

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

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. I. Esposito

**Automatisierte und manuelle DNA-Bildzytometrie  
an konventionellen und Dünnschichtpräparaten von Mundschleimhautläsionen  
bei Fanconi-Anämie-Patienten**

**Dissertation**

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

Düsseldorf

vorgelegt von

Leonie Hirner

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. dent. Michelle Ommerborn

## Zusammenfassung

Die Fanconi-Anämie ist eine genetische, meist autosomal rezessiv vererbte Erkrankung mit heterogener Merkmalsausprägung und mit erhöhtem Risiko für solide Tumor der Mundschleimhaut. Insofern ist ein reguläres *Screening* für eine frühzeitige Diagnose und Therapie sehr wichtig. Goldstandard der Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms ist die histologische Untersuchung einer Biopsie. Aufgrund häufig chronisch rezidivierender oder multilokulärer Befunde sowie der häufig begleitenden Thrombo- oder Leukopenie besteht die Notwendigkeit einer minimal- bzw. nicht-invasiven Diagnostik. Zunehmende Bedeutung hat hier die konventionell zytologische sowie die DNA-bildzytometrische Untersuchung von Mundschleimhautabstrichen. In der Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf wird neben der klassischen manuellen DNA-Bildzytometrie die automatisierte DNA-Bildzytometrie erprobt. Ziel ist der Nachweis oder Ausschluss einer DNA-Aneuploidie als Marker für einen malignen Prozess. Die automatisierte Zytometrie ist bisher kein etabliertes Verfahren, hat aber unter anderem den Vorteil einer großen Zeitersparnis.

In dieser Arbeit wurde von insgesamt 35 seit 2014 abgestrichenen Mundschleimhautläsionen von Fanconi-Anämie-Betroffenen insgesamt 132 automatisierte und manuelle DNA-bildzytometrische Messungen an konventionellen und flüssigkeitsbasierten Präparaten ausgewertet mit dem Ziel, die Treffsicherheit der jeweiligen Messmethoden an den jeweiligen Präparationsformen zu vergleichen.

Die initial angefertigten probatorischen flüssigkeitsbasierten Präparate zeigten sich häufig zellarm und dadurch ungeeignet insbesondere für die automatisierte DNA-bildzytometrische Messung, weshalb das Präparationsprozedere als erstes, wenn auch nicht quantifizierbares Ergebnis dieser Arbeit entsprechend optimiert wurde. Bezüglich der Vergleichbarkeit der Messverfahren wurden unter anderem Stammlinien-Modalwerte anhand der vier Messmodalitäten mit dem Ergebnis einer hinreichenden Übereinstimmung ausgewertet. Auch nach Cohen's Kappa konnte eine gute Übereinstimmung zwischen den zwei Methoden an den beiden Präparationsformen ermittelt werden, sodass insgesamt bis auf wenige diskrepante Fälle eine zufriedenstellende Übereinstimmung aller vier Messmodalitäten erhoben wurde. Zudem gibt es inzwischen auch wesentliche Fortschritte in der Software-Entwicklung der automatisierten DNA-Bildzytometrie, weshalb dieses Verfahren insgesamt als zukunftssträchtig zu bewerten ist.

## Summary

Fanconi anemia is a genetic, mostly autosomal recessive inherited disease with heterogeneous manifestation. The risk for solid tumors, especially squamous cell carcinomas of the oral cavity, is increased. A regular screening is very important for early diagnosis and therapy.

The gold standard of diagnosis of oral squamous cell carcinoma is the histological examination of a biopsy. Because of frequently chronic recurrent or multilocular findings as well as the frequently accompanying thrombocytopenia or leukopenia, there is a need for minimal-invasive or non-invasive diagnostics.

Conventional cytological and DNA-image cytometric examination of oral mucosal swabs is of increasing importance. In the cytopathology department of Düsseldorf, automated DNA image cytometry is being tested in addition to classical manual DNA image cytometry. The aim is to detect or exclude DNA aneuploidy as a marker for a malignant process. Automated cytometry is not yet an established procedure, but has, among other things, the advantage of saving a great deal of time.

In this study, from a total of 35 oral mucosal lesions of Fanconi anemia sufferers swabbed since 2014, a total of 132 automated and manual DNA image cytometric measurements on conventional and liquid-based preparations were evaluated with the aim of comparing the accuracy of each particular measurement method on both preparation forms.

The initially prepared probationary liquid-based preparations were often found to be cell-poor and therefore unsuitable in particular for automated DNA image cytometric measurement, which is why the preparation procedure was optimized accordingly as a first, although not quantifiable, result of this study.

With a view to the comparability of the measurement procedures, among other things, stem line modal values were evaluated on the basis of the four measurement modalities where a sufficient agreement was demonstrated. Also according to Cohen's Kappa a good agreement between the two methods could be determined at the two preparation forms, so that altogether, except for a few discrepant cases, a satisfactory agreement of all four measurement modalities could be worked out. Furthermore, there has also recently been significant progress in the software development of automated DNA image cytometry, which is why this method should be seen as promising overall.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ALDH</b>	Aldehyddehydrogenase
<b>Aqua dest</b>	destilliertes Wasser
<b>BRCA</b>	<i>Breast cancer gene</i>
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>c</b>	<i>content</i>
<b>CC</b>	Korrelationskoeffizient
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>CV</b>	Variationskoeffizient
<b>D</b>	flüssigkeitsbasiertes Präparat
<b>d.V.</b>	dringend verdächtig
<b>DI</b>	DNA-Index
<b>dl</b>	Deziliter
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>e.V.</b>	eingetragener Verein
<b>EE</b>	<i>exceeding event</i>
<b>ERCC4</b>	<i>excision repair cross-complementation group 4</i>
<b>ESACP</b>	<i>European Society for Analytical Cellular Pathology</i>
<b>FAAP100</b>	<i>Fanconi anemia core complex associated protein 100</i>
<b>FANC</b>	<i>Fanconi anemia complementation group</i>
<b>G</b>	<i>gap</i>
<b>g</b>	Gramm
<b>HCL</b>	Salzsäure
<b>HNO</b>	Hals-Nasen-Ohren
<b>HPV</b>	humanes Papillomavirus
<b>IgG1</b>	Immunglobulin G 1
<b>IOD</b>	<i>integrated optical density</i>
<b>K</b>	konventionelles Präparat

<b>KI</b>	Künstliche Intelligenz
<b>min</b>	Minute(n)
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mm<sup>3</sup></b>	Kubikmillimeter
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>neg.</b>	negativ
<b>NH<sub>2</sub>OH</b>	Hydroxylamin
<b>NHCL</b>	Normalsalzsäure
<b>Nr.</b>	Nummer
<b>OPMD</b>	<i>oral potentially malignant disorders</i>
<b>PALB</b>	<i>Partner and localizer of BRCA 2</i>
<b>PD-L1</b>	<i>Programmed cell death 1 Ligand 1</i>
<b>PET</b>	Positronen-Emissions-Tomographie
<b>pos.</b>	positiv
<b>RAD51C</b>	RAD51 homolog C
<b>RFWD3</b>	<i>ring finger and WD Repeat Domain 3</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SEER</b>	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
<b>SLX4</b>	<i>structure-specific endonuclease subunit</i>
<b>SO<sub>2</sub></b>	Schwefeldioxid
<b>TNM</b>	<i>tumor, node, metastasis</i>
<b>UBE2T</b>	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2T</i>
<b>UICC</b>	<i>union of international cancer control</i>
<b>UV-Strahlung</b>	ultraviolette Strahlung
<b>UVB</b>	ultraviolette Strahlung B
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>x g</b>	<i>relative centrifugal force (related to gravity)</i>
<b>XRCC2</b>	<i>X-ray repair cross complementing 2</i>
<b>zw.</b>	zweifelhaft

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung 1

- 1.1 *Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle 1*
  - 1.1.1 Epidemiologie 1
  - 1.1.2 Pathogenese 1
  - 1.1.3 Vorstufen 2
  - 1.1.4 Die TNM-Klassifikation 3
  - 1.1.5 Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle und der Vorläuferläsionen 5
  - 1.1.6 Therapie des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle sowie der Vorläuferläsionen 9
- 1.2 *Die Fanconi-Anämie 11*
  - 1.2.1 Genetik 11
  - 1.2.2 Klinik 12
  - 1.2.3 Risiko für orale Plattenepithelkarzinome 13
- 1.3 *Ploidie-Diagnostik mittels DNA-Bildzytometrie 15*
  - 1.3.1 Prinzip 15
  - 1.3.2 Auswertung und Bedeutung für den zytologischen diagnostischen Prozess 18
- 1.4 *Ziel der Arbeit 19*

## 2 Material und Methoden 20

- 2.1 *Abgrenzung der eigenen Leistung und bisher bereits teilveröffentlichte Ergebnisse 20*
- 2.2 *Patientenkollektiv 21*
- 2.3 *Klinisches Follow-up 23*
- 2.4 *Methodik des Bürstenabstrichs der Mundschleimhaut 23*
  - 2.4.1 Abstrichtechnik, zytologische Präparation und Färbung nach Papanicolaou 23
  - 2.4.2 Standardisierung der Präparation bei flüssigkeitsbasierter Zytologie 26
- 2.5 *Zytologische Untersuchung 26*
- 2.6 *Feulgen-Färbung und Vorbereitung der zytologischen Präparate 27*
- 2.7 *DNA-Bildzytometrie 29*
  - 2.7.1 Durchführung der manuellen DNA-Bildzytometrie 29
  - 2.7.2 Durchführung der automatisierten DNA-Bildzytometrie (= DNA-Karyometrie) 31
  - 2.7.3 Definition von DNA-Aneuploidie als relevantem diagnostischen Messparameter 36
- 2.8 *Statistik 37*
  - 2.8.1 Vierfeldertafeln 37
  - 2.8.2 Kappa nach Cohen 39
  - 2.8.3 Diagramme nach Bland-Altman 40
- 2.9 *Ethikvotum 40*

## 3 Ergebnisse 41

- 3.1 *Klinische Angaben zu den Patienten 41*
- 3.2 *Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik 42*
  - 3.2.1 Qualitative Diagnose 42
  - 3.2.2 Abgleich der qualitativen zytologischen Diagnose mit dem klinischen Follow-up 43
- 3.3 *Anzahl gemessener Analysezellen bei den vier unterschiedlichen Mess-Modalitäten 48*
- 3.4 *DNA-Stammlinienploidie bei den verschiedenen Messmodalitäten 51*
- 3.5 *9c Exceeding Events (9cEE) bei den verschiedenen Messmodalitäten 56*

- 3.6 *DNA-zytometrische Diagnosestellung aus Stammlinien- und Einzelzellauswertung* 60
- 3.7 *Treffsicherheit der DNA-zytometrischen Diagnostik* 61
- 3.8 *Vergleich der Messergebnisse von manueller sowie automatisierter DNA-Bildzytometrie an konventionellen sowie flüssigkeitsbasierten Präparaten* 64
- 3.9 *Vergleich von zytologischer Diagnostik und DNA-Bildzytometrie* 66
- 3.10 *Diskrepante DNA-Ploidie-Diagnosen mit Bezug zum klinischen Follow-Up* 68

#### **4 Diskussion 70**

- 4.1 *Optimierung der flüssigkeitsbasierten Zytologie für die automatisierte DNA-Bildzytometrie* 73
- 4.2 *Treffsicherheit der qualitativen zytologischen Diagnose* 73
- 4.3 *Gegenüberstellung der gemessenen Analysezellen bei manueller und automatisierter DNA-Bildzytometrie an flüssigkeitsbasierten und konventionellen Präparaten* 76
- 4.4 *Treffsicherheit der DNA-Bildzytometrie bei verschiedenen Mess- und Präparationsmethoden* 77
- 4.5 *Übereinstimmung der peridiploiden und peritetraploiden Stammlinien-Modalwerte* 79
- 4.6 *Vergleich der Detektion von Einzelzellaneuploidie (9cEEs)* 80
- 4.7 *Die Interrater-Reliabilität der verschiedenen Messmodalitäten* 81
- 4.8 *Diskrepante DNA-Ploidie-Diagnosen zwischen automatisierter und manueller DNA-Bildzytometrie* 83
- 4.9 *Limitationen der Arbeit* 90
- 4.10 *Schlussfolgerung und Ausblick* 91

#### **5 Literaturverzeichnis 94**

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle

### 1.1.1 Epidemiologie

Die maligne Neoplasie von Lippen und Mundhöhle stellt weltweit die achtzehnthäufigste Tumormanifestation des Menschen dar [1]. Männer sind zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Frauen [2].

Allein im Jahr 2020 gab es weltweit 377.713 neue Fälle maligner Neoplasien von Lippen und Mundhöhle [1]. Im Jahr 2018 erkrankten in Deutschland 4490 Frauen und 9820 Männer erstmals an einer Neoplasie im Bereich der Mundhöhle sowie des Rachens. Für die Zukunft wird in Deutschland eine Zunahme bei Frauen erwartet, so dass das Verhältnis von betroffenen Männern zu Frauen unter 2:1 sinken dürfte [3].

Orale maligne Neoplasien präsentieren sich histologisch in 90 Prozent der Fälle als Plattenepithelkarzinome und können sowohl das nicht keratinisierte Lippenrot als auch die Mundschleimhaut der gesamten Mundhöhle, bestehend aus Innenwange, retromolarem Dreieck, Alveolarfortsatz, hartem Gaumen, Vorderfläche des weichen Gaumens, den vorderen zwei Dritteln der Zunge, Mundboden und Vestibulum, betreffen. Aufgrund der quantitativ histologisch deutlich überwiegenden Plattenepithelkarzinome innerhalb der malignen oralen Neoplasien wird der Begriff traditionell als Synonym verwendet [2].

### 1.1.2 Pathogenese

Zu den Risikofaktoren für die Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms zählen insbesondere Tabak- und Alkoholkonsum. Diese Risikofaktoren liegen in 90 % der Fälle bei den betroffenen Patienten vor [4].

Für Tabakrauch gilt dabei, dass sowohl die unmittelbare als auch die indirekte Exposition das Risiko eines oralen Plattenepithelkarzinoms deutlich erhöhen.

Alkohol kann sowohl das lokale als auch das systemische Immunsystem schädigen und so zu malignen Neoplasien der Mundhöhle führen. Dabei entstehen bei der Verstoffwechslung von Alkohol reaktive Aldehyde, wie Acetaldehyd und Formaldehyd. Im weiteren Verlauf erfolgt die Entgiftung der entstandenen Metabolite über Enzyme wie die Aldehyddehydrogenasen (ALDH) 2 und 5. Dabei entstehen trotz der enzymatischen Aktivität häufig toxische Metabolite und Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schäden wie Quervernetzungen der DNA-Stränge. Reparaturmechanismen des Körpers für diese DNA-Schäden sind bei manchen Erkrankungen, wie der Fanconi-Anämie, geschädigt und wirken nicht, was zu einem weiteren Anstieg des Risikos für Tumorerkrankungen führt [5, 6].

Des Weiteren sind als Risikofaktoren das humane Papillomavirus (HPV) sowie ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung) zu nennen. Beim humanen Papillomavirus ist in erster Linie das HP-Virus 16, seltener vertreten auch das HP-Virus 18, karzinogen. Dabei sind die HPV-induzierten Plattenepithelkarzinome hauptsächlich im Oropharynx lokalisiert, hier besteht eine Prävalenz HPV-induzierter Karzinome von etwa 46% [7]. Bei der ultravioletten Strahlung gilt insbesondere die UVB-Strahlung als karzinogen [2]. Letztere ist insbesondere für die Karzinome im Bereich des Lippenrots relevant.

Genetische Risikofaktoren sind ebenso bekannt. Zum Beispiel kommt es im Rahmen der erblichen Erkrankung Fanconi-Anämie zu einem deutlichen Anstieg der Inzidenz verschiedener maligner Erkrankungen wie hämatologischer Erkrankungen, aber auch von soliden Tumoren wie beispielsweise dem oralen Plattenepithelkarzinom [8].

### 1.1.3 Vorstufen

Obwohl einige Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle primär ohne prädisponierende Läsion entstehen können, sind doch oft sichtbare und damit auch erkennbare Vorstufen vorhanden. Orale Plattenepithelkarzinome können beispielsweise sekundär auf dem Boden von Erythro- oder Leukoplakien entstehen. Diese zählen zu den häufigsten potenziellen Karzinom-Vorstufen, den sogenannten OPMDs (*oral potentially malignant disorders*) [4, 9].

Die Leukoplakie ist definiert als weiße im Schleimhautniveau liegende oder erhabene, regelmäßig oder unregelmäßig begrenzte, gegebenenfalls verruköse Veränderung mit im

Vergleich zur gesunden Mundschleimhaut erhöhtem Risiko der malignen Entartung, wenn andere, für die weiße Schleimhautveränderung ursächliche benigne Pathologien ausgeschlossen sind. Der Begriff der Leukoplakie gilt dabei in erster Linie als klinische Beschreibung einer Läsion und hat keine eindeutige histologische Definition [10]. Nach aktueller Erkenntnislage entarten im Verlauf zwischen 3,6 und 17,5 % der oralen Leukoplakien maligne. Die große Schwankungsbreite ist am ehesten auf die vielfältige klinische Präsentation und auf das eventuell zusätzliche Vorliegen einer oralen epithelialen Dysplasie zurückzuführen [4, 11].

Bei der Erythroplakie handelt es sich laut Definition um eine rote Läsion, die keiner anderen Erkrankung ursprünglich zugeordnet werden kann [10]. Die Erythroplakie hat ein sehr hohes Risiko der malignen Entartung. In Studien zeigten sich in nahezu allen untersuchten Erythroplakien Dysplasien, welche in über 90 % der Fälle bereits in invasive Plattenepithelkarzinome oder zumindest ein *Carcinoma in situ* übergingen [11].

Außerdem ist die Erythroleukoplakie zu nennen als Kombination aus Erythro- und Leukoplakie. Das Entartungsrisiko ist hier ebenso im Anteil der Erythroplakie wie oben beschrieben deutlich erhöht [11].

#### 1.1.4 Die TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms beschreibt das jeweilige Tumorstadium. Dessen Ermittlung gelingt mithilfe der Bestimmung des lokalen Ausmaßes des Tumors, des regionären Lymphknotenbefalls und des Auffindens von gegebenenfalls vorhandenen Fernmetastasen.

Dabei beschreibt „T“ die lokale Ausdehnung sowie die Invasion oder Nicht-Invasion in die Strukturen der Nachbarschaft, die N-Klassifikation trifft eine Aussage über den tumorösen Befall regionärer Lymphknoten und „M“ beschreibt das Vorliegen oder Nicht-Vorliegen von Fernmetastasen. Die Festlegung der TNM-Klassifikation erfolgt vor der Behandlung des Tumors [2]. Anhand ihrer lässt sich durch Vergleich mit den Verlaufsdaten stadienähnlicher Tumore die Prognose der Erkrankung ableiten.

Die TNM-Klassifikation des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle ist wie folgt charakterisiert [12]:

- TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T0 kein Anhalt für Primärtumor
- Tis Tumorfrühstadium ohne invasives Wachstum (*Carcinoma in situ*)
- T1 Tumordurchmesser  $\leq 2$  Zentimeter (cm), Invasionstiefe  $\leq 5$  Millimeter (mm)
- T2 Tumordurchmesser  $\leq 2$  cm mit Invasionstiefe  $>$  als 5 mm aber nicht mehr als 10 mm  
oder:  
Tumordurchmesser  $>$  als 2 cm, maximal bis 4 cm mit Invasionstiefe  $\leq 10$  mm
- T3 Tumordurchmesser  $> 4$  cm oder Invasionstiefe  $> 10$  mm
- T4 Infiltration von Nachbarstrukturen
  
- NX keine Beurteilung möglich
- N0 keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 einzelner tumorpositiver Lymphknoten auf gleicher Seite wie Primarius mit bis zu 3 cm maximalem Durchmesser ohne extranodales Wachstum
- N2a einzelner tumorpositiver Knoten auf der Seite des Primarius gelegen mit minimalem Durchmesser von 3 und maximalem Durchmesser von 6 cm ohne extranodales Wachstum oder einem Durchmesser bis 3 cm mit extranodalem Wachstum
- N2b mehrere tumorpositive Lymphknoten ipsilateral gelegen mit maximalem Durchmesser bis 6 cm ohne extranodales Wachstum
- N2c bi- oder kontralateraler Lymphknotenbefall mit maximalem Durchmesser bis 6 cm ohne extranodales Wachstum
- N3a Metastase in einem einzelnen Lymphknoten mit einem Durchmesser  $> 6$  cm ohne extranodales Wachstum
- N3b Lymphknotenmetastase auf der Seite des Primarius  $> 3$  cm Größe mit extranodalem Wachstum oder multiple ipsilaterale, beidseitige oder kontralaterale Lymphknoten, davon mindestens einer mit extranodalem Wachstum oder solitäre kontralaterale Lymphknotenmetastase bis 3 cm Größe mit extranodalem Wachstum
- MX Fernmetastasen nicht beurteilbar

M0 kein Nachweis von Fernmetastasierung

M1 Fernmetastasierung [12]

Je nach TNM-Stadium erfolgt die Einteilung in die Stadien I bis IVC nach der *Union of International Cancer Control (UICC)*.

### 1.1.5 Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle und der Vorläuferläsionen

Die Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle basiert zunächst auf dem klinischen Befund. Hier sind insbesondere jegliche Veränderungen der Mundschleimhaut verdächtig, die länger als 14 Tage persistieren. Dabei kann die Ausprägung der Veränderung vielfältig sein und sich in einer abweichenden Farbgebung oder auch Gewebeformation sowie in einer subjektiven Empfindung widerspiegeln.

Während das im initialen Tumorstadium befindliche orale Plattenepithelkarzinom aufgrund der vielfältigen Ausprägungsmöglichkeiten und der oft milden Symptomatik leicht übersehen werden kann, kann es beim fortgeschrittenen Tumorstadium mit infiltrativem Wachstum in die umliegenden Strukturen zu ausgeprägten Beschwerden wie der erschwerten Öffnung des Mundes, Sprach- oder Schluckstörungen sowie Mangelernährung kommen [13, 14].

Die Diagnose von OPMDs oder oralen Plattenepithelkarzinomen kann grundsätzlich auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Obwohl die orale Inspektion für das *Screening* die erste Maßnahme darstellen sollte, ist sie doch alleinig durchgeführt als unsicheres diagnostisches Mittel zu betrachten. Anerkannt als diagnostischer Goldstandard ist hingegen die Entnahme und histopathologische Untersuchung einer Mundschleimhautbiopsie. Dies ist aber nicht für alle Patienten die erste Wahl. Insbesondere chronische Läsionen, sehr ausgedehnte Läsionen oder auch immer wiederkehrende Läsionen können aus Gründen der Patientenführung nicht jedes Mal mittels einer Gewebeentnahme untersucht werden [15, 16].

Die Vorläuferläsionen sowie das initiale Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle können wie oben erwähnt vielfältige klinische Erscheinungsbilder aufweisen, dazu zählen beispielsweise eine Verhornungstendenz (Leukoplakie), der flächige Verlust der

Oberflächenintegrität (Erythroplakie) oder eine Erosionsneigung sowie eine Ulzeration oder Atrophie. Diese klinischen Zeichen sind allerdings auch -und in der absoluten Anzahl sicher häufiger- bei gutartigen Läsionen, zum Beispiel verschiedenen Formen der Entzündungen oder Verhornungsstörungen, anzutreffen.

Aufgrund dieser Vielfältigkeit der makroskopischen Darstellung besteht die initiale Diagnostik aus der Inspektion sowie der Palpation. Dies ist in einem regelmäßigen Abstand von 6 Monaten empfohlen und wird üblicherweise durch Zahn- und Hals-Nasen-Ohren-Ärzte oder Allgemeinmediziner durchgeführt. Diese Empfehlung gilt bei einer insgesamt niedrigen Inzidenz von oralen Plattenepithelkarzinomen in der Gesamtbevölkerung der westlichen Industrieländer für Risikopatienten, bei welchen anlassbezogen eine sogenannte opportunistische *Screening*-Untersuchung erfolgen sollte [17-20].

Für ein generelles *Screening* mittels minimalinvasiver Bürstenzytologie bei Risikopatienten ohne makroskopisch sichtbare Läsion der Mundschleimhaut gibt es im Gegensatz zur routinemäßigen Inspektion der Mundhöhle bisher keine evidenzbasierten Aussagen bezüglich der Mortalität [21, 22].

Die Inspektion und Dokumentation der makroskopisch sichtbaren Befunde sollte dabei systematisch beispielsweise anhand einer Mundlandkarte der *World Health Organization* (WHO) erfolgen [23]. Außerdem wird in diesem diagnostischen Schritt eine erste kritische Begutachtung möglicher Ursachen der Mundschleimhautveränderung vorgenommen, wie zum Beispiel eine mechanische oder entzündliche Genese. Obligat sind ebenso die Erhebung des Lymphknotenstatus sowie die Sensibilitätsprüfung der Nervi lingualis und mentalis.

Besteht der Verdacht auf eine inflammatorische oder mechanische Genese der Mundschleimhautveränderung, so kann ein erster Therapieversuch beispielsweise mit Cortison oder Antibiotika erfolgen. Sofern es zu einem Ansprechen der Therapie kommt, stellt dies auch ein diagnostisches Mittel zur Abgrenzung gegenüber malignen Neoplasien dar. Allerdings ist dann eine vollständige Rückbildung der Läsion innerhalb von 14 Tagen notwendig. Kommt es zu einer nur teilweisen Rückbildung, muss weiterhin von einem potenziell malignen Befund ausgegangen werden [20].

Die weiterführende Diagnostik bei dem Verdacht auf eine Vorstufe oder ein bereits bestehendes orales Plattenepithelkarzinom umfasst die zytologische oder histologische Untersuchung gewonnenen Probenmaterials. Als minimalinvasive Methode ist hier

zunächst die Bürstenbiopsie zu nennen, durch welche im Gegensatz zur Probenentnahme mithilfe eines Watteträgers besser mindestens mittlere und tiefe Zellschichten zur weiterführenden zytologischen Diagnostik gewonnen werden können. Diese ist auch dann Mittel der Wahl, wenn bei fehlender Indikation zur Biopsie eine Verlaufskontrolle des Befundes vorgesehen ist [14, 20].

Die durch die Bürstenzytologie gewonnenen Zellen können entweder konventionell auf dem Objektträger fixiert oder flüssigkeitsbasiert verarbeitet werden.

Im Rahmen der konventionellen Zytologie wird das gewonnene Zellmaterial unmittelbar mit der Bürste auf den Objektträger aufgetragen, anschließend alkoholisch fixiert, gefärbt und dann zytologisch unter dem Mikroskop untersucht. Die flüssigkeitsbasierte Methode hat neben einer optimalen Fixation das Ziel, „verunreinigende“ Bestandteile wie Blut- oder Zelldetritus durch geeignete Filtration oder Dichtegradientenzentrifugation zu eliminieren und dadurch die Präparatequalität zu verbessern. Dazu wird die Bürste nach dem Abstreichen der Mundschleimhautläsion in ein Konservierungsmedium getaucht und ausgeschüttelt. Vom zellhaltigen Medium werden entweder standardisiert mittels Automaten (zum Beispiel *ThinPrep Pap Test*) oder durch Zytozentrifugation zelltragende Objektträger hergestellt, gefärbt und ebenfalls unter dem Mikroskop zytologisch untersucht [24]. Die Treffsicherheit der zytologischen Abklärung mittels Bürstenabstrich sichtbarer Mundschleimhautläsionen für die orale epitheliale Dysplasie (alle Grade) und Plattenepithelkarzinome ist nach Angaben aus einer Cochrane-Metaanalyse mit einer Sensitivität von 91% und einer Spezifität von 94% sehr gut [25].

Neben der konventionellen zytologischen Diagnostik der gewonnenen Zellen besteht die Möglichkeit der quantitativen Untersuchung des DNA-Gehalts der Zellen mittels DNA-Bildzytometrie. Diese Methode, welche im Folgenden in einem separaten Abschnitt näher beschrieben wird, ist aber bisher noch kein fester Bestandteil der Leitlinien bei noch unzureichender Evidenz [14, 16, 20] und nur geringer Verbreitung.

Es existieren zahlreiche weitere Methoden zur Untersuchung von sichtbaren OPMDs, wie beispielsweise die Untersuchung einer Läsion mittels Fluoreszenzlicht, welches in die Mundhöhle gestrahlt gezielt maligne entartete Bereiche der Mundschleimhaut darstellt, oder Vitalfärbungen mittels Toluidin-Blau, welches in der Mundhöhle aufgetragen wird und ebenfalls maligne entartete Zellen markieren soll. Auch eine Kombination der

Methoden ist denkbar und wurde untersucht. In verschiedenen Studien wurden dabei die Sensitivität und Spezifität der Untersuchung mittels Fluoreszenzlicht und Vitalfärbung sehr unterschiedlich bewertet, was weitere Studien zu einer validen Aussage der diagnostischen Sicherheit notwendig macht [20, 25].

Im weiteren Verlauf folgt nach den aktuellen Leitlinienempfehlungen bei dem Verdacht auf das Vorliegen eines oralen Plattenepithelkarzinoms die Entnahme einer Biopsie zur histopathologischen Diagnosestellung. Insbesondere bei inhomogenen Befunden kann auch eine totale Exzision des Befundes diskutiert werden, um repräsentatives Material für die histologische Untersuchung zu gewinnen. Bei ausgedehntem klinischem Befund mit dem Risiko einer perioperativen Morbidität bei der diagnostischen Exzision sollten entweder mehrfache simultane Biopsien oder alternativ eine flächige Bürstenzytologie erfolgen [14].

Eine frühe Diagnose und eine in der Folge frühe Therapie verbessern die Prognose des oralen Plattenepithelkarzinoms, weshalb die frühe Diagnose von enormer Wichtigkeit ist [26].

Dabei zeigen sich beispielsweise bezüglich des 5-Jahres-Gesamtüberlebens eine Rate von 84% bei Therapieeinleitung im T1-Stadium im Gegensatz zu 55% im T4-Stadium. Das krankheitsspezifische 5-Jahres-Überleben weist sogar eine Rate von 91% bei Therapieeinleitung im T1-Stadium im Gegensatz zu 64% im T4-Stadium auf. Betrachtet man den regionären Lymphknotenbefall bei Erstdiagnose, dann liegt das 5-Jahres-Gesamtüberleben im N0-Stadium bei 80%, im N3-Stadium bei 24%. Das krankheitsspezifische Überleben über 5 Jahre liegt im N0-Stadium bei 89%, im N3-Stadium bei 49% [27].

In Studien zeigt sich, dass bereits eine Therapieverzögerung von lediglich 4 Wochen die Prognose der Erkrankung signifikant negativ beeinflussen kann [28].

Nach bestätigter Erstdiagnose des oralen Plattenepithelkarzinoms sollte nach synchronen oder metachronen Zweittumoren gefahndet werden. Hierbei ist ein multilokuläres Tumorleiden weiterer Tumorentitäten neben dem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle mit einem ähnlichen Spektrum von Risikofaktoren wie zum Beispiel Karzinome des Hals-Nasen-Ohren (HNO)-Bereichs, des Ösophagus oder der Lunge in Betracht zu ziehen.

Um dies frühzeitig zu untersuchen, sollte eine fachärztliche Vorstellung beim HNO-Arzt oder Internisten mit beispielsweise weiterführender endoskopischer Diagnostik und Bildgebung erfolgen [29, 30].

Um das T-Stadium, also die lokale Ausdehnung des Primärtumors, insbesondere eine prognostisch ungünstige Knocheninvasion, zu bestimmen, ist eine bildmorphologische Untersuchung mittels Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) empfohlen [31-34]. Vor einer Therapieempfehlung erfolgt außerdem obligat die zahnärztliche Panoramaschichtaufnahme [14, 35].

Lymphknotenmetastasen werden mittels CT oder MRT von Schädelbasis bis oberer Thoraxapertur nachgewiesen, ebenso können die ultraschallgesteuerte Feinnadelbiopsie sowie die <sup>18</sup>F-Fluorodesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Diagnostik tumorös befallener Lymphknoten verwendet werden [14, 36-38].

Zum Ausschluss einer Fernmetastasierung sollten eine Computertomographie des Thorax, zumindest beim fortgeschrittenen Befund, sowie eine Abdomensonographie durchgeführt werden [39]. Die Fernmetastasierung betrifft dabei häufig Lunge, Leber und Skelett.

### 1.1.6 Therapie des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle sowie der Vorläuferläsionen

Die Therapie der Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms besteht entweder aus einer Laserablation oder einer chirurgischen Exzision der Läsion. Bei ersterer kann keine histologische Beurteilung von Schnitträndern mit der Beantwortung einer vollständigen Exzision oder auch bei hochgradiger oraler Dysplasie der Ausschluss eines fokal bereits invasiven Tumors erfolgen. Letztlich ist aber die Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms nach der Behandlung nicht mit Sicherheit auszuschließen, da neben einer unvollständigen Resektion zum Beispiel auch ein genetischer Feldeffekt vorliegen kann, der das Ausmaß der sichtbaren Läsion übersteigt [40, 41].

