

Aus dem Institut für Pathologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Irene Esposito

-Funktionsbereich Cytopathologie-

Diagnostische Treffsicherheit der oralen Bürstenbiopsie  
makroskopisch auffälliger,  
insbesondere neoplasieverdächtiger Läsionen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
der medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Eva Leonie Hartmann

2021

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

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

**Meinen Eltern.**

## Zusammenfassung

Das orale Plattenepithelkarzinom entsteht meist über verschiedene morphologisch auffällige Vorstufen wie beispielsweise Leukoplakie oder Lichen planus. Zur Abklärung eines malignen Potenzials dieser Läsionen hat sich die orale Abstrichentnahme mit einer Bürste mit zytologischer Untersuchung und gegebenenfalls anschließender DNA-Bildzytometrie bewährt. Ziel dieser Arbeit ist es, die diagnostische Treffsicherheit (Malignität ja/ nein) der oralen Bürstenbiopsie und DNA-Bildzytometrie anhand des eigenen Archivmaterials retrospektiv zu ermitteln.

In die retrospektive statistische Studie eingeschlossen wurden zytologische Befundberichte von 794 von insgesamt 1015 zytologischen Abstrichen der Jahre 2014 und 2015, die aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie sowie der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme in den Funktionsbereich Cytopathologie des Universitätsklinikum Düsseldorf eingesandt wurden. Daten zu Risikofaktoren des Plattenepithelkarzinoms, Vorerkrankungen, zeitgleichen Gewebebiopsien, klinischer Enddiagnose, vorherigen oder folgenden Bürstenabstrichen etc. wurden aus Pathologiebefunden und der Patientenakte erhoben, so der Referenzstandard (Malignität ja/ nein) ermittelt, und mithilfe einer Excel<sup>®</sup>-Tabelle den zytologischen Befunden gegenübergestellt.

Die Sensitivität für die zytologische Diagnose mindestens einer schweren Dysplasie des Plattenepithels im gesamten Kollektiv betrug 53%, die Spezifität 95%. Durch kombinierte Auswertung von zytologischer Diagnostik und DNA-Bildzytometrie ergab sich je nach Auswertungsmodus eine Sensitivität von 45,5-47% und eine Spezifität von 97,7-98,4%. Bei Durchführung von Bürstenabstrich und chirurgischer Gewebebiopsie durch den selben Behandler erhöhte sich die Sensitivität auf 100% bei einer Spezifität von 92%. Dies war aber nur bei 11,7% der Läsionen realisiert.

Der Anteil von Rezidiven des Plattenepithelkarzinoms war aufgrund der eingeschlossenen Nachsorgesprechstunde mit 48,5% (32/66) hoch.

Die orale Bürstenbiopsie ist ein geeignetes Verfahren zur Abklärung (prä-)maligner oraler Schleimhautläsionen. Allerdings wird durch die vorliegende Studie deutlich, dass nur bei Durchführung von Bürstenbiopsie und ggf. anschließender chirurgischer Gewebebiopsie von einem einzigen Behandler ähnlich zuverlässige Ergebnisse wie im Literaturquerschnitt zu erwarten sind. Wünschenswert wären zusätzlich zu der systematischen Inspektion der Mundschleimhaut z.B. eine standardisierte Abstrichentnahme, das Einzeichnen der Abstrichlokalisierung in eine Mundlandkarte und Fotodokumentation zur Erleichterung der klinischen Befundkontrolle.

## Summary

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) usually develops via various morphologically conspicuous precursors such as leukoplakia or lichen planus. To determine the malignant potential of these lesions, collecting an oral brush smear for a cytological examination and, if indicated, subsequent DNA image cytometry has proven successful.

The aim of this work is to retrospectively determine the diagnostic accuracy (malignancy yes/no) of oral brush biopsy and DNA image cytometry using archival material available from the University Hospital Düsseldorf.

The retrospective statistical study included cytological reports of 794 out of a total of 1015 cytological smears taken in 2014 and 2015, which were sent from the Clinic for Oral and Maxillofacial Plastic Surgery and the Policlinic for Dental Surgery to the Functional Area of Cytopathology of the University Hospital Düsseldorf. Data on risk factors of squamous cell carcinoma, previous diseases, simultaneous tissue biopsies, final clinical diagnosis, previous or subsequent brush smears, etc. were collected from pathology reports and the patient records, thus determining the reference standard (malignancy yes/no). This reference standard was then compared to the cytological findings with the help of an Excel<sup>®</sup> table.

Sensitivity for the cytological diagnosis of at least one severe dysplasia of the squamous epithelium in the entire collective was 53%, and specificity was 95%. Combined evaluation of cytological diagnosis and DNA image cytometry resulted in a sensitivity of 45.5-47% and a specificity of 97.7-98.4%, depending on the evaluation mode. When brush smear and surgical tissue biopsy were performed by the same person, sensitivity increased to 100% with a specificity of 92%. However, this was realized in only 11.7% of lesions.

The fraction of recurrences of squamous cell carcinoma was high at 48.5% (32/66) due to the included follow-up care consultation.

Oral brush biopsy is an appropriate procedure to evaluate (pre)malignant oral mucosal lesions. However, it is clear from the present study that only when the brush biopsy and, if indicated, the subsequent surgical tissue biopsy are performed by a single practitioner can comparably reliable results be achieved as are described in current scientific literature. In addition to the systematic inspection of the oral mucosa, it would be desirable to have, for example, a standardized smear process, a drawing of the swab localization in an oral cavity map and photo documentation to facilitate the clinical control of the findings.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AgNOR</b>	<i>Argyrophilic Nucleolar Organiser Regions</i>
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>DGMKG</b>	Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
<b>DNA</b>	<i>Desoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure</i>
<b>EGFR</b>	<i>epidermal growth factor receptor / epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor</i>
<b>FADH</b>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
<b>Gy</b>	Gray
<b>HPV</b>	Humane Papillomviren
<b>IOD</b>	Integrierte Optische Dichte
<b>Min</b>	Minuten
<b>MKG</b>	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MSH</b>	Mundschleimhaut
<b>NADH</b>	Nicotinamidadenindinukleotid
<b>NPW</b>	negativer prädiktiver Wert
<b>OK</b>	Oberkiefer
<b>PD1</b>	<i>programmed cell death protein 1</i>
<b>PDD</b>	Photodynamische Diagnose
<b>PEC</b>	Plattenepithelkarzinom
<b>PpIX</b>	Protoporphyrin IX
<b>PPW</b>	positiver prädiktiver Wert
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid / Ribonukleinsäure</i>
<b>UICC</b>	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
<b>UK</b>	Unterkiefer
<b>UKD</b>	Uniklinikum Düsseldorf
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization / Weltgesundheitsorganisation</i>
<b>Z.n.</b>	Zustand nach
<b>5-ALA</b>	5-Aminolävulinsäure

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Mundschleimhautkarzinome</i>	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Risikofaktoren	1
1.1.3	Klinische Symptome	2
1.1.4	Früherkennung, Diagnostik und Therapie	3
1.1.5	TNM-Klassifikation	4
1.2	<i>Orale potenziell maligne Erkrankungen</i>	6
1.2.1	Leukoplakie	6
1.2.2	Erythroplakie	8
1.2.3	Lichen planus	8
1.2.4	Weitere potenziell maligne Erkrankungen	9
1.3	<i>Zytologische Untersuchung von Mundschleimhautläsionen als Früherkennung</i>	9
1.3.1	Warum überhaupt zytologische Untersuchungen der Mundschleimhaut: Indikationen der Bürstenbiopsie	9
1.3.2	Durchführung und optimale Bedingungen der Bürstenbiopsie	10
1.3.3	Dünnschichtzytologie	11
1.3.4	DNA-Bildzytometrie	12
1.4	<i>Weitere nicht-invasive Untersuchungsmethoden für Mundkrebs-Screening und -früherkennung</i>	13
1.4.1	Toluidinblau	13
1.4.2	Fluoreszenzdiagnostik	14
1.4.3	Autofluoreszenz	14
1.4.4	Computergestützte Bildanalyse ( <i>Oral CDx</i> <sup>®</sup> )	15
1.5	<i>Ziele der Arbeit</i>	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	<i>Studienaufbau, Patientenkollektiv und Abgrenzung der eigenen Leistung</i>	17
2.2	<i>Entnahme der Bürstenabstriche</i>	17
2.3	<i>Aufarbeitung und Diagnostik im Funktionsbereich Cytopathologie</i>	18
2.4	<i>Planung der zu entnehmenden Daten aus Patientenakten</i>	25
2.5	<i>Aktenstudium</i>	26
2.5.1	Befunddokumentationssystem „dc-pathos“	26
2.5.2	Digitale Akte im Krankenhausinformationssystem Medico <sup>®</sup>	27
2.5.3	Papierakten	27
2.6	<i>Festlegung und Ermittlung des Referenzstandards (Follow-up)</i>	28
2.7	<i>Statistische Aufarbeitung</i>	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1	<i>Patientenkollektiv</i>	31

3.1.1	<i>Follow-up</i>	31
3.1.2	Untersuchungszeitraum	34
3.1.3	Geschlechter- und Altersverteilung	34
3.1.4	Risikofaktoren	35
3.2	<i>Mundschleimhaut-Läsionen</i>	37
3.2.1	Lokalisation der MSH-Läsion	37
3.2.2	Zytologische Diagnosegruppen	38
3.2.3	Klinische Diagnosen	39
3.2.4	(Prä-)Maligne Veränderungen	41
3.3	<i>Diagnostische Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik</i>	44
3.3.1	Variante A	45
3.3.2	Variante B	46
3.3.3	Variante C	47
3.4	<i>Subgruppenanalyse der zytologisch unklaren Fälle im Vergleich mit DNA-Bildzytometrie</i>	48
3.4.1	Treffsicherheit der korrespondierenden zytologischen Diagnosen bei den DNA-zytometrisch auswertbaren Fällen	50
3.4.2	Treffsicherheit der DNA-Bildzytometrie, Variante 1	51
3.4.3	Treffsicherheit der DNA-Bildzytometrie, Variante 2	52
3.4.4	Gegenüberstellung von aneuploiden DNA-Bildzytometrischen Ergebnissen, Zytologie und <i>Follow-up</i> -Daten	52
3.5	<i>Kombination der Auswertung von DNA-Bildzytometrie- und Zytologie-Ergebnissen</i>	54
3.5.1	Variante A1	55
3.5.2	Variante A2	56
3.6	<i>Ermittlung der zytologischen Treffsicherheit bei gleichbleibendem Behandler</i>	56
4	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
4.1	<i>Selektion des Patientenkollektivs</i>	58
4.2	<i>Klinische Daten des Patientenkollektivs: Altersverteilung, Abstrichlokalisierung, Entitäten, Risikofaktoren und Rezidive sowie Stadien bei Karzinomen</i>	59
4.3	<i>Zytologische Treffsicherheit im Literaturvergleich</i>	65
4.4	<i>Treffsicherheiten der alleinigen DNA-Bildzytometrie</i>	69
4.5	<i>Treffsicherheit von kombinierter Zytologie und DNA-Bildzytometrie</i>	70
4.6	<i>Treffsicherheit bei gleichbleibendem Behandler</i>	72
4.7	<i>Schlussfolgerungen</i>	73
5	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>76</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Mundschleimhautkarzinome**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Mundschleimhautkarzinome sind in Deutschland häufige Tumorentitäten und liegen bei Männern an 7., bei Frauen an 15. Stelle der Krebsneuerkrankungen, wobei das Plattenepithelkarzinom (PEC) mit 87% den Hauptanteil ausmacht [1]. Allein in Deutschland gab es im Jahre 2015 fast 14.000 Neuerkrankungen, wovon das mittlere Erkrankungsalter bei Männern 62 und bei Frauen 65 Jahre betrug [1]. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate war 2015 in Deutschland mit 47% bei Männern und 63% bei Frauen niedrig, wobei frühe Tumorstadien eine deutlich günstigere Prognose haben [1, 2]. Weltweit gesehen sind die Prognosen etwas besser und sind vor allem nach der Jahrtausendwende gestiegen: Amit et al. werteten Daten aus 7 internationalen Kliniken mit dem Schwerpunkt Krebsbehandlung („Krebszentren“) aus, darunter auch Deutschland, und stellten eine Verbesserung der relativen 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 2001 und 2011 im Vergleich zum vorhergehenden Jahrzehnt fest. Diese Verbesserung von 59% auf 70% lag unter anderem an neuen operativen und adjuvanten Therapiemöglichkeiten, besserer präoperativer Bildgebungstechnik (z.B. MRT, CT) und interdisziplinären Behandlungsteams [3]. Global betrachtet ist die Inzidenz von oralen Karzinomen in Süd-Asien, Ost- und West-Europa, Lateinamerika, der Karibik und Melanesien mit über 10 Fällen pro 100.000 Einwohnern am höchsten. Männer (5.5 Fälle pro 100.000) sind weltweit mehr als doppelt so häufig betroffen wie Frauen (2.5 Fälle pro 100.000) [4]. In Deutschland waren 2016 mit einer Inzidenz von 17,6 Fällen pro 100.000 Einwohnern sogar fast dreimal so viele Männer betroffen wie Frauen (6,5 Fälle pro 100.000 Einwohnern) [1].

### **1.1.2 Risikofaktoren**

Als schwerwiegendste Risikofaktoren für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms werden der Verzehr von Alkohol und der Konsum von Tabak angesehen [5]. In einer älteren Studie von Blot et al. waren diese beiden Risikofaktoren in den westlichen Ländern für die Entstehung von 75% der Plattenepithelkarzinome verantwortlich [6]. Dabei ist durch einen synergistischen

Effekt das Risiko bei kombiniertem Alkohol- und Tabakverzehr besonders hoch und ist beispielsweise nach 25-jährigem Konsum um mehr als das 140-fache erhöht [6-8].

Beim Tabakkonsum entstehen Nitrosamine und freie Radikale, die z.B. durch DNA-Alkylierung oder durch Hemmung anti-oxidativer Enzyme zu vermehrten Mutationen in der DNA führen und so kanzerogen wirken können. Beim Alkohol ist vor allem die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd (einem Karzinogen) durch die Alkoholdehydrogenase gefährlich [9]. Es wirkt aber auch als Solvens, wodurch Karzinogene wie der Tabakrauch leichter in die Mundschleimhaut eindringen können [10]. Außerdem ist bei chronischem Alkoholkonsum die Speicheldrüsenfunktion vermindert, sodass die schützende Reinigungsfunktion des Speichels entfällt und Karzinogene länger im Mund verweilen können [11].

Auch das vor allem in Asien und Afrika verbreitete Nutzen von Kautabak (Betel) zählt zu den Risikofaktoren bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen [7]. Zu den etablierten Risikofaktoren gehören außerdem eine persistierende HPV (Humane Papillomviren)- und/oder Candida-Infektion und systemische Erkrankungen wie zum Beispiel eine Immunsuppression [12, 13]. Des Weiteren erhöhen erbliche Erkrankungen mit chromosomaler Instabilität und Defekten der DNA-Reparatur, wie z.B. die Fanconi-Anämie, das Risiko für eine Entwicklung eines PEC [14]. Bei der Fanconi-Anämie ist das Risiko gegenüber der Normalbevölkerung um das 500-700-fache erhöht [15]. Als mögliche Risikofaktoren werden außerdem eine einseitige, vitaminarme Ernährung, schlechte Mundhygiene und mechanische Irritationen diskutiert [1].

### **1.1.3 Klinische Symptome**

In vielen Fällen entsteht ein PEC nach oder während einer Schleimhauterkrankung wie beispielsweise Lichen planus. Zu Beginn zeigen sie meist keine klinischen Symptome und wachsen zunächst schmerzlos und daher vom Patienten oft unbemerkt. Erst im fortgeschrittenen Stadium kommt es, je nach Lokalisation der Neoplasie, zu Schmerzen, Dysphagie, eingeschränkter Mastikationsfähigkeit oder geringerer Zungenmobilität. Ihr Wachstum kann endophytisch, exophytisch oder submukös erfolgen. Die Tumoroberfläche ist oft ulzeriert oder keratotisch und in einigen Fällen superinfiziert [16, 17].

### 1.1.4 Früherkennung, Diagnostik und Therapie

In der Leitlinie der DGMKG (Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie) von 2019 „Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde“ werden die Inspektion und Palpation der Mundschleimhaut als notwendige Untersuchungen oraler potenziell maligner Läsionen genannt. Die gesamte Mundhöhle, Lippen und angrenzende Regionen sollen dafür halbjährlich systematisch untersucht und kritisch begutachtet werden. Fakultativ können ergänzend beispielsweise Röntgenmaßnahmen und Sensibilitätsprüfungen durchgeführt werden. Wenn keine chirurgische Biopsie indiziert ist, aber z.B. bei der Verlaufskontrolle einer Läsion Zweifel aufkommen, ist die Bürstenbiopsie als Möglichkeit der morphologischen Abklärung einer Läsion genannt. Die Bürstenbiopsie wird auch als Alternative empfohlen, wenn die Erfolgsaussichten einer chirurgische Biopsie beispielsweise bei chronischen, regionenübergreifenden, flächigen Läsionen gering sind, da es dabei schwierig wäre, repräsentatives Untersuchungsmaterial zu gewinnen [18].

Auch eine weitere Leitlinie der DGMKG aus dem Jahre 2012 mit dem Titel „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“ empfiehlt primär nur eine Inspektion der gesamten Mundschleimhaut. Außerdem wird empfohlen, die Aufklärung der Patienten über Risikofaktoren und Anzeichen von PEC zu verbessern und bei unklaren Schleimhautveränderungen, die seit mehr als zwei Wochen bestehen, eine unmittelbare Überweisung zum Spezialisten durchzuführen. Im Falle eines Karzinoms soll dort dann weiterführende Diagnostik mithilfe von bildgebenden Verfahren (u.a. Ultraschall, MRT, CT, Thorax-CT) erfolgen, um Informationen bezüglich Primärtumor und einer möglichen Metastasierung zu gewinnen, anschließend sollen chirurgische Biopsien (initial meist aus dem Randbereich des Tumors) erfolgen. Die Behandlung eines Mundhöhlenkarzinoms soll interdisziplinär erfolgen, beispielsweise sollen Hals-Nasen-Ohren-Ärzte, Onkologen, Radiologen und Pathologen miteinbezogen werden [19].

Im Falle eines PEC ist die Therapie abhängig von der Art (*Typing*), dem Malignitätsgrad (*Grading*) und der Ausbreitung (*Staging*) des Tumors. Sie basiert auf Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie, wobei letztere nur bedingt einsetzbar ist. Oft werden dabei mehrere dieser Therapieverfahren in Kombination

eingesetzt. Die Ziele der Behandlung sind entweder kurativ oder palliativ, je nach Stadium des Tumors.

Chirurgisch wird der Primärtumor meist radikal entfernt. Da Mundhöhlenkarzinome oft früh lymphogen metastasieren, ist in vielen Fällen außerdem eine *Neck Dissection* zur Entfernung der submentalen und submandibulären Lymphknoten einseitig oder beidseitig indiziert [17].

Eine Strahlentherapie erfolgt entweder adjuvant oder als alleinige Therapiemaßnahme. Dabei werden für die Therapie des Primärtumors tägliche Einzeldosen von 1,8 bis 2 Gy angewandt, bis eine Gesamtreferenzdosis von 57,6 bis 68,4 Gy erreicht ist [20, 21].

Die systemische Chemotherapie wird vor, während oder nach den anderen beiden Therapieverfahren genutzt. Dabei wird beispielsweise Cisplatin als Zytostatikum eingesetzt [22].

Seit 2006 ist durch den monoklonalen Antikörper Cetuximab eine individualisierte Tumorthherapie möglich. Cetuximab inhibiert den in epithelialen Tumorzellen überexprimierten epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), eine Tyrosin-Kinase, und hemmt so ein aggressives Wachstum des Tumors. Cetuximab wird entweder in Kombination mit Chemotherapie oder mit Strahlentherapie angewandt [23].

Vor allem bei rezidivierenden und metastasierenden Tumoren konnte durch eine Kombination von Cetuximab mit platinbasierter Chemotherapie und 5-Fluorouracil die Überlebensdauer der Patienten verlängert werden [24]. Ähnliche Erfolge verzeichnet das seit 2016 zugelassene Nivolumab, ein monoklonaler Antikörper gegen PD1-Rezeptoren (*programmed cell death protein 1*) auf T-Lymphozyten, welcher vor allem zum Einsatz kommt, wenn eine vorherige Chemotherapie nicht den gewünschten Erfolg verzeichnen konnte [25].

### **1.1.5 TNM-Klassifikation**

Zur Stadieneinteilung maligner Tumore wird die TNM-Klassifikation angewendet (Tabelle 1). Diese von der UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) entwickelte Klassifikation ermöglicht einen Überblick über Tumorgröße (=T), Lymphknotenbefall (=N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (=M) und lässt so erste Bewertungen hinsichtlich Therapieplanungen und Prognosen zu [4, 26]. Die Angaben in Tabellen 1 und 2 beziehen sich auf die im Studienzeitraum 2014-2015 gültigen 7. Auflage der TNM-Klassifikation.

<b>Primärtumor (T)</b>	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	kein Anhalt auf Primärtumor
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Tumor im größten Durchmesser $\leq 2$ cm
T2	Tumor im größten Durchmesser $> 2$ cm, aber $\leq 4$ cm
T3	Tumor im größten Durchmesser $> 4$ cm
T4a	<u>Mundhöhle</u> : Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in äußere Zungenmuskulatur, Kieferhöhle oder Haut (Gesicht)
T4b	<u>Lippe und Mundhöhle</u> : Tumor infiltriert <i>Spatium masticatorium</i> , Schädelbasis oder <i>Processus pterygoideus</i> oder umschließt die A. carotis interna
<b>Regionäre Lymphknoten (N)</b>	
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem einzigen ipsilateralen Lymphknoten $\leq 3$ cm
N2a	Metastase in einem einzigen ipsilateralen Lymphknoten $> 3$ cm bis $\leq 6$ cm
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten alle $\leq 6$ cm
N2c	Metastase in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten $\leq 6$ cm
N3	Metastase in einem Lymphknoten $> 6$ cm
<b>Fernmetastasen (M)</b>	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation der Karzinome der Lippe und Mundhöhle** nach der im Studienzeitraum 2014/2015 gültigen Version der WHO/UICC [4, 27].

Für etwas genauere Prognosen wurden anhand der TNM-Klassifikationen „*Stage groups*“ gebildet (Tabelle 2). Die Konstellation in einer gemeinsamen Gruppe haben eine ähnliche Prognose und/oder Therapieansätze. Je höher die römische Zahl, desto schlechter ist die Prognose [4, 28].

<b>Stage Grouping</b>	<b>Definition</b>
Stage 0	Tis N0 M0
Stage I	T1 N0 M0
Stage II	T2 N0 M0
Stage III	T1-2 N1 M0
	T3 N0-1 M0
Stage IVA	T1-3 N2 M0
	T4a N0-2 M0
Stage IVB	jedes T N3 M0
	T4b jedes N M0
Stage IVC	jedes T jedes N M1

**Tabelle 2: Stage Grouping der Karzinome der Lippe und Mundhöhle nach WHO/AJCC [27].**

## **1.2 Orale potenziell maligne Erkrankungen**

Das Mundschleimhautkarzinom entsteht oft nicht *de novo*, sondern über verschiedene, meist morphologisch auffällige Vorstufen, welche aber keinesfalls als spezifisch angesehen werden und sich morphologisch unklar präsentieren können [29].

Die WHO definiert diese sogenannten oralen potenziell malignen „Störungen“ als klinische Präsentationen, die ein Risiko für eine Krebsentstehung in der Mundhöhle besitzen, und zwar entweder in einer klinisch definierbaren Vorläuferläsion oder in klinisch normaler Mukosa [4]. Gemeinsam ist ihnen eine höhere Wahrscheinlichkeit der Tumorbildung als in normalem Gewebe [30].

### **1.2.1 Leukoplakie**

Als nicht-abwischbare, weißliche Veränderung, die sich keiner anderen Krankheit zuordnen lässt, wurde die Leukoplakie von der WHO definiert. Es handelt sich

hierbei demzufolge um eine Ausschlussdiagnose, die nur anhand der Klinik getroffen wird [31, 32]. Sie gilt als häufigste orale Präkanzerose, wobei verschiedene Faktoren über das Entartungsrisiko, welches von 0,1-36% schwankt, entscheiden [33]. Risikofaktoren für die Entartung einer Leukoplakie sind [34]

- 1) Lokalisierung auf Mundboden oder Zunge
- 2) Leukoplakie bei Nichtrauchern (idiopathische Leukoplakie)
- 3) Größe >200mm<sup>2</sup>
- 4) Inhomogener Typ
- 5) Vorkommen von Dysplasien im Epithel
- 6) Weibliches Geschlecht
- 7) Lang andauerndes Vorhandensein der Veränderung
- 8) Anwesenheit von Candida albicans.

Weltweit gesehen ist das Risiko der malignen Transformation einer Leukoplakie mit 1-2% eher gering, insbesondere bei Vorliegen einer epithelialen Dysplasie aber mit 12% erhöht [4]. Anhand der klinischen Oberflächenstruktur unterscheidet man zwischen homogener und inhomogener Leukoplakie. Die homogene Leukoplakie zeigt sich meist als eine flache, dünne Veränderung, die ein sehr geringes Entartungsrisiko hat. Die inhomogene Leukoplakie entartet deutlich häufiger und lässt sich weiter in plan, nodulär und verrukös unterteilen, wobei letztere sich klinisch nicht von einem verrukösen Plattenepithelkarzinom unterscheiden lässt [34].

Auch das histologische Bild der Leukoplakie kann sich vielseitig darstellen. Neben einer Hyperkeratose ist das Auftreten von Dyskeratosen, Basalzellhyperplasien oder Dysplasien möglich. Zu den Ursachen für die Entstehung einer Leukoplakie zählen unter anderem Kautabak, Zigarettenrauch, Alkohol, Soor, mechanische Irritation und UV-Strahlung. Nach Entfernung der Ursache ist eine vollständige Rückbildung der Leukoplakie möglich [16, 35]. Da grundsätzlich jede Veränderung, die länger als 2 Wochen besteht, als tumorverdächtig angesehen werden soll, wird laut Leitlinie bei Persistenz zu engmaschiger Kontrolle und weiterführender Diagnostik geraten [19].

### 1.2.2 Erythroplakie

Analog zur Definition der Leukoplakie wurde auch die Erythroplakie von der WHO als feurig rote Veränderung, die sich keiner anderen Erkrankung zuordnen lässt, definiert [36]. Im Falle einer Mischung von weißen und roten Flecken spricht man von einer Erythroleukoplakie [34].

Zu den wichtigsten Differenzialdiagnosen der Erythroplakie gehören der atrophische Lichen planus und die erythematöse Candidiasis [37]. Klinisch präsentiert sich die Erythroplakie als flache oder indurierte Läsion, die sich meist am Mundboden, der ventralen Zunge, dem weichen Gaumen oder dem Tonsillenschlund befindet. Zwar ist das Vorkommen von Erythroplakien selten, allerdings ist ihr Entartungsrisiko das höchste aller oralen potenziell malignen Störungen [38]. Aufgrund dieses hohen Entartungsrisikos und wegen der meist begleitenden Symptomatik wird bei Erythroplakien die chirurgische Exzision empfohlen [34]. Bei der histologischen Untersuchung der Biopsate liegen meist schon ein *Carcinoma in situ* oder ein invasives Karzinom vor, nur in wenigen Fällen sind geringe bis mäßige Dysplasien zu erkennen [37].

