

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE
DIREKTOR: UNIV. PROF. DR. DR. T. E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**IMMUNZYTOCHEMISCH UNTERSTÜTZTE ANALYSE ORALER BÜRSTENBIOPTATE
MIT NACHWEIS VON HOCHMOLEKULAREM TENASCIN C**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Dr. med. dent. Moralis Antonios

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE
DIREKTOR: UNIV. PROF. DR. DR. T. E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**IMMUNZYTOCHEMISCH UNTERSTÜTZTE ANALYSE ORALER BÜRSTENBIOPTATE
MIT NACHWEIS VON HOCHMOLEKULAREM TENASCIN C**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Dr. med. dent. Moralis Antonios

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. B. Weber

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. T. E. Reichert

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. P. Proff

Tag der Promotion: 19.01.2011

Meiner Frau Eirini
und meiner Tochter Lydia
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Die Notwendigkeit einer sicheren Früherkennung des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen	8
1.1.1	Orales Plattenepithelkarzinom	8
1.1.2	Epitheliale Präkursorläsionen	9
1.1.3	Präkanzeröse Konditionen	12
1.2	Diagnostische Methoden	13
1.2.1	Die visuelle Inspektion zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen	13
1.2.2	Die Biopsie zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen	14
1.2.3	Die Toluidinblaufärbung zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen	14
1.2.4	Die photodynamische Diagnose des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen	15
1.2.5	Die Autofluoreszenz zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen	17
1.2.6	Die DNA-Zytometrie zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen	17
1.2.7	Die Transepitheliale Bürstenbiopsie zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen	18
1.2.8	Automatische Bildanalyse des Bürstenbiopates (Oral CDx [®])	21

1.2.9	Immunzytochemisch erweiterte Bürstenbiopsie zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen	22
1.3	Tenascin-C und seine Varianten	24
2	Fragestellung	26
3	Patienten und Methoden	27
3.1	Patienten	27
3.2	Histopathologische Begutachtung	27
3.3	Technik der Bürstenbiopsie	28
3.4	Immunzytochemische Markierung der Bürstenbiopate mit hochmolekularem Tenascin-C.....	30
3.5	Begriffsbestimmungen: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert.....	31
3.5.1	Sensitivität.....	32
3.5.2	Spezifität	32
3.5.3	Positiver und negativer Vorhersagewert.....	33
4	Ergebnisse	34
	Immunzytochemische Untersuchungen der Bürstenbiopate mit hochmolekularem Tenascin-C.....	34
5	Diskussion	39
6	Schlußfolgerung	44
7	Zusammenfassung	46
8	Literatur	48
9	Addendum	68
10	Lebenslauf	69

1 Einleitung

1.1 Die Notwendigkeit einer sicheren Früherkennung des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen

1.1.1 Orales Plattenepithelkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle entsteht auf dem Boden von Präkanzerosen sowie auch auf gesunder Mundschleimhaut. In der westlichen Welt ist diese Tumorerkrankung unter den 10 häufigsten zu finden (Ganly et al. 2000, Lutz et al. 2003). In der Bundesrepublik Deutschland beträgt die Inzidenz bei Männern 7200 Neuerkrankungen jährlich. Die Mortalitätsrate beträgt hierbei 4 auf 100000 Einwohnern. Bei den Frauen beträgt die Inzidenz 2500 Neuerkrankungen pro Jahr bei einer Mortalitätsrate von 1,3 auf 100000 Einwohnern (Pistner et al. 2004, Moore et al. 2000). Weltweit ist ein deutlicher Trend zu erkennen mit steigenden Inzidenzraten (Moore et al. 2000). Der Altersgipfel der Patienten liegt zwischen 60 und 65 Jahren. Leider zeigt sich in den letzten Jahren ein deutlicher Trend, bei dem der Altersgipfel immer kleiner wird (Davis and Severson 1987, Adam 2003).

Die 5-Jahre-Überlebensrate beträgt etwa 50% (Greenlee et al. 2001, Beck-Mannagetta 2002, Bray et al. 2002). Diese schlechte Prognose kann auf zwei Faktoren zurückgeführt werden. Zum einen liegt es an einer häufig späten Diagnosesicherung. Das Aufsuchen eines qualifizierten und erfahrenen Arztes findet immer noch sehr spät statt. Das vorangeschrittene Tumorstadium bei Erstdiagnose beruht genau auf dieser Tatsache (Schleier et al. 2002b).

Als weiterer negativer Prognosefaktor stellt sich die frühe lymphogene Metastasierung des oralen Plattenepithelkarzinoms dar. Metastasierte Plattenepithelkarzinome zeigen eine erheblich schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate als nicht metastasierte Karzinome. Die zunehmende Mortalität des oralen Plattenepithelkarzinoms erfordert die Etablierung eines Untersuchungsverfahrens zur sicheren und frühzeitigen Diagnosefindung (Baatenburg de Jong et al. 2001).

1.1.2 Epitheliale Präkursorläsionen

Häufig entstehen orale Plattenepithelkarzinome auf dem Boden epithelialer Präkursorläsionen (Scheifele and Reichart 2003). Gemäß der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden sie als umschriebene Mundschleimhautschädigungen charakterisiert, die mit erhöhter Tendenz zur malignen Transformation und somit zur Ausbildung eines oralen Plattenepithelkarzinoms einhergehen (Hullmann et al. 2010). Zu den Präkursorläsion zählen die Leukoplakie, die Erythroplakie sowie die Erythroleukoplakie. Die Inzidenz orale Precursorläsionen zu entwickeln liegt zwischen 1 und 4 %. In der Bundesrepublik Deutschland liegt die Inzidenz zwischen 0,9 und 1,8 % (Reichart et al. 2000). In der Literatur wird das Risiko einer malignen Entartung der Präkursorläsionen mit bis zu 18 % angegeben (Reichart and Philipsen 2005). Zu den Risikofaktoren, für die Entstehung oraler Präkursorläsionen, werden Nikotin, Alkohol, Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) sowie das Vorliegen einer präkanzerösen Kondition gezählt (Krahl et al. 2008).

Leukoplakie

Die Leukoplakie beschreibt eine weißliche, nicht abwischbare Mundschleimhautveränderung, die klinisch und pathologisch keiner anderen Mundschleimhauterkrankung zugeordnet werden kann. Sie tritt in der gesamten Mundschleimhaut auf, bevorzugt im Planum buccale, dem Mundboden, der Gingiva sowie des Zungenrandes. Sie kann in eine homogene oder inhomogene Leukoplakie unterschieden werden (Hullmann et al. 2010). Inhomogene Leukoplakien weisen ein bis zu fünfmal höheres Entartungsrisiko, als homogene Leukoplakien auf (Reichart and Philipsen 2005). Desweiteren können sie als plan, verukös und erosiv charakterisiert werden. Je unruhiger das Erscheinungsbild ist, desto höher liegt das maligne Entartungsrisiko (Hullmann et al. 2010, Reichart and Philipsen 2005).

Einen besonderen Stellenwert hat die proliferative veruköse Leukoplakie die als Vorläufer des verrukösen Karzinoms angesehen wird (Batsakis et al. 1999). Hierbei kommt es zur Abwandlung einer Hyperkeratose in eine verruköse Hyperplasie, anschließend zu einem verrukösen Karzinom und schließlich zum oralen Plattenepithelkarzinom (Batsakis et al. 1999, Murrah et al.1994). Sie kann multifokal auftreten (Krahl et al. 2008) und weist, gegenüber den anderen Formen, eine erhöhte Aggressivität auf (Morton et al. 2007). Da das Risiko einer malignen Entartung mit bis zu 100% angegeben wird (Silverman et al.1997), bedarf es einer umgehenden chirurgischen Intervention (El Naggar et al.2005).

Erythroplakie

Die Erythroplakie beschreibt eine rötliche, nicht abwischbare Mundschleimhautveränderung, die klinisch und pathologisch keiner Mundschleimhauterkrankung zugeordnet werden kann. Sie tritt in der gesamten

Mundschleimhaut auf, bevorzugt wird sie jedoch im Mundboden, dem Zungenrand, retromolar und im weichen Gaumen beobachtet (Hullmann et al. 2010).

Erythroleukoplakie

Die Erythroleukoplakie gehört zu den erosiven, inhomogenen Leukoplakien. Das klinische Bild weist weißliche, unruhige Areale in Kombination mit roten Schleimhautbezirken (Hullmann et al. 2010). Einen besonderen Status weisen Erythroleukoplakie, da hier die Entartungsrate bis zu 50 % angegeben wird (Holmstrup et al. 2006, Neville et al. 2002, Reichart and Philipsen 2005).

Verschiedene Merkmale der gestörten Plattenepithelarchitektur sowie zytologische Atypien werden zur histologischen Diagnosefindung epithelialer Präkursorläsionen verwendet (Driemel et al. 2006, Gale et al. 2005) (Tabelle 1).

Merkmale der gestörten Plattenepithelarchitektur	Merkmale der zytologischen Atypie
<ul style="list-style-type: none"> • Irreguläre Epithelschichtung • Verlust der Ausrichtung der Basalzellen • Tropfenförmige Reteleisten • Steigerung der Mitosezahl • Vorzeitige Keratinisierung in Einzelzellen (Dyskeratose) • Keratinperlen innerhalb der Retezapfen 	<ul style="list-style-type: none"> • Abnorme Variation der Kerngröße • Abnorme Variation der Kernform • Abnorme Variation der Zellgröße • Abnorme Variation der Zellform • Pathologische Kern-Plasma-Relation, Hyperchromasie der Kerne • Atypische Mitosefiguren

Tabelle 1: Histologische Kriterien zur Diagnose epithelialer Präkursorläsionen der Mundhöhle (Gale et al. 2005)

Abhängig vom Dysplasiegrad erfolgt die Klassifikation der Präkursorläsionen (Gale et al. 2005) (Tabelle 2). Abhängig vom Grad der intraepithelialen Neoplasie bzw. dem Dysplasiegrad kann oder ist ein Eingreifen erforderlich. Während squamöse (einfache) Hyperplasie und Basalzell- bzw. Parabasalzellhyperplasie (entspricht

leichter Dysplasie bzw. SIN I) noch eine Beobachtungsstrategie erlauben, sollten Läsionen mit einer atypischen Hyperplasie (entspricht einer mittelgradigen bis schweren Dysplasie bzw. SIN II-III) und Carcinoma in situ (SIN III) entfernt werden (Driemel et al. 2006, Küffer et al. 2002).

2005 WHO-Klassifikation	Squamöse Intraepitheliale Neoplasie (SIN)	Ljubljana Klassifikation Squamöse Intraepitheliale Läsion (SIL)
Squamöse Hyperplasie	-	Squamöse (einfache) Hyperplasie
Leichte Dyplasie	SIN I	Basale und parabasale Hyperplasie (abnorme Hyperplasie)
Mittelgradige Dysplasie	SIN II	Atypische Hyperplasie
Schwere Dysplasie	SIN III	Atypische Hyperplasie
Carcinoma in situ	SIN III	Carcinoma in situ

Tabelle 2: Gegenüberstellung der aktuellen Klassifikationen der epithelialen Prekursorläsionen modifiziert nach Gale und Mitarbeiter (Gale et al. 2005)

1.1.3 Präkanzeröse Konditionen

Gemäß der Weltgesundheitsorganisation (WHO) bezeichnen präkanzeröse Konditionen (Precancerous conditions), ein generalisiertes klinisches Krankheitsbild, das mit einer erhöhten Entartungstendenz einhergeht. Zu den präkanzerösen Konditionen wird der orale Lichen planus (OLP), die Eisenmangelanämie, die orale submuköse Fibrose (OSF), die Syphilis, die Xeroderma pigmentosum, der Lupus erythematodes sowie die Epidermolysis bullosa dystrophicans gezählt (Cardesa et al. 2005, El Naggat et al. 2005, Hullmann et al. 2010).

1.2 Diagnostische Methoden

1.2.1 Die visuelle Inspektion zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen

Die visuelle Inspektion der Mundschleimhaut gehört zum Standarduntersuchungsverfahren der Frühdiagnose des oralen Plattenepithelkarzinoms sowie seiner Präkursorläsionen (Kunkel et al. 2005). Ein besonderes Augenmerk sollte der Untersucher hierbei auf ulzerierende Befunde der Mundschleimhaut, Leukoplakien sowie Erythroplakien haben. Insbesondere wenn diese Veränderungen der Mundschleimhaut länger als 2 Wochen bestehen sollte ein Karzinom ausgeschlossen werden (Hawkins et al. 1999, Kujan et al. 2005, Reibel et al. 2003) (Tabelle 3).

Klinische Warnsignale bezüglich einer malignen Transformation einer Mundschleimhautläsion
<ul style="list-style-type: none">• Erosion oder Ulzeration der Schleimhaut ohne eindeutige mechanische Ursache• Inhomogenität (Wechsel von hyperkeratotischen weißen und erosiven roten Bezirken)• Induration der Schleimhautläsion• Fehlende spontane Schmerzhaftigkeit insbesondere bei Erosion oder Ulzeration• Progress der Läsion insbesondere nach Ausschalten möglicher Ursachen

Tabelle 3: Klinisch auffällige Veränderungen die ein Hinweis auf eine maligne Veränderung der Mundschleimhaut sein können

Eine sichere visuelle und taktile Befundsicherung ist jedoch nicht möglich. Somit ergibt sich die Notwendigkeit der Etablierung einer minimalinvasiven Untersuchungsmethode zur sicheren Diagnosefindung (Kunkel et al. 2005).

