

Aus dem Institut für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. BÖCKING

**MESSPRÄZISION UND DIAGNOSTISCHE TREFFSICHERHEIT DER
MULTIMODALEN ZELLANALYSE AN MUNDSCHLEIMHAUTABSTRICHEN**

DISSERTATION

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

NADJA NIETZKE

2007

Als Inauguraldissertation

gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

DEKAN

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Alfred Böcking

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Christopher Poremba

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms der Mundschleimhaut | 2 |
| 1.2 | Orale Präkanzerosen | 3 |
| 1.3 | Diagnostik des Mundschleimhautkarzinoms | 5 |
| 1.3.1 | Zytologie und Histologie | 6 |
| 1.3.2 | Adjuvante Methoden | 9 |
| 1.3.2.1 | DNA-Zytometrie | 9 |
| 1.3.2.1.1 | Kriterien der DNA-Aneuploidie | 10 |
| 1.3.2.1.2 | Qualitätskontrolle | 13 |
| 1.3.2.1.3 | Diagnostische Relevanz der DNA-Zytometrie für Plattenepithelien | 14 |
| 1.3.2.2 | AgNOR-Analyse | 15 |
| 1.3.2.2.1 | Silberreaktion | 16 |
| 1.3.2.2.2 | Diagnostische Relevanz und prognostische Wertigkeit der AgNOR-Analyse | 18 |
| 1.4 | Problemstellung und neuer Ansatz durch die Multimodale Zellanalyse | 20 |
| 1.5 | Ziel der Arbeit | 21 |
| 2 | Material und Methoden | 23 |
| 2.1 | Methode: Multimodale Zellanalyse (MMZA) | 23 |
| 2.1.1 | Technische Umsetzung | 23 |
| 2.1.2 | Komponenten | 24 |
| 2.1.2.1 | Hardware | 25 |
| 2.1.2.2 | Software | 26 |
| 2.1.3 | Datenbank | 27 |
| 2.1.4 | Benutzeroberfläche / Benutzerführung | 29 |
| 2.1.5 | Visualisierung | 30 |
| 2.1.6 | Navigation | 31 |
| 2.1.7 | Ablauf einer Aufnahme sequenz | 31 |
| 2.1.8 | Bildverarbeitung | 34 |
| 2.1.8.1 | Vorverarbeitung | 34 |
| 2.1.8.2 | Repositionierung und Koregistrierung | 35 |
| 2.1.8.3 | Segmentierung | 38 |
| 2.1.8.4 | Klassifikation | 41 |
| 2.1.8.5 | Auswertung der DNA-Zytometrie | 41 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.1.8.6 | Nukleolus organisierende Regionen..... | 47 |
| 2.2 | Material: Patientengut..... | 49 |
| 2.2.1 | Gewinnung der Präparate..... | 50 |
| 2.2.2 | Zytologische Diagnostik | 51 |
| 2.2.3 | Versuchsablauf und Färbungen..... | 52 |
| 2.2.3.1 | Feulgen-Färbung | 53 |
| 2.2.3.2 | Silbernitrat-Färbung und Auswertung..... | 54 |
| 3 | Ergebnisse | 57 |
| 3.1 | Deskriptive Darstellung klinischer Daten..... | 57 |
| 3.1.1 | Patientenkollektiv | 57 |
| 3.1.2 | Alter und Geschlecht..... | 57 |
| 3.1.3 | Zytologische, histologische und klinische Daten..... | 58 |
| 3.2 | Qualität der Präparate | 60 |
| 3.2.1 | Färbungen | 60 |
| 3.2.2 | Zellverlust durch Umfärbeprozesse | 61 |
| 3.3 | Ablauf der Aufnahmesequenzen | 64 |
| 3.3.1 | Bedienung | 64 |
| 3.3.2 | Bildaufnahme | 65 |
| 3.3.3 | Repositionierung und Koregistrierung..... | 66 |
| 3.3.4 | Segmentierung und Klassifizierung..... | 70 |
| 3.3.5 | AgNOR-Analyse..... | 71 |
| 3.4 | Ergebnisse der Multimodalen Zellanalyse | 72 |
| 3.5 | Auswertung der DNA-Zytometrie..... | 78 |
| 3.5.1 | Qualitätssicherung..... | 78 |
| 3.5.2 | DNA-Zytometrie: MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System..... | 82 |
| 3.5.2.1 | DNA-Histogramme im Vergleich | 88 |
| 3.5.2.2 | Korrelation der Modalwerte der Peaks der MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System | 93 |
| 3.5.2.3 | Peaklagen der DNA-Histogramme der MMZA im Vergleich mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System..... | 94 |
| 3.5.2.4 | Kriterien der Aneuploidie beider Messsysteme im Ver-gleich..... | 96 |
| 3.5.2.5 | Korrelation der DNA-Ergebnisse mit der Zytologie und dem klinischen bzw. histologischen Follow-up | 98 |
| 3.5.2.6 | Diagnostische Treffsicherheit der DNA-Zytometrie..... | 98 |
| 3.6 | Auswertung der AgNOR-Analyse..... | 99 |
| 3.7 | Diagnostische Treffsicherheit der MMZA | 102 |
| 3.8 | Zytologische Bilder der MMZA..... | 105 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.9 | Screenshots der MMZA..... | 108 |
| 4 | Diskussion..... | 111 |
| 4.1 | Funktionsfähigkeit..... | 111 |
| 4.1.1 | Bewertung der Präparatequalität..... | 112 |
| 4.1.2 | Bewertung des Messvorgangs..... | 115 |
| 4.1.2.1 | Bedienung und Bildaufnahme..... | 115 |
| 4.1.2.2 | Relokalisierung und Segmentierung..... | 116 |
| 4.1.2.3 | AgNOR-Analyse..... | 118 |
| 4.2 | Bewertung der DNA-Zytometrie..... | 119 |
| 4.2.1 | Messpräzision der Rattenleberpräparate..... | 119 |
| 4.2.2 | DNA- Ergebnisse und DNA-Histogramme im Vergleich..... | 120 |
| 4.2.3 | Korrelation der Modalwerte beider Messsysteme..... | 124 |
| 4.2.4 | Bewertung der Peaklagen beider Messsysteme..... | 126 |
| 4.2.5 | Bewertung der Kriterien der DNA-Aneuploidie bei beiden Messsystemen..... | 126 |
| 4.2.6 | Diagnostische Treffsicherheit der DNA-Zytometrie..... | 127 |
| 4.3 | Exfoliativzytologie der Mundschleimhaut..... | 130 |
| 4.4 | Bewertung der AgNOR-Analyse..... | 132 |
| 4.5 | Diagnostische Treffsicherheit der MMZA..... | 135 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 137 |
| 6 | Ausblick..... | 141 |
| 7 | Begriffe und Abkürzungen..... | 143 |
| 7.1 | Begriffe und Algorithmen für die diagnostische Interpretation in der DNA-Zytometrie..... | 143 |
| 7.2 | Abkürzungen..... | 145 |
| 8 | Tabellen- und Abbildungsverzeichnis..... | 147 |
| 9 | Literaturverzeichnis..... | 151 |
| 10 | Danksagung..... | 163 |
| 11 | Curriculum Vitae..... | 165 |

1 Einleitung

Die Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle zählen zu den zehn häufigsten Krebsarten weltweit. Ihre Inzidenz beträgt ungefähr 3-5 % unter allen bösartigen Tumoren (Weir et al. 1987). Das Plattenepithelkarzinom an sich hat einen Anteil von 90 % an den malignen Neoplasien der Mundhöhle sowie des Rachens und ist damit der klinisch bedeutendste Tumor in diesem Bereich (Silverman 1988). 1993 wurden in Deutschland etwa 4100 Neuerkrankungen an Mundkrebs bei Männern und 1000 bei Frauen gezählt (Schön et al. 1995). Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen nimmt seit den 70er Jahren sowohl bei Männern, wie auch bei Frauen stetig zu. Der Altersgipfel der Erkrankung liegt nach Untersuchungen des DÖSAK (Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich) zwischen dem fünften und sechsten Lebensjahrzehnt, wobei Männer mindestens dreimal häufiger betroffen sind als Frauen (Löbe et al. 1989). Die Inzidenz der Mundhöhlenkarzinome weist weltweit – auch innerhalb Europas – erhebliche Unterschiede auf. Dies ist anhand aktueller Zahlen in Tab. 1.1 ersichtlich.

| Region | Fallzahlen | Todeszahlen |
|------------------------------|------------|-------------|
| Welt | 266,672 | 127,902 |
| Mehr entwickelte Länder | 84,425 | 29,964 |
| Weniger entwickelte Länder | 182,240 | 97,944 |
| Westeuropa | 20,797 | 5,454 |
| Nordeuropa | 5,370 | 2,087 |
| Südeuropa | 11,890 | 4,124 |
| Osteuropa | 19,021 | 10,483 |
| Nordamerika | 20,982 | 4,947 |
| Süd-/Zentralamerika, Karibik | 18,062 | 6,107 |
| Afrika | 16,235 | 9,295 |
| Ost-/Südost-/Westasien | 36,594 | 17,445 |
| Südzentrasien | 116,667 | 67,328 |
| Australien / Neuseeland | 3,794 | 1,101 |

Tab. 1.1: Inzidenz des Mundhöhlenkarzinoms weltweit (beide Geschlechter).
Quelle: GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide,
Version 1.0. IARC CancerBase No. 5. Lyon, IARC Press, 2001.

Trotz enormer chirurgischer, chemo- und strahlentherapeutischer Bemühungen bei der Behandlung von Mundhöhlenkarzinomen konnte die 5-Jahresüberlebensrate in den letzten 10 Jahren nicht verbessert werden. Sie beträgt immer noch weniger als 50 % (Howald et al.

1996; Platz et al. 1986). Die Überlebensrate für T1-Tumoren liegt bei 80 %, für T4-Tumoren bei 30 % (Platz et al. 1986).

Ursache für die häufig schlechte Prognose ist die bei der Erstdiagnose meist bereits fortgeschrittene Tumorausdehnung (Platz et al. 1983; Löbe et al. 1989). Dennoch ist Mundkrebs heilbar, vorausgesetzt er wird früh erkannt und früh behandelt (Stell et al. 1982). Die frühzeitige Erkennung und Behandlung einer neoplastischen Veränderung bietet für den Mundkrebs, wie für die meisten anderen bösartigen Tumorerkrankungen die besten Überlebenschancen. So kann Mundkrebs in einem frühen Stadium (T1) durch eine minimale Resektion im Gesunden geheilt werden, während spätere Stadien (T2 – T4) eine ausgedehnte Tumorresektion erfordern, aus der funktionell beeinträchtigende Defekte resultieren können, die mit Hilfe aufwendiger, rekonstruktiver Verfahren verschlossen werden müssen. Trotz adjuvanter Therapiemaßnahmen bleibt hier die Prognose sehr schlecht.

Aus diesen Gründen ist es notwendig, die Früherkennung des Mundschleimhautkarzinoms zu verbessern – vorzugsweise durch Methoden, mit denen mögliche Entartungen verdächtiger Schleimhautläsionen sicher und frühzeitig diagnostiziert werden können.

1.1 Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms der Mundschleimhaut

Die Schleimhaut der Mundhöhle besteht aus einem mehrschichtigen Plattenepithel, das keine bzw. stellenweise eine nur mäßige Verhornung zeigt, wodurch ein geringer Widerstand gegen Irritationen und mechanische Verletzungen gegeben ist. Verhornung findet sich im Bereich des harten Gaumens, der Gingiva, sowie bei den Papillae filiformes der Zunge. Eine wichtige Schutzfunktion für die Schleimhaut bildet der von den zahlreichen kleinen, sowie den drei Paar großen Speicheldrüsen sezernierte Speichel. Durch die gute Durchblutung der Mundschleimhaut und die hohe Regenerationsfähigkeit des Epithels zeigen mechanische, physikalische und chemische Traumatisierungen in der Regel eine gute Heilungstendenz.

Die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms ist ein multifaktorielles Geschehen, welches im Einzelnen noch nicht genau geklärt ist. Individualspezifische Faktoren, exogene Noxen und virale Auslöser spielen dabei eine Rolle.

Häufig zeigt sich für die Tumorentstehung eine enge Verknüpfung mit dem Abusus von Tabak, Alkohol und Betelnuss (Thomas, MacLennan 1992; Vokes et al. 1993). Tabakrauch

enthält eine komplexe Mischung aus mindestens 50 verschiedenen Verbindungen, von denen viele toxisch und/oder karzinogen sind, wie z. B. die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe oder die tabakspezifischen N-Nitrosamine (TSNA) (Scully et al. 2000). Andere bekannte Karzinogene sind z. B. Arylamine, Alkylhalogenide, Ethanol und Urethan (Scully et al. 2000). Einige Studien lassen vermuten, dass eine Mutation des p53-Tumorsuppressorgens mit Tabak- (Field et al. 1991,1992, 1994; Lazarus et al. 1996; Liloglou et al. 1997; Ogden et al. 1992; Smith et al. 1992) und Alkoholabusus (Field et al. 1994) in Verbindung steht. Eine Mutation des p53-Gens ist der häufigste genetische Schaden bei Neoplasien des Menschen (Hollstein et al. 1991) und ist bei 80 % aller Karzinome des Mundes zu finden (Burns et al. 1994; Largey et al. 1993; Kerdpon et al. 1997; Zariwala et al. 1994). Alkohol und Tabak reagieren synergistisch (Sciubba 2001), wobei Alkohol hauptsächlich die Permeabilität der Schleimhaut, insbesondere für die Karzinogene des Tabaks verändert (Du et al. 2000).

In Indien hat der Genuss von mit Betelnuss versetztem Kautabak bei der Karzinomentstehung eine Bedeutung. Durch das sog. „reverse smoking“, bei dem das brennende Ende der Zigarette gegen den Gaumen gehalten wird, wird das Plattenepithelkarzinom am harten Gaumen begünstigt, welches sonst an dieser Stelle relativ selten ist. Dies spielt auch in anderen Regionen Südostasiens und in Lateinamerika eine Rolle.

Weitere Risikofaktoren für die Entstehung eines Mundhöhlenkarzinoms sind unzureichende Mundhygiene und ein zu geringer Verzehr von Obst und Gemüse (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002). Karotinoide, Selen, Folsäure, sowie die Vitamine A, C und E als Bestandteile einer gesunden Ernährung sollen einen protektiven Effekt hinsichtlich der Krebsentstehung haben (Enwonwu und Meeks 1995; Garewal 1995; Hennekens et al. 1984; Ramaswamy et al. 1996). Für die Entstehung einiger Unterarten des Mundkrebses wird auch die Beteiligung von Viren diskutiert (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002). Insbesondere Humane Papilloma-Viren (vor allem Typ 16 und 18) kommen in Frage (Silverman und Sugerman 2000).

1.2 Orale Präkanzerosen

Vielen oralen Plattenepithelkarzinomen gehen klinisch auffällige, potentiell bösartige Schleimhautläsionen, darunter insbesondere die Erythroplakie, aber auch die Leukoplakie, voraus (Vokes et al. 1993; Forastiere et al. 2001).

Die häufigste klinische Manifestation einer oralen Präkanzerose ist die Leukoplakie (Silverman und Sugerman 2000; Lippman und Hong 2001). Sie kann zu einem Plattenepithelkarzinom entarten (Bouquot 1994; Speight et al. 1996). Die Leukoplakie erhöht das Risiko der Krebsentstehung in der Mundhöhle, wobei es bisher weder zuverlässige klinische oder histologische Merkmale gibt, welche voraussagen könnten, ob sich die Läsion spontan zurückbilden oder maligne entarten wird (Lippman und Hong 2001). Die Leukoplakie ist definiert als scharf begrenzte weiße Verfärbung der Mundschleimhaut, welche nicht wegwischtbar ist und keiner anderen Krankheit zugeordnet werden kann (WHO 1978). Der Leukoplakiebegriff ist somit rein klinisch. Die weißliche Verfärbung ist Ausdruck einer Hyperkeratose (Silverman und Sugerman 2000). Das klinische Erscheinungsbild ist vielgestaltig, man unterscheidet: Leukoplakia simplex, Leukoplakia verrucosa und die Leukoplakia erosiva. Sie besitzen unterschiedliche Entartungsrisiken. Laut WHO (1978) sollte die Einteilung in homogene und inhomogene Form geschehen, wobei die inhomogenen Formen prinzipiell ein höheres Entartungsrisiko bergen.

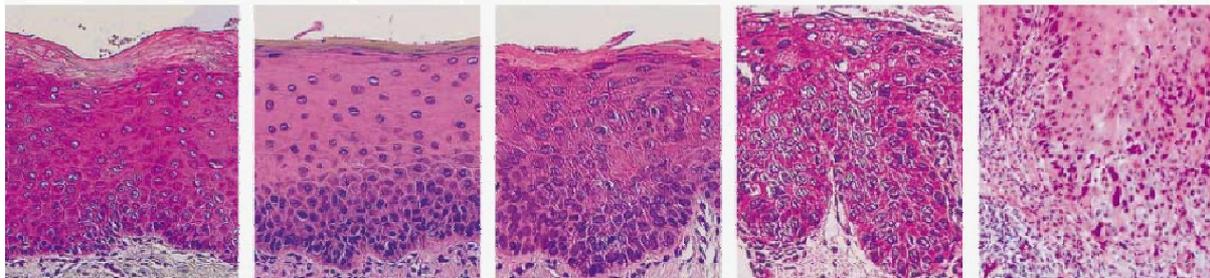
Erythroplakien (oder Erythroplasien = rote Flecken der Mundschleimhaut) haben das höchste maligne Potential (Mashberg 2000). Sie sind zwar sehr viel seltener als Leukoplakien, aber Karzinome sind bei Erythroplakien 17-mal häufiger als bei Leukoplakien (Shafer und Waldron 1975). Diese beiden Veränderungen der Mundschleimhaut kommen oft auch als Mischformen vor (Erythroleukoplakie) (Silverman und Sugerman 2000). Es sollte erwähnt werden, dass nicht allen oralen Plattenepithelkarzinomen eine sichtbare klinische Läsion, wie die Erythroplakie oder die Leukoplakie, vorausgeht, sondern durchaus die Möglichkeit besteht, dass sich der Krebs auch direkt aus klinisch gesund erscheinender Schleimhaut entwickeln kann (Scully et al. 2003).

Wird in Mundschleimhautläsionen zytologisch oder histologisch eine Dysplasie gefunden, so ist dies ein Zeichen für eine statistisch erhöhte Entartungswahrscheinlichkeit (Scully et al. 2003). Unter präkanzerösen Dysplasien versteht man histologische oder zytologische Abweichungen von der Norm, welche verdächtig auf, aber nicht beweisend für Krebs sind (Böcking 1997/98, Böcking 2002). Dysplasien des Plattenepithels sind zytologisch im Wesentlichen durch Normabweichungen der Zellkerngröße und -form gekennzeichnet, welche die für Krebs charakteristische Ausprägung noch nicht erreicht haben (Soost und Bauer 1990). In Abb. 1.1 ist dies veranschaulicht. Ansteigende Grade der Dysplasien des Plattenepithels entsprechen zunehmenden Wahrscheinlichkeiten, dass sich die betreffende Läsion in ein in situ bzw. invasives Plattenepithelkarzinom weiterentwickelt, wobei im

Einzelfall morphologisch nicht zu entscheiden ist, ob sich die betreffende Dysplasie zurückbildet oder zu einem Karzinom fortschreiten wird (Böcking 1997/98).

Orale Leukoplakie

Mundkrebs



Hyperplasie → milde Dysplasie → mittlere Dysplasie → schwere Dysplasie → Krebs

Abb. 1.1: Fortschreiten der oralen Leukoplakie zum Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut. Aus: Lippman, Scott M. und Hong Waun Ki: Molecular Markers of the Risk of Oral Cancer. N Engl J Med, Vol. 344, No. 17

In einigen Studien waren Dysplasien in bis zu 25 % der Biopsien von Leukoplakien diagnostiziert worden (Waldron und Shafer 1975; Pindborg et al. 1963; Bouquot und Gorlin 1986), in anderen waren es 5 bis 15 % (Pindborg et al. 1997; Suarez et al. 1998). Von diesen Dysplasien entarten 15 bis 20 % zu Krebs (Lumerman et al. 1995), was 0,75 – 5 % der Leukoplakieentartungsrate entspricht. Andere Autoren berichten über Entartungsraten der Leukoplakie zu Mundkrebs von 4,4 bis 31,4 % (Hogewind et al. 1998; Lind 1987; Lee et al. 2000), teilweise sogar von 36 % beim Nachweis einer mittleren bis schweren Dysplasie bei einer Leukoplakie (Silverman et al. 1984). Reichart und Philipsen (1999) berichten, dass sich aus 3 – 6 % aller oralen Leukoplakien ein Plattenepithelkarzinom entwickeln würde.

Die Problematik der Dysplasie-Diagnostik wird in Kapitel 1.3.1 besprochen.

1.3 Diagnostik des Mundschleimhautkarzinoms

Screening-Untersuchungen (z. B. durch den Zahnarzt) von Risikogruppen (z. B. Raucher und Alkoholiker) zur Früherkennung des Mundkrebses sind in Deutschland bisher nicht üblich. In der Regel sucht der Patient erst dann einen Arzt auf, wenn er deutlich wahrnehmbare Mundschleimhautveränderungen an sich selbst feststellt und seine Symptome über einen längeren Zeitraum anhalten. Beschwerden, die den Patienten zum Arzt führen, sind:

1. Schmerz
2. Blutung
3. Schwellung
4. Schlechter Geschmack
5. Gefühlsstörung
6. Kieferklemme
7. Zahnlockerungen
8. Kloßiges Sprechen
9. Gewichtsabnahme

Für den behandelnden Arzt ist die Differentialdiagnose zwischen entzündlichen und neoplastischen Erkrankungen der Mundschleimhaut nicht immer leicht zu stellen. Fehldiagnosen von präkanzerösen Läsionen und Carcinomata in situ, die oft harmlos aussehen und als gutartig eingestuft werden, begünstigen das Fortschreiten der Erkrankung und verzögern eine adäquate Behandlung.

Zum Abklären der Dignität einer Läsion der Mundschleimhaut bei klinischer Verdachtsdiagnose stellt die Biopsie mit nachfolgender histologischer Begutachtung bisher den „Goldstandard“ dar. Patienten fürchten in der Regel diesen invasiven Eingriff oder sie können sich ihm aus gesundheitlichen Gründen nur schwerlich unterziehen (z. B. bei Einnahme von Cumarin-Derivaten). Daher verzögern die Patienten oft die Durchführung der Biopsie-Entnahme mit der Konsequenz, dass das Tumorwachstum und die Ausbreitung sowie die Metastasierung fortschreiten und der Patient erst in späten, schlecht therapierbaren oder unheilbaren Stadien des Krebses zur Operation kommt.

Alternative Methoden mit hohen Treffsicherheiten zur Dignitätsabklärung von Mundschleimhautveränderungen sind somit sowohl für den Arzt, als auch für den Patienten wünschenswert. Eine solche Methode könnte die Multimodale Zellanalyse (MMZA) darstellen. Sie vereint drei etablierte zytologische Untersuchungsmethoden mit hohen Treffsicherheiten in einem Diagnoseverfahren. Die morphologische Begutachtung der Exfoliativzytologie, die DNA-Zytometrie und die AgNOR-Analyse bilden die drei Säulen dieser neuen Methode.

1.3.1 Zytologie und Histologie

Unter Exfoliativzytologie versteht man die mikroskopische Untersuchung abgeschilfterter Zellen oder Zellverbände einer Epitheloberfläche, die mittels eines Abstriches oder aus Körperflüssigkeiten gewonnen werden. Dies ist nicht invasiv, relativ schmerzfrei sowie leicht

und schnell durchführbar. Im Gegensatz zur Biopsie mit histologischer Untersuchung stellt der Bürstenabstrich der Mundschleimhaut mit anschließender zytologischer Untersuchung eine mögliche Screening-Methode dar.

Diagnostische Relevanz der Zytologie und Histologie für Plattenepithelien

In der Gynäkologie ist die Zytodiagnostik seit langem ein anerkanntes Verfahren. Weltweit konnte so innerhalb der letzten 50 Jahre mit Abstrichen der Zervix uteri eine Verbesserung der Frühdiagnostik für Dysplasien und Karzinome dieses Bereiches erreicht werden (Koss 1989; Parker et al. 1997). Die Mortalität des Zervixkarzinoms wurde durch diese Technik in Deutschland von 9 auf 5/100.000 Frauen gesenkt (Möbius 1993).

Für das Mundschleimhautkarzinom erreichten Remmerbach et al. (2001) mit Hilfe der konventionellen oralen Exfoliativzytologie eine Sensitivität von 94,6 % und eine Spezifität von 99,5 %. Schwarz et al. (1981) identifizierten anhand der Zytologie 24 von 28 histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen der Mundschleimhaut (Sensitivität: 85,4 %). Silverman et al. (1977) konnten zytologisch 41 Mundhöhlenkarzinome von 48 histopathologisch gesicherten Karzinomen erkennen (Sensitivität: 85,4 %). Reddy et al. (1975) wiesen mit Hilfe der Zytologie von 325 histologisch gesicherten Mundhöhlenkarzinomen 243 nach (Sensitivität: 74,8 %). Die Effektivität der Zytobürste zur Abstrichentnahme wurde mit der des Holzspatels von Jones et al. (1994) und Ogden et al. (1992) verglichen. Sie beurteilten die Zytobürste als geeigneter.

Abstriche der Mundschleimhaut wurden bereits vor 50 Jahren zytologisch untersucht. In den Jahren 1960-70 erschien eine Vielzahl von Studien, die eine erhebliche Schwankungsbreite bezüglich der Sensitivität der oralen Exfoliativzytologie zeigten, so dass sich das Interesse an dieser Methode der Frühdiagnostik wieder verlor.

Silverman et al. (1958) konnten mit einer Sensitivität von 93,3 % Plattenepithelkarzinome der Mundschleimhaut zytologisch identifizieren. Sandler (1964) diagnostizierte mit Hilfe der Zytologie von 249 histologisch gesicherten Mundhöhlenkarzinomen 242 als Karzinome (Sensitivität: 97,2 %). Gardner (1964) erkannte zytologisch alle 18 histopathologisch gesicherten Plattenepithelkarzinome (Sensitivität: 100 %). Becker et al. (1966) diagnostizierten zytologisch mit einer Sensitivität von 48 % Mundkrebs. Watanabe (1968) konnte bei seiner zytologischen Untersuchung von Mundschleimhautabstrichen mit einer Sensitivität von 87 % Mundkrebs identifizieren. Pape (1973) erreichte mit Hilfe der Zytologie

eine 86 %ige Sensitivität bei der Erkennung von histologisch gesicherten Mundhöhlenkarzinomen.

Diese beträchtlichen Unterschiede bezüglich der Sensitivität der oralen Exfoliativzytologie könnten ein Grund dafür sein, dass diese Untersuchungsmethode bisher wenig Beachtung fand und die histologische Begutachtung der Biopsie bevorzugt wurde.

Schwächen der zytologischen Tumordiagnostik ergeben sich häufig durch:

1. die Spärlichkeit des Untersuchungsmaterials,
2. das Fehlen der Möglichkeit an Nachschnitten Zusatzfärbungen oder immunhistochemische Reaktionen anzubringen,
3. die verloren gegangene Verbandstruktur der Zellen (Böcking 1990).

Ein Problem der zytologischen und histologischen Dysplasie-Diagnostik ist die mangelhafte Reproduzierbarkeit (Böcking 1997/98). Auch unter erfahrenen Histopathologen ist nicht nur die interspezifische Reproduzierbarkeit der Dysplasie-Gradierung, sondern auch die Sicherheit der Unterscheidung zwischen reaktiven Veränderungen und geringen Dysplasien unbefriedigend (Ismail et al. 1990).

Eine Studie von Abbey et al. (1995) zeigte eine beachtliche inter- und intraindividuelle Variation der histopathologischen Diagnosen verschiedener Dysplasiegrade von Mundschleimhautläsionen. Sechs erfahrene Pathologen wurden auf die Übereinstimmung ihrer histologischen Diagnosen hin untersucht. Gegenstand der Studie waren 120 Biopsien der Mundschleimhaut, bei denen die histologischen Diagnosen über das ganze Spektrum von Hyperkeratose bis hin zur schweren Dysplasie reichten. Diese Diagnosen waren von Referenzpathologen des „Oral Pathology Diagnostic Service“ erstellt worden. Die interindividuelle Reproduzierbarkeit der histologischen Diagnosen betrug 50,5 %. 60 der 120 Präparate wurden nach einigen Monaten erneut von denselben sechs Pathologen diagnostiziert. Die Übereinstimmung mit ihrer ersten Diagnose, also die intraindividuelle Reproduzierbarkeit, lag bei 50,8 %.

Auch Karabulut et al. (1995) berichteten über einen Mangel an inter- und intraindividuelle Reproduzierbarkeit bei der Typisierung und Gradierung von dysplastischen Mundschleimhautläsionen.

Die Erkennung sowie die korrekte Gradierung einer Dysplasie sind als schwierig zu betrachten.

1.3.2 Adjuvante Methoden

Ein erneutes Interesse an oraler Exfoliativzytologie in den letzten Jahren ist auf die Anwendung adjuvanter Methoden zurückzuführen.

1.3.2.1 DNA-Zytometrie

Messsysteme für die DNA-Zytometrie stellen zum einen die Durchflusszytometer (DNA flow cytometry = DNA-FCM) und zum anderen die TV-Bildanalyse-Systeme (DNA image cytometry = DNA-ICM) dar (Böcking 1990).

Exfoliativzytologische und Zellvereinzlungspräparate aus Biopsien können nach quantitativer Färbung der Zellkern-DNA nach Feulgen und Rossenbeck einer DNA-Messung mit Hilfe eines TV-Bildanalyse-Systems unterzogen werden (Böcking 1995). Eine DNA-Messung an Gewebeschnitten ist wegen nicht zu kontrollierender schnittbedingter Artefakte für diagnostische Aussagen nicht statthaft (Giroud et al. 1998, Böcking 2002). Zur DNA-Zytometrie eignen sich vor allem vorgefärbte (z. B. nach Papanicolaou oder Hämotoxin-Eosin) und vordiagnostizierte Ausstriche von Haut-, Gebärmutterhals-, Vulva-, Vagina-, Mund-, Kehlkopf- und Bronchialschleimhautabstrichen (Böcking 1997/98; 1998).

Alle menschlichen Zellkerne enthalten (mit Ausnahme der Keimzellen) je 2 x 23 Chromosomen (2 x 22 Autosomen + ein Paar Gonosomen XX bzw. XY), entsprechend eines doppelten Chromosomensatzes, genannt 2c (Böcking 1990). Vor Zellteilungen liegt in der G₂-Phase des Zellzyklus ein 4facher Chromosomensatz vor, entsprechend 4c (Böcking 1990).

Die meisten Tumoren, auch gutartige, zeigen von den übrigen Körperzellen abweichende numerische und/oder strukturelle Chromosomenaberrationen (=chromosomale Aneuploidie) (Böcking 2002). Das quantitative zytometrische Äquivalent chromosomaler Aneuploidie ist die DNA-Aneuploidie (Böcking 1998). Alle untersuchten Plattenepithelkarzinome der Bronchial-, Kehlkopf-, Mund- und Pharynxschleimhaut sowie der Haut weisen Aneuploidien auf, welche nicht in normalen oder reaktiv veränderten Epithelien gefunden werden (Heim und Mitelman 1995). Diejenigen Dysplasien sind obligat präkanzerös, welche die beim Karzinom anzutreffenden und in normalen oder reaktiv veränderten Plattenepithelien nicht vorkommenden chromosomalen Aberrationen aufweisen (Böcking 1998). Dem Nachweis

chromosomaler Aneuploidie kommt damit die Funktion eines Markers für neoplastische Transformationen der Zelle zu (Böcking 1998, Böcking 2002).

DNA-Aneuploidie ist ein international anerkannter Marker für die neoplastische Transformation von Zellen (Böcking 2002; Böcking und Motherby 1999; Motherby et al. 1998a; Motherby et al. 1998b; Nadjari et al. 1999a; Nadjari et al. 1999b).

Die Nichtnachweisbarkeit von DNA-Aneuploidie schließt Malignität aber nicht aus, da einige wenige Tumoren so geringe Aberrationen zeigen, dass sie keinen DNA-zytometrisch nachweisbaren Effekt haben (Böcking 1998).

Messgröße ist der DNA-Gehalt der Zellkerne, um den Nettoeffekt chromosomaler Aberrationen auf den Zellkern-DNA-Gehalt als diagnostischen Marker zu nutzen (Böcking 1998). Der DNA-Gehalt kann durch die Zytometrie nicht direkt gemessen werden. Nach der quantitativen Färbung der Zellkern-DNA nach R. Feulgen, ist die IOD (Integrierte Optische Dichte) des Kerns das zytometrische Äquivalent seines DNA-Gehalts. Die Messung des nukleären DNA-Gehaltes erfordert somit eine Skalierung der IOD-Werte durch einen Vergleich mit den Werten von Zellen mit bekanntem DNA-Gehalt. Dies sind die Referenzzellen mit einem DNA-Gehalt von $2c$. Der DNA-Gehalt wird in einem „ c “-Wert angegeben, wobei $1c$ der Hälfte des Zellkern-DNA-Gehalts von Zellen einer normalen (nicht pathologischen) diploiden Population in der G₀/G₁-Zellzyklus-Phase entspricht. In einem DNA-Histogramm wird die Häufigkeitsverteilung der integrierten optischen Dichte der Zellkerne in der Einheit c wiedergegeben (Böcking 2002). Dabei repräsentiert der modale Wert eines Histogramm-Peaks den häufigsten Wert (Gipfel) innerhalb dieses Peaks (Böcking, Nguyen 2004).

1.3.2.1.1 Kriterien der DNA-Aneuploidie

Numerische und/oder strukturelle Chromosomenaberrationen (=chromosomale Aneuploidien) (Sandberg 1990) sind für die meisten Tumoren des Menschen charakteristisch und bilden die biologische Grundlage der diagnostischen DNA-Zytometrie. Chromosomale Aneuploidie, die durch genetische Instabilität verursacht wird, ist ein frühes Schlüsselereignis in der Tumorgenese (Böcking 1995; Haroske et al. 2001).

Eine Population normaler, proliferierender Zellen zeigt in einem DNA-Histogramm einen ersten Häufigkeitsgipfel bei $2c$ und einen zweiten bei $4c$ (entsprechend der G₀/G₁- bzw. G₂/M-Phase im Zellzyklus) (Haroske et al. 2001).

Als DNA-Aneuploidie bezeichnet man DNA-Verteilungen von Zellpopulationen, die statistisch signifikant von denen normaler (ruhender, proliferierender oder polyploider) Zellen differieren (Böcking et al. 1994). Ziel der DNA-Zytometrie ist die Erkennung von nicht normalen (aneuploiden) DNA-Stammlinien, die statistisch signifikant von den Lagen normaler diploider Stammlinien abweichen sowie die Identifizierung von Zellen mit einem DNA-Gehalt $> 9c$. Die DNA-Stammlinie repräsentiert die G0/1-Phase-Fraktion des DNA-Histogramms einer proliferierenden Zellpopulation (Böcking 2002).

Die den DNA-Gehalt beeinflussenden physiologischen Faktoren (euploide Polyploidisierung, Replikation, Apoptose, Nekrose) und unphysiologischen Faktoren müssen bei der Interpretation eines DNA-Histogramms hinsichtlich des qualitativen Nachweises von DNA-Aneuploidie zur Dignitätsbestimmung berücksichtigt werden (Böcking 1995). Zu den unphysiologischen Faktoren gehören morphologisch nachweisbare Virusinfektionen (z. B. HPV, CMV, HV, HIV), Strahlen- und Zytostatikatherapie, ein Vitamin-B₁₂-Mangel und eine Hyperregeneration von Zellen (Böcking 1995).

Bei den im Folgenden genannten Zellen wurde eine physiologische euploide Polyploidisierung (regelhafte Vervielfachungen des Chromosomensatzes, entsprechend der ganzzahligen Potenzen des $2c$ -Wertes $2n c$, also $4c$, $8c$, $16c$, $32c$, ...) beschrieben:

- Arias-Stella-Phänomen des Endometriums
- Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas
- bronchiale Zylinderepithelien
- Onkozyten der Mamma und der Schilddrüse
- Hepatozyten
- Herzmuskelzellen
- Magenschleimhautepithelien
- Mesothelien
- Samenblasenepithelien
- Thyreozyten

- Urothelien
- Zervikale Zylinderepithelien (Böcking 1995; Böcking et al. 1994; Biesterfeld et al. 1994).

Im DNA-Histogramm entspricht die Bezeichnung DNA-Polyploidie dem Vorkommen von DNA-Stammlinien in den Verdopplungsregionen euploider Stammlinien (bei 4c, 8c, 16c) (Böcking 2002).

Bezüglich der Mundschleimhaut wurde bei bestehender Erkrankung mit Lichen ruber planus in einer Studie mit 29 Fällen über eine euploide Polyploidisierung mit DNA-Gehalten $>4c$ in 25 Fällen (86 %) und mit DNA-Gehalten $> 8c$ in 5 Fällen (17 %) berichtet (Biesterfeld et al. 1991).

Die Befundung der DNA-Histogramme zu diagnostischen Zwecken erfolgt qualitativ in die Kategorien DNA-diploid, DNA-polyploid und DNA-aneuploid gemäß den im Folgenden aufgeführten Kriterien. Wird eines der folgenden Kriterien erfüllt, so gilt die Interpretation der DNA-Verteilung für das Mundschleimhautkarzinom als aneuploid:

1. Bei einem Vergleich der Referenzzellpopulation mit der G0/1 Phase-Fraktion einer DNA-Stammlinie der Analysezellpopulation spricht man vom Auftreten einer abnormen Stammlinie, wenn der DNA-Index einer Stammlinie $< 1,80c > 2,20c$ oder $< 3,60c > 4,40c$ ist (Böcking et al. 1995; Haroske et al. 2001) = Stammlinien-aneuploidie.
2. Das Auftreten von Zellen mit einem DNA-Gehalt $> 9c$ (9c Exceeding Events, 9cEE) (Chatélain et al. 1989a) = Einzelzellaneuploidie.

Erscheint die DNA-Verteilung wie folgt, so wird DNA-Euploidie angenommen:

1. DNA-diploid: DNA-Stammlinie $> 1,80c < 2,20c$.
2. DNA-polyploid: DNA-Stammlinie $> 1,80c < 2,20c$ und $> 3,60c < 4,40c$.

Ein polyploides DNA-Histogramm spricht für das Vorliegen eines HPV (Humanes Papillomavirus)- Infektes (Evans und Monaghan 1983).

Eine Quantifizierung der DNA-Aneuploidie zum Zwecke der Malignitätsgradierung erfolgt bei der Messung von Dysplasien in der Regel nicht, weil eine nicht ausgeschlossene

Mitmessung normaler Zellen das Gradierungsergebnis verfälschen könnte (Böcking 1998). Nur wenn ausschließlich morphologisch eindeutige Tumorzellen gemessen wurden, darf auch ein DNA-Malignitätsgrad bestimmt werden (Giroud et al. 1998).

Für die Prognoseabschätzung bekannter maligner Läsionen kann eine prognostisch relevante Histogrammtypisierung vorgenommen werden (Haroske et al. 1998). Folgende Histogrammtypen sind zu diesem Zweck zu verwenden:

1. Grad I: Peridiploides DNA-Histogramm: DNA-Stammlinie $> 1,80c < 2,20c$.
2. Grad II: Peritetraploides DNA-Histogramm: DNA-Stammlinie $> 3,60c < 4,40c$ bei einem DNA-aneuploiden Histogramm oder im Fall einer nachgewiesenen Neoplasie.
3. Grad III: x-ploides DNA-Histogramm: existiert im Falle einer nachgewiesenen Neoplasie und dem Vorhandensein einer Stammlinie, die allein oder zusätzlich zu einer peridiploiden/peritetraploiden Stammlinie außerhalb der oben genannten Grenzen auftritt. „x“ wird dabei durch den DNA-Ploidie-Wert ersetzt (z. B. triploid, hypertetraploid, 2,6-ploid).
4. Grad IV: Multiploides DNA-Histogramm: wird angenommen im Fall einer nachgewiesenen Neoplasie und mehr als einer Stammlinie an Positionen außerhalb der oben genannten Grenzen (Haroske et al. 2001).

1.3.2.1.2 Qualitätskontrolle

Zur Erzielung einer hohen Messpräzision der DNA-Bildzytometrie sind von der ESACP (European Society for Analytical Cellular Pathology) Qualitätsvorgaben bezüglich der erforderlichen hardware- und softwaremäßigen Gerätebedingungen angegeben, die mittlerweile europaweit standardisiert sind.

In den „Consensus Reports of the ESACP Task Force on Standardization of Diagnostic DNA Image Cytometry“ sind detaillierte Richtlinien sowie Maßnahmen der Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle publiziert (Böcking et al. 1995; Giroud et al. 1998; Haroske et al. 1998, 2001).

Wesentliche Aspekte der Maßnahmen zur Qualitätssicherung und Kontrolle, abgesehen von der Ablehnung diagnostischer DNA-Messungen an Gewebeschnitten, sind:

- die Bevorzugung interner Referenzzellen (mindestens 30 Stück),
- ein Variationskoeffizient der Referenzzellen von $< 5 \%$
- und eine Korrelation ihrer Fläche mit der integrierten optischen Dichte (IOD) von $r < 0,4$.

Als interne Referenzzellen dienen im selben Präparat befindliche, morphologisch unauffällige diploide Zellen, z. B. normale Intermediärzellen oder Lymphozyten. Sofern vorhanden, werden mindestens 300 Zellkerne von zuvor als diagnostisch relevant erachteten dysplastischen oder Tumorzellen nach Zufallskriterien gemessen. Eine Ausnahme bildet das gezielte Suchen nach einzelnen Zellen mit einem pathognomonisch erhöhten DNA-Gehalt größer als 9c (1c entspricht der DNA-Menge eines einfachen Chromosomensatzes) (Böcking 2002; Böcking und Motherby 1999).

Standardisierte Testmessungen an Rattenleber-Tupfpräparaten dienen der Qualitätskontrolle der Messpräzision. Die Leistungsdaten des Systems sollen den strikten Standards der ESACP für die Diagnostik mittels DNA-Zytometrie entsprechen (Böcking et al. 1995b; Giroud et al. 1998; Haroske et al. 1998, 2001).

Um die Messung nicht gewünschter Zelltypen und von Artefakten auszuschließen, sollte eine nachträgliche Qualitätskontrolle der gemessenen Zellkerne möglich sein. Dies lässt sich anhand einer Speicherung aller Abbildungen der gemessenen Zellkerne in einer sog. „Image Galery“ (Bildergalerie) des TV-Bildanalyseystems verwirklichen (s. Kapitel 2, Abb. 2.5) (Böcking et al. 1999).

1.3.2.1.3 Diagnostische Relevanz der DNA-Zytometrie für Plattenepithelien

In allen bisher untersuchten in situ und invasiven Gebärmutterhalskarzinomen fanden sich chromosomale Aneuploidien (Böcking 2002). In Plattenepithelien von Zervix uteri-Abstrichen ist DNA-Aneuploidie nur in malignen Zellen nachgewiesen worden (Hillemanns 1964; Sandritter und Fischer 1961; Wright et al. 1994).

Die zytometrische Analyse des Zellkern-DNA-Gehalts wurde auch an Mundschleimhautabstrichen angewendet.

Remmerbach et al. (2001) erreichten mit Hilfe der DNA-Bildzytometrie eine Sensitivität von 96,4 % und eine Spezifität von 100 % für die Erkennung von Mundkrebs. Durch die

Kombination der DNA-Zytometrie mit der konventionellen zytologischen Abstrich-Diagnostik lag die Sensitivität bei 98,2 % (Spezifität: 100 %). Remmerbach et al. (2003a) konnten in vier Fällen die Hypothese belegen, dass diejenigen plattenepithelialen Dysplasien obligate Präkanzerosen darstellen, welche DNA-Aneuploidie aufweisen. Eine erste Biopsie von makroskopisch verdächtigen Läsionen der Mundschleimhaut bei vier Patienten hatte weder Anzeichen eines Plattenepithelkarzinoms, noch einer schweren Dysplasie gezeigt. Durch zytologische Begutachtung von Bürstenabstrichen sowie durch die DNA-zytometrische Untersuchung wurde jedoch Krebs bzw. DNA-Aneuploidie diagnostiziert. So wurde die richtige Diagnose „Krebs“ schon ein bis 15 Monate früher erhoben, denn erst dann diagnostizierte man an einer zweiten Biopsie histologisch in allen vier Fällen ein Karzinom (Remmerbach et al 2003a).

Abdel-Salam et al. (1988) konnten mit 87,5 %iger Sensitivität mittels der DNA-Zytometrie unter 16 Dysplasien der Mundschleimhaut diejenigen acht identifizieren, welche sich in einem 10- bis 15jährigen Beobachtungszeitraum zu Krebs weiterentwickelten. Saku und Sato (1983) waren in der Lage, die maligne Transformation oraler Präkanzerosen durch den Nachweis von DNA-Histogrammen mit mehreren Stammlinien vorherzusagen.

Schimming et al. (1998) haben die DNA-Verteilung von oralen Plattenepithelkarzinomen mit den klinisch-pathologischen Merkmalen zum Zweck des Malignitätsgrading verglichen. DNA-aneuploide Tumoren zeigten in ihren Ergebnissen einen höheren Lymphknotenstatus, vermehrtes Auftreten von Fernmetastasen und eine niedrigere Überlebensrate.

1.3.2.2 AgNOR-Analyse

In den letzten Jahren entwickelte sich die AgNOR-Analyse in der Tumorpathologie zu einem häufig eingesetzten Verfahren zur Prognoseeinschätzung bösartiger Tumoren (Remmerbach et al. 2003).

Der Nukleolus bildet die Region des Interphasekerns, in der die ribosomalen Gene und deren Produkte konzentriert vorliegen. Er tritt meist einzeln und hauptsächlich als dichtes, rundes Kernkörperchen in Erscheinung. Der Nukleolus wird am Ende der Mitose gebildet und bleibt während der Interphase erhalten. In ihm findet eine besonders lebhaft Transkription der rDNA-Gene mittels der Polymerase I statt (Rüschoff 1992), womit er Hauptlieferant für Ribosomenuntereinheiten ist.

Als „Nukleolus organisierende Regionen“ (nucleolar organizer regions = NORs) werden die Chromosomenabschnitte bezeichnet, auf denen die für die Ribosomenbiosynthese verantwortlichen ribosomalen Gene (rDNA) gelegen sind (Rüschoff 1992). Sie befinden sich auf den kurzen Armen der fünf akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15, 21, 22) (Howell 1982, Rüschoff 1992). Auf jedem dieser Chromosomen befinden sich zwei NORs, weshalb eine normale diploide Zelle eine Anzahl von 20 NORs besitzt, die typischerweise während der zellulären Interphase zu Nukleoli aggregiert vorliegen (Cox et al. 1993).

Das Transkriptionsprodukt der rDNA ist die ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA). Sie ist hauptsächlicher Bestandteil der Ribosomen (Rüschoff 1992). Da die Ribosomen eine zentrale Rolle in der Proteinbiosynthese einnehmen, sind die NOR-Gene von großer Bedeutung für die Stoffwechselaktivität und Proliferation der Zelle (Rüschoff 1992). Die Funktion der aus zwei Untereinheiten bestehenden Ribosomen besteht in der Übersetzung des genetischen Codes in Proteine, der Translation (Rüschoff 1992). Die Ribosomenzahl selbst ist mit der Proteinsyntheseaktivität korreliert und beträgt in einer durchschnittlichen Säugetierzelle über zehn Millionen, die bis auf wenige Mitochondrien-Ribosomen im Zytosol anzutreffen sind (Clayton 1984).

1.3.2.2.1 Silberreaktion

Die ursprüngliche Drei-Schritt Silberreaktion bei 60°C von Howell et al. (1975) wurde zunächst von Howell und Black (1980) zur Ein-Schritt Methode und anschließend von Ploton et al. (1986) zur Ein-Schritt Silberreaktion bei Raumtemperatur verbessert (Rüschoff et al. 1992).

Die NORs lassen sich durch Silbernitratlösung selektiv anfärben und erscheinen als braunschwarze Punkte in Zellkernen. Sie werden deshalb als AgNORs (agyrophile Nukleolus organisierende Regionen) bezeichnet. Die AgNOR-Reaktion ist an Proteine gebunden, die mit aktivierten NOR-Genen assoziiert sind. Nur aktiv transkribierende NORs sind agyrophil, da das Silber nicht direkt an die rDNA bindet, sondern an spezifische, mit der rDNA verbundene, saure Non-Histon Proteine (Goodpasture und Bloom 1975, Ploton et al. 1986, Rüschoff 1992). Die Agyrophilie dieser Proteine spiegelt dabei den Aktivitätszustand der rDNA (NORs) selbst wieder (Rüschoff 1992). Die Silberreaktion lässt sich mit Schwermetallen und Ferrozyanid (De Capoa et al. 1985) sowie mit quecksilber- oder dichromathaltigen Fixativa (Smith et al. 1988) blockieren (Rüschoff et al. 1992). Dagegen wird die Silberreaktion bei Alkoholfixierung des Gewebes verstärkt (Derenzini et al. 1988).

Die Anzahl und Morphologie der NORs reflektieren die Aktivität der Transkription von rRNA und die Proliferationsrate einer Zelle (Crocker und Nar 1987, Crocker und Skilbeck 1987, Derenzini et al. 1989a, Murty et al. 1985, Ostwald et al. 1994, Trerè et al. 1989, Underwood und Giri 1988, Warnakulasuriya und Johnson 1993).

Für die Zählung der AgNORs kann zwischen Clustern und Satelliten unterschieden werden. Cluster sind Gruppen von silbergefärbten Punkten innerhalb des Nukleolus. Satelliten stellen einzelne, kleine, silbergefärbte Punkte außerhalb des Nukleolus dar, die häufig in sehr bösartigen Zellen zu finden sind (Crocker et al. 1989). Cluster werden nur in proliferierenden Zellen gefunden und ihre Anzahl steht in Verbindung mit dem Reifegrad der Zelle (Grotto et al. 1991, Reeves et al. 1984, Smetana und Likovsky 1984). In reifen, nicht proliferierenden Zellen zeigen sich nur einzelne, runde, silbergefärbte Punkte, die dem Nukleolus an sich entsprechen (Crocker et al. 1989).

Field et al. (1984) zeigten, dass durch Phythämagglutinine (PHA) stimulierte humane Lymphozyten in Zellkulturen nach der ersten Zellteilung in den nachfolgenden Generationen ein feindisperses AgNOR-Verteilungsmuster (bei gleichzeitiger Erhöhung der Nukleolenzahl) aufwiesen, während zuvor in den ruhenden, kleinen Lymphozyten zumeist (>90 %) ein, allenfalls zwei Silberniederschläge nachweisbar gewesen waren. Rüschoff (1992) vermutet als Erklärung für dieses Phänomen die fehlende Zeit (kurze G1-Phase) bei schnell wachsenden Zellen das rDNA Material in Form eines einzelnen Nukleolus zu organisieren, bzw. die damit verbundene größere Effizienz bei der RNA-Produktion in proliferierenden Zellen.

Generell wurde beobachtet, dass hochmaligne Neoplasien AgNORs aufweisen, die zum einen zahlreicher und zum anderen kleiner sind im Vergleich mit denen von gutartigen oder weniger bösartigen Zellneubildungen (Crocker und Egan 1988, Derenzini et al. 1986). Rüschoff (1992) schlussfolgert, dass die Silberreaktion selbst vom Zellzyklus, Reife- und Proliferationsgrad und somit auch von der Dignität einer Zelle abhängig sei. Zahl, Größe, Verteilung und Färbeintensität sind die wesentlichen Parameter, die das NOR-Verhalten und damit wesentliche Aspekte der biologischen Aktivität einer Zelle auf molekularem Niveau charakterisieren (Rüschoff 1992).

Nach Crocker et al. 1989 gibt es zwei Zählmethoden: zum einen werden die in Haufen liegenden Silberpunkte (Cluster) als ein Punkt in Addition zu den Punkten außerhalb des

Nukleolus gezählt, zum anderen können die als Punkte identifizierbaren Strukturen innerhalb des Nukleolus auch einzeln gezählt und zu den restlichen des Nukleoplasmas addiert werden.

1.3.2.2 Diagnostische Relevanz und prognostische Wertigkeit der AgNOR-Analyse

Untersuchungen am histologischen Schnitt

Die AgNOR-Analyse wurde bereits vielfach an histologischen Paraffin-Schnitten zur Differenzierung gutartiger von bösartigen Läsionen sowie als prognostischer Parameter für Neoplasien eingesetzt (Crocker und McGovern 1988, Crocker und Nar 1987, Crocker et al. 1988, Egan und Crocker 1988, Hall et al. 1988, Howat et al. 1988, Shechtman et al. 1998, Smith und Crocker 1988, Suarez et al. 1989, Underwood und Giri 1988), darunter auch histologische Schnitte von Mundkrebs. Sano et al. (1991) konnten die prognostische Bedeutung der AgNOR-Analyse für das Plattenepithelkarzinom des Mundes sichern.

In einer Studie von Crocker und Nar (1987) an etwa 3 µm dicken Paraffinschnitten von routinemäßig mit Formalin fixierten Gewebeproben zeigten hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) signifikant mehr AgNOR-Partikel im Kern als niedrigmaligne NHL. In der Folgezeit wurde diese Technik an zahlreichen Organtumoren zunächst von der Arbeitsgruppe um Crocker eingesetzt. Demnach ließ sich Normal- und Tumorgewebe zumeist gut mit Hilfe der mittleren AgNOR-Zahl pro Zelle unterscheiden (Rüschoff 1992). Vom diagnostischen Wert der AgNOR-Analyse profitierten verschiedenste neoplastische Veränderungen, wie das Non-Hodgkin-Lymphom (Crocker et al. 1988, Hall et al. 1988), das Mammakarzinom (Trerè 1993, Smith und Crocker 1988), das Neuroblastom (Trerè 1993) und das multiple Myelom (Pich et al. 1994).

Die Trennung verschiedener Dysplasiegrade, z. B. der Portio (CIN I-III), mittels der AgNOR-Analyse ist offenbar schwieriger (Rowlands et al. 1988). Auch der Zusammenhang mit dem jeweiligen Malignitätsgrad ist anscheinend nicht immer so eng, wie es für das Non-Hodgkin-Lymphom gefunden wurde (Rüschoff 1992).

Untersuchungen an zytologischem Material

Es besteht ein grundsätzlicher Unterschied zwischen der AgNOR-Analyse am Schnitt und im zytologischen Präparat, da bei letzterem alle AgNORs einer Zelle erfasst werden (Rüschoff 1992).

Einige Arbeiten an zytologischem Material unterschiedlicher Gewebe deuten auf die Anwendbarkeit der AgNOR-Technik hin. Boldy et al. (1989) fanden, dass sich hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome und niedrigmaligne Non-Hodgkin-Lymphome noch besser voneinander trennen lassen (1,7 vs. 16,3 AgNORs pro Zelle) als am histologischen Schnitt (1,1 vs. 6,0 AgNORs pro Zelle). Eine gute Trennung zwischen normalen und reaktiv entzündlich veränderten Pleuradeckzellen einerseits sowie Karzinom- und Mesotheliumzellen andererseits zeigte sich bei Derenzini et al. (1989b). Gute Resultate ergaben auch Untersuchungen an alkoholisch fixierten Zellen aus Feinnadelaspirationsbiopsien von Speicheldrüsentumoren (Cardillo 1992). Remmerbach et al. (2003b) empfehlen die AgNOR-Analyse als unterstützende diagnostische Methode für Mundschleimhautabstriche, bei denen die zytologische Einteilung in reaktive oder neoplastische Epithelveränderungen Schwierigkeiten bereitet. Ziel ihrer Studie an Mundschleimhautabstrichen verdächtiger Läsionen von 75 Patienten war die Einordnung der diagnostischen Wertigkeit der AgNOR-Analyse als zusätzliches diagnostisches Kriterium zur konventionellen Exfoliativzytologie. Die Exfoliativzytologie alleine zeigte eine Sensitivität von 92,5 %, eine Spezifität von 100 %, einen positiven Vorhersagewert von 100 % und einen negativen von 84,6 %. Der beste Trennwert der durchschnittlichen AgNOR-Anzahl pro Zellkern, der es erlaubte gutartige von bösartigen Zellen zu unterscheiden, lag bei 4,8. Sie erreichten mit der AgNOR-Analyse eine Sensitivität von 100 %, eine Spezifität von 100 % sowie einen positiven und negativen Vorhersagewert von jeweils 100 % (Remmerbach et al. 2003b).

Probleme der AgNOR-Analyse

Ein Grundproblem der AgNOR-Analyse in der Tumorpathologie ist die praktisch völlig fehlende Standardisierung (Rüschoff et al. 1992). Mögliche Ursachen für bei dem Vergleich verschiedener Studien auftretende Differenzen der AgNOR-Werte sind z. B. die gewählten Silberinkubationszeiten, die in einem erstaunlichen Maße voneinander abweichen (Rüschoff et al. 1992). Bei zu langer Färbedauer füllt der Silberniederschlag den kompletten Nukleolus aus (Rüschoff et al. 1992). Bei den so angefärbten Kernstrukturen handelt es sich nicht um AgNORs, sondern im Wesentlichen um Nukleolen (Crocker et al. 1989, Rüschoff et al. 1992). Die zahlreichen kleinen, für die Diagnose bösartiger Veränderungen wichtigen AgNORs lassen sich so nicht mehr voneinander abgrenzen und es können bei der Zählung zu niedrige Werte resultieren.

Selbst bei gleicher Färbetechnik und Silberinkubationsdauer zeigen sich Probleme in der Auswertung. Bei den histologischen Schnitten zeigt sich, dass die Schnittdicke nicht selten

zwischen 3 und 10 μm schwankt und somit von den von Crocker und Nar (1987) vorgeschlagenen 3 μm abweicht (Rüschhoff et al. 1992). Zudem ist das Auszählen der AgNOR-Partikel zeitaufwändig (60 Minuten für 100 Zellen) (Giri et al. 1989a, 1989b) und die interindividuelle Variabilität ist zum Teil erheblich (Rüschhoff 1992). Eine systematische Analyse weiterer Parameter (Größe, Verteilung, Dichte) zur Quantifizierung des AgNOR-Verhaltens unter Einsatz entsprechender Messverfahren (z. B. Bildanalyse) ist erforderlich (Rüschhoff et al. 1992).

1.4 Problemstellung und neuer Ansatz durch die Multimodale Zellanalyse

Die Heilungserfolge des Mundschleimhautkarzinoms sind im Wesentlichen abhängig vom Zeitpunkt der Diagnose. Daher erhält die Frühdiagnose eine entscheidende Bedeutung. Einfach, unblutig und preiswert ist sie mit Hilfe exfoliativzytologischer Abstrichpräparate der Mundschleimhaut durchführbar. Erfahrungsgemäß gute Methoden stellen die rein zytologische Begutachtung, die DNA-Zytometrie und die AgNOR-Analyse dar.

Dennoch gibt es einige einschränkende Faktoren, die eine weite Verbreitung dieser Methoden bisher verhindert haben könnten. Die Treffsicherheit der reinen Zytologie ist unzureichend, lässt sich aber in Kombination mit der DNA-Zytometrie oder der AgNOR-Analyse verbessern (Remmerbach et al. 2001, 2003a, 2003b). Ein ernstzunehmender Nachteil der Zytologie ergibt sich durch den Eingang technisch unzureichender Proben, die einer sicheren Diagnose wegen Zellmangels entsagen. Weiterhin ist die halbautomatisch durchgeführte DNA-Bildzytometrie zeitaufwändig (30 Minuten Messzeit pro Fall) und der Aufwand für das subjektive Auszählen der AgNORs in 100 Zellkernen pro Präparat ist mit 60 bis 90 Minuten ebenfalls zu hoch, um dieses Verfahren in der Routine als Dienstleistung anbieten zu können. Einen weiteren Rückschlag erfährt die nicht invasive präventive zytologische Diagnostik durch Schließung fast aller Ausbildungsstätten für CTA (Cytologisch Technische AssistentInnen), womit es derzeit zu einem eklatanten Mangel an Fachkräften für die Aufgabe des Vormusterns von Abstrichpräparaten kommt. Daher würden automatisierte Analyseverfahren, die DNA-Aneuploidie nachweisen oder eine erhöhte Zahl von AgNORs pro Zellkern erkennen, es erlauben, die oben geschilderten treffsicheren Diagnoseergebnisse auch ohne die selten verfügbare zytopathologische Expertise mit geringerem Zeitaufwand und daher erschwinglich zu ermöglichen.

Böcking et al. haben im Jahr 2004 das Prinzip der Multimodalen Zellanalyse (MMZA) vorgestellt.