### 1.2.3 Lichen planus

Beim Lichen planus werden basale Keratinozyten von T-Lymphozyten zerstört, die genaue Ursache dafür ist bisher nicht bekannt. Betroffen sind vor allem Frauen. Unterteilt wird die Autoimmunerkrankung in fünf klinische Verlaufsformen:

- 1) Retikulärer Lichen
- 2) Ulzerierender/erosiver Lichen
- 3) Plaquetförmiger Lichen
- 4) Bullöser/papulärer Lichen
- 5) Erythematöser/athrophischer Lichen

Je nach Verlaufsform unterscheidet sich das Entartungsrisiko deutlich von 0-12,5%, im Durchschnitt liegt es bei ca. 1% [16, 39].

Die Lokalisation der Erkrankung ist in 80% der Fälle die Wange, meist bilateral, seltener sind Zunge, Lippen, Gingiva, Gaumen und Mundboden betroffen. Das histologische Bild zeigt eine Akanthose, Hyperkeratose, vakuolige Degeneration der Basalzellschicht mit apoptotischen Keratinozyten und ein bandförmiges subepitheliales Lymphozyteninfiltrat [16].

## **1.2.4 Weitere potenziell maligne Erkrankungen**

Zu den weiteren möglichen Vorläufern eines Plattenepithelkarzinoms gehört beispielsweise die orale submuköse Fibrose, welche fast nur in Südostasien vorkommt und mit dem Kauen von Betel assoziiert wird [34]. Außerdem zählt man die aktinische Cheilitis, das Plummer-Vinson-Syndrom, den diskoiden Lupus erythematodes, Syphilis, das Xeroderma pigmentosum, die Dyskeratosis congenita, Epidermolysis bullosa und Gaumenveränderungen, die mit dem *reverse smoking* zusammenhängen, zu den oralen potenziell malignen Störungen [4, 36, 40].

## **1.3 Zytologische Untersuchung von Mundschleimhautläsionen als Früherkennung**

### **1.3.1 Warum überhaupt zytologische Untersuchungen der Mundschleimhaut: Indikationen der Bürstenbiopsie**

Vielfach, insbesondere in besonderen Konstellationen wie der Fanconi-Anämie, sind maligne transformierte Mundschleimhautläsionen, ob bereits als invasives Plattenepithelkarzinom vorliegend oder noch im Stadium einer *high grade* Dysplasie, bereits klinisch-inspektorisch oder palpatorisch auffällig [41]. Da die Prognose des Mundschleimhautkarzinoms in niedrigem Stadium deutlich besser ist als in späten Stadien, sollte eine Früherkennung angestrebt werden. Hierzu bietet sich eine morphologische Abklärung klinisch auffälliger Läsionen, insbesondere vom Phänotyp einer oralen potenziell malignen Läsion an. Diese betreffen mit Ausnahme der oralen submukösen Fibrose das Epithel und sind daher mit der Entnahme von Zellen der oralen Mukosa abklärbar. Da aufgrund der im Vorkapitel genannten Ausführungen mit einer meist niedrigen Rate der malignen Transformation zu rechnen ist, wäre die regelhafte chirurgische Biopsie mit einer Überdiagnostik behaftet. Gemäß der letztgültigen S3 Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, aber auch in der aktualisierten S2k Leitlinie zum Umgang mit den Vorläuferläsionen ist als alternative Abklärungsmöglichkeit die zytologische Bürstenbiopsie genannt [18, 19].

Im Vergleich mit konventionellen chirurgischen Biopsien bieten orale Abstriche mit einer Bürste einige Vorteile. Neben dem wirtschaftlichen Aspekt der geringen Kosten ist eine Bürstenbiopsie einfach, mit wenigen Materialien und schnell

durchzuführen, weswegen sie sich ohne großen Aufwand gut in den Klinikalltag integrieren lässt [42].

Durch den zusätzlichen großen Vorteil der Nichtinvasivität dieser Methode ist eine Durchführung auch bei Angstpatienten meist problemlos möglich. Außerdem werden chirurgische Biopsien wegen ihrer Invasivität oft nur bei dringend verdächtigen Mundschleimhautveränderungen durchgeführt, wohingegen das Indikationsspektrum der Bürstenbiopsien deutlich breiter ist [43].

Mit der Bürstenbiopsie einer verdächtigen Läsion und anschließender zytopathologischer Untersuchung lassen sich sehr gute Ergebnisse in der Ausschlussdiagnostik, Früherkennung und Nachsorge des Mundschleimhautkarzinoms sowie von oralen potenziell malignen Störungen erzielen [44]. Die gepoolte Sensitivität und Spezifität beträgt in einer aktuellen Cochrane-Analyse jeweils 91% [45].

### **1.3.2 Durchführung und optimale Bedingungen der Bürstenbiopsie**

Nach ausführlicher inspektorischer und palpatorischer Untersuchung der Mundhöhle werden bei neoplasieverdächtigen Mundschleimhautveränderungen Abstriche mithilfe einer Zytobürste durchgeführt. Mit dieser wird rotierend und unter leichtem Druck mehrmals über die Läsion gestrichen, um möglichst viele Zellen zu gewinnen [46].

Bei der konventionellen Zytologie wird anschließend die Bürste auf einem Objektträger erneut rotierend ausgestrichen und der Ausstrich sofort mit Alkohol fixiert. Bei der Durchführung sollte darauf geachtet werden, dass pro Läsion eine eigene Bürste und ein eigener Objektträger verwendet wird, da sonst die Ergebnisse nicht eindeutig einer Lokalisation zugeordnet werden können.

Bei jeder Patientenvorstellung beim Zahnarzt sollte im Rahmen des intraoralen Befundes die Mundschleimhaut auf Auffälligkeiten untersucht werden. Bei unklaren, neoplasieverdächtigen Veränderungen sollte neben einer Bürstenbiopsie auch eine Dokumentation über Größe, Farbe, Oberflächenstruktur und Lokalisation der Veränderung in der Patientenakte erfolgen.

### 1.3.3 Dünnschichtzytologie

Die Dünnschichtzytologie (*liquid-based cytology*) wurde ab dem Jahre 1940 in der gynäkologischen Vorsorgezytologie zur Erkennung des Zervixkarzinoms und dessen Vorstufen eingesetzt. Heutzutage ist diese Methode aus der Gynäkologie nicht mehr wegzudenken, wird aber auch in der oralen Krebsfrüherkennung eingesetzt [47, 48].

Bei der Dünnschichtzytologie werden mithilfe einer Plastikbürste Zellen entnommen, die dann in einem Gefäß mit konservierender Flüssigkeit in ein Labor transportiert werden. Dort werden daraufhin aus der Zellsuspension Dünnschichtpräparate hergestellt [49].

Dabei entstehen homogene Präparate mit hellem Hintergrund, da durch diese Methode unerwünschte Blutzellen, Schleim und Ablagerungen entfernt werden [50].

Im direkten Vergleich zeigte in einer Studie die Dünnschichtzytologie eine höhere Sensitivität (95,1%) und Spezifität (99%) als die konventionelle Bürstenbiopsie (Sensitivität 85,7%, Spezifität 95,9%) [51]. Ein weiterer Vorteil der Dünnschichtzytologie besteht darin, dass sie mehr Optionen zur Untersuchung, wie zum Beispiel die zusätzliche HPV-Diagnostik, ermöglicht. Allerdings ist die Dünnschichtzytologie auch mit höheren Kosten verbunden und benötigt mehr Laborgeräte. Genau wie die konventionelle Bürstenzytologie sollte eine Dünnschichtzytologie nie eine chirurgische (Exzisions-)Biopsie zur definitiven Abklärung ersetzen, sondern als nicht invasive, schnelle und kostengünstige Methode zur Abklärung klinisch verdächtiger Läsionen und zur Weichenstellung des weiteren Vorgehens genutzt werden [48, 52].

Leider ergeben sowohl konventionelle zytologische Verfahren als auch die Dünnschichtzytologie mikroskopisch nicht immer sicher tumorpositive oder -negative Diagnosen, sondern auch unklare Befunde, z.B. „tumorverdächtig“ oder „zweifelhaft“ (Tumor nicht auszuschließen). Zytologische Klassifikationssysteme berücksichtigen national und international diesen Umstand, welcher in Kapitel 2.3 weiter ausgeführt wird. Bei zytologisch unklaren Diagnosen kann zur weiteren Abklärung am gleichen Untersuchungsmaterial auf zusätzliche Verfahren, wie z.B. die DNA-Bildzytometrie zurückgegriffen werden.

### 1.3.4 DNA-Bildzytometrie

Als ergänzende Methode zur konventionellen Bürstenbiopsie, aber auch zur Dünnschichtzytologie, kann in vielen Fällen die DNA-Bildzytometrie angewandt werden. Es lässt sich hiermit das Vorliegen einer DNA-Aneuploidie nachweisen, die als spezifischer und sensitiver Marker für eine maligne Transformation suspekter Zellen gilt [47, 53].

Die DNA-Bildzytometrie ist indiziert, wenn z.B. bei konventionell-zytologisch zweifelhaften Läsionen Tumorzellen nicht sicher auszuschließen sind oder wenn eine tumorverdächtige Diagnose verifiziert werden soll [42]. Es ist hierbei von außerordentlichem Vorteil, dass die gleichen mikroskopisch suspekten Zellen erneut mittels DNA-Bildzytometrie untersucht werden können. Dafür werden die bereits konventionell-mikroskopisch beurteilten Präparate zunächst nach Feulgen umgefärbt und mit Hilfe eines Lichtmikroskopes mit angeschlossenem Computerbasiertem Bildanalyse-System untersucht [54]. Mit Hilfe normaler im Präparat enthaltener Zellen werden Referenzwerte der integrierten optischen Dichte (IOD) festgelegt. Die IODs von suspekten Zellkernen werden nun mit der Referenz-IOD verglichen und in einem Histogramm eingetragen. Die Referenz-IOD entspricht dem DNA-Gehalt ( $content=c$ ) von unauffälligen Zellkernen, der in Anlehnung an den diploiden Chromosomensatz als „2c“ bezeichnet wird. Dies ist möglich, da in der Färbereaktion der verwendete Farbstoff kovalent an die DNA bindet und damit zum DNA-Gehalt stöchiometrisch ist. Es lassen sich so Häufigkeitsgipfel von ruhenden Zellen mit gleichem DNA-Gehalt im DNA-Histogramm erkennen die, wenn sie eine Proliferationsfraktion (S-Phase-Fraktion) erkennen lassen, als Stammlinie bezeichnet werden.

Bei normalem und regenerativ aktivem Gewebe hat das DNA-Histogramm typischerweise Häufigkeitsgipfel bei 2c und 4c. Bei einer Abweichung der Stammlinienlage um mehr als 10% von diesen Normwerten oder abnorm hohen Werten von Einzelzellen über 9c liegt eine DNA-Aneuploidie vor [55].

Durch die Kombination von konventioneller Bürstenbiopsie und DNA-Bildzytometrie wurde in verschiedenen Studien am Universitätsklinikum Düsseldorf eine Sensitivität der Untersuchung von 97,8-100% und eine Spezifität von 97,4-100% erreicht. Mit Hilfe der Kombination beider Methoden kann die Erkennungsrate von Karzinomen oder maligne transformierter Vorläuferläsionen (obligate Präkanzerosen) also deutlich verbessert werden [46, 55]. Die

DNA-Bildzytometrie ist außerdem gut reproduzierbar und kostengünstig, wodurch sie heutzutage ihren großen Stellenwert in der weiterführenden Diagnostik von Mundschleimhautveränderungen nicht verloren hat [41, 47, 55].

## **1.4 Weitere nicht-invasive Untersuchungsmethoden für Mundkrebs-Screening und -früherkennung**

Im Vorkapitel wurde die Zytologie als Methode der Früherkennung bei morphologisch auffälligen Läsionen vorgestellt. Früherkennung von Läsionen muss aber von einer Screening-Situation, bei der „gesunde“ Risikopersonen (ggf. auch ohne sichtbare Läsionen) untersucht werden, unterschieden werden. Es gibt Evidenz dafür, dass die Inspektion der Mundhöhle bei Menschen mit hohem Mundkrebsrisiko im Rahmen eines Screenings die Mortalität von Mundkrebs reduziert und außerdem zu Erkennung in früheren Tumorstadien führt. Dieser Zusammenhang lässt sich bislang für die im Folgenden vorgestellten Methoden, aber auch für die orale Bürstenzytologie im Screening-Einsatz bislang noch nicht belegen [13].

### **1.4.1 Toluidinblau**

Ein weiteres Hilfsmittel zur Erkennung von Dysplasien ist der Einsatz von Toluidinblau. Dafür wird eine Toluidinblau-Lösung für 30 Sekunden auf die suspekte Schleimhaut aufgetragen und anschließend mit Essigsäure abgespült. Der azidophile metachromatische Farbstoff lagert sich selektiv an sauren Gewebekomponenten an, beispielsweise an Sulfaten und Phosphatradikalen, wodurch DNA und RNA gefärbt werden [56]. Das Vorgehen basiert also auf der Annahme, dass dysplastische Zellen mehr Nukleinsäuren aufweisen als normale Zellen und dadurch stärker angefärbt werden [56, 57]. Da allerdings auch bei Ulzerationen, die beispielsweise durch traumatische oder inflammatorische Prozesse entstehen, eine erhöhte Regeneration des Epithels abläuft, weist das Verfahren eine geringe Spezifität auf. Diese lag in verschiedenen Studien zwischen 32% und 48%, während die Sensitivität 100% betrug [58]. Während Toluidinblau demnach als alleiniges Untersuchungsmittel zu unsicher ist, kann es beispielsweise bei großflächigen Leukoplakien helfen, die Lokalisation mit der höchstgradigen Dysplasie zu finden, um dort gezielt zu biopsieren [58].

## **1.4.2 Fluoreszenzdiagnostik**

In der Fluoreszenzdiagnostik, auch Photodynamische Diagnose (PDD) genannt, gilt die körpereigene Substanz 5-Aminolävulinat (5-ALA) als Mittel der Wahl, da es lokal oder systemisch appliziert die Porphyrinsynthese anregt. Die Veränderung der Lipidbarriereschicht bei neoplastischen Zellen resultiert in einer defekten Zelloberfläche, in die 5-ALA vereinfacht eindringen kann. In Kombination mit der veränderten Hämbiosynthese bei Tumorzellen, kommt es daher zu einer Anreicherung von Protoporphyrin IX (PpIX) in neoplastischem Gewebe [59, 60].

Für die Anwendung im oralen Bereich wird beispielsweise eine Mundspülung mit 5-ALA verwendet, mit welcher der Patient mehrere Minuten umspült.

Bei anschließender Stimulation des Gewebes mit blau-violetterem Licht (380-440 nm), kommt es zu einer Fluoreszenz des dadurch synthetisierten (5-Aminolävulinat-induzierten) PpIX. Mithilfe von Filtern und Kameras lässt sich diese gut darstellen und so malignes von gesundem Gewebe abgrenzen [59, 60]. Während die Sensitivität bei der Fluoreszenzdiagnostik hoch ist (84-99%), ist die Spezifität (60-89%) geringer [61]. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Da einige Bakterienstämme in der Lage sind, nach 5-ALA-Gabe PpIX zu synthetisieren, kann eine schlechte Mundhygiene zu falsch positiven Ergebnissen führen. Daher wird zur Durchführung einer professionellen Zahnreinigung und Munddesinfektion unmittelbar vor der Fluoreszenzdiagnostik geraten [59].

Eine weitere Ursache für falsch positive Ergebnisse kann eine vorangegangene Radiatio im Kopf-Hals-Bereich sein. Da diese zu einer irreversiblen Zellstrukturveränderung führt, kommt es dort zu einer erhöhten Akkumulation von PpIX. Daher ist die Fluoreszenzdiagnostik bei einem Rezidivverdacht kontraindiziert und sollte eine chirurgische Biopsie nie ersetzen, sondern nur ergänzend angewendet werden [59].

## **1.4.3 Autofluoreszenz**

Als Autofluoreszenz bezeichnet man die Eigenschaft von Gewebe zu fluoreszieren, wenn es Licht einer bestimmten Wellenlänge ausgesetzt wird [61]. Dabei wird zwischen der porphyrinabhängigen und der porphyrinunabhängigen Autofluoreszenz unterschieden. Erstere basiert auf Bakterien, die sich auf nekrotischen Tumoroberflächen befinden und Porphyrin bilden. Dabei entsteht allerdings meist ein inhomogenes Fluoreszenzbild mit irritierenden und falsch

positiven Ergebnissen, da sich diese Bakterien beispielsweise auch auf Zahnhälsen und dem Zungenrücken befinden können [60]. Daher besitzt die porphyrinunabhängige Autofluoreszenz heutzutage einen höheren Stellenwert. Sie gründet auf endogenen, physiologisch vorkommenden Fluorophoren, wie beispielsweise Kollagen, Elastin, NADH, FADH und aromatischen Aminosäuren, die entweder im Gewebeaufbau oder im Stoffwechsel eine Rolle spielen. Diese Fluorophore sind in unterschiedlicher Zusammensetzung und Konzentration vorhanden, je nach Gewebeart, Stoffwechselzustand und Gewebedicke und definieren so verschiedene Autofluoreszenzspektren [62]. Durch Veränderungen dieser Faktoren in neoplastischem Gewebe, beispielsweise durch eine präkanzeröse Epithelschichtverdickung, lässt sich mithilfe der Autofluoreszenz zwischen gesunden, prämaligen und malignen Läsionen unterscheiden [60, 63]. Ein Vorteil der Autofluoreszenz besteht darin, dass keine fluoreszierenden Chemikalien verabreicht werden müssen, wodurch sich der Behandlungsaufwand und das Risiko für Nebenwirkungen verringert [61, 64].

Allerdings ist die Sensitivität der Autofluoreszenz abhängig von der Lokalisation der Schleimhautläsion. Sie wurde zwar in einigen Studien als sehr hoch gelobt, allerdings wurden da oft Entzündungen oder Veränderungen wie Lichen planus nicht mit einbezogen. In einer Studie von Koch et al., in denen diese Veränderungen inkludiert waren, konnten erythematöse, benigne Läsionen mithilfe der Autofluoreszenz nicht zuverlässig von Plattenepithelkarzinomen unterschieden werden, die Sensitivität betrug nur 18-21% bei einer Spezifität von 98%. Daher bringt das Verfahren für den Behandler keine erhebliche Hilfestellung bei der weiteren Behandlung und Therapieplanung [64].

#### **1.4.4 Computergestützte Bildanalyse (*Oral CDx*<sup>®</sup>)**

Für die computergestützte Bildanalyse werden zunächst mit einer speziellen Bürste, die eine Entnahme aus allen drei Epithelschichten (Superficialzellschicht, Intermediärzellschicht, Basalzellschicht) ermöglichen soll, Zellen gewonnen. Nach dem Ausstreichen auf einem Träger, der Fixierung und der Färbung mit einer modifizierten Papanicolaou-Färbung erfolgt die erste morphologische und zytologische Auswertung mithilfe eines Computerprogrammes. Das Programm filtert die 192 am ehesten auffälligen Zellen heraus und präsentiert sie einem speziell geschulten Pathologen. Während der Computer also eine Vorauswahl

trifft, wird die Interpretation der Ergebnisse allein durch den Pathologen durchgeführt [43, 61, 65].

Sciubba et al. führten 1999 eine klinische Studie mit *Oral CDx*<sup>®</sup> an 945 Patienten durch. Sensitivität (100%) und Spezifität (92,9-100%) waren dabei sehr hoch, außerdem erwiesen sich 4,5% der Läsionen, die klinisch gutartig erschienen, als präkanzerös oder sogar kanzerös [65]. In anderen Studien betrug die Sensitivität 71-100 % und die Spezifität lag zum Teil unter 25%. Das Verfahren ist lizenzgebunden [61]. Auch bei *Oral CDx*<sup>®</sup> handelt es sich nur um ein ergänzendes Verfahren, bei atypischen oder positiven Ergebnissen muss eine chirurgische Biopsie erfolgen [43].

## **1.5 Ziele der Arbeit**

Ziel dieser statistischen Arbeit ist es, die diagnostische Treffsicherheit der oralen Bürstenbiopsie inklusive adjuvanter DNA-Bildzytometrie anhand des Archivmaterials neuerer Einsendungen aus dem Universitätsklinikum Düsseldorf retrospektiv zu ermitteln und mit Treffsicherheiten aus dem internationalen Literaturquerschnitt zu vergleichen. Die bisherigen institutseigenen Treffsicherheitsstudien datieren auf Anfang der 2000er Jahre.

Des Weiteren soll neben der zytologischen Diagnose das Krankheitsspektrum, Häufigkeit, Risikofaktoren und Lokalisation der vorliegenden Mundschleimhautläsionen evaluiert werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studienaufbau, Patientenkollektiv und Abgrenzung der eigenen Leistung**

Vor Beginn der Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf das Projekt hinsichtlich der ethischen und rechtlichen Unbedenklichkeit geprüft (Studiennummer 5719, Votum vom 02.11.2016).

Die Arbeit wurde als eine retrospektive Kohortenstudie aufgebaut. Es erfolgte eine statistische Auswertung der zytopathologischen Befundberichte in der Datenbank dc-Pathos, der Patientenakten (in Papierform) der beteiligten Kliniken am Universitätsklinikum Düsseldorf sowie der relevanten Daten aus der elektronischen Patientenakte im Krankenhausinformationssystem Medico<sup>®</sup>. Es wurden sämtliche aus der Klinik für Mund- Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Kübler) sowie der Poliklinik für zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Becker) eingesandten oralen Bürstenabstriche der Jahre 2014 und 2015 ausgewertet.

Die zytopathologischen Befunde wurden einem anhand der klinischen Befunde in den Patientenakten (vgl. Kapitel 2.5) und ggf. den histopathologischen Diagnosen erhobenen *Follow-up* Referenzstandard gegenübergestellt (vgl. Kapitel 2.6). Die Entnahme der Bürstenabstriche und die zytopathologische Diagnostik wurden nicht von mir, sondern von am Universitätsklinikum angestelltem Personal durchgeführt. Die Planung und Durchführung des Studiums der Datenbanken und Patientenakten, die Darstellung der erhobenen Daten in Tabellenform sowie deren statistische Auswertung sind eigene Leistungen im Rahmen dieser Doktorarbeit.

### **2.2 Entnahme der Bürstenabstriche**

Bei den Patienten wurde nach oraler Inspektion der Mundschleimhaut mit einer Zytobürste (z.B. Gynobrush<sup>®</sup> plus, Fa. Heinz Herenz Hamburg) ein- oder mehrmals unter Drehung der Bürste über die klinisch suspekten Läsionen gestrichen, um Plattenepithelien aus dem Epithelverband herauszulösen (sog. forcierte Exfoliation). Anschließend wurde die Bürste rotierend unter leichtem Druck an

mehreren Stellen auf einem Objektträger ausgestrichen und die so gewonnenen Zellen dann sofort mit Aufsprühen von Alkohol (M-FIX™ Fixationsspray, Fa. Merck KGaA, Darmstadt) aus etwa 20 cm Entfernung fixiert.

Bei jeder Bürstenbiopsie wurde ein Begleitschein für die Cytopathologie ausgefüllt, welcher mindestens Name und Geburtsdatum sowie Versicherungsdaten des Patienten, meist aber auch Angaben zur Lokalisation, klinischem Bild und ggf. Vorerkrankungen und Vortherapien enthielt. Dafür wurden die Läsionen hinsichtlich ihrer Lokalisation, Farbe, Oberflächenstruktur und Größe beschrieben und in vielen Fällen eine Verdachtsdiagnose geäußert.

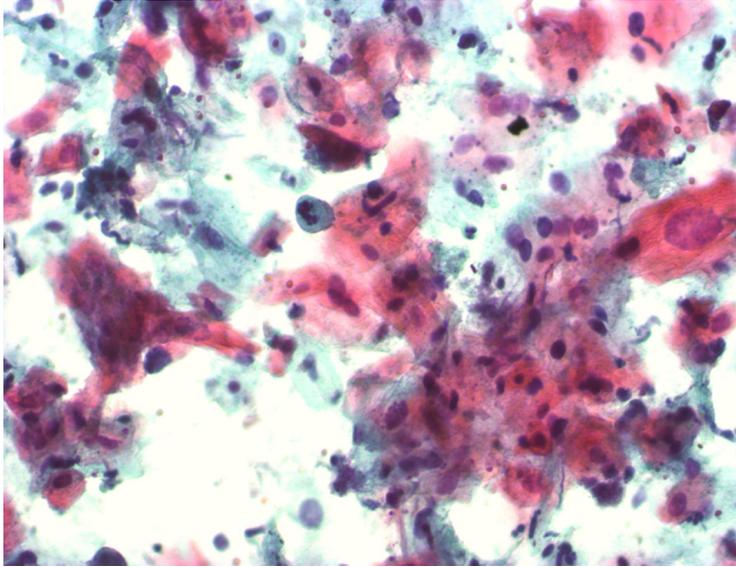
Ebenso wurden wichtige Risikofaktoren, wie beispielsweise ein vorangegangenes Plattenepithelkarzinom, Tabakkonsum oder ein zuvor diagnostizierter Lichen planus auf dem Begleitschein notiert. In fast allen Scheinen wurde außerdem das Hauptanliegen der Frage nach Malignität deutlich gemacht.

## **2.3 Aufarbeitung und Diagnostik im Funktionsbereich Cytopathologie**

Die eingesandten alkoholfixierten zytologischen Präparate wurden im Funktionsbereich Cytopathologie zunächst datenbankmäßig erfasst und anschließend nach Papanicolaou gefärbt. Diese Färbung eignet sich vor allem zur Tumordiagnostik, da das Kernchromatin hierbei besonders gut dargestellt wird. Die Präparate durchliefen einen standardisierten Färbeprozess im Färbeautomaten CellStain® (Firma THARMAC® GmbH Laboratory Solutions, Wiesbaden) in welchem nach Vorbehandlung mit Ethanol verschiedene sukzedane Färbungen mit Hämatoxylin 1a, Orange II 2b und Polychrom 3b (alle Fa. Merck KGaA, Darmstadt) erfolgten (Tabelle 3). Die Zellkerne stellen sich anschließend dunkelviolettschwarz dar, Nukleolen und Erythrozyten rot und das Zytoplasma je nach Dichte und Keratingehalt blaugrün bis orange (Abb.1).

