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

DNA-bildzytometrische Untersuchungen
an zytologisch unklarem Regeneratepithel der Mundschleimhaut

Dissertation

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

vorgelegt von
Anna-Maria Brenner

2016

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Zweitgutachter: Univ.- Prof. Dr. med. dent. Dieter Drescher

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Grundlagen der konventionellen oralen Zytologie	1
1.2 Adjuvante Methoden in der oralen Zytologie	4
1.3 Das „unklare Regeneratepithel“ als besonderes Problem der oralen Zyto- diagnostik	12
1.4 Problemstellung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Patientenkollektiv	15
2.2 Methoden	15
2.2.1 Konventionelle zytologische Diagnostik	15
2.2.2 DNA-Bildzytometrie	17
2.2.3 Ermittlung des klinischen Follow-Up	25
2.2.4 Statistische Untersuchungen	26
3. Ergebnisse	28
3.1 Zusammensetzung der Patientengruppe	28
3.2 Klinische Daten	35
3.2.1 Alter und Geschlecht der Patienten	35
3.2.2 Entnahmelokalisation	35
3.3 Bildzytometrie	36
3.3.1 Allgemeine Datenverteilung in der Messreihe	36
3.3.2 Zusammenhang zwischen Alter bzw. Geschlecht der Patienten und dem Mess- ergebnis	38
3.3.3 Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Proben und dem Messergebnis	39

3.3.4	Betrachtungen zum Follow-Up	40
3.3.4.1	Zytologie und DNA-Bildzytometrie von Bürstenabstrichen mit zeitnaher histologischer Untersuchung der Entnahmestelle durch Biopsie	41
3.3.4.2	Zytologie und DNA-Bildzytometrie von Bürstenabstrichen mit zytologischer Kontrolluntersuchung der Entnahmestelle	45
3.3.4.3	DNA-bildzytometrisch untersuchte Bürstenabstriche ohne Follow-Up	47
4.	Diskussion	48
4.1	Das Fach Pathologie als zentrale Disziplin der Tumordiagnostik	48
4.2	Mikroskopische Diagnostik von Tumoren und Tumorstufen: Bedingungen und Möglichkeiten	49
4.3	„Abnormes Regeneratepithel“: Eine Zusatzkategorie in der oralen Zytodiagnostik	50
4.4	Erfahrungen am Schwerpunkt Cytopathologie der Universität Düsseldorf mit der DNA-Bildzytometrie am „abnormen Regeneratepithel“	53
5.	Zusammenfassung	56
6.	Literaturverzeichnis	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Indikation für eine oralzytologische Untersuchung (van der Waal 2009)	1
Tabelle 2: Treffsicherheit der konventionellen oralen Zytodiagnostik in der Erkennung von Plattenepithelkarzinomen. Sens.= Sensitivität, Spez.= Spezifität, PPV und NPV= positiver bzw. negativer Prädiktionswert	2
Tabelle 3: Zusammenhang zwischen Läsionen, Tumor-bezogener Auswertung zugehöriger Zellbilder und diagnostischer Interpretation. Nicht berücksichtigt wurden hier „unzureichende“ Abstriche, also Präparate, die aus technischen Gründen oder wegen fehlender Zellen nicht ausgewertet werden können (Quote bei Mundhöhlenabstrichen: <1%)	3
Tabelle 4: Ablauf der Papanicolaou-Färbung	16
Tabelle 5: Ablauf der Feulgen-Färbung	18
Tabelle 6: Synoptische Datenübersicht einzeitig entnommener zytologischer Proben und klinischer Verläufe aller 75 Patienten	29
Tabelle 7: Entnahmelokalisationen von 114 oralen Abstrichen mit der Diagnose „abnormes Regeneratepithel“	36
Tabelle 8: Darstellung der Eichzellen- und Analysezellen von 84 oralen Abstrichen mit der Diagnose „abnormes Regeneratepithel“	37
Tabelle 9: Verteilung der „aneuploiden“, „nicht-aneuploiden“ und „verdächtigen“ Proben nach der DNA-Bildzytometrie, n=84	38
Tabelle 10: Korrelation zwischen dem Patientenalter und dem Ergebnis der DNA-Bildzytometrie	38
Tabelle 11: Korrelation zwischen dem Geschlecht der Patienten und dem Ergebnis der DNA-Bildzytometrie	39
Tabelle 12: Korrelation zwischen der Entnahmelokalisation und dem Ergebnis der DNA-Bildzytometrie	39
Tabelle 13: Rückläufer der 75 Fragebögen zum klinischen Follow-Up	41
Tabelle 14: Häufigkeitsverteilung von histologischen Entnahmen in Bezug auf Zytologie und DNA-Bildzytometrie, n= 14	42
Tabelle 15: Gegenüberstellung der DNA-bildzytometrischen Messergebnisse am zytologischen Abstrich und der histologisch-bioptischen Befundung, n= 14	42
Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung der zytologischen Kontrollen in Bezug auf die erste Zytologie und die DNA-Bildzytometrie, n= 16	45
Tabelle 17: Gegenüberstellung der DNA-bildzytometrischen Messergebnisse am ersten zytologischen Abstrich und der zytologischen Befundung von Kontrollentnahmen, n= 16	46

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Überschreitende Eigenschaften gutartiger (grün) und bösartiger Zellen (rot) führen dazu, dass diagnostisch nicht eindeutig zu interpretierende Zellbilder (gelb) entstehen (Biesterfeld 2013)	4
Abb. 2:	Ergebnisse einer FisH-basierten diagnostischen Studie an oralen Präkanzerosen, modifiziert nach Poh et al. 2012 (Biesterfeld 2013)	8
Abb. 3:	Zytologische Präparate von Mundhöhlenabstrichen mit einem großen Verband von Regeneratepithel (linkes Bild) im Vergleich zu dysplastischen Epithelien (rechtes Bild, oberer linker Quadrant) (Biesterfeld 2013)	13
Abb. 4:	Zytologie eines Abstrichpräparates nach Papanicolaou-Färbung (links) und nach Feulgen-Färbung (rechts); die Identifikation identischer Zellen ist nach der Umfärbung unschwer möglich. Im Vorliegenden Beispiel können alle Zellen gemessen werden, da keine Überschneidungen mit anderen kernhaltigen Zellen oder Erythrozyten vorliegen (Biesterfeld 2013)	19
Abb. 5:	Mess-Systeme für die DNA-Bildzytometrie: Roche Auto-Cyte-System (links) und MotiCyte DNA-Workstation (rechts) (Biesterfeld 2013)	20
Abb. 6:	Monitordarstellung eines aktuellen Messvorgangs. Links Darstellung des mikroskopischen Livebildes, in der Mitte Bildgalerie der letzten 12 erfassten Objekte, rechts Diagrammdarstellung der DNA-Messwertverteilung, (oben) und Darstellung 70 der Beziehung von DNA-Messwerten und Kernflächen (Biesterfeld 2013)	21
Abb. 7:	Monitordarstellung einer 55 Messzellen zeigenden Seite der Bildgalerie (Biesterfeld 2013)	22
Abb. 8:	Repräsentative DNA-Histogramme mit gelber Unterlegung der Stammlinie. Links: DNA-Stammlinie bei 2c, kein Hinweis auf Aneuploidie. Rechts: Eindeutige Aneuploidie bei einer DNA-Stammlinie von 3,18c	24
Abb. 9:	Fragebogen zur Ermittlung des klinischen Follow-Up	27
Abb. 10:	Grafische Darstellung der Diagnose mit „abnormen Regeneratepithel“ der Mundschleimhaut in Bezug auf alle oralen Gewebeproben	28
Abb. 11:	Anteile für DNA-bildzytometrische Messungen geeigneter bzw. nicht Geeigneter Präparate	28
Abb. 12:	Grafische Darstellung der Entnahmelokalisation von 114 oralen Abstrichen mit der Diagnose „abnormes Regeneratepithel“	36
Abb. 13:	Darstellung des Anteils DNA-aneuploider Proben verschiedener Entnahmelokalisationen im Säulendiagramm. Rot: Aneuploide Proben, blau: nicht-aneuploide Proben, n= 84	40

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Bezeichnung für Silber (Argentum) im Periodensystem
AgNOR	Akronym für mit kolloidaler Silbernitratlösung (Ag, chem. Zeichen für Silber) dargestellte Nukleolus-organisierende Regionen (NOR)
BDP	Bund Deutscher Pathologen
BG	Berufsgenossenschaft
C1-Stelle	hier: Position eines bestimmten Kohlenstoffatoms an der Purinbase der DNA
cdx-2	<i>Caudal homeobox protein 2</i> (immunhistochemischer Antikörper)
CEP	<i>Chromosome enumeration probe</i> , Bezeichnung für Centromer-nah gelegene DNA-Sonden bei FISH
CINtec-Plus	Immunhistochemisches Testverfahren zur simultanen Darstellung einer p16- und MIB-1-Expression
Ck20	Zytokeratin 20 (immunhistochemischer Antikörper)
DAPI	Fluoreszenzfarbstoff
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
G1, G2, G3	verschiedene Ausprägungen des Tumorgradings
GATA-3	nach einem Gen der GATA-Gruppe benannter immunhistochemischer Antikörper
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HPV	Humane Papillomviren
k-ras	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i> (Bezeichnung für ein Onkogen)
LaVysion	Kommerziell erhältliches FISH-Hybridisierungs-Kit
MIB-1	<i>Molecular Immunology Borstel 1</i> (immunhistochemischer Antikörper)
NOR	<i>nucleolar organizer region</i>

p16	Synonym für CDK2, Cyclin abhängiger Kinaseinhibitor 2A (<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>) (immunhistochemischer Antikörper)
p63	Synonym für TP63, <i>transformation related protein 63</i> (immunhistochemischer Antikörper)
PAS-Reaktion	Perjodsäure-Schiffreagenz (<i>Periodic acid-Schiff-reaction</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen (immunhistochemischer Antikörper)
pT1, pTis	Tumorstadien im TNM-System
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SOP	<i>Standard operating procedure</i>
S-Phase	Eine der drei Phasen des Zellzyklus (G0/G1-, S-, G2/M-Phase)
TTF1	<i>Thyroid transcription factor 1</i> (immunhistochemischer Antikörper)
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
UroVysion	Kommerziell erhältliches FISH-Hybridisierungs-Kit
v.a.A.	verdächtig auf Aneuploidie

1. Einleitung

1.1. Grundlagen der konventionellen oralen Zytologie

Zytologische Untersuchungen der Mundhöhlenschleimhaut spielten bis vor wenigen Jahren keine wesentliche Rolle, obwohl die Mundhöhle ein prinzipiell für Abstriche leicht zugängliches Organ ist und auch an den Bedarf in der Mundhöhle angepasste Bürsten für die Abstrichentnahme zur Verfügung stehen. In den letzten Jahren hingegen hat die Methode eine breitere Anerkennung und Akzeptanz gefunden, was dazu führte, dass am Schwerpunkt Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität zuletzt deutlich über 1000 oralzytologische Fälle pro Jahr beurteilt wurden. Diese stammten aus drei Zahnkliniken universitärer Einrichtungen (Heinrich Heine-Universität Düsseldorf, Universität Leipzig, Universität Rostock) und aus ca. je 30 zahnärztlichen Praxen des Großraums Düsseldorf sowie ganz Deutschlands. Klassische Indikationen zur zytologischen Untersuchung sind in Tabelle 1 dargestellt.

Indikationen zur oralzytologischen Untersuchung
Rot-Weiße Läsionen (nicht abwischbar)
Rote Läsionen bzw. nicht heilende Ulzera
Erosionen ohne vorhandenen Grund
Makroskopisch deutlich erhabene Veränderungen
Anamnestisches Tumorrisiko (bekannte Tumorerkrankung, Rauchen, Alkoholkonsum)

Tab. 1: Indikationen für oralzytologische Untersuchungen (van der Waal 2009)

Prinzipiell ist anerkannt, dass sich mit der oralen Zytologie viele gutartige Veränderungen, aber auch fakultative und obligate Präkanzerosen sowie manifeste Malignome diagnostizieren lassen:

- Die gutartigen Veränderungen, die man zytologisch diagnostizieren kann, umfassen dabei in erster Linie entzündliche Erosionen und Ulzera verschiedener Stadien, ferner die hyper- und parakeratotisch verhornenden reaktiven Veränderungen, mukosale Manifestationen von

Dermatosen (z. B. Lupus erythematodes oder Pemphigus vulgaris) sowie zytologische Korrelate spezieller mikrobieller Infektionen. Diese zeigen sich entweder im direkten Keimnachweis (z. B. Aspergillen oder Candidapilze) oder durch typische zytologische Veränderungen am Plattenepithel (z. B. Herpes simplex oder humane Papillomviren (HPV)).

- Bei den Präkanzerosen stammen die allermeisten Fälle vom Plattenepithel ab, wo sich leichte, mittlere und schwere Dysplasien sowie Zellen eines *Carcinoma in situ* abgrenzen lassen (Barnes et al. 2005). Denkbar sind aber theoretisch auch präkanzeröse Veränderungen am Drüsenepithel von Mündungen des Speichelgangsystems oder solche von melanozytären Zellen.
- Bösartige Veränderungen entsprechen ebenfalls in der großen Mehrzahl der Fälle Plattenepithelkarzinomen; sehr wenige Fälle sind Adenokarzinome oder maligne Melanome. Auch Lymphominfiltrate können in der Mundhöhle vorkommen.

Die Treffsicherheit der konventionellen oralen Zytologie ist allgemein bereits als gut bis sehr gut anzusehen (Tabelle 2). Die entsprechenden Werte für die Sensitivität betragen 76,8%-100%, für die Spezifität 68,4%-100%.

Quelle	Fallzahl	Sens.	Spez.	PPV	NPV
Remmerbach 2004	332	97,8%	100%	100%	98,1%
Remmerbach 2001	251	94,6%	99,5%	98,1%	98,5%
Driemel 2007	93	79%	100%	100%	92%
Maraki 2004	98	100%	97,4%		
Mehrotra 2008	94	76,8%	93,3%		
Koch 2011	186	95,2%	82,3%- 94,9%		
Gupta 2014	117	81,8%	68,4%		
Ma 2014	52	86,4%	90,0%	86,4%	90,0%

Tab. 2: Treffsicherheit der konventionellen oralen Zytodiagnostik in der Erkennung von Plattenepithelkarzinomen. Sens. = Sensitivität, Spez. = Spezifität, PPV und NPV = Positiver bzw. negativer Prädiktionswert

Bei solchen Prozentangaben muss allerdings darauf geachtet werden, dass sie auch von der Kategorisierung der Patientengruppen abhängen. Die oben genannten Diagnosen werden nämlich zunächst vier Diagnosegruppen zugeordnet (Böcking 1998), die in Tabelle 3 wiedergegeben sind. Für Untersuchungen zur Treffsicherheit ist nun mit entscheidend, wie die ca. 5% - 15% (Remmerbach et al. 2001, Remmerbach et al. 2004) ausmachenden Fälle mit den Diagnosen „zweifelhaft“ und „dringender Verdacht“ gewertet werden. Darauf soll in der Diskussion weiter eingegangen werden.

Ätiologisch zugrunde liegende Veränderung	Auswertung des Zellbildes	Diagnostische Interpretation
- Einfache Hyperkeratose - Infektiöse Ursachen - Erosionen / Ulzera	Keine Tumorzellen	negativ
- Leichte und mittlere Dysplasie des Plattenepithels	Tumorzellen nicht sicher auszuschließen	zweifelhaft
- Schwere Dysplasie und - <i>Carcinoma in situ</i> des Plattenepithels	Tumorzellen wahrscheinlich	dringender Verdacht
- Zellen eines Plattenepithelkarzinoms	Sicherer Nachweis von Tumorzellen	positiv

Tab. 3: Zusammenhang zwischen Läsionen, Tumor-bezogener Auswertung zugehöriger Zellbilder und diagnostischer Interpretation. Nicht berücksichtigt wurden hier „unzureichende“ Abstriche, also Präparate, die aus technischen Gründen oder wegen fehlender Zellen nicht ausgewertet werden können (Quote bei Mundhöhlenabstrichen: < 1%).

Die Notwendigkeit wiederum, diese beiden Gruppen unklarer Einschätzungen der Veränderungen neben den der klaren negativen bzw. positiven Diagnosen vorhalten zu müssen, ergibt sich daraus, dass die morphologischen Spektren von Kern- und Zellveränderungen, anhand derer man die Diagnostik durchführt, in gewissem Maße Überschneidungen aufweisen (Abb. 1).

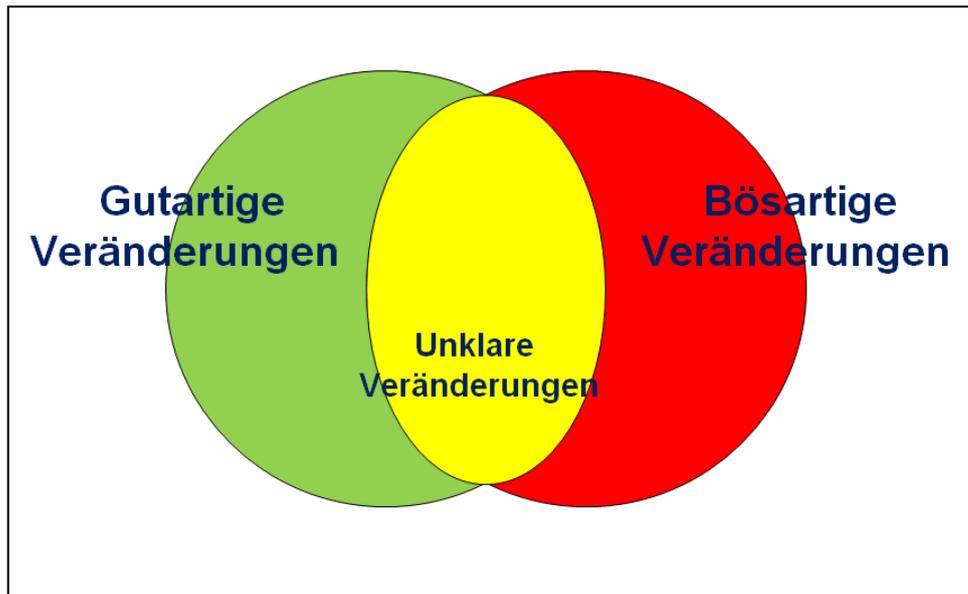


Abb. 1: Sich überschneidende Eigenschaften gutartiger (grün) und bösartiger Zellen (rot) führen dazu, dass diagnostisch nicht eindeutig zu interpretierende Zellbilder (gelb) entstehen (Biesterfeld 2013)

1.2. Adjuvante Methoden in der oralen Zytologie

Die Anwendung adjuvanter Methoden spielt am Schwerpunkt Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität in Düsseldorf eine bedeutende Rolle. Prinzipiell sind dort folgende Methoden etabliert:

- Konventionelle Sonderfärbungen (PAS-Reaktion, Eisenfärbung etc.)
- DNA-Bildzytometrie
- Immunzytochemie
- AgNOR-Histochemie
- Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FisH)
- PCR-basierte Verfahren zur Analyse von Hypermethylierungen von Tumorsuppressorgenen

Von diesen spielen konventionelle Sonderfärbungen keine große und die PCR-basierten Verfahren in der oralen Zytologie überhaupt keine Rolle, wohingegen die anderen bereits erprobt worden sind oder in Erprobung stehen. Die wesentlichste Anwendung stellt dabei aber die DNA-Bildzytometrie dar, während Immunzytochemie, FisH-Verfahren und AgNOR-Histochemie noch

keine größere Bedeutung erlangt haben. Im Folgenden sollen die vier Methoden, insbesondere bezogen auf ihre Aussagekraft in der oralen Zytologie, kurz vorgestellt werden.