1.2.2 Die Biopsie zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen

Eine Mundschleimhautläsion unklarer Dignität, die nach Ausschalten vorhandener mechanischer Irritationen oder Noxen, weiterhin besteht, bedarf einer weiteren Abklärung (Kujan et al. 2005, Kunkel et al. 2010). Die Skalpelbiopsie ist hierbei das etablierte Standardverfahren. Je nach Größe des Befundes kann eine Inzisionsbiopsie oder gleich eine Exzisionsbiopsie durchgeführt werden. Hierbei muss auf die schonende Behandlung des Biopates geachtet werden, um eine gute histologische Aufarbeitung zu gewährleisten. Es ist sinnvoll die Biopsieentnahme in der weiterbehandelnden Klinik durchzuführen, da bei der Entnahme das klinische Erscheinungsbild verändert wird. Vorab sollte jedoch in allen Fällen eine aussagekräftige Fotodokumentation erfolgen (Kujan et al. 2005, Kunkel et al. 2010).

1.2.3 Die Toluidinblaufärbung zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen

Toluidinblau zählt wie die Lugolsche Lösung und Methylenblau zu den absorptiven Farbstoffsubstanzen. Für die Färbung der Mundschleimhaut wird eine 1% Toluidinblau-Lösung aufgetragen und nach ein- bis zweiminütigen Einwirkzeit mit 2% Essigsäure wieder entfernt (Johnson 1999). Toluidinblau diffundiert in die Zellen und färbt im Wesentlichen die Kernstrukturen an. Die Unterscheidung zwischen benignen und malignen Schleimhautarealen basiert auf der Annahme, dass maligne Läsionen aufgrund der größeren Kern-Plasma-Relation eine intensivere Blaufärbung aufweisen sollen (Johnson 1999, Niebel and Chomet 1964). Die Methode soll insbesondere bei Patienten mit starker Exposition zu Risikofaktoren (Mashberg and Samit 1995) helfen, sichtbare Läsionen hinsichtlich ihrer Dignität besser einordnen zu können (Mashberg 1980) und auch eine optisch gezielte Biopsie ermöglichen (Epstein et

al.1992). Die entscheidenden Nachteile der Methode liegen in der geringen Spezifität, da auch nicht maligne proliferationsaktive Bezirke ein vergrößertes Kern-Plasma-Verhältnis zeigen können (Onofre et al. 2001). Das geschilderte Prinzip birgt in sich das Risiko einer vermehrten falsch-positiven Bewertung von Läsionen, die einen erhöhten Zellumsatz aufweisen. Geschildert wurde eine Rate von 40,4% falsch-positiver Werte (Epstein et al. 2008). Insgesamt beschränkt sich der Nutzen daher auf die Erkennung bereits invasiver, aber noch symptomarmer Karzinome, die bei einer klinischen Untersuchung eventuell übersehen werden könnten (Ephros and Mashberg 1999, Missmann et al. 2006). Bei einer eingeschränkten Spezifität von 25-67% erreicht das Verfahren eine Sensitivität von 70-100% (Epstein et al. 1997, Gandolfo et al. 2006, Onofre et al. 2001, Portugal et al. 1996, Ram and Siar 2005).

1.2.4 Die photodynamische Diagnose des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen

Bei der photodynamischen Diagnose (PDD) reichern sich endogene oder exogene fluoreszierende Substanzen, die lokal oder systemisch appliziert wurden, in gesunden und pathologisch veränderten Zellen, unterschiedlich stark an. Diese werden mittels Laser- oder Lichtleitertechnik angeregt und markieren maligne transformiertes Gewebe durch verstärkte oder verminderte Fluoreszenzemission (Messmann 2000).

In der photodynamischen Diagnose des Mundhöhlenkarzinoms wird als photosensibilisierender Farbstoff 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) verwendet. 5-Aminolävulinsäure ist die körpereigene Ausgangssubstanz der Häm-Synthese. Im Überschuss lokal verabreicht, stimuliert 5-Aminolävulinsäure in dysplastischem und in karzinomatösem Gewebe eine verstärkte Bildung und intrazelluläre Akkumulation von stark fluoreszierendem Protoporphyrin IX, das durch kurzfristige Einwirkung von

Licht einer Wellenlänge von 405 nm angeregt wird (Chang et al. 2005, Daskalaki 2002, Leunig et al. 1996). Die Fluoreszenzbefunde gelten als suspekt und können biopsiert werden. Bei der Detektion oraler Plattenepithelkarzinome zeigt die Methode zwar eine hohe Sensitivität von 84-99%, aber eine eingeschränkte Spezifität von 60-89% (Leunig et al. 2000, Schleier et al. 2002a, Schleier et al. 2002b, Sharwani et al. 2006).

Problematisch sind die falsch positiven Befunde insbesondere bei vorbestrahlten Patienten (Zenk et al. 1999, Betz et al. 2002, Schleier et al. 2002b), so dass sich die photodynamische Diagnose (PDD) nicht für die Rezidiv- bzw. Zweittumordiagnostik bei zuvor radiierten Patienten eignet (Zenk et al. 1999). Da verschiedene Bakterienstämme der Mundhöhle bei Inkubation von 5-Aminolävulinsäure ebenfalls Protoporphyrin IX bilden (Doss and Phillip-Dormstro 1973), sind im Rahmen der photodynamischen Diagnose (PDD) professionelle Hygienemaßnahmen zur Erhöhung der Spezifität notwendig (Schleier et al. 2002a). Eine Intervall von ungefähr einer Stunde zwischen professionellen Hygienemaßnahmen und der Applikation des Photosensibilisators 5-Aminolävulinsäure sowie von etwa drei Stunden zwischen Applikation des Photosensibilisators 5-Aminolävulinsäure und der Bildung einer für die Fluoreszenzmessung ausreichenden Menge Protoporphyrin IX (Schleier et al. 2002b) schränken die Praktikabilität der Photodynamischen Diagnose (PDD) in der ambulanten Tumovor- und nachsorge stark ein. Da bereits geringe Mengen Glucose die Bildung von Protoporphyrin IX beeinflussen, wird zudem eine strikte Nahrungskarenz während eines Zeitraumes von mehr als 4 Stunden notwendig (Zenk et al. 1999). Dieses verlangt ein stringentes Patientenmanagement und ist unter Berücksichtigung der begrenzten Compliance gerade der Patienten mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Mundhöhlenkarzinoms schwierig zu realisieren

1.2.5 Die Autofluoreszenz zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen

Autofluoreszenz bezeichnet die biologische Eigenschaft von Gewebe, aufgrund endogener Fluorophore, wie z.B. Flavin, Tryptophan, Elastin und Kollagen, bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zu fluoreszieren (Betz et al. 1994).

Während in maligne transformierten Zellen der anaerobe Glykolyse-Zyklus dominiert, findet in normalen Zellen vornehmlich der aerobe Glykolyse-Zyklus statt. Das Mononukleotid Flavin fungiert im aeroben Glykolyse-Zyklus als Coenzym, während es im anaeroben Glykolyse-Zyklus fehlt. Wird es mit blauem Licht stimuliert, fluoresziert Flavin grün und differenziert so das gesunde vom karzinomatösen Gewebe, welches sich dunkel darstellt (Baletic et al. 2004, DaCosta et al. 2005). Im Gegensatz zur Photodynamischen Diagnose (PDD) erfordert die Autofluoreszenz keine medikamentöse Gabe von Photosensibilisatoren.

1.2.6 Die DNA-Zytometrie zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen

Die DNA-Zytometrie bestimmt die DNA-Ploidie. Liegt ein regelrechter Chromosomensatz vor, wird dies als Diploidie bezeichnet. In maligne transformierten Zellen, kommt es jedoch durch Chromosomenaberration zu einer Abweichung dieses euploiden Chromosomensatzes (Merkel and McGuire 1990, Duesberg et al. 1999, Sen et al. 2000, Rajagopalan and Lengauer 2004). Dieses Phänomen wird als Aneuploidie bezeichnet (Sen et al. 2000, Driemel et al. 2003). Ein etabliertes Verfahren der DNA-Zytometrie ist die DNA Image-Zytometrie (Maraki et al. 2004, Maraki et al. 2006, Remmerbach et al. 2003, Remmerbach et al. 2004). Hierbei

erfolgt die Einfärbung der Kern-DNA der Zellen, die mittels Bürstenbiopsie gewonnen wurden. Mittels eines computergestützten Mikroskopes, das mit einer Digitalkamera ausgerüstet ist, erfolgt die Auswertung. Verglichen werden dann dreihundert suspekta Zellen, mit Zellen die einen euploiden Chromosensatz aufweisen. Durch dieses Verfahren kann eine Sensitivität von bis zu 96,4% und eine Spezifität von bis zu 100% erreicht werden (Remmerbach et al. 2001).

1.2.7 Die Transepitheliale Bürstenbiopsie zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen

Anfang der 90-iger Jahre wurde die Bürste als einfache Entnahmemethode oraler Mundschleimhautzellen entdeckt (Sciubba et al. 1999). Im Gegensatz zur Exfoliativzytologie (Papanicolau et al. 1943, Papanicolau et al. 1949), werden bei der Bürstenbiopsie, Zellen aller Epithelschichten erfasst (Abbildung 1).

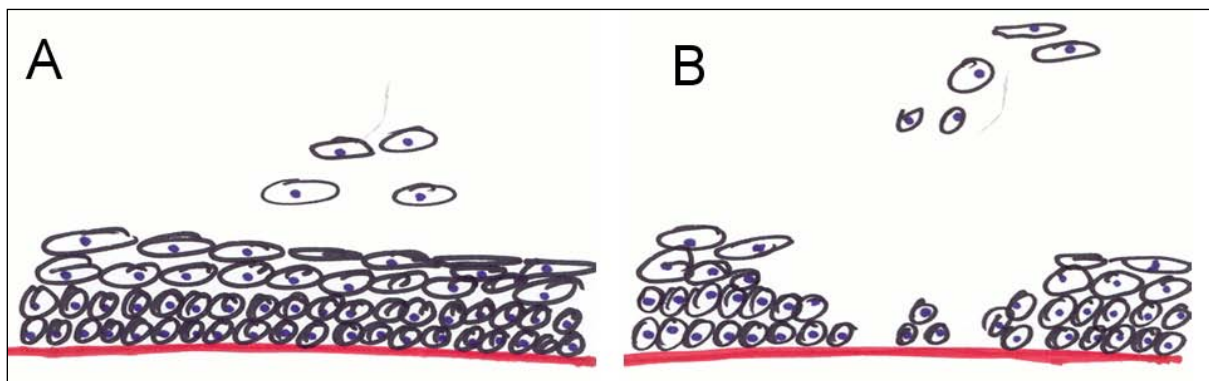


Abbildung 1: Vergleich von Exfoliativzytologie und Bürstenbiopsie der oralen Mukosa. A: Exfoliativzytologie. Es werden nur oberflächliche Zellen geerntet. B: Bürstenbiopsie. Es werden Zellen aller Epithellagen gewonnen.

Die orale Bürstenbiopsie ist nicht nur zur Diagnosefindung oraler Plattenepithelkarzinome und ihrer Vorläuferläsionen, sondern auch zur besseren Spezifizierung benigner Mundschleimhautläsionen, geeignet (Burkhardt et al. 2006, Driemel et al. 2007a, Lottbrein et al. 2003). Sie stellt eine schmerzfreie,

minimalinvasive Maßnahme dar. Es handelt sich hierbei um keine operative Maßnahme. Hierdurch zeigt dieses Untersuchungsverfahren eine große Patientenakzeptanz. Weiterhin stellt es finanziell eine kostengünstige Untersuchungsmethode dar. Durch die Verwendung mehrerer Bürsten kann ein „mapping“ der Mundschleimhaut zusätzlich durchgeführt werden. Hierbei kann topographisch eine Zuordnung der Veränderung der Mundschleimhaut erfolgen.

Die Bürstenbiopsie stellt ein Diagnoseverfahren oraler Risikoläsionen dar und ist als Screening-Verfahren gesunder Patienten ungeeignet. Die große Fläche der Mundhöhle verhindert die Anwendung der Bürstenbiopsie im Sinne eines Screeningverfahrens und beschränkt ihren Nutzen auf die Kontrolle sichtbarer Läsionen. Außerdem ist die Technik für die Untersuchung von Läsionen an der Lippe durch die ausgeprägte Keratinisierung ungeeignet (Remmerbach et al. 2006).

In einer parallel ablaufenden Studie wurde die Wertigkeit oraler konventioneller Bürstenbiopate erforscht (Driemel et al. 2007a, Driemel et al. 2007b, Driemel et al. 2007c). Evaluiert wurden 170 Patienten. Bei der Auswertung der oralen Bürstenbiopate ergaben sich eine Spezifität von 96% sowie eine Sensitivität von 79%. Der positive Vorhersagewert betrug 92%. Der negative Vorhersagewert betrug 89%. Histopathologische Befunde lagen zu allen Bürstenbiopaten vor (Tabelle 4).