Schritt	Küvetteninhalt	Dauer	Funktion
1.	96% Ethanol	2 Min.	Vorbereiten auf wässriges Milieu zur regressiven Kernfärbung
2.	80% Ethanol	1 Min.	
3.	70% Ethanol	1 Min.	
4.	50% Ethanol	1 Min.	
5.	Aqua Dest.	1 Min.	
6.	<b>Hämatoxylin</b>	2 Min.	Kernfärbung
7.	Leitungswasser	3 Min.	Konservieren der Färbung
8.	Leitungswasser	3 Min.	
9.	NH <sub>2</sub> OH	1 Min.	Auswaschen überschüssiger Farbe aus Zytoplasma
10.	70% Ethanol	1 Min.	Entwässerung der Präparate zur Vorbereitung auf hydrophobe Plasmafärbstoffe
11.	70 % Ethanol	1 Min.	
12.	80% Ethanol	1 Min.	
13.	96% Ethanol	1 Min.	
14.	<b>Orange II 2b</b>	2 Min.	Zytoplasmafärbung
15.	96% Ethanol	1 Min.	Entwässerung
16.	96% Ethanol	1 Min.	
17.	<b>Polychrom 3b</b>	2 Min.	Zytoplasmafärbung
18.	96% Ethanol	1 Min.	Entwässerung
19.	96% Ethanol	1 Min.	
20.	99,5% Ethanol	2 Min.	
21.	Xylol	1 Min.	
22.	Xylol	1 Min.	
23.	Voclear	1 Min.	Klären
24.	Voclear	1 Min.	

**Tabelle 3: Ablauf der Papanicolaou-Färbung.**



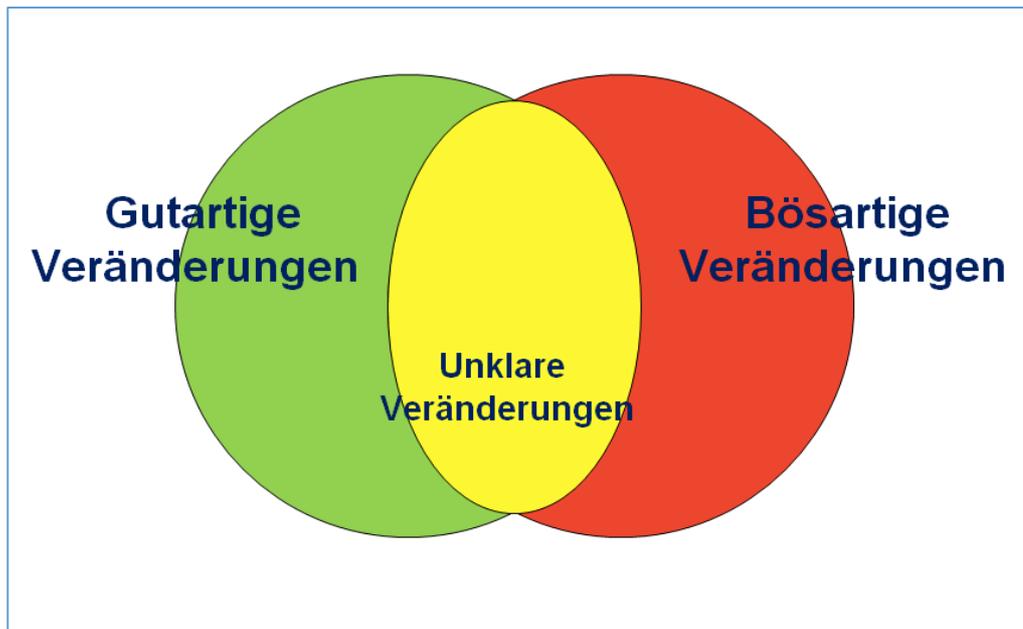
**Abb. 1: Dysplastische Plattenepithelien in der Papanicolaou-Färbung. Objektiv: 20x [66]**

Die gefärbten Präparate wurden anschließend den diagnostizierenden Ärzten vorgelegt. Die zytopathologische Befundung orientiert sich dabei an der Einteilung in Diagnosegruppen gemäß der Malignitätswahrscheinlichkeit, gemäß dem Vorschlag der Deutschen Gesellschaft für Zytologie und der Arbeitsgemeinschaft Zytopathologie der Deutschen Gesellschaft für Pathologie vom 21.06.1997. Diese Klassifikation ist für die extragynäkologische Zytologie nach wie vor in Deutschland üblich:

- Unzureichend: keine oder nur autolytische Zellen im Abstrich enthalten
- Negativ = keine bösartigen Zellen nachweisbar
- Zweifelhaft = Bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen (Malignitätswahrscheinlichkeit etwa 30%)
- Dringender Verdacht = Bösartige Zellen wahrscheinlich (Malignitätswahrscheinlichkeit etwa 70%)
- Positiv = Nachweis von bösartigen Tumorzellen [67]

Zusätzlich erfolgt eine Angabe der Diagnose im Klartext, z.B. „das Zellbild entspricht hyperkeratotischer Mundschleimhaut“. Zytologisch ist ein invasives Karzinom nicht von einem *in situ* Karzinom abzugrenzen. Die nicht eindeutigen Diagnosen „zweifelhaft“ und „dringender Verdacht“ ergeben sich durch die Tatsache, dass manche Zellbilder, z.B. das Zellbild einer Entzündungsreaktion in gewissen Stadien Überschneidungen mit einer beginnenden Entartung oder auch

dysplastischen Zellveränderungen hat (Abb. 2). Zu diesen Auffälligkeiten gehört beispielweise eine veränderte Kern-Plasma-Relation, die sowohl bei inflammatorischen als auch bei dysplastischen Prozessen auftreten kann [61]. Bei diesen nicht eindeutigen Diagnosen wurde, wenn möglich, eine DNA-Bildzytometrie zur weiteren Analyse durchgeführt.



**Abb. 2: Überschneidung der Eigenschaften gutartiger und bösartiger Veränderungen [68]**

Um eine DNA-Bildzytometrie durchführen zu können, muss zunächst eine Feulgen-Färbung der entsprechenden Präparate erfolgen. Hierbei können die bereits mikroskopierten nach Papanicolaou gefärbten zytologischen Präparate verwendet werden. Areale suspekter Zellen wurden mit einem Filzschreiber auf dem Deckglas markiert und der Objektträger zur Übertragung der Markierungen nach der Feulgen-Färbung fotokopiert. Durch Einstellen des Objektträgers in Xylol wurde das Deckglas abgelöst. Dies dauert je nach Alter des Präparates Stunden bis wenige Tage. Die Feulgen-Färbung erfolgte in mehreren Schritten (Tabelle 4) in einem Färbeautomaten CellStain<sup>®</sup>.

Schritt	Küvetteninhalt	Dauer	Funktion
1.	Xylol	15 Min.	Wässern und fixieren
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 bei 27°C in Heizküvette	60 Min.	Saure Hydrolyse der DNA
8.	Aqua dest.	2 Min.	Waschen
9.	Aqua dest.	2 Min.	
10.	Aqua dest.	2 Min.	
11.	Schiff'sches Reagenz	60 Min.	Färbereaktion
12.	SO <sub>2</sub> -Wasser	5 Min.	
13.	SO <sub>2</sub> -Wasser	5 Min.	
14.	SO <sub>2</sub> -Wasser	5 Min.	
15.	Aqua dest.	1 Min.	Waschen
16.	Aqua dest.	1 Min.	
17.	70% Ethanol	10 Min.	Entwässerung
18.	96% Ethanol	10 Min.	
19.	99,5% Ethanol	10 Min.	
20.	Xylol	15 Min.	

**Tabelle 4: Ablauf der Feulgen-Färbung.**

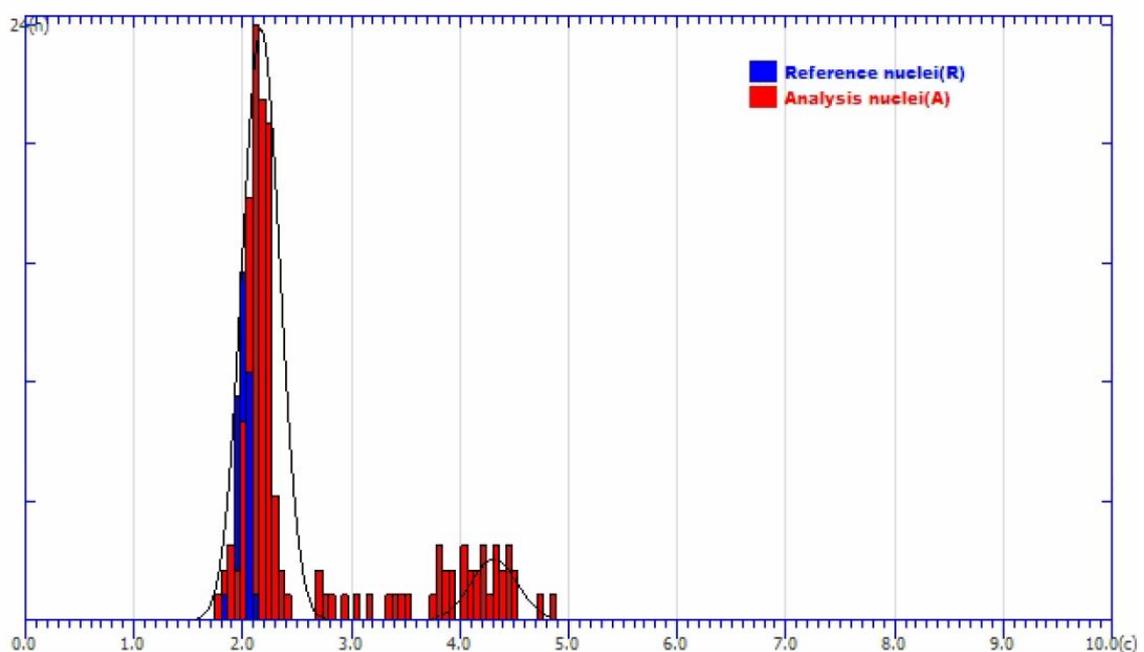
Die nach Feulgen umgefärbten Präparate mussten wegen ihrer Lichtempfindlichkeit bis zur Diagnostik im Dunkeln aufbewahrt werden.

Zur DNA-Bildzytometrie wurde die „MotiCyte DNA-Workstation interactive“ (Fa. Motic, Wetzlar) verwendet. Diese besteht aus einem Lichtmikroskop mit einer Farb-Videokamera, welche an einen PC mit einem Bildanalysesystem angeschlossen ist. Um eine Messung durchführen zu können, mussten zur Eichung des Systems mindestens 30 Referenzzellen (bei MSH-Präparaten meist Plattenepithelzellen oder Granulozyten) manuell ausgewählt werden und so der DNA-Gehalt normaler Zellkerne, welcher einem diploiden Chromosomensatz

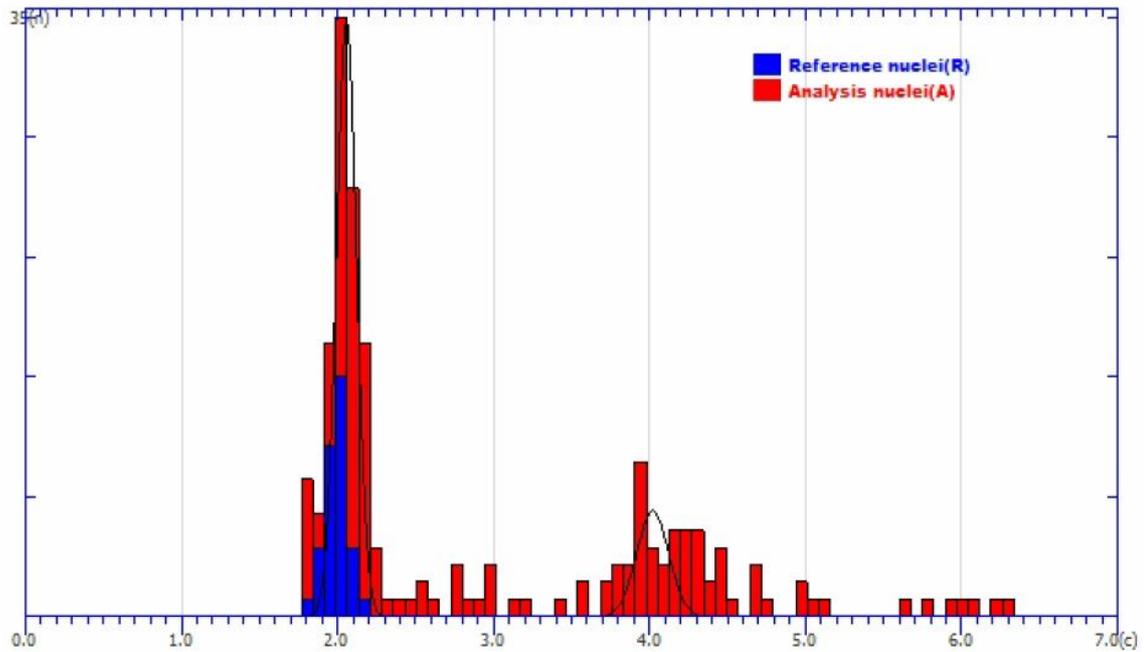
entspricht ( $2c$ ,  $c=content$ ), ermittelt werden. Für die Anforderungen an das Analysesystem und den Messvorgang sind dabei die von der „*European Society for Analytical Cellular Pathology*“ (ESACP) vorgegebenen Standards eingehalten worden [69-72]. Anschließend wurden vom Untersucher ca. 300 morphologisch auffällige Zellkerne durch Anklicken mit der Maus ausgewählt und vom System die IOD bestimmt. Dieser Vorgang beruht auf einer quantitativen Messung, da die Farbintensität der Feulgen-Färbung proportional zum DNA-Gehalt der jeweiligen Zellkerne ist.

Nach Ablauf dieser Messung wurden die Zellkerne in einer Bildergalerie dargestellt und durch den Untersucher auf Korrektheit der Kernerfassung überprüft. Anschließend wurden die zugehörigen DNA-Histogramme erstellt. Das Histogramm ist die Häufigkeitsverteilung von Zellen entsprechend ihrem DNA-Gehalt. Es können so Stammlinien (vgl. Kapitel 1.3.4) ermittelt sowie auch einzelne Zellen mit abnorm hohen DNA-Gehalten detektiert werden.

Eine diploide DNA-Verteilung entspricht dabei der Verteilung einer normalen ruhenden Zellpopulation (Abb. 3). Bei einer euploid-polyploiden DNA-Verteilung (Abb. 4) liegen die DNA-Stammlinien bei Werten um  $2c$ ,  $4c$  und  $8c$ , jeweils mit einer tolerierten Abweichung von  $\pm 10\%$ . Diese Verteilungen kommen z.B. bei entzündlichen oder regenerativen Zellveränderung, z.B. bei Lichen planus, vor [73, 74].

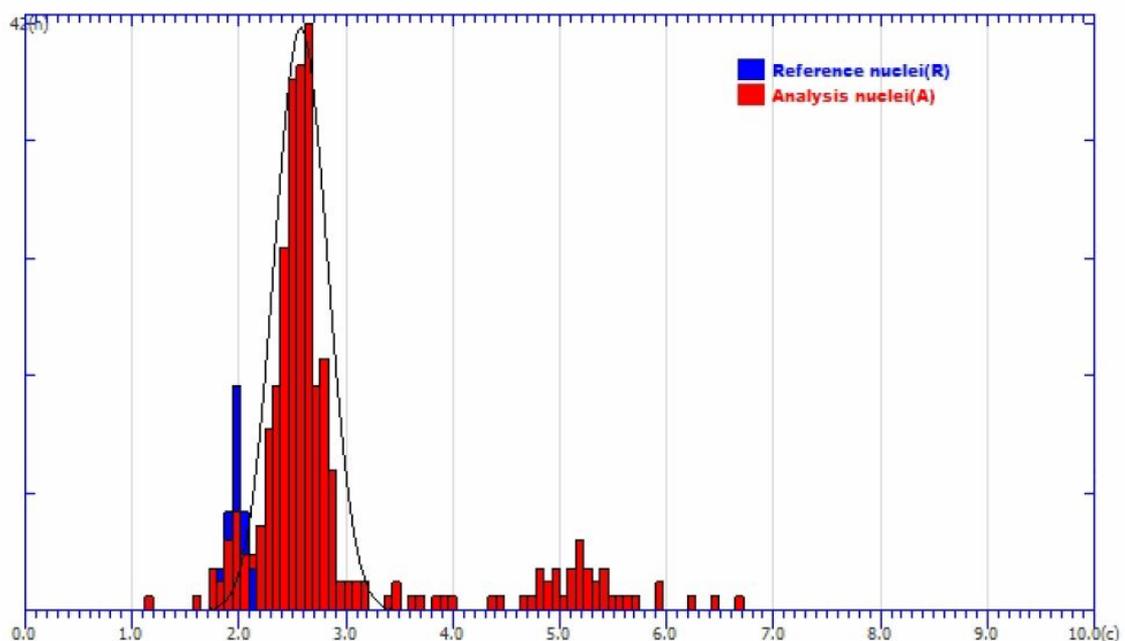


**Abb. 3: Diploides DNA Histogramm mit Stammlinie bei 2,15c mit Verdopplungsgipfel [66]**



**Abb. 4: Euploid-polyploides DNA Histogramm mit Stammlinien bei 2,05c und 4,02c [66]**

DNA-Stammlinien außerhalb dieser Bereiche oder Einzelzellen mit einem DNA-Gehalt über 9c werden als Stammlinienaneuploidie oder Einzelzellaneuploidie bezeichnet und kommen physiologisch nicht vor. Diese Verteilungen sind charakteristisch für eine maligne Transformation der suspekten Zellen. Abbildung 5 zeigt ein solches aneuploides Histogramm. Wenn sich nur sehr wenige Zellen in diesen auffälligen Bereichen befanden, aber nicht genügend für eine eindeutige Diagnose, konnte nur ein Verdacht auf DNA-Aneuploidie geäußert werden.



**Abb. 5: Aneuploides Histogramm mit Stammlinie bei 2,56c mit Verdopplungsgipfel [66].**

## 2.4 Planung der zu entnehmenden Daten aus Patientenakten

Vor dem eigentlichen Aktenstudium war eine detaillierte Planung der Datensammlung notwendig. Dabei war einerseits wesentlich, möglichst viele Informationen über die Patienten und deren Anamnese zu erfassen. Andererseits waren ausführliche Informationen zur Schleimhautläsion und zur zytologischen und klinischen Diagnostik und Behandlung wichtig.

Zur übersichtlichen Datensammlung und anschließenden Auswertung wurde anschließend mithilfe von Microsoft® Excel® (Version 15.23.2) eine Tabelle erstellt.

Diese bestand aus nachfolgenden Spalten-Beschriftungen:

- Patientenummer
- Name
- Geburtsdatum
- Geschlecht\*
- Patienten-Eingangsnummer des Funktionsbereichs Cytopathologie (C-Nummer)
- Patient aus MKG oder aus der Kieferklinik?
- Datum der Bürstenbiopsie
- Lokalisation der Bürstenbiopsie\*
- Klinik vor Abstrich\*
- Zytologische Diagnose\*
- Diagnosegruppe (negativ/zweifelhaft/dringender Verdacht/positiv)
- Durchführung einer DNA-Zytometrie (ja/nein)\*
- Zytologische Vorbefunde
- Zeitgleiche chirurgische Biopsie
- Chirurg. Biopsie im Verlauf
- Zytologische Abstriche im Verlauf
- Grunderkrankungen
- Risikofaktoren\*
- Zusätzliche Untersuchungen (CT, Sonographie...)
- Therapie
- Falls ein Karzinom vorliegt: Staging\*
- Referenzstandard (positiv/negativ/kein)

- Falls „kein Referenzstandard“: Grund
- Klinisches Endergebnis\*
- Letzte Patientenvorstellung in Kieferklinik/MKG
- Durchführender Arzt des Bürstenabstrichs
- Durchführender Arzt der chirurgischen Biopsie
- Untersuchungszeitraum
- Alter des Patienten bei Abstrichentnahme

Die mit „\*“ markierten Begriffe wurden im Rahmen der Aufarbeitung noch in Untergruppen eingeteilt, um ein gezieltes Filtern der Daten zu ermöglichen.

Die personenbezogenen Daten wie Name und Geburtsdatum und C-Nummer wurden nach Zusammentragen sämtlicher Patientendaten gelöscht und durch eine fortlaufende Nummer ersetzt, um eine Anonymisierung der Datensätze zu gewährleisten.

## **2.5 Aktenstudium**

### **2.5.1 Befunddokumentationssystem „dc-pathos“**

Zuerst wurden mithilfe des Befunddokumentationssystems „dc-pathos“ (Firma dc-Systeme, Heiligenhaus) im Funktionsbereich Cytopathologie und im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf sämtliche zytologische Präparate herausgefiltert, die in den Jahren 2014 und 2015 aus der Klinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme und der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie eingesandt wurden. Mithilfe der C-Nummer, einer für jede Einsendung spezifischen Nummer, konnten dann im Befunddokumentationssystem die einzelnen Patientendatensätze eingesehen werden. Anhand der zytopathologischen Befunde und der im System hinterlegten Begleitscheine konnten die ersten Spalten der Excel<sup>®</sup>-Tabelle mit Informationen gefüllt werden.

Durch eine Rückwärtssuche konnte anschließend im Befundsystem gezielt nach einzelnen Patienten gesucht werden und so herausgefunden werden, ob zuvor oder auch als Verlaufskontrollen Bürstenbiopsien erfolgt sind und ob zeitgleiche oder spätere chirurgische Biopsien stattfanden. Falls ja, wurden diese Ergebnisse ebenfalls in der Tabelle notiert.

### **2.5.2 Digitale Akte im Krankenhausinformationssystem Medico®**

Für ergänzende Informationen wurden die digitalen Patientenakten im „Medico“® (Firma Cerner Deutschland GmbH, Idstein) durchgesehen.

Die Patientensuche erfolgte anhand des Geburtsdatums und des Patienten-  
namens. Bei der Durchsicht wurde darauf geachtet, die Informationen nur aus  
Arztbriefen, Protokollen der Tumorkonferenzen und anderen zuverlässigen  
Quellen zu entnehmen, da oft systembedingt nur ein Überbegriff als Diagnose in  
der Akte selbst hinterlegt war, wie beispielsweise „bösartiger Tumor im Kopf-Hals-  
Bereich“.

Mithilfe dieser digitalen Akten war es vor allem möglich, Informationen über  
Grunderkrankungen der Patienten herauszufinden, welche nicht auf dem  
Probenbegleitschein zur zytologischen Untersuchung notiert worden waren.

In den Protokollen der Tumorkonferenzen waren außerdem Risikofaktoren, Details  
über vorliegende Karzinome und Therapieansätze dokumentiert. Des Weiteren  
erfolgte bei einigen Patienten eine chirurgische Biopsie zur Diagnosesicherung  
(wie beispielsweise bei Lichen planus) in der Dermatologie, deren Ergebnis nicht  
über „dc-pathos“ eingesehen werden konnte. Diese Histologiebefunde waren  
ebenfalls im Medico® hinterlegt.

### **2.5.3 Papierakten**

Während die Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie fast vollständig auf  
digitale Dokumentationen umgestiegen ist und nur noch die Akten der  
Privatpatienten im Papierformat führt, nutzt die Klinik für Zahnärztliche Chirurgie  
und Aufnahme für die Dokumentation der entsprechenden Sprechstunde  
ausschließlich Papierakten. Daher war eine Durchsicht von Papierakten für  
weitere Informationen über die Patienten und die zytologischen Abstriche in beiden  
Abteilungen notwendig.

Aus Akteneinträgen wurden beispielsweise die letzte Vorstellung des Patienten in  
der Klinik oder der behandelnde Arzt herausgefunden. Auch genauere Angaben  
zu den Therapien und dem klinischen Endergebnis wurden dokumentiert. Durch  
die vom Patienten ausgefüllten Anamnesebögen wurden die Angaben zu  
Risikofaktoren und Grunderkrankungen in einigen Fällen ergänzt.

## 2.6 Festlegung und Ermittlung des Referenzstandards (*Follow-up*)

Um eine retrospektive Auswertung der Daten zu ermöglichen, wurde bereits bei der Studienplanung vor der Akteneinsicht und vor Beurteilung der vorliegenden Daten ein Referenzstandard definiert (Tabelle 5).

positiver Referenzstandard	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zeitnahe (max. 6 Monate) histologische Diagnose mindestens einer schweren Dysplasie des Plattenepithels</li> </ul> <p>oder</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• zytologische Diagnose „positiv“ oder schwere Dysplasie mit passendem klinischem Verlauf</li> </ul>
negativer Referenzstandard	<p>Mittelgradige Dysplasie oder weniger:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• zytologische Diagnose „negativ“ in Übereinstimmung mit dem klinischen Gesamtbild</li> </ul> <p>oder</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• tumorfreier Verlauf während eines Jahres nach Abstrichentnahme</li> </ul> <p>oder</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• klinische Wiedervorstellung des Patienten nach &gt;14 Tagen nach benigner Diagnose und passender klinischen Verlauf</li> </ul>
kein Referenzstandard	<ul style="list-style-type: none"> <li>• klinisch-histologische Daten können nicht ausreichend sicher der zytologischen Diagnose zugeordnet werden, z.B.: fehlende Akten, fehlende klinische Angaben, Lokalisationsangabe der Bürstenbiopsie zu ungenau, etc.</li> </ul> <p>oder</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• eine einmalige Patientenvorstellung oder ein Untersuchungszeitraum &lt;14 Tagen</li> </ul>

**Tabelle 5: Definition des Referenzstandards zur retrospektiven Auswertung**

Anschließend wurde für jeden Patienten mithilfe der aus den Patientenakten entnommenen Daten (*Follow-up*) eine Zuordnung zu den vordefinierten Referenzstandards durchgeführt und tabellarisch den zytologischen Diagnosen im Berichtszeitraum gegenübergestellt.

Dabei wurden Vorerkrankungen, Untersuchungszeiträume, aktuelle klinische und pathologische Befunde sowie die abschließende klinische Diagnose und Therapie berücksichtigt. Das heißt, jeder zytologische Befund erhält eine Zuordnung zum klinischen Verlauf (mindestens schwere Dysplasie ja/nein/nicht bestimmbar).

## **2.7 Statistische Aufarbeitung**

Die statistische Aufarbeitung erfolgte hauptsächlich mit Microsoft® Excel® (Version 15.23.2, © 2016 Microsoft). Zur deskriptiven Statistik wurden Daten wie Median, Spannweite, Minimum, Maximum und Mittelwert erhoben. Anhand der Filterfunktion wurden außerdem quantitative und prozentuale Berechnungen mit verschiedenen Variablen durchgeführt.

Jede Läsion wurde als einzelner Fall ausgewertet, da einige Patienten mehrere Läsionen aufwiesen. Bei der Ermittlung der Daten über das Patientenkollektiv (z.B. Patientenalter, Geschlechterverteilung...) wurde dann allerdings nur ein Fall pro Patient ausgewertet, um die Daten nicht zu verfälschen, indem einige Patienten mehrfach gezählt hätten.

Durch das Umformatieren der Daten in eine Tabelle konnte auch „PivotTable“, eine Unterfunktion von Microsoft® Excel®, genutzt werden, um aus der ursprünglichen Tabelle mit großen Datenmengen gezielt Daten zu extrahieren, gegenüberzustellen und anschließend auszuwerten (Abb. 6).

Lokalisation der Zyto	blasenbildende Erkrankungen	bösartiger Tumor sonstige	Candida	Dysplasie Grad I
Alveolarkamm	1	1	5	
Gaumen	2		12	
Gingiva OK	5		1	
Gingiva UK	3		6	
Lippe			3	
Mundboden/ Zungengrund			4	
n.a.				
Planum bucc. Links	1	1	2	1
Planum bucc. Rechts	2	2	6	
sonstige				
Vestibulum OK			1	
Vestibulum UK				
Zunge	1		11	5
<b>n</b>	<b>15</b>	<b>4</b>	<b>51</b>	<b>6</b>

**Abb. 6: Ausschnitt aus einem mit Microsoft® Excel® erstellten PivotTable**

Mithilfe dieser durch „PivotTable“ hergestellten Tabellen konnten anschließend verschiedene Graphiken wie Torten-, Balken- und Säulendiagramme erstellt werden.

