

Aus dem Institut für Pathologie und Funktionsbereich Cytopathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Funktionsbereich Cytopathologie
Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Stellenwert der Mundhöhlenzytologie bei Fanconi - Anämie

Dissertation

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

vorgelegt von
Doris Naczke
2014

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

gez.:

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Biesterfeld

Zweitgutachter: Prof. Dr. Germing

„Damit das Mögliche entsteht, muss immer wieder
das Unmögliche versucht werden.“

(Hermann Hesse, 1960)

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	
II.	Tabellen	
III.	Abbildungen	
1.	Einleitung	1
1.1.	Die Fanconi-Anämie – eine komplexe, genetisch determinierte seltene Erkrankung	1
1.2.	Diagnose und Therapiemöglichkeiten der Fanconi-Anämie	5
1.3.	Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle bei FA-Patienten im Vergleich zum sporadischen Mundschleimhautkarzinom.....	8
2.	Ziel der Arbeit.....	13
3.	Material und Methoden.....	14
3.1.	Material.....	14
3.2.	Methoden	14
3.2.1.	Konventionelle zytologische Diagnostik.....	14
3.2.2.	DNA-Bildzytometrie.....	18
3.2.3.	Aufarbeitung von Patientenakten	23
3.2.4.	Statistik	24
4.	Ergebnisse	25
4.1.	Allgemeine Patientendaten	25
4.2.	Ergebnisse der konventionellen und adjuvanten Zytodiagnostik	26
4.3.	Klinisches Follow-up.....	33
4.4.	Betrachtung eines besonderen Falls: Herr J.O.	37
5.	Diskussion.....	41
5.1.	Die Fanconi-Anämie als ernstzunehmende hämatologische und tumorbildene Erkrankung.....	41

5.2.	Primäre und sekundäre Tumorprävention: Klinische Aspekte	44
5.3.	Primäre und sekundäre Tumorprävention: Zytologische Aspekte	45
6.	Zusammenfassung.....	49
IV.	Literaturverzeichnis	50
V.	Abkürzungsverzeichnis	56
Anhang.....		57

II. Tabellen

Tab. 1: Häufigkeit von Fehlbildungen bei der FA (nach TISCHKOWITZ & DOKAL 2004)	2
Tab. 2: Patientenbezogene Aufstellung von Kenndaten der konventionellen Zytologie; KMT = Knochenmarktransplantation.....	26
Tab. 3: Probenbezogene Aufstellung der Lokalisationen der Entnahmen und der Ergebnisse der konventionellen Zytologie.....	29
Tab. 4: Durchführung DNA-bildzytometrischer Messungen nach Diagnosegruppe	31
Tab. 5: Ergebnisse DNA-bildzytometrischer Messungen	32
Tab. 6: Ergebnisse der Auswertung der bis Juli 2013 aufgetretenen Todesfälle	35
Tab. 7: Datensammlung zum Krankheitsverlauf des Patienten S.S.	57

III. Abbildungen

Abb. 1:	Fehlbildung des linken Ohres bei einem FA-Patienten (VELLEUER 2013)...	3
Abb. 2:	Fehlbildung des 1. Strahles der Hand bei einem FA-Patienten. a) Aufsicht, b) Blick auf eine stummelartige fragliche Daumenanlage (VELLEUER 2013)...	3
Abb. 3:	Makroskopie eines Plattenepithelkarzinoms der Mundschleimhaut am Lippenwinkel (BIESTERFELD 2013)	9
Abb. 4:	Histologie eines mäßig differenzierten Plattenepithelkarzinoms (G2), HE-Färbung, 20x Objektivvergrößerung (BIESTERFELD 2013)	9
Abb. 5:	Beispiel für eine Mundlandkarte mit Einzeichnung von zehn Entnahmestellen zytologischer Proben (modifiziert nach VELLEUER 2013)	15
Abb. 6:	DNA-bildzytometrische Messeinrichtung (BIESTERFELD 2013)	21
Abb. 7:	Interaktiver Monitor bei der DNA-Zytometrie (BIESTERFELD 2013)	22
Abb. 8:	Aneuploide DNA-Verteilung in einem Karzinom mit einer DNA-Stammlinie bei ca. 2,5c (unten) im Vergleich zu einer diploiden DNA Verteilung in normalen Zellen (oben) (BIESTERFELD 2013)	23
Abb. 9:	Herkunftsländer der untersuchten Patienten mit Fanconi-Anämie	25
Abb. 10:	Follow-Up-Zeitraum in Monaten mit entsprechender Patientenanzahl	34
Abb. 11:	Beispiel einer bei Herrn O. aufgetretenen flächigen, teils erodierten und klinisch unklaren Läsion an der Unterlippenschleimhaut (VELLEUER 2013). Zytologisch Nachweis maligner Tumorzellen („positiv“). Histologisch Plattenepithelkarzinom.	38
Abb. 12:	Beispiel einer bei Herrn O. aufgetretenen teils retikulären Erythro-leukoplakie am Planum buccale rechts (VELLEUER 2013). Zytologisch kein Nachweis von Tumorzellen („negativ“). Keine histo-logische Probenentnahme.	38
Abb. 13:	Zytologische Ergebnisse der 55 Büstenbiopsien von Herrn O.	39
Abb. 14:	DNA-Zytometrie-Vollautomat.....	45

1. Einleitung

1.1. Die Fanconi-Anämie – eine komplexe, genetisch determinierte seltene Erkrankung

Die Fanconi-Anämie (FA) ist eine genetisch bedingte komplexe Erkrankung, die durch diverse mögliche angeborene Fehlbildungen, gravierende hämatologische Veränderungen sowie durch eine Prädisposition für oropharyngeale, ösophageale bzw. anogenitale Plattenepithelkarzinome charakterisiert ist. Sie muss rein begrifflich von dem Fanconi-Syndrom, einer Nierenfunktionsstörung, abgegrenzt werden.

Das klinische Bild der FA wurde 1927 erstmals von einem Schweizer Kinderarzt, Professor Guido Fanconi, beschrieben und bereits 1931 nach ihm benannt. Anlass zur Forschung war ein fünfjähriger Junge, der mit einer bis dato unbekanntem Anämie ins Krankenhaus eingeliefert wurde und zwei Jahre später verstarb (VELLEUER 2005).

Gegenwärtig zeigt sich, dass es sich bei dieser um eine angeborene aplastische Anämie handelt, die ein typisches Charakteristikum der FA darstellt und häufig die primäre Diagnose eines betroffenen Patienten ist. Bei der auch als 'Panmyelopathie' bezeichneten Erkrankung kommt es zu einer verminderten bzw. komplett fehlenden Zellproduktion im Knochenmark, infolgedessen eine Störung aller drei Zelltypen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) resultiert. Neben einer solchen Bildungsstörung der Blutzellen kann es auch zu einer Ausreifungsstörung kommen, was dann als myelodysplastisches Syndrom (MDS) bezeichnet wird. Ferner kann sich im Verlauf über ein MDS eine akute myeloische Leukämie (AML) entwickeln, die ab einem Anteil von 20 bis 30 Prozent Blasten im Knochenmark als solche bezeichnet wird. Im Gegensatz zu früher, als die FA-Patienten an Blutungen (durch Thrombozytopenie) bzw. spätestens an der AML regelhaft verstarben, werden heute therapeutische Optionen - insbesondere die Knochenmarkstransplantation (s. unten) - angewendet. Besonders wichtig ist es dabei,

regelmäßige Blut- bzw. Knochenmarksuntersuchungen durchzuführen (SHIMAMURA 2005).

Neben den genannten hämatologischen Problemen von FA-Patienten sind einige phänotypische Auffälligkeiten kennzeichnend (Tabelle 1), die allerdings nur 70% der Patienten betreffen. Dazu gehören u.a. Hypo- bzw. Hyperpigmentierungen und *Café au lait*-Flecken der Haut, Kleinwuchs, Fehlbildungen der Daumen und Arme sowie von Kopf, Ohren, Augen und Nieren (ALTER 2008).

Tab. 1: Häufigkeit von Fehlbildungen bei der FA (nach TISCHKOWITZ & DOKAL 2004)

Malformation	Häufigkeit
Skelettal	71
Hautpigmentierungen	64
Kleinwuchs	63
Augen	38
Nieren- und Harnwege	34
Männliche Geschlechtsorgane	20
Mentale Retardierung	16
Gastrointestinal	14
Kardial	13
Gehörorgan	11
ZNS	8
Keine Fehlbildungen	30

In den Abbildungen 1 und 2 sind eine typische Malformation am Ohr bzw. als Beispiel für eine häufige skelettale Fehlbildung eine Veränderung am ersten Strahl der Hand dargestellt, wobei Abbildung 2b eine stummelförmige Restanlage eines Daumens vermuten lässt.



Abb. 1: Fehlbildung des linken Ohres bei einem FA-Patienten (VELLEUER 2013)



Abb. 2: Fehlbildung des 1. Strahles der Hand bei einem FA-Patienten. a) Aufsicht, b) Blick auf eine stummelartige fragliche Daumenanlage (VELLEUER 2013)

Die Fanconi-Anämie muss von anderen Erkrankungen abgegrenzt werden.

Ein in vielerlei Hinsicht ähnliches Krankheitsbild weist die Diamond-Blackfan-Anämie (DBA) auf, die genau wie die Fanconi Anämie zu den vom National Cancer Institute der USA ausgewiesenen IBMFS („Inherited Bone Marrow Failure Syndromes“) gehört (VLACHOS ET AL. 2012). Die DBA zeichnet sich ebenso durch kongenitale Fehlbildungen v.a. im Kopf- und Halsbereich, Versagen des Knochenmarks, hämatologische Veränderungen und einer Prädisposition für Krebserkrankungen aus. Ein signifikanter Unterschied zur FA besteht darin, dass nur die Bildung der Erythrozyten gestört ist. Es wird angenommen, dass eine fehlerhafte Ribosomen-Biogenese für eine proapoptotische Erythropoese und somit für fehlerhafte Erythrozyten verantwortlich ist (LIPTON & ELLIS 2009).

Ebenfalls eine angeborene autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung und zu den IBMFS zugehörig ist das Shwachman-Diamond-Syndrom (SDS). Auch diese Patienten fallen durch skelettale Fehlbildungen, v.a. Kleinwuchs auf. 88-100% der Betroffenen leiden unter einer Neutropenie, 42-82% haben eine Anämie und 10-65% erkranken an einer Panmyelopathie und im Folgenden an einer aplastischen Anämie (BURROUGHS ET AL. 2009). Hier scheinen sich die FA und das SDS sehr ähnlich zu sein. Ein signifikantes weiteres Merkmal der SDS ist allerdings eine exokrine Pankreasinsuffizienz, die u.a. durch eine Malabsorption zum Ausdruck kommt. Können Standarduntersuchungen, wie Bluttests oder Knochenmarksuntersuchungen keinen Aufschluss über die vorliegende Erkrankung liefern, wird spätestens eine Chromosomenuntersuchung Aufschluss geben (vgl. 1.2).

Die FA ist genau wie die exemplarisch genannten anderen Erkrankungen eine insgesamt seltene Erkrankung. Ihre Prävalenz wird auf ca. 1:300.000 geschätzt (HIRSCHFELD ET AL. 2007). Aufgrund ihrer Seltenheit und den möglichen Differentialdiagnosen, ist eine umfangreiche Befundaufnahme obligat; denn nur auf diese Weise gelingt eine sichere Diagnose und es kann eine optimale Therapie durchgeführt werden.

1.2. Diagnose und Therapiemöglichkeiten der Fanconi-Anämie

Die Diagnose einer FA ist, wie in 1.1 erläutert, diffizil. Diesbezüglich muss bedacht werden, dass eine Reihe von FA-Patienten erst mit ungefähr 7 Jahren und nicht etwa bereits als Säuglinge oder Kleinkinder als Betroffene erkannt werden (GIAMPIETRO ET AL. 1993).

Dieses liegt zum einen sicher daran, dass das phänotypische Bild der FA-Patienten nicht allgemein bekannt ist, aber ferner daran, dass lange nicht alle klare phänotypische Veränderungen, wie sie oben beschrieben wurden, aufweisen. Auch auf hämatologischem Sektor gibt es verschieden schwere Verlaufsformen, sodass möglicherweise bei weitestgehend fehlendem Phänotyp und nur gering ausgeprägten hämatologischen Veränderungen lange nicht an eine FA gedacht wird. In Einzelfällen wird selbst noch bei Erwachsenen eine FA erstdiagnostiziert¹ (DOKAL & VULLIAMY 2010).

Ein fundierter Verdacht auf eine FA sollte sich ergeben, wenn die bereits genannten phänotypischen und hämatologischen Auffälligkeiten vorhanden sind. Außerdem sollten zwingend Untersuchungen bei Patienten erfolgen, deren Geschwister oder andere nahe Angehörige an FA erkrankt sind. Weiterhin auffällig sind tendenziell junge Patienten mit Tumoren, sodass hier nicht nur an ein HNPCC-Syndrom, sondern auch an andere mit Tumoren assoziierte Erkrankungen des jüngeren Alters und eben auch an FA gedacht werden sollte, gerade auch wenn die Tumoren eine erhöhte Sensibilität gegenüber Chemo- oder Radiotherapie zeigen. Gleichermassen verdächtig sind junge Patienten mit Lebertumoren, die nicht den typischen Risikofaktoren Hepatitis oder Alkoholkonsum mit Leberzirrhose ausgesetzt sind; auftreten können sowohl gutartige Leberzelladenome, als auch hepatozelluläre Karzinome (ALTER 2008).

Liegen derartige Konstellationen vor, so sollten schnellstmöglich diagnostische Maßnahmen ergriffen werden.

¹ So wurde der Deutschen Fanconi-Anämie Hilfe e.V. noch im Jahr 2011 ein kurz danach verstorbener Patient vorgestellt, der bereits 42 Jahre alt war und bei dem es (bei leerer Familienanamnese als Adoptivkind) erst im Rahmen der Diagnostik eines infausten Mundbodenkarzinoms im Stadium IV zur FA-Diagnose gekommen war - auch er hatte typische, wenn auch mildere Symptome der Erkrankung bereits als Kind aufgewiesen.

Zu den Basisuntersuchungen bei der Prä- und Postnataldiagnose der FA zählt die Chromosomenbruchuntersuchung des Blutes. Es konnte gezeigt werden, dass die Chemikalien Diepoxybutan (DEB) und Mitomycin C (MMC) einen clastogenen Effekt auf die empfindlichen FA-Zellen ausüben (AUERBACH 2009). Da DEB eine hoch giftige Chemikalie ist, wird MMC mittlerweile als diagnostisches Hilfsmittel präferiert. Kommt es zu einem hämatopoetischen somatischen Mosaik, d.h. zum simultanen Vorkommen von normalen und FA-Zellen im Blut, kann es hilfreich sein, statt einer Blutanalyse eine entsprechende Untersuchung an Fibroblasten durchzuführen (ALTER 2008). Während die Bruchrate im peripheren Blut dann als normal getestet wird, kommt es bei den Fibroblasten zu den erwarteten MMC-induzierten Chromosomenbrüchen.

Alternativ kann mithilfe der Durchflusszytometrie eine Zell-Zyklus-Analyse erfolgen. FA-Zellen verbleiben länger in der G₂/M-Phase und können nach Zugabe von Clastogenen kenntlich gemacht werden. Aufgrund der Notwendigkeit hochwertigen und teuren Instrumentariums wird diese Methode jedoch eher selten angewandt (ALTER 2008).

Ist eine FA diagnostiziert, so sollte es primär zu regelmäßigen Untersuchungen aller bedeutsamen Bereiche kommen. Dazu zählen Hörtests, Entwicklungstests, Ultraschalluntersuchungen von Nieren und ableitenden Harnwegen mit fortführenden Kontrollen durch den Urologen, augenärztliche Untersuchungen, eine gynäkologische Überwachung, zahnärztliche Kontrollen und besonders wichtig die regelmäßige Blut- und Knochenmarkuntersuchung (NEUFELD 2005).