	Konventionelle zytologische Analyse der Bürstenbiopate
Spezifität [%]	96
Sensitivität [%]	79
Positiver Vorhersagewert [%]	92
Negativer Vorhersagewert [%]	89

Tabelle 4: Wertigkeit der konventionellen zytologischen Analyse der Bürstenbiopate (Driemel et al. 2007c, Hullmann 2010 (Promotion)).

Eine erweiterte Literaturrecherche zur Wertigkeit der konventionellen oralen Bürstenbiopate ergab im Durchschnitt eine Sensitivität von ca. 80 % (Tabelle 5).

Autor	Methode	Patienten	Läsionen	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Positiver Vorhersagewert [%]	Negativer Vorhersagewert [%]
Remmerbach et al.2001	Konventionell	181	251	94,6	99,5	98,1	98,5
Remmerbach et al.2003	Konventionell	75	75	92,5	100	100	84,6
Remmerbach et al.2004	Konventionell	205	322	91,3	95,1	95,4	92,3
Driemel et al.2007	Konventionell	93	93	79	100	100	92
Driemel et al.2008	Konventionell	169	169	79	93	88	88
Merothra et al. 2008	Konventionell	79	34	76,8	93,3	90,9	91,3

Tabelle 5: Publierte Studien über die Wertigkeit der konventionellen oralen Bürstenbiopsie zur Detektion oraler Plattenepithelkarzinome und seiner Präkursorläsionen

Nachdem eine allein zytomorphologische Betrachtung einen relevanten Anteil maligner Läsionen (studienabhängige Sensitivität von 76,8-94,6%) nicht eindeutig zu identifizieren vermag (Remmerbach et al. 2001, Remmerbach et al. 2003, Remmerbach et al. 2004, Driemel et al. 2007a, Driemel et al. 2007b, Driemel et al. 2007c, Driemel et al. 2007d, Hullmann et al. 2007, Driemel et al. 2008, Mehrotra et al. 2008, Mehrotra et al. 2009), wurden in den letzten Jahren vermehrt unterstützende Verfahren evaluiert. Die von Kujan und Mitarbeitern für orale Bürstenbiopate vorgeschlagene Dünnschicht-Zytologie (Kujan et al. 2006) ist aufgrund der geringen Datenlage noch nicht beurteilbar. Neben computerunterstützten Methoden der Bildanalyse (Oral-CDx) (Sciubba et al. 1999), verwenden andere Auswertungsstrategien den DNA-Gehalt (Remmerbach et al. 2001, Maraki et al. 2006), spezifische Proteinexpressionsmuster zur Detektion maligner Zellen (Driemel et al. 2007c) oder eine zusätzliche Zellblocktechnologie, d. h. die ergänzende Aufbereitung evtl. mit der Bürste gewonnener Gewebefragmente.

1.2.8 Automatische Bildanalyse des Bürstenbiopstates (Oral CDx®)

Bei der automatischen Bildanalyse erfolgt die morphologisch-zytologische Auswertung des Bürstenbiopstates zunächst mit Hilfe eines Computerprogrammes. 192 Zellen, welche vom Computer als am ehesten atypisch klassifiziert worden sind, werden dem Pathologen zur gezielten, mikroskopischen Kontrolle präsentiert. Anschließend werden dem behandelnden Arzt vier Befundkategorien mitgeteilt, welche das weitere Prozedere empfehlen (Burkhardt et al. 2006) (Tabelle 6).





Unzureichendes Zellmaterial		Erneute Bürstenbiopsie
Negativ für epitheliale Atypien		Klinische Kontrolle und evtl. erneute Bürstenbiopsie im Intervall
Atypische Zellen vorhanden		Skalpelliopsie
Positiv für Dysplasie oder Karzinom		Skalpelliopsie

Tabelle 6: Diagnostische Kategorien der automatischen Bildanalyse (Oral CDx®) und empfohlenes weiteres Vorgehen

Die mit diesem Verfahren erreichbare Sensitivität wird mit Werten zwischen 71,4 Prozent und 100 Prozent angegeben (Sciubba et al. 1999, Poate et al. 2004, Scheifele et al. 2004). Aufgrund quantitativ oder qualitativ unzureichenden Materials müssen zwei bis sieben Prozent der Bürstenbiopsate wiederholt werden (Poate et al. 2004, Scheifele et al. 2004).

Das Verfahren ist Lizenz-gebunden und steht in Deutschland bisher nur durch einen Anbieter zur Verfügung. Kritisch wurde die Spezifität der Methode bewertet, die in Studien bis hinunter zu 32 Prozent reicht (Poate et al. 2004) und in Übersichten

pathologischer Institute bisweilen unter 25 Prozent angegeben wird (Slater et al. 2004).

Die Methode soll dem Arzt oder Zahnarzt eine Hilfestellung bieten, klinisch primär nicht bzw. fraglich biopsiewürdige Läsionen auf ihre chirurgische Biopsienotwendigkeit hin zu beurteilen. Benigne orale Läsionen sollen hochspezifisch bestimmt sowie maligne transformierte Zellen und ihre Vorstufen detektiert werden. Das Verfahren ist Lizenz gebunden. Es eignet sich weder zur Diagnosesicherung klinisch manifester bzw. malignitätsverdächtiger Mundschleimhautveränderungen noch zur Screeninguntersuchung bei Mundschleimhautgesunden Patienten (Sciubba et al. 1999).

1.2.9 Immunzytochemisch erweiterte Bürstenbiopsie zur Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen

Die Invasion oraler Plattenepithelkarzinome stellt einen koordinierten und räumlich strukturierten Prozess dar, bei dem in der Invasionsfront zum einen physiologische extrazelluläre Matrixstrukturen abgebaut werden und zum anderen eine provisorische extrazelluläre Matrix unter Einbau von Laminin-5 (Ln-5) bzw. der γ 2-Kette von Ln-5 und von hochmolekularem Tenascin-C (hm Tn-C) gezielt neu synthetisiert wird (Franz et al. 2006) (Abbildung 2). Folglich werden im Rahmen der malignen Transformation sowohl die γ 2-Kette des Ln-5 und ihre proteolytischen Fragmente als auch hm Tn-C als extrazelluläre Matrixproteine hochgradig exprimiert (Patel et al. 2002, Regezi et al. 1995, Regezi et al. 2002). In der immunzytologischen Analyse oraler Bürstenbiopstate werden tumortypische Varianten der Proteinexpression zur Erkennung atypischer Zellen verwendet. Eine interessante Gruppe von Proteinen betrifft hierbei Kontaktstrukturen zur extrazellulären Matrix, die sich im Rahmen der malignen Transformation verändern und beispielsweise vermehrt zytoplasmatisch

exprimiert werden. Diese lassen sich mit spezifischen Antikörpern immunhistochemisch markieren und können so bei der zytopathologischen Begutachtung von Bürstenbiopaten helfen, Karzinomzellen zu detektieren (Driemel et al. 2005, Driemel et al. 2007a, Driemel et al. 2007c). Hierzu wurden beispielsweise Antikörper gegen die extrazellulären Matrixproteine hochmolekulares Tenascin-C und die $\gamma 2$ -Kette von Laminin-5 eingesetzt. (Driemel et al. 2007a, Driemel et al. 2007b). Hierbei konnten transformierte Zellen mit einer Sensitivität um 93 bis 95 Prozent und einer Spezifität bis 100 Prozent detektiert werden.

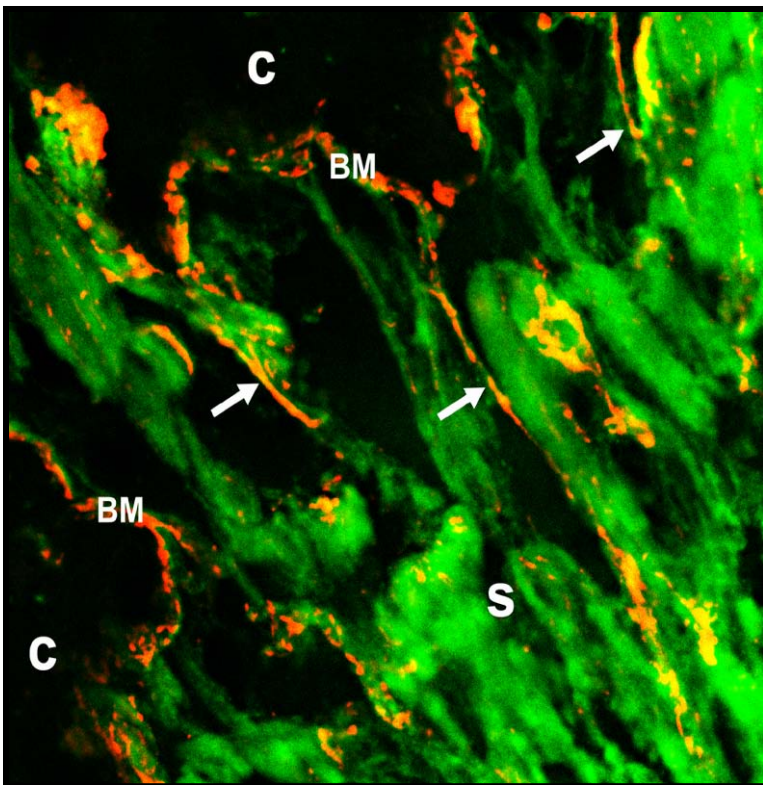


Abbildung 2: Konfokale Laser Scanning-Mikroskopie der Invasionsfront eines oralen Plattenepithelkarzinoms (x300). BM Basalmembran, C Karzinom, S Stroma, →Leitschiene der Invasion, grün Laminin-5, rot hm Tn-C, gelb Kolokalisationsmuster der $\gamma 2$ -Kette von Laminin-5 und hochmolekularem Tenascin-C als Leitschiene der Invasion (Kosmehl 2006)

1.3 Tenascin-C und seine Varianten

Tenascin-C ist ein extrazelluläres Matrixprotein (Chiquet-Ehrismann et al. 1986). Sechs einzelne Ketten bilden ein Hexamer, das über Disulfidbrücken miteinander verbunden ist (Siehe Abbildung 3). Tenascin-C wird während der Embryogenese und Organogenese maximal exprimiert. Eine erhöhte Exprimiertrate kann jedoch auch bei Neoplasien festgestellt werden (Chiquet-Ehrismann et al. 2004), wie bei kolorektalen Karzinomen, Endometriumkarzinomen, Magenkarzinomen, Osteosarkomen, oralen Plattenepithelkarzinomen, Melanomen und Mammakarzinomen. Bei Prostatakarzinomen und oralen Plattenepithelkarzinomen kann sogar ein Anstieg von Tenascin-C im Serum nachgewiesen werden (Adams et al. 2002, Emoto et al. 2001, Mighell et al. 1997, Tanaka et al. 2000, Vollmer et al. 1997, Wiksten et al. 2003). Durch alternatives Spleissen steigt die Vielfalt von Tenascin-C auf mindestens neun verschiedene Spleissvarianten (Mighell et al. 1997). Hierbei werden hochmolekulare (Tn-C_L, 280 kDa) und niedermolekulare (Tn-C_S, 190 kDa) Spleissvarianten unterschieden. Die einzelnen Varianten werden bei unterschiedlichen pathologischen Zuständen unterschiedlich exprimiert (Carnemolla et al. 1989, Carnemolla et al. 1999, Borsi et al. 1992, Borsi et al. 1995).

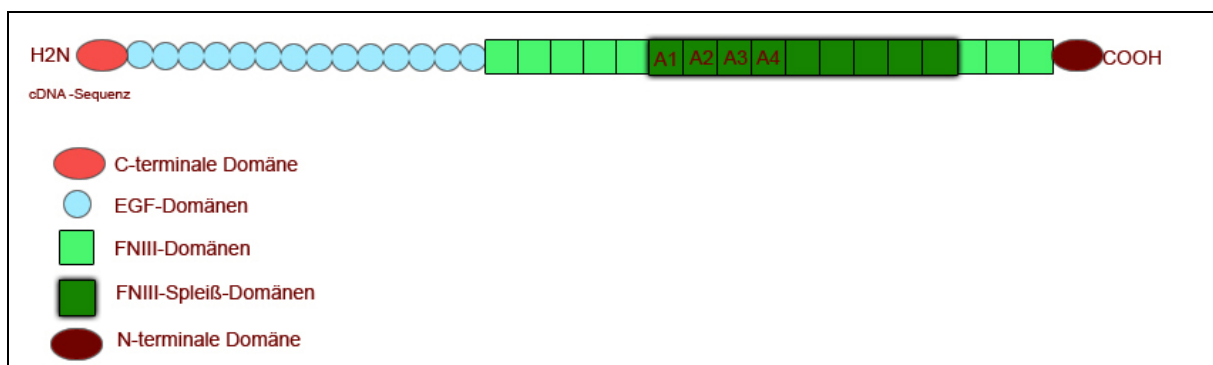


Abbildung 3: Molekülschema einer Tenascin-C-Kette. Die dem alternativen Spleißen unterliegenden Molekülabschnitte sind die fibronectin-like repeats A bis D. Markiert sind ferner die Epitopregionen, welche von dem verwendeten monoklonalen Antikörper BC2 erkannt werden (Zardi L (2006) Persönliche Mitteilung).