Die Therapie des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle besteht grundsätzlich aus drei Säulen, nämlich der operativen Resektion, der Strahlen- und der Chemotherapie. Dabei sollte die Festlegung des Therapieschemas für den individuellen Patienten unter

Berücksichtigung der Lage und Größe des Primärtumors, des Allgemeinzustandes des Patienten, der voraussichtlichen Morbidität sowie des voraussichtlichen Therapieerfolges interdisziplinär im Rahmen eines *Tumorboards* mit den Fachrichtungen der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, der Strahlentherapie, Onkologie, Radiologie und Pathologie festgelegt werden [14]. Die einzelnen Therapieoptionen können je nach Therapiekonzept miteinander kombiniert werden [42].

Lokal begrenzte Tumore im T-Stadium 1-2 können sowohl reseziert als auch strahlentherapeutisch behandelt werden. Beide Therapiealternativen sind hinsichtlich des onkologischen *Outcomes* gleichwertig. Tumore mit einer höheren T-Klassifikationen (T-Stadium 3-4) sollten kombiniert strahlentherapeutisch und chirurgisch behandelt werden [43, 44].

Im Falle lokal fortgeschrittener, inoperabler und nicht fernmetastasierter Befunde ist eine primäre Radiochemotherapie mit angezeigt. Alternativ hierzu kann auch eine Kombination mit dem chimären monoklonalen IgG1 (Immunglobulin G 1)-Antikörper erfolgen [42, 45, 46].

Unheilbare Befunde können mit Pembrolizumab als Mono-Therapie behandelt werden, sofern es sich um PD-L1 (*Programmed cell death 1 Ligand 1*) exprimierende Tumore handelt. Ist dies nicht der Fall, ist eine Cetuximab-Therapie empfohlen, gegebenenfalls auch in Kombination mit einem Platin oder 5-Fluoruracil [14].

Elektiv kann zusätzlich unabhängig vom T-Stadium eine *Neck-Dissection* erfolgen aufgrund einer okkulten Lymphknoten-Metastasenrate von 20 bis 40% bei präoperativem cN0-Status[42, 47].

In fortgeschrittenen Stadien bei nicht kurativ zu therapierendem lokoregionärem Wachstum, Fernmetastasierung oder Einstufung des Patienten als nicht therapiefähig bei insgesamt schlechtem Allgemeinzustand erfolgt eine palliative Therapie.

## 1.2 Die Fanconi-Anämie

### 1.2.1 Genetik

Bei der Fanconi-Anämie handelt es sich um eine erbliche, meist autosomal rezessive (Ausnahmen: FANCB (*Fanconi anemia complementation group B*) ist x-chromosomal gebunden und FANCR ist autosomal dominant) Erkrankung, die erstmals 1927 vom Schweizer Pädiater Guido Fanconi beschrieben wurde [48]. Diese ist durch ein sehr heterogenes phänotypisches Erscheinungsbild charakterisiert. In den meisten Fällen kommt es insbesondere zu einer hämatologischen Ausprägung der Erkrankung. Darüber hinaus werden bei betroffenen Patientinnen und Patienten gehäuft solide Tumore detektiert. Zu Grunde liegt eine biallelische Genmutation mindestens eines der Proteine des sogenannten Fanconi-Anämie-Genreparaturwegs. Die zugrunde liegenden Mutationen betreffen Gene der DNA-Reparatur, insbesondere von DNA-Quervernetzungen. DNA-Quervernetzungen hemmen durch die kovalente Verbindung zweier DNA-Stränge wesentliche zelluläre Prozesse der DNA-Replikation und Transkription. Die DNA-Reparatur erfolgt beispielsweise durch homologe Rekombination und die Koordinierung der DNA-Replikation, wobei die korrekte Chromosomenteilung während der Zellteilung das Ziel ist. Der Kernpunkt des Fanconi-Anämie-Reparaturweges ist die Monoubiquitinierung von FANCI und FANCD2, welche zu einer erleichterten Reparatur der DNA führt [49, 50]. Kommt es hier zu Fehlern, resultiert dies in einer genomischen Instabilität, die zum Zellzyklusstillstand führt oder eine Dysfunktion der Kontrollpunkte innerhalb des Zellzyklus bewirkt [8]. Aufgrund der Fehlfunktion entstehen vermehrt Chromosomenbrüche [51]. Bisher sind 23 Fanconi-Gene identifiziert, nämlich FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1 (BRCA2 (*Breast Cancer Gene 2*)), FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCI (BRIP1), FANCL, FANCM, FANCN (PALB2 (*partner an localizer of BRCA2*)), FANCO (RAD51C (*RAD51homologC*)), FANCP (SLX4 (*structure-specific endonuclease subunit*)), FANCQ (ERCC4 (*excision repair cross-complementation group 4*)), FANCR (RAD51), FANCS (BRCA1), FANCT (UBE2T (*ubiquitin-conjugating enzyme E2T*)), FANCU (XRCC2 (*X-ray repair cross complementing 2*)), FANCV (REV7), FANCW (RFWD 3 (*ring finger and WD Repeat Domain 3*)) und FANCY (FAAP100 (*fanconi*

*anemia core complex associated protein100*)), die von einer Mutation betroffen sein können [8, 52-55].

## 1.2.2 Klinik

Die Fanconi-Anämie kann zu kongenitalen Fehlbildungen sowie zur progressiven Panzytopenie mit Knochenmarksinsuffizienz führen und bildet sowohl für hämatologische Erkrankungen als auch für solide Tumorentitäten eine Prädisposition [56]. Das klinische Erscheinungsbild der Fanconi-Anämie zeigt sich vielfältig.

Von kongenitalen Fehlbildungen kann nahezu jedes Organsystem betroffen sein. Hierzu zählen Sinnesorgane, wie Auge, Ohr oder Haut, skelettale Deformitäten, Fehlbildungen des Urogenital- oder Gastrointestinaltraktes sowie kardiopulmonale oder zentralnervöse Fehlbildungen. Das Auftreten dieser Deformitäten ist jedoch nicht obligat. Liegen keine offensichtlichen Fehlbildungen vor, wird die Diagnose häufig erst dann gestellt, wenn hämatologische Dysfunktionen auftreten, was aber ebenfalls nicht obligat ist [56]. Diese können in vielfältigen Ausprägungen auftreten und reichen von leichten asymptomatischen Zytopenien bis hin zu einer schweren aplastischen Anämie, einem myelodysplastischen Syndrom oder einer akuten myeloischen Leukämie [56]. Eine Makrozytose als Anzeichen einer Knochenmarksdysplasie tritt bei über 90% der Fanconi-Anämie Patienten bereits im frühen Lebensalter auf. Dennoch bleibt die Diagnose häufig erschwert aufgrund der multiplen möglichen Ursachen einer Makrozytose. Daher beinhaltet die Definition der Knochenmarksinsuffizienz, dass die Zytopenie anhaltend besteht und nicht auf einer zu therapierenden sekundären Genese wie beispielsweise einem Folsäure- oder Vitamin B12-Mangel basiert. Der Schweregrad der Knochenmarksinsuffizienz wird anhand des Ausmaßes der Zytopenien in 3 Kategorien eingeteilt, welche unterschiedliche Therapieoptionen vorsehen:

Eine milde Knochenmarksinsuffizienz besteht bei einer absoluten Neutrophilenzahl von weniger als 1500/Kubikmillimeter ( $\text{mm}^3$ ), einer Thrombozytenzahl von 150.000 bis minimal 50.000/ $\text{mm}^3$  sowie einem Hämoglobinwert von  $\geq 8$  Gramm/Deziliter (g/dl). Die moderate Knochenmarksinsuffizienz ist definiert mit einer absoluten Neutrophilenzahl von weniger als 1000/ $\text{mm}^3$ , einer Thrombozytenzahl von weniger als 50.000/ $\text{mm}^3$  sowie einem Hämoglobinwert von weniger als 8 g/dl. Eine schwere Knochenmarksinsuffizienz liegt vor, wenn der Wert der absoluten Neutrophilen weniger als 500/ $\text{mm}^3$  beträgt, die

Thrombozytenanzahl bei weniger als  $30.000/\text{mm}^3$  liegt und der Hämoglobinwert weniger als 8 g/dl beträgt [50]. Während die hämatologischen Ausprägungen der Erkrankung häufig im frühen Kindesalter auftreten und oft letztlich mittels einer Stammzelltransplantation gut behandelt werden können, treten die soliden Krebserkrankungen häufiger im frühen Erwachsenenalter auf [57].

Zudem ist bei an Fanconi-Anämie erkrankten Patientinnen und Patienten das Risiko für solide Tumorentitäten gegenüber der Normalbevölkerung stark erhöht. Neben den Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle sowie der anogenitalen Region (siehe unten) ist auch die Inzidenz einiger weiterer Tumorentitäten erhöht. Hierzu zählen insbesondere Gehirntumore sowie maligne Neoplasien der Leber, der Niere und der Speiseröhre [50]. Weiterhin kann es zu endokrinen Störungen kommen, insbesondere den Glukose- Insulin-Haushalt des Körpers betreffend [51]. Hier werden häufig ein Diabetes mellitus oder eine gestörte Glucosetoleranz diagnostiziert [58].

Bei etwa 75 Prozent der Patienten fallen zusätzlich Abweichungen der Norm bei Körpergröße, Gewicht oder Kopfumfang auf, die sich in retardiertem Wachstum, geringem oder erhöhtem Körpergewicht und Mikrozephalie äußern [51, 56]. Außerdem kann es zu primär benignen Hautanomalien wie einer Hyper- oder Hypopigmentierung der Haut, welche sich teils auch überlagern, oder der Bildung schmerzhafter Papeln im Rahmen des *Sweet*-Syndroms kommen [56, 59, 60].

### 1.2.3 Risiko für orale Plattenepithelkarzinome

Patientinnen und Patienten, die von einer Fanconi-Anämie betroffen sind, haben ein deutlich erhöhtes Risiko, eine hämatologische, hämato-onkologische Erkrankung oder einen soliden Tumor zu entwickeln. Zu den soliden Tumoren zählen hier insbesondere Plattenepithelkarzinome des Kopfes und des Halses, der anogenitalen Region sowie der Haut [61]. Dabei erhöht die Grunderkrankung allein die kumulative Inzidenz von Tumoren des Kopfes und Halses um das 500-fache im Vergleich mit der *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Population* [61]. Teils wird für Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs sogar ein 500 bis 700-fach erhöhtes Risiko beschrieben bei einer kumulativen Inzidenz solider Tumormanifestationen von 28% bis zum 40. Lebensjahr [62]. Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses können dabei die Schleimhäute der oberen Atemwege, der Mundhöhle, des Oropharynx, des Nasopharynx, des Hypopharynx

und des Larynx betreffen [63], wobei der Anteil der oralen Plattenepithelkarzinome etwa zwei Drittel beträgt [64].

Aufgrund der extremen Häufung oraler Karzinome und des häufig auch multilokulären Befalls bei Fanconi-Anämie-Patienten vergesellschaftet mit hämatologischen Erkrankungen, welche teils durch Thrombozytopenie und Leukopenie zusätzlich ein erhöhtes Blutungs- und Infektionsrisiko aufweisen, hat das manifeste Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle bei eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten im Vergleich mit der Normalbevölkerung eine besonders schlechte Prognose [62]. Therapeutisch kommt vor allem eine operative Resektion in Betracht, da zum Beispiel konventionelle radioonkologische Therapieregimes aufgrund der durch den Gendefekt im DNA-Reparaturweg begründeten Strahlenüberempfindlichkeit nicht zur Anwendung gelangen können. Einer Erkennung der Vorläuferläsionen, welche dem oralen Plattenepithelkarzinom bei Fanconi-Anämie regelhaft vorausgehen [23], kommt daher größte Bedeutung zu.

Da die Vorläuferläsionen im Mund gut der Inspektion und weiteren Probeentnahme, zum Beispiel mittels oralem Bürstenabstrich, zugänglich sind, kann hier ein opportunistisches *Screening* durchgeführt werden. Zu den Vorläuferläsionen zählen dabei die Leukoplakie, Erythroplakie sowie die Erythroleukoplakie.

Hierbei werden sichtbare orale Läsionen der Fanconi-Anämie Patientinnen und Patienten anlassbezogen mittels Bürste abgestrichen. Velleuer et al. führten in einer großen, im Jahr 2020 publizierten prospektiven Studie ein opportunistisches *Screening* durch [23]. Zunächst erfolgte die standardisierte Inspektion der Mundhöhle anhand eines Protokolls der WHO bezüglich des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle [65]. Die sichtbaren Läsionen wurden sodann auf einer Mundlandkarte dokumentiert. Außerdem erfolgte die fotografische Abbildung jeder inspizierten Läsion, um auch die digitale Dokumentation zu gewährleisten. Die so dokumentierten Läsionen wurden mittels einer Bürste abgestrichen. Das gewonnene Zellmaterial wurde teils konventionell, teils flüssigkeitsbasiert (oder auch beides) auf Objektträger aufgetragen, um der zytologischen Diagnostik und teils auch der Ploidie-Diagnostik mittels DNA-Bildzytometrie zugeführt zu werden. DNA-bildzytometrisch untersucht wurden insbesondere die zytologisch atypischen oder zumindest verdächtigen Befunde, ganz vereinzelt auch zytologisch negative Befunde,

wenn klinisch dennoch der Verdacht auf eine unmittelbare Vorläuferläsion eines oralen Plattenepithelkarzinoms bestand.

Insbesondere die Kombination von zytologischer und Ploidie-Diagnostik bewies eine sehr gute Treffsicherheit mit einem negativen prädiktiven Wert und einer Sensitivität von 100%. Die Spezifität lag bei 92,2%. Eine Übersicht der zytologischen Befundkategorien befindet sich im Abschnitt „Material und Methoden“.

## 1.3 Ploidie-Diagnostik mittels DNA-Bildzytometrie

### 1.3.1 Prinzip

Eine diagnostische Methode zur Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts stellt die DNA-Bildzytometrie dar. Sie kann grundsätzlich an Zellen aus zytologischen Untersuchungsmaterialien aber auch an Zellen aus Geweben vorgenommen werden. Für die Analyse von Geweben werden die enthaltenen Zellkerne enzymatisch vereinzelt. In beiden Fällen ist es erforderlich, dass zur bildanalytischen Bestimmung des DNA-Gehaltes einer Zelle und von Zellpopulationen jeweils ganze, ungeschnittene Zellkerne vorliegen. Das ist bei zytologischen Untersuchungsmaterialien wie Feinnadelpunktaten oder auch Bürstenabstrichen unterschiedlicher Organsysteme regelhaft der Fall. Für paraffineingebettete Gewebeproben werden vorab circa 70 Mikrometer dicke Schnitte für die Zellvereinzellung hergestellt. Bürstenabstriche der Mundschleimhaut sind sehr gut als Ausgangsmaterial für eine manuelle, interaktive DNA-Bildzytometrie geeignet. Diese kann bei unklaren zytologischen Befunden (siehe Abschnitt „Material und Methoden“) zusätzlich zur Abklärung eingesetzt werden. Automatisierte Verfahren, wie auch in der vorliegenden Arbeit untersucht, bieten möglicherweise darüber hinaus aufgrund der kürzeren Bearbeitungszeit für das Personal die Möglichkeit, dass jeder zytologische Mundschleimhautabstrich untersucht werden kann.

Die Analyse von DNA-Ploidie mittels DNA-Bildzytometrie basiert auf der Annahme, dass die chromosomale Aneuploidie einen Marker für neoplastische Transformationen darstellt [66].

Chromosomale Aneuploidie im Allgemeinen bedeutet die numerische oder strukturelle Abweichung vom normalen Chromosomensatz. Alle numerischen Aberrationen, egal ob

Zugewinne chromosomaler Abschnitte oder Verluste, resultieren in einer Veränderung des numerischen DNA-Gehaltes. DNA-Aneuploidie ist also die zytometrisch darstellbare Veränderung des DNA-Gehaltes beim Vorliegen einer numerischen chromosomalen Aneuploidie. Rein strukturelle chromosomale Aneuploidie, z.B. bei Translokationen, ist hingegen DNA-zytometrisch nicht abbildbar. Da die meisten Tumore numerische chromosomale Aberrationen aufweisen, kann deren indirekter Nachweis durch DNA-Aneuploidie als diagnostisches Mittel zur Bestimmung der Malignität dienen [67, 68].

Ein von chromosomalen Veränderungen bei maligner Transformation abzugrenzendes Phänomen ist die gegebenenfalls repetitive Verdopplung ganzer Chromosomensätze im Rahmen zum Beispiel entzündlicher, regenerativer oder auch physiologischer Prozesse wie Differenzierungsprozesse oder funktionelle Adaptation [69]. Diese physiologische zytogenetische Abweichung vom diploiden Chromosomensatz wird als euploide Polyploidisierung bezeichnet und hat ebenso ein DNA-bildzytometrisches Äquivalent (euploide DNA-Polyploidisierung), welches sich im Rahmen der Messungen von der DNA-Aneuploidie durch entsprechende Definition abgrenzen lässt (siehe „Auswertung und Bedeutung für den zytologischen diagnostischen Prozess“).

Verschiedene Faktoren können Einfluss nehmen auf Größe und Anzahl der Chromatiden und somit auf den DNA-Gehalt des Zellkerns. Zu nennen sind hier beispielsweise die physiologischen Phasen der DNA-Replikation, aber auch Prozesse im Rahmen viraler Infektionen, Mangelerscheinungen wie beispielsweise ein Vitamin B12-Mangel oder die Auswirkungen zytostatischer oder strahlenbasierter Therapie, die zur euploiden Polyploidisierung führen können [66]. Hat eine Zelle malignes Potential, weist sie in den meisten Fällen einen von der Norm abweichenden Chromosomengehalt auf [70]. Die oben genannten Einflussfaktoren müssen jedoch bei der Auswertung einer DNA-bildzytometrischen Messung berücksichtigt werden [66].

Die DNA-Bildzytometrie basiert nicht auf der unmittelbaren Messung des DNA-Gehalts der Zelle, vielmehr wird die DNA im Zellkern zunächst mittels Feulgen-Färbung angefärbt. Die Feulgen-Färbung ist ein histochemisches Verfahren, bei der ein Farbstoff nach Hydrolyse der DNA kovalent gebunden wird. Das heißt, dass die Menge des gebundenen Farbstoffs stöchiometrisch zum DNA-Gehalt eines Zellkerns ist [71]. Im Verlauf wird dann die Integrierte Optische Dichte (*Integrated Optical Density (IOD)*) gemessen, welche letztlich äquivalent zum DNA-Gehalt ist [66]. Die integrierte optische Dichte setzt sich aus der gemessenen Fläche eines Zellkerns und der Intensität der

Färbung zusammen. Der DNA-Gehalt der gemessenen Zellpopulation wird als c-Wert ermittelt („c“ = *content*) und zum Zellgehalt einer normalen diploiden Zellpopulation in der  $G_0/G_1$  (*gap*)-Phase des Zellzyklus (Referenzzellen) in Beziehung gesetzt [66, 72, 73]. Zur Auswertung wird der DNA-Gehalt der gemessenen Analysezellen und Referenzzellen in einem Histogramm gegen die Zellzahl aufgetragen. Die Bestimmung der Referenz- und der Analysezellen sollte innerhalb einer Messung und unter den gleichen Bedingungen erfolgen [73].

Die DNA-Bildzytometrie kann dabei als interaktive manuelle Messung oder als automatisierte Messung erfolgen. Am Funktionsbereich für Cytopathologie des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf stehen für beide Messmethoden entsprechende Gerätschaften zur Verfügung, die *MotiCyte-interactive DNA-Workstation* der Firma Motic für die manuellen Messungen sowie die *MotiCyte-auto* für die automatisierten Messungen. Die interaktive Messung ist Teil der Routine zur Ergänzung der zytologischen Diagnostik in der Krankenversorgung, wohingegen die automatisierte Zytometrie in diesen Aufgabenbereich gerade erst zunehmend einbezogen wird.

Beide Messverfahren erfordern zu Beginn eine Kalibrierung des Geräts. Die Kalibrierung besteht aus dem „Köhlern“, der Anpassung der Lichtintensität sowie dem Weiß- und Schwarzabgleich.

Der Unterschied im weiteren Ablauf der Messung liegt im Wesentlichen in der Aus- und Anwahl der zur Messung geeigneten Zellen. Bei der manuellen Messung wählt der Untersucher die Referenz- und Analysezellen, welche in die Messung mit einfließen sollen, selbstständig per Mausklick am Analysemonitor aus. Hierbei sollten mindestens 30 Referenz- und 100 Analysezellen (sofern vorhanden) angewählt und ausgewertet werden, um eine repräsentative Zellpopulation abzubilden. Da durch die DNA-Bildzytometrie die IOD gemessen wird und nicht der DNA-Gehalt selbst, müssen Zellen als Referenzzellen ausgewählt werden, die physiologischer Weise einen DNA-Gehalt von  $2c$  aufweisen. Als Analysezellen werden atypische Zellen ausgewählt, deren Kerne durch beispielsweise Vergrößerung oder unregelmäßigen Membranverlauf charakterisiert sind.

Bei der automatisierten Messung erfolgt der Messprozess und damit auch die Anwahl der zu messenden Zellen anhand von Zellklassifikatoren für die Auswahl und Einordnung der Zellen automatisiert. Grundsätzlich sind verschiedene Klassifikatoren für verschiedene

Zellpopulationen einsetzbar, hier wurde der Zellklassifikator für alkoholfixierte Abstriche der plattenepithelialen Mucosa des Mundes oder des Gebärmutterhalses verwendet. Ein Klassifikator basiert auf Tausenden von Zellkernbildern, welche von einem Zytologen klassifiziert wurden. Anhand dieser Zellkernbilder wurde ein KI-Algorithmus (KI-künstliche Intelligenz) trainiert. Es werden so Zellkerne von normalen Mundschleimhautepithelien, abnormen Zellen, Granulozyten, Lymphozyten sowie defokussierten Zellkernen, überlappenden Zellkernen und Artefakten unterschieden. Weiterhin erfolgen Diffraktion, *glare* und *shading* sowie die Fokussierung der Zellen automatisiert, wodurch Referenz- und Analysezellen automatisch gewählt und sodann in die jeweiligen Untergruppen eingeordnet werden.

Der Prozess wird lediglich zu Beginn und zum Abschluss des Messvorgangs durch den Untersucher begleitet. Insbesondere durch die abschließend durchgeführte Überprüfung der korrekten Einordnung der Zellen in die jeweiligen Gruppierungen, wird die Zuverlässigkeit der Messmethode überprüft. Dabei erfordert diese aber keine andauernde Präsenz des Untersuchers, was eine enorme Zeitersparnis und bessere Ressourcenverteilung für den Arbeitsalltag bedeutet.

Die bei beiden zytometrischen Verfahren erfassten Zellen werden in einer Bildgalerie gespeichert und sind dem Untersucher so auch nach der Messung weiterhin zugänglich. Insbesondere bei der automatischen DNA-Bildzytometrie können die Zellen hier abschließend validiert und gegebenenfalls manuell reklassifiziert werden.

### 1.3.2 Auswertung und Bedeutung für den zytologischen diagnostischen Prozess

Im Rahmen der Auswertung der Messung werden DNA-Stammlinien von Zellen gleichen DNA-Gehalts ermittelt. Diese können im normalen, also euploiden, oder abnormalen, also aneuploiden Bereich liegen. Zellen einer Stammlinie können hierbei als ein Zellklon aufgefasst werden. Es lassen sich also klonale Zellpopulationen detektieren.

Mittels der DNA-bildzytometrischen Messung werden zusätzlich die Anzahl der abnormalen Stammlinien, die Polyploidisierung von euploiden und aneuploiden Stammlinien, das Auftreten einzelner Zellen mit besonders hohem DNA-Gehalt sowie die Zellzyklusfraktionen ermittelt [66].

Die Detektion einer DNA-Aneuploidie wird zum Einen definiert als Stammlinienaneuploidie, zum Anderen als Einzelzellaneuploidie. Eine Stammlinienaneuploidie liegt vor, wenn der so genannte Modalwert der Stammlinie in „c“-Werten außerhalb der Toleranzbereiche liegt, die noch von normalen Zellpopulationen stammen können. Als Toleranzbereiche werden die Werte um 2c, 4c und 8c, jeweils +/- 10% gesehen [66, 73]. Stammlinien bei 4c oder 8c et cetera kommen typischerweise bei der euploiden DNA-Polyploidisierung vor. Eine maligne Zellpopulation, deren Stammlinienmodalwert sich innerhalb des 10%-Bereiches um diese Werte befindet, kann also DNA-bildzytometrisch nicht sicher erkannt werden. Als Schwellenwert für eine Einzelzellaneuploidie wird meist ein DNA-Gehalt mindestens eines Zellkernes  $>9c$  gesehen [66, 73]. Selten kommen bei Mundschleimhautläsionen im Rahmen einer euploiden Polyploidisierung DNA-Gehalte  $>9c$  vor, was differentialdiagnostisch zu beachten ist [74]. Eine DNA-Aneuploidie, insbesondere die Stammlinienaneuploidie, ist ein Zeichen einer malignen Transformation der untersuchten Zellen. Dies kann auch für die weitere Abklärung von OPMDs eingesetzt werden [75].

## 1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist der Vergleich verschiedener Modalitäten bei der DNA-bildzytometrischen Messung des DNA-Gehalts klinisch verdächtiger Mundschleimhautläsionen von Fanconi-Anämie-Patienten. Dabei werden sowohl zwei Messarten, die konventionelle manuelle DNA-Bildzytometrie sowie die kürzlich neu entwickelte automatisierte DNA-Bildzytometrie miteinander verglichen, als auch zwei unterschiedliche zytologische Präparationsverfahren, der konventionelle alkoholfixierte Bürstenabstrich und die flüssigkeitsbasierte Zytologie (Dünnschichtpräparate). Von einer Mundschleimhautläsion werden so vier Untersuchungsergebnisse generiert, die hinsichtlich etablierter Messparameter, zum Beispiel Lage/Breite von Stammlinien (peridiploid, peritetraploid, X-ploid, multiploid) und Einzelzellaneuploidie miteinander korreliert werden sollen. Daneben soll die Wertigkeit dieser diagnostischen Modalitäten durch Vergleich mit dem klinischen Verlauf bezüglich der Prädiktion einer malignen Transformation der Mundschleimhautläsionen bestimmt werden. Hierzu wird die diagnostische Treffsicherheit der Ploidiediagnostik anhand klinischer *Follow-up*-Daten bestimmt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Abgrenzung der eigenen Leistung und bisher bereits teilveröffentlichte Ergebnisse

Die Entnahme der Bürstenbiopsien und der primäre Ausstrich auf den Präparaten war bereits im Vorfeld der vorgelegten Arbeit im Rahmen der Studie von Velleuer et al. in enger Zusammenarbeit mit der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. erfolgt [23] und wurde nicht von mir durchgeführt.

Die Färbung der Präparate sowie die mikroskopische zytologische Diagnostik erfolgte durch das Team der medizinisch-technischen Assistentinnen und der Fachärzte für Pathologie des Funktionsbereichs Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf.

Die manuellen DNA-bildzytometrischen Messungen wurden in 23 Fällen durch Frau Dr. med. Natalia Pomjanski, Oberärztin und stellvertretende Leiterin des Funktionsbereichs Cytopathologie, durchgeführt. Frau Dr. med. Pomjanski lernte mich bezüglich der manuellen DNA-Bildzytometrie an, sodass die weiteren 47 Messungen durch meine Person angefertigt werden konnten.

Das automatisierte DNA-bildzytometrische Messverfahren erlernte ich durch Anleitung von Herrn Dr. med. Martin Schramm, Oberarzt am Funktionsbereich Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf. Alle automatisierten Messungen habe ich selber durchgeführt, wurde dabei aber in 10 Fällen von Herrn Dr. (UA) Leonid Berynskyy, DNA-Zytometrie-Techniker am Funktionsbereich Cytopathologie, unterstützt.

Daten zum klinischen *Follow-up* der Fanconi-Anämie Betroffenen erhielt ich von Herrn Ralf Dietrich, Geschäftsführer der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. und von Frau Dr. med. Eunike Velleuer, wissenschaftliche Mitarbeiterin am Funktionsbereich Cytopathologie.

Die Zusammenstellung der erhobenen und erfragten Daten erfolgte durch meine Person anonymisiert in einer Excel-Tabelle, ebenso wie die deskriptive und statistische Auswertung. Bei der Anfertigung der Bland-Altman-Diagramme wurde ich von Isabela Karoline de Santana Almeida Araujo, Statistikerin am Funktionsbereich Cytopathologie, unterstützt.

Teilergebnisse meiner Daten habe ich im Jahr 2015 bei dem Familientreffen der Deutschen Fanconi-Anämie Hilfe e.V. in Form eines 20-minütigen Vortrags vorgestellt.

Ebenso sind die Ergebnisse einiger weniger Messergebnisse der Jahre 2017 und 2018 in einem sich nach initial zur Veröffentlichung in einer internationalen Fachzeitschrift eingereichten, derzeit in Revision befindlichen Manuskript enthalten. Der Titel des Manuskripts lautet: „Automated DNA ploidy analysis of oral lesions from Fanconi Anemia patients with DNA karyometry“. Bisher ist das Manuskript nicht veröffentlicht.

## 2.2 Patientenkollektiv

Seit Jahren besteht eine enge Zusammenarbeit des Funktionsbereichs Cytopathologie des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf mit dem Deutschen-Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. Aufgrund des deutlich erhöhten Risikos für orale Plattenepithelkarzinome bei Fanconi-Anämie-Patienten klärt der Deutsche-Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. über eine besondere Mundkrebsvorsorge auf. Dabei sollen regelmäßige selbstständige Inspektionen der Mundschleimhaut durch die Betroffenen selbst erfolgen. Bei auch nur geringfügigen Anzeichen für eine Veränderung der Mundschleimhaut sollen sich die Betroffenen bei spezialisierten Ärzten, zum Beispiel Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen, zur weiteren Abklärung vorstellen. Hierbei kann die nicht-invasive Bürstenbiopsie eine *First-Level*-Diagnostik darstellen, bevor bei Tumorverdacht gegebenenfalls eine invasive chirurgische Biopsie vorgenommen wird.

Vor diesem Hintergrund wird seit 2006 eine große prospektive Studie durchgeführt, welche im Jahr 2018 nach einem 12-Jahres-Zeitraum erstmals ausgewertet wurde. Bis dahin konnten Studien- sowie *Follow-up* Daten von insgesamt 737 makroskopisch sichtbaren Mundschleimhaut-Läsionen von Fanconi-Anämie-Betroffenen ausgewertet werden, die mittels minimal-invasiver Bürstenbiopsie zytologisch untersucht worden waren [23].

Die hier eingeschlossenen Patienten wurden im Rahmen von Fanconi-Anämie-Selbsthilfegruppen, über Krankenhäuser oder behandelnde Ärzte über die Studie informiert und dann unabhängig von Alter, Geschlecht oder Herkunft ausgewählt. Einschluss-Kriterium für die Studie war das Vorliegen einer Fanconi-Anämie als Vorerkrankung sowie einer makroskopisch sichtbaren Läsion der Mundschleimhaut. Ausgeschlossen wurden Patienten mit erhöhtem Blutungsrisiko, da für die Anfertigung

einer Bürstenbiopsie besagte Bürste mehrfach über die abzustreichende Läsion gestrichen werden musste [23]. Es erfolgte jeweils eine standardisierte Inspektion der Mundhöhle mit Markierung der Läsionen auf einer Mundhöhlenkarte. Zusätzlich erfolgte die digitale Dokumentation jeder Läsion in Form von Fotos oder Videoaufzeichnungen mittels eines endoskopischen oralen Dokumentationssystems (Karl Storz SE, Tuttlingen). Daraufhin erfolgte ein Bürstenabstrich mit zumindest zehnfacher Rotation der Bürste auf der Läsion, welcher in einem weiteren Schritt entweder flüssigkeitsbasiert oder konventionell nach Alkoholsprayfixation der Zellen auf dem Objektträger weiter verarbeitet wurde [23]. Dies wird im Abschnitt „Zytologische Untersuchung“ weiter beschrieben.

In der hier vorliegenden, methodisch geprägten Arbeit wurden zum Vergleich der Messergebnisse an diesen beiden unterschiedlichen Präparationsmethoden mittels manueller und automatisierter DNA-Bildzytometrie letztlich insgesamt 35 Mundschleimhautläsionen der vorgenannten Studie aus den Jahren 2014, 2015, 2017 und 2018 untersucht. Dabei wurden jeweils Paare konventioneller sowie flüssigkeitsbasierter Präparate der gleichen Mundschleimhautläsion verwendet. Bei zwei Läsionen lagen nur jeweils zwei flüssigkeitsbasierte Präparate vor, konventionell alkoholfixierte Objektträger gab es zu diesen zwei Läsionen nicht. Die Präparate wurden jeweils von Fachärzten für Pathologie des Funktionsbereichs Cytopathologie für die Studie ausgewählt, dabei wurden die Präparate danach ausgewählt, dass insgesamt in etwa gleich viele Präparate der jeweiligen zytologischen Diagnosen „positiv“, „negativ“ und „dringend verdächtig“ beziehungsweise „zweifelhaft“ vorlagen. Weitere Auswahlkriterien gab es nicht. Da die Arbeit im Jahr 2014 begonnen wurde, stammen die meisten untersuchten Läsionen aus diesem Jahr, da einige Messungen allerdings aufgrund von beispielsweise zellarmen Präparaten nicht auswertbar waren, wurden später andere Läsionen aus den folgenden Jahren hinzugenommen. Die beiden Läsionen, zu welchen es nur flüssigkeitsbasierte Präparate gibt, stammen aus dem Jahr 2015 und wiesen eine positive sowie eine zweifelhafte zytologische Diagnose auf. Da zum damaligen Zeitpunkt diese zytologischen Diagnosen zu einer in etwa gleichen Aufteilung fehlten, gingen die Läsionen trotz der fehlenden konventionellen Präparation in die Studie mit ein.