Die Multimodale Zellanalyse als neuer Ansatz soll hier einen entscheidenden Fortschritt bringen. Sie nutzt systematisch mittels Computereinsatz die Korrelation von Bildern unterschiedlich gefärbter identischer Zellen. An identischen Zellen, deren Positionen auf dem Objektträger anhand der digitalisierten Mikroskopbilder gespeichert bleiben, werden nacheinander die drei Diagnosemethoden der rein zytologischen Begutachtung und subjektiv morphologischer Auswahl, der DNA-Zytometrie und der AgNOR-Analyse durchgeführt. Kern der Methode ist demnach die Kombination sich ergänzender Analysemethoden in einem kaskadierten Umfärbeprozess an demselben mikroskopischen Präparat an jeweils relokalierten Zellen. Der entscheidende Gewinn liegt in der Korrelation der unterschiedlichen Merkmale bezogen auf individuelle Zellen. Klinisch einsetzbar wird die Multimodale Zellanalyse durch die Nutzung digitaler Bildanalysetechniken, mit deren Hilfe individuelle Zellen nach dem jeweiligen Umfärbeprozess relokaliert, präzise zur Deckung gebracht und anschließend quantitativ analysiert werden. Als Ergebnis erhält man pro Zelle viele Informationen, die im Zusammenspiel die Treffsicherheit der Diagnose erhöhen können und gleichzeitig die Anzahl der für eine Diagnose benötigten Zellen verringert. Dadurch kann die Rate der unzureichenden zytologischen Proben drastisch gesenkt werden. Zudem kommt dies der ethischen Forderung entgegen, sehr treffsichere Diagnosen an wenig Zellen durchführen zu können, da die zytologische Abstrichdiagnostik für den Patienten ohne Zweifel die angenehmste Methode im Vergleich mit der operativen Akquirierung einer Biopsie darstellt.

Durch die Automatisierung der wesentlichen Diagnoseprozesse steht mit der Multimodalen Zellanalyse eine nicht invasive, bezahlbare und treffsichere Frühdiagnosemethode für den Mundkrebs zur Verfügung. Da dieser damit nachweislich in frühen Stadien diagnostizierbar, operier- und heilbar wäre, kann mit einer signifikanten Senkung der Sterblichkeit durch Anwendung dieses Verfahrens gerechnet werden.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der vorgelegten Promotionsarbeit ist die Vorstellung dieses neu entwickelten Systems der Multimodalen Zellanalyse und die erstmalige Beschreibung seiner Hard- und Software-Komponenten. In einer dieser ersten Studien mit dem neuen System soll die Durchführbarkeit des diagnostischen Prinzips demonstriert werden. Die Funktionalität der Multimodalen

Zellanalyse soll am Material der Mundschleimhaut untersucht werden. Die Leistung, Funktionsweise und Messqualität des neuen Systems sollen im Vergleich mit einem bekannten System (AutoCyte QUIC-DNA-System) (AutoCyte, Burlington, N.C., USA) (Böcking et al. 1994, Müller et al. 1994) und den Performance Standards der ESACP (Böcking et al. 1995, Giroud et al. 1998, Haroske et al. 1998, Haroske et al. 2001) analysiert werden. Auch die Reproduzierbarkeit der DNA-Zytometrie wird durch den Vergleich der Messergebnisse mit denen des AutoCyte QUIC-DNA-Systems an den identischen Präparaten untersucht. Außerdem soll eine erste grobe Evaluation der mit dem neuen System erreichbaren diagnostischen Treffsicherheit durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Methode: Multimodale Zellanalyse (MMZA)

2.1.1 Technische Umsetzung

Aus Gründen der Standardisierung der Methode stimmt das folgende Kapitel in Absprache mit dem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Alfred Böcking im Wesentlichen mit den Promotionsschriften von Frau Christiane Henning und Frau Astrid Metzger überein.

In enger Kooperation mit dem Institut für Cytopathologie (IfC) in Düsseldorf ist am Lehrstuhl für Bildverarbeitung der RWTH Aachen (LfB) ein Laborsystem entstanden, das in den durchgeführten ersten Studien die Möglichkeiten der neuen Diagnosemethode zeigt. Das hieraus gewonnene Datenmaterial liefert eine solide Basis für kommende Weiterentwicklungen der Einzelkomponenten des Systems. Vor allem die Bedienbarkeit wurde auf die Probe gestellt, und Verbesserungsvorschläge flossen direkt in den Entwicklungsprozess ein. Das Fundament dieses entwickelten Systems bilden digitale Bildverarbeitungsverfahren. Die besonderen technischen Merkmale sind im Folgenden zusammengestellt:

- Robuste Bildverarbeitungsalgorithmen tragen der Variationsbreite des Zellmaterials Rechnung.
- Sichere Speicherung von großen Datenmengen (sowohl Bilder als auch Messergebnisse).
- Integration von Bildaufnahme, Steuerung des Mikroskops und Interaktion mit dem Benutzer in eine graphische Benutzeroberfläche.
- Extraktion von Messwerten aus den einzelnen Modalitäten.
- Korrelation der Daten verschiedener Auswertungen und Bilder einzelner Modalitäten.



Abb. 2.1: Ansicht des Labormusters mit Mikroskop, CCD-Kamera und Computer

Im Folgenden werden die Komponenten im Einzelnen beschrieben, wobei eine Unterteilung in Hard- und Software vorgenommen wird.

2.1.2 Komponenten

Das System für die Multimodale Zellanalyse besteht aus vielen Komponenten, deren einwandfreie Zusammenarbeit eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg darstellt.

In Abb. 2.2 sind die Komponenten schematisch dargestellt.

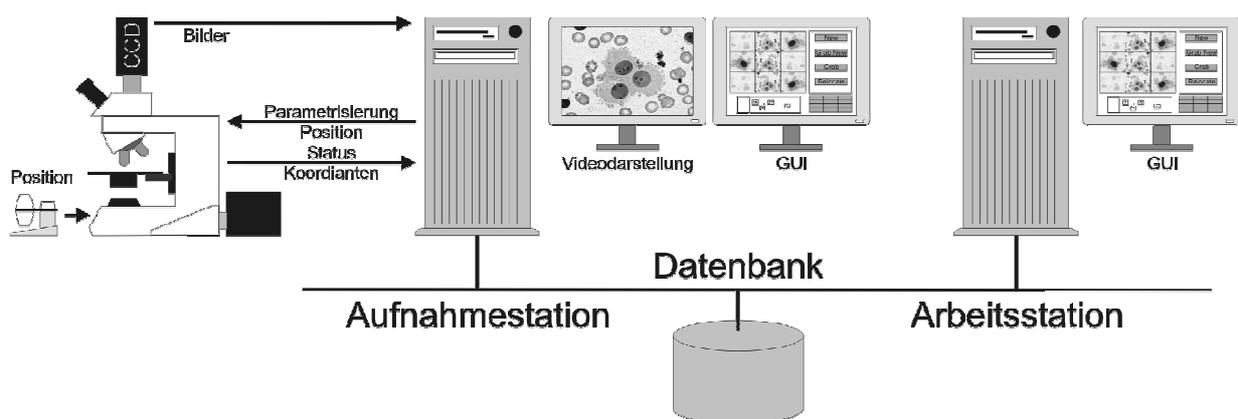


Abb. 2.2: Komponenten des Systems

2.1.2.1 Hardware

Mikroskop / Kamera / Digitalisierer

Die Analyse der zytologischen Präparate erfolgt in einem Durchlichtmikroskop. Zur Verfügung stand das DM-LA-Mikroskop von Leica mit den Objektiven 5x/0.15, 10x/0.30, 20x/0.70, 40x/0.75, 63x/1.32 und 100x/1.35, wobei für die Aufnahmen das 63x-Objektiv verwendet wurde. Wesentliche Komponenten wie XYZ-Positionierung, Objektivwechsel, Aperturblenden und Lichtintensität sind durch einen Personal Computer zu steuern. Gleichzeitig können alle diese Einstellungen auch manuell durch den Benutzer über ein externes Steuergerät (Satellit) vorgenommen werden. Während des Betriebs hält der Computer dann alle Änderungen der Parametrisierung des Mikroskops nach. Die Kommunikation erfolgt über eine serielle Schnittstelle (RS232) per Programmbibliothek (SDK) von Leica.

Die benötigten Farbinformationen liefert eine Kamera mit 3-Chip-Technologie. Für die Entwicklung dieses Systems wurde die 3-Chip-CCD-Kamera CV M-90 von JAI eingesetzt, die mit dem PAL Standard (Bildgröße ca. 800 x 600 Pixel) arbeitet. Für die DNA-Aufnahmen wurde kein Interferenz-Filter benutzt, da dieser nach internen Vergleichstests keine Steigerung der Messgenauigkeit einbringt.

Um die analogen Videosignale in ein digitales Bild umzusetzen, wird ein Framegrabber benötigt, hier das Matrox Meteor-II-Board, der u. a. die Möglichkeit einer Live-Darstellung des Videosignals anbietet und per Matrox Imaging Library (MIL), einer C-Bibliothek, gesteuert wird, die kompatibel zu allen gängigen Matrox-Grabberkarten ist.

Personal Computer

Die Computer für die Aufnahmestation und auch die Arbeitsstationen sind normale PCs in einem Netzwerk. Der Rechner der Aufnahmestation verfügt zusätzlich über einen zweiten Monitor für die Darstellung des Videobildes der CCD-Kamera und eine Grabberkarte zum Digitalisieren der Mikroskopaufnahmen (s. Abb. 2.1). Seine Eckdaten sind: AMD-Prozessor Athlon XP 1600+, Festplatte 80 GB, Grafikkarten (zwei für zwei Monitore): Asus AGP V7700 pro, Matrox Millennium II PCI, CD-Brenner, Microsoft Visual Studio 6.0 Professional. Als Betriebssystem wurde Microsoft Windows 2000 gewählt, da sowohl die Software für die Matrox-Karten (MIL) als auch das SDK von Leica nur für diese Umgebung zur Verfügung standen.

Vom Datenbank- und Fileserver wurden keine hohen Rechenleistungen gefordert, aber er sollte genügend Festplattenspeicher für die großen Datenmengen zur Verfügung stellen (>> 100 GB).

2.1.2.2 Software

Hierzu gehören die grundlegenden Komponenten wie Datenbankanbindung und Ansteuerung des Mikroskops, des Digitalisierers bis hin zur grafischen Benutzeroberfläche, die die Befehle des Anwenders annimmt und die Ergebnisse präsentiert. Entwickelt wurde die Software mit dem Microsoft Visual C++ Compiler 6.0.

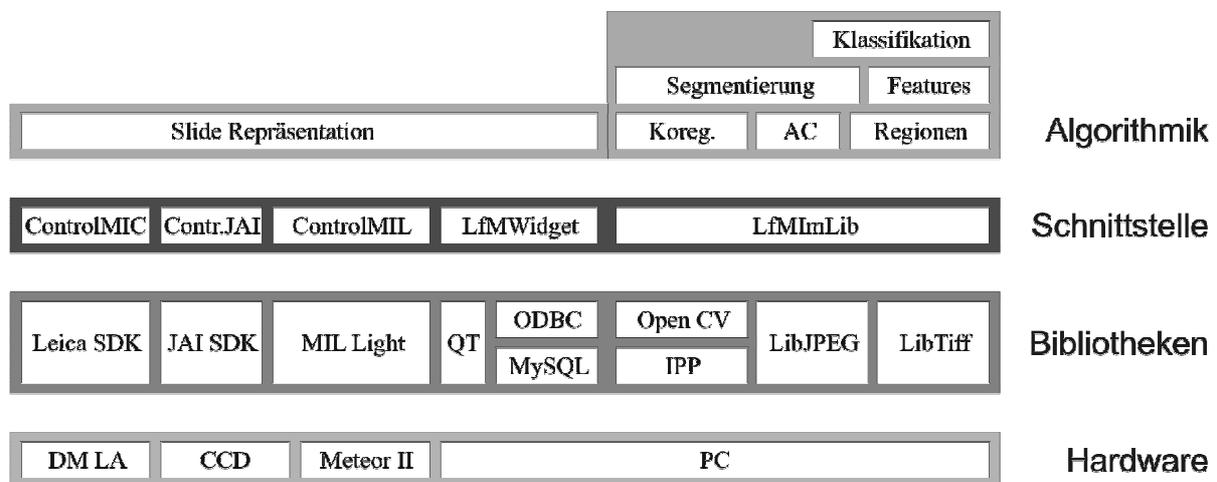


Abb. 2.3: Ebenen der Softwarekomponenten und der Hardware

Abb. 2.3 zeigt die drei verschiedenen Ebenen der verwandten Softwarekomponenten, die auf die beschriebene Hardware aufsetzte:

Bibliotheken:

Zur Ansteuerung der Hardwarekomponenten werden Entwicklungspakete (Leica SDK, JAI SDK, MIL Light) der Hersteller benötigt. Auch für die Anbindung an die Datenbank (MySQL, ODBC) und die Darstellung der Benutzeroberflächenelemente (Qt) wird auf Softwarebibliotheken zurückgegriffen. Ebenso stammen elementare Grafikroutinen aus diversen Bibliotheken (IPP, OpenCV, LibTiff, LibJPEG).

Schnittstellen:

Zur eigentlichen Anwendung wurden Schnittstellen implementiert, die die benötigten Funktionalitäten der Bibliotheken auf das System anpassen (ControlMIC, Control-MIL, ControlJAI). Spezielle Darstellungselemente werden auch in einem Interface abgelegt

(LfMWidget). Die Basis aller höheren Bildverarbeitungsroutinen bildet eine weitere Bibliothek (LfMImLib).

Algorithmik:

An oberster Stufe steht die Repräsentation des Objektträgers (Slide Representation) mit allen Informationen über Positionen und Eigenschaften der Zellen.

Dieses virtuelle Abbild ermöglicht einen einfachen Zugriff auf alle Daten der Probe. Ebenso befinden sich in dieser Ebene komplizierte Bildverarbeitungsalgorithmen für die Repositionierung und Segmentierung der Bilddaten.

Anwendung:

All die beschriebenen Funktionalitäten werden in einer Anwendung (im Diagramm nicht dargestellt) kombiniert, die mit einer grafischen Benutzerschnittstelle die Bedienung ermöglicht.

Im folgenden Abschnitt wird vor allem auf die Komponenten eingegangen, die den Rahmen des Systems bilden und die Anwendung der Multimodalen Zellanalyse im klinischen Alltag ermöglichen. Die zentralen Algorithmen der Bildverarbeitung sind im Abschnitt 2.1.3 detaillierter erläutert.

2.1.3 Datenbank

Für die Erstellung von Diagnosen mittels der Multimodalen Zellanalyse fallen große Mengen an Daten an. Dies sind neben den digitalisierten Aufnahmen der Mikroskopbilder auch Positionsdaten sowie Mikroskop- und Kamera-Parameter. Diese Datenmengen werden mittels einer MySQL-Datenbank verwaltet. Die Datenbank befindet sich auf dem zentralen Server, der gleichzeitig auch als Fileserver fungiert, da die digitalen Mikroskopbilder nicht in der Datenbank abgelegt werden. Die Computer kommunizieren über die ODBC-Schnittstelle (Open Database Connectivity) mit der SQL-Datenbank. Somit kann von allen Arbeitsstationen, die über ein lokales Netzwerk miteinander verknüpft sind, auf die Daten zugegriffen und mit ihnen gearbeitet werden.

Die Ordnungskriterien der Datenbank passen sich an die Anforderungen der Multimodalen Zellanalyse an. Jede Probe erhält beim Eingang in das zytologische Labor eine eindeutige Kennzeichnung, die sich wie folgt zusammensetzt: Zuerst ein großes C, anschließend eine fortlaufende Nummerierung und als Letztes eine zweistellige Jahreszahl, z. B. C5660-98

(zytologische Probe Nr. 5660 im Jahre 1998). Diese sog. C-Nummer ist das oberste Ordnungskriterium. Die nächste Ebene sind die verschiedenen angefahrenen Positionen auf dem Objektträger, die untersucht werden. Sie werden als durchlaufende Nummerierung gespeichert und bilden das zweite Ordnungskriterium. Für jede dieser Positionen sind Aufnahmen in verschiedenen Färbungen möglich. Die Färbungen werden als MGG (May-Grünwald-Giemsa), PAP (Papanicolaou), FEU (Feulgen), AGN (Silbernitrat-Färbung) etc. abgekürzt und stellen das dritte Ordnungskriterium dar. Darüber hinaus ist das benutzte Objektiv das unterste Kriterium.

Es sind Aufnahmen an beliebig vielen angefahrenen Positionen (POS) in beliebigen Färbungen (STA) mit unterschiedlichen Objektiven (OBJ) möglich.

Für jede Probe wird also ein Datenkubus mit den Koordinaten POS, STA und OBJ gefüllt. Mit verschiedenen „Schnittebenen“ durch diesen Kubus können dann verschiedene tabellarische Ansichten der Daten erzeugt werden.

Die aus der Segmentierung der Zellkerne hervorgegangenen Zellkernkonturen und die Klassifikation der Zellen werden ebenfalls in der Datenbank als sog. Zellobjekte gespeichert. Sie sind einer Position auf einer Probe zugeordnet, so dass für jedes dieser Objekte auch die Ursprungsbilder in den verschiedenen Färbungen dargestellt werden können. Die Koordinaten der Segmente beziehen sich nur auf eine Färbung, so dass bei der Überlagerung der Konturen auf andere Färbungen die Bilder vorher noch transformiert werden müssen.

Zur Dokumentation ist es möglich, noch Zusatzinformationen wie Herkunftsmaterial der Probe, ggf. histologische Diagnose und beliebige weitere Kommentare zu speichern. Des Weiteren kann jede einzelne Position mit einem Kommentar versehen werden.

In Abb. 2.4 ist ein Teil des Informationsflusses für die Visualisierung der Ergebnisse dargestellt. Die Kommunikation zwischen der Datenbank und der Arbeitsstation erfolgt über eine ODBC-Schnittstelle. Nachdem feststeht, auf welche der Färbungen die Ergebnisse projiziert werden sollen, wird das passende Bild mit den erforderlichen Parametern transformiert, damit die Koordinaten der Konturen korrekt sind. In das Bild können nun wahlweise die Zellkernkonturen, die Messergebnisse für die einzelnen Zellen, ein kalibrierter Maßstab und, wenn vorhanden, weitere Beschreibungen zu der Probe eingeblendet werden.

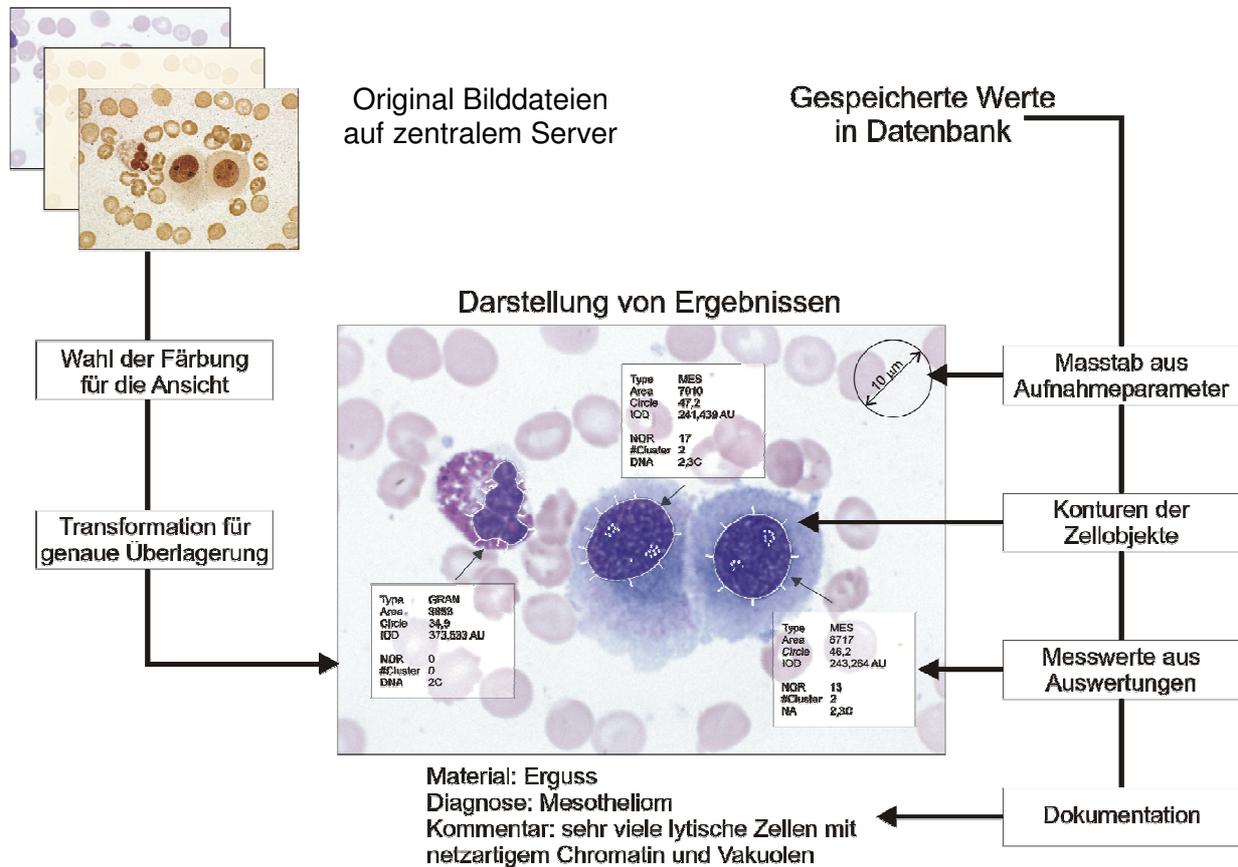


Abb. 2.4: Informationsfluss zur Darstellung der Ergebnisse

2.1.4 Benutzeroberfläche / Benutzerführung

Für die Umsetzung der Oberfläche wurde das Entwicklungspaket Qt der Firma Trolltech gewählt. Die Aufgaben der Benutzeroberfläche lassen sich in mehrere Untergruppen einteilen, die sich auch in der Anordnung der Elemente auf dem Bildschirm widerspiegeln (s. Abb. 2.5).

Abhängig vom Zustand des Systems sind verschiedene Aktionen und Abläufe möglich oder sinnvoll. Der Benutzer wird durch die Anpassung der Oberfläche geführt, um einen reibungslosen Ablauf zu gewährleisten.

Neue Aufnahmen können z. B. erst gemacht werden, wenn die C-Nummer der Probe unter dem Mikroskop in die Oberfläche eingegeben wurde. Die einzelnen Aktionen können über Schaltflächen (Buttons) ausgeführt werden, wobei diese Steuerelemente in einer logischen Reihenfolge untereinander angeordnet sind.

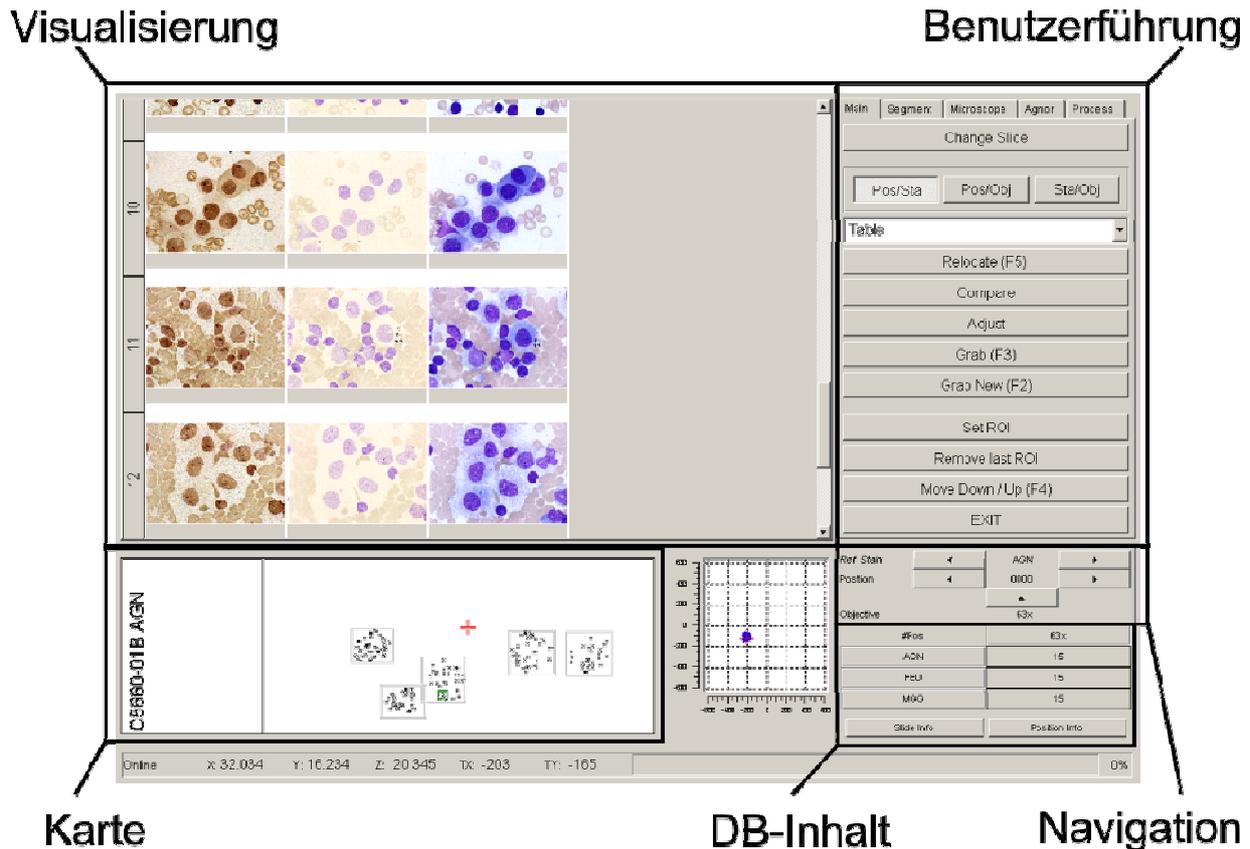


Abb. 2.5: Einteilung der Benutzeroberfläche

Einstellungen des Mikroskops oder der CCD-Kamera sind in verborgenen Dialogen untergebracht und stören somit nicht den normalen Ablauf der Anwendung. Durch diese geringe Schachteltiefe der Befehle ist eine übersichtliche und schnelle Steuerung des Systems möglich.

2.1.5 Visualisierung

Je nach Anwendung sind verschiedene Darstellungen der Daten nötig. Um einen Überblick der in der Datenbank vorhandenen aufgenommenen Zellbilder zu erhalten, ist eine tabellarische Ansicht mit verkleinerten Bildern vorgesehen (Bildergalerie).

Ausgewertete Daten und der Vergleich von identischen Zellen in verschiedenen Färbungen erfordern das Übereinanderlegen von Einzelaufnahmen mit Einblendung der zusätzlichen Eigenschaften der Zellen.

Diese Darstellungen erfolgen alle im linken oberen Teil der Benutzeroberfläche.

Gleichzeitig werden die Positionen der Aufnahmen auf einer „Karte“ des Objektträgers mit seiner C-Nummer links unten dargestellt, wobei die aktuelle Position der gewählten Aufnahme markiert ist und die Position des Mikroskoptisches auch eingeblendet wird.

Die Anzahl der vorhandenen Aufnahmen in den verschiedenen Färbungen ist unterhalb der Navigationselemente dargestellt.

2.1.6 Navigation

Für die Repositionierung des Mikroskops oder die Durchsicht des vorhandenen Bildmaterials muss der Benutzer jederzeit die Möglichkeit haben, Referenzfärbungen oder Positionen auf dem Objektträger auszuwählen. Im unteren rechten Teil der Oberfläche können diese Einstellungen vorgenommen werden. Die Wahl von Referenzfärbung und Position erfolgt über diese Elemente, während der Wechsel des Objektivs nur über das Mikroskop möglich ist.

2.1.7 Ablauf einer Aufnahmesequenz

In diesem Abschnitt wird der Ablauf einer multimodalen Auswertung exemplarisch an der Färbesequenz: „MGG-Feulgen-Silber“ dargestellt (s. Abb.2.6).

Die Sequenz beginnt mit dem Einlegen eines Objektträgers in der visuellen Färbung (in diesem Falle MGG). Zuerst werden Mikroskop und CCD-Kamera auf optimale Bildqualität eingestellt. Dabei wird der Weiß-Abgleich bei eingelegtem leeren Objektträger durch das Programm automatisch durchgeführt. Anschließend werden diese Parameter (Beleuchtung und Aperturblende des Mikroskops, Verstärkung der R-, G- und B-Kanäle der Kamera etc.) in der Datenbank gespeichert.

Der Benutzer sucht sich nun Positionen auf der Probe aus, die durch eine multimodale Analyse untersucht werden sollen, und nimmt Bilder dieser Positionen auf. Parallel zu den digitalen Bildern werden auch die XYZ-Koordinaten des Mikroskops in die Datenbank übernommen. Hierbei ist es jederzeit möglich, durch die automatische Repositionierung schon erfasste Positionen abermals anzufahren. Dies ermöglicht eine nachträgliche Begutachtung der ausgewählten Zellen nicht nur anhand der gespeicherten Bilder, sondern auch an den Originalproben durch das Mikroskop.

Für weitere Verarbeitungsschritte werden vergleichbare Grauwertbilder der Farbaufnahmen benötigt. Unter anderem arbeitet der Repositionierungsalgorithmus mit diesen Grauwertbildern, die durch eine adaptive Grauwerttransformation (s. Abschnitt 2.1.8.1)

erzeugt werden. Die aus dieser Transformation hervorgehenden Koeffizienten werden ebenfalls in der Datenbank gespeichert.

Es folgt nun der Umfärbeprozess zur Feulgen-Färbung.

Nach dem Einlegen werden die Einstellungs-Parameter abermals gespeichert. Zum Auffinden der zuvor erfassten Zellen fährt das System den Tisch des Mikroskops an die gleiche Stelle wie in der ersten Färbung. Da durch mechanische Ungenauigkeiten beim Einlegen der Probe in der Verankerung auf dem Tisch und eventuelle Verschiebung der Zellen durch den Umfärbeprozess die gesuchte Position nicht exakt repositioniert werden kann, muss der Benutzer eine grobe manuelle Korrektur der Position vornehmen. Die Feinjustierung der Position erfolgt durch ein in Abschnitt 2.1.8.2 beschriebenes Verfahren. Anschließend errechnet das System aus der Differenz von Soll- und Ist-Position (Soll: Position aus erster Färbung, Ist: Position des Tisches nach Feinjustage) einen Translationsvektor, mit dessen Hilfe globale Verschiebungen der Probe eliminiert werden und die nachfolgenden Positionen genauer aufgefunden werden. Nun werden die digitalen Bilder der Zellen gespeichert.

Mit den daraus adaptiv erzeugten Grauwertbildern ist es nun möglich, eine pixelgenaue Koregistrierung der ersten beiden Bildsequenzen durchzuführen. Hierbei wird ein zur Repositionierung ähnlicher Algorithmus angewandt, der jedoch über eine höhere Genauigkeit verfügt und um einen Rotationsfreiheitsgrad erweitert ist. Die errechneten Parameter dieser Transformation werden ebenfalls in der Datenbank abgelegt. Von diesem Moment an ist es möglich, die Ansicht der Zellen in den zwei ersten Färbungen darzustellen, um z. B. zu den morphologischen Informationen aus der visuellen Färbung noch die Struktur des Chromatins in der Feulgen-Färbung hinzuzuziehen.

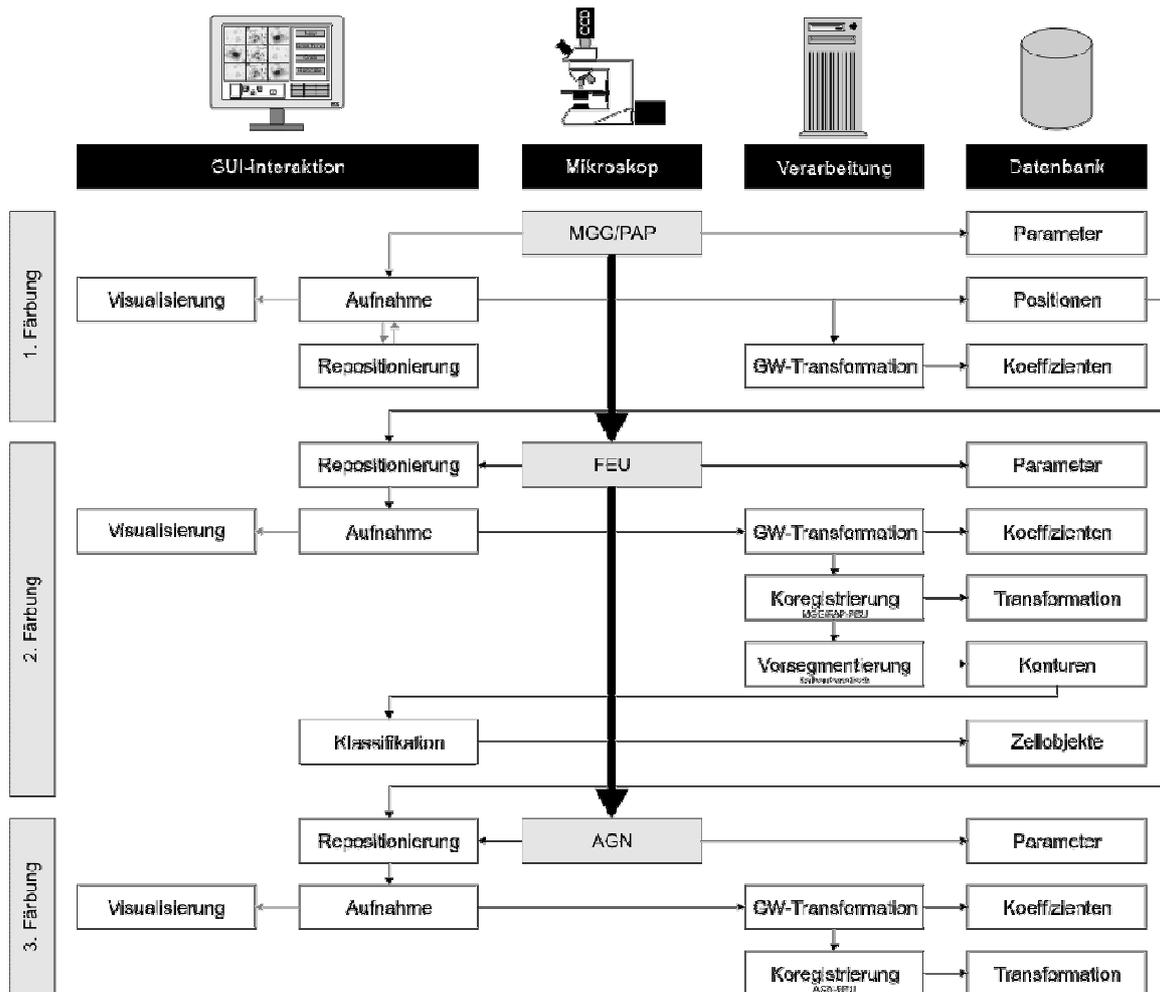


Abb. 2.6: Ablauf einer Aufnahmesequenz mit angedeutetem Informationsfluss (die Extraktion von Messwerten in der Feulgen- und Silbernitrat-Färbung ist nicht dargestellt)

Da sich die Feulgen-Färbung durch ihren hohen Farbkontrast hervorragend für die Segmentierung des Zellkerns eignet, wird an dieser Stelle bereits eine Vorsegmentierung durchgeführt. Die gefundenen Kernkonturen werden dargestellt und der Benutzer kann diese noch verfeinern oder verwerfen sowie die Zellen nach Typ und Aufgabe in der DNA-Zytometrie klassifizieren (s. Abschnitt 2.1.8.3 – 2.1.8.4). In der Datenbank werden die Zellobjekte mit ihrer Kontur und Zugehörigkeit für die weitere Verarbeitung abgelegt.

Durch die erwähnte Client-Server-Architektur ist es ohne weiteres möglich, nach der Aufnahme der zweiten Färbung alle weitergehenden Verarbeitungsschritte (Segmentierung, Klassifikation, etc.) an einer anderen Arbeitsstation durchzuführen. Die Aufnahmestation mit dem Mikroskop ist während dieser Zeit für andere Aufnahmesequenzen frei. Nach dem zweiten Umfärbeprozess zur Silbernitrat-Färbung werden abermals die gleichen Positionen angefahren und die Aufnahmen der Zellen genauso wie die Parameter von Mikroskop und

Kamera gespeichert. Auch hier kann nach erfolgter Grauwerttransformation eine exakte Koregistrierung mit den Feulgen-Bildern erfolgen.

Auf die hier ausgesparte Extraktion der Messdaten aus der Feulgen- und der Silbernitrat-Färbung wird im Abschnitt 2.1.8.5 eingegangen.

2.1.8 Bildverarbeitung

Digitale Bildverarbeitungsverfahren ermöglichen die Durchführung der MMZA-Messungen und die automatisierte Quantifikation von Messergebnissen. In diesem Abschnitt werden die Algorithmen für die einzelnen Verarbeitungsschritte dargelegt.

2.1.8.1 Vorverarbeitung

Das Ziel der Vorverarbeitung ist es, eine geeignete Transformation vom RGB-Farbraum (Rot-, Grün-, Blau-Farbraum) in ein Grauwertbild zu finden. Die Parameter der Transformation werden aus einer Aufnahme einer Probe mittels einer Cluster-Analyse des RGB-Histogrammes errechnet, die radiale Gaussverteilungen für Vordergrund und Hintergrund (bzw. zusätzlich für Zytoplasma) zugrunde legt (s. Abb. 2.7).

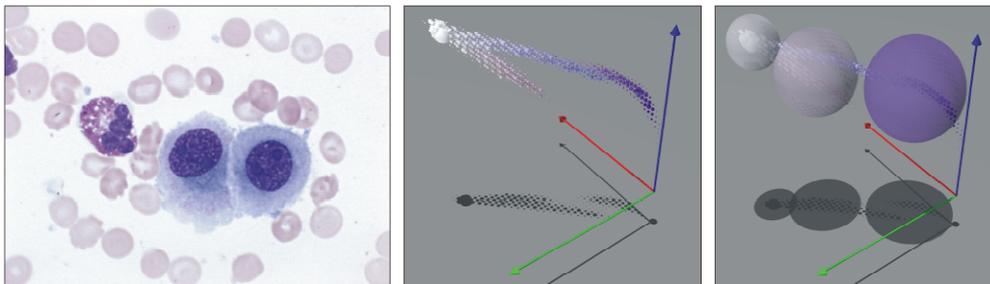


Abb. 2.7: Originales MGG-Bild mit dem dazugehörigen RGB-Histogramm. Die Auftrittswahrscheinlichkeit drückt sich im Durchmesser der Kugel aus. Ganz rechts ist das Ergebnis des Clusterings dargestellt. Jede Verteilung entspricht einer großen Kugel. Die Farbe entspricht dem Zentrum und der Radius der Varianz dieser Verteilungen.

Aus diesen Verteilungen wird durch Anwendung der Fisher-Diskriminante (Blake und Isard 1998) eine kontrastoptimierende Linearkombination der Farbkanäle ermittelt und damit das Grauwertbild erzeugt.

Der vorgestellte Algorithmus liefert aber noch weitere wichtige Informationen. Jede Farbwertkombination (R, G, B) kann einer der gefundenen Verteilungen zugeordnet werden, wobei nur zwischen Vordergrund-, Hintergrund- und Restclustern als Ganzes unterschieden

wird. Jedem Farbbild können also drei Maskenbilder (s. Abb. 2.8) zugeordnet werden, die schon eine grobe Partitionierung in Zellkern und Hintergrund ermöglichen.

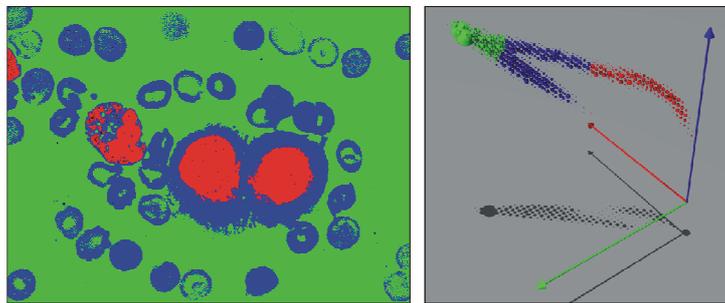


Abb. 2.8: Zuordnung der Pixel durch ihre RGB-Werte zu Vordergrund- (rot), Hintergrund- (grün) und Restcluster (blau). Dargestellt als Farbbild und im RGB-Histogramm.

Diese Masken spielen auch bei der pixelgenauen Koregistrierung eine wichtige Rolle.

Die Parameter der Transformation werden in der Datenbank gespeichert und mit ihnen die verschiedenen Färbungen soweit angeglichen, dass sie für die exakte Koregistrierung verglichen werden können (s. Abb. 2.9 und 2.10).

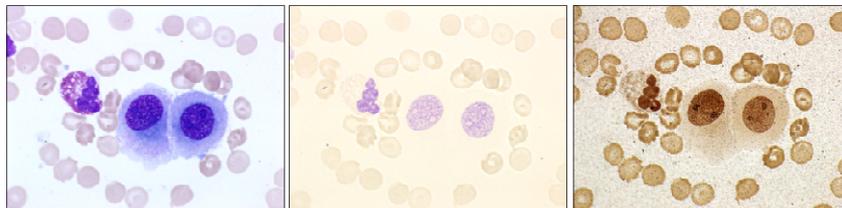


Abb. 2.9: Originalaufnahmen (MGG-, Feulgen- und Silbernitrat-Färbung von links nach rechts) vor der Transformation

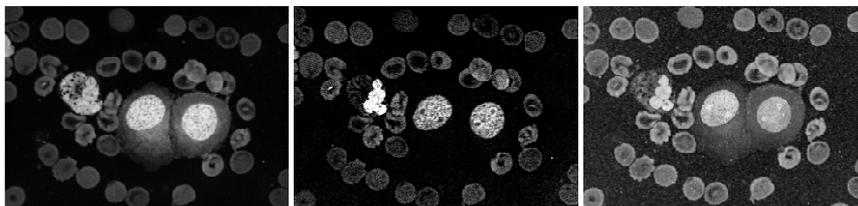


Abb. 2.10: Ergebnis der Transformation für Bilder in MGG-, Feulgen- und Silbernitrat-Färbung derselben Region.

2.1.8.2 Repositionierung und Koregistrierung

Identische Zellen in anderen Färbungen wieder aufzufinden ist eine der Hauptaufgaben während der Erfassung von multimodalen Zellaufnahmen.

Um eine multimodale Analyse praktisch einsetzen zu können, ist eine Automatisierung unverzichtbar. Hierbei nimmt die digitale Bildverarbeitung eine Schlüsselrolle ein. Denn an dieser Stelle übernimmt ein Optimierungsalgorithmus, der die Verschiebung in X- und Y-Richtung korrigiert, die Steuerung des Mikroskops. Der Ablauf ist schematisch in Abb. 2.11 dargestellt.

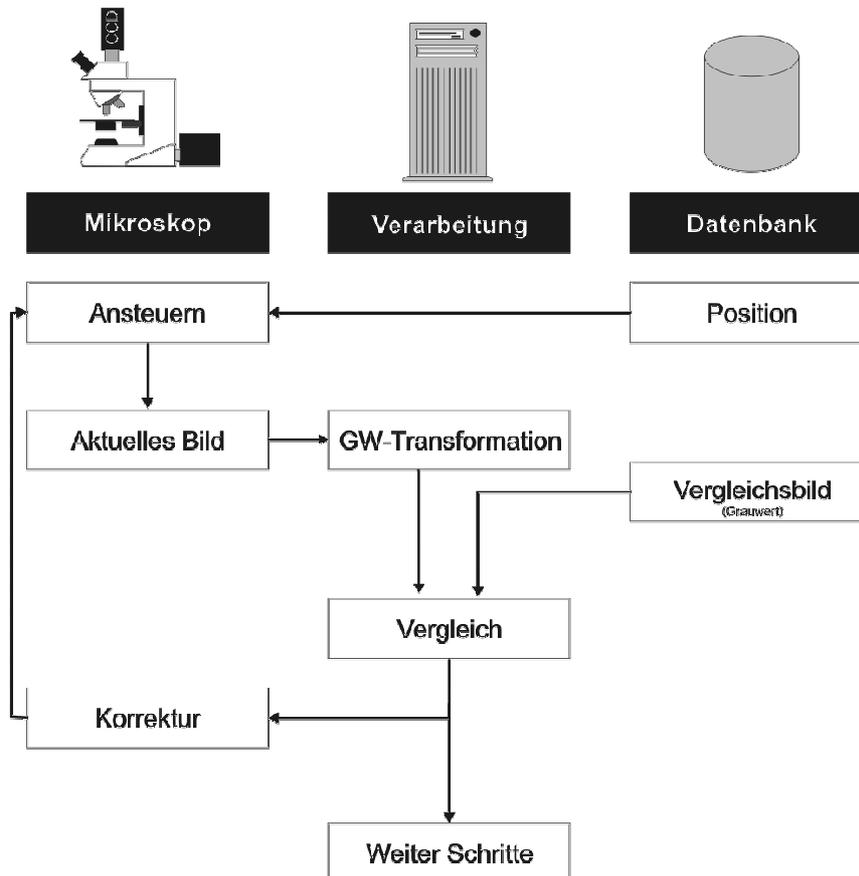


Abb. 2.11: Ablaufschema der Repositionierung

Erhält das System den Auftrag, eine schon in einer früheren Färbung aufgenommene Position anzufahren, werden die in der Datenbank gespeicherten Koordinaten an das Mikroskop weitergegeben und der Tisch des Mikroskops bewegt sich dort hin. Auf Grund von Ungenauigkeiten, die durch die Mechanik des Tisches oder das Einlegen des Objektträgers in die Halterung entstehen, kann die exakte Position nicht mit der benötigten Genauigkeit angesteuert werden.

Im Datenbestand befindet sich die Aufnahme der gesuchten Zellen aus der vorangegangenen Färbung. Mit Hilfe dieser Information wird die Position des Mikroskoptisches noch weiter verfeinert. Hierzu werden das aktuelle Bild der CCD-Kamera und das Bild aus der vorhergehenden Färbung verglichen. Die zwei Farbbilder werden mit dem aus

Abschnitt 2.1.8.1 beschriebenen Verfahren in Grauwertbilder transformiert und mit einem Optimierungsverfahren übereinander gelegt.

Diese Korrektur wird an die Steuerung des Mikroskops weitergegeben und somit die Positionierung verbessert. Auch bei der Korrekturbewegung des Tisches spielt die mechanische Ungenauigkeit eine Rolle. Aus diesem Grund wird das Verfahren mehrfach angewandt. Wird die nötige Verschiebung kleiner als eine einzustellende Schwelle, dann wird die Korrektur der Positionierung beendet.

Durch mehrere Durchläufe dieser Regelschleife kann erreicht werden, dass die Korrektur in der Größenordnung der Ausdehnung eines Pixels liegt. Bei der hier benutzten Kombination aus CCD-Kamera und 63x-Objektiv liegt die Pixelgröße bei ca. 0,1 μm .

Durch diese „optische“ Rückkopplung ist es somit möglich, mit einem mechanisch relativ ungenauen Mikroskoptisch sub- μm -Genauigkeit in der Positionierung zu erreichen.

Zwar sind die Positionsfehler beim Anfahren der Probe zum Wiederauffinden der zuvor gespeicherten Positionen durch eine Korrektur in X- bzw. Y-Richtung korrigiert worden, jedoch erschwert eine weitere Eigenschaft des mechanischen Aufbaus des Mikroskops die endgültige Lagekorrektur: Die Fixierung der CCD-Kamera auf dem mittleren Tubus des Mikroskops ist drehbar und besitzt keinen Anschlag für die Nullposition, d. h. die Rotation der Kamera kann zwischen den einzelnen Aufnahmesequenzen leicht variieren, auch wenn sie bei jeder Neumontage durch eine Testprobe in ihrer Position kalibriert wird. Die Rotationsabweichungen können bis zu einem Grad betragen. Aus diesem Grund muss der Optimierungsalgorithmus für die endgültige Überlagerung der Bilder um den Rotationsfreiheitsgrad erweitert werden.

Der Schritt, die Aufnahmen der Zellen in den verschiedenen Färbungen pixelgenau zu überlagern, wird als Koregistrierung bezeichnet. Er ist nötig, um bei der folgenden Weiterverarbeitung mittels bildverarbeitender Methoden auf die Informationen aus allen Färbungen gleichzeitig zugreifen und Auswertungsergebnisse von einer Färbung auf eine andere projizieren zu können. Aus diesem Grund wird bei der Koregistrierung ein etwas größerer Rechenaufwand in Kauf genommen, um exakte Ergebnisse zu erzielen.

2.1.8.3 Segmentierung

In dieser Arbeit wurden zwei konkurrierende Wege eingeschlagen, um zu einer Segmentierung der Zellkerne zu gelangen: Eine vollautomatische Segmentierung mittels eines Regionenwachstumverfahrens auf Pixelbasis und eine interaktive Segmentierung auf Basis eines Wasserscheidenalgorithmus. Beide Ansätze arbeiten mit den aus der adaptiven Grauwerttransformation hervorgegangenen Informationen und setzen auf den Grauwertbildern auf.

Regionenwachstum:

Die Parametrisierung dieses Algorithmus erfolgt durch zwei Werte. Wenn der Grauwert eines Pixels über einem Schwellwert liegt, wird dieses Pixel als ein Startpunkt des Algorithmus betrachtet.

Anschließend werden alle Nachbapixel dieses Startpixels geprüft und dem Selektionsbild hinzugefügt, wenn die Abweichung ihres Grauwerts zu dem des Startpixels innerhalb eines gewissen Toleranzbereiches liegt. Dieser Vorgang wird rekursiv wiederholt, bis keine neuen Pixel hinzukommen. Die Höhe des Schwellwerts und der Prozentsatz an Grauwertvariation legen dabei die gesamte Parametrierung des Algorithmus fest. Mittels morphologischer Operationen (Löcher füllen, Randobjekte und zu kleine Objekte entfernen, Konturen glätten) wird das (binäre) Ergebnisbild anschließend „gesäubert“. Beschreibungen dieser Konturen werden in der Datenbank abgelegt und stehen anschließend zur Verfügung.

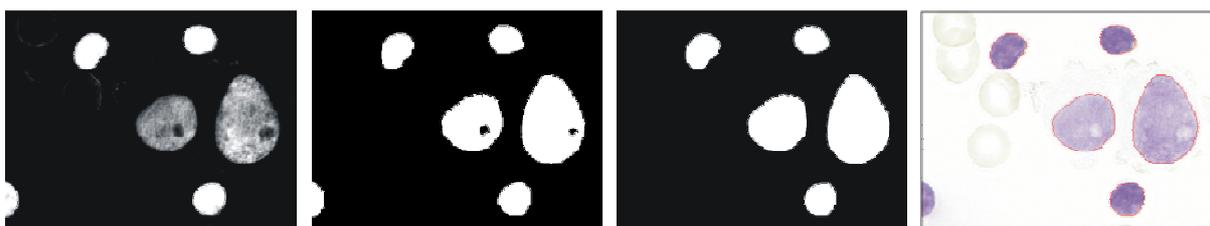


Abb. 2.12: Die einzelnen Schritte des Regionenwachstums (von links nach rechts): Ausgangsbild, gefundene Regionen, nach morphologischer Glättung und Füllung der Löcher, endgültige Kontur im originalen Farbbild

Wasserscheidenalgorithmus:

Bei der anschließenden Klassifikation der Zellen wird vom Benutzer auch die Qualität der Segmentierung überprüft. Ist sie nicht korrekt oder zu ungenau, wird als interaktives Segmentierungsverfahren der Wasserscheidenalgorithmus gestartet.

Im Einzelnen werden folgende Verarbeitungsschritte durchgeführt: Das Ergebnis eines Gradientenoperators (z. B. der Sobel-Operator) interpretiert der Wasserscheidenalgorithmus als „Gebirgslandschaft“, in der ein Wasserspiegel ansteigt und so „Seen“ wachsen. Dadurch werden Wasserscheiden identifiziert (s. Abb. 2.13), die das Bild in – zunächst sehr viele – Regionen unterteilen. Dem kann schon durch einfache Glättungsoperatoren und eine Mindestgröße der Bassins begegnet werden (vgl. Abb. 2.14 mit 2.15). Zusätzlich werden alle aus der Clusteranalyse hervorgegangenen Vordergrundbereiche als einzelne Regionen gesetzt (s. Abb. 2.16).

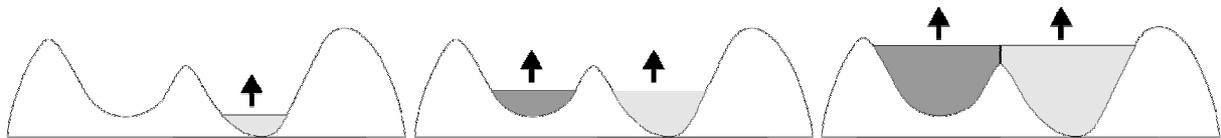
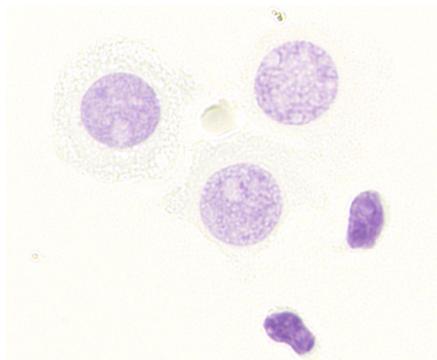
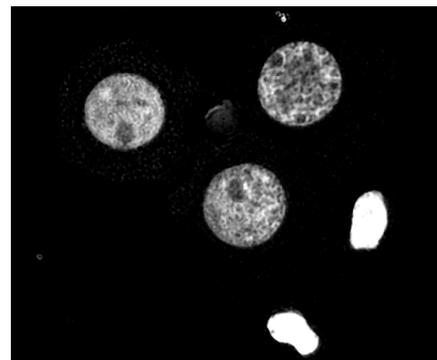


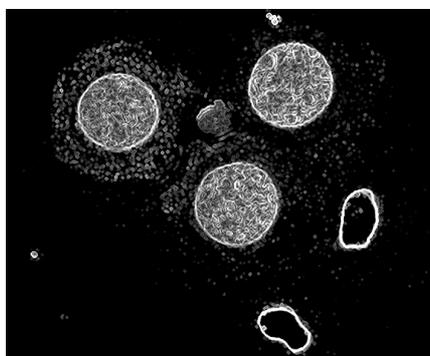
Abb. 2.13: Wasserscheidenalgorithmus (von links nach rechts): Entstehung des ersten „Sees“ in einem Minimum, Entstehung des zweiten „Sees“ in einem höher gelegenen Minimum, Errichten eines „Damms“ zur Trennung der beiden „Seen“. Die „Seen“ außerhalb des Gebirges sind nicht dargestellt.



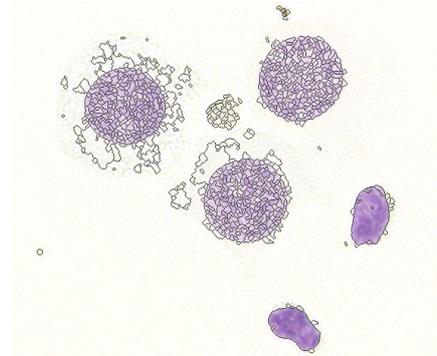
(a) Original



(b) Grauwert



(c) Gradient

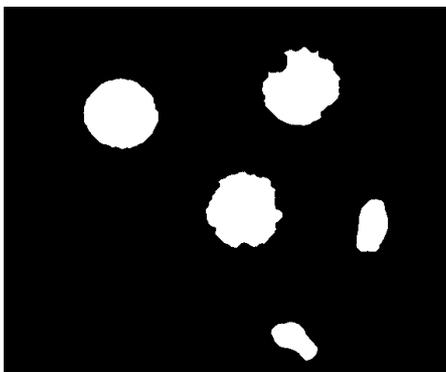


(d) Ergebnis

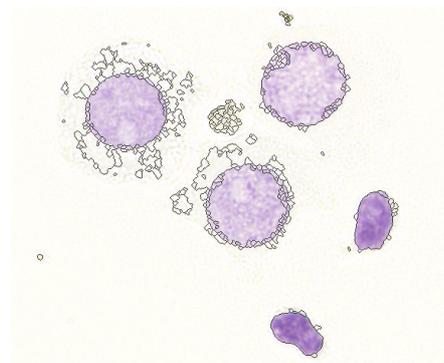
Abb. 2.14: Anwendung des Wasserscheidenalgorithmus

Die Aufgabe des Benutzers besteht nunmehr im Hinzufügen oder Löschen der einzelnen Regionen, um das Gebiet innerhalb eines Zellkerns zu selektieren. Auch hier zeigt sich, dass eine geschickte Kombination aus durch den Computer vorausberechneten Werten, hier die Regionen, und Benutzerinteraktionen den Arbeitsablauf schneller und sicherer macht. Der gleiche Konturfundungsalgorithmus wie beim Regionenwachstum wandelt die Objekte aus dieser Selektion dann in eine Konturbeschreibung um, die ebenfalls in der Datenbank abgelegt wird.

Nach pixelgenauer Koregistrierung können nun die Segmentierungen der Zellkerne auch auf die anderen Färbungen projiziert werden. Bereits in diesem Stadium bietet sich eine völlig neue Sicht auf die Zellen, da sie nun, je nachdem, welche Eigenschaften der Zelle interessieren, wahlweise in einer der vorliegenden Färbungen betrachtet werden können.

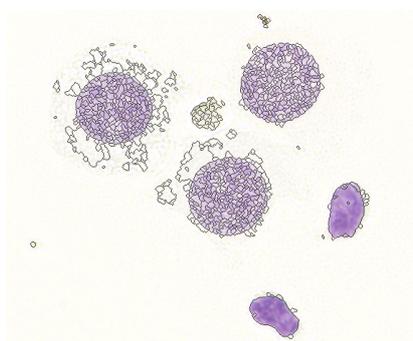


(a) Vordergrundpixel

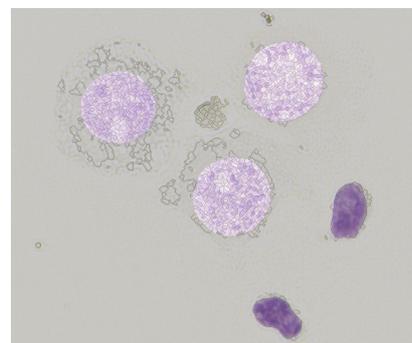


(b) Ergebnis

Abb. 2.15: Reduzierung der Anzahl der Regionen durch Einbeziehung von Zusatzinformationen



(a) Wasserscheide



(b) Selektierte Regionen (hell)

Abb. 2.16: Auswahl von Regionen

2.1.8.4 Klassifikation

Die zunächst noch manuelle Klassifikation verschiedener Zelltypen für die nachfolgenden Auswertungen wird mittels einer einfach zu bedienenden Benutzeroberfläche durchgeführt. Das System zeigt dem Benutzer die Aufnahmen mit den aus der Segmentierung gewonnenen Kernkonturen (s. Abb. 2.17). Jeder Kontur kann ein Zelltyp aus einer vorgegebenen Liste zugeordnet werden, wonach sie mit einem grünen Kreis markiert werden. Zusätzlich kann die Zelle als Mess- oder Referenzzelle für die DNA-Auswertung gewählt werden. Hierbei ist es möglich, die Zellen jederzeit auch in den anderen Färbungen zu betrachten.

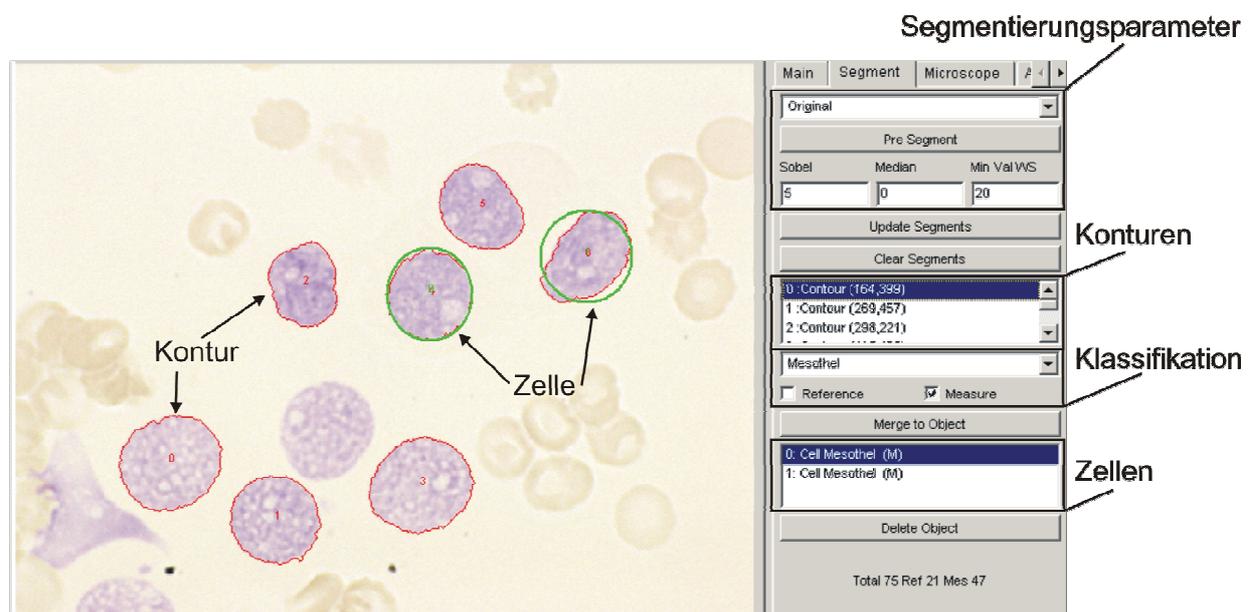


Abb. 2.17: Benutzerschnittstelle für die manuelle Klassifikation der Zellen

2.1.8.5 Auswertung der DNA-Zytometrie

Nachdem nun die Zellen als einzelne klassifizierte Objekte mit ihren Konturen vorliegen, müssen noch die für die Diagnose relevanten Daten extrahiert werden. Eine der aussagekräftigsten adjuvanten Methoden der Zytopathologie ist die DNA-Analyse.