DNA-Bildzytometrie

Die DNA-Bildzytometrie dient der Darstellung von numerischer Aneuploidie in Einzelzellen bzw. Zellpopulationen. Sie basiert auf der mikrodensitometrischen Quantifizierung des DNA-Gehaltes von ca. 250 - 300 morphologisch auffälligen Zellen und von ca. 25 - 30 normalen Eichzellen und kann an allen Präparatearten der Zytologie ebenso wie an nach Zellvereinzelnung hergestellten Ausstrichen von Zellen aus Paraffinblöcken nach Applikation einer DNA-stöchiometrischen Feulgen-Färbung angewandt werden. Die Methode ist heute im Rahmen eines internationalen Konsensus weitgehend standardisiert, vor allem auch die Auswertalgorithmen zur Detektion von DNA-Aneuploidie, welche auf der Darstellung einer aneuploiden DNA-Stammlinie als Nachweis einer chromosomalen abnormen klonalen Zellpopulation oder von Einzelzellaneuploidie beruhen (Haroske et al. 1998).

DNA-bildzytometrische Messungen werden vorwiegend in der Diagnostik prämaligener Veränderungen angewandt. Insgesamt ist, teilweise aus unserer Einrichtung heraus, teilweise von anderen Gruppen, ihre Eignung für den Einsatz in der Diagnostik wissenschaftlich abgesichert für präkanzeröse Läsionen der Bronchialschleimhaut (Auffermann und Böcking 1985), der Vulva (Evans et al. 1987), der Schleimhaut der Ektozervix (Nasiell et al. 1979, Chatelain et al. 1989) und bei der Epidermis (Biesterfeld et al. 1995). Bei drüsigen Veränderungen ist ihr diagnostischer Stellenwert belegt an Schleimhaut der Endozervix (Biesterfeld et al. 2001a), des Endometriums (Biesterfeld et al. 2001b) oder der Gallenwege (Krishnamurthy et al. 2001, Osterheld et al. 2005, Biesterfeld und Deacu 2009). Alle diese Untersuchungen halten den heutigen Anforderungen an die Methodik und die Meßpräzision (Art und Qualität des Bildanalysesystems / Vorbereitung der Proben aus zytologischen Ausstrichen oder nach Zellvereinzelnung aus Paraffinblöcken) stand.

Bezogen auf die Mundhöhle liegen ebenfalls bereits Erfahrungen vor, die belegen, dass die DNA-Bildzytometrie prinzipiell geeignet ist, die Diagnostik oraler Vorläuferläsionen von Mundhöhlenkarzinomen zu verbessern. So gelang es in einer hier in Düsseldorf durchgeführten Studie, die Sensitivität der Diagnostik von 91,3% nach konventioneller Zytologie auf 97,8% zu erhöhen und ebenfalls die Spezifität von 95,1% auf 100% zu steigern (Remmerbach et al. 2004). Etwa 30% der hinzugewonnenen geklärten Fälle repräsentierten dabei Tumoren in den Stadien pT1 und pTis (*Carcinoma in situ*), also Fälle mit deutlich herausgehobener Überlebensprognose der Patienten. Andere Studien bestätigten den Grundtenor der Aussage der genannten Studie (Maraki et al. 2004, Remmerbach et al. 2001) Ferner kamen Fälle vor, in denen sich im Gefolge einer aneuploiden DNA-Diagnose erst bis zu 2 ½ Jahre später morphologisch manifeste Veränderungen zeigten, so dass DNA-Aneuploidie auch eine Bedeutung als Indikator für prospektive Malignität hat (Remmerbach et al. 2001, Remmerbach et al. 2003) Ähnliches ist übrigens auch am Gebärmutterhals, einem strukturell sehr ähnlichen Epithel, bereits Ende der 80er Jahre belegt worden (Chatelain et al. 1989). Auch zur Abklärung von Metastasen der Halsregion ist die Methodik geeignet (Nordemar 2001).

In der hiesigen Zytopathologie werden DNA-bildzytometrische Messungen pro Jahr an ca. 700 Fällen angewandt, wobei sich klinisch relevante Ergebnisse in gut 650 Fällen zeigen lassen; nur ca. 50 Fälle kommen auch mit dieser Methode nicht zu einer weiterführenden diagnostischen Klärung.

Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FisH)

Die Darstellung von chromosomaler Aneuploidie erfolgt mit der FisH dadurch, dass durch ein Hybridisierungsverfahren eine oder mehrere, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte DNA-Sonden an die zuvor durch Hitzedenaturierung einzelsträngig gemachte DNA der Zellen gebunden werden. Bei dem sich anschließenden Mikroskopiervorgang werden mit einem Fluoreszenzmikroskop 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 man einer Einzelzelle einen aneuploiden Charakter zuweisen kann oder nicht. Diejenigen Sonden oder Sondenmixe, die heute industriell erhältlich sind, wie z.B. UroVysion oder LaVysion, sind an Studien erprobt, und man kann eine Interpretation der FisH anhand von Literaturerfahrungen vornehmen. Der Vorteil der FisH ist, dass die Interpretationsalgorithmen oft nur eine geringe Zahl von positiven Einzelzellen voraussetzen, so dass eine Aussage auch bei Vorliegen nur weniger auffälliger Zellen möglich ist.

Erfahrungen am Plattenepithel, insbesondere dem der Mundhöhle, sind bisher nur recht gering, und es ist derzeit noch nicht ersichtlich, dass sich eine bestimmte Sondenkonstellation als allgemein diagnostisch hilfreich herausstellte, anders beispielsweise als am Urothel, bei dem der inzwischen bereits einige Jahre eingeführte UroVysion-Test (drei Centromersonden an den Chromosomen 3, 13 und 17 sowie eine Sonde zur Testung der chromosomalen Region 9p21) gewerblich standardisiert erhältlich ist und breite Zustimmung erfährt (Schlomer et al 2010).

Die einzige Arbeit, die am oralen Plattenepithel eine diagnostische FisH-Anwendung versucht hat (Poh et al. 2012), verglich eine DNA-Sonde aus der Region des EGFR-Gens auf Chromosom 7 mit einer CEP 7-Sonde bzw. eine DNA-Sonde aus der Region des Cyclin D1-Gens auf Chromosom 11 mit einer CEP 11-Sonde an 22 histologisch dargestellten Fällen von später progredient verlaufenden Präkanzerosen mit 13 Fällen von nicht-progredient verlaufenden Präkanzerosen und kam zu befriedigenden, aber noch nicht diagnostisch nutzbaren Werten für Sensitivität und Spezifität zwischen 68,2% und 95,5% bzw. 69,2% und 84,6%.

Ansätze aus den 90er Jahren, die postulierten, dass am oralen Plattenepithel ggfls. an den Regionen 3p, 9p und 11q13 chromosomale Aberrationen zu erwarten wären (Califano et al. 1996), sind bislang nicht diagnostisch weiter verfolgt worden. Gleiches gilt für das Plattenepithel des Gebärmutterhalses, wo aus ersten Anwendungen der FisH-Methodik am Chromosom 3q (Heselmeyer et al 1996) keine diagnostisch einsetzbare Testentwicklung folgte.

Case number	Progressor	Non-progressor	Normal	Progressor vs. Non-progressor	
	22	13	20	All groups	
<i>EGFR</i>					
No gain (%)	4 (18%)	11 (84%)	Sensitivität:	18/22	81.9%
Low gain (%)	13 (59%)	1 (8%)	Spezifität:	11/13	84.6%
High gain (%)	5 (23%)	1 (8%)			
<i>CCND1</i>					
No gain (%)	1 (4%)	9 (70%)	Sensitivität:	21/22	95.5%
Low gain (%)	7 (32%)	2 (15%)	Spezifität:	9/13	69.2%
High gain (%)	14 (64%)	2 (15%)			
<i>CEP7</i>					
Disomy (%)	7 (32%)	11 (84%)	Sensitivität:	15/22	68.2%
Trisomy (%)	12 (54%)	1 (8%)	Spezifität:	11/13	84.6%
Polysomy (%)	3 (14%)	1 (8%)			
<i>CEP11</i>					
Disomy (%)	5 (23%)	10 (77%)	Sensitivität:	17/22	77.3%
Trisomy (%)	9 (41%)	1 (8%)	Spezifität:	10/13	76.9%
Polysomy (%)	8 (36%)	2 (15%)			

Abb. 2: Ergebnisse einer FisH-basierten diagnostischen Studie an oralen Präkanzerosen, modifiziert nach Poh et al. 2012 (Biesterfeld 2013)

Insgesamt werden am Schwerpunkt Cytopathologie in Düsseldorf derzeit ca. 120 FisH-Untersuchungen im Jahr durchgeführt, wobei sich diese auf die Abklärung urothelialer Läsionen bei Verdacht auf ein Tumorrezidiv eines Urothelkarzinoms bzw. auf die Diagnostik von Gallenwegs- und Pankreaskarzinomen, jeweils mit dem oben genannten UroVysion-Kit, sowie ferner auf den Nachweis einer 9p21-Deletion bei der Frage nach einem malignen Mesotheliom konzentrieren. Seltener wird eine Vierfach-Sonden-Kombination bei unklaren pulmonalen Veränderungen eingesetzt, das LaVysion-Kit.

Immunzytochemie

Immunologische Verfahren (Immunhistochemie, Immunzytochemie) sind aus der Pathologie nicht mehr wegzudenken. Vom Prinzip her funktionieren sie so, dass eine mehrschrittige Antikörperreaktion gegen ein zelleigenes Antigen, die üblicherweise im Farblosen abläuft, nach Applikation von Spülprozessen farbig umgesetzt wird und somit die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe auf dem morphologischen Präparat visualisiert werden. Hierzu dient in der Regel eine enzymatische Farbreaktion mit Peroxidase oder alkalischer Phosphatase; die übrigen Darstellungsmethoden (Immunfluoreszenz, Entwicklung durch

kolloidale Goldpartikel mit Silberpräzipitation, radioaktive Markierung) spielen keine wesentliche diagnostische Rolle.

Wichtige Anwendungen dienen dabei insbesondere der Charakterisierung und Typisierung manifester maligner Tumoren. So kann z. B. durch PSA-Positivität eine Knochenmetastase sicher einem metastasierten Prostatakarzinom zugeordnet werden oder durch Thyreoglobulin- und TTF-1-Positivität einem metastasierten Schilddrüsenkarzinom. Auch für Mammakarzinome (Mammoglobin, Lactalbumin, GATA-3) oder kolorektale Karzinome (cdx-2, CK20) gibt es recht charakteristische Marker. Auch in der Tumoridentifikation in Abgrenzung gegenüber Präkanzerosen können immunhistochemische und immunzytochemische Untersuchungen sinnvoll sein. Sicherlich sind heute mehr als 1000 verschiedene Antikörper kommerziell erhältlich und auch auf zytologische Präparate anwendbar.

Gerade innerhalb der Gruppe der plattenepithelialen Läsionen aber ist ihr Einsatz bislang kaum möglich, da sich zwischen gutartig-reaktiven, präkanzerösen und manifest malignen plattenepithelialen Zellpopulationen keine diagnostisch nutzbaren, ausreichend eindeutigen Unterschiede nachweisen lassen. Dies gilt sowohl für verschiedene Arten der 20 Typen umfassenden Zytokeratine als auch für Proliferationsmarker (MIB-1) oder Differenzierungsmarker wie p63. Ferner gibt es auch keine Marker, die bei einem manifesten Plattenepithelkarzinom Rückschlüsse auf zahlenmäßig wesentliche Primärorgane (Lunge, *Cervix uteri*, orale Regionen bzw. HNO-Regionen) erlauben.

Entsprechend gibt es auch in der Mundhöhle kein klares Einsatzgebiet für die Immunhistochemie. Dieses gilt auch für die in der gynäkologischen Zytologie kürzlich entwickelte und auch hier in Düsseldorf praktizierte CINtec-plus-Immunzytochemie (Loghavi et al. 2013, Yoshida et al. 2011, Kalof und Cooper 2007), bei der eine zytoplasmatische Färbung mit p16^{INK4α} (braun dargestellt) mit einer kernbindenden Färbung mit MIB-1 (rot dargestellt) als Doppelfärbung kombiniert wird. Auffällige Plattenepithelien mit eindeutiger Doppelmarkierung werden, auch wenn sie möglicherweise nur in sehr geringer Zahl vorkommen, als Beleg für höhergradige Dysplasien gesehen, wodurch die in Diskussion stehende Läsion dort als zur Progression neigende Veränderungen gesehen

wird. Zu übersetzen wäre dieses in die Gruppe „dringender Verdacht“ auf Tumorzellen oder zumindest als Nachweis einer auf zellulärer Ebene erfolgten malignen Transformation. Eine Übertragung der CINtec-plus-Färbung auf orale Abstriche führte aber erwartungsgemäß, da sie im Grunde Veränderungen am Plattenepithel nach HPV-Infektionen morphologisch visualisiert, bei uns und auch bei anderen Gruppen zu keinem klinisch umsetzbaren Ergebnis.

Von den derzeit bei uns ca. 700 immunzytochemisch weiter untersuchten Fällen haben entsprechend nur sehr wenige etwas mit einer plattenepithelialen Fragestellung zu tun.

AgNOR-Histochemie

Die dieser Anwendung biologische zugrunde liegenden Nukleolusorganisierenden Regionen („nucleolar organizer regions“, NOR) sind große rDNA-Loops, die auf den Satellitenregionen der p-Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 gelegen sind (Crocker et al 1989). Topographisch liegen sie unter Normalbedingungen der Zelle eng benachbart und bilden im Interphasekern den morphologisch erkennbaren Nukleolus. Seine Erkennbarkeit hat dabei mit dem unterschiedlichen Färbeverhalten der ribosomalen RNA (rRNA) gegenüber den Kernfarbstoffen, insbesondere Hämatoxylin zu tun. Von der Funktion her sind die NORs für die Transskription der rRNA verantwortlich und greifen somit in die Dynamik der Proteinbiosynthese entscheidend mit ein. Mit geeigneten, technisch nicht ganz einfachen, aber inzwischen standardisierten Versilberungstechniken (Ag = Abkürzung für Argentum, Silber) lassen sich NOR-assoziierte Proteine mikroskopisch als schwarze Dot-artige Komplexe (AgNOR) darstellen, deren Zahl, Einzelfläche und Gesamtfläche auf biologische Fragestellungen bezogen wird (Aubele et al 1994).

Ihre Zahl und Größe wurde als direktes Maß für die Zellzyklusdauer interpretiert. Zusammen mit der Rate proliferierender Zellen (dargestellt z.B. mit dem Marker MIB-1) liefern die AgNORs gemäß der sogenannten Brugal-Hypothese ein gutes Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit einer Zellpopulation, die sich bei Mammakarzinomen prognostisch nutzen ließ (Biesterfeld et al. 2001c). In der oralen Zytologie wurde zwar gezeigt, dass sich

Mundhöhlenkarzinome auf diese Weise mit hoher Sensitivität und Spezifität diagnostizieren lassen (Remmerbach et al. 2003, Remmerbach et al. 2004), dennoch hat sich diese Methode bisher nicht etablieren lassen - möglicherweise wegen ihres technischen Aufwandes und der schwierigen Auswertung, die viel morphologische Erfahrung des Untersuchers und außerdem eine mikroskopische Bearbeitung weit auseinander liegender auffälliger Einzelzellen in 100x-facher Objektivvergrößerung unter Ölimmersion verlangt und somit auch zeitlich nicht effektiv sein kann. Eine Kombination mit MIB-1 wurde unserem Wissen nach dort noch nicht versucht.

Das derzeit einzige Einsatzgebiet der AgNOR-Histochemie in der Zytodiagnostik liegt in ihrer Fähigkeit, mit großer Trennschärfe zwischen reaktiv verändertem und neoplastischem Mesothel zu unterscheiden (Onofre et al. 2008), so dass sie nicht nur zur Primärdiagnostik von Mesotheliomen, sondern bei dieser Fragestellung auch in BG-beauftragten Berentungsbegutachtungen im Falle einer beruflichen Asbestbelastung eingesetzt wird (Biesterfeld et al. 2014).

Molekulare Zytologie

Die Übertragung molekularer Verfahren auf die Zytologie befindet sich derzeit noch in den Anfängen, da in vielen Pathologien die molekulare Bearbeitung an histologischen Präparaten bevorzugt wird. Prinzipiell sind aber PCR-basierte Verfahren, beispielsweise zur Erregeridentifikation, zur Mutationsanalyse oder zur Erfassung einer Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen, möglich und werden in unserer Einrichtung in Kooperation mit den Instituten für Pathologie der Universitäten Köln, Düsseldorf und Mainz angewandt, wobei auch Verfahren der zytologischen Mikrodissektion zum Einsatz kommen. Anwendungen beziehen sich beispielsweise auf molekulare HPV-Analysen an gynäkologischen Abstrichen, auf die Erfassung einer Mutation im EGFR-Gen oder bei k-ras bei Lungenkarzinomen und Peritonealkarzinosen von Kolonkarzinomen oder auf die Identifizierung einer monoklonalen lymphoiden Population bei klinischem Lymphomverdacht. Wissenschaftliche Untersuchungen bei uns betreffen derzeit überwiegend Hypermethylierungsanalysen in Fortsetzung der Arbeiten der Arbeitsgruppe Grote (Grote 2006). Für die hier

vorliegende Thematik aus der oralen Zytologie spielen molekulare Anwendungen aber bislang keine diagnostische Rolle, weswegen auf sie nur cursorisch eingegangen werden sollte.