Zu jeder einzelnen Mundschleimhautläsion mit Ausnahme der beiden nur mittels flüssigkeitsbasierter Zytologie untersuchten gab es somit insgesamt vier DNA-zytometrischen Messungen. Insgesamt wurden somit letztlich 136 Messungen

vorgenommen. Vier automatisierte Messungen an flüssigkeitsbasierten Präparaten mussten im Nachhinein bei nicht gegebener Auswertbarkeit aufgrund zu geringer Zellzahl und Zelldichte für die Datenauswertung ausgeschlossen werden.

## 2.3 Klinisches Follow-up

Das jeweilige klinische und wo vorhandene histologische *Follow-up* der einzelnen abgestrichenen Läsionen wurde von Ralf Dietrich, Geschäftsführer des Vereins „Deutsche Fanconi-Anämie-Hilfe e.V.“ und Frau Dr. med. Eunike Velleuer, wissenschaftliche Mitarbeiterin des Funktionsbereichs Cytopathologie, eingeholt. Beide leiteten beziehungsweise leiten die Vorsorgestudie, aus der die Präparate der vorliegenden Arbeit stammten und haben die *Follow-up* Daten den Studienunterlagen entnommen beziehungsweise konnten sie bei den Studienteilnehmern erfragen.

Der Referenzstandard für ein positives *Follow-up* war dabei mindestens eine hochgradige orale epitheliale Dysplasie (bzw. ein Carcinoma in situ) oder ein Plattenepithelkarzinom an gleicher Stelle wie mittels Bürstenabstrich untersucht. Ein negatives *Follow-up* ergab keine der vorgenannten Läsionen an gleicher Stelle innerhalb eines mindestens zweijährigen Verlaufs (Definitionen des Referenzstandards vergleiche auch Velleuer et al. 2020 [23]).

Bei 4 Mundschleimhautläsionen gelang es nicht, das *Follow-up* der einzelnen Läsionen in Erfahrung zu bringen.

## 2.4 Methodik des Bürstenabstrichs der Mundschleimhaut

### 2.4.1 Abstrichtechnik, zytologische Präparation und Färbung nach Papanicolaou

Zum Erstellen eines Bürstenabstrichs wurde zunächst die potenziell verdächtige Läsion der Mundschleimhaut aufgesucht. Sodann wurde mit leicht ausgeübtem Druck die Bürste mehrfach (circa 10 Mal in einer Richtung) auf der Läsion gerollt. Die Bürstenabstriche, welche in die vorliegende Arbeit miteingingen, erfolgten mit Cervix-Abstrichbürsten der

Firma Cellpath (CellPath Ltd, Newton, Großbritannien) oder Orcellex-Abstrichbürsten der Firma Rovers (Rovers Medical Devices, Oss, Niederlande) [23].

Um ein konventionelles Präparat zu fertigen, wurde daraufhin die Bürste mit den an ihr haftenden Zellen der untersuchten Läsion unmittelbar auf den Objektträger an 3 bis 4 Stellen durch Drehung der Bürste um circa 180 Grad unter leichtem Vorschieben gestrichen und sofort innerhalb weniger Sekunden mittels alkoholischer Sprayfixation (circa 4 Sprühstöße aus etwa 20 cm Entfernung) fixiert. In einem nächsten Schritt erfolgte dann die Färbung nach Papanicolaou, um eine zytologische Untersuchung zu ermöglichen.

Zur Fertigung eines flüssigkeitsbasierten Präparates wurden die an der Bürste haftenden Zellen nicht unmittelbar auf den Objektträger übertragen, sondern zunächst in eine Flüssigkeit mit meist ethanolhaltigem Fixationsmittel gegeben. Hierdurch konnte eine Vereinzelnung der Zellen sowie ein Auswaschen störender Abstrichbestandteile wie beispielsweise von Blut bewirkt werden. Dieses Verfahren führt dazu, dass die Fixierung der Zellen durch ausreichendes Fixationsmittel eher gewährleistet ist, als bei der doch stark Untersucher-abhängigen Sprayfixation konventioneller Präparate. Für die Präparate der vorliegenden Arbeit wurden *SafePrep* (Medite, Burgdorf) oder *BD SurePath* (BD Biosciences, Heidelberg) Medien verwendet. Ein Aliquot des Mediums wurde mittels einer Zytocentrifuge bei 1800 Umdrehungen/Minute (min) für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einen Objektträger zentrifugiert (Cellspin, I; Tharmac, Wiesbaden) und anschließend an der Luft getrocknet.

Auch bei der flüssigkeitsbasierten Gewinnung der Zytologie folgte im Anschluss die Anfärbung des Präparats nach Papanicolaou.

Die Papanicolaou-Färbung, auch kurz als „Pap-Färbung“ bezeichnet, wurde erstmals 1943 von George Papanicolaou beschrieben und dann später noch mehrfach modifiziert. Ihr Färbeprinzip basiert auf einer mehrfarbigen transparenten Färbung der Zellkerne und restlichen Zellbestandteile, die durch einen versierten Pathologen gut interpretiert werden können [76]. Sie gilt als die Standardfärbung in der konventionellen gynäkologischen und extra-gynäkologischen Zytologie.

Das im Funktionsbereich Cytopathologie verwendete Protokoll ist wie folgt (Tabelle 1):

Arbeits-schritt	Reagenz	Ungefärbte / fixierte Präparate	Bemerkungen
1.	96% Alkohol	2 min	
2.	96% Alkohol	1 min	
3.	70% Alkohol	1 min	
4.	50% Alkohol	1 min	
5.	Aqua dest. (destilliertes Wasser)	1 min	
6.	Hämatoxylin	2 min	
7.	Leitungswasser	3 min	kalt
8.	Leitungswasser	3 min	kalt
9.	Hydroxylamin (NH <sub>2</sub> OH)	1 min	
10.	70% Alkohol	1 min	
11.	80% Alkohol	1 min	
12.	96% Alkohol	1 min	
13.	Orange II2b	2 min	
14.	96% Alkohol	1 min	
15.	96% Alkohol	1 min	
16.	<i>Polychrome 3b</i>	2 min	
17.	96% Alkohol	1 min	
18.	96% Alkohol	1 min	
19.	99,5% Alkohol	2 min	
20.	<i>Tissue clear</i>	1 min	

**Tabelle 1: In der Cytopathologie der Uniklinik Düsseldorf verwendetes Färbeprotokoll nach Papanicolaou**

## 2.4.2 Standardisierung der Präparation bei flüssigkeitsbasierter Zytologie

Nach ersten Auswertungen mit der automatischen DNA-Bildzytometrie stellte sich heraus, dass einige sehr zellarme flüssigkeitsbasierte Präparate trotz zum Teil mehrfacher Mess-Wiederholung nicht gemessen werden konnten. Als Ursache wurden aufeinander folgende zellfreie Gesichtsfelder auf den Zytospinpräparaten nach flüssigkeitsbasierter Präparation und Feulgen Färbung ausgemacht, die dazu führten, dass das automatische DNA-Bildzytometriesystem die Fokusebene verlor und in den hieran anschließend untersuchten Arealen auf dem Objektträger dann keine Zellen mehr detektieren konnte. Dieses wichtige Ergebnis führte dazu, dass die Präparation der Zytospinpräparate der flüssigkeitsbasierten Zytologie im Funktionsbereich Cytopathologie wie folgt standardisiert wurde: Die Probengefäße wurden zunächst gut aufgeschüttelt (auf dem Vortexer) anschließend in ein 15 Milliliter (ml) Spitzröhrchen (*Falcon tube*) übertragen und bei 500 *relative centrifugal force* (x g) und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert (Rotina 56; Hettich, Tuttlingen). Die Menge des Zellpellets wurde mittels optischen Abgleichs anhand eines vorab erstellten Standards in 5 Mikroliter Schritten bestimmt. Anschließend wurde der Überstand bis auf einen Rest von 1ml pro 5 Mikroliter Pelletmenge abpipettiert und in das Einsendegefäß der Probe zurückgegeben. Das Pellet wurde in der Restflüssigkeit erneut aufgeschüttelt. Zytospinpräparate wurden wie oben beschrieben erstellt, wobei pro Objektträger jetzt eine 5 Mikroliter Pellet entsprechende Menge der Probe eingesetzt wurde.

## 2.5 Zytologische Untersuchung

Nach der Anfertigung der Präparate sowie der Färbung nach Papanicolaou erfolgte bei den im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Präparaten die zytologische Untersuchung. Hier wurden die angefärbten Zellen der Mundschleimhaut durch erfahrene Fachärzte für Pathologie des Funktionsbereichs Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf lichtmikroskopisch begutachtet und bewertet. Für konventionelle und flüssigkeitsbasierte Abstriche wurden dabei jeweils gesonderte Diagnosen gestellt, auch wenn die Abstriche von der gleichen Mundschleimhautläsion stammten.

Dabei folgt der Funktionsbereich Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf bei der Bewertung der Präparate der in Deutschland allgemein anerkannten Klassifikation

nach Konsens der Deutschen Gesellschaften für Zytologie und Pathologie zytopathologischen Kriterien und klassifiziert die Ergebnisse gemäß Malignitätswahrscheinlichkeit wie folgt [77, 78]:

- unzureichend (meist keine beurteilbaren Zellen enthalten)
- negativ (Normalbefunde sowie entzündliche und regenerative Veränderungen)
- zweifelhaft (unklare Degeneration und Regeneration, leichte/mittlere Dysplasien)
- dringender Verdacht (schwere Dysplasien, wenige atypische Zellen)
- positiv (Nachweis bösartiger Zellen)

Von Velleuer und Mitarbeiterinnen sowie Mitarbeitern konnten für die Malignitätswahrscheinlichkeit in den einzelnen Diagnosegruppen bereits Daten an Mundschleimhautabstrichen von Fanconi-Anämie Betroffenen erhoben werden [23]: Hiernach ist die Malignitätswahrscheinlichkeit nach einer zytologisch negativen, zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Diagnose 0,4%, 34%, 76% beziehungsweise 100%.

## 2.6 Feulgen-Färbung und Vorbereitung der zytologischen Präparate

Die Feulgen-Färbung wurde erstmals 1924 von Feulgen und Rossenbeck beschrieben [71]. Dabei basiert diese Färbungsmethode auf der Annahme, dass ein stöchiometrischer Zusammenhang zwischen der Menge des gebundenen Farbstoffes und dem DNA-Gehalt (sowie indirekt damit der Chromosomenzahl) einer Zelle besteht. Es muss zudem berücksichtigt werden, dass die Zelle vor der Zellteilung ihren DNA-Gehalt physiologisch verdoppelt.

Die Färbung beruht auf einer chemischen Reaktion, bei welcher nach hydrolytischer Spaltung von Purinbasen von der Deoxyribose durch Salzsäure (HCl) freie Aldehydgruppen an der DNA entstehen.

In einem ersten Schritt werden in einer mild sauren Umgebung Purinbasen von der Deoxyribose gelöst, sodass freie Aldehydgruppen an der DNA entstehen.

Daraufhin erfolgt die Zugabe von Schiff Reagenz. Das im Schiff Reagenz gelöste Parafuchsin bindet an die freien Aldehydgruppen der apurinen DNA und führt allein zu

einer magentafarbenen stöchiometrischen Färbung der in den Zellkernen befindlichen DNA [79]. Mittels dieser Färbung wird ausschließlich DNA färberisch dargestellt.

Vor der Feulgen-Färbung war die Entfernung der Deckgläser der zytologischen Präparate in Xylol erforderlich. Um die Bereiche von besonderer diagnostischer Bedeutung, das heißt die Bereiche, welche suspekta Zellen enthielten, im Nachhinein wieder bestimmen zu können, erfolgte zuvor eine farbliche Markierung auf dem Deckglas und Fotokopie der Objektträger, damit die Markierungen nach erfolgter Feulgen-Färbung wieder übernommen werden konnten. Dies wurde sowohl bei den konventionellen als auch den flüssigkeitsbasierten Präparaten so durchgeführt. Die Färbung selbst wurde von Mitarbeiterinnen des Funktionsbereichs Cytopathologie durchgeführt. Das Färbeprotokoll ist wie folgt (Tabelle 2):

Arbeits-schritte	Reagenz	gefärbte, entdeckelte Präparate	Zellvereinzelnungs- präparate	Bemerkungen
1.	Xylol	15 min		Ab hier: vorgefärbte, entdeckelte Präparate
2.	99,5% Alkohol	5 min		
3.	96% Alkohol	5 min		
4.	10% gep. Formalin	50 min	50 min	Ab hier: ungefärbte Präparate
5.	Aqua dest	10 min	10 min	
6.	Aqua dest	10 min	10 min	
7.	5 N HCl, ca. 27 °C	60 min	60 min	konstante Tempe- ratur einhalten
8.	Aqua dest	2 min	2 min	
9.	Aqua dest	2 min	2 min	
10.	Aqua dest	2 min	2 min	
11.	Schiff's Reagenz	60 min	60 min	
12.	Schwefeldioxid (SO <sub>2</sub> )-Wasser	5 min	5 min	
13.	SO <sub>2</sub> -Wasser	5 min	5 min	
14.	SO <sub>2</sub> -Wasser	5 min	5 min	
15.	Aqua dest	1 min	1 min	
16.	Aqua dest	1 min	1 min	
17.	70% Ethanol	10 min	10 min	
18.	96% Ethanol	10 min	10 min	
19.	99,8% Ethanol	10 min	10 min	
20.	Xylol	15 min	15 min	Präparate nicht länger als 30 min im Xylol stehen lassen
21-	Präparate aus dem Xylol direkt mit Entellan eindecken			

**Tabelle 2: In der Cytopathologie der Uniklinik Düsseldorf verwendetes Färbeprotokoll der Feulgen-Färbung**

## 2.7 DNA-Bildzytometrie

Die DNA-Bildzytometrie dient der Bestimmung des DNA-Gehalts einer Zelle. Da dieser DNA-bildzytometrisch nicht unmittelbar gemessen werden kann, erfolgt nach der Feulgen-Färbung des Präparates die Messung der IOD, welche durch die DNA-Bildzytometrie erfasst werden kann und als stöchiometrisches Äquivalent zum DNA-Gehalt der Zelle gilt.

Die Messung der DNA-Gehalte einer zytologisch suspekten Population von Zellen kann durch Vergleich mit im Untersuchungsmaterial enthaltenen sicher gutartigen Zellen, von denen der regelrechte diploide Chromosomensatz bekannt ist (DNA-Gehalt  $2c$ ), zur Malignitätsdiagnostik eingesetzt werden. Das zugrunde liegende Prinzip ist bereits im Kapitel Einleitung beschrieben.

Für die DNA-bildzytometrischen Messungen der vorliegenden Arbeit wurden die manuellen DNA-bildzytometrischen Messungen mit einer *MotiCyte-interactive DNA-Workstation* (Motic Group Co. Ltd., Xiamen, China) erhoben, die automatisierten Messungen erfolgten mit einem *MotiCyte-auto System* (Motic Group Co. Ltd., Xiamen, China). Beide Geräte nutzten eine Software, welche Korrekturalgorithmen für optische Effekte wie Schattierungen (*shading*) und Blendlicht (*glare*) enthält. Die Geräte sowie auch die Durchführung und Interpretation der Messungen berücksichtigen Vorgaben zur Messmethodik, standardisierten Befundung und Qualitätssicherung der *European Society for Analytical Cellular Pathology* (ESACP) [66, 73, 80, 81].

### 2.7.1 Durchführung der manuellen DNA-Bildzytometrie

Die verwendete *MotiCyte DNA workstation* besteht aus einem Mikroskop (Motic BA400) mit 40x Objektiv, einer 12bit Farb-CCD Kamera (Moticam Pro 285A 12) und einem Computer mit spezieller Analyse-Software (*MotiCyte-DNA image cytometry software*). Bilder von im Strahlengang des Mikroskops liegenden Zellen werden so auf den Bildschirm des Computers übertragen. Es sind nach Feulgen-Färbung nur die Zellkerne sichtbar, da lediglich sie DNA enthalten. RNA (Ribonukleinsäure) bleibt ungefärbt. Durch Anklicken eines Zellkerns mit der Computermaus wird von der Analysesoftware eine Maske um die Kernkonturen gelegt und die integrierte optische Dichte (IOD - Maß aus Fläche des Zellkerns und der Intensität der Färbung) gemessen.

Da die gemessene IOD dem DNA-Gehalt der Zelle nicht identisch, sondern lediglich äquivalent ist, ist der Vergleich zu Zellen mit einem physiologischen DNA-Gehalt von  $2c$ , so genannten Referenzzellen, notwendig. Ein DNA-Gehalt von  $2c$  entspricht einem diploiden Chromosomensatz, wie er bei vielen bekannten menschlichen Zellen physiologisch ist, zum Beispiel bei normalen Keratinozyten der Mundschleimhaut oder auch neutrophilen Granulozyten. Beide Zellgruppen wurden im Rahmen dieser Arbeit als Referenzzellen gewertet, wobei in der Mehrheit der Fälle normale Keratinozyten ausgewählt wurden. In einer manuellen DNA-bildzytometrischen Messung wurden bei den hier untersuchten Fällen je mindestens 30 Referenz- und etwa 300 Analysezellen gemessen, sofern vorhanden.

Vor Beginn des Messvorgangs wird zunächst das Mikroskop kalibriert. Hierbei werden die optischen Eigenschaften des Mikroskops durch „Köhlern“ (Einstellen des Kondensors, der Kondensorblende und der Leuchtfeldblende) optimal eingestellt, die Intensität der Lichtquelle an den Untersucher angepasst und anschließend ein Weißabgleich in einem azellulären Bereich des Präparats und ein Schwarzabgleich durch Schließen des Strahlteilers durchgeführt.

Daraufhin wird der Bereich durchfokussiert, in welchem Zellkerne gemessen werden sollen.

Die zu messenden Bereiche des Präparats werden durch Übertragen der fotokopierten Markierungen des Originalpräparates auf das nach Feulgen umgefärbte Präparat mit einem Filzschreiber festgelegt und Stück für Stück durchgemustert. Dabei kann der anvisierte Bereich sowohl unmittelbar durch das Objektiv als auch parallel im angeschlossenen Bildschirm, welcher wiederum über die 12-bit CCD-Kamera des Mikroskops das Signal erhält, begutachtet werden. Es werden Referenzzellen markiert und atypische Zellen mit Kernatypien wie Vergrößerung, Hyperchromasie, Nukleolen, vergrößerter Chromatinstruktur oder unregelmäßigem Kernmembranverlauf als Analysezelle markiert. Auch eine irreguläre, organuntypische Lagerung von Zellkerngruppen kann suspekt sein.

Nach Anwählen einer einzelnen Zelle kann eine Funktionsmaske („freeze frame“) zur Optimierung der Zellerfassung aufgerufen werden. Hier kann beispielsweise die vom System nach Anklicken des Kerns automatisch erfasste Kernkontur („Maske“) der Zelle angepasst oder korrigiert werden, ebenso können im Falle von mehreren in einer Maske erfassten Zellen diese manuell voneinander getrennt werden. Zellkerne sollten möglichst überlagerungsfrei gemessen werden.

Alle ausgewählten Zellen werden in einer Bildgalerie, der sogenannten *Image Gallery*, aufgeführt, wo sie auch nach der Messung noch begutachtet und überarbeitet werden können. Dies schließt zum Beispiel das manuelle Trennen von mehreren in einer Maske erfassten Zellen, die Optimierung der Maske anhand der Kernkontur sowie gegebenenfalls die Reklassifikation der gemessenen Zellkerne ein.

Zudem erfolgt durch die Software die Auftragung der gemessenen Zellkerne in einem Histogramm sowie Streudiagramm, welches je nach Einstellung als Balken- oder Kurvenhistogramm aufgeführt wird.

Vor Auswertung des Histogramms ist neben dem Variationskoeffizienten (CV) der gemessenen IODs der Referenzzellen, der unter 5% liegen muss, auch auf den Korrelationskoeffizienten zu achten (CC). Dieser beschreibt die Korrelation der integrierten optischen Dichte mit der Fläche der gemessenen Referenzzellen und muss unter +/- 0,4 liegen [66].

Bei der Auswertung können sogenannte Stammlinien von Zellen ähnlichen DNA-Gehalts im Histogramm detektiert werden sowie auch Einzelzellen mit abnorm hohen DNA-Gehalten. Dies wird im Abschnitt „Definition von DNA-Aneuploidie als relevantem diagnostischen Messparameter“ näher beschrieben.

Am Ende der Messung wird ein Messbericht erstellt. Dieser enthält neben dem Histogramm und dem Streudiagramm die Anzahl der Gesamtzellen sowie der Referenz- und Analysezellen, die ermittelten Modalwerte der Stammlinien, CV und CC der Referenzzellen, die Anzahl von Einzelzellen mit abnorm hohem DNA-Gehalt und letztlich einen Ausschnitt der Bildgalerie mit Darstellung einiger Referenz- und Analysezellen.

### 2.7.2 Durchführung der automatisierten DNA-Bildzytometrie (= DNA-Karyometrie)

Die automatisierte DNA-Bildzytometrie arbeitet nach den gleichen Prinzipien wie die manuelle DNA-Bildzytometrie, allerdings werden die Zellkerne von der Software klassifiziert und zunächst nicht vom Untersucher. Dies geht über die bloße Messung des DNA-Gehaltes von Zellkernen wie bei der manuellen DNA-Bildzytometrie weit hinaus,

weshalb daher zur Abgrenzung die Methode auch DNA-Karyometrie genannt wird [82]. Das *MotiCyte-auto* umfasst ein motorisiertes Mikroskop, das *Motic BA610* mit 2x Objektiv und 40x Objektiv (numerische Apertur 0,65) sowie einer Kontrolleinheit, welches mit der *MoticamPro 285A* CCD Kamera (Auflösung 1360 x 1024 pixel) verbunden ist. Weiterhin besteht das System aus einem Computer mit einer spezialisierten Software, der *MotiCyte-DNA image cytometry software*. Die Entwicklung des *MotiCyte-auto* ist nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird daher anhand exemplarischer hierzu publizierter Literatur nur kurz angerissen [83, 84].

In der genannten Software sind Zellklassifikatoren für unterschiedliche Präparate/Organe enthalten. In dieser Arbeit wurde der Klassifikator für alkoholfixierte Abstriche der plattenepithelialen Mucosa des Mundes oder des Gebärmutterhalses verwendet.

Die Software enthält Korrekturalgorithmen für Diffraction, *glare* und *shading*. Außerdem ist ein Algorithmus für das Fokussieren der Zellen in den zytologischen Präparationen enthalten. In diesen Präparationen sind die Zellen in einem dickeren Bereich auf dem Objektträger verteilt als in histologischen Schnittpräparaten, weshalb hier erhöhte Anforderungen an das automatische Detektieren von im Fokus abgebildeten Zellen bestehen.

Der Klassifikator basiert auf Tausenden von Zellkernbildern alkoholfixierter und Feulgen-gefärbter Mundschleimhautabstriche, welche von einem Zytologen (Professor Dr. Alfred Böcking) klassifiziert wurden. Die Abstriche stammten sowohl von intakter, also auch von entzündlich veränderter Mundschleimhaut, von Dysplasien als auch von Plattenepithelkarzinomen. Anhand dieser Zellkernbilder wurde ein auf *random forest classifiern* basierender Algorithmus trainiert (Maschinelernen). Der Algorithmus klassifizierte hiernach Zellkerne von normalen Mundschleimhautepithelien, abnormen Zellen, Granulozyten, Lymphozyten sowie defokussierten Zellkernen, überlappenden Zellkernen und Artefakten mit einer Genauigkeit von 90,43% [83]. Das heißt, dass das *MotiCyte-auto* mithilfe des Klassifikators während der Messung unterschiedliche Zelltypen mit guter Treffsicherheit unterscheiden kann.

Auch bei der automatisierten Messung erfolgt die Kalibrierung des Mikroskops sowie der Weiß- und Schwarzlicht-Abgleich, wie oben bereits beschrieben.

Beim Messvorgang erstellt das *MotiCyte-auto* initial in niedriger Vergrößerung (2x Objektiv) eine Übersicht des Präparates. Auf dem hierdurch entstehenden Scan des gesamten Präparates kann folgend der diagnostisch wichtige Bereich, welcher wie oben beschrieben nach der Feulgen-Färbung übernommen wurde, als vom System zu messend

markiert werden. Es werden in dieses Feld manuell Fokuspunkte gesetzt, an welchen sich der Autofokus des Systems zusätzlich orientieren soll.

Sowohl das Auffinden von diagnostisch wichtigen, mittels Filzschreiber auf den Objektträger umfahrenen Bereichen als auch die Fokussierung kann auch vollautomatisch vom *MotiCyte-auto* durchgeführt werden. Es zeigte sich im Verlauf der Arbeit jedoch, dass aufgrund der oft zellarmen Präparate diese Funktion nicht voll genutzt werden konnte.

Zum eigentlichen Messvorgang in den diagnostisch wichtigen Bereichen auf dem Objektträger wechselt das *MotiCyte-auto* auf das 40x Objektiv. Da dies eine nur geringe Tiefenschärfe hat, ist die korrekte Fokussierung von Zellen, die aufgrund der hohen Schichtdicke der zytologischen Präparation selbst in unmittelbar benachbarten Gesichtsfeldern unterschiedlich sein kann, mittels eines leistungsfähigen Autofokus-Algorithmus essenziell, um keine abnormen Zellen durch Defokussierung zu verlieren.

Die klassifizierten und gemessenen Zellen werden dann während des Scans des markierten Bereichs automatisch in der *Image Gallery* abgebildet. Dabei werden die gemessenen Zellen und Strukturen den unterschiedlichen Zellarten zugeordnet wie Artefakte, defokussierte Zellen, normale Epithelzellen, Granulozyten oder Lymphozyten. Die atypischen Zellen werden als sogenannte *abnormals* als Analysezellen gespeichert. Die Speicherkapazität für die Artefakte wurde im Laufe der Arbeit auf 1000 pro Messung gedeckelt, da die Speicherung von mehr Bildern in der Galerie intermittierend zu einem Zusammenbruch des Systems führte und die ungehinderte Durchführung automatisierter Messungen so erschwerte.

Der Messvorgang dauert je nach Zellreichtum des Präparates und der Größe der zu messenden Bereiche bis zu 60 Minuten, selten länger bis etwa 150 Minuten.

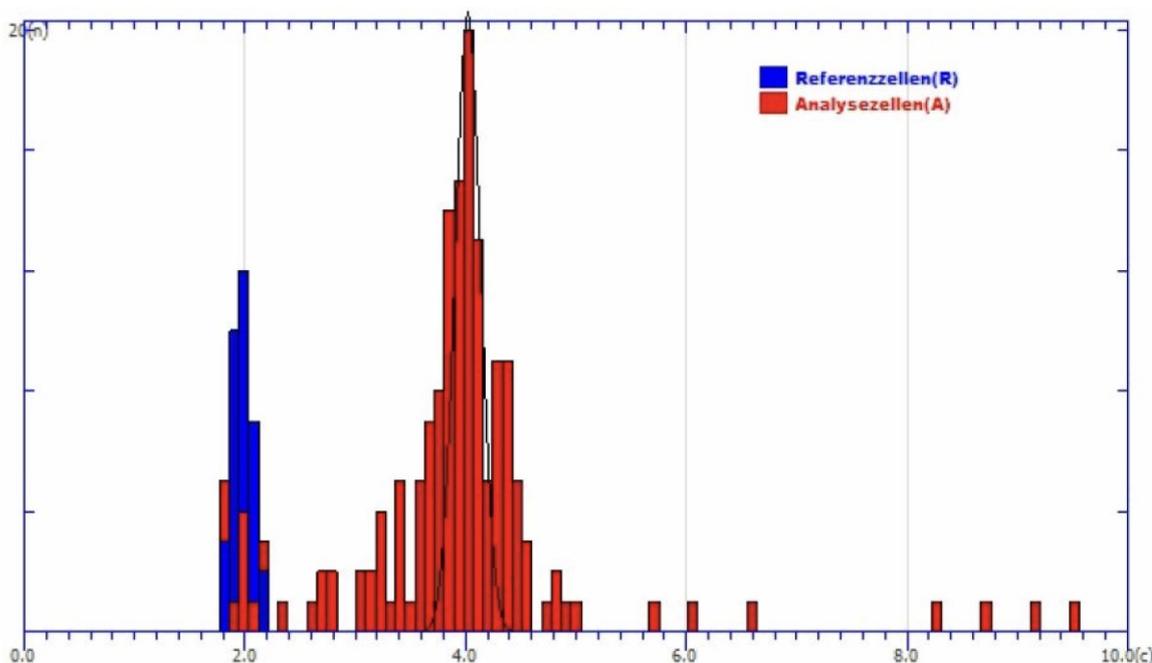
Um sicherzustellen, dass die automatische Klassifikation der Zellen korrekt ist, können nach der Messung die Zellkernbilder (Rohdaten) in der *Image Gallery* durch den Untersucher begutachtet werden. Dies ist in der diagnostischen Anwendung ein zwingend notwendiger Schritt, damit die diagnostische Verantwortung immer beim untersuchenden ärztlichen beziehungsweise zytologisch-technischen Personal verbleibt.

Eine Auswertung der Messung erfolgt dann, wie oben bereits für die manuelle DNA-Bildzytometrie beschrieben, wobei hier überwiegend normale Mundschleimhautepithelien, selten Granulozyten, als Referenzzellen ausgewählt wurden. Aus den oft zahlreichen im Präparat enthaltenen normalen Mundschleimhautepithelien werden durch

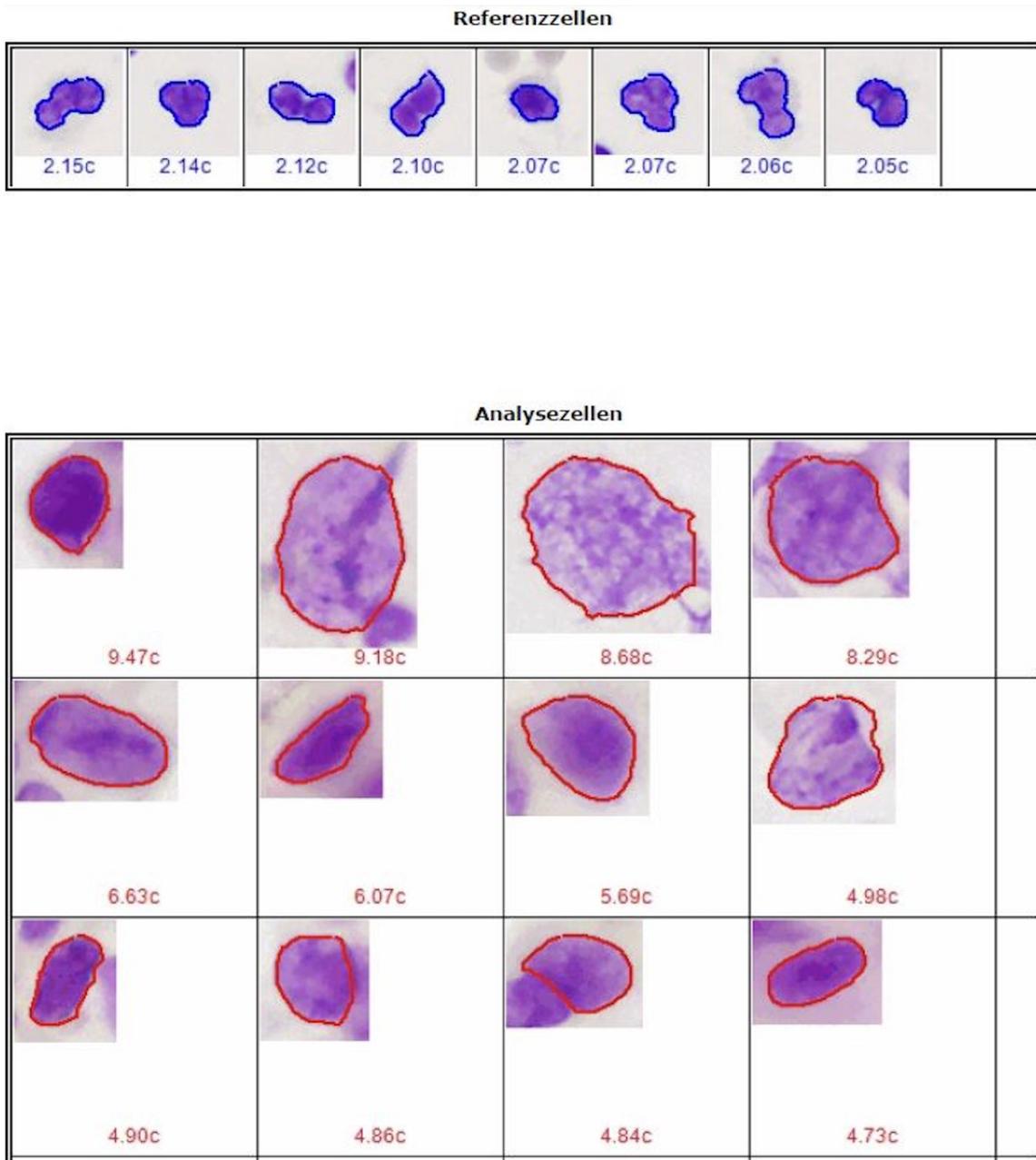
eine in der Software bereitgestellte automatische Filterfunktion diejenigen als Referenzzellen klassifiziert, die eine Einhaltung der Grenzwerte für den CV und CC erlauben.

