (+/- 0,652)	-	-	-	3,431 (+/- 0,993)

Tabelle 27: Vergleich zwischen den Mittelwerten der AgNORs für zytologische Untersuchungen oraler Läsionen in der Literatur und unserer Studie [53, 70-73]

Bei unserer Literaturrecherche wurden keine Arbeiten für die AgNORs in der Histologie in der Mundschleimhaut gefunden, die sich mit der Sensitivität und Spezifität der Methode befasst hätten. Deswegen beschränkte sich unsere Studie auf den Vergleich der Mittelwerte der AgNORs. Um den Mittelwert der AgNORs (Cluster+Satelliten) der Histologie unserer Arbeit mit den in der Literatur vorhandenen

Werten vergleichen zu können, wurden die Werte von diversen Studien tabellarisch zusammengestellt (Tabelle 28).

AgNOR MW Cluster+Satelliten						
Autor	Land / Jahr	normale Mukosa	präkanzeröse Läsionen	Lichen planus	Leukoplakie allgemein	Leukoplakie bis leichte Dysplasie
Pillai et al.	Indien 2005	1,53 (+/-0,39)	-	-	2,25 (+/-0,47)	-
Elangovan et al.	Indien 2008	1,77 (+/-0,02)	-	-	2,52 (+/-0,50)	-
Sousa et al.	Brasilien 2012	-	-	1,74 (+/-0,32)	-	-
Khiavi et al.	Iran 2012	1,581 (+/-0,762)	2,17 (+/-1,051)	-	-	-
Chowdhry et al.	Indien 2013	1,95	-	-	-	-
Garg et al.	Indien 2013	0,927 (+/-0,87)	-	-	-	1,28 (+/-0,133)
Damanaki	Deutschland 2014	-	-	1,708 (+/-0,419)	2,086 (+/-0,719)	-
AgNOR MW Cluster+Satelliten						
Autor	Land / Jahr	Leukoplakie ab mäßiger Dysplasie / Ca. in situ	Dysplasie	PE-Ca	gut differenziertes PE-Ca.	mäßig differenziertes PE-Ca.
Pillai et al.	Indien 2005	-	-	4,65 (+/-0,98)	-	-
Elangovan et al.	Indien 2008	-	-	-	5,97 (+/-1,20)	8,47 (+/-0,99)
Sousa et al.	Brasilien 2012	-	2,42 (+/-0,62)	2,41 (+/-0,61)	-	-
Khiavi et al.	Iran 2012	-	-	2,433 (+/-1,338)	-	-
Chowdhry et al.	Indien 2013	-	3,76	5,19	-	-
Garg et al.	Indien 2013	1,605 (+/-0,321)	-	-	-	-
Damanaki	Deutschland 2014	-	3,068 (+/-0,817)	3,056 (+/-0,759)	-	-

Tabelle 28: Vergleich zwischen den Mittelwerten der AgNORs für Histologie oraler Läsionen in der Literatur und unserer Studie [36, 74-78]

Aus der Tabelle 28 ist die Vielfalt und die Schwankungsbreiten der AgNOR-Mittelwerte zu ersehen, so dass eine Vergleichbarkeit der Rohdaten sicher nicht besteht. Bemerkenswert ist die Variation der histologischen Kategorien, für die die Werte berechnet wurden. Obwohl die Analysen der anderen Autoren auf histologischen

Schnitten und nicht auf Zellvereinzelung erfolgte, sieht man ähnlich Werte zwischen unserer Arbeit und Sousa et al.[75] für den Lichen planus und zwischen unserer Arbeit und Pillai et al. [74] und Elangovan et al. [36] für die Leukoplakie. Die Werte unserer Studie für die Dysplasien sind ähnlich wie die von Chowdhry et al. [77]. Die Werte für die Karzinome dagegen variieren sehr stark. Innerhalb einer Publikation lässt sich aber jeweils eine Zunahme der Mittelwerte mit steigender biologischer Relevanz feststellen.

Die hohe Variabilität der AgNOR-Werte für die durch Zellvereinzelung aus histologischen Präparaten gewonnenen Befunde unterstreicht die Notwendigkeit für eine weitere Standardisierung, bevor die Methode routinemäßig angewendet werden kann.