Die primäre Messgröße ist hierbei die integrale optische Dichte (IOD) einer Zelle. Durch die Messung von Referenzzellen wird mit Hilfe ihres mittleren IOD-Wertes der DNA-Gehalt ruhender normaler Zellen von $2c$ festgelegt ($c = \text{content}$). Aus der Messung von 30 Referenzzellen in jedem Präparat ergibt sich der euploide $2c$ -Wert als interner Referenzwert (Mittelwert der integrierten optischen Dichte IOD). Zur Qualitätssicherung muss der Variationskoeffizient (CV) einer Referenzzellpopulation kleiner als 5 % sein (Böcking et al. 1995b, Haroske et al. 1998).

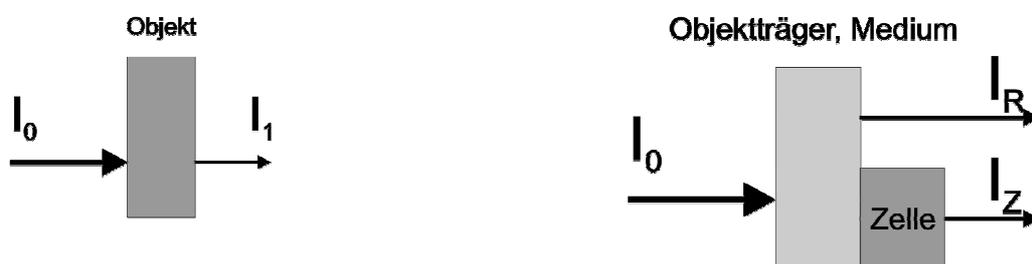
Zunächst werden hier die technischen Aspekte, die die DNA-Messung ermöglichen, dargestellt:

Berechnung der optischen Dichte

Die optische Dichte OD eines durchleuchteten Objektes ist wie folgt definiert:

$$OD = -\log_{10}(T) \quad (2.1)$$

mit dem Transmissionskoeffizienten $T = I_1 / I_0$, wobei I_0 die Lichtintensität vor dem Objekt und I_1 die Intensität hinter dem Objekt ist (s. Abb. 2.18(a)).



- (a) Die Intensität I_0 des einfallenden Strahls wird zur Intensität I_1 gedämpft
- (b) Während die Intensität I_R des Referenzstrahls nur von der optischen Dichte des Objektträgers und des Mediums der Probe abhängt, beeinflusst die Dichte der Zelle den Strahl mit der Intensität I_Z noch zusätzlich

Abb. 2.18: Zur Definition der optischen Dichte

Die Messung der OD von Zellen unter dem Mikroskop ist etwas komplizierter, da weder die Eingangsintensität I_0 noch die OD des Objektträgers und des die Zelle umgebenden Mediums bekannt sind. Durch eine Referenzmessung der OD in der nahen Umgebung der zu vermessenden Zelle können diese Einflüsse kompensiert werden.

Es ergibt sich nach Abb. 2.18 (b):

$$T_{\text{ges}} = I_Z / I_0; T_R = I_R / I_0; T_Z = I_Z / I_R$$

$$\Rightarrow T_Z = T_{\text{ges}} / T_R = (I_Z / I_0) / (I_R / I_0) = I_Z / I_R$$

Hieraus kann dann die IOD der Zelle

$$IOD = \sum_i -\log_{10}(I_i / I_R) \quad (2.2)$$

mit den Intensitäten der Pixel innerhalb der Zelle I_i und dem Mittelwert der Referenzintensität I_R außerhalb der Zelle bestimmt werden.

Gemäß des Absorptionsmaximums des Feulgen-Farbstoffes werden die IOD-Werte aus einer Linearkombination des Grün- und des Rotkanales im Verhältnis 7:3 berechnet. Die Intensitäten ergeben sich aus den Grauwerten der betrachteten Pixel. Weitere Einflüsse müssen jedoch noch beachtet werden, um die Messung der IOD korrekt durchzuführen.

Streulicht

Gleichung 2.2 geht von parallelen Lichtstrahlen aus. In Realität werden Lichtstrahlen aber abseits der zu vermessenden Zelle in der Probe gestreut, so dass die Intensität hinter der Zelle höher ist, als sie auf Grund der Dichte sein dürfte (s. Abb. 2.19(a)). Um dies zu korrigieren, muss der prozentuale Anteil des Streulichtes bei der Messung ermittelt werden (Kindermann und Hilgers 1994).

Hierzu werden am besten Objekte vermessen, die vollständig opaque sind, also einen Transmissionskoeffizienten von Null haben. Es bieten sich kleine Stücke Aktivkohle an, die auf die gleiche Art verarbeitet und fixiert sind wie die Zellen. Aus den Messungen ergibt sich dann eine von Null abweichende Transmission. Da in diesem Fall die korrekte Transmission Null wäre, ist dieser „falsche“ Transmissionswert gleichzeitig die Korrektur der gemessenen Transmission, und die optische Dichte ergibt sich dann zu:

$$OD = -\log_{10} \left(\frac{I_{\text{gemessen}} - I_{\text{streu}}}{I_{\text{Referenz}} - I_{\text{streu}}} \right) \quad (2.3)$$

Beugung

Die betrachteten Objekte sind so klein, dass in dieser Größenordnung bereits Beugungseffekte eine Rolle spielen. An der Kante des Zellkerns wird das zum größten Teil parallel verlaufende Licht in Richtung des Kerns gebeugt (s. Abb. 2.19(b)).

Somit erscheint der Rand der Zelle heller als er sich eigentlich abbilden sollte. Um diesen Effekt zu kompensieren, werden in der Randregion nicht die Werte der einzelnen Pixel für die Berechnung der IOD herangezogen, sondern sie werden auf den mittleren Wert aus dem Inneren der Zelle gesetzt.



- (a) Streuung der Lichtstrahlen in der gesamten Probe (b) Beugung der Lichtstrahlen am Rand der optisch dichteren Zellen

Abb. 2.19: Störeffekte bei der Berechnung der optischen Dichte der Zellen

Der Zellkern wird für die Bestimmung der IOD in drei Regionen eingeteilt (s. Abb. 2.20): Ein äußerer Rahmen für die Bestimmung der Referenzintensität I_R , der innere Rand für die Korrektur der Beugung und schließlich der innere Rest des Zellkerns für die Berechnung der IOD.

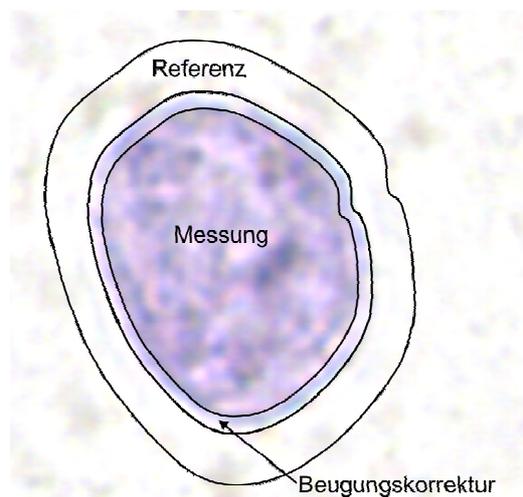


Abb. 2.20: Einteilung der Zellen in verschiedene Regionen für die Bestimmung der IOD

Für die Beurteilung der Messung ist auch die Fläche A der Zellen von Bedeutung. Die Fläche der Zellen in Abhängigkeit der IOD aufgetragen gibt Aufschluss über eine erfolgreiche Korrektur der Beugung. Je kleiner die Objekte sind, desto größer ist der Einfluss der Beugung auf das Ergebnis der IOD. Bei nicht korrigierten Aufnahmen verschiebt sich die IOD von Zellen mit kleiner Ausdehnung zu kleineren Werten hin, was an einer Krümmung des unteren Astes zu erkennen ist. Wird die Beugung durch das beschriebene Verfahren korrigiert, verschwindet dieser Effekt.

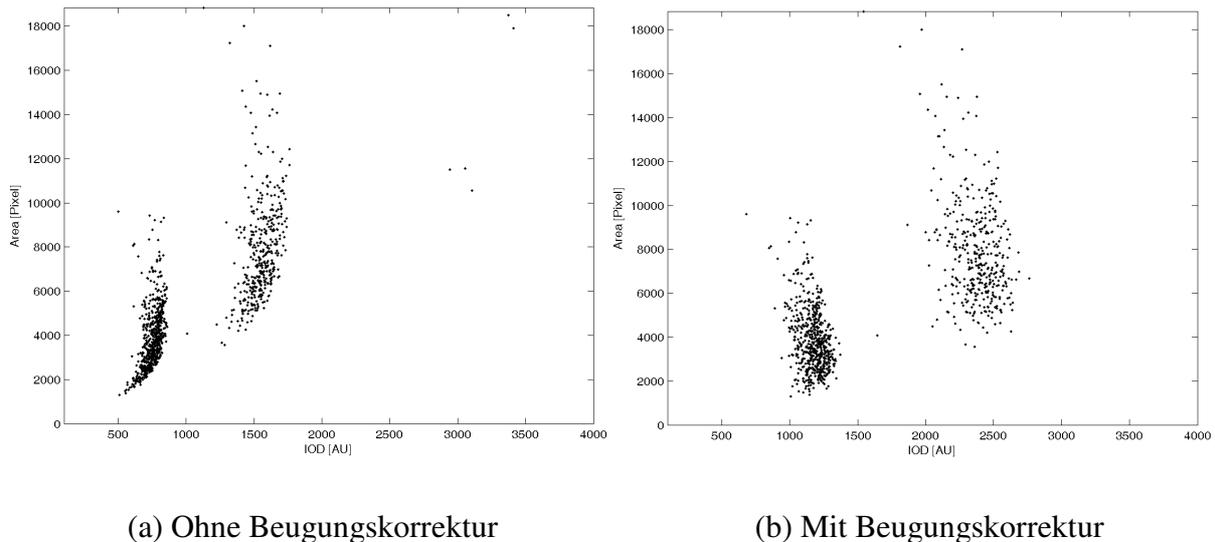


Abb. 2.21: Beugungskorrektur einer IOD-Messung

DNA-Messung

Nachdem all diese störenden Effekte eliminiert bzw. kompensiert wurden, kann nun die integrierte optische Dichte der einzelnen Zellkerne angegeben und somit nach interner Kalibrierung mit Zellen bekannten DNA-Gehalts die DNA-Verteilung in der untersuchten Zellpopulation errechnet werden. Diese wird in einem DNA-Histogramm dargestellt. Dieses offenbart die Häufigkeitsverteilung der integrierten optischen Dichte der spezifisch mit DNA-Farbstoffen (Feulgen-Färbung) gefärbten Zellkerne in der Einheit c ($1c$ entspricht der DNA-Menge eines einfachen Chromosomensatzes). Pro Präparat wurden, wenn möglich, 300 Analysezellen und 30 Referenzzellen gemessen. Nekrotische, autolytische oder übereinander liegende Zellen wurden nicht gemessen.

Bei der Auswertung der Histogramme wird der Bereich der zu beurteilenden DNA-Stammlinie interaktiv am Monitor durch den Untersucher festgelegt. Die Berechnung des Modalwertes, der den häufigsten Wert (Gipfel) eines DNA-Histogramms darstellt, erfolgt bei der Berechnung des DNA-Histogramms. Diese geschieht in einem separaten Rechenprozess nach Erstellen der Bildergalerie in der Feulgen-Färbung mit der darauf folgenden Segmentierung und Klassifikation der Zellen durch den Benutzer. Letzteres dient gleichzeitig der Qualitätskontrolle, da die Messzellen und Referenzzellen anhand der Bilder erst jetzt endgültig klassifiziert und in die Messung aufgenommen oder verworfen werden. Dabei können zu jeder Zelle die jeweils entsprechenden Bilder in der Papanicolaou- oder May-Grünwald-Giemsa-Färbung betrachtet werden. Es werden die zu messenden Zellkerne hierbei direkt überprüft, sowie Artefakte aus der Messung ausgeschlossen (Müller et al. 1994).

Anschließend werden die DNA-Histogramme und weitere DNA-zytometrische Daten ausgedruckt.

Die Benutzerschnittstelle des Systems erstellt für die Beurteilung der Ergebnisse durch den Pathologen eine übersichtliche Darstellung (s. Abb. 2.22).

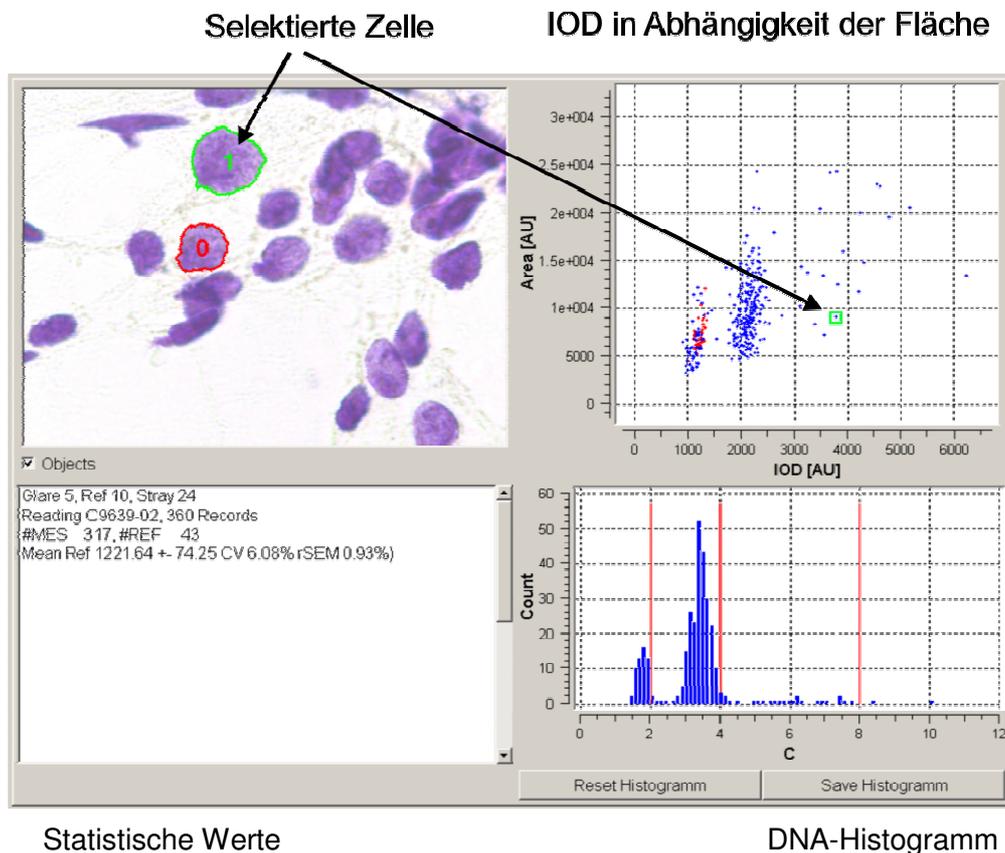


Abb. 2.22: Benutzeroberfläche für die DNA-Analyse

Rechts unten ist die Darstellung des DNA-Histogramms zu sehen. Zur Orientierung sind rote Markierungen an den Stellen 2c, 4c und 8c angebracht. Um ggf. Fehler in der Beugungskorrektur zu erkennen, sind nochmals in einem weiteren Diagramm die Flächenmaße aller Zellen über ihrem IOD eingezeichnet. Die Werte der Messzellen sind blau und die der Referenzzellen rot dargestellt. Der Benutzer kann in dieser Darstellung einzelne Zellen selektieren, die dann links daneben auf dem Originalbild eingezeichnet werden.

Selbstverständlich können dann auch die Bilder dieser Zellen in allen bereits aufgenommenen Färbungen betrachtet werden.

2.1.8.6 Nukleolus organisierende Regionen

Da es sich bei der Silbernitrat-Färbung um eine Ausfallreaktion und nicht um eine Reaktion mit definierten Bindungspartnern handelt, unterliegt diese Färbung starken Schwankungen, abhängig von der Probe und den Eigenschaften des Färbebad. Die zu Clustern zusammengelagerten NORs sind in den meisten Fällen nicht einzeln aufzulösen, so dass die mittlere Anzahl von Clustern und Satelliten als diagnostisches Maß gelten.

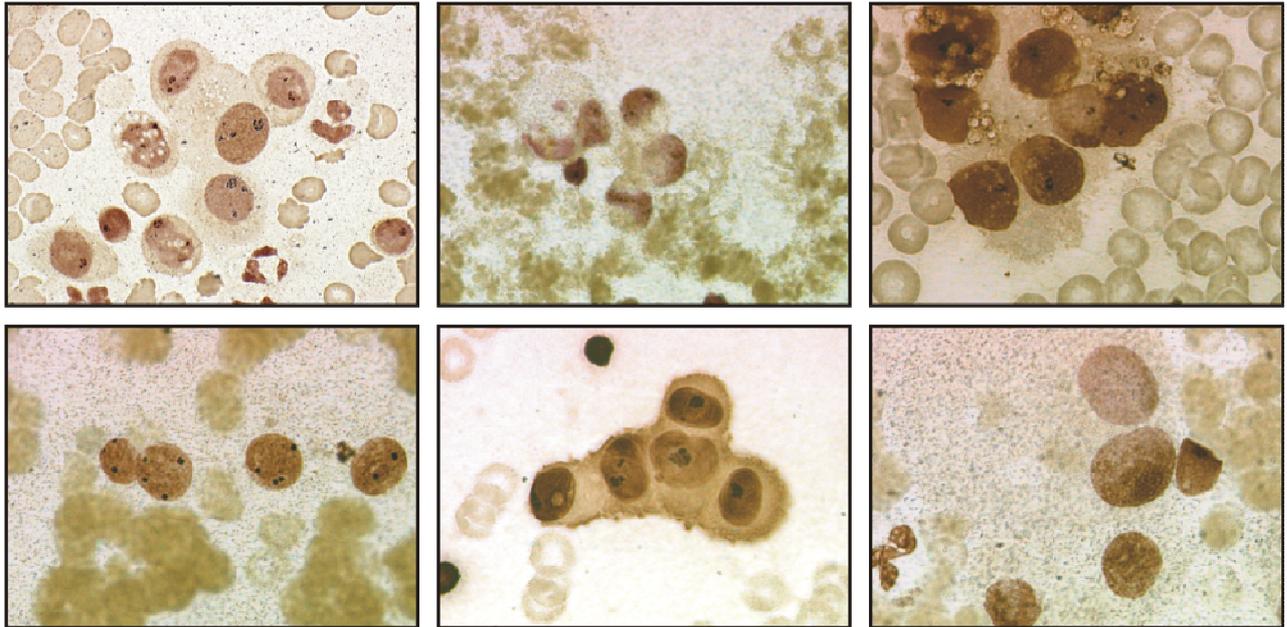


Abb. 2.23: Aufnahmen in der Silbernitrat-Färbung in unterschiedlicher Qualität

Die Erfassung dieser Werte ist wegen der stark variierenden Färberegebnisse und des geringen Kontrastes zwischen Zellkern und NORs schwer zu automatisieren (s. Abb. 2.23). Jedoch ist es durch eine geschickte Gestaltung der Benutzeroberfläche möglich, dem Anwender genügend Hilfestellung zu geben, um die Auswertung eines Silber-Präparats in einer für die Routineanwendung akzeptablen Zeitspanne durchführbar zu machen.

Zusätzlich zur Bedienung des Mikroskops muss nur noch die Anzahl der Cluster und Satelliten manuell in das System eingegeben werden.

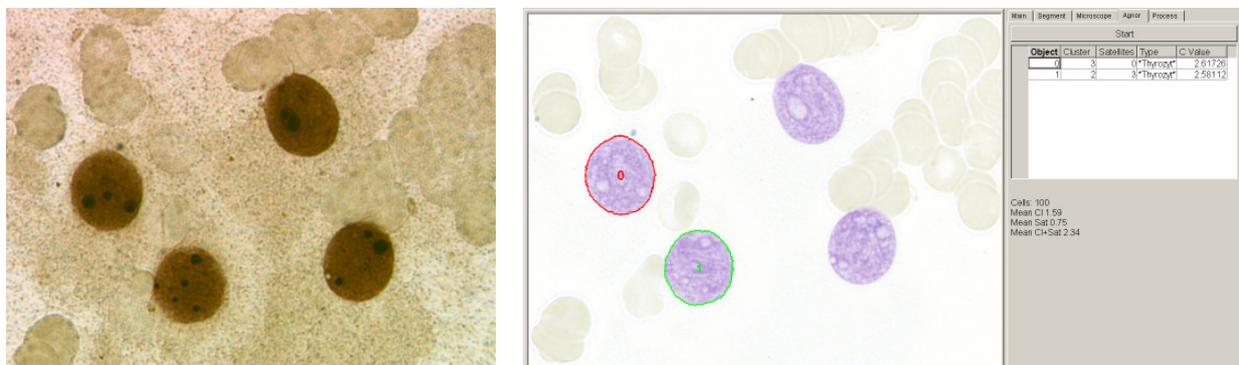
Da das Prinzip der Multimodalen Zellanalyse auf der Auswertung identischer Zellen in verschiedenen Färbungen beruht, wurden in der Silbernitrat-Färbung auch nur Zellen ausgewertet, die bereits in vorherigen Färbungen betrachtet worden sind. Insbesondere werden Zellen untersucht, bei denen nach einer erfolgreichen Segmentierung und Klassifikation ein Ergebnis der DNA-Analyse vorliegt.

Das System erfasst für diese Zellen zusätzlich die Anzahl der Cluster und Satelliten und berechnet daraus die mittleren Anzahlen pro Zelle.

Dem Benutzer wird bereits bei der Aufnahme der Bilder in der Silbernitrat-Färbung die Möglichkeit gegeben, die Messwerte in die Datenbank einzutragen. Auf dem Bildschirm mit der Benutzeroberfläche wird das aktuelle Bild in der Feulgen-Färbung mit den Konturen der auszuwertenden Zellkerne dargestellt.

Die Werte für die Anzahl der Cluster und Satelliten werden dann in eine Tabelle eingetragen, in der auch Daten der vorhergehenden Färbungen dargestellt werden (s. Abb. 2.24 (b)).

Sowohl der Zelltyp als auch der errechnete DNA-Gehalt werden angezeigt.



(a) Videobild des Mikroskops auf dem linken Bildschirm (b) GUI der Anwendung auf dem rechten Bildschirm

Abb. 2.24: Benutzerschnittstelle für die Eingabe der Messwerte aus der Silbernitrat-Färbung

Das Ergebnis dieser Auswertung besteht dann nicht nur wie bei der ursprünglichen Auswertungsmethode aus den Mittelwerten von Clustern und Satelliten pro Zellkern, sondern jeder Zelle wird ein diagnostisch relevanter Wert zugeordnet. Hierdurch sind Korrelationen, z. B. zwischen dem DNA-Gehalt und der Anzahl von AgNORs, in Bezug auf individuelle Kerne möglich.

Nicht nur die Verbindung der einzelnen Ergebnisse der adjuvanten Methoden ergänzt sich durch die Anwendung der Multimodalen Zellanalyse. Auch die Ansichten der Zellen in den verschiedenen Färbungen tragen entscheidend dazu bei, Fehler bei der Auswertung zu unterbinden.

Der Mehrwert der Multimodalen Zellanalyse gegenüber der klassischen Auswertung einzelner Färbungen zeigt das enorme Potenzial der neuen Methode. Durch diese Umsetzung in ein

funktionierendes System sind viele Vorteile demonstriert worden. Mit Hilfe dieses Labormusters ist es möglich, ohne großen Aufwand zytopathologische Proben multimodal auszuwerten.

2.2 Material: Patientengut

Gegenstand dieser Studie waren 30 Präparate, die der Routinediagnostik des Institutes der Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf entnommen wurden. Sie stammten von 28 Patienten, die im Zeitraum von Dezember 2001 bis Dezember 2002 zytologisch diagnostiziert wurden.

10 Präparate kamen aus der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Becker), während die restlichen 20 Präparate aus Einsendungen der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Leipzig (Univ. Prof. Dr. Dr. med. A. Hemprich sowie Dr. med. T. Remmerbach) hervorgingen.

Sieben Präparate kamen von Frauen mit einem Durchschnittsalter von 66,6 Jahren (43,4 - 82,9 Jahre; SD: $\pm 11,7$ Jahre), 23 Präparate entstammten von Männern mit einem Durchschnittsalter von 62,7 Jahren (40,1 – 83,7 Jahre; SD: $\pm 10,8$ Jahre).

Die zytologischen Diagnosen setzten sich wie folgt zusammen:

- zehn Tumorzell-negative Präparate
- acht zweifelhafte Präparate (davon vier: dringender Verdacht und vier: ohne sicheren Nachweis von Tumorzellen)
- zwölf Tumorzell-positive Präparate

Die Befundung geschah standardisiert nach einer von der Deutschen Gesellschaften für Pathologie und für Zytologie erarbeiteten Nomenklatur für extragenitale Zytologie (Böcking und Freudenberg, 1998).

Für 29 Fälle ist ein klinisches oder histologisches Follow-up nach Beendigung des Messvorgangs eingeholt worden. Bei einem Fall war ein Follow-up nicht zu ermitteln.

2.2.1 Gewinnung der Präparate

Unter den 30 Präparaten gab es 22 konventionelle Bürstenabstrich-Präparate und acht sog. Monolayer-Präparate. Beiden gemein war der Vorgang des zytologischen Abstrichs, bei dem zur Gewinnung der Zellen an der verdächtigen oder pathologischen Läsion der Mundschleimhaut eine Bürste (Cytobrush GT, Med-Scand Medical, Malmo Schweden) aufgesetzt und unter leichtem Druck mehrmals rotiert wurde (siehe Abb. 2.25).

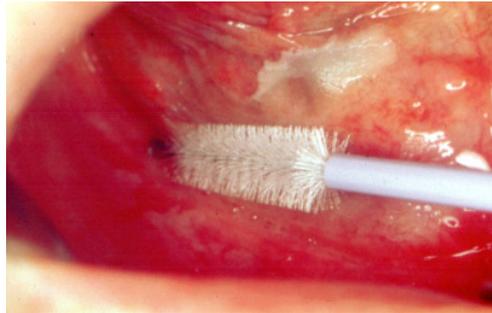


Abb. 2.25: Durchführung des Bürstenabstrichs

Zur Herstellung der konventionellen Abstrich-Präparate wurde das Zellmaterial durch sofortiges, mehrmaliges Abrollen des Bürstchens auf den Objektträger übertragen. Direkt darauf erfolgte die alkoholische Fixation mit Hilfe eines Propanol und Carbowachs enthaltenden Fixationssprays (Merckofix, Fa. Merck, Darmstadt), wie in Abb. 2.26 dargestellt. Die alkoholisch fixierten Präparate konnten so später routinemäßig nach Papanicolaou gefärbt werden.

Bei der Anfertigung der Monolayer-Präparate wurde nicht das gesamte Probenmaterial, das sich nach Abstrich auf der Bürste befand, zur Präparateherstellung verwendet. Erst nach Erstellen eines konventionellen Ausstriches wurde von den restlichen an der Bürste haftenden Zellen ein Monolayer-Präparat erzeugt. Dazu wurde das Bürsten-Köpfchen in eine alkoholische Fixationsflüssigkeit (SurePath, Burlington, N.C., USA) überführt und an das Institut für Pathologie (Dr. med. Neumann) in Nordhorn versendet. Mit Hilfe des etablierten Automaten PrepStain (Motherby et al. 1999; Geyer et al. 1993) entstanden die Monolayer-Präparate. Die konventionelle Papanicolaou-Färbung erfolgte im selben Automaten.

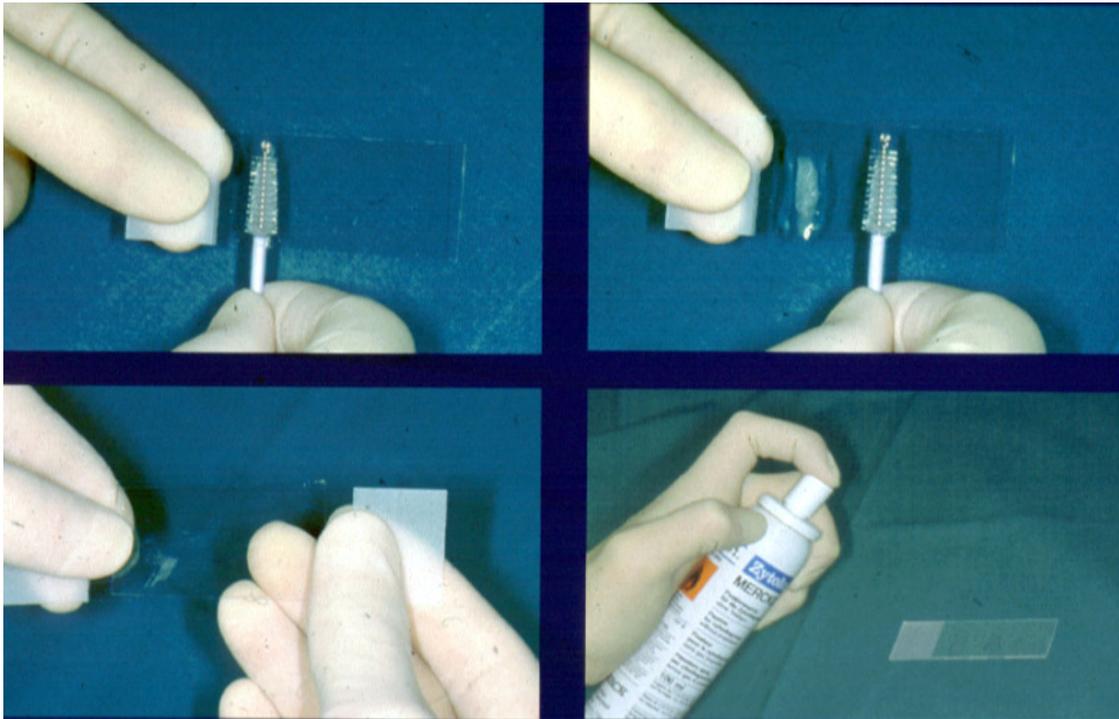


Abb. 2.26: Erstellen eines Bürstenabstrich-Präparats

2.2.2 Zytologische Diagnostik

Die nach Papanicolaou gefärbten Mundschleimhaut-Präparate erhielten zytologische Diagnosen der folgenden Kategorien (Böcking et al. 1998b):

- Tumorzell-negativ: bösartige Zellen nicht nachweisbar (für unauffällige, reaktive oder entzündliche Zellbilder)
- zweifelhaft: bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen (bei abnormen Zellveränderungen, z. B. leichte oder mittlere Dysplasien)
- dringender Verdacht: bösartige Zellen wahrscheinlich (bei nur wenigen atypischen Zellen oder nicht sicheren Malignitätskriterien atypischer Zellen, z. B. schwere Dysplasien)
- Tumorzell-positiv: bösartige Zellen nachweisbar (bei Vorliegen eindeutig maligner Zellen)

Die Kategorien „zweifelhaft“ und „dringender Verdacht“ wurden in dieser Arbeit unter der Bezeichnung „zweifelhaft“ zusammengefasst.

Für die Erkennung von Tumorzellen kamen folgende Diagnosekriterien zur Anwendung:

- Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zu Gunsten des Kerns
- Anisonukleose
- Kernpleomorphie, Kernüberlappungen
- Kernhyperchromasie
- Mitosereichtum
- Vergrößerung der Chromatinstruktur
- Irreguläre Chromatinverteilung
- Irreguläre Kernmembran
- Starke Variation im Reifegrad der Zellen

Ein erfahrener Zytopathologe, Herr Univ.-Prof. Dr. med. Alfred Böcking, hat sämtliche Präparate einer erneuten Begutachtung unterzogen und alle relevanten Areale auf dem Objektträger mit Hilfe eines Filzschreibers markiert. Anschließend wurden die Objektträger fotokopiert, um nach Umfärben der Präparate die relevanten Bereiche erneut nachvollziehen zu können und die Markierungen nochmals aufzutragen.

2.2.3 Versuchsablauf und Färbungen

In den eingezeichneten Bezirken der Präparate wurde sodann am Cytometer die erste digitale Bildaufnahme unternommen. Dabei wurde für jedes Präparat eine Bildergalerie von durchschnittlich 266 Bildern in der Papanicolaou-Färbung erstellt. Diese Bilder wurden auf eine CD-ROM gebrannt und Herrn Dr. med. Vu Quoc Huy Nguyen am Institut für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe dieser Bilder und den Fotokopien der Objektträger war es ihm möglich – nach Umfärbung der Präparate in die Feulgen-Färbung – eine konventionelle DNA-Zytometrie an annähernd denselben Zellen durchzuführen. Er verwendete dazu das AutoCyte QUIC-DNA-System (AutoCyte, Burlington, N.C., USA) in Kombination mit einem konventionellen Lichtmikroskop (Böcking et al. 1994; Müller et al. 1994). Alle technischen Komponenten sowie die verwendete Software entsprachen den Anforderungen der ESACP Consensus Reports (Böcking et al. 1995b; Haroske et al. 1998; Giroud et al. 1998; Haroske et al. 2001).

2.2.3.1 Feulgen-Färbung

Für die DNA-Messung ist eine quantitative Färbung der Zellkern-DNA nach R. Feulgen und H. Rossenbeck (Feulgen und Rossenbeck 1924) obligat (Böcking 1998a). Dazu wurden die nach Papanicolaou vorgefärbten Präparate in Xylol gestellt, um die Deckgläser zu entfernen.

Die Feulgen-Färbung wurde in der automatischen Färbemaschine „Varistain 24-4“ (Shandon, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) vollzogen (Chatélain et al. 1989b).

Die Zellkern-DNA wird durch die Feulgen-Färbung spezifisch dargestellt, was die Voraussetzung für eine quantitative DNA-Analyse durch die statische DNA-Zytometrie bildet. Die Färbung besteht im Wesentlichen aus zwei Schritten. **Zum einen** führt die saure Hydrolyse (5N HCl bei 27°C für 60 Minuten) zum Absplitten der Purin-Basen von der Doppelstrang-DNA, so dass an deren Stelle die Aldehydgruppen frei werden. Die vorhergehende Fixierung der Präparate mit Formalin führt zur Stabilisierung der DNA gegenüber der Salzsäure.

Zum anderen werden anschließend die Aldehydgruppen durch Schiff'sches Reagens (Merck, Darmstadt, Germany, No. 1.09033.0500), eine fuchsin-schweflige Säure, durch Reaktion zu einem rot-violetten Farbstoff farbig markiert. Dieses geschieht bei Raumtemperatur und dauert ebenfalls 60 Minuten.

Nach der Färbung mit Schiff'schem Reagens werden die Präparate mit SO₂-Wasser gespült und in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen dehydriert. Ferner werden die Objektträger mit Entellan (Merck, Darmstadt, Germany, No. 1.07961.0500) eingedeckelt. Diese müssen in der Zeit danach zum Schutz vor Ausbleichen unter Lichtausschluss aufbewahrt werden. Eine Rückfärbung der Präparate nach Papanicolaou ist nach durchgeführter Feulgen-Färbung ohne wesentliche Qualitätseinbuße möglich.

Schema für die automatische Feulgen-Färbung:

| Substanz | Zeit und Temperatur |
|---------------------------|--|
| Xylol | 15 Minuten |
| Ethanol 100 % | 5 Minuten |
| Ethanol 96 % | 5 Minuten |
| 10 % gepuffertes Formalin | 50 Minuten |
| Aqua-dest. | 10 Minuten |
| Aqua-dest. | 5 Minuten |
| 5N HCl | 60 Minuten bei 27°C |
| Aqua-dest. | 3 Bäder für jeweils 2 Minuten bei Raumtemperatur |
| Schiff'sches Reagenz | 60 Minuten bei 25°C |
| SO ₂ | 3 Bäder für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur |
| H ₂ O | 10 Minuten bei Raumtemperatur |
| Aqua-dest. | 2 Bäder für jeweils 1 Minute |
| Ethanol 70 % | 3 Minuten |
| Ethanol 96 % | 3 Minuten |
| Ethanol 100 % | 3 Minuten |
| Xylol | 10 Minuten |

Nach der Feulgen-Färbung und der Durchführung der DNA-Zytometrie mittels des AutoCyte QUIC-DNA-Systems wurde am Cytometer in Aachen von jedem Präparat eine zweite Bildergalerie – diesmal in der Feulgen-Färbung – angefertigt. Dazu wurde jede einzelne Zelle aus der ersten Bildergalerie in der Papanicolaou-Färbung relokalisiert und erneut fotografiert.

Die Feulgen-Bilder wurden abschließend segmentiert, die Zellen als Referenzzelle oder Analysezelle klassifiziert, der DNA-Gehalt berechnet und für alle Fälle ein DNA-Histogramm erstellt und ausgedruckt.

2.2.3.2 Silbernitrat-Färbung und Auswertung

Anschließend wurde die Silbernitrat-Färbung an den alkoholfixierten und nach Feulgen gefärbten Proben durchgeführt. Aktiv transkribierende NORs (Nukleolus organisierende Regionen) sind argyrophil und lassen sich somit mittels Versilberungstechnik selektiv anfärben, weshalb sie auch als AgNORs bezeichnet werden. Erstmals wurde dieses Phänomen durch Goodpasture und Bloom 1975 beschrieben (Rüschoff 1992). Ploton et al. (1986) vereinfachten die vorher praktizierte Drei-Schritt Silberreaktion bei 60°C zu einer Ein-Schritt Silberreaktion bei Zimmertemperatur (Ploton et al. 1986; Crocker et al. 1989), die durch die einfachere Handhabung und die gute Anwendbarkeit an Paraffin eingebettetem und Formalin fixiertem Gewebe schnell eine weite Verbreitung fand (Rüschoff et al. 1992). Die Silbernitrat-Färbung wurde entsprechend der Ein-Schritt Silberreaktion mit einigen Modifikationen durchgeführt.

Zunächst wurden die Präparate zum Entdeckeln in Xylol gestellt und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 %, 50 %) für jeweils fünf Minuten eingebracht.

Nach fünfminütigem Spülen mit Aqua-bidest folgte die Inkubation in einer Silbernitrat-Gelatine-Ameisensäure-Lösung (Reagenzien und Färbelösungen der Firma Merck, Darmstadt) in einer abgedunkelten, feuchten Kammer für 20 Minuten. Bei den Monolayer-Präparaten reichte eine etwas kürzere Inkubation von 15 Minuten. Nach Beendigung der Einwirkzeit folgte das Ablaufenlassen der Silbernitrat-Lösung und 2-maliges gutes Spülen mit Aqua-bidest – ebenfalls im Dunkeln. Danach wurden die Präparate 10 Minuten lang in 10 %ige Natriumthiosulfatlösung (Merck, Darmstadt) im Dunkeln eingestellt, um sie danach erneut 5 Minuten in Aqua-bidest zu spülen. Schließlich kamen die Objektträger für jeweils 5 Minuten in eine aufsteigende Alkoholreihe (50 %, 70 %, 96 %, 100 %) und danach 5 Minuten in Xylol. In der Folge wurden sie mit Entellan eingedeckelt und im Dunkeln aufbewahrt.

Am Cytometer folgte sodann die Erstellung der dritten Bildergalerie in der Silbernitrat-Färbung nach vorheriger Relokalisation der bereits aufgenommen digitalen Bilder mit den gespeicherten Positionen. Es wurden – sofern vorhanden – bevorzugt morphologisch auffällige sowie durch DNA-aneuploiden bzw. erhöhten DNA-Gehalt abweichende Zellen zur subjektiven Auszählung der AgNORs in den Zellkernen herangezogen. Hier wurden die Vorteile der Multimodalen Zellanalyse sehr deutlich, da gezielt dieselben Zellen zur AgNOR-Zählung benutzt wurden, welche bereits in zwei anderen Färbungen anerkannte diagnostische Kriterien der Dysplasie oder Malignität gezeigt haben. Vor der Bildaufnahme jeder Position mit dem 63er Objektiv des Mikroskops wurde die manuelle AgNOR-Zählung der Zellen dieser Position mit dem 100er Objektiv in Ölimmersion durchgeführt. Crocker's Methode, die zwei Zählvarianten vorschlägt, diente als Richtlinie für den Zählvorgang (Crocker et al. 1989), um eine standardisierte Durchführung zu gewährleisten. Die AgNOR-Punkte lagen als sog. Cluster (= in Haufen liegend) und Satelliten (= einzeln liegend) vor. Nach Crocker et al. (1989) kann der Cluster als eine Einheit betrachtet und zu den Satelliten addiert werden, oder die als Punkte differenzierbaren Einheiten innerhalb eines Clusters können ausgezählt und zu den Satelliten addiert werden. Beide Methoden schließen einander nicht aus (Crocker et al. 1989). Allerdings sollte beachtet werden, dass bei nukleolärer Disaggregation, welche wiederum zelluläre Aktivität anzeigt (Crocker und Nar 1987; Underwood und Giri 1988), es bei der Bewertung wichtig ist, ob sich im Nukleolus einzelne AgNORs auflösen lassen (Crocker et al. 1989). Crocker et al. (1989) empfehlen die Zählung aller, d. h. der intra- und

extranukleolären AgNOR-Punkte. In Anlehnung an diese Empfehlung wurden in dieser Arbeit die AgNORs auf diese Weise gezählt. Es wurde, wenn möglich, die Anzahl der abgrenzbaren AgNORs innerhalb der Cluster und die Anzahl der Satelliten pro Zellkern addiert und dann ein Mittelwert für die 100 Zellkerne, die pro Präparat ausgezählt wurden, gebildet. Durch Justieren am Feintrieb der Schärfereinstellung des Mikroskops wurden alle im Zellkern vorhandenen AgNORs erfasst. Die Errechnung des Mittelwerts geschah automatisch beim Eintragen der Werte in die Tabelle der Benutzeroberfläche für die AgNOR-Zählung.

Die automatische AgNOR-Analyse mit Hilfe der digitalen Bilder wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt möglich und nachträglich angewandt. Sie beinhaltet die Erfassung der AgNOR-Anzahl sowie die Flächenberechnung der AgNORs im Zellkern. Dieser Fortschritt trägt maßgeblich zur Standardisierung der AgNOR-Technik bei.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Darstellung klinischer Daten

3.1.1 Patientenkollektiv

Gegenstand dieser Studie waren 30 Präparate, die der Routinediagnostik des Institutes der Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf, entnommen wurden. Sie stammten von 28 Patienten, die im Zeitraum von Dezember 2001 – Dezember 2002 zytologisch diagnostiziert wurden. Jedes Präparat wurde für die Multimodale Zellanalyse als ein individueller Fall gewertet. Die zytologischen Diagnosen galten als Auswahlkriterium für diese Studie und setzten sich wie folgt zusammen: zehn Tumorzell-negative Präparate, acht zweifelhafte Präparate (davon vier dringender Verdacht und vier ohne sicheren Nachweis von Tumorzellen) und zwölf Tumorzell-positive Präparate. Die drei Kategorien sollten zu etwa gleichen Teilen vertreten sein. Nach Beendigung des Messvorganges ist für 29 Fälle ein klinisches oder histologisches Follow-up eingeholt worden. Bei einem zytologisch Tumorzell-negativen Fall war ein Follow-up nicht ermittelbar. In 19 Fällen existierte ein histologisches Follow-up, zehn Fälle wurden ausschließlich klinisch begutachtet. Bei den zehn Tumorzell-negativen Präparaten gab es fünf klinische und vier histologische Follow-ups. Im Fall der zytologisch zweifelhaften Präparate lagen jeweils vier histologische und klinische Follow-ups vor. Zehn Follow-ups der Tumorzell-positiven Präparate waren histologische, zwei waren klinische Begutachtungen.

3.1.2 Alter und Geschlecht

Das Kollektiv von 28 Patienten setzte sich aus 21 Männern und sieben Frauen zusammen, deren Alter bei Diagnosestellung zwischen 40,1 und 83,7 Jahren betrug. Das Durchschnittsalter aller Patienten lag bei 63,6 Jahren (SD: $\pm 11,2$ Jahre). Das Alter der Frauen betrug durchschnittlich 66,6 Jahre (43,4 – 82,9 Jahre; SD: $\pm 11,7$ Jahre), das der Männer 62,7 Jahre (40,1 – 83,7 Jahre; SD: $\pm 10,8$ Jahre). Die Frauen waren damit bei der Diagnosestellung im Schnitt 3,9 Jahre älter als die Männer.

| Alter in Jahren: | Männer | | Frauen | | Gesamt | |
|------------------|-----------|-------------|----------|-------------|-----------|--------------|
| | n | % | n | % | n | % |
| < 39 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| 40 - 44 | 2 | 7,1 | 1 | 3,6 | 3 | 10,7 |
| 45 - 49 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| 50 - 54 | 2 | 7,1 | 0 | 0,0 | 2 | 7,1 |
| 55 - 59 | 5 | 17,9 | 1 | 3,6 | 6 | 21,5 |
| 60 - 64 | 3 | 10,7 | 0 | 0,0 | 3 | 10,7 |
| 65 - 69 | 3 | 10,7 | 1 | 3,6 | 4 | 14,3 |
| 70 - 74 | 3 | 10,7 | 3 | 10,7 | 6 | 21,4 |
| 75 - 79 | 1 | 3,6 | 0 | 0,0 | 1 | 3,6 |
| 80 - 84 | 2 | 7,1 | 1 | 3,6 | 3 | 10,7 |
| > 85 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Gesamt: | 21 | 75,0 | 7 | 25,0 | 28 | 100,0 |

Tab. 3.1: Beziehung zwischen Alter und Geschlecht der 28 Patienten

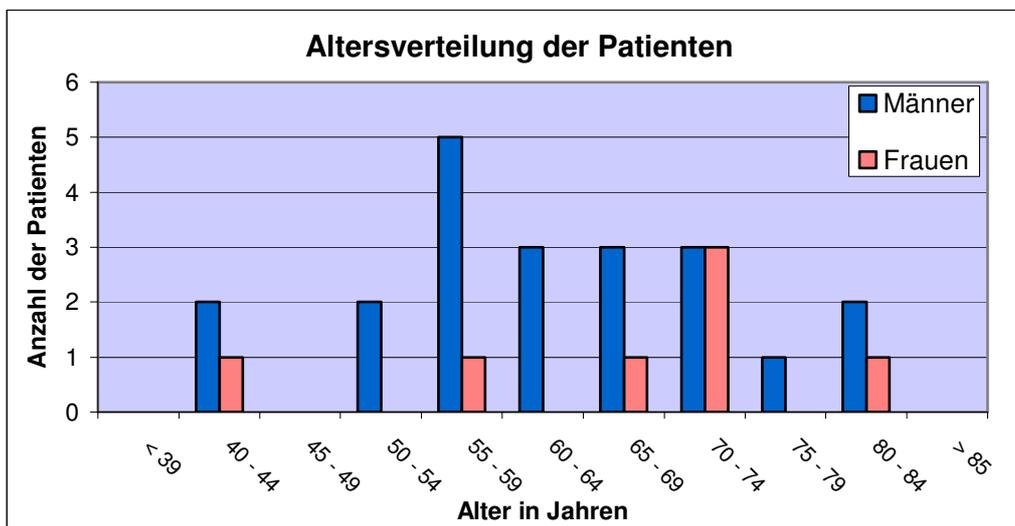


Abb. 3.1: Altersverteilung der Patienten

3.1.3 Zytologische, histologische und klinische Daten

Die zytologische Diagnose der zehn Tumorzell-negativen Präparate war in sechs Fällen eine Hyperkeratose ohne Entzündung oder Dysplasie und in zwei Fällen eine Hyperkeratose mit gering entzündlicher Komponente ohne Dysplasie. In einem Fall wurde ein frisches Ulcus mit eitrig-entzündlicher Komponente diagnostiziert und ein Fall zeigte eine regelrechte Mundschleimhaut mit gering entzündlicher Komponente ohne Dysplasie.

Zur endgültigen Diagnosesicherung konnte in neun Fällen ein Follow-up, darunter vier histologische und fünf klinische Begutachtungen, eingeholt werden. In einem Fall war ein Follow-up nicht ermittelbar. Bei der endgültigen Diagnose zeigte sich in drei Fällen klinisch

eine Leukoplakie und in zwei Fällen histologisch ein Lichen Planus. In einem Fall wurde klinisch ein traumabedingtes Ulcus festgestellt, in einem weiteren Fall wurde histologisch eine Hyperkeratose diagnostiziert. Histologisch wurde in einem Fall eine chronisch rezidivierende ulceröse Stomatitis nachgewiesen und ein Fall bekam die klinische Diagnose einer Leukokeratose.

| Follow-up | | | | |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------------|
| Tumorzell-negative Fälle n = 10; davon histologisch gesichert: 4 | Leukoplakie: 3 (klin.) | Lichen planus: 2 (histol.) | Ulcus: 1 (klin.) | nicht auffindbar: 1 |
| | Hyperkeratose: 1 (histol.) | Leukokeratose: 1 (klin.) | ulceröse Stomatitis: 1 (histol.) | |

Tab. 3.2: Übersicht über die Follow-up Diagnosen der zytologisch Tumorzell-negativen Fälle
Die zytologische Diagnose der acht zweifelhaften Präparate lautete in vier Fällen „dringender Verdacht; bösartige Zellen wahrscheinlich“. Bei den übrigen vier Fällen lautete die zytologische Diagnose „zweifelhaft; bösartige Zellen waren nicht sicher auszuschließen“, wobei das Zellbild abnormen Regeneratepithelien entsprach.

Das Follow-up umfasste fünf histologische Diagnosen und drei klinische Begutachtungen. In zwei Fällen zeigte das Follow-up gutartige Mundschleimhautveränderungen (ein Fall ergab histologisch eine Hyperkeratose; ein Fall wurde klinisch als epitheliale Hyperplasie begutachtet). Das Follow-up zeigte in sechs Fällen ein Karzinom der Mundschleimhaut (darunter vier histologische und zwei klinische Begutachtungen).

| | Follow-up | | | | | | | | | | | | | | | | ge-sund | |
|--|-----------|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|---------|---|---|---|---------|----|
| | T | | | | N | | | | M | | R | | Stadium | | | | | |
| | T1 | T2 | T3 | T4 | NX | N0 | N1 | N2b | MX | M0 | R0 | R1 | 1 | 2 | 3 | 4 | | 4a |
| zweifelhafte Fälle n = 8; davon histologisch gesichert: 5 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 3 | 0 | 2 | 4 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Tumorzell-positive Fälle n = 12; davon histologisch gesichert: 10 | 1 | 6 | 2 | 3 | 0 | 3 | 4 | 4 | 11 | 1 | 10 | 0 | 0 | 5 | 2 | 1 | 3 | 0 |

Tab. 3.3: Übersicht über die Follow-up Diagnosen der zytologisch zweifelhaften und Tumorzell-positiven Fälle

Bei den zwölf zytologisch Tumorzell-positiven Präparaten waren in allen Fällen bösartige Zellen nachweisbar. Die Zellbilder entsprachen einem Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut (darunter vier ohne Grad-Angaben, ein Fall ergab Grad I; fünf Fälle entsprachen Grad II; ein Fall zeigte Grad III, ein weiterer erwies ein verhornendes Plattenepithelkarzinom).

In allen Fällen wurde im Follow-up eine bösartige Mundschleimhautveränderung nachgewiesen (darunter zehn histologische und zwei klinische Begutachtungen).

3.2 Qualität der Präparate

3.2.1 Färbungen

Die Färbequalität der Papanicolaou- und Feulgen-Färbung war in allen Fällen gut. Allerdings konnte in Einzelfällen eine Zytoplasma- und Zellkernschrumpfung nach der Feulgen-Färbung beobachtet werden. Bei der Silbernitrat-Färbung ergaben sich einige Schwierigkeiten, da das Färbeprotokoll ursprünglich auf luftgetrocknete Präparate ausgerichtet war und dennoch gleichermaßen auf die alkoholisch fixierten Präparate der Mundschleimhaut dieser Studie angewendet wurde. Eine deutlich zu starke Färbung konnte so zu Beginn der ersten Färbedurchläufe festgestellt werden. Allerdings war bei den Bürstenabstrichpräparaten in etwa nur die Hälfte betroffen, bei den Monolayer-Präparaten zeigte sich in jedem Fall eine starke Überfärbung, weshalb das Färbeprotokoll für die Monolayer-Präparate gegen Ende angepasst wurde. Die Inkubationszeit in der Silbernitrat-Gelatine-Ameisensäure-Lösung in der abgedunkelten, feuchten Kammer wurde um fünf Minuten (von 20 auf 15 Minuten) reduziert. Ein Präparat (Monolayer; zytologische Diagnose: Tumorzell-positiv), war in dem Maße überfärbt, dass es nicht für die AgNOR-Analyse verwendet werden konnte. Ein weiteres Präparat (Bürstenabstrich; zytologische Diagnose: Tumorzell-positiv) war aus demselben Grund der automatischen AgNOR-Analyse nicht zuführbar, in der manuellen AgNOR-Analyse war es durch Änderungen der Lichtmikroskopeinstellungen noch interpretierbar. Die übrigen 28 Präparate waren auf Grund der dunklen Färbung generell für die Bildanalyse der automatischen AgNOR-Analyse schlecht geeignet. Schwierigkeiten bereitete die Abgrenzung der AgNOR-Punkte innerhalb des dunkel angefärbten Zellkerns. Dies ergab eine Überprüfung der Bilddaten aller Präparate, nach dem festgestellt werden konnte, dass die Ergebnisse der automatischen AgNOR-Zählung wenig aussagekräftig erschienen. Die manuelle AgNOR-Analyse bot den Vorteil, durch Änderungen am Mikroskop (Lichtintensität, Farbfilter-Grün, Durchfokussieren) auf die Intensität der Färbung einzugehen

und so in 29 von 30 Fällen eine subjektive Auszählung der AgNOR-Punkte in den Zellkernen möglich zu machen. Ein genereller Silber Niederschlag, der sich darstellte wie ein dunkelgrauer Schleier, welcher sich über das ganze Präparat zog und sich etwas oberhalb der Zellkernebene befand, war bei einem Großteil der Präparate zu erkennen. Darunter stellten sich in den Zellkernen die AgNORs als braun-schwarze, rundliche, teilweise unförmige Pünktchen im Zellkern dar. Teilweise lagen die AgNORs in Haufen, waren als einzeln differenzierbare Punkte zu erkennen und wurden in diesen Fällen auch einzeln gezählt. Außerdem konfluieren die AgNORs stellenweise zu einer großen AgNOR-Fläche, in der keine abgrenzbaren Einheiten feststellbar waren.

Das Auffinden von 100 Zellen für die AgNOR-Zählung war in keinem Fall ein Problem.

3.2.2 Zellverlust durch Umfärbeprozesse

Während der beiden Umfärbeprozesse (zum einen von der Papanicolaou- auf die Feulgen-Färbung, und zum anderen von der Feulgen- auf die Silbernitrat-Färbung) ist ein bemerkenswerter Anteil von Zellmaterial der Präparate verloren gegangen oder auf dem Objektträger verschoben worden. Dadurch konnten einige Bilder, deren Positionen in der Feulgen- bzw. Silbernitrat-Färbung repositioniert wurden, nicht in diesen Färbungen aufgenommen werden, da die Zellen der betreffenden Position nicht mehr vorhanden waren. Die Bildposition aus der Papanicolaou-Färbung war *repositionierbar*, aber die Zellen nicht *relokalisierbar*. So konnte ein bestimmter Anteil der in der Papanicolaou-Färbung aufgenommenen Bilder in den weiteren Färbungen nicht weiter verwendet werden. Dieser Anteil wurde für jedes Präparat errechnet.

Insgesamt 26 Präparate (86,7 %) waren von Zellverlusten bzw. starken Zellverschiebungen durch die Umfärbeprozesse betroffen und wiesen einen bestimmten prozentualen Anteil an Bildern auf, der in die Multimodale Zellanalyse nicht weiter eingehen konnte. Bei vier Präparaten konnte in den aufgenommenen Positionen der Papanicolaou-Färbung durch Relokalisation derselben in der Feulgen- bzw. Silbernitrat-Färbung kein Zellverlust nachgewiesen werden.

Es zeigte sich, dass die acht Monolayer-Präparate mit einem Anteil von 20,3 % (5,6 – 61,1 %; SD: $\pm 18,3$ %) nicht multimodal analysierbarer Bildpositionen am stärksten von Zellverlusten/-verschiebungen betroffen waren. Die 22 Bürstenabstrichpräparate dagegen wiesen durchschnittlich einen deutlich geringeren Anteil nicht relokalisierbarer Zellen von

8,4 % (0,0 - 66,1 %; SD: $\pm 14,8$ %) auf. Auch die vier Präparate, deren Bildpositionen durch Zellverluste überhaupt nicht eingeschränkt wurden, waren Bürstenabstrichpräparate.

| C Nummer: | Art des Präparats | Zahl der PAP-Bilder | Nicht mögl. Bilder wg. Zellverlusten bis zur Silbernitrat-Färbung | %-Anteil nicht relokalisierbarer Bilder | |
|--|-------------------|---------------------------|---|---|------------|
| zytologisch Tumorzell-negative Fälle (n = 10) | | | | | |
| C 10100-02 | Bürstenabstrich | 313 | 21 | 6,7 | |
| C 10182-02 | Bürstenabstrich | 324 | 15 | 4,6 | |
| C 10231-02 | Bürstenabstrich | 285 | 5 | 1,8 | |
| C 10344-02 | Bürstenabstrich | 325 | 14 | 4,3 | |
| C 10632-02 | Bürstenabstrich | 314 | 0 | 0,0 | |
| C 12205-02 | Bürstenabstrich | 279 | 87 | 31,2 | |
| C 12760-02 | Bürstenabstrich | 359 | 18 | 5,0 | |
| C 13105-02 | Bürstenabstrich | 318 | 6 | 1,9 | |
| C 13391-02 | Bürstenabstrich | 290 | 43 | 14,8 | |
| C 13723-02 | Bürstenabstrich | 332 | 43 | 13,0 | |
| | | | Mittelwert: | 8,3 | Min.: 0,0 |
| | | | Standardabweichung: | 9,3 | Max.: 31,2 |
| zytologisch zweifelhafte Fälle (n = 8) | | | | | |
| C 8760-02 | Bürstenabstrich | 169 | 5 | 3,0 | |
| C 8996-02 | Monolayer | 360 | 26 | 7,2 | |
| C 10783-02 | Monolayer | 346 | 69 | 19,9 | |
| C 11231-02 | Bürstenabstrich | 290 | 0 | 0,0 | |
| C 11345-02 | Bürstenabstrich | 326 | 44 | 13,5 | |
| C 13775-02 | Bürstenabstrich | 142 | 2 | 1,4 | |
| C 14336-02 | Bürstenabstrich | 62 | 41 | 66,1 | |
| C 14535-02 | Bürstenabstrich | 252 | 5 | 2,0 | |
| | | | Mittelwert: | 14,1 | Min.: 0,0 |
| | | | Standardabweichung: | 22,1 | Max.: 66,1 |
| zytologisch Tumorzell-positive Fälle (n = 12) | | | | | |
| C 1912-01 | Monolayer | 360 | 220 | 61,1 | |
| C 8399-02 | Bürstenabstrich | 250 | 0 | 0,0 | |
| C 9639-02 | Bürstenabstrich | 327 | 15 | 4,6 | |
| C 10777-02 | Monolayer | 267 | 61 | 22,9 | |
| C 10778-02 | Monolayer | 213 | 20 | 9,4 | |
| C 10780-02 | Monolayer | 260 | 24 | 9,2 | |
| C 10781-02 | Monolayer | 288 | 16 | 5,6 | |
| C 11071-02 | Bürstenabstrich | 315 | 26 | 8,3 | |
| C 12128-02 | Monolayer | 116 | 31 | 26,7 | |
| C 13132-02 | Bürstenabstrich | 217 | 2 | 0,9 | |
| C 14483-02 | Bürstenabstrich | 340 | 2 | 0,6 | |
| C 14531-02 | Bürstenabstrich | 364 | 0 | 0,0 | |
| | | | Mittelwert: | 12,4 | Min.: 0,0 |
| | | | Standardabweichung: | 17,6 | Max.: 61,1 |
| Werte nur für Bürstenabstrich-Präparate: | | | | | |
| | | | Mittelwert: | 8,4 | Min.: 0,0 |
| | | | Standardabweichung: | 14,8 | Max.: 66,1 |
| Werte nur für Monolayer-Präparate: | | | | | |
| | | | Mittelwert: | 20,3 | Min.: 5,6 |
| | | | Standardabweichung: | 18,3 | Max.: 61,1 |
| Abkürzungen: | Max.. | Maximum | | | |
| | Min. | Minimum | | | |
| | PAP | nach Papanicolaou gefärbt | | | |

Tab. 3.4: Übersicht über den nicht relokalisierbaren Bildanteil aller 30 Präparate

Betrachtet man nicht die Präparationstechnik, sondern die zytologischen Diagnosen der 30 Präparate, so lassen sich auch dort Unterschiede feststellen. Die zehn zytologisch Tumorzell-negativen Präparate wiesen den geringsten Anteil zu verwerfender Bildpositionen auf Grund von Zellablösungen vom Präparat auf; er betrug 8,3 % (0,0 – 31,2 %; SD: \pm 9,3 %). Bei den acht zytologisch zweifelhaften Präparaten lag dieser Anteil mit 14,1 % (0,0 – 66,1 %; SD: \pm 22,1 %) am höchsten. Bei den zwölf zytologisch Tumorzell-positiven Präparaten konnte ein durchschnittlicher Anteil von 12,4 % (0,0 – 61,1 %; SD: \pm 17,6 %) der Bildpositionen aus der Papanicolaou-Färbung nicht bis zur Silbernitrat-Färbung genutzt werden.