1.3. Das „abnorme Regeneratepithel“ als besonderes Problem der oralen Zytodiagnostik

Regeneration ist ein im Körper üblicher Mechanismus, der an dem Ziel teilhat, Läsionen jeglicher Art möglichst im Sinne einer *Restitutio ad integrum* zur Heilung zu bringen. Das Korrelat hiervon in epithelialen Strukturen ist das Regeneratepithel, das sowohl bei Plattenepithel, als auch bei Drüsenepithel auftritt und für das es durchaus gut definierte Kriterien gibt (Koss 2005). Zur Abgrenzung gegenüber Dysplasien werden gemäß den Vorschlägen der WHO überwiegend Kernkriterien herangezogen (Gale et al. 2005), darunter insbesondere Beurteilung der Kerngröße, der Kerngrößenvariabilität, der Kern-Plasma-Relation, der Chromatinverteilung und der Chromasie des Kernes sowie das eventuelle Auftreten von regulär bzw. atypisch erscheinenden Mitosen. Liegen gleichzeitig regenerative Veränderungen und geringe Hinweise auf Dysplasie vor, die man aber noch nicht abschließend als manifest suspekt beurteilen möchte, ist eine Einordnung der Veränderung als „abnormes Regeneratepithel“ und die Zuordnung der Diagnose in der Formenkreis der „zweifelhaften“ Veränderungen sinnvoll.

Das Auftreten von Regeneratepithel ist aus biologischer Sicht insgesamt eine gutartige Reaktionsform, die man häufig am Rand von Erosionen oder Ulzera in Abheilung bzw. als Residuum nach abgelaufener Erosion findet. Das Vorliegen von Kriterien zu seiner Erkennung und Abgrenzung darf aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass es auch hier keine 100%-ige Klarheit der Definition gibt, sondern dass stattdessen die in Abb. 1 gezeigte Überschneidung von Eigenschaften gutartiger und bösartiger Zellen „im Kleinen“ auch gilt und es somit zwischen solchem Regeneratepithel, das möglicherweise etwas „unruhiger“ erscheint, und dysplastischen Zellveränderungen interpretatorische Übergänge geben kann (Abb. 3).

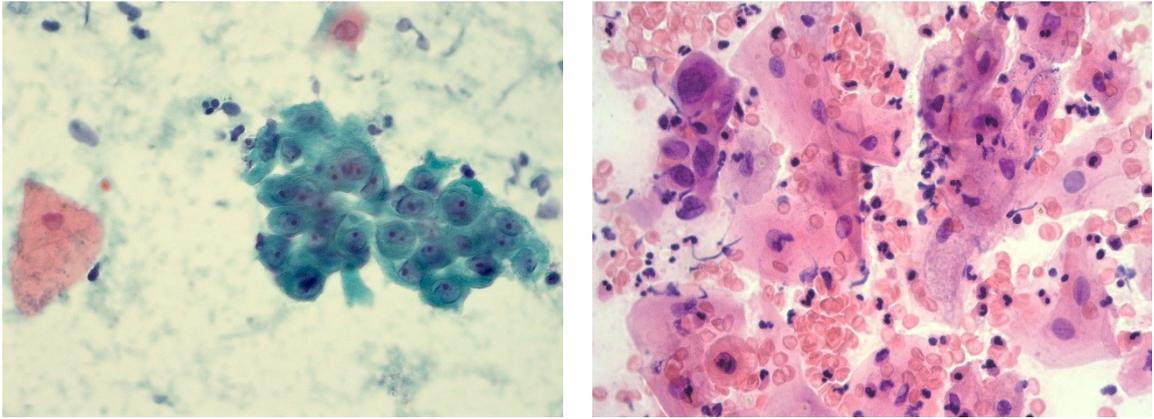


Abb. 3: Zytologische Präparate von Mundhöhlenabstrichen mit einem großen Verband von Regeneratepithel (linkes Bild) im Vergleich zu dysplastischen Epithelien (rechtes Bild, oberer linker Quadrant) (Biesterfeld 2013)

Aus diagnostischer Sicht ist das zytologisch unauffällige, blande Regeneratepithel in die Gruppe der „negativen Befunde“ (s. Tab. 2) einzuordnen, wohingegen das unklare Regeneratepithelien die Gruppe der „zweifelhaften Befunde“ gehört, da hier schon Zweifel, wenn auch nur minimaler Art, an seiner Gutartigkeit bestehen. Dies bedeutet, dass dieser Zuordnung eine durchaus bemerkenswerte Bedeutung zukommt, da die entsprechenden Patienten damit in eine gewisse Nachsorge überführt werden müssen, welche mindestens eine klinische Kontrolle des Abstrichgebietes, ggfls. kombiniert mit einer Kontrollzytologie oder gar Biopsie, umfassen sollte.

1.4. Problemstellung

Das Stellen einer Diagnose aus dem Formenkreis der "zweifelhaften" Veränderungen ist sowohl für den Pathologen, als auch für den Kliniker unbefriedigend, da man aus ihr keine klaren klinisch-therapeutischen Konsequenzen ziehen kann. Mit Hilfe von adjuvanten Methoden gelingt es allerdings, diverse zweifelhafte Fälle zu klären.

In dieser Arbeit soll eine solche Klärung für eine Diagnosegruppe aus der oralen Zytologie versucht werden, die ganz am unteren Ende auffälliger

Veränderungen steht, also zwischen "noch normal" und bereits "leichter Dysplasie". Die zur Klärung am Schwerpunkt Zytopathologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf hierzu vorgehaltene, geeignet erscheinende Methode ist die DNA-Bildzytometrie, die an oralen Abstrichen ohnehin häufig bei dysplastischen Veränderungen angewandt wird und auch, sofern die Zellzahl es zulässt, bei den hier zur Debatte stehenden Fällen mit „abnormem Regeneratepithel" zum Einsatz kommt. Ziel der hier vorliegenden Studie ist, retrospektiv die Ergebnisse von Zytodiagnostik und DNA-Bildzytometrie zu korrelieren und, soweit möglich, auf den klinischen Verlauf der Patienten zu beziehen. Dazu wurde eine Analyse der in den Jahren 2007, 2008 und 2009 untersuchten Fälle nach Art einer retrospektiven und epidemiologischen Follow-Up-Studie vorgenommen, die im Folgenden vorgelegt wird.

Zu der Studie wurde ein Ethikvotum von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf eingeholt (Studennummer 4890 vom 4.12.2014).

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Am Funktionsbereich Cytopathologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf sind zwischen dem 01.01.2007 und dem 31.12.2009 insgesamt 4634 Fälle von oralen Gewebeproben zur Untersuchung eingegangen. Aus dem Befundarchiv des dort eingesetzten Befundschreibungssystems „dc-pathos“ (Fa. dc-Systeme, Heiligenhaus) wurden diejenigen 114 Gewebeproben ermittelt, in welchen eine "zweifelhafte" Diagnose (s. unten) wegen „abnormer Regeneratepithelien" in der Mundschleimhaut als gravierendster Veränderung diagnostiziert wurden. Bei 84 dieser Proben wurde seinerzeit eine ergänzende DNA-bildzytometrische Messung durchgeführt. Bei 30 Fällen (= 26,3%) war dieses nicht möglich gewesen, weil die Zahl der auffälligen Zellen den Befunden zu gering erschienen war, als dass eine solche Messung (Mindestzellzahl: s. Kapitel 2.2) für aussichtsreich gehalten worden wäre, oder weil die Proben fehlerhaft fixiert wurden und somit keine Auswertung möglich war. Entsprechend waren diese Fälle rein zytologisch als „zweifelhaft“ abgeschlossen worden.

Die verbliebenen Fälle betrafen zu 41% Männer (mittleres Alter: 54,9+/- 13,97 [SD] Jahre) und zu 59% Frauen (mittleres Alter 61,2 +/- 13,95 [SD] Jahre).

2.2. Methoden

2.2.1. Konventionelle zytologische Diagnostik

Papanicolaou-Färbung

Die zytologischen Untersuchungen erfolgten an seitens der Kliniker abgenommenen und mit alkoholischem Spray (üblicherweise MERCKOFIX, Fa. Merck, Darmstadt) fixiert eingesandten Ausstrichpräparaten. Diese wurden im Eingangslabor routinemäßig einer automatisierten, d.h. in einem Färbematen (Shandon-Varistain 24-4) abgewickelten Papanicolaou-Färbung („Pap-Färbung“) gemäß dem allgemein üblichen Protokoll („Standard Operating Procedures“, SOP) unterzogen (Tab. 4) und mit einem konventionellen Medium eingedeckelt. Die Schritte 6 (Hämatoxylin), 14 (Orange II 2b) und 17 (Polychrom 3b) repräsentieren dabei die Farbstoffinkubationen.

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

Tab. 4: Ablauf der Papanicolaou-Färbung

Zytologische Beurteilung

Hieran schloss sich die konventionelle zytologische Diagnostik unter Anwendung der üblichen zytologischen Kriterien der oralen Zytologie an (Koss 2005). Wesentliche Zellveränderungen wurden dabei gemäß den SOPs mit

einem wasserfesten dünnen Filzstift auf dem Deckglas eingekreist und auf diese Weise dokumentiert. An der zytologischen Diagnostik waren sowohl Zytologieassistenten, als auch Pathologen beteiligt. Für die Zytologieassistenten galt dabei der berufstypische Grundsatz, dass sie alle Fälle, die sie als „nicht negativ“ abschließen würden, einem Facharzt vorlegen müssen, so dass alle Präparate dieser Serie abschließend fachärztlich gesehen worden sind. Allen Präparaten gleich war die Zuordnung der stärksten Zellveränderungen am Plattenepithel als „abnormes Regeneratepithel“ und die Formulierung einer Diagnose der Kategorie „zweifelhaft“.

Sofern die Befundung nach rein subjektiven Kriterien der Befunde ausreichend viele Zellen für eine adjuvante Beurteilung ergeben hatte, wurden die Präparate zur DNA-bildzytometrischen Messung weitergegeben.

2.2.2. DNA-Bildzytometrie

Feulgen-Färbung

Zunächst wurde mit einem handelsüblichen Kopierer vom Objektträger im Originalzustand, der auf den Einsendeschein gelegt war, eine Kopie angefertigt, die die mit wasserfestem Stift vorgenommenen punktförmigen oder kreisförmigen Markierungen dokumentieren sollte und gleichzeitig als Einsendeschein für die DNA-Bildzytometrie diente.

Danach wurde der Objektträger in eine Xylol-gefüllte Küvette eingestellt, damit sich das Deckglas lösen konnte. Dieser Vorgang konnte gelegentlich bis zu drei Tagen dauern. Nachdem das Deckglas abgelöst war, erfolgte die Feulgen-Färbung in einem mit einer heizbaren Küvette ausgestatteten und auch in einigen anderen Bauteilen speziell modifizierten Färbeautomaten Shandon-Varistain 24-4 (Chatelain et al. 1989) gemäß den SOPs der Einrichtung (Tab. 5).

Färbeschritt	Küvetteninhalt	Inkubationszeit
1	Xylol	15 min
2	99,5% Ethanol	5 min
3	96% Ethanol	5 min
4	10% gepuffertes Formalin	50 min
5	Aqua dest.	10 min
6	Aqua dest.	10 min
7	5N HCl (ca. 27°C)	60 min
8	Aqua dest.	2 min
9	Aqua dest.	2 min
10	Aqua dest.	2 min
11	Schiff'sches Reagenz	60 min
12	SO ₂ -Wasser	5 min
13	SO ₂ -Wasser	5 min
14	SO ₂ -Wasser	5 min
15	Aqua dest.	1 min
16	Aqua dest.	1 min
17	70% Ethanol	10 min
18	96% Ethanol	10 min
19	99,5% Ethanol	10 min
20	Xylol	15 min

Tab. 5: Ablauf der Feulgen-Färbung

Die bereits 1924 entwickelte Feulgen-Färbung (Feulgen und Rossenbeck 1924), die formal einer histochemischen Reaktion entspricht, läuft, modifiziert und standardisiert nach Graumann(1953), in zwei Reaktionsschritten ab. Im ersten Schritt erfolgt durch eine saure Hydrolyse mit 5N HCl über 55 Minuten bei einer konstanten Temperatur von ca. 27 °C an der DNA die Zerstörung der glykosidischen Bindung der Purinbasen an der C1-Stelle, so dass eine freie Aldehydgruppe entsteht. Diese kann man dann im zweiten Schritt der Feulgen-Färbung, der Reaktion mit der aromatischen Aminogruppe des Schiff'schen

Reagenz, als rosaroten Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 570nm darstellen (von Hörmann et al. 1958). RNA wird dabei nicht angefärbt, weil hier die Spaltung der Glykosidbindung an der C1-Stelle nicht möglich ist. Ebenfalls nicht angefärbt werden Histone und andere Proteine.

Die Feulgen-Färbung kann somit als eine anerkannte stöchiometrische Methode zur quantitativen DNA-Darstellung gelten.

Nach Abschluss der Färbung erfolgte die manuelle Eindeckelung der Präparate mit einem konventionellen Medium für die Histologie und Zytologie, z. B. VitroClud, und einem üblichen Deckglas. Vom DNA-bildzytometrischen Einsendeschein wurden die aufkopierten Markierungen auf das neue Deckglas manuell übertragen. Danach wurde das Präparat bis zur Messung dunkel bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

In Abb. 4 ist ein repräsentatives Beispiel für eine Feulgen-Färbung nach vorheriger Papanicolaou-Färbung wiedergegeben; eine Entfärbung der Papanicolaou-Färbung vor der Umfärbung nach Feulgen ist nicht notwendig, da die Farbstoffe der Erstfärbung spätestens in der 5-normalen Salzsäure in Lösung gehen.

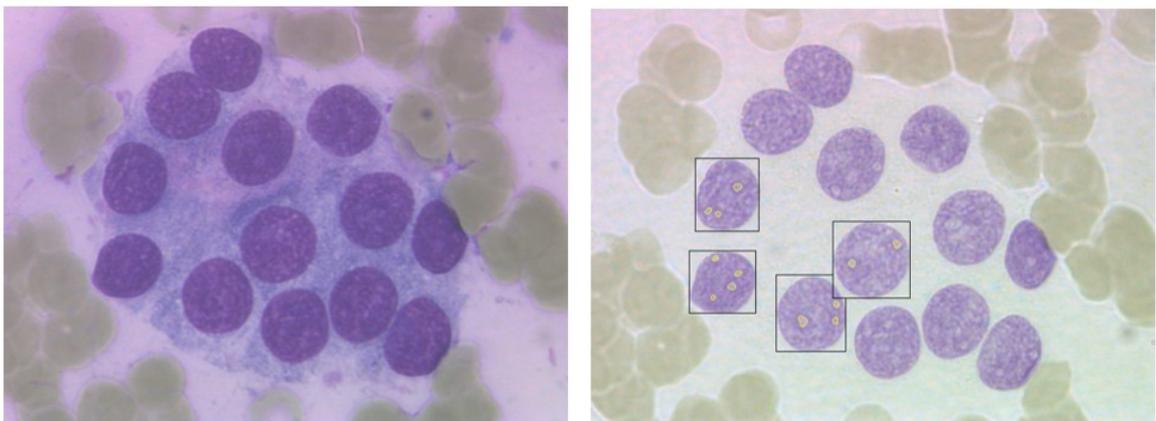


Abb. 4: Zytologie eines Abstrichpräparates nach Papanicolaou-Färbung (links) und nach Feulgen-Färbung (rechts); die Identifikation identischer Zellen ist nach der Umfärbung unschwer möglich. Im vorliegenden Beispiel können alle Zellen gemessen werden, da keine Überschneidungen mit anderen kernhaltigen Zellen oder Erythrozyten vorliegen (Biesterfeld 2013).

DNA-bildzytometrische Messung

Die in dieser Studie ausgewerteten DNA-bildzytometrischen Messungen wurden mit einem AutoCyte-System der Firma Roche bzw. einer MotiCyte DNA-Workstation der Firma Motic, die verschiedene Generationen von DNA-Zytometern repräsentieren, durchgeführt (Abb. 5), wobei beide Messmethoden als gleichwertig gelten können (nicht veröffentlichte Daten des Schwerpunktes Zytopathologie). Alle Messungen erfolgten in 40x-Objektivvergrößerung an auf einen Monitor übertragenen mikroskopischen Bildern und wurden mit der jeweiligen Gerätesoftware des PC-basierten TV-Bildanalyse-Systems ausgeführt. An beiden Systemen werden die ESACP-Konsensus-Anforderungen an DNA-bildzytometrische Messeinrichtungen (Haroske et al. 1998) eingehalten.



Abb. 5: Mess-Systeme für die DNA-Bildzytometrie: Roche AutoCyte-System (links) und MotiCyte DNA-Workstation (rechts) (Biesterfeld 2013)

Pro Messung werden ca. 300 auffällige Epithelien („Analysezellen“), üblicherweise aus zuvor markierten Bereichen (s. oben), und ca. 30 normale Zellen („Referenzzellen“, beispielsweise normale Epithelien, Fibroblasten, Lymphozyten) aus ihrer Umgebung untersucht. Die Zellkerne werden nach vorheriger Wahl des Zelltyps vom Untersucher mit der Maus angeklickt. Nach automatisierter Bildung einer durch den Untersucher korrigierbaren Maske wird die integrierte optische Dichte der von der Maske umschlossenen Pixel bestimmt. Der Stand der Messung kann anhand des Monitorbildes, welches das

Livebild, einen Teil der Bildgalerie und die Datenverteilung zum aktuellen Stand der Messung zeigt (Abb. 6), verfolgt werden. Nach Abschluss der Messungen wird, sofern die internen Qualitätsmerkmale des Systems (Messwertbreite der Referenzzellen in CV vom Mittelwert; Unabhängigkeit der Messwerte von der Kernfläche etc.) eingehalten sind, der mittlere Messwert der Referenzzellen als 2c („diploider Standard“) gesetzt und hierauf basierend jeder einzelnen Analysezelle ein Wert in c zugeordnet. Alle gemessenen Zellen werden dabei in eine Bildgalerie eingepflegt (Abb. 7).

Nach Abschluss der Messung überprüft der Untersucher anhand der Bildgalerie die Referenz- und die Analysezellen auf die Richtigkeit der Zuordnung und auf eine fehlerfreie korrekte Erfassung. Danach wird das Messergebnis unter Anwendung der von der ESACP („European Society of Analytical and Cellular Pathology“) anerkannten DNA-zytometrischen Variablen (s. Kapitel 2.2.2) in einer versandfähigen Befundseite, die auch das interpretatorisch wichtige DNA-Histogramm (s. unten Abb. 7) enthält, und zwei Seiten nach Arten eines Messprotokolls dokumentiert und abgespeichert.