Der Vergleich unserer Ergebnisse der AgNOR-Analyse an korrespondierenden zytologischen und histologischen Präparaten für die jeweilige histologische Diagnose, zeigte einen signifikanten Unterschied für den Lichen planus insgesamt (Kluster, Satelliten, Cluster+Satelliten), für die Cluster und die Satelliten der Leukoplakie und der anderen histologischen Diagnosen.

Die Karzinome und die Dysplasien hingegen wiesen vergleichbare Werte für die AgNORs auf, sowohl an den zytologischen als auch an den histologischen Proben. Das heißt, dass diese Werte an korrespondierenden zytologischen und histologischen Präparaten bei der AgNOR-Analyse vergleichbar waren.

Die Anwendung der AgNOR-Analyse konnte in unserer Studie nicht zu einer Verbesserung der Treffsicherheit der konventionellen oralen Zytologie bei der Frühdiagnose einer Malignität führen. Der Einsatz dieser Methode an Zellvereinzelungen von histologischen Präparaten konnte ebenfalls keine höhere Sensitivität der Methode zeigen, auch wenn sich im Literaturvergleich gruppenbezogen Übereinstimmungen für gewisse Mundschleimhauterkrankungen ergaben.

5.5 Der Vergleich der adjuvanten diagnostischen Methoden

Die Ergebnisse unserer Studie haben bestätigt, dass die konventionelle Zytologie kombiniert mit der ergänzenden DNA-Bildzytometrie hilfreiche „diagnostische Instrumente“ für den Kliniker im Alltag darstellen.

Aufgrund der Analysen für die zwei adjuvanten Methoden, nämlich die DNA-Bildzytometrie und die AgNOR-Analysen, konnte gezeigt werden, dass der Einsatz der DNA-Bildzytometrie zusätzlich zur konventionellen Zytologie zu einer Erhöhung der Treffsicherheit der Methode führte. Dasselbe konnten aber für die AgNOR-Analyse nicht gezeigt werden.

Remmerbach et al. sind nach besten Wissen aus der Literatur die einzigen, die eine ähnliche „Multimodale Zellanalyse“ durchgeführt haben. Sie haben die zytologischen Präparate von 47 Patienten mit präkanzerösen und kanzerösen Läsionen analysiert. Dabei wurden die identischen Abstriche nacheinander Papanicolaou- und Feulgengefärbt bzw. einer Silbernitrat-Inkubation zur AgNOR-Darstellung unterzogen. Die Sensitivität der Zytologie betrug 100% und die Spezifität 93%. Die DNA-Bildzytometrie zeigte eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 100%. Durch die AgNOR-Analyse hat die Sensitivität wieder 100% erreicht und die Spezifität ist konstant 100% geblieben [79]. Für die drei Untersuchungen wurde ein Mikroskop mit einer besonderen Software verwendet, bei der die Koordinaten der der Diagnose zugrunde gelegten Zellen abgespeichert wurden, so dass die identischen Zellen für alle drei Untersuchungsverfahren zur Verfügung standen. Im Gegensatz zu der Arbeit von Remmerbach et al. wurden die Analysen in unserer Studie ohne eine solche Koordinatenspeicherung durchgeführt. Das heißt, dass zwar im Prinzip dieselbe Zellpopulation an denselben zytologischen Abstrichen ausgewertet wurde, allerdings nicht die dieselben Zellen. Die Unterschiede in den Ergebnissen könnten daher mindestens zu einem auf die verschiedene Vorgehensweise zurückgeführt werden. Dabei hat unsere Arbeit durchaus eine Erhöhung der Sensitivität der konventionellen oralen Zytologie durch die DNA-Bildzytometrie gezeigt. Bei einer konstant als mindestens 95% vorausgesetzten Spezifität zeigte die AgNOR-Analyse allerdings eine Senkung der Sensitivität.

Unsere Schlussfolgerung ist somit, dass die DNA-Bildzytometrie als Zusatzmethode eine höhere diagnostische Sensitivität und Spezifität als die konventionelle Zytologie alleine ermöglicht. Die AgNOR-Analyse dagegen konnte die Treffsicherheit der anderen beiden Methoden nicht weiter verbessern.