Zusätzlich kann eine so genannte Komplementationsanalyse erfolgen. Diese spezifiziert die Zugehörigkeit zu einer bestimmten FA-Untergruppe und kann so den Gendefekt identifizieren, der die chromosomale Instabilität hervorruft. Bisher konnten 15 Komplementationsgruppen definiert werden (KNIES ET AL. 2012). In acht von ihnen lassen sich gegenwärtig Patienten klassifizieren (FA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -J und -L), wobei sich einige in der klinischen Ausprägung der FA sehr ähnlich sind (ZIERHUT 2008). Wichtig ist diese Einteilung vor allem zukünftig, vorausgesetzt es wird möglich, mithilfe Gentherapie therapeutisch einzuwirken. Leider gibt es zum aktuellen Zeitpunkt noch keine Therapie, die alle symptomatischen Erscheinungen simultan beheben kann.

Besonders häufig und schwerwiegend ist jedoch im Verlauf das mittelgradige bis schwere Knochenmarksversagen, das unbedingt therapiert werden muss. Hierfür stehen als therapeutische Optionen die Knochenmarktransplantation oder die medikamentöse Androgentherapie zur Verfügung.

Kann zum aktuellen Zeitpunkt kein passender Spender gefunden werden oder kommt aus anderen Gründen eine Knochenmarktransplantation nicht in Frage, so wird mit Androgenen, im Speziellen mit Oxymetholon und Danazol, behandelt. Diese wirken vorwiegend auf die Erythrozyten und Thrombozyten, gelegentlich auch auf die Granulozyten. Es konnte gezeigt werden, dass der hämatopoetische Effekt der Steroide aus einer verlängerten Lebensdauer bzw. einer verstärkten Proliferation der Stammzellen von Erythrozyten und Granulozyten resultiert (BERAN ET AL. 1982). Des Weiteren scheint Oxymetholon auf die Glykolyse von Erythrozyten einzuwirken (MOLINARI & NERI 1978). Sinkt das Hämoglobin unter 8g/dl oder die Thrombozyten unter 30000/ μ l, sollte mit der Therapie begonnen werden.

Veranschaulichen lässt sich die Wirkung der Androgene am jetzt (2013) 14-jährigen Patienten S. S.

Kurz vor Beginn der Therapie variierte der Hb-Wert im Bereich zwischen 5,2 und 8,3g/dl, die Erythrozyten lagen ungefähr bei 2 Mio./ μ l und die Thrombozyten zwischen 11.000 und 20.000 / μ l. Die Anfangsdosis lag bei 50mg Oxymetholon einmal am Tag und 5mg Decortin jeden zweiten Tag. Sieben Monate später konnte die Dosis bereits auf 25mg Oxymetholon täglich reduziert werden. Acht Monate nach Beginn der Therapie lagen der Hb-Wert bei 15,3g/dl, die Erythrozytenzahl bei 4,3 Mio./ μ l und die Thrombozyten bei 62000/ μ l. Über 6 Jahre konnte so das Blutbild auf einem stabilen Level gehalten werden, bis eine Stammzelltransplantation unumgänglich wurde.

Bedauerlicherweise müssen jedoch bei der Behandlung mit Androgenen diverse Nebenwirkungen einkalkuliert werden. Dazu zählen unter anderem Vermännlichung, frühzeitiger Schluss der Epiphysen mit entsprechender Wachstumsproblematik, Anstieg der Leberwerte, Hyperaktivität oder die Bildung von Leberzelladenomen. Aufgrund dessen sollte die Dosis androgener Medikamente so gering wie möglich gehalten werden; die Anfangsdosis für

Oxymetholon liegt üblicherweise bei 2-5 mg/kg/Tag, wobei nach zwei bis vier Monaten mit einer Dosisreduktion begonnen werden kann, sofern die Therapie anspricht. Alle Veränderungen, die als Therapiefolge angesehen werden können, müssen genauestens beobachtet werden (SHIMAMURA 2005).

Gegenwärtig ist es jedoch ausschließlich mit der hämatopoetischen Stammzelltransplantation möglich, der Blutbildungsstörung langfristig entgegenzuwirken. Dabei sollte HLA-identischen Geschwisterspendern gegenüber alternativen Spendern der Vorzug gegeben werden. So können mittlerweile trotz der immer noch bestehenden Risiken der Abstoßungsreaktion und der Graft versus Host Disease (GvHD) sehr gute Langzeitergebnisse erzielt werden (HANSEN 2005).

Werden an dieser Stelle zur Veranschaulichung noch einmal die Daten von S. S. hinzugezogen, so zeigte sich dreieinhalb Monate nach der Transplantation eine Stabilisierung der Blutwerte mit einem Hb-Wert von 13,4 g/dl und eine Thrombozytenzahl von 239000 / μ l. Aus einem persönlichen Gespräch mit dem Vater des Patienten ein weiteres Jahr später ging hervor, dass die Blutwerte auch weiterhin im stabilen Bereich liegen (vgl. Tabelle 7 im Anhang).

Allerdings ist nach einer Knochenmarktransplantation das Risiko für die Entstehung von Schleimhauttumoren, insbesondere im Mundhöhlenbereich, noch stärker erhöht als bei FA bereits ohnehin.

1.3. Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle bei FA-Patienten im Vergleich zum sporadischen Mundschleimhautkarzinom

Neben gynäkologischen und ösophagealen Karzinomen sind es die Kopf-Hals-Tumoren, denen eine bedeutsame Rolle unter den Krebserkrankungen der FA-Patienten zukommt (ROSENBERG ET AL. 2008). Besondere Relevanz haben dabei die Tumoren der Mundhöhle und des Pharynx, bei denen es sich in aller Regel um Plattenepithelkarzinome (Abb. 3, Abb. 4) handelt, während Adenokarzinome oder andere Malignome zwar möglich, aber sehr selten sind. Elementare Unterschiede ergeben sich verglichen mit Tumoren dieser

Lokalisation der Normalbevölkerung hinsichtlich Ätiologie und klinischer Charakteristika.



Abb. 3: Makroskopie eines Plattenepithelkarzinoms der Mundschleimhaut am Lippenwinkel (BIESTERFELD 2013)

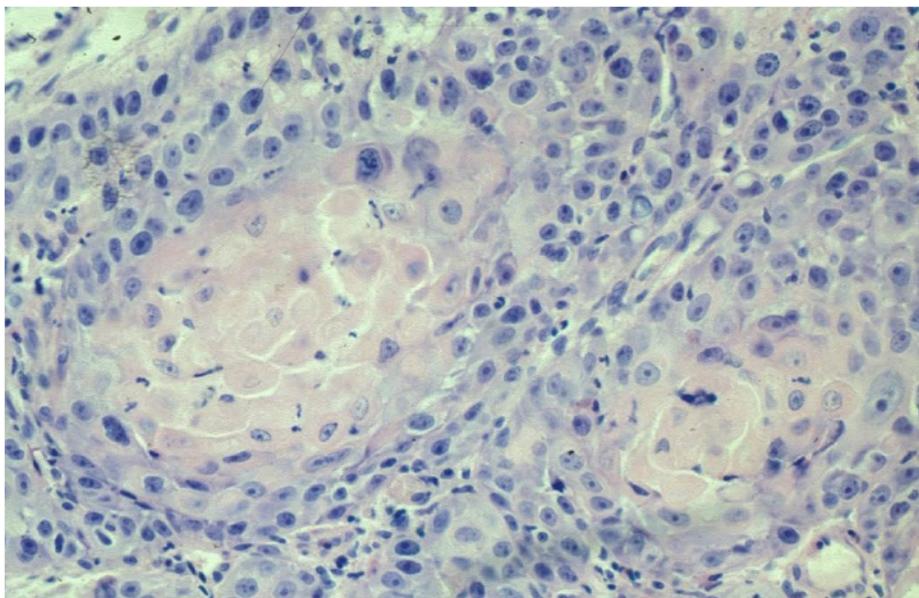


Abb. 4: Histologie eines mäßig differenzierten Plattenepithelkarzinoms (G2), HE-Färbung, 20x Objektivvergrößerung (BIESTERFELD 2013)

In den USA werden jährlich circa 40.000 Mundhöhlen- und Pharynxkarzinome neu diagnostiziert, wobei das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Diagnose bei 62 Jahren liegt (HOWLADER ET AL. 2011). Bereits an diesem Punkt differieren die Risikogruppen signifikant voneinander, da bei FA-Patienten die Tumoren ungefähr ab dem 20. Lebensjahr auftreten können (ALTER 2005).

Laut dem National Cancer Institute der USA, das sich bei seinen Zahlen auf Studien von Rosenberg et al. beruft, haben FA-Patienten im Alter von 40 Jahren ein 8%iges Risiko pro Jahr für das Auftreten eines Plattenepithelkarzinoms (ROSENBERG ET AL. 2003). Das durchschnittliche Alter bei der Diagnose eines soliden Tumors liegt hier bei etwa 26 Jahren (ALTER 2003), also deutlich vorverlegt gegenüber den sporadischen Karzinomen, die ihren Altersgipfel bei > 60 Jahren haben (RKI 2012). Die O/E-Ratio von 706 in einem nordamerikanischen Vergleich von Patienten mit FA zur Normalbevölkerung belegt noch einmal das erheblich erhöhte Risiko von FA-Patienten, ein Kopf-Hals-Karzinom zu entwickeln (ROSENBERG ET AL. 2003).

Bezüglich der außerhalb der FA üblichen Ätiologie gibt es zahlreiche Studien, in denen diverse Risikofaktoren für das Ausbilden eines oralen Karzinoms beschrieben werden. Besondere Bedeutung kommt dabei den chemischen Faktoren Tabak und Alkohol zu (RAM ET AL. 2011). Kommt es zu einem Zusammenspiel beider Faktoren, so erhöht sich das Risiko um ein Vielfaches (JOHNSON 2001). Ursache dieses Effekts ist, dass durch den Alkoholkonsum die Schleimhaut durchlässiger für toxische Substanzen der Zigarette, wie z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine, wird. Da in den Industrienationen Männer einen höheren Konsum dieser Genussmittel haben als Frauen, sind sie auch zwei- bis dreifach häufiger von Karzinomen im Mund- und Pharynxbereich betroffen (JOHNSON 2001). Grundsätzlich steigt das Risiko jedoch dosisabhängig (MAIER ET AL. 1992). Ein dreifach erhöhtes Risiko ergibt sich beispielsweise für Männer, die mehr als 46 g Ethanol pro Tag trinken (IDE ET AL. 2008), bei 90 g Ethanol pro Tag ergibt sich bereits ein 15-fach erhöhtes Risiko für orale Karzinome (CHOI & KAHYO 1991). Diese Ethanolmenge entspricht in etwa einer Tagesdosis von 1150 ml bzw. 2250 ml Bier mit 5%igem Alkoholgehalt.

Bei FA-Patienten dürfte aufgrund des eher jungen Alters der Alkohol- und Tabakkonsum, gerade weil es auch um Dosis-abhängige Langzeitveränderungen geht, bei der Entstehung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich keine signifikante Rolle spielen. Zahlen sind hier aber offenbar nicht bekannt.

Gleichermaßen spielt die Mundhygiene bei der Ausbildung eines sporadischen Mundschleimhautkarzinoms eine signifikante Rolle. Zahlreiche kariöse Zähne und damit einhergehend eine schlechte Pflege und die Bildung von Zahnstein erhöhen das Risiko deutlich (MAIER ET AL. 1993).

Neben den bisher genannten Faktoren sind es unter anderem auch Viren, die für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren verantwortlich gemacht werden (D'SOUZA ET AL. 2007). Auslöser können dabei unterschiedliche Vorgänge sein. Viren müssen, um sich replizieren zu können, ihre Nukleinsäure in eine Wirtszelle einbauen. Dabei kann es zur Zerstörung der wirtseigenen Gene kommen, die normalerweise die Zellteilung kontrollieren. Zusätzlich können Viren über verschiedene Mechanismen die Apoptose der Wirtszellen beeinflussen und somit zu einem Tumorwachstum führen. Zu diesen krebsauslösenden Viren gehören unter anderem die Humanen Papillomaviren (HPV), hüllenlose Viren mit einer zirkulären doppelsträngigen DNA, die vor allem durch Infektionen im Anogenitalbereich und damit einhergehend durch die Zervixkarzinome medizinisch relevant geworden sind. Nicht alle zu dieser Gruppe gehörenden Viren sind krebsauslösend und nicht jede Infektion führt zwangsläufig zu einer malignen Entartung; jedoch liegt die Prävalenz von HPV bei den sporadischen oralen Plattenepithelkarzinomen ungefähr bei 23,5%, wobei vor allem HPV16 vorherrschend ist (KREIMER ET AL. 2005). Anders ist es bei den Kopf-Hals-Tumoren der FA-Patienten. Hier scheint HPV keine wesentliche Rolle bei der Karzinogenese zu spielen (VAN ZEEBURG ET AL. 2008).

Als Resümee lässt sich festhalten, dass viele Risikofaktoren des sporadischen Mundschleimhautkarzinoms auf FA-Patienten nicht zutreffen. Leider ist bisher noch nicht hinreichend geklärt, warum es zu einem erhöhten Vorkommen der oralen Karzinome bei FA-Patienten kommt. Auffällig ist die Tatsache, dass es nach einer Stammzelltransplantation zu einem Risiko kommt, das altersspezifisch noch einmal ungefähr 4,4-fach höher ist im Vergleich zu FA-

Patienten ohne Transplantation (ROSENBERG ET AL. 2005). Eine Erklärung dafür wäre das geschwächte Immunsystem nach einem solchen Eingriff.

Doch auch, wenn die Ätiologie der Mundschleimhautkarzinome bei FA-Patienten und der Normalbevölkerung vollkommen unterschiedlich sind, so haben beide Gruppen durchaus auch Gemeinsamkeiten. Es konnte festgestellt werden, dass sich beide genetisch sehr ähnlich sind. Über die Analyse von Allelverlusten konnte gezeigt werden, dass die gleichen krebserzeugenden Gene und chromosomalen Lokalisationen betroffen sind, u.a. die Chromosomen-Arme 3p, 8p, 9p, 13q, 17q und 18q (VAN ZEEBURG ET AL. 2008). Durch diese Erkenntnis könnte die präzise Diagnose und die Bewertung von sichtbaren oralen Läsionen erleichtert und das klinische Vorgehen deutlich verbessert werden (ROSIN ET AL. 2000), denn immer noch ist die Prognose nach der Diagnose eines oralen Karzinoms bei FA-Patienten signifikant schlecht. Dies ist unter anderem in der erhöhten Sensibilität gegenüber Radio- und Chemotherapien begründet, die bereits in 1.1.2 angesprochen wurde. Diese basiert vor allem auf der schlechten Reparaturfähigkeit von Chromosomenschäden, so dass es zu schweren Nebenwirkungen kommen kann, wie z.B. Mukositis, Dysphagie und Panzytopenie (BIRKELAND ET AL. 2011).

Umso wichtiger ist es, verdächtige Läsionen frühzeitig zu erkennen, sicher zu diagnostizieren und schonende Therapiemöglichkeiten anzuwenden.

2. Ziel der Arbeit

Die Erforschung und Behandlung sehr seltener Krankheiten erfolgt heutzutage häufig in Zentren. Das Universitätsklinikum Düsseldorf stellt ein solches Zentrum für die Fanconi-Anämie dar. Insbesondere in der Kinderklinik bestehen nicht nur seit Jahren umfangreiche Bestrebungen zur Charakterisierung der Erkrankung durch moderne zytogenetische Methoden, sondern es werden auch große Anstrengungen gemacht, eine überregionale bzw. sogar internationale Patientenversorgung in Kooperation mit einer der beiden deutschen FA-Selbsthilfeorganisationen, der "Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V.", gerade auf dem Sektor der epithelialen Tumoren zu realisieren. Auf verschiedenen Reisen konnten seitens der beiden beteiligten Partner größere Zahlen von Patienten auf das Vorliegen epithelialer Läsionen untersucht werden, sodass am Universitätsklinikum Düsseldorf die größte Sammlung von oralen Zytologien von Fanconi-Anämie-Patienten aufgebaut werden konnte. Entsprechend verfügt der Schwerpunkt Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf wiederum über eine große Zahl beurteilter Proben von Patienten mit dieser seltenen Erkrankung.