Auch im Rahmen des automatisierten Verfahrens werden die gemessenen Zellen in einem Histogramm sowie Streudiagramm aufgetragen und ein Messbericht erstellt. Das Histogramm kann hierbei aufgrund der manchmal großen Zahl der gemessenen Zellen zur besseren Erfassung von kleinen Häufigkeitsgipfeln in logarithmischer Skalierung der Ordinate dargestellt werden.

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen beispielhaft je ein Histogramm sowie eine Bildergalerie einer DNA-bildzytometrischen Messung.



**Abb. (Abbildung) 1: Beispiel eines Histogramms einer DNA-bildzytometrischen Messung mit Stammlinie im Bereich von 4 c sowie 2 Einzelzellen mit abnorm hohem DNA-Gehalt >9c**



**Abb. 2:** Beispiel einer *Image Gallery* einer DNA-bildzytometrischen Messung

### 2.7.3 Definition von DNA-Aneuploidie als relevantem diagnostischen Messparameter

Die aus den Messberichten erhobenen relevanten Parameter sowie relevante Definitionen DNA-bildzytometrischer Kenngrößen für diese Arbeit werden im Folgenden aufgeführt:

- Zahl der Analysezellen
- Zahl der Referenzzellen
- Einzelzellen mit hohem abnormem DNA-Gehalt (*rare events*) in DNA-Histogrammen - atypische Zellen, welche einen DNA-Gehalt haben, der das Vierfache einer normalen sich in der Zellteilung befindenden Zelle überschreitet, hier *9c exceeding events* (9cEEs), somit Zellkerne, welche DNA-Gehalt-Werte von über 9c aufweisen
- DNA-Stammlinie: Eine Stammlinie beschreibt eine sich teilende Zellpopulation in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus mit einer weiteren Häufung von Zellkernen (*Peak* oder auch wenige Zellkerne) in der Verdopplungsregion
- Modalwert einer Stammlinie: Beschreibt den am häufigsten auftretenden Wert im Gipfel eines DNA-Histogramms, entspricht dabei dem Mittelwert im Rahmen einer Gaußschen Normalverteilung
- DNA-Euploidie: DNA-Verteilung, die der einer normalen Zellpopulation entspricht
- DNA-Aneuploidie: eine DNA-Verteilung einer Zellpopulation, welche statistisch relevant von der DNA-Verteilung einer normalen Zellpopulation abweicht, indem Stammlinien-Aneuploidie und / oder Einzelzellaneuploidie nachgewiesen werden
- Euploide Polyploidisierung: (gegebenenfalls wiederholte) Verdopplung von Chromosomensätzen. In der DNA-Bildzytometrie bedeutet dies das Vorkommen von Häufigkeitsgipfeln in der Verdopplungsregion (Vervierfachungs-, Veracht-fachungsregion etc.) euploider Stammlinien.

Liegt der Modalwert einer Stammlinie bei 2c (diploid), 4c (tetraploid) oder 8c (oktaploid), so gilt sie als euploid. Hierbei darf es zu einer Abweichung innerhalb eines Vertrauensbereichs um diese Idealwerte von +/- 10% kommen. Modalwerte einer DNA-Stammlinie außerhalb von 1,8c bis 2,2c beziehungsweise von 3,6c bis 4,4c oder von 7,2c bis 8,8c kennzeichnen insofern DNA-Stammlinienaneuploidie.

Als Einzelzellaneuploidie wird das Vorkommen mindestens einer Zelle mit abnorm hohem DNA-Gehalt  $>9c$  definiert ( $9cEE \geq 1$ ).

DNA-Aneuploidie liegt bei sogenannter DNA-Stammlinienaneuploidie und / oder bei Einzelzellaneuploidie vor. Ein Präparat ist daher bereits als aneuploid einzuordnen, wenn eines der beiden Aneuploidiekriterien vorliegt, also eine aneuploide DNA-Stammlinie oder der Nachweis von  $9cEE$ s.

## 2.8 Statistik

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten statistischen Methodiken dargestellt. Für die Aufarbeitung der erhobenen Daten wurden dabei im Allgemeinen übliche Programme verwendet: Microsoft Excel für Mac Version 16.68 und SPSS Version 23 (IBM Corp. *IBM SPSS Statistics for Windows*. Armonk, NY, USA: IBM Corp.).

Mit der Anfertigung von Vierfeldertafeln kann die Treffsicherheit der zytologischen Diagnosen sowie der DNA-bildzytometrischen Messergebnisse der vier unterschiedlichen Mess- und Präparationsmethoden durch Vergleich mit dem klinischen *Follow-up* bestimmt werden.

Die Berechnungen nach Cohen's Kappa dienen der Bestimmung des Grades der Übereinstimmungen zwischen den vier Mess- und Präparationsmethoden.

Mittels Bland-Altman-Diagrammen können nach Prüfung der Normalverteilung der Messdaten die peridiploiden und peritetraploiden Modalwerte der DNA-Stammlinien beziehungsweise die Zahl der ermittelten *9c exceeding events* auf Übereinstimmung geprüft werden.

### 2.8.1 Vierfeldertafeln

Die Verwendung von Vierfeldertafeln dient der Bestimmung der Treffsicherheit der zytologischen Diagnosen sowie der DNA-bildzytometrischen Messergebnisse der vier unterschiedlichen Mess- und Präparationsmethoden durch Vergleich mit dem klinischen

*Follow-up*. Die Vierfeldertafeln wurden mittels des Chi<sup>2</sup>-Tests auf statistische Signifikanz überprüft; diese wurde angenommen für  $p < 0,05$ .

Bei Vierfeldertafeln handelt es sich um eine Unterart der Kontingenztafel. Diese weisen dabei sowohl die absoluten als auch die relativen Häufigkeiten der Kombinationen der Merkmalsausprägungen zweier kategorialer Variablen auf. Eine Vierfeldertafel liegt dann vor, wenn es sich um zwei binäre Variablen handelt, also Variablen mit jeweils nur zwei Merkmalsausprägungen [85]. Diese werden dann in Zeile und Spalte gegeneinander aufgetragen.

In dieser Arbeit wurden mittels Vierfeldertafeln zytologische Diagnosen sowie manuelle und automatisierte DNA-bildzytometrische Messungen an konventionellen und flüssigkeitsbasierten Präparaten gegen die *Follow-up* Daten deskriptiv ausgewertet.

Maßzahlen der diagnostischen Treffsicherheit sind hierbei Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert sowie die Gesamttreffsicherheit.

Die Sensitivität beschreibt dabei die Wahrscheinlichkeit, dass eine tatsächlich erkrankte Person ein richtig positives Testergebnis aufweist.

Die Spezifität hingegen beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass eine tatsächlich gesunde Person ein entsprechend richtig negatives Testergebnis hat.

Eine Aussage darüber, dass eine Person tatsächlich erkrankt ist, wenn der Test positiv war, trifft der positive prädiktive Wert. Der negative prädiktive Wert hingegen bezieht sich auf die bedingte Wahrscheinlichkeit, dass eine Person tatsächlich gesund ist, wenn der Test negativ war.

Tabelle 3 stellt eine beispielhafte Vierfeldertafel dar, anhand derer die Berechnung von Sensitivität, Spezifität, positivem und negativem prädiktiven Wert aufgezeigt wird:

Testergebnis	Krankheit		
	Positiv (krank)	Negativ (nicht krank)	gesamt
positiv	a	b	a+b
negativ	c	d	c+d
gesamt	a+c	b+d	a+b+c+d

**Tabelle 3: Beispielhafte Vierfeldertafel**

$$\text{Sensitivität} = a / (a+c)$$

$$\text{Spezifität} = d / (b+d)$$

$$\text{Positiver prädiktiver Wert} = a / (a+b)$$

$$\text{Negativer prädiktiver Wert} = d / (c+d)$$

## 2.8.2 Kappa nach Cohen

Bei Cohens Kappa handelt es sich um ein statistisches Mittel, um die Übereinstimmung zweier oder mehrerer Bewertungen zu beschreiben. Hierbei kann es sich um Bewertungen unterschiedlicher Beobachter oder aber um Bewertungen desselben Beobachters zu unterschiedlichen Zeitpunkten handeln [86]. Für die vorliegende Arbeit lassen sich so beispielsweise Ergebnisse der automatisierten DNA-Bildzytometrie konventioneller und flüssigkeitsbasierter Präparate et cetera vergleichen.

In die Berechnung fließen sowohl die gemessene Übereinstimmungsrate  $p_0$  als auch die aufgrund des Zufalls erwartete Übereinstimmung  $p_e$  ein:

$$K = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e}$$

Hierbei kann der Wert Kappas zwischen 0 und 1 liegen, wobei  $k = 1$  bedeutet, dass eine vollkommene Übereinstimmung vorliegt, bei  $k = 0$  hingegen liegt die Übereinstimmung rein im Rahmen des zu erwartenden Zufalls.

In dieser Arbeit wurden die Werte zwischen 0 und 1 wie folgt bewertet [87]:

0,81 bis 1,0 – sehr gute Übereinstimmung

- 0,61 bis 0,8 – gute Übereinstimmung
- 0,41 bis 0,6 – mittelmäßige Übereinstimmung
- 0,21 bis 0,4 – leichte Übereinstimmung
- 0,00 bis 0,2 – schwache Übereinstimmung

### 2.8.3 Diagramme nach Bland-Altman

Diagramme nach Bland und Altman ermöglichen den graphischen Vergleich zwischen zwei Messmethoden S1 und S2 unter Einbeziehung der Messwertdifferenzen [88]. Für die vorliegende Arbeit kann beispielsweise S1 die automatisierte DNA-bildzytometrische Messung und S2 die manuelle DNA-bildzytometrische Messung sein, beide bei konventionellen Präparaten.

Es handelt sich um ein Punktdiagramm, in welchem auf der x- und y-Achse die Differenz von S1 und S2 gegen den Mittelwert aus S1 und S2 aufgetragen werden. Als optische Interpretationshilfe werden zusätzlich drei Linien im Diagramm eingezeichnet, zum Einen der Mittelwert der Differenz, zum Anderen die jeweils zuvor festgelegte Standardabweichung im positiven wie im negativen Bereich.

Da Aussagen über beispielsweise Schwankungsbreite oder systematische Messfehler getroffen werden können, ist dieses statistische Mittel insbesondere zur Bewertung neuer Messmethoden im Vergleich zu einem bestehenden Goldstandard geeignet.

Zur Berechnung der Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test in R angewendet. Hier geht die Nullhypothese von einer Normalverteilung aus. Zum Verwerfen der Nullhypothese kommt es dann, wenn der p-Wert unter dem zuvor bestimmten Alpha-niveau liegt. In dieser Arbeit wurde  $\alpha = 0,05$  vorgegeben.

## 2.9 Ethikvotum

Zu der vorliegenden Studie wurde ein Ethikvotum von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingeholt (Studiennummer 4898 vom 18.12.2014).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klinische Angaben zu den Patienten

Das endgültige Studienkollektiv dieser Arbeit umfasste 35 klinisch suspekta Mundschleimhautläsionen von insgesamt 22 Patienten. Die sechs Frauen (27%) und 16 Männer (73%) hatten ein medianes Alter zum Zeitpunkt des Bürstenabstrichs von 28 Jahren. Von insgesamt sechs Patienten wurden bei multilokulären Befunden mehrere Läsionen in die vorliegenden Untersuchungen eingeschlossen (siehe auch Tabelle 4).

<b>Klinische Daten</b>		<b>Patienten, n</b>
Patienten		22
Geschlecht		6 Frauen, 16 Männer
Medianes Alter und Spannweite zum Zeitpunkt des Abstrichs		28 Jahre (11-40 Jahre)
		<b>Läsionen, n</b>
Anzahl der analysierten Läsionen		35
Anzahl der Patienten mit Analyse multipler Läsionen		6
Anzahl der Läsionen ohne klinisches <i>Follow-up</i>		4

**Tabelle 4: Klinische Angaben zu den Patienten des endgültigen Studienkollektivs und den untersuchten Läsionen**

Im Folgenden (Abb. 3 und 4) werden mit Flussdiagrammen die Ergebnisse der manuellen und automatisierten DNA-Zytometrie sowohl bei konventionellen als auch flüssigkeitsbasierten Präparaten zusammengefasst. Bei den konventionellen Präparaten fehlt zu insgesamt 8 Messergebnissen ein klinisches *Follow-up*. Bei den flüssigkeitsbasierten Präparaten fehlt bei insgesamt 7 Messergebnissen, welche anhand

von 4 verschiedenen Präparaten erhoben wurden, ein klinisches *Follow-up*. Das *Follow-up* wurde in den Flussdiagrammen jeweils in positiv (pos.) und negativ (neg.) eingeteilt:

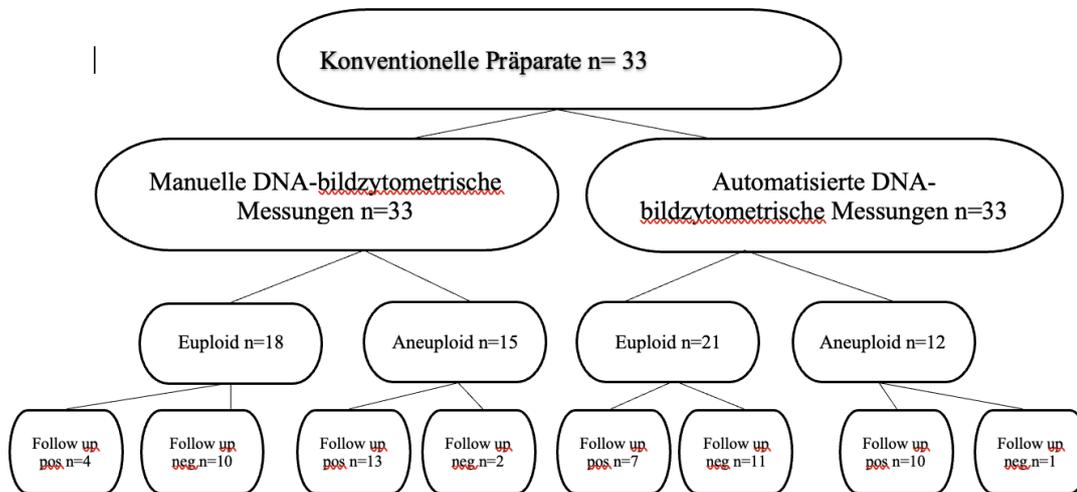


Abb. 3: Flussdiagramm der Messergebnisse bei 33 konventionellen Präparaten

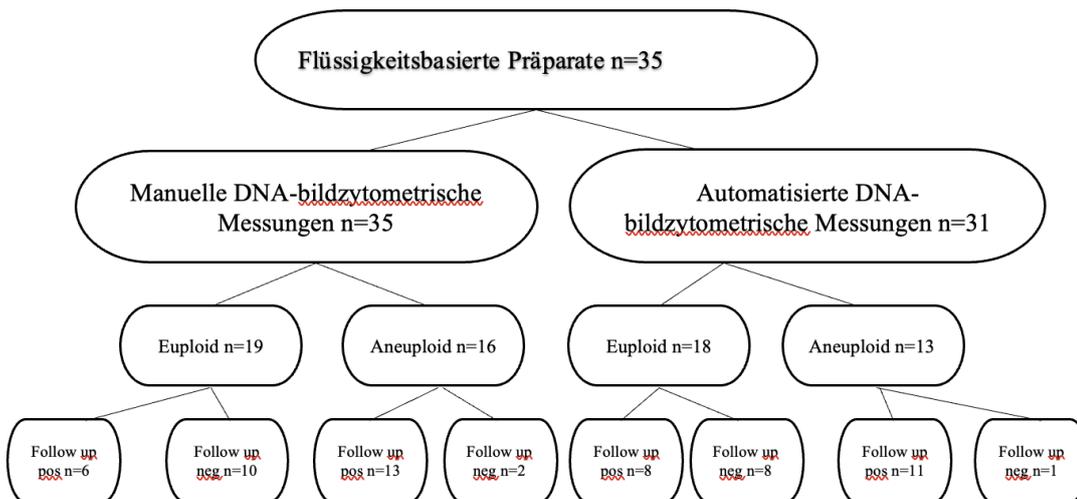
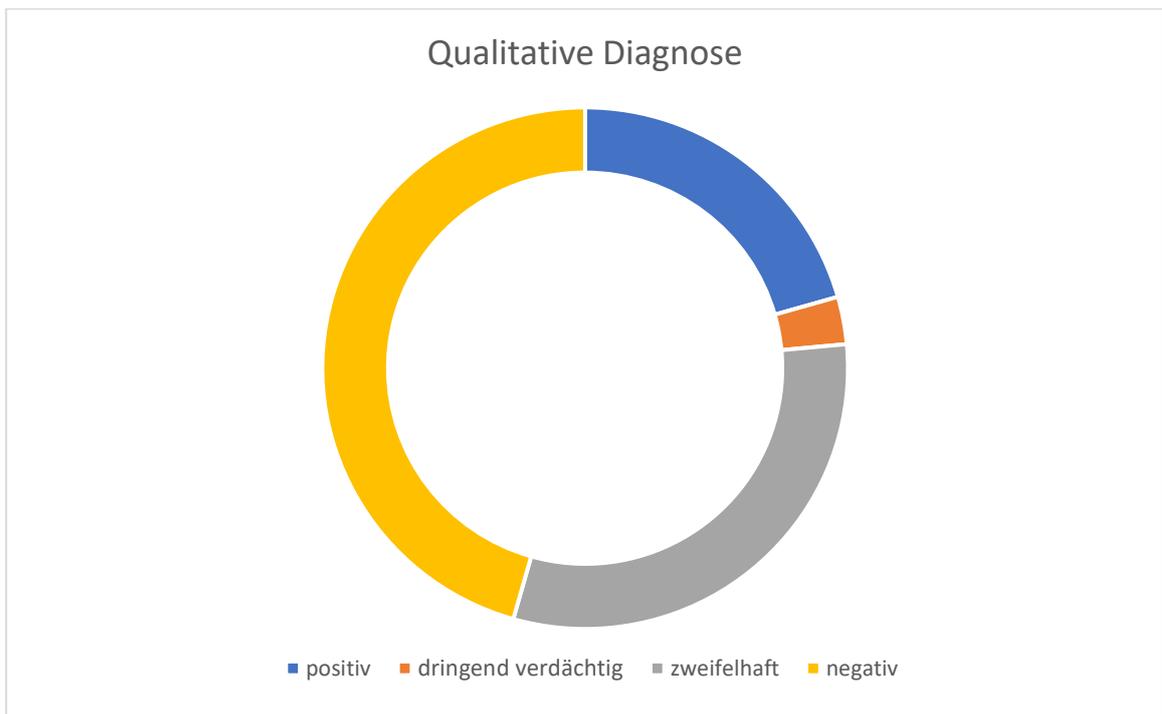


Abb. 4: Flussdiagramm der Messergebnisse bei 35 flüssigkeitsbasierten Präparaten

## 3.2 Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik

### 3.2.1 Qualitative Diagnose

Innerhalb des endgültigen Studienkollektivs gab es unabhängig von der Präparationsmethode 14 positive Präparate, 2 dringend verdächtige Präparate, 21 zweifelhafte Präparate und 31 negative Präparate, wie in Abbildung 5 visualisiert:



**Abb. 5: Ringdiagramm der Diagnosekategorien in der zytopathologischen Diagnostik**

### 3.2.2 Abgleich der qualitativen zytologischen Diagnose mit dem klinischen *Follow-up*

Im Folgenden wird der Abgleich der qualitativen, also zytologischen Diagnose mit dem klinischen *Follow-up* der einzelnen Läsionen dargestellt. Insgesamt 4 konventionelle Präparate und 4 flüssigkeitsbasierte Präparate gehen bei fehlenden Daten zum *Follow-up* nicht in diese Auswertung mit ein. Bei 33 vorliegenden konventionellen Präparaten ergeben sich also 29 Präparate mit *Follow-up* Daten, bei 35 flüssigkeitsbasierten Präparaten 31 Präparate mit *Follow-up* Daten.

Zur Ermittlung der jeweilig vorliegenden Sensitivität und Spezifität sowie des positiven und negativen prädiktiven Werts erfolgte die Anfertigung von Vierfeldertafeln. Hierzu war die Zuordnung der dringend verdächtigen und zweifelhaften zytologischen Befundgruppen als statistisch positiv beziehungsweise negativ notwendig, um eine binäre Merkmalsausprägung des Tests zu erreichen. Eine dritte Möglichkeit umfasst die Zuordnung der dringend verdächtigen Befunde als statistisch positiv und die Zuordnung der zweifelhaften Befunde als statistisch negativ. Die Zuordnung der zweifelhaften und

dringend verdächtigen Zytologie in den einzelnen Auswertungen ist jeweils im Tabellentitel beschrieben.

### Konventionelle Präparate

In Tabelle 5 ist die originale Datenverteilung der 29 Fälle, für die ein *Follow-up* vorlag, auf die Diagnosekategorien wiedergegeben.

<b>Zytologische Diagnose der konventionellen Präparate</b>	<b><i>Follow-up</i></b>		<b>Gesamt</b>
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	
<b>positiv</b>	7	0	7
<b>dringend verdächtig</b>	0	0	0
<b>zweifelhaft</b>	9	3	12
<b>negativ</b>	1	9	10
<b>Gesamt</b>	17	12	29

**Tabelle 5: Mehrfeldertafel mit der Zuordnung der zytologischen Diagnose der konventionellen Präparate zum *Follow-up*; Originaldaten**

Die Tabellen 6 und 7 zeigen die Datenverteilung in Abhängigkeit von der Zuordnung der zytologisch dringend verdächtigen (d.V.) beziehungsweise (bzw.) zweifelhaften Fälle zu „positiv“ bzw. „negativ“.

<b>Zytologische Diagnose der konventionellen Präparate</b>	<b><i>Follow-up</i></b>		<b>Gesamt</b>
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	
<b>positiv / d.V. / zweifelhaft</b>	16	3	19
<b>negativ</b>	1	9	10
<b>Gesamt</b>	17	12	29

**Tabelle 6: Vierfeldertafel mit der Zuordnung der zytologischen Diagnose der konventionellen Präparate zum *Follow-up*; positive, dringend verdächtige (d.V.) und zweifelhafte Fälle zusammengefasst,  $p = 0,0001$**

Werden die dringend verdächtigen und zweifelhaften Befunde als statistisch positiv miteingestuft, wie es in Tabelle 6 der Fall ist, so ergeben sich eine Sensitivität von 94%,

eine Spezifität von 75%, ein positiver prädiktiver Wert von 84% und ein negativer prädiktiver Wert von 90%.

<b>Zytologische Diagnose der konventionellen Präparate</b>	<b>Follow-up</b>		<b>Gesamt</b>
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	
<b>positiv</b>	7	0	7
<b>negativ / zweifelhaft / d.V.</b>	10	12	22
<b>Gesamt</b>	17	12	29

Tabelle 7: Vierfeldertafel mit der Zuordnung der zytologischen Diagnose der konventionellen Präparate zum *Follow-up*; negative, zweifelhafte und dringend verdächtige (d.V.) Fälle zusammengefasst,  $p = 0,0107$

Fasst man die dringend verdächtigen und zweifelhaften Befunde als statistisch negativ auf, wie es in Tabelle 7 der Fall ist, so berechnet sich eine Sensitivität von 41%, eine Spezifität von 100%, ein positiver prädiktiver Wert von 100% und ein negativer prädiktiver Wert von 55%.

Die oben skizzierte Möglichkeit, die dringend verdächtigen Fälle mit den positiven bzw. die zweifelhaften Fälle mit den negativen zusammenzubringen, führt zu identischen Ergebnissen, da die Gruppe „dringend verdächtig“ unbesetzt war.

#### Flüssigkeitsbasierte Präparate

In Tabelle 8 ist die originale Datenverteilung der 31 Fälle, für die ein *Follow-up* vorlag, auf die Diagnosekategorien dargestellt.

<b>Zytologische Diagnose der flüssigkeitsbasierten Präparate</b>	<b>Follow-up</b>		<b>Gesamt</b>
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	
<b>positiv</b>	7	0	7
<b>dringend verdächtig</b>	1	1	2
<b>zweifelhaft</b>	7	2	9
<b>negativ</b>	4	9	13
<b>Gesamt</b>	19	12	31

Tabelle 8: Mehrfeldertafel mit der Zuordnung der zytologischen Diagnose der flüssigkeitsbasierten Präparate zum *Follow-up*; Originaldaten

Die Tabellen 9 und 10 zeigen die Datenverteilung in Abhängigkeit von der Zuordnung der zytologisch dringend verdächtigen bzw. zweifelhaften Fälle zu „positiv“ bzw. „negativ“.

<b>Zytologische Diagnose der flüssigkeitsbasierten Präparate</b>	<b>Follow-up</b>		<b>Gesamt</b>
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	
<b>positiv / d.V. / zweifelhaft</b>	15	3	18
<b>negativ</b>	4	9	13
<b>Gesamt</b>	19	12	31

**Tabelle 9: Vierfeldertafel mit der Zuordnung der zytologischen Diagnose der flüssigkeitsbasierten Präparate zum Follow-up; positive, dringend verdächtige (d.V.) und zweifelhafte Fälle zusammengefasst;  $p = 0,0030$**

Werden die dringend verdächtigen und zweifelhaften Befunde als statistisch positiv interpretiert, wie es in Tabelle 9 der Fall ist, so liegen die Sensitivität bei 79%, die Spezifität bei 75%, der positive prädiktive Wert bei 83% und der negative prädiktive Wert bei 69%.

<b>Zytologische Diagnose der flüssigkeitsbasierten Präparate</b>	<b>Follow-up</b>		<b>Gesamt</b>
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	
<b>positiv</b>	7	0	7
<b>negativ / zweifelhaft / d.V.</b>	12	12	24
<b>Gesamt</b>	19	12	31

**Tabelle 10: Vierfeldertafel mit der Zuordnung der zytologischen Diagnose der flüssigkeitsbasierten Präparate zum Follow-up; negative, zweifelhafte und dringend verdächtige (d.V.) Fälle zusammengefasst;  $p = 0,0169$**

Fasst man die dringend verdächtigen und zweifelhaften Befunde als statistisch negativ auf, wie es in Tabelle 10 der Fall ist, so ergeben sich eine Sensitivität von 37%, eine Spezifität von 100%, ein positiver prädiktiver Wert von 100% und ein negativer prädiktiver Wert von 50%.

Zytologische Diagnose der flüssigkeitsbasierten Präparate	Follow-up		Gesamt
	positiv	negativ	
positiv / d.V.	8	1	9
negativ / zweifelhaft.	11	11	22
Gesamt	19	12	31

**Tabelle 11: Vierfeldertafel mit der Zuordnung der zytologischen Diagnose der flüssigkeitsbasierten Präparate zum Follow-up; negative und zweifelhafte bzw. positive und dringend verdächtige (d.V.) Fälle zusammengefasst;  $p = 0,0436$**

Werden die positiven und die dringend verdächtigen bzw. die negativen und die zweifelhaften Befunde in zwei Gruppen zusammengefasst, wie es in Tabelle 11 der Fall ist, so ergeben sich eine Sensitivität von 42%, eine Spezifität von 92%, ein positiver prädiktiver Wert von 89% und ein negativer prädiktiver Wert von 50%.

#### Zusammenfassende Betrachtung

In Tabelle 12 sind die statistischen Daten zur Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik zusammenfassend wiedergegeben.

Als „positiv“ gewertete Diagnosekategorien	Präparationsmethode	Sensitivität	Spezifität	Positiver prädiktiver Wert	Negativer prädiktiver Wert
pos.	konventionell	41%	100%	100%	55%
pos. / d.V.	konventionell	41%	100%	100%	55%
pos. / d.V. / zw.	konventionell	94%	75%	84%	90%
pos.	flüssigkeitsbasiert	37%	100%	100%	50%
pos. / d.V.	flüssigkeitsbasiert	42%	92%	89%	50%
pos. / d.V. / zw.	flüssigkeitsbasiert	79%	75%	83%	69%

**Tabelle 12: Darstellung der statistischen Kennwerte zur Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik für die verschiedenen Zuordnungen dringend verdächtiger und zweifelhafter Fälle. pos. = positiv, d.V. = dringender Verdacht, zw. = zweifelhaft**

Für die weiteren Betrachtungen war es notwendig, sich bezüglich der jeweils drei Möglichkeiten, die dringend verdächtigen und die zweifelhaften Fälle zuzuordnen, zu entscheiden, um pro Präparationsmethode zu einem „Endergebnis“ der zytologischen Treffsicherheit zu gelangen. Gemäß der bei Velleuer et al. abgeleiteten geringeren Vortest-Wahrscheinlichkeit für ein positives *Follow-up* wurden die zytologisch als zweifelhaft gewerteten Fälle zu den statistisch negativen Diagnosen und aufgrund der höheren Wahrscheinlichkeit für ein positives *Follow-up* die zytologisch als dringend verdächtig gewerteten Fälle zu den statistisch positiven Diagnosen hinzugezählt [23]. Durch diese Festlegung bedingt ergibt sich als endgültige Kennwerte für die Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik für diesen Versuchsansatz (Tabelle 13):

Als „positiv“ gewertete Diagnosekategorien	Präparationsmethode	Sensitivität	Spezifität	Positiver prädiktiver Wert	Negativer prädiktiver Wert
pos. / d.V.	konventionell	41%	100%	100%	55%
pos. / d.V.	flüssigkeitsbasiert	42%	92%	89%	50%

**Tabelle 13: Darstellung der statistischen Kennwerte zur Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik für endgültige Zuordnung dringend verdächtiger Fälle als „positiv“ und zweifelhafter Fälle als „negativ“. pos. = positiv, d.V. = dringender Verdacht, zw. = zweifelhaft**

Dies bedeutet, dass sowohl die konventionellen Präparate als auch die flüssigkeitsbasierten Präparate mit einer hohen Spezifität verbunden sind.

### 3.3 Anzahl gemessener Analysezellen bei den vier unterschiedlichen Mess-Modalitäten

Die automatisierte DNA-Bildzytometrie gibt eine Kategorie abnormaler Zellen an, die als Analysezellen gewertet werden. Normale Mundschleimhautepithelien mit einem DNA-Gehalt bei 2c hingegen werden in eine entsprechende Kategorie eingeordnet und erscheinen im Histogramm möglicherweise nicht als Analysezellen. Dies ist bei der manuellen DNA-Bildzytometrie anders. Hier wählt eine untersuchende Person die Analysezellen selbst aus. In der Praxis bedeutet das, dass alle als Analysezellen ausgewählte Zellen, auch die mit nur gering veränderter Morphologie und DNA-Werten

um 2c, als solche gewertet werden. Es ist daher sinnvoll, die Zahl gemessener Analysezellen für die manuelle und die automatisierte DNA-Bildzytometrie getrennt zu betrachten (Tabelle 14). Eine unmittelbare Vergleichbarkeit bezüglich der Zahl gemessener Analysezellen der beiden Verfahren ist aufgrund der vorgenannten Umstände nicht gegeben.