Um die relevantesten Daten auf einen Blick darzustellen und Daten zur diagnostischen Treffsicherheit zu ermitteln, wurden Vierfeldertafeln (auch 2x2-Tafeln genannt) angefertigt (Tabelle 6).

	Krank	Nicht krank	Gesamt
Positives Testergebnis	richtig positiv (A)	falsch positiv (B)	A+B
Negatives Testergebnis	falsch negativ (C)	richtig negativ (D)	C+D
Gesamt	A+C	B+D	n

**Tabelle 6: Beispiel einer Vierfeldertafel [75]**

Aus diesen Vierfeldertafeln ließen sich folgende Daten mit den angegebenen Formeln berechnen:

- Sensitivität =  $A / (A+C)$
- Spezifität =  $D / (B+D)$
- Positiver prädiktiver Wert (PPW) =  $A / (A+B)$
- Negativer prädiktiver Wert (NPW) =  $D / (C+D)$

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patientenkollektiv

Der Funktionsbereich Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf erhielt im Zeitraum vom 01.01.2014 bis zum 31.12.2015 insgesamt 1021 Abstriche aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie (MKG) sowie der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme. 372 Proben (entsprechen 36%) stammten dabei aus der MKG, während 649 Proben (entsprechen 64%) aus der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme eingesandt wurden.

Sechs der eingesandten Proben waren, wie sich im weiteren Verlauf herausstellte, keine Mundschleimhautabstriche, sondern beispielsweise Zystenaspirate oder Abstriche aus offenen Halswunden, weswegen sie aus der Studie ausgeschlossen wurden.

Weitere drei Proben entfielen, da sie keine Zellen oder nur nekrotisches Material enthielten und daher eine zytologische Auswertung nicht möglich war (Diagnosekategorie „unzureichend“). Es verblieben so 1012 auswertbare Bürstenabstriche von 555 Patienten.

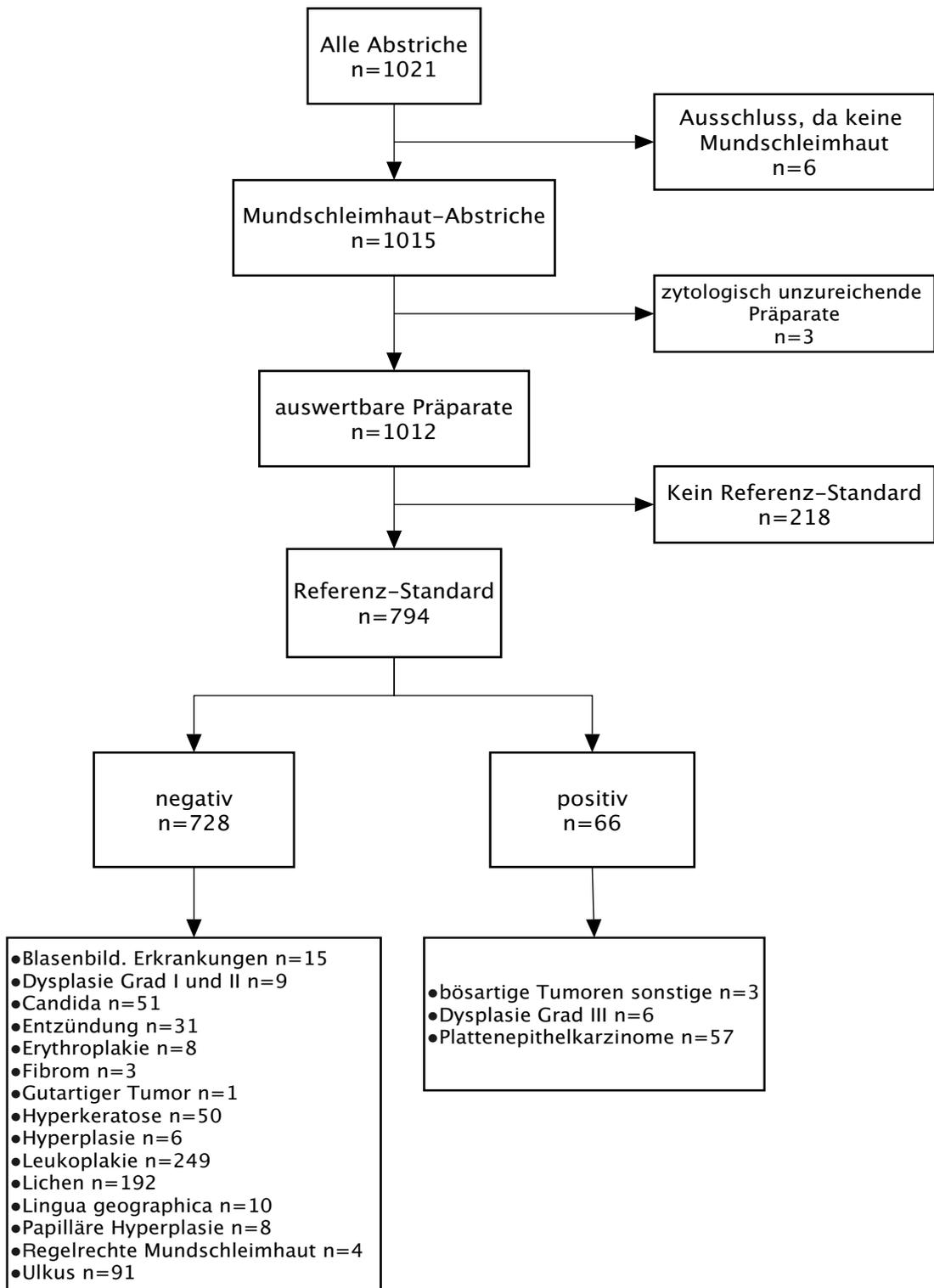
Angaben zu Geschlechtszuordnung und Alter der Patienten, von denen die Abstriche entnommen wurden, werden in Tabelle 7 dargestellt:

	<b>weiblich</b>	<b>männlich</b>
Anzahl der Abstriche (n)	590 (58%)	422 (42%)
Anzahl der Patienten (n)	319 (57%)	236 (43%)
Median Patientenalter	63	57
Range	4 - 93	9 - 84
MW +/- SD	61,9 +/- 15,2	56,9 +/- 15,6

**Tabelle 7: Geschlechtsverteilung und Altersverteilung im Gesamtkollektiv (1012 Proben von 555 Patienten). MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung**

#### 3.1.1 Follow-up

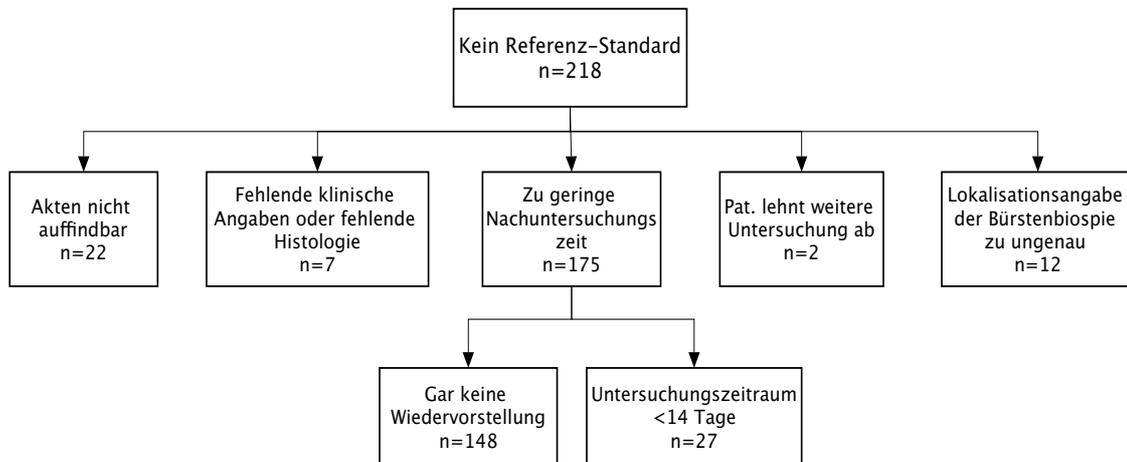
Von den 1012 auswertbaren Mundschleimhautabstrichen konnte für 218 Abstriche (21%) kein Referenzstandard ermittelt werden, da klinische Angaben fehlten oder gar keine Wiedervorstellung der Patienten erfolgte. Somit verblieben 794 auswertbare Abstriche von 411 Patienten (Abb. 7).



**Abb. 7: Flussdiagramm mit Angaben zur Zahl der Mundschleimhautabstriche, Studienausschluss und *Follow-up*-Daten**

Die Gründe dafür, dass bei 218 Fällen kein Referenzstandard ermittelbar war, waren vielfältig. In 175 diese Fälle (80%) war eine fehlende Wiedervorstellung des

Patienten oder eine zu geringe Nachuntersuchungszeit von weniger als 2 Wochen der Grund (Abb. 8).



**Abb. 8: Flussdiagramm über die Gründe für einen nicht ermittelbaren Referenzstandard**

In 27 dieser Fälle erfolgte zwar eine Wiedervorstellung innerhalb von 14 Tagen, aber danach keine Weiterbehandlung. Dabei kam es beispielsweise zur Mitteilung eines benignen Befundes und anschließender Rücküberweisung zum Hauszahnarzt. Aber auch die Kontrolle nach Behandlung mit Medikamenten (beispielsweise mit Antimykotika bei Candidiasis-Verdacht) erfolgte meist innerhalb von 14 Tagen und ließ bei Erfolg eine Rücküberweisung zum Hauszahnarzt zu.

In den übrigen 148 Fällen kam es zu gar keiner Wiedervorstellung, beispielsweise, weil die teilweise sehr betagten Patienten nur wenige Tage nach der Bürstenbiopsie an multiples Organversagen oder Leukämie verstarben. In den meisten Fällen sind die Patienten allerdings trotz teils dringender Empfehlung zur Wiedervorstellung innerhalb der nächsten Wochen nicht mehr erschienen, obwohl in einigen Fällen sogar noch versucht wurde, sie telefonisch oder postalisch auf die Dringlichkeit einer Wiedervorstellung aufmerksam zu machen.

Dieser Grund für einen Studienausschluss hängt eng mit dem nächsten Grund, dass der Patient weitere Untersuchungen ablehnt, zusammen. Bei zwei Fällen wurde zu einer chirurgischen Biopsie geraten, die die Patienten dann ablehnten. In weiteren 19 Fällen war die Lokalisationsangabe der Bürstenbiopsie zu ungenau oder es fehlten klinische Angaben. So war beispielsweise nur „Mundschleimhaut links“ oder „Oberkiefer und Unterkiefer Abstriche“ auf dem Begleitschein der

Bürstenbiopsie notiert, was zur weiteren Auswertung durch die Studie eine viel zu ungenaue Lokalisationsangabe war. In anderen Fällen entsprachen die Lokalisationen der Bürstenbiopsien nicht den Lokalisationen der anschließenden chirurgischen Biopsien.

Anhand der Ausschlusskriterien zum Festlegen des Referenzstandards musste so die Fallzahl von 1012 auf 794, somit um 21%, reduziert werden.

### 3.1.2 Untersuchungszeitraum

Der Untersuchungszeitraum (*Follow-up-Zeitraum*) des in die Studie inkludierten Patientenkollektivs wurde als Differenz zwischen zytologischer Abstrichentnahme und letzter Vorstellung in der Uniklinik Düsseldorf (laut Akteneintrag bei Aktendurchsicht) festgelegt.

Der Untersuchungszeitraum betrug im Durchschnitt 17,2 Monate (Mittelwert). Der Großteil der Patienten war unter 4 Monate in Behandlung, was sich in den meisten Fällen durch eine abgeschlossene Diagnostik der Läsionen und anschließende Rücküberweisung zum Hauszahnarzt erklären ließ (Abb. 9).

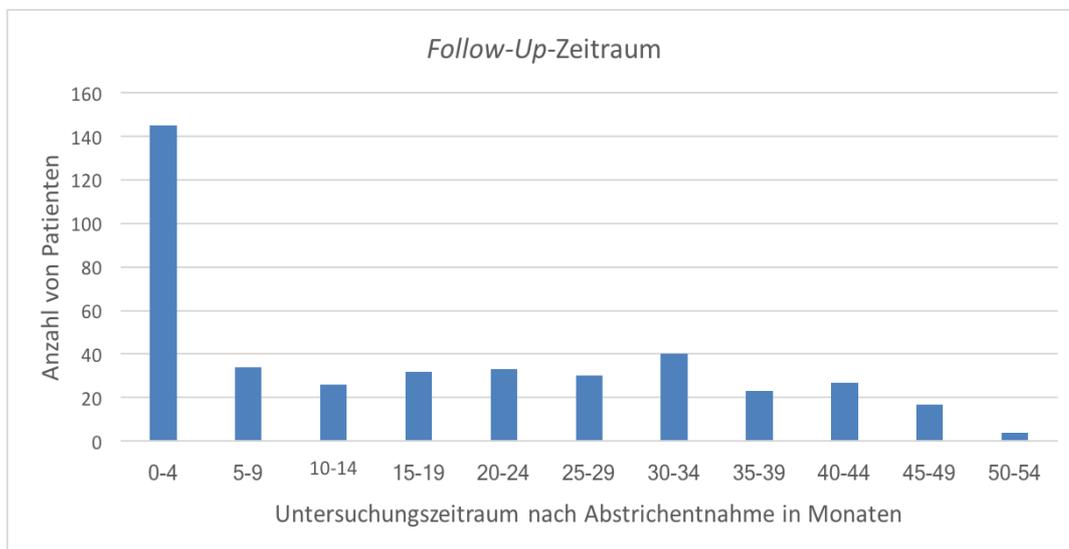
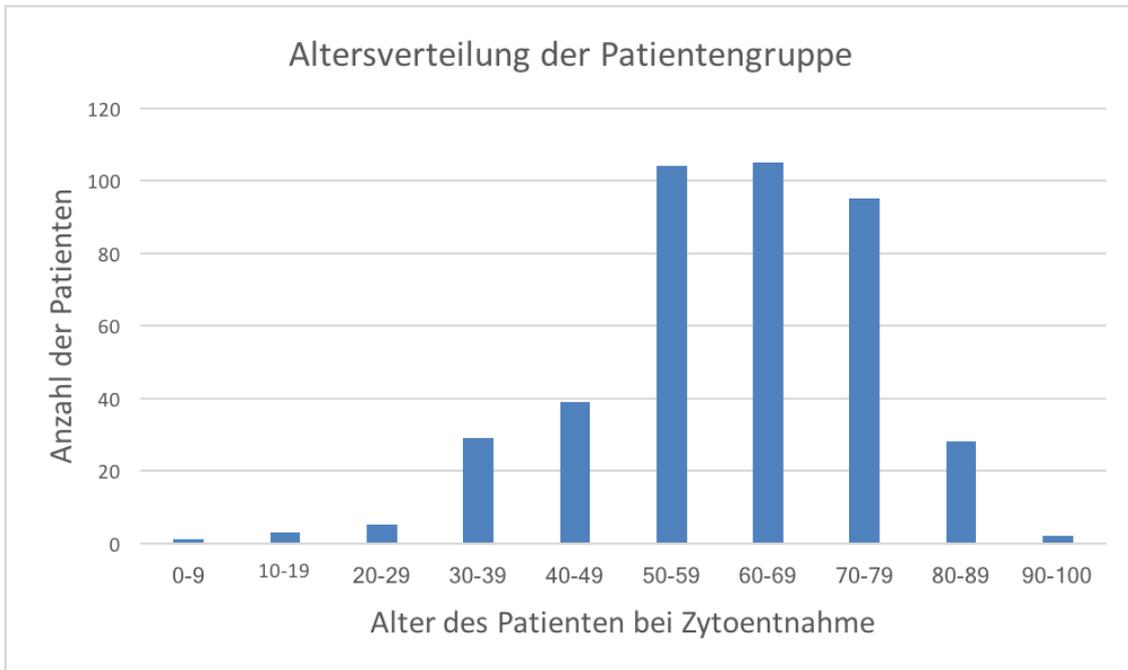


Abb. 9: Untersuchungszeitraum der Patienten nach Abstrichentnahme in Monaten (n=411)

### 3.1.3 Geschlechter- und Altersverteilung

Der jüngste Patient des eingeschlossenen Patientenkollektivs war 5, der älteste 93 Jahre alt. Während diese Spanne sehr breit ist, entfiel der Großteil der Bürstenbiopsien auf die Gruppe der 50- bis 79-Jährigen, die 74% des Patientenkollektivs ausmachen (Abb. 10).

Das Durchschnittsalter der Männer lag mit 58,4 Jahren unter dem der Frauen, welches 62,4 Jahre betrug. Insgesamt betrachtet lag das Durchschnittsalter des Patientenkollektives bei 60,8 Jahren.



**Abb. 10: Altersverteilung des Patientenkollektivs (n=411).**

Angaben zu Geschlechtszuordnung und Alter der Patienten, von denen Abstriche entnommen und deren Daten ins Kollektiv eingeschlossen wurden, werden in Tabelle 8 dargestellt:

	<b>weiblich</b>	<b>männlich</b>
Anzahl der Abstriche (n)	474 (59,7%)	320 (40,3%)
Anzahl der Patienten (n)	240 (58,4%)	171 (41,6%)
Median Patientenalter	63	59
Range	5-93	14 - 84
MW +/- SD	62,4 +/- 14,4	58,4 +/- 14,6

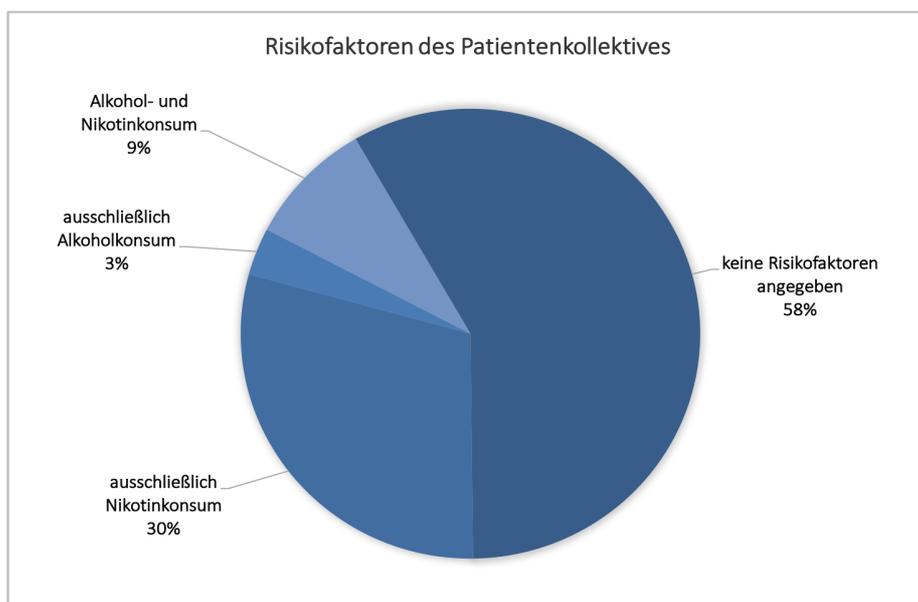
**Tabelle 8: Geschlechtsverteilung und Altersverteilung im eingeschlossenen Kollektiv (794 Abstriche von 411 Patienten). MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung**

### 3.1.4 Risikofaktoren

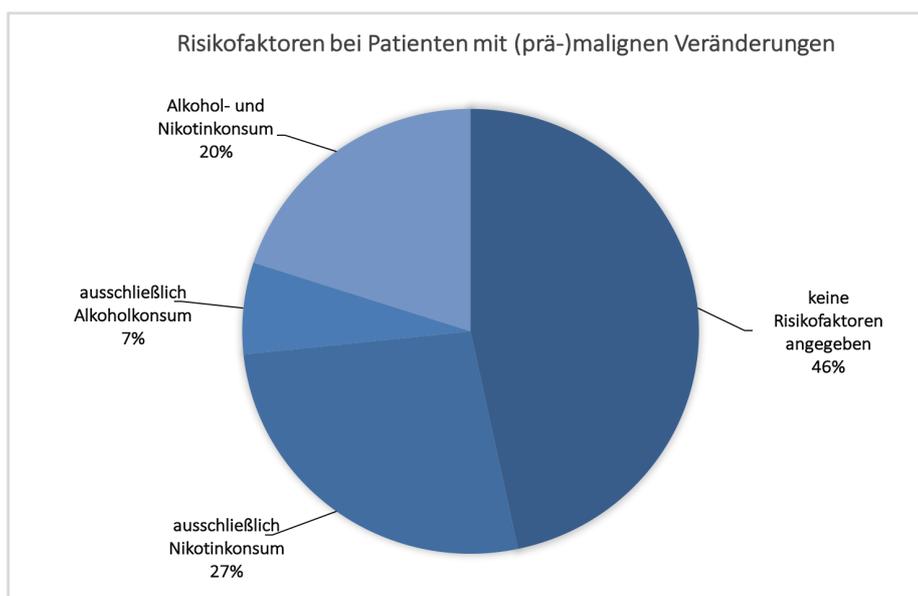
Bei Untersuchung der bekannten Risikofaktoren für Mundschleimhautkarzinome wurde zunächst das gesamte Patientenkollektiv analysiert. Im Anschluss wurden die Patienten mit positivem Referenzstandard noch einmal separat ausgewertet. Eine positive Nikotinanamnese wurde nur vermerkt, wenn in den letzten 20 Jahren

geraucht wurde. Bei 58% des gesamten Patientenkollektives waren keine Risikofaktoren vorhanden bzw. keine Risikofaktoren angegeben (Abb. 11).

Im Vergleich zum Gesamtkollektiv wurden anschließend die 30 Patienten, an denen die 66 Abstriche mit positivem Referenzstandard genommen wurden, aus dem Patientenkollektiv herausgefiltert und separat auf ihre Risikofaktoren untersucht (Abb. 12). Dabei sank der Anteil der Patienten, bei denen gar keine Risikofaktoren angegeben wurden, von 58% auf 46%. Außerdem verdoppelte sich der Wert der Patienten, die Alkohol- und Nikotinkonsum als Risikofaktoren nannten, von 9% auf 20%.



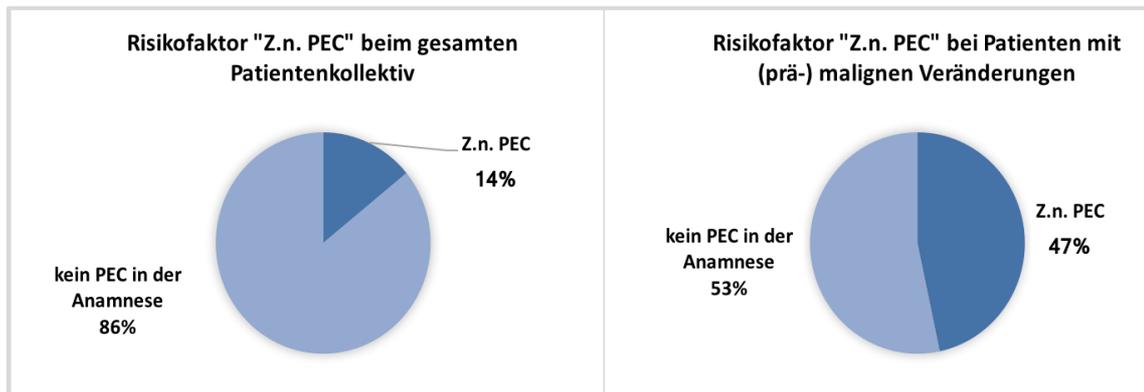
**Abb. 11: Angegebene Risikofaktoren im gesamten Patientenkollektiv. n=411**



**Abb. 12: Risikofaktoren bei Patienten mit (prä-)malignen Veränderungen (ab hochgradiger Plattenepitheldysplasie). n=30**

Da die Risikofaktoren „Zustand nach PEC“ und „Lichen planus in der Anamnese“ als Mehrfachnennung zusätzlich zum Alkohol- oder Nikotinkonsum auftraten, wurden diese beiden Risikofaktoren separat ausgewertet (Abb. 13).

Dabei war auffällig, dass der Anteil der Patienten mit einem PEC in der Anamnese bei Patienten mit positivem Referenzstandard mehr als dreimal höher war als im Gesamtkollektiv.



**Abb. 13: Risikofaktor „Zustand nach PEC“ beim gesamten Patientenkollektiv (links) im Vergleich zu Patienten mit (prä-)malignen Veränderungen (ab hochgradige Plattenepitheldysplasie, rechts). Z.n. PEC = Zustand nach Plattenepithelkarzinom. links n=411, rechts n=30**

Der Risikofaktor „Lichen planus in der Anamnese“ trat im Gesamtkollektiv bei 28 von 411 Patienten auf, also in ca. 7% der Fälle. Genauso war es beim Patientenkollektiv mit (prä-)malignen Veränderungen, dort wiesen 2 von 30 Patienten, also auch ca. 7% diesen Risikofaktor auf.

## 3.2 Mundschleimhaut-Läsionen

### 3.2.1 Lokalisation der MSH-Läsion

Die meisten der 794 Läsionen befanden sich an der Wange, an der Gingiva oder an der Zunge.

191 Abstriche (24%) entfielen auf die Wangen (Planum buccale rechts und links) und insgesamt 176 Abstriche auf die Gingiva.

An der Zunge wurden 144 (18%) Abstriche entnommen. Unter „sonstige“ sind Lokalisationen wie beispielsweise die Tonsillenloge erfasst (Abb. 14).

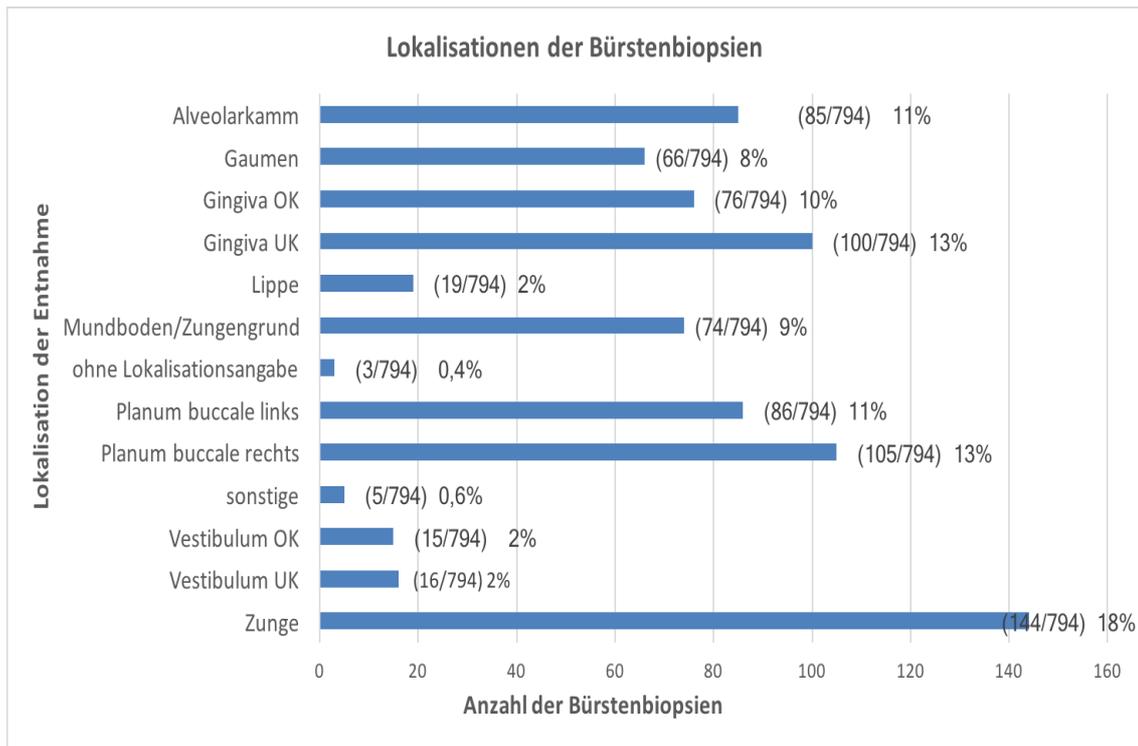


Abb. 14: Lokalisation der Bürstenbiopsie (n=794). OK = Oberkiefer, UK = Unterkiefer.