6. Schlussfolgerungen

Auf der Basis der Ergebnisse unserer Studie können zusammenfassend folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

Die orale Zytologie stellt eine zuverlässige nicht-invasive Methode für die Diagnostik der oralen Läsionen dar. Die ergänzende DNA-Bildzytometrie der oralen Zytologie führt zu einer Erhöhung der Sensitivität der Methode um 17,7 Prozentpunkte und der Spezifität um 15 Prozentpunkte.

In unserer Studie konnte die AgNOR-Analyse zu keiner Verbesserung der Treffsicherheit in der Diagnostik der Mundschleimhautläsionen beitragen.

Die nach enzymatischer Zellvereinzelnung durchgeführte DNA-Bildzytometrie an histologischen Präparaten konnte in 76,5% der prospektiv malignen Fälle eine Aneuploidie erkennen und in 90% der Fälle mit gutartigen Läsionen eine Aneuploidie ausschließen. Daraus ist zu schließen, dass diese Methode auch an histologischen Präparaten verwendet werden kann.

An denselben histologischen Präparaten und bei einer konstanten Spezifität von 95% zeigte die AgNOR-Analyse keine hohe Sensitivität.

Der Einsatz der DNA-Bildzytometrie und der AgNOR-Analyse an korrespondierenden zytologischen und histologischen Präparaten zeigte eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse.

Der Vergleich der drei Methoden an zytologischen Präparaten führte zu der Schlussfolgerung, dass die ergänzende DNA-Bildzytometrie die Treffsicherheit der konventionellen Zytologie deutlich verbessert, die AgNOR-Analyse aber nicht.

7. Literaturverzeichnis

1. Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. und Parkin, D.M., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, **2010**. 127(12): p. 2893-917.
2. *Krebs in Deutschland 2009/2010*, ed. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Vol. 9. Ausgabe. **2013**, Berlin: Robert Koch-Institut
3. Sarode, S.C., Sarode, G.S. und Tupkari, J.V., *Oral potentially malignant disorders: precisising the definition*. Oral Oncol, **2012**. 48(9): p. 759-60.
4. Warnakulasuriya, S., Johnson, N.W. und van der Waal, I., *Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa*. J Oral Pathol Med, **2007**. 36(10): p. 575-80.
5. Papanagiotou, P., *Stomatology, Diagnosis and therapy of diseases of the oral mucosa*. 3rd Edition ed. **2002**, Thessaloniki: Fototipotiki.
6. Regezi, J.A., Sciubba, J. J., Jordan, R. C. K. , *Oral Pathology, Clinical Pathologic Correlations*. Fourth Edition ed, ed. Elsevier. **2003**, Missouri, USA: Elsevier.
7. Straßburg, M., Knolle, G., *Farbatlas und Lehrbuch der Mundschleimhautrekrankungen*. 3. Auflage ed. **1991**, Berlin: Quintessenz Verlag-GmbH.
8. Bombeccari, G.P., Guzzi, G., Tettamanti, M., Gianni, A.B., Baj, A., Pallotti, F. und Spadari, F., *Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, **2011**. 112(3): p. 328-34.
9. Huber, M.A., *White oral lesions, actinic cheilitis, and leukoplakia: confusions in terminology and definition: facts and controversies*. Clin Dermatol, **2010**. 28(3): p. 262-8.
10. Jaafari-Ashkavandi, Z., Mardani, M., Pardis, S. und Amanpour, S., *Oral mucocutaneous diseases: clinicopathologic analysis and malignant transformation*. J Craniofac Surg, **2011**. 22(3): p. 949-51.
11. Ramos-e-Silva, M., Jacques, C. und Carneiro, S.C., *Premalignant nature of oral and vulval lichen planus: facts and controversies*. Clin Dermatol, **2010**. 28(5): p. 563-7.
12. Kaplan, I., Ventura-Sharabi, Y., Gal, G., Calderon, S. und Anavi, Y., *The dynamics of oral lichen planus: a retrospective clinicopathological study*. Head Neck Pathol, **2012**. 6(2): p. 178-83.

13. Shen, Z.Y., Liu, W., Feng, J.Q., Zhou, H.W. und Zhou, Z.T., *Squamous cell carcinoma development in previously diagnosed oral lichen planus: de novo or transformation?* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, **2011**. 112(5): p. 592-6.
14. Amagasa, T., Yamashiro, M. und Uzawa, N., *Oral premalignant lesions: from a clinical perspective*. Int J Clin Oncol, **2011**. 16(1): p. 5-14.
15. Epstein, J.B., Cabay, R.J. und Glick, M., *Oral malignancies in HIV disease: changes in disease presentation, increasing understanding of molecular pathogenesis, and current management*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, **2005**. 100(5): p. 571-8.
16. Khan, F.M., Sy, S., Louie, P., Ugarte-Torres, A., Berka, N., Sinclair, G.D., Stewart, D.A., Russell, J.A. und Storek, J., *Genomic instability after allogeneic hematopoietic cell transplantation is frequent in oral mucosa, particularly in patients with a history of chronic graft-versus-host disease, and rare in nasal mucosa*. Blood, **2010**. 116(10): p. 1803-6.
17. Scully, C., *Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, **2011**. 16(3): p. e306-11.
18. WORLD HEALTH ORGANIZATION und INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, *Tobacco Smoke and Involuntary Smoking, Summary of Data Reported and Evaluation*. **2002**.
19. Lambert, R., Sauvaget, C., de Camargo Cancela, M. und Sankaranarayanan, R., *Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx*. Eur J Gastroenterol Hepatol, **2011**. 23(8): p. 633-41.
20. Testino, G., *The burden of cancer attributable to alcohol consumption*. Maedica (Buchar), **2011**. 6(4): p. 313-20.
21. Mehrotra, R., *The role of cytology in oral lesions: a review of recent improvements*. Diagn Cytopathol, **2012**. 40(1): p. 73-83.
22. Holmstrup, P., Vedtofte, P., Reibel, J. und Stoltze, K., *Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable?* J Oral Pathol Med, **2007**. 36(5): p. 262-6.
23. Mehrotra, R., ed. *Oral cytology: a concise guide*. **2013**, Springer: New York
24. Navone, R., Pentenero, M. und Gandolfo, S., *Liquid-based cytology in oral cavity squamous cell cancer*. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, **2011**. 19(2): p. 77-81.
25. Babshet, M., Nandimath, K., Pervatkar, S. und Naikmasur, V., *Efficacy of oral brush cytology in the evaluation of the oral premalignant and malignant lesions*. J Cytol, **2011**. 28(4): p. 165-72.

26. Böcking, A., Sproll, C., Stocklein, N., Naujoks, C., Depprich, R., Kubler, N.R. und Handschel, J., *Role of brush biopsy and DNA cytometry for prevention, diagnosis, therapy, and followup care of oral cancer*. J Oncol, **2011**. 2011: p. 875959.
27. Kämmerer, P.W., Koch, F.P., Santoro, M., Babaryka, G., Biesterfeld, S., Brieger, J. und Kunkel, M., *Prospective, blinded comparison of cytology and DNA-image cytometry of brush biopsies for early detection of oral malignancy*. Oral Oncol, **2013**. 49(5): p. 420-6.
28. Koch, F.P., Kunkel, M., Biesterfeld, S. und Wagner, W., *Diagnostic efficiency of differentiating small cancerous and precancerous lesions using mucosal brush smears of the oral cavity-a prospective and blinded study*. Clin Oral Investig, **2011**. 15(5): p. 763-9.
29. Mehrotra, R., Mishra, S. und Singh, M., *The efficacy of oral brush biopsy with computer-assisted analysis in identifying precancerous and cancerous lesions*. Head Neck Oncol, **2011**. 3: p. 39.
30. Bhoopathi, V., Kabani, S. und Mascarenhas, A.K., *Low positive predictive value of the oral brush biopsy in detecting dysplastic oral lesions*. Cancer, **2009**. 115(5): p. 1036-40.
31. Biesterfeld, S., *Manuskript Biesterfeld IAP-Kurs Ergüsse 2013*.
32. Biesterfeld, S., Beckers, S., Del Carmen Villa Cadenas, M. und Schramm, M., *Feulgen staining remains the gold standard for precise DNA image cytometry*. Anticancer Res, **2011**. 31(1): p. 53-8.
33. Handschel, J., Oz, D., Pomjanski, N., Depprich, R., Ommerborn, M.A., Braunstein, S., Kubler, N.R., Meyer, U. und Böcking, A., *Additional use of DNA-image cytometry improves the assessment of resection margins*. J Oral Pathol Med, **2007**. 36(8): p. 472-5.
34. Bremmer, J.F., Brakenhoff, R.H., Broeckaert, M.A., Belien, J.A., Leemans, C.R., Bloemena, E., van der Waal, I. und Braakhuis, B.J., *Prognostic value of DNA ploidy status in patients with oral leukoplakia*. Oral Oncol, **2011**. 47(10): p. 956-60.
35. Hullmann, M., Reichert, T.E., Dahse, R., von Eggeling, F., Pistner, H., Kosmehl, H. und Driemel, O., *[Oral cytology: historical development, current status, and perspectives]*. Mund Kiefer Gesichtschir, **2007**. 11(1): p. 1-9.
36. Elangovan, T., Mani, N.J. und Malathi, N., *Argyrophilic nucleolar organizer regions in inflammatory, premalignant, and malignant oral lesions: a quantitative and qualitative assessment*. Indian J Dent Res, **2008**. 19(2): p. 141-6.

37. Remmerbach, T.W., Weidenbach, H., Muller, C., Hemprich, A., Pomjanski, N., Buckstegge, B. und Böcking, A., *Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity*. Anal Cell Pathol, **2003**. 25(3): p. 139-46.
38. Lopez-Blanc, S.A., Collet, A.M., Gandolfo, M.S., Femopase, F., Hernandez, S.L., Tomasi, V.H., Paparella, M.L. und Itoiz, M.E., *Nucleolar organizer regions (AgNOR) and subepithelial vascularization as field cancerization markers in oral mucosa biopsies of alcoholic and smoking patients*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, **2009**. 108(5): p. 747-53.
39. Hanemann, J.A., Miyazawa, M. und Souza, M.S., *Histologic grading and nucleolar organizer regions in oral squamous cell carcinomas*. J Appl Oral Sci, **2011**. 19(3): p. 280-5.
40. Böcking, A., Grote, H. J., Buckstegge, B., Knops K., *Labormethoden der Cytopathologie, Grundkurs, Routine-Verfahren*, ed. Institut für Cytopathologie, U.D. **2008**, Düsseldorf: Akademie für Fortbildung in der Morphologie e.V.
41. Maraki, D., Becker, J. und Boecking, A., *Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer*. J Oral Pathol Med, **2004**. 33(7): p. 398-404.
42. Remmerbach, T.W., Weidenbach, H., Pomjanski, N., Knops, K., Mathes, S., Hemprich, A. und Böcking, A., *Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer*. Anal Cell Pathol, **2001**. 22(4): p. 211-21.
43. Böcking, A., *Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie*. Pathologie, **1998**. 3(19): p. 235–258.
44. Chieco, P. und Derenzini, M., *The Feulgen reaction 75 years on*. Histochem Cell Biol, **1999**. 111(5): p. 345-58.
45. Böcking, A., Grote, J., Pomjanski, N., Buckstegge, B., Knops, K., Varnai, A., Heller, H., Haroske G., *Labormethoden der Cytopathologie, Aufbaukurs: Adjuvante Verfahren, DNA-Bildzytometrie, Immuncytochemie, Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung*, ed. Institut für Cytopathologie, U.D., Institut für Pathologie, Bonn-Duisdorf, Institut für Pathologie, Klinikum Dresden Friedrichstadt. **2008**: Institut für Cytopathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Institut für Pathologie, Bonn-Duisdorf, Institut für Pathologie, Klinikum Dresden Friedrichstadt.
46. Girmer, G., *Stellenwert der DNA-Bildzytometrie in der Differentialdiagnostik leiomyogener Tumoren*, in *Medizinische Fakultät*. **2009**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz: Mainz.
47. Biesterfeld, S., *Interaktiver Monitor bei der DNA-Bildzytometrie, Zurverfügungstellung von urheberrechtlich geschützten Abbildungen aus dem Bestand des Schwerpunktes Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* **2013**: Düsseldorf.

48. Hardie, D.C., Gregory, T.R. und Hebert, P.D., *From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry*. J Histochem Cytochem, **2002**. 50(6): p. 735-49.
49. Maraki, D., *Bedeutung der Exfoliativzytologie und DNA-Bildzytometrie der Mundschleimhaut im Vergleich zur konventionellen Histologie*, in *Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*. **2005**, Heinrich-Heine-Universität: Düsseldorf.
50. Haroske, G., Giroud, F., Reith, A. und Böcking, A., *1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation*. European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol, **1998**. 17(4): p. 189-200.
51. Haroske, G., Baak, J.P., Danielsen, H., Giroud, F., Gschwendtner, A., Oberholzer, M., Reith, A., Spieler, P. und Böcking, A., *Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry*. Anal Cell Pathol, **2001**. 23(2): p. 89-95.
52. Crocker, J., Boldy, D.A. und Egan, M.J., *How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach*. J Pathol, **1989**. 158(3): p. 185-8.
53. Rajput, D.V. und Tupkari, J.V., *Early detection of oral cancer: PAP and AgNOR staining in brush biopsies*. J Oral Maxillofac Pathol, **2010**. 14(2): p. 52-8.
54. Reibel, J., *Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics*. Crit Rev Oral Biol Med, **2003**. 14(1): p. 47-62.
55. Böcking, A., ed. *Mit Zellen statt Skalpell*. Vol. 48. **2007**, GEK-Gmünder ErsatzKasse, Medizinisches Versorgungsmanagement: Berlin.
56. Remmerbach, T.W., Mathes, S.N., Weidenbach, H., Hemprich, A. und Böcking, A., *[Noninvasive brush biopsy as an innovative tool for early detection of oral carcinomas]*. Mund Kiefer Gesichtschir, **2004**. 8(4): p. 229-36.
57. Böcking, A., *[Standardization of cytopathologic diagnosis]*. Pathologe, **1998**. 19(3): p. 236-41.
58. Fleskens, S. und Slootweg, P., *Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility*. Head Neck Oncol, **2009**. 1: p. 11.
59. Silverman, S., Jr., Gorsky, M. und Lozada, F., *Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients*. Cancer, **1984**. 53(3): p. 563-8.

60. Schepman, K.P., van der Meij, E.H., Smeele, L.E. und van der Waal, I., *Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands*. Oral Oncol, **1998**. 34(4): p. 270-5.
61. Lumerman, H., Freedman, P. und Kerpel, S., *Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, **1995**. 79(3): p. 321-9.
62. Ma, J.M., Zhou, T.J., Wang, R., Shan, J., Wu, Y.N., Song, X.L., Gu, N. und Fan, Y., *Brush biopsy with DNA-image cytometry: a useful and noninvasive method for monitoring malignant transformation of potentially malignant oral disorders*. Eur Arch Otorhinolaryngol, **2014**.
63. Biesterfeld, S., Füzesi, L., Härle, F. und Böcking, A., *DNA-cytometric detection of euploid polyploidization in oral lichen ruber planus*. Anal Quant Cytol Histol, **1991**. 13(1): p. 7-10.
64. Pektas, Z.O., Keskin, A., Gunhan, O. und Karslioglu, Y., *Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements*. J Oral Maxillofac Surg, **2006**. 64(4): p. 628-35.
65. Torres-Rendon, A., Stewart, R., Craig, G.T., Wells, M. und Speight, P.M., *DNA ploidy analysis by image cytometry helps to identify oral epithelial dysplasias with a high risk of malignant progression*. Oral Oncol, **2009**. 45(6): p. 468-73.
66. Santos-Silva, A.R., Ribeiro, A.C., Soubhia, A.M., Miyahara, G.I., Carlos, R., Speight, P.M., Hunter, K.D., Torres-Rendon, A., Vargas, P.A. und Lopes, M.A., *High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study*. Histopathology, **2011**. 58(7): p. 1127-35.
67. Biesterfeld, S. und Schreiber, H., *The relationship between aneuploidy and p53 overexpression during genesis of colorectal adenocarcinoma*. Virchows Arch, **1995**. 427(4): p. 459.
68. Gouvea, A.F., Santos Silva, A.R., Speight, P.M., Hunter, K., Carlos, R., Vargas, P.A., de Almeida, O.P. und Lopes, M.A., *High incidence of DNA ploidy abnormalities and increased Mcm2 expression may predict malignant change in oral proliferative verrucous leukoplakia*. Histopathology, **2013**. 62(4): p. 551-62.
69. Pentenero, M., Giaretti, W., Navone, R., Demurtas, A., Rostan, I., Bertolusso, G., Broccoletti, R., Arduino, P.G., Malacarne, D. und Gandolfo, S., *DNA aneuploidy and dysplasia in oral potentially malignant disorders: association with cigarette smoking and site*. Oral Oncol, **2009**. 45(10): p. 887-90.