Hochmolekulares Tenascin-C (hm Tn-C) markiert im Gegensatz zum niedermolekularem Tenascin-C (nm Tn-C) ausschließlich die Invasionszone von in Umbau befindlichen Geweben (Prieto et al. 1990, Chiquet-Ehrismann et al. 1991, Murphy-Ullrich et al. 1991, Tucker et al. 1994). Bei oralen Plattenepithelkarzinomen kommt es, abhängig vom Dysplasiegrad, zu unterschiedlichen Expressionsintensitäten (Tiitta et al. 1994, Ramos et al. 1998, Regezi et al. 2002).

2 Fragestellung

1. Die vorliegende prospektive Studie soll erstmals den Einsatz extrazellulärer Matrixproteine in der zytologischen Diagnostik testen.
2. Die Studie soll die methodische Erweiterung der Bürstenbiopsie erproben, die mittels hochmolekularem Tenascin-C, immunzytochemisch markiert wurde.
3. Die Studie soll den Stellenwert der immunzytochemischen Tests, als Beitrag zur schnellen und sicheren Interpretation von oralen Bürstenbiopsaten sowie zur Aufdeckung klinisch karzinomverdächtiger Herde der Mundhöhle, abschließend diskutieren.

3 Patienten und Methoden

3.1 Patienten

Die Kohorte dieser Studie umfasst 170 Patienten, die sich von August 2003 bis Oktober 2004 in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/Plastische Operationen des HELIOS Klinikums Erfurt (Chefarzt: Prof. Dr. Dr. H. Pistner) und von November 2004 bis Februar 2006 in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Dr. Dr. T. E. Reichert) mit benignen und malignen Mundschleimhautveränderungen vorstellten. Nach Erhebung der Anamnese und nach klinischer intra- und gegebenenfalls extraoraler Untersuchung mit Inspektion und Palpation wurden von allen Mundschleimhautläsionen Bürstenbiopsien gewonnen. Zur korrelativen histopathologischen Analyse der Bürstenbiopsiediagnosen erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik von allen pathologischen Veränderungen eine Skalpellbiopsie. Von den 170 Patienten waren 80 Frauen und 90 Männer. Zum Zeitpunkt der Bürstenbiopsie war der jüngste Patient 19 Jahre alt, der älteste 84 Jahre. Der Altersdurchschnitt betrug 54 Jahre.

3.2 Histopathologische Begutachtung

Die chirurgischen Biopate und die operativen Präparate wurden in 0,9 %ige Kochsalzlösung überführt und unverzüglich in die Abteilung für Pathologie (01.08.2003-31.10.2004: Institut für Pathologie des HELIOS Klinikums Erfurt

(Chefarzt: Prof. Dr. H. Kosmehl), 01.11.2004-28.02.2006: Institut für Pathologie des Klinikums der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Dr. F. Hofstädter)) verbracht. Die histopathologische Begutachtung erfolgte dort nach Standardmethoden, mittels formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt wurden (HE).

3.3 Technik der Bürstenbiopsie

Nach dem die Patienten ihren Mund kurz mit Leitungswasser ausgespült hatten, wurde die Bürste (Cytobrush[®] Plus GT unsteril, Medscand Medical AB, Malmö, Schweden) mit leichtem Druck und gleichzeitiger Rotation über die Läsion geführt. Feine Blutungspunkte signalisierten eine ausreichende Eindringtiefe der Bürste.

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden die geernteten Zellen der Bürstenbiopsie durch ein Abrollen der Bürste mit einer Drehung um 360 Grad auf den Objektträger (SuperFrost[®] Plus, Menzel, Braunschweig, Deutschland) übertragen. Hierbei wurde die Bürste mehrfach angesetzt und 360 Grad gedreht, so dass ein wiederkehrendes Muster der Zellen auf den Objektträger erhalten wurde (Abbildung 4). Anschließend wurden die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur Luft getrocknet, für 10 Minuten in reines Aceton gegeben und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur Luft getrocknet.

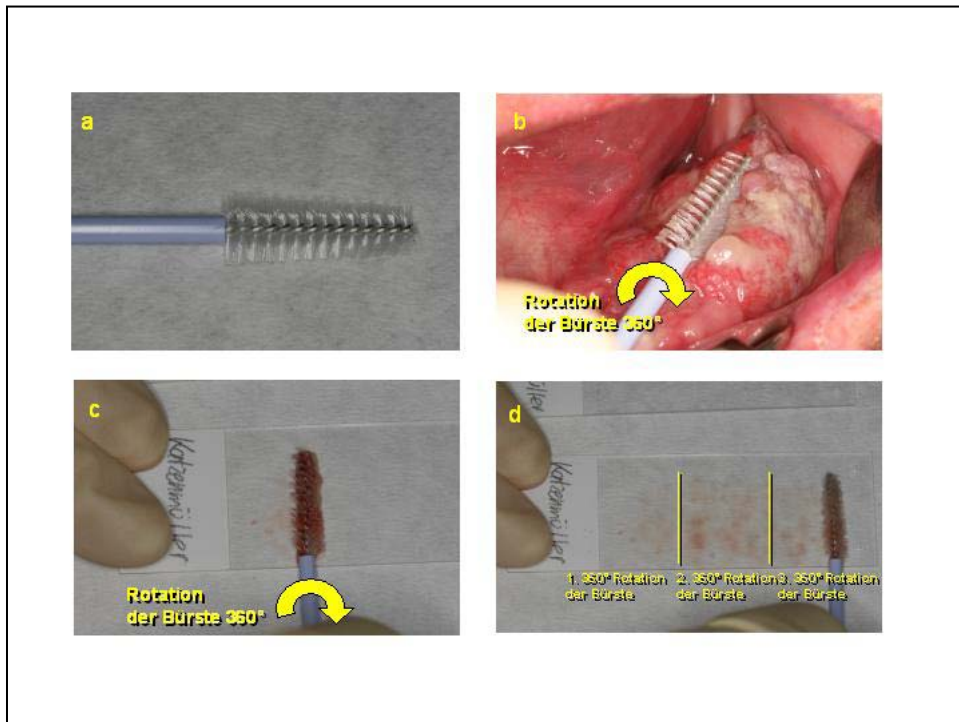


Abbildung 4: Technik der Bürstenbiopsie a: Die Bürste als Entnahmeträger. b: Die Bürste wird mit leichtem Druck und gleichzeitiger Rotation über die Läsion geführt. c und d: Die entnommenen Zellen werden durch mehrfaches Drehen und Ausstreichen auf den Objektträger übertragen.

3.4 Immunzytochemische Markierung der Bürstenbioptate mit hochmolekularem Tenascin-C

Für die hm Tn-C Immunzytochemie standen 159 Bürstenbioptate mit histopathologischer Diagnose für die korrelative Analyse der Bürstenbiopsiediagnosen zur Verfügung (Tabelle 7).

Art der Mundschleimhautläsion	Anzahl der Bürstenbioptate für die Hm Tn-C Immunzytochemie
Normale Mundschleimhaut, Nichtraucher	15
Entzündliche Läsion	28
Hyperproliferative Läsion	56
Plattenepithelkarzinom	52
Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms	8
Gesamt	159

Tabelle 7: Klassifizierung und Anzahl der für die Immunzytochemie zur Verfügung stehenden Mundschleimhautläsionen

Zur Analyse wurde eine standardisierte Immunzytochemie mit einem monoklonalen Antikörper gegen hm Tn-C nach Aceton-Fixierung verwendet.

Für die hm Tn-C Immunzytochemie stand der Klon BC2 (Prof. L. Zardi, Natl. Inst. Canc. Res. Genua, Italien) in einer Verdünnung von 1:20 zur Verfügung.

Die gebundenen hm Tn-C-Antikörper wurden mittels des Streptavidin Alkalische Phosphatase ChemMate Kit und dem Immunfärbeautomat Autostainer (Dako, Glostrup, Dänemark) entsprechend dem Protokoll des Herstellers detektiert.

3.5 Begriffsbestimmungen: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert

In der Diagnostik oraler Bürstenbiopate muss eine Entscheidung zwischen „Karzinom (positiv)“ und „normaler Mundschleimhaut bzw. benigner Läsion (negativ)“ getroffen werden. Hierbei gibt es zwei Fehlermöglichkeiten (Abbildung 5):

1. Man kann normale Mundschleimhaut bzw. eine benigne Läsion als Karzinom einstufen (falsch positiv).
2. Man kann ein Karzinom als normale Mundschleimhaut bzw. benigne Läsion einstufen (falsch negativ).

		Tatsächliche Situation:	
		Plattenepithelkarzinom Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms (positiv)	Normale Mundschleimhaut Entzündliche Läsion Hyperproliferative Läsion (negativ)
Die Diagnose lautet:	Plattenepithelkarzinom Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms (positiv)	Richtige Entscheidung (richtig positiv)	Falsche Entscheidung (falsch positiv)
	Normale Mundschleimhaut Entzündliche Läsion Hyperproliferative Läsion (negativ)	Falsche Entscheidung (falsch negativ)	Richtige Entscheidung (richtig negativ)

Abbildung 5: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert in der Diagnostik oraler Bürstenbiopate.

3.5.1 Sensitivität

Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Plattenepithelkarzinom bzw. das Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms als Karzinom erkannt werden, wird als Sensitivität des Untersuchungsverfahrens der oralen Bürstenbiopate bezeichnet:

Sensitivität = richtig positiv x 100 % : (richtig positiv + falsch negativ)
= Plattenepithelkarzinom bzw. das Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms als Karzinom erkannt x 100 % :
(Plattenepithelkarzinom bzw. das Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms als Karzinom erkannt + Karzinom als normale Mundschleimhaut bzw. benigne Läsion eingestuft)

3.5.2 Spezifität

Unter der Spezifität eines Untersuchungsverfahrens der oralen Bürstenbiopate wird die Wahrscheinlichkeit verstanden, mit der normale Mundschleimhaut sowie entzündliche und hyperproliferative Läsionen als benigne erkannt werden:

Spezifität = richtig negativ x 100 % : (falsch positiv + richtig negativ)
= normale Mundschleimhaut sowie entzündliche und hyperproliferative Läsionen als benigne erkannt x 100 %:
(normale Mundschleimhaut bzw. eine benigne Läsion als Karzinom eingestuft + normale Mundschleimhaut sowie entzündliche und hyperproliferative Läsionen als benigne erkannt)

3.5.3 Positiver und negativer Vorhersagewert

Die Wahrscheinlichkeit, dass die getroffene Diagnose zutreffend ist, wird durch den Begriff des Vorhersagewertes ausgedrückt, wobei es für das „Karzinom“ und „die normale Mundschleimhaut bzw. benigne Läsion“ zwei verschiedene Vorhersagewerte gibt:

Positiver Vorhersagewert = richtig positiv x 100 % : (richtig positiv + falsch positiv)
= Plattenepithelkarzinom bzw. das Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms als Karzinom erkannt x 100 % : (Plattenepithelkarzinom bzw. das Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms als Karzinom erkannt + normale Mundschleimhaut bzw. eine benigne Läsion als Karzinom eingestuft)

Negativer Vorhersagewert = richtig negativ x 100 % : (falsch negativ + richtig negativ)
= normale Mundschleimhaut sowie entzündliche und hyperproliferative Läsionen als benigne erkannt x 100 % : (Karzinom als normale Mundschleimhaut bzw. benigne Läsion eingestuft + normale Mundschleimhaut sowie entzündliche und hyperproliferative Läsionen als benigne erkannt)

4 Ergebnisse

Immunzytochemische Untersuchungen der Bürstenbioptate mit hochmolekularem Tenascin-C

Die Immunzytochemie der Bürstenbioptate der oralen Mukosa ließ keine atypischen Zellen erkennen. Es fand sich keine Immunfärbung für hochmolekulares Tenascin-C. Dagegen wurden beim oralen Plattenepithelkarzinom die atypischen Epithelkomplexe durch eine intensive Rotfärbung hervorgehoben (Abbildung 6).

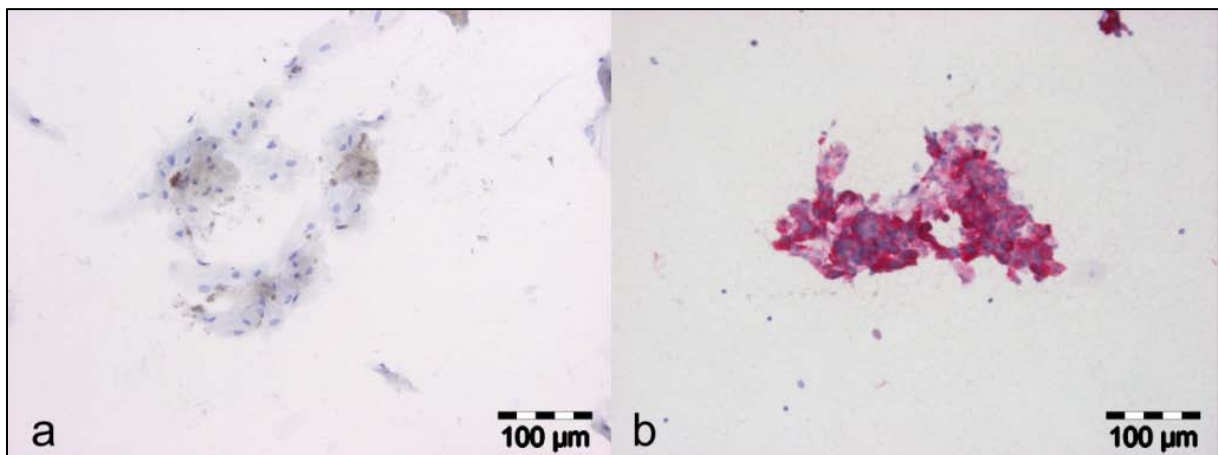


Abbildung 6: Standardisierte Immunzytochemie mit hm Tn-C (Klon BC2). a: normale orale Mukosa ohne Immunfärbung für Tenascin-C, b: orales Plattenepithelkarzinom mit intensiver Immunfärbung der atypischen Epithelzellkomplexe

Hierbei waren zwei immunzytochemische Muster möglich: 1. eine Anfärbung des Zytoplasmas und der Zellmembran und 2. ein positiver Schleier um atypische Zellen (Abbildung 7). Bakterien- und Pilzkolonien stellten sich ebenfalls dar.