Analysezellen	Automatisierte DNA-Zytometrie		Manuelle DNA-Zytometrie	
	konventionelle Präparate	flüssigkeitsbasierte Präparate	konventionelle Präparate	flüssigkeitsbasierte Präparate
<b>Mittelwert +/- SD</b>	355 +/- 438,7	888 +/- 1491,1	320 +/- 117,3	337 +/- 125,6
<b>Variations- koeffizient</b>	1,24	1,68	0,37	0,37
<b>Minimalwert</b>	49	45	107	103
<b>Maximalwert</b>	2115	8173	575	669

**Tabelle 14: Statistische Kenndaten der Zahl und der Streuungsmaße gemessener Analysezellen bei den vier unterschiedlichen Messmodalitäten; SD = Standardabweichung**

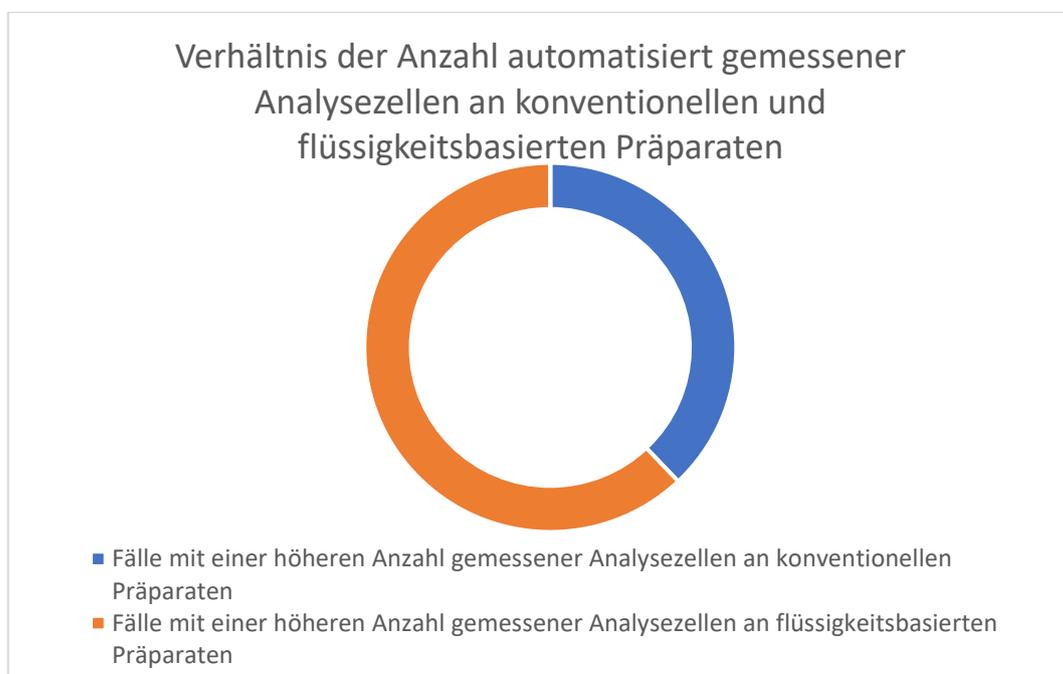
Die Datenverteilungen zeigen, dass im Durchschnitt bei den konventionellen Präparaten im Wesentlichen gleich viele Zellen mit den beiden Messmethoden erfasst wurden, während bei den flüssigkeitsbasierten Präparaten automatisiert gut 2,5-mal so viele Zellen in die Messung einfließen. Die Angaben zu den Minimal- und Maximalwerten zeigen allerdings ähnlich wie die hohen Variationskoeffizienten, wie sehr sich die Zelldichten auffälliger Epithelien von Fall zu Fall unterscheiden.

Abbildung 6 stellt dar, wie häufig die gemessene Anzahl der Analysezellen bei dem manuellen Messverfahren an konventionellen Präparaten kleiner oder größer als an den gepaarten flüssigkeitsbasierten Präparaten war. In absoluten Zahlen benannt war die Anzahl der manuell gemessenen Analysezellen an konventionellen Präparaten in 13 Fällen größer als die Anzahl der manuell gemessenen Analysezellen an flüssigkeitsbasierten Präparaten und in 20 Fällen kleiner. Abbildung 7 zeigt, wie häufig die gemessene Anzahl der Analysezellen an konventionellen Präparaten im Rahmen der automatisierten Messung größer oder kleiner als an flüssigkeitsbasierten Präparaten war. Hier war die Zahl der automatisiert gemessenen Analysezellen an konventionellen

Präparaten in 11 Fällen größer als an flüssigkeitsbasierten Präparaten und in 18 Fällen kleiner.



**Abb. 6:** Ringdiagramm zum Verhältnis der Anzahl der manuell gemessenen Analysezellen an konventionellen und flüssigkeitsbasierten Präparaten; 33 Paarvergleiche



**Abb. 7:** Ringdiagramm zum Verhältnis der Anzahl der automatisiert gemessenen Analysezellen an konventionellen und flüssigkeitsbasierten Präparaten; 29 Paarvergleiche

### 3.4 DNA-Stammlinienploidie bei den verschiedenen Messmodalitäten

Tabelle 15 gibt die Lage der DNA-Stammlinienploidie der 35 Läsionen bezogen auf die vier verschiedenen Messmodalitäten wieder.

Fallnummer	Manuelle Messung, flüssigkeitsbasiertes Präparat	Manuelle Messung, konventionelles Präparat	Automatisierte Messung, flüssigkeitsbasiertes Präparat	Automatisierte Messung, konventionelles Präparat
1	1,93c	4,00c	1,82c	1,98c
2	1,96c, 3,83c	2,01c, 3,84c	2,10c	1,99c
3	2,11c, 4,17c	2,14c, 4,36c	3,89c	4,01c
4	1,96c, 3,79c	1,92c, 4,23c	3,89c	3,83c
5	1,99c, 3,29c, 6,35c	3,25c, 6,38c	3,60c	3,71c, 7,31c
6	3,74c, 6,17c	1,90c	3,85c	2,09c
7	2,79c, 5,37c	2,72c	2,41c	2,92c
8	3,18c	1,99c, 3,70c	2,02c	1,94c
9	1,97c, 4,07c	-	1,99c	-
10	2,02c, 4,04c	-	2,15c	-
11	2,03c	1,99c	2,20c	1,86c
12	1,95c	1,96c	2,05c	2,13c
13	1,94c	2,04c	-	1,88c
14	2,15c	1,99c	-	1,92c
15	2,07c	2,01c	1,91c	1,99c
16	2,02c	2,04c	1,99c	2,06c
17	2,06c	2,03c	1,98c	2,02c
18	1,96c, 4,03c	2,01c, 4,15c	2,03c, 4,21c	2,02c, 4,29c
19	1,97c	1,97c	-	1,81c
20	1,93c	1,97c	1,86c	1,98c
21	1,95c	2,13c, 4,06c	2,18c	2,02c
22	2,00c, 3,83c	2,07c	1,98c, 3,93c	2,03c
23	3,82c	1,89c	2,03c, 4,30c	1,98c
24	1,95c	1,99c, 4,13c	-	2,00c
25	1,99c	2,57c, 5,00c	1,94c	1,99c
26	2,04c	2,05c, 3,95c	2,17c	1,86c
27	1,89c, 3,69c	4,00c	1,96c	1,98c, 3,82c
28	1,92c, 3,49c	3,81c	3,58c	2,12c, 3,90c
29	3,71c	3,54c, 6,17c, 7,79c	3,99c	3,60c
30	1,98c, 3,97c	1,90c, 3,80c	2,00c	1,99c, 4,05c
31	2,09c, 4,01c, 2,42c	2,26c, 2,61c, 4,65c	3,94c, 2,37c	4,36c, 2,99c
32	3,47c, 7,09c	3,55c	3,49c, 6,97c	3,54c
33	3,55c, 6,97c	3,44c	3,46c	3,51c
34	3,20c	2,03c, 4,00c	3,40c	2,01c
35	2,01c, 3,94c, 2,26c	4,01c, 2,21c	3,94c, 2,49c	1,97c

Tabelle 15: Darstellung der Stammlinienploidie anhand der vier verschiedenen Messmodalitäten

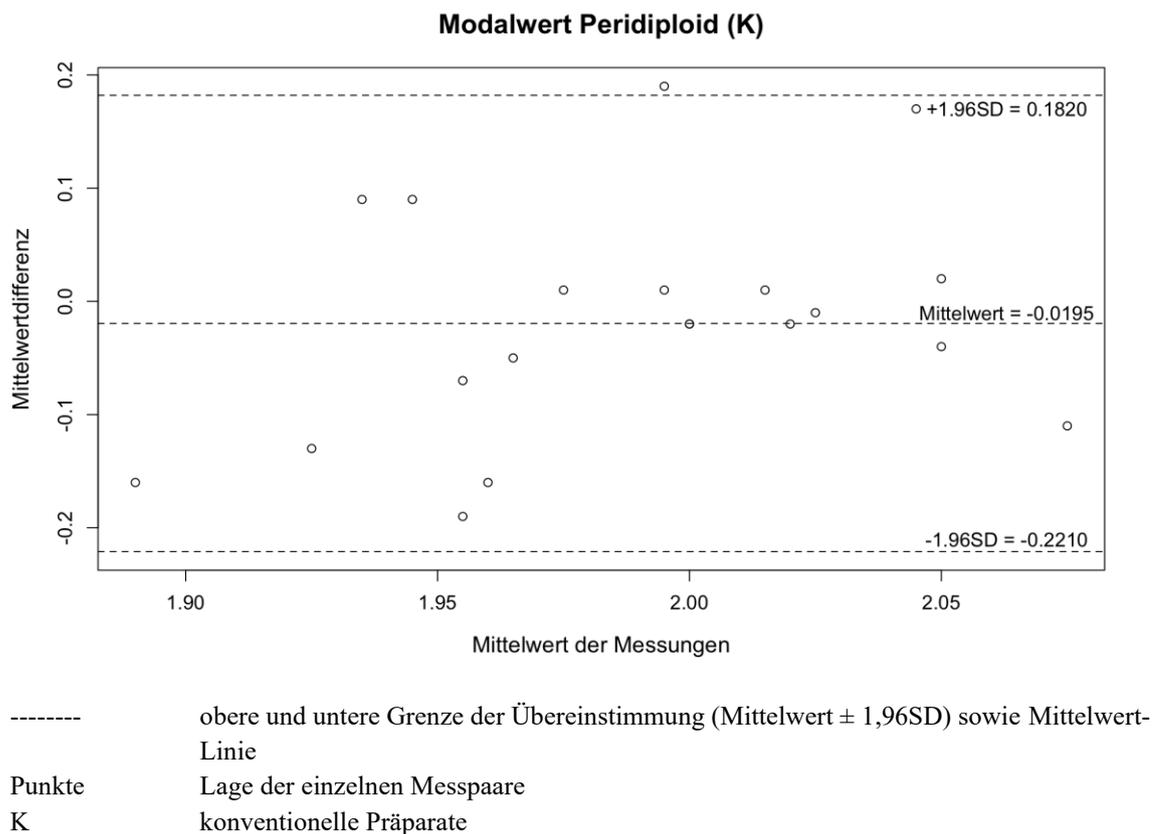
In 27 der 35 Fälle (77%, in der Tabelle grau schattiert) zeigte sich zu der Frage, ob eine euploide oder eine aneuploide DNA-Stammlinie vorliegt, ein kongruentes Ergebnis. Es lagen in 23 Fällen euploide Stammlinien vor, in 4 Fällen (Fallnummern 7, 31, 32 und 33) aneuploide Stammlinien. In 4 Fällen lagen nur drei Messwerte vor, weil die automatisierte Messung der flüssigkeitsbasierten Präparation nicht auswertbar war, und in 2 Fällen nur zwei Messwerte, weil keine konventionellen Präparate vorgelegen hatten.

In 2 Fällen (Fallnummer 28 und 34, in der Tabelle gelb schattiert), wurden aneuploide Stammlinien ausschließlich in flüssigkeitsbasierten Präparaten erfasst. Dies deutet darauf hin, dass ausreichend viele auffällige Zellen, die für die Identifikation einer DNA-Stammlinie notwendig sind, nur in diesem Präparatetyp enthalten waren.

Schließlich zeigten 6 Mundschleimhautläsionen, in der Tabelle weiß hinterlegt, inkonsistente Ergebnisse. Bei 4 dieser Läsionen (Fallnummern 6, 8, 25 und 29) war eine aneuploide Stammlinie nur in einem Präparatetyp enthalten und wurde nur von einer der beiden DNA-bildzytometrischen Methoden erfasst. In 2 weiteren Fällen (Fallnummer 5 und 35) wurde sowohl im konventionellen als auch flüssigkeitsbasierten Präparat Stammlinienaneuploidie diagnostiziert, wurde aber in einer der vier Messungen nicht detektiert.

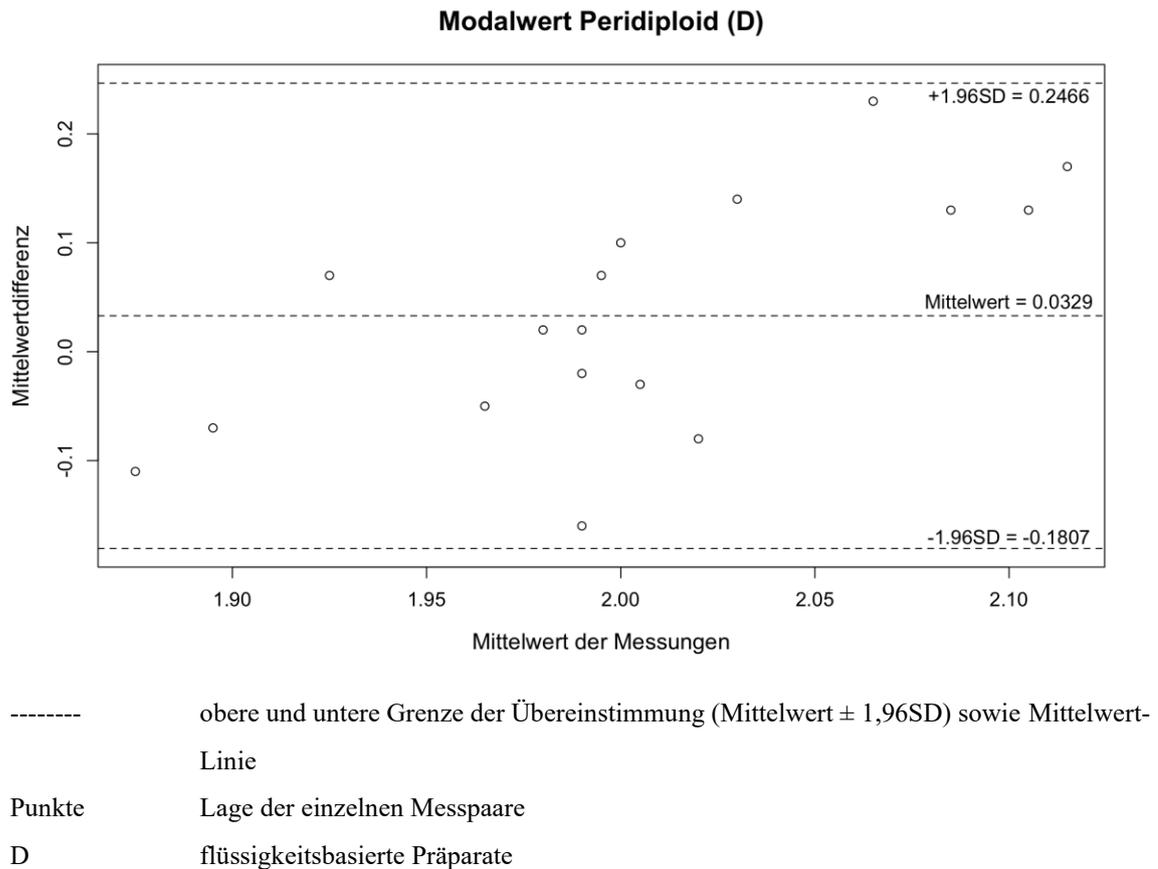
Mittels Bland-Altman-Diagramm wurden jeweils die Mittelwerte sowie die Differenzen der Werte peridiploider sowie peritetraploider, insgesamt als euploid einzuordnender Stammlinien der verschiedenen Messmethoden gegeneinander aufgetragen. Aufgrund der geringen Zahl von Fällen wurde auf die Berücksichtigung auch aneuploider Stammlinien verzichtet. Die zuvor notwendige Prüfung auf Normalverteilung der Modalwerte erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-Test. Dieser zeigt bei den peridiploiden Modalwerten der manuellen und automatisierten Messung an konventionellen Präparaten eine Normalverteilung der Differenz und Mittelwerte der Modalwerte mit  $p=0,9601$  und  $p=0,4868$  bei  $N=20$ .

Es zeigt sich, dass nahezu 100% der peridiploiden Modalwerte innerhalb des Intervalls des Mittelwertes aller gemessenen Stammlinienmodalwerte  $\pm 1,96$  Standardabweichungen liegen, was eine zumindest hinreichende Übereinstimmung der manuellen und der automatisierten DNA-bildzytometrischen Messungen an konventionellen Präparaten bedeutet (Abb. 8).



**Abb. 8: Bland-Altman-Diagramm zur Darstellung der Übereinstimmung der peridiploiden Stammlinienmodalwerte der automatisierten und manuellen DNA-Bildzytometrie an konventionellen Präparaten**

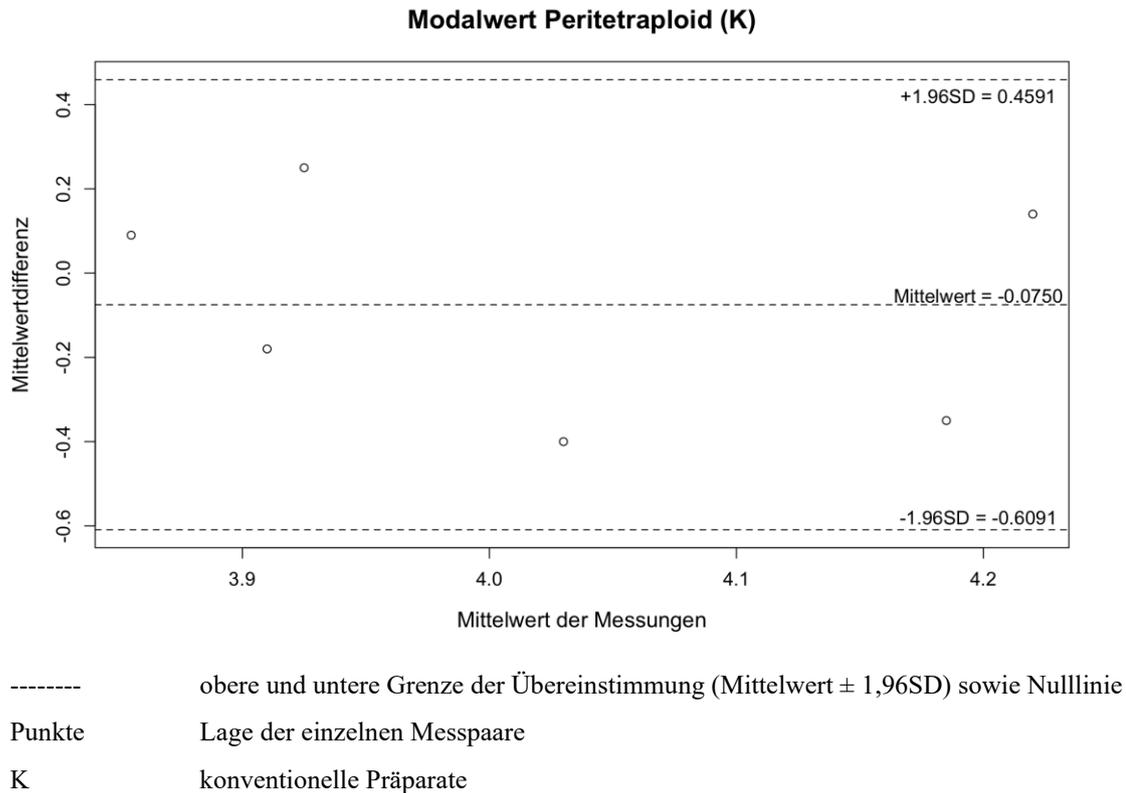
Trägt man die peridiploiden Modalwerte der manuellen und automatisierten Messungen an flüssigkeitsbasierten Präparaten auf, ergibt sich folgendes Bland-Altman-Diagramm bei  $N=17$  bei einer Normalverteilung der Differenz und Mittelwerte der Modalwerte mit  $p=0,5526$  und  $p=0,9346$  (Abb.9):



**Abb. 9: Bland-Altman-Diagramm zur Darstellung der Übereinstimmung der peridiploiden Stammlinienmodalwerte der automatisierten und manuellen DNA-Bildzytometrie an flüssigkeitsbasierten Präparaten**

Hier liegen alle erhobenen Werte innerhalb des Mittelwerts aller Messungen  $\pm$  1,96 Standardabweichungen. Die Abweichung im Bereich der Standardabweichung ist fast zu gleichen Teilen positiv und negativ. Auch hier liegt eine hinreichende Übereinstimmung von automatisierter und manueller DNA-Bildzytometrie bezüglich der gemessenen peridiploiden Modalwerte an flüssigkeitsbasierten Präparaten vor.

N = 6 Fälle wiesen beim Vergleich der manuellen sowie der automatisierten DNA-Zytometrie an konventionellen Präparaten peritetraploide Stammlinienmodalwerte auf, wie in Abbildung 10 gezeigt. Hier zeigt der Shapiro-Wilk-Test ebenfalls eine Normalverteilung der Differenz und Mittelwerte der Messpaare von Modalwerten mit  $p = 0,3268$  und  $p = 0,3964$ .

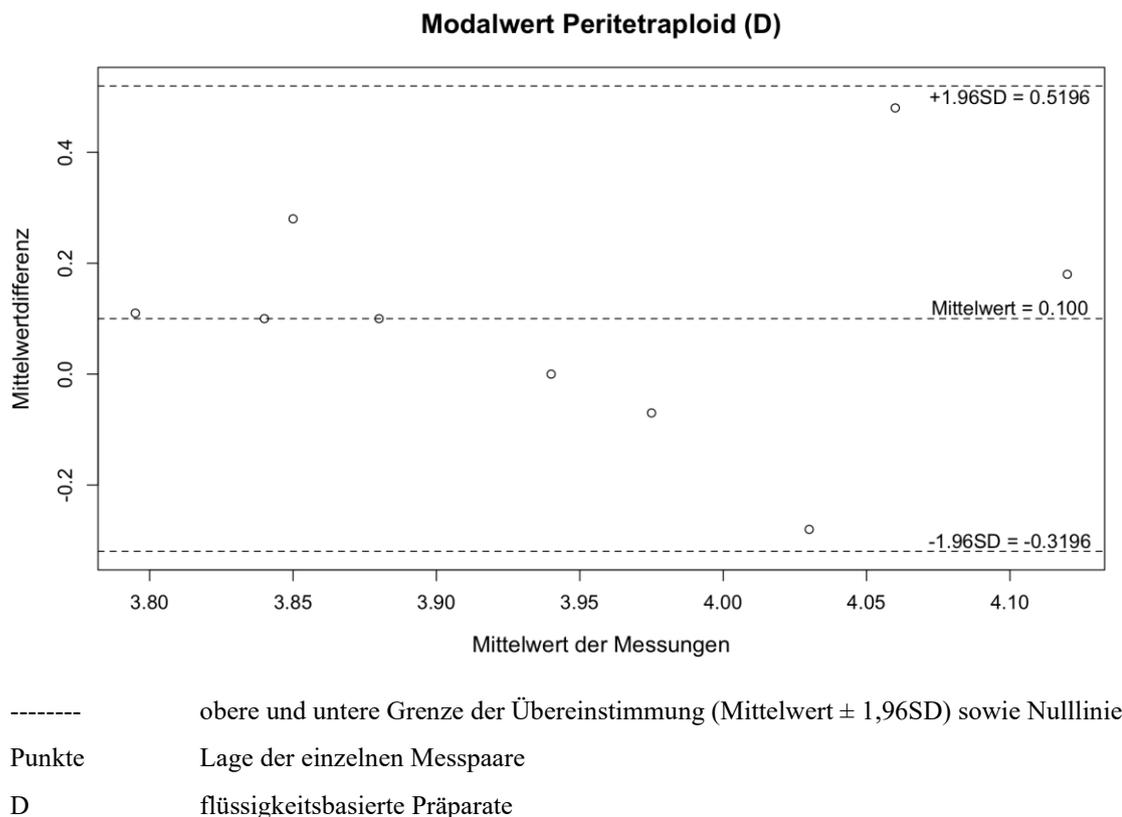


**Abb. 10: Bland-Altman-Diagramm zur Darstellung der Übereinstimmung der peritetraploiden Stammlinienmodalwerte der automatisierten und manuellen DNA-Bildzytometrie an konventionellen Präparaten**

Auch hier liegen alle Messwerte innerhalb des Mittelwertes aller Messungen  $\pm$  1,96 Standardabweichungen mit gleicher Verteilung in den positiven und negativen Wertebereich, was erneut auf eine hinreichende Übereinstimmung von manueller und automatisierter DNA-Bildzytometrie an konventionellen Präparaten hinweist.

Trägt man die peritetraploiden Modalwerte der manuellen und automatisierten DNA-bildzytometrischen Messung an flüssigkeitsbasierten Präparaten auf, gehen N=9 Fälle in die Auswertung mit ein. Es besteht erneut eine Normalverteilung der Differenz und Mittelwerte der Modalwerte mit  $p = 0,763$  und  $p = 0,9255$ .

Alle eingehenden Modalwerte liegen im Bereich des Mittelwertes aller Messpaare  $\pm$  1,96 Standardabweichungen, die Verteilung in den positiven und negativen Wertebereich ist auch hier ausgeglichen. Es liegt also ebenso eine hinreichende Übereinstimmung der manuellen und automatisierten DNA-Bildzytometrie hinsichtlich der erhobenen peritetraploiden Stammlinienmodalwerte an flüssigkeitsbasierten Präparaten vor (Abb.11):



**Abb. 11: Bland-Altman-Diagramm zur Darstellung der Übereinstimmung der peritetraploiden Stammlinienmodalwerte der automatisierten und manuellen DNA-Bildzytometrie an flüssigkeitsbasierten Präparaten**

### 3.5 *9c Exceeding Events* (9cEE) bei den verschiedenen Messmodalitäten

Eine Auflistung der gemessenen 9cEE in den 35 Läsionen bezogen auf die vier verschiedenen Messmodalitäten zeigt Tabelle 16:

Fallnummer	Manuelle Messung, flüssigkeitsbasiertes Präparat	Manuelle Messung, konventionelles Präparat	Automatisierte Messung, flüssigkeitsbasiertes Präparat	Automatisierte Messung, konventionelles Präparat
1	0	2	0	0
2	0	0	0	0
3	1	3	1	1
4	5	1	4	1
5	26	29	11	90
6	5	1	1	1
7	4	0	2	0
8	2	0	0	0
9	0	-	0	-
10	0	-	0	-
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	-	0
14	0	0	-	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	1	1	0	0
19	0	0	-	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	5	0	1	0
24	0	0	-	0
25	1	2	0	0
26	0	0	0	0
27	0	2	0	1
28	0	1	0	2
29	17	7	5	1
30	0	0	0	0
31	2	2	1	0
32	1	2	1	1
33	1	4	0	0
34	0	0	0	1
35	0	0	0	0

**Tabelle 16: Darstellung der 9cEEs anhand der vier verschiedenen Messmodalitäten**

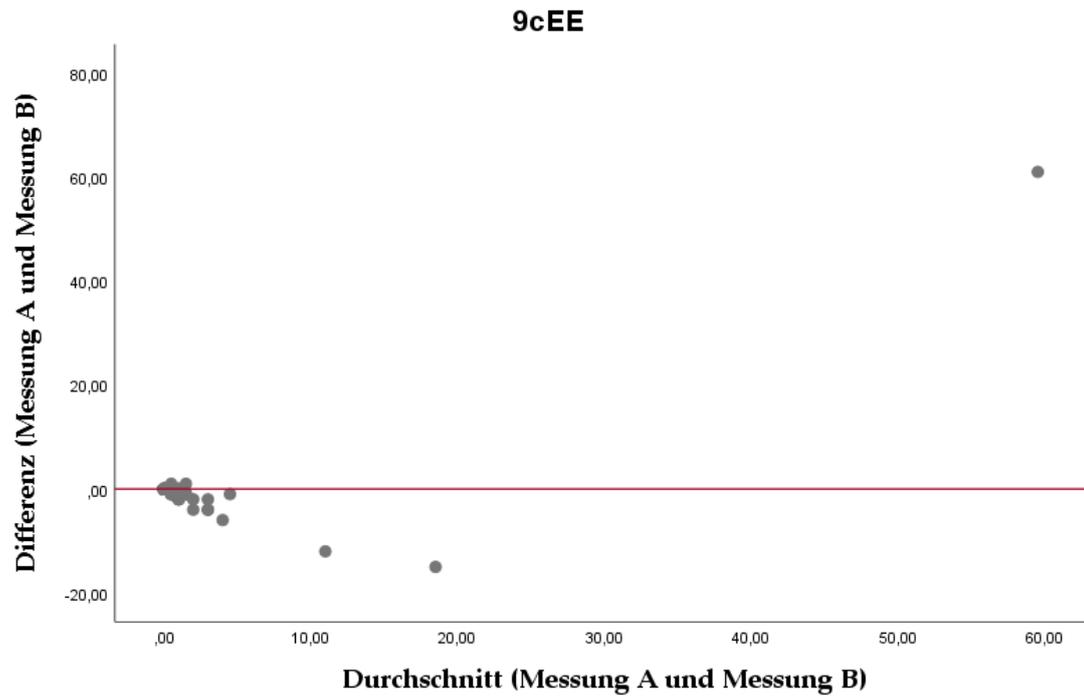
In 24 der 35 Fälle (69%, in der Tabelle grau schattiert) waren die Messergebnisse bezüglich der Frage, ob 9cEE vorliegen, kongruent. In 18 Fällen waren keine 9cEEs nachweisbar, in 12 Fällen bezogen auf vier Messwerte. In 4 Fällen lagen nur drei Messwerte vor, weil die automatisierte Messung der flüssigkeitsbasierten Präparation nicht auswertbar war, und in 2 Fällen nur zwei Messwerte, weil keine konventionellen

Präparate vorgelegen hatten. In den sechs Fällen mit 9cEEs-Nachweis lagen jeweils vier Messungen vor.

In jeweils 2 Fällen (Fallnummer 27 und 28 sowie Fallnummer 7 und 23, in der Tabelle gelb schattiert), wurden 9cEEs ausschließlich in konventionellen bzw. ausschließlich in flüssigkeitsbasierten Präparaten erfasst. Dies deutet darauf hin, dass 9cEEs jeweils nur in einem Präparatetyp enthalten waren.

7 Mundschleimhautläsionen, in der Tabelle weiß hinterlegt, zeigten inkonsistente Ergebnisse. In 3 dieser Fälle (Fallnummern 18, 25 und 33) konnte lediglich die manuelle DNA-Zytometrie sowohl bei konventioneller als auch flüssigkeitsbasierter Präparation im Gegensatz zur automatisierten DNA-Zytometrie 9cEEs erfassen. Bei drei weiteren dieser Läsionen (Fallnummern 1, 8 und 34) waren 9cEEs nur in einem Präparatetyp enthalten und wurden nur von einer DNA-bildzytometerischen Methode erfasst. Im verbleibenden Fall (Fallnummer 31) waren sowohl im konventionellen als auch flüssigkeitsbasierten Präparat 9cEEs enthalten, wurden aber in einer der vier Messungen nicht detektiert.

Das Bland-Altman-Diagramm umfasst die paarweisen Vergleiche der automatisierten (Messung A) und der manuellen Bestimmung (Messung B) der 9cEES für die jeweils gleichen Präparationsmethoden und bezieht sich auf 66 Vergleiche. Hier zeigte sich nach Auswertung des Shapiro-Wilk-Tests, dass keine Normalverteilung vorliegt (Abb.12).



**Abb. 12: Bland-Altman-Diagramm zur Analyse der Übereinstimmung der Anzahl ermittelter 9c Exceeding Events der automatisierten (Messung A) und der manuellen (Messung B) DNA-Bildzytometrie.**

### 3.6 DNA-zytometrische Diagnosestellung aus Stammlinien- und Einzelzellauswertung

Aus den in Kapitel 3.4 und 3.5 dargestellten Daten wurden DNA-zytometrische Enddiagnosen pro Messung erstellt; diese sind in Tabelle 17 wiedergegeben:

Fallnummer	Manuelle Messung, flüssigkeitsbasiertes Präparat	Manuelle Messung, konventionelles Präparat	Automatisierte Messung, flüssigkeitsbasiertes Präparat	Automatisierte Messung, konventionelles Präparat
1	<b>euploid</b>	<i>aneuploid</i>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
2	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
3	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>
4	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>
5	<b>aneuploid</b>	<b>aneuploid</b>	<i>aneuploid</i>	<b>aneuploid</b>
6	<b>aneuploid</b>	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>
7	<b>aneuploid</b>	<i>aneuploid</i>	<b>aneuploid</b>	<i>aneuploid</i>
8	<b>aneuploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
9	<b>euploid</b>	-	<b>euploid</b>	-
10	<b>euploid</b>	-	<b>euploid</b>	-
11	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
12	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
13	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	-	<b>euploid</b>
14	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	-	<b>euploid</b>
15	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
16	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
17	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
18	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
19	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	-	<b>euploid</b>
20	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
21	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
22	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
23	<i>aneuploid</i>	<b>euploid</b>	<i>aneuploid</i>	<b>euploid</b>
24	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	-	<b>euploid</b>
25	<i>aneuploid</i>	<b>aneuploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
26	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
27	<b>euploid</b>	<i>aneuploid</i>	<b>euploid</b>	<i>aneuploid</i>
28	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>
29	<i>aneuploid</i>	<b>aneuploid</b>	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>
30	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>	<b>euploid</b>
31	<b>aneuploid</b>	<b>aneuploid</b>	<b>aneuploid</b>	<i>aneuploid</i>
32	<b>aneuploid</b>	<b>aneuploid</b>	<b>aneuploid</b>	<b>aneuploid</b>
33	<b>aneuploid</b>	<b>aneuploid</b>	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>
34	<i>aneuploid</i>	<b>euploid</b>	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>
35	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>	<i>aneuploid</i>	<b>euploid</b>

**Tabelle 17: Zusammenführung von DNA-Stammlinie und 9cEEs zur DNA-zytometrischen Diagnose. Fett: Beide Kriterien entsprechen Euploidie bzw. Aneuploidie. Kursiv: Aneuploid ausschließlich wegen 9cEE > 0; normal: Aneuploid ausschließlich wegen aneuploider DNA-Stammlinie**

In 27 der 35 Fälle (77%, in der Tabelle grau schattiert) war die DNA-zytometrische Diagnose für alle vier Präparate gleich. Dabei zeigte sich in 10 Fällen Aneuploidie und in 17 Euploidie. In 4 Fällen lagen nur drei Messwerte vor, weil die automatisierte Messung der flüssigkeitsbasierten Präparation nicht auswertbar war, und in 2 Fällen nur zwei Messwerte, weil keine konventionellen Präparate vorgelegen hatten.