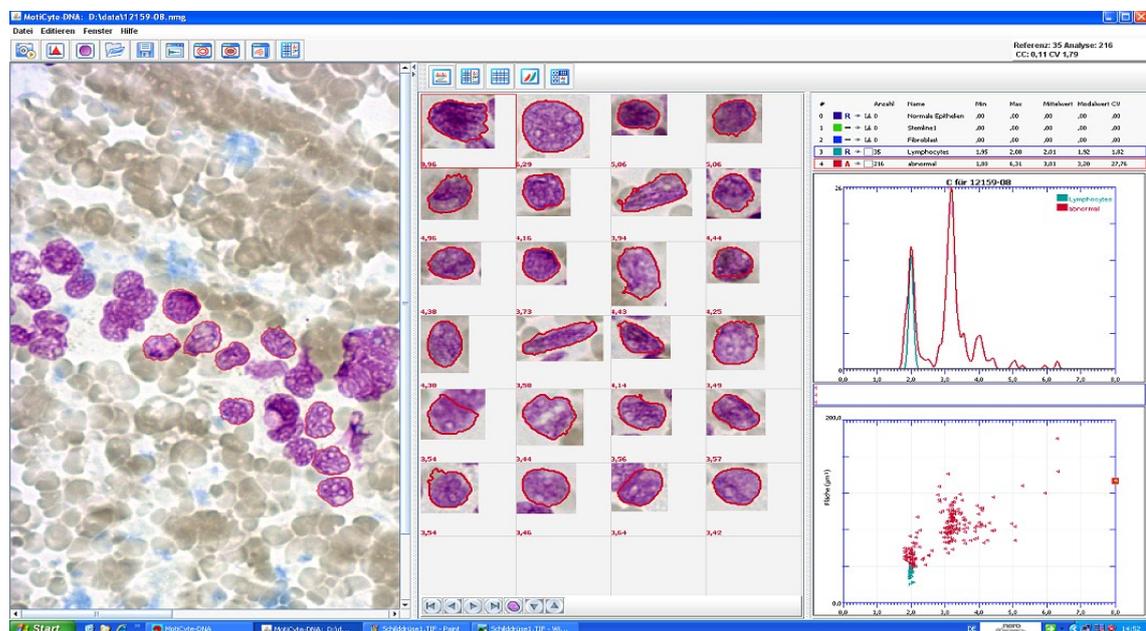


Abb. 6: Monitordarstellung eines aktuellen Messvorgangs. Links Darstellung des mikroskopischen Livebildes, in der Mitte Bildgalerie der letzten 12 erfassten Objekte, rechts Diagrammdarstellung der DNA-Messwertverteilung (oben) und Darstellung der Beziehung von DNA-Messwerten und Kernflächen (Biesterfeld 2013).

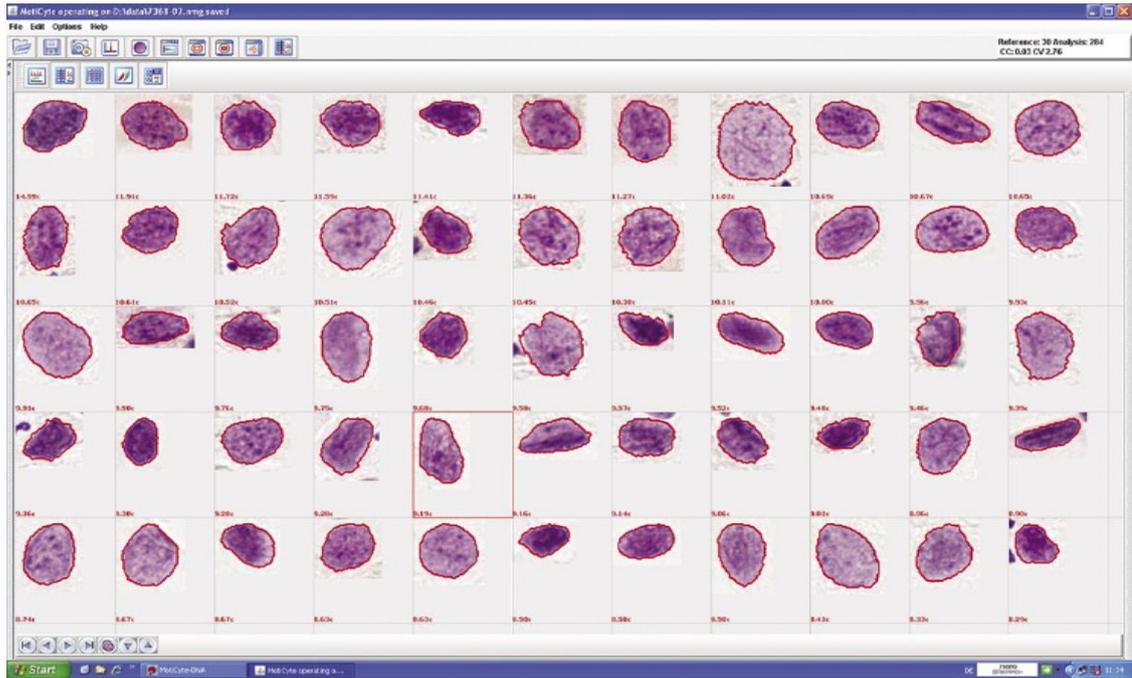


Abb. 7: Monitordarstellung einer 55 Messzellen umfassenden Seite der Bildgalerie (Biesterfeld 2013)

DNA-bildzytometrische Variable

Für vergleichbare objektive Ergebnisse ist es wichtig, festgelegte Standards für die Interpretation der DNA-Verteilungshistogramme zu verwenden. Diese betreffen sowohl die Interpretation von Aneuploidie, als auch die Definition verschiedener Indizes und Algorithmen zur Beschreibung von DNA-Verteilungsmustern. Auf der ESACP-Konsensuskonferenz in Oslo wurden 1997 diverse Variablen empfohlen bzw. zugelassen (Haroske et al. 1998), von denen im Folgenden die dort gefasste gültige Definition der in dieser Arbeit verwendeten Größen modifiziert nach Girmes (2009) dargestellt werden sollen.

DNA-Stammlinie

Der bereits 1963 geprägte Begriff der DNA-Stammlinie (Seidel und Sandritter 1963) beschreibt die Lage der G_0/G_1 -Fraktion einer Zellpopulation und sollte mit einer (kleineren) Zellpopulation mit einem doppelt so hohen DNA-Gehalt (G_2/M -Fraktion) einhergehen. Festgelegt wurde im ESACP-Protokoll, dass eine DNA-Stammlinie im Histogramm um ein signifikantes lokales Maximum, das kein Duplikat eines anderen Peaks darstellen darf, definiert werden soll. Die

Festlegung darüber, wo im konkreten Fall eine DNA-Stammlinie liegt, trifft letztendlich subjektiv der Untersucher, der im DNA-Histogramm eine Umgebung festlegt, innerhalb derer dann die DNA-Einzelwerte zu einem DNA-Stammlinienwert gemittelt werden.

„Exceeding Events“ (EE) bzw. „Exceeding Rates“ (ER)

Die „Exceeding Events“ (EE) Werte geben an, wie viele Zellen einen bestimmten absoluten DNA-Wert, z.B. 5c („5cEE“) etc., überschreiten (Ploem-Zaijer et al. 1979). Einige der zahlreichen gemachten Vorschläge zu EEs wie der 3cEE oder der 7cEE sind eher willkürlicher, virtueller Natur. Hinter den Vorschlägen des 2,5cEE, des 5cEE und des 9cEE stehen allerdings durchaus biologisch begründete Vorstellungen, auf diese Weise Werte zu quantifizieren, die die Grenzen für Diploidie (2c), Tetraploidie (4c) oder Oktoploidie (8c) sicher überschreiten; sie stammen aus den 80er Jahren, in denen man noch breitere Messfehlermargen berücksichtigen musste und könnten heute theoretisch enger gefasst werden (z.B. „2,25cEE“ etc.) - solche Modifizierungen haben sich aber nicht durchgesetzt, insbesondere da man die Vergleichbarkeit von Studien erhalten wollte. Gibt man ihre Zahl nicht als Rohwert (z.B. „5cEE = 6), sondern als Prozentsatz der Analysezellpopulation an, so entsteht die zugehörige „Exceeding Rate“ (ER) (z.B. „5cER = 2%“ bei 300 Analysezellen). Ihr Vorteil liegt in der besseren Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Fällen bzw. verschiedenen Studien, die nicht unbedingt mit identischer Anzahl von Analysezellen durchgeführt worden sind. Aus den EE- und ER-Parametern leiten sich Optionen zur DNA-bildzytometrischen Einzelzellinterpretation ab, die von der Überlegung ausgeht, dass DNA-Aneuploidie auch dann vorliegt, wenn DNA-Einzelwerte auftreten, die im entsprechenden Gewebe nicht vorkommen dürfen. Bei diversen Geweben ist dieses mithilfe des 5cEE möglich, der Zellen charakterisiert, die signifikant ober des 4c-Wertes der normalen G₂/M-Phase liegen. Bei Plattenepithelien, wie sie Gegenstand dieser Arbeit sind, müssen aber Aspekte der euploiden Polyploidisierung (Biesterfeld et al. 1994), viraler Infektionen (z. B. HPV) sowie vorangegangener Zytostatika- oder Strahlentherapie bedacht werden. Deswegen wird bei plattenepithelialen Läsionen, die bis 8c polyploidisieren können, lediglich der 9cEE bzw. der 9cER diagnostisch herangezogen, nicht aber 5cEE oder 5cER.

Diagnostische Interpretation DNA-zytometrischer Messungen

In der hier durchgeführten Studie wurde DNA-Aneuploidie diagnostiziert, wenn Stammlinienaneuploidie oder Einzelzellaneuploidie gemäß den ESACP-Konventionen vorlag.

Stammlinienaneuploidie

DNA-Stammlinien werden als aneuploid angenommen, wenn sie außerhalb des normalen Wertes von $2c$ oder seiner potenzierten Vielfachen $\pm 10\%$ liegen, also außerhalb von $1,8c - 2,2c$ bzw. außerhalb von $3,6c - 4,4c$ etc. In Abb. 8 sind zwei repräsentative DNA-Histogramme wiedergegeben.

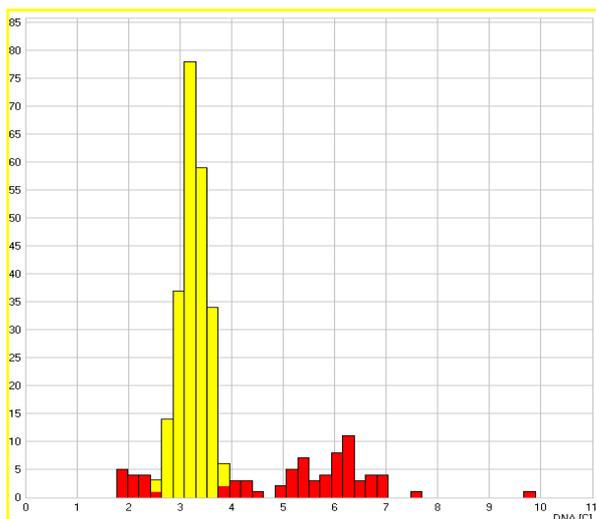
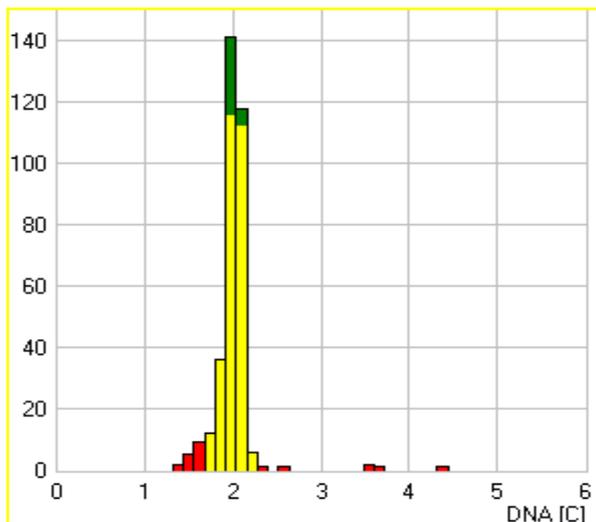


Abb. 8: Repräsentative DNA-Histogramme mit gelber Unterlegung der Stammlinie. Oben: DNA-Stammlinie bei $2c$, kein Hinweis auf Aneuploidie. Unten: Eindeutige Aneuploidie bei einer DNA-Stammlinienploidie von $3,18c$.

Einzelzellaneuploidie

Bei Vorliegen von Meßwerten oberhalb von 9c wurde von Einzelzellaneuploidie ausgegangen ($9cEE > 0$).

Verdacht auf Aneuploidie

Ein Verdacht auf Aneuploidie wurde geäußert, wenn sich eine aus diagnostischer Erfahrung auffälliger, aber nicht für DNA-Aneuploidie beweisender Befund zeigte. Hierzu gehören breite Verdopplungsgipfel bzw. Stammlinien im tetraploiden Bereich (3,6c - 4,4c) bzw. eine Bildung angedeuteter kleiner Wertehäufungen im aneuploiden Bereich, die man noch nicht als eindeutige aneuploide Stammlinie interpretieren möchte. Letzten Endes ist diese Interpretationsart nicht eindeutig definiert und greift überwiegend auf die Erfahrung der Befunder zurück.

2.2.3. Ermittlung des klinischen Follow-Up

Die aus den Befunden und den in unserer EDV dokumentierten Stammdaten der Patienten (Name, Geburtsdatum, Adresse, einsendender Zahnarzt, klinische Angaben [Lokalisation der Entnahme, klinisches Bild etc.], zytologische Diagnosen) wurden in eine Excel-basierte Datenbank überführt.

Zur Ermittlung des Follow-Up wurde zum einen ein Fragebogen entwickelt, der auf der übernächsten Seite zur besseren Abgrenzung zum übrigen Text blau wiedergegeben ist (Abb. 9, S. 27) und der an alle auf dem Einsendeschein genannten Behandler, also die einsendende Praxis / Klinik und an ggfls. mit genannte Hausärzte und Hauszahnärzte versandt wurde. Wurde unter 7. eine entsprechende Angabe getätigt, so wurde ein weiterer Versand eines neuen Fragebogens an den dort Genannten veranlasst.

Trotz mehrfacher Einsendung der Fragebögen sowie telefonischer als auch Nachfrage per E-Mail kamen nur 18 (= 24,0%) Fragebögen zurück. Von diesen waren nur neun ausreichend beantwortet und trugen zur weiterführenden Datenauswertung bei. Von den übrigen wurde bei fünf Fragebögen nur die

Lokalisation der Probenentnahme angegeben. Bei vier Fragebögen waren keine weiterführenden Antworten eingetragen.

Insgesamt konnten auf diese Weise zufriedenstellende Angaben zu lediglich neun Proben (von $n = 114$) der 75 Patienten (= 7,9%) ermittelt werden; auf diese Zahl beziehen sich die in Kapitel 3 dargestellten Ergebnisse, die nach Überführung der Datenbank in eine anonymisierte Form errechnet wurden.

Zum anderen stand das Befundarchiv des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (Leiter: Prof. Dr. med. Gabbert) zur Verfügung. Zu allen Patienten wurden hier ein Datenabgleich durchgeführt und etwaig vorhandene Befunde daraufhin überprüft, ob sie eine Beurteilung einer Probe von einer vorherigen zytologischen Entnahmestelle der Patienten repräsentierten. Letztendlich war dieses bei weiteren acht Patienten der Fall.

2.2.4. Statistische Untersuchungen

Die statistischen Untersuchungen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt. Die biometrischen Grunddaten umfassten die üblichen Variablen der deskriptiven Statistik, d.h. Median, Mittelwert, Varianz und Standardabweichung. Ferner wurden zur Analyse von statistischen Zusammenhängen zwischen Untergruppen bei kategorisierten Größen der Chi²-Test und bei stetigen Größen der t-Test angewandt. Statistische Signifikanz wurde jeweils für ein p-Niveau von $p < 0.05$ angenommen, entsprechend einer Wahrscheinlichkeit von $< 5\%$, die Nullhypothese irrtümlich abzulehnen.

Klinische Studie „DNA-zytometrische Diagnostik an Regeneratepithel der Mundschleimhaut“

Daten zum Patienten

Name des Patienten:

Geb.-Datum:

Eingangsnummer:

Datum der zytologischen Befundung:

Lokalisation der Entnahme lt. Einsendeschein:

Unsere Fragen

1. Wann bestand Ihr letzter Kontakt zum Patienten?
2. Bitte überprüfen und ggfls. präzisieren Sie die Lokalisation der Entnahme.
3. Welche Grunderkrankung lag der untersuchten Läsion zugrunde?
4. Wie verhielt sich der klinische Verlauf der Läsion (Abheilung / Persistenz / Progredienz etc.)?
5. Wurden eine zytologische Kontrolluntersuchung oder einer histologische Untersuchung der identischen Läsion vorgenommen (wenn ja, bitte Befund beilegen bzw. kurz wiedergeben)?
6. Lagen seinerzeit weitere Schleimhautläsionen der Mundhöhle vor oder wurden seitdem neue diagnostiziert?
7. Welche weiteren Ärzte oder Zahnärzte könnten bei Bedarf weitere Auskunft über den Patienten geben?

BITTE VERWENDEN SIE FÜR DIE RÜCKSENDUNG DIESES BOGENS DAS ADRESSFELD AUF DER RÜCKSEITE, DAS FÜR EINEN FENSTERUMSCHLAG POSITIONIERT IST.

SIE KÖNNEN DEN BOGEN AUCH PER FAX AN UNS SENDEN (0211-8118402).

gez. Prof. Dr. S. Biesterfeld / ZÄ A.-M. Leschik

Abb. 9: Fragebogen zur Ermittlung des klinischen Follow-Up; dieser wurde einem Anschreiben beigelegt, in welchem Aufbau und Zweck der Studie erläutert wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Zusammensetzung der Patientengruppe

Ursprünglich umfasste das Patientenkollektiv 110 Personen, bei denen 374 Proben entnommen worden sind (Abb. 10). Lediglich die 114 Proben, die wegen „abnormen Regeneratepithels“ als „zweifelhaft“ eingestuft worden waren, wurden im Folgenden berücksichtigt, synchron an anderen Entnahmeregionen erhobene Diagnosen der Kategorien „negativ“, „dringend verdächtig“ und „positiv“ hingegen nicht. Bei 30 Proben konnte aufgrund von technischen Problemen, insbesondere bei zu starken Zellüberlagerungen oder zu deutlichen Lufttrocknungsartefakten bzw. aufgrund zu geringer Zellzahl keine DNA-bildzytometrische Messung durchgeführt werden (Abb. 11). Zur Auswertung kamen somit endgültig 84 Proben von 75 Patienten (vgl. Tab. 6).