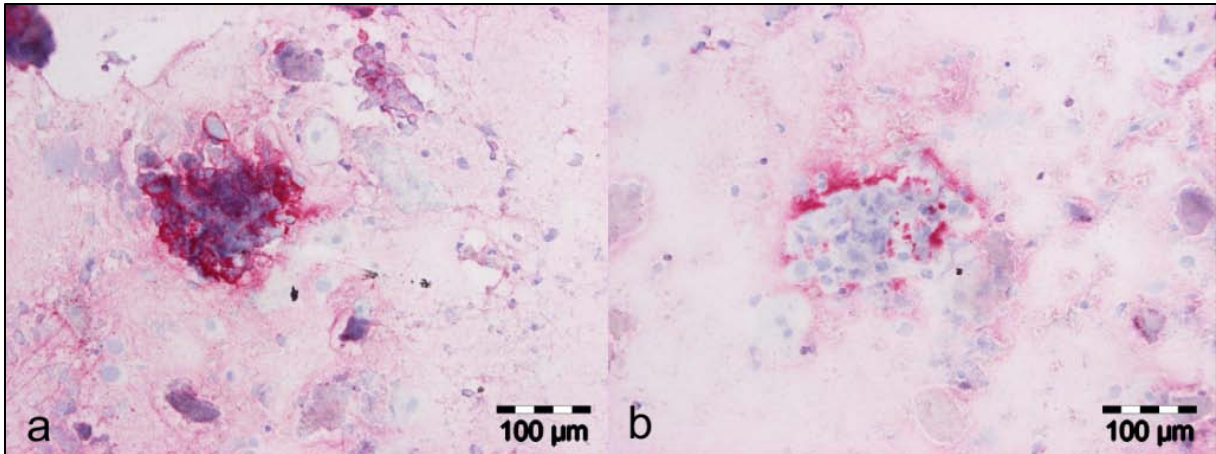


Abbildung 7: Unterschiedliche immunzytochemische Färbemuster von hm Tn-C in atypischen Plattenepithelzellen oraler Bürstenbioptate (Klon BC2). a: eine Anfärbung des Zytoplasmas und der Zellmembran, b: positiver Schleier um atypische Zellen.

Die hm Tn-C Immunzytochemie ergab sieben falsch-positive Fälle, d. h. atypische Zellen in normaler, entzündlicher oder benigner hyperproliferativer Schleimhaut (Spezifität 93 %). Neun primäre Plattenepithelkarzinome und ein Rezidiv konnten immunzytochemisch mit hm Tn-C nicht markiert werden (Sensitivität der hm Tn-C Immunzytochemie 83 %) (Abbildung 8).

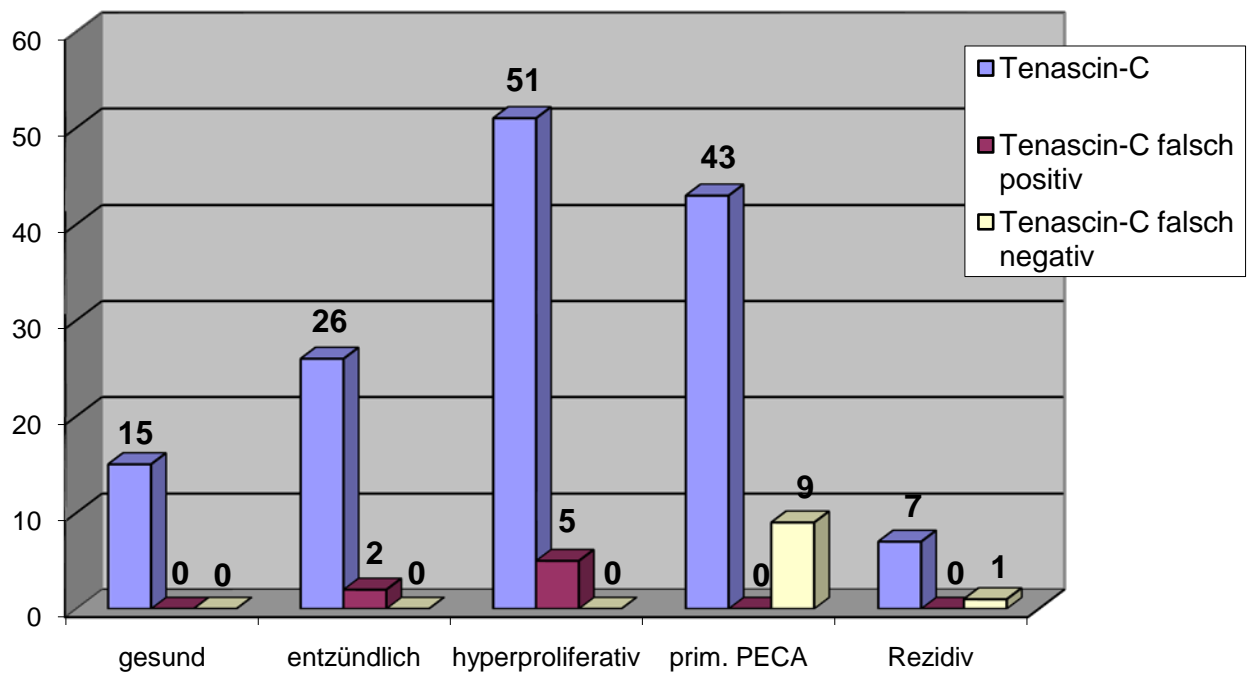


Abbildung 8: Ergebnis der immunzytochemischen Darstellung von hm Tn-C in den Bürstenbiopsaten

Der positive Vorhersagewert betrug für die hm Tn-C Immunzytochemie 88 %, der negative Vorhersagewert erreichte 90 % (Tabelle 8).

Durch die Kombination von konventioneller Zytologie und Immunzytochemie mit hochmolekularem Tenascin-C konnte die Spezifität von 93% auf 99% und die Sensitivität von 83% auf 95% gesteigert werden. Der positive Vorhersagewert betrug für die kombinierte Immunzytochemie mit hochmolekularem Tenascin-C 98 %, der negative Vorhersagewert erreichte für die kombinierte Immunzytochemie mit hochmolekularem Tenascin-C 97% (Tabelle 8).

	Konventionelle Zytologische Analyse der Bürstenbioptate	Tenascin-C Immunzytochemie der Bürstenbioptate	Konventionelle zytologische Analyse und Tenascin-C Immunzytochemie der Bürstenbioptate
Spezifität [%]	96	93	99
Sensitivität [%]	79	83	95
Positiver Vorhersagewert [%]	92	88	98
Negativer Vorhersagewert [%]	89	90	97

Tabelle 8: Wertigkeit der konventionellen und der immunzytochemischen Analyse der Bürstenbioptate mit hm Tn-C

Insgesamt wurden durch die Kombination von konventioneller Zytologie und hm Tn-C Immunzytochemie nur drei orale Plattenepithelkarzinome nicht erkannt, darunter 1 Carcinoma in situ und ein mikroinvasives Karzinom mit einem maximalen Durchmesser von 0,2 cm.

Auch die Zahl der falsch positiven Fälle konnte durch die Kombination von konventioneller Zytologie und hochmolekularer Tenascin-C Immunzytochemie von vier auf einen Fall reduziert werden (Abbildung 9).

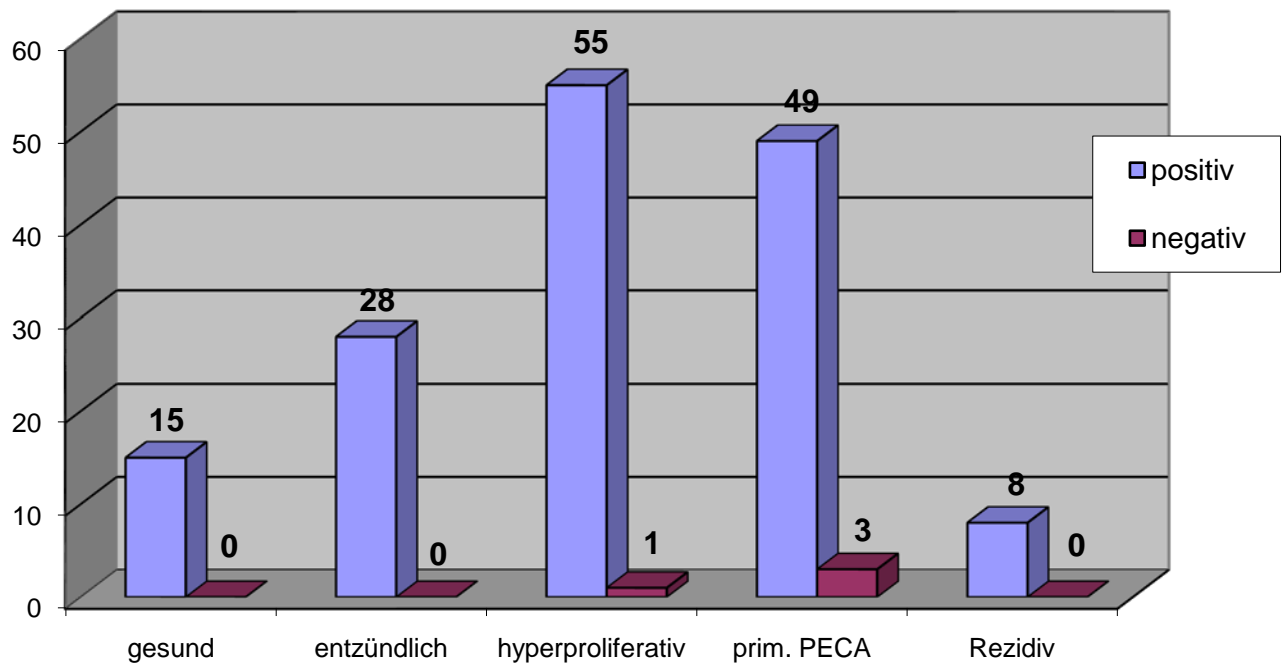


Abbildung 9: Ergebnis der Kombination aus konventioneller zytologischer und immunzytochemischer hm Tn-C Analyse der Bürstenbiopate

Im oben beschriebenen Fall eines in der Skalpellbiopsie zunächst nicht erkannten Plattenepithelkarzinoms markierte hm Tn-C ebenso wie die $\gamma 2$ -Kette von Ln-5 positive Zellgruppen und gab Anlass zu einer Wiederholung der Inzisionsbiopsie, welche in einer Reklassifikation in orales Plattenepithelkarzinom resultierte.

5 Diskussion

Die Notwendigkeit einer sicheren Früherkennung von oralen Plattenepithelkarzinomen und ihrer Prekursorläsionen stellt eine hohe Anforderung an das zu verwendende Testverfahren. Dieses Screeningverfahren muß verschiedene Voraussetzungen erfüllen. Es sollte minimalinvasiv sein, um vom Patienten anstandslos akzeptiert zu werden. Es sollte einfach in der Anwendung sein für die breite Masse der Behandler, sowie finanziell erschwinglich (Doherty 1989). Als Testverfahren muß es eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen (Zenk et al. 1999). In Anbetracht dieser Anforderungen an ein Screeningverfahren wurde nach ergänzenden Methoden gesucht, die die Sensitivität und Spezifität der klassischen oralen Bürstenbiopsie mit nachfolgender zytologischer Untersuchung verbessern. Zu diesen Methoden zählen die computerunterstützte Bildanalyse (Oral-CDx) (Sciubba 1999, Svirsky et al. 2002, Rick 2003, Scheifele et al. 2004), die DNA Image-Zytometrie (Böcking et al. 2004, Maraki et al. 2004, Maraki et al. 2006, Remmerbach et al. 2004) und die AgNOR-Analyse (Remmerbach 2003).

Bei der automatischen Bildanalyse (Oral-CDx) erfolgt eine computergestützte Auswertung der Zellen, die mit der Bürstenbiopsie gewonnen wurden. Die vom Computer als morphologisch Auffällig deklarierten Zellen, werden erneut durch den Pathologen begutachtet. In der Literatur wird die Sensitivität des Verfahrens von 71,4% bis zu 100% angegeben. Die Spezifität hierbei wird mit 32% bis hin zu 93% angegeben (Sciubba 1999, Svirsky et al. 2002, Rick 2003, Poate et al. 2004, Scheifele et al. 2004).