Im Gesamtdurchschnitt aller 30 Präparate betrug der nicht relokalisierbare Bildanteil 11,2 % (0,0 – 66,1 %; SD: \pm 16,4 %).

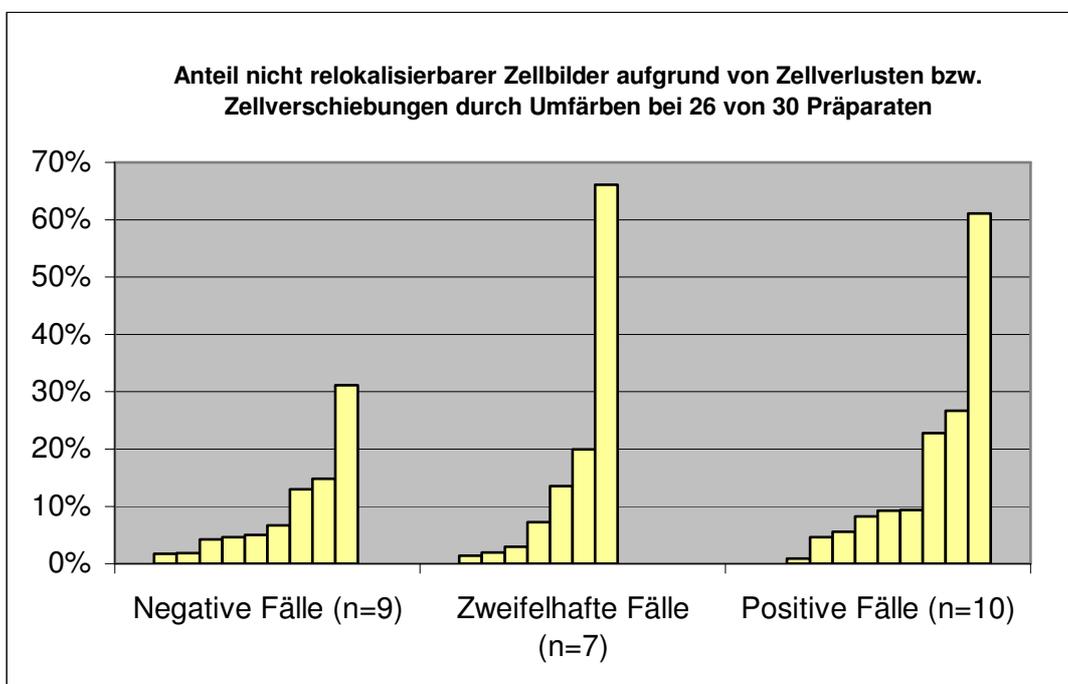


Abb. 3.2: Übersicht über den prozentualen Anteil nicht relokalisierbarer Zellbilder pro Präparat

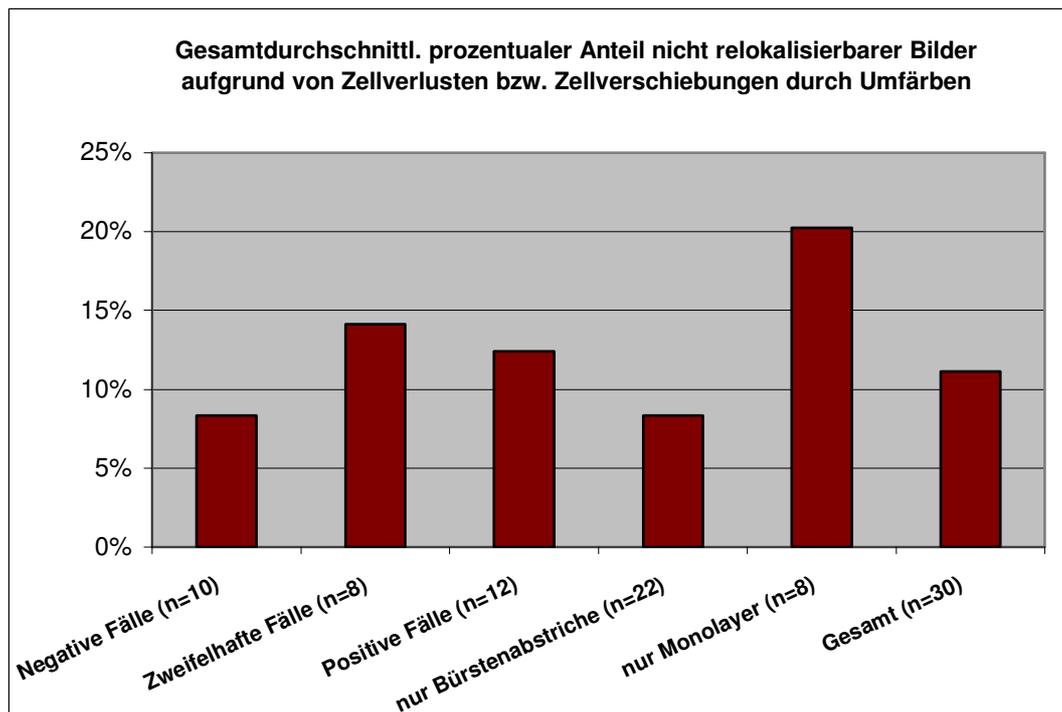


Abb. 3.3: Gesamtdurchschnitte der prozentualen Anteile nicht relokalisierbarer Zellbilder pro Präparat

3.3 Ablauf der Aufnahmesequenzen

3.3.1 Bedienung

Das für die Benutzeroberfläche gewählte Entwicklungspaket QT der Firma Trolltech war übersichtlich und einfach zu bedienen. Nach Einlegen des Präparats und Eingeben der C-Nummer der jeweiligen Probe konnte sofort mit den Bildaufnahmen begonnen werden. Die Benutzerführungsleiste half beim Ablauf der einzelnen Aktionen, da die Schaltflächen übersichtlich in einer logischen Reihenfolge untereinander angeordnet waren.

Zu Beginn der Messung eines neuen Präparats bestand die Möglichkeit, die mit Filzschreiber markierten Areale auf dem Objektträger (ROI = Region of Interest) auf einer Abbildung des Objektträgers, der sog. Karte, die sich auf der Benutzeroberfläche unten links befand, als Quadrate einzuzichnen. Die Karte bot den Vorteil, während einer Aufnahmesequenz ständig auf dem Bildschirm kontrollieren zu können, ob man sich innerhalb einer „Region of Interest“ bewegte. Die Position des Mikroskops war auf dieser Karte durch ein rotes Kreuz gekennzeichnet. Auch jedes aufgenommene Bild erhielt eine Markierung in Form eines kleinen schwarzen Punktes auf der Karte. Auf diese Weise konnte man auch später noch feststellen, an welchem Ort ein bestimmtes Bild gemacht wurde, denn mit der Markierung

eines Bildes in der Bildergalerie erschien gleichzeitig ein kleines grünes Quadrat um den dem Bild entsprechenden schwarzen Punkt auf der Karte des Objektträgers.

Die Visualisierung nahm den größten Teil der Benutzeroberfläche ein. Sie bot verschiedene Möglichkeiten zur Darstellung der zytologischen Bilder. Zur Übersicht der in der Datenbank vorhandenen aufgenommenen Zellbilder war eine tabellarische Ansicht mit verkleinerten Bildern (Bildergalerie) vorgesehen. Zur genauen Ansicht eines einzelnen Bildes konnte dieses auch allein im Großformat an dieser Stelle der Benutzeroberfläche angezeigt werden. In der Ansicht der Bildergalerie konnte anhand einer linken Leiste zusätzlich die Nummer der Bildposition abgelesen werden.

Diese Informationen sowie die zusätzliche Information über Färbung und Objektiv bot die Navigation auf der Benutzeroberfläche unterhalb der Benutzerführung. Die Möglichkeit, den Datenbankinhalt abzulesen bzw. abzufragen, befand sich unterhalb der Navigationselemente. Mit Hilfe der Schaltflächen „Slightinfo“ bzw. „Positioninfo“ konnten so zusätzliche Informationen zu einem Präparat bzw. einer bestimmten Position jederzeit eingetragen, nachgelesen oder geändert werden. Die Anzahl der vorhandenen Aufnahmen in den verschiedenen Färbungen wurde ebenfalls dargestellt und half beim Einschätzen des verbleibenden Arbeitsaufwandes für dieses Präparat.

Das Laden einer fertigen Bildersequenz einer Probe erforderte jedoch etwas Geduld. Je nach Anzahl der vorhandenen Bilder konnte dieser Vorgang von 30 Sekunden bis zu acht Minuten dauern.

Dieses störte vor allem dann, wenn die Visualisierung der Bilder geändert wurde, da das bloße Umschalten von der Ansicht der Bildergalerie zu der eines einzelnen Bildes im Großformat jedes Mal das erneute Laden der kompletten Bildersequenz erforderte. Aus diesem Grund war ein Ändern der Bilddarstellungen in den verschiedenen Färbungen nur unter erhöhtem Zeitaufwand praktikierbar.

3.3.2 Bildaufnahme

Zu Beginn einer jeden Aufnahmesequenz wurde die Köhler Beleuchtung am Mikroskop eingestellt und der automatische Weißabgleich durchgeführt. Dazu wurde ein leerer Objektträger eingelegt und das 63er Objektiv des Mikroskops mit Ölimmersion verwendet. Nach Eingabe der C-Nummer jeder Probe und wahlweise auch Kommentaren zu diesem Präparat konnte die erste Bildaufnahme in der Papanicolaou-Färbung gestartet werden.

Im Durchschnitt wurden pro Präparat an 280 Positionen Bilder in der Papanicolaou-Färbung angefertigt. Dabei wurde die jeweilige zu fotografierende Position vorher mit Hilfe des Mikroskops aufgesucht und die entsprechende Zellformation sodann auf dem zweiten Bildschirm (zeigte den zentralen Ausschnitt des Live-Bildes des Mikroskops) zentriert und fokussiert. Die Möglichkeit eines Autofokus bestand nicht. Durch Anklicken der entsprechenden Schaltfläche in der Benutzerführung („Grab-New“) oder Bedienung der entsprechenden Taste auf der Tastatur (hier F2) wurde das Bild aufgenommen. Der Ablauf erforderte nun eine gewisse Bildspeicherzeit, die ohne weitere Manipulationen am Mikroskoptisch abzuwarten war. Sie betrug ca. eine Sekunde und ihr Ende wurde durch ein akustisches Signal angezeigt. Sofort erschien daraufhin das neu gespeicherte Bild als kleines Abbild in der Bildergalerie.

Zu Beginn dieser Arbeit dauerte dieser Prozess teilweise bis zu drei Stunden, konnte aber mit wachsender Routine und stetiger Verbesserung der Software auf ca. zwei Stunden gekürzt werden. Zusammenfassend beinhaltete dieser erste Arbeitsprozess der Multimodalen Zellanalyse das Einstellen der Köhler-Beleuchtung am Mikroskop, den Weißabgleich, das Eingeben der Zytonummer und der Kommentare, das Setzen der Regions of Interest (ROI's) auf der Karte des Präparats der Benutzeroberfläche, das Auffinden der für die Analyse interessanten Zellen, ihre Zentrierung und Fokussierung auf dem zweiten Bildschirm und schließlich die Speicherung der durchschnittlich 280 Bildpositionen.

Die Aufnahmezeiten für die Bildersequenzen in der Feulgen- und Silbernitrat-Färbung sind zu vergleichen, waren aber tendenziell kürzer, da das Einzeichnen der ROI's sowie das Suchen und Auffinden von Zellen auf dem Objektträger wegfielen.

Mit Hilfe der Schaltfläche „Relocate“ (bzw. Taste F5 der Tastatur) wurden in der Feulgen- sowie in der Silbernitrat-Färbung die gespeicherten Bildpositionen der Papanicolaou-Färbung durch Positionierung des Mikroskoptischs automatisch wieder angefahren. Mit der Schaltfläche „Grab“ (bzw. Taste F3 der Tastatur) wurden die Bilder der Feulgen- und der Silbernitrat-Färbung aufgenommen. Sie erschienen gleichermaßen in der Bildergalerie links neben der jeweils vorherigen Färbung.

3.3.3 Repositionierung und Koregistrierung

Grundlage der Multimodalen Zellanalyse ist das Wiederauffinden identischer Zellen in verschiedenen Färbungen. Der erste Schritt bestand aus dem Wiederanfahren der in der

Datenbank gespeicherten Koordinaten einer in einer früheren Färbung aufgenommenen Position. Diese Daten wurden an das Mikroskop weitergegeben und der Mikroskoptisch bewegte sich automatisch dorthin.

Beim jeweils ersten Repositionierungsversuch in einer neuen Färbung machten sich Ungenauigkeiten durch die Mechanik des Tisches oder das Einlegen des Objektträgers in die Halterung bemerkbar. Regelmäßig kam bei der ersten Repositionierung der Tisch nur in die Nähe der eigentlich gesuchten Zellformation. Daraus resultierte, dass diese Zellformation mit Hilfe des Mikroskops manuell aufgefunden werden musste. Mit der Aufnahme des ersten Bildes jedoch an der nun korrekten Position wurde dieser Verschiebevektor automatisch gespeichert und auf alle folgenden Bilder angewendet, so dass alle weiteren Bilder problemlos repositioniert werden konnten.

Die gesuchte Zellformation erschien dann im Folgenden stets erkennbar auf dem zweiten Bildschirm, wenn auch immer noch sichtbar leicht verschoben im Vergleich zum Originalbild in der Papanicolaou-Färbung. Hier gab es nun die Möglichkeit mit Hilfe der Schaltfläche „Refine“ die beiden Bilder pixelgenau übereinander zulegen. Dazu wurden das Datenbankbild und das Live-Bild, nachdem sie in Grauwertbilder transformiert worden waren, miteinander verglichen. Dabei wurde der entsprechende Differenzvektor bestimmt, der die beiden Bilder voneinander trennte und der Mikroskoptisch entsprechend dieses Differenzvektors verschoben. Der Verschiebefehler wurde also berechnet und nachkorrigiert. Diese Korrektur wurde automatisch so lange wiederholt, bis der Differenzvektor eine bestimmte definierte Schwelle unterschritten hatte. Auf der Entwicklungsstufe des Cytometers zu Zeiten dieser Studie dauerte dieser Prozess pro Bild, das zu repositionieren war, ca. fünf Sekunden und war damit subjektiv eindeutig zu lang. Durch Änderung der Einstellung des Schwellenwertes des Differenzvektors, der unterschritten werden muss, kann dieser Vorgang allerdings stark verkürzt werden.

Um Aussagen über das Maß der Verschiebungen machen zu können, wurde bei allen Präparaten ein Vergleich der Bildpositionen in den unterschiedlichen Färbungen für einen bestimmten Bildindex ausgeführt.

In 23 Fällen konnten entsprechend dieses Bildindexes Werte für die Verschiebevektoren in die X- und Y-Richtung im Vergleich zur Bildposition Null ermittelt werden. Aus den Werten der Verschiebevektoren in die x- bzw. y-Richtung wurde für jedes Präparat der Euklidische Abstand ($\sqrt{dx^2+dy^2}$) errechnet. Für jedes der 23 Präparate resultierten daraus zwei Werte: zum

einen die Abweichung für die Bildposition Null (Euklidischer Abstand) von der Papanicolaou- auf die Feulgen-Färbung; zum anderen die Abweichung für die Bildposition Null von der Papanicolaou- auf die Silbernitrat-Färbung. Die Mittelwerte dieser Berechnungen unterteilt in die zytologischen Diagnosen sind aus Tab. 3.5 ersichtlich. Im Diagramm 3.4 sind die euklidischen Abstände jedes Präparats als Säule aufgeführt. Eine Übersicht über die Mittelwerte zeigt Diagramm 3.5.

Alle 23 Präparate zeigten im Gesamtdurchschnitt eine Abweichung für die Bildposition Null von 176,99 μm von der Papanicolaou- auf die Feulgen-Färbung (24,68 – 1707,43 μm ; SD: \pm 337,92 μm) und 185,22 μm von Papanicolaou- auf die Silbernitrat-Färbung (7,68 – 1634,72 μm ; SD: \pm 333,88 μm).

Wird das Maß einer Bilddiagonalen des Bildschirms von entsprechend 92,5 μm in Betracht gezogen, so ergibt sich daraus für beide Fälle eine ungefähre Abweichung von **zwei** Bilddiagonalen. Anschaulich dargestellt musste im Durchschnitt um eine Distanz von **zwei** Bildschirmdiagonalen um das erste Relokalisierungsergebnis herum das eigentliche Bild gesucht werden. Wie bereits erwähnt war dies nur einmal – und zwar bei der Relokalisierung des ersten Bildes – notwendig, da die entsprechenden Verschiebevektoren für alle anderen Bilder automatisch gespeichert wurden und bei den folgenden Relokalisierungen der nächsten Bilder dieses Präparats mit in die Repositionierungskordinaten einfließen.

| FÄLLE | Abweichungen für Bildposition Null (Euklidischer Abstand) von der Papanicolaou- auf die Feulgen-Färbung in μm (in Klammern der entsprechende Wert als Bilddiagonale) | Abweichungen für Bildposition Null (Euklidischer Abstand) von der Papanicolaou- auf die Silbernitrat-Färbung in μm (in Klammern der entsprechende Wert als Bilddiagonale) |
|---|---|--|
| zytol. negative (n = 8): | | |
| Mittelwert: | 154,6 (~ 1,7 BD) | 153,4 (~ 1,7 BD) |
| Standardabweichung: | 40,3 | 31,9 |
| zytol. zweifelhafte (n=8): | | |
| Mittelwert: | 79,2 (~ 0,9 BD) | 112,5 (~ 1,2 BD) |
| Standardabweichung: | 48,9 | 178,2 |
| zytol. positive (n = 7): | | |
| Mittelwert: | 314,4 (~ 3,4 BD) | 304,7 (~ 3,3 BD) |
| Standardabweichung: | 615,3 | 587,8 |
| GESAMT (n = 23) | | |
| Mittelwert: | 176,99 (~ 1,9 BD) | 185,22 (~ 2,0 BD) |
| Median: | 112,2 | 115,13 |
| Standardabweichung: | 337,92 | 333,88 |
| Minimum: | 24,68 | 7,68 |
| Maximum: | 1707,43 | 1634,72 |
| Bildformat: 74,2 x 55,2μm Bilddiagonale (BD): 92,5μm | | |

Tab. 3.5: Übersicht über die Mittelwerte der Relokalisierungsungenauigkeiten in μm

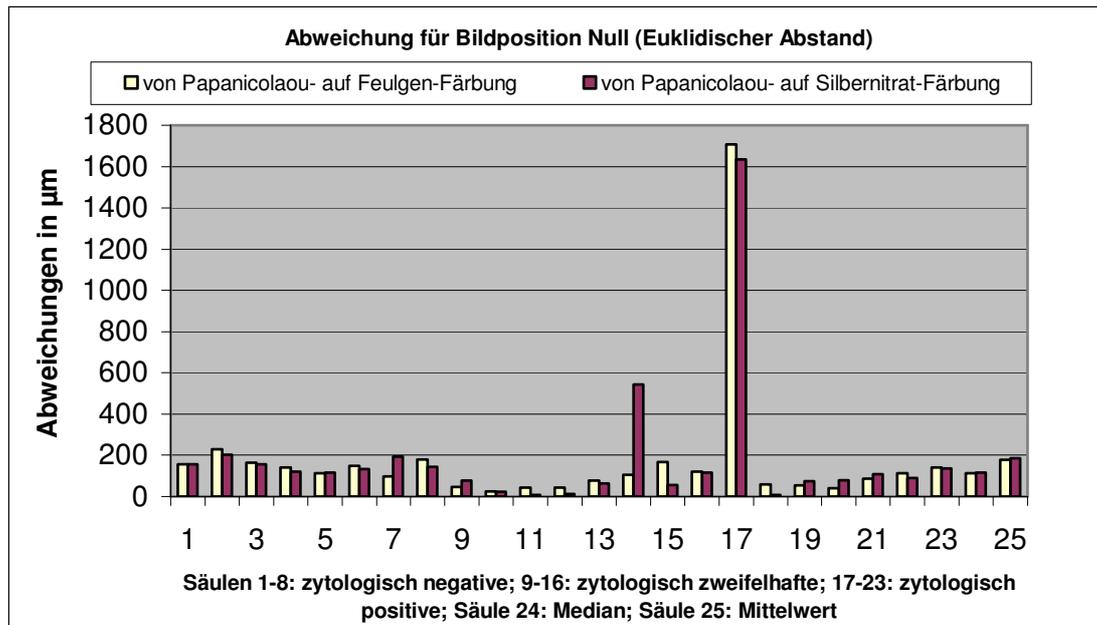


Abb. 3.4: Übersicht über die Relokalisierungsungenauigkeiten eines jeden Falles

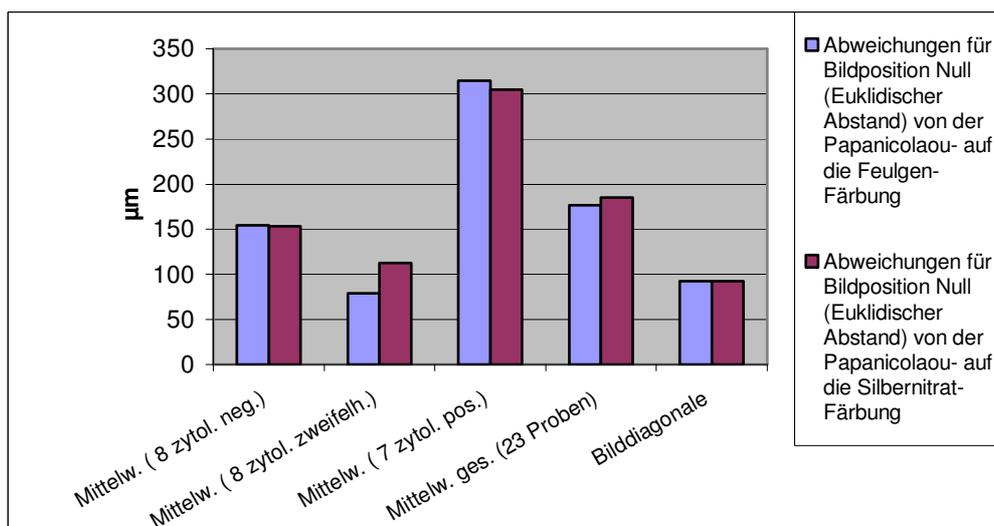


Abb. 3.5: Übersicht über die Mittelwerte der Relokalisierungsungenauigkeiten

Bei der Betrachtung der Präparate gemäß ihrer zytologischen Diagnosen zeigte sich, dass die acht zytologisch zweifelhaften Fälle mit einem Mittelwert von $79,2 \mu\text{m}$ (SD: $\pm 48,9 \mu\text{m}$) der Abweichungen für die Bildposition Null von der Papanicolaou- auf die Feulgen-Färbung und einem Mittelwert von $112,5 \mu\text{m}$ (SD: $\pm 178,2 \mu\text{m}$) der Abweichung von der Bildposition Null von der Papanicolaou- auf die Silbernitrat-Färbung insgesamt die geringsten Relokalisierungsungenauigkeiten aufwiesen.

Die acht zytologisch Tumorzell-negativen Fälle lagen im Mittelfeld mit Mittelwerten von $154,6 \mu\text{m}$ (SD: $\pm 40,3 \mu\text{m}$) und $153,4 \mu\text{m}$ (SD: $\pm 31,9 \mu\text{m}$).

Die größten Euklidischen Abstände von der Bildposition Null konnten für die sieben Tumorzell-positiven Präparate festgestellt werden. Ihr Mittelwert lag bei $314,4 \mu\text{m}$ (SD: $\pm 615,3 \mu\text{m}$) Abweichung für die Bildposition Null von der Papanicolaou- auf die Feulgen-Färbung sowie bei $304,7 \mu\text{m}$ (SD: $\pm 587,8 \mu\text{m}$) für die Abweichung für die Bildposition Null von der Papanicolaou- auf die Silbernitrat-Färbung.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die Repositionierung im Allgemeinen sehr gut funktioniert hat. Abgesehen von der oben erwähnten Schwierigkeit (s. Abschnitt 3.3.2), die auf Zellverlusten oder sehr starken Zellverschiebungen durch die Umfärbeprozesse beruhte, war bei den restlichen Bildern durch die genannten drei Arbeitsprozesse eine pixelgenaue Bildüberlagerung möglich. Kurz rekapituliert bestanden die drei Arbeitsprozesse zuerst aus dem Wiederanfahren der gespeicherten Koordinaten des Papanicolaou-Bildes durch den Mikroskopist, das manuelle Suchen und Einstellen des ersten Bildes in einer durchschnittlichen Distanz von zwei Bildschirmdiagonalen um das erste Repositionierungsergebnis herum und die automatische Feinjustierung der Koregistrierung des Datenbankbildes und des Live-Bildes.

3.3.4 Segmentierung und Klassifizierung

Der erste Schritt beinhaltete das Erstellen der Bildgalerie in der Feulgen-Färbung entsprechend der relokalierten Positionen aus der Papanicolaou-Färbung. Erst nachdem alle Feulgen-Bilder eines Präparats aufgenommen waren, konnte in einem separaten Arbeitsschritt der Segmentierungsalgorithmus auf die Feulgen-Bilder angewendet werden. Die Segmentierung und Klassifikation der Zellkerne erfolgte nicht gleichzeitig und automatisch mit der Aufnahme der Feulgen-Bilder, sondern dieser Prozess unterteilte sich in drei Arbeitseinheiten. Nachdem im zweiten Schritt die Kernsegmentierungen errechnet worden waren, diente der dritte Schritt der Kontrolle und etwaiger Verbesserungen der gefundenen Segmentierungen sowie der Klassifikation der Zellen. Dazu wurden die nun segmentierten Feulgen-Bilder erneut der Reihe nach angeschaut. Zu Beginn dieser Studie war der Segmentierungsalgorithmus noch nicht fehlerfrei, so dass ein Problem der Übersegmentierung existierte. Dies erforderte die Korrektur der Segmentierung eines jeden Zellkerns durch Hinzunahme oder Entfernung von einzelnen Teilsegmenten. Dieses stellte sich als sehr arbeitsintensiv dar, konnte jedoch schnell verbessert werden bis hin zu einem Segmentierungsalgorithmus, der für die Feulgen-Färbung beinahe fehlerfrei funktionierte. War eine Kernkontur zufrieden stellend genau, so konnte diese markiert werden, um

anschließend die dazugehörige Zelle gemäß ihres Zelltyps sowie ihrer Funktion als Referenz- oder Messzelle zu klassifizieren. Hierbei war es möglich, die Zellen jederzeit auch in der Papanicolaou-Färbung zu betrachten.

Durch die relativ starke Verschmutzung des Zytoplasmas der Mundschleimhautzellen in der Feulgen-Färbung waren die Segmentierungen der Kerne am Anfang sehr ungenau, so dass der Vorgang der manuellen Korrektur der Segmentierungen sowie der Klassifikation der Zellen pro Präparat bis zu vier Stunden dauern konnte. Durch die Optimierung der Software für die Segmentierung, die kaum eine Korrektur nötig machte, konnte der Arbeitsaufwand drastisch auf ca. 45 Minuten pro Präparat gesenkt werden.

Die Berechnung der Integrierten Optischen Dichte als zytometrisches Messäquivalent des zellulären DNA-Gehaltes stellte einen weiteren abgekoppelten Prozess dar, da sie nicht automatisch und gleichzeitig zur Segmentierung und Klassifikation der Zellen stattfand. Danach erst konnten die DNA-Histogramme ausgedruckt und diese DNA-zytometrisch interpretiert werden.

3.3.5 AgNOR-Analyse

Im letzten Teil der Multimodalen Zellanalyse wurde die AgNOR-Analyse an den Silbernitratgefärbten Präparaten durchgeführt. Die manuelle AgNOR-Analyse wurde mit dem 100er Objektiv des Mikroskops in Ölimmersion vorgenommen. Dazu konnte auf dem rechten Bildschirm wahlweise das Papanicolaou- oder das Feulgen-Bild eingestellt werden, während auf dem linken Bildschirm das Live-Bild in der Silbernitrat-Färbung zu sehen war. Zunächst wurden die Zellen relokalisiert und anschließend durch das Mikroskop betrachtet, um die Anzahl der AgNORs subjektiv zu ermitteln. Für einen besseren Kontrast sorgte in manchen Fällen ein grüner Farbfilter, der am Mikroskop einzuschwenken war. Auf der Benutzeroberfläche des rechten Bildschirms befand sich eine Tabelle, in der die subjektiv gezählten AgNOR-Werte direkt für jede Zelle eingetragen wurden. Automatisch wurde mit jeder gezählten Zelle der Durchschnittswert aller gezählten AgNORs pro Zelle sowie die Anzahl der bereits in die Messung eingegangener Zellen errechnet und angezeigt. So war es einfach zu kontrollieren und es wurde auch in jedem Fall erreicht, dass pro Präparat 100 Zellen in der manuellen AgNOR-Analyse betrachtet wurden. In der Tabelle waren gleichzeitig die Klassifikation sowie der DNA-Gehalt der Zellen auf dem entsprechenden Bild abzulesen, so dass es möglich war, gezielt Zellen mit einem DNA-aneuploiden oder zu hohen DNA-Gehalt für die AgNOR-Analyse heranzuziehen. Die Aufnahme der zytologischen

Bilder in der Silbernitrat-Färbung erfolgte mit dem 63er Objektiv des Mikroskops in Ölimmersion so wie zuvor in der Papanicolaou- und der Feulgen-Färbung. Die automatische AgNOR-Analyse verwendete diese Bilder zur Berechnung ihrer Daten. Dabei wurde eine derartige Einstellung gewählt, dass die automatische AgNOR-Analyse lediglich dieselben Zellen erfasste, die auch zuvor manuell ausgewertet worden waren.

3.4 Ergebnisse der Multimodalen Zellanalyse

Eine Übersicht über die mit der Multimodalen Zellanalyse ermittelten Ergebnisse der 30 zytologischen Präparate zeigt Tab. 3.6. Zytologische und DNA-zytometrische Daten sowie Ergebnisse der manuellen und automatischen AgNOR-Analyse sind hieraus abzulesen.

| | C Nr. | Ge- schl. | Alter | Art des Präpa- rats | Zytologische Diagnose | Follow-up (Histologie / Klinik) |
|---|------------|--------------|-------|------------------------------|---|--|
| Zytol. neg. Fälle (n=10) 1 | C 10100-02 | w | 43,4 | B | neg., Hyperkeratose, gering entzündl. Komp. | Karte ist nicht auffindbar |
| 2 | C 10182-02 | w | 58,5 | B | neg., Hyperkeratose | histol. und klin.: Lichen planus |
| 3 | C 10231-02 | w | 65,5 | B | neg., frisches Ulcus mit eitrigem Entzdg. | histol. und klin.: Lichen planus |
| 4 | C 10344-02 | m | 44,3 | B | neg., Hyperkeratose, keine Entzdg., keine Dysplasie | keine PE durchgeführt; Leukoplakia simplex |
| 5 | C 10632-02 | m | 61,3 | B | neg., Hyperkeratose, keine Entzdg., keine Dysplasie | keine PE durchgeführt; Leukoplakie+Alkoholuvulosis |
| 6 | C 12205-02 | w | 82,9 | B | neg., Hyperkeratose, keine Entzdg., keine Dysplasie | keine PE durchgeführt; trauma- bedingtes Ulcus |
| 7 | C 12760-02 | m | 56,3 | B | neg., Hyperkeratose, gering entzündl. Komp., keine Dysplasie | histol.: Hyperkeratose; klin.: Leukoplakie |
| 8 | C 13105-02 | w | 72,3 | B | neg., Hyperkeratose, keine Entzdg., keine Dysplasie | histol.: chron.rezidiv. ulceröse Stomatitis, klin.:asthmaspraybedingt |
| 9 | C 13391-02 | m | 70,8 | B | neg., Hyperkeratose, keine Entzdg., keine Dysplasie | keine PE durchgeführt; klin.: V. a. Leukokeratose |
| 10 | C 13723-02 | m | 58,7 | B | neg., regelrechte MS, gering entzündl.Komp., keine Dysplasie | keine PE durchgeführt; klin.: leukoplakische Veränderung |
| Zytol. zweifelh. Fälle (n=8) 11 | C 8760-02 | m | 75,7 | B | d. V. (böartige Zellen wahrscheinlich) | T1 NX Mx; Stadium 1; R1; G2 |
| 12 | C 8996-02 | m | 40,1 | M | d. V. (böartige Zellen wahrscheinlich) | T2 N0 Mx; Stadium 2; R0; G2 |
| 13 | C 10783-02 | m | 58,3 | M | zweifelh. (böartige Zellen nicht sicher auszuschl.), abnorme Regeneratepith. | keine OP; klin.: T4 N2b M0; G2 |
| 14 | C 11231-02 | m | 62,2 | B | d. V. (böartige Zellen wahrscheinlich) | T2 N0 Mx; Stadium 2; R0; G2 |
| 15 | C 11345-02 | m | 83,7 | B | zweifelh. (böartige Zellen nicht sicher auszuschl.), abnorme Regeneratepith. | epitheliale Hyperplasie |
| 16 | C 13775-02 | w | 70,1 | B | zweifelh. (böartige Zellen nicht sicher auszuschl.), abnorme Regeneratepith. | T1 N0 M0; Stadium 1; R0; G2 |
| 17 | C 14336-02 | m | 69,2 | B | zweifelh. (böartige Zellen nicht sicher auszuschl.), abnorme Regeneratepith. | klin.: Leukoplakie; histol.: Hyperkeratose |
| 18 | C 14535-02 | m | 83,4 | B | d. V. (böartige Zellen wahrscheinlich) | keine OP; klin.: T3 N2b Mx; G2 |
| Zytol. pos. Fälle (n=12) 19 | C 1912-01 | m | 59,9 | M | pos. (böartige Zellen nachweisbar), Zellbild entspricht PEC der MS Grad 2 | T3 N2b Mx; Stadium 4a; R0; G2 |
| 20 | C 8399-02 | m | 67,1 | B | pos. (böartige Zellen nachweisbar), Zellbild entspricht PEC der MS | T2 N0 Mx; Stadium 2; R0; G2 |
| 21 | C 9639-02 | m | 58,2 | B | pos. (böartige Zellen nachweisbar), Zellbild entspricht PEC der MS Grad 1 | keine OP; klin.: T4 N2b M0; G2 |
| 22 | C 10777-02 | m | 52,1 | M | pos. (böartige Zellen nachweisbar), Zellbild entspricht PEC der MS Grad 2 | T4 N2b Mx; Stadium 4a; R0; G2 |
| 23 | C 10778-02 | m | 62,7 | M | pos. (böartige Zellen nachweisbar), Zellbild entspricht PEC der MS Grad 2 | T2 N1 Mx; Stadium 2; R0; G2 |
| 24 | C 10780-02 | m | 55,4 | M | pos. (böartige Zellen nachweisbar), Zellbild entspricht PEC der MS Grad 2 | T4 N2b Mx; Stadium 4; G2 klinisch |
| 25 | C 10781-02 | w | 73,2 | M | pos. (böartige Zellen nachweisbar), Zellbild entspricht PEC der MS Grad 2 | T1 N1 Mx; Stadium 3; R0; G2 |
| 26 | C 11071-02 | m | 51,2 | B | pos. (böartige Zellen nachweisbar), Zellbild entspricht einem verhornenden PEC der MS | T2 N1 M ; Stadium 2; R0; G2 |
| 27 | C 12128-02 | m | 62,2 | M | pos. (böartige Zellen nachweisbar), Zellbild entspricht PEC der MS | T2 N0 Mx; Stadium 2; R0; G2 |
| 28 | C 13132-02 | m | 70,7 | B | pos. (böartige Zellen nachweisbar), Zellbild entspricht PEC der MS Grad 3 | T3 N2c Mx; Stadium 4a; R0; G2 |
| 29 | C 14483-02 | m | 71,5 | B | pos. (böartige Zellen nachweisbar), Zellbild entspricht PEC der MS | T2 N1 Mx; Stadium 3; R0; G2 |
| 30 | C 14531-02 | m | 66,8 | B | pos. (böartige Zellen nachweisbar), Zellbild entspricht PEC der MS | T2 N0 Mx; Stadium 2; R0; G2 |

Tab. 3.6a: Zytologische Daten im Gesamtüberblick

| | DNA-Diagnose | Modalwerte der Peaks (c) | 5c EE | 9c EE | STL.-Aneupl. | Einzelz.-Aneupl. | Ref.-Zellen | Mess-Zellen |
|---|------------------|--------------------------|-------|-------|--------------|------------------|-------------|-------------|
| Zytol. neg. Fälle (n=10) 1 | DNA-euploid | 1,92 | 0 | 0 | nein | nein | 29 | 182 |
| 2 | DNA-euploid | 2,02 | 0 | 0 | nein | nein | 34 | 311 |
| 3 | DNA-euploid | 2,09 | 0 | 0 | nein | nein | 31 | 309 |
| 4 | DNA-euploid | 2,07 | 0 | 0 | nein | nein | 32 | 180 |
| 5 | DNA-euploid | 1,98 | 0 | 0 | nein | nein | 41 | 304 |
| 6 | DNA-euploid | 1,99 | 0 | 0 | nein | nein | 31 | 338 |
| 7 | DNA-euploid | 2,01 | 0 | 0 | nein | nein | 30 | 300 |
| 8 | DNA-euploid | 2,01 | 0 | 0 | nein | nein | 35 | 362 |
| 9 | DNA-euploid | 1,96 | 0 | 0 | nein | nein | 30 | 297 |
| 10 | DNA-euploid | 2,00 | 0 | 0 | nein | nein | 30 | 137 |
| Zytol. zweifelh. Fälle (n=8) 11 | DNA-aneuploid | 2,00 | 10 | 1 | ja | ja | 32 | 287 |
| | | 3,39 | | | | | | |
| | | 5,98 | | | | | | |
| 12 | DNA-aneuploid | 2,03 | 14 | 0 | ja | nein | 35 | 264 |
| | | 3,55 | | | | | | |
| 13 | DNA-aneuploid | 1,88 | 51 | 6 | ja | ja | 30 | 333 |
| | | 3,54 | | | | | | |
| | | 6,64 | | | | | | |
| 14 | DNA-aneuploid | 1,88 | 21 | 1 | ja | ja | 30 | 132 |
| | | 3,45 | | | | | | |
| 15 | DNA-euploid | 1,92 | 0 | 0 | nein | nein | 30 | 354 |
| 16 | DNA-euploid (FN) | 1,98 | 2 | 0 | nein | nein | 30 | 278 |
| | | 4,04 | | | | | | |
| 17 | DNA-euploid | 2,01 | 0 | 0 | nein | nein | 30 | 155 |
| | | - | | | | | | |
| 18 | DNA-aneuploid | 2,00 | 14 | 0 | ja | nein | 34 | 304 |
| | | 3,02 | | | | | | |
| Zytol. pos. Fälle (n=12) 19 | DNA-aneuploid | 2,63 | 100 | 7 | ja | ja | 9 | 156 |
| | | 5,35 | | | | | | |
| 20 | DNA-aneuploid | 2,23 | 150 | 28 | ja | ja | 30 | 315 |
| | | 3,89 | | | | | | |
| | | 7,19 | | | | | | |
| 21 | DNA-aneuploid | 1,84 | 20 | 3 | ja | ja | 31 | 310 |
| | | 3,53 | | | | | | |
| 22 | DNA-aneuploid | 2,33 | 15 | 6 | ja | ja | 41 | 241 |
| | | 4,45 | | | | | | |
| 23 | DNA-aneuploid | 2,06 | 2 | 0 | ja | nein | 36 | 150 |
| | | 3,56 | | | | | | |
| 24 | DNA-aneuploid | 1,94 | 22 | 4 | ja | ja | 61 | 179 |
| | | 3,48 | | | | | | |
| | | 6,26 | | | | | | |
| 25 | DNA-aneuploid | 1,95 | 13 | 1 | nein | ja | 36 | 250 |
| | | 3,68 | | | | | | |
| 26 | DNA-euploid (FN) | 2,11 | 4 | 0 | nein | nein | 33 | 297 |
| | | 4,08 | | | | | | |
| 27 | DNA-aneuploid | 2,03 | 26 | 3 | ja | ja | 30 | 143 |
| | | 3,50 | | | | | | |
| | | 7,21 | | | | | | |
| 28 | DNA-aneuploid | 1,97 | 82 | 3 | ja | ja | 34 | 300 |
| | | 3,62 | | | | | | |
| | | 7,04 | | | | | | |
| 29 | DNA-aneuploid | 2,06 | 36 | 0 | ja | nein | 39 | 331 |
| | | 3,20 | | | | | | |
| | | 5,73 | | | | | | |
| 30 | DNA-aneuploid | 1,96 | 78 | 3 | ja | ja | 30 | 333 |
| | | 3,01 | | | | | | |
| | | 5,78 | | | | | | |

Tab. 3.6b: Zytologische Daten und DNA-zytometrische Ergebnisse im Gesamtüberblick

| | Histogramm- typ | Malig- nitäts- grad | Manuelle AgNOR- Anal.: Ø- Anzahl | Autom. AgNOR- Anal.: Ø Anzahl | Ø absol. AgNOR- Fläche/Zell- kern (µm ²) | Ø Zellkern- fläche (µm ²) | | |
|---|------------------------|---------------------------|---|--|---|--|---------------------|---------------------------------------|
| Zytol. neg. Fälle(n=10) 1 | DNA-diploid | - | 3,89 | 5,7 | 11,6 | 69,5 | | |
| 2 | DNA-diploid | - | 3,67 | 5,3 | 8,5 | 58,6 | | |
| 3 | DNA-diploid | - | 3,00 | 5,2 | 7,5 | 63,9 | | |
| 4 | DNA-diploid | - | 4,49 | 5,3 | 14,5 | 67,2 | | |
| 5 | DNA-diploid | - | 3,86 | 5,7 | 22,5 | 69,1 | | |
| 6 | DNA-diploid | - | 3,75 | 4,3 | 8,3 | 77,4 | | |
| 7 | DNA-diploid | - | 3,49 | 4,5 | 10,9 | 53,1 | | |
| 8 | DNA-diploid | - | 4,24 | 5,5 | 22,6 | 57,8 | | |
| 9 | DNA-diploid | - | 2,30 | 4,0 | 12,3 | 52,7 | | |
| 10 | DNA-diploid | - | 3,69 | 6,1 | 15,9 | 63,7 | | |
| Zytol. zweifelh. Fälle (n=8) 11 | DNA- multiploid | Grad IV | 6,20 | 6,4 | 13,0 | 86,2 | | |
| 12 | DNA-x-ploid | Grad III | 5,85 | 4,3 | 6,7 | 77,5 | | |
| 13 | DNA- multiploid | Grad IV | 5,23 | 4,5 | 9,4 | 65,9 | | |
| 14 | DNA-x-ploid | Grad III | 5,51 | 7,6 | 17,3 | 102,0 | | |
| 15 | DNA-diploid | - | 3,72 | 3,9 | 2,7 | 70,5 | | |
| 16 | DNA-polyploid | - | 5,13 | 5,6 | 7,7 | 56,6 | | |
| 17 | DNA-diploid | - | 4,25 | 4,9 | 6,7 | 60,1 | | |
| 18 | DNA-x-ploid | Grad III | 6,22 | 5,4 | 20,7 | 73,8 | | |
| Zytol. pos. Fälle(n=12) 19 | DNA- multiploid | Grad IV | 6,77 | 5,7 | 17,2 | 89,9 | | |
| 20 | DNA- multiploid | Grad IV | 9,15 | 8,8 | 19,7 | 115,4 | | |
| 21 | DNA-x-ploid | Grad III | 5,36 | 6,9 | 22,4 | 91,7 | | |
| 22 | DNA- multiploid | Grad IV | 7,48 | 3,7 | 12,2 | 61,0 | | |
| 23 | DNA-x-ploid | Grad III | 6,62 | 4,4 | 12,1 | 57,3 | | |
| 24 | DNA- multiploid | Grad IV | wg. Überfärbung nicht mögl. | | | | | |
| 25 | DNA- peritetraploid | Grad II | 7,23 | 5,2 | 19,1 | 77,2 | | |
| 26 | DNA-polyploid | - | 6,21 | 5,8 | 12,0 | 102,2 | | |
| 27 | DNA- multiploid | Grad IV | 7,21 | 3,9 | 5,8 | 62,2 | | |
| 28 | DNA-x-ploid | Grad III | 8,75 | 6,8 | 20,0 | 111,6 | | |
| 29 | DNA- multiploid | Grad IV | 7,90 | 7,5 | 32,4 | 106,5 | | |
| 30 | DNA- multiploid | Grad IV | 8,83 | wg. Überfärbung nicht mögl. | | | | |
| | | | | | | | Abkürzungen: | |
| | | | | | | | Regeneratepith. | Regeneratepithelien |
| | | | | | | | w | weiblich |
| | | | | | | | m | männlich |
| | | | | | | | Nr. | Nummer |
| | | | | | | | Entzdg. | Entzündung |
| | | | | | | | Komp. | Komponente |
| | | | | | | | wahrsch. | wahrscheinlich |
| | | | | | | | d. V. | dringender Verdacht |
| | | | | | | | neg. | Tumorzell-negativ |
| | | | | | | | zweifelh. | zweifelhaft |
| | | | | | | | pos. | Tumorzell-positiv |
| | | | | | | | Geschl. | Geschlecht |
| | | | | | | | histol. | histologisch |
| | | | | | | | klin. | klinisch |
| | | | | | | | zytol. | zytologisch |
| | | | | | | | V. a. | Verdacht auf |
| | | | | | | | PE | Probeexzision |
| | | | | | | | MS | Mundschleimhaut |
| | | | | | | | PEC | Plattenepithelkarzi- nom |
| | | | | | | | FN | falsch negativ |
| | | | | | | | 5c EE | 5c Exceeding Events |
| | | | | | | | 9c EE | 9c Exceeding Events |
| | | | | | | | STL | Stammlinie |
| | | | | | | | Einzelz.- | Einzelzell- |
| | | | | | | | Aneupl. | Aneuploidie |
| | | | | | | | Ref.- | Referenz |
| | | | | | | | B | konvent. Bürsten- abstrichpräparat |
| | | | | | | | M | Monolayer- Präparat |

Tab. 3.6c: Histogrammtypen sowie Ergebnisse der manuellen und automatischen AgNOR-Analyse im Gesamtüberblick

Von den 30 DNA-Messungen waren 14 (46,7 %) DNA-euploid. 16 (53,3 %) Messungen wurden als DNA-aneuploid interpretiert. Dabei gingen durchschnittlich 33 Referenzzellen und 261 Messzellen in die Untersuchung ein. Das histologische bzw. klinische Follow-up ergab in elf Fällen eine gutartige Mundschleimhautveränderung und in 18 Fällen eine bösartige Veränderung der Mundschleimhaut; für einen Fall war ein Follow-up nicht zu ermitteln. Dementsprechend hatten zwei DNA-zytometrisch als euploid interpretierte Fälle eine falsch negative Diagnose. Falsch positive DNA-zytometrische Diagnosen sind nicht zu verzeichnen. Für die Annahme von DNA-Aneuploidie waren in vier Fällen nur atypische Stammlinienlagen (= Stammlinienaneuploidie), in einem Fall nur das Vorkommen von Zellen $> 9c$ (= Einzelzellaneuploidie) und in elf Fällen eine Stammlinien- und Einzelzellaneuploidie in Kombination zu verzeichnen.

Bei den zehn zytologisch Tumorzell-negativen Präparaten war die DNA-zytometrische Diagnose in allen Fällen DNA-euploid. Der Histogrammtyp stellte sich in diesen zehn Proben als DNA-diploid heraus.

Fünf der acht zytologisch zweifelhaften Präparate hatten eine DNA-aneuploide DNA-zytometrische Diagnose, die restlichen drei waren DNA-euploid. Darunter befand sich eine der zwei falsch negativen Diagnosen; der Histogrammtyp dieses Falles war DNA-polyploid.

Die Histogrammtypisierungen der restlichen sieben zytologisch zweifelhaften Präparate ergaben in zwei Fällen einen diploiden, in drei Fällen einen x-ploiden und in zwei Fällen einen multiploiden Histogrammtyp.

Bei den zwölf zytologisch Tumorzell-positiven Fällen gab es DNA-zytometrisch eine DNA-euploide Diagnose zu verzeichnen; diese war gleichzeitig die falsch negative mit einem DNA-polyploiden Histogrammtyp. Die restlichen elf Präparate waren DNA-aneuploid. Bei den Histogrammtypen war ein DNA-peritetraploider, drei DNA-x-ploide und sieben DNA-multiploide Verteilungen festzustellen.

Mit Hilfe der manuellen AgNOR-Analyse wurden für die zehn zytologisch Tumorzell-negativen Fälle aus 100 Zellen eine durchschnittliche Anzahl von 3,64 AgNORs (2,3 – 4,49 AgNORs; SD: $\pm 0,62$ AgNORs) pro Zellkern ermittelt. Die automatische AgNOR-Analyse dagegen ergab eine durchschnittliche Anzahl von 5,16 AgNORs (4 – 6,1 AgNORs; SD: $\pm 0,68$ AgNORs) pro Zellkern. Außerdem konnten mit der automatischen AgNOR-Analyse noch andere Werte, wie die durchschnittliche absolute AgNOR-Fläche pro Zellkern

in μm^2 , die für die zehn zytologisch Tumorzell-negativen Fälle einen Mittelwert von $13,46 \mu\text{m}^2$ ($7,5 - 22,6 \mu\text{m}^2$; SD: $\pm 5,48 \mu\text{m}^2$) ergab sowie die durchschnittliche Zellkernfläche in μm^2 , die für die Tumorzell-negativen Präparate $63,30 \mu\text{m}^2$ ($52,7 - 77,4 \mu\text{m}^2$; SD: $\pm 7,86 \mu\text{m}^2$) betrug, ermittelt werden.

Der Mittelwert der manuell ermittelten AgNOR-Anzahlen der acht zytologisch zweifelhaften Fälle betrug 5,26 AgNORs ($3,72 - 6,22$ AgNORs; SD: $\pm 0,9$ AgNORs) aus 100 Zellen pro Präparat, der der automatisch ermittelten AgNOR-Anzahlen lag bei 5,33 AgNORs ($3,9 - 7,6$ AgNORs; SD: $\pm 1,22$ AgNORs).

Der Mittelwert der durchschnittlich absoluten AgNOR-Fläche pro Zellkern lag hierbei $10,53 \mu\text{m}^2$ ($2,7 - 20,7 \mu\text{m}^2$; SD: $\pm 6,04 \mu\text{m}^2$). Der Mittelwert der durchschnittlichen Zellkernfläche errechnete sich zu $74,08 \mu\text{m}^2$ ($56,6-102 \mu\text{m}^2$; SD: $\pm 14,73 \mu\text{m}^2$).

Elf der zwölf zytologisch Tumorzell-positiven Präparate konnten in die manuelle AgNOR-Analyse eingehen; zehn waren für die automatische AgNOR-Analyse geeignet. Zwei Präparate waren stark überfärbt; eines davon konnte aus diesem Grund nicht in die AgNOR-Analyse eingehen, das andere war nur manuell zu interpretieren. $7,41$ AgNORs ($5,36 - 9,15$ AgNORs; SD: $\pm 1,18$ AgNORs) aus 100 Zellkernen pro Präparat wurde mit Hilfe der manuellen AgNOR-Analyse bei den Tumorzell-positiven Präparaten ermittelt. Durch die automatische Analyse ergab sich ein Mittelwert von $5,87$ AgNORs ($3,7 - 8,8$ AgNORs; SD: $\pm 1,65$ AgNORs) pro Präparat für die Tumorzell-positiven Fälle. Hier zeigte sich außerdem ein Mittelwert von $17,29 \mu\text{m}^2$ ($5,8 - 32,4 \mu\text{m}^2$; SD: $\pm 7,33 \mu\text{m}^2$) für die durchschnittliche absolute AgNOR-Fläche pro Zellkern und ein Mittelwert von $87,5 \mu\text{m}^2$ ($57,3 - 115,4 \mu\text{m}^2$; SD: $\pm 21,91 \mu\text{m}^2$) für die durchschnittliche Zellkernfläche.

Die diagnostische Treffsicherheit der DNA-Zytometrie alleine lag bei $93,1 \%$ (Sensitivität: $88,9 \%$; Spezifität: 100%) (für 29 Fälle mit Follow-up).

Remmerbach et al. (2003b) ermittelten einen Schwellenwert von $4,8$ AgNORs pro Zellkern, um gutartige von bösartigen Zellen der Mundschleimhaut zu trennen. Interpretiert man die in der Multimodalen Zellanalyse mit Hilfe der manuellen AgNOR-Analyse gefundenen durchschnittlichen AgNOR-Anzahlen pro Zellkern gemäß dieses Schwellenwerts, so ergibt sich eine diagnostische Treffsicherheit von 100% (Sensitivität: 100% ; Spezifität: 100%). Demzufolge wurden die beiden DNA-zytometrisch falsch negativen Präparate durch die anschließende manuelle AgNOR-Analyse noch korrekt als bösartig erkannt. Hier wird der

diagnostische Mehrwert der Multimodalen Zellanalyse besonders deutlich, da in dieser Arbeit alle diagnostischen Methoden in Kombination am selben Präparat zu einer diagnostischen Treffsicherheit von 100 % führten.

In Kapitel 3.2.1 ist beschrieben, aus welchen Gründen die automatische AgNOR-Analyse nicht zu aussagekräftigen bzw. verlässlichen Werten führte, weshalb sie zur diagnostischen Interpretation hier nicht herangezogen wurde.

3.5 Auswertung der DNA-Zytometrie

3.5.1 Qualitätssicherung

Grundsätzlich wurden in dieser Studie verschiedene qualitätssichernde Kriterien für die DNA-Zytometrie betrachtet. Der Vergleich der Messergebnisse der beiden Systeme (die DNA-Zytometrie am Cytometer der MMZA und die des etablierten AutoCyte QUIC-DNA-Systems) diene der Kontrolle der Messgenauigkeit der DNA-Zytometrie des neuen Labormusters der Multimodalen Zellanalyse. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Kapitel 3.5.2 beschrieben.

Andererseits sollten beide Messsysteme für sich auch den Qualitätsvorgaben der ESACP (European Society for Analytical Cellular Pathology) genügen. Zur Erzielung einer hohen Messpräzision der DNA-Bildzytometrie sind von der ESACP Qualitätsvorgaben bezüglich der erforderlichen hardware- und softwaremäßigen Gerätebedingungen angegeben, die mittlerweile europaweit standardisiert sind. In den „Consensus Reports of the ESACP Task Force on Standardization of Diagnostic DNA Image Cytometry“ der ESACP sind detaillierte Richtlinien sowie Maßnahmen der Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle publiziert (Giroud et al. 1998; Haroske et al. 1998, 2001).

Wesentliche Aspekte der Maßnahmen zur Qualitätssicherung und Kontrolle, abgesehen von der Ablehnung diagnostischer DNA-Messungen an Gewebeschnitten, sind:

- die Bevorzugung interner Referenzzellen (mindestens 30 Stück),
- ein Variationskoeffizient (CV) der Referenzzellen von $< 5\%$
- und eine Korrelation ihrer Fläche mit der integrierten optischen Dichte (IOD) von $r < 0,4$ (auch „CC“ genannt).

In die 30 Messungen der Multimodalen Zellanalyse gingen durchschnittlich 33 Referenzzellen und 261 Messzellen ein. Der Variationskoeffizient (CV) der Referenzzellen

betrug hier im Mittel 5,6 %, der Korrelationseffizient r ihrer Fläche mit der integrierten optischen Dichte lag im Durchschnitt bei 0,14.

Mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System wurden durchschnittlich 31 Referenzzellen und 275 Messzellen untersucht. Der Variationskoeffizient (CV) der Referenzzellen ergab einen Mittelwert von 3,1 %, der Korrelationseffizient r ihrer Fläche mit der integrierten optischen Dichte lag im Mittel bei 0,1.

Außerdem wurden in Anlehnung an die Richtlinien der ESACP (Giroud et al. 1998) standardisierte Testmessungen an Rattenleberpräparaten zur Qualitätskontrolle der Messpräzision an beiden Systemen durchgeführt. Die drei identischen Rattenleberpräparate (A, B, C) wurden in einem zeitlichen Abstand von vier Monaten einerseits mit der Multimodalen Zellanalyse und andererseits mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System gemessen. Dabei existierten bei der Messung mit der Multimodalen Zellanalyse zu jedem der drei Rattenleberpräparate jeweils drei Messungen. Mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System wurde jedes Präparat nur einmal vermessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tab. 3.7 ersichtlich.

Folgende Qualitätsmaße sind bei der Beurteilung der Rattenleberpräparate zu beachten:

- Coefficient of variation (CV) jedes Peaks jedes Zelltyps auf jedem Abdruck < 5 %,
- CV der Quotienten der Mittelwerte der Peaks zwischen Referenz- und Analysezellen auf jedem Abdruck < 2 %,
- CV der Quotienten der Mittelwerte der Peaks zwischen tetraploiden und diploiden Analysezellen der Abdrücke < 1 %,
- Correlation Coefficient (CC; auch „ r “) Korrelationskoeffizient zwischen Kernfläche und IOD jedes Peaks < 0,4 (Giroud et al 1998).

Mit zwei Ausnahmen wurden bei allen Messungen der Multimodalen Zellanalyse sämtliche Standards eingehalten. Die beiden Ausnahmen beziehen sich auf den Korrelationskoeffizienten CC des 2c-Peaks, der jeweils in der dritten Messung bei dem Rattenleberpräparat A und B die Grenze von 0,4 geringfügig überschritt (Rattenleberpräparat A: 0,42; Rattenleberpräparat B: 0,47).

Werden allerdings aus den drei Messungen mit der MMZA für jedes Rattenleberpräparat A, B und C die Mittelwerte für die einzelnen Qualitätsmerkmale errechnet, so dass jeweils nur ein Wert entsteht, der mit dem des AutoCyte QUIC-DNA-Systems zu vergleichen ist, so stellt

sich heraus, dass alle Messungen der MMZA unterhalb der von der ESACP geforderten Sollwerte liegen und somit von ihr alle Standards eingehalten werden.

Bei der Messung mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System gab es zwei CC-Wert-Erhöhungen über dem Optimum, die beide Male das Rattenleberpräparat B betrafen. Der CC des 2c-Peaks kam bei 0,66 zu liegen, der CC der Referenzzellen lag bei 0,62. Außerdem war bei der Messung mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System eine Überschreitung der CV-Werte aller 2c-Peaks, aller 4c-Peaks und des Quotienten $4c / 2c$ zu bemerken. Der CV-Wert aller 2c-Peaks lag bei 2,5 % (Soll < 2 %), der CV-Wert aller 4c-Peaks hatte den Wert von 3,1 % (Soll < 2 %) und der Quotient der CV-Werte $4c / 2c$ war mit 1,2 % (Soll < 1 %) geringfügig erhöht.