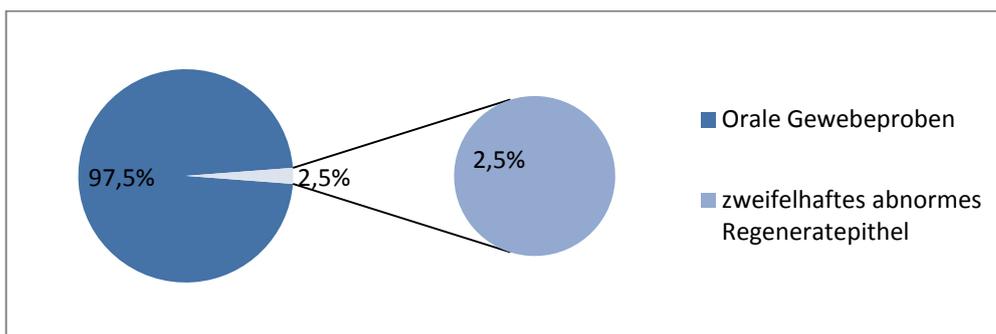


Abb. 10: Graphische Darstellung der Diagnosen mit "abnormen Regeneratepithel" der Mundschleimhaut in Bezug auf alle oralen Gewebeprobe

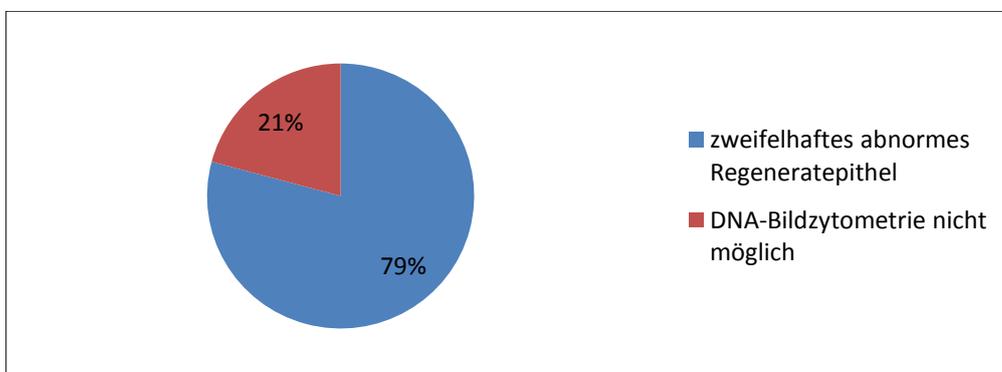


Abb. 11: Anteile für DNA-bildzytometrische Messungen geeigneter bzw. nicht geeigneter Präparate

Fall	Patient	Entnahmestelle	Ergebnis der DNA-Zytometrie	Histologie	Zeitraum zwischen Zytologie und Histologie	Zahl der Eichzellen	Zahl der Analysezellen	Kommentar zur DNA-Zytometrie
1	1	Gaumen rechts	nicht aneuploid			33	107	euploide Polyploidisierung
3	2	Mundboden	nicht aneuploid			30	276	
5	2	Mundboden, Übergang Zunge	Verdacht auf Aneuploidie	Schwere Dysplasie und Plattenepithelkarzinom G1	10 Tage	30	264	peritetraploid
6	2	Mundboden regio 34	aneuploid.	Plattenepithelkarzinom G1	10 Tage	41	256	
13	2	Mundboden	aneuploid.	Tumorfrei	20 Tage	41	313	
23	2	Mundboden rechts	nicht aneuploid	mittlere Dysplasie und Plattenepithelkarzinom G2	13 Tage	37	262	peritetraploid
24	3	4.Quadrant vestibulär	nicht aneuploid			40	227	
25	4	Wange links	Verdacht auf Aneuploidie			30	188	peritetraploid
26	4	Wange links	nicht aneuploid			35	220	euploide Polyploidisierung
28	5	---	nicht aneuploid			44	202	
30	6	Vestibulum „relativ hinten“	Verdacht auf Aneuploidie			40	343	peritetraploid
37	7	regio 44 sublingual	nicht aneuploid			34	226	peritetraploid
44	8	---	nicht aneuploid			31	217	euploide Polyploidisierung
46	9	---	nicht aneuploid			34	101	euploide Polyploidisierung
56	10	Zungenrand rechts	aneuploid			38	153	
57	11	Zungenrand rechts	aneuploid			37	304	
58	12	---	nicht aneuploid			39	111	
59	13	Gaumen	nicht aneuploid			39	151	euploide Polyploidisierung
60	14	Oberkieferfront	nicht aneuploid			43	205	euploide Polyploidisierung

Tab.:6: Synoptische Datenübersicht einzeltig entnommener zytologischer Proben und klinischer Verläufe aller 75 Patienten

Fall	Patient	Entnahmestelle	Ergebnis der DNA-Zytometrie	Histologie	Zeitraum zwischen Zytologie und Histologie	Zahl der Eichzellen	Zahl der Analysezellen	Kommentar zur DNA-Zytometrie
61	14	Unterkieferfront	nicht aneuploid			39	202	euploide Polyploidisierung
64	15	Unterkiefer Regio33-36 lingual	aneuploid			40	301	
65	16	Zungenrand rechts	nicht aneuploid			37	152	
69	17	Wange links	nicht aneuploid			38	135	
70	18	Gaumen	Verdacht auf Aneuploidie			32	110	
71	19	regio 31 sublingual	aneuploid			30	307	
72	20	regio 16	nicht aneuploid			32	104	euploide Polyploidisierung
78	20	Planum buccale rechts	nicht aneuploid			32	93	
83	21	Zungenunterseite links	Verdacht auf Aneuploidie			38	243	
96	23	---	nicht aneuploid			30	126	euploide Polyploidisierung
97	24	Wange regio 47-48	nicht aneuploid			32	135	euploide Polyploidisierung
100	25	retromolar rechts	nicht aneuploid			30	100	euploide Polyploidisierung
104	26	Unterlippe links	aneuploid			35	210	
106	26	Mundwinkel rechts	aneuploid			30	202	
114	26	Mundwinkel rechts außen	---					nicht möglich
133	26	Lippe innen	---					nicht möglich
135	27	weicher Gaumen rechts	nicht aneuploid			39	230	
136	28	harter Gaumen	nicht aneuploid			38	157	euploide Polyploidisierung
137	29	harter Gaumen	nicht aneuploid			43	304	euploide Polyploidisierung

Tab.:6 (Fortsetzung): Synoptische Datenübersicht einzeitig entnommener zytologischer Proben und klinischer Verläufe aller 75 Patienten

Fall	Patient	Entnahmestelle	Ergebnis der DNA-Zytometrie	Histologie	Zeitraum zwischen Zytologie und Histologie	Zahl der Eichzellen	Zahl der Analyse-zellen	Kommentar zur DNA-Zytometrie
138	30	Gaumen	nicht aneuploid			35	139	euploide Polyploidisierung
140	31	Wange	nicht aneuploid			37	121	
141	31	Umschlagfalte rechts	nicht aneuploid			30	155	
144	31	Umschlagfalte links	---					nicht möglich
147	32	---	nicht aneuploid			44	64	
149	33	Unterkieferfront	nicht aneuploid			39	126	
155	34	Regio17	nicht aneuploid			37	115	
158	35	Zungenrand hinten links	nicht aneuploid			41	214	euploide Polyploidisierung
159	35	Zungenrand vorne links	---					nicht möglich
164	35	Mundwinkel rechts		leichte Dysplasie	zeitgleich			nicht möglich
168	36	regio 47 crestal	aneuploid			30	301	
169	37	Gaumen	nicht aneuploid			39	258	peritetraploid
172	38	Planum buccale rechts	nicht aneuploid			30	179	peritetraploid
173	39	Oberkiefer links	nicht aneuploid			35	263	euploide Polyploidisierung
174	40	Zungenunterseite links	nicht aneuploid			35	223	
178	41	regio 37	nicht aneuploid			30	73	euploide Polyploidisierung
182	42	regio 22	nicht aneuploid			41	69	
184	43	Wange links	nicht aneuploid			35	157	peritetraploid
186	44	Alveolarkamm rechts	nicht aneuploid			56	271	euploide Polyploidisierung

Tab.:6 (Fortsetzung): Synoptische Datenübersicht einzeitig entnommener zytologischer Proben und klinischer Verläufe aller 75 Patienten

Fall	Patient	Entnahmestelle	Ergebnis der DNA-Zytometrie	Histologie	Zeitraum zwischen Zytologie und Histologie	Zahl der Eichzellen	Zahl der Analyse-zellen	Kommentar zur DNA-Zytometrie
188	45	regio 46	nicht aneuploid			46	212	
198	47	Gaumensegel links	nicht aneuploid			41	111	
200	48	Regio38	nicht aneuploid			31	50	
207	50	Wange rechts	nicht aneuploid			39	163	euploide Polyploidisierung
208	50	Wange rechts	nicht aneuploid			42	172	euploide Polyploidisierung
209	50	Oberlippe	nicht aneuploid			40	141	
210	51	Zungenrand rechts	aneuploid			38	304	
212	52	Planum buccale links	---	Schwere Dysplasie und Plattenepithelkarzinom G2	20 Tage			nicht möglich
213	52	Regio 33-35	---	mittlere Dysplasie bei Leukoplakie	20 Tage			nicht möglich
216	52	Mundboden Regio 41	nicht aneuploid					Nicht möglich
218	53	regio 12-13 vestibulär	---					nicht möglich
219	53	Gingiva regio 44-45	---					nicht möglich
224	53	Gingiva regio 13	---					nicht möglich
225	53	Oberkieferfront regio 22	---	Tumorfrei	zeitgleich			nicht möglich
230	53	Unterkieferfront Regio 42	---	Tumorfrei	zeitgleich			nicht möglich
231	53	regio 12-13 marginal						nicht möglich
232	53	Oberkieferfront	nicht aneuploid			55	169	

Tab.:6 (Fortsetzung): Synoptische Datenübersicht einzeitig entnommener zytologischer Proben und klinischer Verläufe aller 75 Patienten

Fall	Patient	Entnahmestelle	Ergebnis der DNA-Zytometrie	Histologie	Zeitraum zwischen Zytologie und Histologie	Zahl der Eichzellen	Zahl der Analyse-zellen	Kommentar zur DNA-Zytometrie
233	53	Unterkieferfront						nicht möglich
234	53	Umschlagfalte Oberkiefer	nicht aneuploid			33	289	euploide Polyploidisierung
236	54	---	nicht aneuploid			43	105	
237	55	Unterkieferkamm	nicht aneuploid			40	259	peritetraploid
243	57	Zungenrand rechts	Verdacht auf Aneuploidie			31	201	
244	58	Zungenrand links	aneuploid			39	307	
245	59	regio 17	nicht aneuploid			34	162	euploide Polyploidisierung
247	60	Zungenrand links	aneuploid			51	152	
252	61	regio 33 lingual	nicht aneuploid			40	113	euploide Polyploidisierung
256	62	retromolar rechts	nicht aneuploid			48	43	
264	63	Mundboden rechts	aneuploid			34	311	
268	64	Gaumen rechts	nicht aneuploid			39	124	euploide Polyploidisierung
269	64	Gaumen links	nicht aneuploid			53	115	euploide Polyploidisierung
270	65	Zungenrand links	aneuploid			41	325	
277	66	Mundboden rechts	nicht aneuploid			38	179	euploide Polyploidisierung
278	66	Gingiva Oberkiefer rechts	aneuploid			32	187	
279	67	regio 41 lingual	nicht aneuploid	mittlere Dysplasie und Plattenepithelkarzinom G2	zeitgleich	43	198	euploide Polyploidisierung
282	67	regio 41-43 vestibulär	nicht aneuploid	mittlere Dysplasie und Plattenepithelkarzinom G2	zeitgleich	53	132	euploide Polyploidisierung
283	67	regio 41-43 lingual	nicht aneuploid	mittlere Dysplasie und Plattenepithelkarzinom G2	zeitgleich	52	202	euploide Polyploidisierung

Tab.:6 (Fortsetzung): Synoptische Datenübersicht einzeitig entnommener zytologischer Proben und klinischer Verläufe aller 75 Patienten

Fall	Patient	Entnahmestelle	Ergebnis der DNA-Zytometrie	Histologie	Zeitraum zwischen Zytologie und Histologie	Zahl der Eichzellen	Zahl der Analyse-zellen	Kommentar zur DNA-Zytometrie
286	68	Planum buccale rechts	---					nicht möglich
288	68	Planum buccale rechts	---	Tumorfrei bei Lichen ruber	3 Monate			nicht möglich
289	68	Planum buccale rechts	nicht aneuploid			46	112	euploide Polyploidisierung
292	69	Unterkieferfront vestibulär	---					nicht möglich
294	69	regio 34	nicht aneuploid			79	201	euploide Polyploidisierung
296	69	regio 35	---					nicht möglich
299	70	regio 16 buccal	nicht aneuploid			56	212	euploide Polyploidisierung
306	71	regio 36-37	nicht aneuploid			83	65	
307	72	Mundboden rechts	nicht aneuploid			74	88	
308	73	Gaumen-Glossotonsillarfurche	nicht aneuploid			68	54	
323	75	vestibulär	nicht aneuploid			31	258	
327	75	harter Gaumen rechts	---					nicht möglich
332	75	harter Gaumen rechts	---					nicht möglich
348	75	regio 38	nicht aneuploid			38	205	
354	75	Vestibulum 1. Quadrant	---					nicht möglich
356	75	Vestibulum 4. Quadrant	---					nicht möglich

Tab.:6 (Fortsetzung): Synoptische Datenübersicht einzeitig entnommener zytologischer Proben und klinischer Verläufe aller 75 Patienten

3.2. Klinische Daten

3.2.1. Alter und Geschlecht der Patienten

Die Aufschlüsselung der Patienten bezogen auf die Geschlechterverteilung zeigt, dass insgesamt mehr Frauen (n = 44, 58,7 %) im Vergleich zu den Männern (n = 31, 41,3%) untersucht worden sind. Das durchschnittliche Alter aller Patienten bei der Probenentnahme lag bei 58,9 Jahren. Die Altersverteilung der Frauen mit einem Mittelwert von 61,2 +/- 13,5 [SD] Jahren unterschied sich nicht signifikant von der der Männer mit 54,9 +/- 15,2 [SD] Jahren (t-Test: $p > 0,05$).

3.2.2. Entnahmelokalisationen

Die Gewebeproben der Mundschleimhaut zeigen eine breite Fächerung der Probenentnahmestellen (Tab.7, Abb. 12).

Mit 41% liegt der Bereich des Kieferkammes weit vorne. Zum Kieferkamm wurde auch das Vestibulum dazu gezählt. Beide Bereiche liegen so eng aneinander, dass man davon ausgehen muss, dass bei der Probenentnahme keine einheitliche Abgrenzung durch den Behandler stattgefunden haben wird. Auch die Abgrenzung zur Wange ist nicht immer eindeutig festzulegen. Hier wurden aber diverse Entnahmestellen von den Behandlern dem Planum buccale zugeordnet, das sich klar vom Vestibulum unterscheiden lässt.

Die Anteile von Entnahmen vom Gaumen und vom Mundboden liegen zahlenmäßig im mittleren Bereich der Verteilung vor der Zunge und den Mundwinkeln.

Bei 7% der Fälle wurde keine genaue Lokalisation der Probenentnahmestelle angegeben; diese Fälle wurden generell unter „Mundschleimhaut“ (MSH) zusammengefasst.

Lokalisation	n	Prozentualer Anteil
Kieferkamm	47	41%
Wange	16	14%
Gaumen	14	12%
Mundboden	13	12%
Zunge	9	8%
MSH/ unspezifiziert	8	7%
Mundwinkel	7	6%

Tab. 7: Entnahmelokalisationen von 114 oralen Abstrichen mit der Diagnose „abnormes Regenerat epithel“

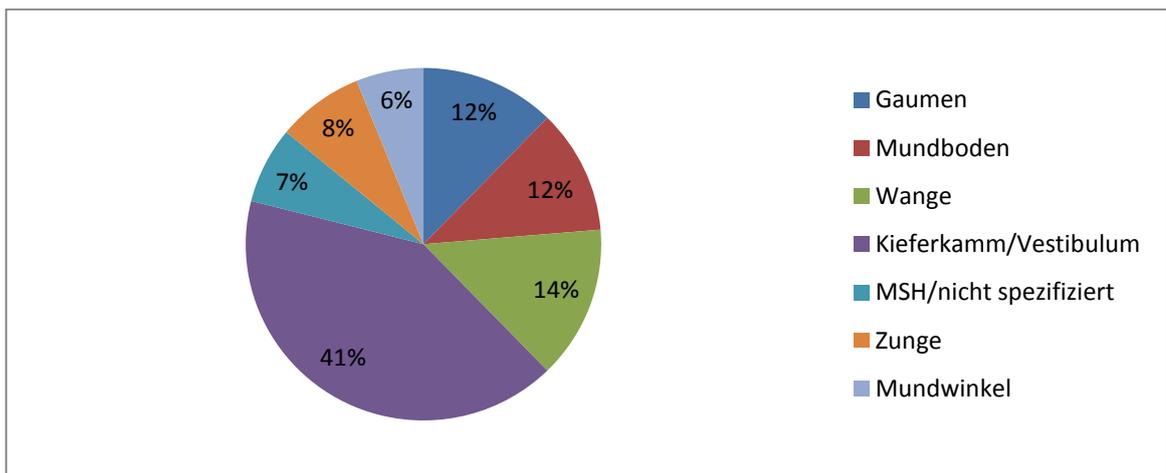


Abb. 12: Graphische Darstellung der Entnahmelokalisationen von 114 oralen Abstrichen mit der Diagnose „abnormes Regenerat epithel“

3.3. DNA-Bildzytometrie

3.3.1. Allgemeine Datenverteilung in der Messreihe

Im Folgenden werden die Ergebnisse mit der adjunktiven Methode der DNA-Bildzytometrie dargestellt. Insgesamt wurden an 84 Präparaten von 75 Patienten entsprechende Untersuchungen vorgenommen. 30 Proben konnten nicht untersucht werden, weil bei der Befundung die Zahl der zu erwartenden Analysezellen auf den Präparaten als zu gering erachtet worden waren (n = 27)

bzw. weil aufgrund zu starker Lufttrocknungsartefakte eine Messung für technisch nicht möglich gehalten worden war ($n = 3$). Alle Messungen erfolgten im Rahmen der ursprünglichen Routinediagnostik; es wurden gemäß der Studienplanung keine nachträglichen Messungen vorgenommen.

Im Durchschnitt basierten die Messungen auf der Erfassung von ca. 40 Eichzellen und ca. 185 Analysezellen, so dass die Zielgröße von mindestens 200 Analysezellen im Durchschnitt nicht ganz erreicht wurde (Tabelle 8).