In 2 Fällen (Fallnummer 23 und 27, in der Tabelle gelb schattiert) wurde Aneuploidie nur in jeweils einem der beiden Präparationstypen nachgewiesen.

6 Mundschleimhautläsionen, in der Tabelle weiß hinterlegt, wiesen inkonsistente Ergebnisse auf. In 2 dieser Fälle (Fallnummern 18 und 25) konnte lediglich die manuelle DNA-Zytometrie sowohl bei konventioneller als auch flüssigkeitsbasierter Präparation im Gegensatz zur automatisierten DNA-Zytometrie Aneuploidie erfassen. In 2 der verbleibenden 4 Fälle (Fallnummern 1 und 8) wurde eine Aneuploidie in nur einem Präparatetyp von nur einer DNA-bildzytometrischen Methode erfasst. In den weiteren 2 Fällen (Fallnummern 34 und 35) wurde Aneuploidie in nur einem Präparatetyp von nur einer DNA-bildzytometrischen Methode nicht erfasst.

### 3.7 Treffsicherheit der DNA-zytometrischen Diagnostik

Im Folgenden zeigen Vierfeldertafeln den Vergleich der unterschiedlichen Messmethoden (automatisierte und manuelle DNA-Zytometrie) an den unterschiedlichen Präparationsmethoden (konventioneller alkoholfixierter Abstrich, flüssigkeitsbasiertes Dünnschichtpräparat) mit dem klinischen *Follow-up*. Aufgrund des fehlenden *Follow-ups* sind jeweils 4 der ursprünglich 35 Messungen pro Methode nicht mit aufgeführt, so dass 31 Fälle berücksichtigt werden konnten. Bei zwei weiteren Mundschleimhautläsionen lagen nur flüssigkeitsbasierte Präparationen vor, so dass sich die Daten bei den konventionellen Fällen nur auf 29 Fälle beziehen:

Tabelle 18 zeigt den Abgleich der automatisierten Messung am konventionellen Präparat mit dem *Follow-up*.

<b>Automatisierte DNA-Bildzytometrie, konventionelle Präparate</b>	<b>Follow-up</b>		<b>Gesamt</b>
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	
<b>Aneuploidie</b>	10	1	11
<b>Euploidie</b>	7	11	18
<b>Gesamt</b>	17	12	29

**Tabelle 18: Vierfeldertafel mit der Zuordnung der automatisierten DNA-zytometrischen Diagnose der konventionellen Präparate zum *Follow-up*;  $p = 0,0058$**

Die Sensitivität liegt bei 59%, die Spezifität bei 92%, der positive prädiktive Wert bei 91% und der negative prädiktive Wert bei 61%.

Tabelle 19 zeigt den Vergleich der automatisierten Messung mit dem *Follow-up* für die flüssigkeitsbasierten Präparate. Es werden wie oben beschrieben 4 Messungen aufgrund fehlenden *Follow-ups* nicht aufgeführt, wobei eine dieser Messungen zudem im automatisierten Messverfahren nicht auswertbar war. 3 weitere automatisierte Messungen an flüssigkeitsbasierten Präparaten wurden ausgeschlossen, da sie ebenfalls nicht auswertbar waren.

<b>Automatisierte DNA-Bildzytometrie, flüssigkeitsbasierte Präparate</b>	<b>Follow-up</b>		<b>Gesamt</b>
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	
<b>Aneuploidie</b>	11	1	12
<b>Euploidie</b>	8	8	16
<b>Gesamt</b>	19	9	28

**Tabelle 19: Vierfeldertafel mit der Zuordnung der automatisierten DNA-zytometrischen Diagnose der flüssigkeitsbasierten Präparate zum *Follow-up*;  $p = 0,0195$**

In diesem Fall liegt die Sensitivität bei 58%, die Spezifität bei 89%, der positive prädiktive Wert bei 92% und der negative prädiktive Wert bei 50%.

Tabelle 20 zeigt den Abgleich der manuellen Messungen am konventionellen Präparat mit dem späteren Krankheitsverlauf.

<b>Manuelle DNA-Bildzytometrie, konventionelle Präparate</b>	<i>Follow-up</i>		<b>Gesamt</b>
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	
<b>Aneuploidie</b>	13	2	15
<b>Euploidie</b>	4	10	14
<b>Gesamt</b>	17	12	29

**Tabelle 20:** Vierfeldertafel mit der Zuordnung der manuellen DNA-zytometrischen Diagnose der konventionellen Präparate zum *Follow-up*;  $p = 0,0015$

Die Sensitivität berechnet sich mit 76%, die Spezifität mit 83%, der positive prädiktive Wert mit 87% und der negative prädiktive Wert mit 71%.

Abschließend ist in Tabelle 21 die Vierfeldertafel der manuellen Messungen am flüssigkeitsbasierten Präparat mit Hinblick auf das *Follow-up* dargestellt:

<b>Manuelle DNA-Bildzytometrie, flüssigkeitsbasierte Präparate</b>	<i>Follow-up</i>		<b>Gesamt</b>
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	
<b>Aneuploidie</b>	13	2	15
<b>Euploidie</b>	6	10	16
<b>Gesamt</b>	19	12	31

**Tabelle 21:** Vierfeldertafel mit der Zuordnung der manuellen DNA-zytometrischen Diagnose der flüssigkeitsbasierten Präparate zum *Follow-up*;  $p = 0,0050$

Hier beläuft sich die Sensitivität auf 68%, die Spezifität auf 85%, der positive prädiktive Wert auf 87% und der negative prädiktive Wert auf 65%.

Tabelle 22 stellt die ermittelten statistischen Maße im Vergleich miteinander dar:

Messmethode	Präparationsmethode	Sensitivität	Spezifität	Positiver prädiktiver Wert	Negativer prädiktiver Wert
manuell	flüssigkeitsbasiert	68%	85%	87%	65%
manuell	konventionell	76%	83%	87%	71%
automatisiert	flüssigkeitsbasiert	58%	89%	92%	50%
automatisiert	konventionell	59%	92%	91%	61%

**Tabelle 22:** Tabelle mit Darstellung der statistischen Kennwerte zur Treffsicherheit der DNA-Zytometrie für alle vier Messreihen

### 3.8 Vergleich der Messergebnisse von manueller sowie automatisierter DNA-Bildzytometrie an konventionellen sowie flüssigkeitsbasierten Präparaten

Im Folgenden werden die vier Messmethoden anhand von Vierfeldertafeln miteinander verglichen und mithilfe von Cohens Kappa statistisch ausgewertet.

Tabelle 23 zeigt die Übereinstimmung von automatisierter und manueller DNA-Bildzytometrie an konventionellen Präparaten. Bei insgesamt 28 übereinstimmenden Fällen (85%) errechnet sich ein Kappa-Wert von 0,689 (gute Übereinstimmung) bei einer Standardabweichung von 0,126 bei N=33.

Automatisierte DNA-Bildzytometrie, konventionelle Präparate	Manuelle DNA-Bildzytometrie, konventionelle Präparate		Gesamt
	Euploidie	Aneuploidie	
Euploidie	17	4	21
Aneuploidie	1	11	12
Gesamt	18	15	33

**Tabelle 23:** Vierfeldertafel zum Vergleich der Aneuploidiediagnostik mit automatisierter und manueller DNA-Bildzytometrie (konventionelle Präparate);  $p < 0,0001$

Tabelle 24 zeigt denselben Vergleich anhand der Messungen an flüssigkeitsbasierten Präparaten. 4 Fälle mussten hier bei fehlendem Messpartner ausgeschlossen werden. Es

ergibt sich bei insgesamt 28 übereinstimmenden Ploidie-Diagnosen (90%) ein Kappa-Wert von 0,807 (gute Übereinstimmung) bei einer Standardabweichung von 0,104 bei N=31.

<b>Automatisierte DNA-Bildzytometrie, flüssigkeitsbasierte Präparate</b>	<b>Manuelle DNA-Bildzytometrie, flüssigkeitsbasierte Präparate</b>		<b>Gesamt</b>
	<b>Euploidie</b>	<b>Aneuploidie</b>	
<b>Euploidie</b>	15	3	18
<b>Aneuploidie</b>	0	13	13
<b>Gesamt</b>	15	16	31

**Tabelle 24: Vierfeldertafel zum Vergleich der Aneuploidiediagnostik mit automatisierter und manueller DNA-Bildzytometrie (flüssigkeitsbasierte Präparate);  $p < 0,0001$**

Vergleicht man die automatisierte DNA-Bildzytometrie an konventionellen Präparaten mit derselben Messmethode an flüssigkeitsbasierten Präparaten (Tabelle 25) ergibt sich unter Ausschluss von insgesamt 6 Fällen bei fehlendem Messpartner bei 26 übereinstimmenden Fällen ein Kappa-Wert von 0,789 (gute Übereinstimmung) mit einer Standardabweichung von 0,115 bei N= 29.

<b>Automatisierte DNA-Bildzytometrie, konventionelle Präparate</b>	<b>Automatisierte DNA-Bildzytometrie, flüssigkeitsbasierte Präparate</b>		<b>Gesamt</b>
	<b>Euploidie</b>	<b>Aneuploidie</b>	
<b>Euploidie</b>	15	2	17
<b>Aneuploidie</b>	1	11	12
<b>Gesamt</b>	16	13	29

**Tabelle 25: Vierfeldertafel zum Vergleich der Aneuploidiediagnostik mit automatisierter DNA-Bildzytometrie an konventionellen bzw. flüssigkeitsbasierten Präparaten;  $p < 0,0001$**

Einen ebenso aufgebauten Vergleich anhand der manuellen DNA-Bildzytometrie an konventionellen und flüssigkeitsbasierten zytologischen Präparaten zeigt Tabelle 26. Hier wurden bei fehlendem Messpartner 2 Messungen ausgeschlossen. Es zeigen sich 28 übereinstimmende Fälle bei 33 Messvergleichen (85%), was einen Kappa-Wert von 0,696 (gute Übereinstimmung) bei einer Standardabweichung von 0,125 ergibt.

Manuelle DNA-Bildzytometrie, konventionelle Präparate	Manuelle DNA-Bildzytometrie, flüssigkeitsbasierte Präparate		Gesamt
	Euploidie	Aneuploidie	
Euploidie	15	3	18
Aneuploidie	2	13	15
<b>Gesamt</b>	17	16	33

Tabelle 26: Vierfeldertafel zum Vergleich der Aneuploidiediagnostik mit manueller DNA-Bildzytometrie an konventionellen bzw. flüssigkeitsbasierten Präparaten;  $p < 0,0001$

### 3.9 Vergleich von zytologischer Diagnostik und DNA-Bildzytometrie

Mittels Darstellung in Vierfeldertafeln und Auswertung nach Cohen's Kappa wurde die qualitative zytologische Diagnose mit dem Messergebnis der verschiedenen Messmodalitäten verglichen.

Tabelle 27 zeigt die Übereinstimmung der qualitativen Diagnose mit den Messergebnissen der automatisierten DNA-Bildzytometrie an konventionellen Präparaten in absoluten Zahlen.

Zytologie-Kategorien	Automatisierte DNA-Bildzytometrie, konventionelle Präparate		Gesamt
	Euploidie	Aneuploidie	
Negativ / zweifelhaft	19	7	26
Positiv / dringender Verdacht	2	5	7
<b>Gesamt</b>	21	12	33

Tabelle 27: Vierfeldertafel zum Vergleich der qualitativen zytologischen Diagnose mit der automatisierten DNA-Bildzytometrie an konventionellen Präparaten,  $p = 0,0298$

Bei 24 übereinstimmenden Diagnosen (73%) beträgt Cohens Kappa 0,353 (leichte Übereinstimmung) bei einer Standardabweichung von 0,165 (N=33).

Tabelle 28 stellt die Übereinstimmung der qualitativen zytologischen Diagnose mit den Messergebnissen der automatisierten DNA-Bildzytometrie an flüssigkeitsbasierten Präparaten dar.

Zytologie-Kategorien	Automatisierte DNA-Bildzytometrie, flüssigkeitsbasierte Präparate		Gesamt
	Euploidie	Aneuploidie	
Negativ / zweifelhaft	14	8	22
Positiv / dringender Verdacht	4	5	9
<b>Gesamt</b>	18	13	31

**Tabelle 28: Vierfeldertafel zum Vergleich der qualitativen zytologischen Diagnose mit der automatisierten DNA-Bildzytometrie an flüssigkeitsbasierten Präparaten,  $p > 0,05$  (nicht signifikant)**

In der Berechnung nach Cohen`s Kappa ergibt sich bei 19 übereinstimmenden Diagnosen (61%) ein Kappa-Wert von 0,170 (schwache Übereinstimmung) bei einer Standardabweichung von 0,174 (N=31).

Tabelle 29 zeigt die Übereinstimmung der qualitativen zytologischen Diagnose mit der manuellen DNA-Bildzytometrie an konventionellen Präparaten in absoluten Zahlen.

Zytologie-Kategorien	Manuelle DNA-Bildzytometrie, konventionelle Präparate		Gesamt
	Euploidie	Aneuploidie	
Negativ / zweifelhaft	17	9	26
Positiv / dringender Verdacht	1	6	7
<b>Gesamt</b>	18	15	33

**Tabelle 29: Vierfeldertafel zum Vergleich der qualitativen zytologischen Diagnose mit der manuellen DNA-Bildzytometrie an konventionellen Präparaten,  $p = 0,0160$**

Für diesen Vergleich berechnet sich der Kappa-Wert bei insgesamt 23 Übereinstimmungen (70%) als 0,360 (leichte Übereinstimmung); die Standardabweichung beträgt 0,144 (N=33).

Im Vergleich der qualitativen zytologischen Diagnose mit der manuellen DNA-Bildzytometrie an flüssigkeitsbasierten Präparaten (Tabelle 30) liegt der Kappa-Wert bei 0,225 (leichte Übereinstimmung) bei einer Standardabweichung von 0,152. Auch in diesem Fall wurden die zytologisch zweifelhaften und dringend verdächtig gewerteten Fälle wie oben benannt zugeordnet. Es ergeben sich 22 Übereinstimmungen (63%) bei N=35:

Zytologie-Kategorien	Manuelle DNA-Bildzytometrie, flüssigkeitsbasierte Präparate		Gesamt
	Euploidie	Aneuploidie	
<b>Negativ / zweifelhaft</b>	16	10	26
<b>Positiv / dringender Verdacht</b>	3	6	9
<b>Gesamt</b>	19	16	35

**Tabelle 30:** Vierfeldertafel zum Vergleich der qualitativen zytologischen Diagnose mit der manuellen DNA-Bildzytometrie an flüssigkeitsbasierten Präparaten,  $p > 0,05$  (nicht signifikant)

### 3.10 Diskrepante DNA-Ploidie-Diagnosen mit Bezug zum klinischen Follow-Up

Im Folgenden gibt Tabelle 31 detailliert die Fälle wieder, welche hinsichtlich der automatisierten und manuellen DNA-Bildzytometrie eine diskrepante DNA-Ploidie-Diagnose aufweisen. Dabei sind in der Tabelle alle Werte nach den jeweiligen Fall- und Messnummern sowie nach Einzelzell- sowie Stammlinien-Aneuploidie und unter Bezug auf das jeweilige *Follow-up* aufgelistet.

Fall-Nr.	Mess-Nr.	Präparat	DNA-Zytometrie	DNA-Ploidie	DNA-Stammlinien	Anzahl der 9cEE	Follow-up
1	1.1	konventionell	automatisiert	Euploidie	1,98 c	0	positiv
	1.2		manuell	Aneuploidie	4,00 c	2	
8	8.3	flüssigkeitsbasiert	automatisiert	Euploidie	2,02 c	0	positiv
	8.4		manuell	Aneuploidie	3,18 c	2	
18	18.1	konventionell	automatisiert	Euploidie	2,02 c; 4,29 c	0	negativ
	18.2		manuell	Aneuploidie	2,01 c; 4,15 c	1	
	18.3	flüssigkeitsbasiert	automatisiert	Euploidie	2,03 c; 4,21 c	0	negativ
	18.4		manuell	Aneuploidie	1,96 c; 4,03 c	1	
25	25.1	konventionell	automatisiert	Euploidie	1,99 c	0	positiv
	25.2		manuell	Aneuploidie	2,57 c; 5,00 c	2	
	25.3	flüssigkeitsbasiert	automatisiert	Euploidie	1,94 c	0	positiv
	25.4		manuell	Aneuploidie	1,99 c	1	
34	34.1	konventionell	automatisiert	Aneuploidie	2,01 c	1	-
	34.2		manuell	Euploidie	2,03 c; 4,00 c	0	
35	35.1	konventionell	automatisiert	Euploidie	1,97 c	0	positiv
	35.2		manuell	Aneuploidie	4,01 c; 2,21 c	0	

**Tabelle 31: Tabellarische Übersicht der diskrepanten DNA-bildzytometrischen Messungen**

Es lag bei 5 Messpaaren (62,5%) eine Einzelzell-Aneuploidie, bei einem Messpaar (12,5%) eine Stammlinien-Aneuploidie sowie bei 2 Messpaaren (25%) eine kombinierte Stammlinien- und Einzelzellaneuploidie vor. 7 der 8 Messpaare sind in der manuellen DNA-Bildzytometrie aneuploid und in der automatischen DNA-Bildzytometrie euploid gemessen worden. Nur bei einem Fall war dieses gegenteilig (Einzelzellaneuploidie, Mess-Nummer 34.1).

Bei einem der 8 Messpaare konnte das *Follow-up* nicht ermittelt werden. Bei 5 der 7 Messpaare (71,4%), in welchen ein *Follow-up* ermittelt werden konnte, bestätigte das *Follow-up* die aneuploide Diagnose mit einem positiven weiteren Verlauf. Bei 2 Messpaaren (28,6%) blieb es im weiteren Verlauf bei einem negativen Befund.

## 4 Diskussion

Maligne Läsionen der Mundhöhle, welche in 90% der Fälle orale Plattenepithelkarzinome sind, sind mit einer jährlichen Inzidenz von 377.713 für das Jahr 2020 und 177.757 Todesfällen im selben Jahr eine aggressive und lebensbedrohliche Erkrankung [1]. Fanconi-Anämie-Patienten tragen neben weiteren zahlreichen Risiken ein mit circa 700fach gegenüber der Normalbevölkerung deutlich erhöhtes Risiko für teils multifokale Neoplasien der Mundhöhle, komplizierend kombiniert mit einer Knochenmarksinsuffizienz, die in einer panzytopenen Blutungsdiathese und Infektneigung resultieren kann, sowie in einer Hypersensitivität für chemotherapeutische und radioonkologische Therapien [8, 62].

Um die Chance auf eine kurative Therapieoption zu erhöhen, ist die möglichst frühe Diagnose daher besonders wichtig. Hierzu bedarf es einer zeitnahen diagnostischen Abklärung jeder Veränderung der Mundschleimhaut, welche länger als 14 Tage persistiert, nicht abheilt, rezidivierend blutet, persistierend schmerzt oder sogar die Funktionalität der Mundhöhle behindert [2, 11, 13, 26, 89]. Der diagnostische Goldstandard des oralen Plattenepithelkarzinoms ist die invasive Entnahme einer Gewebeprobe jeder auffälligen Läsion mit histopathologischer Untersuchung [89].

Die Invasivität dieser diagnostischen Methodik stellt jedoch für eine gehörige Zahl von Patienten ein Hindernis dar. Zum einen kommt es aufgrund der aufwändigen Biopsientnahme mit potenziellen Risiken wie Blutung oder Infektion häufig zu einer geringeren Patientencompliance, insbesondere dann wenn es sich um multilokuläre oder chronisch-rezidivierende Befunde handelt, zum anderen haben insbesondere die an der Fanconi-Anämie vorerkrankten Patienten aufgrund der häufig begleitenden Knochenmarksinsuffizienz ein erhöhtes Risiko für Komplikationen der Gewebsbiopsie [90]. Allein bei 6 der in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurden Bürstenabstriche von unterschiedlichen suspekten Läsionen der Mundschleimhaut bei multilokulärem Befund untersucht. Vor dem Hintergrund der oft multifokalen Erkrankung und einem komorbiden Patientengut besteht ein dringender klinischer Bedarf nach einer alternativen, minimal-invasiven Abklärungsmethode klinisch auffälliger Mundschleimhautläsionen.

Eine alternative Möglichkeit der nicht invasiven Abklärung dieser Läsionen bei Betroffenen mit Fanconi-Anämie stellt die Bürstenzytologie dar [50], die in Düsseldorf bereits seit längerem unter Einschluss der manuellen DNA-Bildzytometrie bei

zytologisch unklaren Befunden praktiziert wird [23]. Im Funktionsbereich Cytopathologie des Instituts für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf werden sowohl ein manuelles wie auch ein automatisiertes DNA-Bildzytometer genutzt. Aufgrund der engen Verbundenheit und langjährigen wissenschaftlichen Kooperation der Cytopathologie Düsseldorf mit der Deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe e.V. wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Bürstenabstriche der Mundschleimhaut auffälliger Läsionen von Fanconi-Anämie-Betroffenen mittels DNA-Bildzytometrie auf das Vorliegen einer DNA-Aneuploidie untersucht. Dabei wurden sowohl konventionell alkoholfixierte Präparate wie auch flüssigkeitsbasierte Dünnschichtpräparate verwendet.

Die DNA-bildzytometrische Ploidie-Diagnostik unter Nutzung von zytologischen Bürstenabstrichen gilt als etablierte Methode zur Abklärung klinisch auffälliger Mundschleimhautläsionen für Patienten, die an einer Fanconi-Anämie leiden. So konnte die Arbeitsgruppe um Velleuer kürzlich zeigen, dass die kombinierte Anwendung zytologischer und DNA-bildzytometrischer Diagnostik bei Bürstenabstrichen von Mundschleimhautläsionen bei Fanconi-Anämie-Betroffenen eine exzellente Sensitivität und Spezifität von 100% und 92,2% aufweisen. Es wurden 63% maligner oder obligat präkanzeröser Läsionen in einem nicht invasiven oder frühen Stadium diagnostiziert, was im Vergleich mit den Daten des Internationalen Fanconi Anämie Registers [62] die Erkennung hin zu früheren Stadien verschiebt und so zu einer erfreulicheren Prognose führt [23]. Von diesen Patienten mit *high-grade* oraler epithelialer Dysplasie oder Plattenepithelkarzinom im lokalen Tumorstadium T1 ist bis Ende des Auswertungszeitraums keiner an der oralen Läsion verstorben. Die Prognose ist insbesondere in den höheren Tumorstadien ab T2 schlechter. Insgesamt ist nach den Daten des Internationalen Fanconi Anämie Registers die 5-Jahresüberlebensrate der Kopf-Halserkrankungen ohne Angabe der Stadien 47% [62]. In der genannten Studie von Velleuer et al. bestätigen die hohe Sensitivität und Spezifität bei nicht invasiver Probenentnahme die gute Treffsicherheit dieses diagnostischen Mittels. Allerdings ist insbesondere die manuelle DNA-Bildzytometrie diagnostisch aufwändig und muss von erfahrenem Personal durchgeführt werden, was die klinische Anwendbarkeit der Methodik begrenzt.

Eine manuell durchgeführte DNA-Bildzytometrie nimmt im Mittel bei der Messung einiger hundert Zellkerne etwa 40 bis 60 Minuten Zeit in Anspruch und bindet den Untersucher während dieser Zeit an den Arbeitsplatz der DNA-Bildzytometrie [91].

Deswegen werden auf diese Weise vor allem zytologische Abstriche weiter untersucht, deren konventionelle mikroskopische Diagnose unklar ist. Das heißt die Diagnosekategorie ist „zweifelhaft“ oder „dringender Verdacht“. Negative oder positive zytologische Diagnosen sind ausreichend sicher, was auch im Besonderen für die Mundschleimhautabstriche der Fanconi-Anämie-Betroffenen gilt [23]. Allerdings gibt es selten zytologisch (falsch) negative Läsionen, die doch in der DNA-Bildzytometrie durch eine DNA-Aneuploidie auffallen. Zytologisch negative Befunde können aber aufgrund des Zeitaufwands der manuellen Zytometrie bisher nicht regulär weiter untersucht werden. Die automatisierte DNA-Bildzytometrie dagegen verlangt die Anwesenheit des Untersuchers lediglich zu Beginn und Ende einer jeden Messung zur Vorbereitung der Messung und Kalibrierung des Mikroskops sowie zur Sichtung der *Image Gallery* und gegebenenfalls der Umklassifizierung einzelner Zellkerne in andere Subgruppen. In der vorliegenden Arbeit hatten die automatisierten DNA-bildzytometrischen Messungen eine Dauer von teilweise bis zu 180 Minuten ohne Präsenz, die Vor- und Nachbearbeitung und damit die personelle Bindung an den Arbeitsplatz dauerte bis zu 20 Minuten an. Um diese Zeitersparnis auch im klinischen Alltag nutzen zu können, scheint die Implementierung des automatisierten Messverfahrens in die klinische Routine prinzipiell sinnvoll.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit dem Vergleich der bereits etablierten manuellen DNA-Bildzytometrie und der neuen automatisierten DNA-Bildzytometrie anhand unterschiedlicher Verarbeitungsmethoden der oralen zytologischen Bürstenabstriche. Zudem wurde anhand der erhobenen Daten die Treffsicherheit der zytologischen Diagnose im Hinblick auf das *Follow-up* erhoben.

Insgesamt gibt es kaum Literatur zum Vergleich der manuellen mit der automatisierten DNA-Bildzytometrie. Am Funktionsbereich Cytopathologie des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf wurden aber bereits mehrere Forschungsprojekte bezüglich der manuellen sowie der automatisierten DNA-Bildzytometrie anhand unterschiedlicher Zellpopulationen durchgeführt. So gehen in den Vergleich der vorliegenden Studie mit der Literatur Arbeiten an Prostatakarzinomen, Schilddrüsenpräparaten sowie Pleuraergüssen mit ein [92-94].

## 4.1 Optimierung der flüssigkeitsbasierten Zytologie für die automatisierte DNA-Bildzytometrie

Initial wurden 28 gepaarte flüssigkeitsbasierte und konventionelle Präparationen manuell und automatisiert DNA-bildzytometrisch untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass das automatisierte Zytometer Schwierigkeiten bei der Messung zellarmer Präparate hatte. Manche Präparate mussten wiederholt gemessen werden, da die Fokusebene verloren ging und weitere Zellen bis zum Ende des Messvorgangs nicht detektiert wurden, da sie entweder defokussiert waren oder als nicht sichtbar weit außerhalb der Fokusebene lagen. 5 Präparatepaare wurden so aus der Studie genommen. Dieses Problem war im Funktionsbereich Cytopathologie so bisher nicht bekannt und es wurde in der Folge die Präparation flüssigkeitsbasierter Präparate standardisiert. Hierzu wird nun zunächst das zellhaltige Fixationsmedium flüssigkeitsbasierter Bürstenabstriche in ein Spitzröhrchen überführt und zentrifugiert. Die Menge der so pelletierten Zellen wird durch Abgleich mit einem Standard bestimmt. Pro herzustellendem Objektträger werden jetzt 5 Mikroliter Zellen resuspendiert und zytozentrifugiert. Das Erkennen dieses Optimierungsbedarfs ist, wie bereits oben erwähnt, ein wesentliches methodisches Ergebnis der vorliegenden Arbeit.

## 4.2 Treffsicherheit der qualitativen zytologischen Diagnose

Der Abgleich der zytologischen Diagnose mit dem klinischen Verlauf ist wichtig, um abschätzen zu können, ob sich maligne transformierte Zellen überhaupt im Untersuchungsmaterial, welches dann anschließend weiter DNA-bildzytometrisch untersucht wurde, befinden. Bei der binären Aufteilung der qualitativen zytologischen Diagnosen zur Bestimmung der diagnostischen Treffsicherheit mittels Vierfeldertafeln besteht die Problematik der statistischen Einordnung der zytologisch als zweifelhaft oder als dringend verdächtig eingeordneten Fälle. Diese beiden Diagnosekategorien wurden bei dem Vergleich mit dem *Follow-up* einmal als statistisch positiv und einmal als statistisch negativ bewertet. Außerdem wurde gemäß der differenten Vortest-Wahrscheinlichkeit für zweifelhafte und dringend verdächtige zytologische Diagnosen zudem eine dritte Berechnung mit Einteilung der zytologisch zweifelhaften zu den

statistischen negativen Ergebnissen sowie der zytologisch dringend verdächtigen zu den statistisch positiven Ergebnissen durchgeführt [23].

Dabei zeigt sich im Falle der Wertung der zweifelhaften und dringend verdächtigen Befunde als statistisch positiv eine höhere Sensitivität mit 94% an konventionellen Präparaten und 79% Sensitivität an flüssigkeitsbasierten Präparaten als bei der Wertung dieser Fälle als statistisch negativ (41% und 37%). Da in diese Studie mit zweien insgesamt nur wenige zytologisch als dringend verdächtig klassifizierte Mundschleimhautläsionen eingehen, beträgt die Sensitivität bei der statistischen Einordnung dieser zu den positiven Diagnosen, sowie der statistischen Einordnung der zweifelhaft klassifizierten Läsionen zu den negativen Diagnosen eine sehr ähnliche Sensitivität wie bei der statistischen Einordnung beider Gruppen zu den negativen Diagnosen (41% und 42%). Insgesamt ist die Sensitivität bei konventionellen Präparaten besser als bei flüssigkeitsbasierten. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Optimierung und Standardisierung der Präparation.

In der vorliegenden Arbeit wird keine kontrollierte klinische Kohorte untersucht, daher ist die diagnostische Treffsicherheit nur sehr begrenzt vergleichbar. Dennoch ist im Vergleich mit der einzigen weiteren Studie zur oralen Bürstenzytologie bei Fanconi-Anämie die Sensitivität 97,7%, die bei Velleuer et al. bei Einordnung der zweifelhaften und dringend verdächtigen Läsionen als statistisch positiv erreicht wurden. Ein Grund hierfür könnte in dem deutlich größeren Patientenkollektiv liegen. Bei Velleuer et al. wurden insgesamt 1233 klinisch auffällige Mundschleimhautläsionen untersucht [23]. Auch wurde dort jeweils die zytologische Diagnose mit der höheren Kategorie in die Berechnung der Treffsicherheit einbezogen, wenn es sowohl konventionelle als auch flüssigkeitsbasierte Präparate einer Läsion gab. Es wird ebenso deutlich, dass die Sensitivität der Bürstenzytologie lediglich zufriedenstellend ist, wenn die zweifelhaften Diagnosen im Sinne eines Suchtests als statistisch positiv gewertet werden, trotz der ermittelten nur ca. 1/3 betragenden Wahrscheinlichkeit für ein positives *Follow-up*. Falsch „positive“ zytologische Diagnosen würden so vermehrt in Kauf genommen. Bisherige Philosophie ist es, möglichst durch Anschluss einer manuellen DNA-Bildzytometrie und Ausschluss bzw. Nachweis von DNA-Aneuploidie dieses Risiko falsch „positiver“ zytologischer Befunde zu reduzieren.

Die Spezifität ist mit jeweils 100% allerdings bei der Wertung der zweifelhaften und dringend verdächtigen Fälle als statistisch negativ höher als bei der statistisch positiven Wertung derselben (jeweils 75%). Somit liegt in diesem Falle auch der positive prädiktive Wert bei 100%, was eine perfekte Übereinstimmung qualitativ zytologisch positiver Befunde mit mindestens einer hochgradigen oralen epithelialen Dysplasie oder einem invasiven Karzinom zeigt. Allerdings geht dies zu Lasten einer nicht akzeptabel niedrigen Sensitivität. Dies gilt auch für die wie oben erläutert unterschiedliche statistische Einordnung der zweifelhaften und dringend verdächtigen Läsionen. Hier beträgt die Spezifität bei der Berechnung an konventionellen Präparaten 100%, bei der Berechnung an flüssigkeitsbasierten Präparaten 92%, allerdings bleibt die Sensitivität inakzeptabel niedrig. Insbesondere die qualitativ zytologisch zweifelhaft und dringend verdächtig klassifizierten Fälle könnten somit von einer weiteren Abklärung mittels standardisierter DNA-Bildzytometrie profitieren, welche im Falle des automatisierten Messverfahrens eine deutlich kürzere Bindung des vorhandenen Personals an den Arbeitsplatz der DNA-Bildzytometrie bedeuten würde und somit besser in den regulären Arbeitsalltag zu integrieren wäre [91].