### 3.2.2 Zytologische Diagnosegruppen

Bei einem Großteil der Bürstenbiopsien lautete die zytologische Diagnosegruppe „negativ“. Mit 725 Fällen machte dieses Ergebnis 91,3% aller Diagnosen aus (Tabelle 9).

Zytologisches Ergebnis	Anzahl	Anteil (%)
Negativ	725	91,3%
Zweifelhaft	49	6,2%
Dringender Verdacht	11	1,4%
Positiv	9	1,1%
<b>Gesamt</b>	<b>794</b>	<b>100%</b>

Tabelle 9: Häufigkeit der zytologischen Diagnosen (n = 794).

Auffällig war, dass bei bestimmten Lokalisationen, wo dringend tumorverdächtige Läsionen vorkamen, fast immer auch „positiv“ zytologisch diagnostizierte Läsionen in der vorliegenden Studie auftraten (Tabelle 10). Dies zeigte sich beispielsweise an Mundboden und Zungengrund sowie an der Zunge.

Andere Lokalisationen hatten wiederum höchstens „zweifelhafte“ Befunde, obwohl zum Teil zahlreiche Abstriche in der Studie eingeschlossen waren, wie beispielsweise beim Planum buccale rechts (105 Abstriche).

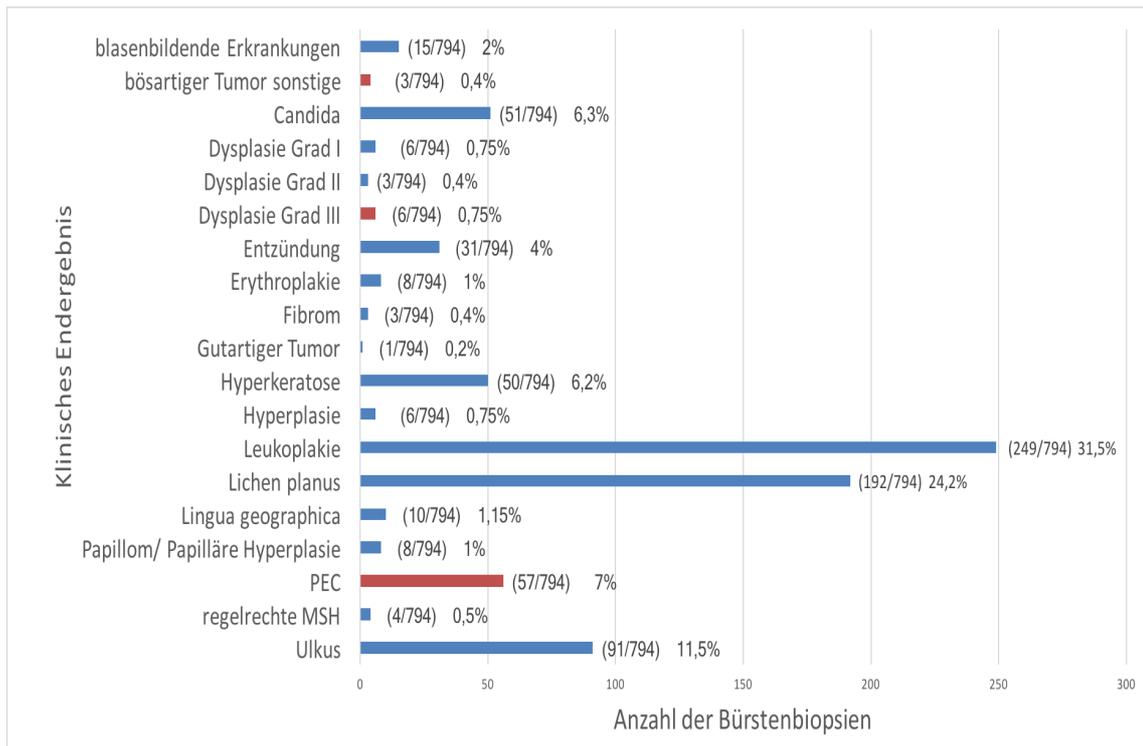
Lokalisation der Läsion	Zytologische Diagnose				n
	negativ	zweifelhaft	dringender Verdacht	positiv	
Alveolarkamm	80	3	1	1	85
Gaumen	61	5			66
Gingiva OK	67	6	1	2	76
Gingiva UK	93	4	1	2	100
Lippe	19				19
Mundboden/ Zungengrund	63	5	3	3	74
ohne Lokalisationsangabe	3				3
Planum buccale links	78	7	1		86
Planum buccale rechts	100	5			105
sonstige	4	1			5
Vestibulum OK	13	2			15
Vestibulum UK	15	1			16
Zunge	129	10	4	1	144
<b>n</b>	<b>725</b>	<b>49</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>794</b>

Tabelle 10: Häufigkeit der zytologischen Diagnosen an den verschiedenen Lokalisationen (n = 794). OK = Oberkiefer, UK = Unterkiefer.

### 3.2.3 Klinische Diagnosen

Die häufigsten klinischen Endergebnisse nach dem *Follow-up* waren Leukoplakie (249 Abstriche) und Lichen planus (192 Abstriche). Gemeinsam machten sie 55% aller Diagnosen aus.

Abb. 15 zeigt die Häufigkeit der verschiedenen Diagnosen bezogen auf die Zahl der Abstriche. Dabei sind bösartige Veränderungen in Rot dargestellt.



**Abb. 15: Häufigkeitsverteilung der *Follow-up*-Diagnosen (n=794). Maligne Veränderungen in Rot dargestellt. PEC = Plattenepithelkarzinom, MSH = Mundschleimhaut**

Um Aussagen für jede einzelne Läsion machen zu können, wurden neben der in Kapitel 3.1. angegebenen Auswertung für die einbezogenen Patienten (n=411) auch die einzelnen abgestrichenen Läsionen (n=794) den klinischen Enddiagnosen gegenübergestellt. Dabei ließ sich beispielsweise feststellen, dass das Durchschnittsalter eines Patienten mit einer malignen Läsionen 71 Jahre betrug und somit zehn Jahre über dem Durchschnittsalter eines Patienten mit einer benignen Läsion lag (Tabelle 11).

	<b>Benigne Veränderungen (n=719)</b>	<b>Dysplasien (n=15)</b>	<b>PEC/ Tumoren (n=60)</b>
<b>Alter</b>	61 (5-93)	68 (48-81)	71 (37-91)
<b>Geschlecht</b>			
Weiblich	433 (60)	5 (33)	36 (60)
Männlich	286 (40)	10 (67)	24 (40)
<b>zeitgleiche Biopsie*</b>	144 (20)	13 (87)	57 (95)
<b>Untersuchungszeitraum (Monaten)</b>	18 (0-52)	25 (0,8-43)	24 (1,5-51)
<b>Klinisches Endergebnis (benigne)</b>			
Blasenbildende Erkrankungen	15 (2)		
Candida	51 (7)		
Entzündung	31 (4,1)		
Erythroplakie	8 (1)		
Fibrom	3 (0,4)		
Pleomorphes Adenom	1 (0,1)		
Hyperkeratose	50 (7)		
Hyperplasie	6 (0,8)		
Leukoplakie	249 (35)		
Lichen	192 (27)		
Lingua geographica	10 (1,4)		
Papilläre Hyperplasie	8 (1)		
Regelrechte Mundschleimhaut	4 (0,5)		
Ulkus	91 (12,7)		
<b>Dysplasiegrad</b>			
Grad I		6 (40)	
Grad II		3 (20)	
Grad III		6 (40)	
<b>Histologie</b>			
Plattenepithelkarzinom			57 (95)
Myoepitheliales Karzinom			2 (3)
Plasmozytom			1 (2)

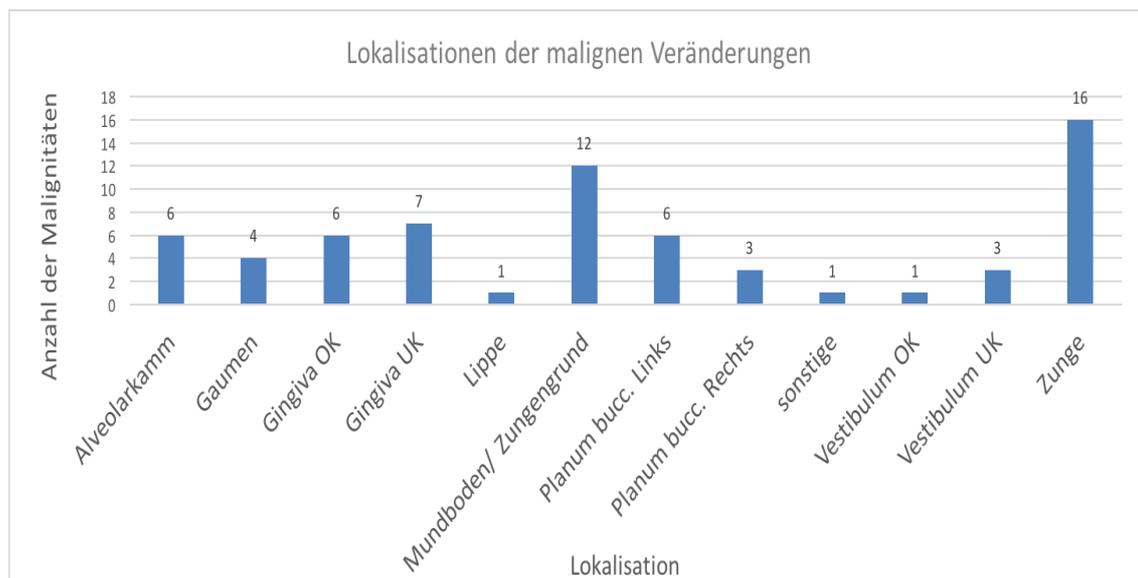
**Tabelle 11: Gesamtkollektiv (n=794) nach klinischen Enddiagnosen aufgeteilt. Daten dargestellt bei Alter und Untersuchungszeitraum als arithmetischer Mittelwert (Spannweite), bei den übrigen Punkten als Anzahl und Anteil (%). \*, „Zeitgleiche Biopsie“ ist in der Studie als Histologie innerhalb von maximal 6 Monaten nach Zytologie definiert. PEC = Plattenepithelkarzinom**

### **3.2.4 (Prä-)Maligne Veränderungen**

Insgesamt wurden an 30 Patienten 66 maligne Veränderungen und obligate Präkanzerosen diagnostiziert. Damit stammten 8,3% aller Abstriche mindestens von einer schweren Dysplasie und hatten somit einen positiven Referenzstandard. 57 dieser Veränderungen entsprachen einem PEC, davon eins einem verrukösen Karzinom, einer Unterform des PECs. Sechs Mal lag eine Dysplasie Grad III vor

und in drei Fällen ein anderer bösartiger Tumor. Letztere setzten sich aus Myoepithelialen Karzinomen (2x) und Plasmazytom (1x) zusammen, die zytologische Diagnosegruppe betrug bei ihnen „negativ“, sie wurden entweder als Ulkus oder als entzündliche Hyperkeratose interpretiert.

Die meisten (prä-)malignen Veränderungen befanden sich an der Zunge und am Mundboden bzw. Zungengrund. Dort befanden sich insgesamt 42,4% (=28 Läsionen) (Abb. 16).



**Abb. 16: Lokalisation der malignen Veränderungen (n=66). OK = Oberkiefer, UK= Unterkiefer.**

53 der 60 Tumoren war eine TNM-Klassifikation zugeordnet. Eine TNM-Klassifikation war nicht bei allen Malignitäten angegeben, da beispielsweise einige Patienten erneute chirurgische Eingriffe zur Biopsie ablehnten. Die Dysplasien Grad III und das Plasmazytom wurden ebenfalls nicht mit TNM-Klassifikation angegeben und daher im Folgenden nicht mitberücksichtigt.

Unter den 53 zugeordneten Karzinomen waren allerdings die beiden myoepithelialen Karzinome, bei denen aus der Datenlage nicht eindeutig hervorging, ob diese in kleinen oder großen Speicheldrüsen vorkamen. Der Vollständigkeit halber muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass es für große Speicheldrüsen eine separate TNM-Klassifikation gibt. Bei beiden myoepithelialen Karzinomen lautete die TNM-Klassifikation „pT4a pN0 cM0 L0 V0 Pn0 R1“, so dass sie zum Stadium IVA gehörten.

Der Primärtumor war in der Hälfte der Fälle im Stadium T1, also maximal 2 cm groß. In 40% der Fälle konnte keine Aussagen zu Lymphknotenbefall gemacht werden. In keinem der vorliegenden Fälle lag eine Fernmetastasierung vor (Tabelle 12). Mit insgesamt 88% ließen sich die meisten Karzinome den Stadien I und IVA zuordnen (Tabelle 13).

TNM-Klassifikation	Anzahl und Anteil (%)
Primärtumor	
T1	26/53 (49%)
T2	8/53 (15%)
T3	3/53 (6%)
T4a	16/53 (30%)
T4b	0
Lymphknoten	
NX	21/53 (40%)
N0	17/53(32%)
N1	2/53 (4%)
N2a	0
N2b	13/53 (24%)
N2c	0
N3	0
Metastasen	
M0	53/53 (100%)
M1	0

**Tabelle 12: Einteilung der Tumore des Patientenkollektivs anhand der TNM-Klassifikation (n=53)**

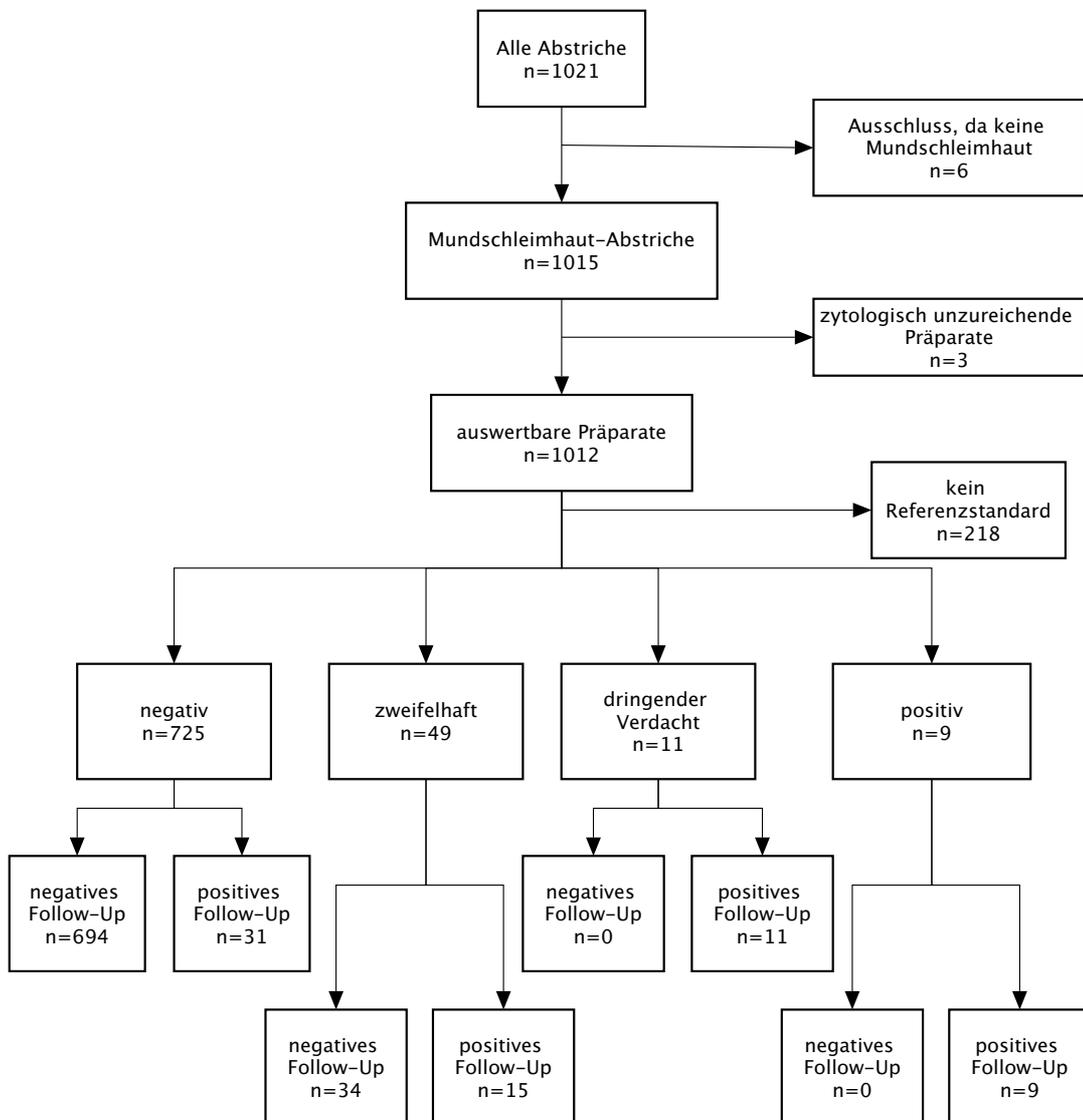
Stadieneinteilung	TNM	Anzahl	Anteil (%)
Stage 0	Tis N0 M0	0	0
Stage I	T1 N0 M0	26	49 %
Stage II	T2 N0 M0	4	8%
Stage III	T1-2 N1 M0	2	4%
	T3 N0-1 M0	0	0
Stage IVA	T1-3 N2 M0	5	9%
	T4a N0-2 M0	16	30%
Stage IVB	T1-4 N3 M0	0	0
	T4b N0-3 M0	0	0
Stage IVC	T1-4 N0-3 M1	0	0

**Tabelle 13: Einteilung der Tumore anhand der im Studienzeitraum gültigen Fassung der Stadieneinteilung gemäß der UICC (n=53)**

### 3.3 Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik

Um die Treffsicherheit für das Gesamtkollektiv zu berechnen, sind grundsätzlich verschiedene Auswertungsvarianten denkbar. So können die nicht eindeutigen Diagnosegruppen mit den zytologischen Ergebnissen „zweifelhaft / bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen“ und „dringender Verdacht / bösartige Zellen wahrscheinlich“ in verschiedenen Varianten entweder als statistisch positives oder als negatives Ergebnis gewertet werden, wodurch unterschiedliche Werte für die Treffsicherheitsdaten der Vierfeldertafeln resultieren.

In Abb. 17 ist u.a. zu sehen, wie sich die zytologischen Diagnosen aufteilen und welche *Follow-up*-Ergebnisse bei weiterer Aufarbeitung der Daten resultierten.



**Abb. 17: Zytologische Ergebnisse der Läsionen, bei denen ein Referenzstandard ermittelt werden konnte und dazugehörige *Follow-up*-Ergebnisse**

Zum Überblick der in den folgenden Abschnitten dargestellten Auswertungsvarianten sind diese in Tabelle 14 mit ihren Auswertungskriterien und ihren Ergebnissen zusammengefasst:

	statistisch negativ	statistisch positiv	Sensitivität	Spezifität	PPW	NPW
Variante A	•negativ	•zweifelhaft •dringender Verdacht •positiv	53%	95,3%	50,7%	95,7%
Variante B	•negativ •zweifelhaft	•dringender Verdacht •positiv	30,3%	100%	100%	94,1%
Variante C	•negativ •zweifelhaft •dringender Verdacht	•positiv	13,6%	100%	100%	92,7%

**Tabelle 14: Überblick über die Auswertungsvarianten A-C und ihre Ergebnisse. NPW = negativer prädiktiver Wert, PPW = positiver prädiktiver Wert**

### 3.3.1 Variante A

Bei Variante A wurden nur zytologischen Befunde, die „negativ“ lauteten auch als statistisch „negativ“ gewertet. Die Diagnosegruppen „zweifelhaft“, „dringender Verdacht“ und „positiv“ wurden als statistisch „positiv“ gewertet (Abb. 18). Die Sensitivität betrug in diesem Fall 53%, die Spezifität 95,3% (Tabelle 15). Der positive prädiktive Wert war mit 50,7% der geringste, der negative prädiktive Wert mit 95,7% der höchste im Vergleich zu Auswertungsvarianten B und C.

		Follow-up		Gesamt
		positiv	negativ	
Zytologisches Ergebnis	positiv (zw./d.V./pos.)	35	34	69
	negativ (neg.)	31	694	725
Gesamt		66	728	794

**Abb. 18: Vierfeldertafel Variante A. Zw. = zweifelhaft, d.V. = dringender Verdacht, pos. = positiv, neg. = negativ**

Parameter	Ergebnis
Sensitivität	53% (35/66)
Spezifität	95,3% (694/728)
Positiver Prädiktiver Wert (PPW)	50,7% (35/69)
Negativer Prädiktiver Wert (NPW)	95,7% (694/725)

**Tabelle 15: Auswertung der Vierfeldertafel Variante A**

### 3.3.2 Variante B

Bei der Auswertung nach Variante B wurden die zytologischen Diagnosen „negativ“ und „zweifelhaft“ als statistisch „negatives“ Ergebnis gezählt. „Dringender Verdacht“ und „positiv“ wurden demnach als statistisch „positiv“ ausgewertet (Abb. 19). Bei dieser Variante ergab sich erwartungsgemäß eine geringere Sensitivität als bei Auswertung A von hier 30,3%, aber eine höhere Spezifität von 100% und ein positiver prädiktiver Wert von ebenfalls 100% (Tabelle 16). Der negative prädiktive Wert ist mit 94,1% geringer als bei Auswertung A.

		Follow-up		Gesamt
		positiv	negativ	
Zytologisches Ergebnis	positiv (d.V./pos.)	20	0	20
	negativ (zw./neg.)	46	728	774
	Gesamt	66	728	794

**Abb. 19: Vierfeldertafel Variante B. D.V. = dringender Verdacht, pos. = positiv, zw. = zweifelhaft, neg. = negativ**

Parameter	Ergebnis
Sensitivität	30,3% (20/66)
Spezifität	100% (728/728)
Positiver Prädiktiver Wert (PPW)	100% (20/20)
Negativer Prädiktiver Wert (NPW)	94,1% (728/774)

Tabelle 16: Auswertung der Vierfeldertafel Variante B

### 3.3.3 Variante C

Bei Auswertungsvariante C zählten die zytologischen Diagnosegruppen „negativ“, „zweifelhaft“ und „dringender Verdacht“ zu den statistisch „negativen“ Ergebnissen. Nur die zytologische Diagnosegruppe „positiv“ wurde auch als statistisch „positives“ Ergebnis gewertet (Abb. 20).

Die Sensitivität von 13,6% war im Vergleich zu den Auswertungsvarianten A und B mit Abstand die geringste. Wie in Variante C betrug die Spezifität 100% und der positive prädiktive Wert 100% (Tabelle 17). Der negative prädiktive Wert ist im Vergleich zu den Auswertungsvarianten A und B ebenfalls der niedrigste mit 92,7%.

		<i>Follow-up</i>		Gesamt
		positiv	negativ	
Zytologisches Ergebnis	positiv (pos.)	9	0	9
	negativ (d.V./zw./neg.)	57	728	785
	Gesamt	66	728	794

Abb. 20: Vierfeldertafel Variante C. Pos. = positiv, d.V. = dringender Verdacht, zw. = zweifelhaft, neg. = negativ

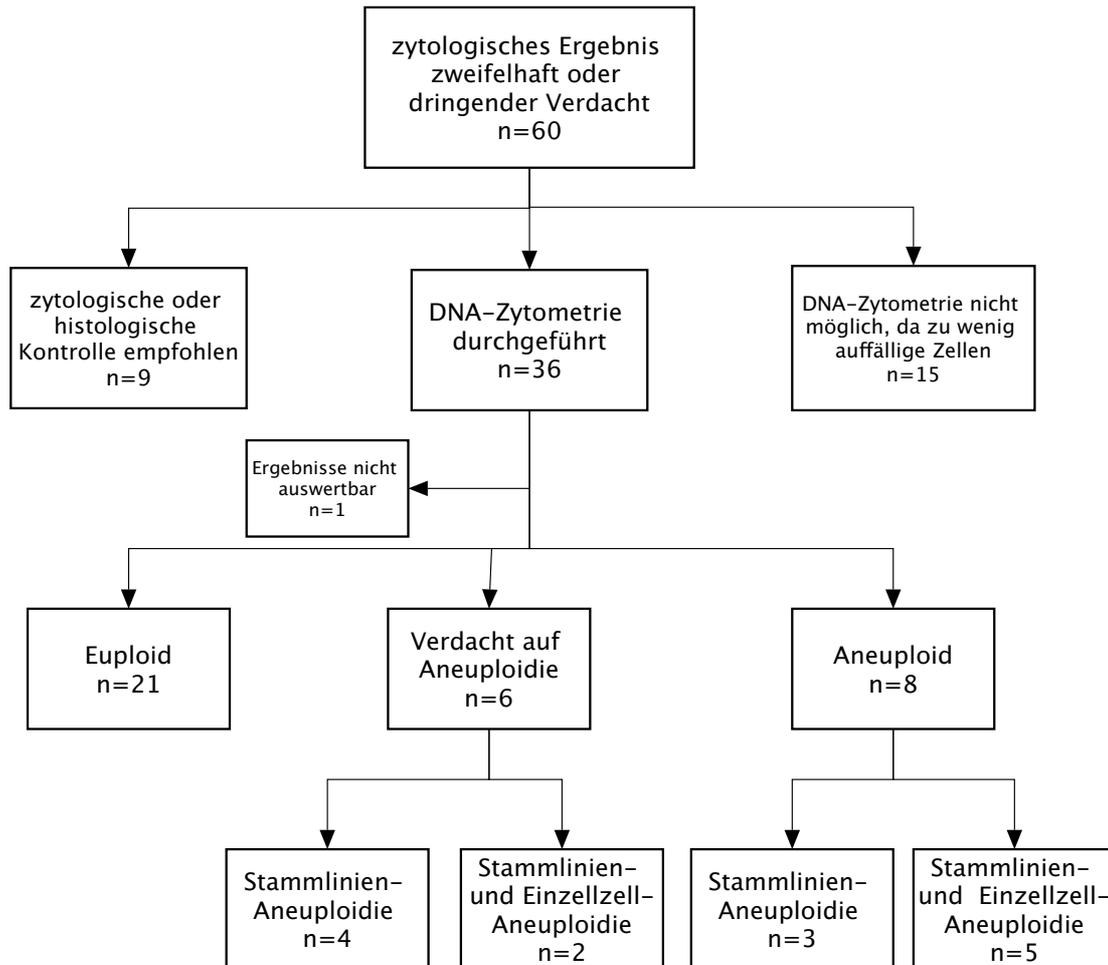
Parameter	Ergebnis
Sensitivität	13,6% (9/66)
Spezifität	100% (728/728)
Positiver Prädiktiver Wert (PPW)	100% (9/9)
Negativer Prädiktiver Wert (NPW)	92,7% (728/785)

**Tabelle 17: Auswertung der Vierfeldertafel Variante C**

### **3.4 Subgruppenanalyse der zytologisch unklaren Fälle im Vergleich mit DNA-Bildzytometrie**

Bei 49 Läsionen war das zytologische Ergebnis „zweifelhaft / maligne Zellen nicht sicher auszuschließen“ und in elf Fällen lautete es „böartige Zellen wahrscheinlich / dringender Verdacht“.

In diesen 60 unsicheren Fällen wurde grundsätzlich eine weitere Abklärung mittels DNA-Bildzytometrie angestrebt. In 15 dieser Fälle waren laut Angaben im zytologischen Befund zu wenig auffällige Zellen für eine Messung im Präparat. Bei weiteren 9 Läsionen wurden im Befundbericht histologische oder zytologische Kontrollen empfohlen, ohne dass explizit erwähnt wurde, dass zu wenig Zellen für eine ergänzende DNA-Bildzytometrie vorlagen, wovon aber ausgegangen werden muss. Deshalb konnte nur bei 36 Proben eine DNA-Bildzytometrie durchgeführt werden. Ein Präparat hiervon war nicht auswertbar, da nach Feulgen-Umfärbung nur 72 auffällige Analysezellen zur Verfügung standen. Diese Zellanzahl reicht nicht zur Festlegung einer Diagnose aus. Die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie sind in Abbildung 21 zusammengestellt. Euploide DNA-bildzytometrische Ergebnisse schließen euploid-diploide und euploid-polyploide Resultate ein. Ein Verdacht auf eine DNA-Aneuploidie wurde dann ausgesprochen, wenn zu wenige Zellen für eine sicher aneuploide Diagnose vorlagen (vgl. Kapitel 2.3.1).



**Abb. 21: DNA-Bildzytometrie bei zytologisch unklaren Ergebnissen (n = 60)**

Um einen möglichen diagnostischen Zugewinn der DNA-Bildzytometrie zu ermitteln, wurden die Ergebnisse denen der korrespondierenden konventionellen Zytologie „zweifelhaft“ und „dringend verdächtig“ gegenübergestellt. Diese beiden Diagnosekategorien wurden hier als statistisch „positiv“ gewertet. In zwei getrennten Auswertungsvarianten wurde der zytometrische „Verdacht auf DNA-Aneuploidie“ einmal als statistisch positiv (DNA-Bildzytometrie Variante 1) und einmal als „negativ“ (DNA-Bildzytometrie Variante 2) klassifiziert.

Diese Auswertungen sind in den nachfolgenden Abschnitten dargelegt und in Tabelle 18 zusammengefasst:

	statistisch positiv	statistisch negativ	Sensitivität	Spezifität	PPW	NPW
korrespondierende Zytologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>•zweifelhaft</li> <li>•dringender Verdacht</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•negativ</li> </ul>	100%	0%	37,1%	n.e.
DNA-Bildzytometrie Variante 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>•V.a. Aneuploidie</li> <li>•Aneuploidie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•euploid</li> </ul>	69,2%	77,3%	64,3%	81%
DNA-Bildzytometrie Variante 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aneuploidie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•V.a. Aneuploidie</li> <li>•euploid</li> </ul>	61,5%	100%	100%	81,5%

**Tabelle 18: Treffsicherheiten der DNA Bildzytometrie und der korrespondierenden zytologischen Diagnosen (n=35). V.a. = Verdacht auf, NPW = negativer prädiktiver Wert, PPW = positiver prädiktiver Wert, n.e. = nicht ermittelbar**

### 3.4.1 Treffsicherheit der korrespondierenden zytologischen Diagnosen bei den DNA-zytometrisch auswertbaren Fällen

In dieser Auswertungsvariante wurden „zweifelhafte“ und „dringend verdächtige“ Fälle als statistisch „positiv“ gewertet. So ergab sich eine Sensitivität von 100% (Abb. 22 und Tabelle 19). Die Spezifität von 0% sagt hier nichts aus, da in der vorliegenden Auswertung definitionsgemäß keine negativen Testergebnisse vorliegen.

		Follow-up		Gesamt
		positiv	negativ	
Zytologisches Ergebnis	positiv (zw./d.V.)	13	22	35
	negativ	0	0	0
	Gesamt	13	22	35

**Abb. 22: Vierfeldertafel Treffsicherheit der korrespondierenden zytologischen Diagnosen bei den DNA-zytometrisch auswertbaren Fällen. Zw. = zweifelhaft, d.V. = dringender Verdacht.**

Parameter	Ergebnis
Sensitivität	100% (13/13)
Spezifität	0% (0/22)
Positiver Prädiktiver Wert (PPW)	37,1% (13/35)
Negativer Prädiktiver Wert (NPW)	Nicht ermittelbar

**Tabelle 19: Treffsicherheit der korrespondierenden zytologischen Diagnosen bei den DNA-zytometrisch auswertbaren Fällen**

### 3.4.2 Treffsicherheit der DNA-Bildzytometrie, Variante 1

Bei dieser Variante wurden die DNA-Bildzytometrie Ergebnisse „Verdacht auf Aneuploidie“ und „Aneuploidie“ zu den statistisch „positiven“ Ergebnissen gezählt. Das Ergebnis „euploid“ wurde als statistisch „negatives“ Ergebnis gewertet (Abb. 23). Die Sensitivität betrug 69,2% und die Spezifität 77,3% (Tabelle 20).

		Follow-up		Gesamt
		positiv	negativ	
DNA-Bildzytometrie-Ergebnis	positiv (V.a. Aneuploidie, Aneuploidie)	9	5	14
	negativ (euploid)	4	17	21
Gesamt		13	22	35

**Abb. 23: Vierfeldertafel Treffsicherheit der DNA-Bildzytometrie, Variante 1. V.a. = Verdacht auf**

Parameter	Ergebnis
Sensitivität	69,2% (9/13)
Spezifität	77,3% (17/22)
Positiver Prädiktiver Wert (PPW)	64,3% (9/14)
Negativer Prädiktiver Wert (NPW)	81% (17/21)

**Tabelle 20: Treffsicherheit der DNA-Bildzytometrie, Variante 1**

### 3.4.3 Treffsicherheit der DNA-Bildzytometrie, Variante 2

Bei dieser Variante wurde nur das DNA-Zytometrie-Ergebnis „Aneuploidie“ als statistisch „positives“ Ergebnis gewertet. Die Ergebnisse „Verdacht auf Aneuploidie“ und „euploid“ wurden als statistisch „negative“ Ergebnisse gewertet (Abb. 24). Mit 61,5% war die Sensitivität im Vergleich mit den beiden vorgenannten Auswertungen die geringste, dafür aber die Spezifität mit 100% mit Abstand am höchsten. Auch der positive prädiktive Wert und der negative prädiktive Wert waren mit 100% und 81,5% im Vergleich sehr hoch (Tabelle 21).

		Follow-up		Gesamt
		positiv	negativ	
DNA-Bildzytometrie-Ergebnis	positiv (Aneuploidie)	8	0	8
	negativ (V.a. Aneuploidie, euploid)	5	22	27
	Gesamt	13	22	35

Abb. 24: Vierfeldertafel Treffsicherheit der DNA-Bildzytometrie, Variante 2. V.a. = Verdacht auf

Parameter	Ergebnis
Sensitivität	61,5% (8/13)
Spezifität	100% (22/22)
Positiver Prädiktiver Wert (PPW)	100% (8/8)
Negativer Prädiktiver Wert (NPW)	81,5% (22/27)

Tabelle 21: Treffsicherheit der DNA-Bildzytometrie, Variante 2

### 3.4.4 Gegenüberstellung von aneuploiden DNA-bildzytometrischen Ergebnissen, Zytologie und Follow-up-Daten

Um einen Überblick des Zusammenhanges von zytologischem Befund, Follow-up Diagnosen und aneuploiden Zytometrie Ergebnissen zu ermöglichen, wurden diese in einer Tabelle separat dargestellt (Tabelle 22).

Die Tabelle ist in zwei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt (oberhalb der schwarzen Linie) befinden sich die sechs Fälle, bei denen das Ergebnis der DNA-Bildzytometrie „Verdacht auf DNA-Aneuploidie“ lautete.

Im zweiten Abschnitt sind die acht Fälle dargestellt, bei denen die DNA-Bildzytometrie das Ergebnis „DNA-Aneuploid“ ergab. DNA-aneuploide Ergebnisse traten hier immer mit einer *Follow-up* Diagnose von mindestens einer schweren Dysplasie (Dysplasie Grad III) oder einem PEC auf, wohingegen sich bei den lediglich Aneuploidie-verdächtigen Ergebnissen nur eine Karzinom-Diagnose im *Follow-up* fand.

zytologische Diagnose	Ergebnis der DNA-Bildzytometrie		DNA-Bildzytometrie Ergebnis gruppiert	Follow-up-Diagnose
	Einzelzell- Aneuploidie (inkl. Zahl der 9cEE)	Stammlinien (inkl. Modalwert in c)		
abnorme Regeneratepithelien		1,84c und 3,61c und 3c	V.a. DNA-Aneuploidie	Blasenbildende Erkrankung (ulzerierend und entzündlich)
Dysplasie Grad I	eine Zelle >9c (10,1c)	2c und 4c und 8c	V.a. DNA-Aneuploidie	Papillom/ Papilläre Hyperplasie
abnorme Regeneratepithelien		2c und 3,57c und 6c und 7,3c	V.a. DNA-Aneuploidie	Dysplasie Grad I
abnorme Regeneratepithelien	mehrere Zellen bis 9c	2,2c und 4,11c	V.a. DNA-Aneuploidie	Dysplasie Grad II
abnorme Regeneratepithelien	eine Zelle >9c	2,06 und 3,91c	V.a. DNA-Aneuploidie	PEC
abnorme Regeneratepithelien		4c und 7,6c	V.a. DNA-Aneuploidie	Entzündung
abnorme Regeneratepithelien		3,05c und 6,04c	DNA-Aneuploidie	Dysplasie Grad III
Dysplasie Grad III	viele Zellen >9c Höchstwert 22,1c	3,61c und 7,11c	DNA-Aneuploidie	PEC
abnorme Regeneratepithelien		3,58c und 7c	DNA-Aneuploidie	PEC
Dysplasie Grad III	2 Zellen >9c	2,76c und 4,52c und 5,16c	DNA-Aneuploidie	Dysplasie Grad III
Dysplasie Grad III	4 Zellen >9c	3,26c und 3,84c und 7c und 8c	DNA-Aneuploidie	PEC
Dysplasie Grad I		3,24c und 6c	DNA-Aneuploidie	PEC
Dysplasie Grad III	mehrere Zellen >9c	3,13c und 4,05c und 5,93c	DNA-Aneuploidie	PEC
Dysplasie Grad III	mehrere Zellen >9c	3,13c und 4,05c und 5,93c	DNA-Aneuploidie	PEC

**Tabelle 22: Gegenüberstellung von aneuploiden Zytometrie-Ergebnissen, Zytologie und Follow-up-Daten. Aneuploide Stammlinien sind in Rot dargestellt. V.a. = Verdacht auf, PEC = Plattenepithelkarzinom, 9cEE = 9 c exceeding events. n=14**

### 3.5 Kombination der Auswertung von DNA-Bildzytometrie und Zytologie

In zwei weiteren Auswertungsvarianten (A1 und A2) wurde wieder das Gesamtkollektiv (n=794) betrachtet. Allerdings wurde nun das zytologische Ergebnis in den 35 Fällen, bei denen eine DNA-Bildzytometrie durchgeführt wurde, durch das zytometrische Ergebnis ersetzt. Bei den übrigen Fällen ohne DNA-Bildzytometrie blieb das Ergebnis der Zytologie bestehen. Diese Art der Auswertung entspricht dem Vorgehen in der klinischen Routinediagnostik, bei der ein nachträglicher Befundbericht über das Ergebnis der DNA-Bildzytometrie den primären „zweifelhaften“ oder „dringend verdächtigen“ zytologischen Befund entkräftet oder bestätigt.

Wie in Variante A (s. Kapitel 3.4.1) wurden nur zytologisch „negative“ Befunde auch als statistisch „negativ“ gewertet. Die anderen Diagnosegruppen „zweifelhaft“, „dringender Verdacht“ und „positiv“ wurden als statistisch „positiv“ gewertet. Die beiden Auswertungen A1 und A2 beziehen sich auf die unterschiedliche Zuordnung des zytometrischen Befundes „V.a. DNA-Aneuploidie“ (siehe folgende Abschnitte).

Tabelle 23 zeigt die Auswertungsvarianten der kombinierten Auswertungen von Zytologie und DNA-Bildzytometrie (A1 und A2) im Vergleich mit der alleinigen Auswertung zytologischer Befunde (Variante A, s. Kapitel 3.4.1).

	statistisch positiv	statistisch negativ	Sensitivität	Spezifität	PPW	NPW
Variante A	<ul style="list-style-type: none"> <li>•zweifelhaft</li> <li>•dringender Verdacht</li> <li>•positiv</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•negativ</li> </ul>	53%	95,3%	50,7%	95,7%
Variante A1 (DNA-Bildzytometrie und Zytologie)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aneuploidie</li> <li>•positiv</li> <li>•dringender Verdacht</li> <li>•zweifelhaft</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•V.a. Aneuploidie</li> <li>•euploid</li> <li>•negativ</li> </ul>	45,5%	98,4%	71,4%	95,2%
Variante A2 (DNA-Bildzytometrie und Zytologie)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aneuploidie</li> <li>•V.a. Aneuploidie</li> <li>•positiv</li> <li>•dringender Verdacht</li> <li>•zweifelhaft</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•euploid</li> <li>•negativ</li> </ul>	47,0%	97,7%	64,6%	95,3%

**Tabelle 23: Kombinierte Auswertung von zytologischer und DNA-bildzytometrischer Diagnostik im Vergleich zur alleinigen Zytologie Variante A. V.a. = Verdacht auf, NPW = negativer prädiktiver Wert, PPW = positiver prädiktiver Wert**

### 3.5.1 Variante A1

In der Auswertungsvariante A1 wurde nur das DNA-Bildzytometrie-Ergebnis „Aneuploidie“ als statistisch „positiv“ gewertet. „Verdacht auf Aneuploidie“ und „euploid“ wurden demnach als statistisch „negative“ Ergebnisse gewertet (Abb. 25).

Im Vergleich mit den Treffsicherheiten der alleinigen Zytologie (Auswertungsvariante A) war die Sensitivität mit 45,5% hier geringer, die Spezifität aber mit 98,4% erhöht. Der positive prädiktive Wert war mit 71,4% deutlich höher (Variante A: 50,7%), der negative prädiktive Wert mit 95,2% fast genauso hoch (Tabelle 24).

		Follow-up		Gesamt
		positiv	negativ	
DNA-Bildzytometrie- oder Zytologie- Ergebnis	DNA-Zytometrie: Aneuploidie Zytologie: positiv; zw.; d.V.	30	12	42
	DNA-Zytometrie: V.a. Aneuploidie; euploid Zytologie: negativ	36	716	752
	Gesamt	66	728	794

Abb. 25: Vierfeldertafel Variante A1. zw = zweifelhaft, d.V. = dringender Verdacht, V.a. = Verdacht auf

Parameter	Ergebnis
Sensitivität	45,5% (30/66)
Spezifität	98,4% (716/728)
Positiver Prädiktiver Wert (PPW)	71,4% (30/42)
Negativer Prädiktiver Wert (NPW)	95,2% (716/752)

Tabelle 24: Kombinierte Auswertung Zytologie und DNA-Bildzytometrie, Variante A1

### 3.5.2 Variante A2

Bei der Auswertungsvariante A2 wurden die DNA-Bildzytometrie-Ergebnisse „V.a. Aneuploidie“ und „Aneuploidie“ als statistisch „positiv“ gewertet. Nur euploide Ergebnisse wurden als statistisch „negativ“ gewertet. Die Treffsicherheiten waren verglichen mit Auswertungsvariante A1 ähnlich, nur der positive prädiktive Wert war mit 64,6% schlechter als bei Variante A1 (Abb. 26 und Tabelle 25).

		Follow-up		Gesamt
		positiv	negativ	
DNA-Bildzytometrie- oder Zytologie-Ergebnis	DNA-Zytometrie: V.a. Aneuploidie; Zytologie: positiv; zw.; d.V.	31	17	48
	DNA-Zytometrie: euploid Zytologie: negativ	35	711	746
	Gesamt	66	728	794

Abb. 26: Vierfeldertafel Variante A2. V.a. = Verdacht auf, zw. = zweifelhaft, d.V. = dringender Verdacht

Parameter	Ergebnis
Sensitivität	47% (31/66)
Spezifität	97,7% (711/728)
Positiver Prädiktiver Wert (PPW)	64,6% (31/48)
Negativer Prädiktiver Wert (NPW)	95,3% (711/746)

Tabelle 25: Kombinierte Auswertung Zytologie und DNA-Bildzytometrie, Variante A2

### 3.6 Ermittlung der zytologischen Treffsicherheit bei gleichbleibendem Behandler

In einer weiteren Auswertungsvariante wurden nur die Fälle inkludiert, bei denen die Bürstenbiopsie und die chirurgische Gewebebiopsie durch den selben Behandler durchgeführt wurden. Dies war bei 93 Läsionen der Fall. Es galten dieselben Kriterien wie Auswertung A des gesamten Abstrichkollektivs (die

zytologischen Diagnosekategorien „zweifelhaft“, „dringender Verdacht“ und „negativ“ wurden als statistisch „negatives“ Ergebnis gewertet) und wurde daher Variante AX genannt. Diese Auswertung schloss 82 zytologisch negative, 9 zweifelhafte, 2 dringend verdächtige und keine positiven Diagnosen mit ein. Bei dieser Auswertung waren sowohl die Sensitivität mit 100% als auch die Spezifität mit 92,1% sehr hoch und auch im Vergleich zu den vorangegangenen Auswertungen deutlich erhöht (Abb. 27 und Tabelle 26).

		Follow-up		Gesamt
		positiv	negativ	
Zytologisches Ergebnis	positiv (zw./d.V./pos.)	4	7	11
	negativ (neg.)	0	82	82
	Gesamt	4	89	93

Abb. 27: Vierfeldertafel Variante AX. Zw. = zweifelhaft, d.V. = dringender Verdacht, pos. = positiv, neg. = negativ

Parameter	Ergebnis
Sensitivität	100% (4/4)
Spezifität	92,1% (82/89)
Positiver Prädiktiver Wert (PPW)	36,4% (4/11)
Negativer Prädiktiver Wert (NPW)	100% (82/82)

Tabelle 26: Zytologische Treffsicherheit bei gleichbleibendem Behandler, Auswertungsvariante AX

## **4 Diskussion**

Der Goldstandard zur Abklärung auffälliger Mundschleimhautläsionen ist nach wie vor die chirurgische Gewebebiopsie, die in der Praxis insbesondere bei malignitätsverdächtigen Veränderungen durchgeführt wird. Es hat sich als ebenfalls leitliniengemäße deutlich weniger invasive, einfache, schnelle und kostengünstige Alternative die orale Abstrichentnahme zur zytologischen Untersuchung mit einer Bürste bewährt [18, 19, 42, 44]. Diese kommt insbesondere bei unklarer Dignität und nicht primärer Indikation zur Biopsie zur Anwendung. Da eine möglichst gute zytologische Untersuchung für eine sichere Diagnostik essenziell ist, wurde in dieser Studie die diagnostische Treffsicherheit der oralen Bürstenbiopsien am Universitätsklinikum Düsseldorf der Jahre 2014 und 2015 untersucht.

### **4.1 Selektion des Patientenkollektivs**

In diese Studie wurden mit 1012 auswertbaren Mundschleimhautabstrichen viele Proben einbezogen. Der Umstand, dass jeder 5. Mundschleimhautabstrich nicht auswertbar war, da ihm kein Referenzstandard zugewiesen werden konnte, verringerte das auswertbare Kollektiv auf 794 Fälle. Die Gründe dafür waren verschieden.

So waren in 22 Fällen beispielsweise keine Akten auffindbar. Da es in Unikliniken nie nur um Forschung geht, sondern die Akten beispielsweise von behandelnden Ärzten und Studenten benötigt wurden, war das Anfordern in einigen Fällen trotz wiederholter Versuche nicht erfolgreich. Erfreulich war, dass in nur 19 Fällen ein Studienausschluss aufgrund unzureichender Korrelation von Angaben zur Abstrichstelle und dem weiteren klinischen Verlauf erfolgen musste, was für eine insgesamt gute Dokumentation der Lokalisation der Läsionen spricht.

Außerdem wurden 175 Fälle aufgrund von zu geringer Nachuntersuchungszeit ausgeschlossen.

In 27 dieser Fälle erfolgte eine Weiterbehandlung beim Hauszahnarzt. Hiermit ist ebenfalls bei Studien mit einem Kollektiv zu rechnen, das von extern mit spezifischen Fragestellungen an eine Universitätsklinik überwiesen wird.

In den übrigen 148 Fällen kam es zu gar keiner Wiedervorstellung. Dies lässt sich in einigen Fällen ebenfalls mit eindeutig benignen Diagnosen erklären, die weiter

beim Hauszahnarzt besprochen und behandelt werden können. In anderen Fällen starben die teilweise sehr betagten Patienten nur wenige Tage nach der Bürstenbiopsie an multiplen Organversagen oder Leukämie. In den meisten Fällen sind die Patienten nicht zur Wiedervorstellung oder empfohlenen weiteren Abklärung innerhalb der nächsten Wochen erschienen. Ein möglicher Grund könnte in der Angst vor einem chirurgischen Eingriff bestehen.

Als negativer Referenzstandard wurde aus praktischen Gründen akzeptiert, wenn nach Diagnose einer benignen Mundschleimhauterkrankung und passendem klinischem Gesamtbild die Patienten sich nach mehr als 14 Tagen erneut klinisch vorstellen. In diesen Fällen wurden die Bedingungen für einen negativen Referenzstandard als erfüllt angesehen, wenn sich die Patienten innerhalb von 12 Monaten nicht mit der Diagnose einer (prä-)malignen Läsion erneut vorstellten. Für die Zulässigkeit eines solchen Vorgehens spricht die insgesamt hohe Spezifität der zytologischen Abstrichuntersuchung [45].

## **4.2 Klinische Daten des Patientenkollektivs: Altersverteilung, Abstrichlokalisierung, Entitäten, Risikofaktoren und Rezidive sowie Stadien bei Karzinomen**

### Altersverteilung:

Setzt man die folgend genannten Daten zum Altersdurchschnitt bei Karzinompatienten dieser Studie mit den bundesweiten Daten aus dem Jahr 2016 in Vergleich, so sieht man eine gewisse Verschiebung.

So machten in dieser Studie beispielsweise die Patienten in der Altersgruppe der 50- bis 79-Jährigen mit 74% den Großteil des gesamten Patientenkollektivs aus. Das Durchschnittsalter betrug bei den Männern 58,4 Jahre und bei den Frauen 62,4 Jahre. Das durchschnittliche Alter der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen lag in dieser Studie mit 71 Jahren etwas höher. Bei den bundesweiten Krebsregisterdaten war das Durchschnittsalter der im Jahre 2016 an Mund- und Rachenkrebs erkrankten Männer mit 63 etwas geringer als das der Frauen mit 66 [1]. Das in der eigenen Serie hiermit verglichen erhöhte Durchschnittsalter lässt sich möglicherweise durch den Umstand erklären, dass im Krebsregister das Alter bei Neuerkrankungen angegeben wird, während in der eigenen Studie in knapp der Hälfte der Fälle (32 von 66 Fällen) auch Rezidive vorlagen. Das Alter der

Patienten bei Erstdiagnose, was sich aber aus den Krankenakten meist nicht ableiten ließ, wäre daher auch in den eigenen Daten geringer.

#### Abstrichlokalisation:

Während sich die meisten Läsionen in dieser Studie an Wange (24%), Gingiva (23%) oder Zunge (18%) befanden, war eine ähnliche Verteilung bei einer Studie von Damanaki an einer Kohorte von 135 Mundschleimhautabstrichen sichtbarer Läsionen zu finden [76]. Dort entfielen mit 45,2% noch mehr der untersuchten Läsionen auf die Wangen, mit 25,9% ähnlich viele auf Gingiva und 11% auf Zunge. Diese Verschiebung lässt sich durch die Häufung von Patienten mit Lichen planus und Leukoplakien von 85,9% (klinische Diagnosen) bzw. 71,9% (histologische Diagnosen) in der Arbeit von Damanaki erklären im Vergleich zu 55,7% im eigenen Kollektiv. Diese Läsionen befinden sich oft an der Wangenschleimhaut [16].

Auffällig war, dass die Häufigkeitsverteilung der Lokalisationen in der eigenen Studie sich bei separater Betrachtung der (prä-)malignen Veränderungen veränderte. So entfielen beispielsweise 42,4% (28/66) aller Karzinome und hochgradigen Plattenepitheldysplasien auf Zunge und Mundboden bzw. Zungenrund, obwohl dort nur 27% aller Abstriche entnommen wurden. Diese Prädilektionsstelle für Plattenepithelkarzinome war auch in einer Studie von Dhanuthai et al. zu finden, die 474.851 Biopsieberichte verschiedener internationaler Institute aus den Jahren 2005-2014 untersuchte, wovon 6.151 Fälle tumorpositiv waren [77]. Von diesen Karzinomen befanden sich 25,4% auf der Zunge. Die üblichen Prädilektionsstellen des Mundhöhlenkarzinoms sind insbesondere Zunge und Mundboden und auch die Gingiva [4, 19].

Während in der eigenen Studie an der Wange 24% aller Abstriche entnommen wurden, machte der Anteil der an der Wange lokalisieren (prä-)malignen Läsionen nur 13,8% (9/66) aus. Dies könnte damit zusammenhängen, dass beispielsweise in der Poliklinik für zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme eine spezielle „Mundschleimhautsprechstunde“ angeboten wird, in welcher nicht nur unklare, meist vom Hauszahnarzt überwiesene Mundschleimhautveränderungen überprüft werden, sondern sich beispielsweise auch Patienten mit chronischen Mundschleimhautläsionen, wie Lichen planus, Pemphigus vulgaris etc. regelmäßig untersuchen lassen können und sollen. Diese Läsionen sind oft im Bereich der

Wange lokalisiert. Da ca. 500 der in dieser Studie eingeschlossenen Mundschleimhautabstriche aus der oben genannten Sprechstunde stammen, ist das Kollektiv wahrscheinlich für die Abstrichlokalisation Wange angereichert. Somit erklärt sich möglicherweise der Umstand, dass fast jeder 4. Abstrich dieser Studie an der Wange entnommen wurde.

#### Entitäten:

Auch die abschließenden Diagnosen nach dem *Follow-up* bzw. histologischer und zytologischer Diagnostik waren in ihren Anteilen ähnlich mit der Kohortenstudie von Damanaki. In dieser Studie an Abstrichen von Patientinnen und Patienten der Poliklinik für zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme am UKD entfielen von den Abstrichen von 135 klinisch auffälligen Läsionen insgesamt 48,1% auf Leukoplakien, 23,7% auf Lichen (wohl ohne Dysplasie), 8,2% auf Karzinome und 5,2% auf Dysplasien aller Dysplasiegrade. In der vorliegenden Studie waren es 794 Abstriche, von denen 31,4% auf Leukoplakie, 24,2% auf Lichen, 7,6% auf Karzinome und 1,9% auf milde bis schwere Dysplasien entfielen. Die leichten und bei der Leukoplakie deutlichen Unterschiede der Häufigkeiten erklären sich am ehesten aufgrund des unterschiedlichen Spektrums an oralpathologischen Grunderkrankungen, die in der Klinik für MKG und der Poliklinik für zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme am UKD behandelt werden. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass bei der Studie von Damanaki im Wesentlichen nur die oralen potenziell malignen Störungen Lichen planus und Leukoplakie (neben wenigen Fällen von Condylomen und *Graft versus Host* Erkrankung) sowie Karzinome in die Studie eingeschlossen wurden, während in der vorliegenden Studie auch einige andere, nicht primär als OPMD diskutierte Läsionen, beispielsweise Ulzera, papilläre Hyperplasien oder Fibrome inkludiert wurden [76]. Auch in einer Studie von Deuerling et al. aus dem Jahr 2019 an 1352 auffälligen Mundschleimhautläsionen mit histologischer Korrelation und/oder klinischem *Follow-up* überwogen die Diagnosen Leukoplakie mit 23,5% (317/1352) und Lichen planus und Lichen erosivus mit insgesamt 29,4% (398/1352) gegenüber den anderen Diagnosen, während 105 Fälle (7,8%) auf Karzinome entfielen [78]. Lichen und Leukoplakie zusammen machen bei Deuerling et al. 52,9% aus, was gut mit 55,7% des eigenen Kollektivs korreliert. Der Anteil von Karzinomen bei Deuerling et al. ist ähnlich hoch wie bei Damanaki oder im eigenen Kollektiv.

### Risikofaktoren:

Bei den malignen Tumoren in der eigenen Studie handelte es sich in 95% (57/60) der Fälle um ein Plattenepithelkarzinom, welches auch in den Krebsregisterdaten als häufigstes Karzinom der Mundhöhle und des Rachens angegeben wird [1].

Für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen werden neben diversen anderen Faktoren vor allem der Konsum von Alkohol und Tabak als Hauptrisikofaktoren angesehen [6, 19].

Daher wurden auch in der eigenen Studie die Krankenakten der Patienten auf Angaben für diese Risikofaktoren hin untersucht. Auffällig war, dass der Anteil der Patienten mit negativer oder unbekannter Risiko-Anamnese im Gesamtkollektiv 58% betrug und sich bei Betrachtung der Patienten mit malignen Veränderungen auf 46% verringerte. Dies könnte an dem Umstand liegen, dass bei den Patienten mit bereits vorbekannten oder bereits klinisch vermuteten malignen Läsionen die Anamnese eventuell sorgfältiger erstellt und so mehr vorliegende Risikofaktoren erhoben wurden.

Auch eine positive Tumor-Anamnese als Risikofaktor wurde untersucht: Der Anteil an Patienten am Gesamtkollektiv, die in ihrer Vergangenheit bereits ein Plattenepithelkarzinom hatten, betrug 14%, während dieser bei den Patienten mit malignen Veränderungen 47% ausmachte. Die absolute Zahl beim Betrachten der Läsionen anstatt der Patienten ist noch etwas höher, da bei einigen Patienten synchrone Plattenepithelkarzinome auftraten. So handelte es sich bei 32 von 66 (prä-)malignen Läsionen um ein Rezidiv, also in 48,5% der Fälle. Da sich in der eigenen Studie auch Patienten der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie am Universitätsklinikum in der Nachsorge nach einem Mundschleimhautkarzinom mit erneuten morphologisch auffälligen Läsionen befanden, die mittels Bürstenzytologie und/oder chirurgischer Biopsie abgeklärt wurden, ist eine hohe Rate an Rezidivkarzinomen in der vorliegenden Studie nicht überraschend.

### Rezidive maligner Tumoren:

Die hohe Rezidivneigung von Mundschleimhautkarzinomen findet sich ebenfalls in anderen Arbeiten. So untersuchten Liu et al. in einer retrospektiven Studie 1282 Krankenakten von Patienten, bei denen in einem Krankenhaus in Taichung (Taiwan) ein Plattenepithelkarzinom im Mund diagnostiziert wurde, auf Einträge

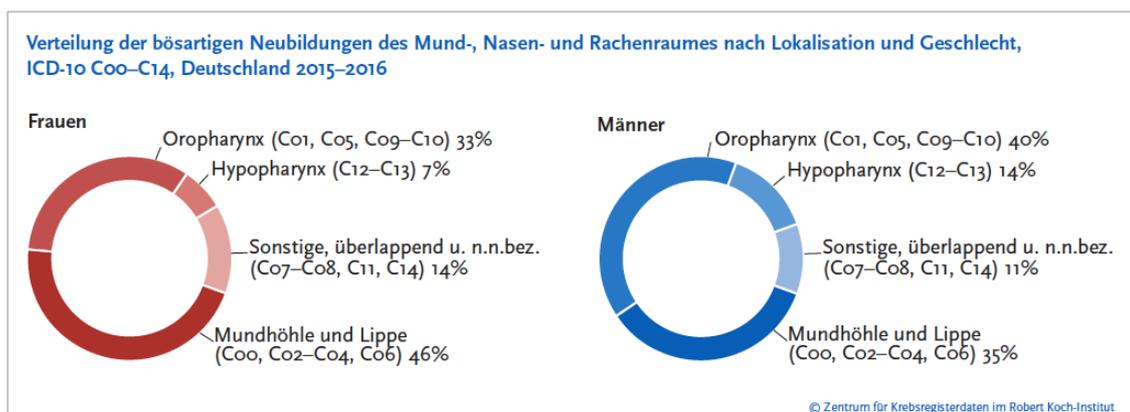
über Rezidive. In 31,3% der Fälle wurden Lokalrezidive und in 19,3% der Fälle lokoregionäre Rezidive entdeckt [79]. Auch Mücke et al. stellten in Bochum in einer aktenbasierten retrospektiven Studie von 773 Patienten mit histologisch gesichertem PEC bei 23,9% Rezidive fest, davon waren ca. 65% lokaler und 25% lokoregionärer Art [80]. Zaman et al. untersuchten 73 Patienten, bei denen ein Plattenepithelkarzinom chirurgisch *in sano* (>5mm Sicherheitsabstand) entfernt und eine *Neck Dissection* ohne Metastasennachweis blieb, aber anschließend keine Strahlen- oder Chemotherapie erfolgte. Sie ermittelten eine Rezidivrate von 30,1%, hiervon 55% lokale und 45% lokoregionale Rezidive. 72,7% der Rezidive traten in den ersten 2 Jahren nach Erstbehandlung des Primärtumors auf [81]. Auch in einer retrospektiven Kohortenstudie von Yanamoto et al. an 187 histologisch bestätigten, radikalchirurgisch entfernten PEC (<1,5 cm Sicherheitsabstand), die in einigen Fällen anschließend einer Strahlentherapie zugeführt wurden, traten 90% der Rezidive in den ersten beiden Jahren nach Erstbehandlung des Primärtumors auf [82]. Die daraus resultierende Empfehlung einer Tumornachsorgezeit von mindestens 2 Jahren wird in diversen anderen Studien und Leitlinien bekräftigt [19, 83]. Die Detektionsrate mittels eines zytologischen Bürstenabstriches von 48,5% im eigenen Kollektiv ist durchaus verbesserungsbedürftig. Mittels eines Bürstenabstriches können nur oberflächliche Läsionen erfasst werden, was im Falle der Primärdiagnostik eines Plattenepithelkarzinoms oder bei der Diagnose von Plattenepitheldysplasien gegeben sein dürfte. Im Falle eines Rezidivs nach primärer chirurgischer Therapie kann nicht unbedingt von einer oberflächlichen Läsion ausgegangen werden, daher wäre bei negativer Zytologie, aber klinisch weiter bestehendem Verdacht auf ein Rezidiv hier eine diagnostische Methode zu wählen, welche auch tiefere Läsionen erfasst, z.B. MRT oder eine Gewebebiopsie.

#### Stadien maligner Tumoren:

In der eigenen Studie befanden sich von allen (prä-)malignen Läsionen mit Angabe des Stadiums (53 von 66) 49% im Stadium I und 8% im Stadium II (alles Plattenepithelkarzinome). Weitere 9,1% (6 von 66) waren hochgradige Plattenepitheldysplasien und wurden daher keinem Tumorstadium zugeordnet. Sowohl die

hochgradige Plattenepitheldysplasie und spätestens aber das Plattenepithelkarzinom im Stadium I müssen aber als Zielläsionen für eine Früherkennung angesehen werden.

Außerdem lag bei keinem Fall eine allerdings auch nur selten vorkommende Fernmetastasierung vor. Beides spricht für eine in vielen Fällen vorhandene erfolgreiche Früherkennung einer (prä-)malignen Mundschleimhautläsion oder eines Rezidivs im vorliegenden Kollektiv, wohingegen in der Literatur beschrieben ist, dass 60% aller oralen Plattenepithelkarzinome erst im fortgeschrittenen Stadium (Stadium III-IV) diagnostiziert werden [84]. Auch im bundesweiten Datenvergleich des Robert-Koch-Instituts wurden 2015 und 2016 nur jeder vierte bis fünfte Tumor bei Frauen und sogar nur jeder siebte Tumor bei Männern im frühen Stadium (0/I) entdeckt [1]. Dies dürfte die alle Stadien einbeziehende nur mäßige 5-Jahresüberlebensrate von 47% bei Männern und 63% bei Frauen erklären. Allerdings muss beim Vergleich mit diesen deutschlandweiten Zahlen einschränkend beachtet werden, dass in der eigenen Studie nur Karzinome im Mundschleimhautbereich inkludiert sind, während im bundesweiten Vergleich zusätzlich Karzinome des Oropharynx und Hypopharynx eingeschlossen sind. Allein die Karzinome im Oropharynxbereich machen mit 33% bei den Frauen bzw. 40% bei den Männern einen großen Anteil aus und werden auch wegen der anatomisch schwieriger zugänglichen und weniger sichtbaren Lage oft erst später entdeckt, was eine Verschiebung der Daten hin zu den höheren Tumorstadien zur Folge haben dürfte (s. Abb. 28) [1, 85].



**Abb. 28: Verteilung der bösartigen Neubildungen des Mund-, Nasen- und Rachenraumes nach Lokalisation und Geschlecht, ICD-10 C00–C14, Deutschland 2015–2016. Quelle: Robert-Koch-Institut [1, 85], abgedruckt mit Genehmigung.**

Eine Tumor(früh)erkennung spätestens im Stadium I ist aber prognostisch bedeutsam. So war die 5-Jahresüberlebensrate in einer Studie an 396 überwiegend männlichen Patienten mit primär kurativ operiertem Mundschleimhautkarzinom von Lee und Mitarbeitern im TNM-Stadium I 91,3%, im Stadium II 75,8%, im Stadium III 60,9% und 40,5% im Stadium IV [86].

### **4.3 Zytologische Treffsicherheit im Literaturvergleich**

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien zur Ermittlung der diagnostischen Treffsicherheit der oralen Abstrichzytologie. Die Studienheterogenität ist enorm. So können z.B. Treffsicherheiten von Studien, die Abstriche von sichtbaren Läsionen untersuchen, nicht verglichen werden mit solchen, die unauffällige Mundschleimhaut an Prädilektionsstellen für das Plattenepithelkarzinom miteinschließen. Auch ist das gewählte Abstrichinstrument nicht einheitlich. So werden kleine Zahnbürsten, Spatel, Watteträger und spezielle Bürstchen verwendet. Eine Vergleichbarkeit der Treffsicherheiten ist auch deshalb nicht immer einfach, da oft verschiedene ergänzende Diagnostikverfahren wie DNA-Bildzytometrie oder AgNOR-Analyse eingesetzt werden oder das zytologische Klassifikationssystem, welches neben tumorpositiven und tumornegativen Kategorien immer auch unklare Kategorien miteinschließt, international nicht standardisiert ist.

2018 publizierten Alsarraf et al. einen systematischen Review sämtlicher Studien, welche sich mit Bürstenbiopsien zur Diagnostik, zum Screening oder zur Verlaufsbeobachtung von oralen potenziell malignen Störungen und Mundkrebs bei Menschen befassten [49]. Von insgesamt 343 gefundenen Studien erfüllten nur 36 diese festgelegten Selektionskriterien.

Selbst diese verbliebenen 36 Studien aus den Jahren 1994-2017 zeigten ein inhomogenes Bild hinsichtlich mehrerer Faktoren. Es wurden beispielsweise Material und Technik der Studien verglichen, die den Einsatz von Zytobürsten und Zahnbürsten, konventioneller Exfoliativzytologie und Flüssigkeits-basierter Zytologie, *Oral CDx*<sup>®</sup> und DNA-Bildzytometrie beschrieben. Bei einigen Studien war die genaue Durchführungsweise nicht dokumentiert. Die Sensitivität reichte in den Studien von 55-100% und die Spezifität von 23,5-100% und wurde auch in einigen

Studien nicht ermittelt, was die Diversität der Studien und damit einhergehend eine enorme Schwierigkeit für Metaanalysen unterstreicht [49].

Die Treffsicherheit der zytologischen Abstrichdiagnostik sichtbarer oraler Läsionen wurde in der eigenen Studie aufgrund der verschiedenen Zuordnungsmöglichkeiten unklarer („zweifelhafter“ und „dringend verdächtiger“) zytologischer Befunde zu statistisch bezüglich des Referenzstandards positiven oder negativen Läsionen mit verschiedenen Auswertungsvarianten berechnet. Da eine Entzündungsreaktion oder Regeneration von Zellen mikroskopisch sichtbare Atypien zeigen können, welche von Zellveränderungen bei einer (beginnenden) malignen Transformation morphologisch oft nicht sicher unterschieden werden können, sind die zytologischen Ergebnisse nicht immer eindeutig „positiv“ oder „negativ“. Sie lauteten in 7,6% der Abstrichbefunde der eigenen Serie „zweifelhaft / maligne Zellen nicht sicher auszuschließen“ oder „dringender Verdacht / maligne Zellen wahrscheinlich“. Entsprechend des in Deutschland auch für die Mundschleimhautzytologie gebräuchlichen zytologischen Klassifikationssystems ist bei zweifelhaften Befunden eine Malignitätswahrscheinlichkeit von ca. 30% und bei dringend verdächtigen Befunden von ca. 70% zugrundeliegend [67]. Damit diese unklaren Fälle deskriptiv statistisch erfasst werden können, müssen sie entweder als statistisch positiv oder negativ klassifiziert werden. Sie können daher in der Auswertung des Gesamtkollektives sowohl alle als positiv (Variante A) oder teilweise als positiv und teilweise als negativ (Variante B) oder alle als negativ gewertet werden (Variante C). Naturgemäß ergibt sich bei Einordnung zweifelhafter Läsionen als bereits statistisch positiv die höchste Sensitivität bei zu erwartender niedrigster Spezifität im Vergleich der Auswertungsvarianten. Dieses Vorgehen käme einem Suchtest der zytologischen Abstrichuntersuchungen gleich. Im Kontrast dazu weist Variante C, bei der nur wirklich bezüglich Malignität positive zytologische Befunde als statistisch positiv gezählt werden, eine zu erwartende maximale Spezifität auf. Sie lag bei letzterer Auswertung bei der eigenen Serie bei 100%, wohingegen die Sensitivität nur 13,6% betrug. Diese Auswertung entspräche der Anwendung eines Bestätigungstestes und zeigt, dass eine „positive“ zytologische Diagnose absolut glaubhaft ist. Angesichts der dann schlechten Sensitivität der Mundschleimhautzytologie sollte diese nicht in der Form eingesetzt werden.

Folgend werden Auswertungsvarianten A und B weiter diskutiert:

Bei Auswertungsvariante A der eigenen Daten (zytologisch „zweifelhafte“ und „dringend verdächtige“ Diagnosen sind statistisch positiv) ergab sich eine Sensitivität von 53% und eine Spezifität von 95,3%. Diese Werte sind in ähnlichen Bereichen wie die ermittelten Treffsicherheiten von Damanaki, die mit der gleichen Auswertungsmethode in ihrer Auswertung der zytologischen Mundschleimhautabstriche mittels Bürste von 135 Läsionen an 111 Patienten mit OPMD und Karzinomen eine Sensitivität von 64,7% und eine Spezifität von 82,5% erreichte [76].

Entsprechend der Anwendung der Zytologie als Suchtest lässt sich eine deutliche Steigerung der Spezifität erreichen, wenn eine weitere Methode, hier die DNA-Bildzytometrie, als Bestätigungstest bzw. weiterer Test zur Abklärung eines unklaren zytologischen Befundes eingesetzt wird (siehe Kapitel 4.5).

Bei Auswertungsvariante B der eigenen Daten, bei der die zytologisch „zweifelhaften“ Ergebnisse als statistisch negativ und die „dringend verdächtigen“ als positiv gewertet wurden, sank im Vergleich zu Auswertung A die Sensitivität auf 30,3%, während sich die Spezifität auf 100% erhöhte. Im Vergleich dazu war die Sensitivität dieser Auswertungsvariante bei der Studie von Damanaki mit 35,3% etwas höher und die Spezifität betrug ebenfalls 100% [76]. Trotzdem reicht in beiden Studien die diagnostische Treffsicherheit nicht an die gepoolte Sensitivität und Spezifität einer Metaanalyse zur oralem Bürstenbiopsie heran, welche jeweils 91% betrug [43]. Auch wird die Treffsicherheit früherer Arbeiten aus der Abteilung nicht erreicht. So erreichten Remmerbach et al. bei Zuordnung der „dringend verdächtigen“ Zytologie als statistisch positiv und der „zweifelhaften“ Zytologie als statistisch negativ eine Sensitivität 94,6% bei einer Spezifität von 99,5% [42].

Bei einer Studie von Remmerbach et al. von 2017 wurde die Treffsicherheit der oralen Bürstenzytologie nach Präparation von konventionellen Objektträgern und der so genannten flüssigkeitsbasierten Zytologie (oder Dünnschichtzytologie) verglichen. Bei 113 Fällen wurde bei Wertung zytologisch zweifelhafter und dringend verdächtiger Diagnosen als statistisch positiv eine Sensitivität der konventionellen Zytologie von 96,3% und eine Spezifität von 90,6% erreicht. Es wurden 81 Fälle mit histologisch bestätigten Karzinomen und 32 unklare Läsionen inkludiert. In der

Methodik wird allerdings beschrieben, dass bei jedem Fall fünf Bürsten und fünf Objektträger verwendet wurden, also pro Läsion fünf Bürstenabstriche erfolgt sind, um möglichst viele Zellen auch der tieferen Epithelschichten zu gewinnen und so präzise Ergebnisse zu erreichen [48]. In der vorliegenden Studie wurde in der Regel nur ein Bürstenabstrich pro Läsion durchgeführt, was das Risiko auf falsch negative Abstriche erhöhen könnte. In unserer Studie wurde beispielsweise bei 31 Fällen die zytologische Diagnose falsch „negativ“ gestellt, obwohl im Rahmen des *Follow-ups* ein eine (prä-)maligne Läsion vorlag. Weitere mögliche Gründe für eine verbesserungsbedürftige Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik werden in Kapitel 4.6. diskutiert.

Eine Studie, deren Treffsicherheiten unterhalb derjenigen der oben genannten Cochrane-Metaanalyse bleibt, ist eine kleine Serie von Trakroo et al. Die Autoren erreichten bei ihrer Studie im Jahr 2014 durch Bürstenabstriche mit einer speziellen Zytobürste eine Sensitivität von 84,37% und eine Spezifität von 88,89% bei Wertung zytologisch unklarer Diagnosen als statistisch positiv. Inkludiert wurden auch hier Patienten mit OPMD und Karzinomen. Allerdings wurden gezielt die 50 Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen eine anschließende chirurgische Biopsie möglich war, um die Sensitivität und Spezifität im direkten Vergleich der Ergebnisse zu ermitteln [87].

Gupta et al. führten 2014 eine Studie an 202 Patienten mit insgesamt 225 verdächtigen Läsionen durch. An 117 Läsionen ergaben sich durch die Bürstenbiopsien, die mit konventionellen Zahnbürsten durchgeführt wurden, unklare oder positive Ergebnisse, sodass dort eine chirurgische Biopsie folgte. Auch die Läsionen, die zwar als zytologisch negativ diagnostiziert wurden, bei denen aber trotzdem beispielsweise durch klinische Auffälligkeiten eine anschließende Biopsie als notwendig erachtet wurde, wurden biopsiert. Sie erzielten eine Sensitivität von 81,69% und eine Spezifität von 68,42%, diese Werte wurden auch wieder anhand einer Gegenüberstellung mit den Ergebnissen der chirurgischen Biopsien errechnet. Die im internationalen Vergleich relativ geringen Werte führen die Autoren auf den Umstand zurück, dass keine speziellen Zytobürsten verwendet wurden, es ein relativ kleines Patientenkollektiv war und keine computergestützten Auswertungshilfen inkludiert wurden. Die geringe Spezifität

erklären die Autoren außerdem durch den Umstand, dass bei den zytologisch negativen Ergebnissen nicht immer eine anschließende Biopsie durchgeführt wurde und diese Fälle dann aus der Berechnung der Sensitivität und Spezifität exkludiert wurden [88]. Auch in unserer Studie wurden bei negativen Abstrichen nur in Ausnahmefällen chirurgische Biopsien durchgeführt, was ein großer Unterschied beispielsweise im Vergleich zur o.g. Studie von Trakroo et al. ist, die gezielt nur Patientenfälle inkludierte, wenn anschließend auch eine Biopsie erfolgte [87].

#### **4.4 Treffsicherheiten der alleinigen DNA-Bildzytometrie**

In einer Metaanalyse von Alaizari et al. 2017 wurden 5 Studien mit insgesamt 528 Fällen untersucht. Diese 5 Studien waren die einzigen aus einem Pool von 611 Studien, die diverse Kriterien erfüllten. So wurden beispielsweise nur prospektive oder retrospektive Kohortenstudie, die sich mit OPMDs befassten, inkludiert, außerdem mussten DNA-Ploidie-Analysen erfolgt sein und vergleichbare Ergebnisse vorliegen. Es wurde unter anderem herausgefunden, dass das Vorliegen einer DNA-Aneuploidie mit einem 3,12-fach erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Karzinoms verbunden ist [53].

So wie es unterschiedliche Möglichkeiten gibt, unklare zytologische Befunde statistisch zu klassifizieren, gibt es ebenfalls unterschiedliche Kriterien für die Analyse der DNA-Ploidie. In der vorliegenden Studie wurden als Kriterien für eine DNA-Aneuploidie eine Stammlinienaneuploidie und eine Einzelzellaneuploidie, letzteres bei Vorliegen einzelner abnorm hoher DNA-Gehalte  $>9c$ , gemäß den Richtlinien der ESACP gewertet [69-72]. In der diagnostischen Praxis kommt es aber immer wieder vor, dass bei Nichterfüllen dieser Voraussetzungen trotzdem ein aneuploides Ergebnis vermutet wird. Dies kann beispielsweise eine angedeutete aneuploide Stammlinie nur weniger Zellen sein, die aber beim Mikroskopieren in der Feulgenfärbung Atypiekriterien der Zellkerne erkennen lassen. Ein weiteres Beispiel wäre eine „breite“ peritetraploide Stammlinie. Ein derartiges Ereignis ist bisher statistisch nicht quantifiziert und publiziert. Erfahrungsgemäß zeigen einige Plattenepithelkarzinome der Mundschleimhaut aber ein derartiges DNA-Profil. In der vorliegenden Studie wurden derartige Fälle als „Verdacht auf DNA-Aneuploidie“ und erfüllte Stammlinien oder Einzelzellaneuploidie als „DNA-Aneuploidie“ klassifiziert.

In der vorliegenden Arbeit erzeugt das Abweichen von den Kriterien der Stammlinienaneuploidie und der Einzelzellaneuploidie eine deutliche Abnahme der Spezifität von 100% auf 77,3%, da das *Follow-up* der Diagnosen eines „Verdachts auf DNA-Aneuploidie“ in 5 der 6 Fälle einen negativen Referenzstandard ergab (vergleiche Tabelle 21). Es wäre also kritisch zu überlegen, ob die Kriterien für eine DNA-Aneuploidie nicht streng ausgelegt werden sollten. Velleuer et al. konnten in ihrer Studie bei 126 DNA-bildzytometrisch messbaren Mundschleimhautabstrichen von Patienten mit Fanconi-Anämie bei Vorliegen einer DNA-Aneuploidie (Stammlinienaneuploidie oder Einzelzellaneuploidie) eine Sensitivität von 82,8% bei einer Spezifität von 98,5% zeigen [41]. Für die Hinzunahme des „Verdacht auf eine DNA-Aneuploidie“ ergab sich eine reduzierte Spezifität von 86,8% bei allerdings perfekter Sensitivität von 100% (persönliche Mitteilung, nicht im Manuskript der Publikation enthalten). Dieses Ergebnis stützt ein Vorgehen, in bestimmten Risikogruppen, wo eine möglichst hohe Sensitivität essentiell ist, auch bereits dem „Verdacht auf DNA-Aneuploidie“ weiter klinisch nachzugehen.

2003 berichteten Remmerbach et al. in einem Fallbericht über vier Patienten mit verdächtigen oralen Läsionen genauer. Die initialen chirurgischen Biopsien zeigten in keinem der Fälle eine schwere Dysplasie oder Tumorzellen. Mithilfe von DNA-Bildzytometrie ließ sich eine DNA-Aneuploidie allerdings in jeder der vier Läsionen darstellen. Erst 1-15 Monate später war dann bei einer zweiten chirurgischen Biopsie auch histologisch das Vorliegen einer malignen Läsion nachweisbar [89].

Diese Studie zeigt deutlich die Bedeutung der DNA-Bildzytometrie, welche hinsichtlich in der Frühdiagnostik einer maligne transformierten Läsion sogar der chirurgischen Biopsie überlegen sein kann.

## **4.5 Treffsicherheit von kombinierter Zytologie und DNA-Bildzytometrie**

Üblicherweise wird die DNA-Bildzytometrie als zweiter Test zu weiteren Abklärung nach einem zytologisch unklaren „zweifelhaften“ oder „dringend verdächtigen“ Befund in der Routinediagnostik eingesetzt. Es macht daher Sinn, die Zytologie als Suchtest möglichst sensitiv einzustellen, so dass bereits „zweifelhafte“

Diagnosen weiter untersucht werden. Die DNA-Bildzytometrie hätte dann den Stellenwert eines Bestätigungstests und sollte eine gute Sensitivität und möglichst hohe Spezifität haben, was gegeben ist (vergleiche Kapitel 4.4). In einer Studie von Maraki et al. 2004 an 98 auffälligen Mundschleimhautläsionen mit histologischer Korrelation erreichte die Zytologie inklusive Anwendung von DNA-Bildzytometrie nach zytologisch unklarer und positiver Diagnose eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 97,4% [46]. Einschränkend muss gesagt werden, dass nur 8 Abstriche der Studie „zweifelhaft“ oder „dringend verdächtig“ waren. Trotzdem reichen die Ergebnisse der eigenen Studie an diese hohe Treffsicherheit nicht heran: hier betrug bei kombinierter Zytologie und DNA-Bildzytometrie die Sensitivität 45,5-47% und Spezifität 97,7-98,4% (Auswertungsvarianten A1 und A2).

In einer anderen prospektiven Studie von Remmerbach et al. wurde an 1328 Mundschleimhautpräparaten von 332 Patienten eine Sensitivität der Zytologie von 91,3% und eine Spezifität von 95,1% erreicht. Durch anschließende DNA-Bildzytometrie an zytologisch „zweifelhaften“ und „dringend verdächtigen“ Präparaten erhöhten sich Sensitivität und Spezifität sogar auf 97,8% und 100%, was erneut deutlich zeigt, wie im optimalen Fall die DNA-Bildzytometrie die diagnostische Aussagekraft erhöht. Die Autoren der Studie haben die Zellentnahme pro Läsion 4-5x durchgeführt, um auf eine ausreichend hohe Anzahl an Epithelzellen zu kommen und führen die hohen Treffsicherheiten auf dieses Verfahren zurück [90].

Kaur et al. untersuchten Mundschleimhautläsionen von 100 aufeinander folgenden Patienten mittels Bürstenzytologie und Gewebebiopsie. In diesem Kollektiv war der Plattenepithelkarzinomanteil mit 49% sehr hoch. An 96 Patienten war eine DNA-bildzytometrische Messung möglich. Es wurden also nicht nur die 6 in der Studie eingeschlossenen verdächtigen Läsionen untersucht. Die Kombination aus zytologischer und DNA-bildzytometrischer Diagnose erreichte eine Sensitivität von 92% und eine Spezifität von 100% [91].

Es ist erstaunlich, dass die Treffsicherheiten von Zytologie und DNA-Bildzytometrie der eigenen Studie hinter den Treffsicherheiten so deutlich hinter den oben genannten ausgewählten Arbeiten zurückbleiben, da die schwerpunktmäßig diagnostizierende Ärztin im Funktionsbereich Cytopathologie bei

dieser Studie und bei den Studien von Remmerbach, Maraki und auch Damanaki die gleiche Person war und sich auch die Durchführung der DNA-Bildzytometrie nicht geändert hat. Es könnten daher möglicherweise weitere Ursachen auf Seiten der Abstrichgewinnung und weiteren klinisch/histologische Abklärung von Mundschleimhautläsionen zum Tragen kommen. Hierbei ist beispielsweise an die Mundschleimhautsprechstunde der Uniklinik zu denken, die von wechselnden, Behandlern mit unterschiedlich großer Erfahrung durchgeführt wird. Im Gegensatz dazu haben Remmerbach, Maraki und Damanaki ihre Abstriche größtenteils selbst entnommen und so Routine und große Erfahrung im Verfahren entwickelt.

#### **4.6 Treffsicherheit bei gleichbleibendem Behandler**

Aufgrund dieser Diskrepanz erfolgte eine separate Auswertung von den Läsionen, bei denen die Bürstenbiopsie und anschließende chirurgische Biopsie durch den selben Arzt durchgeführt wurden. Bei diesen 93 Läsionen betrug die Sensitivität 100% und die Spezifität 92,1%, bei Wertung zytologisch „zweifelhafter“ und „dringend verdächtiger“ Diagnosen als statistisch positiv. Beide Werte sind durchaus auf dem hohen Niveau der zuvor genannten Studien von Remmerbach et al., bei hier einschränkend aber nur wenigen erfassten malignen Läsionen. In der vorliegenden Studie konnte also durch den Umstand, dass die Bürstenbiopsie und chirurgische Biopsie von demselben Behandler durchgeführt wurde, die Sensitivität von 53% auf 100% fast verdoppelt werden, während die Spezifität von 95,3% auf 92,1% vergleichsweise wenig sank. Dass nur bei 93 Fällen der Behandler identisch war, wirkt auf den ersten Blick sehr wenig. Allerdings muss beachtet werden, dass beim Gesamtkollektiv nur in einem Bruchteil der Fälle eine chirurgische Biopsie durchgeführt wurde, da oft keine Notwendigkeit dafür bestand. Außerdem war in einigen Fällen der durchführende Behandler der Bürstenbiopsie oder der chirurgischen Biopsie in den Akten nicht ersichtlich, beispielsweise, weil in den digitalen Akten kein Behandlerkürzel oder keine digitale Unterschrift angegeben war. Der Behandler konnte dadurch nicht eindeutig ermittelt werden, woraufhin diese Fälle dann nicht die Kriterien erfüllten, in diese separate Auswertungsvariante eingeschlossen zu werden. Vergleichbare Ergebnisse zu einer erhöhten Treffsicherheit durch den selben Behandler bei zytologischer und chirurgischer Biopsie lassen sich der publizierten Literatur in der Regel nicht entnehmen, da nicht angegeben ist, ob der Behandler derselbe war.

Die Hypothese, dass die Treffsicherheit durch bessere Korrelation der Entnahmestellen von zytologischer und chirurgischer Biopsie erhöht werden kann, wird allerdings durch die Analyse eines prospektiven Kollektivs von oralen Bürstenabstrichen von Patienten mit Fanconi-Anämie gestützt. Die untersuchenden Zytopathologen dieser Studie waren die gleichen, wie auch bei dem vorliegenden Kollektiv. Fanconi-Anämie-Patienten haben ein zur Normalbevölkerung ca. 500-700fach erhöhtes Risiko an Mundkrebs zu erkranken. Die systematische Inspektion der Mundhöhle, Abstrichentnahme inklusive Fotodokumentation suspekter Läsionen durch wenige erfahrene Untersucher und mikroskopisch-zytologische sowie ggf. DNA-bildzytometrische Untersuchung von 737 Abstrichlokalisationen ergab für die Detektion mindestens einer mittelgradigen Dysplasie eine Sensitivität von 100% sowie eine Spezifität von 92,2%. Der NPW betrug 100% [41]. Die zytologischen Ergebnisse wurden hierbei inklusive Foto der Läsion im Mund und Einzeichnung der Abstrichstelle der Bürstenzytologie in eine Mundlandkarte an weiterbehandelnde und biopsierende Ärzte weitergegeben.

## **4.7 Schlussfolgerungen**

Die Treffsicherheit der zytologischen Bürstenbiopsie von klinisch auffälligen Läsionen der Mundschleimhaut ist im Literaturquerschnitt grundsätzlich sehr gut [45], aber abhängig von der genauen klinischen Untersuchung, der korrekten Entnahme der Zellen mittels spezieller Bürstchen, der Befundung durch erfahrene Zytopathologen und der weiteren Abklärung malignitätsverdächtiger Läsionen mittels Gewebebiopsie an der korrekten Stelle. Aufgrund des Feldeffektes von Kanzerogenen kann eine maligne Läsion in einem größeren genetisch veränderten Feld der Mundschleimhaut sehr umschrieben sein. Schon eine Abweichung von suspekter Bürstenzytologie und anschließender Gewebebiopsie von 1 mm kann daher unterschiedliche Diagnosen erbringen. Die sehr hohen Werte der Sensitivität und Spezifität der Bürstenbiopsien aus anderen Studien wurden in der eigenen Studie nur erreicht, wenn die zytologische und chirurgische Biopsie durch denselben Behandler erfolgte.

Zur Erhöhung der Treffsicherheit empfiehlt sich die Überlegung mehrerer Faktoren. Zum einen sollten pro Läsion ein gründlicher Bürstenabstrich entnommen werden. Remmerbach et al. empfehlen hier mindestens 4-5

Zellentnahmen mit jeweils einer Bürste und einem Objektträger, um genügend aussagekräftiges Zellmaterial zu gewinnen [90]. Dies ist aufwändig und erfordert eine lange Mikroskopiedauer in der Zytologie. Alternativ könnten die Bürstenabstriche einer Läsion in einer Fixationsflüssigkeit für die flüssigkeitsbasierte Zytologie gepoolt werden. Dieses Verfahren wendet Remmerbach in der Praxis derzeit (2020) an [78]. Gute Treffsicherheiten wie in der Studie von Velleuer et al. können aber auch mit weniger Bürstenabstrichen auf der gleichen Läsion erreicht werden. Es wurden hier zumindest für einen Großteil der Abstriche zwei Bürsten pro Läsion entweder auf Objektträger ausgerollt oder in einem Fixationsmedium gepoolt [41].

Außerdem empfiehlt sich eine Fotodokumentation der Läsionen bei Abstrichentnahme. Diese dient der weiteren visuellen Kontrolle im Vergleich bei einer Wiedervorstellung des Patienten, selbst wenn anschließend keine chirurgische Biopsie erfolgt. Gerade in (Uni-)Kliniken erscheint diese Fotodokumentation wichtig, da dort in einer Abteilung mehrere und wechselnde Behandler arbeiten und oft keine festen Patientenzuteilungen zu bestimmten Ärzten bestehen. Außerdem kommt es in einigen Fällen zu strukturellen Mitarbeiter-Veränderungen in den verschiedenen Abteilungen, was eine kontinuierliche Patientenbehandlung durch einen einzigen Behandler unmöglich und eine sorgfältige Fotodokumentation umso wichtiger macht. Aber selbst bei einem oder wenigen kontinuierlichen Behandlern, wie zum Beispiel in der Studie von Velleuer et al. ist eine regelmäßige Fotodokumentation sinnvoll, da kleine Veränderungen der Läsionen sonst bei einer Wiedervorstellung eventuell nicht auffallen würden. Nur mithilfe von Fotos kann eine mögliche Veränderung hinsichtlich der Größe, Farbe und Oberflächenstruktur in zukünftigen Untersuchungen sicher erkannt werden.

Entsprechend dem Vorgehen bei Velleuer et al. 2020 könnte auch eine Kennzeichnung der Entnahmestelle der Bürstenbiopsie auf diesen Fotos oder auf Grafiken (Mundlandkarten) in den Patientenakten erfolgen, damit eine chirurgische Entnahme genau an derselben Stelle erfolgen kann, selbst wenn in Ausnahmefällen die chirurgische Biopsie durch einen anderen Behandler erfolgt. Bei nicht selten vorkommenden synchronen Läsionen sollten die Lokalisationen dann genau durchnummeriert werden und es sollte eine standardisierte anatomische Bezeichnung der Abstrichlokalisierung gemäß der Mundlandkarte

erfolgen, um eine spätere Zuordnung der zytologischen und histologischen Befunde zu ermöglichen und individuelle Abweichungen möglichst gering zu halten.

## 5 Literaturverzeichnis

1. *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. Vol. 12. 2019, Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).
2. Liao, C.T., et al., *Good tumor control and survivals of squamous cell carcinoma of buccal mucosa treated with radical surgery with or without neck dissection in Taiwan*. *Oral Oncol*, 2006. **42**(8): p. 800-9.
3. Amit, M., et al., *Improvement in survival of patients with oral cavity squamous cell carcinoma: An international collaborative study*. *Cancer*, 2013. **119**(24): p. 4242-4248.
4. *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4 ed, ed. A. El-Naggar, et al. 2017, Lyon: International Agency for Research on Cancer.
5. Koontongkaew, S., *The Tumor Microenvironment Contribution to Development, Growth, Invasion and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas*. *Journal of Cancer*, 2013. **4**(1): p. 66-83.
6. Blot, W.J., et al., *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*. *Cancer Res*, 1988. **48**(11): p. 3282-7.
7. Petersen, P.E., *Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization*. *Oral Oncol*, 2009. **45**(4-5): p. 454-60.
8. Andre, K., et al., *Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France*. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 1995. **31B**(5): p. 301-9.
9. Scully, C., *Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects*. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 2011: p. e306-e311.
10. Squier, C.A., P. Cox, and B.K. Hall, *Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol*. *J Oral Pathol*, 1986. **15**(5): p. 276-9.
11. Singer, M. and S. Teyssen, *Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten: Grundlagen - Diagnostik - Therapie*. 2 ed. 2005: Springer Verlag. 147-152.
12. Ragin, C.C., F. Modugno, and S.M. Gollin, *The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus*. *J Dent Res*, 2007. **86**(2): p. 104-14.
13. Brocklehurst, P., et al., *Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013(11): p. Cd004150.
14. Velleuer, E. and R. Dietrich, *Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma*. *Mol Cell Pediatr*, 2014. **1**(1): p. 9.
15. Kutler, D.I., et al., *Natural history and management of Fanconi anemia patients with head and neck cancer: A 10-year follow-up*. *Laryngoscope*, 2016. **126**(4): p. 870-9.
16. Regezi, J.A., J.J. Sciubba, and R.C.K. Jordan, *Oral Pathology: Clinical pathologic correlations, seventh edition*. 2017, USA, Missouri: Elsevier.
17. Reichart, P.A., et al., *Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten*. Chirurgie Band II. 2002, Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH.

18. Kunkel, M. and K. Hertrampf. *Leitlinie: Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde. Version September 2019.* 2019 08.08.2020]; Available from: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/007-092.html>.
19. Wolff K.-D., B.F., Beck J., Bikowski K., Böhme P., Budach W., Burkhardt A., Danker H., Eberhardt W., Engers K., Fietkau R., Frerich B., Gauler T., Germann G., Gittler- Hebestreit N., Grötz K., Horch R., Ihrler S., Keilholz U., Lell M., Lübbe A., Mantey W., Nusser-Müller-Busch R., Pistner H., Paradies K., Reichert T., Reinert S., Schliephake H., Schmitter M., Singer S., Westhofen M., Wirz S., Wittlinger M., *Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms*, D.K.e.V. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebshilfe e.V., Editor. 2012: Berlin.
20. Rosenthal, D.I., et al., *Final Report of a Prospective Randomized Trial to Evaluate the Dose-Response Relationship for Postoperative Radiation Therapy and Pathologic Risk Groups in Patients With Head and Neck Cancer.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2017. **98**(5): p. 1002-1011.
21. Ravi, K.S., et al., *Abnormal Nuclear Variations in Response to Radiotherapy- As a Tool in Treatment Planning and Assessment of Prognosis.* J Clin Diagn Res, 2016. **10**(8): p. AC08-12.
22. Wong, T. and D. Wiesenfeld, *Oral Cancer.* Aust Dent J, 2018. **63 Suppl 1**: p. S91-S99.
23. Santuray, R.T., D.E. Johnson, and J.R. Grandis, *New Therapies in Head and Neck Cancer.* Trends Cancer, 2018. **4**(5): p. 385-396.
24. Vermorken, J.B., et al., *Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer.* N Engl J Med, 2008. **359**(11): p. 1116-27.
25. Ferris, R.L., et al., *Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression.* Oral Oncology, 2018. **81**: p. 45-51.
26. Hausamen, J.-E., et al., *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.* Chirurgie Band III. 2003, Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH.
27. *Klassifikation maligner Tumoren. 7. Auflage*, ed. C. Wittekind and H.J. Meyer. 2009, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH&Co.
28. Tirelli, G., et al., *Prognosis of oral cancer: a comparison of the staging systems given in the 7th and 8th editions of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual.* Br J Oral Maxillofac Surg, 2018. **56**(1): p. 8-13.
29. Neville, B.W. and T.A. Day, *Oral cancer and precancerous lesions.* CA Cancer J Clin, 2002. **52**(4): p. 195-215.
30. Sarode, S.C., G.S. Sarode, and J.V. Tupkari, *Oral potentially malignant disorders: precisising the definition.* Oral Oncol, 2012. **48**(9): p. 759-60.
31. Dionne, K.R., et al., *Potentially malignant disorders of the oral cavity: Current practice and future directions in the clinic and laboratory.* International Journal of Cancer, 2014: p. n/a-n/a.
32. Warnakulasuriya, S., N.W. Johnson, and I. van der Waal, *Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa.* J Oral Pathol Med, 2007. **36**(10): p. 575-80.
33. Yanik, E.L., et al., *Leukoplakia, Oral Cavity Cancer Risk, and Cancer Survival in the U.S. Elderly.* Cancer Prev Res (Phila), 2015. **8**(9): p. 857-63.

34. van der Waal, I., *Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management*. Oral Oncol, 2009. **45**(4-5): p. 317-23.
35. Napier, S.S. and P.M. Speight, *Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature*. J Oral Pathol Med, 2008. **37**(1): p. 1-10.
36. Warnakulasuriya, S., *Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2018. **125**(6): p. 582-590.
37. Reichart, P.A. and H.P. Philipsen, *Oral erythroplakia--a review*. Oral Oncol, 2005. **41**(6): p. 551-61.
38. Villa, A., C. Villa, and S. Abati, *Oral cancer and oral erythroplakia: an update and implication for clinicians*. Aust Dent J, 2011. **56**(3): p. 253-6.
39. Gonzalez-Moles, M.A., C. Scully, and J.A. Gil-Montoya, *Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation*. Oral Dis, 2008. **14**(3): p. 229-43.
40. Dunsche, A. and F. Harle, *[Precancer stages of the oral mucosa: a review]*. Laryngorhinootologie, 2000. **79**(7): p. 423-7.
41. Velleuer, E., et al., *Diagnostic accuracy of brush biopsy-based cytology for the early detection of oral cancer and precursors in Fanconi anemia*. Cancer Cytopathology, 2020.
42. Remmerbach, T.W., et al., *Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer*. Anal Cell Pathol, 2001. **22**(4): p. 211-21.
43. Navone, R., M. Pentenero, and S. Gandolfo, *Liquid-based cytology in oral cavity squamous cell cancer*. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2011. **19**(2): p. 77-81.
44. Böcking, A., et al., *Role of brush biopsy and DNA cytometry for prevention, diagnosis, therapy, and followup care of oral cancer*. J Oncol, 2011. **2011**: p. 875959.
45. Macey, R., et al., *Diagnostic tests for oral cancer and potentially malignant disorders in patients presenting with clinically evident lesions*. Cochrane Database Syst Rev, 2015(5): p. CD010276.
46. Maraki, D., J. Becker, and A. Boecking, *Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer*. J Oral Pathol Med, 2004. **33**(7): p. 398-404.
47. Kazanowska, K., A. Halon, and M. Radwan-Oczko, *The role and application of exfoliative cytology in the diagnosis of oral mucosa pathology - contemporary knowledge with review of the literature*. Adv Clin Exp Med, 2014. **23**(2): p. 299-305.
48. Remmerbach, T.W., et al., *Liquid-based versus conventional cytology of oral brush biopsies: a split-sample pilot study*. Clin Oral Investig, 2017. **21**(8): p. 2493-2498.
49. Alsarraf, A.H., O. Kujan, and C.S. Farah, *The utility of oral brush cytology in the early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: A systematic review*. J Oral Pathol Med, 2018. **47**(2): p. 104-116.
50. Olms, C., et al., *Clinical comparison of liquid-based and conventional cytology of oral brush biopsies: a randomized controlled trial*. Head Face Med, 2018. **14**(1): p. 9.
51. Navone, R., et al., *The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma*. Cytopathology, 2007. **18**(6): p. 356-60.

52. Hayama, F.H., et al., *Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2005. **10**(2): p. 115-22.
53. Alaizari, N.A., et al., *Meta-analysis of the predictive value of DNA aneuploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders*. J Oral Pathol Med, 2018. **47**(2): p. 97-103.
54. Feulgen, R. and H. Rossenbeck, *Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten*. . Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, 1924. **135**: p. 203-248.
55. Remmerbach, T.W., et al., *[Noninvasive brush biopsy as an innovative tool for early detection of oral carcinomas]*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2004. **8**(4): p. 229-36.
56. Epstein, J.B., C. Scully, and J. Spinelli, *Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy*. Journal of Oral Pathology and Medicine, 1992. **21**(4): p. 160-163.
57. Mehrotra, R. and D.K. Gupta, *Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection*. Head Neck Oncol, 2011. **3**: p. 33.
58. Chainani-Wu, N., et al., *Toluidine blue aids in detection of dysplasia and carcinoma in suspicious oral lesions*. Oral Dis, 2015. **21**(7): p. 879-85.
59. Zenk, W., et al., *[Visualizing carcinomas of the mouth cavity by stimulating synthesis of fluorescent protoporphyrin IX]*. Mund Kiefer Gesichtschir, 1999. **3**(4): p. 205-9.
60. Betz, C.S. and A. Leunig, *Möglichkeiten und Grenzen der Fluoreszenzdiagnostik und photodynamischen Therapie : Teil 1: Fluoreszenzdiagnostik*. HNO, 2003. **51**(12): p. 1019-1035.
61. Driemel, O., et al., *Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions*. Jddg, 2007. **5**(12): p. 1095-1100.
62. Wagnieres, G.A., W.M. Star, and B.C. Wilson, *In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications*. Photochem Photobiol, 1998. **68**(5): p. 603-32.
63. Winiarski, P., et al., *Autofluorescence spectroscopy in the differentiation of laryngeal epithelial lesions – preliminary results*. Acta Oto-Laryngologica, 2016. **136**(6): p. 580-584.
64. Koch, F.P., et al., *Effectiveness of autofluorescence to identify suspicious oral lesions--a prospective, blinded clinical trial*. Clin Oral Investig, 2011. **15**(6): p. 975-82.
65. Sciubba, J.J., *Improving Detection of Precancerous and Cancerous Oral Lesions*. The Journal of the American Dental Association, 1999. **130**(10): p. 1445-1457.
66. Schramm, M., *Zurverfügungstellung von urheberrechtlich geschützten Abbildungen aus dem Bestand des Funktionsbereichs Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*. 2020.
67. Böcking, A., *Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie*. Der Pathologe, 1998. **19**(3): p. 235-241.
68. Biesterfeld, S., *Zurverfügungstellung von urheberrechtlich geschützten Abbildungen aus dem Bestand des Schwerpunktes Zytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*. 2013.

69. Böcking, A., F. Giroud, and A. Reith, *Consensus Report of the European Society for Analytical Cellular Pathology Task Force on Standardization of Diagnostic DNA image Cytometry*. Analytical and Quantitative Cytology and Histology, 1995. **17**(1): p. 1-7.
70. Giroud, F., et al., *1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance*. European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol, 1998. **17**(4): p. 201-8.
71. Haroske, G., et al., *1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation*. European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol, 1998. **17**(4): p. 189-200.
72. Haroske, G., et al., *Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry*. Anal Cell Pathol, 2001. **23**(2): p. 89-95.
73. Biesterfeld, S., et al., *DNA-cytometric detection of euploid polyploidization in oral lichen ruber planus*. Anal Quant Cytol Histol, 1991. **13**(1): p. 7-10.
74. Biesterfeld, S., et al., *Polyploidy in non-neoplastic tissues*. J Clin Pathol, 1994. **47**(1): p. 38-42.
75. Sauerbrei, W. and M. Blettner, *Interpreting results in 2 x 2 tables: part 9 of a series on evaluation of scientific publications*. Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(48): p. 795-800.
76. Damanaki, A., *Multimodale Zellanalyse zur nicht-invasiven Diagnostik oraler Präkanzerosen und Karzinome*, in *Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*. 2015, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
77. Dhanuthai, K., et al., *Oral cancer: A multicenter study*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2018. **23**(1): p. e23-e29.
78. Deuerling, L., et al., *Evaluation of the Accuracy of Liquid-Based Oral Brush Cytology in Screening for Oral Squamous Cell Carcinoma*. Cancers (Basel), 2019. **11**(11).
79. Liu, S.A., et al., *Impact of recurrence interval on survival of oral cavity squamous cell carcinoma patients after local relapse*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2007. **136**(1): p. 112-8.
80. Mucke, T., et al., *Recurrence interval affects survival after local relapse of oral cancer*. Oral Oncol, 2009. **45**(8): p. 687-91.
81. Zaman, S.U., S. Aqil, and M.A. Sulaiman, *Predictors of locoregional recurrence in early stage buccal cancer with pathologically clear surgical margins and negative neck*. Acta Otorrinolaringol Esp, 2018. **69**(4): p. 226-230.
82. Yanamoto, S., et al., *Clinicopathological risk factors for local recurrence in oral squamous cell carcinoma*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2012. **41**(10): p. 1195-200.
83. Brands, M.T., et al., *Time patterns of recurrence and second primary tumors in a large cohort of patients treated for oral cavity cancer*. Cancer Med, 2019. **8**(12): p. 5810-5819.
84. van Harten, M.C., et al., *The association of treatment delay and prognosis in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients in a Dutch comprehensive cancer center*. Oral Oncol, 2014. **50**(4): p. 282-90.
85. Robert-Koch-Institut. *Zurverfügungstellung der Graphik durch das Robert-Koch-Institut*:  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Mundhoehle\\_Ra](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Mundhoehle_Ra)

[chenkrebs/mundhoehle\\_rachen\\_node.html](#). 2020 17.12.2019 [cited 2020 31.05.].

86. Lee, C.C., et al., *Prognostic Performance of a New Staging Category to Improve Discrimination of Disease-Specific Survival in Nonmetastatic Oral Cancer*. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2017. **143**(4): p. 395-402.
87. Trakroo, A., et al., *Efficacy of oral brush biopsy without computer-assisted analysis in oral premalignant and malignant lesions: a study*. Journal of International Oral Health, 2015. **7**(3): p. 33-38.
88. Gupta, S., et al., *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, 2014. **10**(2): p. 232-8.
89. Remmerbach, T.W., et al., *Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases*. Anal Cell Pathol, 2003. **25**(4): p. 159-66.
90. Remmerbach, T.W., A. Hemprich, and A. Boecking, *Minimalinvasive Bürstenbiopsie. Innovative Methode zur Früherkennung oraler Plattenepithelkarzinome*. Schweiz Monatsschr. Zahnmed., 2007. **117**: p. 927-935.
91. Kaur, M., et al., *Evaluation of brush cytology and DNA image cytometry for the detection of cancer of the oral cavity*. Diagn Cytopathol, 2016. **44**(3): p. 201-5.

# Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Biesterfeld, Herrn Prof. Dr. Jürgen Becker und Herrn Prof. Dr. Dr. Norbert Kübler für das Überlassen des Themas, die hervorragende Betreuung und die Zurverfügungstellung von Räumlichkeiten, Geräten und Materialien.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem den Mitarbeitern des Funktionsbereichs Cytopathologie, insbesondere Herrn Dr. Martin Schramm, für jede erdenkliche hilfreiche und geduldige Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung. Durch die Bereitstellung der Daten der histologischen Untersuchungen ist diese Dissertation erst ermöglicht worden. Über den gesamten Zeitraum konnte ich mich auf die unablässige Hilfsbereitschaft und große Freundlichkeit aller Mitarbeiter verlassen und möchte mich dafür sehr herzlich bedanken.

Mein größter Dank gilt schließlich meinen Eltern, meinen drei Schwestern und meinem Ehemann, die durch vielfältige Unterstützung und ihr unerschütterliches Vertrauen in mich den Abschluss dieser Arbeit erleichtert haben.