Zellart	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum
Eichzellen	39,4	9,5	30	83
Analysezellen	185,4	76,7	43	343

Tab. 8: Darstellung der Eichzell- und Analysezellzahlen von 84 oralen Abstrichen mit der Diagnose „abnormes Regeneratepithel“

Weniger als 50 Analysezellen standen in einem Präparat zur Verfügung, 50 - 100 Zellen bei neun Präparaten, 101 - 150 Zellen bei 19 Präparaten und > 150 Zellen bei 55 Präparaten. Messungen mit vergleichsweise wenigen Analysezellen wurden vorsichtig interpretiert; bei 5 Präparaten wurde explizit auf die eingeschränkte Aussagekraft hingewiesen bzw. eine erneute Probenentnahme angeraten.

Bei 15 der 84 Messungen (= 17,9%) wurde DNA-Aneuploidie diagnostiziert, sechs weitere (= 7,1%) waren auf DNA-Aneuploidie verdächtig, während die übrigen 63 (= 75%) als nicht-aneuploid eingestuft wurden (Tabelle 9).

Bei einem der 15 Präparate mit DNA-Aneuploidie beruhte diese Diagnose rein auf dem Auffinden einer oder mehrerer aneuploider Stammlinien, bei den übrigen 14 Präparaten waren sowohl die Kriterien für Stammlinienaneuploidie, als auch für Einzelzellaneuploidie erfüllt. Ausschließlich Einzelzellaneuploidie wies keines der Präparate auf.

Die sechs Präparate, bei denen Verdacht auf DNA-Aneuploidie erhoben wurde, erfüllten die Kriterien für DNA-Aneuploidie nicht eindeutig. Keines von ihnen wies eine Stammlinie auf, die sich außerhalb der oben dargestellten Bereiche bei 2c bzw. 4c befand. Allerdings zeigten sich zum Teil sehr breite Stammlinien bzw. zahlenmäßig starke Stammlinien im 4c-Bereich, schwer interpretierbare angedeutete kleine aneuploide *Peaks* oder hohe Zahlen von Zellen in der S-Phase.

Ergebnis der DNA-Zytometrie	n	Prozentualer Anteil
nicht aneuploid	63	75,0%
Verdacht auf Aneuploidie	6	7,1%
aneuploid	15	17,9%

Tab. 9: Verteilung der „aneuploiden“, „nicht aneuploiden“ und „verdächtigen“ Proben nach DNA-Bildzytometrie, n=84

3.3.2. Zusammenhang zwischen Alter bzw. Geschlecht der Patienten und dem Messergebnis

Die Diagnose von DNA-Aneuploidie war vom Alter der Patienten bei Abstrichentnahme unabhängig. Teilt man nämlich die Patienten nach einem Alter von 60 Jahren, dem Median, in zwei fast gleich große Gruppen auf, so ergibt sich die in Tabelle 10 dargestellte statistisch nicht signifikant unterschiedliche Verteilung (Chi²-Test: $p > 0,05$).

Alter der Patienten	DNA-Bildzytometrie			n
	nicht aneuploid	V.a. Aneuploidie	aneuploid	
≤ 60 Jahre	32	4	8	44
>60 Jahre	31	2	7	40
n	63	6	15	84

Tab. 10: Korrelation zwischen dem Patientenalter und dem Ergebnis der DNA-Bildzytometrie, (V.a. Aneuploidie = Verdacht auf Aneuploidie)

Bezogen auf das Geschlecht der Patienten erwies sich die Diagnose von DNA-Aneuploidie ebenfalls als unabhängig. Die genauen Daten sind in Tabelle 11 wiedergegeben und zeigen keine statistische Signifikanz (Chi²-Test: $p > 0,05$).

Geschlecht der Patienten	DNA-Bildzytometrie			n
	nicht aneuploid	V.a. Aneuploidie	aneuploid	
männlich	24	2	9	35
weiblich	39	4	6	49
n	63	6	15	84

Tab. 11: Korrelation zwischen dem Geschlecht der Patienten und dem Ergebnis der DNA-Bildzytometrie (V.a. Aneuploidie = Verdacht auf Aneuploidie)

3.3.3. Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Proben und dem Messergebnis

Die Lokalisationen der Proben sind in Bezug zur DNA-Bildzytometrie in Tabelle 12 dargestellt und in Abbildung 13 illustriert.

Lokalisation der Probenentnahme	DNA-Bildzytometrie			n
	nicht aneuploid	V.a. Aneuploidie	aneuploid	
Kieferkamm / Vestibulum	28	1	3	32
Mundboden	7	1	5	13
Gaumen	9	1	0	10
Wange	8	1	0	9
Zunge	1	2	5	8
MSH	8	0	0	8
Mundwinkel / Lippe	2	0	2	4
n	63	6	15	84

Tab.12: Korrelation zwischen der Entnahmelokalisation und dem Ergebnis der DNA-Bildzytometrie, (V.a. Aneuploidie = Verdacht auf Aneuploidie)

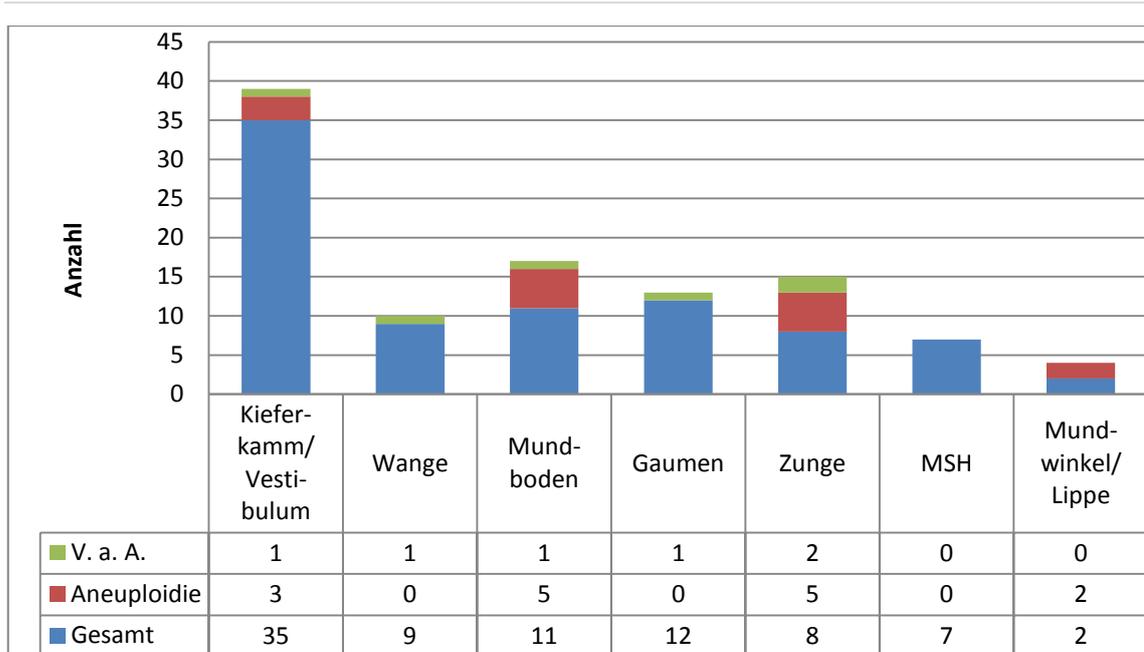


Abb. 13: Darstellung des Anteils DNA-aneuploider Proben verschiedener Entnahmelokalisationen im Säulendiagramm. Rot: Aneuploide Proben, grün: Proben mit Verdacht auf DNA-Aneuploidie, blau: Nicht-aneuploide Proben; n = 84, (V.a.A = Verdacht auf Aneuploidie)

Insgesamt zeigt sich, dass an den meisten Entnahmelokalisation aneuploide DNA-Verteilungen selten sind (0 – 28,6 %); nur im Bereich Mundboden liegen die Werte mit 38,5 % (5/13) bzw. an der Zunge mit 55,5% (5/9) deutlich höher. Im Chi²-Test erwiesen sich diese Unterschiede im Vergleich zwischen Mundboden und Zunge zu allen anderen Lokalisationen als signifikant (Chi²-Test: $x^2 = 24,69$ und $p < 0,01$) und im Vergleich Zunge zu allen anderen Lokalisationen ebenfalls als signifikant (Chi²-Test: $x^2 = 18,42$ und $p < 0,01$), wobei die statistische Aussage bei der aufgrund der Seltenheit der Diagnose begrenzten Fallzahl noch zurückhaltend beurteilt werden sollte.

3.3.4. Betrachtungen zum Follow-Up

Aufgrund der nur geringen Zahl an Rücksendungen der Fragebögen (vgl. Kap. 2.2.3), die zum Teil dann auch nur unvollständig ausgefüllt waren, kann man leider nicht in vielen Fällen einen gesicherten klinischen Verlauf nachvollziehen; auch bei der Lokalisationskennzeichnung durch den Behandler kam es leider zu

Ungenauigkeiten in der Dokumentation, die sich retrospektiv nicht mehr aufklären ließen (Tabelle 13).

Wenn man davon ausgeht, dass die Zahnärzte der Primäreinsendung auch etwaige Kontrollzytologien an den Schwerpunkt Cytopathologie und nicht an ein anderes Institut für Pathologie gesandt hätten, so lässt sich festhalten, dass die angeratenen Kontrollabstriche bei den auffälligen DNA-bildzytometrischen Befunden bis auf wenige Ausnahmen (s. u.) nicht gemacht worden sein dürften.

	Rücksendungen	Prozentualer Anteil
Ausreichend beantwortet	9	12,0
Lediglich Lokalisations- angabe der Probenentnahme	5	6,7
Nicht weiterführend	4	5,3
Gesamt	18	24,0

Tab.13: Rückläufer der 75 Fragebögen zum klinischen Follow-Up

Zusätzlich standen allerdings diejenigen acht Fälle zur Verfügung, bei denen im Institut für Pathologie eine Einsendung eines Biopsates oder Resektates von der Entnahmeregion der Zytologie erfolgte, was einen direkten Vergleich möglich machte.

3.3.4.1. Zytologie und DNA-Bildzytometrie von Bürstenabstrichen mit zeitnaher histologischer Untersuchung der Entnahmestelle durch Biopsie

Zu den 84 DNA-bildzytometrisch untersuchten Bürstenabstrichen gibt es in acht Fällen histologische Untersuchungen von derselben Entnahmeregion, von denen sieben zeitnah (innerhalb von 0- 20 Tagen) durchgeführt wurden und eine verzögert, nämlich 3 Monate nach der Zytologie (Tabelle 14). In weiteren sechs Fällen, in denen keine Messung vorgenommen werden konnte, wurde ebenfalls eine histologische Biopsiediagnostik durchgeführt.

Probenart	mit DNA-Bildzytometrie		Gesamt
	mit	ohne	
Zytologische Diagnose eines abnormen Regeneratepithels	84	30	114
Zeitnahe histologische Untersuchung aus gleicher Lokalisation	7	6	13
Zeitversetzte histologische Untersuchung aus gleicher Lokalisation	1	0	1

Tab. 14: Häufigkeitsverteilung von histologischen Entnahmen in Bezug auf Zytologie und DNA-Bildzytometrie, n = 14

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie am Bürstenabstrich denen der Histologie gegenübergestellt, wobei auch die Fälle berücksichtigt wurden, an denen keine entsprechende Messung möglich gewesen war.

Histologische Diagnose am Biopsat	DNA-Bildzytometrie am zytologischen Abstrichpräparat			
	nicht aneuploid	V.a. An- euploidie	aneuploid	keine Messung
Plattenepithelkarzinom			1	
schwere Dysplasie		1	1	
mittlere Dysplasie	4			1
leichte Dysplasie				1
kein Karzinom / keine Präkanzerose			1	4

Tab. 15: Gegenüberstellung der DNA-bildzytometrischen Messergebnisse am zytologischen Abstrich und der histologisch-biopsischen Befundung, n = 14, (V.a. Aneuploidie = Verdacht auf Aneuploidie)

Im Folgenden sollen zwei charakteristische Fälle kurz näher ausgeführt werden.

Fall 2: Rezidivierende präkanzeröse und kanzeröse Mundschleimhautläsionen

Bei einer 65 Jahre alten Patientin wurde bereits in der Vergangenheit ein Mundbodenkarzinom behandelt. Innerhalb des von uns gewählten Zeitintervalls (2007-2009) wurde 2007 in einem Bürstenabstrich des Mundbodens im Übergang zur Zunge, also in Angrenzung an das frühere Operationsgebiet,

abnormes Regeneratepithel diagnostiziert und DNA-zytometrisch ein Verdacht auf DNA-Aneuploidie bei einer peritetraploiden Stammlinie und Zellen bis in den 16c-Bereich geäußert. Zehn Tage nach diesem Abstrich wurde histologisch in einer Biopsie ein gut differenziertes invasives Plattenepithelkarzinom (schwere Dysplasie mit Übergang in ein G1-Karzinom) gesichert. Zeitgleich zur ersten Zytologie wurde ein zweiter Abstrich, der etwas tiefer am Mundboden an Regio 34 entnommen wurde und der ebenfalls abnormes Regeneratepithel aufwies, als DNA-aneuploid eingestuft. Hier ergab die Histologie 10 Tage später ebenfalls die Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms (G1). Als Therapie erfolgte eine Mundbodenteilresektion mit adjuvanter Radiochemo-Therapie.

Nach weiteren 5 Monaten wurde erneut ein Bürstenabstrich dieser Region entnommen, da bei der Tumornachsorge leukoplakische Veränderungen auffällig waren. Das Zellbild entsprach dabei auch hier einem abnormen Regeneratepithel der Mundschleimhaut, was DNA-zytometrisch ein polyploides Muster aufwies, wie es bei Zustand nach Radiatio oder Chemotherapie vorkommen kann. Hier wurde keine Aneuploidie nachgewiesen.

Innerhalb der nächsten 10 Monate nach der Mundbodenteilresektion erfolgte eine Mundbodenplastik mit einem Vollhauttransplantat, da keine Zungenmobilität mehr gegeben war. Nach anfänglicher guter Einheilung wurden Teile des Vollhauttransplantates nekrotisch und mussten wiederum reseziert werden. Bei der Mundbodenplastik erfolgte auch eine Biopsie der Zunge, sowie des Mundbodens, da dort klinisch erneut ulzeröse Veränderungen der Mundschleimhaut zu erkennen waren. Es konnten histologisch keine malignen Veränderungen festgestellt werden.

Bei den nachfolgenden Terminen der Patientin zu Anfertigung eines Zahnersatzes wurde im Bereich des weichen Gaumens eine Veränderung festgestellt. Zytologisch wurde eine leichte Dysplasie diagnostiziert und histologisch als erosive Leukoplakie mit Dysplasien bestätigt.

Zwei Jahre später wurde bei einem Bürstenabstrich des Mundbodens DNA-Aneuploidie nachgewiesen und eine obligate Präkanzerose diagnostiziert. Histologisch konnte diese aber nicht bestätigt werden.

Der weitere Werdegang dieser Patientin liegt außerhalb des ausgewählten Untersuchungszeitraumes (2007-2009), aber stand durch die Behandlung innerhalb des Uniklinikums Düsseldorf zur Verfügung. Ein Jahre später wurde

erneut der Mundboden, wegen klinisch sichtbarer leukoplakischer Veränderungen mit einer zytologischen Untersuchung kontrolliert. Es konnte zytologisch keine DNA-Aneuploidie nachgewiesen werden, aber wegen der peritetraploiden Stammlinienverteilung (mit einem Wert bei 15c) eine regelmäßige zytologische Kontrolle des Regeneratepithels angeraten. Die durchgeführte Histologie zeigte dann aber bereits ein Plattenepithelkarzinom (G2) mit angrenzend mittlerer Dysplasie noch strukturell erhaltener Schleimhautabschnitte.

Der Fall belegt, wie bei Patienten mit anzunehmender Feldkanzerisierung immer wieder sowohl klinisch, als auch zytologisch bzw. histologisch relevante Veränderungen über die Zeit auftreten und diagnostisch abgeklärt werden müssen.

Fall 67: Diskrepanz zwischen Histologie- und Zytologiebefunden

In diesem Fall wurden bei einer 78 jährigen Patientin Untersuchungen von der Mundschleimhaut Regio 41 lingual durchgeführt, die abnormes Regeneratepithel ergaben. Dieses wies eine als euploid interpretierte polyploide Stammlinienverteilung auf (2,05c, 4c, 8c). DNA-Aneuploidie wurde hingegen nicht nachgewiesen. Bei der zeitgleich entnommen Biopsie ergab das histologische Ergebnis allerdings bereits ein mäßiggradig differenziertes, verhornendes Plattenepithelkarzinom G2, dessen Zellen auch in der Rückschau nicht auf den zytologischen Präparaten vorhanden gewesen waren.

Auch bei einer nachfolgenden Untersuchung knapp 3 Monate später zeigte sich ein identischer Befund in der Zytologie. Ein Abstrich aus der Regio 41-43 vestibulär (Stammlinie bei 1,98c, 4c, 8c) und ein zweiter Abstrich aus der Regio 41-43 lingual (Stammlinie 2,04c, 4c, 7c) zeigten wiederum ein polyploides Muster, aber keine DNA-Aneuploidie, so dass auch hier von aktivierten Regeneratepithelien ausgegangen wurde. Die zeitgleiche Histologie ergab auch hier wieder ein mäßiggradig differenziertes verhornendes Plattenepithelkarzinom G2 sowohl an der vestibulären, als auch an der lingualen Probe. Weitere Kontrolluntersuchungen liegen in diesem Fall nicht vor.

Zusammenfassend bleibt als Interpretation zum einen die Überlegung, dass jeweils nur Regenerat aus der Umgebung des Tumors erfasst worden ist. Alternativ könnte überlegt werden, ob die Verhornung der Oberflächen verhindert haben könnte, dass eindeutig atypische Zellen bereits oberflächenbildend waren.

3.3.4.2. Zytologie und DNA-Bildzytometrie von Bürstenabstrichen mit zytologischer Kontrolluntersuchung der Entnahmestelle

Von den insgesamt 84 DNA-bildzytometrisch untersuchten Fällen wurde in 6 Fällen eine zeitnahe und in 3 Fällen eine zeitversetzte zytologische Untersuchung derselben Lokalisation durchgeführt. Auch die Erstzytologien, bei welchen keine DNA-Bildzytometrie (30 Fälle) durchgeführt wurde, sind nur in 3 Fällen zeitnah und in 4 Fällen durch eine zeitversetzte zytologische Untersuchung erneut an derselben Lokalisation überprüft worden (Tabelle 16). Damit wurden von den 114 abnormen Regeneratepithelien insgesamt nur 14% weiter verfolgt. Ein repräsentatives Follow-Up ist damit sicherlich nicht gegeben und bedarf zukünftig mehr Nachhaltigkeit. Die Empfehlung seitens des Schwerpunktes Cytopathologie in Düsseldorf, Kontrollabstrichen anzufertigen, wurde insgesamt nicht stringent umgesetzt.