Durch Verlust des Datenmaterials sind die Werte für den CC des 4c-Peaks aller drei Rattenleberpräparate bei der Messung des AutoCyte QUIC-DNA-System leider nicht mehr nachvollziehbar.

| | Messung MMZA | | | | | | | | | | | | Messung AutoCyte QUIC-DNA-System | | |
|--|---------------|---------|----------|-------------|---------------|---------|----------|-------------|---------------|---------|---------|-------------|----------------------------------|---------------|---------------|
| | Rattenleber A | | | | Rattenleber B | | | | Rattenleber C | | | | Rattenleber A | Rattenleber B | Rattenleber C |
| | Mess. 1 | Mess. 2 | Mess. 3 | MW | Mess. 1 | Mess. 2 | Mess. 3 | MW | Mess. 1 | Mess. 2 | Mess. 3 | MW | Messung | Messung | Messung |
| Modalwert 2c | 2,03 | 2,01 | 2,03 | 2,02 | 2,03 | 1,98 | 2,00 | 2,00 | 2,02 | 2,00 | 2,00 | 2,01 | 1,95 | 1,88 | 1,86 |
| Modalwert 4c | 4,02 | 4,00 | 4,06 | 4,03 | 4,04 | 3,96 | 4,04 | 4,01 | 4,03 | 3,98 | 3,99 | 4,00 | 4,15 | 4,05 | 3,90 |
| 4c / 2c | 1,98 | 1,99 | 2,00 | 1,99 | 1,99 | 2,00 | 2,02 | 2,00 | 2,00 | 1,99 | 2,00 | 2,00 | 2,13 | 2,15 | 2,10 |
| CV (%) des 2c-Peaks (Soll: <5 %) | 2,6 | 2,02 | 1,75 | 2,12 | 3,28 | 2,93 | 1,54 | 2,58 | 2,54 | 2,68 | 1,8 | 2,34 | 2,78 | 2,97 | 3,06 |
| CV (%) des 4c-Peaks (Soll: <5 %) | 1,64 | 1,64 | 1,61 | 1,63 | 2,74 | 2,70 | 1,31 | 2,25 | 1,92 | 1,92 | 1,46 | 1,77 | 4,04 | 3,37 | 2,50 |
| CV (%) der Referenzzellen (Soll: <5 %) | 1,87 | 1,63 | 1,94 | 1,81 | 2,84 | 1,85 | 1,35 | 2,01 | 2,21 | 1,48 | 1,9 | 1,86 | 3,75 | 3,25 | 2,75 |
| CC des 2c-Peaks (Soll: <0,4) | 0,05 | 0,02 | 0,42 (↑) | 0,16 | 0,05 | 0,25 | 0,47 (↑) | 0,26 | 0,21 | 0,08 | 0,23 | 0,17 | -0,17 | 0,66 (↑) | -0,01 |
| CC des 4c-Peaks (Soll: <0,4) | 0,10 | 0,06 | 0,31 | 0,16 | 0,19 | 0,10 | 0,16 | 0,15 | 0,10 | 0,13 | 0,15 | 0,13 | | | |
| CC der Referenzzellen (Soll: <0,4) | 0,05 | 0,01 | 0,22 | 0,09 | 0,03 | 0,05 | 0,05 | 0,04 | 0,00 | 0,04 | 0,02 | 0,02 | 0,29 | 0,62 (↑) | 0,37 |
| CV aller 2c-Peaks (%) (Soll: <2 %) | 0,88 | | | | | | | | | | | | 2,49 (↑) | | |
| CV aller 4c-Peaks (%) (Soll: <2 %) | 0,82 | | | | | | | | | | | | 3,12 (↑) | | |
| CV von 4c / 2c (%) (Soll: <1 %) | 0,55 | | | | | | | | | | | | 1,18 (↑) | | |

Tab. 3.7: Messergebnisse der DNA-Analyse der Rattenleber aus beiden Messsystemen im Vergleich
(Mess.: Messung; MW: Mittelwert; (↑): Überschreitung des Sollwerts)

3.5.2 DNA-Zytometrie: MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System

Tab. 3.8 listet ausführlich die DNA-zytometrischen Ergebnisse der beiden Messsysteme auf. Jedes Präparat wurde nach der Feulgen-Färbung zunächst mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System und anschließend mit der Multimodalen Zellanalyse vermessen.

Die mit Filzschreiber markierten Areale auf dem Objektträger waren in der Multimodalen Zellanalyse ausschließlich Gegenstand der Untersuchung. Im Nachhinein war festzustellen, dass mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System auch Zellen außerhalb der Regions of Interest in die Messung mit eingingen. Dies geschah, wenn in den Kringeln nicht genügend interessante Analysezellen vorhanden waren, um die geforderte Anzahl von 300 zu erreichen, und dann außerhalb gesucht wurde, um genügend Zellen zu messen. Dieser Fakt verursachte leichte Unterschiede in den Messergebnissen und ist bei der Bewertung dieser zu beachten.

Die Diagnosen der DNA-Zytometrie waren bei beiden Messsystemen bei allen 30 Fällen identisch. Beide Messsysteme diagnostizierten in 14 Fällen (46,7 %) DNA-Euploidie und in 16 Fällen (53,3 %) DNA-Aneuploidie. Das histologische bzw. klinische Follow-up konnte in 29 Fällen ermittelt werden, Daten zu einem zytologisch Tumorzell-negativen Fall waren nicht auffindbar. Elf Patienten zeigten im Follow-up eine gutartige und 18 Patienten eine bösartige Mundschleimhautveränderung.

Die DNA-Histogramm-Peaks, die ein statistisch signifikantes lokales Maximum eines DNA-Histogramms darstellen, wurden ermittelt und ihr Modalwert berechnet. Der Modalwert eines Histogramm-Peaks beinhaltet den häufigsten Wert eines Peaks. Die Modalwerte aller gefundenen Peaks sind in Tab. 3.8 aufgelistet. Auch die Modalwerte der Referenzzellpeaks sind mit aufgeführt, um mehr Vergleichswerte zu haben. Nicht in jedem Fall wurden mit der Multimodalen Zellanalyse gleich viele Peaks gefunden. Bei acht Messungen wurde mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System ein zusätzlicher kleiner Peak bei höheren c-Werten gefunden, der jedoch die Diagnostik nicht beeinflusste. In vier Fällen jedoch hat sich dadurch der DNA-Histogrammtyp wie folgt geändert: drei in der MMZA DNA-diploide Histogrammtypen änderten sich entsprechend bei der Messung mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System in DNA-polyploide Histogrammtypen sowie ein DNA-x-ploides Histogramm in einen DNA-multiploiden Histogrammtyp.

| C Nummer Zytologisch Tumorzell-neg. Fälle (n = 10) | Follow-up: histologische bzw. klinische Diagnose | DNA-zytometrische Diagnose | | Modalwerte der Peaks (c) | | Differenz der Modalwerte MMZA - AutoCyte | CV der Referenzzellen (%) | | CV-Differenz (%) MMZA - AutoCyte | DNA-Histogrammtyp | |
|---|---|----------------------------|-------------|-----------------------------|---------------|--|------------------------------|---------------|--|--|-----------|
| | | MMZA | AutoCyte | MMZA | Auto- Cyte | | MMZA | Auto- Cyte | | MMZA | AutoCyte |
| C 10100-02 | Karte nicht auffindbar | DNA-euploid | DNA-euploid | 1,92 | 2,10 | -0,18 | 4,78 | 2,89 | 1,89 | diploid | diploid |
| C 10182-02 | histol. und klin.: Lichen planus | DNA-euploid | DNA-euploid | 2,02 | 1,95 | 0,07 | 5,77 | 2,83 | 2,94 | diploid | diploid |
| C 10231-02 | histol. und klin.: Lichen planus (Gingivitis desquamativa) | DNA-euploid | DNA-euploid | 2,09 | 2,00 | 0,09 | 4,90 | 3,77 | 1,13 | diploid | diploid |
| C 10344-02 | keine PE durchgeführt; Leukoplakia simplex | DNA-euploid | DNA-euploid | 2,07 | 2,03 | 0,04 | 21,55 | 3,09 | 18,46 | diploid | diploid |
| C 10632-02 | keine PE durchgeführt; klin.: Leukoplakie+Alkoholuvulosis | DNA-euploid | DNA-euploid | 1,98 | 4,10 | -0,15 | 4,32 | 0,97 | 3,35 | diploid | polyploid |
| C 12205-02 | keine PE durchgeführt; traumabedingtes Ulkus | DNA-euploid | DNA-euploid | 1,99 | 2,00 | -0,01 | 2,77 | 2,60 | 0,17 | diploid | diploid |
| C 12760-02 | histol.: Hyperkeratose; klin.: Hyperkeratose im Sinne einer Leukoplakie | DNA-euploid | DNA-euploid | 2,01 | 2,05 | -0,04 | 3,51 | 3,47 | 0,04 | diploid | diploid |
| C 13105-02 | histol.: chron. rezidiv. ulceröse Stomatitis; klin.: asthmaspraybedingte ulceröse Stomatitis | DNA-euploid | DNA-euploid | 2,01 | 2,04 | -0,03 | 2,89 | 2,18 | 0,71 | diploid | diploid |
| C 13391-02 | keine PE durchgeführt; klin.: V. a. Leukokeratose | DNA-euploid | DNA-euploid | 1,96 | 1,99 | -0,03 | 4,14 | 2,45 | 1,69 | diploid | diploid |
| C 13723-02 | keine PE durchgeführt; klin.: leukoplakische Veränderung | DNA-euploid | DNA-euploid | 2,00 | 2,06 | -0,06 | 2,72 | 2,80 | -0,08 | diploid | diploid |
| Mittelwert: | | | | | | -0,03 | 5,74 | 2,71 | 3,03 | | |
| Standardabweichung: | | | | | | 0,09 | 5,65 | 0,77 | 5,55 | | |
| Minimum: | | | | | | -0,18 | 2,72 | 0,97 | -0,08 | Übereinstimmungen in den Histogrammtypen: | |
| Maximum: | | | | | | 0,09 | 21,55 | 3,77 | 18,46 | | |
| Mittelwert der Beträge: | | | | | | 0,07 | | | 3,05 | 9 von 10 | |
| Standardabweichung der Beträge: | | | | | | 0,06 | | | 5,54 | | |
| Minimum der Beträge: | | | | | | 0,01 | | | 0,04 | | |
| Maximum der Beträge: | | | | | | 0,18 | | | 18,46 | | |
| Ø-Abweichung der Modalwerte der MMZA vs. AutoCyte nach unten (c): -0,07 (7 STL) | | | | | | Ø-Abweichung der Modalwerte der MMZA vs. AutoCyte nach oben (c): 0,07 (3STL) | | | | | |
| Ø-Abweichung der Modalwerte des 2c-Peaks vom 2,00c-Wert: MMZA: 0,04 (SD: ±0,03; Min: 0,00; Max: 0,09) | | | | | | AutoCyte: 0,05 (SD: ±0,04; Min: 0,00; Max: 0,13) | | | | | |

Tab. 3.8a: Vergleich der DNA-Zytometrien der zehn zytologisch Tumorzell-negativen Fälle: MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System

| C Nummer Zytologisch zweifelhafte Fälle (n = 8) | Follow-up: histologische bzw. klinische Diagnose | DNA-zytometrische Diagnose | | Modalwerte der Peaks (c) | | Differenz der Modalwerte MMZA - AutoCyte | CV der Referenzzellen (%) | | CV-Diffe- renz (%) MMZA - AutoCyte | DNA-Histogrammtyp | |
|---|--|----------------------------|------------------|-----------------------------|---------------|---|------------------------------|---------------|---|---|------------|
| | | MMZA | AutoCyte | MMZA | Auto- Cyte | | MMZA | Auto- Cyte | | MMZA | AutoCyte |
| C 8760-02 | T1 NX MX; Stadium 1; R1; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 2,05 | 2,00 | 0,05 | 4,71 | 2,80 | 1,91 | multiploid | multiploid |
| | | | | 3,39 | 3,59 | -0,20 | | | | | |
| | | | | 5,98 | 5,83 | 0,15 | | | | | |
| C 8996-02 | T2 N0 MX; Stadium 2; R0; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 2,03 | 2,04 | -0,01 | 3,49 | 3,10 | 0,39 | x-ploid | x-ploid |
| | | | | 3,55 | 3,54 | 0,01 | | | | | |
| C 10783-02 | keine OP; klin.: T4 N2b M0; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 1,88 | 1,95 | -0,07 | 4,71 | 3,81 | 0,90 | multiploid | x-ploid |
| | | | | 3,54 | 3,70 | -0,16 | | | | | |
| | | | | 6,64 | 6,41 | 0,23 | | | | | |
| C 11231-02 | T2 N0 MX; Stadium 2; R0; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 1,88 | 1,88 | 0,00 | 5,32 | 4,10 | 1,22 | x-ploid | x-ploid |
| | | | | 3,45 | 3,97 | -0,52 | | | | | |
| | | | | | 7,70 | | | | | | |
| C 11345-02 | epitheliale Hyperplasie | DNA-euploid | DNA-euploid | 1,92 | 2,08 | -0,16 | 5,22 | 2,80 | 2,42 | diploid | polyploid |
| C 13775-02 | T1 N0 M0; Stadium 1; R0; G2 | DNA-euploid (FN) | DNA-euploid (FN) | 1,98 | 2,08 | -0,10 | 4,40 | 3,13 | 1,27 | polyploid | polyploid |
| | | | | 4,04 | 4,00 | 0,04 | | | | | |
| C 14336-02 | klin.: Leukoplakie; histol.: Hyperkeratose | DNA-euploid | DNA-euploid | 2,01 | 1,96 | 0,05 | 4,95 | 4,71 | 0,24 | diploid | polyploid |
| C 14535-02 | keine OP; klinisch: T3 N2b MX; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 2,00 | 2,11 | -0,11 | 3,20 | 2,29 | 0,91 | x-ploid | multiploid |
| | | | | 3,02 | 3,13 | -0,11 | | | | | |
| | | | | | 5,99 | | | | | | |
| Mittelwert: | | | | | | -0,06 | 4,50 | 3,34 | 1,16 | Übereinstimmungen in den Histogrammtypen: 4 von 8 | |
| Standardabweichung: | | | | | | 0,17 | 0,77 | 0,80 | 0,73 | | |
| Minimum: | | | | | | -0,52 | 3,20 | 2,29 | 0,24 | | |
| Maximum: | | | | | | 0,23 | 5,32 | 4,71 | 2,42 | | |
| Mittelwert der Beträge: | | | | | | 0,12 | | | 1,16 | | |
| Standardabweichung der Beträge: | | | | | | 0,13 | | | 0,73 | | |
| Minimum der Beträge: | | | | | | 0,00 | | | 0,24 | | |
| Maximum der Beträge: | | | | | | 0,52 | | | 2,42 | | |
| Ø-Abweichung der Modalwerte der MMZA vs. AutoCyte nach unten (c): -0,16 (9STL) Ø-Abweichung der Modalwerte der MMZA vs. AutoCyte nach oben (c): 0,096 (5STL) | | | | | | | | | | | |
| Keine Abweichung der Modalwerte MMZA versus AutoCyte: bei 1 Stammlinie | | | | | | | | | | | |

Tab. 3.8b: Vergleich der DNA-Zytometrien der acht zytologisch zweifelhaften Fälle: MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System

| C Nummer Zytologisch Tumorzell-pos. Fälle (n = 12) | Follow-up: histologische bzw. klinische Diagnose | DNA-zytometrische Diagnose | | Modalwerte der Peaks (c) | | Differenz der Modalwerte MMZA - AutoCyte | CV der Referenzzellen (%) | | CV-Diffe- renz (%) MMZA - AutoCyte | DNA-Histogrammtyp | |
|---|--|----------------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|---|---------------------------------|---------------|---|---------------------|---------------------|
| | | MMZA | AutoCyte | MMZA | Auto- Cyte | | MMZA | Auto- Cyte | | MMZA | AutoCyte |
| C 1912-01 | T3 N2b MX; Stadium 4a; R0; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 2,63 5,35 | 2,80 5,83 | -0,17 -0,48 | 19,18 | 2,67 | 16,51 | multiploid | multiploid |
| C 8399-02 | T2 N0 MX; Stadium 2; R0; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 2,23 3,89 7,19 | 2,00 3,39 6,47 12,27 | 0,23 0,50 0,72 | 6,15 | 3,52 | 2,63 | multiploid | multiploid |
| C 9639-02 | keine OP; klin.: T4 N2b M0; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 1,84 3,53 | 2,05 3,69 6,61 | -0,21 -0,16 | 3,97 | 2,56 | 1,41 | x-ploid | x-ploid |
| C 10777-02 | T4 N2b MX; Stadium 4a; R0; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 2,33 4,45 | 2,09 3,74 7,35 | 0,24 0,71 | 4,75 | 4,85 | -0,10 | multiploid | x-ploid |
| C 10778-02 | T2 N1 MX; Stadium 2; R0; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 2,06 3,56 | 2,15 3,49 | -0,09 0,07 | 4,60 | 4,88 | -0,28 | x-ploid | x-ploid |
| C 10780-02 | T4 N2b MX; Stadium 4; G2 klinisch | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 1,94 3,48 6,26 | 2,02 3,37 6,51 | -0,08 0,11 -0,25 | 4,51 | 2,82 | 1,69 | multiploid | multiploid |
| C 10781-02 | T1 N1 MX; Stadium 3; R0; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 1,95 3,68 | 2,16 3,87 | -0,21 -0,19 | 5,17 | 4,24 | 0,93 | peritetra- ploid | peritetra- ploid |
| C 11071-02 | T2 N1 MX; Stadium 2; R0; G2 | DNA-euploid (FN) | DNA-euploid (FN) | 2,11 4,08 | 1,83 3,63 | 0,28 0,45 | 8,94 | 2,33 | 6,61 | polyploid | polyploid |
| C 12128-02 | T2 N0 MX; Stadium 2; R0; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 2,03 3,50 7,21 | 2,13 3,33 6,99 | -0,10 0,17 0,22 | 6,66 | 3,30 | 3,30 | multiploid | multiploid |
| C 13132-02 | T3 N2c MX; Stadium 4a; R0; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 1,97 3,62 7,04 | 2,00 3,87 7,11 | -0,03 -0,25 -0,07 | 3,40 | 3,76 | -0,36 | x-ploid | x-ploid |
| C 14483-02 | T2 N1 MX; Stadium 3; R0; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 2,06 3,20 5,73 | 2,01 3,28 5,67 | 0,05 -0,08 0,06 | 3,10 | 2,74 | 0,36 | multiploid | multiploid |
| C 14531-02 | T2 N0 MX; Stadium 2; R0; G2 | DNA-aneuploid | DNA-aneuploid | 1,96 3,01 5,78 | 2,00 3,16 6,00 | -0,04 -0,15 -0,22 | 3,76 | 2,66 | 1,10 | multiploid | multiploid |

Tab. 3.8c: Vergleich der DNA-Zytometrien der zwölf zytologisch Tumorzell-positiven Fälle: MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System

| | | | | | | | |
|--|--|--|-------|-------|------|-------|---|
| Mittelwert: | | | 0,03 | 6,18 | 3,36 | 2,82 | Übereinstimmungen in den Histogrammtypen: 11 von 12 |
| Standardabweichung: | | | 0,29 | 4,40 | 0,90 | 4,73 | |
| Minimum: | | | -0,48 | 3,10 | 2,33 | -0,36 | |
| Maximum: | | | 0,72 | 19,18 | 4,88 | 16,51 | |
| Mittelwert der Beträge: | | | 0,22 | | | 2,94 | |
| Standardabweichung der Beträge: | | | 0,18 | | | 4,65 | |
| Minimum der Beträge: | | | 0,03 | | | 0,10 | |
| Maximum der Beträge: | | | 0,72 | | | 16,51 | |
| Ø-Abweichung der Modalwerte der MMZA vs. AutoCyte nach unten (c): -0,16 (17STL) Ø-Abweichung der Modalwerte der MMZA vs. AutoCyte nach oben (c): 0,29 (13STL) | | | | | | | |

| |
|--|
| Mittelwert der Modalwertdifferenzen (c) aller Fälle: -0,01 |
| Standardabweichung der Modalwertdifferenzen (c) aller Fälle: 0,17 |
| Mittelwert der Beträge der Modalwertdifferenzen (c) aller Fälle: 0,16 |
| Standardabweichung der Beträge der Modalwertdifferenzen (c) aller Fälle: 0,16 |
| Minimum der Beträge der Modalwertdifferenzen aller Fälle (c): 0,00 |
| Maximum der Beträge der Modalwertdifferenzen aller Fälle (c): 0,72 |
| Ø-Abweichung der Modalwerte der MMZA vs. AutoCyte aller Fälle nach unten (c): -0,012 (33STL) |
| Ø-Abweichung der Modalwerte der MMZA vs. AutoCyte aller Fälle nach oben (c): 0,021 (22 STL) |
| Keine Abweichung der Modalwerte MMZA versus AutoCyte: bei 1 Stammlinie |

| |
|---|
| Mittelwert der CV-Werte (%) aller Fälle bei der MMZA: 5,58 |
| Mittelwert der CV-Werte (%) aller Fälle des AutoCyte QUIC-DNA-Systems: 3,14 |
| Mittelwert der CV-Wertdifferenzen (%) aller Fälle: 2,45 |
| Standardabweichung der CV-Wertdifferenzen (%) aller Fälle: 4,34 |
| Mittelwert der Beträge der CV-Wertdifferenzen (%) aller Fälle: 2,50 |
| Standardabweichung der Beträge der CV-Wertdifferenzen (%) aller Fälle: 4,30 |
| Minimum der Beträge der CV-Wertdifferenzen aller Fälle (%): 0,04 |
| Maximum der Beträge der CV-Wertdifferenzen aller Fälle (%): 18,46 |
| Mittelwert des CC der Referenzzellen aller 30 Messungen der MMZA: 0,14 |
| Mittelwert des CC der Referenzzellen aller 30 Messungen des AutoCyte QUIC-DNA-Systems: 0,10 |

| Abkürzungen: | | | | | |
|--------------|---------------|-----------|---------------------|------|--------------------------|
| Geschl. | Geschlecht | 5c EE | 5c Exceeding Events | MS | Mundschleimhaut |
| histol. | histologisch | 9c EE | 9c Exceeding Events | PEC | Plattenepithelkarzinom |
| klin. | klinisch | STL | Stammlinie | CV | coefficient of variation |
| zytol. | zytologisch | Einzelz.- | Einzelzell- | CC | correlation coefficient |
| V. a. | Verdacht auf | Aneupl. | Aneuploidie | MMZA | Multimodale Zellanalyse |
| PE | Probeexzision | Ref.- | Referenz | | |

Tab. 3.8d: Fortsetzung von Tab. 3.8c und Gesamtauswertung

In allen Fällen, in denen mit beiden Messsystemen sich entsprechende Peaks gefunden wurden, wurden deren Modalwerte miteinander verglichen. Dazu wurden die Differenzen der Modalwerte (Modalwert der MMZA – Modalwert des AutoCyte QUIC-DNA-Systems) gebildet. Die Beträge dieser Differenzen stellen die absolute Abweichung der Modalwerte voneinander dar.

Im Mittel schwankten die Modalwerte bei den zehn zytologisch Tumorzell-negativen Fällen am geringsten. Die durchschnittliche Differenz der Modalwerte MMZA – AutoCyte QUIC-DNA-System betrug hier $-0,03c$ ($-0,18c - 0,09c$; SD: $\pm 0,09c$), die durchschnittliche Differenz der Modalwerte als Betrag lag bei $0,07c$ ($0,01c - 0,18c$; SD: $\pm 0,06c$). Im Vergleich wichen die Modalwerte der MMZA durchschnittlich um $-0,07c$ bei sieben Stammlinien zu denen des AutoCyte QUIC-DNA-Systems nach unten ab. Bei drei Stammlinien der MMZA gab es eine Abweichung nach oben, die durchschnittlich bei $0,07c$ lag. Bei den Tumorzell-negativen Präparaten wurden ausschließlich gesunde Zellen gemessen, die definitionsgemäß bei $2,00c$ bzw. $4,00c$ ein Histogramm-Peak zeigen würden. Aus diesem Grund bietet es sich an, die Schwankung der $2c$ -Peaks der Tumorzell-negativen Präparate gegenüber dem $2,00c$ -Wert zu ermitteln. Sie ergab für die Multimodale Zellanalyse einen Wert von $0,04c$ ($0,00c - 0,09c$; SD: $\pm 0,03c$). Bei den Messungen des AutoCyte QUIC-DNA-Systems war eine leicht höhere durchschnittliche Abweichung der Modalwerte des $2c$ -Peaks vom $2,00c$ -Wert von $0,05c$ ($0,00c - 0,13c$; SD: $\pm 0,04c$) zu verzeichnen.

Bei den acht zytologisch zweifelhaften Präparaten wichen die Modalwerte der MMZA im Mittel um $-0,06c$ ($-0,52c - 0,23c$; SD: $\pm 0,17c$) von denen des AutoCyte QUIC-DNA-Systems ab. Die absolute Abweichung der Modalwerte (= Differenzen als Betrag) lag hier bei $0,12c$ ($0,00c - 0,52c$; SD: $\pm 0,13c$). Neun Stammlinien der MMZA wichen im Vergleich zum AutoCyte QUIC-DNA-System mit einem durchschnittlichen Modalwert von $-0,16c$ nach unten ab. Bei fünf Stammlinien der MMZA zeigte sich eine durchschnittliche Abweichung der Modalwerte von $0,096c$ nach oben. Eine Stammlinie erhielt bei beiden Messsystemen exakt den gleichen c -Wert.

Die durchschnittliche Differenz der Modalwerte der zwölf zytologisch Tumorzell-positiven Fälle lag bei $0,03c$ ($-0,48c - 0,72c$; SD: $\pm 0,29c$), die Beträge der Differenz der Modalwerte errechneten sich zu einem Wert von $0,22c$ ($0,03c - 0,72c$; SD: $\pm 0,18c$), der damit hier am höchsten lag. Insgesamt war hier festzuhalten, dass 17 Stammlinien der MMZA im Vergleich zum AutoCyte QUIC-DNA-Systems mit einem durchschnittlichen Modalwert von $-0,16c$

nach unten abwichen. 13 Stammlinien der MMZA zeigten eine durchschnittliche Modalwertabweichung von 0,29c nach oben.

In Betrachtung aller 30 Fälle lag der Mittelwert der Modalwertdifferenzen bei -0,01c (SD: $\pm 0,17c$). Der Mittelwert der Beträge der Modalwertdifferenzen aller Fälle lag bei 0,16c (0,00c – 0,72c; SD: $\pm 0,16c$). 33 Stammlinien der Multimodalen Zellanalyse wichen mit einem Mittelwert der Modalwerte von -0,012c im Vergleich zum AutoCyte QUIC-DNA-System nach unten ab. Eine durchschnittliche Abweichung der Modalwerte der MMZA von 0,021c nach oben war bei 22 Stammlinien festzustellen. Bei einer Stammlinie wurde mit beiden Messsystemen exakt der gleiche Wert gemessen.

Der CV-Wert der Referenzzellen lag insgesamt bei der MMZA bei 5,6 %, bei dem AutoCyte QUIC-DNA-System bei 3,1 %. Auch hier wurden für jeden Fall die Differenzen der CV-Werte (MMZA – AutoCyte QUIC-DNA-System) und deren Beträge errechnet. Der Mittelwert der CV-Wert-Differenzen aller Fälle lag bei 2,5 % (SD: $\pm 4,3$ %); der Mittelwert der Beträge der CV-Wert-Differenzen lag bei 2,5 % (0,04 – 18,5 %; SD: $\pm 4,3$ %). Die CV-Werte der beiden Messsysteme schwankten mit Abstand bei den acht zweifelhaften Präparaten am geringsten. Die größten CV-Wert-Differenzen wurden durchschnittlich bei den zehn Tumorzell-negativen Präparaten beobachtet.

Die Histogrammtypisierungen der 30 Fälle ergaben in 24 Fällen (80 %) einen identischen Typus. Mit der MMZA ergab sich in zwölf Fällen und in neun Fällen mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System ein DNA-diploides Muster. Zwei Histogramme der MMZA und fünf Fälle des AutoCyte QUIC-DNA-Systems waren DNA-polyploid. Kein Fall war DNA-peridiploid und jeweils einer war bei beiden Messsystemen DNA-peritetraploid. Einen DNA-x-ploiden Histogrammtyp gab es bei der MMZA in sechs Fällen und bei dem AutoCyte QUIC-DNA-System in sieben Fällen. Neun Histogramme der MMZA zeigten ein DNA-multiploides Histogramm sowie acht mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System.

3.5.2.1 DNA-Histogramme im Vergleich

Die in diesem Kapitel dargestellten DNA-Histogramme zeigen für jede diagnostische Kategorie der Zytologie (Tumorzell-negativ, zweifelhaft, Tumorzell-positiv) jeweils ein Pärchen als Beispiel für eine gute Übereinstimmung zwischen der MMZA und dem AutoCyte QUIC-DNA-System und jeweils ein weiteres als Beispiel für eine weniger gute Übereinstimmung.

Für die farblichen Markierungen in den folgenden Histogrammen des AutoCyte QUIC-DNA-Systems gilt:

- grün = Referenzzellen
- rot = Analysezellen
- gelb = Stammlinie

Beispielhistogramme für die zytologisch Tumorzell-negativen Fälle:

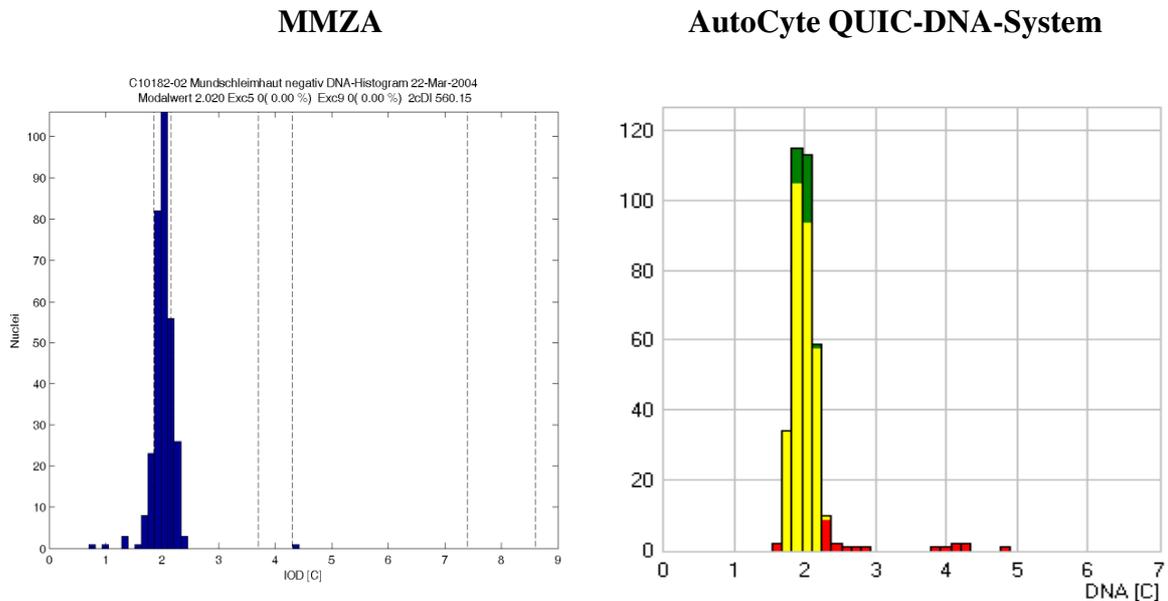


Abb. 3.6: DNA-Histogramme eines Abstriches von einem histologisch gesicherten Lichen planus ohne Dysplasie. Beide Messsysteme zeigen ein DNA-euploides (diploides) DNA-Histogramm mit einer Stammlinie mit dem Modalwert bei 2,02c (MMZA) und 1,95c (AutoCyte QUIC-DNA-System) und einzelnen Werten bei 4c.

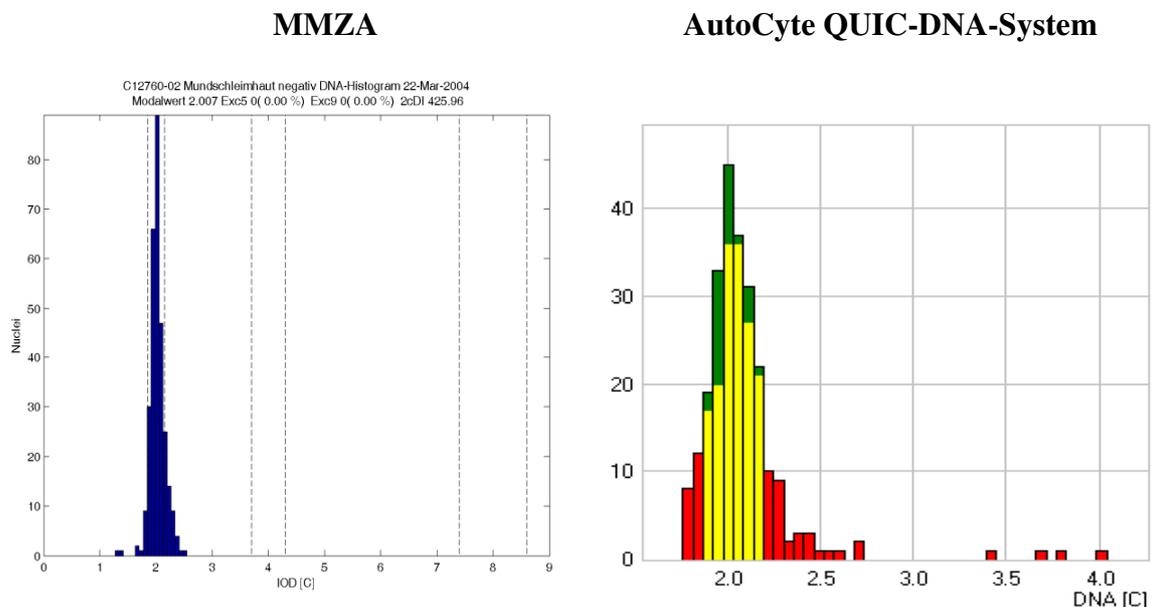


Abb. 3.7: DNA-Histogramme eines Abstriches einer histologisch gesicherten Hyperkeratose ohne Dysplasie. Die MMZA zeigt ein DNA-euploides (diploides) DNA-Histogramm mit einer Stammlinie mit dem Modalwert bei 2,01c und keinen weiteren Werten bei 4c. Die Messung des AutoCyte QUIC-DNA-Systems zeigt eine deutlich breitere Stammlinie mit dem Modalwert bei 2,05c mit einzelnen Werten bei 4c. Die DNA-Histogramme sind demnach leicht unterschiedlich; dieses hat jedoch keine Auswirkung auf die Diagnose.

Beispielhistogramme für die zytologisch zweifelhaften Fälle:

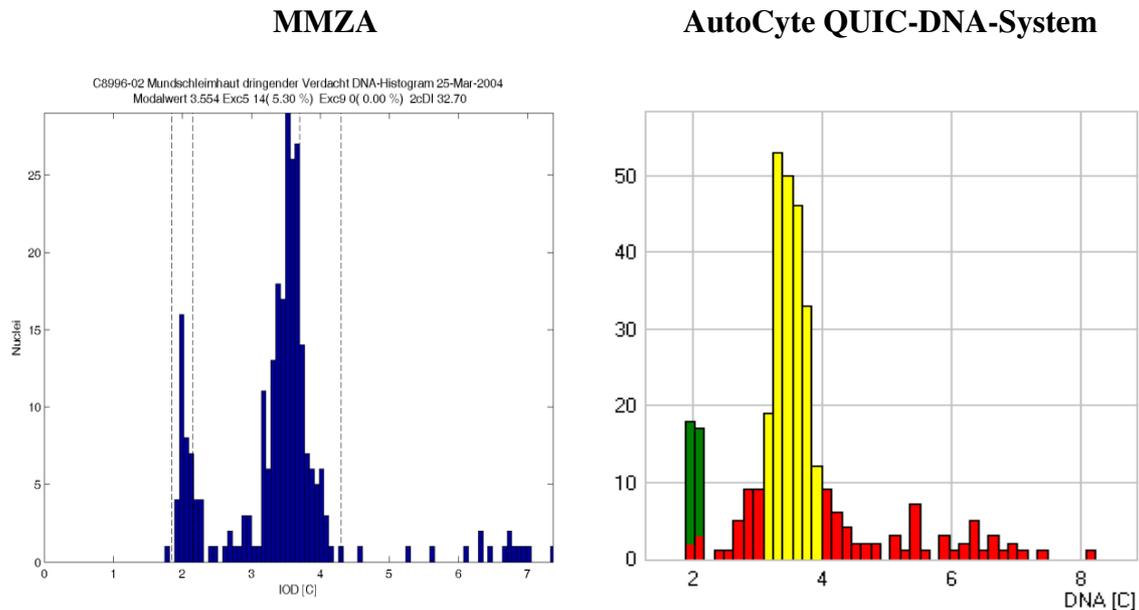


Abb. 3.8: DNA-Histogramme eines Abstriches von einem histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut (T2 N0 MX; Stadium 2; R0; G2). Beide Messsysteme zeigen ein DNA-aneuploides (x-ploides) Histogramm. Die Modalwerte der Stammlinien der **MMZA** liegen bei 2,03c und 3,55c und einige Werte bei ~ 5c, ~ 6c und ~ 7c. Die des **AutoCyte QUIC-DNA-Systems** liegen bei 2,04c und 3,54c sowie einige Werte bei ~ 5c, ~ 6c und ~ 7c; in beiden Fällen sind keine Zellen > 9c zu verzeichnen.

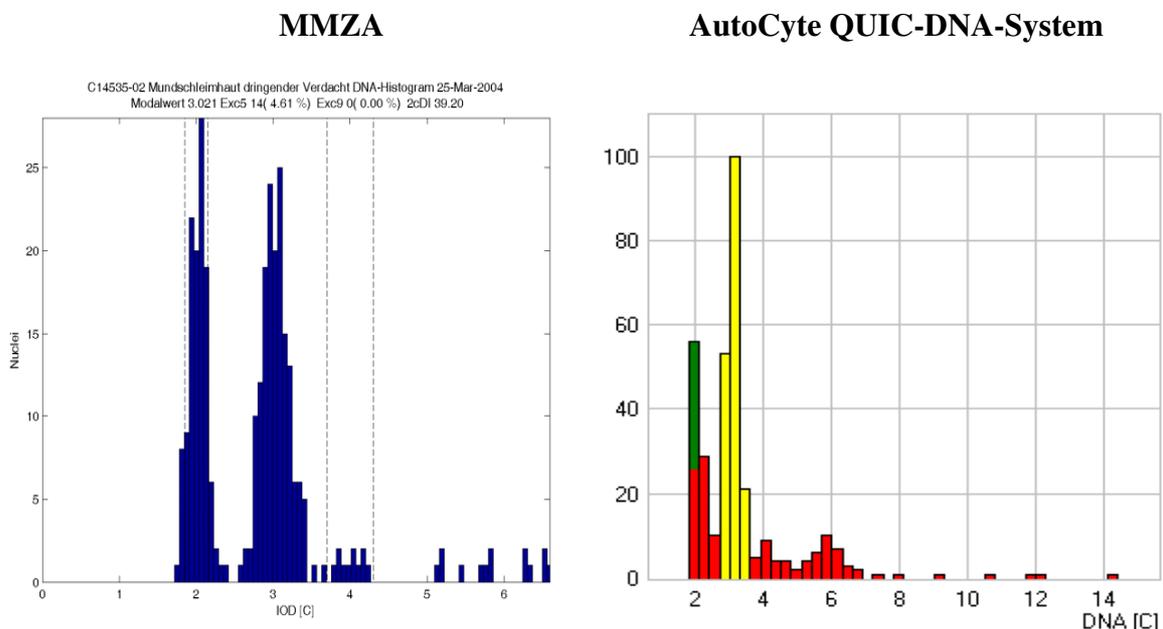


Abb. 3.9: DNA-Histogramme eines klinisch diagnostizierten Plattenepithelkarzinoms der Mundschleimhaut (T3 N2b MX; G2). **MMZA:** eine DNA-euploide Stammlinie bei 2,00c, eine DNA-aneuploide Stammlinie bei 3,02c, keine Zellen > 9c, DNA-x-ploider Histogrammtyp. **AutoCyte QUIC-DNA-System:** eine DNA-euploide Stammlinie bei 2,11c und zwei aneuploide Stammlinien mit Modalwerten bei 3,13c und 5,99c, 5 Zellen > 9c, DNA-multi-ploider Histogrammtyp. Beide Histogramme sind trotz der Unterschiede DNA-aneuploid.

Beispielhistogramme für die zytologisch Tumorzell-positiven Fälle:

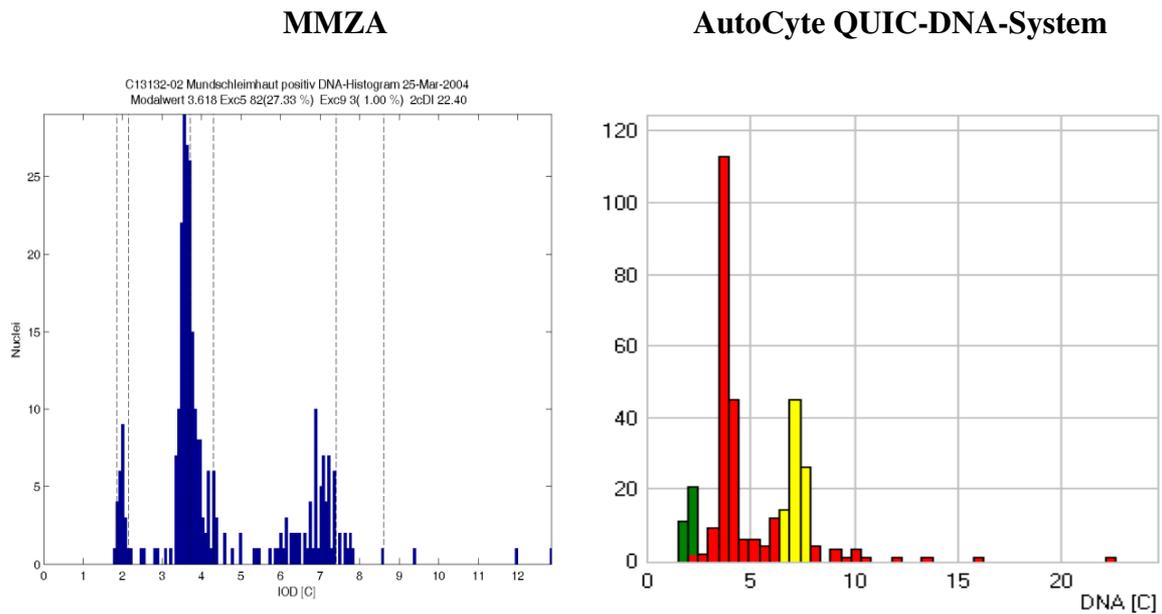


Abb. 3.10: DNA-Histogramme eines histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinoms der Mundschleimhaut (T3 N2c MX; Stadium 4a; R0; G2). Beide Messsysteme zeigen ein x-ploides Histogramm mit zwei DNA-euploiden Stammlinien mit Modalwerten bei 1,97c sowie 2,0c und bei 3,62c sowie 3,87c und eine DNA-aneuploide Stammlinie bei 7,04c sowie 7,11c. Als weiteres Aneuploidiekriterium weist die Messung der **MMZA** drei Zellen > 9c und die des **AutoCyte QUIC-DNA-Systems** acht Zellen > 9c auf.

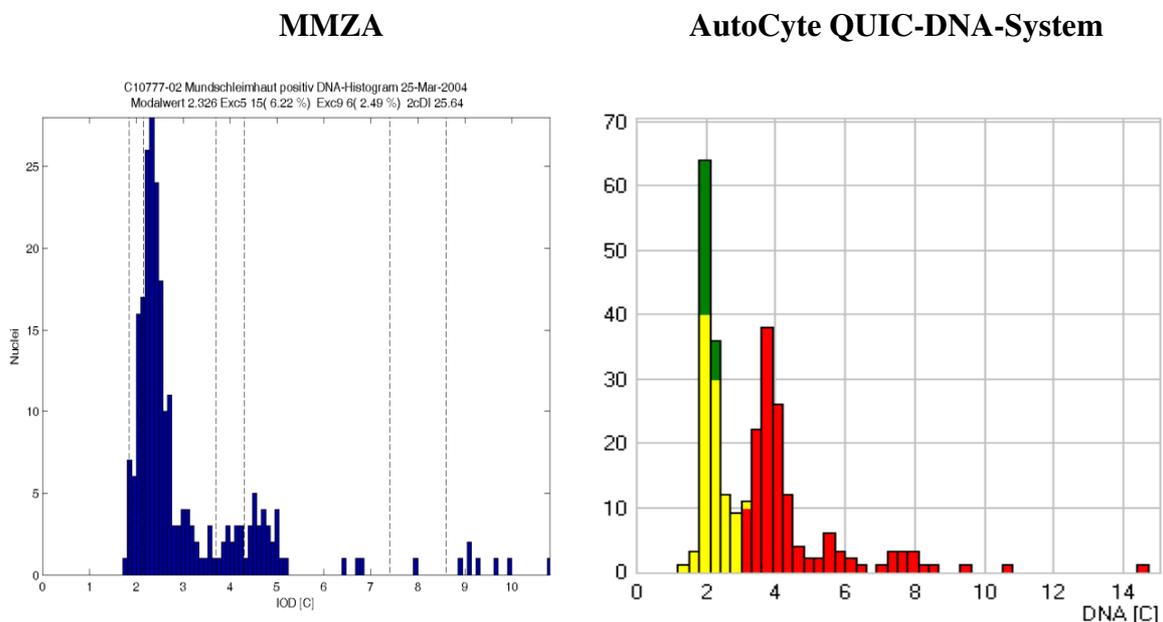


Abb. 3.11: DNA-Histogramme eines Abstriches von einem histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut (T4 N2b MX; Stadium 4a; R0; G2). **MMZA:** DNA-aneuploides (multiploides) DNA-Histogramm durch zwei DNA-aneuploide Stammlinien bei 2,33c und 4,45c, sechs Zellen > 9c. **AutoCyte QUIC-DNA-System:** DNA-aneuploides (x-ploides) DNA-Histogramm mit zwei DNA-euploiden Stammlinien mit Modalwerten bei 2,09c und 3,74c und einer DNA-aneuploiden Stammlinie bei 7,35c, drei Zellen > 9c. Die Unterschiede führen nicht zu einer Änderung der DNA-zytometrischen Diagnose.

3.5.2.2 Korrelation der Modalwerte der Peaks der MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System

Mit Hilfe des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten wurde berechnet, inwieweit die Modalwerte der Peaks der beiden Messsysteme miteinander korrelieren. Der Korrelationskoeffizient r betrug bei der Berechnung für die Modalwerte aller Peaks 0,989. In alleiniger Betrachtung der Modalwerte des größten Peaks eines Histogrammes betrug der Korrelationseffizient $r = 0,96$. Tab. 3.9 und 3.10 sowie Abb. 3.12 und 3.13 veranschaulichen diese Begebenheiten.

| | |
|---|--------------|
| Korrelationskoeffizient r der Modalwerte aller Peaks: MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System | |
| Gesamt | 0,989 |

Tab. 3.9: Korrelationskoeffizient r der Modalwerte aller Peaks der DNA-Histogramme

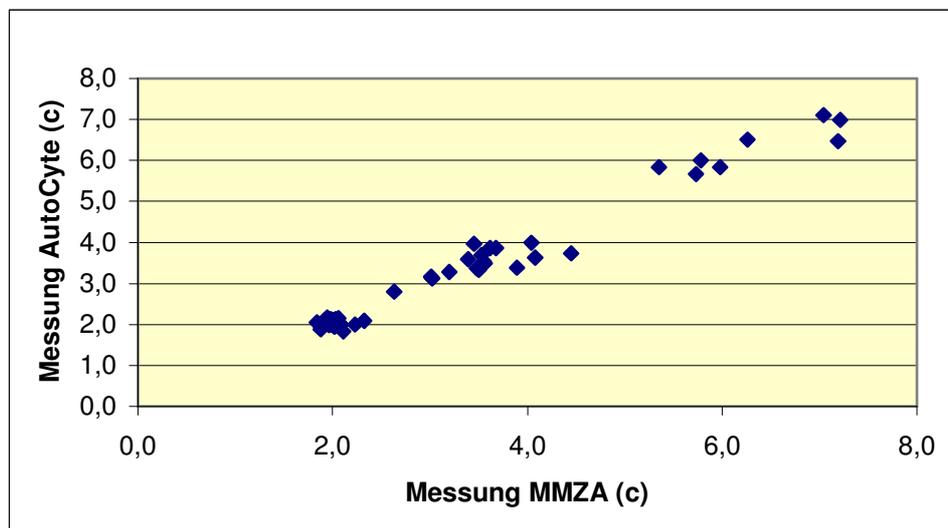


Abb. 3.12: Korrelation der Modalwerte (c) aller Peaks aller 30 Fälle MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System ($r = 0,989$)

| Korrelationskoeffizient r der Modalwerte der größten Peaks pro Fall MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System | |
|--|------|
| Gesamt | 0,96 |

Tab. 3.10: Korrelationskoeffizient r der Modalwerte der größten Peaks pro Fall

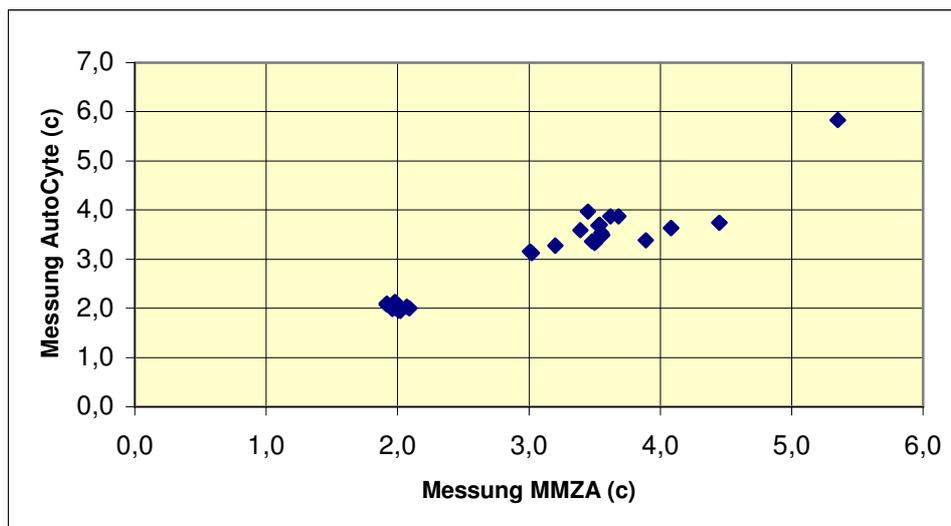


Abb. 3.13: Korrelation der Modalwerte (c) des größten Peaks pro Fall ($r = 0,96$)

3.5.2.3 Peaklagen der DNA-Histogramme der MMZA im Vergleich mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System

In den folgenden Abbildungen wird die Häufigkeitsverteilung der Peaklagen unterteilt nach gemäß Follow-up gesunden und an Mundkrebs erkrankten Patienten dargestellt. Abb. 3.14 zeigt die Peaklagen der mit der MMZA gemessenen Fälle, Abb. 3.15 das dementsprechende Ergebnis des AutoCyte QUIC-DNA-Systems. Die Peaks der Referenzzellpopulationen um $2c$ gingen in die Darstellungen nicht mit ein.

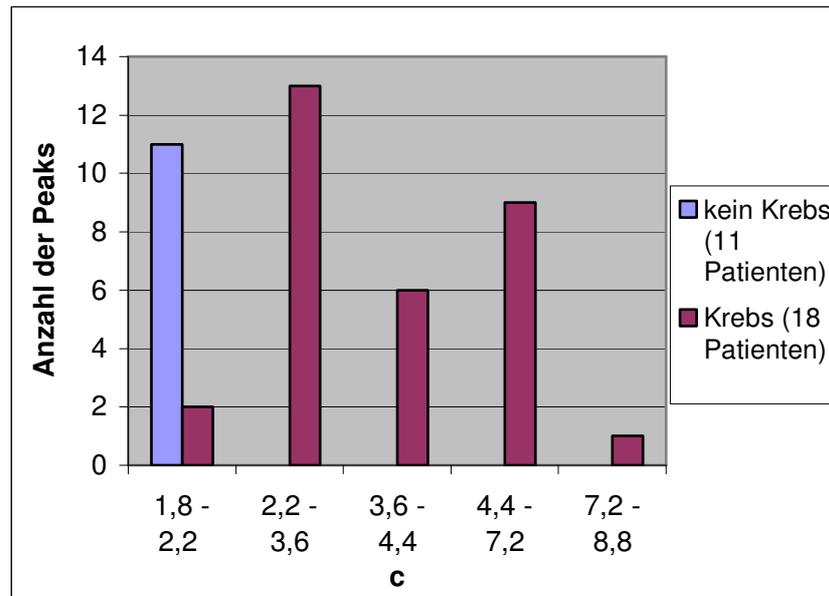


Abb. 3.14: Peaklagen der DNA-Zytometrie der MMZA (ohne Referenzzell-Peaks bei 2c)

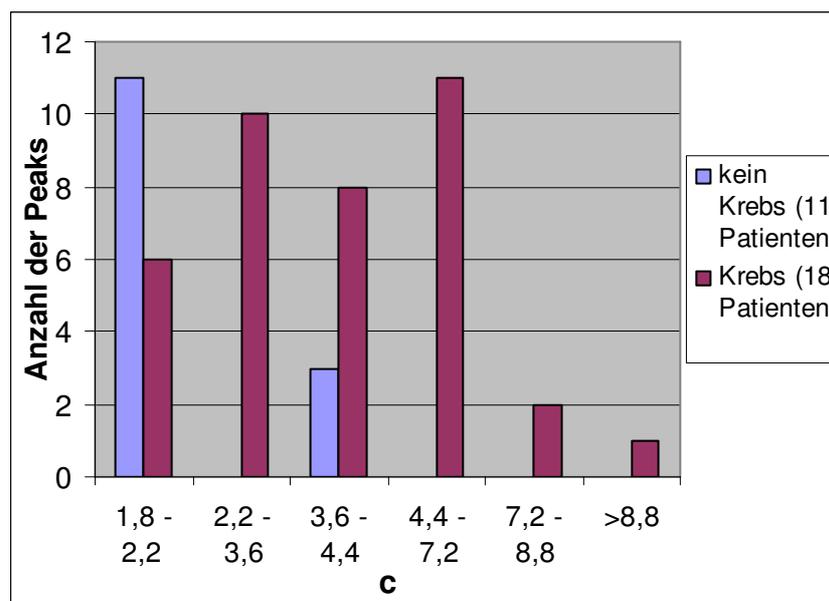


Abb. 3.15: Peaklagen der DNA-Zytometrie des AutoCyte QUIC-DNA-Systems (ohne Referenzzell-Peaks bei 2c)

Die gesunden Patienten wiesen erwartungsgemäß ausschließlich Peaks in diploiden oder euploid polyploiden DNA-Bereichen auf. Aus beiden Abbildungen ist ersichtlich, dass die meisten Peaks der Histogramme der an Mundkrebs erkrankten Patienten in x-ploiden (2,2c – 3,6c bzw. 4,4c – 7,2c) DNA-Bereichen lagen. Die restlichen Peaks befanden sich am häufigsten im peritetraploiden (3,6c – 4,4c) und weniger häufig im peridiploiden (1,8c – 2,2c) DNA-Bereich. Die wenigsten Peaks verteilten sich auf DNA-Bereiche > 7,2c.

Insgesamt waren nur geringe Häufigkeitsunterschiede in der Peaklagenverteilung der beiden Messsysteme zu verzeichnen.

3.5.2.4 Kriterien der Aneuploidie beider Messsysteme im Vergleich

14 Präparate wiesen DNA-Euploidie und 16 DNA-Aneuploidie auf. Dabei waren alle DNA-zytometrischen Diagnosen der MMZA identisch mit denen des AutoCyte QUIC-DNA-Systems. Hinsichtlich der Kriterien der Aneuploidie-Entstehung gab es zwischen den beiden Messsystemen geringfügige Unterschiede festzustellen.

Die Kombination der Kriterien „Stammlinienaneuploidie und Einzelzellaneuploidie“ trat mit 68,8 % bei der MMZA am häufigsten auf. Das Merkmal „nur Stammlinienaneuploidie“ war hier mit 25 % am zweithäufigsten und das Merkmal „nur Einzelzellaneuploidie“ mit 6,2 % am seltensten vertreten.

Bei den Messungen des AutoCyte QUIC-DNA-Systems war ebenfalls die Kombination der Kriterien „Stammlinienaneuploidie und Einzelzellaneuploidie“ mit 75 % am häufigsten. Im Gegensatz zu der Messung der MMZA war hier das Kriterium „nur Einzelzellaneuploidie“ mit 18,8 % das zweithäufigste und das Merkmal „nur Stammlinienaneuploidie“ mit 6,2 % das seltenste. Abb. 3.16 und 3.17 stellen diese Ergebnisse dar.

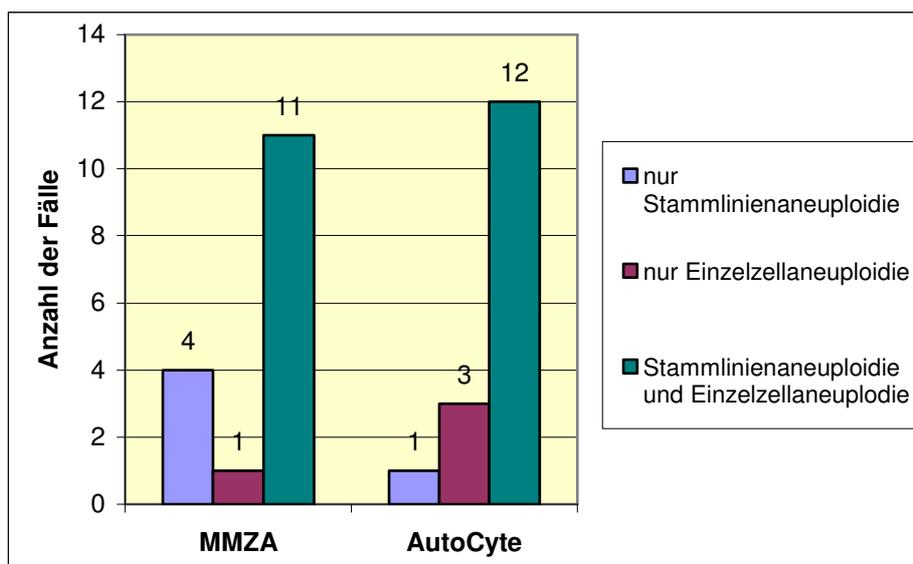


Abb. 3.16: Kriterien der DNA-Aneuploidie-Entstehung (der 16 aneuploiden DNA-Histogramme) im Vergleich

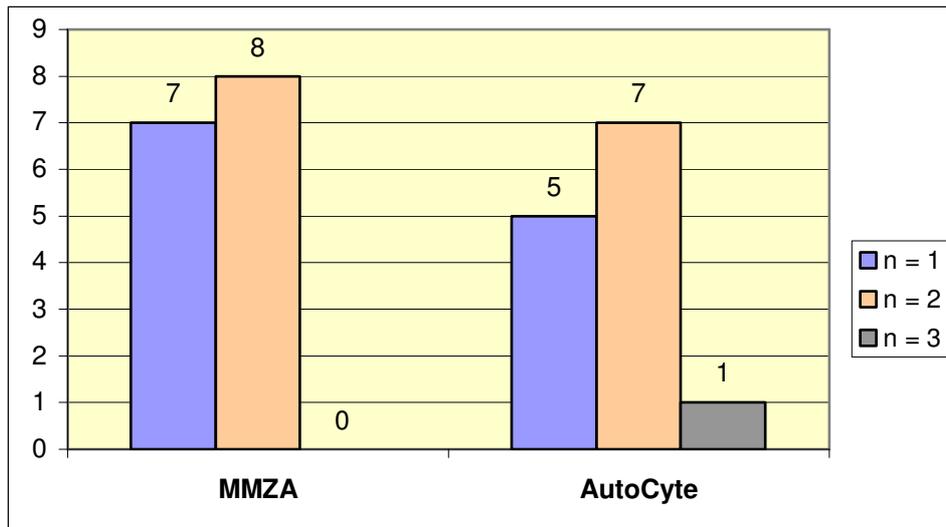


Abb. 3.17: Anzahl der Fälle mit „n“ DNA-aneuploiden Stammlinien im Vergleich

Abb. 3.18 veranschaulicht die Anzahlen der Zellen $> 9c$, die in den Messungen gefunden wurden. Am häufigsten gab es bei der MMZA ein bis drei Zellen $> 9c$ (in sieben Fällen), am zweithäufigsten vier bis zehn Zellen $> 9c$ (in vier Fällen) und in einem Fall mehr als zehn Zellen $> 9c$. Bei den Messungen des AutoCyte QUIC-DNA-Systems zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung in diese drei Kategorien mit jeweils fünf Fällen.

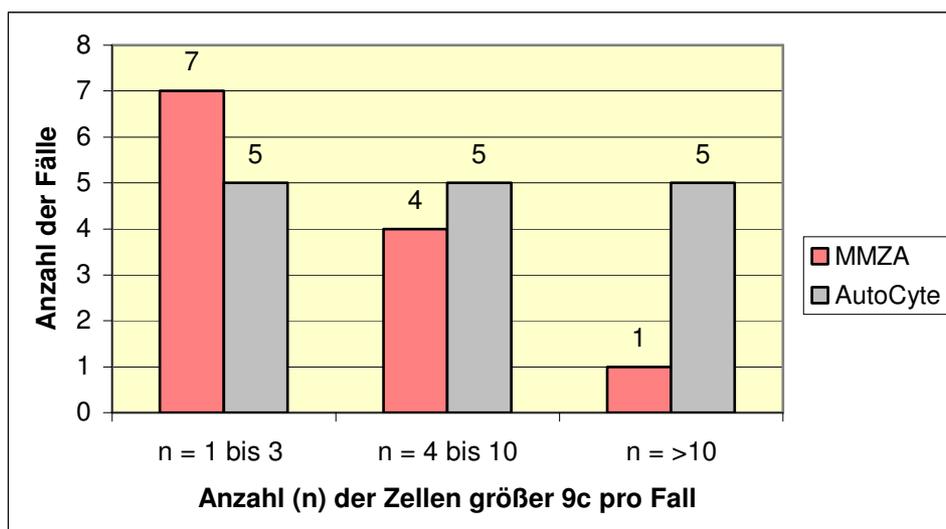


Abb. 3.18: Anzahl der Fälle mit (n) Zellen $> 9c$ im Vergleich

3.5.2.5 Korrelation der DNA-Ergebnisse mit der Zytologie und dem klinischen bzw. histologischen Follow-up

| | Zytologie (30 Fälle): | | | Follow-up | | | | |
|--|--------------------------|----------|-----------|---------------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------------|
| | | | | davon Histologie (19 Fälle): | | davon Klinik (10 Fälle): | | davon nicht auf- findbar: |
| | neg. | zw. | pos. | benigne Läs. | maligne Läs. | benigne Läs. | maligne Läs. | |
| Gesamtanzahl: | 10 | 8 | 12 | 5 | 14 | 6 | 4 | 1 |
| DNA-Zytometrie: Ergebnisse der MMZA | | | | | | | | |
| DNA-euploid | 10 | 3 | 1 | 5 | 2 | 6 | 0 | 1 |
| DNA-aneuploid | 0 | 5 | 11 | 0 | 12 | 0 | 4 | |
| Falsch negative: | 0 | 1 | 1 | | 2 | | 0 | |
| Falsch positive: | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | | |
| DNA-Zytometrie: Ergebnisse des AutoCyte QUIC-DNA-Systems | | | | | | | | |
| DNA-euploid | 10 | 3 | 1 | 5 | 2 | 6 | 0 | 1 |
| DNA-aneuploid | 0 | 5 | 11 | 0 | 12 | 0 | 4 | |
| Falsch negative: | 0 | 1 | 1 | | 2 | | 0 | |
| Falsch positive: | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | | |
| Übereinstimmungen in den Diagnosen der beiden Messsysteme: | | | | | | | | |
| DNA-euploide Fälle in %: | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| DNA-aneuplo- ide Fälle in %: | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Tab. 3.11: Korrelation der DNA-Ergebnisse mit dem klinischen/histologischen Follow-up

Die MMZA und das AutoCyte QUIC-DNA-System diagnostizierten an zwei identischen Präparaten DNA-Euploidie, die in Betrachtung des Follow-up falsch negative Diagnosen darstellten. Ansonsten waren die DNA-zytometrischen Diagnosen bei beiden Messsystemen mit dem Follow-up kongruent. Falsch positive DNA-zytometrische Diagnosen sind nicht zu verzeichnen. Genaue Verteilungen sind aus Tab. 3.11 abzulesen.

3.5.2.6 Diagnostische Treffsicherheit der DNA-Zytometrie

Da die DNA-zytometrischen Diagnosen der MMZA und des AutoCyte QUIC-DNA-Systems in allen Fällen identisch waren, bleibt insgesamt festzustellen, dass die diagnostische Treffsicherheit beider Messsysteme in dieser Arbeit bei 93,1 % lag (Sensitivität: 88,9 %; Spezifität: 100 %). Tab. 3.12 gibt darüber eine kurze Übersicht.

| DNA-Zytometrie: | Follow up: | | | falsch negative | falsch positive | Sensitivität | Spezifität |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-----------------|--------------|------------|
| | negativ n=11 | positiv n=18 | nicht auffindbar n=1 | | | | |
| MMZA | | | | | | | |
| DNA-euploid | 11 | 2 | 1 | 2 | | | 100 % |
| DNA-aneuploid | 0 | 16 | 0 | | 0 | 88,9 % | |
| AutoCyte QUIC-DNA-System | | | | | | | |
| DNA-euploid | 11 | 2 | 1 | 2 | | | 100 % |
| DNA-aneuploid | 0 | 16 | 0 | | 0 | 88,9 % | |

Tab. 3.12: Diagnostische Treffsicherheit der DNA-Zytometrie

3.6 Auswertung der AgNOR-Analyse

Eine Beschreibung der erzielten Ergebnisse der AgNOR-Analyse erfolgte bereits in Kapitel 3.4. Die Gründe, aus denen die automatische AgNOR-Zählung keine relevanten Ergebnisse lieferte, sind in Kapitel 3.2.1 erläutert worden. Die automatische Zellkernflächenberechnung dagegen blieb von diesen Gründen unberührt und lieferte plausible Ergebnisse. Eine ausführliche Darstellung der erzielten Ergebnisse liefert Tab. 3.13.

Die auffälligsten Ergebnisse sind durch die manuelle AgNOR-Zählung und die automatische Zellkernflächenberechnung erzielt worden. Demnach wurde bei Patienten, die gemäß Follow-up eine gutartige Mundschleimhautveränderung aufwiesen, ein mittlerer Wert von 3,7 AgNORs (2,3 – 4,49 AgNORs; SD: $\pm 0,59$ AgNORs) gezählt und ein Mittelwert von $63,63 \mu\text{m}^2$ ($52,7 - 77,4 \mu\text{m}^2$; SD: $\pm 7,48 \mu\text{m}^2$) für die Zellkernfläche berechnet. Im Gegensatz dazu wiesen die gemäß Follow-up an Mundkrebs erkrankten Patienten eine mittlere Anzahl von 6,8 AgNORs (5,13 – 9,15 AgNORs; SD: $\pm 1,29$ AgNORs) und eine durchschnittliche Zellkernfläche von $83,56 \mu\text{m}^2$ ($56,6 - 115,4 \mu\text{m}^2$; SD: $\pm 19,99 \mu\text{m}^2$) auf.

| | | | Automatische AgNOR-Analyse | | | | Manuelle AgNOR-Analyse | | |
|--|-------------|--|---|--|-------------------------------------|---------------------|------------------------|---------------|--|
| C Nummer | Zyto.-Diag. | Zellzahl | Ø relative AgNOR-Fl. bez. auf Kernfl. (%) | Ø absolute AgNOR-Fl./Zellkern (µm ²) | Ø Zellkernfläche (µm ²) | Ø Anzahl der AgNORs | Ø Anzahl der AgNORs | Zellzahl | |
| C10100-02 | neg. | 96 | 0,20 | 11,60 | 69,50 | 5,70 | 3,89 | 100 | |
| C10182-02 | neg. | 91 | 0,20 | 8,50 | 58,60 | 5,30 | 3,67 | 100 | |
| C10231-02 | neg. | 89 | 0,10 | 7,50 | 63,90 | 5,20 | 3,00 | 100 | |
| C10344-02 | neg. | 77 | 0,30 | 14,50 | 67,20 | 5,30 | 4,49 | 100 | |
| C10632-02 | neg. | 99 | 0,30 | 22,50 | 69,10 | 5,70 | 3,86 | 100 | |
| C12205-02 | neg. | 91 | 0,10 | 8,30 | 77,40 | 4,30 | 3,75 | 100 | |
| C12760-02 | neg. | 93 | 0,20 | 10,90 | 53,10 | 4,50 | 3,49 | 100 | |
| C13105-02 | neg. | 80 | 0,40 | 22,60 | 57,80 | 5,50 | 4,24 | 100 | |
| C13391-02 | neg. | 94 | 0,20 | 12,30 | 52,70 | 4,00 | 2,30 | 100 | |
| C13723-02 | neg. | 77 | 0,30 | 15,90 | 63,70 | 6,10 | 3,69 | 100 | |
| Mittelwert: | | | 0,23 | 13,46 | 63,30 | 5,16 | 3,64 | 100 | |
| Standardabweichung: | | | 0,09 | 5,48 | 7,86 | 0,68 | 0,62 | 0 | |
| Minimum: | | | 0,10 | 7,50 | 52,70 | 4,00 | 2,30 | 100 | |
| Maximum: | | | 0,40 | 22,60 | 77,40 | 6,10 | 4,49 | 100 | |
| C8760-02 | d. V. | 96 | 0,20 | 13,00 | 86,20 | 6,40 | 6,20 | 100 | |
| C8996-02 | d. V. | 93 | 0,10 | 6,70 | 77,50 | 4,30 | 5,85 | 100 | |
| C10783-02 | zw. | 99 | 0,20 | 9,40 | 65,90 | 4,50 | 5,23 | 100 | |
| C11231-02 | d. V. | 66 | 0,20 | 17,30 | 102,00 | 7,60 | 5,51 | 100 | |
| C11345-02 | zw. | 87 | 0,10 | 2,70 | 70,50 | 3,90 | 3,72 | 100 | |
| C13775-02 | zw. | 100 | 0,20 | 7,70 | 56,60 | 5,60 | 5,13 | 100 | |
| C14336-02 | zw. | 66 | 0,10 | 6,70 | 60,10 | 4,90 | 4,25 | 100 | |
| C14535-02 | d. V. | 93 | 0,30 | 20,70 | 73,80 | 5,40 | 6,22 | 100 | |
| Mittelwert: | | | 0,18 | 10,53 | 74,08 | 5,33 | 5,26 | 100 | |
| Standardabweichung: | | | 0,07 | 6,04 | 14,73 | 1,22 | 0,90 | 0 | |
| Minimum: | | | 0,07 | 2,70 | 56,60 | 3,90 | 3,72 | 100 | |
| Maximum: | | | 0,30 | 20,70 | 102,00 | 7,60 | 6,22 | 100 | |
| C1912-01 | pos. | 100 | 0,20 | 17,20 | 89,90 | 5,70 | 6,77 | 100 | |
| C8399-02 | pos. | 98 | 0,20 | 19,70 | 115,40 | 8,80 | 9,15 | 100 | |
| C9639-02 | pos. | 99 | 0,30 | 22,40 | 91,70 | 6,90 | 5,36 | 100 | |
| C10777-02 | pos. | 91 | 0,20 | 12,20 | 61,00 | 3,70 | 7,48 | 100 | |
| C10778-02 | pos. | 65 | 0,20 | 12,10 | 57,30 | 4,40 | 6,62 | 100 | |
| C10780-02 | pos. | wegen Überfärbung keine AgNOR-Analyse möglich | | | | | | | |
| C10781-02 | pos. | 75 | 0,20 | 19,10 | 77,20 | 5,20 | 7,23 | 100 | |
| C11071-02 | pos. | 99 | 0,20 | 12,00 | 102,20 | 5,80 | 6,21 | 100 | |
| C12128-02 | pos. | 52 | 0,10 | 5,80 | 62,20 | 3,90 | 7,21 | 100 | |
| C13132-02 | pos. | 99 | 0,20 | 20,00 | 111,60 | 6,80 | 8,75 | 100 | |
| C14483-02 | pos. | 99 | 0,30 | 32,40 | 106,50 | 7,50 | 7,90 | 100 | |
| C14531-02 | pos. | wegen Überfärbung keine autom. AgNOR-Analyse möglich | | | | | 8,83 | 100 | |
| Mittelwert: | | | 0,21 | 17,29 | 87,50 | 5,87 | 7,41 | 100,00 | |
| Standardabweichung: | | | 0,06 | 7,33 | 21,91 | 1,65 | 1,18 | 0,00 | |
| Minimum: | | | 0,10 | 5,80 | 57,30 | 3,70 | 5,36 | 100,00 | |
| Maximum: | | | 0,30 | 32,40 | 115,40 | 8,80 | 9,15 | 100,00 | |
| Ausschließlich Werte der – gemäß Follow-up – gesunden Patienten: | | | | | | | | | |
| Mittelwert: | | | 0,21 | 12,00 | 63,63 | 5,03 | 3,70 | 100 | |
| Standardabweichung: | | | 0,10 | 6,08 | 7,48 | 0,71 | 0,59 | 0 | |
| Minimum: | | | 0,10 | 2,70 | 52,70 | 3,90 | 2,30 | 100 | |
| Maximum: | | | 0,40 | 22,60 | 77,40 | 6,10 | 4,49 | 100 | |
| Ausschließlich Werte der – gemäß Follow-up – krebskranken Patienten: | | | | | | | | | |
| Mittelwert: | | | 0,21 | 15,48 | 83,56 | 5,78 | 6,80 | 100 | |
| Standardabweichung: | | | 0,06 | 6,97 | 19,99 | 1,46 | 1,29 | 0 | |
| Minimum: | | | 0,10 | 5,80 | 56,60 | 3,70 | 5,13 | 100 | |
| Maximum: | | | 0,30 | 32,40 | 115,40 | 8,80 | 9,15 | 100 | |

Tab. 3.13: Übersicht über die Ergebnisse der AgNOR-Analyse

Eine Darstellung der AgNOR- und Zellkernflächenberechnung bietet Abb. 3.19; vergleichende Darstellungen der manuellen und automatischen AgNOR-Analyse sind aus Abb. 3.20 und 3.21 ersichtlich.

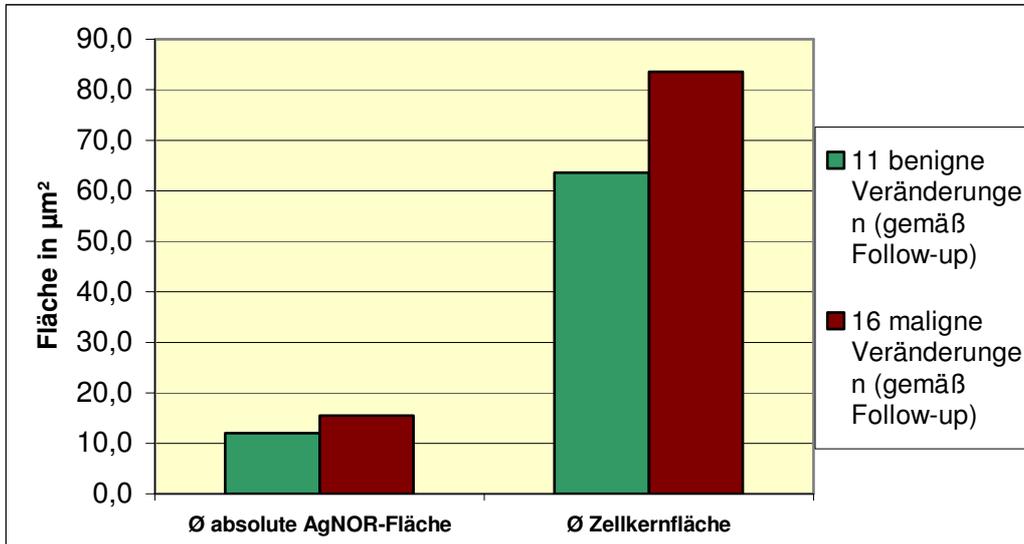


Abb. 3.19: AgNOR-Flächen- und Zellkernflächenberechnung durch die automatische AgNOR-Analyse

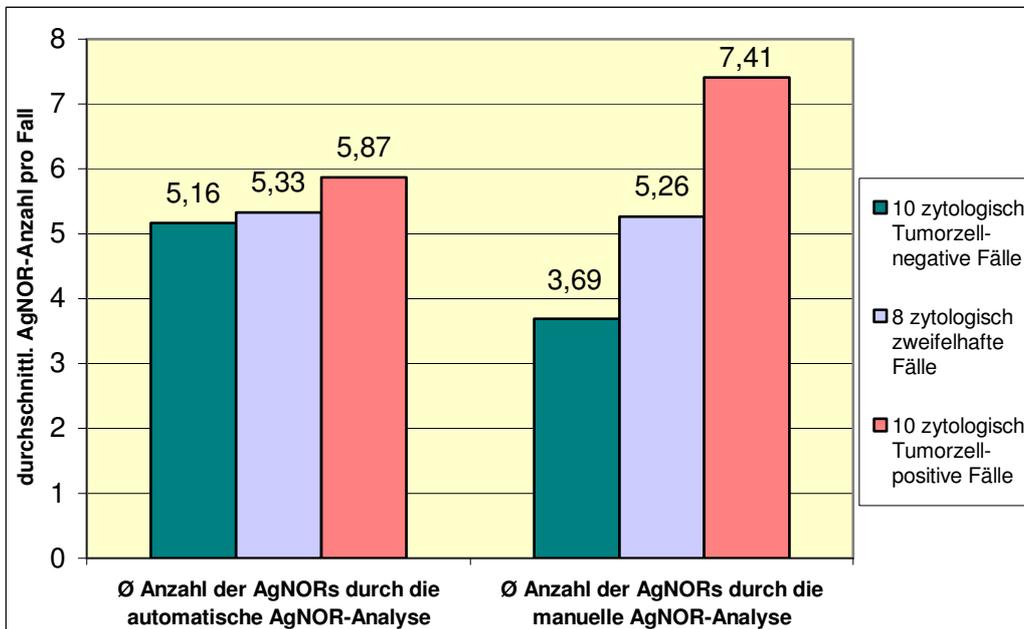


Abb. 3.20: Vergleich der AgNOR-Zählungen: automatische vs. manuelle AgNOR-Analyse (aufgeschlüsselt nach der zytologischen Diagnose)

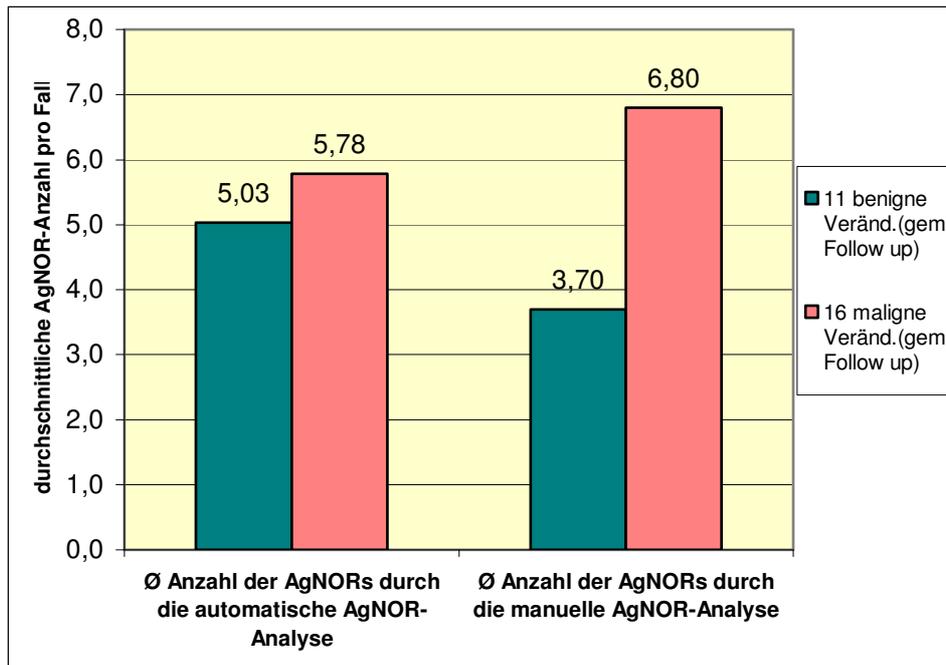


Abb. 3.21: Vergleich der AgNOR-Zählungen: automatische vs. manuelle AgNOR-Analyse (aufgeschlüsselt nach der Diagnose des Follow-up)

3.7 Diagnostische Treffsicherheit der MMZA

Ein Überblick über die DNA-Ergebnisse in Verbindung mit den Ergebnissen der manuellen AgNOR-Analyse und die gegenseitige Beeinflussung auf die diagnostische Treffsicherheit gewährt Tab. 3.14. Die in der DNA-Zytometrie als falsch-negativ diagnostizierten Fälle sind in der Tabelle gelb untermalt. Wie oben bereits erwähnt, können die AgNOR-Werte, die bei diesen Präparaten gezählt wurden und in beiden Fällen über 4,8 AgNORs liegen, für das Vorliegen von maligne transformierten Zellen sprechen (Remmerbach et al. 2003). Demnach wurden in dieser Arbeit erst durch die Kombination der Untersuchungsmethoden alle Präparate richtig diagnostiziert.

| C Nummer | Follow up | DNA-Zytometrie Diagnose MMZA | Stamm- linien- Aneuploidie | Einzelzell- Aneuploidie | Histogramm -typ | Manuelle AgNOR- Analyse: Ø-Anzahl aus Ø 100 Zellen | DNA-Zytometrie Diagnose AutoCyte | Stamm- linien- Aneuploidie | Einzelzell- Aneuploidie | Histogramm -typ |
|------------|------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------|--|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------|
| C 10100-02 | - | DNA-euploid | - | - | diploid | 3,89 | DNA-euploid | - | - | diploid |
| C 10182-02 | kein Krebs | DNA-euploid | - | - | diploid | 3,67 | DNA-euploid | - | - | diploid |
| C 10231-02 | kein Krebs | DNA-euploid | - | - | diploid | 3,00 | DNA-euploid | - | - | diploid |
| C 10344-02 | kein Krebs | DNA-euploid | - | - | diploid | 4,49 | DNA-euploid | - | - | diploid |
| C 10632-02 | kein Krebs | DNA-euploid | - | - | diploid | 3,86 | DNA-euploid | - | - | polyploid |
| C 12205-02 | kein Krebs | DNA-euploid | - | - | diploid | 3,75 | DNA-euploid | - | - | diploid |
| C 12760-02 | kein Krebs | DNA-euploid | - | - | diploid | 3,49 | DNA-euploid | - | - | diploid |
| C 13105-02 | kein Krebs | DNA-euploid | - | - | diploid | 4,24 | DNA-euploid | - | - | diploid |
| C 13391-02 | kein Krebs | DNA-euploid | - | - | diploid | 2,30 | DNA-euploid | - | - | diploid |
| C 13723-02 | kein Krebs | DNA-euploid | - | - | diploid | 3,69 | DNA-euploid | - | - | diploid |
| C 8760-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | + | multiploid | 6,20 | DNA-aneuploid | + | + | multiploid |
| C 8996-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | - | x-ploid | 5,85 | DNA-aneuploid | + | - | x-ploid |
| C 10783-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | + | multiploid | 5,23 | DNA-aneuploid | + | + | x-ploid |
| C 11231-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | + | x-ploid | 5,51 | DNA-aneuploid | - | + | x-ploid |
| C 11345-02 | kein Krebs | DNA-euploid | - | - | diploid | 3,72 | DNA-euploid | - | - | polyploid |
| C 13775-02 | Krebs | DNA-euploid (FN) | - | - | polyploid | 5,13 | DNA-euploid (FN) | - | - | polyploid |
| C 14336-02 | kein Krebs | DNA-euploid | - | - | diploid | 4,25 | DNA-euploid | - | - | polyploid |
| C 14535-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | - | x-ploid | 6,22 | DNA-aneuploid | + | + | multiploid |
| C 1912-01 | Krebs | DNA-aneuploid | + | + | multiploid | 6,77 | DNA-aneuploid | + | + | multiploid |
| C 8399-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | + | multiploid | 9,15 | DNA-aneuploid | + | + | multiploid |
| C 9639-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | + | x-ploid | 5,36 | DNA-aneuploid | + | + | x-ploid |
| C 10777-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | + | multiploid | 7,48 | DNA-aneuploid | - | + | x-ploid |
| C 10778-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | - | x-ploid | 6,62 | DNA-aneuploid | + | + | x-ploid |
| C 10780-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | + | multiploid | - | DNA-aneuploid | + | + | multiploid |
| C 10781-02 | Krebs | DNA-aneuploid | - | + | peritetraploid | 7,23 | DNA-aneuploid | - | + | peritetraploid |
| C 11071-02 | Krebs | DNA-euploid (FN) | - | - | polyploid | 6,21 | DNA-euploid (FN) | - | - | polyploid |
| C 12128-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | + | multiploid | 7,21 | DNA-aneuploid | + | + | multiploid |
| C 13132-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | + | x-ploid | 8,75 | DNA-aneuploid | + | + | x-ploid |
| C 14483-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | - | multiploid | 7,90 | DNA-aneuploid | + | + | multiploid |
| C 14531-02 | Krebs | DNA-aneuploid | + | + | multiploid | 8,83 | DNA-aneuploid | + | + | multiploid |

Tab. 3.14: Diagnostische Treffsicherheit gemäß der DNA-Ergebnisse in Kombination mit der manuellen AgNOR-Analyse

| Ergebnistabelle der MMZA über die 28 von 30 Fällen, die in allen* diagnostischen Bereichen dieser Arbeit Ergebnisse lieferten: | | |
|---|-------------------|--|
| DNA-Zytometrie Diagnosen MMZA / AutoCyte ** : | Follow-up: | manuelle AgNOR- Analyse *** : |
| DNA-euploid: 13 | kein Krebs: 11 | kein Krebs: 11 |
| DNA-aneuploid: 15 | Krebs: 17 | Krebs: 17 |
| falsch negative: 2 | | falsch negative: 0 |
| Falsch positive: 0 | | falsch positive: 0 |
| Sensitivität: 88,2 % | | Sensitivität: 100 % |
| Spezifität: 100 % | | Spezifität: 100 % |
| Beide Diagnosekriterien in Kombination ergeben demnach eine diagnostische Treffsicherheit von: 100 % (Sensitivität 100 %, Spezifität 100 %) | | |
| * bei einem zytologisch negativen Fall war das Follow-up <u>nicht</u> ermittelbar; ein zytologisch positiver Fall wurde in der Silbernitrat-Färbung überfärbt und war für die AgNOR-Analyse <u>unbrauchbar</u> geworden | | |
| **die DNA-zytometrischen Diagnosen waren bei der MMZA und dem AutoCyte QUIC-DNA-System in allen 28 Fällen <u>identisch</u> | | |
| *** es wurde hier der von Remmerbach et al. (2003b) ermittelte Cut-off- Wert von <u>4,8 AgNORs</u> für 100 ausgezählte Zellkerne bei der Interpretation der AgNOR-Analyse zu Grunde gelegt | | |

Tab. 3.15: Diagnostische Treffsicherheit der MMZA

3.8 Zytologische Bilder der MMZA

Zytologische Bilder der MMZA eines Tumorzell-negativen Präparats (Follow-up: Leukoplakie) mit Einblendung der Messergebnisse:

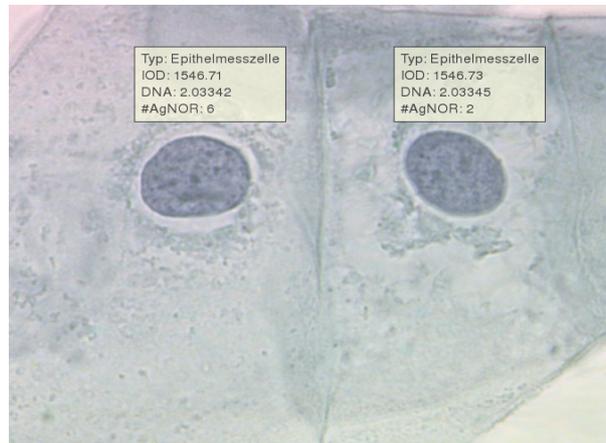


Abb. 3.22: Papanicolaou-Färbung

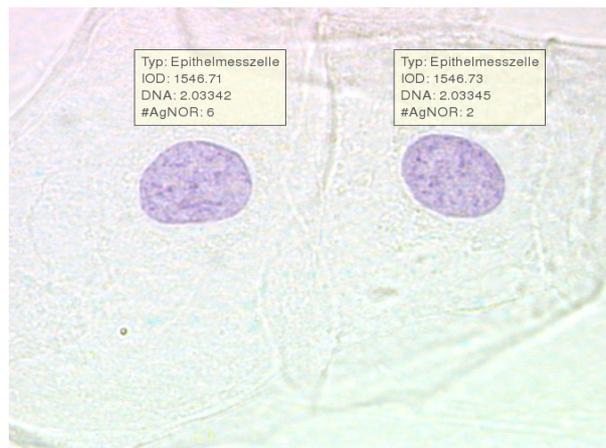


Abb. 3.23: Feulgen-Färbung

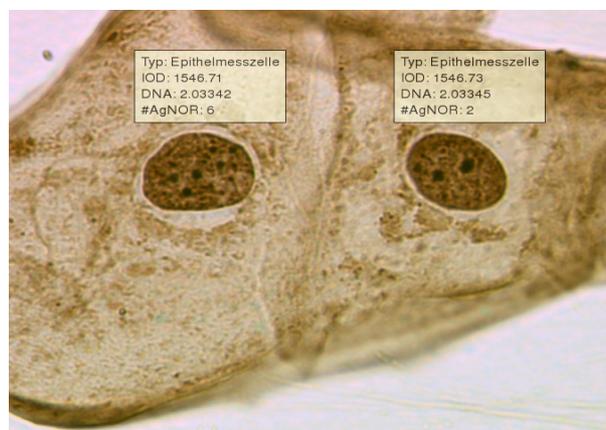


Abb. 3.24: Silbernitrat-Färbung

Zytologische Bilder der MMZA eines zweifelhaften Präparats (Follow-up: T1 NX MX; Stadium 1; R1; G2) mit Einblendung der Messergebnisse:



Abb. 3.25: Papanicolaou-Färbung



Abb. 3.26: Feulgen-Färbung



Abb. 3.27: Silbernitrat-Färbung

Zytologische Bilder der MMZA eines Tumorzell-positiven Präparats (Follow-up: T1 N1 MX; Stadium 3; R0; G2) mit Einblendung der Messergebnisse:

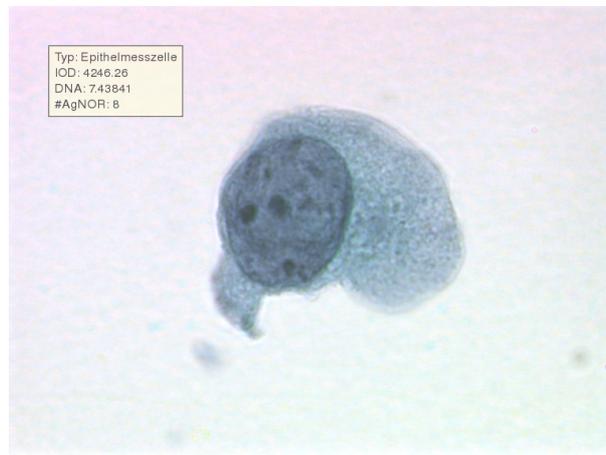


Abb. 3.28: Papanicolaou-Färbung

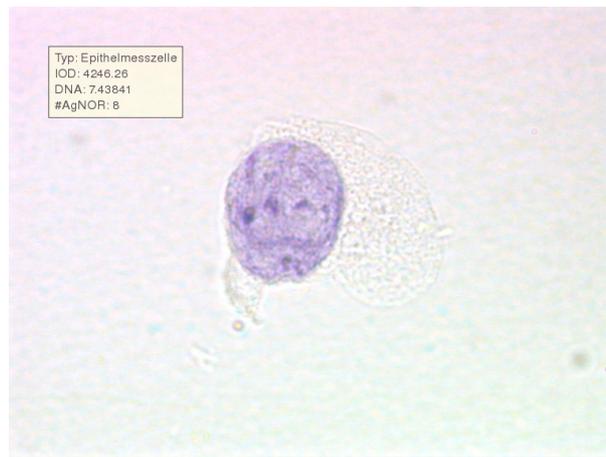


Abb. 3.29: Feulgen-Färbung



Abb. 3.30: Silbernitrat-Färbung

3.9 Screenshots der MMZA

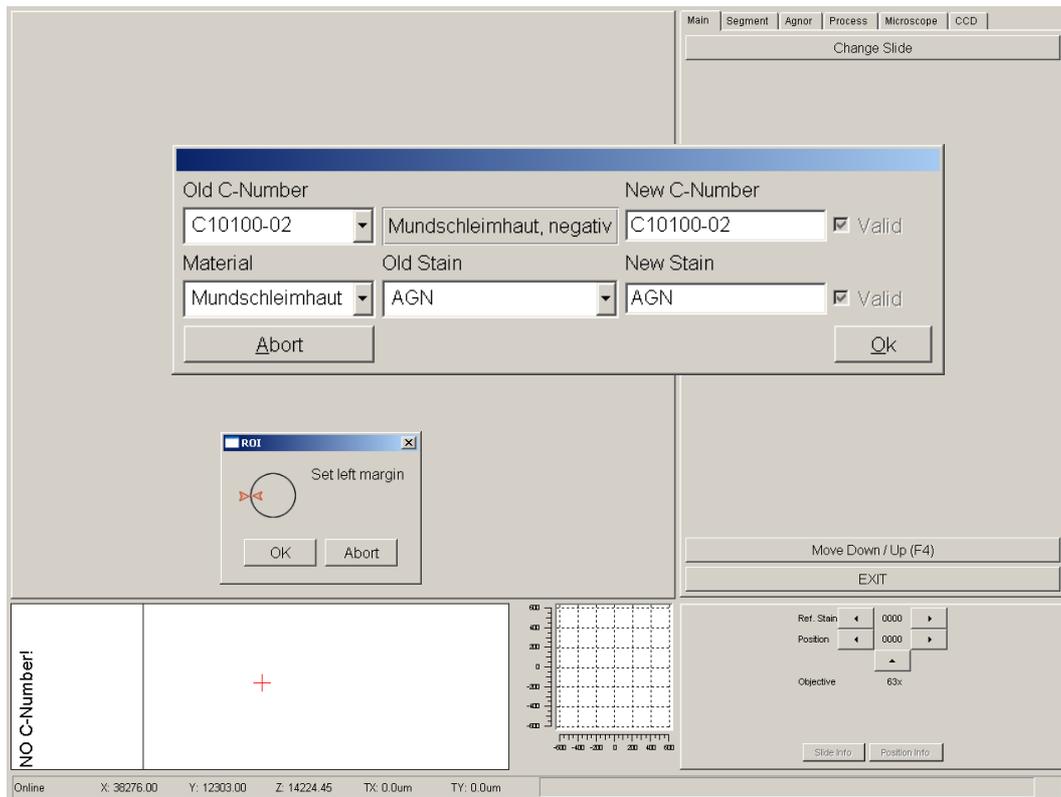


Abb. 3.31: Benutzeroberfläche zu Beginn eines neuen Präparats

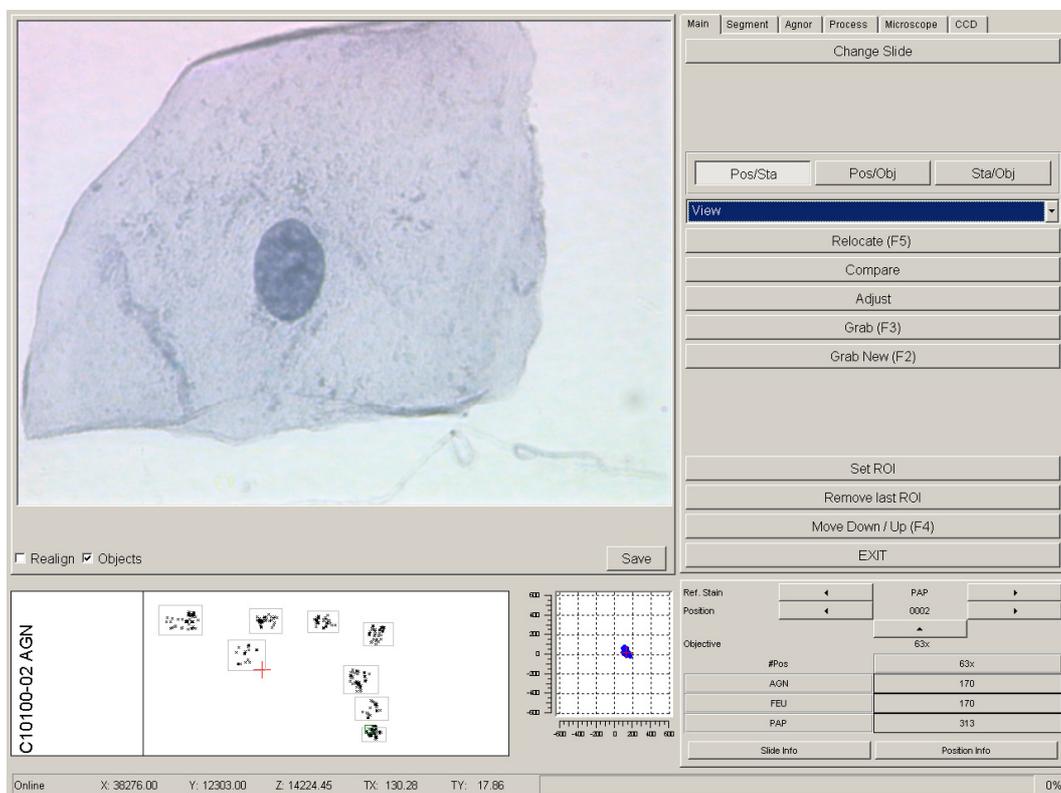


Abb. 3.32: Erstellen der ersten Bildergalerie in der Papanicolaou-Färbung

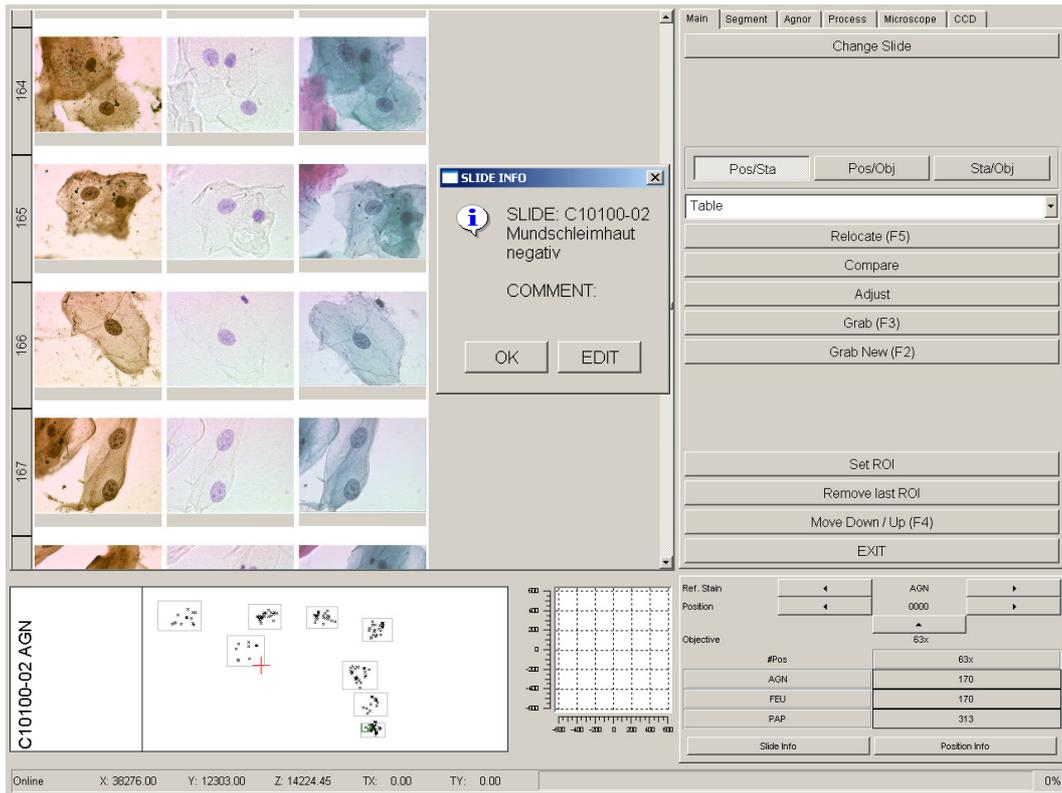


Abb. 3.33: Benutzeroberfläche nach Fertigstellung aller drei Bildergalerien in den drei Färbungen

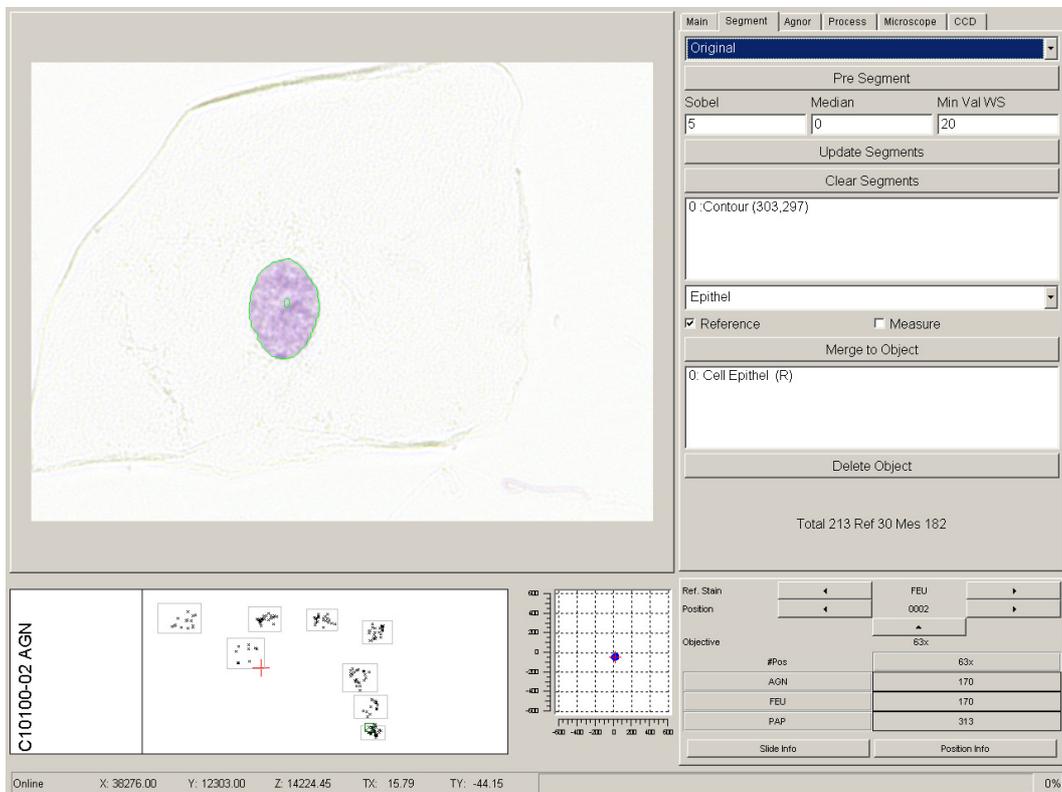


Abb. 3.34: Benutzeroberfläche für die Segmentierung und Klassifizierung der Zellen in der Feulgen-Färbung

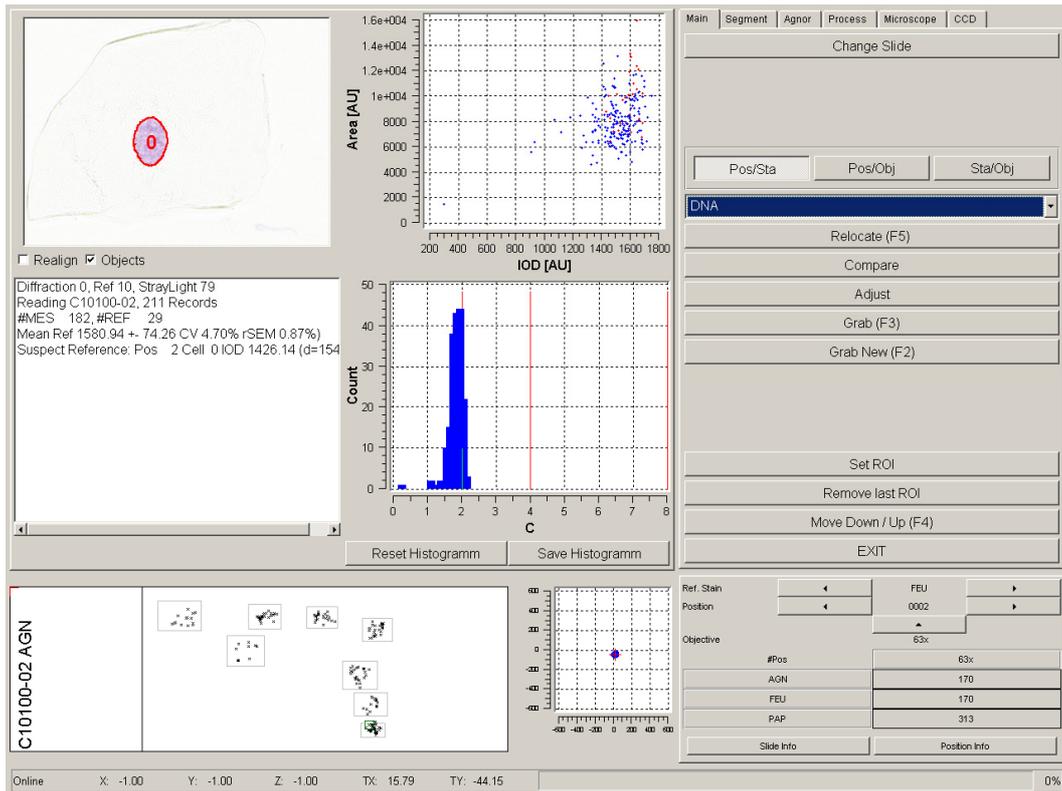


Abb. 3.35: Ergebnisoberfläche der DNA-Zytometrie

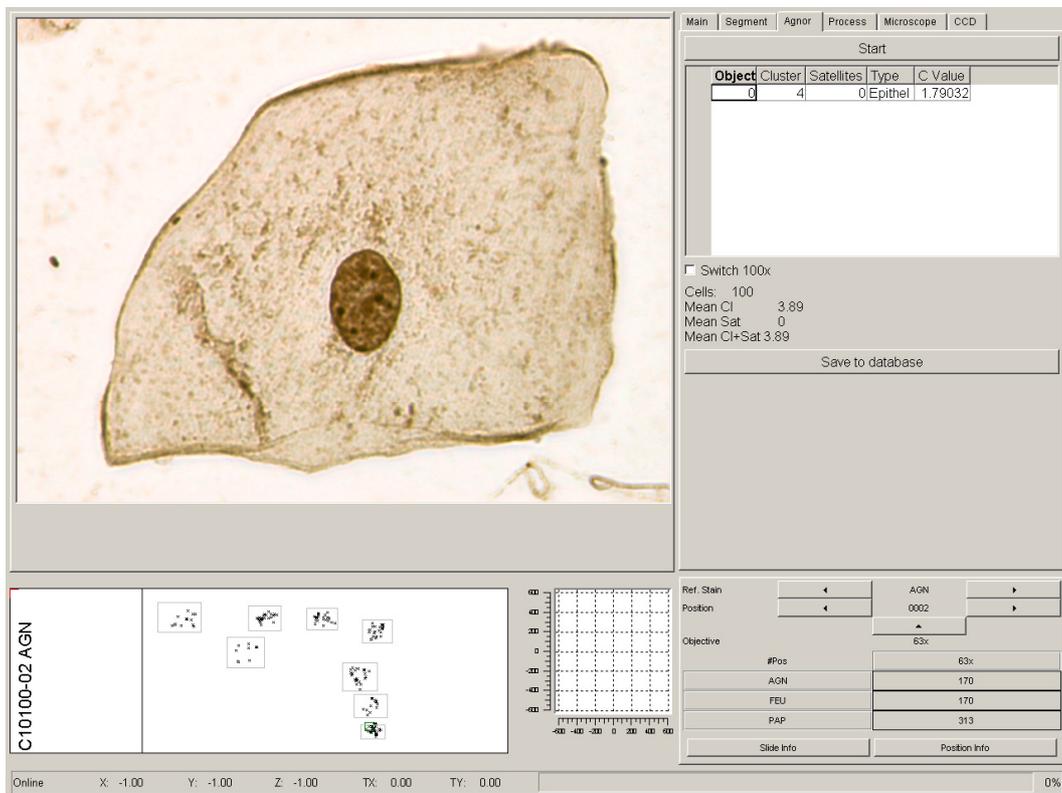


Abb. 3.36: Benutzeroberfläche für die manuelle AgNOR-Analyse in der Silbernitrat-Färbung

4 Diskussion

4.1 Funktionsfähigkeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Anwendbarkeit der Multimodalen Zellanalyse an Mundschleimhautabstrichen zu zeigen und die Machbarkeit dieser Methode im Sinne eines „proof of principle“ zu demonstrieren.

Mit Hilfe des am Lehrstuhl für Bildverarbeitung (LfB) der RWTH Aachen entwickelten Prototyps der MMZA konnten 30 zytologische Mundschleimhautabstriche multimodal untersucht werden. Die Papanicolaou-Färbung, die DNA-Zytometrie und die AgNOR-Analyse stellten die drei diagnostischen Säulen der MMZA dar. Eine Evaluation der durch ihre Kombination erreichbaren diagnostischen Treffsicherheit sowie die Feststellung eines diagnostischen Mehrwertes sollten in dieser Arbeit erfolgen. Von den 30 zytologischen Präparaten zu Beginn konnten 28 vollständige Ergebnisse für die MMZA liefern. Ein Präparat wurde in der Silbernitrat-Färbung bis zur Unbrauchbarkeit überfärbt und für ein weiteres konnte kein Follow-up ausfindig gemacht werden. Alle 28 verwertbaren Fälle wurden durch die Anwendung der MMZA im Vergleich mit den Follow-up-Diagnosen richtig diagnostiziert. Da die DNA-Zytometrie in zwei Fällen ein falsch negatives Ergebnis lieferte, das jedoch durch das positive Ergebnis der darauf folgenden AgNOR-Analyse ausgeglichen wurde, könnte hier ein diagnostischer Mehrwert der MMZA vermutet werden. Die Qualitätssicherung der DNA-Zytometrie erfolgte durch Vergleiche der Messergebnisse mit denen des bereits etablierten AutoCyte QUIC DNA-Systems und den Performance Standards der European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP). Die Übereinstimmung der DNA-zytometrischen Diagnosen beider Systeme lag bei 100 %, der Korrelationskoeffizient r der Modalwerte aller Peaks betrug 0,989. Die Forderungen der ESACP zur Qualitätssicherung wurden bis auf wenige Ausnahmen, die im Folgenden erörtert werden, eingehalten.

Generell ist festzustellen, dass die Anwendbarkeit und Funktionsfähigkeit der MMZA an Mundschleimhautabstrichen mit dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wobei das Erkennen von verbesserungsfähigen Aspekten ebenso von Bedeutung war.

4.1.1 Bewertung der Präparatequalität

Die 30 zytologischen Mundschleimhautpräparate, die sich aus 22 Bürstenabstrich- und acht sog. Monolayer-Präparaten zusammensetzten, mussten einen dreimaligen kaskadierten Färb- und Umfärbeprozess durchlaufen. Zu Beginn stand die Papanicolaou-Färbung, als zweites schloss sich die Feulgen-Färbung an und zuletzt fand die Silbernitrat-Färbung statt.

Die Färbequalität an sich war bezüglich der Papanicolaou- und der Feulgen-Färbung zufrieden stellend, so dass sich für das Auffinden von interessanten Messzellen und die automatische DNA-zytometrische Messung aus dieser Sicht keine Probleme ergaben. Zu beobachten war in Einzelfällen eine geringe Zytoplasma- und Zellkernschrumpfung nach der Feulgen-Färbung, die am ehesten auf Effekte der Nachfixation an zuvor nicht hinreichend fixierten Zellen zurückzuführen ist. Dies hatte jedoch auf das Messergebnis keinen Einfluss.

Problematischer stellte sich die Qualität der Silbernitrat-Färbung dar. Das Färbeprotokoll, das hier als Grundlage diente, war ursprünglich auf luftgetrocknete Präparate ausgerichtet. Die Mundschleimhautpräparate dieser Arbeit waren jedoch alkoholisch fixiert und färbten sich aus diesem Grund deutlich zu stark an, was bereits makroskopisch sichtbar war. Bereits Derenzini et al. (1988) beschrieben eine verstärkte Silberreaktion nach Alkoholfixierung des Gewebes. Im Verlauf wurde das Färbeprotokoll zwar adaptiert und die Inkubationszeit in der Silbernitrat-Gelatine-Ameisenlösung in der abgedunkelten, feuchten Kammer von 20 auf 15 Minuten verkürzt, das Färbeergebnis war aber dennoch nicht optimal. So musste festgestellt werden, dass die Software der automatischen AgNOR-Analyse mit dem Färbeergebnis überfordert war und keine plausiblen Ergebnisse liefern konnte, da die kleinen dunklen AgNOR-Partikel nicht hinreichend von der restlichen sehr dunklen Umgebung des Zellkerns abgegrenzt werden konnten. Lediglich die gröbere Zellkernflächenberechnung funktionierte hinreichend gut. Ein Präparat war völlig schwarz und fiel aus der AgNOR-Analyse ganz heraus; ein weiteres Präparat wurde von der automatischen AgNOR-Analyse komplett abgelehnt, konnte aber in der manuellen AgNOR-Analyse noch interpretiert werden. Bei den anderen Fällen konnte die Nukleolendetektion der automatischen AgNOR-Analyse die Nukleolen nicht korrekt abgrenzen und die Abgrenzung der AgNORs präsentierte lediglich verschwommene, zusammenlaufende Gebilde. Diese Probleme wären wahrscheinlich zukünftig durch ein Ändern des Färbeprotokolls und eine Verbesserung der Software zu vermeiden. Eine Berechnung der Zellkernflächen mit Hilfe der

Software der automatischen AgNOR-Analyse war trotz allem möglich und lieferte plausible Resultate.

Bei 29 Präparaten konnte ein manuelles AgNOR-Ergebnis erreicht werden. Die manuelle AgNOR-Analyse bot den Vorteil auf die Farbeintensität jedes Präparats gesondert reagieren zu können. So konnten durch Änderung der Lichtintensität am Mikroskop sowie durch mehrmaliges sorgfältiges Durchfokussieren jedes Zellkerns und durch Einschwenken eines grünen Farbfilters, der den Kontrast verbesserte, die AgNORs von 100 Zellkernen pro Präparat relativ gut erkannt und gezählt werden. Für zukünftige Anwendungen der MMZA ist jedoch der Einsatz der automatischen AgNOR-Analyse das Ziel.

Ein anderes Problem der Umfärbeprozesse, welches sich bei der Feulgen- und Silbernitrat-Färbung erkennen ließ, stellte der Zellverlust sowie die Zellverschiebungen auf dem Objektträger dar.

Dies hatte zur Folge, dass im Verlauf der Messungen immer weniger der vorab in der Papanicolaou-Färbung selektierten Zellen für die weiteren Messungen vorhanden waren. Von diesem Phänomen waren 26 Präparate (86,7 %) betroffen. Aus diesem Grund war es bei 16 Präparaten (53,3 %) nicht mehr möglich, die optimale Anzahl von 300 Messzellen zu erreichen. Ebenso wurde bei zwei Präparaten die geforderte Anzahl von 30 Referenzzellen unterschritten. Diese hohe Anzahl betroffener Präparate unterstreicht die Schwere dieses Problems. Eine Möglichkeit der Vorbeugung wäre gegeben, indem direkt in der Papanicolaou-Färbung ein gewisser Anteil zusätzlicher zytologischer Bilder aufgenommen würde. Andererseits wäre ein verbessertes Anhaften der Zellen auf dem Objektträger vorrangig zu erreichen.

Bezüglich der Präparationstechnik ließ sich ein beachtlicher Unterschied im Anteil der nicht relokalisierbaren Zellen feststellen. So wiesen die acht Monolayer-Präparate im Gesamtdurchschnitt einen Anteil von 20,3 % (5,6 – 61,1 %; SD: $\pm 18,3$ %) und dagegen die 22 Bürstenabstrich-Präparate im Gesamtdurchschnitt einen Anteil von 8,4 % (0,0 – 66,1 %; SD: $\pm 14,8$ %) nicht relokalisierbarer Zellen auf. Diese Zahlen beziehen sich auf die ursprüngliche Anzahl der zytologischen Bilder aus der Papanicolaou-Färbung und die verbliebenen relokalisierbaren Zellen nach der Silbernitrat-Färbung. Eine Erklärung für das noch schlechtere Anhaften der Zellen bei den Monolayer-Präparaten mag an dem Einbringen der vom Bürstchen abgelösten Zellen in die alkoholische Fixationsflüssigkeit (SurePath) liegen. Dort nämlich erstarren die Zellen zum einen in ihrer jeweiligen Form und verlieren

zum anderen ihre natürliche Klebrigkeit, die sonst durch Proteine des Speichels gegeben ist. Außerdem sedimentieren die Zellen in der Flüssigkeit auf dem Objektträger in ihrer jeweiligen Form und legen sich diesem keinesfalls plan an. Dies führte zu einer unzureichenden Anhaftung der Zellen, die sich während der Umfärbeprozesse bemerkbar machte. Offensichtlich ist dies auch durch die vorhandene Beschichtung des Objektträgers für die Monolayer-Präparate nicht zu vermeiden. Im Vergleich dazu hafteten die Zellen der Bürstenabstrich-Präparate besser am Objektträger, wenn auch insgesamt dennoch nicht gut genug. Die vier Präparate (13,3 %), bei denen *alle* Bildpositionen aus der Papanicolaou-Färbung bis zur Silbernitrat-Färbung relokalisierbar waren, waren Tumorzell-negative Bürstenabstrich-Präparate. Bei den Monolayer-Präparaten gab es keines, das nicht von Zellverlusten gekennzeichnet war. Die Anfertigung von Bürstenabstrich-Präparaten stellt die herkömmliche zytologische Präparationstechnik dar. Sie weist zur Monolayer-Präparateherstellung deutliche Unterschiede auf. So werden die Zellen bei den Bürstenabstrichen nicht vor Aufbringung auf den Objektträger fixiert, wie es bei den Monolayer-Präparaten der Fall ist, sondern sie werden in einem unfixierten und damit auch beweglichen Zustand nativ in ihrem eigenen Flüssigkeitsfilm, also dem Speichel, der natürliche klebrige Inhaltsstoffe – wie z. B. Proteine – enthält, auf den Objektträger aufgebracht. In diesem Zustand sind die Zellen noch klebrig und flexibel, passen sich der Oberfläche an und können sich ihr plan anlegen. Erst dann erfolgt die alkoholische Sprayfixation (Merckofix, Fa. Merck, Darmstadt), die Carbowachs und Propanol enthält. Im Vergleich mit den Monolayer-Präparaten schien diese Form der Aufbringung und Fixation der Mundschleimhautzellen in dieser Arbeit vorteilhafter zu sein. Im Vergleich mit den Präparationstechniken anderer Gewebe schneidet die Methode der Sprayfixation wiederum schlechter ab und stellt sie in Frage. Es ist zu vermuten, dass es sich bei diesem Problem um ein für Mundschleimhautpräparate spezifisches handeln könnte. Zwei zu dieser Arbeit parallel verlaufende Studien, die die Anwendung der MMZA an serösen Körperhöhlenergüssen (Frau Christiane Henning) und an Schilddrüsengewebe (Frau Astrid Metzger) untersuchten, wiesen keine derartigen Zellverluste während der Umfärbeprozesse auf. Der Grund dafür mag in der unterschiedlichen Präparationstechniken und Fixation dieser Gewebe, wobei keine alkoholische Sprayfixation stattfindet, liegen. Demnach lässt sich vermuten, dass auch die Sprayfixation für das Anhaften von Mundschleimhautzellen negativ ist.

Andererseits fiel auf, dass in Bezug auf die zytologischen Diagnosen der Präparate ebenso unterschiedliche Zellverlustanteile zu verzeichnen waren. So zeigten die zytologisch Tumorzell-negativen Präparate im Durchschnitt mit 8,3 % (0,0 – 31,2 %; SD: \pm 9,3 %) den

geringsten Anteil und die zytologisch zweifelhaften mit 14,1 % (0,0 – 66,1 %; SD: $\pm 22,1$ %) den höchsten Anteil verlorener Zellen. Die zytologisch Tumorzell-positiven lagen mit einem Durchschnittswert von 12,4 % (0,0 – 61,1 %; SD: $\pm 17,6$ %) dazwischen. Eine Erklärung hierfür mag in der Form und Beschaffenheit von dysplastischen Zellen oder Tumorzellen liegen. Sie sind im Vergleich zu normalen Plattenepithelien (die in der Form eher platt sind und eine plane Oberfläche haben) eher kugelig geformt, deformiert und weisen eine eher unregelmäßige, nicht plane Oberfläche auf. Dies scheint zu einer schlechteren Anhaftung dieser Zellen beizutragen. Mit Beachtung des Follow-up ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Zellen von gesunden Patienten mit Bürstenabstrichen am besten und die Zellen von an Mundkrebs erkrankten Patienten mit Monolayer-Präparaten am schlechtesten am Objektträger gehaftet haben.

4.1.2 Bewertung des Messvorgangs

4.1.2.1 Bedienung und Bildaufnahme

Das Arbeiten mit der von der Firma Trolltech entwickelten Benutzeroberfläche gestaltete sich problemlos, da sie übersichtlich erschien und die einzelnen Arbeitsschritte in einer logischen Reihenfolge untereinander angeordnet waren. Die Verknüpfung des Rechners mit dem Mikroskop funktionierte zu jedem Zeitpunkt einwandfrei. Die Karte unten links auf dem Bildschirm, auf der die entsprechenden „Regions of Interest“ elektronisch eingezeichnet werden konnten und die dem Benutzer immer eine Übersicht gab, wo genau das Präparat im Mikroskop positioniert und bereits aufgenommene Bilder lokalisiert waren, war ein sehr hilfreiches Mittel während der Aufnahmen. Die Visualisierung, die den größten Anteil der Benutzeroberfläche einnahm, bot verschiedene Möglichkeiten der Bilddarstellung. Es war angenehm und hilfreich die Bildaufnahmen in allen drei Färbungen nebeneinander gestellt betrachten zu können. Häufig war es von Nutzen in der Feulgen- oder Silbernitrat-Färbung, sich die Morphologie und das Färbeverhalten in der Papanicolaou-Färbung noch einmal vor Augen zu führen. Allerdings muss erwähnt werden, dass hier eine Schwäche der Software vorlag, da beim Ändern der Bildansicht jedes Mal ein erneutes Laden der gesamten Daten eines Präparats erforderlich war, welches bis zu acht Minuten dauern konnte. Somit fand dieser Vorteil aus Zeitgründen nur selten Anwendung und sollte zukünftig benutzerfreundlicher werden.

Der Weißabgleich vor einer erneuten Bildaufnahme zeigte häufiger ein nicht zufrieden stellendes Ergebnis, so dass er zeitweise mehrmals hintereinander ablaufen musste.

Anschließend konnten problemlos die ausgewählten Zellen zunächst in der Papanicolaou-Färbung fotografiert werden. Ein Autofokus existierte zu der Zeit dieser Arbeit noch nicht, wurde aber mittlerweile installiert. Dies ermöglicht nun ein bequemerer und zeitsparenderes Fotografieren. Die Speicherzeit für ein Bild erschien mit der Dauer von ca. einer Sekunde subjektiv zu lang, zumal in dieser Zeit jede kleinste Erschütterung des Mikroskoptisches das Bild unbrauchbar machte. Insgesamt ist die Dauer der Erstellung der ersten Bildersequenz in der Papanicolaou-Färbung mit zwei bis drei Stunden zu lang gewesen und wäre so in der Routinediagnostik nicht tragbar. Zwar verbesserte sich die Software im Verlauf und wurde schneller, ebenso beschleunigte die wachsende Erfahrung und Routine des Anwenders mit der Zeit den Prozess, aber es blieb dennoch stark oberhalb einer wünschenswerten Zeit.

4.1.2.2 Relokalisierung und Segmentierung

Das **Relokalisieren** identischer Zellen in verschiedenen Färbungen ist die Grundidee der Multimodalen Zellanalyse. Die gespeicherten Bildpositionen aus der Papanicolaou-Färbung wurden das erste Mal in der Feulgen-Färbung und das zweite Mal in der Silbernitrat-Färbung relokalisiert und erneut fotografiert. Anhand der in der Datenbank gespeicherten Bildkoordinaten konnte der Mikroskoptisch auf die genaue Position eines jeden Bildes in jeder der drei Färbungen eingestellt werden. Die Relokalisierung einer Bildposition gliederte sich in einen groben und einen feinen Einstellungsschritt. Beim jeweils ersten Bild eines Präparats in einer neuen Färbung kamen Ungenauigkeiten durch die Mechanik des Mikroskoptisches oder das Einlegen des Objektträgers in die Halterung zum Tragen. Aus diesem Grund war der Relokalisierungsversuch des ersten Bildes eines neuen Präparats nie ausreichend genau und der Mikroskoptisch bewegte sich nur in die Nähe der gesuchten Position. Bei 23 Präparaten wurden entsprechend des Bildindexes Werte für die Verschiebevektoren in die x- und y-Richtung im Vergleich zur Bildposition Null ermittelt. Daraus wurde für jedes Präparat der Euklidische Abstand ($\sqrt{dx^2/dy^2}$) errechnet. Zwei Werte pro Präparat konnten dabei ermittelt werden. Das waren zum einen die Abweichung für die Bildposition Null (Euklidischer Abstand) von der Papanicolaou- auf die Feulgen-Färbung und zum anderen der Euklidische Abstand von der Papanicolaou- auf die Silbernitrat-Färbung. Im Gesamtdurchschnitt aller 23 Präparate ergaben sich Werte für den Euklidischen Abstand von 176,99 μm (24,68 – 1707,43 μm ; SD: $\pm 337,92 \mu\text{m}$) von der Papanicolaou- auf die Feulgen-Färbung und von 185,22 μm (7,68 – 1634,72 μm ; SD: $\pm 333,88 \mu\text{m}$) von der Papanicolaou- auf die Silbernitrat-Färbung. Bei einem entsprechenden Wert von 92,5 μm als Maß der

Bilddiagonalen des Bildschirms war – anschaulich dargestellt – das erste Relokalisierungsergebnis durchschnittlich um eine Distanz von zwei Bildschirmdiagonalen um das eigentliche Bild verschoben. Diese Distanz musste manuell mit Hilfe des Mikroskops abgesucht werden, um die gesuchte Zellformation zu finden. Dies konnte teilweise etwas länger dauern, war aber nur einmal zu Beginn eines neuen Präparats notwendig, da der ermittelte Verschiebevektor für alle folgenden Bildpositionen in der Datenbank gespeichert und im weiteren Verlauf automatisch auf sie angewendet wurde. Durch diese programmtechnische Unterstützung funktionierte die Relokalisierung ab dem zweiten Bild ausreichend gut und schnell.

Die pixelgenaue Übereinanderlegung des Datenbankbildes und des Livebildes in der Feulgen- bzw. Silbernitrat-Färbung stellte die Feinjustierung der Relokalisierung dar. Diese automatische Korrektur war ein zweiter Arbeitsschritt und dauerte im Mittel ca. fünf Sekunden pro Bild und war damit subjektiv eindeutig zu lang. Aus diesem Grund wurde weitestgehend auf die Feinjustierung verzichtet. Für die Routinediagnostik müsste die Software für die pixelgenaue Überlagerung hinsichtlich der Geschwindigkeit verbessert werden. Ein Verfahren zur vollkommen automatisierten Zellrelokalisierung wurde kürzlich am Lehrstuhl für Bildverarbeitung (LfB) entwickelt und in das Modell der Multimodalen Zellanalyse integriert.

Bis zu einem DNA-zytometrischen Ergebnis waren insgesamt vier verschiedene Arbeitsschritte notwendig. Der erste beinhaltete das Relokalisieren und Fotografieren der Zellen in der Feulgen-Färbung mit einem Zeitaufwand von ca. einer Stunde, abhängig von der Masse des vorhandenen Bildmaterials. Als nächstes schloss sich die automatische **Segmentierung** der Zellkerne an, die erst nach der Bildaufnahme gestartet werden konnte und keine Anwesenheit des Anwenders erforderte. Im dritten Arbeitsschritt konnten nun die errechneten Kernkonturen manuell korrigiert und die Zellen mit Hilfe einer einfach zu bedienenden Benutzeroberfläche in Referenz- und Messzellen klassifiziert werden. Dieser Prozess war zu Beginn der Arbeit – als auch die Berechnung der Kernsegmente noch nicht einwandfrei funktionierte – sehr mühsam und zeitintensiv (fünf Stunden pro Präparat). Allerdings konnte der Segmentierungsalgorithmus erfreulicherweise bald derartig verbessert werden, dass nachträgliche Korrekturen der Kernsegmentierungen nicht mehr nötig waren und die alleinige Klassifikation der Zellen nur noch 30 – 45 Minuten je Probe in Anspruch nahm. Im vierten und letzten Schritt konnten die DNA-Werte schließlich berechnet und die DNA-Histogramme ausgedruckt werden. Zusammenfassend stellte sich somit die

DNA-Zytometrie – trotz aller Verbesserungen – als ein stundenlanger, mehrschrittiger Prozess dar, der in dieser Form in der Routinediagnostik nicht zu tolerieren wäre. Das AutoCyte QUIC-DNA-System am Institut für Cytopathologie (LfC) in Düsseldorf zeigt dazu im Vergleich erhebliche Vorteile. Durch eine andere Funktionsweise und Software liegt der Zeitaufwand für die DNA-zytometrische Diagnostik insgesamt bei ca. 30 Minuten pro Präparat. Die Zellkernsegmentierung und DNA-Berechnung erfolgt unmittelbar nach Aufnahme eines Zellbildes und gliedert sich somit sinnvoll und schnell in einen Arbeitsprozess ein. Damit ist die DNA-Zytometrie am LfC fester Bestandteil der täglichen Routinediagnostik geworden. Die Messgenauigkeit beider Systeme ist zufrieden stellend, bzw. bei der MMZA sogar leicht besser. Dennoch wäre ein Angleichen der DNA-Zytometrie hinsichtlich der Geschwindigkeit und Arbeitsintensität an das System in Düsseldorf zukünftig wünschenswert.

4.1.2.3 AgNOR-Analyse

Wie bereits erwähnt, lieferte die automatische AgNOR-Analyse auf Grund von Färbeproblemen der Präparate keine verwertbaren Ergebnisse. Dies ist als Rückschlag interpretierbar, da die MMZA optimalerweise die automatische AgNOR-Analyse enthalten sollte. Die manuelle Auszählung der AgNORs verlief vergleichsweise problemlos. Im selben Arbeitsschritt, in dem in der Silbernitrat-Färbung die Zellen relokalisiert wurden, konnten 100 interessante Zellen für die AgNOR-Analyse nach Kriterien der Morphologie des eingblendeten Papanicolaou-Bildes und des eingblendeten DNA-Wertes selektioniert werden. Die Auszählung erforderte dann das Einschwenken des 100er Objektivs des Mikroskops in Öl, da die Relokalisierung und Bildaufnahme an das 63er Objektiv in Öl gekoppelt ist. Problemlos konnten die AgNORs dann durch Durchfokussieren, Änderung der Lichtintensität und Verwendung eines grünen Farbfilters gezählt werden. Die so ermittelten Werte wurden anschließend in eine Liste auf der Benutzeroberfläche für die AgNOR-Analyse eingetragen. Praktischerweise wurde die Anzahl bereits ausgezählter Zellen sowie der Durchschnittswert der AgNORs noch während des Zählvorgangs auf dem Bildschirm angezeigt. Die AgNOR-Analyse dauerte durchschnittlich zwei Stunden.

Insgesamt lag der optimale Zeitaufwand der MMZA pro Präparat für alle Arbeitsschritte gegen Ende dieser Studie bei ca. acht bis zehn Stunden reiner Arbeitszeit am Cytometer ohne Einbeziehung der Berechnungszeiten für die Kernsegmentierung und DNA-Zytometrie. Zu Beginn der Messungen jedoch war diese Zeit noch ca. doppelt so hoch, wodurch eine stetige

Verbesserung des Systems erkennbar wird. Dennoch ist der Status quo für routinemäßigen Einsatz noch nicht effizient genug und zu umständlich.

4.2 Bewertung der DNA-Zytometrie

4.2.1 Messpräzision der Rattenleberpräparate

Zur Qualitätskontrolle der Messpräzision dienten standardisierte Testmessungen an Rattenlebertupfpräparaten an beiden Systemen. Diese fanden in Anlehnung an die Vorgaben der ESACP (Giroud et al. 1998) statt. Drei Leberpräparate derselben Ratte (A, B und C) wurden dafür zunächst jeweils dreimal mit der MMZA DNA-zytometrisch und anschließend jeweils einmal mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System vermessen. Wichtige Qualitätsmaße zur Beurteilung der Messpräzision wurden für beide Systeme berechnet.

Dabei zeigten die Ergebnisse der MMZA in zwei Einzelmessungen eine sehr geringe Überschreitung des geforderten Qualitätsmaßes. Dies betraf die Rattenleberpräparate A und B jeweils in der dritten Messung. Dabei lag der Korrelationskoeffizient („CC“) des 2c-Peaks (Soll: $< 0,4$) einerseits bei 0,42 und andererseits bei 0,47. Die Mittelwerte der Ergebnisse aus Messung eins bis drei dieser beiden Präparate jedoch lagen wiederum in den gewünschten Wertegrenzen, so wie auch alle anderen Werte und Mittelwerte. Demnach wurden im Mittel von der MMZA alle geforderten Messwertgrenzen eingehalten und es ist daraus zu schließen, dass mit diesem System durch die so belegte Messpräzision eine zuverlässige DNA-Zytometrie möglich ist. Zusätzlich bleibt zu bemerken, dass zu den Zeiten dieser Messungen noch keine automatische Glare- (= Streulicht) Korrektur in das System der MMZA integriert war, welches für Messungenauigkeiten verantwortlich sein kann. Mittlerweile wurde das System daraufhin verbessert und die Messgenauigkeit sollte nun noch besser sein.

Im Gegensatz dazu erzielte das AutoCyte QUIC-DNA-System größtenteils schlechtere Messergebnisse. Im Vergleich mit den Mittelwerten der MMZA waren alle Qualitätsparameter des AutoCyte QUIC-DNA-Systems schlechter, d. h. näher an den einzuhaltenden Grenzwerten. Es resultierte sogar bei fünf Werten eine deutliche Überschreitung des Sollwertes. Das Rattenleberpräparat B wies eine Erhöhung des Korrelationskoeffizienten r („CC“; Soll: $< 0,4$) des 2c-Peaks (r : 0,66) und der Referenzzellen (r : 0,62) auf. Außerdem wurden der Variationskoeffizient („CV“) aller 2c-Peaks und aller 4c-Peaks (Soll: $< 2\%$) mit den Werten von 2,5 % und 3,1 % deutlich überschritten. Letztlich war auch der CV von 4c /

2c (Soll: < 1 %) mit 1,2 % leicht erhöht. Damit ist dem AutoCyte QUIC-DNA-System eine vergleichsweise schlechtere Messpräzision zu bescheinigen. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass vier Monate nach der MMZA-Messung verstrichen sind, bis die Rattenleberpräparate mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System gemessen wurden, welches auch eine Erklärung für die schlechtere Messpräzision darstellen könnte, da die besten DNA-Messergebnisse nur mit frischem Zellmaterial erreicht werden können (Kindermann und Hilgers, 1994).

4.2.2 DNA- Ergebnisse und DNA-Histogramme im Vergleich

Die Messgenauigkeit der MMZA sollte zusätzlich durch Vergleiche der DNA-Messergebnisse der 30 Mundschleimhautpräparate mit denen des AutoCyte QUIC-DNA-Systems erfolgen.

Die grundsätzlichen Bedingungen bezüglich der Einhaltung von 30 Referenz- und 300 Analysezellen (Giroud et al. 1998; Haroske et al. 1998, 2001) konnten bei den Messungen mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System generell besser erreicht werden. Hier wurden in allen Fällen ≥ 30 Referenzzellen gemessen, in sechs Messungen wurden weniger als 300 Analysezellen einbezogen. Bei der MMZA konnten in zwei Fällen nicht genügend Referenzzellen und in 16 Fällen weniger als 300 Analysezellen gemessen werden. Diese große Diskrepanz beider Systeme ist dadurch zu erklären, dass die MMZA an die in der ersten Färbung aufgenommenen Zellen gebunden war, da es die Idee der MMZA ist, an identischen Zellen ausgeführt zu werden und es das Problem der Zellverluste durch die Umfärbeprozesse gab (vgl. Kapitel 3.2.2 und 4.1.1). Dies verhinderte leider sehr oft das Erreichen der erforderlichen Zellanzahlen für die DNA-Zytometrie. Die Schwere der Zellverlustproblematik für die MMZA wird dadurch wieder deutlich. Mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System konnten hingegen wahllos Zellen in den zuvor auf dem Objektträger eingezeichneten Arealen für die DNA-Zytometrie ausgewählt werden und die Zellanzahl unterlag keinen derartigen Beschränkungen. Die beiden DNA-zytometrisch von der MMZA und vom AutoCyte QUIC-DNA-System als falsch negativ gemessenen Präparate waren bei der MMZA mit geringfügig zu wenigen Messzellen vergesellschaftet (278 und 297 Zellen). Dies bekräftigt wiederum die Forderung nach mindestens 300 Messzellen für die DNA-Zytometrie.

Bei beiden Systemen war anhand der Bildergalerie eine nachträgliche Qualitätskontrolle der gemessenen Zellkerne möglich. Dies ist wichtig, um eine Messung nicht gewünschter Zelltypen und von Artefakten auszuschließen (Böcking et al. 1999).

Eine kurze Rekapitulation und Interpretation der Messergebnisse der MMZA und des AutoCyte QUIC-DNA-Systems liefert der folgende Abschnitt.

Es wurden 30 Mundschleimhautpräparate, bestehend aus 22 Bürstenabstrichen und acht sog. Monolayer-Präparaten, DNA-zytometrisch vermessen. Die vorherigen zytologischen Diagnosen setzten sich aus zehn Tumorzell-negativen, acht zweifelhaften und zwölf Tumorzell-positiven Beurteilungen zusammen.

Im Durchschnitt gingen 33 Referenz- und 261 Analysezellen in die 30 Messungen der MMZA ein. Alle DNA-Ergebnisse der zytologisch Tumorzell-negativen Präparate waren hier DNA-euploid. Das Follow-up bestätigte in neun Fällen eine gutartige Mundschleimhautveränderung, in einem Fall war es nicht mehr nachvollziehbar. Der Histogrammtyp der zehn Messungen stellte sich als DNA-diploid heraus. Eigentlich wäre in der Routine eine DNA-Zytometrie bei zytologisch Tumorzell-negativen Präparaten nicht nötig, sollte aber hier zu Validierung der Messgenauigkeit erfolgen. Die DNA-Zytometrie lieferte somit in den neun Fällen, bei denen ein Vergleich mit dem Follow-up möglich war, das richtige Ergebnis, womit für negative Präparate eine gute Messgenauigkeit gezeigt wurde. Leider war jedoch die Fallzahl für eine optimale Aussagekraft zu klein.

Bei dem AutoCyte QUIC-DNA-System waren bei den 30 Analysen im Mittel 31 Referenz- und 275 Analysezellen vertreten. Auch hier waren alle DNA-Messungen der zehn Tumorzell-negativen Präparate DNA-euploid und die Histogrammtypen in neun Fällen DNA-diploid und in einem DNA-polyploid. Diese Histogrammtypisierung ist der einzige Unterschied in den beiden Messungen der zwei Systeme, der allerdings keine diagnostische Relevanz hatte.

Von den acht zytologisch zweifelhaften Präparaten stellten sich sechs im Follow-up als bösartige und zwei als gutartige Mundschleimhautveränderung heraus. Die DNA-Diagnosen beider Messsysteme waren wiederum identisch und lauteten in fünf Fällen DNA-aneuploid und in drei Fällen DNA-euploid. Beide Systeme lagen bei demselben Präparat kongruent mit der Diagnose DNA-euploid falsch negativ, da das histologische Follow-up Mundkrebs (T1 M0 N0; Stadium 1; R0; G2) lautete. Durch beide Messsysteme war bei diesem Fall der Histogrammtyp DNA-polyploid. Damit kann es sich einerseits um einen zufällig bei

demselben Präparat aufgetretenen Messfehler handeln; wahrscheinlicher ist jedoch, dass es sich um einen „geographic error“ des Abstrichnehmers und somit die Abwesenheit von Tumorzellen auf dem Präparat, oder einen „sampling error“, d. h. ein Fehler des Anwenders durch falsche Auswahl von Analysezellen, handelt. Letztlich kann es sich auch um einen DNA-euploiden Tumor handeln, da die Nichtnachweisbarkeit von DNA-Aneuploidie Malignität nicht ausschließt, weil einige wenige Tumore so geringe Aberrationen zeigen, dass sie keinen DNA-zytometrisch nachweisbaren Effekt haben (Böcking 1998). Der letztendliche Grund bleibt ungeklärt. Von den übrigen sieben Histogrammtypen stimmten drei überein. Bei den anderen vier gab es zwei Mal die Diskrepanz „DNA-diploid (MMZA) – DNA-polyploid (AutoCyte QUIC-DNA-System)“ und ein mal die Diskrepanz „DNA-multiploid (MMZA) – DNA-x-ploid (AutoCyte QUIC-DNA-System)“ sowie einmal „DNA-x-ploid (MMZA) – DNA-multiploid (AutoCyte QUIC-DNA-System)“. Bei den acht zweifelhaften Präparaten stimmte daher nur die Hälfte im Histogrammtyp überein, was wahrscheinlich durch das Messen nicht identischer Zellen zu erklären ist. Bei den Messungen des AutoCyte QUIC-DNA-System waren bekannterweise auch Zellen außerhalb der mit einem Filzschreiber auf dem Objektträger aufgezeichneten Kringel gemessen worden. Auch ein Bemühen, nur innerhalb der Kringel zu messen, würde das Messen nur identischer Zellen natürlich ebenso wenig garantieren können, da die Auswahl an Zellen noch zu groß wäre. Dieser Fakt erklärt viele Unstimmigkeiten zwischen den Messergebnissen beider Systeme. Außerdem bleibt zu bemerken, dass die Messungen an dem AutoCyte QUIC-DNA-System von einem Gynäkologen mit einer Spezialausbildung in Zytologie durchgeführt wurden. Dies begünstigte eine fachkundigere Zellektion als es durch die Doktoranden bei der MMZA möglich war. Erfreulicherweise führte dies jedoch in keinem Fall zu einer unterschiedlichen DNA-zytometrischen Diagnose. CV- und Modalwertdifferenzen sowie einige unterschiedliche Histogrammtypisierungen könnten dadurch allerdings zu erklären sein. Zu den Histogrammtypen ist zu sagen, dass sie hier nur der Vollständigkeit halber angegeben wurden, um die Systeme miteinander zu vergleichen. Denn eine Quantifizierung der DNA-Aneuploidie zum Zwecke der Malignitätsgradierung erfolgt bei der Messung von Dysplasien in der Regel nicht, weil eine nicht ausgeschlossene Mitmessung normaler Zellen das Gradierungsergebnis verfälschen könnte (Böcking 1998). Nur wenn ausschließlich morphologisch eindeutige Tumorzellen gemessen wurden, was bei keiner Messung hier der Fall war, darf auch anhand des DNA-Histogrammtyps ein DNA-Malignitätsgrad bestimmt werden (Giroud et al. 1998).

Ähnliches gilt für die zwölf zytologisch Tumorzell-positiven Präparate. Das Follow-up bestätigte in allen Fällen eine bösartige Mundschleimhautveränderung. Die MMZA sowie das AutoCyte QUIC-DNA-System lagen somit in elf Fällen (91,7 %) mit der Diagnose DNA-aneuploid richtig. Wiederum war bei demselben Präparat bei beiden Messsystemen eine falsch negative Diagnose aufgetreten. Hier gelten zur Erklärung dieselben Überlegungen wie für den falsch negativen Fall beider Messsysteme bei den zytologisch zweifelhaften Präparaten. Die Histogrammtypen der Messungen beider Systeme stimmten in elf (91,7 %) Fällen überein. Ein Fall stimmte wie folgt nicht überein: „DNA-multiploid (MMZA) – DNA-x-ploid (AutoCyte QUIC-DNA-System)“. Insgesamt stimmten demnach 24 von 30 (80 %) Histogrammtypisierungen überein. Gründe für die sechs Diskrepanzen sind oben aufgeführt.

Erfreulich ist die 100 %ige Übereinstimmung in den DNA-zytometrischen Diagnosen der beiden Messsysteme. Das neue System der MMZA hat sich diesbezüglich bewährt und bewiesen, dass es richtige DNA-Diagnosen liefern kann.

Ein weiterer Aspekt der Qualitätssicherung fordert für den Variationskoeffizienten (CV) der Referenzzellen einen Wert $< 5\%$. Je niedriger der Variationskoeffizient der Referenzzellen ist, desto genauer werden die Modalwerte der Analysezellen berechnet. Durch die Messungen an den Rattenleberpräparaten konnte bereits gezeigt werden, dass beide Messsysteme dieses Kriterium hinreichend erfüllen. Da diese Messungen an der Rattenleber ausschließlich der Qualitätssicherung dienen und in Anlehnung an die Forderungen der ESACP durchgeführt wurden, sind die erreichten Messergebnisse für den CV der Referenzzellen stärker zu bewerten als die der DNA-Messungen selbst. Ein weiterer Grund für die Richtigkeit dieser Aussage liegt darin, dass die DNA-Messungen der Rattenleberpräparate etwa sechs Monate nach den DNA-Messungen der Mundschleimhaut stattfanden und das System der MMZA in dieser Zeit weitere umfangreiche Verbesserungen der DNA-Zytometrie (z. B. die automatische Glare-Korrektur) erfahren hat. Dadurch entsprechen die Ergebnisse der Rattenleber-Messungen dem neueren Stand der Entwicklung des MMZA-Systems. Damit sollten einige schlechtere Ergebnisse der CV-Werte der MMZA bei den 30 DNA-Messungen der Mundschleimhaut sowie die relativ große mittlere Schwankung der CV-Werte von 2,5 % aller Fälle von beiden Systemen im Vergleich zum Teil erklärt sein.

Der durchschnittliche CV-Wert der Referenzzellen aller 30 Präparate lag mit der MMZA bei 5,6 % und überstieg damit leicht den Sollwert von 5 %. Dahingegen lag der durchschnittliche CV-Wert der Referenzzellen aller 30 Präparate mit dem AutoCyte QUIC-

DNA-System bei 3,1 % und erfüllte so dieses Kriterium zufrieden stellend. Daraus kann abgeleitet werden, dass zu dem Zeitpunkt dieser DNA-Messungen das AutoCyte QUIC-DNA-System präziser gemessen hat.

Bezüglich der CV-Werte der Referenzzellen der MMZA ist allerdings zu bemerken, dass zwei auffällige Ausreißer mit CV-Werten von 21,6 % bei einem zytologisch Tumorzell-negativen Bürstenabstrich und von 19,2 % bei einem zytologisch Tumorzell-positiven Monolayer-Präparat zu verzeichnen waren, die nicht eindeutig zu erklären sind. Nimmt man diese beiden Werte aus der Berechnung des Mittelwertes heraus, so liegt auch der durchschnittliche CV-Wert der Referenzzellen bei der MMZA mit einem Wert von 4,5 % unterhalb der geforderten 5 %-Marke und somit im Sollbereich.

4.2.3 Korrelation der Modalwerte beider Messsysteme

Kurz rekapituliert war zwischen den beiden Systemen eine hohe Korrelation der Modalwerte der Peaks aus den DNA-Histogrammen zu verzeichnen. Die Korrelation wird verwendet, um den Zusammenhang zwischen zwei Datensätzen zu überprüfen. Diese Datensätze werden skaliert, um unabhängig von den jeweiligen Maßeinheiten zu sein. Die Korrelation wird aus der Division der Kovarianz durch das Produkt der beiden Standardabweichungen berechnet. Hängen hohe Werte des einen Datensatzes mit hohen Werten des anderen zusammen, wird von einer positiven Korrelation ($r = 1$) gesprochen. Hängen niedrige Werte des ersten Datensatzes mit hohen Werten des zweiten zusammen, sind die Datensätze negativ korreliert ($r = -1$). Gibt es keinen Zusammenhang zwischen den Datensätzen, so sind diese unkorreliert ($r = 0$). Der Korrelationskoeffizient r lag bei den Messreihen der beiden Systeme für die Modalwerte aller Peaks bei 0,989 und für die Modalwerte des größten Peaks aus einem Histogramm bei 0,96. Diese hohe Korrelation lässt eine hohe Reliabilität und Validität des Systems der MMZA vermuten.

Eine etwas speziellere Betrachtung ergibt, dass mit der MMZA tendenziell leicht niedrigere Modalwerte der Analysezellen gemessen wurden als mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System. Der Mittelwert der Modalwertdifferenzen betrug $-0,01c$ und ist als sehr gering zu bewerten. Dabei wichen die Modalwerte der zytologisch zweifelhaften Präparate mit einem Wert von $-0,06c$ am stärksten nach unten ab, gefolgt von den zytologisch Tumorzell-negativen Fällen mit einem Wert von $-0,03c$. Die zytologisch Tumorzell-positiven Präparate hingegen wichen im Mittel um $0,03c$ nach oben ab. 33 der insgesamt 56 Stammlinien (59 %) der MMZA wichen im Vergleich zum AutoCyte QUIC-DNA-System mit einem Mittelwert der

Modalwerte von $-0,012c$ nach unten ab. Dahingegen war bei 22 Stammlinien (39 %) der MMZA eine durchschnittliche Abweichung von $0,021c$ nach oben zu beobachten, während bei einer Stammlinie (2 %) exakt derselbe Modalwert gemessen wurde. Es bleibt festzustellen, dass die Abweichung nach unten häufiger bei geringeren Schwankungen im Gegensatz zu den selteneren, aber dann höheren Schwankungen nach oben auftrat. Da sich die Schwankungen im Bereich der zweiten Stelle nach dem Komma abspielen, liegt hier die Annahme, dass dies diagnostisch weniger relevant ist, nahe, da sich auch tatsächlich in der DNA-zytometrischen diagnostischen Interpretation bei den 30 untersuchten Fällen in keinem Fall Unstimmigkeiten ergaben. Die absolute Schwankung der Modalwerte aller Fälle beider Messsysteme im Vergleich lag im Mittel bei $0,16c$ (Mittelwert der Beträge der Modalwertdifferenzen).

Ein aussagekräftiges Maß für die Messpräzision war durch die Streuung der Modalwerte bei den zytologisch Tumorzell-negativen Präparaten um den $2c$ -Wert gegeben, da hier ausschließlich gesunde Zellen gemessen wurden, die definitionsgemäß bei $2c$ (evtl. auch bei $4c$) eine Stammlinie zeigen würden. Bei der MMZA lag diese Schwankung um den $2c$ -Wert im Mittel bei $0,04c$, während sie bei dem AutoCyte QUIC-DNA-System einen leicht höheren durchschnittlichen Wert von $0,05c$ ergab. Dieses wiederum spricht für eine graduell präzisere Messkompetenz der MMZA.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die MMZA auf dem Stand der Entwicklung zu den Zeiten der Messungen der 30 Mundschleimhautpräparate tendenziell zu hohe Werte für den CV der Referenzzellen bot, dagegen aber in DNA-euploidem Gewebe leicht präziser messen konnte und im Vergleich zu dem etablierten, in der Routine eingesetzten AutoCyte QUIC-DNA-System in den Modalwerten nur eine sehr geringe Schwankung von $-0,01c$ und eine hohe Korrelation in den Messreihen von $r = 0,989$ aufzeigte. Außerdem wurde mit der MMZA in jedem der 30 Fälle dieselbe DNA-zytometrische Diagnose ermittelt wie mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System. Diese Fakten zusammen betrachtet lassen auf eine hohe Messpräzision der MMZA schließen. Nach weiterer Entwicklung der MMZA zeigte sich sogar durch die Rattenlebermessergebnisse eine bessere Einhaltung der erforderlichen Qualitätsmaße als durch das AutoCyte QUIC-DNA-System. Daraus ist zu schließen, dass das System der MMZA mittlerweile eine mindestens vergleichbar hohe Messpräzision wie das AutoCyte QUIC-DNA-System erlangt hat. Allerdings bleibt noch zu untersuchen, ob die CV-Werte der Referenzzellen auch an Mundschleimhautgewebe nun tatsächlich gering genug gemessen werden. Dazu wären weitere Studien an beiden Systemen sinnvoll. Hierbei sollten

allerdings verfälschende Einflüsse, die bei dieser Arbeit wahrscheinlich eine Rolle spielten, vermieden werden. Deshalb sollte versucht werden, tatsächlich nur identische Zellen zu messen und zwischen den Messungen an den beiden Systemen nicht allzu viel Zeit verstreichen zu lassen, um eine konstante Präparatequalität zu sichern. Außerdem wäre es von Vorteil, nur eine Person alleine beide Messungen durchführen zu lassen. So könnten systemische und methodische Fehler entdeckt und vermieden werden.

4.2.4 Bewertung der Peaklagen beider Messsysteme

Zusammenfassend waren nur geringe Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Peaklagen bei den DNA-Histogrammen der beiden Messsysteme zu bemerken. Generell gab es die Tendenz, dass mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System mehr Peaks als mit der MMZA gefunden wurden. Dies hatte aber für die diagnostische Interpretation keine Auswirkungen, sondern machte sich nur im Bereich der Histogrammtypisierungen bemerkbar, die dadurch in sechs Fällen unterschiedlich ausfielen. Die Ursache für das häufigere Auffinden eines Histogramm-Peaks mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System lag wahrscheinlich an den insgesamt höheren Zellzahlen, die mit diesem System durch einen anderen, fachkundigeren Anwender gemessen wurden. Außerdem war es nicht möglich innerhalb der mit dem Filzschreiber markierten Areale auf dem Objektträger durch zwei unterschiedliche Anwender nur identische Zellen zu messen. Zudem scheint es sehr wahrscheinlich, dass sich bei der Messung mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System nicht strikt an die vorgegebene Markierung gehalten wurde. Aus der Tatsache, dass mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System durchschnittlich mehr und auch andere Zellen gemessen wurden, erklärt sich hinreichend, dass in den 30 Histogrammen acht zusätzliche Peaks gefunden wurden.

4.2.5 Bewertung der Kriterien der DNA-Aneuploidie bei beiden Messsystemen

Insgesamt wurden 14 Präparate von beiden Messsystemen als DNA-euploid interpretiert. Darunter fanden sich allerdings zwei falsch negative Diagnosen, die durch beide Systeme an den identischen Präparaten auftraten. 16 Präparate erhielten von beiden Systemen die Diagnose DNA-aneuploid; darunter gab es – gemessen am Follow-up – keinen falsch positiven Fall. Sechs der 16 DNA-aneuploiden Diagnosen kamen bei beiden Systemen durch unterschiedliche Kriterien zustande. Mit der MMZA gab es drei Fälle mehr, die allein durch Stammlinienaneuploidie DNA-aneuploid diagnostiziert wurden. Dies war mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System nur in einem Fall zutreffend. Dafür trat bei den Messungen des

AutoCyte QUIC-DNA-Systems in zwei Fällen mehr eine alleinige Einzelzellaneuploidie auf, die es bei der MMZA nur einmal zu verzeichnen gab. Beide Kriterien (Stammlinienaneuploidie und Einzelzellaneuploidie) zusammen traten bei beiden Systemen weitaus am häufigsten auf und zeigten nur einen diskrepanten Fall. Zusammenfassend ist zu sagen, dass ein Anteil von 37,5 % aller Präparate auf einem unterschiedlichen Weg zu der gleichen, richtigen Diagnose gekommen ist. Dieser Anteil erscheint zu hoch, doch es ist erfreulich, dass trotzdem bei allen Fällen dieselbe Diagnose resultierte, was wesentlich ist. Gründe für aufgetretene Unterschiede decken sich mit denen für die Diskrepanzen in der Häufigkeitsverteilung der DNA-Histogramm-Peaks und sollen hier nicht wiederholt werden (siehe 4.2.4).

4.2.6 Diagnostische Treffsicherheit der DNA-Zytometrie

Alle 30 DNA-zytometrischen Diagnosen der beiden in dieser Arbeit verwendeten Messsysteme stimmten überein. Die Probeexzision und histologische Begutachtung gilt als Goldstandard für die Diagnostik des Mundschleimhautkarzinoms. Für 19 Fälle dieser Arbeit konnte ein derartiges Follow-up ermittelt werden. In zehn Fällen wurde eine sorgfältige klinische Begutachtung als Follow-up herangezogen. In einem Fall konnte kein Follow-up ermittelt werden. In der Annahme, dass das Follow-up die richtige Diagnose darstellt, wurden die DNA-zytometrischen Ergebnisse damit verglichen. Es stellte sich heraus, dass alle neun zytologisch Tumorzell-negativen Fälle durch beide Messsysteme eine DNA-euploide Diagnose erhielten, die bei allen im Follow-up durch die Diagnose einer gutartigen Mundschleimhautveränderung bestätigt wurde. Damit war die diagnostische Treffsicherheit hier 100 %. Bei den acht zytologisch zweifelhaften Fällen diagnostizierten beide Messsysteme fünfmal DNA-Aneuploidie, die im Follow-up in allen fünf Fällen durch die Diagnose Mundkrebs bestätigt wurde. Drei Fälle bekamen von beiden Messsystemen eine DNA-euploide Interpretation, die jedoch nur in zwei Fällen im Follow-up durch eine gutartige Veränderung der Mundschleimhaut untermauert werden konnte. Ein Fall zeigte im Follow-up histologisch ein Mundschleimhautkarzinom (T1 N0 M0; Stadium 1; R0; G2). Der Histogrammtyp dieses Falles war bei beiden Messsystemen DNA-polyploid. Demnach trat bei den zytologisch zweifelhaften Fällen eine DNA-zytometrisch falsch negative Diagnose auf, womit hier die diagnostische Treffsicherheit bei 87,5 % lag. Bei den zwölf zytologisch Tumorzell-positiven Präparaten wurde durch die MMZA sowie durch das AutoCyte QUIC-DNA-System in elf Fällen DNA-Aneuploidie und in einem DNA-Euploidie diagnostiziert, wobei sich im Follow-up bei allen zwölf Fällen ein Mundschleimhautkarzinom herausstellte.

Damit trat hier ein weiterer DNA-zytometrisch falsch negativer Fall auf, den allerdings beide Messsysteme wiederum kongruent nicht erkannt hatten. Der Histogrammtyp stellte sich erneut durch beide Messsysteme als DNA-polyploid heraus. Das Follow-up zeigte einen Tumor des Stagings: T2 N1 MX; Stadium 2; R0; G2. Die diagnostische Treffsicherheit lag somit bei den zytologisch Tumorzell-positiven Präparaten bei 91,7 %. Für alle 29 Fälle ergab sich dementsprechend alleinig für die DNA-Zytometrie eine diagnostische Gesamttreffsicherheit, d. h. eine Anzahl richtiger DNA-Diagnosen gemessen an der Follow-up-Diagnose als Goldstandard, von 93,1 %. Da es sich bei dieser Arbeit um ein selektives Patientenkollektiv, das untersucht wurde, und nicht um eine Kohorte handelte, ist das Errechnen der Sensitivität hier nicht sinnvoll, würde aber einen Wert von 88,9 % ergeben; die Spezifität einen Wert von 100 %. Die 100 %ige Übereinstimmung der Messergebnisse beider Systeme spricht für eine hohe Messpräzision der DNA-Zytometrie der MMZA. Die erreichte diagnostische Treffsicherheit ist nicht ganz zufrieden stellend, aber mit Ergebnissen anderer Studien vergleichbar (siehe unten). Überlegungen zur Erklärung der zwei falsch negativen Diagnosen sind im Kapitel 4.2.2 nachzulesen.

Die DNA-Zytometrie ist eine adjuvante und objektive Methode, deren Resultate nicht annähernd so stark von der Qualifikation und Erfahrung des Zytologen und des Klinikers abhängig sind wie die der Exfoliativzytologie (Schwarz et al. 1981). Mehrere Studien haben bereits die Zuverlässigkeit und diagnostische Kompetenz der DNA-Zytometrie für verschiedene Gewebe belegt.

Laut Remmerbach et al. (2001) stellt die DNA-Zytometrie eine sehr sensitive, hochspezifische und objektive adjuvante Methode zur Früherkennung neoplastisch transformierter Epithelien dar. Remmerbach et al. (2001) untersuchten 251 zytologische Präparate von 181 Patienten mit makroskopisch verdächtigen Läsionen oder klinisch gutartigen Veränderungen der Mundschleimhaut. Die Sensitivität der DNA-Zytometrie für Mundkrebs war 96,4 %, die Spezifität 100 %, der positive Vorhersagewert lag bei 100 % und der negative bei 99 %. In Kombination mit der zytologischen Diagnose erhöhte sich die Sensitivität sogar auf 98,2 %, die Spezifität auf 100 %, der positive Vorhersagewert auf 100 % und der negative auf 99,5 % (Remmerbach et al. 2001).

In einer Untersuchung von Ogden et al. (1994) wurde die DNA-Zytometrie an 33 Mundschleimhautabstrichen von histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinomen durchgeführt. Bei 23 Fällen konnte eine abnorme DNA-Verteilung festgestellt werden,

welches einer Sensitivität von 70 % entsprach. Durch zusätzlichen Einsatz von Keratinmarkern konnte die Sensitivität auf 90 % gesteigert werden. Dabei sollte erwähnt werden, dass hier mit der DNA-Zytometrie lediglich 50 zufällig selektionierte Zellen gemessen wurden, welches den derzeitigen Forderungen von mindestens 300 Analysezellen (Böcking und Motherby 1999) bei weitem nicht entspricht und eine Erklärung für die nicht optimale Sensitivität dieser Studie darstellen könnte. Denn eine Variable, die das Erkennen von DNA-Aneuploidie beeinflusst, ist die Anzahl der Analysezellen (Remmerbach et al. 2001). Eine zu geringe Zahl von gemessenen Zellen kann zu falsch negativen Ergebnissen führen. Die beiden DNA-zytometrisch falsch negativen Diagnosen waren bei der MMZA in dieser Arbeit mit weniger als 300 Analysezellen vergesellschaftet, worin demnach eine Erklärung für das Messergebnis liegen könnte. Im Durchschnitt wurden mit der MMZA 33 Referenz- und 261 Analysezellen und mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System 31 Referenz- und 275 Analysezellen gemessen.

Saku und Sato (1983) konnten durch den Nachweis von DNA-Histogrammen mit mehreren Stammlinien bei Präparaten von oralen Präkanzerosen deren maligne Transformation vorhersagen.

Abdel-Salam et al. (1988) untersuchten 16 Dysplasien der Mundschleimhaut mit Hilfe der DNA-Zytometrie und konnten mit einer 87,5 %igen Sensitivität diejenigen acht identifizieren, welche sich in einem Beobachtungszeitraum von zehn bis 15 Jahren zu Krebs weiterentwickelten.

In einer weiteren Studie von Abdel-Salam et al. (1990) wurden retrospektiv 35 Gewebeschnitte von Mundschleimhautläsionen auf acht Merkmale bezüglich der Art und Intensität der Färbung und auf sechs Merkmale in Bezug auf das Chromatinmuster der Zellkerne hin untersucht. Auch diese Studie diente der Untersuchung der Vorhersagbarkeit einer malignen Transformation von Mundschleimhautläsionen. 23 der 35 untersuchten Gewebeschnitte hatten sich zu Karzinomen entwickelt. Die Untersuchung ergab einen positiven Prädiktionswert von 86 % und eine Sensitivität von 83 %.

Abschließend bleibt zu bemerken, dass fast keine vergleichbare adjuvante Diagnosemethode ein höheres Niveau von Standardisierung besitzt wie die DNA-Bildzytometrie. Über die standardisierte DNA-Bildzytometrie wurden von der ESACP bereits vier Berichte veröffentlicht (Böcking et al. 1995; Giroud et al. 1998; Haroske et al. 1998, 2001). Mit Hilfe

des EUROQUANT Servers kann auch eine standardisierte Auswertung DNA-zytometrischer Daten online erfolgen (<http://euroquant.med.tu-dresden.de>).

4.3 Exfoliativzytologie der Mundschleimhaut

Es ist zu bemerken, dass die zytologischen Diagnosen bei den neun Tumorzell-negativen Fällen, in denen ein Follow-up ermittelbar war, zu 100 % richtig waren. Auch die zwölf zytologisch Tumorzell-positiven Präparate zeigten in allen Fällen im Follow-up eine bösartige Mundschleimhautveränderung, womit auch hier die zytologischen Diagnosen zu 100 % richtig waren. Bei den acht zytologisch zweifelhaften Fällen gab es vier Mal die Diagnose „dringender Verdacht; bösartige Zellen wahrscheinlich“, die sich alle im Follow-up als Mundkrebs herausstellten. Von den übrigen vier Fällen, die zytologisch als „zweifelhaft; bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen“ interpretiert wurden, stellten sich zwei im Follow-up als gutartige und zwei als bösartige Mundschleimhautveränderung dar. Demnach erscheint in dieser Arbeit die Exfoliativzytologie als sehr zuverlässige diagnostische Maßnahme, welche unabhängig von der Art der Präparateherstellung (Bürstenabstrich oder Monolayer) ist.

Im Allgemeinen hat sich die Methode der exfoliativ-zytologischen Diagnostik dennoch nicht gegenüber der chirurgischen Intervention mittels Probenentnahme und anschließender histologischer Begutachtung durchgesetzt. Dies könnte an der erheblichen Schwankungsbreite für die Sensitivitäten und Spezifitäten für die orale Zytologie liegen, die durch eine Vielzahl von Studien im Zeitraum von 1950 und 1970 in der Literatur veröffentlicht wurden. Ein Literaturdurchschnitt von mehr als 1300 Fällen aus 18 Untersuchungen (Kaugars et al. 1998) ergab eine Sensitivität von ungefähr 87,3 % für orale zytologische Diagnostik. Dabei schwankten die Werte von 48 % bis 100 %. Für die Spezifität wurde ein Wert von 99,1 % ermittelt, der auf sieben Untersuchungen mit mehr als 16240 Fällen basierte. Die Streubreite dieser Werte lag zwischen 77,7 % und 99,6 % (Kaugars et al. 1998).

Für die schlechten Ergebnisse bezüglich der Sensitivität der oralen Zytologie könnte das damals verwendete Instrument für die Zellentnahme verantwortlich gewesen sein. In den meisten Fällen wurden Schabeinstrumente, wie z. B. ein Holzspatel oder ein Wattestäbchen, für die Zellentnahme verwendet. Heutzutage wird überwiegend mit einer Zytobürste gearbeitet. In einer Studie von Ogden et al. (1992) wurde die Effektivität eines Holzspatels mit der einer Zytobürste verglichen. Die Abstrichentnahme fand an klinisch gesunder Mundschleimhaut jeweils am Alveolarfortsatz bukkal, am Hartgaumen, an der

Zungenunterseite und am Zungenrücken statt. Außer für den Gaumen zeigte die Zytobürste Vorteile durch einen höheren Zellgehalt und eine bessere Zellverteilung auf dem Objektträger. In einer ähnlichen Untersuchung von Jones et al. (1994), in der die Zytobürste mit dem Zungenspatel verglichen wurde, stellte sich die Handhabung der Bürste als leichter und die durch sie erreichte Gleichmäßigkeit der Zellverteilung auf dem Objektträger als besser heraus. Bei beiden Instrumenten war die Zellanzahl auf dem Objektträger sowie das Unbehagen für den Patienten gleich. Es war mit beiden eine zytologische Diagnose möglich.

Eine neuere Studie von Remmerbach et al. (2001) weist auf zuverlässige Ergebnisse der konventionellen oralen Exfoliativzytologie hin. Sie erreichten für das Mundschleimhautkarzinom eine Sensitivität von 94,6 % und eine Spezifität von 99,5 % durch die zytologische Diagnostik.

Klinische Vorteile für die orale Exfoliativzytologie liegen auf der Hand. Die Handhabung ist einfach und von jedem Arzt / Zahnarzt ohne Spezialkenntnisse durchführbar. Der Zeitaufwand ist mit ca. drei Minuten sehr gering und zudem ist es eine kostengünstige Methode. Speziell auf der Seite des Patienten sind die Vorteile offensichtlich: die Methode ist nicht invasiv, weitestgehend schmerzfrei und es sind für Bürstungen bis jetzt keine Kontraindikationen bekannt. Die Anerkennung für die Etablierung als Screening-Methode oder für häufige Nachuntersuchungen bei bestimmten Veränderungen der Mundschleimhaut wäre damit wahrscheinlich sehr hoch. Die Erkennung der Indikation für Mundschleimhautabstriche sowie das Erlernen ihrer Durchführung sollte Bestandteil der (zahn-)medizinischen Ausbildung sein, um die Chance zu erhöhen, die Morbidität und Mortalität von Mundkrebs zu senken. Noch bessere Aussichten darauf wird in der Kombination der Exfoliativzytologie mit adjuvanten Methoden, wie z. B. der DNA-Zytometrie oder der AgNOR-Analyse, gegeben sein. Studien von Remmerbach et al. (2001, 2003a, 2003b) sowie auch die vorliegende Arbeit lassen dies vermuten.

Die Exfoliativzytologie bietet allerdings auch einige Nachteile und Fehlerquellen, die hier kurz erwähnt werden. Schwächen der zytologischen Tumordiagnostik ergeben sich häufig durch die Spärlichkeit des Untersuchungsmaterials und die verloren gegangene Verbandstruktur der Zellen (Böcking 1990). Fehlerquellen in der Routinediagnostik sind durch Zeitmangel für die Durchsicht eines Präparats (normalerweise hat der Pathologe dafür ca. fünf Minuten Zeit) und eine nicht immer zu vermeidende Nachlässigkeit in der Routine gegeben. Auf Seiten des Kliniklers sind klinische Unerfahrenheit und eine ineffektive

Nachsorge als mögliche Fehlerquellen zu nennen (Koss 1989). Nach einer Studie von Möbius (1993) liegt die Verantwortung für falsch negative Befunde zu 25 % auf Seiten des Zytologen und zu 75 % auf Seiten des Klinikers.

4.4 Bewertung der AgNOR-Analyse

Die dritte diagnostische Säule der MMZA war in dieser Arbeit durch die AgNOR-Analyse gegeben. Sie hatte die Aufgabe für jede Zelle noch mehr Informationen über ihre Dignität zu liefern als bereits durch ihre Morphologie und die DNA-Zytometrie bekannt waren. Diese Zusatzinformationen sollten zum einen Diagnosen erhärten und zum anderen helfen, bis dahin unklare Fälle zu lösen. Die Idee beinhaltete die Vorstellung, dass weniger Zellen zur Diagnosefindung benötigt würden, da es pro Zelle mehr Informationen auf unterschiedlichen Ebenen gab. Das eigentliche Ziel wäre durch die Anwendung einer automatischen AgNOR-Analyse gegeben. Dies wurde in dieser Arbeit versucht, führte aber zu keinen plausiblen Ergebnissen. Gründe dafür lagen in der bislang unzureichenden Software sowie an Färbeproblemen bei der Silbernitrat-Färbung. Die starke Überfärbung war bei den meisten Präparaten schon makroskopisch sichtbar. Die Software war mit diesem Färbeergebnis überfordert, obwohl es Hinweise auf ihr Funktionieren gibt. So konnten in einer parallel verlaufenden Studie über die MMZA an Schilddrüsengewebe (Titel: „Messpräzision und diagnostische Treffsicherheit der multimodalen Zellanalyse an Feinnadelaspirationsbiopsien der Schilddrüse“ von Frau A. Metzger) gute Ergebnisse mit dieser Software für die automatische AgNOR-Analyse erreicht werden. Außerdem erschienen in dieser Studie die Ergebnisse für die automatische Zellkernflächenberechnung im Durchschnitt ebenfalls plausibel. Die feinere AgNOR-Detektion innerhalb der Zellkerne allerdings funktionierte noch nicht befriedigend.

Eine subjektive, manuelle Zählung der AgNORs aus 100 Zellkernen pro Präparat mit dem 100er Objektiv des Mikroskops in Ölimmersion war dennoch alternativ möglich. Kurz rekapituliert wurde für die zytologisch Tumorzell-negativen Fälle ein Durchschnittswert von 3,64 AgNORs und mit der automatischen Analyse eine Zellkernfläche von $63,3 \mu\text{m}^2$ ermittelt. Dies waren jeweils auch die niedrigsten Werte im Vergleich zu denen der zytologisch zweifelhaften oder Tumorzell-positiven Fälle.

Bei den zytologisch zweifelhaften Präparaten ergaben sich Durchschnittswerte von 5,26 AgNORs und mit der automatischen Analyse ein Wert von $74,08 \mu\text{m}^2$ für die Zellkernfläche. Diese Werte lagen genau im Mittelfeld.

Nur elf der zwölf zytologisch Tumorzell-positiven Präparate konnten in die AgNOR-Analyse eingehen, da ein Präparat völlig überfärbt und nicht mehr zu interpretieren war. Durchschnittlich wurden hier 7,41 AgNORs gezählt und automatisch ein Zellkernfläche von $87,5 \mu\text{m}^2$ berechnet. Diese Werte waren damit die höchsten und entsprechen im Allgemeinen den Erwartungen, da – neben zahlreichen anderen Merkmalen – eine hohe Anzahl an AgNORs und eine große Zellkernfläche für das Vorliegen von Malignität bei Zellen sprechen.

Werden die Fälle bezüglich ihrer Follow-up Diagnose betrachtet, so ergaben sich eine durchschnittliche Anzahl von 3,7 AgNORs und Zellkernfläche von $63,63 \mu\text{m}^2$ für die gutartigen Mundschleimhautveränderungen. Dagegen waren bei den Mundschleimhautkarzinomen deutlich höhere Durchschnittswerte von 6,8 AgNORs und einer Zellkernfläche von $83,56 \mu\text{m}^2$ ermittelt worden. Auch dies entspricht den Erwartungen und lässt auf eine korrekte Auszählung sowie auf eine zuverlässige Zellkernflächenberechnung schließen.

Die AgNOR-Analyse ist bereits seit einigen Jahren eine sinnvolle Ergänzung in der histopathologischen Routinediagnostik an verschiedenen Geweben geworden. Auch an zytologischen Präparaten wurde sie schon erfolgreich angewendet. Durch Auszählung der AgNOR-Partikel nach der Silbernitrat-Färbung innerhalb von 100 Zellkernen pro Präparat und anschließender Mittelwertbildung wurden verschiedenste Gewebe zur Differenzierung von benignen und malignen Veränderungen untersucht. Diese Methode ist mit einem einfachen Lichtmikroskop durchführbar, braucht allerdings etwas Zeit und schränkt daher ihre Anwendbarkeit ein. Außerdem sollten die weit verbreiteten Schwierigkeiten mit der Silbernitrat-Färbung sowie die Tatsache, dass die AgNOR-Analyse eine sehr subjektive Methode darstellt, die im Allgemeinen noch keine einheitlich anerkannte Standardisierung besitzt, erwähnt werden.

In einer retrospektiven Studie von Remmerbach et al. (2003b) wurde die diagnostische Zuverlässigkeit der AgNOR-Analyse an exfoliativzytologischen Präparaten der Mundschleimhaut von 86 Patienten untersucht. Sie ermittelten einen Schwellenwert von 4,8 AgNORs, um gutartige von bösartigen Veränderungen zu unterscheiden. So konnten bei zwölf zytologisch zweifelhaften bzw. verdächtigen Läsionen in zehn Fällen der histologisch nachgewiesene Mundkrebs und in zwei Fällen die histologisch bestätigte gutartige Mundschleimhautveränderung mit Hilfe der AgNOR-Analyse richtig diagnostiziert werden. Es ergaben sich ein positiver und ein negativer Vorhersagewert von 100 %. Sie schlussfolgern, dass die AgNOR-Analyse eine sinnvolle Ergänzung zu anderen

routinemäßigen zytologischen Diagnosemethoden für Mundkrebs sein kann. Dies stimmt vor allem im Hinblick auf die Diagnosefindung bei zytologisch verdächtigen oder zweifelhaften Fällen (Remmerbach et al. 2003b).

Nur zwei weitere Studien berichten über die Anwendung der AgNOR-Analyse an zytologischen Präparaten der Mundschleimhaut. Mao (1995) untersuchte zytologische Präparate von 26 Patienten mit Hilfe der AgNOR-Analyse um herauszufinden, ob mit ihr gutartige von bösartigen Veränderungen zu unterscheiden sind. Er ermittelte eine durchschnittliche AgNOR-Anzahl von 2,44 ($\pm 0,37$) AgNORs für die gutartigen Veränderungen sowie einen Mittelwert von 4,69 ($\pm 0,72$) AgNORs für die Präparate mit Mundkrebs. Die statistische Analyse der AgNOR-Zählung zeigte einen signifikant höheren Durchschnittswert für die maligne entarteten Präparate, als für die mit normaler Mundschleimhaut ($p < 0,005$). Es wurden keine Überlappungen zwischen beiden Gruppen gefunden. Die Mittelwerte für die Präparate mit Mundkrebs erscheinen niedriger als die aus der Studie von Remmerbach et al. 2003b (8,99 AgNORs) oder aus der vorliegenden Arbeit (6,8 AgNORs). Dies mag eine Auswirkung der Färbemethode sein, da bei Mao die Inkubationszeit in der Silberlösung eine Stunde und nicht wie üblich 20 Minuten betrug, was dazu führt, dass kleine AgNOR-Partikel zusammenfließen und die Trennung von mehreren kleinen Partikeln so nicht mehr möglich sein kann. Bereits Rüschoff et al. (1992) beschrieben bei zu langer Färbedauer eine komplette Ausfüllung des Nukleolus durch den Silber Niederschlag. Bei den so angefärbten Kernstrukturen handelt es sich demnach nicht um AgNORs, sondern im Wesentlichen um Nukleolen (Crocker et al. 1989, Rüschoff et al. 1992).

Sampaio et al. (1999) verglichen AgNOR-Werte von Mundschleimhautpräparaten von Rauchern (ohne Angaben über die Menge des täglichen Zigarettenkonsums) und Nichtrauchern. Der durchschnittliche Wert für die Rauchergruppe betrug 3,4 ($\pm 0,54$) AgNORs und der der Nichtrauchergruppe lag bei 2,6 ($\pm 0,49$) AgNORs. Der Mittelwert für die gezählten AgNORs war bei den Zellkernen der Raucher statistisch signifikant höher als bei den Nichtrauchern ($p < 0,01$). Remmerbach et al. (2003b) fanden dagegen keinen signifikanten Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Dabei sollte allerdings bemerkt werden, dass die Raucher nie mehr als zehn Zigaretten pro Tag konsumiert hatten.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Möglichkeit, zytologische Mundschleimhautpräparate nach der Papanicolaou- und der Feulgen-Färbung für die AgNOR-Analyse mit Silbernitrat zu

färben. Dies war aber nur unter Qualitätseinbußen möglich, da die Silbernitrat-Färbung generell zu stark ausfiel und dadurch eine automatische Auswertung unmöglich wurde, eine manuelle Zählung aber noch durchführbar war. Es erschien hier die subjektive AgNOR-Analyse als sensitiver Parameter zur Unterscheidung von gutartigen und bösartigen Mundschleimhautläsionen. Die ausgezählten Durchschnittswerte für diese beiden Gruppen lagen weit auseinander und ähnelten denen aus den oben erwähnten Studien. Unter Anwendung des von Remmerbach et al. (2003b) ermittelten Schwellenwertes von 4,8 AgNORs, der gutartige von bösartigen Läsionen der Mundschleimhaut trennt, können auch alle in dieser Studie untersuchten Präparate gemäß Follow-up richtig diagnostiziert werden. Damit ergibt sich eine diagnostische Treffsicherheit von 100 % für die AgNOR-Analyse. Sogar die zwei falsch negativen Diagnosen aus der DNA-Zytometrie werden mit der AgNOR-Analyse richtig diagnostiziert. Sie zeigten durchschnittliche AgNOR-Anzahlen von zum einen 5,13 AgNORs und zum anderen 6,21 AgNORs. Damit kamen sie beide über dem Schwellenwert von 4,8 AgNORs (Remmerbach et al. 2003b) zu liegen, was als Zeichen für Malignität gewertet werden kann. Hier ist der wahrscheinliche diagnostische Mehrwert der AgNOR-Analyse bzw. der MMZA deutlich erkennbar. In Zweifelsfällen kann die AgNOR-Analyse die Lösung bringen. Daraus kann auch geschlossen werden, dass eine zusätzliche Methode, die klare Ergebnisse liefert, hilfreicher ist als die Feineinstellung des Algorithmus der ersten Methode.

4.5 Diagnostische Treffsicherheit der MMZA

Die zytologischen Diagnosen der Tumorzell-negativen und der Tumorzell-positiven Präparate stimmten alle mit den Follow-up-Diagnosen überein. Bei den zytologisch zweifelhaften Fällen stellten sich alle mit der Diagnose „dringender Verdacht; bösartige Zellen wahrscheinlich“ im Follow-up als Karzinom heraus. Die vier Fälle mit der Diagnose „zweifelhaft; bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen“ zeigten zur Hälfte im Follow-up ein Karzinom und zur Hälfte eine gutartige Mundschleimhautveränderung.

Die diagnostische Gesamttreffsicherheit der DNA-Zytometrie von 29 Fällen lag mit zwei falsch negativen Diagnosen bei 93,1 %.

Mit Hilfe der manuellen AgNOR-Analyse wurden unter Beachtung des Grenzwertes für Malignität von 4,8 AgNORs (Remmerbach et al. 2003b) alle Präparate richtig diagnostiziert (diagnostische Treffsicherheit von 100 %). Sie ist damit eine sinnvolle adjuvante Methode für die zytologische Mundschleimhautkarzinom-Diagnostik.

Zusammenfassend führte demnach die Kombination aller Methoden der MMZA zu einer diagnostischen Treffsicherheit von 100 % bei 28 Mundschleimhautpräparaten (ein Fall hatte kein Follow-up; ein Fall war für die AgNOR-Analyse überfärbt). Damit liegt der Schluss nahe, dass die Idee der Multimodalität in der Diagnostik des Mundschleimhautkarzinoms sehr wahrscheinlich sinnvoll ist. Die Durchführbarkeit der Multimodalen Zellanalyse wurde mit der vorliegenden Arbeit bewiesen und der „proof of principle“ ist gelungen.

5 Zusammenfassung

Die Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle beträgt 3 – 5 % aller bösartigen Tumoren und zählt damit weltweit zu den zehn häufigsten Krebsarten. Der Goldstandard zur Diagnostik des Mundkrebses ist die Exzisionsbiopsie mit histologischer Untersuchung. Alternativ besteht die Möglichkeit, zytologische Abstriche einer suspekten Mundschleimhautläsion durch Zellentnahme mittels eines Bürstchens anzufertigen und zu begutachten. Diese Methode ist verglichen mit der Exzisionsbiopsie nicht invasiv, weniger schmerzhaft, zeitsparender und kostengünstiger. Die Diagnostik an zytologischen Präparaten lässt sich hervorragend mit adjuvanten Diagnosemethoden, wie alternative Färbungen oder Markerdarstellungen, kombinieren und damit verbessern.

Ein zumindest teilweise automatisiertes Zellanalyseverfahren, das treffsichere zytopathologische Diagnosemethoden miteinander vereint, wurde hier erstmals durch das Prinzip der Multimodalen Zellanalyse (MMZA) verwirklicht. Sie stellt die Kombination von drei Zellanalyseverfahren dar, die an demselben zytologischen Präparat computergestützt und mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung aufeinander folgend ablaufen. Die drei diagnostischen Säulen der MMZA sind hierbei die subjektive morphologische Begutachtung der Zellen in der Papanicolaou-Färbung, die DNA-Zytometrie und die AgNOR-Analyse.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die erstmalige Demonstration der Funktionalität des Prototypen sowie die Untersuchung der Messpräzision und der erreichbaren diagnostischen Treffsicherheit der MMZA an Mundschleimhautabstrichen. Weiterhin sollten die zugehörigen Hard- und Software-Komponenten beschrieben werden. Zwei weitere Arbeiten untersuchten maligne Körperhöhlenergüsse (Frau C. Henning) und neoplastische Schilddrüsenveränderungen (Frau A. Metzger).

Zur Entwicklung und Validierung des Prototypen der MMZA wurde hochschulübergreifend und interdisziplinär gearbeitet. Beteiligt waren das Institut für Cytopathologie (IfC) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Alfred Böcking sowie der Lehrstuhl für Bildverarbeitung (LfB) an der RWTH Aachen unter der damaligen Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dietrich Meyer-Ebrecht.

Gegenstand dieser Arbeit waren 30 zytologische Mundschleimhaut-Präparate, die sich aus 22 konventionellen Bürstenabstrich-Präparaten und acht sog. Monolayer-Präparaten

zusammensetzten. Die zytologische Diagnose war in zehn Fällen Tumorzell-negativ, in acht Fällen zweifelhaft und in zwölf Fällen Tumorzell-positiv. Auffallend war ein gehäuftes Ablösen der Zellen von den Objektträgern durch die Umfärbeprozesse (20,3 % betroffene Bildpositionen bei den Monolayer-Präparaten und 8,4 % bei den Bürstenabstrichpräparaten). Bis auf einen Fall konnte für alle Fälle ein klinisches oder histologisches Follow-up nach Beendigung des Messvorgangs eingeholt werden.

In der ersten Färbung (Papanicolaou) wurden am Leica-Mikroskop DM-LA mit angeschlossener CCD-Kamera Bilder von morphologisch verdächtigen Zellen aufgenommen und in der Datenbank gespeichert. Nach Umfärbung der Präparate in die Feulgen-Färbung wurde die DNA-Zytometrie an den identischen Zellen aus der ersten Färbung durchgeführt. Dies geschah durch automatische Bewegung des Mikroskoptischs an die in der Datenbank gespeicherten Bildpositionen (Relokalisation). Abschließend wurden die Proben in die Silbernitrat-Färbung für die AgNOR-Analyse umgefärbt, relokalisiert, fotografiert und dann manuell, subjektiv ausgezählt. Eine speziell entwickelte Software für die automatische AgNOR-Analyse scheiterte an den qualitativ schlechten Färbeergebnissen. So entstanden von jeder Zelle drei Bilder in unterschiedlichen Färbungen, die jeweils für ein anderes diagnostisches Prinzip standen.

Die Reproduzierbarkeit und Messqualität der DNA-Zytometrie wurden im Vergleich mit einem in der Routindiagnostik am IfC eingesetzten System - AutoCyte QUIC-DNA-System (AutoCyte, Burlington, N.C., USA) – und in Anlehnung an die Anforderungen der Europäischen Gesellschaft für Analytische Zelluläre Pathologie (ESACP) analysiert und bewertet. Am AutoCyte QUIC-DNA-System wurden die Proben von einem erfahrenen Gynäkologen, Herrn Dr. med. Vu Quoc Huy Nguyen, DNA-zytometrisch vermessen und die Ergebnisse beider Systeme anschließend miteinander verglichen.

Die diagnostische Treffsicherheit bei alleiniger Betrachtung der DNA-Zytometrie lag bei 93,1 %. Es waren dabei zwei falsch negative und keine falsch positiven Diagnosen zu verzeichnen. Bemerkenswert war eine völlige Übereinstimmung aller DNA-Messergebnisse der MMZA mit denen des AutoCyte QUIC-DNA-Systems, dessen diagnostische Treffsicherheit somit ebenfalls bei 93,1 % lag. Dies ließ Messfehler unwahrscheinlicher und Probenentnahmefehler (geographic error) oder Probenauswertefehler (sampling error) wahrscheinlicher werden. Diese Annahme wurde durch die qualitätssichernden Messungen an Rattenhepatozyten in Anlehnung an die Anforderungen der ESACP bekräftigt, da beide

Systeme hier sehr gute Ergebnisse liefern konnten. Die Erwartungen an die DNA-Zytometrie der MMZA wurden somit hinreichend gut erfüllt.

Die Ergebnisse der manuellen AgNOR-Analyse wurden unter Zuhilfenahme eines Schwellenwertes von 4,8 AgNORs pro Zellkern bei mindestens 100 ausgezählten Zellkernen interpretiert. Demnach können Durchschnittswerte von mehr als 4,8 AgNORs pro Zellkern für das Vorliegen von maligner Transformation sprechen. In dieser Arbeit lag die diagnostische Treffsicherheit der manuellen AgNOR-Analyse bei 100 %. Bei den gemäß Follow-up gutartigen Mundschleimhautveränderungen wurde ein Durchschnittswert von 3,7 AgNORs pro Zellkern gezählt. Für die bösartigen Mundschleimhautläsionen lag der Wert bei durchschnittlich 6,8 AgNORs pro Zellkern. Die guten Ergebnisse der manuellen Auszählung legen eine generelle Funktionstüchtigkeit der Methode nahe.

In dieser Arbeit wurden erst durch die Kombination aller Messmethoden alle Präparate richtig diagnostiziert; die diagnostische Treffsicherheit der MMZA lag somit bei 100 %. Der erste Prototyp hat sich bewährt und das Prinzip, verschiedene adjuvante zytologische Messmethoden an einem Präparat und identischen Zellen miteinander zu kombinieren, hat einen erheblichen Informationsgewinn gezeigt und bei 6,9 % der Fälle einen diagnostischen Mehrwert eingebracht. Die Schwächen der einzelnen Methoden haben sich durch ihre Kombination aufgehoben. Als Fazit aus dieser Arbeit bleibt das Prinzip der MMZA als diagnostisch gewinnbringend zu empfehlen.

6 Ausblick

Die Umsetzung des Prinzips der MMZA durch den Prototypen am Lehrstuhl für Bildverarbeitung (LfB) unter der damaligen Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dietrich Meyer-Ebrecht und unter der derzeitigen Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. Til Aach hat ein funktionierendes System dargestellt, das allerdings für den Einsatz in der Routinediagnostik noch weitere Verbesserungen erfahren sollte. Die MMZA könnte die Hoffnungen auf eine treffsichere, automatisierte zytologische Messmethode zur Diagnostik des Mundschleimhautkarzinoms für die Zukunft darstellen. Es könnte ein Screening von Risikogruppen auf Vor- und Frühstadien von Mundkrebs ermöglicht werden, woraus wiederum weniger belastende kurative Therapien resultieren könnten, die im Stande wären, die Morbidität und Mortalität dieser Erkrankungen signifikant zu senken.

Am LfB wird indes an der Entwicklung einer besseren und vollautomatisierten Version des MMZA-Systems weitergearbeitet. Dazu werden schnellere und präzisere Bildverarbeitungsalgorithmen benötigt. Es wurde z. B. an einer Autofokus-Funktion gearbeitet, die für die vollautomatische Relokalisation der Zellen aus den verschiedenen Färbungen nötig ist. Bei der automatischen Relokalisation der Zellen findet eine Vorsegmentierung des aktuellen Bildes zur groben Lagen- und Größeneinschätzung der Zellkerne statt. Anschließend erfolgt rechnergestützt ein Szenenvergleich zwischen dem Live-Bild und dem Datenbankbild, der entscheidet, ob identische Zellkern-Ensembles auf beiden Bildern vorliegen. Ist dies nicht der Fall, so wird mit Hilfe einer Suchstrategie in der näheren Umgebung nach den gewünschten Zellen geforscht. So ist es möglich, Zellen automatisch, schnell und präzise aufzufinden und zu koregistrieren (Ropers 2004).

Durch die insgesamt drei Promotionsarbeiten, die mit Hilfe der MMZA Zellen untersucht haben, ist ein beträchtliches Bilddatenmaterial entstanden, das als Grundlage für weitere Verbesserungen des vorhandenen Systems dienen kann. So wird z. B. mit den akquirierten Daten an einer automatischen Klassifikation der Zellen in Analyse- und Referenzzellen gearbeitet.

Es bleibt zu erwähnen, dass die manuelle AgNOR-Analyse eine subjektive und damit fehleranfällige und zeitaufwändige Methode ist, die durch eine Automatisierung und damit Objektivierung sicher mehr Anerkennung finden würde. Die guten Ergebnisse der manuellen Auszählung legen eine generelle Funktionstüchtigkeit der Methode nahe.

Für die automatische AgNOR-Analyse muss eine präzisere Software entwickelt werden, die auch bei schlechteren Färbergebnissen funktioniert. Auf der anderen Seite sollte aber auch die Qualität der Silbernitrat-Färbung für Mundschleimhaut-Präparate angepasst und verbessert werden, da sie selbst für die manuelle Auszählung sehr dunkel erschien.

Eine verbesserte Technologie der MMZA, die in Zukunft evtl. auch mit anderen adjuvanten Methoden gekoppelt werden könnte, kann somit zu einer effizienteren und zuverlässigeren Tumordiagnostik beitragen.

7 Begriffe und Abkürzungen

7.1 Begriffe und Algorithmen für die diagnostische Interpretation in der DNA-Zytometrie

DNA-Histogramm: Häufigkeitsverteilung der integrierten optischen Dichte spezifisch mit DNA-Farbstoffen gefärbter Zellkerne in der Einheit c (c = DNA-Gehalt eines einfachen Chromosomensatzes)

DNA-Histogramm-Peak: Ein statistisch signifikantes lokales Maximum in einem DNA-Histogramm

Modalwert eines Histogramm-Peaks: Der häufigste Wert innerhalb eines Peaks, d. h. der Durchschnittswert einer Histogrammgruppe, die die höchste Anzahl an Zellkernen enthält

DNA-Stammlinie: G0/1-Phase-Fraktion des DNA-Histogramms einer proliferierenden Zellpopulation (mit einem ersten Peak und einem zweiten Verdopplungspeak oder mit Zellkernen in der Verdopplungsregion)

Stammlinienploidie: Modalwert einer DNA-Stammlinie in der Dimension c (c = content)

DNA-Euploidie: DNA-Verteilungen von Zellpopulationen, die statistisch signifikant different von denen normaler (ruhender, proliferierender oder polyploider) Zellpopulationen sind

Diploide Euploidie: DNA-Stammlinien mit einem modalen Wert zwischen $1,8$ und $2,2c$ besitzen eine diploide Euploidie.

Tetraploide Euploidie: DNA-Stammlinien mit einem Modalwert zwischen $3,6$ und $4,4c$ besitzen eine tetraploide Euploidie

DNA-Aneuploidie: DNA-Verteilungen von Zellpopulationen, die statistisch signifikant different von denen normaler (ruhender, proliferierender oder polyploider) Zellpopulationen sind (kann entweder bestehen durch DNA-Stammlinienaneuploidie oder Einzelzellaneuploidie „rare events“)

DNA-Stammlinienaneuploidie: Stammlinie(n) mit Modalwerten $< 1,80c$ oder $> 2,20c$ und $< 3,60c$ oder $> 4,40c$

Einzelzellaneuploidie („rare events“): Diese abnormalen Zellen werden oft 5c oder 9c-exceeding events (5cEE oder 9cEE) genannt. Ihr DNA-Gehalt ist größer als das Doppelte oder das Vierfache einer normalen G0/1 Phase-Fraktion (sie gehören nicht zur G2/M Phasefraktion). Sie präsentieren nicht proliferierende abnormale Zellen mit verschiedenen chromosomalen Aneuploidien und abnormal hohem Chromosomengehalt. DNA-Einzelzellaneuploidie in der Pathologie der Mundschleimhaut ist definiert bei der Präsenz von mindestens einer Zelle mit einem DNA-Gehalt $> 9c$ ($9cEE \geq 1$) pro Präparat.

DNA-Polyploidie: Vorkommen von DNA-Stammlinien in den Verdopplungsregionen euploider Stammlinien (bei 4c, 8c, 16c)

Aneuploide Polyploidie: Das Auftreten von Peaks in der Verdopplungsregion von aneuploiden Stammlinien

7.2 Abkürzungen

| | |
|----------|--|
| 9cEE | 9c Exceeding Events |
| 5cEE | 5c Exceeding Events |
| AgNOR | Agropylic Nucleolar Organizer Region |
| Aneupl. | Aneuploidie |
| B | Konventionelles Bürstenabstrichpräparat |
| c | content |
| CC | Correlation Coefficient |
| CCD | charge coupled device (Sensor für Digitalkamera) |
| CMV | Zytomegalie-Virus |
| CV | Coefficient of Variation |
| d. V. | dringender Verdacht |
| DNA-FCM | DNA flow cytometry |
| DNA-ICM | DNA image cytometry |
| Einzelz. | Einzelzell |
| Entzdg. | Entzündung |
| ESACP | European Society for Analytical Cellular Pathology |
| FN | falsch negativ |
| Geschl. | Geschlecht |
| histol. | histologisch |
| HV | Herpes-Viren |
| HIV | human immunodeficiency virus |
| HPV | humanes Papillomavirus |
| klin. | klinisch |
| Komp. | Komponente |
| LfB | Lehrstuhl für Bildverarbeitung |
| LfC | Lehrstuhl für Cytopathologie |
| M | Monolayer-Präparat |
| m | männlich |
| MGG | May-Grünwald-Giemsa |
| MMZA | Multimodale Zellanalyse |
| MS | Mundschleimhaut |
| neg. | Tumorzell-negativ |

| | |
|-----------------|---------------------------------|
| NOR | Nukleolus organisierende Region |
| Nr. | Nummer |
| PAP | Papanicolaou |
| PE | Probeexzision |
| PEC | Plattenepithelkarzinom |
| PHA | Phythämagglutinine |
| pos. | Tumorzell-positiv |
| Ref. | Referenz |
| Regeneratepith. | Regeneratepithelien |
| ROI | Region of Interest |
| STL | Stammlinie |
| w | weiblich |
| wahrsch. | wahrscheinlich |
| V. a. | Verdacht auf |
| zweifelh. | zweifelhaft |
| zytol. | zytologisch |

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----|
| Tab. 1.1: | Inzidenz des Mundhöhlenkarzinoms weltweit (beide Geschlechter)..... | 1 |
| Tab. 3.1: | Beziehung zwischen Alter und Geschlecht der 28 Patienten..... | 58 |
| Tab. 3.2: | Übersicht über die Follow-up Diagnosen der zytologisch Tumorzell-negativen Fälle..... | 59 |
| Tab. 3.3: | Übersicht über die Follow-up Diagnosen der zytologisch zweifelhaften und Tumorzell-positiven Fälle..... | 59 |
| Tab. 3.4: | Übersicht über den nicht relokalisierbaren Bildanteil aller 30 Präparate..... | 62 |
| Tab. 3.5: | Übersicht über die Mittelwerte der Relokalisierungsungenauigkeiten in μm | 68 |
| Tab. 3.6a: | Zytologische Daten im Gesamtüberblick..... | 73 |
| Tab. 3.6b: | Zytologische Daten und DNA-zytometrische Ergebnisse im Gesamtüberblick.... | 74 |
| Tab. 3.6c: | Histogrammtypen sowie Ergebnisse der manuellen und automatischen AgNOR-Analyse im Gesamtüberblick..... | 75 |
| Tab. 3.7: | Messergebnisse der DNA-Analyse der Rattenleber aus beiden Messsystemen im Vergleich..... | 81 |
| Tab. 3.8a: | Vergleich der DNA-Zytometrien der zehn zytologisch Tumorzell-negativen Fälle: MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System..... | 83 |
| Tab. 3.8b: | Vergleich der DNA-Zytometrien der acht zytologisch zweifelhaften Fälle: MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System..... | 84 |
| Tab. 3.8c: | Vergleich der DNA-Zytometrien der zwölf zytologisch Tumorzell-positiven Fälle: MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System..... | 85 |
| Tab. 3.8d: | Fortsetzung von Tab. 3.8c und Gesamtauswertung..... | 86 |
| Tab. 3.9: | Korrelationskoeffizient r der Modalwerte aller Peaks der DNA-Histogramme | 93 |
| Tab. 3.10: | Korrelationskoeffizient r der Modalwerte der größten Peaks pro Fall..... | 94 |
| Tab. 3.11: | Korrelation der DNA-Ergebnisse mit dem klinischen/histologischen Follow-up . | 98 |
| Tab. 3.12: | Diagnostische Treffsicherheit der DNA-Zytometrie..... | 99 |
| Tab. 3.13: | Übersicht über die Ergebnisse der AgNOR-Analyse..... | 100 |
| Tab. 3.14: | Diagnostische Treffsicherheit gemäß der DNA-Ergebnisse in Kombination mit der manuellen AgNOR-Analyse..... | 103 |
| Tab. 3.15: | Diagnostische Treffsicherheit der MMZA..... | 104 |

| | |
|---|----|
| Abb. 1.1: Fortschreiten der oralen Leukoplakie zum Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut | 5 |
| Abb. 2.1: Ansicht des Labormusters mit Mikroskop, CCD-Kamera und Computer | 24 |
| Abb. 2.2: Komponenten des Systems..... | 24 |
| Abb. 2.3: Ebenen der Softwarekomponenten und der Hardware..... | 26 |
| Abb. 2.4: Informationsfluss zur Darstellung der Ergebnisse | 29 |
| Abb. 2.5: Einteilung der Benutzeroberfläche..... | 30 |
| Abb. 2.6: Ablauf einer Aufnahmesequenz mit angedeutetem Informationsfluss | 33 |
| Abb. 2.7: Originales MGG-Bild mit dem dazugehörigen RGB-Histogramm | 34 |
| Abb. 2.8: Zuordnung der Pixel durch ihre RGB-Werte zu Vordergrund- (rot), Hintergrund- (grün) und Restcluster (blau)..... | 35 |
| Abb. 2.9: Originalaufnahmen vor der Transformation | 35 |
| Abb. 2.10: Ergebnis der Transformation für Bilder in MGG-, Feulgen- und Silbernitrat-Färbung derselben Region..... | 35 |
| Abb. 2.11: Ablaufschema der Repositionierung | 36 |
| Abb. 2.12: Die einzelnen Schritte des Regionenwachstums | 38 |
| Abb. 2.13: Wasserscheidenalgorithmus | 39 |
| Abb. 2.14: Anwendung des Wasserscheidenalgorithmus | 39 |
| Abb. 2.15: Reduzierung der Anzahl der Regionen durch Einbeziehung von Zusatzinformationen..... | 40 |
| Abb. 2.16: Auswahl von Regionen | 40 |
| Abb. 2.17: Benutzerschnittstelle für die manuelle Klassifikation der Zellen | 41 |
| Abb. 2.18: Zur Definition der optischen Dichte..... | 42 |
| Abb. 2.19: Störeffekte bei der Berechnung der optischen Dichte der Zellen | 44 |
| Abb. 2.20: Einteilung der Zellen in verschiedene Regionen für die Bestimmung der IOD | 44 |
| Abb. 2.21: Beugungskorrektur einer IOD-Messung | 45 |
| Abb. 2.22: Benutzeroberfläche für die DNA-Analyse..... | 46 |
| Abb. 2.23: Aufnahmen in der Silbernitrat-Färbung in unterschiedlicher Qualität..... | 47 |
| Abb. 2.24: Benutzerschnittstelle für die Eingabe der Messwerte aus der Silbernitrat-Färbung..... | 48 |
| Abb. 2.25: Durchführung des Bürstenabstrichs | 50 |
| Abb. 2.26: Erstellen eines Bürstenabstrich-Präparats | 51 |
| Abb. 3.1: Altersverteilung der Patienten | 58 |
| Abb. 3.2: Übersicht über den prozentualen Anteil nicht relokalisierbarer Zellbilder pro Präparat | 63 |
| Abb. 3.3: Gesamtdurchschnitte der prozentualen Anteile nicht relokalisierbarer Zellbilder pro Präparat | 64 |
| Abb. 3.4: Übersicht über die Relokalisierungsungenauigkeiten eines jeden Falles..... | 69 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 3.5: Übersicht über die Mittelwerte der Relokalisierungsungenauigkeiten | 69 |
| Abb. 3.6: DNA-Histogramme eines Abstriches von einem histologisch gesicherten Lichen planus ohne Dysplasie | 90 |
| Abb. 3.7: DNA-Histogramme eines Abstriches einer histologisch gesicherten Hyperkeratose ohne Dysplasie | 90 |
| Abb. 3.8: DNA-Histogramme eines Abstriches von einem histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut (T2 N0 MX; Stadium 2; R0; G2) . | 91 |
| Abb. 3.9: DNA-Histogramme eines klinisch diagnostizierten Plattenepithelkarzinoms der Mundschleimhaut (T3 N2b MX; G2)..... | 91 |
| Abb. 3.10: DNA-Histogramme eines histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinoms der Mundschleimhaut (T3 N2c MX; Stadium 4a; R0; G2)..... | 92 |
| Abb. 3.11: DNA-Histogramme eines Abstriches von einem histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut (T4 N2b MX; Stadium 4a; R0; G2) | 92 |
| Abb. 3.12: Korrelation der Modalwerte (c) aller Peaks aller 30 Fälle MMZA versus AutoCyte QUIC-DNA-System | 93 |
| Abb. 3.13: Korrelation der Modalwerte (c) des größten Peaks pro Fall | 94 |
| Abb. 3.14: Peaklagen der DNA-Zytometrie der MMZA | 95 |
| Abb. 3.15: Peaklagen der DNA-Zytometrie des AutoCyte QUIC-DNA-Systems | 95 |
| Abb. 3.16: Kriterien der DNA-Aneuploidie-Entstehung | 96 |
| Abb. 3.17: Anzahl der Fälle mit „n“ DNA-aneuploiden Stammlinien im Vergleich | 97 |
| Abb. 3.18: Anzahl der Fälle mit (n) Zellen > 9c im Vergleich | 97 |
| Abb. 3.19: AgNOR-Flächen- und Zellkernflächenberechnung durch die automatische AgNOR-Analyse | 101 |
| Abb. 3.20: Vergleich der AgNOR-Zählungen: automatische vs. manuelle AgNOR-Analyse..... | 101 |
| Abb. 3.21: Vergleich der AgNOR-Zählungen: automatische vs. manuelle AgNOR-Analyse..... | 102 |
| Abb. 3.22: Papanicolaou-Färbung..... | 105 |
| Abb. 3.23: Feulgen-Färbung | 105 |
| Abb. 3.24: Silbernitrat-Färbung | 105 |
| Abb. 3.25: Papanicolaou-Färbung..... | 106 |
| Abb. 3.26: Feulgen-Färbung | 106 |
| Abb. 3.27: Silbernitrat-Färbung | 106 |
| Abb. 3.28: Papanicolaou-Färbung..... | 107 |
| Abb. 3.29: Feulgen-Färbung | 107 |
| Abb. 3.30: Silbernitrat-Färbung | 107 |
| Abb. 3.31: Benutzeroberfläche zu Beginn eines neuen Präparats..... | 108 |
| Abb. 3.32: Erstellen der ersten Bildergalerie in der Papanicolaou-Färbung..... | 108 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 3.33: Benutzeroberfläche nach Fertigstellung aller drei Bildergalerien in den drei Färbungen..... | 109 |
| Abb. 3.34: Benutzeroberfläche für die Segmentierung und Klassifizierung der Zellen in der Feulgen-Färbung | 109 |
| Abb. 3.35: Ergebnisoberfläche der DNA-Zytometrie | 110 |
| Abb. 3.36: Benutzeroberfläche für die manuelle AgNOR-Analyse in der Silbernitrat-Färbung..... | 110 |

9 Literaturverzeichnis

- [1] Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, et al.: Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (1995); 80: 188-191.
- [2] Abdel-Salam M, Mayall B, Chew K, Silverman S, Greenspan JS: Prediction of malignant transformation in oral epithelial lesions by image cytometry. *Cancer* (1988); 62: 1981-1987.
- [3] Abdel-Salam M, Mayall B, Chew K, Silverman S, Greenspan JS: Which oral lesions will become malignant? An image cytometric study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* (1990);69; 345-350.
- [4] Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. *Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe*, Saarbrücken, (2002).
- [5] Balke A, Isard M: *Active Contours*. Springer Verlag , (1998).
- [6] Becker R, Erwig R, Lorscheich G, Schmidseher R: Vergleichende zytologische und histologische Untersuchungen zur Tumordiagnostik. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 21 (1966), 145-148.
- [7] Biesterfeld S, Füzesi L, Härle F, Böcking A: DNA-cytometric detection of euploid polyploidization in oral lichen ruber planus. *Anal Quant Cytol Histol* (1991); 13: 7-10.
- [8] Biesterfeld S, Gerres K, Fischer-Wein G, Böcking A: Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J Clin Pathol*; 47 (1994), 38-42.
- [9] Böcking A: DNA-Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik. *Beitr Onkol*, Karger, Basel, (1990); vol. 38, pp 298-347.
- [10] Böcking A: DNA measurements. When and why? In: *Compendium on quality assurance, proficiency testing, and workload limitations*: In: Wied GL, Keebler CM, Rosenthal DL, Schenk U, Somrak TM, Vooijs GP (eds.) Chicago, Illinois, USA: *Tutorials of Cytology* (1995): 170-188.
- [11] Böcking A: Die Bedeutung der statischen DNA-Zytometrie bei Dysplasien des Plattenepithels. *Fortschritt und Fortbildung in der Medizin*. Band 21 (1997/98): 41-49.
- [12] Böcking A: Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA-Bildzytometrie. *Dt. Ärztebl.* (1998); 95: A-658-662 [Heft 12].
- [13] Böcking A: Identifizierung progredienter Dyplasien des Plattenepithels mittels DNA-Bildzytometrie. *MTA Dialog* 6 (2002) 3: 490-493.
- [14] Böcking A, Freudenberg N: Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Pathologie* (1998); 19:235-258.

- [15] Böcking A, Giroud F, Reith A: Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology Task Force on Standardization of Diagnostic DNA Image Cytometry (1995b). *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 17 (1): 1-7.
- [16] Böcking A, Meyer-Ebrecht D, Stockhausen J: Verfahren zur Zellanalyse und Zellanalyseeinrichtung, DE 101 28 552.3 (Patent), (2001).
- [17] Böcking A, Motherby H: Abklärung zervikaler Dysplasien mittels DNA-Bild-Zytometrie. *Pathologe* 20 (1) (1999), 25-33.
- [18] Böcking A, Nguyen VQH: Diagnostic and Prognostic Use of DNA Image Cytometry in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Invasive Carcinoma. *Cancer Cytopathol* (2004); 102:41-54.
- [19] Böcking A, Stockhausen J, Meyer-Ebrecht D: Towards a single cell cancer diagnosis. Multimodal and Monocellular Measurements of Markers and Morphology (5M). *Anal Cell Pathol* 00 (2004); 1-7.
- [20] Böcking A, Striepeke E, Auer H, Füzesi L: Static DNA-cytometry. Biological background, technique and diagnostic interpretation. In *Tutorials of Cytology*. Edited by Wied L, Keebler CM, Rosenthal DL, Schenk U, Somrak TM, Vooijs GP, Chicago, Illinois, USA (1994), 107-128.
- [21] Boldy DA, Crocker J, Ayres JG: Application of the AgNOR method to cell imprints of lymphoid tissue, *J Pathol* (1989); 157: 75-79.
- [22] Bouquot JE: Oral leukoplakia and erythroplakia: a review and update. *Pract Periodont Aesthet Dent* (1994); 6: 9-17.
- [23] Bouquot JE, Gorlin RJ: Leukoplakia, lichen planus and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* (1986); 61: 373-381.
- [24] Burns JE, McFarlane R, Clark LJ, et al.: Maintenance of identical p53 mutations throughout progression of squamous cell carcinoma of the tongue. *Eur J Cancer B Oral Oncol* (1994); 30B: 335-337.
- [25] Cardillo MR: Ag-NOR technique in fine needle aspiration cytology of salivary gland masses. *Acta Cytol* (1992); 36(2): 147-151.
- [26] Chatélain R, Schunck T, Schindler EM, Schindler AE, Böcking A: Diagnosis of prospective malignancy in koilocytic dysplasia of the cervix with DNA Cytometry. *J. Reprod. Med.* 34 (1989a), 505-510.
- [27] Chatélain R, Willms A, Biesterfeld S, Auffermann W, Böcking A: Automated Feulgen Staining with a Temperature-Controlled Staining Machine. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* (1989b); 11: 211-217.
- [28] Clayton DA: Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Ann Rev Biochem* (1984) 53: 573-594.

- [29] Cox M, Maitland N, Scully C: Human herpes simplex -1 and papillomavirus type 16 homologous DNA sequences in normal, potentially malignant and malignant oral mucosa, *Eur J Cancer B*; (1993); 29(3): 215-219.
- [30] Crocker J, Boldy DA, Egan MJ: How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach, *J. Pathol.* 158(3) (1989), 185-188.
- [31] Crocker J, Egan MJ: Correlation between NOR sizes and numbers in non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* (1988); 156: 233-239.
- [32] Crocker J, Macartney JC, Smith PJ: Correlation between DNA flow cytometry and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* (1988); 154: 151-156.
- [33] Crocker J, McGovern J: Nucleolar organiser regions in normal, cirrhotic, and carcinomatous livers. *J Clin Pathol* (1988); 41(10): 1044-1048.
- [34] Crocker J, Nar P: Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* (1987); 151: 111-118.
- [35] Crocker J, Skilbeck N: Nucleolar organiser region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study, *J Clin Pathol* (1987); 40(8): 885-889.
- [36] De Capoa A, Baldini A, Marlekaj P, Natoli C, Rocchi M, Archidiacono N, Cianfarani S, Spadoni GL, Boscherini B: Hormone-modulated rRNA gene activity is visualized by selective staining of the NOs. *Cell Biol Int Rep* (1985); 9: 791-796.
- [37] Derenzini M, Betts CM, Ceccarelli C, Eusebi V: Ultrastructural organization of nucleoli in benign naevi and malignant melanomas. *Virchows Arch B [Cell Pathol]* (1986); 5: 343-352.
- [38] Derenzini M, Hernandez-Verdun D, Pession A, Novello F: Structural organization of chromatin in nucleolar organizer regions of nucleoli with a nucleolonema-like and compact ribonucleoprotein distribution, *J. Ultrastruct. Res.* 84(2) (1983), 161-172.
- [39] Derenzini M, Nardi F, Farabegoli F, Ottinetti A, Roncaroli F, Bussolanti G: Distribution of silver-stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from nonneoplastic reactive cells in human effusions. *Acta Cytol* (1989b); 33: 491-498.
- [40] Derenzini M, Pession A, Farabegoli F, Trerè D, Badiali M, Dehan P: Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. (1989a). *Am J Pathol* 134: 925-932.
- [41] Derenzini M, Romagnoli T, Ceccarelli C, Eusebi V: Fixatives and silver stainability of NOR proteins at the light microscopical level [letter]. *J Histochem Cytochem* (1988); 36: 1453-1454.
- [42] Du X, Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW: Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med* (2000); 29 (2): 80-5.

- [43] Egan MJ, Crocker J: Nucleolar organizer regions in cutaneous tumours. *J Pathol* (1988); 154(3): 247-253.
- [44] Enwonwu CO, Meeks VI: Bionutrition and oral cancers in humans. *Crit Rev Oral Biol Med* (1995); 6 (1): 5-17.
- [45] Evans AS, Momaghan JM: Nuclear DNA content of normal, neoplastic, and wart affected cervical biopsies. *Analyt Quant Cytol* (1983); 5: 122-116.
- [46] Feulgen R, Rossenbeck H: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* (1924); 135: 203-248.
- [47] Field DH, Fitzgerald PH, Sin FY: Nucleolar silver-staining patterns related to cell cycle phase and cell generation of PHA-stimulated human lymphocytes. *Cytobios* (1984); 41: 23-33
- [48] Field JK, Spandidos DA, Malliri A, et al.: Elevated p53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* (1991); 64: 573-7.
- [49] Field JK, Spandidos DA, Stell PM: Overexpression of the p53 gene in head and neck cancer, linked with heavy smoking and drinking. *Lancet* (1992); 339: 502-3.
- [50] Field JK, Zoumpourlis V, Spandidos DA, Jones AS: P53 expression and mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck: expression correlates with the patients use of tobacco and alcohol. *Cancer Detect Prev* (1994); 18: 197-208.
- [51] Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D: Head and neck cancer. *N Engl J Med* (2001); 345: 1890-1900.
- [52] Gardner AF: An investigation of the use of exfoliative cytology in the diagnosis of malignant lesions of the oral cavity. The cytologic diagnosis of oral carcinoma. *Acta Cytol* 8 (6) (1964), 436-445.
- [53] Garewal H: Antioxidants in oral cancer prevention. *Am J Clin Nutr* (1995); 62: 1410-1416.
- [54] Geyer J, Haanck F, Carrico C, Kirck Patrick M: Preliminary Evaluation of CytoRich®: An Improved Automated Cytology Preparation. *Diagn Cytopathol* (1993); 9: 412-422.
- [55] Giri DD, Dundas SA, Sanderson PR, Howat AJ: Silver-binding nucleoli and nucleolar organizer regions (AgNORs) in fine needle aspiration cytology of the breast. *Acta Cytol* (1989a); 33: 173-175.
- [56] Giri DD, Nottingham JF, Lawry J, Dundas SA, Underwood JC: Silver-binding nucleolar organizer region (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. *J Pathol* (1989b); 157: 307-313.

- [57] Giroud F, Haroske G, Reith A, Böcking A: 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance. *Anal Cell Pathol* (1998); 17: 201-208.
- [58] Goodpasture C, Bloom SE: Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining, *Chromosoma* 20, 53(1) (1975), 189-205.
- [59] Grotto HZW, Lorand-Metze I, Metze K: Nucleolar organizer regions in normal hematopoiesis: relationship to cellular proliferation and maturation. *Nouv Rev Fr Hematol* (1991); 33: 1-4.
- [60] Hall PA, Crocker J, Watts A, Stansfeld AD: A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* (1988); 12: 373-381.
- [61] Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A: 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. *Anal Cell Pathol* 17 (1998), 189-200.
- [62] Haroske G, Baak JPA, Danielsen H, Giroud F, Gschwendtner A, Oberholzer M, Reith A, Spieler P, Böcking A: Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol* 23 (2001) 89-95.
- [63] Heim S, Mitelman F: *Cancer cytogenetics*. Wiley-Liss, New York, (1995); 389-407.
- [64] Hennekens CH, Stampfer MJ, Willett W: Micronutrients and cancer chemoprevention. *Cancer Detect Prev* (1984); 7: 147-58.
- [65] Hillemanns HG: *Entstehung und Wachstum des Zervixkarzinoms*, Basel, New York: Karger S, (1964).
- [66] Hogewind WF, van der Waal I, van der Kwast WA, Snow GB: The association of white lesions with oral squamous cell carcinoma. A retrospective study of 212 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* (1989); 18: 163-4.
- [67] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al.: p53 Mutations in human cancers. *Science* (1991); 253: 49-53.
- [68] Howald HP und Kainz M: Zentralregister des DÖSAK für Tumoren im Kiefer-Gesichtsbereich, 7. Projektbericht, Zentrales Tumorregister des DÖSAK Gießen, (1996).
- [69] Howat AJ, Giri DD, Wright AL, Underwood JCE: Silver-stained nucleoli and nucleolar organizer counts are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma. *J Pathol* (1988); 156: 227-232.
- [70] Howell WM: Selective staining of nucleolar organizer regions (NORs), in: *The Cell Nucleus*; H. Busch and L. Rothblum, ed., Vol. IX, Academic Press, New York, (1982), 89-142.
- [71] Howell WM, Black DA: Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective-colloid developer: a 1 step method. (1980); *Experientia* 36: 1014-1017.

- [72] Howell WM, Denton TE, Diamond JR: Differential staining of the satellite regions of human chromosomes. (1975); *Experientia* 31: 260-262.
- [73] Ismail S, Colclougi AB, Dinnen SJ, Eakins D, Evans DM, Gradwell E, Sullivan JPO, Summerell JM, Newcombe P: Reprting cervical intra-epithelial neoplasia (CIN): intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement. *Histopathology* (1990); 16: 371-376.
- [74] Jones CJ, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA: The cytobrush cell collector in oral cytology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 77 (1994), 101-107.
- [75] Karabulut A, Reibel J, Therkildsen MH, Praetorius F, Nielsen HW, Dabelsteen E: Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. *J Oral Pathol Med* (1995); 24: 198-200.
- [76] Kaugars GE, Silverman S Jr, Ray AK, Page DG, Burns LM, Svirsky JA: The use of exfoliative cytology for the early diagnosis of oral cancers: is there a role for it in education and private practice? *J. Cancer Educ.* (1998);13 (2); 85-89.
- [77] Kerdpon D, Rich AM, Reade PC: Expression of p53 in oral mucosal hyperplasia, dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oral Dis* (1997); 3: 86-92.
- [78] Kindermann D, Hilgers CH: Glare-correction in DNA image cytometry. *Anal. Cell. Pathol.* 6 (1994), 165-180.
- [79] Koss LG: The Papanicolaou test for cervical cancer detection. Triumph and tragedy, *JAMA* 261 (5) (1989), 737-743.
- [80] Largey JS, Meltzer SJ, Yin J, et al.: Loss of heterozygosity of p53 in oral cancers demonstrated by the polymerase chain reaction. *Cancer* (1993); 71: 1933-7.
- [81] Lazarus P, Stern J, Zwiebel N, Fair A, Richie Jr JP, Schantz S: Relationship between p53 mutation incidence in oral cavity squamous cell carcinomas and patient tobacco use. *Carcinogenesis* (1996); 17: 733-9.
- [82] Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, et al.: Predicting cancer development in oral leukoplakia: 10 years of translational research. *Clin Cancer Res* (2000); 6: 1702-10.
- [83] Liloglou T, Scholes AGM, Spandidos DA, Vaughan ED, Jones AS, Field JK: P53 mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck predominate in a subgroup of former and present smokers with a low frequency of genetic instability. *Cancer Res* (1997); 57: 4070-4.
- [84] Lind PO: Malignant transformation in oral leukoplakia. *Scand J Dent Res* (1987); 95: 449-55.
- [85] Lippman SM, Hong WK: Molecular Markers of the Risk of Oral Cancer. *N Engl J Med*, Vol. 344, No. 17; (2001); 1323-1326.
- [86] Löbe HP, Mehnert WH, Bernstein P, Rudolph H: Einordnung maligner Geschwülste des Kopf-Hals-Gebietes in die Strategie der Krebsbekämpfung der DDR. *Arch Geschwulstforschung* 59: 23-29, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1989).

- [87] Lumerman H, Freedman P, Kerpel S: Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (1995); 79: 321-329.
- [88] Mashberg A: Diagnosis of early oral and oropharyngeal squamous carcinoma: obstacles and their amelioration. *Oral Oncol* (2000); 36: 253-255.
- [89] Möbius G: Cytological early detection of cervical carcinoma: possibilities and limitations. Analysis of failures: *J Cancer Clin Oncol* 119 (9) (1993), 513-521.
- [90] Motherby H, Marcy T, Hecker M, Ross B, Nadjari B, Auer H, Müller KM, Häussinger D, Strauer BE, Böcking A: Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology: I. DNA aneuploidy for identification and differentiation of primary and secondary tumors of the serous membranes, *Anal Quant Cytol Histol* 20 (1998a), 153-161.
- [91] Motherby H, Niklaus S, Berg A et al.: Semiautomated Monolayer Preparation of Bronchial Secretion using AutoCyte® PREP acta *Cytol.* (1999); 43 (1): 47-57.
- [92] Motherby H, Nadjari B, Remmerbach T, Marcy T, Pomjanskaja N, Müller W, Knops K, Häussinger D, Strauer BE, Böcking A: Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology: II. DNA aneuploidy for identification of neoplastic cells in equivocal effusions, *Anal Quant Cytol Histol* 20 (1998b), 162-168.
- [93] Müller HW, Böcking A, Auer H: TV Cytometer CM 1 for computer aided tumor diagnosis, in: *Compendium on the computerized cytology and histology laboratory. Tutorials in Cytology.* Edited by Wied L, Bartels PH, Rosenthal DL, Schenk U, Chicago, Illinois, USA (1994): 376-387.
- [94] Murty VV, Mitra AB, Sharma JK, Luthra UK: Nucleolar organizer regions in patients with precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. *Cancer Genet Cytogenet* (1985); 18(3): 275-279.
- [95] Nadjari B, Kersten A, Ross B, Motherby H, Krallmann R, Sundmacher R, Böcking A: Cytologic and DNA cytometric diagnosis and therapy monitoring of squamous cell carcinoma in situ and malignant melanoma of the cornea and conjunctiva, *Anal Quant Cytol Histol* 21 (5) (1999a), 387-396.
- [96] Nadjari B, Motherby H, Poeschke T, Poeschke S, Gabbert HE, Simon D, Roher HD, Feldkamp J, Tharandt L, Böcking A: DNA aneuploidy as a specific marker of neoplastic cells in FNAB of the thyroid, *Anal Quant Cytol Histol* 21 (6) (1999b), 481-488.
- [97] Ogden GR, Cowpe JG, Chrisholm DM, Lane EB: DNA and keratin analysis of oral exfoliative cytology in the detection of oral cancer. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.* (1994);6: 405-408.
- [98] Ogden GR, Cowpe JG, Green M: Cytobrush and wooden Spatula for Oral Exfoliative Cytology. A comparison. *Acta cytol.* 36 (1992), 706-710.
- [99] Ogden GR, Kiddie RA, Lunny DP, Lane DP: Assessment of p53 protein expression in normal, benign and malignant oral mucosa. *J Pathol* (1992); 166: 389-394.

- [100] Ostwald C, Müller P, Barten M, Rutsatz K, Sonnenburg M, Milde-Langosch K, Löning T: Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa, *J Oral Pathol Med* (1994); 23(5): 220-225.
- [101] Pape HD, Pfitzer P: The nuclear content of tumor cells in the oral cavity. *J. Max. Fac. Surg.* 1 (1973), 117-121.
- [102] Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics, 1997. *CA, Cancer J. Clinicians* 47 (1997), 5-27.
- [103] Pich A, Chiusa L, Boccadoro M, Marmont F: AgNORs and myeloma prognosis. *Leuk Lymph* (1994); 12: 383-394.
- [104] Pindborg JJ, Renstrup G, Poulsen HE, Silverman S: Studies in oral leukoplakias vs. clinical and histological signs of malignancy. *Acta Odont Scand* (1963); 21: 407-414.
- [105] Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I, eds.: *Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa*. 2nd ed. Berlin, Germany: Springer Verlag, (1997): 21-6.
- [106] Platz H, Fries R, Hudec M: Retrospektive DÖSAK-Studie über Karzinome der Mundhöhle. Die prognostische Relevanz verschiedener Faktoren unter Berücksichtigung der Therapie, *Österreich Z Stomatologie* 80; 216-227 (1983).
- [107] Platz H, Fries R, Hudec M: *Prognosis of Oral Cavity Carcinomas*, Hanser, Munich-Vienna, Germany (1986).
- [108] Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ: Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.* (1986); 18(1): 5-14.
- [109] Ramaswamy G, Rao VR, Kumaraswamy SV, Anantha N: Serum vitamins' status in oral leukoplakias: a preliminary study. *Eur J Cancer Oral Oncol* (1996); 32B: 120-122.
- [110] Reddy CR, Kameswari VR, Prahlad D, Ramulu C, Reddy PG: Correlative study of exfoliative cytology and histopathology of oral carcinomas. *J Oral Surg.* 33 (6) (1975), 435-438.
- [111] Reeves BR, Casey G, Honeycombe JR, Smith S: Correlation of differentiation state and silver staining of nucleolar organizers in the promyelocytic leukaemia cell line HL-60. *Cancer Genet Cytogenet* (1984); 13: 159-166.
- [112] Reichart PA, Philipsen HP: *Oralpathologie*. Vol. 14. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag, (1999), 285.
- [113] Remmerbach TW, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A: Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: Report on four cases. *Analytical Cellular Pathology* 00 (2003a), 1-8.
- [114] Remmerbach TW, Weidenbach H, Müller C, Hemprich A, Pomjanski N, Buckstegge B, Böcking A: Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Analytical Cellular Pathology* 25 (2003b), 139-146.

- [115] Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski M, Knops K, Mathes S, Hemprich A, Böcking A: Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer: Analytical Cellular Pathology 22 (2001), 211-221.
- [116] Ropers S-O: Automatische mikroskopische Relokalisation von Zellkern-Ensembles mit Hilfe eines multimodalen Szenenvergleichs. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Meßtechnik und Bildverarbeitung der RWTH Aachen (2004).
- [117] Rowlands DC: Nucleolar organising regions in cervical intraepithelial neoplasia. J Clin Pathol (1988); 41: 1200-1202.
- [118] Rüschoff J: Nucleolus organizer regions (NORs), in: Diagnostic Tumorpathology, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, (1992), pp. 1-144.
- [119] Saku T und Sato E: Prediction of malignant change in oral precancerous lesions by DNA-cytofluorometry. J Oral Pathol (1983); 12: 90-102.
- [120] Sandberg AA: The chromosomes in human cancer and leukaemia. 2. Edition. Elsevier, New York, Amsterdam, Oxford (1990).
- [121] Sandler HC: Reliability of oral exfoliative cytology for detection of oral cancer. J Am Dent Assoc. 68 (1964), 489-499.
- [122] Sandritter W und Fischer R: Der DNS-Gehalt des normalen Plattenepithels und des invasiven Carcinomas der Portio. In: Proceedings of the First International Congress of Exfoliative Cytology. Philadelphia: Lippincott (1961), 189-195.
- [123] Sano K, Takahashi H, Fujita S, Inokuchi T, Pe MB, Okabe H, Tsuda N: Prognostic implication of silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral squamous cell carcinoma. (1991); J Oral Pathol Med 20: 53-56.
- [124] Schimming R, Hlawitschka M, Haroske G, Eckelt U: Prognostic relevance of DNA image cytometry in oral cavity carcinomas, Anal Quant Cytol Histol 20 (1) (1998), 43-51.
- [125] Schön D, Bertz J, Hoffmeister H: Bevölkerungsbezogene Krebsregister in der Bundesrepublik Deutschland, Robert Koch Institut Schriften 2 (1995), 374.
- [126] Schwarz K, Böcking A, Lehmann W, Hahn W: Potentials and limits of exfoliative cytology in judging the significance of oral mucosal changes. Dtsch Zahnärztl Z. 36 (11) (1981), 701-703.
- [127] Sciubba JJ: Oral cancer and its detection. History-taking and the diagnostic phase of management. JADA, Vol. 132, (2001); 12-18.
- [128] Scully C, Field JK, Tanzawa H: Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. Oral Oncol 36 (2000); 256-263.
- [129] Scully C, Sudbo J, Speight PM: Progress in determining the malignant potential of oral lesions. J Oral Pathol Med, (2003), 32: 251-256.

- [130] Shafer WG, Waldron CA: Erythroplakia of the oral cavity. *Cancer* (1975); 36: 1021-1028.
- [131] Shechtman L, Koren R, Horowitz A, Shechtman I, Halpern M, Gal R: Diagnostic value of AgNOR staining in thyroid cytology. *Anal Quant Cytol Histol* (1998); 20(3): 187-191.
- [132] Silverman S Jr: Early diagnosis of oral cancer. *Cancer* 62 (suppl 8): 1796-9, (1988).
- [133] Silverman S Jr, Becks H, Farber SM: The diagnostic value of intraoral cytology. *J Dent Res* 37 (1985), 195-205.
- [134] Silverman S Jr, Bilimaria KF, Bhargara K, Mani NJ, Shah RA: Cytologic, histologic and clinical correlations of precancerous and cancerous oral lesions in 57,518 industrial workers of Gujavat, India. *Acta. Cytol.* 37 (1977), 196-198.
- [135] Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada F: Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study of 257 patients. *Cancer* (1984); 53: 563-8.
- [136] Silverman S Jr und Sugerman PB: Oral Premalignancies and Squamous Cell Carcinoma. *Clinics in Dermatology*. Elsevier Science Inc (2000); 18: 563-568.
- [137] Smetana K, Likovsky Z: Nucleolar silver-stained granules in maturing erythroid and granulocytic cells. *Cell Tiss Res* (1984); 237: 367-370.
- [138] Smith R, Crocker J: Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy. *Histopathology* (1988); 12: 113-125.
- [139] Smith PJ, Skilbeck N, Harrison A, Crocker J: The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. *J Pathol* (1988); 155: 109-112.
- [140] Smith ML, Yin XY, Whiteside TL, Johnson JT, Herberman RB, Locker J: Abnormalities in the p53 gene in tumors and cell lines of human squamous cell carcinomas of the head and neck. *Proc Am Assoc Cancer Res* (1992); 33: 387.
- [141] Soost HG, Baur S: *Gynäkologische Zytodiagnostik. Lehrbuch und Atlas.* (1990); Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- [142] Speight PM, Farthing PM, Bouquot JE: The pathology of oral cancer and pre-cancer. *Curr Diag Pathol* (1996); 3: 165-176.
- [143] Stell PM, Wood GD, Scott MH: Early oral cancer: treatment by biopsy excision, *Br. J. Oral. Surg.* 20 (1982), 234-236.
- [144] Suarez V, Newman J, Hiley C, Crocker J, Collins M: The value of NOR numbers in neoplastic and non-neoplastic epithelium of the stomach. *Histopathology* (1989); 14: 61-66.
- [145] Suarez P, Batsakis JG, el-Nagger AK: Leukoplakia: still a gallimaufry or is progress being made? – a review. *Adv Anat Pathol* (1998); 5: 137-155.
- [146] Thomas SJ, MacLennan R: Slaked lime and betel nut cancer in Papua New Guinea. *Lancet* (1992); 340: 577-8.

- [147] Trerè D: Critical analysis of the methods commonly employed in the assessment of cell proliferation: advantages of the NOR silver-staining technique in routine cytohistopathology. *Anal Cell Pathol* (1993); 5: 191-201.
- [148] Trerè D, Pession A, Derenzini M: The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res* (1989); 184: 131-157.
- [149] Underwood JCE, Giri DD: Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathol* (1988); 155: 95-96.
- [150] Vincent L, Soille P: Watersheds in Digital Space: An Efficient Algorithm Based on Immersion Simulations. In: *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 13 (1990), 583-598.
- [151] Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK: Head and neck cancer. *N Engl J Med* (1993); 328: 184-94.
- [152] Waldron CA, Shafer WG: Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study of 3256 oral leukoplakias. *Cancer* (1975); 36: 1386-1392.
- [153] Warnakulasuriya KA, Johnson NW: Nucleolar organiser region (NOR) distribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma, *J Oral Pathol Med* (1993); 22(2): 77-81.
- [154] Watanabe Y: Methods for the early diagnosis of oral tumors by oral cytology. *Int. Dent. J.* 18 (1968), 708-723.
- [155] Weir JC, Davenport WD und Skinner RL: A diagnostic and epidemiologic survey of 15,783 oral lesions, *J. Am. Dent. Assoc.* 115 (1987), 439-442.
- [156] Wright TC, Kurmann RG, Ferenczy A: Precancerous lesions of the uterine cervix. In: *Blaustein's pathology of the female genital tract*. Kurmann R (Hrsg.), New York: Springer Verlag (1994), 229-277.
- [157] Zariwala M, Schmid S, Pfaltz M, et al.: p53 Gene mutations in oropharyngeal carcinomas: A comparison of solitary and multiple primary tumours and lymph-node metastases. *Int J Cancer* (1994); 56: 807-11.

10 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. A. Böcking, Direktor des Institutes für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, meine besondere Dankbarkeit für die Überlassung des Themas, die stete hilfreiche Unterstützung und die anregenden Diskussionen zum Ausdruck bringen.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Poremba für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Für die hilfreiche, fachliche Beratung im Bereich der DNA-Zytometrie danke ich Frau Dr. med. N. Pomjanski sowie Herrn Dr. med. V. Q. H. Nguyen für seine Mitarbeit. Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. med. T. Remmerbach für die fachliche Unterstützung und die Überlassung hilfreicher Literatur. Herrn Prof. Dr. med. dent. J. Becker danke ich für die Mitarbeit bei der Vervollständigung der Daten. Außerdem gilt auch Frau Buckstegge mein Dank für die technische Bearbeitung der Präparate sowie allen anderen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Instituts für Cytopathologie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Gleichzeitig bedanke ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr.-Ing. D. Meyer-Ebrecht und allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Bildverarbeitung der RWTH Aachen für die stets gute Zusammenarbeit und die weitreichende Unterstützung bei der technischen Umsetzung des Projekts. Insbesondere haben Herr Dipl.-Inform. T. Würflinger und Herr Dipl. Phys. J. Stockhausen wesentliche Hilfe zum technischen Gelingen dieser Arbeit geleistet. Ebenso waren Herr Dipl.-Ing. A. Bell und Frau Dipl.-Inform. T. Schneider immer kompetente Ansprechpartner. Außerdem danke ich Herrn Dipl.-Inform. T. Klein für die Herrstellung des Kontakts, durch den diese Zusammenarbeit überhaupt entstanden ist.

Im Speziellen möchte ich meinen ganz besonderen Dank an meinen Freund Gerd richten, der mir stets unterstützend und motivierend sowie mit konstruktiver Kritik zur Seite stand und mir bei der formalen Gestaltung dieser Arbeit wesentliche Hilfe leistete.

Frau A. Burton danke ich für die Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

Auf diesem Weg bedanke ich mich auch sehr herzlich bei meinen Eltern für die steten Ermutigungen und die allzeitige Unterstützung während meines gesamten Ausbildungsweges.

11 Curriculum Vitae

Nadja Nietzke

*23. März 1978 in Oberhausen

Nationalität

deutsch

Familienstand

ledig, keine Kinder

Konfession

römisch-katholisch

Schulbildung

08/1984 – 06/1988

Grundschule „Dietrich-Bonhöffer“, Oberhausen

08/1988 – 06/1997

Gymnasium „Sophie-Scholl“, Oberhausen

10/1994 – 07/1995

„Grants Pass High School“, Oregon, USA

06/1995

Graduation, USA

06/1997

Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Studium

10/1997 – 04/2006

Studium der Humanmedizin, RWTH Aachen

03/2001

Ärztliche Vorprüfung

03/2002

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/2005

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/2005 – 03/2006

Praktisches Jahr, Marienhospital, Aachen

Wahlfach: Gynäkologie und Geburtshilfe

04/2006

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung / Ärztliche Prüfung

06/2006

Approbation

Berufliche Tätigkeit

07 – 12/2006

Assistenzärztin Innere Medizin, Marienhospital, Aachen

seit 07/2007

Assistenzärztin Gynäkologie und Geburtshilfe, Medizinisches Zentrum Kreis Aachen –Betriebsteil Marienhöhe, Würselen

Kurzfassung der Dissertation

Messpräzision und diagnostische Treffsicherheit der multimodalen Zellanalyse an Mundschleimhautabstrichen

von Nadja Nietzke

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle zählt mit einer Inzidenz von 3-5% aller bösartigen Tumoren weltweit zu den zehn häufigsten Krebsarten. Der diagnostische Goldstandard ist die Biopsie mit histologischer Untersuchung. Eine schonendere, nicht invasive, zeitsparendere und kostengünstigere Methode dagegen ist die zytologische Abstrichdiagnostik, die sich hervorragend mit adjuvanten Diagnosemethoden kombinieren und verbessern lässt. Eine drastische Steigerung der Treffsicherheit der zytologischen Krebsdiagnostik ist der entscheidende Zielgedanke der Multimodalen Zellanalyse (MMZA). Sie stellt die Kombination dreier Zellanalyseverfahren dar, die an demselben zytologischen Präparat computergestützt und mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung nach Durchlaufen eines kaskadierten Färbe- und Umfärbeprozesses aufeinander folgend ablaufen. Durch automatische Relokalisation werden bei jeder Analyse eines Präparates nur identische Zellen gemessen. Die drei Säulen der MMZA sind die zytomorphologische Begutachtung der Zellen in der Papanicolaou-Färbung, die DNA-Zytometrie in der Feulgen-Färbung und die AgNOR-Analyse in der Silbernitrat-Färbung. Ziel der vorliegenden Arbeit war die erstmalige Demonstration der Funktionalität des Prototypen sowie die Evaluierung der Messpräzision und der diagnostischen Treffsicherheit der MMZA an Mundschleimhautabstrichen. Die Reproduzierbarkeit und Messqualität der DNA-Zytometrie wurden im Vergleich mit dem in der Routinediagnostik eingesetzten AutoCyte QUIC-DNA-System (AutoCyte, Burlington, N.C., USA) und in Anlehnung an die Anforderungen der Europäischen Gesellschaft für Analytische Zelluläre Pathologie (ESACP) analysiert und bewertet.

Gegenstand dieser Arbeit waren 30 zytologische Mundschleimhaut-Präparate, die sich aus 22 konventionellen Bürstenabstrich- und acht sog. Monolayer-Präparaten zusammensetzten. Die zytologische Diagnose war in zehn Fällen Tumorzell-negativ, in acht Fällen zweifelhaft und in zwölf Fällen Tumorzell-positiv. Es konnte für 29 Fälle retrospektiv ein klinisches oder histologisches Follow-up eingeholt werden. Auffallend war ein gehäuftes Ablösen der Zellen von den Objektträgern durch die Umfärbeprozesse (20,3 % betroffene Bildpositionen bei den Monolayer-Präparaten und 8,4 % bei den Bürstenabstrich-Präparaten).

Die diagnostische Treffsicherheit der DNA-Zytometrie – isoliert betrachtet – lag bei 93,1 %; es waren zwei falsch negative Diagnosen zu verzeichnen. Es zeigte sich eine völlige Übereinstimmung aller DNA-Messergebnisse der MMZA mit denen des AutoCyte QUIC DNA-Systems, mit dem alle Proben ebenfalls gemessen worden waren. Außerdem wurden qualitätssichernde Messungen an Rattenhepatozyten in Anlehnung an die Anforderungen der ESACP durchgeführt, in denen beide Systeme sehr gute Ergebnisse liefern konnten. Die Erwartungen an die DNA-Zytometrie der MMZA wurden somit hinreichend gut erfüllt.

Die diagnostische Treffsicherheit der manuellen AgNOR-Analyse – isoliert betrachtet – lag bei 100 %. Die beiden DNA-zytometrisch falsch negativen Diagnosen wiesen in der AgNOR-Analyse bemerkenswerterweise einen Wert auf, der für Malignität sprechen kann. Diese Interpretation legt einen Schwellenwert von 4,8 AgNORs pro Zellkern zu Grunde. Bei den gemäß Follow-up gutartigen Mundschleimhautveränderungen wurde ein Durchschnittswert von 3,7 AgNORs pro Zellkern gezählt. Für die bösartigen Läsionen lag der Wert bei durchschnittlich 6,8 AgNORs pro Zellkern.

In dieser Arbeit wurden erst durch die Kombination aller Messmethoden alle Präparate richtig diagnostiziert; die diagnostische Treffsicherheit der MMZA lag somit bei 100 %. Der erste Prototyp hat sich bewährt und das Prinzip, verschiedene adjuvante zytologische Messmethoden an einem Präparat und identischen Zellen miteinander zu kombinieren, hat einen erheblichen Informationsgewinn gezeigt und bei 6,9 % der Fälle einen diagnostischen Mehrwert eingebracht. Als Fazit bleibt das Prinzip der MMZA als diagnostisch gewinnbringend zu empfehlen.