Die vorliegende Arbeit, die in Kooperation von Cytopathologie, Kinderklinik und der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. entstanden ist, wertet erstmals diese Patientendatenbank aus, insbesondere im Hinblick auf die Zuordnung zytologischer Diagnosen zu korrespondierenden klinischen Daten.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Bei den dieser Studie zugrunde liegenden Proben handelt es sich um seitens der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. eingesandte Ausstrichpräparate des oberen (erreichbaren) Digestivtrakts, größtenteils aus dem Bereich der Mundschleimhaut entnommen. Erfasst wurden diejenigen Fälle, die im Zeitraum 2006 bis 2010 von ärztlichen Mitarbeitern bzw. von den Patienten selber in verschiedenen Ländern (Österreich, Deutschland, Niederlande, Frankreich, Italien, USA, Brasilien, Spanien, Schweiz) abgestrichen wurden. Dabei handelt es sich um 325 Proben von 94 unterschiedlichen Patienten.

Über das Befunddokumentationssystem der Cytopathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf („dc-pathos“, Fa. dc-Systeme, Heiligenhaus) konnten die betreffenden Proben nach verschiedenen Suchkriterien ausfindig gemacht werden. Dabei kamen sowohl „Fanconi*“ als allgemeiner Oberbegriff für alle Fanconi-Anämie-assoziierten Begriffe als auch die Namen typischer Einsender als Schlagworte zum Einsatz. Die ausgegebenen Treffer konnten dann mit einer Auflistung der entnommenen Proben durch die Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. verglichen und verifiziert werden.

Anhand der aufgefundenen Fälle wurde eine Excel-basierte Datenbank erstellt, die alle verfügbaren klinischen Daten und die morphologisch erhobenen Daten enthält.

3.2. Methoden

3.2.1. Konventionelle zytologische Diagnostik

Als primäre morphologische diagnostische Maßnahme kam bei den Patienten die Exfoliativzytologie zum Einsatz. Eingeführt wurde diese Methode im Bereich der oralen malignen Veränderungen bereits 1951 von Montgomery und Haam

(MONTGOMERY & HAAM 1951) und gilt seitdem als wichtige, gering invasive Alternative zur klassischen Biopsie. Durchgeführt wird sie wie folgt:

Bei der Entnahme werden mit einem Watteträger oder Bürstchen unter leichtem Druck und einer drehenden Bewegung Zellen von der verdächtigen Läsion abgeschilfert. Anschließend werden sie sofort auf einen Glasobjektträger durch abrollende Bewegungen übertragen und großzügig mit alkoholischem Spray fixiert. Dabei sind Lufttrocknungsartefakte unbedingt zu vermeiden.

Für eine genaue Zuordnung der Präparate ist nicht nur ein Vermerk des Patientennamens auf dem Mattrand des Objektträgers vonnöten, sondern auch eine ausführliche Dokumentation auf einem Einsendeschein. Obligat sind dabei die Patientendaten, sowie die Lokalisation der Probenentnahme. Werden mehrere Proben entnommen, kann das Einzeichnen der Stellen in eine 'Mundlandkarte' die Orientierung und spätere Zuordnung simplifizieren (Abb. 5).

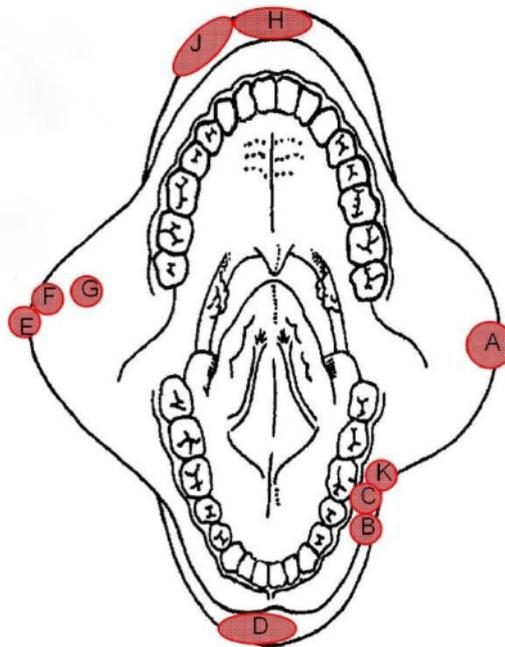


Abb. 5: Beispiel für eine Mundlandkarte mit Einzeichnung von zehn Entnahmestellen zytologischer Proben (modifiziert nach VELLEUER 2013)

Nach Eingang im Labor werden diese noch am gleichen bzw. spätestens am folgenden Tag mit einer eindeutigen Bezeichnung, Eingangsnummer etc. versehen und maschinell nach Papanicolaou („Pap-Färbung“) gemäß den SOPs („Standard Operation Procedure“) gefärbt, die im Eingangslabor der Cytopathologie schriftlich hinterlegt sind. Die Färbung gleicht dabei derjenigen der gynäkologischen Früherkennungszytologie, an der sie historisch erstmals eingesetzt wurde und seitdem auf viele Gebiete der Zytologie übertragen wurde. Im Einzelnen erfolgt die Pap-Färbung in folgenden Schritten:

1. 96% Ethanol (2 Min.)
2. Absteigende Alkoholreihe (96%, 70%, 50% je 1 Min.)
3. Spülen mit Aqua dest. (1 Min.)
4. Hämatoxylin (2 Min.)
5. Spülen mit Leitungswasser (zweimal 3 Min.)
6. NH_2OH
7. Aufsteigende Alkoholreihe (70% zweimal 1 Min., 80%, 96% je 1 Min.)
8. Orange II 2b (2 Min.)
9. 96% Ethanol (zweimal 1 Min.)
10. Polychrom 3b (2 Min.)
11. 96% Ethanol (zweimal 1 Min.)
12. 99,5% Ethanol (2 Min.)
13. Xylol (zweimal 1 Min.)
14. Voclear (zweimal 1 Min.)

Danach werden die Präparate mit einem konventionellen Eindeckmedium, z.B. *Vitro-Clud*, eingedeckt, wobei ein Eindeckautomat verwendet wird.

Zytologische Befunderhebung und Dokumentation

Anschließend werden die Präparate nach üblichen Kriterien der Zytodiagnostik fachärztlich untersucht (AFROGHEH ET AL. 2013) und ein schriftlicher Befund verfasst. In diesem wird nach einem beschreibenden Teil ein Gutachten erstellt,

das zunächst die Veränderungen einer von fünf Kategorien zuordnet (BÖCKING 1998):

- | | |
|-----------------------|---|
| - unzureichend | Nicht ausreichende Zellzahl bzw. aus anderen Gründen (Artefakte etc.) nicht durchführbare Diagnostik |
| - negativ | Kein Hinweis auf Tumorzellen |
| - zweifelhaft | Kein sicherer Ausschluss von Tumorzellen, da mindestens abnorme Zellveränderungen vorliegen |
| - dringender Verdacht | Nachweis weniger bereits atypischer Zellen, deren Zahl noch nicht für eine klinisch-therapeutisch umsetzbare Tumordiagnose genügt |
| - positiv | Sicherer Nachweis von malignen Tumorzellen |

Die Kategorisierung in eine der fünf Gruppen wird durch eine Klartextdiagnose ergänzt, die dem Kliniker konkreten Aufschluss über die aufgefundenen Zellveränderungen geben soll. Ein Negativbefund könnte z.B. lauten: „Kein Nachweis von Tumorzellen (= negativ). Das Zellbild entspricht einer hyperkeratotisch verhornenden Mundschleimhaut mit geringer entzündlicher und hämorrhagischer Komponente. Im vorliegenden Material kein Anhalt für Malignität“. Als Positivbefund käme in Betracht: „Mit Nachweis bösartiger Tumorzellen (= positiv). Das Zellbild entspricht einem Plattenepithelkarzinom“.

Ein besonderes Problem stellen die Fälle dar, die als „zweifelhaft“ oder „dringender Verdacht“ eingestuft werden. Dabei handelt es sich nach der Vorgehensweise der Cytopathologie Düsseldorf um vier Arten von Zellveränderungen, nämlich um

- abnormes Regeneratepithel, das noch unterhalb der Dysplasien angesiedelt ist und geringe, aber schon dem Untersucher suspekta Veränderungen des Plattenepithels repräsentiert („zweifelhaft“),
- leichte bzw. mittlere Dysplasien des Plattenepithels, die der Untersucher als signifikant abnorm interpretiert („zweifelhaft“),
- schwere Dysplasien des Plattenepithels, die bereits als atypisch einzustufen sind, aber die Kriterien von Tumorzellen noch nicht vollständig erfüllen („dringender Verdacht“) sowie
- sehr wenige manifeste Tumorzellen eines Plattenepithelkarzinoms, bei denen man sich aufgrund der zu geringen Zahl solcher Zellen noch nicht für eine manifeste Tumordiagnose entscheiden mag („dringender Verdacht“).

Hier bietet sich zur Objektivierung der Zellveränderungen die Anwendung adjuvanter Methoden an, zu den prinzipiell die Immunzytochemie, die DNA-Bildzytometrie, spezielle histochemische Reaktionen, die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und PCR-basierte Techniken zu zählen sind. Insbesondere die DNA-Bildzytometrie kommt als Anwendung bei unklaren Mundhöhlenveränderungen in Betracht und wird in der Cytopathologie Düsseldorf in oben genannten Fällen ca. 250-mal im Jahr angewandt; insgesamt werden jährlich ca. 750 solcher Untersuchungen (Stand: 2012) vorgenommen. Auch eine Reihe der in dieser Studie dargestellten Fälle wurde DNA-bildzytometrisch untersucht, weswegen die Methode im Folgenden vorgestellt werden soll.

3.2.2. DNA-Bildzytometrie

Die DNA-Bildzytometrie beruht im Prinzip auf den Grundlagen der Photometrie und wendet Erkenntnisse zur Abhängigkeit zwischen der Konzentration einer Färbung bzw. ihrer optischen Dichte und der Lichtschwächung an, basierend auf den Arbeiten von Lambert im Jahre 1760 und von Beer im Jahre 1854 (MEIJER ET AL. 1997).

Feulgen-Färbung

Grundvoraussetzung für die DNA-bildzytometrische Auswertung ist die vorherige Anfärbung der Präparate nach Feulgen (FEULGEN & ROSSENBECK 1924), wobei es sich hierbei um eine stöchiometrische chemische Reaktion handelt, die heute üblicherweise in der Modifikation nach Graumann (GRAUMANN 1953) ausgeführt wird.

Dabei kommt es im ersten Schritt durch eine saure Hydrolyse mit HCl zu einer Spaltung der glykosidischen Bindung am C1-Atom der Purinbasen und hierdurch zur Entstehung von freien Aldehyd-Gruppen. Im zweiten Schritt wird dieses mit Schiff'schem Reagenz zu einem rot-violetten Farbstoff umgesetzt (CHATELAIN ET AL. 1989). RNA wird dabei nicht angefärbt, weil hier die Spaltung der Glykosidbindung an der C1-Stelle nicht möglich ist, sodass eine korrekt durchgeführte Feulgen-Färbung als spezifisch für DNA gelten kann. Im Falle der hier DNA-bildzytometrisch ausgewerteten Proben wurde die Färbung auf der Arbeit von Chatelain et al. basierenden SOPs in einem speziell umgerüsteten Shandon-Färbeautomaten, der über eine Temperaturkontrollierte Küvette für die saure Hydrolyse verfügt, folgendermaßen realisiert:

1. Fixation der Objektträger für 50 Min. in gepuffertem Formalin (10%)
2. Spülen mit Aqua dest. (10 Min. / 5 Min.)
3. Saure Hydrolyse für 60 Min. in 5N HCl bei 27 °C
4. Spülen mit Aqua dest. (dreimal 2 Min.)
5. Darstellung der DNA mit Hilfe des Schiff'schen Reagenz (60 Min.)
6. Spülen in Sulfitwasser (dreimal 5 Min.)
7. Spülen mit Aqua dest. (zweimal 1 Min.)
8. Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol für jeweils 3 Min.)
9. Einstellen der Objektträger in Xylol (5 Min.)

Anschließend erfolgte das Eindecken der Präparate mit einem konventionellen Eindeckmedium, z.B. *Vitro-Clud*. Zum Schutz vor dem Ausbleichen werden die Präparate abgedunkelt aufbewahrt.

DNA-bildzytometrische Messung

Um reproduzierbare und klinisch umsetzbare Ergebnisse in der DNA-Bildzytometrie zu erhalten, müssen die verschiedenen methodischen Schritte wie Präparation, Färbung, Messung und Auswertung für alle verwendeten Tumoren uniform und reproduzierbar sein (GIROUD ET AL. 1998). Insbesondere müssen mögliche Fehlerquellen, die die Genauigkeit der DNA-Messung in Zellkernen beeinflussen, erkannt und gegebenenfalls korrigiert werden (Densiometrische Linearität, Streulicht, Beugung, Segmentierungsprobleme). Als aktuelle und umfassende Darstellung entsprechender methodischer Aspekte und auch der Bildanalyse sei auf GIRMES (2009) verwiesen.

Durchgeführt wurden die DNA-bildzytometrischen Messungen teilweise mit einem AutoCyte-System der Firma Roche (Grenzach-Wyhlen) und teilweise mit einer MotiCyte DNA-Workstation der Firma Motic (Xianmen, China bzw. Wetzlar), deren Leistungsfähigkeit Instituts-intern als gleichwertig angesehen wird. Sie bestehen aus einem Durchlichtmikroskop, einer hochauflösenden Schwarz-/Weiß-Kamera und einem mit einer speziellen Bildverarbeitungssoftware bestückten PC, auf dessen Monitor das Kamerabild, dem eine 40x-Objektivvergrößerung im Mikroskop zugrunde liegt, übertragen wird (s. Abb.6). An beiden Systemen werden die Konsensus-Anforderungen der *European Society of Analytical and Cellular Pathology* (ESACP) an DNA-bildzytometrische Messeinrichtungen (HAROSKE ET AL. 1998) eingehalten.



Abb. 6: DNA-bildzytometrische Messeinrichtung (BIESTERFELD 2013)

Als Referenzwert für einen normalen diploiden Chromosomensatz wird die mittlere IOD von ca. 30 regelrechten Zellen („Referenz- oder Eichzellen“) verwendet, wofür unauffällige Epithelien, Lymphozyten oder Fibroblasten in Betracht kommen, und als $2c$ gesetzt („diploider Standard“) werden. Als Messzellzahl wird, soweit diese Zahl an Zellen auf dem Präparat überhaupt vorhanden ist, die Erfassung von 300 auffälligen Epithelien („Analysezellen“) angestrebt, wobei eine Selektion innerhalb dieser Zellpopulation (z.B. nur besonders große oder dunkle Kerne) unbedingt vermieden werden muss. Durch den Vergleich mit dem diploiden Standard kann dann jeder Analysezelle ein konkreter Wert in c zugeordnet werden (s. Abb. 7).