Die DNA-Zytometrie bestimmt die DNA-Ploidie. Liegt ein regelrechter Chromosomensatz vor, wird dies als Diploidie bezeichnet. In maligne transformierten

Zellen, kommt es jedoch durch Chromosomenaberrationen zu einer Abweichung dieses euploiden Chromosomensatzes (Merkel and McGuire 1990, Duesberg et al. 1999, Sen et al. 2000, Rajagopalan and Lengauer 2004). Dieses Phänomen wird als Aneuploidie bezeichnet (Sen et al. 2000, Driemel et al. 2003). Ein etabliertes Verfahren der DNA-Zytometrie ist die DNA Image-Zytometrie (Maraki et al. 2004, Maraki et al. 2006, Remmerbach et al. 2003, Remmerbach et al. 2004). Hierbei erfolgt die Einfärbung der Kern DNA der Zellen, die mittels Bürstenbiopsie gewonnen wurden. Mittels eines computergestützten Mikroskopes, das mit einer Digitalkamera ausgerüstet ist, erfolgt die Auswertung. Vergleichen werden dann dreihundert suspekt Zellen, mit Zellen die einen euploiden Chromosomensatz aufweisen. Durch dieses Verfahren kann eine Sensitivität von bis zu 96,4% und eine Spezifität von bis zu 100% erreicht werden (Remmerbach et al. 2001). Die Kombination der DNA Image-Zytometrie mit der konventionellen Bürstenbiopsie konnte die Sensitivität bis zu 98,2% steigern, bei einer Spezifität von 100% (Remmerbach et al. 2001, Remmerbach et al. 2004, Remmerbach et al. 2004).

Die AgNOR-Analyse ist ein weiteres Verfahren zur Detektion maligner transformierter Zellen, die mittels Bürstenbiopsie gewonnen wurden. Hierbei werden die Nuclear Organizer Region (NOR) der RNA bestimmt (Remmerbach et al. 2003). NORs sind ein Parameter für die Syntheseleistung einer Zelle und damit auch ihrer Proliferation. Das Verfahren weist eine Sensitivität und Spezifität von 100% auf und kann mit der konventionellen Bürstenbiopsie kombiniert werden. Aufgrund des sehr großen technischen Aufwandes des Verfahrens kann die AgNOR-Analyse trotz der guten Sensitivität und Spezifität nicht als Routineverfahren angesehen werden.

Leider stehen die genannten erweiterten Untersuchungsverfahren nicht allen auswertenden Laboren zur Verfügung. Im Gegensatz hierzu ist die Immunzytochemie, die in den meisten histopathologischen Laboratorien automatisiert

erfolgt, ein Verfahren, das flächendeckend in der Bundesrepublik Deutschland angewendet wird und zugleich kostengünstig ist (Driemel et al. 2007a, Driemel et al. 2007b, Scott et al. 2006).

Die Expression von Tenascin-C bei Invasion der Zellen eines Plattenepithelkarzinomen durch die Basalmembran kann als immunzytochemischer Parameter herangezogen werden, insbesondere wenn eine Differenzierung zu schweren dysplastischen Formen erschwert ist (Lissitzky et al. 1985, Grundmann et al. 1989). Hierbei erfolgt die Expression direkt durch die Karzinomzellen, vor allem in der Invasionszone (Hindermann et al. 1999, Katenkamp et al. 2003, Wewer and Mareel 2003). Somit weist das hochmolekulare Tenascin-C ein ähnliches Expressionsmuster wie die γ 2-Ketten von Laminin-5 auf. Bei der immunzytochemischen Auswertung der γ 2-Ketten von Laminin-5 der Bürstenbiopsien, konnte eine Sensitivität von 93% und eine Spezifität von 98% erreicht werden. Die immunzytochemische Erweiterung der konventionellen Bürstenbiopsie mit der γ 2-Kette von Laminin-5 zeigt wiederum eine hohe Sensitivität von 98% sowie Spezifität von 100%. Der positive und negative Vorhersagewert betragen jeweils 100% (Driemel et al. 2007a).

Das Tenascin-C-Muster bietet, wie das Laminin-5-Muster, eine von der Morphologie unabhängige Information und unterstützt die diagnostische Interpretation. Die farbliche Immunmarkierung der suspekten Zellen der Bürstenbiopsie erleichtert das Auffinden atypischer Zellen im zytologischen Präparat und rationalisiert die Diagnostik (Driemel et al. 2005, Driemel et al. 2007a, Driemel et al. 2007b, Scott et al. 2006). Die immunzytochemische Auswertung der Bürstenbiopsate mit hochmolekularem Tenascin-C zeigte eine Sensitivität von 83% und eine Spezifität von 93%. Der positive Vorhersagewert betrug 88% und der negative Vorhersagewert 90%. Die immunzytochemische Erweiterung der konventionellen Bürstenbiopsie mit

hochmolekularem Tenascin-C erhöhte die Sensitivität auf 95% sowie die Spezifität auf 99%. Anlog hierzu stieg der positive Vorhersagewert auf 98% und der negative Vorhersagewert auf 97% (Driemel et al. 2007b).

Somit ist die hm Tn-C immunzytochemisch unterstützte konventionelle Zytologie mit einer Sensitivität von 95 % geeignet, atypische bzw. invasionsfähige Zellen im oralen Bürstenbioptat zu identifizieren. Hierbei verhält sich das hm Tn-C analog zur γ 2-Kette von Laminin-5 sowie der computerunterstützte Bildanalyse (Oral-CDx), der DNA Image-Zytometrie und der AgNOR-Analyse.

Die unterschiedlichen, zurzeit verwendeten Verfahren zur diagnostischen Unterstützung der konventionellen Bürstenzytologie erhöhen die Wertigkeit der Methode (Tabelle 9).

Autor	Methode	Patienten	Läsionen	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Positiver Vorhersagewert [%]	Negativer Vorhersagewert [%]
Sciubba et al. (1999)	Computer unterstützte Bildanalyse (Oral CDx [®])	327	327	100	93	90	100
Remmerbach et al. (2001)	Konventionell	181	251	94,6	99,5	98,1	98,5
	DNA-Image-Zytometrie	181	251	96,4	100	100	99
	Kombiniert konventionell und DNA-Image-Zytometrie	181	251	98,2	100	100	99,5
Svirsky et al. (2002)	Computer unterstützte Bildanalyse (Oral CDx [®])	n. g.	n. g.	95,9	n. g.	38	n. g.
Potter et al. (2003)	n. g.	115	n. g.	97	n. g.	n. g.	n. g.
Remmerbach et al. (2003a)	Konventionell	75	75	92,5	100	100	84,6
	AgNOR-Analyse	75	75	100	100	100	100
	Kombiniert konventionell und AgNOR-Analyse	75	75	100	100	100	100
Rick (2003)	Computer unterstützte Bildanalyse (Oral CDx [®])	n. g.	n. g.	90,9	n. g.	n. g.	n. g.
Maraki et al. (2004)	Kombiniert konventionell und DNA-Image-Zytometrie	98	98	100	97,4	89	100
Poate et al. (2004)	Computer unterstützte Bildanalyse (Oral CDx [®])	49	49	71,4	32	44,1	60
Remmerbach et al. (2004)	Konventionell	205	322	91,3	95,1	95,4	92,3
	DNA-Image-Zytometrie	205	322	95,5	100	100	96,2
	Kombiniert konventionell und DNA-Image-Zytometrie	205	322	97,8	100	100	98,1
Scheifele et al. (2004)	Computer unterstützte Bildanalyse (Oral CDx [®])	80	96	92,3	94,3	85,7	97,1
Driemel et al. (2007)	Konventionell	93	93	79	100	100	92
	Ln-5 Immunzytochemie	93	93	93	98	97	97
	Kombiniert konventionell und γ 2-Kette von Ln-5 Immunzytochemie	93	93	93	100	100	97
Driemel et al. (2007)	Konventionell	159	159	79	96	92	89
	hm Tn-C Immunzytochemie	159	159	83	93	88	90
	Kombiniert konventionell und hm Tn-C Immunzytochemie	159	159	95	99	98	97
Remmerbach et al. (2007)	Konventionell	n. g.	n. g.	91,3	95,1	94,4	92,3
	DNA-Image-Zytometrie			97,8	100	100	98,1
Driemel et al. (2008)	Konventionell	169	169	79	93	88	88
Merhotra et al. (2008)	Konventionell	79	34	76,8	93,3	90,9	91,3

Tabelle 9: Publierte Studien über die Wertigkeit der methodisch erweiterten oralen Bürstenbiopsie zur Detektion des oralen Plattenepithelkarzinoms und seiner Präkursorläsionen. (n. g. nicht genannt)

6 Schlußfolgerung

- Die visuelle Inspektion der Mundschleimhaut gehört zum Standarduntersuchungsverfahren der Frühdiagnose des oralen Plattenepithelkarzinoms sowie seiner Prekursorläsionen.
- Die Skalpelbiopsie ist ein etabliertes Standardverfahren bei der Abklärung malignitätsverdächtiger Mundschleimhautveränderungen.
- Obwohl der Nachweis extrazellulärer Matrixproteine nicht obligater Bestandteil einer zytologischen Untersuchung ist, ermöglicht ihr Auftreten, im Rahmen der malignen Transformation und Invasion, eine intrazytoplasmatische Demonstration und erlaubt ihren Einsatz in der zytologischen Diagnostik oraler Plattenepithelkarzinome.
- Die Bürstenbiopsie, kombiniert mit der immunzytochemischen Analyse von hochmolekularem Tenascin-C, unterstützt das Screening von Personen und Bevölkerungsgruppen mit erhöhtem Risiko im Hinblick auf maligne und potentiell maligne Mundschleimhautveränderungen. Sie ermöglicht das Monitoring verdächtiger oraler Läsionen über längere Zeiträume und hilft bei der Überwachung von Patienten im Rahmen der Tumornachsorge.
- Die mit hochmolekularem Tenascin-C immunzytochemisch unterstützte konventionelle Bürstenbiopsie konnte bezüglich der Sensitivität von 79% auf 95% gesteigert werden.
- Die mit hochmolekularem Tenascin-C immunzytochemisch unterstützte konventionelle Bürstenbiopsie konnte bezüglich der Spezifität von 96% auf 99% gesteigert werden.

- Die mit hochmolekularem Tenascin-C immunzytochemisch unterstützte konventionelle Bürstenbiopsie ist geeignet, atypische bzw. invasionsfähige Zellen im oralen Bürstenbioptat zu identifizieren.
- Ein positiver Befund oder eine Progression einer Mundschleimhautläsion bei negativem Befund sind stets Indikationen zur Überweisung des Patienten an Fachkliniken und zur dort durchgeführten Skalpellbiopsie mit histopathologischer Untersuchung.

7 Zusammenfassung

Die transepitheliale Bürstenbiopsie soll als moderne, nicht invasive Methode, die klinisch-morphologische Einordnung oraler Schleimhautveränderungen unterstützen und dem Untersucher die Entscheidung über eine notwendige Skalpellbiopsie erleichtern oder diese sogar ersetzen. Sensitivität und Spezifität der Methode sollen durch unterschiedliche, unterstützende Verfahren erhöht werden. Da im Rahmen der malignen Transformation das extrazelluläre Matrixprotein hochmolekulares Tenascin-C (hm Tn-C) hochgradig exprimiert wird, stellt es einen attraktiven Ansatzpunkt für eine methodische Erweiterung der oralen Bürstenbiopsie dar.

Über einen Zeitraum von 3 Jahren wurden 159 konsekutive transepitheliale Bürstenbiopsiate von benignen und malignen Mundschleimhautläsionen gewonnen. Alle pathologischen Läsionen wurden für die korrelative Analyse histopathologisch untersucht und kontrolliert.

In einem ersten Schritt wurde die Wertigkeit der konventionellen HE-Färbung transepithelialer Bürstenbiopsiate zur Identifikation des Plattenepithelkarzinomes und seiner Präkursorläsionen bestimmt. Mittels standardisierter immunzytochemischer Untersuchungen wurde dann die Eignung von hm Tn-C als Indikator invasionsfähiger atypischer Zellen in oralen Bürstenbiopsiaten geprüft. Die konventionelle Zytologie ergab eine Spezifität von 96 %, die immunzytochemische Markierung mit hm Tn-C 93% und die kombinierte hm Tn-C Immunzytochemie eine Spezifität von 99 %. Die Sensitivität der konventionellen Zytologie betrug 79%, die immunzytochemische Markierung mit hm Tn-C 83% und die kombinierte hm Tn-C Immunzytochemie wies eine Sensitivität von 95 % auf. Der positive Vorhersagewert betrug für die konventionelle Zytologie 92 %, für die immunzytochemische Markierung mit hm Tn-C

88% und für die kombinierte hm Tn-C Immunzytochemie 98%. Der negative Vorhersagewert erreichte 89 % für die konventionelle Zytologie, 90% für die immunzytochemische Markierung mit hm Tn-C und 97 % für die kombinierte hm Tn-C Immunzytochemie.