Probenart	mit		Gesamt
	DNA-Bildzytometrie		
Zytologische Diagnose eines abnormen Regeneratepithels	84	30	114
Zeitnahe zytologische Untersuchung aus gleicher Lokalisation	6	3	9
Zeitversetzte zytologische Untersuchung aus gleicher Lokalisation	3	4	7

Tab. 16: Häufigkeitsverteilung von zytologischen Kontrollen in Bezug auf die erste Zytologie und die DNA-Bildzytometrie, n =16

Tabelle 17 zeigt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie an der ersten Zytologie im Vergleich zu den Kontrollzytologien, wobei hier (bei teilweise mehreren Kontrollen) nur das zytologische Ergebnis mit den höchstgradigen Veränderungen berücksichtigt ist. Mit aufgenommen

wurden auch hier die Fälle, bei denen keine Messung der ersten Zytologie vorgenommen werden konnte.

Zytologische Diagnose an Kontrollabstrichen	DNA-Bildzytometrie am ersten zytologischen Abstrichpräparat			
	nicht aneuploid	V.a. An- euploidie	aneuploid	keine Messung
Plattenepithelkarzinom	1			
schwere Dysplasie	1			
mittlere Dysplasie				
leichte Dysplasie				
abnormes Regeneratepithel	4	3		1
kein Karzinom / keine Präkanzerose	1	1		
Unzureichendes Untersuchungsmaterial		1	2	1

Tab. 17: Gegenüberstellung der DNA-bildzytometrischen Messergebnisse am ersten zytologischen Abstrich und der zytologischen Befundung von Kontrollentnahmen, n = 16, (V.a. Aneuploidie = Verdacht auf Aneuploidie)

Im Folgenden soll noch ein Fall gesondert dokumentiert werden.

Fall 19: Frühe Detektion von DNA-Aneuploidie zwei Jahre vor histologischer Manifestation

Dieser Fall ist insofern interessant, als bei diesem 48 jährigen männlichen Patienten bei der zytologischen Untersuchung DNA-Aneuploidie am abnormen Regeneratepithel nachgewiesen werden konnte. Eine kurzzeitige zytologische Abstrichkontrolle wurde nicht durchgeführt, aber bei der Nachverfolgung des Patienten in den Befundarchiven zeigte sich, dass zwei Jahre nach der ersten Probenentnahme (Regio 31, sublingual) tatsächlich dort bei einer Biopsie *Carcinoma in situ* aufgedeckt wurde. Die Läsion wurde daraufhin im Rahmen einer Exzision operativ saniert. Leider kann der heutige Zustand des Patienten nicht dokumentiert werden, da auch nach mehrmaliger Kontaktierung der

Einsendepraxis keine aktuellen Informationen zu erzielen war. Sicher wäre hier sinnvoller gewesen, eher zu kontrollieren; letztendlich war aber wenigstens noch eine nicht-invasive Läsion vorhanden.

3.3.4.3. DNA-bildzytometrisch untersuchte Bürstenabstriche ohne Follow-Up

Zu den übrigen 98 Patienten konnte aufgrund des mangelnden Rücklaufs an Fragebögen durch die auswärtigen Zahnärzte kein Follow-Up ermittelt werden; ebenso lagen am Schwerpunkt Cytopathologie des UKD keine zytologischen und am Institut für Pathologie des UKD keine histologischen Präparate aus der gleichen Entnahmeregion wie der zuvor untersuchte auffällige Bürstenabstrich vor.

Bei neun dieser Fälle, darunter fünf Männer und vier Frauen zwischen 49 und 80 Jahren, war DNA-bildzytometrisch DNA-Aneuploidie bzw. ein Verdacht auf DNA-Aneuploidie diagnostiziert worden. Auffälligerweise waren in sieben Fällen (78%) der Zungenrand bzw. der Mundboden betroffen, obwohl diese bezogen auf das Gesamtkollektiv (vgl. Kap. 3.3.2, Abb. 12) zusammen nur knapp 20% der Probenentnahmestellen ausmachen.

4. Diskussion

4.1. Das Fach Pathologie als zentrale Disziplin der Tumordiagnostik

Der Erkennung und Behandlung maligner Tumoren kommt in der modernen Medizin schon aufgrund der hohen Inzidenz und Mortalität solcher Erkrankungen eine besondere Bedeutung zu. Derzeit (Stand: 2010) erkranken in Deutschland pro Jahr 477.300 Menschen an malignen Tumoren, und die Zahl von Menschen, die daran pro Jahr versterben, lag zuletzt bei 218.258 (Robert Koch-Institut 2012). Entsprechend kann man, eine etwa gleich bleibende Inzidenz einmal vorausgesetzt, von einer Tumorsterblichkeit maligner Tumoren von 45,7% ausgehen.

Ohne eine sichere Tumordiagnostik ist eine Therapie aufgrund der erheblichen Konsequenzen operativer Eingriffe und / oder strahlentherapeutischer bzw. chemotherapeutischer Ansätze nur in Ausnahmefällen vertretbar und kann nicht die Regel sein. Ferner kommt es darauf an, nicht nur die Entscheidung über das Vorliegen eines malignen Tumors im allgemeinen zu treffen, sondern auch darauf, ihn histogenetisch grob (z.B. Sarkom / Karzinom / malignes Lymphom) bzw. fein (z.B. Adenokarzinom / Plattenepithelkarzinom) einzuordnen und durch Bestimmung seiner Differenzierung (z.B. gut differenziert (G1) / gering differenziert (G3)) auch in seiner malignen Potenz zu klassifizieren. Diese diagnostischen Leistungen können nur durch morphologische Untersuchungen von Zell- oder Gewebeproben erbracht werden, ggfls. ergänzt um molekulare Verfahren (z.B. in der Sarkomdiagnostik), nicht aber durch klinische oder bildgebende Verfahren. So ist es beispielsweise der modernen Radiologie durchaus möglich, eine Raumforderung mit einer hohen Wahrscheinlichkeit als gutartig-reaktiv, gutartigen Tumor oder bösartigen Tumor zu beschreiben. Eine echte, therapiefähige Artdiagnose aber lässt sich dennoch aus der Bildgebung in aller Regel nicht ableiten.

Entsprechend ist es sicher nicht falsch, wenn der Berufsverband der Pathologen („Bundesverband Deutscher Pathologen“, BDP) mit dem Satz „Jede Tumordiagnose wird von einem Pathologen gemacht“ versucht, sich der

Öffentlichkeit gegenüber mit einer der Hauptaufgaben seiner Mitglieder vorzustellen, auch wenn neben Pathologen bei manchen Fragestellungen alternativ auch Hämato-Onkologen (als Befunder von Sternalpunktaten), Gynäkologen (als Befunder von gynäkologischen Abstrichen) oder Dermatologen (als Befunder von Haut-Unterhaut-Exzidaten) hiermit befasst sein können. Sinngemäß gilt der oben genannte Satz natürlich nicht nur für maligne Tumoren, sondern auch für gutartige Tumoren und für alle Tumorstufen, und inhaltlich gemeint ist mit ihm letztendlich jede Betrachtung und Interpretation von Zell- und Gewebsveränderungen im lichtmikroskopischen Bild.

4.2. Mikroskopische Diagnostik von Tumoren und Tumorstufen: Bedingungen und Möglichkeiten

Histologie und Zytologie sind, was außerhalb der Pathologie wenig gesehen wird, nach wie vor subjektive Methoden mit sehr guten, aber nicht umfassenden Möglichkeiten. So einfach es ist, klare Fälle zu entscheiden, so schwierig kann es andererseits sein, beispielsweise im Grenzbereich zwischen „noch gutartig“ und „schon bösartig“ zu einer tragfähigen Diagnose zu gelangen.

Fokussiert man ausschließlich auf das Themenfeld der Karzinome, deren mögliche Vorstufen Gegenstand dieser Arbeit sind, so liegen die Hauptschwierigkeiten der Histologie

- in der Abgrenzung reaktiver Veränderungen gegenüber Dysplasien,
- in der Gradierung von Dysplasien als leicht, mittel oder schwer sowie
- bei manchen Entitäten in der zweifelsfreien Erkennung von Invasion, z.B. bei verrukösen Prozessen des Plattenepithels (verruköse Hyperplasie vs. verruköses Plattenepithelkarzinom).

Während die ersten beiden Problemfelder rein mit den epithelialen Zellschichten zu tun haben und deren eventuellen Schichtungs- und Reifungsstörungen beurteilen, geht es im dritten Problemfeld um Texturstörungen des Epithels hin zum darunter liegenden Stroma.

In der Zytologie, die nicht auf einen Zellverbund oder auf Texturparameter zurückgreifen kann, sondern rein auf die Morphe der abgetragenen oder aspirierten Zellen angewiesen ist, liegen die Schwierigkeiten hauptsächlich in

der Vielfalt der zur Interpretation vorhandenen Parameter, z.B. Kerngröße, Kerngrößenvariabilität, Ausmaß der Verschiebung der Kern-Plasma-Relation, Hyperchromasie und Chromatinkörnung, und ihrer subjektiv vorgenommenen Wertung durch den Befunder (vgl. auch Abb. 1).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse beider Methoden als Goldstandard-artige Grundlage therapeutischer Entscheidungen herangezogen werden, obwohl immer noch Unschärfen in der Diagnostik aufgrund der Interpretationsspielräume der Zell- und Gewebsbilder möglich sind. Hinzu kommt noch der Aspekt, dass Tumordiagnosen üblicherweise präoperativ an kleinen Proben gestellt werden müssen und daher immer die Frage im Raum steht, ob eine zytologische Probe oder eine histologisch zu bearbeitende Biopsie ausreichend repräsentativ für das biologische Gesamtgeschehen sind.

4.3. „Abnormes Regeneratepithel“: Eine Zusatzkategorie in der oralen Zytodiagnostik

Verbindliche Vorgaben für die Klassifizierung zellulärer Veränderungen in zytologischen Proben existieren nur für wenige zytologische Anwendungen.

Darunter befindet sich insbesondere die der oralen Zytologie im Grunde eng verwandte gynäkologische Vorsorgezytologie, die aufgrund ihres Screening-Charakters die mit großem Abstand häufigste zytologische Untersuchung überhaupt ist; pro Jahr werden in Deutschland ca. 16,2 Millionen Fälle bearbeitet. In dieser war bis zum 30.6.2014 die „Münchener Nomenklatur II“ (Wagner 1990) verpflichtend anzuwenden, die im Grenzgebiet zwischen „noch gutartig“ und „schon verdächtig“ dem Befunder die Wahl zwischen der Gruppe II, der Gruppe III und der Gruppe IIID ließ. Ein Problem lag dabei darin, dass damit eine Entscheidungsnotwendigkeit bestand, zwischen Gruppen mit unterschiedlicher klinischer Implikation stets klar zu entscheiden - lag man dann mit einer Gruppe III oder IIID für eine am Ende doch regenerative Veränderung „zu hoch“, hatte man eine Patientin unnötigerweise in eine Gruppe mit Kontrollanwendungen und Überweisung in eine Dysplasiesprechstunde verbracht. Im anderweitigen Fall einer Unterschätzung als Gruppe II, also einer „zu niedrigen“ Einschätzung, wäre eine möglicherweise relevante Läsion

zunächst unerkant geblieben. Um diesem Problem zu entgehen, wurde inoffiziell eine weitere Diagnosegruppe etabliert, die in vielen zytologischen Laboren, unabhängig davon, ob sie von Gynäkologen oder Pathologen geführt wurden, verwendet wurde. In dieser Gruppe Ilk (mit „k“ für „Kontrolle“) bzw. Ilw (mit „w“ für „Wiederholung“) wurden dann diejenigen Fälle geführt, bei denen sich der Befunder über den biologischen Charakter der Läsion nicht im Klaren war und die gleichzeitig aber als höchstens geringe Veränderung interpretiert wurden; das Kontrollintervall von drei oder sechs Monaten wurde im Befund als Empfehlung angegeben¹.

Als ca. 2000 - 2005 die orale Zytologie in Deutschland verbreiteter wurde und die kontroverse Diskussion über ihren Nutzen abebbte (vgl. Driemel et al. 2007), wurde sinngemäß das Konzept der Interpretation gynäkologischer Abstriche auf die oralen Bürstenbiopsien übertragen, weil die zugrunde liegende Zelle, nämlich das nicht verhornende Plattenepithel, in beiden Körperregion nicht nur bei Normalbefunden identisch aussieht, sondern auch im Krankheitsfall. Entsprechend kann man den Begriff des „abnormen Regeneratepithels“, wie er am Schwerpunkt Cytopathologie in Düsseldorf gewählt wurde, als Äquivalent in der oralen Zytodiagnostik zu den Befunden der Gruppe Ilk / Ilw in der gynäkologischen Zytologie ansehen, nämlich als einen Befund, der Veränderungen oberhalb der Normalität, aber unterhalb der Dysplasie beschreibt und auf der Basis der konventionellen Zytologie rein als Indikator für eine Kontrolle etc. dienen sollte. An anderen Einrichtungen werden derartige Veränderungen möglicherweise anders benannt, sind aber letztendlich überall als zweifelhaft akzeptiert.

Ob die Diagnose von abnormem Regeneratepithel, die ein erster Pathologe stellt, von einem zweiten bestätigt würde, ist dabei erfahrungsgemäß unsicher, da die Beurteilung nicht nur histologischer, sondern auch zytologischer Proben letztendlich subjektiv ist. In der Vergangenheit konnte auch für die Beurteilung oraler Dysplasien gezeigt werden, dass eine exakt gleichbleibende Bewertung

¹ In der seit 1.7.2014 gültigen Münchner Nomenklatur III (Griesser et al. 2013) wurden die Gruppen I und II neu gefasst, was zum Wegfall der inoffiziellen Gruppen Ilk und Ilw führte. Alle auffälligen Befunde „unterhalb“ der Gruppen III und IIID werden jetzt als Gruppen II-p, II-g, II-e und II-x klassifiziert.

nicht sichergestellt werden kann (Abbey et al. 1995). In der Arbeit wurden von sechs Pathologen 120 Fälle von histologisch untersuchten Mundschleimhautproben mit Diagnosen des Pathologen-Panels zwischen einfacher Hyperkeratose und schwerer Dysplasie abgeschlossen. Nach sechs Monaten beurteilte jeder der Pathologen einzeln ein Set von 60 dieser Fälle erneut. Dabei ergab sich eine durchschnittliche Übereinstimmung mit der Erstdiagnose aller Pathologen von 50,2% und mit der eigenen Diagnose von 50,8%; wurde eine Schwankung um +/- eine Kategorie erlaubt (also z.B. mittlere Dysplasie statt leichter Dysplasie oder umgekehrt), so lag die durchschnittliche Übereinstimmung mit 90,4% bzw. 92,4% deutlich höher. Allerdings ergab sich in der Frage, ob überhaupt eine Dysplasie vorlag, auch nur eine durchschnittliche Übereinstimmung von 81,5% bzw. 80,3% - jeder fünfte Fall war somit allein in der Frage strittig, ob er in den Formenkreis des Normalen oder nicht mehr Normalen fiel.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Biopsien vom Gebärmutterhals berichtet (vgl. insbesondere Stoler und Schiffman 2001 und dalla Palma et al. 2009), wobei die Studien mit 2772 bzw. 1003 Fällen deutlich größer waren.

Die zunehmende Etablierung adjuvanter Methoden in der Zytologie ließ ergänzend den Gedanken aufkommen, sich nicht rein auf die Zuordnung von Zellveränderungen in die Gruppe des abnormen Regeneratepithels zu beschränken, sondern auch zusätzliche Untersuchungen zu seiner Abklärung zu entwickeln. Von den zur Verfügung stehenden Methoden (Biesterfeld et al. 2013) kommen bislang immunzytochemische Verfahren und molekulare Anwendungen ebenso wenig in Betracht wie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FisH), wohl aber die DNA-Bildzytometrie, deren Anwendung auch Gegenstand dieser Studie ist. FisH und DNA-Bildzytometrie dienen zwar beide dem Nachweis von Aneuploidie als hartem Marker für maligne Transformation; FisH-Anwendungen setzen aber die vorherige Etablierung von möglichst spezifischen DNA-Sonden voraus, die als Marker für chromosomale Aneuploidie dienen können. Diese stehen bei Plattenepithelkarzinomen allgemein für eine klinische Anwendung noch nicht zur Verfügung, anders als bei Urothelkarzinomen oder Adenokarzinomen. Die DNA-Bildzytometrie, mit der nicht chromosomale, sondern numerische Aneuploidie detektiert werden soll, ist

hingegen nicht an spezifische Voraussetzung solcher Art gebunden, sondern lässt sich, eine *lege artis* durchgeführte Feulgen-Färbung und eine ausreichende Zahl von auffälligen Zellen vorausgesetzt, an jedem Präparat durchführen; auch die Auswertelgorithmen sind, von definierten Ausnahmen abgesehen, überwiegend von Organ zu Organ identisch. Auch biologische Störfaktoren, die ein DNA-zytometrisches Messergebnis beeinflussen können, sind nicht organspezifisch; hierzu zählen Effekte der Hyperregeneration, Folgen viraler Infektionen oder auch Zellveränderungen während oder nach Strahlen- und / oder Chemotherapie, die jeweils Ursachen für eine euploide Polyploidisierung sein können (Biesterfeld et al. 1994), aber nicht zu DNA-Aneuploidie führen.

4.4. Erfahrungen am Schwerpunkt Cytopathologie der Universitätskliniken Düsseldorf mit der DNA-Bildzytometrie am abnormen Regeneratepithel

Die hier retrospektiv nachuntersuchten 84 Fälle von zytologisch diagnostiziertem und DNA-zytometrisch weiter untersuchtem abnormen Regeneratepithel der Mundschleimhaut lassen erkennen, dass in der Tat DNA-Aneuploidie in einer durchaus gehörigen Zahl von Fällen auftritt; in 15 Fällen war DNA-Aneuploidie belegbar (= 17,85%), in weiteren sechs Fällen wurde immerhin ein Verdacht auf DNA-Aneuploidie erhoben (= 7,15%). Die übrigen 63 Fälle (= 75%) wiesen keine Hinweise auf DNA-Aneuploidie auf.