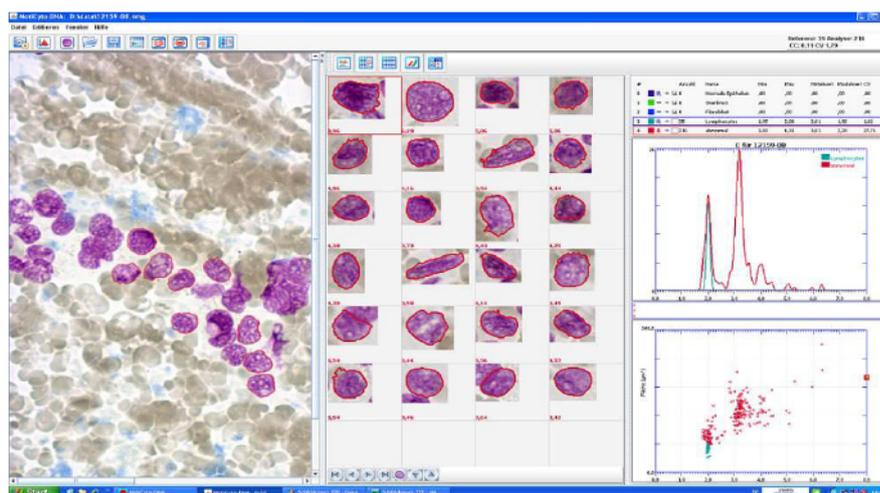


Abb. 7: Interaktiver Monitor bei der DNA-Zytometrie (BIESTERFELD 2013)

Um zu einem möglichst verlässlichen Resultat zu gelangen, ist es dabei wünschenswert, die Referenzzellen nicht nur aus dem gleichen Präparat zu wählen, sondern aus der unmittelbaren Umgebung der Analysezellen, da durch Lagerung, Präparation und Fixation der Zellen erheblicher Einfluss auf deren Färbung und somit auf das Messergebnis genommen wird. Um die Qualität der Eichung zu überprüfen, wird der Variationskoeffizienten der IOD's bestimmt, welcher gemäß unseren SOPs unter 5% liegen sollte.

Auswertung DNA-bildzytometrischer Messungen

Von den vielen von der *European Society of Analytical and Cellular Pathology* (ESACP) akzeptierten DNA-bildzytometrischen Variablen (HAROSKE ET AL. 1998 bzw. im Detail auch GIRMES 2009) wird in der diagnostischen Mundhöhlenzytologie zur Bestimmung der Dignität der Läsion die Lage der DNA-Stammlinie herangezogen, ggfls. auch der Nachweis von Einzelzellen oberhalb eines Grenzwertes von 9c.

Der Begriff der DNA-Stammlinie beschreibt die Lage der G₀/G₁-Phase einer Zellpopulation und kann liegen:

- bei 2c +/- 10%, entsprechend einer als diploid zu interpretierenden Stammlinie (Abb.8, oben)

- bei 4c, 8c, 16c +/- 10%, entsprechend einer euploiden Polyploidisierung (BIESTERFELD et al. 1994)
- außerhalb der vorgenannten Bereiche als Ausdruck von DNA-Aneuploidie (Abb. 8, unten), zu interpretieren als Äquivalent für maligne Transformation der Zellpopulation und entsprechend prospektiver oder manifester Malignität der zugrunde liegenden Läsion

Das Auftreten von Einzelzellen mit einem DNA-Gehalt von $> 9c$ wird ebenfalls als Nachweis von DNA-Aneuploidie verstanden. In Einzelfällen ist auch aufgrund ärztlicher Erfahrung legitim, statt einer Entscheidung für oder gegen das Vorliegen von Aneuploidie einen Verdacht auf Aneuploidie zu äußern.

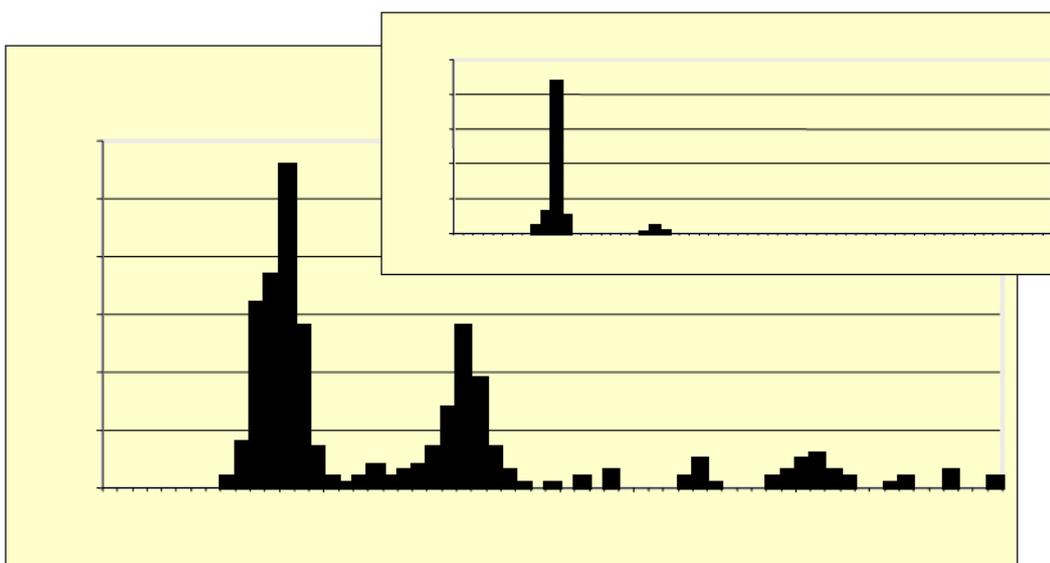


Abb. 8: Aneuploide DNA-Verteilung in einem Karzinom mit einer DNA-Stammlinie bei ca. 2,5c (unten) im Vergleich zu einer diploiden DNA Verteilung in normalen Zellen (oben) (BIESTERFELD 2013)

3.2.3. Aufarbeitung von Patientenakten

Alle im Archiv des Universitätsklinikum Düsseldorf verfügbaren Akten von Patienten, die an Fanconi-Anämie erkrankt sind, wurden hinsichtlich allgemeiner Daten (Alter, Geschlecht, Wohnort), Verlauf der pathologischen Befunde

mit jeweiliger Lokalisation der Entnahmestelle und gravierender klinischer Eingriffe (z.B. Knochenmarkstransplantation) durchgearbeitet.

Unterstützend wirkten dabei der Geschäftsführer der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V., Herr Ralf Dietrich (Unna), und seine ehrenamtliche Mitarbeiterin Frau Dr. med. Eunike Velleuer (Klinik für Kinder-Onkologie, Kinder-Hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) mit, die aus engem persönlichen Kontakt mit den Patienten heraus Lücken in den Aufzeichnungen füllen konnten.

3.2.4. Statistik

Die statistischen Untersuchungen wurden mit dem am Schwerpunkt Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität etablierten biometrischen Programmpaket BMDP (Unterprogramme 1D, 2D, 3T, 4F) vorgenommen.

An biometrischen Grunddaten standen insbesondere die Grundgrößen der deskriptiven Statistik, also Mittelwert, Minimal- und Maximalwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient sowie der Median zur Verfügung. Korrelationen zwischen zwei kategorisierten Parametern wurden in Mehr-Felder-Tafeln analysiert und mit dem Chi²-Test auf statistische Signifikanz getestet, solche zwischen kategorisierten und stetigen Parametern mit dem t-Test bzw. dem Mann-Whitney U-Test. Statistische Signifikanz wurde jeweils für ein α -Niveau (p-Wert) von $\leq 0,05$ angenommen, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$, die Nullhypothese fälschlich zu verwerfen.

4. Ergebnisse

4.1. Allgemeine Patientendaten

Zur Auswertung standen 325 Proben von 94 verschiedenen Patienten, davon 38 männliche und 56 weibliche, mit einem mittleren Alter von 20,8 +/- 10,1 [SD] Jahren. Getrennt nach Geschlechtern waren die männlichen Patienten beim ersten Abstrich mit 18,6 +/- 8,9 [SD] Jahren im Durchschnitt jünger als die weiblichen mit 22,4 +/- 10,4 [SD] Jahren. Dieser Unterschied im Durchschnittsalter von fast vier Jahren erwies sich im t-Test als grenzwertig statistisch signifikant ($p = 0.046$) und im U-Test als gerade noch nicht signifikant ($p = 0.059$).

48 (51,1%) von den Patienten, die in fünf Gruppen à 10 Jahren Alter aufgeteilt wurden, waren zwischen 10 und 19 Jahre alt.

Der betrachtete Entnahmezeitraum dieser Studie umfasste die Jahre 2006 bis 2010, wobei die Herkunftsländer (vgl. auch 3.1) sehr unterschiedlich waren und sich über zwei Kontinente erstreckten (Österreich, Deutschland, Niederlande, Frankreich, Italien, USA, Brasilien, Spanien, Schweiz, Großbritannien). Abb. 9 zeigt die entsprechenden Zahlen.

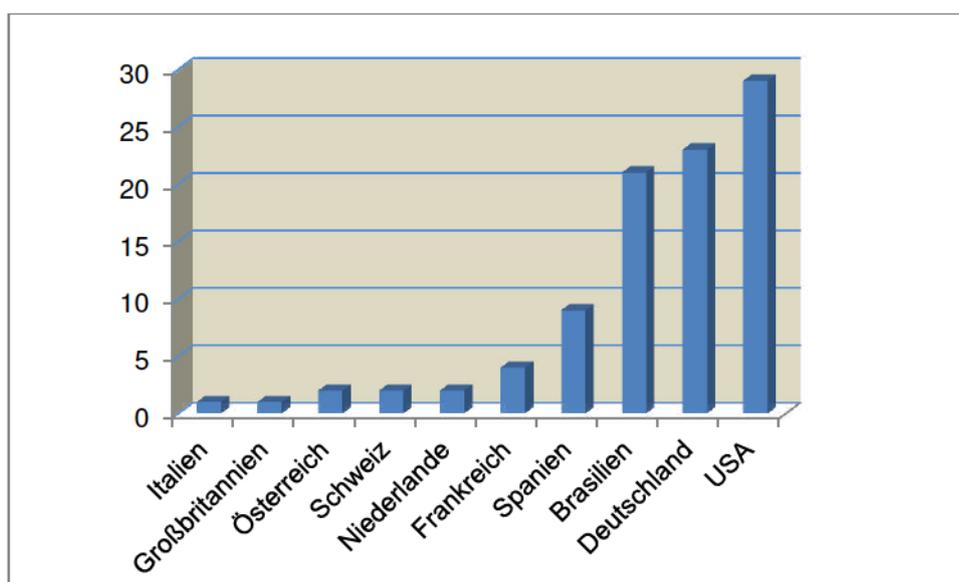


Abb. 9: Herkunftsländer der untersuchten Patienten mit Fanconi-Anämie

4.2. Ergebnisse der konventionellen und adjuvanten Zytodiagnostik

Die Betrachtung der Daten erfolgte teilweise patientenbezogen, teilweise probenbezogen.

Konventionelle Zytologie

Viele Aspekte der konventionellen Zytologie wurden patientenbezogenen ausgewertet, wobei jeweils pro Patient die Diagnose von höchster Relevanz, also in der Reihenfolge positiv - dringender Verdacht - zweifelhaft - negativ, zugrunde gelegt wurde. Sie sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tab. 2: Patientenbezogene Aufstellung von Kenndaten der konventionellen Zytologie; KMT = Knochenmarktransplantation

Zytologische Diagnose	<u>Alle Diagnosen</u>	<u>positiv</u>	<u>Dringender Verdacht</u>	<u>zweifelhaft</u>	<u>negativ</u>
Anzahl Patienten (orientiert an "schlimmster Diagnose")	94	9	8	21	56
<u>Geschlecht</u>					
männlich	38	4	2	9	23
weiblich	56	5	6	12	33

Fortsetzung Tab. 2: Patientenbezogene Aufstellung von Kenndaten der konventionellen Zytologie; KMT = Knochenmarkstransplantation

<u>Patienten mit KMT</u>	51	8	5	10	28
in %	54,3	88,9	62,5	47,6	50,0
<u>Alter bei Probenentnahme</u>					
Median (Monate)	220,5	336	236	235	208
Mittelwert (Monate)	251,5	296,3	296,1	259,6	234,9
Standardabw.	121,1	107,9	212,9	121,5	105,0
< 120 Monate	7	0	2	1	4
120-240 Monate	48	4	2	11	31
241-360 Monate	22	3	2	4	13
361-480 Monate	13	2	0	4	7
>480 Monate	4	0	2	1	1

Von den insgesamt 94 untersuchten Patienten ergab sich bei neun von ihnen als höchste Diagnose „positiv“, bei acht ergab sich ein „dringender Verdacht“, 21 erhielten die Diagnose „zweifelhaft“ und 56 waren „negativ“.

Mit einem Anteil von 59,6% kamen deutlich mehr weibliche Patienten vor als männliche. Gleichzeitig ist das Verhältnis der Diagnosen jedoch noch recht ähnlich, wenn man eine grobe Einteilung in „nicht negativ“ und „negativ“ wählt. Es ergab sich so ein Verhältnis bei den Männern von 15:23 („negativ“: 60,5%) und bei den Frauen von 23:33 („negativ“: 58,9%). Die Differenz von ca. zwei Prozentpunkten im Hinblick auf den Anteil der „negativen“ Ergebnisse war statistisch nicht signifikant (Pearson-Chi²-Test: $p > 0.05$).

Aufgeschlüsselt wurde ebenfalls, wie viele Patienten bei Probenentnahme bereits eine Knochenmarkstransplantation erhalten hatten. Bei 54,3% der untersuchten Patienten war dies der Fall. Dabei zeigt sich eine Steigerung der Häufigkeit von 47,6% bei den „zweifelhaften“ Fällen und 62,5% bei den Fällen mit „dringendem Verdacht“ bis hin zu 88,9% bei den „positiven“ Fällen. Statistisch signifikant waren die Veränderungen im Pearson-Chi²-Test für den Vergleich der 56 negativen Fälle mit allen anderen nicht ($p > 0.05$), wohl aber eben noch für den Vergleich zwischen den 85 negativen, zweifelhaften bzw. dringend verdächtigen Fällen mit den neun positiven Fällen (Chi²: 4,1; $p = 0.0422$).

In gleicher Richtung steigt auch das Alter der Patienten an. Anhand des Mittelwertes zeigt sich ein zunehmendes Alter, beginnend mit den Patienten mit den „negativen“ Abstrichergebnissen (gerundet 235 Monate) über die „zweifelhaften“ (gerundet etwa 25 Monate älter) und denen mit „dringendem Verdacht“ bzw. jenen mit „positivem“ Ergebnis (gerundet jeweils weitere ca. 36 Monate älter). Bezogen auf den Ausreißer-festeren Median ergibt sich ein ähnliches Ergebnis; dort liegen zwischen den „negativen“ Fällen (208 Monate) über die „zweifelhaften“ Fälle und die Fälle mit „dringendem Verdacht“ (27 bzw. 28 Monate älter) bzw. den „positiven“ Fällen (weitere 100 Monate älter) ebenfalls klar erkennbare Abstände. Welcher der beiden Auswertungen auch der Vorzug gegeben wird, am Ende steht jeweils die Idee eines gerichteten zeitlichen Ablaufes der Karzinogenese. Statistisch signifikant waren die Ergebnisse aber (noch) nicht, möglicherweise bedingt durch die recht geringe Fallzahl und die sich in den Standardabweichungen niederschlagende breite Streuung. Selbst für den Vergleich zwischen „positiven“ und „negativen“ Fällen wurde sowohl im t-Test, als auch im Mann-Whitney U-Test nur das noch nicht signifikante Testniveau von $p \sim 0,10$ erreicht, sodass die dargestellten Unterschiede nur als Trend interpretierbar sind.

Probenbezogen sollen die Lokalisationen der Entnahmen in Beziehung zum Ergebnis der Diagnostik dargestellt werden (Tab. 3). Insgesamt konnten 320 Proben ausgewertet werden, von denen 236 negativ (= 73,75%) und 84 „nicht negativ“ (= 26,25%) waren. Nur fünf Proben, davon vier am Mundwinkel, wo sich als einzige Entnahmeregion verhornendes Plattenepithel findet, waren unzureichend (= 1,5%, bezogen auf ursprünglich 325 Proben).