Die hm Tn-C immunzytochemische Markierung atypischer Zellen im Bürstenbiopsiepräparat erleichtert das Auffinden der diagnostisch entscheidenden Zellen und unterstützt die diagnostische Interpretation. Die hohe Sensitivität der methodisch erweiterten Bürstenzytologie empfiehlt diese Technik als ersten diagnostischen Schritt im Rahmen des Monitorings von Mundschleimhautläsionen. Positiver Befund oder Progression der Läsion bei negativem Befund sind Indikationen zur Überweisung des Patienten an Fachkliniken und zur weiteren histopathologischen Abklärung.

8 Literatur

Adam C (2003) Tumoren im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich unter spezieller Berücksichtigung von Plattenepithelkarzinomen. Datenbankgestützte Dokumentation, Med Dissertation, Universität Tübingen

Adams M, Jones JL, Walker RA, Pringle JH, Bell SC (2002) Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. *Cancer Res* 62: 3289-3297

Baatenburg de Jong RJ, Hermans J, Molenaar J, Briaire JJ, le Cessie S (2001) Prediction of survival in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 23: 718-724

Baletic N, Petrovic Z, Pendjer I, Malicevic H (2004) Autofluorescent diagnostics in laryngeal pathology. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 261: 233-237

Batsakis JG, Suarez P, El-Naggar AK. (1999) Proliferative verrucous leukoplakia and its related lesions. *Oral Oncol*; 35:354-359

Beck-Mannagetta J (2002) Hilfe für rauchende Patienten. Eine Anleitung für das zahnärztliche Team, S 1-34

Betz CS, Stepp H, Janda P, Arbogast S, Grevers G, Baumgartner R, Leunig A (2002) A comparative study of normal inspection, autofluorescence and 5-ALA-induced PPIX fluorescence for oral cancer diagnosis. *Int J Cancer* 97: 245-252

Böcking A, Remmerbach T, Becker J (2004) Bürstenbiopsie zur Mundkrebsfrüherkennung. Zahnarztl Mitteil 9: 28-32

Borsi A, Carnemolla B, Nicolo G, Spina B, Tanara G, Zardi L (1992) Expression of different tenascin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. Int J Cancer 52: 688-692

Borsi A, Balza E, Gaggero B, Allemanni G, Zardi L (1995) The alternative splicing pattern of the tenascin-C pre-mRNA is controlled by the extracellular pH. J Biol Chem 270: 6243-6245

Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM (2002) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. Eur J Cancer 38: 99-166

Burkhardt A, Maerker R (1978) Dysplasieklassifikation oraler Leukoplakien und Präkanzerosen. Bedeutung für Prognose und Therapie. Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir 2: 199-205

Burkhardt A, Burkhardt AM, Aklan T (2006) Die Bürstenbiopsie - Grundlagen und Ergebnisse einer neuen Methode zur Abklärung von Mundschleimhautläsionen. Thüringer Zahnarztbl 04: 21-29

Burkhardt A (2006) Letter to the editor: Very early cytological and DNA-cytometric diagnosis of in situ carcinoma in an immunosuppressed liver transplant recipient. J Oral Pathol Med 35: 520-522

Carnemolla B, Balza E, Siri A, Zardi L, Nicotra MR, Bigotti A, Natali PG (1989) A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. *J Cell Biol* 108: 1139-1148

Carnemolla B, Castellani P, Ponassi M, Borsi L, Urbini S, Nicolo G, Dorcaratto P, Viale G, Winter G, Neri D, Zardi L (1999) Identification of a glioblastoma-associated tenascin-C isoform by a high affinity recombinant antibody. *Am J Pathol* 154: 1345-1352

Cardesa A, Gale N, Nadal A, Zidar N (2005) Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (eds) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon, pp 140-143

Chang CJ, Wilder-Smith P (2005) Topical application of photofrin for photodynamic diagnosis of oral neoplasms. *Plast Reconstr Surg* 115: 1877-1886

Chiquet M, Fambrough DM (1984) Chick myotendinous antigen. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis. *J Cell Biol* 98: 1926-1946

Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T (1986) Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 47: 131-139

Chiquet-Ehrismann R, Matsuoka Y, Hofer U, Spring J, Bernasconi C, Chiquet M (1991) Tenascin variants: differential binding to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues. *Cell Regul* 2: 927-938

Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M (2003) Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol* 4: 488-499

Chiquet-Ehrismann R (2004) Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 986-90

DaCosta RS, Andersson H, Cirocco M, Marcon NE, Wilson BC (2005) Autofluorescence characterisation of isolated whole crypts and primary cultured human epithelial cells from normal, hyperplastic, and adenomatous colonic mucosa. *J Clin Pathol* 58. 766-774

Daskalaki A (2002) Untersuchung zur Anwendung photodynamischer Methoden in der Zahnheilkunde, Med Dissertation, Universität Berlin

Davis S, Severson RK (1987) Increasing incidence in tongue cancer in the US among young adults. *Lancet* 2: 910-911

Doherty SA (1989) Basic issues in screening for oral cancer among male subpopulation. *J Tenn Dent Assoc* 69: 26-29

Doss M, Phillip-Dormstro W (1973) Regulatory link between lactate dehydrogenase and biosynthesis of porphyrin and heme in microorganisms. *Enzyme* 16: 28-41

Driemel (2003) Bestimmung des klonalen DNA-Gehaltes bei Speicheldrüsentumoren mit Hilfe hochauflösender DNA-Durchflusszytometrie, Med Dissertation, Universität Ulm

Driemel O, Braxein K, Pistner H, Kosmehl H (2004) Orales Adenoid-Squamöses Karzinom. Tumormarker und Prognose. Mund Kiefer Gesichtschir 8: 118-122

Driemel O, Hemmer J, Dahse R, Dietmaier W, Tsioutsias T, Buch RS, Reichert TE, Pistner H, Kosmehl H (2005) Laminin-5 identifiziert atypische Zellen in oralen Bürstenbiopsaten. Dtsch Zahnarztl Z Supplement: 144.

Driemel O, Hertel K, Reichert TE, Kosmehl H (2006) Aktuelle Klassifikation der Präkursorläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms: Prinzipien der WHO-Klassifikation 2006. Mund Kiefer Gesichtschir 10: 89-94

Driemel O, Dahse R, Hakim SG, Tsioutsias T, Pistner H, Reichert TE, Kosmehl H (2007a) Laminin-5 immunocytochemistry: a new tool for identifying dysplastic cells in oral brush biopsies. Cytopathology 2007 Dec;18(6):348-55.

Driemel O, Dahse R, Berndt A, Pistner H, Hakim SG, Zardi L, Reichert TE, Kosmehl H (2007b) High-molecular tenascin-C as an indicator of atypical cells in oral brush biopsies. Clin Oral Investig 2007 Mar;11(1):93-9. Epub 2006 Nov 17.

Driemel O, Kosmehl H, Rosenhahn J, Berndt A, Reichert TE, Zardi L, Dahse R. (2007c) Expression analysis of extracellular matrix components in brush biopsies of oral lesions. Anticancer Res. 2007 May-Jun;27(3B):1565-70.

Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Müller-Richter U, Kosmehl H, Reichert TE. (2007d) Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2007 Dec;5(12):1095-100. Review. English, German.

Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, Kleinsasser N, Staudenmaier R, Müller-Richter U, Reichert TE, Kosmehl H. (2008) Performance of conventional oral brush biopsy - Wertigkeit der konventionellen oralen Bürstenbiopsie. *HNO.* 2008 Feb;56(2):205-10. German.

Duesberg P, Rasnick D, Li R, Winters L, Rausch C, Hehlmann R (1999) How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res* 19: 4887-4906

El Naggar AK, Reichart PA. (2005) Proliferative verrucous leukoplakia and precancerous conditions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D (eds) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics: Head and Neck Tumours.* Lyon: IARC Press, 2005: 180-181

Emoto K, Yamada Y, Sawada H, Fujimoto H, Ueno M, Takayama T, Kamada K, Naito A, Hirao S, Nakajima Y (2001) Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma. *Cancer* 92: 1419-1426

Ephros H, Mashberg A. (1999) Toluidine blue - viewpoints. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 87: 526-527

Epstein JB, Scully C, Spinelli J. (1992) Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 160-163

Epstein JB, Oakley C, Millner A, Emerton S, Meij van der E, Le N. (1997) The utility of toluidine blue application as a diagnostic aid in patients previously treated for upper oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 83: 537-547

Epstein JB, Siverman S, Epstein JD, Lonky SA, Bride MA. (2008) Analysis of oral lesion biopsies identified and evaluated by visual examination and toluidine blue. *Oral Oncology* 2008; 44: 538-544

Franz M, Hansen T, Richter P, Borsi L, Böhmer FD, Hyckel P, Schleier P, Katenkamp D, Zardi L, Kosmehl H, Berndt A (2006) Complex formation of the laminin-5 gamma2 chain and large unspliced tenascin-C in oral squamous cell carcinoma in vitro and in situ: implications for sequential modulation of extracellular matrix in the invasive tumor front. *Histochem Cell Biol* 126: 125-131

Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Westra WH, Califano J (2005) Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (eds) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon, pp 140-143

Gandolfo S, Penetenero M, Brocoletti R, Pagano M, Carrozzo M, Scully C. (2006) Toluidine blue uptake in potentially malignant oral lesions in vivo: clinical and histological assessment. *Oral Oncol* 2006; 42: 89-95

Ganly I, Soutar D, Kaye S (2000) Current role of gene therapy in head and neck cancer. *Eur J Surg Oncol* 26: 338-343

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M (2001) Cancer statistics 2001. *CA Cancer J Clin* 51: 15-36

Hawkins RJ, Wang EE, Leake JL (1999) Preventive health care, 1999 update: prevention of oral cancer mortality. *The Canadian Task Force on Preventive Health Care* 65: 617.

Hindermann W, Berndt A, Boris L, Luo X, Hyckel P, Katenkamp D, Kosmehl H (1999) Synthesis and protein distribution of the unspliced large tenascin C-isoform in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 189: 475-480

Hindermann W, Berndt A, Haas KM, Wunderlich H, Katenkamp D, Kosmehl H (2003) Immunohistochemical demonstration of the gamma2 chain of laminin-5 in urinary bladder urothelial carcinoma. Impact for diagnosis and prognosis. *Cancer Detect Prev* 27: 109-115

Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. (2006) Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol* 2006; 42, 461-474

Hullmann M, Reichert TE, Dahse R, Eggeling von F, Pistner H, Kosmehl H, Driemel O (2007) Orale Zytologie: Historische Entwicklung, aktueller Stand und Ausblick. Mund Kiefer GesichtsChir 11:1-9

Hullmann M, Kunkel M, Reichert TE (2010) Diagnostik und Therapie oraler präkanzeröser Läsionen. MKG Chirurg 2010 3:7-15

Hullmann M (2010) Dissertation: IDENTIFIKATION DES ORALEN PLATTEN-EPITHELKARZINOMS UND SEINER VORLÄUFERLÄSIONEN MITTELS KONVENTIONELLER BÜRSTENBIOPSIE

Johnson NW. Oral Cancer, FDI World Dental Press, London, 1999, pp 1-44

Katenkamp K (2001) Synthese und Verteilung der hochmolekularen Tenascin-C-Isoform im Adenokarzinom der Prostata und im Prostatagewebe, Med Dissertation, Universität Jena

Katenkamp K, Berndt A, Hindermann W, Wunderlich H, Haas KM, Borsi L, Zardi L, Kosmehl H (2003) mRNA expression and protein distribution of the unspliced tenascin-C isoform in prostatic adenocarcinoma. J Pathol 203: 771-779

Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D (1996) Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. Virchows Arch 429: 311-322

Kosmehl H, Berndt A, Strassburger S, Borsi L, Rousselle P, Mandel U, Hyckel P, Zardi L, Katenkamp D (1999) Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. Br J Cancer 81: 1071-1079

Krahl D, Altenburg A, Zouboulis C. (2008) Reactive hyperplasias, precancerous and malignant lesions of the oral mucosa. JDDG; 6: 217-232

Küffer R, Lombardi T (2002) Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). Oral Oncology 38 (2002) 125–130

Kujan O, Glenny AM, Duxbury J, Thakker N, Sloan P (2005) Evaluation of screening strategies for improving oral cancer mortality: a cochrane systematic review. J Dent Educ 69: 255-265

Kujan O, Desai M, Sargent A, Bailey A, Turner A, Sloan P (2006) Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: Results from a cohort of normal oral mucosa. Oral Oncol 42: 810-818

Kunkel M (2005) Leitlinienentwurf: Dentoalveoläre Chirurgie: Präkanzeröse Mundschleimhautveränderungen, S 1-10

Kunkel M, Hertrampf K, Kopp I et al (2010) Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde. Leitlinie der DGZMK / BZÄK / DGMKG AWMF-Leitlinien-Register Nr.007/092

Leunig A, Rick K, Stepp H, Goetz A, Baumgartner R, Feyh J (1996) Photodynamische Diagnostik von Neoplasien der Mundhöhle nach lokaler Applikation von 5-Aminolävulinsäure. *Laryngorhinootologie* 75: 459-464

Leunig A, Betz SC, Mehlmann M, Stepp H, Arbogast S, Grevers G, Baumgartner R (2000) Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence. *Laryngoscope* 110: 78-83

Lissitzky JC, Pourreau-Schneider N, Kopp F, Chiarotti Y, Charpin C, Jacquemier J, Martin PM (1985) Invasion, métastases des tumeurs solides. Interactions cellules tumorales/membranes basales tissulaires et vasculaires. *Bull Cancer* 72: 367-376

Lutz JM, Francisci S, Mugno E, Usel M, Pompe-Kirn V, Coebergh JW, Bieska-Lasota M EUROPREVAL Working Group (2003) Cancer prevalence in Central Europe: the EUROPREVAL Study. *Ann Oncol* 14: 313-322

Maraki D, Becker J, Boecking A (2004) Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. *J Oral Pathol Med* 33: 398-404

Maraki D, Hengge UR, Becker J, Böcking A (2006) Very early cytological and DNA-cytometric diagnosis of in situ carcinoma in an immunosuppressed liver transplant recipient. *J Oral Pathol Med* 35: 58-60

Mashberg A (1980) Reevaluation of toluidine blue application as a diagnostic adjunct in the detection of asymptomatic oral squamous cell carcinoma. A continuing prospective study of oral cancer III. *Cancer* 46: 758-763

Mashberg A, Samit A. (1995) Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *Ca Cancer J Clin* 1995; 45: 328-351

Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R (2006) Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer* 5: 1-11

Mehrotra R, Singh MK, Pandya S, Singh M. The use of an oral brush biopsy without computer-assisted analysis in the evaluation of oral lesions: a study of 94 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106:246–53.