Während letztere 63 Fälle als reaktiv interpretiert wurden, wurde bei den 21 Fällen mit auffälligen Veränderungen im DNA-Verteilungsmuster eine kurzfristige Kontrolle bzw. eine bioptische Entnahme zur weiteren Klärung angeraten. Die eigentliche Idee, über ein Follow-Up genaueren Aufschluss über den klinischen Verlauf zu erhalten, ließ sich bedauerlicherweise nur partiell verwirklichen. Nur 18 der versandten Fragebögen (= 24%) wurden trotz Erinnerung seitens des Schwerpunktes Cytopathologie zurückgesandt, und mit neun Fällen war die Hälfte der Angaben nicht weiterführend. So blieben insgesamt nur neun Fälle aus dem Fragebogenversand und weitere acht Fälle mit am Universitätsklinikum Düsseldorf beurteilten Histologien aus gleicher Entnahmeregion, die als mit ausreichendem Follow-Up versehen gelten dürfen.

Unter Zugrundelegung der Hypothese, dass die per Fragebogen angefragten Zahnärzte der Primäreinsendung auch etwaige Kontrollzytologien an den Schwerpunkt Cytopathologie und nicht an ein anderes Institut für Pathologie gesandt hätten und man daher davon ausginge, dass die angeratenen Kontrollabstriche bei den auffälligen DNA-bildzytometrischen Befunden nicht gemacht worden sein dürften, so läge die Quote der Kontrollen bzw. Klärungen mit 20,2% (17 von 84) immer noch in etwa doppelt so hoch wie diejenige, die man in der gynäkologischen Vorsorgezytologie bei der Klärung von Fällen der Gruppen III oder IIID erzielt. Die Zahlen der Kassenärztlichen Bundesvereinigung (KBV) für das Jahr 2012, in denen 16,2 Millionen Fälle erfasst sind, weisen hier aus, dass von 43.270 Fällen der Gruppe III 17,1% geklärt wurden und von 181.903 Fällen der Gruppe IIID 9,4%, was insgesamt 10,9% entspricht (Schneider 2014).

Weswegen der Frauenanteil mit 58,7% deutlich höher als der Männeranteil lag, lässt sich letztendlich nicht begründen. Die Verteilung der Lokalisationen lässt sich mangels Daten mit anderen Studien insgesamt nicht vergleichen. Was die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie betrifft, so waren die Unabhängigkeit der DNA-zytometrischen Diagnosen vom Patientenalter und vom Geschlecht zu erwarten. Darüber, weswegen am Mundboden bzw. an der Zunge deutlich häufiger DNA-Aneuploidie vorlag als an den anderen Lokalisationen, lässt sich letztendlich auch nur spekulieren.

Alles in allem lässt sich unter allen Vorbehalten der lückenhaften Rückmeldungen über die Verläufe jedenfalls festhalten, dass in keinem Fall eines nicht DNA-aneuploiden Messergebnisses im Follow-Up über eine maligne Läsion an gleicher Stelle berichtet wurde, dass aber andererseits DNA-Aneuploidie verschiedentlich als Indikator für eine später auftretende Läsion angesehen werden konnte. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der Nachweis von DNA-Aneuploidie in so frühen Läsionen nicht bedeuten muss, dass sie progredient verlaufen. Offenbar ist durchaus auch eine Rückbildung bzw. wohl auch eine immunologische Abstoßung der Läsionen denkbar.

Letzten Endes muss der Kliniker, der den Patienten unmittelbar betreut, derjenige sein, der in Abhängigkeit von klinischem Bild und vom zytologischen bzw. auch DNA-zytometrischen Befund die Entscheidung darüber trifft, wie invasiv er welche fakultative Vorläuferläsion von malignen Tumoren behandeln lassen möchte. Die über die reine Diagnostik hinausgehende Aufgabe der Pathologie in diesem Zusammenhang ist, den Klinikern durch entsprechende Hinweise im Befundtext einen Anhaltspunkt über die biologische Wertigkeit aus morphologischer Sicht zu geben. Bei einer DNA-aneuploiden Veränderung aus dem Formenkreis des abnormen Regeneratepithels würde üblicherweise der Hinweis gegeben, in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf eine zytologische Kontrolle zu überlegen.

5. Zusammenfassung

Trotz guter bis sehr guter Treffsicherheit der konventionellen oralen Zytologie ist es heute immer noch schwierig, Grenzfälle zwischen noch gutartigen und bereits bösartigen Veränderungen präzise zu unterscheiden. Manche solcher als „zweifelhaft“ eingestuften Veränderungen entsprechen auffälligen, als „abnormes Regeneratepithel“ bezeichneten Zellpopulationen. Sofern genügend auffällige Zellen vorliegen, ist es am Schwerpunkt Cytopathologie des UKD üblich, sie mit der Methode der DNA-Bildzytometrie weiter zu untersuchen, um ggfls. DNA-Aneuploidie nachzuweisen bzw. auszuschließen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden retrospektiv die zwischen 2007 und 2009 diagnostizierten Fälle aufgearbeitet.

Abzüglich aller nicht verwendbaren Proben wurde ein Patientenkollektiv von 75 Patienten (44 Frauen, 31 Männer) mit 114 relevanten Proben gefunden, wobei bei 84 Fällen DNA-bildzytometrische Untersuchungen vorlagen. Die klinischen Verläufe wurden durch Einsichtnahme in die Datenbanken des Institutes für Pathologie und der Cytopathologie am UKD sowie anhand eines an die überweisenden Hauszahnärzte versandten Fragebogens ermittelt, standen letztendlich aber nur für 26 Patienten zur Verfügung.

In 17,9 % der Messungen wurde DNA-Aneuploidie und in 7,1 % ein Verdacht auf Aneuploidie nachgewiesen, so dass 25% der Fälle ein auffälliges DNA-Profil zeigten. Das Messergebnis war unabhängig von Alter und Geschlecht der Patienten ($p > 0,05$). Im Vergleich mit allen übrigen Lokalisationen kam DNA-Aneuploidie statistisch signifikant gehäuft im Bereich des Mundboden und der Zunge vor ($p < 0,01$). Von den vier histologisch geklärten Fällen mit auffälligem DNA-Profil wiesen drei schwere Dysplasien bzw. ein Plattenepithelkarzinom auf, eine Klärung verlief negativ. Die beiden DNA-aneuploiden Abstriche, die zytologisch kontrolliert wurden, waren technisch unzureichend; vier weitere dieser Fälle mit Verdacht auf DNA-Aneuploidie zeigten keine Hinweise auf Präkanzerosen oder Malignität.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass „abnormes Regeneratepithel“ durchaus bereits DNA-zytometrische Veränderungen im Sinne einer präkanzerösen malignen Transformation aufweisen kann. Leider erwiesen sich die Angaben zu Kontrollen als zu lückenhaft, um den Stellenwert der Methode am vorliegenden Patientengut bereits abschließend beurteilen zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, Burns JC, Page DG, Svirsky JA, et al (1995): Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodont* 80: 188-191.
2. Auffermann W, Böcking A. (1985): Early detection of precancerous lesions in dysplasias of the lung by rapid DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol.*7:218-226.
3. Aubele M, Biesterfeld S, Derenzini M, Hufnagl P, Martin H, Ofner D, Ploton D, Rüschoff J (1994): Guidelines of AgNOR quantitation. *Zentralbl Pathol* 140: 107-108.
4. Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. (2005): *World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors*. Lyon: IARC Press.
5. Biesterfeld, S (2013): *Zurverfügungstellung von urheberrechtlich geschützten Abbildungen aus dem Bestand des Schwerpunktes Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
6. Biesterfeld S, Deacu L. (2009): DNA image cytometry in the differential diagnosis of benign and malignant lesions of the bile duct, the pancreatic duct and the papilla of Vater. *Anticancer Res.*29: 1579-1584.
7. Biesterfeld S, Farokhzad F, Klüppel D, Schneider S, Hufnagl P (2001c): Improvement of breast cancer prognostication using cell kinetic-based silver-stainable nucleolar organizer region quantification of the MIB-1 positive tumor cell compartment. *Virch Arch* 438: 478-484.
8. Biesterfeld S, Gerres K, Fischer-Wein G, Böcking A (1994): Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J Clin Pathol* 47: 38-42.
9. Biesterfeld S, Leitloff M, Rath W, Schröder W. (2001b): DNA image cytometry in the differential diagnosis of endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 23: 123-128.
10. Biesterfeld S, Pennings K, Grussendorf-Conen EI, Böcking A. (1995): Aneuploidy in actinic keratosis and Bowen's disease--increased risk for invasive squamous cell carcinoma? *Br J Dermatol.* 133: 557-560.
11. Biesterfeld S, Pomjanski N, Schramm M (2013): Adjuvante Methoden in der diagnostischen Zytopathologie. *Verh Dtsch Ges Zyt* 28: 8-16.
12. Biesterfeld S, Reus K, Bayer-Pietsch E, Mihalcea AM, Böcking A. (2001a): DNA image cytometry in the differential diagnosis of endocervical adenocarcinoma. *Cancer.* 93: 160-164.

13. Biesterfeld S, Schramm M, Schad A, Pomjanski N (2014): Zytopathologische Ergussdiagnostik in der berufsgenossenschaftlichen Begutachtung von Asbest-assoziierten malignen Mesotheliomen und Lungenkarzinomen. *Pneumologie* 68: 268-274.
14. Böcking, A (1998): Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Pathologie* 19: 253-258
15. Califano J, Ahrendt SA, Meininger G, Westra WH, Koch WM, Sidransky D (1996): Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res.* 56: 5720-5722.
16. Chatelain R, Schunck T, Schindler EM, Schindler AE, Böcking A. (1989): Diagnosis of prospective malignancy in koilocytic dysplasias of the cervix with DNA cytometry. *J Reprod Med.* 34: 505-510.
17. Crocker J, Boldy DA, Egan MJ. (1989): How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol.* 158: 185-188.
18. Driemel O, Dahse R, Hakim SG, Tsioutsias T, Pistner H, Reichert TE, Kosmehl H. (2007): Laminin-5 immunocytochemistry: a new tool for identifying dysplastic cells in oral brush biopsies. *Cytopathology.* 18:348-355.
19. Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Müller-Richter U, Kosmehl H, Reichert TE (2007): Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *J Dtsch Ges Dermatol* 5: 1095-1100
20. Evans AS, Monaghan JM (1987): The nuclear DNA content of vulvar skin using Feulgen microspectrophotometry and "four-quarter" analysis. *Anal Quant Cytol Histol.* 9: 39-42.
21. Feulgen R, Rossenbeck H (1924): Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 135: 203-248.
22. Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Westra WH, Califano J (2005): Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (eds): World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC, Lyon, S. 140-143
23. Girmes G (2009): Stellenwert der DNA-Bildzytometrie in der Differentialdiagnostik leiomyogener Tumoren. *Med. Diss., Johannes Gutenberg-Universität Mainz*
24. Graumann W (1953): Zur Standardisierung des Schiff'schen Reagens. *Z Wiss Mikrosk* 61: 225-226.
25. Griesser, H, Marquardt K, Jordan B, Kühn WK, Neis W, Neumann HH, Bollmann R, Pöschel B, Steiner M, Schenck U (2013): Gynäkologische

- Zytodiagnostik der Zervix. Münchner Nomenklatur III. Frauenarzt 54: 1041-1048
26. Grote HJ (2006): Aberrante Promotor-Methylierungen als Tumormarker für die molekularzytologische Diagnostik des Lungenkarzinoms. Habil.-Schrift, Med. Fak., Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
 27. Gupta S, Shah JS, Parikh S, Limbdiwala P, Goel S. (2014): Clinical correlative study on early detection of oral cancer and precancerous lesions by modified oral brush biopsy and cytology followed by histopathology. *J Cancer Res Ther.* 10: 232-238.
 28. 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. Anal Cell Pathol* 17: 189-200
 29. Heselmeyer K, Schröck E, du Manoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, Auer G, Ried T (1996): Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 479-484.
 30. von Hörmann H, Grassman W, Fries G (1958): Über den Mechanismus der Schiff'schen Reaktion. *Liebigs Ann Chem* 616: 125-147.
 31. Kalof AN, Cooper K (2007): Our approach to squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 60: 449-455.
 32. Koch FP, Kunkel M, Biesterfeld S, Wagner W. (2011): Diagnostic efficiency of differentiating small cancerous and precancerous lesions using mucosal brush smears of the oral cavity--a prospective and blinded study. *Clin Oral Invest* 15: 763-769.
 33. Koss GL (2005): Epithelial lesions of the oral cavity, larynx, trachea, nasopharynx and paranasal sinuses. In Koss GL (Hrsg.): *Koss' diagnostic cytology and its histopathological basis.* Verlag Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Kap. 21, S. 713-737.
 34. Krishnamurthy S, Katz RL, Shumate A, Strohle K, Khanna A, Tucker SL, Rajman I, Lahoti S. (2001): DNA image analysis combined with routine cytology improves diagnostic sensitivity of common bile duct brushing. *Cancer* 93: 229-235.
 35. Loghavi S, Walts AE, Bose S (2013): CINtec® plus dual immunostain: A triage tool for cervical pap smears with atypical squamous cells of undetermined significance and low grade squamous intraepithelial lesion. *Diagn Cytopathol* 41: 582-587
 36. Ma JM, Zhou TJ, Wang R, Shan J, Wu YN, Song XL, Gu N, Fan Y. (2014): Brush biopsy with DNA-image cytometry: a useful and noninvasive method for monitoring malignant transformation of

- potentially malignant oral disorders. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 271: 3291-3295.
37. Madani AH, Jahromi AS, Dikshit M, Bhaduri D (2010): Risk assessment of tobacco types and oral cancer. *Am J Pharmacol Toxicol* 5: 9-13.
 38. Maraki D, Becker J, Böcking A. (2004): Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. *J Oral Pathol Med.* 33: 398-404.
 39. Mehrotra R, Singh MK, Pandya S, Singh M (2008): The use of an oral brush biopsy without computer-assisted analysis in the evaluation of oral lesions: A study of 94 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106: 246-253.
 40. Nasiell K, Auer G, Nasiell M, Zetterberg A. (1979): Retrospective DNA analyses in cervical dysplasia as related to neoplastic progression or regression. *Anal Quant Cytol.* 1: 103-106.
 41. Nordemar S, Kronenwett U, Auer G, Högmo A, Lindholm J, Edström S, Tryggvasson K, Linder S, Munck-Wikland E. (2001): Laminin-5 as a predictor of invasiveness in cancer in situ lesions of the larynx. *Anticancer Res.* 21: 509-12.
 42. Onofre FB, Onofre AS, Pomjanski N, Buckstegge B, Grote HJ, Böcking A (2008): 9p21 Deletion in the diagnosis of malignant mesothelioma in serous effusions additional to immunocytochemistry, DNA-ICM, and AgNOR analysis. *Cancer* 114: 204-215.
 43. Osterheld MC, Andrejevic Blant S, Caron L, Braunschweig R, Dorta G, Bouzourene H, Mihaescu A. (2005): Digital image DNA cytometry: a useful tool for the evaluation of malignancy in biliary strictures. *Cell Oncol* 27: 255-260.
 44. dalla Palma P, Giorgi Rossi P, Collina G, Buccoliero AM, Ghiringhello B, Gilioli E, Onnis GL, Aldovini D, Galanti G, Casadei GP, Aldi M, Gomes VV, Giubilato P, Ronco G, and the NTCC Pathology Group (2009): The reproducibility of CIN diagnosis among different pathologists: data from histology reviews from a multicenter randomized study. *Am J Clin Pathol* 132: 125-132
 45. Ploem-Zaijer JJ, Beyer-Boon ME, Leyte-Veldstra L, Ploem JS(1979): Cytofluometric and cytophotometric DNA measurements of cervical smears stained using a new bicolor method. In: Pressman NJ, Wied GL (eds): *Automation of cancer cytology and cell image analysis. Tutorials of cytology*, Chicago, S. 225-235.
 46. Poh CF, Zhu Y, Chen E, Berean KW, Wu L, Zhang L, Rosin MP (2012): Unique FISH patterns associated with cancer progression of oral dysplasia. *J Dent Res.* 91: 52-57.

47. Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, Böcking A (2001): Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol* 22:211-221.
48. Remmerbach TW, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A. (2003): Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases. *Anal Cell Pathol*. 25: 159-166.
49. Remmerbach TW, Mathes SN, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A (2004): Noninvasive brush biopsy as an innovative tool for early detection of oral carcinomas. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8:229-236
50. Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.): Krebs in Deutschland 2007-2008. Häufigkeiten und Trends. 8. überarbeitete Auflage, Berlin, 2012
51. Seidel A, Sandritter W, (1963); Cytophotometric measurements of the DNA content of a pulmonary adenoma and of a malignant pulmonary adenomatosis. *Z Krebsforsch*. 65: 555-559.
52. Schlomer BJ, Ho R, Sagalowsky A, Ashfaq R, Lotan Y. (2010): Prospective validation of the clinical usefulness of reflex fluorescence in situ hybridization assay in patients with atypical cytology for the detection of urothelial carcinoma of the bladder. *J Urol* 183: 62-67.
53. Schneider V. (2014): Paradigmenwechsel in der Früherkennung des Zervixkarzinoms? *GYNE* 35: 34-41
54. Stoler MH, Schiffman M (2001): Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 21: 1500-1505
55. van der Waal I (2009): Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* 45: 317-323.
56. Wagner D (1990): Münchner Nomenklatur II für die gynäkologische Zyto-diagnostik. *Acta Cytol* 34: 900-902
57. Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Inoue H, Itoh T, Yazaki C, Obara M, Fukuda T (2011): Usefulness of CINtec® PLUS p16/Ki-67 double-staining in cytological screening of cervical cancer. *Acta Cytol* 55: 413-420.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Biesterfeld, Leiter Funktionsbereiches Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Überlassung des Themas meiner Dissertation. Darüber hinaus danke ich ihm für jede erdenkliche hilfreiche Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung. Dank seiner großen Geduld und zur Verfügung gestellten Zeit konnte ich die Arbeit neben dem beruflichen Alltag fertig stellen.

Mein Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Helmut Gabbert, Direktor des Instituts für Pathologie, der mir zur Anfertigung meiner Arbeit die Daten der histologischen Untersuchungen zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Funktionsbereiches Cytopathologie für die immer ausgesprochen freundliche Unterstützung.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Doris Naczke für den Verzicht auf unseren Pilger-Walk und ihre vorbildliche, unerschütterliche und kompromisslose Motivation, die in großem Maße an dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Vielen Dank an meine Familie und Freunde für die Unterstützung, womit sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben. Besonders bedanke ich mich bei meinen Schwestern für die Hilfe bei EDV-Fragen und ihre mathematische Intelligenz und bei meinem Freund für die Flexibilität und Rücksichtnahme. Was man verspricht, muss man auch halten.

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.

Datum,

Anna-Maria Brenner