Tab. 3: Probenbezogene Aufstellung der Lokalisationen der Entnahmen und der Ergebnisse der konventionellen Zytologie

Zytologische Diagnose	<u>Alle Diagnosen</u>	<u>positiv</u>	<u>Dringender Verdacht</u>	<u>zweifelhaft</u>	<u>negativ</u>
<u>Anzahl Proben</u>	320	13	18	53	236
<u>Entnahmeregionen der Proben</u>					
Gingiva OK	46	7	9	9	21
Gingiva UK	25	1		6	18
Planum bukkale re.	42		2	8	32
Planum bukkale li.	28	1		1	26
Oberlippe	3	1		1	1
Unterlippe	22		1	7	14
Zunge	84			8	76
Sublingual	12		1	2	9
Gaumen	10	1	3		6
Mundwinkel re & li	24		1	8	15
Sonstige	24	2	1	3	18

Insgesamt fällt die hohe Zahl von Proben mit „dringendem Verdacht“ bzw. „positiver“ Diagnose an der Oberkiefergingiva ($16/46 = 34,8\%$) auf, zum einen im Kontrast zur Unterkiefergingiva ($1/25 = 4,0\%$), aber auch zu allen anderen Regionen mit mehr als 20 Probenentnahmen. Lediglich bei Entnahmen am

Gaumen wurde eine noch höhere Quote solcher Diagnosen beobachtet, allerdings bei eingeschränkt repräsentativer Fallzahl ($4/10 = 40,0\%$).

Werden mit den zweifelhaften Diagnosen alle „nicht negativen“ Proben als Berechnungsgrundlage genommen, so erreicht nur bei der Oberkiefergingiva die Quote solcher Befunde bei mehr als der Hälfte der Proben ($25/46 = 54,3\%$), während die übrigen Lokalisationen zusammen genommen weniger als halb so hoch liegen ($59/274 = 21,5\%$). Dieser Unterschied ist bei Aufstellung einer Vier-Felder-Tafel im Chi²-Test statistisch hochsignifikant (Chi²: 21.9; $p < 0,0001$). Im Vergleich zwischen Oberkiefergingiva und Unterkiefergingiva, bei der ebenfalls nur relativ wenige Fälle nicht-negativ waren ($7/25 = 28\%$), ergab sich ein ebenfalls noch statistisch signifikanter Unterschied (Chi²: 4.5; $p = 0.0331$).

Adjuvante DNA-bildzytometrische Diagnostik

In 57 Fällen wurde anschließend eine DNA-Bildzytometrie durchgeführt, hauptsächlich im Falle eines „nicht negativen“ Ergebnisses (Tab 4).

Allerdings wurden auch in wenigen Fällen DNA-bildzytometrische Untersuchungen an negativen Proben vorgenommen und somit, ähnlich wie auch bei Messung positiver Proben, von den Gepflogenheiten der Cytopathologie Düsseldorf abgewichen.

Gründe für diese Vorgehensweise lagen im Falle der „negativen“ Proben am klinischen Erscheinungsbild der Läsionen. Bei zwei von ihnen ließ sich anhand der Einsendescheine eruieren, dass es sich um ein Ulkus handelte, d.h. jeweils um eine hochverdächtige Läsion, die vorzugsweise mit größter Sicherheit abgeklärt werden sollte. Im Falle von einer der übrigen zwei Proben kam es laut Aufzeichnungen zu einer telefonischen Rücksprache mit dem behandelnden Kliniker, der die Läsion anders einschätzte als es die konventionelle zytologische Diagnose ergab. Bei der vierten „negativen“ Probe wurde kurze Zeit nach unserer konventionellen Zytologie aufgrund des fragwürdigen klinischen Erscheinungsbildes *alio loco* eine Biopsie durchgeführt - mit einem „positiven“ Ergebnis. Daraufhin wurde diese Probe noch einmal konventionell zytologisch überprüft, herabgestuft und anschließend retrospektiv DNA-zytometrisch unter-

sucht, sodass bei dieser Probe abschließend DNA-Aneuploidie festgestellt wurde und die Biopsie bestätigte.

Da den FA-Patienten unter allen Umständen unnötige Biopsien erspart werden sollten, wird - nach Absprache zwischen der Leitung der Cytopathologie Düsseldorf und der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. - zusätzlich zu einem „positiven“ konventionellen zytologischen Ergebnis die DNA-Zytometrie zur Absicherung der Diagnose hinzugezogen.

Tab. 4: Durchführung DNA-bildzytometrischer Messungen nach Diagnosegruppen

Zytologische Diagnose	Alle Diagnosen	positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ
<u>Anzahl Proben</u>	320	13	18	53	236
Anzahl der durchgeführten DNA-Bildzytometrien	57	10	16	27	4
DNA-Bildzytometrie von vornherein nicht möglich aufgrund zu weniger auffälliger Zellen	31	3	2	26	0
DNA-Bildzytometrie nicht durchgeführt	232	0	0	0	232

Dass in 31 der in Tabelle 4 erfassten Fälle, an denen eine DNA-Bildzytometrie vorgesehen gewesen wäre, keine Messung erfolgen konnte, lag an der zu

geringen Zahl auffälliger Epithelzellen. Wie darüber hinaus aus der Tabelle ersichtlich ist, gilt dieses Problem selbst für „positive“ Proben, von denen drei nicht für eine DNA-Bildzytometrie geeignet waren. Beispielsweise waren bei einer der besagten Proben gerade einmal 27 atypische Zellen vorhanden. Eine dermaßen geringe Zahl auffälliger Zellen kann für eine definitive konventionelle zytologische Diagnose durchaus ausreichen, für eine DNA-bildzytometrische Messung ist aber eine Stichprobe von 250 - 300 auffälligen Zellen vonnöten, um zu einer statistisch robusten Werteverteilung für eine spätere Stammlinienanalyse zu gelangen.

In Tabelle 5 ist die Verteilung der DNA-bildzytometrischen Messergebnisse wiedergegeben.

Tab. 5: Ergebnisse DNA-bildzytometrischer Messungen

Zytologische Diagnose	Alle Diagnosen	positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ
Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie	57	10	16	27	4
Aneuploidie	22	9	6	6	1
Verdacht auf Aneuploidie	6	1	1	4	
negativ	24		7	14	3
Kein auswertbares Ergebnis	5		2	3	

Bezogen auf die zehn untersuchten positiven Fälle ergab sich, hinsichtlich Aneuploidie oder den Verdacht auf Aneuploidie, eine Bestätigung der zytologischen Diagnose in 100% der Fälle. In allen diesen Fällen wurde im

Nachtragsbericht die Empfehlung zu einer operativen bzw. bioptischen Klärung gegeben.

Indes konnte bei den 16 Patienten mit „dringendem Verdacht“, deren Proben auswertbar waren, nur in 50% Aneuploidie nahegelegt bzw. nachgewiesen werden. Zehn von 27 Proben mit „zweifelhaften“ Veränderungen (37,0%) wiesen Aneuploidie oder einen Verdacht auf Aneuploidie auf. Gleiches gilt für diejenige der vier untersuchten negativen Proben (25%), die bereits oben erläutert wurde. Fanden sich keine Hinweise auf DNA-Aneuploidie, so wurden die zytologischen Befunde im Nachbericht herabgestuft; beispielsweise wurden in acht Veränderungen, die als zweifelhaft oder dringend verdächtig klassifiziert waren, die Zellen im Nachhinein als unklares Regeneratepithel interpretiert.

4.3. Klinisches Follow-up

Da viele Probengewinnungen aus nicht jederzeit wiederholbaren Fernreisen stammten, die auch in entlegene und dünn besiedelte Gebiete beispielsweise der USA oder Brasiliens geführt hatten, sind über das klinische Follow-Up vereinzelter Patienten nur lückenhafte Informationen gegeben. Die im Folgenden dargestellten Daten von 67 der 94 Patienten (= 71,3%) müssen daher teilweise unvollständig bleiben und gehen im Wesentlichen auf Angaben der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. zurück.

Trotz dieser genannten Schwierigkeiten war es möglich, ein Follow-Up von insgesamt 52 aktuell noch lebenden Patienten zu erstellen. Ausgehend von der ersten Probenentnahme umfasst das Follow-Up im Mittel einen Zeitraum von 44,5 Monaten bei einer Standardabweichung von 20,1 Monaten. Die Dauer variiert dabei in einem Rahmen von 12 bis 79 Monaten, wobei die größte Anzahl der Patienten auf ein Zeitintervall von 21-30 Monaten entfällt. Erfreulich ist, dass sechs Patienten sogar über einen Zeitraum von mehr als 70 Monaten beobachtet werden konnten. Relativ ausgeglichen ist die Patientenanzahl mit fünf bis acht Patienten pro Gruppe im Intervall von 31 bis 70 Monaten.

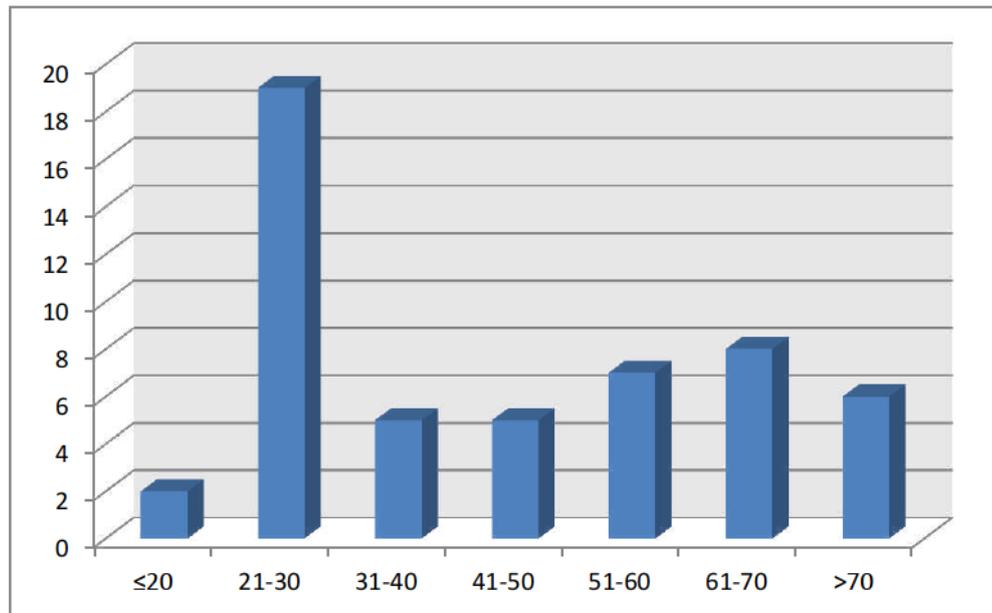


Abb. 10: Follow-Up-Zeitraum in Monaten mit entsprechender Patientenanzahl

Sicher festgehalten werden kann auch, dass im Zeitraum bis Juli 2013 insgesamt 15 der 94 Patienten verstorben sind. Von diesen waren elf weiblich und vier männlich.

Sechs der Patienten sind aufgrund eines Kopf-/Hals-Tumors oder an den direkten Folgen (wie z. B. Metastasen oder Blutungen nach einer OP) verstorben. Sie hatten zum Zeitpunkt des Todes ein durchschnittliches Alter von 41 Jahren.

Bei sechs der übrigen neun verstorbenen FA-Patienten stand die Todesursache in direktem Zusammenhang zu einer Knochenmarkstransplantation (KMT). Zwei waren direkt ohne Erfolg, in zwei Fällen folgte eine tödliche Infektion kurze Zeit nach der KMT, einmal führte die GvHD zum Tod und in einem Fall eine Sepsis. Die beiden anderen Ursachen waren ein Mammakarzinom bzw. eine Knochenmarkaplasie nach chromosomalen Aberrationen. Zu einem Todesfall lagen keine Angaben zur Todesursache vor. Insgesamt lag das durchschnittliche Alter in dieser Gruppe bei 31,3 Jahren.

Tab. 6: Ergebnisse der Auswertung der bis Juli 2013 aufgetretenen Todesfälle

Todesursachen	m	w	Durchschn. Alter
Kopf-/Hals-Tumor bzw. dessen Folgen	2	4	41
andere Ursachen (s. Text)	2	6	31,3
unbekannt		1	40

Insgesamt wurde bei acht der 94 Patienten eine Operation bei gesichertem Kopf-/Hals-Tumor durchgeführt, vier davon sind mittlerweile verstorben. In fünf Fällen wurde vorher eine DNA-zytometrische Messung in unserer Datenbank als Aneuploidie bzw. Verdacht auf Aneuploidie ausgewertet.

Eine große Anzahl an Patienten wird regelmäßig von Mitarbeitern der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. inspiziert und auf mögliche Läsionen hin überprüft. Erfreulich ist, dass bei 40 Patienten mindestens zwei Jahre nach der letzten Abstrichentnahme keine auffälligen Läsionen in der Mundhöhle zu finden waren. Ein erneuter Abstrich war nicht notwendig.

Wichtig war ferner das konkrete Follow-Up zur Entnahmeregion der Zytologie-Entnahmen zu erarbeiten. Trotz der Schwierigkeiten in der Datensammlung konnte bei elf Patienten und zwölf Entnahmestellen ein Follow-Up direkt aus der Datenbank gewonnen werden, das auf einer zytologischen Kontrolluntersuchung der exakt gleichen Entnahmeregion basierte.

Sieben der Probenpaare waren in beiden Befundungen, zwischen denen 27 - 65 Monate lagen, als „negativ“ bewertet worden. Dabei ging es meistens um die Langzeitkontrolle einer seit längerem bestehenden Leukoplakie bzw. einer weißlichen Auflagerung / Veränderung.

In drei Fällen war die erste Probe „negativ“ befundet worden; die Kontrollproben wurden in zwei Fällen als „zweifelhaft“ und in einem als „dringender Verdacht“

beurteilt, wobei zwischen den Proben 29 - 60 Monate lagen. Bei den ersteren beiden Patienten wurde eine Leukoplakie kontrolliert, bei letzterem war bei der Erstentnahme ebenfalls eine Leukoplakie klinisch angegeben, wohingegen die Zweitentnahme nach 29 Monaten mit der klinischen Angabe „Z.n. Karzinom, chronisches Ulkus, Erythroplakie" erfolgte. Diese Probe erwies sich als DNA-aneuploid. Von den beiden als „zweifelhaft" eingestuft Proben war eine nicht DNA-aneuploid, die andere wegen zu weniger auffälliger Zellen DNA-zytometrisch nicht auswertbar. Über weitere therapeutische Maßnahmen ist jeweils leider nichts bekannt.

Eine Probe aus einer Erythroleukoplakie war bei der Erstuntersuchung als „zweifelhaft" diagnostiziert worden; bei der Kontrolle nach neun Monaten, die jetzt bereits mit der klinischen Angabe „Z.n. Karzinom, Rötung" erfolgte, wurde ein „dringender Verdacht" auf Tumorzellen (im Sinne eines wahrscheinlichen Tumorrezidivs) erhoben und DNA-Aneuploidie nachgewiesen. Die erste Probe hatte sich aus technischen Gründen nicht messen lassen.

Eine weitere Probe der älteren Untersuchungen ergab einen „dringenden Verdacht" an der Gingiva an Regio 12. Eine DNA-zytometrische Untersuchung gab damals Entwarnung durch ein nicht DNA-aneuploides Verteilungsmuster. Aufgrund einer ulzerierenden Veränderung an der gleichen Lokalisation wurde 25 Monate später erneut ein Abstrich entnommen, der als „zweifelhaft" eingestuft wurde. Allerdings ergab auch hier die DNA-zytometrische Untersuchung ein nicht aneuploides DNA-Verteilungsmuster.

Einer der Patienten, zu denen mehr Angaben vorliegen, ist Herr J. O., dessen allerdings komplikationsreiche Krankheitsgeschichte als Beispiel für den Verlauf einer Fanconi-Anämie stehen kann.