In der Mehrzahl erreicht die Berechnung der diagnostischen Treffsicherheit an den konventionellen Präparaten bessere Ergebnisse als an den flüssigkeitsbasierten Präparaten (vergleiche auch Tabelle 12). Dies ist am ehesten auf die initial nicht standardisierte Anfertigung der flüssigkeitsbasierten Präparationen zurückzuführen, die wie oben bereits erläutert teils zu zellarm waren. Einige der nicht zu messenden Präparate fielen daher aus dieser Studie und somit aus den obigen Berechnungen der Treffsicherheit heraus. Andere zu messende, immer noch suboptimale Präparationen gingen aber in die Auswertungen der Studie mit ein, was letztlich die teils schlechteren Werte von Sensitivität und Spezifität erklären kann. Die flüssigkeitsbasierte Zytologie von oralen Mundschleimhautläsionen muss nicht notwendigerweise eine schlechtere Treffsicherheit ergeben als für konventionelle Abstriche. Für Betroffene mit Fanconi-Anämie liegen hier keine Ergebnisse in der Literatur vor. Für die allgemeine Bevölkerung berichten Remmerbach et al. aber in einer Studie an aufgeteiltem Zellmaterial eines oralen Bürstenabstriches über eine Sensitivität für flüssigkeitsbasierte Präparate von 97,5% bei besserer Präparatequalität hinsichtlich störender Beimengungen durch Blut und Zellüberlappungen im Vergleich zu einer Sensitivität von 96,3% für konventionelle

Ausstrichpräparate. Allerdings war die Spezifität der flüssigkeitsbasierten Präparate hier mit 68,8% deutlich schlechter als die der konventionellen Zytologie mit 90,6% [95].

### 4.3 Gegenüberstellung der gemessenen Analysezellen bei manueller und automatisierter DNA-Bildzytometrie an flüssigkeitsbasierten und konventionellen Präparaten

Stellt man die Anzahl gemessener Zellkerne im Rahmen der manuellen und der automatisierten DNA-Bildzytometrie einander gegenüber, muss dringend beachtet werden, dass die Anzahl sich bereits aufgrund des unterschiedlichen Messvorgangs unterscheidet. Während bei der manuellen Messung die Zellkerne vom Untersucher selbst aus- und angewählt werden, erfolgt die Auswahl, Speicherung und Gruppierung der Zellkerne bei der automatisierten Messmethode automatisch anhand von in der Software enthaltenen und mittels KI-Algorithmen entwickelter Zellklassifikatoren. In diesem grundlegenden Unterschied liegen die unterschiedlich gemessenen Anzahlen der Zellkerne begründet. Eine manuelle Messung benötigt zur validen Aussage eines Ergebnisses zumindest 30 Referenz- und mehrere hundert Analysezellen umfassen, soweit möglich. Diese Zahlen weit überschreitende Mengen an gemessenen Zellen sind unüblich, da sie zur Diagnosestellung primär nicht notwendig sind, sofern der Untersucher eine repräsentative Menge der einzelnen Zellreihen wie normaler und atypischer Epithelzellen, Granulozyten oder Lymphozyten auswählt. Ein Vorteil der automatisierten DNA-Bildzytometrie liegt darin, dass aufgrund des schnelleren und automatisierten Verfahrens alle Zellen eines Präparates, beziehungsweise des durch den Untersucher ausgewählten Bereichs, erfasst werden können und mithilfe des Klassifikators typisiert werden. Folglich sind die Mengen der gemessenen Zellen im automatisierten Verfahren üblicherweise größer [96]. Die hohe Anzahl gemessener Zellen in der automatisierten DNA-Bildzytometrie ist möglicherweise ein Vorteil, da durch die sehr hohe Anzahl gemessener Zellen auch mehr (aus relativ wenigen Zellen im Präparat bestehende) Stammlinien sichtbar werden könnten, welche bei der manuellen Messung möglicherweise nicht auffallen [73].

Am meisten Analysezellen wurden mit 8173 Zellen in einer automatisierten DNA-Bildzytometrie an einem flüssigkeitsbasierten Präparat erhoben (siehe auch Tabelle 14).

Dies entspricht den Erwartungen, zum einen, da es wie oben erläutert in der Natur der automatisierten DNA-Bildzytometrie liegt, möglichst alle Zellen des zu messenden Bereichs zu erfassen, zum anderen, da die flüssigkeitsbasierte Präparation das Ziel hat, die einzelnen Zellen des Präparats besser zu vereinzeln und Bestandteile wie beispielsweise Blutzellen auszuwaschen, was prinzipiell ebenfalls den Messvorgang verbessert.

In 61% der ausgewerteten manuellen DNA-bildzytometrischen Messungen wurden anhand des flüssigkeitsbasierten Präparates mehr Analysezellen gemessen als anhand des konventionellen Präparates. Bei den automatisierten DNA-bildzytometrischen Messungen wurden zu 62% anhand der flüssigkeitsbasierten Präparate mehr Analysezellen gemessen. Als Grund hierfür kommt möglicherweise ebenso eine leicht bessere Messbarkeit aufgrund weniger Zellüberlagerungen infrage [97].

#### 4.4 Treffsicherheit der DNA-Bildzytometrie bei verschiedenen Mess- und Präparationsmethoden

Die Bestimmung der diagnostischen Treffsicherheit der DNA-Zytometrie anhand von klinischen *Follow-up* Daten ist nicht das Hauptziel der vorliegenden Arbeit. Es sollen hier in erster Linie die Messergebnisse der unterschiedlichen Präparationen und Messmethoden miteinander verglichen werden. Dennoch liegen *Follow-up* Daten vor, anhand derer Daten für die diagnostische Treffsicherheit abgeleitet werden können. Allerdings muss erneut darauf hingewiesen werden, dass es sich hier nicht um eine Kohorte handelt, sondern um anhand der zytologischen Diagnosekategorien aus methodischen Gründen selektierte Mundschleimhautläsionen. 117 der automatisierten und manuellen DNA-bildzytometrischen Messungen an konventionellen und flüssigkeitsbasierten Präparaten konnten mit dem klinischen *Follow-up* zur Bestimmung der Treffsicherheit abgeglichen werden. Insgesamt waren 132 Messungen auswertbar, für 15 der Messungen an 8 verschiedenen Präparaten lagen aber keine *Follow-up* Daten vor. Die höchste Sensitivität für mindestens eine hochgradige orale epitheliale Dysplasie oder ein Plattenepithelkarzinom betrug 76% bei den manuellen Messungen an den konventionellen alkoholfixierten Präparaten. Die niedrigste Sensitivität wurde mit 58% beim automatisierten Messverfahren an den Dünnschichtpräparaten verzeichnet. Die höchste Spezifität zeigte sich mit 92% bei den automatisierten Messungen an den konventionellen Präparaten, die niedrigste Spezifität mit 83% an den manuellen

Messungen an den konventionellen Präparaten. Insgesamt erwiesen sich die Werte für Sensitivität und Spezifität bei den Messungen an konventionellen Präparaten als höher.

In der Literatur finden sich bei Messungen mit einem automatisierten DNA-Bildzytometrie-System (*iClearCyte*) rein an flüssigkeitsbasierten Bürstenabstrichpräparaten (n=214) von Plattenepithelkarzinomen, Carcinomata in situ, hochgradigen Dysplasien sowie negativen und reaktiven Läsionen Werte für die Sensitivität von 100% und die Spezifität von 86,7% [98]. Letztlich ist die Vergleichbarkeit der Arbeiten aufgrund unterschiedlicher Grundvoraussetzungen der Studienkollektive und Definitionen für DNA-Aneuploidie aber eingeschränkt. Insbesondere wurden dort Kriterien für Aneuploidie angelegt, die nicht den ESACP-Kriterien [66, 73, 80, 81] entsprechen.

Ma et al. beschreiben in einer Veröffentlichung aus 2014 eine Studie mit automatisierter DNA-Bildzytometrie an konventionellen Präparaten von klinisch auffälligen Mundschleimhautläsionen [15]. Hierbei wurden insgesamt 52 Präparate von Patienten mit klinisch auffälligen Mundschleimhautläsionen untersucht. Es erfolgte zudem eine Biopsie jeder Läsion. Der Bürstenabstrich und die Biopsie wurden nachgehend in jeweils unterschiedlichen Institutionen untersucht. Die Definition der Stammlinien-Aneuploidie entsprach in dieser Studie der der hier vorliegenden Arbeit. Die Einzelzell-Aneuploidie wurde aber bereits ab einem DNA-Gehalt einzelner Zellkerne von  $\geq 5c$  festgelegt. Sensitivität und Spezifität wurden im Hinblick auf das histopathologische Ergebnis der untersuchten Biopsie berechnet und betragen 86,36% und 90%. Zum Vergleich betragen Sensitivität und Spezifität für die automatisierte DNA-Bildzytometrie an konventionellen Präparaten der eigenen Studie 59% und 92%. Ursache für die niedrigere Sensitivität dürfte die weitaus strengere Definition von Einzelzellaneuploidie der eigenen Arbeit sein.

Böcking et al. beschreiben in einer Studie mit automatisierten Messungen des *MotiCyte* Systems an 92 entnommenen flüssigkeitsbasierten Präparaten von klinisch auffälligen Mundschleimhautabstrichen von insgesamt 40 Fanconi-Anämie-Betroffenen eine diagnostische Gesamtgenauigkeit von 84,8% im Vergleich zu 76,1% bei der Zytologie. Bei ihrer Studie wurde ein Teil der flüssigkeitsbasierten Präparate von Mundschleimhautabstrichen von Fanconi-Anämie-Patienten aus dem Pool von Velleuer et al. verwendet.

Ebenso wurde ein Teil dieser Präparate in der hier vorliegenden Arbeit verwendet [23, 96]. Die Definitionen für den Referenzstandard bezüglich des *Follow-ups* und die DNA-Aneuploidie (eine einzelne Zelle mit einem DNA-Gehalt von größer 9c oder eine Stammlinie kleiner oder größer 1,8 bis 2,2c oder 3,6 bis 4,4c) stimmten dabei jeweils überein. Allerdings wurden bei Böcking et al. Mundschleimhautabstriche aus den Jahren 2016 bis 2018 verwendet, während in der hier vorliegenden Arbeit überwiegend Mundschleimhautabstriche älteren Datums untersucht wurden. Wie bereits oben erwähnt, wurde die Durchführung der Präparation nach den ersten der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen optimiert, um zellreichere flüssigkeitsbasierte Präparationen zu gewinnen und dadurch die Messgenauigkeit der automatisierten DNA-Bildzytometrie zu verbessern.

## 4.5 Übereinstimmung der peridiploiden und peritetraploiden Stammlinien-Modalwerte

Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich der Messergebnisse der neuen automatisierten DNA-Bildzytometrie mit der bereits langjährig etablierten manuellen DNA-Bildzytometrie an konventionellen und flüssigkeitsbasierten zytologischen Mundschleimhautabstrichpräparaten von Betroffenen mit Fanconi-Anämie.

Durch die Erstellung und folgende Interpretation eines Bland-Altman-Diagramms kann eine Aussage über den Vergleich zweier Messmethoden miteinander getroffen werden. Mit diesem Diagrammtyp können systematische Abweichungen, einzelne Ausreißer oder Abhängigkeiten der Varianz von der Größe der Messwerte ermittelt und interpretiert werden. Die Interpretation bleibt dabei eine klinische Bewertung. In diesem Fall war der Vergleich der langjährig etablierten manuellen DNA-Bildzytometrie mit der neueren automatisierten DNA-Bildzytometrie vorgesehen.

Im Rahmen der statistischen Prüfung der Übereinstimmung mittels Bland-Altman-Diagrammen der sowohl manuell als auch automatisiert DNA-bildzytometrisch gemessenen peridiploiden und peritetraploiden Stammlinien-Modalwerte an jeweils konventionellen und flüssigkeitsbasierten Präparaten zeigte sich allseits eine zumindest hinreichende Übereinstimmung der Werte, was eine akzeptable Korrelation zwischen den zwei Messverfahren bedeutet und auf eine gute Zuverlässigkeit auch der automatisierten DNA-Bildzytometrie hinweist. Zu begründen ist dieses Ergebnis damit, dass die

ermittelten Mittelwerte und Differenzen bis auf eine einzige Ausnahme innerhalb der jeweils berechneten doppelten Standardabweichungen zu liegen kommen, was als hoher Qualitätsstandard angesehen wird [99].

## 4.6 Vergleich der Detektion von Einzelzellaneuploidie (9cEEs)

Der Vergleich der 9cEEs im Rahmen der Bland-Altman-Statistik zeigt keine Normalverteilung der gemessenen Zellkerne, sodass hier eine weitere statistische Auswertung mit der Methode nicht möglich ist.

Es erfolgte aber der numerische Vergleich der gemessenen 9cEEs. Hier konnte dargestellt werden, dass in 62% der Messergebnisse in allen Messmodalitäten 9cEEs erkannt wurden beziehungsweise in allen Messmodalitäten keine 9cEEs erkannt wurden (18 kongruente von insgesamt 29 auswertbaren Fällen). Zusätzlich waren in 6 weiteren Läsionen die auswertbaren Messungen ebenfalls kongruent. Bezieht man diese Fälle ebenfalls mit ein, handelte es sich um 24 kongruente Fälle bei 35 vergleichenden Messungen (68,6%). In jeweils 2 Fällen wurden 9cEEs rein anhand der konventionellen oder der flüssigkeitsbasierten Präparate gemessen, was vermuten lässt, dass 9cEEs in nur einem Präparatetyp vorlagen, und in 3 Fällen wurden die 9cEEs rein anhand der manuellen DNA-Zytometrie erhoben. 4 weitere Fälle wiesen jeweils in nur einer Messmethode mit kombinierter Präparationsmethode 9cEEs auf.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der Doktorarbeit aus dem Funktionsbereich Cytopathologie von Dogan, zeigt sich dort eine bessere Übereinstimmung der 9cEEs [93]. In ihrer Arbeit wurden automatisierte und manuelle DNA-bildzytometrische Messungen an luftgetrockneten zytologischen Ausstrichpräparaten von Schilddrüsenpräparaten verglichen. Bei insgesamt 40 Messpaaren bestand eine Übereinstimmung der erhobenen 9cEEs bei 85% der Fälle. Der Kappa-Wert betrug 0,6. Allerdings erfolgten die Messungen an rein luftgetrockneten Schilddrüsenpräparationen und nicht wie im Rahmen dieser Arbeit an konventionell alkoholfixierten und flüssigkeitsbasierten Dünnschichtpräparationen. In der eigenen Arbeit waren hier 9cEEs bei insgesamt 4 Fällen nur in jeweils einem Präparatetyp (konventionell oder flüssigkeitsbasiert) erfasst, was den Messvergleich erschwert. Es wurde aber in allen Fällen mindestens ein 9cEE sowohl mit

der manuellen als auch mit der automatischen DNA-Bildzytometrie detektiert. Werden diese 4 Messungen dazugezählt, sind 80% (28 von 35) Läsionen als kongruent gemessen zu bewerten und damit vom Ergebnis ähnlich wie bei den Messungen an Schilddrüsenpunktaten.

Es ist davon auszugehen, dass die im Vergleich etwas schlechtere Übereinstimmung der Erhebung der 9cEEs in der vorliegenden Arbeit möglicherweise auf die vier verschiedenen Messbedingungen zurückzuführen ist mit den oben bereits genannten Einschränkungen der flüssigkeitsbasierten Präparate aus dem Jahr 2014. Es waren 4 automatisierte Messungen hier nicht auswertbar, woraus ein teils nicht vollkommenes Ausschöpfen des Potentials der automatisierten DNA-Bildzytometrie resultiert. 7 Läsionen ergaben inkongruente Messungen bei automatischer und manueller DNA-bildzytometrischer Methode, ohne dass ein Muster oder ein offensichtlicher Fehler abzuleiten wären. Bei 5 dieser Fälle wurden 9cEEs nur in der manuellen Messung erfasst. Möglicherweise waren der oder die Zellkerne mit einem DNA-Gehalt  $>9c$  aufgrund von Zellüberlagerungen nicht für den Klassifikator erkennbar oder waren defokussiert. Dies ist aber im Nachhinein nicht sicher zu sagen.

## 4.7 Die Interrater-Reliabilität der verschiedenen Messmodalitäten

Mittels der Auswertung in Vierfeldertafeln und nach Cohen's Kappa wurde zum einen jeweils die Übereinstimmung der zytologischen Diagnose mit der manuellen oder automatisierten DNA-bildzytometrischen Messung bei konventioneller oder bei flüssigkeitsbasierter Präparation verglichen. Zum anderen wurde die automatisierte DNA-Bildzytometrie jeweils mit der manuellen DNA-Bildzytometrie bei konventionellen und flüssigkeitsbasierten Präparaten in Beziehung gesetzt.

Die Auswertung macht deutlich, dass der Kappa-Wert bezüglich der Übereinstimmung zwischen Zytologie und manuellem Messverfahren höher ist als bei dem automatisierten Messvorgang. Ebenso zeigt sich ein höherer Kappa-Wert bei den Messungen an konventionellen Präparaten als an den Dünnschicht-Präparaten. Die Kappa-Werte liegen dabei zwischen 0,360 (manuelle DNA-Bildzytometrie an konventionellen Präparaten) und 0,170 (automatisierte DNA-Bildzytometrie an flüssigkeitsbasierten Präparaten), was einer leichten und schwachen Übereinstimmung entspricht.

Dies stärkt neuerlich die Annahme, dass die Abstrichqualität und Anfertigung der flüssigkeitsbasierten Dünnschichtpräparate im Jahr 2014 weniger erprobt war als in späteren Jahren. Zudem war insbesondere die Messung zellarmer Präparate mit dem automatisierten DNA-Bildzytometer teilweise erschwert. Wie oben bereits erwähnt, kam es teils zu einem Verlust der Fokusebene während des Scans der zellarmen Anteile der Präparate. Häufig konnte durch den automatisierten DNA-Bildzytometer keine selbstständige Refokussierung erfolgen, weshalb einzelne Messungen abgebrochen werden mussten. Sofern die Refokussierung erfolgen konnte, wurden dennoch teils kleine Partien der Präparate defokussiert gemessen, wodurch einzelne Zellkerne im Gegensatz zur Messung mit dem manuellen DNA-Bildzytometer nicht regelrecht erfasst werden konnten. Ein Großteil dieser Messungen wurde wiederholt, einige Fälle mussten von der Studie ausgeschlossen werden und andere zellreichere Präparationen wurden hinzugenommen.

Prüft man die Übereinstimmung der jeweiligen Messmethoden, also manuelle oder automatisierte DNA-Bildzytometrie an konventionellen oder flüssigkeitsbasierten Präparaten, ergibt sich durchweg eine gute Übereinstimmung mit Werten zwischen 0,807 (automatisierte DNA-Bildzytometrie versus manuelle DNA-Bildzytometrie an flüssigkeitsbasierten Präparaten) bis 0,689 (automatisierte DNA-Bildzytometrie versus manuelle DNA-Bildzytometrie an konventionellen Präparaten). Dies hebt erneut die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hervor.

Es fällt dabei auf, dass der Kappa-Wert bezüglich der flüssigkeitsbasierten Präparate einen höheren Wert und damit eine noch bessere Übereinstimmung zwischen manueller und automatisierter Messung aufweist.

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass ein zellreiches flüssigkeitsbasiertes Präparat Vorteile gegenüber einem konventionell gefärbten Präparat haben kann. Hierzu zählen insbesondere die homogene Verteilung des Abstrichmaterials auf dem Objektträger sowie die Reduktion von Zellüberlagerungen. Ebenso werden den Messvorgang störende Zellen wie beispielsweise Erythrozyten größtenteils ausgewaschen. Diese Eigenschaft der flüssigkeitsbasierten Präparate erleichtert den automatisierten bildzytometrischen Messvorgang sehr, da der Scan und die Klassifizierung der einzelnen Zellen aufgrund der Monolayer-Eigenschaft deutlich reibungsloser erfolgen können. Hierin mag der

wesentliche Grund dafür liegen, dass die Übereinstimmung der Messverfahren an flüssigkeitsbasierten Präparaten besser als an konventionellen Präparaten war.

Der Vergleich der automatisierten Bildzytometrie an flüssigkeitsbasierten und an konventionellen Abstrichpräparaten weist eine ebenfalls gute Übereinstimmung mit einem Kappa-Wert von 0,789 auf, wohingegen der Vergleich der manuellen Messung an den zwei unterschiedlich verarbeiteten Präparatetypen zwar auch eine gute Übereinstimmung, allerdings mit einem niedrigeren Kappa-Wert von 0,696, zeigt.

Bei der Durchsicht der einzelnen diesbezüglich diskrepanten Fälle lässt sich kein Muster erkennen, wie die Diskrepanzen zustande kommen. Im Rahmen der manuellen Messungen war in 2 Fällen die Messung am konventionellen Präparat im Gegensatz zu den gepaarten flüssigkeitsbasierten Präparaten aneuploid aufgrund von Einzelzellaneuploidien, in 3 weiteren Fällen ergab die manuelle Messung an den flüssigkeitsbasierten Präparaten aneuploide Befunde im Gegensatz zu den konventionellen Präparaten. Hier lag in einem Fall eine Einzelzellaneuploidie vor, in einem Fall konnte ein aneuploider Modalwert ermittelt werden und in einem Fall lagen beide Aneuploidiekriterien vor.

Bei den automatisierten bildzytometrischen Messungen an konventionellen und flüssigkeitsbasierten Präparaten kommt es hingegen zu 3 diskrepant gemessenen Messpaaren. In jeweils einem Fall war entweder die Messung am konventionellen oder am flüssigkeitsbasierten Präparat aufgrund einer Einzelzellaneuploidie aneuploid gewertet. In einem weiteren Fall wies die automatisierte Messung an einem flüssigkeitsbasierten Präparat im Gegensatz zum gepaarten konventionellen Präparat einen aneuploiden Modalwert auf.

#### 4.8 Diskrepante DNA-Ploidie-Diagnosen zwischen automatisierter und manueller DNA-Bildzytometrie

Bei den Messungen von insgesamt 8 abgestrichenen suspekten Mundschleimhautläsionen von Fanconi-Anämie-Patienten kam es im Rahmen dieser Arbeit zu diskrepanten Ergebnissen der automatisierten und der manuellen DNA-Bildzytometrie bezüglich des Vorliegens von DNA-Aneuploidie.

Dabei handelte es sich in 5 Fällen um Messungen an konventionellen Präparaten, in 3 Fällen um Messungen an flüssigkeitsbasierten Dünnschichtpräparaten:

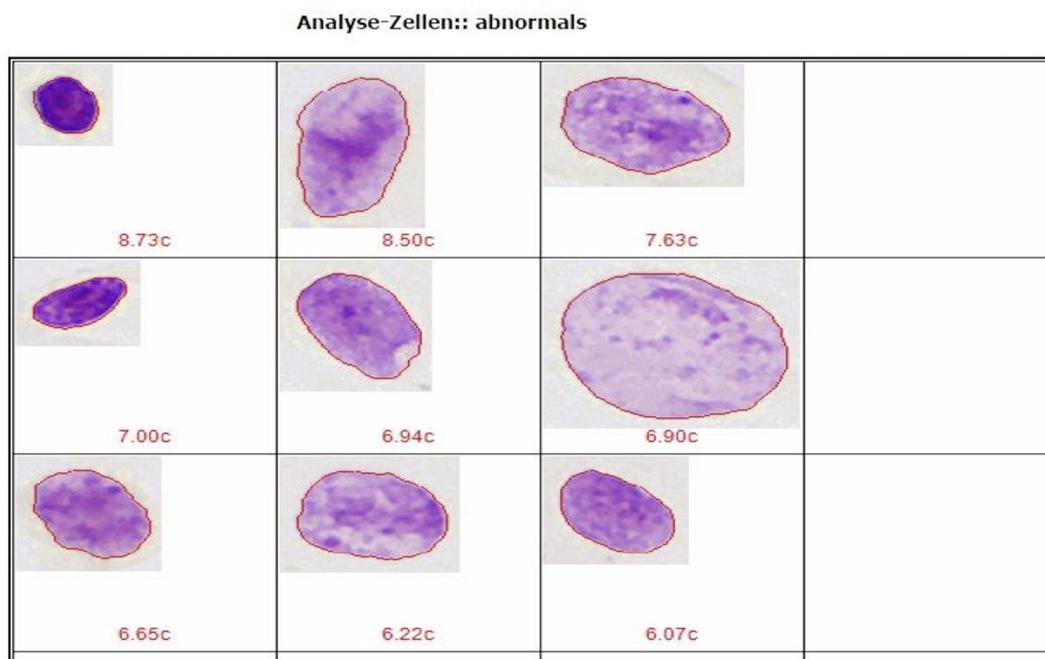
- In den jeweils zusammengehörigen Messungen mit der Messnummer 1.1 und 1.2, 8.3 und 8.4, 18.1 und 18.2, 18.3 und 18.4, 25.1 und 25.2, 25.3 und 25.4 und 35.1 und 35.2 (vergleiche Tabelle 31) wurde bei der manuellen DNA-Zytometrie die Diagnose einer Aneuploidie gestellt, während bei der automatisierten DNA-Zytometrie eine Euploidie diagnostiziert wurde. Hierbei lag manuell gemessen in 4 Fällen eine Einzelzell-Aneuploidie vor, in 1 Fall eine Stammlinien-Aneuploidie und in 2 Fällen eine kombinierte Aneuploidie.
- Die Messungen mit den Messnummern 34.1 und 34.2 (vergleiche Tabelle 31) wiesen in der automatisierten DNA-Zytometrie eine Einzelzell-Aneuploidie auf, welche in der manuellen DNA-Zytometrie nicht nachgewiesen worden war.

Betrachtet man die Messungen im Einzelnen, fällt auf, dass in der automatisierten Messung der fünf Fälle mit den Messnummern 1.1 und 1.2, 8.3 und 8.4, 18.1 und 18.2, 25.1 und 25.2 sowie 35.1 und 35.2 (vergleiche Tabelle 31) jeweils deutlich mehr Referenz- als Analysezellen erfasst wurden. Die automatisierte Messung 1.1 beispielsweise verzeichnet 3036 Referenz-, allerdings im Verhältnis deutlich weniger Analysezellen. Als mögliche Ursache kommt die Bestimmung des Referenz-DNA-Gehalts von  $2c$  durch Auswahl der Referenzzellen in Betracht. Durch die unterschiedliche (automatisierte) Auswahl der Referenzzellen bei den beiden Messmethoden kann es zu einer Verschiebung der DNA-Gehalte der Analysezellen kommen. Dies betrifft sowohl die Stammlinienaneuploidie als auch die Einzelzellaneuploidie. Eine DNA-Stammlinie nah an  $2,2c$  beispielsweise kann abhängig von Nuancen in der Eichung als  $2,18c$  (euploid) oder als  $2,23c$  (aneuploid) ausgewertet werden. Gleichermäßen gilt, dass eine Zelle mit einem DNA-Gehalt um  $9c$  auf diese Weise als  $8,95c$  (euploid) oder als  $9,03c$  (aneuploid) gemessen werden kann.

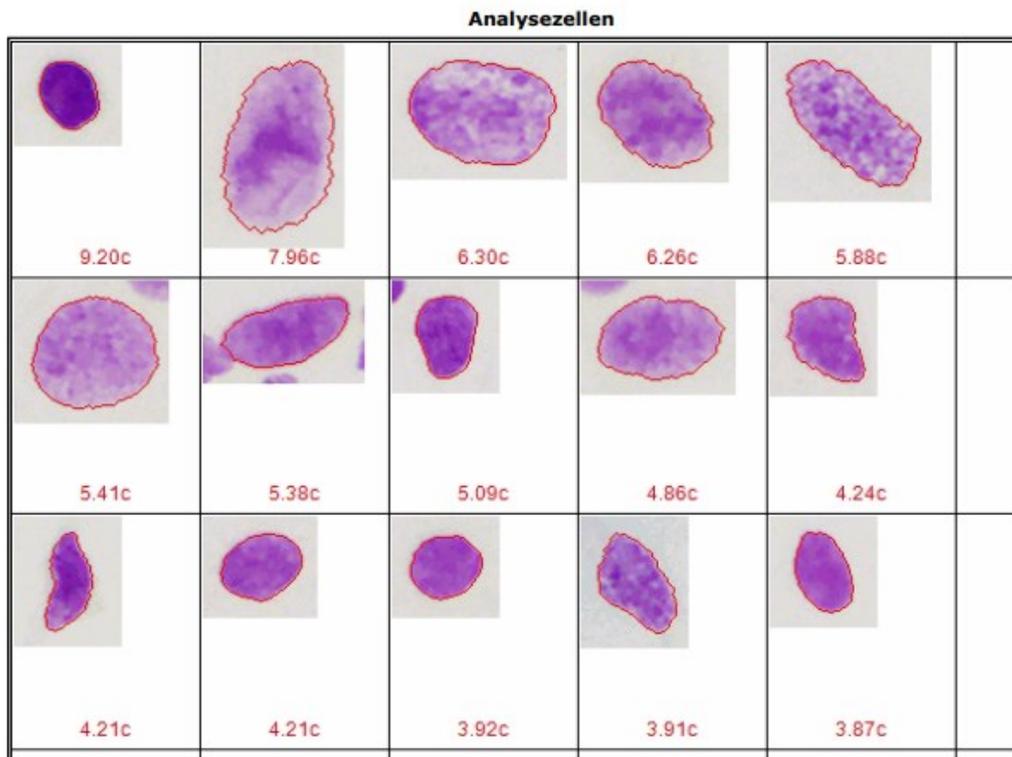
Zudem ist hier zu diskutieren, dass im Rahmen einer manuellen Messung häufig alle Zellen eines auffälligen Zellverbundes mit Zellen verdächtigen DNA-Gehalts gemeinsam als Analysezellen eingeordnet werden. Dies bedeutet also, dass auch Zellen mit einem DNA-Gehalt von etwa  $2c$  aufgrund ihrer Lage im genannten Zellverbund als Analysezellen gewertet werden. Im Rahmen einer automatisierten Messung fällt diese Einschätzung des Untersuchers weg, sodass die Zellen, welche einen DNA-Gehalt um  $2c$  aufweisen, als Referenzzellen klassifiziert werden. So kann es im Rahmen automatisierter

Messungen zu einer geringeren Anzahl von Analysezellen kommen als im Rahmen manueller Messungen.

Betrachtet man beispielhaft die Messungen mit den Messnummern 25.3 und 25.4 (vergleiche Tabelle 31) isoliert, wird anhand der *Image Galleries* der manuellen und automatisierten DNA-Zytometrie deutlich, dass die automatisierte Messung nur knapp keine Einzelzellaneuploidie festlegt (Abb. 13 und 14). Die abnorme Zelle mit dem höchsten DNA-Gehalt liegt bei 8,73c. Die manuelle Messung zeigt hingegen einen 9cEE, wobei durch Vergleich der Kernbilder offensichtlich unterschiedliche Zellen vorliegen. Läge der Schwellenwert für eine Einzelzellaneuploidie nicht bei einem DNA-Gehalt von größer 9c sondern bei größer 5c wie bei Ma et al., gäbe es hier nicht den bezüglich einer Einzelzellaneuploidie diskrepanten Befund, beide Messungen wären DNA-aneuploid [15].



**Abb. 13: Image Gallery der automatischen Messung mit der Messnummer 25.3**

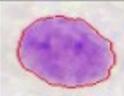
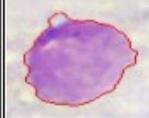
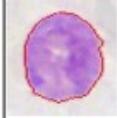


**Abb. 14: Image Gallery der manuellen Messung mit der Messnummer 25.4**

Die Messungen 34.1 und 34.2 (vergleiche Tabelle 31) zeigen eine Einzelzellaneuploidie in der automatisierten DNA-Zytometrie, welche in der manuellen DNA-Zytometrie nicht nachgewiesen wurde. Die automatisierte Messung hat hier eine Gesamtzahl gemessener Zellkerne von 392 Zellkernen, wohingegen in der manuellen Messung insgesamt 204 Zellkerne, also beinahe 50% Zellkerne weniger, gemessen wurden. In diesem Fall wurden gleiche Zellkerne (vergleiche Bildergalerien Abb. 15 und 16) mit unterschiedlichen DNA-Gehalten gemessen, was am Ehesten auf eine unterschiedliche Auswahl von Referenzzellen und dadurch bedingt die Verschiebung der gemessenen DNA-Gehalte zurückzuführen ist. Da in diesem Fall leider das *Follow-up* nicht ermittelt werden konnte, bleibt letztlich offen, ob eine maligne Transformation vorlag oder nicht.

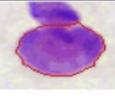
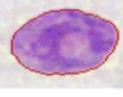
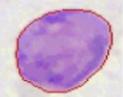
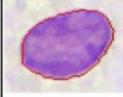
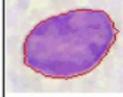
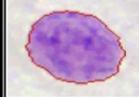
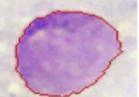
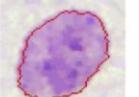
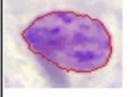
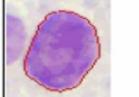
Betrachtet man aber den Abgleich der diskrepanten Fälle mit dem *Follow-up* (vergleiche Ergebnisteil Tabelle 31), so zeigt sich in 71,4% der diskrepanten Fälle, bei denen das jeweilige *Follow-up* ermittelt werden konnte, ein maligner Endbefund. Sollten im klinischen Alltag also unterschiedliche Messmethoden an gleichen Präparaten angewandt werden und dabei diskrepante Ergebnisse zustande kommen, wäre eine genaue Prüfung und gegebenenfalls erneute Nachmessung des jeweiligen Präparates unabdingbar.