70. Fontes, P.C., Correa, G.H., Issa, J.S., Brandao, A.A. und Almeida, J.D., *Comparison of exfoliative pap stain and AgNOR counts of the tongue in smokers and nonsmokers*. Head Neck Pathol, **2008**. 2(3): p. 157-62.
71. Jindal, S., Chauhan, I. und Grewal, H.K., *Alteration in buccal mucosal cells due to the effect of tobacco and alcohol by assessing the silver-stained nucleolar organizer regions and micronuclei*. J Cytol, **2013**. 30(3): p. 174-8.
72. Mohan, B.C. und Angadi, P.V., *Exfoliative cytological assessment of apparently normal buccal mucosa among quid chewers using argyrophilic nucleolar organizer region counts and Papanicolaou staining*. Acta Cytol, **2013**. 57(2): p. 164-70.
73. de M. Thiele, M.C., Bohn, J.C., Chaiben, C.L., Gregio, A.M., Machado, M.A. und de Lima, A.A., *Nucleolar organizer regions of oral epithelial cells in crack cocaine users*. Iran Biomed J, **2013**. 17(2): p. 107-11.
74. Pillai, K.R., Sujathan, K., Madhavan, J. und Abraham, E.K., *Significance of silver-stained nucleolar organizer regions in early diagnosis and prognosis of oral squamous cell carcinoma: a multivariate analysis*. In Vivo, **2005**. 19(4): p. 807-12.
75. de Sousa, F.A., Paradella, T.C., Carvalho, Y.R. und Rosa, L.E., *Comparative analysis of cell proliferation ratio in oral lichen planus, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, **2009**. 14(11): p. e563-7.
76. Moradzadeh Khiavi, M., Vosoughhosseini, S., Halimi, M., Mahmoudi, S.M. und Yarahmadi, A., *Nucleolar organizer regions in oral squamous cell carcinoma*. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, **2012**. 6(1): p. 17-20.
77. Chowdhry, A., Deshmukh, R.S., Shukla, D., Bablani, D. und Mishra, S., *Quantitative estimation of AgNORs in normal, dysplastic and malignant oral mucosa*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, **2013**.
78. Garg, K.N., Raj, V. und Chandra, S., *Evaluation of the efficacy of AgNOR as a proliferative marker in oral leukoplakia: A morphometric analysis*. Natl J Maxillofac Surg, **2013**. 4(1): p. 40-5.
79. Remmerbach, T.W., Meyer-Ebrecht, D., Aach, T., Wurflinger, T., Bell, A.A., Schneider, T.E., Nietzke, N., Frerich, B. und Böcking, A., *Toward a multimodal cell analysis of brush biopsies for the early detection of oral cancer*. Cancer, **2009**. 117(3): p. 228-35.

Danksagung:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. J. Becker, Herrn Professor Dr. S. Biesterfeld und Herrn Professor Dr. A. Böcking für das Überlassen des Themas, die hervorragende Betreuung und für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten, Geräte und Materialien.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei dem Personal des Instituts für Cytopathologie für die technische und seelische Unterstützung bedanken. Mein Dank gilt auch allen ehemaligen Kollegen/innen in der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme der Westdeutschen Kieferklinik des Universitätsklinikum Düsseldorf für die Hilfe bei der Rekrutierung und Behandlung der Patienten der Studie.

Bei alle Teilnehmern der Studie möchte ich mich auch bedanken, denn ohne deren Teilnahme wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Ein besonderer Dank gilt auch Professor Dr. J. Deschner, der im Rahmen meiner neuen Beschäftigung verständnisvoll war und mir die Freiräume geschaffen hat, damit ich diese Arbeit zügig beenden konnte.

Mein größter Dank gilt schließlich meinen Eltern und meiner Schwester, die durch ihre vielfältige Unterstützung die Vollendung dieser Arbeit erleichtert haben.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf,

Anna Damanaki