Mehrotra R, Hullmann M, Smeets R, Reichert TE, Driemel O (2009) Oral cytology revisited. *J Oral Pathol Med.* 2009 Feb;39(2):161-6

Merkel DE, McGuire WL (1990) Ploidy, proliferative activity and prognosis. *Cancer* 65: 1194-1205

Messmann H (2000) Fluoreszenzendoskopie in der Gastroenterologie. *Z Gastroenterol* 38: 21-30

Mighell AJ, Thompson J, Hume WJ, Markham AF, Robinson PA (1997) Human tenascin-C: identification of a novel type III repeat in oral cancer and of novel splice variants in normal, malignant and reactive oral mucosae. *Int J Cancer* 72(2):236-40

Missmann M, Jank S, Laimer K, Gassner R (2006) A reason for the use of toluidine blue staining in the presurgical management of patients with oral squamous cell carcinomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 741-743

Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF (2000) The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Dis* 6: 65-74

Morton TH, Cabay RJ, Epstein JB. (2007) Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: report of three cases. *J Oral Pathol Med*; 36: 315-318

Murphy-Ullrich JE, Lightner VA, Aukhil I, Yan YZ, Erickson HP, Hook M (1991) Focal adhesion integrity is downregulated by the alternative spliced domain of human tenascin. *J Cell Biol* 115: 1127-1130

Murrah VA, Batsakis JG. (1994) Proliferative verrucous leukoplakia and verrucous hyperplasia. *Ann Otol Rhinol Laryngol*; 103: 660-663

Neville BW, Day TA. (2002) Oral Cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 195-215

Niebel HH, Chomet B. (1964) In vivo staining test for delineation of oral epithelial neoplastic change: Preliminary report. *J Am Dent Assoc*; 68: 801-806

Onofre MA, Sposto MR, Navarro CM. (2001) Reliability of toluidine blue application in the detection of oral epithelial dysplasia and in situ and invasive squamous cell carcinomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 91: 535-540

Papanicolaou GN (1942) A new procedure for staining vaginal smears. *Science* 95: 438-439

Papanicolaou GN, Traut HF (1943) Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear, The Commonwealth Fund, New York, pp 1-47

Papanicolaou GN (1949) A survey of the actualities and potentialities of exfoliative cytology in cancer diagnosis. *Ann Intern Med* 31: 661-674

Patel V, Aldridge K, Ensley JF, Odell E, Boyd A, Jones J, Gutkind J, Yeudall WA (2002) Laminin-gamma2 overexpression in head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 99: 583-588

Pistner H (2004) Tumor-Früherkennung auf Zahnärztetag. *Thuring Zahnarztebl* 10: 10.

Poate TW, Buchanan JA, Hodgson TA, Speight PM, Barrett AW, Moles DR, Scully C, Porter SR (2004) An audit of the efficacy of the oral brush biopsy technique in a specialist Oral Medicine unit. *Oral Oncol* 40: 829-834

Portugal LG, Wilson KM, Biddinger PW, Gluckman JL. (1996) The role of toluidine blue in assessing margin status after resection of squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122: 517-519

Potter TJ, Summerlin DJ, Campbell JH (2003) Oral malignancies associated with negative transepithelial brush biopsy. *J Oral Maxillofac Surg* 61: 674-677

Prieto AL, Jones FS, Cunningham BA, Crossin KL, Edelmann GM (1990) Localization during development of alternatively spliced forms of cytotoxic mRNA by in situ hybridization. *J Cell Biol* 111: 685-698

Rajagopalan H, Lengauer C (2004) Aneuploidy and cancer. *Nature* 432: 338-341

Ram S, Siar CH. (2005) Chemiluminescence as a diagnostic aid in the detection of oral cancer and potentially malignant epithelial lesions. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34: 521-527

Ramos DM, Chen B, Regezi J, Zardi L, Pytela R (1998) Tenascin-C matrix assembly in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 75: 680-687

Regezi JA, Zarbo RJ, Regev E, Pisanty S, Silverman S, Gazit D (1995) p53 protein expression in sequential biopsies of oral dysplasias and in situ carcinomas. *J Oral Pathol Med* 24: 18-22

Regezi JA, Ramos DM, Pytela R, Dekker NP, Jordan RC (2002) Tenascin and beta 6 integrin are overexpressed in floor of mouth in situ carcinomas and invasive squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 38: 332-336

Reibel J, Clausen H, Dabelsteen E (1985) Staining patterns of human pre-malignant oral epithelium and squamous cell carcinomas by monoclonal anti-keratin antibodies. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 93: 323-330

Reibel J (2003) Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 14: 47-62

Reichart PA (2000) Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. *Community Dent Oral Epidemiol* 28: 390-398

Reichart PA, Philipsen HP (2005) Oral erythroplakia - a review. *Oral Oncol* 41: 551-561

Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, Böcking A (2001) Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol* 22: 211-221

Remmerbach TW, Weidenbach H, Müller C, Hemprich A, Pomjanski N, Buckstegge B, Böcking A (2003a) Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal Cell Pathol* 25: 139-146

Remmerbach TW, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A (2003b) Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image cytometry: report on four cases. *Anal Cell Pathol* 25: 159-166

Remmerbach TW, Mathes SN, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A (2004) Nichtinvasive Bürstenbiopsie als innovative Methode in der Früherkennung des Mundhöhlenkarzinoms. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8: 229-236

Remmerbach TW, Hemprich A, Böcking A. (2007) Minimal invasive brush-biopsy: diagnostic aid for earliest detection of oral cancer. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2007; 117: 926–40.

Rick GM (2003) Oral brush biopsy: the problem of false positives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 96: 252.

Scheifele C, Schlechte H, Bethke G, Reichart PA (2002) Nachweis von TP53-Mutationen mittels Exfoliativzytologie (brush biopsy) oraler Leukoplakien. *Mund Kiefer Gesichtschir* 6: 410-414

Scheifele C, Reichart PA (2003) Is there a natural limit of the transformation rate of oral leukoplakia? *Oral Oncol* 39: 470-475

Scheifele C, Schmidt-Westhausen AM, Dietrich T, Reichart PA (2004) The sensitivity and specificity of the OralCDx technique: evaluation of 103 cases. *Oral Oncol* 40: 824-828

Schleier P, Zenk W, Dietel W (2002a) Mundhöhlentumoren. Nicht alles was fluoresziert ist bösartig. MMW Fortschr Med 144: 26-28

Schleier P, Zenk W, Dietel W (2002b) Fluoreszenz beim Mundhöhlenkarzinom. HNO-Nachrichten 5: 22-24

Sciubba JJ (1999) Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. US Collaborative OralCDx Study Group. J Am Dent Assoc 130: 1445-1457

Scott IS, Odell E, Chatrath P, Morris LS, Davies RJ, Vowler SL, Laskey RA, Coleman N (2006) A minimally invasive immunocytochemical approach to early detection of oral squamous cell carcinoma and dysplasia. Br J Cancer 94: 1170-1175

Sen S (2000) Aneuploidy and cancer. Curr Opin Oncol 12: 82-88

Sharwani A, Jerjes W, Salih V, MacRobert AJ, El-Maaytah M, Khalil HS, Hopper C (2006) Fluorescence spectroscopy combined with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy. J Photochem Photobiol B 83: 27-33

Silverman Jr S, Gorsky M. (1997) Proliferative verrucous leukoplakia: a follow-up study of 54 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod; 84: 154-157

Slater LJ (2004) Oral brush biopsy: false positives redux. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 97: 419.

Svirsky JA, Burns JC, Carpenter WM, Cohen DM, Bhattacharyya I, Fantasia JE, Lederman DA, Lynch DP, Sciubba JJ, Zunt SL (2002) Comparison of computer-assisted brush biopsy results with follow up scalpel biopsy and histology. *Gen Dent* 50: 500-503

Tanaka M, Yamazaki T, Araki N, Yoshikawa H, Yoshida T, Sakakura T, Uchida A (2000) Clinical significance of tenascin-C expression in osteosarcoma: tenascin-C promotes distant metastases of osteosarcoma. *Int J Mol Med* 5: 505-10

Tiitta O, Happonen RP, Virtanen I, Luomanen M (1994) Distribution of tenascin in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 23: 446-450

Tucker RP, Brunso-Bechthold JK, Jenrath DA, Khan NA, Poss PM, Sweatt AJ, Xue Y (1994) Cellular origins of tenascin in the developing nervous system. *Perspect Dev Neurobiol* 2: 43-52

Vollmer G, Tan MI, Wunsche W, Frank K (1997) Expression of tenascin-C by human endometrial adenocarcinoma and stroma cells: heterogeneity of splice variants and induction by TGF-beta. *Biochem Cell Biol* 75:759-69

Wewer de O, Mareel M (2003) The role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 200: 429-447

Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, Lundin M, Kokkola A, Boguslawski von K, Haglund C (2003) Tenascin-C expression correlates with prognosis in gastric cancer. *Oncology* 64:245-50

Zenk W, Dietel W, Schleier P, Günzel S (1999) Visualisierung von Karzinomen der Mundhöhle durch Stimulierung der Synthese von fluoreszierendem Protoporphyrin IX. *Mund Kiefer Gesichtschir* 3: 205-209

9 Addendum

Ein großer Dank ist an Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. T.E. Reichert gerichtet, für die Förderung meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank ist an Herrn PD Dr. med. Dr. med. dent. O. Driemel gerichtet, für die Überlassung des Themas und die Förderung meiner Arbeit sowie für die intensive und fachspezifische Betreuung.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Frau Eirini, meiner Tochter Lydia und meinen Eltern, Athanasia und Georgios, die mir mit Rat und Tat immer zur Seite gestanden haben.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Moralis Antonios

Geburtsdatum: 03.12.1971

Geburtsort: Stuttgart

Familienstand: verheiratet

Konfession: griechisch Orthodox

Nationalität: deutsch

Ehefrau: Zakyri Eirini
*26.08.1973 in Paris, Frankreich

Kinder: Morali Lydia
*03.12.2007 in Regensburg

Vater: Moralis Georgios
*15.10.1942 in Griechenland

Mutter: Moralis Athanasia,
Geborene Orfanou
*09.09.1945 in Griechenland

Geschwister: Morali Chrissi
*28.08.1967 in Griechenland

Schulbildung: 1977 - 1983 griechische Grundschule in Stuttgart
1983 - 1986 griechisches Gymnasium in Stuttgart
1986 - 1989 griechisches Lyzeum in Stuttgart

1989 Teilnahme an der Panhellenischen Prüfung in Athen/Griechenland

1990 - 1991 Studienkolleg der wissenschaftlichen Hochschulen Bayern in München

Universitäre Ausbildung:

Studium der Medizin:

1991 - 1999 an der Ludwig Maximilians Universität München

1998 - 1999 Praktisches Jahr in München

29.03.1995 Ärztliche Vorprüfung

28.08.1997 I. Staatsexamen

24.03.1998 II. Staatsexamen

14.04.1999 III. Staatsexamen

Studium der Zahnmedizin:

1999 - 2003 an der Ludwigs Maximilians Universität München

27.10.2003 Zahnärztliche Prüfung

Berufstätigkeit:

01.02.2004 bis 31.12.2008 Assistenzarzt

in Weiterbildung bei

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. T. E. Reichert,

Klinik und Poliklinik für

Mund-, Kiefer- und

Gesichtschirurgie der

Uniklinik Regensburg

Seit 01.01.2009 Oberarzt in der

Klinik und Poliklinik für
Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie der
Uniklinik Regensburg
bei Prof. Dr. med. Dr. med. dent. T. E. Reichert

Approbation als Arzt: 01.10.2004 in München

Approbation als Zahnarzt: 12.11.2003 in München

Promotion in der Zahnmedizin: 12.07.2005 (Dolor Post Extractionem - Die lokale
Therapie der Alveolitis mit medikamentösen
Einlagen)

Facharztprüfung: 23.07.2008 in München