4.4. Betrachtung eines besonderen Falls: Herr J.O.

Herr J. O., * 1980, ist ein inzwischen 33-jähriger Patient, der an multiplen und rezidivierenden Läsionen der Mundhöhle und der Lippen leidet. Er steht exemplarisch für Langzeit-beobachtete Fanconi-Anämie-Patienten und war Gesprächspartner auf einem Treffen der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. in Nottuln im Frühsommer 2012.

Herr O. erfuhr im Alter von vier Jahren, dass er an Fanconi-Anämie erkrankt ist. Auch wenn er schon mit den phänotypischen Merkmalen des Kleinwuchses und einer Fehlbildung am linken Daumen geboren wurde, konnte die Diagnose erst nach dem Auftreten einer Darmblutung gestellt werden. Vier Jahre später, also schon mit acht Jahren, erhielt er eine Knochenmarkstransplantation, in deren Folge es durch starke Abstoßungsreaktionen u.a. zu extrem trockener Haut mit Altersflecken, fehlendem Nachwachsen von Haaren, Ausgang von Fuß- und Fingernägeln und fehlender Produktion von Tränenflüssigkeit kam, was schließlich drei Jahre später, also im Alter von 11 Jahren, zur Erblindung führte.

Die erste Veränderung der Mundschleimhaut wurde ca. 1991/1992, also mit ca. 15 Jahren, sichtbar und als Leukoplakie diagnostiziert. Zu diesem Zeitpunkt war das Wissen bezüglich der oralen Karzinome bei FA-Patienten noch nicht so weit fortgeschritten, dass umgehend weiterführende diagnostische Maßnahmen ergriffen worden wären.

Erst im Jahr 2001, nachdem eine Verhärtung an der Unterlippe festgestellt werden konnte, wurde eine Biopsie entnommen, die wohl bereits auffällige Veränderungen enthielt; ein Befundausdruck lag leider nicht vor. Über dreieinhalb Jahre wurde die Veränderung weiter beobachtet. Es kam zu erschwerter Nahrungsaufnahme und vermehrten Blutungen, sodass im Folgenden eine weitere Biopsie entnommen wurde.

Diese führte im Jahr 2005 dazu, dass das erste Mal ein Karzinom an der Unterlippe diagnostiziert wurde (Abb. 11).



Abb. 11: Beispiel einer bei Herrn O. aufgetretenen flächigen, teils erodierten und klinisch unklaren Läsion an der Unterlippenschleimhaut (VELLEUER 2013). Zytologisch Nachweis maligner Tumorzellen („positiv“). Histologisch Plattenepithelkarzinom.

Im Verlauf kam es zu sechs chirurgischen Eingriffen und Bestrahlung, da immer wieder präkanzeröse Veränderungen bzw. ein manifestes Plattenepithelkarzinom mit Lymphknotenmetastasen festgestellt werden konnte.

Seitdem können bei Herrn O. immer wieder wandernde Erythroplakien, Leukoplakien und offene Läsionen im Mund- / Lippenbereich beobachtet werden (Abb. 12).



Abb. 12: Beispiel einer bei Herrn O. aufgetretenen teils retikulären Erythroleukoplakie am Planum buccale rechts (VELLEUER 2013). Zytologisch kein Nachweis von Tumorzellen („negativ“). Keine histologische Probenentnahme.

Aufgrund des starken Gewebeverlustes im Zuge von Biopsien und chirurgischen Eingriffen wurden seit 2008 bevorzugt non-invasive Techniken bei verdächtigen Läsionen angewandt. Therapeutisch zählen dazu vor allem die photodynamische Therapie für Veränderungen, die bis zu drei mm tief sind, und der CO₂-Laser. Beide haben den Vorteil, dass sie kaum Narben hinterlassen und fast ausschließlich das betroffene Gewebe behandeln.

Weiterhin wurde 2012 ein *lip-shaving* in Rostock durchgeführt. Im Zuge dieser Operation wurde das Vermillion-Epithel exzidiert und mit einem Mukosa-Lappen abgedeckt.

Diagnostisch wurden zwischen 2008 und 2010 55 Bürstenbiopsien entnommen, von denen 22 wiederum präkanzeröse bzw. suspekte Veränderungen zeigten (s. Abb.13), sodass ergänzende DNA-bildzytometrische Untersuchungen vorgenommen wurden. Betroffen sind bei Herrn O. weiterhin vor allem die Mundwinkel und die Unterlippe, die zusammen alleine 34 der 55 Proben betreffen. Die restlichen 21 Proben entfallen auf verschiedene Regionen, wie z.B. Wangeninnenseiten, Zunge, Oberlippe oder Gingiva.

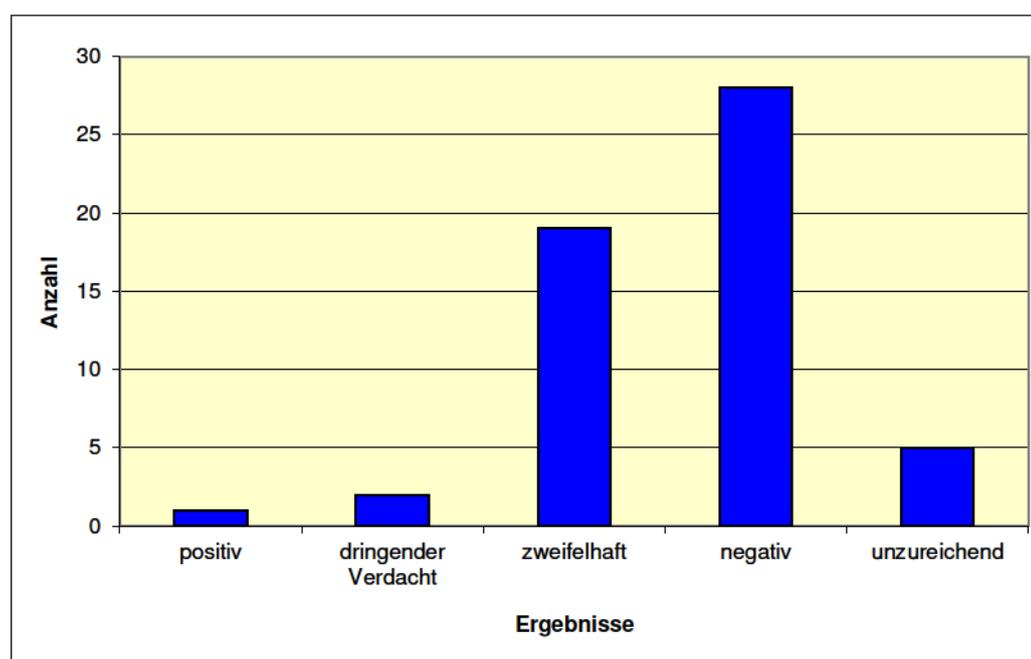


Abb. 13: Zytologische Ergebnisse der 55 Bürstenbiopsien von Herrn O.

Acht der 22 zytometrischen Untersuchungen ergaben als Ergebnis eine DNA-Aneuploidie. Im Falle der 14 restlichen Proben konnte die DNA-Zytometrie aufgrund zu wenig abnormer Zellen leider kein Ergebnis liefern.

Die acht positiven Ergebnisse ergaben sich bei den beiden dringenden Verdachtsfällen und bei sechs zweifelhaften Bürstenbiopsien. Hier zeigt sich deutlich die Bedeutung der DNA-Bildzytometrie als ergänzende Diagnostik bei einem unsicheren Ergebnis der Bürstenbiopsie. Auf diese Weise konnte selbst bei zweifelhaften Fällen eine sichere Diagnose getroffen und entsprechende Therapiemaßnahmen eingeleitet werden. Gleichzeitig zeigt sich durch die Bestätigung der dringenden Verdachtsfälle, dass die Zytologie in Verbindung mit der DNA-Bildzytometrie auch bei diesem einzelnen Fallbeispiel eine schmerzfreie und komplikationsarme Methode darstellt, mit der eine definitive Diagnosesicherung erzielt werden kann. Seither konnten bei Herrn O. einige positive Befunde erkannt und mithilfe der photodynamischen Therapie eliminiert werden.

Herr O. befindet sich weiterhin in regelmäßiger klinischer Kontrolle, sodass idealerweise auch in Zukunft neu aufschießende Läsionen oder sich verändernde vorhandene Auffälligkeiten der Schleimhaut vergleichsweise früh in ihrer tumorbiologischen Wertigkeit geklärt werden können.

5. Diskussion

5.1. Die Fanconi-Anämie als ernstzunehmende hämatologische und tumorbildene Erkrankung

Obwohl die Wissenschaft seit der Erstbeschreibung der Fanconi-Anämie 1927 erhebliche Fortschritte im Bereich der Erkennung und Therapie insbesondere des hämatologischen Grundleidens verzeichnen konnte, ist immer noch an multiplen Stellen Bedarf zur Verbesserung gegeben.

Nach einer Studie von Kutler et al., die 2003 veröffentlicht wurde und auf den Daten von 754 Fanconi-Anämie-Patienten basiert, die im Internationalen Fanconi-Anämie-Register verzeichnet sind, liegt die mediane Überlebenszeit noch immer bei nur 24 Jahren (KUTLER ET AL. 2003). Tendenziell ähnliche Ergebnisse lieferte auch die Auswertung unseres Patientenkollektivs. 15 der 94 Patienten sind bis dato verstorben, das durchschnittliche Alter lag bei 35,7 Jahren.

Bezüglich therapeutischer Maßnahmen ist in den letzten Jahren vor allem die hämatopoietische Stammzelltransplantation optimiert worden. Mittlerweile beträgt die Überlebensrate bei HLA-identischen Geschwisterspendern ungefähr 80% (MACMILLAN ET AL. 2011, FROHNMAYER & FROHNMAYER 2005). Wie die ausgewerteten Daten dieser Arbeiten jedoch zeigen, erhöht sich das Risiko, nach einer Knochenmarktransplantation an einem Mundhöhlenkarzinom oder einem anderen Karzinom des nicht-verhornenden Plattenepithels zu erkranken. Grund dafür ist unter anderem die gestiegene Lebenserwartung der Patienten. Wie Dave und Lynn Frohnmayer in „Behandlung und Therapie der Fanconi-Anämie“ erläutern, leben Patienten, die von ihrem Knochenmarksversagen geheilt werden, länger, woraufhin jedoch das Risiko, an Krebs zu erkranken, steigt (FROHNMAYER & FROHNMAYER 2005). Diese Tendenz ist auch in den obigen Auswertungen deutlich ersichtlich. Patienten mit einem „positiven“ Abstrichergebnis waren im Schnitt älter und zeigten einen deutlich höheren Anteil an Knochenmarktransplantationen.

Neben diesem Aspekt sind die Einnahme von Immunsuppressiva, die adjuvante Radio- und Chemotherapie oder die chronische Graft-versus-host-disease (GvHD) (MASSEROT ET AL. 2008) von maßgebender Relevanz. Es stellt sich

also die Frage, ob es andere Therapiemöglichkeiten gibt, die auch dieses Risiko reduzieren könnten. Hinzu kommt, dass es oft schwierig ist, einen HLA-identischen Spender zu finden, unter Berücksichtigung der Tatsache, dass auch unter Geschwistern formalgenetisch nur jedes vierte als Spender in Frage kommt.

Aufgrund dieser Problematik wird seit einigen Jahren im Bereich der Genforschung nach einer möglichen Lösung gesucht. Stark vereinfacht ausgedrückt, werden bei dieser Gentherapie Zellen aus dem Knochenmark entnommen, im Labor korrigiert und kultiviert und nach einigen Tagen über eine Infusion dem Patienten zurückgegeben. Grundvoraussetzung ist die Zuordnung zu einer der Komplementationsgruppen, um das defekte Gen herausfinden und behandeln zu können. Die für die Gentherapie benötigten CD34-positiven Stammzellen befinden sich im Knochenmark bzw. nach der Gabe von speziellen Wachstumsfaktoren oder nach Chemotherapie ebenso im peripheren Blut. Doch bereits hier zeigt sich eines der signifikantesten Probleme. Es erweist sich als große Schwierigkeit, eine ausreichende Anzahl von hämatopoietischen Stammzellen aus dem bereits oft aplastischen Knochenmark des Patienten zu gewinnen (TOLAR ET AL. 2012).

Trotz der zahlreichen offenen Fragen und den Schwierigkeiten, die sich bei der klinischen Anwendung der Gentherapie ergeben, konnten in den letzten Jahren schon einige Erfolge an Tierversuchen und sogar an FA-Patienten verzeichnet werden (TOLAR ET AL. 2011). Leider beschränken sich diese positiven Ergebnisse hauptsächlich auf kleine Teilschritte der Therapie, wie z.B. die Gewinnung der Stammzellen oder der Vektorsuche. Hinzu kommen fehlende Langzeitergebnisse über die Wirkdauer der Gentherapie.

Auch wenn die Therapie in einigen Jahren zu einer dauerhaften Stabilisierung der Hämatopoiese führt, so ist damit immer noch nicht das Risiko der Entstehung von soliden Tumoren komplett gebannt (HÖFLING 2007). Von diesen nämlich werden FA-Patienten nicht selten befallen, und dieses in Altersklassen, in denen bei der Normalbevölkerung solide Tumoren noch sehr selten sind. Die bereits oben erwähnte Studie von Kutler et al. (2003) dokumentierte bei 79 der 754 Patienten (= 10,5%) solide nicht-hämatologische Tumoren. Darunter befinden sich mit 39 Fällen fast genau 50% Plattenepithel-

karzinome, von denen 20, also wiederum die Hälfte, auf Kopf- und Halsregion bzw. Ösophagus entfielen; ferner fanden sich 14 Fälle an Vulva und Cervix uteri, drei an der Haut und zwei im Analbereich. Weiterhin konnte sie belegen, dass ab dem 20. Lebensjahr die soliden Tumoren proportional zum Alter ansteigen. Diese Daten zeigen, wie wichtig das Screenen dieser jungen Patienten auf solide Tumoren ist, gerade auch im Kopf-Hals-Bereich.

Zum Diagnosezeitpunkt eines „positiven“ Abstrichergebnisses lag das durchschnittliche Patientenalter in der vorliegenden Auswertung bei etwa 24,7 Jahren. Nahezu kongruent dazu sind die Ergebnisse einer Studie von Masserot et al. aus dem Jahr 2008. Gegenstand dieser Publikation war eine Falluntersuchung von 13 FA-Patienten, die an einem Kopf-Hals-Karzinom erkrankten und in einem bestimmten Zeitraum eine Knochenmarkstransplantation erhalten haben. Hier lag das durchschnittliche Alter zum Diagnosezeitpunkt bei 20,6 Jahren.

Konträr zu dieser Studie sind die betroffenen Lokalisationen. In sieben von 13 „positiven“ Fällen war bei unserem Patientenkollektiv die Oberkiefer-Gingiva betroffen. Masserot et al. (2008) fanden hier eine signifikante Häufung im Bereich der Zunge mit acht von 13 Patienten. Auch in unseren Untersuchungen kam es zu einer großen Anzahl von auffälligen Läsionen im Zungenbereich. 84 Mal wurde dieser Bereich von uns aufgrund verdächtiger Läsionen abgestrichen; bis auf acht „zweifelhafte“ Ausnahmen waren jedoch alle Ergebnisse der konventionellen Zytologie „negativ“. Die folgende DNA-Zytometrie hat nur in einem der acht „zweifelhaften“ Fälle einen „Verdacht auf Aneuploidie“ feststellen können. Alle anderen Ergebnisse dieser Lokalisation waren „negativ“ oder nicht auswertbar.

In einer weiteren, durch die Größe des Patientenkollektivs vergleichbaren Studie von Birkeland et al. aus dem Jahr 2011 war die Zunge in zwei von zwölf Fällen betroffen. Insgesamt teilen sich die Lokalisationen bei diesem Patientenkollektiv jedoch zwischen verschiedenen Regionen auf, sodass keine deutliche Tendenz zu erkennen ist.

5.2. Primäre und sekundäre Tumorprävention: Klinische Aspekte

Eine primäre Tumorprävention, d.h. eine Verhinderung der Tumorentstehung, erweist sich bei FA-Patienten aus erläuterten Gründen als ausgesprochen schwierig. Die klassischen Risikofaktoren wie Tabak- und Alkoholkonsum oder HPV-Infektion treffen auf diese Patientengruppe nur bedingt zu und auch das erhöhte Risiko nach Transplantation kann leider nicht verhindert werden. Das bedeutet, dass vor allem an der sekundären Tumorprävention, der Tumorfrüherkennung, angesetzt werden muss.

Wie den Interviews mit betroffenen Eltern zu entnehmen ist, erweist es sich noch immer als schwierig, einen Arzt zu finden, der zum einen zügig die richtige Diagnose stellen kann, zum anderen aber auch eine adäquate Langzeitbetreuung unter Berücksichtigung der mannigfaltigen Erscheinungsformen dieser Erkrankung gewährleisten kann. Die Familien müssen lange Fahrtzeiten in Kauf nehmen, um kompetente ärztliche Hilfe in Anspruch nehmen zu können. Ein Ansatz, dieses Problem zu lösen, wären überregionale diagnostische Zentren, die das gesamte Spektrum der FA abdecken. Dazu gehören vor allem ein Hals-Nasen-Ohren Arzt (inkl. Ösophagoskopie), ein Gynäkologe, ein Zahnarzt oder Oralchirurg und ein Hämatologe. Diese Liste könnte noch beliebig erweitert werden, doch geht es vor allem darum, eine Grundversorgung zu schaffen und so die Eltern und Betroffenen so weit wie möglich zu entlasten. An der Uniklinik Düsseldorf wird seit einigen Jahren mithilfe der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. daran gearbeitet, eine möglichst umfassende Versorgung zu gewährleisten. Weitere Arbeitsgruppen gibt es in Würzburg und Berlin.

Unter Berücksichtigung der oralen Tumorprävention wäre es hier besonders wichtig, auch lokal eine größere Anzahl an Zahnärzten und Oralchirurgen verstärkt in diesem Bereich zu schulen. So könnte einerseits die frühe Erkennung einer bedrohlichen Läsion, sowie auch andererseits eine engmaschigere Nachsorge gewährleistet werden.

5.3. Primäre und sekundäre Tumorprävention: Zytologische Aspekte

Wie die obigen Auswertungen zeigen, stellt die DNA-Bildzytometrie in den Fällen, in denen sich genügend auffällige Zellen in den zytologischen Abstrichen nachweisen ließen, eine gute und aussagekräftige Methode dar. Als ausreichende Zahl von auffälligen Zellen werden dabei üblicherweise 300 angesehen, wobei aber am Schwerpunkt Cytopathologie in besonderen Fällen (beispielsweise wenn eine Wiederholung der Probe nicht möglich ist und eine therapeutische Entscheidung getroffen werden muss) bei eindeutig klarem Ergebnis auch weniger Zellen akzeptiert werden.

Ein Ansatz in der Verbesserung der DNA-Bildzytometrie liegt in ihrer Automatisierung, die inzwischen durchaus technisch realisiert werden konnte. Die in der Cytopathologie Düsseldorf zur Verfügung stehende Motic DNA Workstation ist inzwischen als Vollautomat erhältlich und steht neuerdings als Dauerleihgabe der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. dem Institut zur Verfügung (s. Abb. 14).



Abb. 14: DNA-Zytometrie-Vollautomat

Die Automatisierungsbestrebungen der DNA-Zytometrie verfolgen als Ziele zum einen die Erhöhung der Messzellzahlen zur Verbesserung der statistischen Sicherheit der Messergebnisse, zum anderen eine Beschleunigung der Messung und schließlich als wichtigsten Aspekt die Freistellung des Unter-

suchers während des eigentlichen Messvorganges durch die Beschränkung seiner Arbeit auf die Durchsicht der Bildgalerie mit Kontrolle und gegebenenfalls Korrektur der gemessenen Zellpopulationen und die Durchführung der Messauswertung und -interpretation. Das Erreichen dieser Ziele setzt (neben einigen technischen Aspekten) inhaltlich voraus, dass es gelingt, eine korrekte automatische Zuordnung von Feulgen-gefärbten Zellkernen rein aufgrund ihrer Morphologie zu verschiedenen Zellklassen zu realisieren und darüber hinaus auch Artefakte, also beispielsweise überlappend liegende Zellcluster oder lytische Zellreste, abzugrenzen. Diese Zuordnung gelingt durch die Verwendung von Organsystem- bzw. auch präparationsabhängigen Zellklassifikatoren („*Classifiern*“), die in einer Kooperation zwischen dem Lehrstuhl für Bildverarbeitung der RWTH Aachen, dem Institut für Pathologie in Düren und dem Schwerpunkt für Cytopathologie in Düsseldorf entwickelt wurden. Für die Entwicklung eines einzelnen *Classifiers*, welche bisher für Mundhöhle / Gebärmutterhals, Ergusszytologie und Prostata vorliegen, ist die Zuordnung von mehreren Zehntausend Feulgen-gefärbten Objekte als Lymphozyten, Granulozyten, Fibroblasten, atypische Zellen oder Artefakte durch einen Zytopathologen notwendig, die dann jeweils als Testset für die aufwendige bildanalytische Arbeit verwendet werden. Ziel ist, möglichst fehlerfrei auf der Basis der Erkennung von morphometrischen Variablen, bei denen die Kernfläche, der Kernumfang, Biegungrößen und das Ausmaß der Gezacktheit der Kernkontur, ferner die Färbeintensität und ihre Homogenität sowie weitere Texturparameter berücksichtigt werden, diese Zuordnung automatisch nachzuahmen. Dieses gelingt inzwischen für Prostata und Mundhöhle für > 90% der Objekte bei einer Zuordnung morphologisch als Tumorzellen eingestufferter Zellen in andere Kategorien von 5% - 7% (FRIEDRICH ET AL. 2012, BÖCKING ET AL. 2013). Ein wesentliches Problem, das noch nicht recht gelöst ist, besteht in der Fehlerkennung von defokussierten Elementen, wenn es sich bei den untersuchten Präparaten nicht um wirkliche Monolayer, also Präparate, bei denen die Zellen streng in einer Ebene liegen, handelt, sondern auch mehrdimensionale Zellanordnungen vorkommen. Hier wäre ggfls. eine Modifikation durch eine Umstellung der Zellpräparation von der klassischen Ausstrichtechnik auf eine Dünnschichttechnik denkbar. Hierbei würden die Kliniker nicht die Abstriche selber herstellen, sondern die

Abstrichbürsten in alkoholischer Lösung fixiert an die befundene Pathologie versenden, in welcher dann durch eine maschinelle Sedimentationstechnik ein Monolayer realisiert werden könnte.

Dennoch werden Fälle verbleiben, in denen sich trotz aller Bemühungen keine für DNA-Bildzytometrie ausreichende Zahl auffälliger Zellen darstellen lässt. Hier müssten dann alternative Untersuchungsmethoden überlegt werden, wobei insbesondere an die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zu denken wäre. Bei dieser Untersuchung werden durch ein Hybridisierungsverfahren mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte DNA-Sonden an die zuvor durch Hitze-denaturierung einzelsträngig gemachte DNA der Zellkerne gebunden. Bei der anschließenden Fluoreszenzmikroskopie werden nach einer Gegenfärbung des Zellkerns mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI die gefundenen Signale auf die Zahl von Kopien der von den DNA-Sonden repräsentierten Genomabschnitte bezogen und auf diese Weise entschieden, ob einer Einzelzelle ein aneuploider Charakter zugewiesen werden kann oder nicht. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass Interpretationen hier bereits nach Untersuchungen von nur sehr wenigen, d.h. manchmal (abhängig von der konkreten DNA-Sonde) nur 5 - 25 Zellen, treffen kann. Als „klassische“ diagnostische FISH-Anwendung ist der zur Abklärung zweifelhafter Veränderungen in Urinen oder Harntraktspülflüssigkeiten eingeführte „UroVysion-Test“ aus vier Sonden (CEP 3, CEP 7, 9p21, CEP17) anzusehen, der aber auch für Gallenwegs- und Bauchspeicheldrüsenläsionen geeignet ist. Für plattenepitheliale Läsionen sind derzeit leider noch keine etablierten FISH-Tests existent, was sich insbesondere in den Bereichen der oralen Zytologie und der gynäkologischen Zytologie negativ auswirkt. Hintergrund ist hier, dass die Zielsequenzen der FISH-Untersuchung bekannt sein müssen, dass es also Genomabschnitte mit möglichst häufig vorkommenden, spezifischen Abnormitäten für die zu untersuchende Tumorentität geben muss (SUNIL ET AL. 2013). Dies ist vor allem bei einer immer noch in der Forschung befindlichen Erkrankung wie der Fanconi-Anämie eine nicht zu unterschätzende Problematik.

Ebenfalls eine Ergänzung zur Zytodiagnostik bietet seit einiger Zeit die Immunzytochemie mit p16 plus dem Proliferationsmarker Ki-67 als simultane Doppelfärbung (CINtec®PLUS). Momentan ausschließlich im Bereich des

Zervixscreenings angewandt, bietet diese Methode eine Alternative zur klassischen Pap-Zytologie oder zum HPV-Test. Basis dieses Tests ist die Tatsache, dass in einer normalen Zelle keine gleichzeitige Färbung von p16 und Ki-67 auftritt. Kommt es jedoch zu einer Regulationsstörung der Zellzykluskontrolle mit gesteigerter Proliferation, wird Ki-67 exprimiert - über ein rotes Signal im Zellkern zu erkennen. Weiterhin kommt es zu einer Überexpression von p16, was sich in einer Braunfärbung des Zytoplasmas niederschlägt (SCHMIDT ET AL. 2011). Wäre es in Zukunft möglich diese Methode auch im oralen Bereich anzuwenden würden die diagnostischen Verfahren durch einen Test mit ausgezeichneter Sensitivität und Spezifität ergänzt werden.

Zusätzlich zu den verbesserten diagnostischen Methoden wäre es vorteilhaft, die Frage klären zu können, warum sich Karzinome bei FA-Patienten weitgehend auf das nicht verhornende Plattenepithel beschränken, oder anders herum gefragt, weswegen (bei Chromosomenfragilität in allen Körperzellen) das verhornende Plattenepithel der Haut und die drüsenbildenden Gewebe vergleichsweise wenige Tumoren bilden. Könnte die Wissenschaft dieser Fragestellung auf den Grund gehen, wäre es gegebenenfalls möglich, Schutzmechanismen für das nicht verhornende Plattenepithel, also auch für die Mundhöhle zu entwickeln und der Tumorentstehung so auf einem weiteren Weg präventiv entgegenzuwirken.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, eine der größten Sammlungen an oralen Zytologien von Fanconi-Anämie Patienten hinsichtlich verschiedener Gesichtspunkten auszuwerten. Es wurden 325 Abstriche von 94 Patienten, darunter 38 männliche und 56 weibliche, ausgewertet und klinischen Aspekten zugeordnet.

Die Proben wurden hinsichtlich Alter, Geschlecht und KMT ausgewertet. Hier wurde deutlich, dass mit steigendem Alter und Anteil einer KMT das Risiko, an einem Mundschleimhautkarzinom, zu erkranken ansteigt. Weiterhin wurden die zytologischen Diagnosen den Proben zugeordnet und die Entnahmestellen zusammengetragen. Dabei zeigt sich ein vermehrtes Vorkommen auffälliger Läsionen an der Oberkiefergingiva und im Planum bukkale. Diagnostisch von Bedeutung ist die Tatsache, dass einige Proben aufgrund zu weniger Zellen DNA-zytometrisch nicht ausgewertet werden konnten. Dieses zeigt deutlich, dass an dieser Stelle noch Optimierungsbedarf in der methodischen Durchführung der DNA-Zytometrie (z.B. durch die Verwendung der Dünnschichtzytologie) bzw. in der Weiterentwicklung anderer diagnostischer Methoden besteht.

Mithilfe der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. konnte des Weiteren ein ausführliches Follow-Up der Patienten erstellt und bis Juli 2013 ausgewertet werden. Von 52 Patienten konnte dabei, trotz zahlreicher erschwerender Aspekte, ein Follow-Up über einen mittleren Zeitraum von 44,52 Monaten erstellt werden. 15 der insgesamt 94 Patienten sind bis zum Ende der Studie bereits verstorben.

Zusammenfassend untermauert die vorliegende Arbeit, dass es sich bei der Fanconi-Anämie um eine hämatologische Erkrankung mit ernstzunehmenden Risiken zur Entwicklung von Karzinomen des nicht verhornenden Plattenepithels handelt, die in zahlreichen Fällen zu einem frühen Tod führen; gleichzeitig konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die diagnostischen Methoden zur früheren Tumorerkennung und dadurch entsprechend auch die therapeutischen Möglichkeiten deutlich verbessert haben und sich ergo die Lebenserwartung der Patienten bei enger klinischer Führung deutlich verbessern lassen sollte.

IV. Literaturverzeichnis

1. Afrogheh, A; Hille, J; Mehrotra R (2013): The Development of a Novel Oral Cytologic Grading System. In: Mehrotra, R (Hg.): Oral Cytology. A Concise Guide. Springer Verlag, New York, Kapitel 6, S. 73-90.
2. Alter, BP (2003): Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. In: *Cancer* 97 (2), S. 425–440.
3. Alter, BP (2005): Leukämie- und Krebserkrankungen bei FA-Patienten. In: Dt. Fanconi-Anämie-Hilfe (Hg.): Fanconi-Anämie. Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte. Selbstverlag, Unna, S. 267-270, ISBN 3-00-015621-6.
4. Alter, BP (2008): Diagnostic Evaluation of FA. In: Mary Ellen Eiler, Dave Frohnmeyer, Linn Frohnmeyer, Kim Larsen und Joyce Owen (Hg.): Fanconi Anemia. Guidelines for Diagnosis and Management. 3. Aufl., S. 33–48.
5. Auerbach, AD (2009): Fanconi anemia and its diagnosis. In: *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 668 (1-2), S. 4–10.
6. Beran, M; Spitzer, G; Verma, DS (1982): Testosterone and synthetic androgens improve the in vitro survival of human marrow progenitor cells in serum-free suspension cultures. In: *J. Lab. Clin. Med.* 99 (2), S. 247–253.
7. Biesterfeld, S (2013): Zurverfügungstellung von urheberrechtlich geschützten Abbildungen aus dem Bestand des Schwerpunktes Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
8. Biesterfeld, S; Gerres, K; Fischer-Wein, G; Böcking, A (1994): Polyploidy in non-neoplastic tissues. In: *J. Clin. Pathol.* 47 (1), S. 38–42.
9. Birkeland, AC; Auerbach, AD; Sanborn, E; Parashar, B; Kuhel, WI; Chandrasekharappa, SC; Smogorzewska, A; Kutler, DI (2011): Postoperative Clinical Radiosensitivity in Patients With Fanconi Anemia and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. In: *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 137 (9), S. 930–934.
10. Böcking, A (1998): Standardisierung der zytopathologischen Diagnostik. In: *Der Pathologe* 19 (3), S. 236–241.
11. Böcking, A; Friedrich, D; Jin, C; Bell, A; Würflinger, T; Meyer-Ebrecht, D; Zhang, Y; Biesterfeld, S; Pomjanski, N; Bernyskyy, L; Yeung, R;

- Handsichel, J; Palcic, B; Aach, T (2013): Diagnostic Cytometry. In: Mehrotra R (Hrsg.): Oral Cytology. A Concise Guide. Springer Verlag, New York, Kapitel 9, S. 125-146.
12. Burroughs, L; Woolfrey, A; Shimamura, A (2009): Shwachman-Diamond syndrome: a review of the clinical presentation, molecular pathogenesis, diagnosis, and treatment. In: *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 23 (2), S. 233–248.
 13. Chatelain, R; Willms, A; Biesterfeld, S; Auffermann, W; Böcking, A (1989): Automated Feulgen staining with a temperature-controlled staining machine. In: *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 11 (3), S. 211–217.
 14. Choi, SY; Kahyo, H (1991): Effect of cigarette smoking and alcohol consumption in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. In: *Int J Epidemiol* 20 (4), S. 878–885.
 15. Dokal, I; Vulliamy, T (2010): Inherited bone marrow failure syndromes. In: *Haematologica* 95 (8), S. 1236–1240.
 16. D'Souza, G; Kreimer, AR; Viscidi, R; Pawlita, M; Fakhry, C; Koch, WM; Westra, WH; Gillison, ML (2007): Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. In: *N Engl J Med.* 356 (19), S. 1944-1956.
 17. Feulgen, R; Rossenbeck, H (1924): Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende Elektiv-Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. In: *Z Physiol Chem.* 135, S. 203–248.
 18. Friedrich, D; Jin, C; Zhang, Y; Demin, C; Yuan, L; Berynsky, L; Biesterfeld, S; Aach, T; Böcking, A (2012): Identification of prostate cancer cell nuclei for DNA-grading of malignancy. In: Tolxdorff T, Deserno T, Handels H, Meinzer HP (Hrsg.): Proceedings des Workshops "Bildverarbeitung für die Medizin", S. 334-339, erschienen in der Buchreihe „Informatik aktuell“ (Hrsg.: Brauer W).
 19. Frohnmayr, D; Frohnmayr, L (2005): Behandlung und Therapie der Fanconi-Anämie. In: Dt. Fanconi-Anämie-Hilfe (Hg.): Fanconi-Anämie. Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte. Selbstverlag, Unna, S. 57–68, ISBN 3-00-015621-6.
 20. Giampietro, PF; Adler-Brecher, B; Verlander, PC; Pavlakis, SG; Davis, JG; Auerbach, AD (1993): The need for more accurate and timely diagnosis in Fanconi anemia: a report from the International Fanconi Anemia Registry. In: *Pediatrics* 91 (6), S. 1116–1120.

21. Girmes, G (2009): Stellenwert der DNA-Bildzytometrie in der Differentialdiagnostik uteriner leiomyogener Tumoren. Med. Diss. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
22. Giroud, F; Haroske, G; Reith, A; Böcking, A (1998): 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance. European Society for Analytical Cellular Pathology. In: *Anal Cell Pathol* 17 (4), S. 201–208.
23. Graumann, W (1953): Zur Standardisierung des Schiff'schen Reagens. In: *Z Wiss.Mikrosk.* 61, S. 225–226.
24. Hansen, JA (2005): Gewebetypisierung und Spenderauswahl für hämatopoetische Stammzelltransplantation: HLA-System und Transplantationsgenetik. In: Dt. Fanconi-Anämie-Hilfe (Hg.): Fanconi-Anämie. Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte. Selbstverlag, Unna, S. 201-210, ISBN 3-00-015621-6.
25. Haroske, G; Giroud, F; Reith, A; Böcking, A (1998): 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. In: *Anal Cell Pathol* 17 (4), S. 189–200.
26. Hirschfeld, G; Berneburg, M; Arnim, C; Iben, S; Ludolph, AC; Scharffetter-Kochanek, K (2007): Progeroid-Syndrome: Klinik und Molekularbiologie der vorzeitigen Alterung. In: *Dtsch Ärztebl* 104(6): A346-A353.
27. Höfling, C. (2007): Gentherapie bei Fanconi Anämie. Med. Diss., Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
28. Howlader, N; Noone, AM; Krapcho, M; Neyman, N; Aminou, R; Altekruse, SF; Kosary, CL; Ruhl, J; Tatalovich, Z; Cho, H; Mariotto, A; Eisner, MP; Lewis, DR; Chen, HS; Feuer, EJ; Cronin, KA (based on 2011 SEER data submission): SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations). Hg. v. M. D. National Cancer Institute. Bethesda.
Auch online verfügbar unter:
http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/, zuletzt aktualisiert 2012.
29. Ide, R; Mizoue, T; Fujino, Y; Hoshiyama, Y; Sakata, K; Tamakoshi, A; Yoshimura, T (2008): Cigarette smoking, alcohol drinking, and oral and pharyngeal cancer mortality in Japan. In: *Oral Dis* 14 (4), S. 314–319.
30. Johnson, N (2001): Tobacco use and oral cancer: a global perspective. In: *J Dent Educ* 65 (4), S. 328–339.

31. Knies, K; Schuster, B; Ameziane, N; Rooimans, M; Bettecken, T; Winter, J; Schindler, D (2012): Genotyping of Fanconi Anemia Patients by Whole Exome Sequencing: Advantages and Challenges. In: *PLoS ONE* 7(12), e52648.
32. Kreimer, AR; Clifford, GM; Boyle, P; Franceschi, S (2005): Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14 (2), S. 467–475.
33. Kutler, DI; Singh, B; Satagopan, J; Batish, SD; Berwick, M; Giampietro, PF; Hanenberg, H; Auerbach AD (2003): A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). In: *Blood* 101 (4), S. 1249–1256.
34. Lipton, JM; Ellis, SR (2009): Diamond-Blackfan anemia: diagnosis, treatment, and molecular pathogenesis. In: *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 23 (2), S. 261–282.
35. MacMillan, ML; Hughes, MR; Agarwal, S; Daley, GQ (2011): Cellular Therapy for Fanconi Anemia: The Past, Present, and Future. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 17 (1), S. S109–S114.
36. Maier, H; Dietz, A; Gewelke, U; Heller, WD; Weidauer, H (1992): Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. In: *Clin Investig* 70 (3-4), S. 320–327.
37. Maier, H; Zöller, J; Herrmann, A; Kreiss, M; Heller, WD (1993): Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer. In: *Otolaryngol Head Neck Surg* 108 (6), S. 655–661.
38. Masserot, C; Peffault de Latour, R; Rocha, V; Leblanc, T; Rigolet, A; Pascal, F et al. (2008): Head and neck squamous cell carcinoma in 13 patients with Fanconi anemia after hematopoietic stem cell transplantation. In: *Cancer* 113 (12), S. 3315–3322.
39. Meijer, GA; Beliën, JA; van Diest, PJ; Baak, JP (1997): Image analysis in clinical pathology. In: *J. Clin. Pathol.* 50 (5), S. 365–370.
40. Molinari, PF; Neri, LL (1978): Effect of a single oral dose of oxymetholone on the metabolism of human erythrocytes. In: *Exp. Hematol.* 6 (8), S. 648–654.
41. Montgomery, PW; Haam, E (1951): A study of the exfoliative cytology in patients with carcinoma of the oral mucosa. In: *J. Dent. Res.* 30 (3), S. 308–313.

42. Neufeld, E (2005): Medizinische Checkliste-Vorschläge für Basis und Spezialuntersuchungen bei Patienten mit Fanconi-Anämie. In: Dt. Fanconi-Anämie-Hilfe (Hg.): Fanconi-Anämie. Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte. Selbstverlag, Unna, S. 89-94, ISBN 3-00-015621-6.
43. Ram, H; Sarkar, J; Kumar, H; Konwar, R; Bhatt, MLB; Mohammad, S (2011): Oral Cancer: Risk Factors and Molecular Pathogenesis. In: *J. Maxillofac. Oral Surg.* 10 (2), S. 132–137.
44. Robert Koch-Institut (Hg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (Hg.) (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausg. Berlin.
45. Rosenberg, PS; Alter, BP; Ebell, W (2008): Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. In: *Haematologica* 93 (4), S. 511–517.
46. Rosenberg, PS; Greene, MH; Alter, BP (2003): Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. In: *Blood* 101 (3), S. 822–826.
47. Rosenberg, PS; Socié, G; Alter, BP; Gluckman, E (2005): Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. In: *Blood* 105 (1), S. 67–73.
48. Rosin, MP; Cheng, X; Poh, C; Lam, WL; Huang, Y; Lovas, J et al. (2000): Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. In: *Clin. Cancer Res.* 6 (2), S. 357–362.
49. Schmidt, D; Bergeron, C; Denton, KJ; Ridder, R; European CINtec Cytology Study Group (2011): p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. In: *Cancer Cytopathol.* 119(3), S. 158-166.
50. Shimamura, A (2005): Behandlung der hämatologischen Probleme von Patienten mit Fanconi-Anämie. In: Dt. Fanconi-Anämie-Hilfe (Hg.): Fanconi-Anämie. Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte. Selbstverlag, Unna, S. 105-123, ISBN 3-00-015621-6.
51. Sunil, PM; Ramachandran, CR; Gokul, S; Jaisanghar, N (2013): Fluorescence in-situ hybridization technique as a diagnostic and prognostic tool in oral squamous cell carcinoma. In: *J Oral Maxillofac Pathol* 17 (1), S. 61–64.

52. Tischkowitz, M; Dokal, I (2004): Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. In: *Br J Haematol* 126(2), S. 176-91.
53. Tolar, J; Adair, JE; Antoniou, M; Bartholomae, CC; Becker, PS; Blazar, BR et al. (2011): Stem Cell Gene Therapy for Fanconi Anemia: Report from the 1st International Fanconi Anemia Gene Therapy Working Group Meeting. In: *Mol Ther* 19 (7), S. 1193–1198.
54. Tolar, J; Becker, PS; Clapp, DW; Hanenberg, H; Díaz de Heredia, C; Kiem, HP et al. (2012): Gene Therapy for Fanconi Anemia: One Step Closer to the Clinic. In: *Human Gene Therapy* 23 (2), S. 141–144.
55. van Zeeburg, HJT; Snijders, PJF; Wu, T; Gluckman, E; Soulier, J; Surralles, J et al. (2008): Clinical and molecular characteristics of squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 100 (22), S. 1649–1653.
56. Velleuer, E (2005): Guido Fanconi - eine Kurzbiographie. In: Dt. Fanconi-Anämie-Hilfe (Hg.): *Fanconi-Anämie. Ein Handbuch für Eltern, Patienten und ihre Ärzte.* Selbstverlag, Unna, S. 347-356, ISBN 3-00-015621-6.
57. Velleuer, E (2013): Zurverfügungstellung von urheberrechtlich geschützten Abbildungen aus dem Bestand der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V..
58. Vlachos, A; Rosenberg, PS; Atsidaftos, E; Alter, BP; Lipton, JM (2012): Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. In: *Blood* 119 (16), S. 3815–3819.
59. Zierhut, H (2008): Genetic counseling. Unter Mitarbeit von Ann Garrity. In: Mary Ellen Eiler, Dave Frohnmeyer, Linn Frohnmeyer, Kim Larsen und Joyce Owen (Hg.): *Fanconi Anemia. Guidelines for Diagnosis and Management.* 3. Aufl., S. 275–290.

V. Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
Aqua dest	Aqua destillata
CD	Cluster of Differentiation
DAPI	4'6-Diamidin-2-phenylindol
DBA	Diamond-Blackfan-Anämie
DEB	Diepoxybutan
NA	Desoxyribonucleic acid
ESACP	European Society of Analytic and Cellular Pathology
FA	Fanconi-Anämie
FisH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GvHD	Graft versus Host Disease
Hb	Hämoglobin
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Human Leukocyte Antigen
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HPV	Humanes Papillomavirus
IBMFS	Inherited Bone Marrow Failure Syndrom
IOD	Integrierte optische Dichte
KMT	Knochenmarktransplantation
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MMC	Mitomycin C
O/E	observed-to-expected
OK	Oberkiefer
Pap	Papanicolaou
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Shwachman-Diamond-Syndrom
SOP	Standard Operation Procedure
UK	Unterkiefer
Z.n.	Zustand nach

Anhang

Tabelle 7: Datensammlung zum Krankheitsverlauf des Patienten S.S.

Datum	Hb-Wert (g/dl)	Erthrozyten (Mio./ μ l)	Thrombozyten (/ μ l)
18.06.2004	6,6	2	8000
23.06.2004	6,1	1,88	16000
29.06.2004	8,3	2,5	9000
14.07.2004	6	1,9	20000
20.07.2004	5,2	1,57	11000
Beginn der Oxymetholontherapie (50mg/d + 5mg Decortin jeden 2.Tag)			
14.09.2004	6,8	1,9	39000
21.09.2004	7,2	2,1	48000
14.10.2004	8,6	2,4	46000
11.01.2005	14	4	36000
08.03.2005	15,3	4,3	57000
Reduktion d. Oxymetholon auf 25 mg/d			
05.04.2005	15,3	4,3	62000
24.05.2005	15	4,2	41000
04.10.2005	15,8	4,3	63000
14.12.2005	15,1	4,2	47000
Reduktion d. Decortin auf 5 mg jeden 3.Tag			
07.03.2006	15,1	4,1	56000
10.05.2006	14	3,8	59000
23.08.2006	15,1	4,1	45000
Reduktion d. Oxymetholon auf 12,5 mg/d			
17.11.2006	14,1	3,9	40000
15.05.2007	14,9	4	60000
18.12.2007	13,9	3,8	46000
27.05.2008	14,4	3,9	42000
17.12.2008	14,5	3,9	40000
02.02.2009	15,6	4,2	56000
15.06.2009	15,5	3,8	46000
17.12.2009	14,8	3,9	49000
28.06.2010	12,2	3,3	32000
22.12.2010	15	4,3	22000
Erhöhung d. Oxymetholon auf 50 mg/d			
10.01.2011	13,2	3,8	10000
02.02.2011	12,8	3,66	13000
Beginn zahlreicher Thrombozytentransfusionen			
10.02.2011	11,9	3,4	23000
04.03.2011	10,5	2,9	19000
07.04.2011	8,5	2,2	12000
Beginn zusätzlicher Erythrozytentransfusionen			

28.04.2011	10,7	3	12000
25.05.2011	7,3	1,9	26000
09.06.2011	7,9	2,1	13000
06.07.2011	10,4	3,1	21000
21.07.2011 Knochenmarktransplantation			
24.07.2011	9,7	keine Angabe	56000
08.08.2011	9,2	keine Angabe	88000
02.09.2011	9,2	keine Angabe	96000
04.10.2011	11,2	keine Angabe	122000
08.11.2011	13,4	keine Angabe	239000

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Biesterfeld für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit. Ohne seine herausragende fachliche Kompetenz, seine Geduld und Hilfsbereitschaft wäre die Vollendung nicht möglich gewesen.

Besonderen Dank schulde ich der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V., insbesondere Herrn Ralf Dietrich und seiner Frau Cornelia Sowa-Dietrich, sowie Frau Dr. Eunike Velleuer. Durch sie alle hatte ich die Ehre als ein Teil der Fanconi-Gemeinschaft an Familien- und Wissenschaftlertreffen teilzunehmen und auf diese Weise die wichtigsten und bedeutendsten Informationen für diese Arbeit zu sammeln. Das außergewöhnliche und bewundernswerte Engagement, das Familie Dietrich und Frau Dr. Velleuer in die Betreuung der betroffenen Familien und das Vorantreiben der Forschung investiert, beeindruckte mich zutiefst und ließ nie einen Zweifel an der Wichtigkeit dieser Arbeit zu. Durch Ihre Unterstützung durfte ich meine Arbeit nicht nur durch umfangreiche Hintergrundinformationen bereichern, sondern durfte auch zahlreiche Eindrücke sammeln, die mich auf meinem weiteren Lebensweg begleiten werden.

Ferner möchte ich mich bei allen Familien der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. bedanken, die mir gerne alle meine Fragen beantwortet und einen Einblick in ihr Leben gewährt haben.

An dieser Stelle gilt ein besonderer Dank Herrn J.O., der mir für ein langes Gespräch zu Verfügung stand und dadurch ein wichtiger Teil dieser Arbeit geworden ist.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Germing für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meinem Freund, die in jeder Phase meines Lebens hinter mir stehen und die auf ihre Art und Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Eidesstattliche Versicherung

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