**Analyse-Zellen:: abnormals**

 9.32c	 5.93c	 5.10c	 4.87c	 4.60c	 4.55c	
 4.35c	 4.32c	 4.20c	 4.20c	 4.09c	 3.94c	
 3.93c	 3.78c	 3.73c	 3.65c	 3.46c	 3.36c	

**Abb. 15: Image Gallery der automatischen Messung mit der Messnummer 34.1**

**Analyse-Zellen:: abnormals**

 8.27c	 5.23c	 4.86c	 4.55c	 4.39c	 4.36c	
 4.21c	 4.15c	 4.14c	 4.13c	 4.11c	 4.09c	
 3.92c	 3.84c	 3.63c	 3.54c	 3.29c	 3.26c	

**Abb. 16: Image Gallery der manuellen Messung mit der Messnummer 34.2**

Die Messungen 8.3 und 8.4 (vergleiche Tabelle 31) zeigen einen sowohl anhand einer Einzelzellaneuploidie als auch anhand einer Stammlinienaneuploidie diskrepant gemes-

senen Fall (Abb. 17 und 18). Es handelt sich um ein flüssigkeitsbasiertes Präparat. Im Rahmen der manuellen DNA-Bildzytometrie wurden hier 38 Referenz- und 103 Analysezellen gemessen, im Rahmen der automatisierten DNA-Bildzytometrie eine vergleichbare Gesamtmenge von 107 Referenz- und 64 Analysezellen, was auf ein insgesamt sehr zellarmes Präparat verweist. Dabei konnten anhand der manuellen Messung 2 Zellen mit einem DNA-Gehalt von größer 9c nachgewiesen werden, zudem zeigte sich die größte Stammlinie mit einem Peak bei 3,18c, was ein zusätzliches Kriterium für eine Aneuploidie im Rahmen dieser Arbeit ist (vergleiche Abbildung 17). Anhand der automatisierten DNA-Bildzytometrie wurden keine 9cEEs gemessen, die Stammlinie lag mit einem Peak von 2,02c in einem euploiden Bereich (vergleiche Abbildung 18).

Es darf nicht unerwähnt bleiben, dass aufgrund der besagten Zellarmut des Präparates bei der manuellen Messung Granulozyten als Referenzzellen ausgewählt wurden, wohingegen bei der automatisierten DNA-Bildzytometrie normale Epithelzellen als Referenzzellen verwendet wurden. Dies könnte zusätzlich feine Diskrepanzen erklären, allerdings handelt es sich in diesem Fall um eine Abweichung der Peaks von 1,16c. Außerdem wurde bei der automatisierten Messung eine Zelle von größer 14c nicht erfasst, welche in der manuellen Bildzytometrie ins Auge fällt.

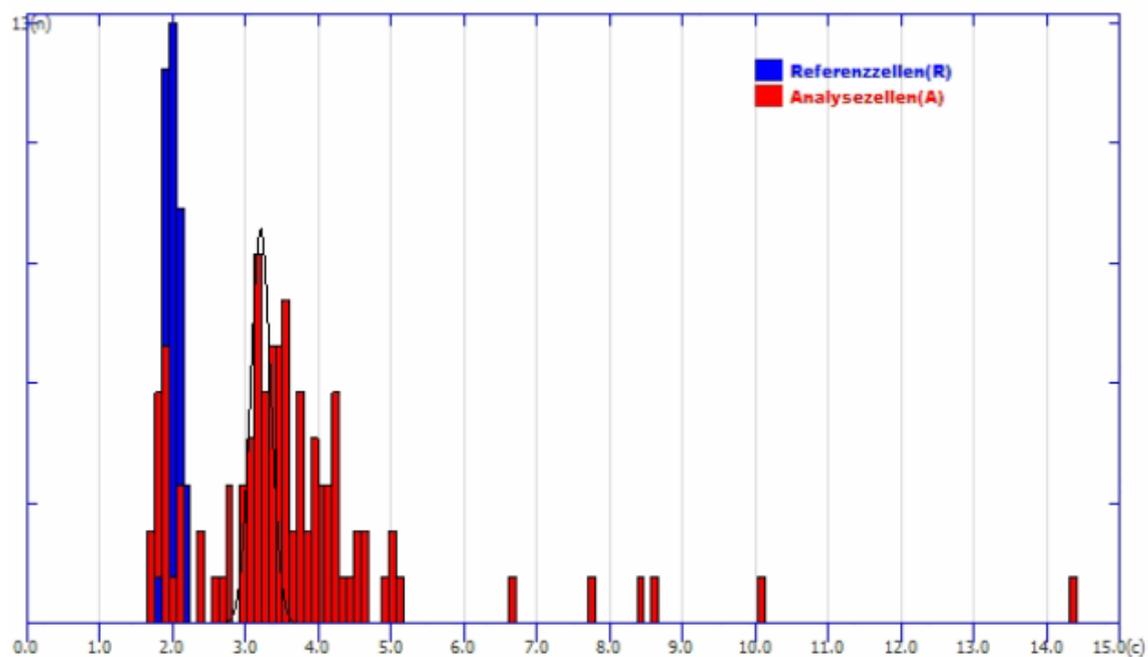
Grundsätzlich verfügt die zum Zeitpunkt der hier ausgewerteten Messungen verwendete Software des DNA-Zytometers über eine unbegrenzte Speicherkapazität. Eine hohe Anzahl insbesondere gespeicherter Artefakte führte aber häufiger zu einem Systemabsturz, was das ungehinderte Messen erschwerte. Aus diesem Grund wurde im Verlauf der durchgeführten Messungen die Speicherung der Artefakte auf 1000 Stück gedeckelt. Dabei ist im Nachhinein nicht sicher auszuschließen, dass die in der automatisierten Messung nicht registrierte Zelle mit DNA-Gehalt von größer 14c möglicherweise als Artefakt nicht abgespeichert werden konnte und so übersehen wurde.

Die Messungen weisen zusammenfassend deutliche Unterschiede auf, welche lediglich durch die unterschiedliche Auswahl von Referenzzellen nicht zu erklären sind. Letztlich bleibt die Ursachenforschung für die deutlichen Diskrepanzen der Messungen unklar, was eine sehr kritische Bewertung des Ergebnisses bedeuten muss. Es ist aber zu vermuten, dass wesentliche Zellen des insgesamt zellarmen Präparates aufgrund einer

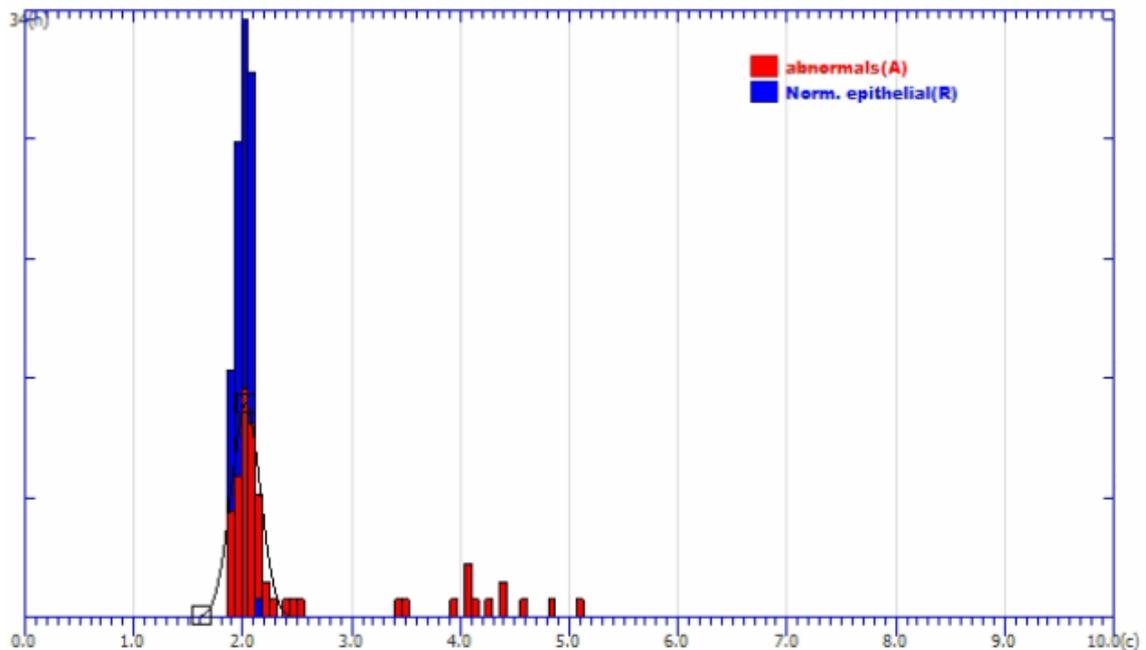
Defokussierung im Rahmen des Präparate-Scans des automatisierten Bildzytometers oder aufgrund der Deckelung der gespeicherten Artefakte nicht erfasst wurden.

Zum heutigen Zeitpunkt mit Optimierung der Präparation und neu entwickelter Software des DNA-Zytometers dürfte eine solche Messung letztlich im klinischen Alltag nicht akzeptiert werden und bedürfte zumindest einer Nachmessung.

In diese Arbeit ging sie aufgrund ihrer technischen Auswertbarkeit dennoch mit ein.



**Abb. 17: Histogramm der manuellen DNA-bildzytometrischen Messung mit der Fallnummer 16 mit Stammlinie bei 3,18c und 2 Einzelzellen mit abnorm hohem DNA-Gehalt >9c**



**Abb. 18:** Histogramm der automatisierten DNA-bildzytometrischen Messung mit Stammlinie bei 2,02c

## 4.9 Limitationen der Arbeit

Es gibt zwei wesentliche Limitationen der Arbeit. Zum einen wurden im Jahr 2014 im Rahmen der Mundkrebs-Vorsorgestudie der deutschen Fanconi-Anämie-Hilfe-e.V. die Dünnschichtpräparate probatorisch und zusätzlich zu den damals etablierten konventionellen Abstrichen erstellt. Im Rahmen dieser Neuerungen der Abstrichverarbeitung kam es auch aufgrund der Anfertigung zweier verschiedener Präparate, nämlich dem konventionellen Präparat und dem flüssigkeitsbasierten Dünnschichtpräparat, teilweise zu zellarmen Befunden. Diese wiederum stellten für die in dieser Arbeit verwendete Software des automatisierten DNA-Bildzytometrie-Systems (*MotiCyte-auto*) eine Hürde dar. In der hier verwendeten Programmierung war es häufig problematisch, wenn in einem gescannten Bild kein Zellkern zu messen war. Das System verlor häufig kurzfristig in dem Versuch, die Fokussierung zu optimieren, die eigentliche Fokusebene für den weiteren Verlauf der Messung, was das Nichterfassen einiger oder auch zahlreicher zu messender Zellkerne bedeutete und möglicherweise ein Mitgrund für die im Vergleich mit der manuellen Messung der gleichen Objektträger teils fehlenden 9cEEs ist. Hier ist ebenfalls mitzuerwähnen, dass aufgrund intermittierender Systemabstürze bei enorm hoher Anzahl gespeicherter Artefakte, im Verlauf der Arbeit eine Begrenzung der

gespeicherten Artefakte auf 1000 Stück erfolgte. Auch hier können möglicherweise das Messergebnis beeinflussende Zellen untergegangen sein.

Eine weitere Limitation bezüglich der Aussagekraft der erhobenen Ergebnisse ist das relativ kleine Patientenkollektiv mit insgesamt 132 in die Auswertung eingegangenen Messungen.

## 4.10 Schlussfolgerung und Ausblick

Bei der DNA-Bildzytometrie handelt es sich um ein zwar anerkanntes, aber nur an wenigen Einrichtungen praktiziertes Verfahren zur Bestimmung der DNA-Ploidie (euploid vs. aneuploid) einer Zellpopulation. Die Detektion einer DNA-Aneuploidie bedeutet hierbei die Detektion einer behandlungsbedürftigen malignen Transformation. Die sehr vulnerable Patientengruppe der Fanconi-Anämie-Betroffenen hat unter anderem ein deutlich erhöhtes Risiko für Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle. Insbesondere in diesen Fällen eignet sich die nichtinvasive Bürstenabstrich-basierte DNA-Bildzytometrie zur Abklärung der bei dieser Patientengruppe häufigen und chronischen suspekten Mundschleimhautläsionen im Sinne von „oralen potenziell malignen Störungen“ (OPMD). Die kombinierte zytologische und DNA-bildzytometrische Untersuchung dieser Läsionen ergibt gute Ergebnisse bezüglich der früheren Erkennung behandlungsbedürftiger, mindestens einer oralen epithelialen Dysplasie, *high grade* entsprechender Befunde.

Da die manuelle DNA-Bildzytometrie sehr zeitaufwändig ist und hochqualifiziertes Personal erfordert, scheint die automatisierte DNA-Bildzytometrie anhand von flüssigkeitsbasierten Präparaten eine alternative Methode zu sein, die bei ebenfalls bestehender Nicht-Invasivität Zeit und Personal einsparen kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen mit Ausnahme einiger diskrepanter Befunde eine weitgehende Übereinstimmung der automatisierten und manuellen Messergebnisse an konventionellen und flüssigkeitsbasierten zytologischen Präparaten, wobei noch Optimierungsbedarf vor allem bezüglich der standardisierten Herstellung flüssigkeitsbasierter Präparate deutlich wurde. Inzwischen gibt es bereits entscheidende Fortschritte in der Präparationsmethodik der flüssigkeitsbasierten Präparate sowie in der

Programmierung des automatischen DNA-Zytometers mit optimierter Fokusfunktion (*Easy-Scan*, Nachfolgegerät des *MotiCyte-auto*), was in Zukunft einen weitreichenderen Einsatz dieser Methodik ermöglichen könnte.

Insgesamt ist diese Arbeit die vierte und letzte in einer Reihe von methodischen Ansätzen zum Vergleich der manuellen und der automatisierten DNA-Bildzytometrie. Dass eine einzige Arbeit hierfür nicht ausreichte, lag an der Tatsache, dass für DNA-bildzytometrische Anwendungen ganz unterschiedlich aufgearbeitete Präparate verwendet werden und schon die Präparation, unabhängig von biologischen Unterschieden der zu analysierenden Zellen, die Erstellung eines jeweils eigenständigen KI-unterstützten Klassifikators erforderte.

Die weiteren, etwas eher als die hier vorliegende Arbeit konzipierten Studien am Funktionsbereich Cytopathologie bezogen sich auf drei andere, ebenfalls typische Präparationsmethoden in der Zytologie, nämlich

- Alkohol-fixierte zytologische Ausstrichpräparate an durch Zellvereinzelung aus vorbestehenden Paraffinblöcken gewonnenen Zellsuspensionen am Beispiel des Prostatakarzinoms [92],
- luftgetrocknete zytologische Ausstrichpräparate von nativ verarbeiteten, durch Zytozentrifugation angereicherten Zellsuspensionen am Beispiel von Pleuraergüssen [94] und auf
- luftgetrocknete zytologische Ausstriche von Feinnadelaspirationsbiopsien am Beispiel von Schilddrüsenpunktaten [93].

Sie wurden jetzt um die eigene Arbeit an

- Alkohol-fixierten zytologischen Ausstrichen im Vergleich zu Alkohol-fixierten flüssigkeitsbasierten Ausstrichen am Beispiel von Bürstenbiopsien der Mundhöhle

ergänzt, wodurch dann alle wesentlichen zytologischen Präparationsarten im Vergleich der konventionellen zur flüssigkeitsbasierten DNA-Bildzytometrie untersucht sind.

Alle diese Arbeiten folgten organ- und präparationsbedingten praktischen Erwägungen in ihrer Konzeption und Methodik, gehen aber von gleichen wissenschaftlichen Prämissen aus. Ihre Ergebnisse, für die anderen drei Anwendungen bereits in der Arbeit an den Schilddrüsenpunktaten zusammengefasst [93] zeigen, dass automatisierte DNA-

Bildzytometrie sinnvoll und praktikabel ist, wenn organspezifische und präparations-spezifische Aspekte bei der ärztlichen Datenauswertung und Dateninterpretation berücksichtigt werden. So sollte es bei Mundhöhlenabstrichen oder vergleichbaren Materialien (z.B. Zervix- oder Vaginalabstrichen) ebenso sein, um auch dort ein primär eher technisches Messergebnis in therapeutisch nutzbare klinische Diagnostik umzusetzen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
2. Rivera, C., *Essentials of oral cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(9): p. 11884-94.
3. Erdmann, F., et al., *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. 2021, Robert Koch-Institut. p. 32-35.
4. El-Naggar, A.K., J.K.C. Chan, and J.R. Grandis, *WHO classification of head and neck tumours*. 4 ed. Vol. 9. 2017, Lyon: International Agency for Research on Cancer.
5. Lai, C.L., et al., *Dominance of the inactive Asian variant over activity and protein contents of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 in human liver*. Alcohol Clin Exp Res, 2014. **38**(1): p. 44-50.
6. Crabb, D.W., et al., *Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive ALDH2(2) allele is dominant*. J Clin Invest, 1989. **83**(1): p. 314-316.
7. Ndiaye, C., et al., *HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Oncol, 2014. **15**(12): p. 1319-1331.
8. Nalepa, G. and D.W. Clapp, *Fanconi anaemia and cancer: an intricate relationship*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(3): p. 168-185.
9. Foy, J.P., et al., *Bibliometric analysis of a century of research on oral erythroplakia and leukoplakia*. J Oral Pathol Med, 2018. **47**(4): p. 388-395.
10. van der Waal, I., *Historical perspective and nomenclature of potentially malignant or potentially premalignant oral epithelial lesions with emphasis on leukoplakia-some suggestions for modifications*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2018. **125**(6): p. 577-581.
11. Neville, B.W. and T.A. Day, *Oral cancer and precancerous lesions*. CA Cancer J Clin, 2002. **52**(4): p. 195-215.
12. Wittekind, C., *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. Vol. 8. 2017, Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
13. Rahman, A.U., et al., *Histopathologic Oral Cancer Prediction Using Oral Squamous Cell Carcinoma Biopsy Empowered with Transfer Learning*. Sensors (Basel), 2022. **22**(10): p. 3833.
14. Wolff, K.-D., et al., *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms*. 2021, AWMF: Berlin.
15. Ma, J.M., et al., *Brush biopsy with DNA-image cytometry: a useful and noninvasive method for monitoring malignant transformation of potentially malignant oral disorders*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2014. **271**(12): p. 3291-3295.
16. Kammerer, P.W., et al., *Prospective, blinded comparison of cytology and DNA-image cytometry of brush biopsies for early detection of oral malignancy*. Oral Oncol, 2013. **49**(5): p. 420-426.

17. Speight, P.M., et al., *The cost-effectiveness of screening for oral cancer in primary care*. Health Technol Assess, 2006. **10**(14): p. 1-144, iii-iv.
18. Rethman, M.P., et al., *Evidence-based clinical recommendations regarding screening for oral squamous cell carcinomas*. J Am Dent Assoc, 2010. **141**(5): p. 509-520.
19. Speight, P.M., et al., *Screening for oral cancer-a perspective from the Global Oral Cancer Forum*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2017. **123**(6): p. 680-687.
20. Hertrampf, K. and M. Kunkel, *S2k-Leitlinie: Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (DGMKG))*. 2019.
21. Brocklehurst, P., et al., *Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2013. **2013**(11).
22. Shenoy, M., *Efficacy of oral brush biopsy in the early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders - a systematic review*. Saudi J Oral Sci, 2022. **9**: p. 3-9.
23. Velleuer, E., et al., *Diagnostic accuracy of brush biopsy-based cytology for the early detection of oral cancer and precursors in Fanconi anemia*. Cancer Cytopathology, 2020. **128**(6): p. 403-413.
24. Klug, S.J., et al., *A randomized trial comparing conventional cytology to liquid-based cytology and computer assistance*. Int J Cancer, 2013. **132**(12): p. 2849-2857.
25. Walsh, T., et al., *Diagnostic tests for oral cancer and potentially malignant disorders in patients presenting with clinically evident lesions*. Cochrane Database Syst Rev, 2021. **7**(7).
26. Sciubba, J.J., *Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment*. Am J Clin Dermatol, 2001. **2**(4): p. 239-251.
27. Amit, M., et al., *Improvement in survival of patients with oral cavity squamous cell carcinoma: An international collaborative study*. Cancer, 2013. **119**(24): p. 4242-4248.
28. Kowalski, L.P. and A.L. Carvalho, *Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer*. Oral Oncol, 2001. **37**(1): p. 94-98.
29. Haughey, B.H., et al., *Meta-analysis of second malignant tumors in head and neck cancer: the case for an endoscopic screening protocol*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1992. **101**(2 Pt 1): p. 105-112.
30. Chow, T.L., et al., *Prediction of simultaneous esophageal lesions in head and neck squamous cell carcinoma: a multivariate analysis*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2009. **135**(9): p. 882-885.
31. Imaizumi, A., et al., *A potential pitfall of MR imaging for assessing mandibular invasion of squamous cell carcinoma in the oral cavity*. AJNR Am J Neuroradiol, 2006. **27**(1): p. 114-122.
32. Van Cann, E.M., et al., *Assessment of mandibular invasion of squamous cell carcinoma by various modes of imaging: constructing a diagnostic algorithm*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2008. **37**(6): p. 535-541.
33. Rotzinger, R., et al., *Malignant tumors of the oral cavity*. Radiologe, 2020. **60**(11): p. 1038-1046.

34. Lo Casto, A., et al., *Diagnostic and prognostic value of magnetic resonance imaging in the detection of tumor depth of invasion and bone invasion in patients with oral cavity cancer*. Radiol Med, 2022. **127**(12): p. 1364-1372.
35. Hendriks, A.W., et al., *Cone-beam CT in the assessment of mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma: results of the preliminary study*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2010. **39**(5): p. 436-439.
36. Sumi, M., et al., *Diagnostic performance of MRI relative to CT for metastatic nodes of head and neck squamous cell carcinomas*. J Magn Reson Imaging, 2007. **26**(6): p. 1626-1633.
37. Sumi, M., M. Ohki, and T. Nakamura, *Comparison of sonography and CT for differentiating benign from malignant cervical lymph nodes in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. AJR Am J Roentgenol, 2001. **176**(4): p. 1019-1024.
38. Balogova, S., et al., *Prospective comparison of FDG and FET PET/CT in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Mol Imaging Biol, 2008. **10**(6): p. 364-373.
39. Andrie, J., et al., *Initial staging examinations for head and neck squamous cell carcinoma: are they appropriate?* J Laryngol Otol, 2009. **123**(8): p. 885-888.
40. Lodi, G., et al., *Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2005. **100**(2): p. 164-178.
41. Smetsers, S.E., et al., *Noninvasive molecular screening for oral precancer in Fanconi anemia patients*. Cancer Prev Res (Phila), 2015. **8**(11): p. 1102-1111.
42. Wong, T. and D. Wiesenfeld, *Oral Cancer*. Aust Dent J, 2018. **63 Suppl 1**: p. S91-S99.
43. Panje, W.R., B. Smith, and B.F. McCabe, *Epidermoid carcinoma of the floor of the mouth: surgical therapy vs combined therapy vs radiation therapy*. Otolaryngol Head Neck Surg (1979), 1980. **88**(6): p. 714-720.
44. Rosenthal, D.I., et al., *Final Report of a Prospective Randomized Trial to Evaluate the Dose-Response Relationship for Postoperative Radiation Therapy and Pathologic Risk Groups in Patients With Head and Neck Cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2017. **98**(5): p. 1002-1011.
45. Li, Y., et al., *Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in head and neck squamous cell carcinoma: an updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2022. **280** (1): p. 11-22.
46. Santuray, R.T., D.E. Johnson, and J.R. Grandis, *New Therapies in Head and Neck Cancer*. Trends Cancer, 2018. **4**(5): p. 385-396.
47. Fakih, A.R., et al., *Elective versus therapeutic neck dissection in early carcinoma of the oral tongue*. Am J Surg, 1989. **158**(4): p. 309-313.
48. Lobitz, S. and E. Velleuer, *Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 893-898.
49. Shakeel, S., et al., *Structure of the Fanconi anaemia monoubiquitin ligase complex*. Nature, 2019. **575**(7781): p. 234-237.
50. Sroka, I., et al., *Fanconi anaemia clinical care guidelines*. 2020, Fanconi Anemia Research Fund.

51. Schifferli, A. and T. Kuhne, *Fanconi Anemia: Overview of the Disease and the Role of Hematopoietic Transplantation*. J Pediatr Hematol Oncol, 2015. **37**(5): p. 335-343.
52. Auerbach, A.D., *Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis*. Curr Protoc Hum Genet, 2015. **85**: p. 8.7.1-8.7.17.
53. Knies, K., et al., *Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFW3 cause Fanconi anemia*. J Clin Invest, 2017. **127**(8): p. 3013-3027.
54. Ling, C., et al., *FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway*. EMBO J, 2007. **26**(8): p. 2104-2114.
55. Sumpster, R., Jr. and B. Levine, *Emerging functions of the Fanconi anemia pathway at a glance*. J Cell Sci, 2017. **130**(16): p. 2657-2662.
56. Auerbach, A.D., *Fanconi anemia and its diagnosis*. Mutat Res, 2009. **668**(1-2): p. 4-10.
57. Rosenberg, P.S., M.H. Greene, and B.P. Alter, *Cancer incidence in persons with Fanconi anemia*. Blood, 2003. **101**(3): p. 822-826.
58. Rose, S.R., et al., *Endocrine phenotype of children and adults with Fanconi anemia*. Pediatr Blood Cancer, 2012. **59**(4): p. 690-696.
59. Johansson, E., et al., *Fanconi's anemia. Tumor-like warts, hyperpigmentation associated with deranged keratinocytes, and depressed cell-mediated immunity*. Arch Dermatol, 1982. **118**(4): p. 249-252.
60. Giulino, L., et al., *Sweet syndrome in patients with Fanconi anaemia: association with extracutaneous manifestations and progression of haematological disease*. Br J Haematol, 2011. **154**(2): p. 278-281.
61. Kutler, D.I., et al., *A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR)*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1249-1256.
62. Kutler, D.I., et al., *Natural history and management of Fanconi anemia patients with head and neck cancer: A 10-year follow-up*. Laryngoscope, 2016. **126**(4): p. 870-879.
63. Romick-Rosendale, L.E., et al., *The Fanconi anemia pathway: repairing the link between DNA damage and squamous cell carcinoma*. Mutat Res, 2013. **743-744**: p. 78-88.
64. Velleuer, E. and R. Dietrich, *Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma*. Mol Cell Pediatr, 2014. **1**(1): p. 9.
65. Ramadas, K., et al. *A Digital Manual for the Early Diagnosis of Oral Neoplasia. Physical Examination of the Oral Cavity*. . 2019 March 13]; Available from: <http://screening.iarc.fr/atlasoral.php>.
66. Haroske, G., et al., *Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry*. Anal Cell Pathol, 2001. **23**(2): p. 89-95.
67. Böcking, A., *Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA-Bildzytometrie*. Deutsches Ärzteblatt International, 1998. **Heft 12**: p. A-658-662.
68. Böcking, A., et al., *DNA-cytometric grading of prostate cancer systematic review with descriptive data analysis*. Pathol Discov., 2014. **2**: p. 7.
69. Biesterfeld, S., et al., *Polyploidy in non-neoplastic tissues*. J Clin Pathol, 1994. **47**(1): p. 38-42.
70. Ogden, G.R., J.G. Cowpe, and A.J. Wight, *Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment*. J Oral Pathol Med, 1997. **26**(5): p. 201-205.

71. Feulgen, R. and H. Rossenbeck, *Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem., 1924: p. 203-248.
72. Meng, Z., et al., *Automated quantification of DNA aneuploidy by image cytometry as an adjunct for the cytologic diagnosis of malignant effusion*. Anal Cell Pathol (Amst), 2013. **36**(3-4): p. 107-115.
73. Haroske, G., et al., *1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation*. European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol, 1998. **17**(4): p. 189-200.
74. Biesterfeld, S., et al., *DNA-cytometric detection of euploid polyploidization in oral lichen ruber planus*. Anal Quant Cytol Histol, 1991. **13**(1): p. 7-10.
75. Alaizari, N.A., et al., *Meta-analysis of the predictive value of DNA aneuploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders*. J Oral Pathol Med, 2018. **47**(2): p. 97-103.
76. Goel, G., et al., *Rapid, Economic, Acetic Acid Papanicolaou Stain (REAP): An Economical, Rapid, and Appropriate Substitute to Conventional Pap Stain for Staining Cervical Smears*. J Cytol, 2020. **37**(4): p. 170-173.
77. Böcking, A., *Standardisierung der zytopathologischen Diagnostik* Der Pathologe, 1998: p. 236-241.
78. Böcking, A., *Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie*. Der Pathologe 1998: p. 235-236.
79. Chieco, P. and M. Derenzini, *The Feulgen reaction 75 years on*. Histochem Cell Biol, 1999. **111**(5): p. 345-358.
80. Giroud, F., et al., *1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance*. European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol, 1998. **17**(4): p. 201-208.
81. Böcking, A., F. Giroud, and A. Reith, *Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry*. Anal Quant Cytol Histol, 1995. **17**(1): p. 1-7.
82. Böcking, A., et al., *Objective DNA malignancy grading as adjunct to the histological Gleason score: Frankfurt consensus*. Pathologe, 2015. **36**(5): p. 498-502.
83. Friedrich, D., *Effective improvement of cancer diagnostics and prognostics by computer-assisted cell image analysis*. 2015, Rhine-Westphalia Technical University of Aachen: Aachen.
84. Böcking, A., et al., *Diagnostic Cytometry*. In Oral Cytology - A Concise Guide, 2013: p. 125-145.
85. Harms, V., *Medizinische Statistik*. Vol. 8. 2012, Kempten: HARMS VERLAG.
86. Cohen, J., *Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit*. Psychol Bull, 1968. **70**(4): p. 213-220.
87. Grouven, U., et al., *The kappa coefficient*. Dtsch Med Wochenschr, 2007. **132** Suppl 1: p. e65-68.

88. Bland, J.M. and D.G. Altman, *Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement*. Lancet, 1986. **1**(8476): p. 307-310.
89. Silverman, S., Jr., A.R. Kerr, and J.B. Epstein, *Oral and pharyngeal cancer control and early detection*. J Cancer Educ, 2010. **25**(3): p. 279-281.
90. Maraki, D., J. Becker, and A. Böcking, *Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer*. J Oral Pathol Med, 2004. **33**(7): p. 398-404.
91. Böcking, A., et al., *Automated detection of cancer cells in effusion specimens by DNA karyometry*. Cancer Cytopathol, 2019. **127**(1): p. 18-25.
92. Rezaie, M., *Erprobung der automatischen DNA-Bildzytometrie am Prostatakarzinom.*, H.-H.-U. Düsseldorf, Editor. 2018, Med. dent. Diss. .
93. Dogan, T., *Erprobung eines automatischen DNA-bildzytometrischen Messsystems an Schilddrüsenpunktaten.*, H.-H.-U. Düsseldorf, Editor. 2023, Med. dent. Diss. .
94. Feider, A., *Erprobung eines automatisierten DNA-zytometrischen Messsystems an luftgetrockneten Ergusspräparaten*. 2018, Med. dent. Diss.
95. Remmerbach, T.W., et al., *Liquid-based versus conventional cytology of oral brush biopsies: a split-sample pilot study*. Clin Oral Investig, 2017. **21**(8): p. 2493-2498.
96. Böcking, A., et al., *DNA Karyometry for Automated Detection of Cancer Cells*. Cancers (Basel), 2022. **14**(17).
97. Remmerbach, T.W., et al., *Noninvasive brush biopsy as an innovative tool for early detection of oral carcinomas*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2004. **8**(4): p. 229-236.
98. Parfenova, E., et al., *An improved algorithm using a Health Canada-approved DNA-image cytometry system for non-invasive screening of high-grade oral lesions*. J Oral Pathol Med, 2021. **50**(5): p. 502-509.
99. Grouven, U., et al., *Vergleich von Messmethoden*. Dtsch Med Wochenschr, 2007. **132**: p. e69-e73.

# Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Biesterfeld, dem ehemaligen Leiter des Fachbereichs Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf, für die Überlassung des Themas, die große Unterstützung und freundliche Betreuung meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. med. Martin Schramm für sein großes Engagement, seine konstruktive Kritik an meiner Arbeit und seinen stets guten Rat.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachbereichs Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf bedanken für die Hilfsbereitschaft, Unterstützung im Rahmen der DNA-bildzytometrischen Messarbeiten und das Anlernen meiner Person im Umgang mit den DNA-Bildzytometern.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern, meinen Brüdern und meinem Ehemann für die gewissenhafte Durchsicht früherer Versionen sowie die liebevolle, geduldige und zuversichtliche Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken.