

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
der Ludwig–Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

**Evaluation der optischen Kohärenztomographie in der  
Tumorfrühdiagnostik im oberen Luft- Speiseweg  
- klinisch prospektive Evaluation einer neuen Methode in vivo-**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig–Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Veronika Volgger  
aus Kaltern a.d. Weinstraße (I)

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christian Stephan Betz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Knösel  
Priv. Doz. Dr. Axel Kleespies  
Prof. Dr. Klaus Hallfeldt

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: /

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>.....</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>.....</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Maligne Tumore des oberen Aerodigestivtraktes.....	1
1.1.1 Präkanzeröse Läsionen.....	2
1.1.2. Risikofaktoren für die Entstehung maligner Tumore des OADT.....	4
1.1.3 Mortalitätsraten.....	5
1.1.4 Wichtigkeit und Probleme der Tumorfrühdiagnostik.....	6
1.2 Nicht- invasive Techniken zur Tumorfrühdiagnostik im oberen Luft-.....	.....
Speiseweg.....	8
1.2.1 Anfärbetechniken.....	8
1.2.2 Moderne Zytologie.....	9
1.2.3 Hochfrequenzultraschall.....	10
1.3 Optische Systeme zur Tumorfrühdiagnostik.....	10
1.3.1 Optische Spektroskopie.....	13
1.3.2 Fluoreszenzbildgebung.....	14
1.3.3 Schmalband-Bildgebung.....	15
1.3.4 Konfokale Mikro(endo)skopie, Multiphotonenmikro(endo)skopie....	16
1.3.5 Photoakustische Bildgebung.....	17
1.4 Optische Kohärenztomographie (OCT).....	18
1.4.1 Technische Grundlagen der OCT.....	18
1.5 Fragestellung und Zielsetzung.....	23
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
2.1 Patientenkollektiv der prospektiven klinischen Studie.....	24
2.2 Time Domain – Optische Kohärenz Tomographie.....	24
2.3 Screening der Mundhöhle.....	25
2.4 Durchführung der prospektiven klinischen Studie.....	26
2.5 Vergleich von Epitheldicken: OCT und Histologie.....	31
2.6 Retrospektive Intensitätsanalyse.....	31
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1 Ergebnisse Screening der Mundhöhle.....	34
3.2 Ergebnisse der prospektiven Studie.....	36

3.2.1 Auswertung bezüglich Integrität der Basalmembran.....	36
3.2.2 Analyse der in der OCT falsch positiven Läsionen.....	38
3.2.3 Analyse der in der OCT falsch negativen Läsion.....	40
3.2.4 Analyse der dysplastischen Läsionen.....	40
3.2.5 Beurteilung durch verblindete Bewerter.....	42
3.3 Vergleich von Epitheldicken: OCT und Histologie.....	45
3.4 Retrospektive Intensitätsanalyse.....	46
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>50</b>
4.1. Material und Methoden.....	50
4.2 Ergebnisse.....	53
4.2.1 Ergebnisse aus der prospektiven klinischen Studie.....	54
4.2.2 Ergebnisse der Intensitätsanalyse.....	55
4.3 Vergleich unserer Ergebnisse mit anderen Publikationen.....	58
4.4 Vergleich unserer Ergebnisse mit Publikationen zur Anwendung der.....	
OCT an Haut und Schleimhäuten aus anderen Fachbereichen.....	65
4.4.1 Klinische Anwendung der OCT in der Gynäkologie.....	65
4.4.2 Klinische Anwendung der OCT in der Urologie.....	67
4.4.3 Klinische Anwendung der OCT in der Gastroenterologie.....	69
4.4.4. Klinische Anwendung der OCT in der Dermatologie.....	70
4.5 Die OCT im Vergleich zu anderen optischen Methoden in der.....	
Tumorfrühdiagnostik im OADT.....	74
<b>5. Zusammenfassung und Perspektive.....</b>	<b>77</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>7. Danksagung.....</b>	<b>88</b>

## Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5- Aminolaevulinsäure
\$	Dollar
Ø	durchschnittlich
a	Jahre
AFI	Autofluoreszenzbildgebung
AK	aktinische Keratose
BCC	Basalzellkarzinom
CE	Communauté Européenne
Cis	Carcinoma in situ
CM	konfokale Mikroskopie
cm	Zentimeter
CME	konfokale Mikroendoskopie
CO <sub>2</sub> -Laser	Kohlendioxid-Laser
CT	Computertomographie
D I-III	Dysplasie (Grad I-III)
d. h.	das heißt
DMBA	9,10 Dimethyl-1,2-Benzanthracene
EC	epitheliale Zyste
EFI	exogene Fluoreszenzbildgebung
Et al.	Lat. et alii oder et aliae
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDA	Food and Drug Administration
FD-OCT	Frequency Domain Optische Kohärenztomographie
FN	falsch Negative
FP	falsch Positive
FS	Fibrinschorf
HE	Hämatoxylin- Eosin
HK	Hyperkeratose
HNO	Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
HP	Hyperplasie
HPV	humane Papilloma-Viren
Hz/MHz	Hertz/ Megahertz
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität

lt.	laut
MDL	Michelson Diagnostic Limited
MIT	Massachusetts Institute of Technology
mm	Millimeter
MPM	Multiphotonen Mikroskopie
MPME	Multiphotonen Mikroendoskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NM	Normale Mukosa
nm	Nanometer
NPW	negativer prädiktiver Wert
OADT	oberer Aerodigestivtrakt
OCT	optische Kohärenztomographie
OLP	oraler Lichen planus
PAI	photoakustische Bildgebung
PAM	photoakustische Mikroskopie
PAT	photoakustische Tomographie
PEC	Plattenepithelkarzinom
PPIX	Protoporphyrin IX
PPW	Positiver prädiktiver Wert
PS-OCT-Bilder	Polarisations-sensitive OCT-Bilder
RN	richtig Negative
RP	richtig Positive
SD	Standardabweichung
SHG	second harmonic generation
WHO	world health organization
TD-OCT	Time Domain Optische Kohärenztomographie
µm	Mikrometer
U.S.	United States
z. B.	zum Beispiel
Z. n.	Zustand nach

# 1. Einleitung

## 1.1 Maligne Tumore des oberen Aerodigestivtraktes

Jährlich werden in der europäischen Union in etwa 147500 erstmals aufgetretene Tumoren des oberen Luft-Speiseweges diagnostiziert und circa 63400 Menschen sterben daran [1]. Europaweit liegen diese Tumoren sowohl in der Inzidenzrate als auch in der tumorassoziierten Mortalitätsrate an siebter Stelle [1]. Bei Männern machen sie 7,1% aller Tumorneuerkrankungen pro Jahr aus, bei Frauen sind es 1,9%. Die Mortalitätsraten der Tumore des oberen Aerodigestivtraktes an allen Tumoren liegen bei 5,5% für Männer und 3,7% für Frauen.

Daten des Robert Koch Institutes [2] zeigen, dass die Inzidenz der Krebserkrankungen des Mund- und Rachenraumes bei Männern in Deutschland bis zum Beginn der 1990er Jahre erheblich zugenommen hat. Seitdem ist ein ebenso deutlich fallender Trend zu verzeichnen. Bei Frauen stieg die Inzidenz bis Ende der 1990er Jahre an und ging danach in einen konstanten Kurvenverlauf mit beginnendem Rückgang über. Die Mortalität an diesen Tumoren weist einen ähnlichen Kurvenverlauf mit jeweils niedrigeren Raten auf. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für die gemeinschaftlich betrachteten Lokalisationen der Mundhöhle und des Rachens betragen für Männer 47% und für Frauen 55%. Inzidenz- und Mortalitätsraten sind in Abbildung 1 dargestellt.

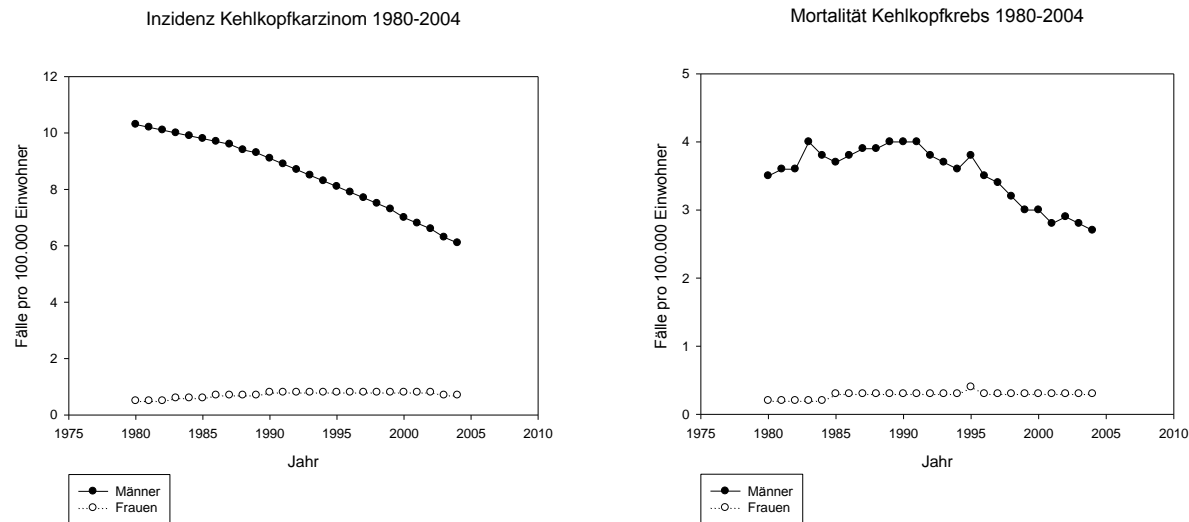
Bei Larynxkarzinomen bei Männern nimmt die Erkrankungshäufigkeit seit den 1980er Jahren ab, während die Sterblichkeit erst seit etwa 1990 deutlich zurückgeht. Sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität an Kehlkopfkrebs bei Frauen ist nach Zunahme bis in die 1980er Jahre seit Beginn der 1990er Jahre weitgehend unverändert (Abbildung 2).

Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für Kehlkopfkrebs liegen für Männer bei 61% und für Frauen bei 62% [2].

# 1. Einleitung



**Abbildung 1:** links: Inzidenz Mundhöhlen- und Rachenkrebs 1980-2004 in Deutschland [2]; rechts: Mortalität Mundhöhlen- und Rachenkrebs 1980-2004 in Deutschland [2]



**Abbildung 2:** links: Inzidenz Larynxkarzinom 1980-2004 in Deutschland [2]; rechts: Mortalität Larynxkarzinom 1980-2004 in Deutschland [2]

## 1.1.1 Präkanzeröse Läsionen

Den meisten Kopf- Halstumoren ist der histologische Typ gemeinsam: in über 90% aller Karzinome des oberen Luft-Speiseweges handelt es sich um Plattenepithelkarzinome [3], die entweder de novo entstehen oder sich aus präkanzerösen Läsionen wie Leukoplakien und Erythroplakien entwickeln.

In der WHO-Klassifikation von 2005 wurde auf eine neue Definition der oralen Leukoplakie verzichtet, so dass diejenige von 1994 [4] unverändert gilt: „Die orale Leukoplakie ist eine vorwiegend weiße, nicht abwischbare Veränderung der Mundschleimhaut, die weder klinisch noch histopathologisch einer anderen genau bestimmbar Läsion zugeordnet werden kann.“



## 1. Einleitung

---

Der Begriff Leukoplakie ist eine rein klinische Bezeichnung. Histopathologisch kann diese Schleimhautveränderung von einer einfachen epithelialen Hyperplasie bis hin zum invasiven PEC reichen. Auch bei der Erythroplakie handelt es sich um einen streng klinischen Begriff, der eine rötliche Läsion beschreibt, welche im Rahmen der Diagnostik zunächst nicht weiter differenziert werden kann.

Epidemiologisch kommt die Leukoplakie vor allem bei Männern im mittleren bis höheren Alter vor. Die Prävalenz nimmt mit dem Alter zu [5]. Weniger als 1% der Männer unter 30 Jahren haben Leukoplakien, bei über 70-Jährigen sind es bereits 8%. Bei Frauen beträgt die Prävalenz bei über 70-Jährigen circa 2% [6]. Am häufigsten sind diese Leukoplakien an der Wangenschleimhaut, an den Alveolarkämmen und an der Unterlippe vorzufinden. Läsionen am Mundboden, am Zungenrand und an der Unterlippe weisen hingegen am häufigsten dysplastische Areale auf [5]. Erythroplakien kommen wesentlich seltener vor, es gibt allerdings keine exakten Zahlen zu den Prävalenzraten in der Fachliteratur. Die Wahrscheinlichkeit, dysplastische oder frühmaligne Bereiche innerhalb von Leukoplakien zu finden, liegt je nach Studie zwischen 15,6% bis 39,2%, wohingegen sie bei Erythroplakien bei über 90% liegt [5].

Bei Dysplasien und Carcinoma in situ handelt es sich um rein histopathologische Begriffe. Dysplasie und Carcinoma in situ sind dabei nach der 2. Auflage der WHO-Klassifikation [7] wie folgt definiert:

*Dysplasie*: Präkanzeröse Läsion des Plattenepithels, gekennzeichnet durch zelluläre Atypien und Verlust der normalen Reifung und Schichtung, wobei noch nicht die Charakteristika des Carcinoma in situ erreicht werden. Die Dysplasie wird in 3 Grade unterteilt: geringgradige, mäßiggradige und schwere Dysplasie.

- Die *geringgradige Dysplasie* ist gekennzeichnet durch insgesamt geringe Kernatypien, die am stärksten im basalen Drittel des Epithels zu sehen und in den oberen Lagen des Epithels höchstens minimal sind. Hier sind Reifung und Schichtung klar erhalten;
- Bei der *mäßiggradigen Dysplasie* erkennt man ausgeprägte Kernabnormalitäten mit deutlichen Nukleolen, wobei die Veränderung am deutlichsten in den basalen zwei Dritteln des Epithels sichtbar ist. Im oberen Drittel des Epithels können mäßiggradige Kernabnormalitäten vorhanden sein, aber Reifung und Schichtung sind deutlich ausgeprägt;
- Die *schwere Dysplasie* zeigt ausgeprägte Kernabnormalitäten und Verlust der Reifung in mehr als zwei Dritteln des Epithels, aber in den oberen Lagen ist noch Schichtung erkennbar. Es liegen eine ausgeprägte Kernpolymorphie (z.T. bizarre Kerne), zumindest stellenweise

## 1. Einleitung

---

sehr deutliche Nukleolen, andernorts dichte hyperchromatische Kerne und Mitosen bis in die oberen Epithellagen vor.

*Carcinoma in situ*: Dabei handelt es sich um eine Veränderung, die in voller Epitheldicke die zellulären Kennzeichen des Karzinoms zeigt, aber nirgends Invasion des Stromas erkennen lässt.

Gering- bis mäßiggradige Dysplasien gelten dabei als fakultative Präkanzerosen, da sie potenziell noch reversibel sind. Bei hochgradigen Dysplasien und Carcinomata in situ handelt es sich hingegen um obligate Präkanzerosen, deren Früherkennung für die Prognose des Patienten essentiell ist.

### **1.1.2. Risikofaktoren für die Entstehung maligner Tumore des OADT**

Als Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von präkanzerösen Läsionen und malignen Tumoren des oberen Luft-Speiseweges gelten exzessiver Nikotin- und Alkoholkonsum. Auch eine mangelnde Mundhygiene stellt ein erhöhtes Risiko dar. Die Assoziation zwischen malignen Tumoren in Mundhöhle und Pharynx und Nikotinkonsum bzw. Tabak wurde bereits in vielen Studien untersucht. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass das Risiko, Krebs des oberen Luft- Speiseweges zu entwickeln bei Rauchern fünf bis neun Mal höher ist als bei Nichtrauchern [5].

Auch Alkoholkonsum konnte als ein unabhängiger Risikofaktor für Krebs des oberen Aerodigestivtraktes identifiziert werden. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass moderater bis starker Alkoholkonsum das Krebsrisiko um den Faktor drei bis neun erhöht [5]. Eine französische Studie zeigte, dass sehr starker Alkoholkonsum (>100g täglich) sogar zu einer 30-fachen Erhöhung des Risikos führt [8].

Der erhöhte Alkohol- und Nikotinkonsum bei Männern wird als Hauptgrund dafür gesehen, dass Männer deutlich häufiger betroffen sind als Frauen. Nichtsdestotrotz ist der Anteil an Frauen in den letzten 3 Jahrzehnten von 13,5% auf 20,6% angestiegen [2]. Die in den letzten Jahren beobachtete Reduktion der Inzidenzraten für Krebs des OADT ist höchstwahrscheinlich direkt assoziiert mit sich ändernden Lebensgewohnheiten durch Rauchverbote und Aufklärungskampagnen.

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung eines malignen Tumors im oberen Luft-Speiseweg ist ein vorangegangener maligner Tumor im Kopf-Hals Bereich. Dieser geht mit einem erhöhten Risiko für das spätere Auftreten eines zweiten Primärtumors einher – entweder lokal oder auch an anderer Stelle im oberen Luft-Speiseweg.

## 1. Einleitung

---

Bei einer retrospektiven Auswertung von nahezu 100.000 Patienten wurde das 20 Jahre kumulative Risiko, einen zweiten Primärtumor im OADT zu entwickeln mit 36% ermittelt [9]. Dabei waren diese zweiten Primärtumoren in absteigender Reihenfolge gehäuft in Mundhöhle/Pharynx, Larynx/Lunge und Ösophagus lokalisiert [9]. Grund dafür könnte die von Slaughter et al. 1953 erstbeschriebene "field cancerization" sein, welche beschreibt, dass karzinogene Effekte von Tabak und Alkohol simultan an mehreren Bereichen des oberen Aerodigestivtraktes einwirken, und die Entwicklung von mehreren voneinander unabhängigen Primärtumoren triggern [10].

### 1.1.3 Mortalitätsraten

Die Wichtigkeit der Frühdiagnostik und damit frühen Therapie von Tumoren des oberen Luft-Speiseweges kann nicht genug betont werden. Der Bericht der U.S. Cancer Statistics Working Group 2009 [11] zeigt einen rasanten Abfall der 5-Jahres-Überlebensraten von einem lokal begrenzten Tumorgeschehen zu Tumoren mit regionaler Lymphknotenmetastasierung oder Fernmetastasierung. In Tabelle 1 sind die relativen 5-Jahresüberlebensraten nach Lokalisation und Tumorstadium bei Erstdiagnose aufgelistet.

<b>Lokalisation</b>	<b>Lokal</b>	<b>Regional</b>	<b>Metastasiert</b>	<b>Ohne Staging</b>
Mundhöhle und Pharynx gesamt	82,3	48,6	25,8	52,8
Lippe	97	80,7	37,4	89,9
Zunge	74,1	47,9	26,9	44,1
Gaumen und restliche Mundhöhle	94,7	58,5	32,8	56,5
Mundboden	81,4	47,7	27,5	54,6
Oropharynx und Tonsillen	73,4	39,7	19,3	49,5
Hypopharynx	78,4	58	33,7	51,1
Speicheldrüsen	66,2	54,8	29,1	38,7
Nasopharynx	50,3	30,1	13,3	27,8
Andere (Mundhöhle und Pharynx)	47,4	30,5	5,7	32,6

Tabelle 1: relative 5-Jahresüberlebensraten (in Prozent) von Tumoren der Mundhöhle und des Pharynx, aufgeschlüsselt nach Lokalisation und Stadium (lokal: T1-4 N0 M0, regional: T1-4 N1-3 M0, metastasiert: T1-4 N1-3 M1) wie im 1975-2005 SEER Cancer Statistics Review [11] berichtet.

## 1. Einleitung

### 1.1.4 Wichtigkeit und Probleme der Tumorfrühdagnostik

Unglücklicherweise bleiben Tumoren des oberen Luft-Speiseweges oft lange Zeit asymptomatisch und werden erst relativ spät entdeckt. Tabelle 2 zeigt die Verteilung der Tumorstadien bei Erstdiagnose.

Lokalisation	Lokal	Regional	Metastasiert	Ohne Staging
Mundhöhle und Pharynx	34	49	12	6
Lippe	79	14	1	5
Zunge	36	46	13	4
Gaumen und restliche Mundhöhle	39	47	6	8
Mundboden	40	51	5	4
Oropharynx und Tonsillen	13	69	14	4
Hypopharynx	14	64	18	3
Speicheldrüsen	47	34	14	6
Nasopharynx	10	67	17	6
Andere (Mundhöhle und Pharynx)	16	48	12	24

Tabelle 2: Stadienverteilung (lokal: T1-4 N0 M0, regional: T1-4 N1-3 M0, metastasiert: T1-4 N1-3 M1) in Prozent bei Tumoren von Mundhöhle und Pharynx zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wie im 1975-2005 SEER Cancer Statistics Review [11] berichtet

Dieses Problem könnte möglicherweise, wie von Sankaranarayanan et al. [12] vorgeschlagen, durch die Einführung von ausgedehnten Screeningprogrammen gelöst werden. In einer großen, Kluster- randomisierten, kontrollierten Studie in Kerala, Indien konnte gezeigt werden, dass visuelles Screening durch trainiertes medizinisches Personal die Mortalität in Hochrisikogruppen (also bei Personen mit hohem Alkohol- und Nikotinkonsum oder vorhergehenden malignen Tumor des OADT) signifikant senken kann. Allerdings kann, auch wenn diese Patienten mit prämaligen oder frühmaligen Läsionen einen Arzt aufsuchen, aus verschiedenen Ursachen manchmal eine therapiebedürftige Läsion übersehen werden:

- Leukoplakien und Erythroplakien können üblicherweise zu einem frühen Zeitpunkt visuell entdeckt werden. Um eine Diagnose zu sichern und Klarheit über die Dignität einer Läsion zu erhalten, werden dann normalerweise Biopsien entnommen und die Gewebeprobe histopathologisch untersucht. Liegen keine Dysplasien oder invasives Wachstum vor, dann werden die Läsionen entweder entfernt oder engmaschig in ihrem weiteren Verlauf beobachtet. Handelt es sich histopathologisch um eine DIII

## 1. Einleitung

---

oder invasives Wachstum, wird die Läsion nach Richtlinien der Kopf-Hals-Chirurgie mit einem Sicherheitsabstand von 0,5 cm entfernt. Insgesamt bleibt bei diesem Vorgehen das Risiko eines falsch negativen Befundes durch fehlerhafte Biopsieentnahme bestehen – bei großflächigen leukoplakischen und erythroplakischen Veränderungen können oft mehrere Befunde parallel in einer Läsion bestehen. Bei Entnahme einer Gewebeprobe kann so möglicherweise jene Stelle, wo ein invasives Wachstum vorliegt, verfehlt werden, da sie makroskopisch von Stellen mit erhaltener Schichtung einer nicht- malignen Gewebeveränderung nicht unterscheidbar ist (Abbildung 3).



Abbildung 3: Typische Schleimhautläsion der Mundhöhle. Linkes Bild: homogene Hyperplasie und Hyperkeratose im Biopsiepräparat. Rechtes Bild: invasives PEC (\*) neben Dysplasie I und Hyperkeratose (#).

- Andererseits können frühinvasive PEC, die nicht aus präkanzerösen Läsionen hervorgehen, als Ulkus, Erosion oder aber nur als leicht aufgeraute gesunde Schleimhaut erscheinen und keine typischen morphologischen Eigenschaften von malignen Tumoren aufweisen. Aufgrund dessen können sie fälschlicherweise für chronisch entzündliche Prozesse gehalten werden oder gar nicht auffallen.

Wie bereits oben erwähnt, steht eine Verzögerung der Diagnose in direktem Zusammenhang mit der Prognose eines Patienten. Deshalb erscheint es als äußerst wichtig (prä)maligne Läsionen frühzeitig zu erkennen, zu identifizieren, abzugrenzen und sodann schnellstmöglich zu therapieren. Um dieses Ziel zu erreichen wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Methoden entwickelt und ihr Wert in klinischen Studien geprüft.

### **1.2 Nicht- invasive Techniken zur Tumorfrühdiagnostik im oberen Luft-Speiseweg**

In den letzten Jahren wurden vermehrt nicht-invasive Techniken, zusätzlich zur invasiven Biopsieentnahme, in der Tumorfrühdiagnostik im OADT eingesetzt. Diese haben den Vorteil, dass im Zuge der Diagnostik keine Traumatisierung des Patienten erfolgt.

#### **1.2.1 Anfärbetechniken**

Die ersten Experimente maligne orale Schleimhaut anzufärben wurden 1957 von Morgenroth [13] mit Lugolscher Lösung (Iod-Kaliumiodidlösung) durchgeführt. Durch Reaktion des Iodids mit Glykogen kann so Gewebe angefärbt werden. Diese Methode ist jedoch im Kopf-Hals-Bereich umstritten und wird derzeit nicht routinemäßig angewendet.

1963 präsentierte Richart seine ersten Erfahrungen mit Toluidin-Blau im Bereich der Gynäkologie [14]. Toluidin-Blau bindet an intrazelluläre DNA und RNA. Es kommt dabei zu einer selektiven Anfärbung von neoplastischem Gewebe. Dies könnte zum einen an der erhöhten Dichte an Nukleinsäuren innerhalb neoplastischer Zellen oder an weiteren und vermehrten intrazellulären Gängen, die dem Färbemittel ein erhöhtes Eindringen ermöglichen, liegen [15]. Mithilfe von Toluidin-Blau war es Richart möglich, die Grenzen von Carcinomata in situ der Cervix darzustellen. In der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde wurde Toluidin-Blau in zahlreichen Studien angewendet und kontrovers diskutiert. In einer Metaanalyse von klinischen Studien reichte die Sensitivität von Toluidin-Blau für die Detektion von malignen Tumoren des OADT von 0,78 bis 1,00 und die Spezifität von 0,31 bis 1,00. Bei Dysplasien scheint die Methode nur in circa 50% der Fälle positiv zu sein [16]. In allen neueren Publikationen zu diesem Thema [16-19] wird Toluidin-Blau als additive Methode zur Frühdiagnostik von (prä)malignen Läsionen des OADT und nicht als Screening-Verfahren gesehen, da die Spezifität zu gering ist [18-20].

1990 publizierte Kellokoski et al. [21] eine Studie an 315 Patienten, bei denen HPV-infizierte Schleimhautläsionen das OADT mittels Essigsäure angefärbt wurden und anschließend mit blauem oder weißem Licht (Wellenlänge von 490 bis 510 nm) untersucht wurden. Die Essigsäure führt dazu, dass die Glykoproteinbarriere an der Zelloberfläche verschwindet und die malignen Zellen das Licht auf eine andere Art und Weise als gesunde Zellen absorbieren und reflektieren. Die Spezifität lag bei circa 50% - dennoch wurde diese Idee zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgegriffen und vor allem in der Zahnmedizin angewendet. Als eine mögliche Verbesserung gibt es das kommerziell erhältliche System ViziLite (Zila, Inc., Scottsdale, Arizona, USA) neuerdings auch in Kombination mit Toluidin-Blau (eine standardisierte Toluidin-Blau-Lösung) [22].

## 1. Einleitung

---

Eine weitere Technik in der Tumorfrühdagnostik im oberen OADT, die Färbemittel verwendet, stellt die Kontaktendoskopie dar. Sie schlägt eine Brücke zwischen Zytologie und optischen Systemen. Diese Methode wurde in den 90er-Jahren durch Andrea et al. [23] zum ersten Mal beschrieben. Bei der Kontaktendoskopie wird ein spezielles Endoskop auf die Schleimhaut aufgesetzt, nachdem ein Färbemittel (typischerweise Methylenblau) auf die Schleimhaut aufgetragen worden ist. Mit einer 60-300fachen Vergrößerung können die oberflächlichen Schichten bezüglich Zelldichte und zytologischen Abnormalitäten untersucht werden. In den meisten Studien wurde berichtet, dass die Ergebnisse der Kontaktendoskopie in 80-93% mit den histopathologischen Befunden übereinstimmen [23-27]. Bei einer von Cikojevic et al. durchgeführten Studie [28] an 142 Patienten mit benignen (n=70), präkanzerösen (n=23) oder malignen Läsionen (n=49) wurde eine Sensitivität von lediglich 79,6% erreicht. Aufgrund der Möglichkeit, zelluläre Informationen in vivo zu erhalten, bleibt die Methode weiterhin interessant, obgleich sie durch neuere optische Techniken wie der konfokalen Mikroskopie und der Multiphotonenmikroskopie überholt ist, da diese bei gleicher Auflösung eine wesentlich höhere Eindringtiefe aufweisen.

### 1.2.2 Moderne Zytologie

In der modernen Zytologie wird oft die Methode der Bürstenbiopsie, welche als Screeningverfahren für die Detektion von Zervixkarzinomen weit verbreitet ist, für die Gewinnung von Gewebeproben angewandt. Diese Methode wurde ursprünglich entwickelt, um Schleimhautveränderungen, welche klinisch als niedrig-Risiko Läsionen eingeschätzt werden und deshalb nicht biopsiert werden, dennoch einer weiteren Diagnostik zuzuführen [22]. Zur Gewinnung von Gewebe wird eine starre Bürste auf die Schleimhaut im OADT aufgesetzt und eine 360° Rotationsbewegung durchgeführt. Die Gewebeprobe wird anschließend auf einem Objektträger ausgestrichen, angefärbt und mikroskopisch untersucht (Computer-basiert). Werden morphologisch auffällige Zellen entdeckt, so erhält man ein „positives“ oder „atypisches“ Ergebnis, welches dann eine Gewebebiopsie der Läsion erforderlich macht. Anders als die Toluidin-Blau-Färbung ist diese Methode nur für die Differenzierung von sichtbaren Läsionen sinnvoll. Sie wird scheinbar effizient parallel zu den oben genannten Methoden angewandt.

Wenn man dabei lediglich die zelluläre Morphologie betrachtet, dann beträgt die Sensitivität für die korrekte Identifikation von Malignomen zwischen 79,0 bis 94,5% [20]. In den letzten Jahren wurden viele Bemühungen unternommen, die Sensitivität zu verbessern. Das bekannteste System ist dabei der OralCDx Brush Test (OralCDx Laboratories Inc., Suffern,

## 1. Einleitung

---

NY, USA). Die in der Literatur beschriebene Sensitivität des OralCDx Brush Tests reicht von 71.4% bis 100% [29-32]. Die Spezifität ist umstritten - in einer Studie von Poate et al. wurde von einer Spezifität von lediglich 32% berichtet [30]. Lingen et al. 2008 [18] bemängelt, dass die bisherigen Studien lediglich an Hochrisiko-Patienten durchgeführt wurden- dies verfälscht die Sensitivität, die Spezifität und die Rate an falsch positiven Biopsien.

### **1.2.3 Hochfrequenzultraschall**

Im Bereich der Sonographie gibt es neuerdings verschiedenste kommerziell erhältliche Hochfrequenzultraschall-Systeme. Diese Geräte verwenden 20 oder 25MHz-Schallköpfe und liefern zweidimensionale (B-Scan) oder auch dreidimensionale (C-Scan) Bilder von lebendem Gewebe. Dies führt zu einer verbesserten Tiefenauflösung von 80µm und einer höheren lateralen Auflösung von in etwa 200µm, wobei die Eindringtiefe allerdings auf circa 8mm beschränkt ist. Der Hochfrequenzultraschall schließt die Lücke in der Auflösung zwischen CT, MRT und Standard-Sonographie auf der einen Seite und optischen Techniken, die eine Auflösung auf zellulärer oder gar molekularer Ebene erreichen, auf der anderen Seite.

### **1.3 Optische Systeme zur Tumorfrühdagnostik**

Alle optischen Techniken basieren auf Interaktionen, die zustande kommen, wenn Licht auf lebendes Gewebe trifft. Physikalisch gesprochen handelt es sich bei Gewebe um ein „trübes Medium“, da es aus verschiedensten Bestandteilen, die den Weg des Lichtes beeinflussen, zusammengesetzt ist (anders als klare Medien, wie z.B. der Glaskörper des Auges oder andere Körperflüssigkeiten).

Die wichtigsten Interaktionen zwischen Licht und Gewebe sind in Abbildung 4 dargestellt.



## 1. Einleitung

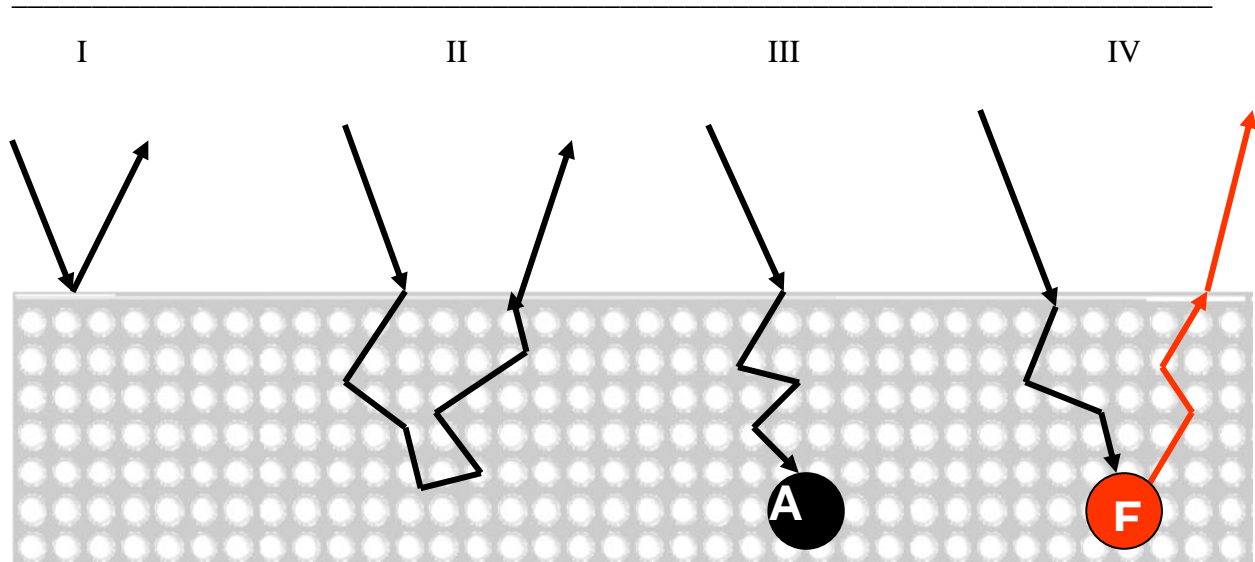


Abbildung 4: Darstellung der häufigsten Interaktionen zwischen Licht und Gewebe (adaptiert von [33]). Lichteinfall aufs Gewebe kann zu Reflexion (I), Streuung gefolgt von diffuser Reflexion (II), Absorption (III) oder Absorption gefolgt von Fluoreszenzemission (IV) führen.

Photonen können an der Oberfläche von Geweben entweder reflektiert werden (I in Abbildung 4) oder ins Gewebe eindringen. Einmal im Gewebe unterliegen sie zwei physikalischen Prozessen: Streuung und Absorption. Die Streuung kann dabei elastisch (d.h. das Photon behält seine ursprüngliche Energie) oder unelastisch sein (d.h. das Photon verliert/gewinnt Energie). Elastische Streuung kommt zustande, wenn Licht auf Objekte trifft, deren Durchmesser in etwa der Wellenlänge des Lichtes entsprechen und entsteht durch Variationen im Brechungsindex. Im Gewebe werden diese Objekte sowohl durch ganze Zellen als auch durch subzelluläre Strukturen, wie Zellkerne, Nukleolen, Lysosomen, Mitochondrien und Vesikel repräsentiert. Nach einem oder mehreren Streuvorgängen, gelangt ein Teil des eindringenden Lichtes wieder an die Oberfläche, wo es ursprünglich eingetreten ist und kann dort gemessen werden (II in Abbildung 4). Die Intensität des Signals ist dabei abhängig von der Größe und Anzahl der Streuungen. Zahlreiche optisch-diagnostische Methoden, wie OCT und CM/CME basieren auf elastischer Streuung.

Ein typisches Beispiel für unelastische Streuung ist die sogenannte Raman-Streuung, welche vor allem für eine Molekül-spezifische chemische Analyse von Gewebe herangezogen wird. Sie entsteht, wenn Licht auf Atome, Moleküle und solide Materialien trifft und es zu einem gewissen Energieaustausch zwischen Photonen und den oben genannten Objekten kommt, die dann zu einer Verschiebung der Wellenlänge, dem sogenannten „Raman-Shift“ führen. Diese kleinen Verschiebungen sind durch spektral hoch auflösende und sensitive Detektoren messbar.

## 1. Einleitung

---

Absorption kommt zustande, wenn ein Photon (vor oder nach einem bis mehreren Streuvorgängen) auf einen Absorber trifft und genau die richtige Menge an Energie besitzt, um eines der Valenzelektronen (Elektronen in der äußersten Schale eines Atoms oder Moleküls) in einen angeregten elektronischen Zustand (höheres Energieniveau) zu befördern. Das ursprüngliche Photon wird dabei eliminiert und der Absorber verweilt für eine sehr kurze Zeit in einem angeregten, jedoch instabilen Energiezustand. Die wichtigsten Absorber im menschlichen Gewebe sind Melanin, Hämoglobin und Wasser. Die Relaxation des Absorbers in den Grundzustand erfolgt in den meisten Fällen unter Abgabe von Wärme auf „nichtstrahlende Art“ (III in Abbildung 4).

Allerdings kann die Energieabgabe bei der Relaxation auch in sog. strahlenden Prozessen erfolgen, zu denen auch die Fluoreszenz gehört (IV in Abbildung 4). Die wichtigsten Gewebe-Fluorophore sind Strukturproteine wie Kollagen und Elastin, Koenzyme des Energiestoffwechsels der Zelle wie NAD(P)H und FAD, aromatische Aminosäuren wie Tryptophan und endogene Porphyrine als Vorläufer in der Hämsynthese. Die Energie des fluoreszierenden Photons ist stets geringer als die des anregenden Photons, weil ein Teil der Energie immer in Wärme verloren geht („nichtstrahlende Relaxation“). Damit ändert sich gleichzeitig die Wellenlänge des Lichts – die Fluoreszenz ist zum längerwelligen Bereich hin verschoben. Weil die Effizienz der Fluoreszenzlichterzeugung (Fluoreszenzquantenwirkungsgrad) häufig sehr gering ist, ist das abgegebene Licht in seiner Intensität meistens deutlich schwächer als das anregende Licht und erfordert äußerst sensitive Messmethoden. Fluoreszenzspektroskopie und – bildgebung basieren auf diesem physikalischen Prozess der Fluoreszenzemission [34,35].

Eine dritte, kleine Gruppe von absorbierenden Molekülen (sogenannte Photosensitizer) durchlaufen einen Wechsel in einen meta-stabilen Energiezustand während der Relaxation („intersystem crossing“). In diesem Energiestatus kann Energie auf andere Moleküle, wie molekularen Sauerstoff übertragen werden, wobei Radikale oder Singulett-Sauerstoff, eine elektronisch angeregte reaktive Sauerstoffspezies, entstehen, die lebende Zellen schädigen und zerstören können. Auf diesem Prozess basiert die Photodynamische Therapie. Beispiele für endogene Photosensitizer sind wiederum Porphyrine. Im klinischen Alltag werden allerdings meist viel stärkere, exogen applizierbare Photosensitizer verwendet (z.B. verschiedene Chlorine).

In der folgenden Tabelle (Tabelle 3) sind die wichtigsten optisch-diagnostischen Methoden in der Tumorfürhdiagnostik im oberen Luft-Speiseweg aufgelistet. Sie werden bezüglich

## 1. Einleitung

zugrundeliegender Technik der Primärkontrastbildung, Eindringtiefe und Auflösung miteinander verglichen.

<b>Methode</b>	<b>Primärkontrast</b>	<b>Eindringtiefe</b>	<b>Max. Auflösung</b>
CM/CME	Fluoreszenz/Streuung	0,2 mm	1-3 $\mu\text{m}$
MPM/MPME	Fluoreszenz	0,5 mm	1-3 $\mu\text{m}$
FD-OCT	Optische Streuung	2,0 mm	5 $\mu\text{m}$
TD-OCT	Optische Streuung	2,0 mm	15 $\mu\text{m}$

Tabelle 3: Vergleich verschiedener optisch-diagnostischer Methoden, betreffend optischen Prozess des Primärkontrastes, Eindringtiefe und maximaler Auflösung.

### 1.3.1 Optische Spektroskopie

Eine der frühesten und immer noch weit verbreiteten Anwendungen in der Diagnostik lebender Gewebe sind die Reflexions- und Fluoreszenzspektroskopie.

Charakteristisch für diese Methoden ist, dass sie Punktmessungen von lebendem Gewebe liefern. Die Art und Weise wie Licht direkt (I in Abbildung 4) oder diffus (II in Abbildung 4) reflektiert wird, wird von verschiedenen Parametern wie Reflexionsindex, Partikelgröße und –form, Zelldichte und Kern-Plasma-Verhältnis beeinflusst, welche sich alle bei der Transformation von normalen in prämaliges Gewebe verändern [36] und somit zur Diagnostik herangezogen werden können. Auch die Messung der Absorptionscharakteristika von Gewebe (III in Abbildung 4), welche Informationen über die Verteilung von Chromophoren wie Deoxy- und Oxyhämoglobin liefert, kann auf Veränderungen im Gewebe hinweisen. Schlussendlich ist die Fluoreszenzspektroskopie (IV in Abbildung 4) geeignet für die Messung des Fluorophor-Gehaltes von Gewebe, welcher teilweise eine gewebs- und krankheitsspezifische Verteilung aufweist. Sie weist eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und gesunder Schleimhaut auf – die Differenzierung zwischen verschiedenen Arten von Läsionen ist aber schwierig [18,19,37]. Die Problematik bei dieser Methode ist, aus den erhaltenen Informationen die wichtigsten Ergebnisse herauszufiltern.

Häufig werden allerdings bildgebende Methoden gegenüber nicht-bildgebenden Verfahren bevorzugt, da sie für den untersuchenden Arzt leichter interpretierbar sind und Informationen über die gesamte zwei- bis dreidimensionale Ausdehnung einer Läsion liefern. Da optisch spektroskopische Methoden tendenziell aber sehr sensitiv sind, und die Arbeitsdiagnose durch

## 1. Einleitung

---

objektive statistische und analytische Methoden erhalten wird, könnten sie nützlich sein in der gemeinsamen Anwendung mit oft weniger sensitiven, optisch-bildgebenden Techniken.

### 1.3.2 Fluoreszenzbildgebung

Diese Methode basiert auf der Detektion von Fluoreszenzemissionen, welche durch endogene oder exogen zugeführte Fluorophore zustande kommen und wird vornehmlich als Screening-Methode propagiert. Die autofluoreszenten Eigenschaften von Gewebe werden durch die verschiedenen endogenen Fluorophore bestimmt und sind je nach Verteilung der Fluorophore unterschiedlich. Die Fluoreszenzbildgebung wurde bereits zum Screening und zur Diagnostik prä- und frühmaligner Läsionen der Lunge, der Zervix, der Haut und neuerdings der Mundhöhle eingesetzt [37].

Die spektralen Eigenschaften der wichtigsten endogenen Fluorophore sind in Tabelle 4 aufgelistet.

<b>Fluorophore</b>	<b>Zytologisches Vorkommen</b>	<b>Histologisches Vorkommen</b>	<b>Anregungspeak</b>	<b>Emissionspeak</b>
NADH	Intrazellulär	Alle Schichten	260+350 nm	440+450 nm
FAD	Intrazellulär	Alle Schichten	450 nm	515 nm
Kollagen	Extrazellulär	Submukosa	330 nm	390 nm
Elastin	Extrazellulär	Submukosa	350 nm	420 nm
Keratin	Intra-/ extrazellulär	Mukosa	340 nm	430 nm
Porphyrine	Intrazellulär	Oberflächlich	405 nm	635 nm

Tabelle 4: Anregungs- und Emissionspeaks der wichtigsten endogenen Fluorophore (abgewandelt von [38]).

Bei Anregung durch einen Lichtstimulus kommt es bei den meisten dieser Fluorophore zu einer Emission von sichtbarem Licht im violett-grünen Bereich des Spektrums. Sowohl FAD und NADH als auch fluoreszierende Strukturproteine wie Kollagen, Elastin und Keratin haben ein relativ breites Anregungs- und Emissionsspektrum. Alle in der Tabelle aufgeführten Moleküle sind durch kurzwelliges sichtbares Licht anregbar, welches in kommerziell erhältlichen AFI-Systemen verwendet wird (z.B. D-Light C/AF System, KARL STORZ GmbH, Tuttlingen, Germany).

Bei der Autofluoreszenzdiagnostik maligner Tumoren fällt auf, dass im Vergleich zum Normalgewebe vor allem das grüne Emissionslicht deutlich vermindert ist, da Tumorgewebe

weniger grün-fluoreszierende endogene Fluorophore enthält [39-42]. Zudem ist die Fluoreszenz insgesamt durch die dickere Epithelschicht vermindert, da Kollagen und Elastin weniger zur Fluoreszenzbildgebung beitragen können [43-46]. Insgesamt stellt sich bei der AFI das maligne Gewebe in einem dunkleren Grün dar als das umgebende Normalgewebe [22]. Weil diese Intensitätsminderung für den roten Spektralbereich nicht so stark ausfällt, kommt es zusätzlich zu einer Verschiebung des spektralen Schwerpunkts in Richtung des roten Spektralbereichs, entsprechende Läsionen werden „bräunlich“.

Es können auch zusätzlich Tumor-spezifische Fluorophore oder deren Vorläufer von exogen appliziert werden. Am häufigsten wird dabei 5-ALA (5-Aminolaevulinsäure) als natürliche Vorstufe von fluoreszierenden Porphyrinen und Häm verwendet. Die Bildung von 5-ALA und damit die Biosynthese von Häm werden normalerweise durch einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert, der durch die externe Applikation von 5-ALA umgangen wird. Nach topischer Applikation (z.B. als Mundspülung) wird es vor allem von (prä)malignen Läsionen aufgenommen und in stark rot-fluoreszierendes PPIX (Protoporphyrin IX) umgewandelt. Die wahrscheinlichsten Gründe dafür sind [47]: 1) erhöhte Penetration von 5-ALA in malignes Tumorgewebe aufgrund einer verminderten oberflächlichen Lipidschicht, 2) erhöhte Umwandlung von 5-ALA in PPIX in malignen Zellen aufgrund einer erhöhten Enzymaktivität und 3) Retention von PPIX in malignen Zellen aufgrund einer verminderten Umwandlung in Häm. Der Gewebekontrast stellt sich dann folgendermaßen dar: das Normalgewebe erscheint grün, während sich das Tumorgewebe rot darstellt.

### **1.3.3 Schmalband-Bildgebung**

Die Schmalbandbildgebung (Narrow Band Imaging) ist eine endoskopische Technik, die von Olympus Medical Systems (Hamburg, Deutschland) vertrieben wird und die auf die Bildkontrastverstärkung oberflächlicher, vaskulärer Strukturen fokussiert ist. Da (prä)maligne Läsionen meist eine Veränderung dieser oberflächlichen Gefäße aufweisen, könnte sie als Hilfsmittel bei der konventionellen Endoskopie fungieren.

Anders als in der konventionellen Endoskopie, wo ein breites Spektrum an Wellenlängen zur Bildgebung beiträgt, verwendet diese Methode zwei schmale Spektralbereiche, die jeweils um 415 nm und 540 nm liegen und von Hämoglobin stark absorbiert werden. Auf diese Weise ist es möglich, simultan die Vaskularisierung der obersten Gewebsschicht und der Submukosa selektiv darzustellen.

### **1.3.4 Konfokale Mikro(endo)skopie, Multiphotonenmikro(endo)skopie**

Diese Techniken ermöglichen eine in vivo Bildgebung mit einer besonders hohen, subzellulären räumlichen Auflösung von 1-3  $\mu\text{m}$  bei einer Eindringtiefe von bis zu 200  $\mu\text{m}$  bei der konfokalen Mikroskopie und bis zu 500  $\mu\text{m}$  bei der Multiphotonenmikroskopie. Dies wird erreicht, indem ein Laserstrahl in seiner Lage so verändert wird, dass der Fokuspunkt sich durch das Präparat bewegt, dieses also abrastert. Bei der konfokalen Mikro(endo)skopie (CM(E)) tragen nur Strukturen, die in der Fokusebene liegen, zur Bildgebung bei. Das Licht, das nicht aus der Fokusebene kommt, wird ausgeblendet. Da man lediglich Licht aus einem Punkt der Probe erhält, ist es notwendig, die Probe abzurastern und das Bild am Computer zusammensetzen. Bei der Multiphotonenmikroskopie (MPM(E)) kommt es zur Fluoreszenz, wenn 2 (oder mehrere) Photonen gleichzeitig absorbiert werden. Dies geschieht sehr selten und man braucht deshalb eine sehr hohe Photonendichte bzw. Lichtintensität, die nur ein kurz-gepulster Laser erzielt. Selbst dann kommt es lediglich im Fokuspunkt zu einer genügend hohen Photonendichte, um eine Fluoreszenzanregung zu erzeugen, nicht aber darüber und darunter. Außerdem ist es möglich, sowohl die CM als auch die MPM durch ein flexibles oder starres Endoskop zu führen (und damit die CME und MPME zu ermöglichen). Die größten klinischen Anwendungsgebiete der konfokalen Mikroendoskopie sind die Dermatologie [48,49] und die Ophthalmologie [50,51], wo kommerziell erhältliche Systeme die Diagnostik von z.B. Melanomen oder degenerativen und dystrophischen Retinaerkrankungen verbessert haben. Seit kurzem gibt es zwei kommerziell erhältliche Systeme für die endoskopische Anwendung im Gastrointestinal- und Atemwegstrakt (ISC-1000, OptiScan Pty. Ltd., Notting Hill, Victoria, Australien; Cellvizio, Mauna Kea Technologies, Paris, Frankreich). Zudem wurde die konfokale Mikroskopie in Kombination mit der Fluoreszenzdiagnostik eingesetzt, um prä-maligne und maligne Läsionen im Larynx zu charakterisieren [52]. Seit Herbst 2011 steht unserer Klinik ein konfokales Mikroskop der Firma Mauna Kea Technologies, Paris, Frankreich zur Verfügung.

### **1.3.5 Photoakustische Bildgebung**

In der photoakustischen Bildgebung werden optische und akustische Phänomene miteinander verbunden. Das Gewebe wird mit einem kurz-gepulsten Laserstrahl mit nah-infrarotem, kohärentem Licht bestrahlt, welches relativ tief ins Gewebe eindringt. Das Licht wird dort von bestimmten Molekülen (v.a. oxygeniertem und nicht oxygeniertem Hämoglobin) absorbiert, was zu einer transienten, sogenannten „thermoelastischen Expansion“ führt, die wiederum bedingt, dass hochfrequente Ultraschallwellen („photoakustische Wellen“) [53] an die Oberfläche gelangen. Ultraschalldetektoren an der Oberfläche können diese Signale registrieren und ein dreidimensionales Bild generieren. Weil Ultraschallwellen weniger gestreut werden als Licht, erzielt man mit dieser Methode eine Eindringtiefe von mehreren Zentimetern, während rein optische Methoden meistens auf wenige Millimeter Eindringtiefe beschränkt sind. Nichtsdestotrotz gilt der Grundsatz: je größer die Eindringtiefe, umso geringer die Auflösung der erhaltenen Scans.

Es gibt derzeit zwei verschiedene PAI (photoakustische Bildgebung) Systemtypen: PAM (photoakustische Mikroskopie), mit einer maximalen Auflösung von 15  $\mu\text{m}$  und einer Eindringtiefe von 3 mm und PAT (photoakustische Tomographie) mit einer hohen Eindringtiefe von bis zu 5 cm und einer Auflösung von nur 700  $\mu\text{m}$ . Wegen des starken Signals, das vom Hämoglobin ausgeht, gibt es zwei Hauptindikationen für die Anwendung der PAI: Die in vivo Darstellung von Blutgefäßen und die Oxygenierung von Gewebe. Neue Studien haben gezeigt, dass sich die PAI möglicherweise zum Monitoring der Tumorangio-genese, zum Mapping der Blutoxygenierung, zur funktionellen Bildgebung im Gehirn und zur Detektion von Melanomen der Haut eignet [53].

### **1.4 Optische Kohärenztomographie (OCT)**

Die 1991 von Professor James Fujimoto am MIT (Massachusetts Institute of Technology) in den USA erfundene optische Kohärenztomographie ist eine neue, nicht-invasive, optische Methode zur Früherkennung von malignen Läsionen im oberen Luft-Speiseweg mit nahezu histologischer Auflösung. Die OCT liefert in vivo zwei- oder dreidimensionale Tiefschnittbilder von Gewebe. Da die mittels OCT erhaltenen Bilder mit histologischen Tiefschnittbildern verglichen werden können [54], wird die OCT oft als Methode zur Gewinnung von „optischen Biopsien“ bezeichnet.

Die optische Kohärenztomographie etablierte sich dann zunächst in der Ophthalmologie und in der Dermatologie und wird dort nun schon seit langem standardmäßig klinisch angewendet. Sie wurde bis dato erfolgreich von Humphreys Inc., jetzt im Besitz der Carl Zeiss AG (Jena, Deutschland) im ophthalmologischen Sektor kommerzialisiert und liefert einen jährlichen Ertrag von ungefähr 50 Millionen US\$.

Über die ersten in vivo Untersuchungen von humaner Schleimhaut berichtete Sergeev et al. 1997. Dabei wurde die OCT im Bereich der Gastroenterologie, der Urologie, der Gynäkologie und der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde eingesetzt [55]. Seit diesem Zeitpunkt wurde die OCT dann auch oft für Untersuchungen von Mundhöhle [56,57], Pharynx [56,57] und Larynx [56,58-64] herangezogen.

#### **1.4.1 Technische Grundlagen der OCT**

Die optische Kohärenztomographie (OCT) ist ein auf Infrarotlicht basierendes Bildgebungsverfahren, welches eine hohe, im Mikrometerbereich liegende Auflösung biologischer Gewebestrukturen ermöglicht. Das Prinzip der optischen Kohärenztomographie ist ähnlich dem des Ultraschalls. Doch im Gegensatz zu diesem bedient sie sich nicht der Schallwellen, sondern des Lichts als Trägermedium, was ihr gegenüber dem Ultraschall einen bedeutenden Vorteil bei der Auflösung verschafft. Zur Bildgebung wird bei der OCT ein möglichst breitbandiges, kurz-kohärentes Infrarotlicht verwendet.

Die Vorteile der OCT-Bildgebung im Vergleich zu konventioneller Bildgebung wie Magnetresonanztomographie, Computertomographie, Positronenemissionstomographie und Sonographie liegen in der wesentlich besseren Auflösung, der fehlenden Strahlenbelastung und dem geringen Zeitaufwand. Die Vorteile gegenüber der konfokalen Mikroskopie liegen in der höheren Eindringtiefe. Sie wird deshalb oft in Kombination mit einer der oben genannten Methoden eingesetzt.



## 1. Einleitung

---

In Abbildung 5 ist der Aufbau und die Funktion eines OCT-Gerätes am Beispiel der Time-Domain-OCT (TD-OCT) schematisch dargestellt. Bei der OCT wird breitbandiges, kurz-kohärentes (Kohärenzlänge von ca. 10  $\mu\text{m}$ ), infrarotes Licht (meist etwa 1300 nm Wellenlänge) aus einer Strahlungsquelle auf ein Interferometer gesendet, wo die Strahlung dann aufgeteilt wird: ein Teil der Strahlung trifft auf die Gewebeprobe, der zweite Teil auf einen Referenzspiegel in bekanntem Abstand zum Interferometer. Die Lichtwellen werden sowohl von der Gewebeprobe als auch vom Referenzspiegel reflektiert und gelangen zurück zum Strahlungsteiler, wo sie dann mittels eines Photodetektors aufgezeichnet werden [65]. Der OCT-Bildgebung liegt dabei die Interferenz zugrunde. Nur Strahlen, bzw. Photonen die am Strahlungsteiler interferieren tragen zur Bildgebung bei. Auf diese Weise ist es möglich zwei- oder sogar dreidimensionale Tiefenschnittbilder mit nahezu histologischer Auflösung von epithelialen und subepithelialen Strukturen auf dem Monitor zu erhalten. Die Tiefenauflösung ist bestimmt durch die Kohärenzlänge des verwendeten Lichts (minimal etwa 1  $\mu\text{m}$ ), die laterale Auflösung durch den Durchmesser der Fokustaille des abtastenden Lichtstrahls (einige  $\mu\text{m}$ ).

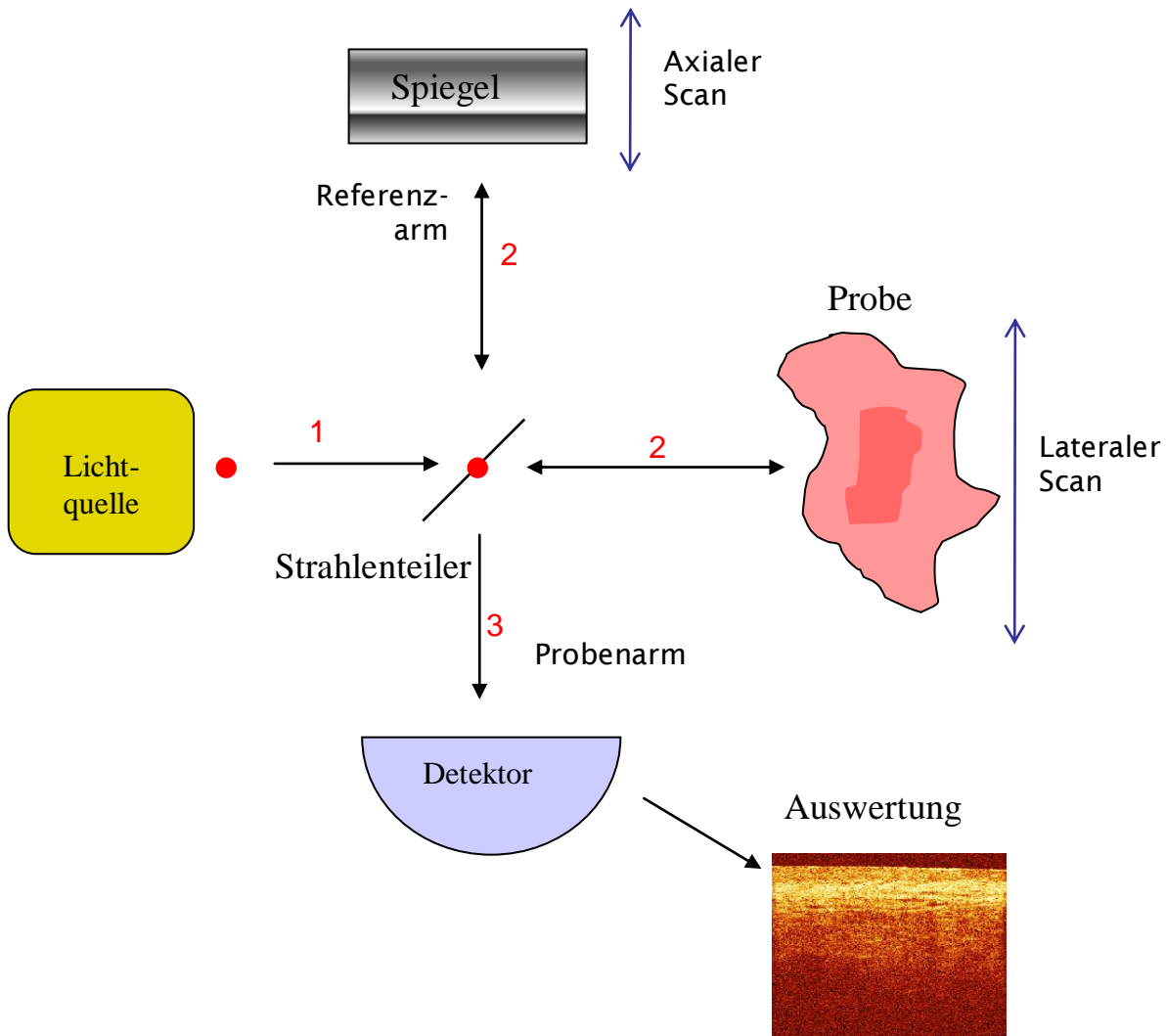


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines OCT-Gerätes, Weg des Lichts ist beziffert.

Die maximale Eindringtiefe in der OCT ist jene Tiefe, von der einmalig gestreute Photonen noch ihren Ursprung haben [66]. Aufgrund der Gewebestreuung ist die Eindringtiefe der OCT in stärker streuenden Geweben wie z.B. in den meisten Weichgeweben auf etwa 2 mm beschränkt, wohingegen sie in transparenten Medien wie z.B. dem menschlichen Auge nahezu unbegrenzt ist. Mit einer Eindringtiefe von circa 1-2 mm in den meisten Weichgeweben ist die OCT ausreichend für eine hochauflösende Bildgebung von dysplastischen und invasiven Läsionen der Schleimhaut im oberen Luft-Speiseweg [59].

In der Time-Domain-OCT (TD-OCT) erfolgt der Tiefenscan (A-Scan) durch periodische Veränderung der Referenzarmlänge (z.B. durch mechanische Bewegung des Spiegels im Referenzarm), während der laterale Scan (B-Scan) durch relative laterale Verschiebung zwischen Probe und Probenarm erfolgt, meist realisiert durch Verschwenken des fokussierten

## 1. Einleitung

---

Probenstrahls über die Gewebeoberfläche in x- bzw. x- und y-Richtung. Somit können zwei- oder dreidimensionale Bilder entstehen.

Bis heute wird die TD-OCT in der HNO nicht im kommerziellen Sinne zur routinemäßigen in-vivo Tumorfrühdiagnostik verwendet – dies liegt beinahe ausschließlich an den technischen Charakteristika der TD-OCT. Traditionellerweise wird in der TD-OCT die Tiefe, in der die Bildgebung erfolgt, wie oben bereits erwähnt, durch mechanische Bewegung eines Spiegels im Referenzarm bestimmt. Das OCT-Bild entsteht also dadurch, dass das zu untersuchende Gewebe Schicht für Schicht abgescannt wird. Das Scanning hierfür muss sehr schnell erfolgen, um Bewegungsartefakte in einem in-vivo System zu reduzieren. Dies hat sich als große technische Herausforderung, mit bedeutenden mechanischen und elektro-optischen Schwierigkeiten, erwiesen. Nichtsdestotrotz hat die Imalux Corporation (Cleveland, Ohio, USA) ein FDA- und CE-zertifiziertes TD-OCT-System, genannt Niris, entwickelt, welches auf klinisch experimenteller Basis breit eingesetzt wird [67-70].

Zu Beginn dieses Jahrhunderts wurde dann an der Universität Wien ein OCT-Gerät mit einem vielversprechenden neuen technischen Ansatz entwickelt- das sogenannte Frequency-Domain-OCT (FD-OCT). In der FD-OCT ist es im Gegensatz zur TD-OCT nicht mehr nötig, für den Tiefenscan auf mechanische Methoden zurückzugreifen. Die Bildgebung basiert auf der schnellen Demodulation des optischen Spektrums (also schnellen Änderung der Wellenlänge des ausgesandten Lichts) aus einer Laserquelle - der Tiefenscan kann dabei aus den erhaltenen optischen Spektren sofort durch eine inverse Fourier-Transformation errechnet werden. Die spektralen Informationen in der FD-OCT sind dabei entweder räumlich (Spectral-source-OCT) oder zeitlich (Swept-source-OCT) verschlüsselt. Da die Wellenlängenänderung des Laserlichtes um mehrere Größenordnungen schneller erfolgen kann, als eine mechanische Bewegung des Spiegels im Referenzarm, sind die Bildakquisitionsrate und das Signal-Rausch-Verhältnis in der FD-OCT wesentlich höher als in der TD-OCT. Somit hat die FD-OCT viele technische Probleme der TD-OCT gelöst und scheint deshalb großen Wert für die Tumorfrühdiagnostik zu besitzen [71]. Wie die TD-OCT ist auch diese Methode vor allem im ophthalmologischen Sektor weit verbreitet. Eine Firma aus England (MDL, Orpington, United Kingdom) hat jetzt ein kommerziell erhältliches FD-OCT Gerät, das sogenannte EX1301 zur ex-vivo Diagnostik von Haut- und Schleimhaut-Gewebe entwickelt und hat vor kurzem auch ein in-vivo FD-OCT (VivoSight) für die klinische Anwendung auf den Markt gebracht.

## 1. Einleitung

---

Die meisten OCT-Geräte, die derzeit klinisch angewendet werden, besitzen eine Tiefenauflösung von ca. 10-15  $\mu\text{m}$ . Im Vergleich dazu ist die effektive Auflösung in der Magnetresonanztomographie (0,5-1 mm), der Computertomographie (0,5-1 mm) und im Hochfrequenzultraschall (100-500  $\mu\text{m}$ ) um mindestens eine Größenordnung schlechter. In Zukunft könnten bereits entwickelte, ultrahochauflösende OCT-Geräte von 1  $\mu\text{m}$  axialer und 3  $\mu\text{m}$  lateraler Auflösung dazu verwendet werden, Veränderungen bereits auf zellulärer Ebene zu beobachten [39].

Die OCT kann demnach sehr gut in Kombination mit anderen bildgebenden Systemen, wie der Magnetresonanztomographie, der Computertomographie, dem Hochfrequenz-Ultraschall und der konfokalen Mikroskopie in der Tumorfrühdagnostik eingesetzt werden, da diese entweder eine geringere Auflösung oder eine geringere Eindringtiefe aufweisen.

### 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die Frühdiagnostik von Tumoren des oberen Luft-Speiseweges ist sowohl für die tumorassoziierte Morbidität als auch für die Mortalität entscheidend. Den bisherigen Goldstandard in der Diagnostik prä- und frühmaligner Läsionen im OADT stellt die invasive Gewebeentnahme dar. Diese ist jedoch, wie auch alle weiteren herkömmlichen Techniken, anfällig für diagnostische Fehler:

- 1.) Bei der invasiven Gewebeentnahme kann es a) zu Fehlbiopsien kommen, da es visuell oft nicht möglich ist, innerhalb einer größeren Läsion jene Stelle zu finden, an der invasives Wachstum vorliegt und b) können invasive Läsionen in manchen Fällen bei reiner Inspektion unauffällig erscheinen und damit einer Biopsie entgehen.
- 2.) Bei der MRT, der CT und dem Hochfrequenzultraschall können aufgrund der geringen Auflösung erst fortgeschrittenere Läsionen erkannt werden, währenddessen frühinvasive Läsionen oft unentdeckt bleiben.
- 3.) Bei der konfokalen Mikroskopie ist die Eindringtiefe zu gering, um eine Aussage über die Integrität der Basalmembran und somit über eine mögliche Invasivität einer Läsion zu treffen.

Um die offensichtlichen diagnostischen Mängel zu reduzieren, werden derzeit verschiedene oben angeführte, sensitive, nicht-invasive Techniken zusätzlich zur invasiven Gewebebiopsie klinisch experimentell angewendet und evaluiert. In diesem Sinne wird in dieser Studie überprüft, inwieweit die optische Kohärenztomographie zur Detektion, Differenzierung und Abgrenzung prä- und frühmaligner Schleimhautläsionen des oberen Aerodigestivtraktes beitragen und damit die Tumorfrühdiagnostik verbessern kann.

## **2. Material und Methoden**

Diese prospektive klinisch-diagnostische Studie wurde nach positivem Ethikvotum der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München (Projekt Nr. 240-08 vom 23.07.2008) und des Princess Alexandra Hospital, Brisbane, Australien (Projekt Nr. HREC/10/QPAH/204 vom 22.03.2011) durchgeführt.

Alle mittels optischer Kohärenztomographie untersuchten Patienten wurden über das Verfahren aufgeklärt und willigten schriftlich vor Durchführung der Untersuchung in die Studienteilnahme ein.

### **2.1 Patientenkollektiv der prospektiven klinischen Studie**

Patienten, die sich an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der LMU München oder am Princess Alexandra Hospital, Brisbane (Australien), mit oberflächlichen tumorverdächtigen leuko- oder erythroplakischen Läsionen des oberen Aerodigestivtraktes vorstellten, wurden vor der invasiven Gewebebiopsie mittels optischer Kohärenztomographie untersucht. Davon wurden ausschließlich Patienten mit Primärläsionen in die prospektive klinisch diagnostische Studie eingeschlossen. Insgesamt wurden 74 Patienten (Durchschnittsalter 59,41 a, Altersbereich 33-82 a, Standardabweichung 11,17 a) mit 100 makroskopisch verdächtigen, flachen, leuko- oder erythroplakischen epithelialen Läsionen des oberen Aerodigestivtraktes untersucht. Als Primärläsionen wurden Läsionen, die noch keiner invasiven Diagnostik unterzogen wurden betrachtet – so wurden Läsionen, die bereits biopsiert waren, aus der Studie ausgeschlossen. Aus der Studie ausgeschlossen wurden zudem minderjährige Patienten und nicht-einwilligungsfähige Patienten.

### **2.2 Time Domain – Optische Kohärenz Tomographie**

In der vorliegenden Studie wurde das Niris<sup>®</sup> Time-Domain-OCT der Firma Imalux (Cleveland, Ohio, USA) verwendet (Abbildung 6). Es erhielt 2004 die FDA- und 2006 die CE-Zertifizierung. Es besteht aus einer zentralen OCT-Einheit (Rechner, Michelson-Interferometer, Bildschirm und Fußschalter), an die die Imalux-Sonde direkt angeschlossen wird. Als Strahlungsquelle dient eine Superlumineszenz-Diode mit einer zentralen Wellenlänge von 1300 nm. Das optische System wird in einem flexiblen Kabel mit einem Durchmesser von 2,7 mm und einer Länge von 3,0 m geführt. Laut Herstellerangaben beträgt die Bildfrequenz 0,7 Hz (bei einer Scan-Länge von ca. 2 mm), die laterale Auflösung beträgt

## 2. Material und Methoden

---

$\leq 50 \mu\text{m}$  und die Tiefenauflösung  $10\text{-}20 \mu\text{m}$ . Die Eindringtiefe beträgt bis zu 2 mm.



Abbildung 6: Imalux Niris® TD-OCT-System

### 2.3 Screening der Mundhöhle

An einer Kontrollgruppe von 52 gesunden Probanden (männlich 29, weiblich 23, Durchschnittsalter 44,8 a, Altersbereich 20-73 a, Standardabweichung 16,9 a) wurde vor Durchführung der prospektiven Studie ein Screening der Mundhöhle durchgeführt. Diese Probanden wurden alle an der Klinik und Poliklinik für Hals- Nasen- & Ohrenheilkunde der LMU München rekrutiert. Für das Screening wurden bei jedem Probanden OCT-Bilder von 8 verschiedenen Stellen innerhalb der Mundhöhle (Lippe, Wange, Mundboden, Zungenrand, Zungenrücken, harter Gaumen, weicher Gaumen, Zungenunterseite) gemacht. Die Messungen erfolgten sitzend im Stuhl und erforderten keine besondere Vorbereitung der Probanden. Die Sonde wurde dazu direkt, wie in Abbildung 7 erkenntlich, auf die Schleimhaut aufgesetzt. Die Bildakquisition nahm nur wenige Minuten in Anspruch. Die Daten der Probanden wurden pseudonymisiert im OCT-System erfasst. Auf allen aufgezeichneten Bildern wurde dann die Epitheldicke ausgemessen (mit einem Softwareprogramm namens ImageJ, Freeware, Wayne Rasband, US National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) und die mittlere Epitheldicke aus den einzelnen Werten für die verschiedenen Lokalisationen errechnet.



Abbildung 7: OCT-Sonde von Imalux wird sachte auf die Schleimhautoberfläche aufgesetzt

### **2.4 Durchführung der prospektiven klinischen Studie**

Alle rekrutierten Patienten mit primären leukoplakischen oder erythroplakischen Schleimhautläsionen des oberen Luft-Speiseweges (Mundhöhle, Oropharynx, Larynx) wurden prospektiv mittels Niris TD-OCT (Niris®, Imalux Corporation, Cleveland, USA) untersucht. Die Untersuchung mittels OCT erfolgte vor Abtragung der Veränderung und wurde, je nach Lokalisation, entweder in Narkose (Larynx) oder im Wachzustand (Mundhöhle und Oropharynx) durchgeführt. Eine Lokalanästhesie war dabei nicht notwendig. Die Patienten wurden pseudonymisiert für die Datenerfassung in den Rechner eingespeichert. Eine sterilisierte, optische Sonde (Durchmesser 2.7 mm; Abbildung 8) wurde anschließend entweder direkt oder über einen Endoskop-Arbeitskanal (70°/4 mm Hopkins II Endoskop, KARL STORZ GmbH, Tuttlingen, Deutschland, Abbildung 9) senkrecht auf die Schleimhaut-Oberfläche aufgebracht und die Aufnahme mittels Fußschalter erfasst und gespeichert. In Abbildung 10 ist der Monitor des OCT-Systems (Niris®) dargestellt.

Meist war ein zweiter Untersucher anwesend, um den Vorgang zu beschleunigen und um einen Kommentar zu den OCT-Bildern in den Rechner einzutragen. Abhängig von der Größe der untersuchten Schleimhautveränderung wurden eine bis mehrere solcher Aufnahmen pro Patient durchgeführt, zusätzlich wurden Bilder vom makroskopischen Randbereich der Läsion und vom angrenzenden, makroskopisch gesunden Gewebe gemacht. Diese wenige Minuten in Anspruch nehmende Untersuchung erforderte keine spezielle Patientenvorbereitung. Die Risiken entsprachen den üblichen Risiken einer Panendoskopie, falls die OCT endoskopisch



## 2. Material und Methoden

---

für die Bildgebung des Larynx eingesetzt wurde. Bei der direkten handgeführten Untersuchung gab es keine Zusatzrisiken für den Patienten.



Abbildung 8: OCT-Sonde von Imalux

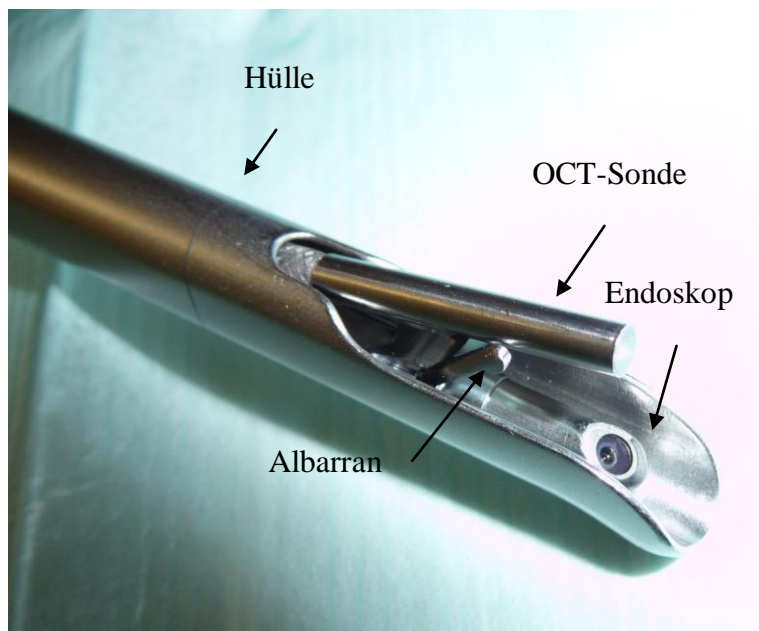


Abbildung 9: OCT-Sonde in einem Endoskop Arbeitskanal für laryngeale Untersuchungen

## 2. Material und Methoden

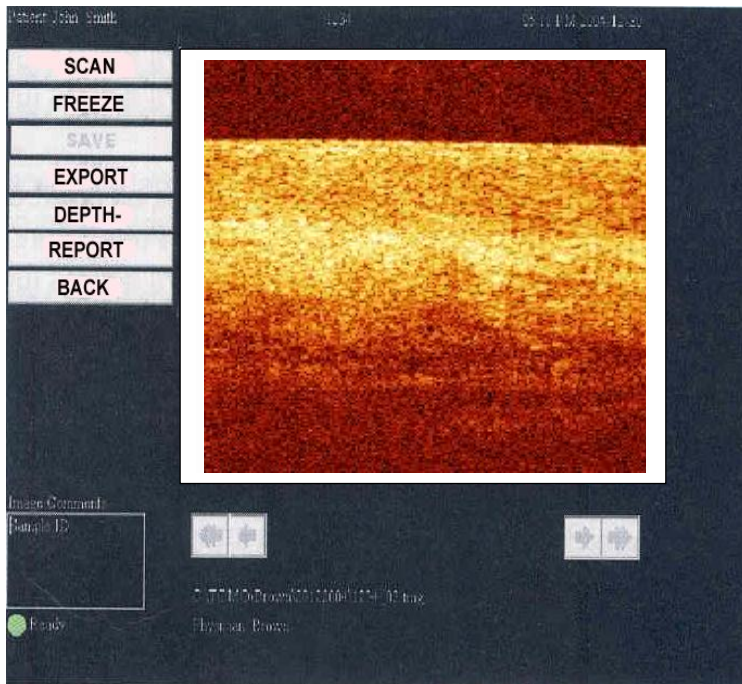


Abbildung 10: Monitor des OCT-Systems (Niris<sup>®</sup>) von Imalux

In Abbildung 11 ist dargestellt, wie bei einem Patienten die OCT-Sonde endoskopisch in den Larynx eingeführt wird und dann für die Untersuchung der Stimmlippe sachte auf die letztere aufgesetzt wird. Bei diesem Patienten wurde zudem, vor Durchführung der OCT-Untersuchung eine Autofluoreszenzdiagnostik (AFI) durchgeführt. Die in der AFI auffällig erscheinenden Areale (Abbildung 12, beim veränderten Gewebe handelt es sich um die umschrieben blau dargestellte Fläche) wurden dann mittels OCT einer vertieften Diagnostik unterzogen.

## 2. Material und Methoden

---

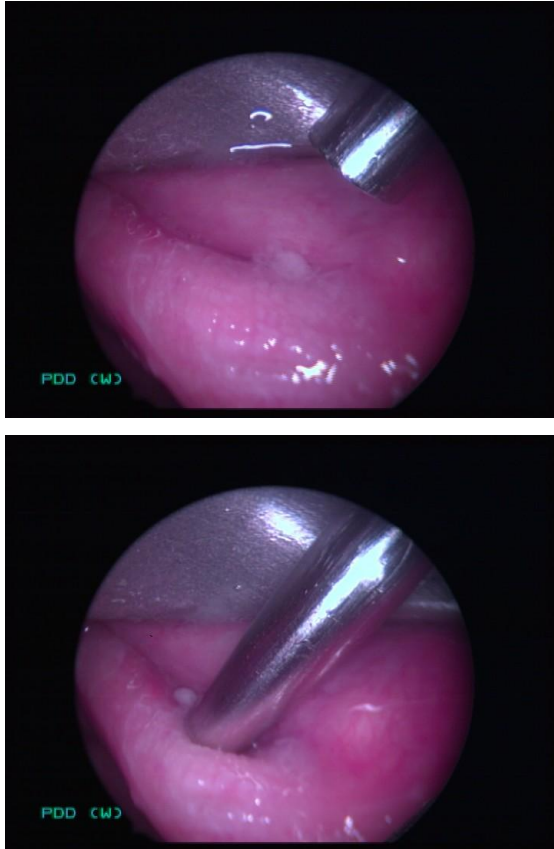


Abbildung 11: Imalux-Sonde wird für die Untersuchung der Stimmlippe endoskopisch in den Larynx eingeführt (links) und dann direkt auf die Stimmlippe aufgesetzt (rechts)

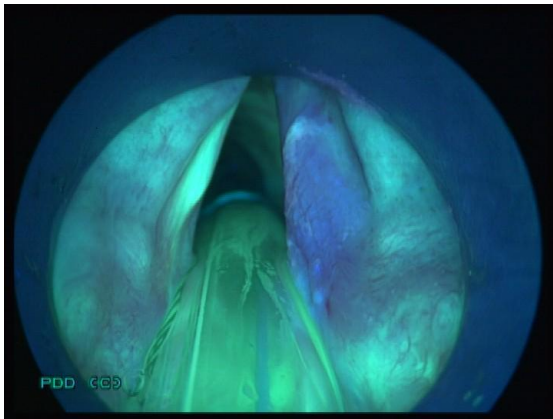


Abbildung 12: Autofluoreszenzdiagnostik bei einer laryngealen Läsion. Das veränderte Gewebe an der rechten Stimmlippe stellt sich als umschriebene blaue Fläche dar.

Die klinische Befundlokalisierung und -ausdehnung wurde anhand einer Skizze sowie photographisch vom entsprechenden Untersucher festgehalten. Zudem beurteilte derselbe Untersucher die Integrität der Basalmembran auf den erhaltenen TD-OCT-Bildern. Auf einem Dokumentationsbogen wurden dann sowohl die klinische Verdachtsdiagnose, als auch die

## 2. Material und Methoden

Verdachtsdiagnose, welche sich aus der OCT-Untersuchung ergab, eingetragen. Dabei wurden jeweils für die klinische, die OCT- und die histologische Beurteilung dieselben möglichen Diagnosen verwendet um die Ergebnisse später korrelieren zu können. Tabelle 5 zeigt die möglichen Differentialdiagnosen.

Normalgewebe	<input type="checkbox"/>								
Entzündung	<input type="checkbox"/>	→	<table border="1"> <tr> <td>akut</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>chronisch</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>	akut	<input type="checkbox"/>	chronisch	<input type="checkbox"/>		
akut	<input type="checkbox"/>								
chronisch	<input type="checkbox"/>								
Hyper- / Parakeratose	<input type="checkbox"/>								
<small>KANN ALLEINE ODER ALS ZUSÄTZLICHE DIAGNOSE ANGEKREUZT WERDEN</small>									
Hyperplasie	<input type="checkbox"/>								
Lichen planus	<input type="checkbox"/>								
Dysplasie	<input type="checkbox"/>	→	<table border="1"> <tr> <td>Grad I</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Grad II</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Grad III</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>	Grad I	<input type="checkbox"/>	Grad II	<input type="checkbox"/>	Grad III	<input type="checkbox"/>
Grad I	<input type="checkbox"/>								
Grad II	<input type="checkbox"/>								
Grad III	<input type="checkbox"/>								
Invasives PEC	<input type="checkbox"/>								
Andere (_____)	<input type="checkbox"/>								

Tabelle 5: Mögliche Diagnosen bei der klinischen-, OCT- und histologischen Beurteilung von Schleimhautläsionen des OADT

Für die OCT-Beurteilung wichtige Kriterien waren die Bildqualität, die horizontale Schichtung des Gewebes, die An- oder Abwesenheit einer klar definierten Grenze zwischen Epithelschicht und Lamina propria (also die Integrität der Basalmembran), die Schichtdicke und Signalintensität der Epithelschicht, die An- oder Abwesenheit einer oberflächlichen Keratinschicht und die Beschaffenheit der Submukosa. Das wichtigste Merkmal für die Unterscheidung zwischen prämaligen und malignen Läsionen war dabei die Integrität der Basalmembran, welche bei invasiven Läsionen nicht mehr gegeben ist. Anschließend erfolgte

## 2. Material und Methoden

---

die operative Entfernung oder Biopsie der vorher mittels OCT untersuchten Schleimhautveränderung. Das Operationspräparat wurde wie üblich HE-gefärbt und histologisch untersucht (federführend durch PD Dr. Stephan Ihrler, Pathologisches Institut der LMU München). Sowohl die OCT- Verdachtsdiagnosen als auch die histopathologischen Befunde wurden in eine Excel- Tabelle (Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Corporation) eingetragen und auf deren Übereinstimmung bezüglich Invasivität einer Läsion überprüft. Für die Detektion von invasiven Läsionen mittels OCT wurden Sensitivität, Spezifität, negativer prädiktiver Wert (NPW) und positiver prädiktiver Wert (PPW) aus den vorliegenden Ergebnissen, welche in eine Kreuztabelle eingetragen wurden, berechnet.

Schlussendlich wurden alle 100 OCT-Bilder aus der prospektiven klinisch-diagnostischen Studie zur verblindeten Bewertung einer Mitarbeiterin und Ärztin der Firma Imalux, einer studentischen Mitarbeiterin der Firma Imalux und einem HNO-Arzt mit großer OCT-Erfahrung im Kopf-Hals-Bereich (Dr. Marcel Kraft, HNO, Kantonsspital Aarau, Aarau, Schweiz) vorgelegt. Die drei verblindeten Bewerter beurteilten jeweils ob die Läsion invasiv war oder nicht. Die verblindete Bewertung wurde in die oben erwähnte Excel-Tabelle (Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Corporation) eingetragen und mit dem histopathologischen Befund der zugehörigen Läsion verglichen. Es wurden wiederum Sensitivität und Spezifität aus den vorliegenden Ergebnissen mit Hilfe einer Kreuztabelle berechnet.

### **2.5 Vergleich von Epitheldicken: OCT und Histologie**

Des Weiteren wurden bei 38 Läsionen die Epitheldicken der OCT-Bilder mit einem Softwareprogramm (ImageJ, Freeware, Wayne Rasband, US National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) ausgemessen und mit denjenigen der histologischen Schnittbilder verglichen. Für diese Auswertung wurde dabei jeweils jene Stelle mit der höchsten Epitheldicke herangezogen. Die so erhaltenen Werte wurden miteinander verglichen und es wurde zur Darstellung der Korrelation der erhaltenen Werte mithilfe des Softwareprogrammes SigmaPlot (SigmaPlot® 2001, SPSS Inc., Chicago, Illinois) ein Cohen's Kappa errechnet.

### **2.6 Retrospektive Intensitätsanalyse**

Retrospektiv wurden sowohl OCT-Bilder von Normalgewebe (n=2) als auch OCT-Bilder von Karzinomen (n=8, die falsch negative Läsion wurde nicht mit ausgewertet) und falsch positiven Läsionen (n=6) ausgewertet und deren Intensitätsprofile miteinander verglichen.

## 2. Material und Methoden

---

Leuko- und erythroplakische Läsionen (Hyperplasien: n=28, Dysplasien: n=20) wurden bezüglich Intensitätsänderung ausgewertet. Dazu wurden die Bilder einzeln mit dem Softwareprogramm ImageJ (Freeware, Wayne Rasband, US National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) geöffnet und bearbeitet. Bei jedem OCT-Bild wurden 4 Regions of Interest (ROI) gesetzt: Luft (optische Lücke am oberen Rand aller Bilder), oberes Epithel, unteres Epithel und Stroma. Mit Hilfe des „Roy Managers“ wurden dann die jeweiligen Intensitäten und die Epitheldicke ermittelt. Daraufhin wurden die Quotienten aus den Intensitäten von oberem Epithel/unterem Epithel und Stroma/unterem Epithel gebildet und somit die Intensitätszunahme/-abnahme über die unterschiedlichen Gewebsabschnitte berechnet. Zudem wurde von jedem Bild ein graphisches Intensitätsprofil erstellt. Schlussendlich wurde die Intensitätsab- und -zunahme innerhalb des Epithels bzw. zwischen Epithel und Stroma bei hyperplastischen Läsionen mit denen von dysplastischen Läsionen verglichen und die unterschiedliche Intensitätsänderung auf ihre statistische Relevanz überprüft. Zur statistischen Überprüfung wurde für die Intensitätsabnahme über das Epithel der Mann-Whitney U-Test zum Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen mit nicht normalverteilten Werten verwendet. Für die statistische Überprüfung des Intensitätssprunges zwischen Epithelschicht und Lamina propria wurde der Zweistichproben T-Test verwendet, da es sich in diesem Fall um normalverteilte Werte handelte.

Außerdem wurden die Intensitätsprofile von Normalgewebe, Tumorgewebe und den falsch positiven Läsionen gruppiert dargestellt und miteinander verglichen. Die genaue Auswertung und die Erstellung der Graphiken erfolgten mit dem Softwareprogramm SigmaPlot (Sigma-Plot® 2001, SPSS Inc., Chicago, Illinois).

## 3. Ergebnisse

In der klinischen Studie war es möglich, mikroanatomische Strukturen wie die Epithelschicht und die Lamina propria klar zu identifizieren. Die Epithelschicht konnte in den meisten Fällen als dünne Struktur an der Oberfläche mit einer relativ geringen Signalintensität differenziert werden. Im Gegensatz dazu imponierte die Lamina propria als Schicht mit hoher Signalintensität, was auf die dort vorhandenen, stark streuenden dichten Schichten von kollagenen und elastischen Fasern zurückzuführen ist. Weiters finden sich in der Lamina propria auch Blutgefäße und Lymphgefäße, welche eine niedrigere Signalintensität aufweisen. Die Basalmembran liegt an der meist klar sichtbaren Grenze zwischen Epithelschicht und Lamina propria (Abbildung 13). Die OCT-Bilder korrelierten gut mit den histologischen Gewebsschnitten aus dem fraglichen Bereich (Abbildung 14). Bei vorliegender Hyperkeratose konnte eine oberflächliche Keratinschicht vom Epithel abgegrenzt werden, die vermehrt Licht reflektiert und deshalb eine hellere Farbe aufweist (Abbildung 15).

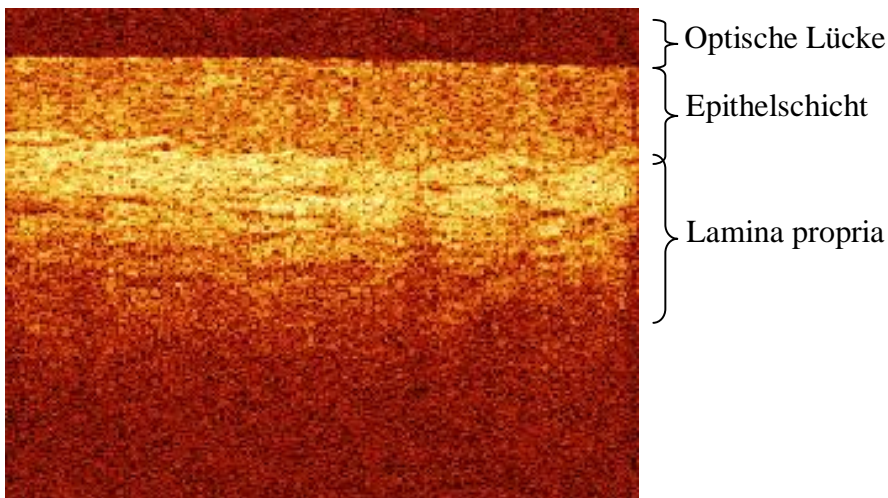


Abbildung 13: In vivo TD-OCT von Normalgewebe an der Innenseite der Unterlippe

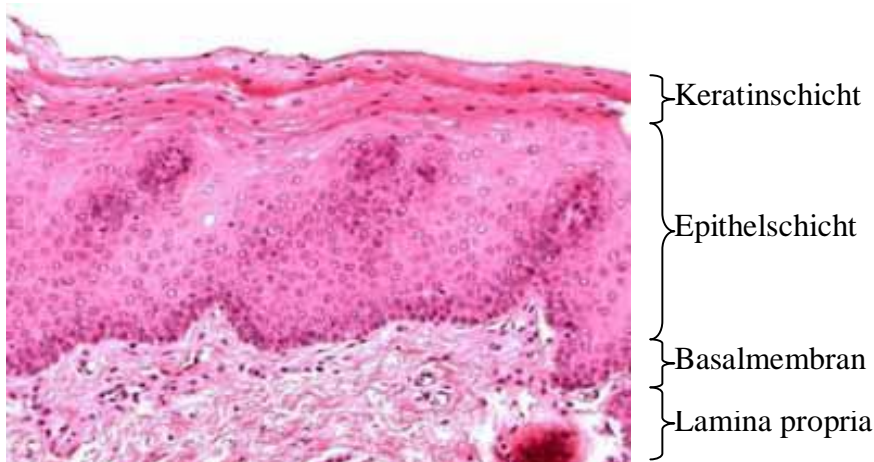


Abbildung 14: Histologischer Gewebsschnitt von Normalgewebe an der Innenseite der Unterlippe

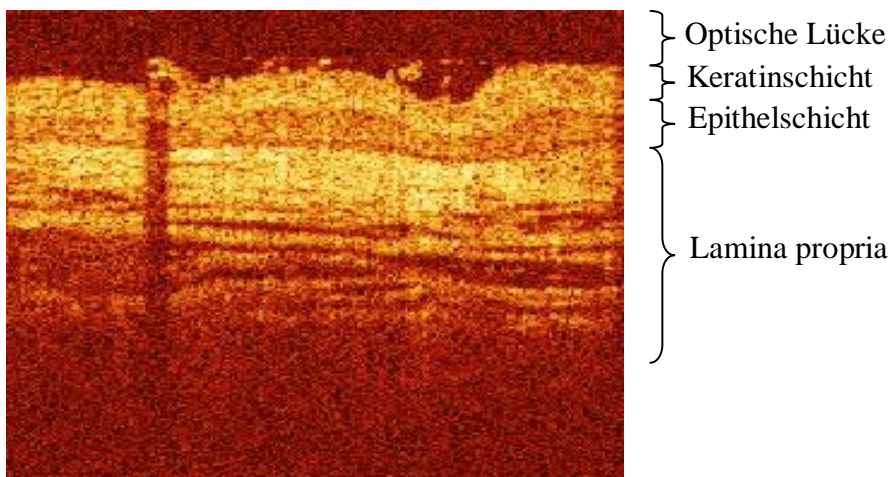


Abbildung 15: In vivo TD-OCT einer rein hyperkeratotischen Läsion am Mundboden

#### 3.1 Ergebnisse Screening der Mundhöhle

In der Screening Studie an 52 gesunden Probanden (n=29 männlich, n=23 weiblich; Durchschnittsalter: 44,8 a, Altersbereich: 20-73 a, Standardabweichung: 16,9 a) wurden große physiologische Unterschiede in der Epitheldicke innerhalb der Mundhöhle gefunden (Abbildung 16). Insgesamt wurden an 8 verschiedenen Lokalisationen innerhalb der Mundhöhle die Epitheldicken erfasst. Dies waren:

- Mundboden (n=52)
- Zungenunterseite (n=52)
- Zungenrand (n=52)
- Zungenrücken (n=50)
- Lippe (n=47)
- Wange (n=52)

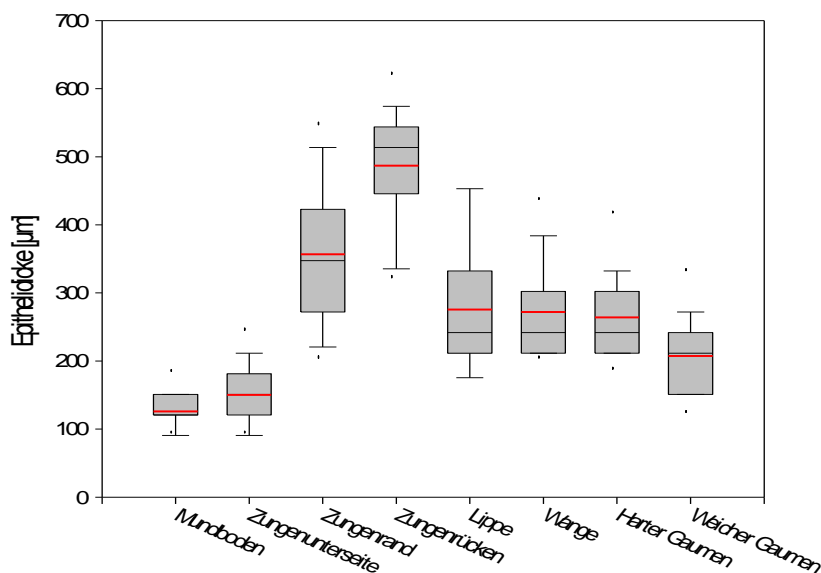


### 3. Ergebnisse

- Harter Gaumen (n=50)
- Weicher Gaumen (n=50)

Nicht bei jedem Patienten konnten OCT-Bilder von allen 8 Lokalisationen gemacht bzw. ausgewertet werden, da entweder die Abgrenzung zwischen Epithel und Lamina propria schwierig zu erkennen war oder es aufgrund eines sehr starken Würgereizes nicht möglich war OCT-Bilder z.B. vom weichen Gaumen zu erhalten.

Sowohl die geringste mittlere Epitheldicke als auch die geringste interindividuelle Variabilität an Epitheldicken wurden am Mundboden (Mittelwert 126  $\mu\text{m}$ , SD 25  $\mu\text{m}$ ) und an der Zungenunterseite (Mittelwert 150  $\mu\text{m}$ , SD 44  $\mu\text{m}$ ) gemessen. Die höchste mittlere Epitheldicke wurde am Zungenrücken (Mittelwert 487  $\mu\text{m}$ , SD 85  $\mu\text{m}$ ) gefunden, wohingegen sich die größten interindividuellen Unterschiede am Zungenrand (Mittelwert 357  $\mu\text{m}$ , SD 102  $\mu\text{m}$ ) und an der Lippe (Mittelwert 278  $\mu\text{m}$ , SD 98  $\mu\text{m}$ ) zeigten.



**Abbildung 16:** Die Box Plots zeigen die an 52 gesunden Probanden mittels TD-OCT gemessenen, mittleren Epitheldicken. Zeichenerklärung: rote Linie: Mittelwert, schwarze Linie: Median, Box-Grenzen: 25. und 75. Perzentile, Whiskers: 10. und 90. Perzentile, Kreise: 5. und 95. Perzentile.

### 3.2 Ergebnisse der prospektiven Studie

#### 3.2.1 Auswertung bezüglich Integrität der Basalmembran

In der prospektiven klinischen Studie zur Tumorfrühdiagnostik im OADT mittels OCT wurden 74 Patienten mit 100 primären, makroskopisch verdächtigen, flachen, leuko- oder erythroplakischen epithelialen Läsionen des oberen Aerodigestivtraktes untersucht. Die Läsionen befanden sich in der Mundhöhle (n=63), im Oropharynx (n=3) und im Larynx (n=34). Die ausführlichen Ergebnisse dieser Untersuchungen bezüglich Durchbruchs der Basalmembran sind in Tabelle 6 dargestellt.

	OCT: Schichtung erhalten	OCT: keine Schichtung vorhanden	Gesamt
<b>PEC</b>	1	8	9
<b>DIII</b>	5		5
<b>DII</b>	9	1	10
<b>DI</b>	11		11
<b>OLP</b>	4	1	5
<b>HK</b>	10	1	11
<b>HP</b>	35	6	41
<b>EC</b>	2		2
<b>I</b>	2		2
<b>FS</b>	1		1
<b>Ulcus</b>		1	1
<b>NM</b>	2		2
<b>Gesamt</b>	82	18	<b>100</b>

Tabelle 6: Tabellarische Auflistung der 100 mittels TD-OCT untersuchten Läsionen bezüglich Schichtintegrität/Durchbruch der Basalmembran in der OCT in Korrelation zum entsprechenden histologischen Befund. Abkürzungen: PEC= Plattenepithelkarzinom, DI-III= Dysplasie Grad I-III, OLP= oraler Lichen planus, HK= Hyperkeratose, HP= Hyperplasie, EC= epitheliale Zyste, I= Entzündung, FS= Fibrinschorf, NM= normale Mukosa

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich, war bei 8 von 9 frühinvasiven Karzinomen in der OCT die Schichtung aufgehoben und die Läsionen konnten als invasiv erkannt werden. Es gab 1 falsch negative Läsion. Abbildung 17 und 18 zeigen Beispiele für frühinvasive Läsionen. Von den 91 nichtmalignen bzw. prämaligen Läsionen konnten 81 als solche erkannt werden (Abbildung 19), es gab 10 falsch positive Befunde.

### 3. Ergebnisse

---

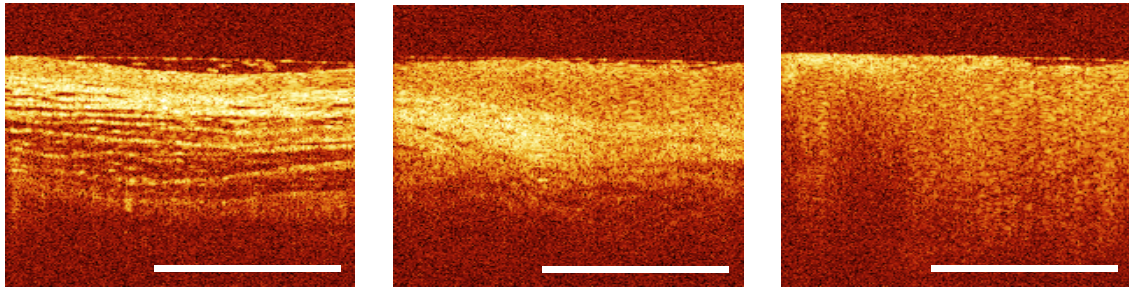


Abbildung 17: Drei TD-OCT Bilder eines Patienten mit einem frühinvasiven Plattenepithelkarzinom des Zungenrandes (linkes Bild: Normalgewebe; mittleres Bild: Übergangszone; rechtes Bild: Zentrum der Läsion); weiße Balken im Bild entsprechen 1 mm.

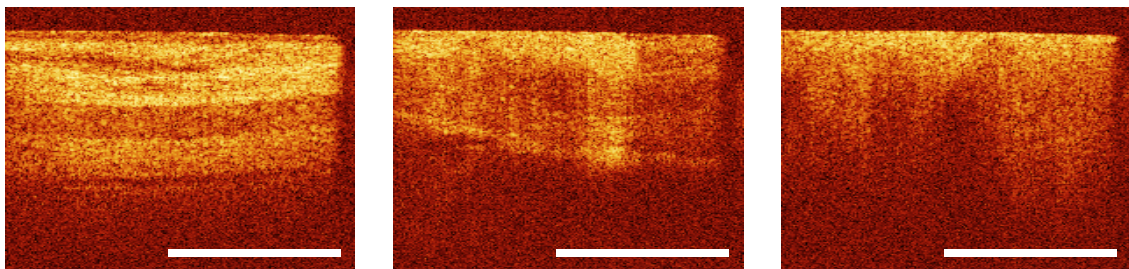


Abbildung 18: Drei TD-OCT Bilder eines Patienten mit einem frühinvasiven Plattenepithelkarzinom der vorderen Kommissur im Larynx (linkes Bild: Normalgewebe (mit ausgeprägter Hyperkeratose); mittleres Bild: Übergangszone; rechtes Bild: Zentrum der Läsion); weiße Balken im Bild entsprechen 1 mm.

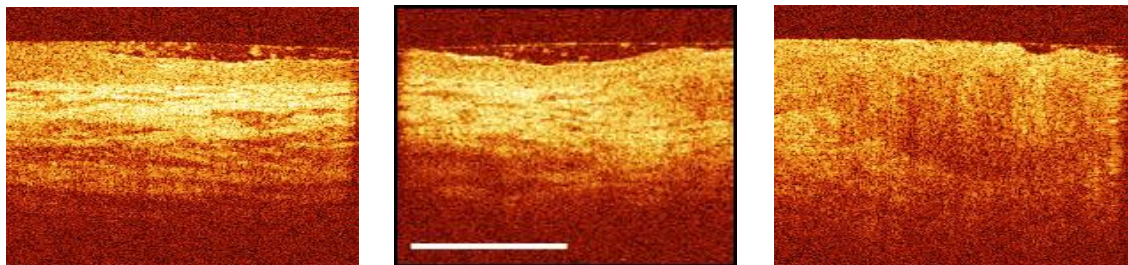


Abbildung 19: Drei TD-OCT Bilder von einem Patienten mit einem Carcinoma in situ am rechten Mundboden (linkes Bild: Normalgewebe, mittleres Bild: Übergangszone, rechtes Bild: Zentrum der Läsion); weißer Balken im Bild entspricht 1 mm.

Die bisherigen Ergebnisse, wie in Tabelle 7 zusammengefasst, zeigen für die Unterscheidung zwischen invasiven und nicht-invasiven Läsionen einen Trend zu einer hohen Sensitivität. Aufgrund der geringen Anzahl an invasiven Läsionen (n=9) kann allerdings noch keine verlässliche Aussage über die Sensitivität getroffen werden. Dennoch lässt sie sich wie folgt errechnen:

### 3. Ergebnisse

$$\text{Sensitivität (TD-OCT invasive Läsionen)} = \frac{RP}{RP+FN} = \frac{8}{8+1} = 88,89\%$$

Die Spezifität hingegen berechnet sich wie folgt:

$$\text{Spezifität (TD-OCT invasive Läsionen)} = \frac{RN}{RN+FP} = \frac{81}{81+10} = 89,01\%$$

Der positive und der negative prädiktive Wert berechnen sich folgendermaßen:

$$\text{PPW (TD-OCT invasive Läsionen)} = \frac{RP}{RP+FP} = \frac{8}{8+10} = 44,44\%$$

$$\text{NPW (TD-OCT invasive Läsionen)} = \frac{RN}{RN+FN} = \frac{81}{81+1} = 98,78\%$$

	Mittels OCT richtig zugeordnet	Mittels OCT falsch zugeordnet	Summe
<b>Läsionen ohne invasives Wachstum (Hyperkeratose/Hyperplasie/Dysplasie)</b>	81	10	91
<b>Läsionen mit invasivem Wachstum (Frühkarzinome)</b>	8	1	9
<b>Summe</b>	89	11	<b>100</b>

Tabelle 7: Ergebnisse zur Differenzierung zwischen prä- und frühmalignen Läsionen mittels OCT

#### 3.2.2 Analyse der in der OCT falsch positiven Läsionen

Die detaillierte Analyse der 10 falsch positiven Befunde (d.h. bei welchen sich in der OCT-Untersuchung fälschlicherweise der Verdacht auf einen Durchbruch der Basalmembran ergab) ergab folgendes:

- Lokalisation: 5x Zungenrand, 1x Zungenrücken, 1x Wange, 1x harter Gaumen, 1x Stimmlippe, 1x Mundboden
- primärer histologischer Befund: 6x HP (2x hochgradig papilläre HP), 1x OLP, 1x DII, 1x Ulcus, 1x HK
- zusätzliche histologische Befunde: 7x HK

### 3. Ergebnisse

---

In Abbildung 20 bis 23 sieht man Beispiele für falsch positive Läsionen.

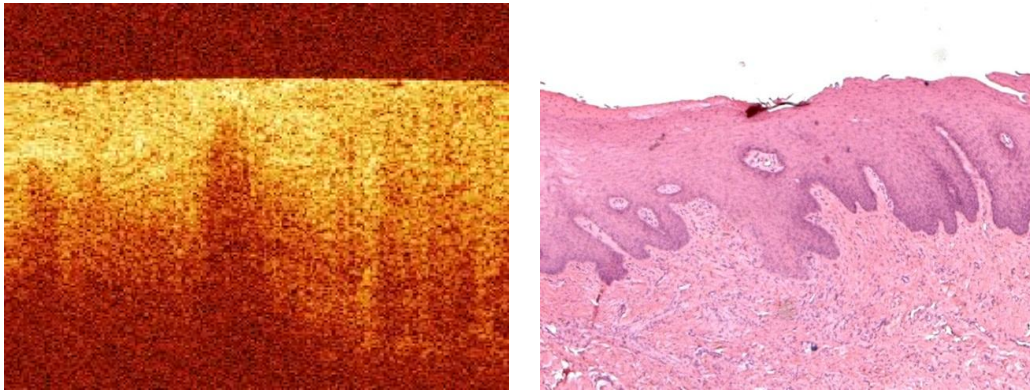


Abbildung 20: Links: Beispiel für ein TD-OCT Bild einer falsch positiven Läsion am Zungenrand; Rechts: histologischer Gewebeschnitt derselben Läsion ergab eine hochgradige, papilläre Hyperplasie.

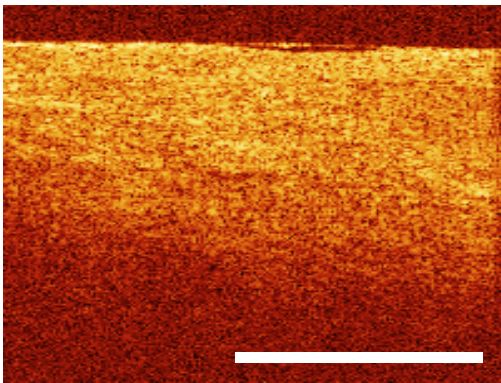


Abbildung 21: Beispiel für ein falsch positives TD-OCT Bild. Die Leukoplakie war an der Wange lokalisiert, der histologische Befund ergab Epithelhyperplasie und Hyperkeratose. Balken im Bild entspricht 1 mm.

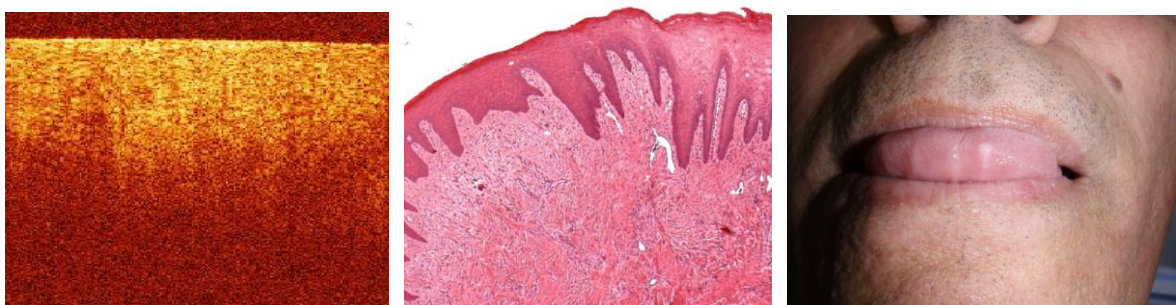


Abbildung 22: Links: Beispiel für ein TD-OCT Bild einer falsch positiven Läsion an der Zungenspitze (klinisch handelte es sich um einen Mundschleimhautpolypen); Mitte: histologischer Gewebeschnitt derselben Läsion ergab eine hochgradige, papilläre Hyperplasie. Rechts: Foto der Läsion

### 3. Ergebnisse

---

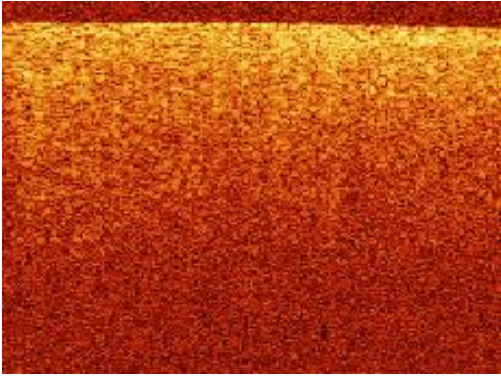


Abbildung 23: Beispiel einer falsch positiven Läsion am Zungenrand. Histologisch handelte es sich um ein Ulcus.

#### **3.2.3 Analyse der in der OCT falsch negativen Läsion**

Die in der OCT-Untersuchung falsch negative Läsion war am vorderen Stimmlippendrittel lokalisiert. Es handelte sich histologisch um ein PEC. In der OCT-Untersuchung wurde der Verdacht auf eine Dysplasie III mit zusätzlicher Hyperkeratose gestellt. Abbildung 24 zeigt das OCT-Bild der falsch negativen Läsion.

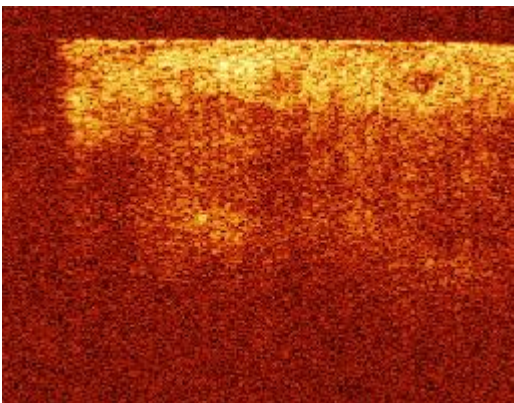


Abbildung 24: Beispiel einer falsch negativen Läsion am vorderen Stimmlippendrittel. Histo: PEC. OCT: Dysplasie III + Hyperkeratose.

#### **3.2.4 Analyse der dysplastischen Läsionen**

Eine detaillierte Analyse der 26 histologisch gesicherten Dysplasien ist in Tabelle 8 dargestellt. Nach OCT-Untersuchung ergab sich insgesamt 13x der Verdacht auf Dysplasie I, 8x der Verdacht auf Dysplasie II und 13x der Verdacht auf DIII. Die korrelierenden histopathologischen Befunde sind in Tabelle 9 aufgelistet.

### 3. Ergebnisse

	<b>Histo: DI</b>	<b>Histo:DII</b>	<b>Histo:DIII</b>	<b>Gesamt</b>
<b>PEC</b>		1		1
<b>DI</b>	5	3	1	9
<b>DII</b>	1	1	1	3
<b>DIII</b>	3		2	5
<b>HK</b>		2		2
<b>HP</b>	2	3	1	6
<b>Gesamt</b>	11	10	5	<b>26</b>

Tabelle 8: Spalten: histologisch gesicherte Dysplasien, Zeilen: korrelierender OCT-Verdachtsbefund

	<b>OCT: DI</b>	<b>OCT:DII</b>	<b>OCT:DIII</b>	<b>Gesamt</b>
<b>PEC</b>			1	1
<b>DI</b>	5	1	3	9
<b>DII</b>	3	1		4
<b>DIII</b>	1	1	2	4
<b>HK</b>	1	1	2	4
<b>HP</b>	3	4	3	10
<b>I</b>			2	2
<b>Gesamt</b>	13	8	13	<b>34</b>

Tabelle 9: Spalten: Dysplasie-Verdacht nach OCT-Untersuchung, Zeilen: korrelierender histopathologischer Befund

Die Epitheldickenvermessung bei den ersten 20 dysplastischen Läsionen ergab eine Zunahme der Epitheldicke auf das 1,4 bis 5,7fache im Vergleich zu Normalgewebe (als „normale Epitheldicken“ wurden dabei die aus unserer Screening-Studie hervorgehenden Mittelwerte für die Epitheldicken in der Mundhöhle und die von Arens et al. 2007 [46] mit durchschnittlich 147  $\mu\text{m}$  (n=16) angegebene mittlere Epitheldicke für gesunde Stimmlippenschleimhaut herangezogen. In Tabelle 10 sind die einzelnen Läsionen mit gemessener OCT-Epitheldicke und korrelierender Durchschnittsepitheldicke von Normalgewebe dargestellt.

### 3. Ergebnisse

	<b>Lokalisation</b>	<b>Epitheldicke OCT in mm</b>	<b>Ø Epitheldicke Normalgewebe in mm</b>	<b>Verdickungsfaktor</b>
<b>Dysplasie I</b>	Weicher Gaumen	0,42	0,21	2,0
	Mundboden	0,49	0,13	3,8
	Zungenrand	0,90	0,36	2,5
	Zungenrand	0,71	0,36	2,0
	Mundboden	0,30	0,13	2,3
	Stimm lippe	0,32	0,15	2,1
	Zungenunterseite	0,57	0,15	3,8
	Stimm lippe	0,85	0,15	5,7
<b>Dysplasie II</b>	Stimm lippe	0,46	0,15	3,1
	Stimm lippe	0,60	0,15	4,0
	Stimm lippe	0,60	0,15	4,0
	Weicher Gaumen	0,42	0,21	2,0
	Stimm lippe	0,52	0,15	3,5
	Sinus piriformis	0,37	/	
	Zungenrand	0,51	0,36	1,4
<b>Dysplasie III</b>	Zungenrand	0,80	0,36	2,2
	Stimm lippe	0,59	0,15	3,9
	Mundboden	0,37	0,13	2,9
	Stimm lippe	0,33	0,15	2,2
	Stimm lippe	0,34	0,15	2,3

Tabelle 10: Mittels OCT ausgemessene Epitheldicken von 20 dysplastischen Läsionen im Vergleich zu korrelierenden mittleren Epitheldicken von Normalgewebe. Eine Läsion konnte nicht eingeschlossen werden, da sie falsch positiv war und folglich keine Schichtung erkennbar war. Als mittlere Epitheldicken für die Mundhöhle wurden die in unserer Screening-Studie erhaltenen Werte herangezogen, für den Larynx wurden die von Arens et al. 2007 [46] publizierten Werte verwendet.

Errechnet man den durchschnittlichen Verdickungsfaktor so ergibt dies:

- 3,025 für Dysplasie I
- 3,0 für Dysplasie II und
- 2,7 für Dysplasie III.

#### 3.2.5 Beurteilung durch verblindete Bewerter

Die Beurteilung der OCT-Bilder durch drei verblindete externe Bewerter (Bewerter 1: Ärztin und Mitarbeiterin der Imalux Corporation, Cleveland, Ohio, USA; Bewerter 2: Medizinstudentin und Praktikantin der Imalux Corporation; Bewerter 3: HNO-Arzt und OCT-



### 3. Ergebnisse

Experte im Kopf-Hals-Bereich, Kantonsspital Aarau, Schweiz) sind in Tabelle 11 bis 13 aufgezeigt. Insgesamt wurden jeweils 100 der 100 Läsionen durch die drei verblindeten Bewerter beurteilt.

	<b>Mittels OCT richtig zugeordnet</b>	<b>Mittels OCT falsch zugeordnet</b>	<b>Summe</b>
<b>Läsionen mit invasivem Wachstum (Frühkarzinome)</b>	9	0	9
<b>Läsionen ohne invasives Wachstum (Hyperkeratose/Hyperplasie/Dysplasie)</b>	69	22	91
<b>Summe</b>	78	22	<b>100</b>

Tabelle 11: Ergebnisse zur Differenzierung zwischen prä- und frühmalignen Läsionen mittels OCT (verblindeter Bewerter 1)

	<b>Mittels OCT richtig zugeordnet</b>	<b>Mittels OCT falsch zugeordnet</b>	<b>Summe</b>
<b>Läsionen mit invasivem Wachstum (Frühkarzinome)</b>	6	3	9
<b>Läsionen ohne invasives Wachstum (Hyperkeratose/Hyperplasie/Dysplasie)</b>	65	26	91
<b>Summe</b>	71	29	<b>100</b>

Tabelle 12: Ergebnisse zur Differenzierung zwischen prä- und frühmalignen Läsionen mittels OCT (verblindeter Bewerter 2)

### 3. Ergebnisse

	<b>Mittels OCT richtig zugeordnet</b>	<b>Mittels OCT falsch zugeordnet</b>	<b>Summe</b>
<b>Läsionen mit invasivem Wachstum (Frühkarzinome)</b>	7	2	9
<b>Läsionen ohne invasives Wachstum (Hyperkeratose/Hyperplasie/Dysplasie)</b>	64	27	91
<b>Summe</b>	71	29	<b>100</b>

Tabelle 13: Ergebnisse zur Differenzierung zwischen prä- und frühmalignen Läsionen mittels OCT (verblindeter Bewerter 3)

Für die 3 verblindeten Bewerter errechnete sich bei der Unterscheidung zwischen malignen und nicht- malignen Läsionen aus den vorliegenden Daten eine Sensitivität von 100%/66,7%/77,8% (Bewerter 1/2/3 bei lediglich 9 invasiven Läsionen). Für den verblindeten Bewerter Nr. 1 errechnete sich eine Spezifität von 75,8%. Es gab 22 falsch positive Läsionen. Für den verblindeten Bewerter Nr. 2 hingegen errechnete sich bei der Unterscheidung zwischen malignen und nicht- malignen Läsionen aus den vorliegenden Daten eine Spezifität von 71,4%. Hier gab es 26 falsch positive und 3 falsch negative Läsionen. Für Bewerter Nr. 3 errechnete sich eine Spezifität von 70,3%. Es gab 27 falsch positive Läsionen und 2 falsch negative Läsionen.

In Tabelle 14 sind nochmals zusammenfassend die erhaltenen Spezifitäten und Sensitivitäten der OCT-Auswertung vom Untersucher (also mit Kenntnis der Klinik) und den verblindeten Bewertern dargestellt.

	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>	<b>PPW</b>	<b>NPW</b>
Untersucher	88,9%	89,0%	44,4%	98,8%
Verblindeter Bewerter 1	100%	75,8%	29,0%	100%
Verblindeter Bewerter 2	66,7%	71,4%	18,8%	95,6%
Verblindeter Bewerter 3	77,8%	70,3%	20,6%	97,0%

Tabelle 14: Ergebnisse zur Differenzierung zwischen nicht- bzw. prämaligen und frühmalignen Läsionen. Sensitivität und Spezifität vom Untersucher und von den verblindeten Bewertern 1, 2 und 3.

### 3. Ergebnisse

#### 3.3 Vergleich von Epitheldicken: OCT und Histologie

In Zusammenarbeit mit dem pathologischen Institut der LMU München wurden bei 38 Patienten die Epitheldicken, die aus den OCT-Bildern ermittelt wurden (mit dem Softwareprogramm ImageJ), mit denen aus den histologischen Schnittbildern verglichen. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse dazu dargestellt. Die Läsionen, an denen die Epitheldicken ausgemessen wurden, befanden sich an verschiedensten Stellen in der Mundhöhle (n=27) und im Larynx (n=11).

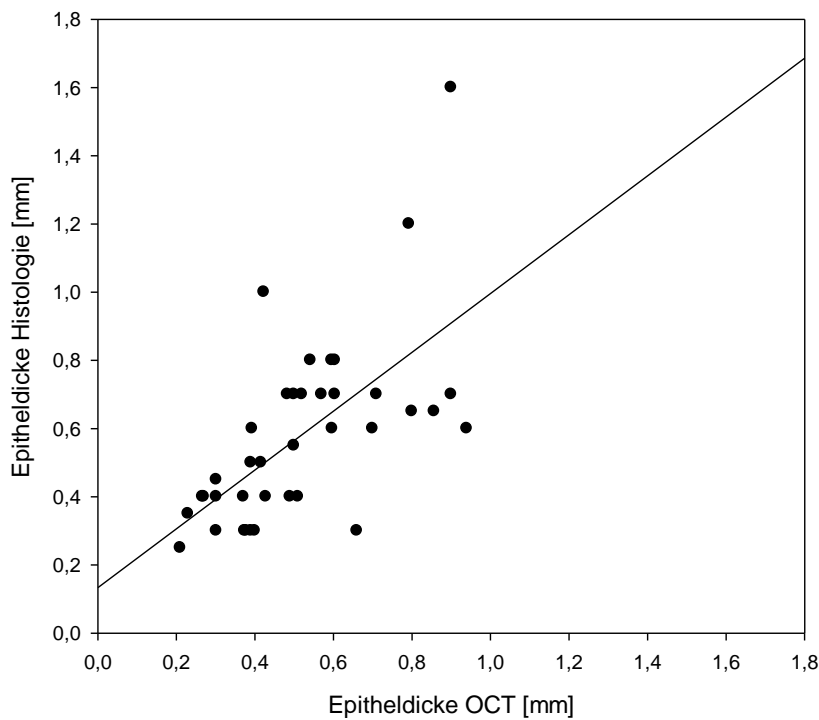


Abbildung 25: Balkendiagramm zum Vergleich der 38 mittels OCT bzw. histologisch gemessenen Epitheldicken

Aus den vorliegenden Werten berechnete sich ein Cohen's Kappa von  $\kappa=0,63$ .

#### 3.4 Retrospektive Intensitätsanalyse

Bei der Intensitätsanalyse von Normalgewebe zeigte sich eine relativ homogene Intensität im Bereich der Epithelschicht mit leichter Intensitätsabnahme von der obersten Epithelschicht in Richtung Basalmembran. Am Übergang zur Lamina propria nahm die Signalintensität dann deutlich zu (Abbildung 26, hier Zunahme der Signalintensität um ca. 50%).

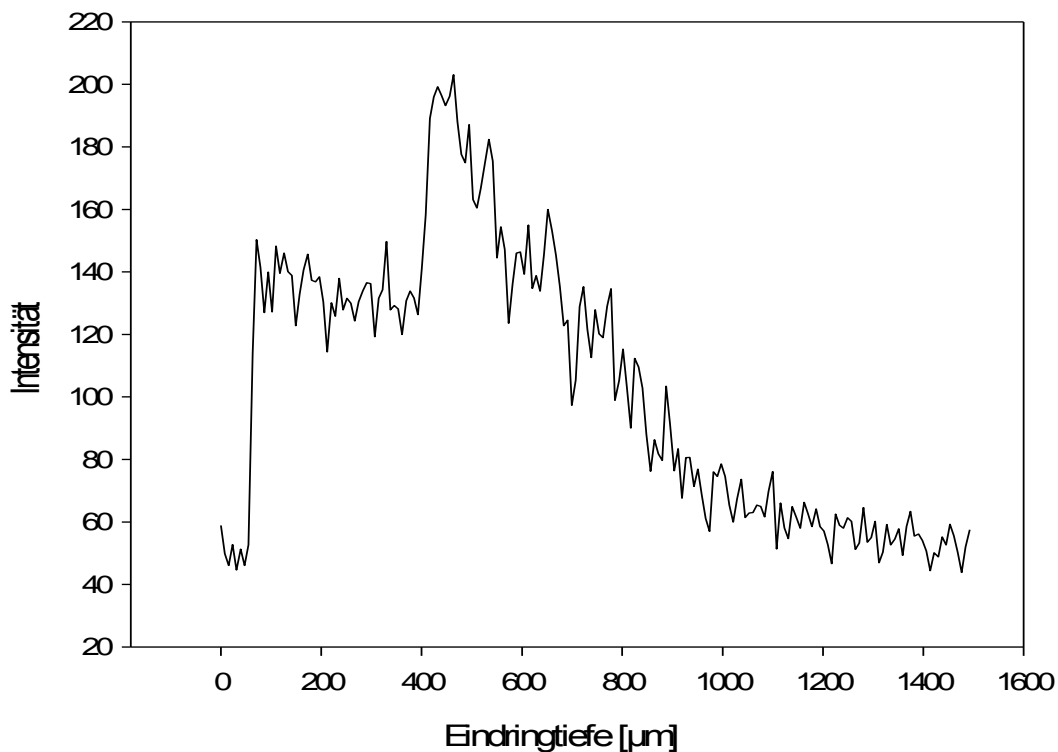


Abbildung 26: gemittelte Intensitätsprofile von Normalgewebe an Zungenrand und Wange (n=2)

Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Intensitätsanalyse der 8 richtig positiven frühinvasiven Plattenepithelkarzinome kein Intensitätssprung über den gesamten axialen Verlauf. Entgegen den Normalbefunden nahm die Intensität hier weitgehend linear ab. Die Intensitätsprofile der 8 frühinvasiven Befunde sind in Abbildung 27 dargestellt. Abbildung 28 zeigt jene 6 falsch positiven Befunde die sich histologisch schlussendlich als rein hyperplastische Läsionen herausstellten. In den Intensitätsprofilen, wie auch schon in den OCT-Bildern selbst, konnte kein eindeutiger Unterschied zu den richtig positiven Läsionen aufgezeigt werden.

### 3. Ergebnisse

---

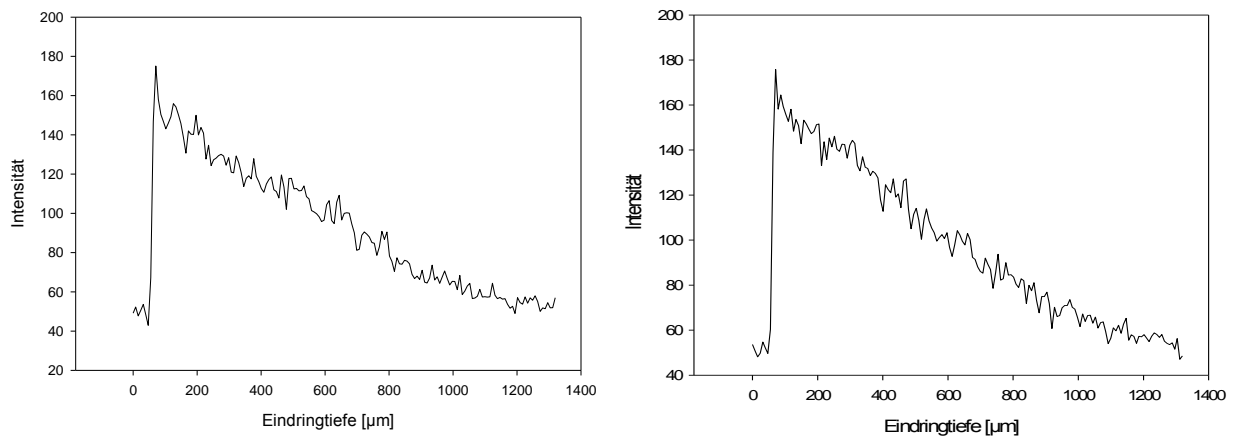


Abbildung 27, links: Intensitätsprofile von 8 frühinvasiven Läsionen

Abbildung 28, rechts: Intensitätsprofile der 6 falsch positiven Läsionen, die sich histologisch als reine Hyperplasie herausstellten

Zur Unterscheidung von Hyperplasien und dysplastischen Läsionen wurden ebenfalls Intensitäten ausgemessen und Intensitätsprofile erstellt.

In der retrospektiven Analyse der histologisch gesicherten, dysplastischen Läsionen zeigte sich in den meisten Fällen eine Intensitätsabnahme von der obersten Epithelschicht in Richtung Basalmembran. Die Lamina propria imponierte dann wiederum wie üblich als signalreiche Schicht. Bei der retrospektiven Analyse der ersten 28 Hyperplasien (ausgenommen wurden hier alle falsch positiven Läsionen) war diese Intensitätsabnahme innerhalb des Epithels zwar ebenfalls vorhanden, durchschnittlich allerdings wesentlich geringer ausgeprägt (Abbildung 29). Bei den ausgewerteten Dysplasien (n=20) zeigte sich im unteren Epithel eine Intensitätsabnahme auf durchschnittlich 61,3% (Standardabweichung=32,5%) der Intensität der obersten Epithelschicht, bei der Hyperplasie eine Abnahme auf durchschnittlich 81,1% (Standardabweichung=27,9%). Die erhöhte Intensitätsabnahme der dysplastischen Läsionen konnte mit dem Mann-Whitney U-Test als statistisch signifikant nachgewiesen werden ( $P < 0,001$ ). Gleichzeitig war bei den Dysplasien im Gegensatz zu den Hyperplasien auch ein höherer Intensitätssprung zwischen unterer Epithelschicht und Lamina propria zu verzeichnen. Die Intensitätszunahme betrug dabei im Mittel 21,0% bei Hyperplasien (Standardabweichung 11,9%) und 29,4% bei Dysplasien (Standardabweichung 18,6%) (Abbildung 30). Dieser Unterschied wurde mit dem T-Test überprüft. Er war statistisch allerdings nicht signifikant ( $P = 0,063$ ).

### 3. Ergebnisse

Bei den 28 hyperplastischen Läsionen lag in 20 Fällen eine zusätzliche Hyperkeratose vor (also in 71,4% der Fälle), bei den dysplastischen Läsionen traf dies auf 18 von 20 Läsionen zu (also in 90% der Fälle).

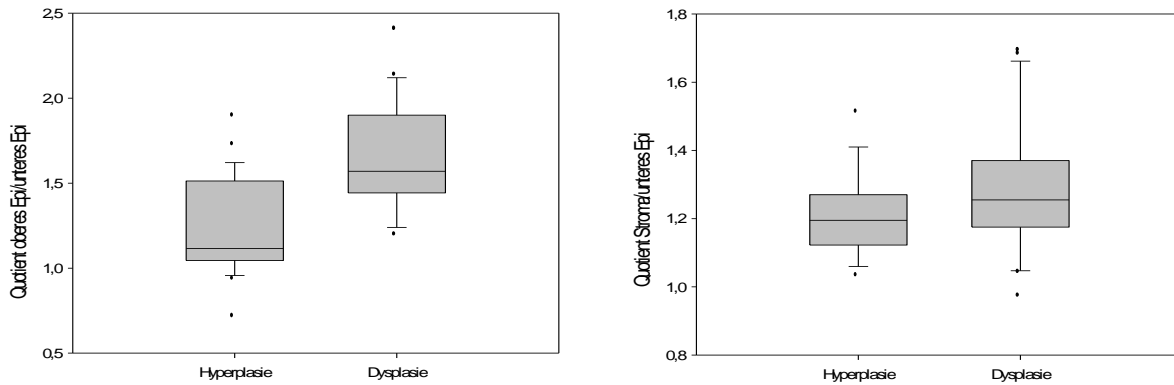


Abbildung 29, links: Die Box Plots zeigen die Quotienten aus den Intensitäten des oberen Epithels und den Intensitäten des unteren Epithels bei rein hyperplastischen (links) bzw. dysplastischen Läsionen (rechts).

Abbildung 30, rechts: Die Box Plots repräsentieren die Intensitätszunahmen vom unteren Epithel zur Lamina propria (Intensität Lamina propria/Intensität unteres Epithel) bei hyperplastischen (links) bzw. dysplastischen (rechts) Läsionen.

Schwarze Linie: Median, Box-Grenzen: 25. und 75. Perzentile, Whiskers: 10. und 90. Perzentile, Kreise: 5. und 95. Perzentile

Zur Verdeutlichung dieser Ergebnisse sind in Abbildung 31 und 32 Bilder von leukoplakischen Läsionen an der Wangenschleimhaut einer Patientin dargestellt. Die Biopsie der Läsion an der rechten Wangenschleimhaut ergab eine reine Epithelhyperplasie. Dies zeigt sich im OCT-Bild (oben) in einer homogenen Dickenzunahme des Epithels. Die Biopsie an der linken Wange ergab zusätzlich zur Hyperplasie eine geringgradige Dysplasie. Im OCT-Bild (unten) ist eine Zunahme der Epitheldicke und eine Abnahme der Signalintensität von der Epitheloberfläche in Richtung Basalmembran zu erkennen.

### 3. Ergebnisse

---

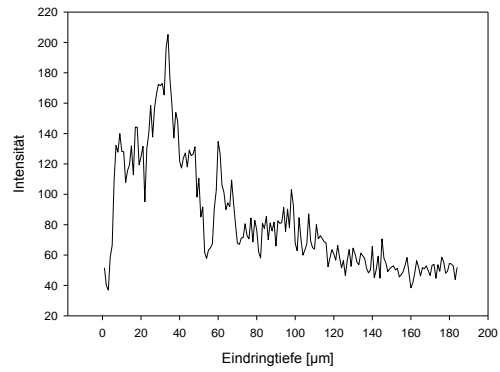
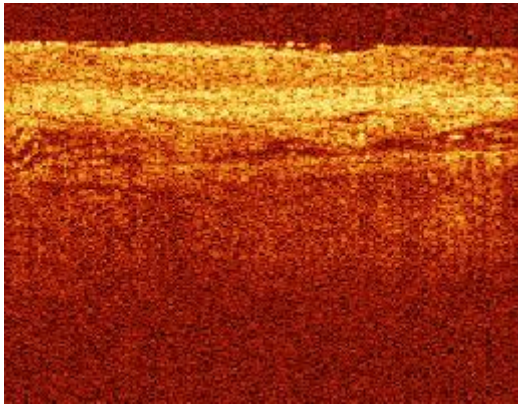


Abbildung 31: links: TD-OCT Bild einer Läsion am harten Gaumen rechts. Histologie: Hyperplasie; rechts: dazugehöriges Intensitätsprofil.

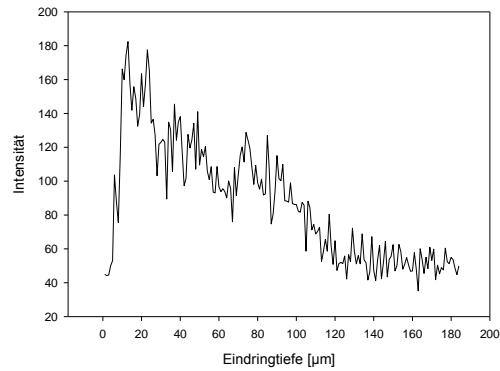
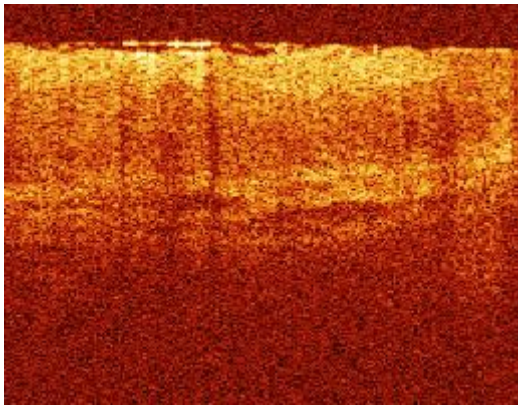


Abbildung 32: links: TD-OCT Bild einer Läsion am harten Gaumen links. Histologie: Dysplasie I und Hyperplasie; rechts: dazugehöriges Intensitätsprofil.

### 4. Diskussion

Aufgrund ihres nicht-invasiven Charakters und ihrer Fähigkeit, in-vivo Informationen über die Epithelschicht und die darunterliegende Lamina propria zu liefern, scheint die optische Kohärenztomographie in der Tumorfrühdagnostik im oberen Luft-Speiseweg und in der Verlaufskontrolle von Tumoren eine wichtige Rolle spielen zu können. Im Folgenden werden sowohl die angewandte Methode als auch die erhaltenen Ergebnisse im Kontext mit der relevanten Fachliteratur in diesem Bereich und anderen Fachbereichen diskutiert und ein Ausblick für die möglichen Einsatzgebiete und Potentiale der OCT gegeben.

#### 4.1 Material und Methoden

Vom Prinzip her erscheint die OCT geeignet für eine Differenzierung zwischen prä- und frühmalignen Läsionen sowie die Bestimmung der exakten Grenzen einer oberflächlichen Schleimhautläsion. Die durch den B-Scan erhaltenen Tiefenschnittbilder sollten die Oberflächeninformation, die durch genaue Inspektion oder optische Hilfsverfahren wie beispielsweise durch Fluoreszenzbildgebung erhalten werden kann, komplettieren. Falls die Eindringtiefe der Läsion die Penetrationstiefe der OCT-Untersuchung übersteigt, wäre der beste nächste Schritt in der Diagnostik zur Vermessung der Läsion vermutlich die Anwendung eines Hochfrequenzultraschallgerätes.

Da sich ex vivo die optischen Eigenschaften von Gewebe rasch verändern und somit eine Beurteilung erschweren, kann nur ein in vivo OCT-Gerät genügend Informationen liefern, um eine Verbesserung in der Tumorfrühdagnostik zu erreichen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie das Time Domain in vivo OCT-Gerät Niris der Firma Imalux verwendet. Verschiedene methodologische Aspekte sollen an dieser Stelle nun diskutiert werden:

- Ein großes Problem ist die technische Limitation eines TD-OCTs im Allgemeinen. Frequency Domain-OCT-Geräte haben eine höhere Bildakquisitionsrate, eine bessere laterale Auflösung und weniger Rauschen. Die niedrige Bildakquisitionsrate der TD-OCT-Geräte (0,7 Hz für das Imalux Niris System) verhindert bisher auch die dreidimensionale in vivo Bildakquisition. Derzeit werden in vivo FD-OCT-Geräte von MDL und weiteren Anbietern für die klinische Anwendung entwickelt – Publikationen aus präklinischen Studien scheinen vielversprechend zu sein. In Bälde wird beispielsweise ein in vivo FD-OCT-Gerät der Firma MDL mit einer Bildakquisitionsrate von bis zu 40 Hz und einer Auflösung von 7  $\mu\text{m}$  erwartet. Aus diesem Grund liegt die Zukunft wohl bei den FD-OCT-Geräten.



- Des Weiteren liefert die OCT-Untersuchung keine absoluten Werte für Distanzen innerhalb des Bildes, da Areale mit verschiedenen Brechungsindices zu räumlicher Distorsion führen können. An einer kleinen Anzahl von Patienten (n=38), bei denen die Epitheldicke aus den OCT-Bildern errechnet wurde (mit dem Softwareprogramm ImageJ (Freeware, Wayne Rasband, US National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA)), korrelierte diese jedoch ziemlich gut ( $\kappa=0,63$ ) mit der aus den Gewebeschnitten erhaltenen Epitheldicke. Histologische Schnittbilder, bei denen das Epithel offensichtlich nicht orthograd angeschnitten war, wurden ausgeschlossen.
- Zusätzlich zu den technischen Limitationen eines TD-OCT-Gerätes stellte sich auch das Handling teilweise als problematisch heraus. Nicht jede Leukoplakie konnte mittels OCT gut untersucht werden, da es z.B. bei subglottischen Läsionen nicht möglich war die OCT-Sonde, die für die Untersuchung durch ein starres Endoskop geführt wurde, artgerecht und orthograd auf die Läsion aufzusetzen. Auch die Untersuchung der vorderen Kommissur im Larynx erwies sich als problematisch und verursachte potentiell auch den einzigen falsch negativen Befund in der unverblindeten Auswertung, da die Läsion extrem schwer erreicht werden konnte und somit ggf. nicht suffizient abgescannt werden konnte. Aufgrund unseres experimentellen Setups musste die laryngeale OCT-Untersuchung immer unter Vollnarkose im Zuge einer diagnostischen Panendoskopie stattfinden, da das System nur durch ein starres Endoskop direkt auf die Läsion aufgesetzt werden konnte. Das scheint für eine klinische Studie gut genug zu sein. In den letzten Jahren gab es neue technische Weiterentwicklungen für ambulant einsetzbare OCT-Geräte. Eine Möglichkeit scheint die Integration eines OCT-Systems, welches nicht direkt Kontakt zur Läsion haben muss, in ein starres, indirektes Laryngoskop [60] zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass eine ambulante Bildakquisition auf diese Weise möglich ist- allerdings stellt es (insbesondere aufgrund der Bewegungsartefakte) eine große Herausforderung dar, was die Bildlokalisierung betrifft. Eine zweite Möglichkeit wäre die direkte Platzierung einer flexiblen OCT-Sonde unter Lokalanästhesie. Dies könnte sowohl transoral (kontrolliert durch ein 90° starres Endoskop) [63] als auch transnasal (an ein flexibles Endoskop angeschlossen) [72] erfolgen.
- Bei dieser Studie besteht die Möglichkeit einer fehlerhaften Ko-Korrelation, d.h. die OCT-Daten werden nicht an derselben Stelle erhoben, an denen im Anschluss die Gewebeprobe entnommen wird. Um diesen Fehler zu minimieren wurde in der vorliegenden Studie die Lokalisation der Läsion genau in einen Dokumentationsbogen

eingetragen und meist unmittelbar im Anschluss an die OCT-Untersuchung die Gewebeprobe entnommen.

- Die Beurteilung der OCT-Untersuchung ist immer subjektiv. Aus diesem Grund kann potentiell ein systematischer Fehler auftreten. Dieses Problem wurde durch eine enge Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut (Pathologisches Institut der LMU München, PD Dr. Stephan Ihrler) versucht zu minimieren. Dazu wurden jeweils OCT-Bilder und histologische Schnittbilder einer Läsion gemeinsam betrachtet und diskutiert. Außerdem wurden die Läsionen aus der prospektiven diagnostischen Studie zusätzlich von drei verblindeten Bewertern, einer Mitarbeiterin und Ärztin der Firma Imalux, deren studentischer Mitarbeiterin und einem HNO-Arzt mit großer OCT-Erfahrung im Kopf-Hals-Bereich beurteilt.
- Des Weiteren scheint die Beschaffenheit mancher Läsion ein Problem in der Diagnostik mittels OCT darzustellen. So können 1) stark hyperkeratotische Läsionen zu einer erhöhten Reflexion von Licht an der Oberfläche führen und damit eine Beurteilung der tieferen Epithelschichten erschweren, 2) stark hyperplastische Läsionen in ihrem Ausmaß die Eindringtiefe der OCT überschreiten und somit den Eindruck erwecken, dass die Basalmembran nicht mehr erhalten wäre, 3) submukös wachsende Karzinome, welche vom Epithel ausgehend in die Tiefe wachsen und sich dort unterhalb des Epithels und damit in einer Tiefe, die der OCT-Untersuchung nicht mehr zugänglich ist ausbreiten, eine richtige Abgrenzung des Tumorgewebes vom Normalgewebe unmöglich machen und zu falsch negativen Ergebnissen führen, 4) schwierig zugängliche Läsionen sowohl zu falsch negativen als auch zu falsch positiven Ergebnissen führen und 5) Ulcera, bei welchen per definitionem eine Läsion der Basalmembran besteht, zu falsch positiven Läsionen führen.
- Last but not least ist die Validität der Intensitätsanalyse kritisch zu beleuchten, da immer nur bestimmte Ausschnitte des gesamten OCT-Bildes beurteilt werden konnten. Dabei wurde jeweils ein möglichst repräsentativ für das jeweilige OCT-Bild aussehender Abschnitt herangezogen. An einem OCT-Bild wurde daher überprüft, ob es große Schwankungen innerhalb des Bildes gab – das Bild wurde in 6 vertikale Säulen unterteilt, in denen jeweils 4 Regions of interest festgelegt wurden. Die Intensitätsabnahme übers Epithel und die Intensitätszunahme vom Epithel zum Stroma wurden dann miteinander verglichen. Die Werte waren dabei nur unwesentlich unterschiedlich und aus diesem Grund ist es wohl gerechtfertigt sich bei der

Intensitätsanalyse auf lediglich einen visuell repräsentativ erscheinenden Abschnitt zu beschränken.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Zukunft der klinischen Anwendung von OCT-Geräten wohl bei den FD-OCT-Geräten liegt. Wie bereits erwähnt, wird gerade in diesem Bereich intensiv geforscht. In Bälde werden kommerziell verfügbare in vivo FD-OCT-Geräte der Fa. Imalux, MDL und von weiteren Anbietern erwartet. Neuere Bemühungen schließen auch die Inkorporation von FD-OCT-Systemen in ein starres Laryngoskop [73] oder in ein chirurgisches Mikroskop [74] mit ein, welche sich derzeit in der klinischen Erprobung befinden.

### 4.2 Ergebnisse

Abgesehen von der relativ geringen lateralen Auflösung (laut Herstellerangaben schlechter als 20  $\mu\text{m}$ ) war die Bildqualität in der klinischen Studie sehr konstant. Auf den Bildern war es möglich, die Keratinschicht, die Epithelschicht und die Lamina propria gut zu differenzieren; die Basalmembran konnte meist anhand einer klar definierten Grenze zwischen Epithelschicht und Lamina propria lokalisiert werden.

Beim Screening der Mundhöhle an 52 gesunden Probanden konnte gezeigt werden, dass es eine große physiologische Variabilität an Epitheldicken an verschiedenen intraoralen Lokalisationen gibt, und dass auch die interindividuelle Variabilität an Epitheldicken beträchtlich ist. Die geringsten mittleren Epitheldicken lagen am Mundboden und an der Zungenunterseite vor, die höchsten Epitheldicken hingegen am Zungenrand und am Zungenrücken. Dies muss bei der Beurteilung von OCT-Bildern von den verschiedenen Bereichen der Mundhöhle berücksichtigt werden. So kann eine Epitheldicke von 300  $\mu\text{m}$  an der Wangenschleimhaut durchaus als normal betrachtet werden, wohingegen dieselbe Epitheldicke am Mundboden schon verdächtig für eine Schleimhautveränderung ist (z.B. Hyperplasie oder Dysplasie). Die Messungen der Epitheldicke bei den dysplastischen Läsionen ergab nämlich eine Epitheldickenzunahme auf das 1,4 bis 5,7fache von Normalgewebe, allerdings unabhängig vom Grad der Dysplasie. Eine große interindividuelle Variabilität, wie sie an der Lippe und am Zungenrand gefunden wurde, erschwert die OCT-Beurteilung von Bildern aus diesen Regionen erheblich und deshalb müssen die Bilder immer im Zusammenhang mit dem Normalgewebe desselben Individuums betrachtet werden. Diese ausgeprägte Variabilität scheint im Larynx nicht vorhanden zu sein. So beschrieb Arens et al. 2007 [46] an einer Studie an 206 benignen und malignen Läsionen an den Stimmlippen eine mittlere Epitheldicke von 147  $\mu\text{m}$ . Diese Epitheldicke nahm bei der Dysplasie Grad I auf 258

µm, bei der Dysplasie Grad II auf 301 µm, beim CIS auf 445 µm und beim frühinvasiven Karzinom sogar auf 974 µm zu. Dies ist also eine kontinuierliche Zunahme der Epitheldicke vom Normalgewebe über die verschiedenen Grade der Dysplasie bis zum Karzinom. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen die Wichtigkeit, die normale Epitheldicke für verschiedene Läsionen zu kennen und die Epitheldicke im Verlauf immer wieder zu bestimmen. Allein durch die Bestimmung der Epitheldicke kann also schon eine gewisse Aussage über die Pathologie einer Läsion gemacht werden kann.

### 4.2.1 Ergebnisse aus der prospektiven klinischen Studie

In der prospektiven klinischen Studie von 100 primären Leukoplakien oder Erythroplakien des oberen Luft-Speiseweges konnten acht der neun mikroinvasiven Plattenepithelkarzinome durch einen Verlust der regulären Gewebsschichtung und damit einem möglichen Durchbruch der Basalmembran korrekterweise als solche identifiziert werden. Von den verbleibenden 91 nicht- oder prä malignen Läsionen wurden 81 als solche erkannt – es gab 10 falsch positive Befunde (es wurde fälschlicherweise ein PEC vermutet). Für die Differenzierung zwischen benignen/präkanzerösen und frühinvasiven Läsionen konnte hieraus eine Spezifität von 89,01% errechnet werden. Bei der Mehrzahl der falsch positiven Läsionen (6 von 10) handelte es sich um epitheliale Hyperplasien mit einer zusätzlichen Hyperkeratose (5 von 6). Dies kann folgenderweise erklärt werden:

- 1) An der Keratinschicht wird Licht stark reflektiert (deshalb die helle Farbe), was dann wiederum dazu führt, dass weniger Licht in die tieferen Gewebsschichten vordringen kann und eine verlässliche Beurteilung derselben erschwert, da die Informationen aus den tieferen Schichten vermindert sind.
- 2) Epitheliale Hyperplasien können Ausmaße annehmen, die über die Eindringtiefe der OCT hinausreichen. Zusätzlich gibt es eine Sonderform der Hyperplasie: die papilläre Hyperplasie. Dabei wächst das Epithel zapfenförmig in die Tiefe ohne jedoch die Basalmembran zu durchdringen oder andere Malignitätszeichen aufzuweisen. Dadurch entsteht in der OCT der Eindruck, dass die horizontale Schichtung des Gewebes aufgehoben ist.

Die Bewertung der OCT-Bilder der 100 Läsionen durch drei verblindete Bewerter ergab für die Differenzierung zwischen benignen/präkanzerösen und frühinvasiven Läsionen durch Bewerter 1 eine Sensitivität von 100% (bei lediglich 9 invasiven Läsionen) und eine Spezifität von 75,8%, für Bewerter 2 eine Sensitivität von 66,7% und eine Spezifität von 71,4%, für Bewerter 3 eine Sensitivität von 77,8% und eine Spezifität von 70,3%. Die errechneten Daten

lassen darauf schließen, dass sich vor allem die Spezifität mit zunehmender Erfahrung, sowohl mit dem OCT-Gerät als auch mit der Thematik von Mundhöhlen- und Kehlkopfkrebs im Allgemeinen, wesentlich verbessern lässt. Dennoch ist die Spezifität, ohne Kenntnis der Klinik des Patienten relativ schlecht und es gab viele falsch positive Befunde. Diese Ergebnisse zeigen erneut, dass die OCT als Ergänzung zur klinischen Untersuchung sehr hilfreich sein kann, dass sie als alleiniges Diagnostikum allerdings keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern kann. Eine genaue Voraussage der Pathologie mittels OCT gestaltet sich als schwierig. So lässt sich in der Mundhöhle und im Pharynx, wie bereits weiter oben beschrieben, keine kontinuierliche Dickenzunahme des Epithels vom Normalgewebe über die verschiedenen Grade der Dysplasie bis zum Karzinom feststellen. Dadurch fällt die Abgrenzung zwischen benignen Läsionen wie Hyperplasien und prämaligen Dysplasien sehr schwer. Es gibt dennoch einige Kriterien (weiter unten beschrieben) die bei dieser Differenzierung Hilfestellung geben können. Auch ist die Beurteilung ohne genaue Kenntnis des Patienten und dessen Krankengeschichte schwierig, da verschiedenste Erkrankungen und Noxen generell zu einer Veränderung der Mukosa führen, welche man nur beurteilen und quantifizieren kann, wenn mehrere Abschnitte der Schleimhaut untersucht werden.

### **4.2.2 Ergebnisse der Intensitätsanalyse**

Eine Differenzierung zwischen Hyperplasien und präkanzerösen Dysplasien war alleine anhand der OCT-Bilder oft sehr schwierig, war aber auch nicht primäres Ziel dieser Studie. In der retrospektiven Intensitätsanalyse der OCT-Bilder mit dem Softwareprogramm ImageJ (Freeware, Wayne Rasband, US National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) konnte jedoch eine statistisch signifikant erhöhte Intensitätsabnahme über das Epithel in Richtung Basalmembran bei den dysplastischen im Vergleich zu den hyperplastischen Läsionen festgestellt werden. Bei den Dysplasien war im unteren Epithel noch durchschnittlich 61,3% der Ursprungsintensität vom oberen Epithel erhalten, bei den Hyperplasien waren es noch 81,1%. Diese erhöhte Intensitätsabnahme über den axialen Verlauf des Epithels bei Dysplasien könnte folgendermaßen erklärt werden: 1.) Bei dysplastischen Läsionen ist ausgehend von der Basalmembran eine Auflockerung des Epithels zu beobachten, da es nicht mehr zu einer regulären Ausreifung kommt. Dies könnte in der unteren Epithelschicht zu einer verminderten Intensität führen. Da die Ausreifung in der oberen Epithelschicht noch vorhanden ist, besteht also ein erhöhter Intensitätsunterschied. 2.) Des Weiteren könnte zur erhöhten Intensitätsabnahme bei Dysplasien auch eine hier häufiger vorliegende Hyperkeratose beitragen. Bei Dysplasien lag in 90,0% eine Hyperkeratose vor,

während dies bei den rein hyperplastischen Läsionen nur in 71,4% der Fall war. Allein durch eine der beiden Theorien lässt sich der Unterschied allerdings nicht zufriedenstellend erklären. Wahrscheinlich liegt eine Kombination von beidem vor. Die Tatsache, dass es bei den dysplastischen Läsionen zu einem größeren Intensitätssprung zwischen Epithel und Stroma kommt, lässt vermuten, dass die 1. Theorie wohl eine größere Rolle spielen könnte, da der Einfluss einer vorliegenden Hyperkeratose sowohl auf die Intensität der unteren Epithelschicht als auch auf jene des Stromas ungefähr gleich groß sein dürfte und deshalb nicht mehr berücksichtigt werden muss. Inwieweit sich diese Ergebnisse bestätigen lassen, wird sich bei Analysen von einer größeren Anzahl von Läsionen herausstellen.

Auch am Übergang zwischen Epithel und Lamina propria zeigte sich ein Unterschied im Intensitätssprung. Bei den Hyperplasien kam es zu einer Intensitätszunahme von durchschnittlich 21,0%, bei den Dysplasien um 29,4%. Diese Intensitätsanalyse könnte in Zukunft eine Beurteilung fraglicher OCT-Bilder erleichtern, sie wurde bisher allerdings nur an einer kleinen Anzahl von Bildern und Läsionen durchgeführt und es muss sich noch zeigen, wie groß ihr Wert ist. Des Weiteren wurde bei der Intensitätsanalyse weder der Grad der Dysplasie noch eine zusätzlich vorliegende akute oder chronische Entzündung des Epithels oder eine vorliegende Hyperkeratose berücksichtigt, wenngleich sie die optischen Eigenschaften des untersuchten Gewebes durchaus beeinflussen und verändern können.

In Zukunft könnte dieses Problem der Differenzierung zwischen Hyperplasien und Dysplasien möglicherweise durch Verbesserungen in der OCT-Hardware und -Software (z.B. über eine Berechnung der optischen Eigenschaften des Gewebes aus den Rohdaten) angegangen werden. So zeigen z.B. die Ergebnisse einer ex-vivo Studie an Gewebeproben von oralem Tumorgewebe [75,76], dass— abgesehen von der Epitheldicke— die exponentielle Abfallskonstante des OCT-Signals entlang der Tiefe (welche in Richtung Dysplasie und PEC abnimmt) und die Standardabweichung der OCT-Signal Intensitäts-Schwankungen (welches in Richtung PEC zunimmt) effektive Indikatoren für die Diagnose von malignen Schleimhautläsionen sein könnten. Bei der graphischen Darstellung der Intensitätsprofile von Normalgewebe im Vergleich zu Tumorgewebe konnten auch in unserer Studie deutliche Unterschiede erkannt werden. So kommt es beim Normalgewebe zu einer geringen Intensitätsabnahme über das Epithel und zu einer großen Intensitätszunahme am Übergang zwischen Epithel und Lamina propria. Anschließend kommt es zu einem mehr oder weniger linearen Intensitätsabfall, der dann in einer Tiefe von ca. 2 mm den Endpunkt erreicht hat (maximale Eindringtiefe). Bei Tumorgewebe hingegen kommt es von der obersten Epithelschicht angefangen zu einer optisch linearen Intensitätsabnahme. Beim Vergleich der

#### 4. Diskussion

---

Intensitätsprofile von Tumorgewebe und falsch positiven Läsionen konnte graphisch allerdings kein Unterschied festgestellt werden. Der Ansatz, anhand des Intensitätsprofils Pathologien unterscheiden zu können, erscheint jedoch trotzdem sehr wichtig. Auf diese oder ähnliche Weise könnte es gegebenenfalls gelingen, objektive Beurteilungskriterien für OCT-Bilder zu generieren.

Eine ähnliche objektive Beurteilung von OCT-Bildern wollte auch Lingley-Papadopoulos et al. [77] im urologischen Fachgebiet ermöglichen. Dazu wurde ein Algorithmus zur computergestützten Gewebeanalyse von OCT-Bildern entwickelt. Hierfür wurden zuerst verschiedene Gewebeparameter erhoben und anschließend jene, welche nicht zu einer Unterscheidung zwischen invasiven- und nicht-invasiven Gewebe beitragen konnten, ausgeschlossen. Der Algorithmus, der anhand eines Trainingssets entwickelt wurde, wurde auf 182 OCT-Bilder angewendet und die Ergebnisse anschließend mit dem histopathologischen Befund verglichen. Auf diese Weise war es möglich, mit einer Sensitivität von 92% und einer Spezifität von 62% zwischen benigner und maligner Blasenschleimhaut zu unterscheiden. Diese Ergebnisse sind vielversprechend- vielleicht ist es mit der technischen Weiterentwicklung möglich, eine objektivere Beurteilung der OCT-Bilder zu erhalten, als es derzeit möglich ist. In einer weiteren Publikation [78] verglichen die Autoren 2 verschiedene Algorithmen zur automatischen Detektion von Blasenkarzinomen. Dabei wurden OCT-Bilder, die mit 2 Geräten unterschiedlicher Wellenlänge gemacht wurden (Wellenlänge 980 nm, 196 Bilder; Wellenlänge 1310 nm, 96 Bilder) anhand der genannten Algorithmen beurteilt. Die Algorithmen wurden an einem Trainingsdaten-Set entwickelt, dessen Bilder vom OCT-Gerät mit der zentralen Wellenlänge von 980 nm stammten. Einer dieser Algorithmen berücksichtigte dabei nicht die Unterschiede der verschiedenen OCT-Systeme und konnte jene Blasenkarzinome die mit dem OCT-Gerät mit 980 nm zentraler Wellenlänge untersucht wurden, mit einer Sensitivität 73% von und einer Spezifität von 69% erkennen – die Bilder, die vom 1310 nm OCT-Gerät stammten wurden jedoch alle, ohne Ausnahme, als Karzinome erkannt. Mit dem zweiten Algorithmus, der die Differenzen zwischen den verschiedenen OCT-Systemen berücksichtigte, konnte eine Sensitivität von 87% und eine Spezifität von 58% erreicht werden. Dies sind vielversprechende Ergebnisse- dennoch ist es lt. Autoren mit diesem Algorithmus noch nicht möglich, alle gerätespezifischen Eigenschaften aus den Bildern herauszufiltern.

### 4.3 Vergleich unserer Ergebnisse mit anderen Publikationen

Auch wenn die bisherigen Patientenzahlen in vorliegender Studie noch gering sind, scheint die OCT für die Differenzierung zwischen prämaligen und frühinvasiven Läsionen des oberen Luft- Speiseweges geeignet zu sein. Sie kann der besseren Führung einer Biopsieentnahme dienen- dies ist vor allem bei großen Läsionen oder rezidivierenden Leukoplakien von großer Hilfe. Intraoperativ kann sie zur Festlegung der lateralen Tumorgrenzen dienen, allerdings erlaubt sie keine Beurteilung der Eindringtiefe eines Tumors (außer dessen Eindringtiefe beträgt  $<2$  mm). Der größte Nutzen für die Klinik liegt wahrscheinlich in der Führung der Gewebeentnahmen- mittels OCT kann innerhalb einer großen Läsion jene Stelle gefunden werden, an welcher am ehesten invasives Wachstum vorliegt- auf diese Weise könnten falsch negative Biopsien deutlich reduziert werden.

Die vorliegenden Studienergebnisse korrelieren gut mit den Ergebnissen anderer klinischer OCT-Studien, die in den letzten Jahren durchgeführt wurden [56,58,64,70,79-81].

Zusätzlich zur Hilfestellung bei der Wahl der optimalen Biopsiestelle könnte die OCT ebenso für die Festlegung der exakten Tumorgrenzen geeignet sein, und damit ein dreidimensionales Mapping von Schleimhautläsionen (wie von Hanna et al. auf der Basis von OCT-Studien am Tiermodell vorgeschlagen [82]) ermöglichen. Des Weiteren könnte sie zur Verlaufskontrolle von persistierenden, nicht-malignen Schleimhautläsionen eingesetzt werden; dies wurde bisher allerdings noch in keiner Studie ausreichend gezeigt.

Eine weitere Schwierigkeit stellen in dieser Studie die bisher fehlenden Standards, nach denen eine Beurteilung von OCT-Bildern erfolgen sollte, dar. Da mehr und mehr Publikationen mit z. T. exzellentem Bildmaterial veröffentlicht werden, sollte dieses Problem ebenfalls in naher Zukunft überholt sein.

Nachdem die optische Kohärenztomographie ein neues bildgebendes Verfahren darstellt, kann man relevante Publikationen von klinischen Studien zu dieser bildgebenden diagnostischen Methode im OADT nur bis 1997 zurückverfolgen. Es wurden einige in vitro Studien an oraler Schleimhaut durchgeführt und publiziert. In drei kleineren, deskriptiven Studien an Larynxschleimhaut von Schweinen [63] oder Menschen [54,59] mit einem TD-OCT, konnten die Autoren die normale Schichtung gesunder Schleimhaut beschreiben (Epithelschicht, Lamina propria), welche gut mit dem histopathologischen Schnittbild korrelierte. In drei weiteren Studien wurden artifizielle Veränderungen an einer ex-vivo Schleimhaut des OADT mittels TD-OCT adäquat entdeckt und beobachtet: einmal verursacht durch submuköse Kollagen/NaCl-Injektion [83], des Weiteren durch chemisch induzierte



#### 4. Diskussion

---

Traumata [84] oder durch CO<sub>2</sub>-Laser induzierte thermale Verletzung/Ablation [85]. Laut Autoren bilden diese Beobachtungen die Basis für weitere Nachforschungen an endogenen, pathologischen Schleimhautveränderungen (wie Dysplasie und PEC), da sie das Ausmaß der Gewebsschädigung gut aufzeigen konnten.

In den letzten Jahren hat eine Forschungsgruppe der Universität von Kalifornien Irvine, Kalifornien, USA mehrere interessante präklinische OCT-Studien an einem Hamsterbacken-Modell publiziert. Durch regelmäßige Applikation von DMBA (9,10 Dimethyl-1,2-Benzanthracene) war es möglich, dysplastische Leukoplakien (in 3-5 Wochen) und PECs (in 8-12 Wochen) mit histologischen Merkmalen, die denen oraler Schleimhaut äußerst ähnlich sind, zu generieren. In der ersten Publikation von Wilder-Smith et al. von 2005 [86] wurden TD-OCT-Untersuchungen (und Untersuchungen mit weiteren optischen Techniken) an insgesamt 120 Tieren in verschiedenen Krankheitsstadien durchgeführt und jeweils mit dem histologischen HE-gefärbten Tiefenschnittbild verglichen. Die Autoren fanden einen statistischen kappa-Wert von 0,77 für die Übereinstimmung der OCT-Diagnose des Untersuchers mit der exakten Histopathologie (die Bewertung reichte von 0=gesund bis 6=PEC) und kamen zur Schlussfolgerung, dass die OCT eine „vielversprechende, nicht-invasive diagnostische Methode für orale Dysplasie und Malignität“ sei. Sie führten dieses Thema in der folgenden Publikation von 2006 [82] weiter, wo sie zeigten, dass sie dreidimensionale OCT-Bilder von Plattenepithelkarzinomen im Tiermodell erstellen konnten, welche es erlaubten, die Ausdehnung und die genauen Grenzen der Tumoren darzustellen. Wegen der bisherigen technischen Limitierungen (vor allem wegen der niedrigen Bildakquisitionsraten), die auch in unserer OCT-Studie beobachtet wurden, konnte die dreidimensionale Bildgebung bisher noch in keiner klinischen Studie an Menschen reproduziert werden. Mit den rasanten technischen Fortschritten in diesem Bereich scheint dies allerdings nur noch eine Frage der Zeit zu sein, bis dies möglich sein wird. Erst dann ist es wirklich treffend, über die OCT als eine Technik für „Optisches Mapping“ von Schleimhautläsionen zu sprechen. Derzeit kann sie bloß als ein diagnostisches Hilfsmittel betrachtet werden.

Seit die OCT klinisch eingesetzt wird scheint der OADT, abgesehen von der Ophthalmologie, von besonderem Interesse für die wissenschaftliche Welt gewesen zu sein. Das könnte z.T. dadurch erklärt werden, dass es wenige diagnostische Möglichkeiten zur Detektion von (prä)kanzerösen Läsionen in diesem Bereich gibt. Zusätzlich ist der obere Luft-Speiseweg sehr gut zugänglich für den Einsatz der OCT im Zuge von klinischen Studien (für die meisten Lokalisationen ist keine Anästhesie für die OCT-Untersuchung mit anschließender

Biopsieentnahme notwendig). Zusätzlich erleichtert die Tatsache, dass es sich im oberen Luft-Speiseweg um nicht keratinisierte Schleimhaut handelt, die Beurteilung von OCT-Bildern, da an der äußeren Haut mit ihrer Keratinschicht viel Licht reflektiert wird und weniger Licht in die tieferen Gewebsschichten eindringen kann um von dort Informationen zu liefern.

Die wichtigsten bisher publizierten, klinischen Studien zum Einsatz der OCT in der Hals-Nasen- Ohrenheilkunde (und deren Beziehung zu unserer eigenen Arbeit) werden im Folgenden präsentiert:

- Viele frühe Studien zur klinischen Anwendung der OCT stammen aus Russland und zwar von einer Gruppe von Forschern, die sich auch mit der Geräteentwicklung auseinandersetzten (Institute of Applied Physics of RAS in Nizhny Novgorod). Schon 1997 publizierte Sergeev et al. [55] aus Russland die erste klinische in vivo OCT-Studie an menschlicher Schleimhaut. Es wurde eine endoskopisch geführte OCT-Sonde zur Darstellung der Schleimhäute von Respirations- (Larynx), Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt verwendet. Dabei wurde sowohl gesunde als auch tumoröse Schleimhaut untersucht. Die Autoren beobachteten „eine Aufhebung der normalen Gewebsschichtung im Tumorgewebe“ und hielten die OCT für eine vielversprechende Technik in der „Frühdiagnostik von Tumoren und in der Führung von präzisen Biopsieentnahmen“.
- 2001 haben Shakov et al. in Russland [79] eine deskriptive Studie an 26 Patienten publiziert. Dabei wurde die OCT bei Patienten mit Carcinoma in situ oder T1 und T2 Tumoren des Larynx eingesetzt. Zudem wurden zahlreiche Bilder von gesunder Larynxschleimhaut gemacht. Die Autoren beschreiben, dass es mittels OCT möglich wäre, die Tumorgrenzen genau festzulegen. Laut Autoren ist „die im OCT sichtbare Schichtung des Gewebes ein Kriterium für einen gesunden Larynx. Die Auflösung dieser Schichtung hingegen ist Zeichen pathologischer Gewebsalteration“. Des Weiteren wurde auch schon beschrieben, dass die OCT dazu dienen kann, eine invasive Gewebeentnahme zu dirigieren und zu steuern. Diese Beobachtungen bilden die Grundlage für die heutige Interpretation von OCT-Bildern.
- Eine größere Anzahl von OCT-Untersuchungen an oraler Schleimhaut wurde erneut aus Russland berichtet. 2004 publizierte Fomina et al. [80,81] eine klinische Studie, in der 43 Patienten mit 56 Schleimhautläsionen im Bereich der Mundhöhle untersucht wurden. Die Autoren berichten, dass sie mit einer Sensitivität von 83% und einer Spezifität von 98% (was ziemlich gut mit unseren eigenen Beobachtungen übereinstimmt) maligne von nicht maligner Schleimhaut unterscheiden konnten.

Zudem zeigten sie zahlreiche Beispiele von normaler oder von verschiedensten pathologischen Zuständen oraler Mukosa.

- Vier weitere relevante Publikationen von in-vivo OCT-Untersuchungen an oraler Schleimhaut stammen von einer Kopf und Hals OCT-Forschungsgruppe an der Universität von Kalifornien Irvine, Kalifornien, USA, von der bereits weiter oben berichtet wurde.

In der von Wong et al. 2005 [64] publizierten Studie wurden 82 Patienten mit verschiedensten Pathologien im Bereich des Larynx während einer diagnostischen Panendoskopie endoskopisch mittels TD-OCT untersucht. Bei der von Ridgway et al. 2006 [56] publizierten Studie hingegen wurden benigne und maligne Schleimhautveränderungen der Mundhöhle und des Pharynx an 41 Patienten untersucht. Die optischen Biopsien wurden dann mit der klinischen und histopathologischen Diagnose korreliert. Die Autoren beschreiben jeweils, dass es die OCT ermöglichte, „mikroanatomische Informationen über die Epithelschicht, die Integrität der Basalmembran und über die Lamina propria“ zu erhalten und dass es möglich war, „benigne Prozesse, prä maligne Läsionen und maligne Läsionen voneinander zu unterscheiden“. Bei benignen und prä malignen Prozessen (wie z.B. Hyperkeratose, geringgradige Dysplasie, chronische Entzündung) beobachteten die Autoren Veränderungen in der Signalintensität und in der Dicke des Epithels. Bei frühinvasiven Karzinomen konnte eine zusätzliche Aufhebung der Gewebestruktur und ein Fehlen der Basalmembran beobachtet werden. Zudem wurden mittels OCT die Epitheldicken verschiedenster laryngealer Strukturen an gesundem Gewebe ausgemessen. Die mittlere Epitheldicke (errechnet aus Werten von n=46 Patienten) an den Stimmlippen ergab dabei  $129\pm 58\ \mu\text{m}$ , jene an den Taschenfalten (errechnet aus Werten von n=25 Patienten)  $124\pm 47\ \mu\text{m}$ . Es zeigte sich jedoch, wie auch bei unseren Messungen der Epitheldicke an verschiedenen Lokalisationen in der Mundhöhle, eine große Variabilität der gemessenen Dicken an den verschiedenen Lokalisationen und zudem eine große interindividuelle Variabilität. Die geringste mittlere Epitheldicke, errechnet aus Daten von 15 Patienten, wurde an der Subglottis gefunden ( $98\pm 44\ \mu\text{m}$ ), die höchste mittlere Epitheldicke hingegen an der lingualen Epiglottis (n=4 Patienten, Epitheldicke:  $271\pm 26\ \mu\text{m}$ ). Als wichtigste Beobachtung dieser Studien betrachten die Autoren den „durchgehenden Nachweis einer klaren Abgrenzung zwischen Epithel und Lamina propria in allen benignen und prä malignen Veränderungen des Larynx bzw. der Mundhöhle und des Pharynx“. Deshalb würde, laut Autoren, der größte

Nutzen der OCT darin liegen, bereits eine „geringgradige Störung in der Integrität der Basalmembran zu identifizieren“, da diese invasives Wachstum definiert. Diese beiden Studien zeigen eine Vielzahl an OCT-Bildern verschiedenster Pathologien des Larynx bzw. der Mundhöhle und des Pharynx, allerdings ohne relevante statistische Daten zu liefern.

Bei einer dritten von dieser Forschungsgruppe publizierten Studie von Armstrong et al. 2006 [58] wurden 26 TD-OCT-Untersuchungen an 22 Patienten mit Kehlkopfkrebs oder anamnestisch therapiertem Kehlkopfkrebs und Verdacht auf Rezidiv durchgeführt und mit den histopathologischen Befunden verglichen. Dabei wurde in allen 18 Fällen mit invasivem Wachstum eine Unterbrechung der Basalmembran im OCT beobachtet. Zudem konnte in den meisten Fällen die Übergangszone zwischen Tumor- und Normalgewebe dargestellt werden, die sich „durch eine graduelle Dickenzunahme der Epithelschicht und einen Verlust der klaren Abgrenzung zwischen Epithelschicht und Lamina propria bemerkbar machte“. In 6 Fällen handelte es sich histologisch um benigne oder prämaligne Läsionen. Die OCT erlaubte dabei 3x eine klare Identifikation der Basalmembran, in drei Fällen, wo es sich um große, exophytische, prämaligne Läsionen handelte, konnte allerdings keine Basalmembran identifiziert werden. Diese diagnostische Schwierigkeit bei benignen großen und hyperplastischen Läsionen zeigte sich auch in der von uns durchgeführten Studie. Dies könnte laut Autoren daran liegen, dass „dicke, hyperzelluläre Gewebe zu einer erhöhten Reflexion von Licht an der Oberfläche führen und damit die Eindringtiefe von Licht in tiefere Gewebsschichten limitieren. Aus diesem Grund ist es schwieriger, die Basalmembran zu identifizieren und tiefere Gewebstrukturen darzustellen“. Abgesehen davon, könnte auch (zumindest teilweise) eine unpräzise Korrelation zwischen OCT-Bild und entnommener Gewebeprobe für die falsch positiven Befunde verantwortlich sein.

Bei der im Juli 2009 publizierten Studie von Wilder-Smith et al. [87] wurden 50 Patienten mit oralen leukoplakischen oder erythroplakischen Schleimhautläsionen entweder mittels hochauflösender 3D OCT-Sonde oder kommerziell erhältlicher 2D OCT-Sonde (Niris, Imalux, Cleveland, Ohio, USA- also dieselbe Sonde, die auch in unserer Studie verwendet wurde) untersucht. Die OCT-Bilder wurden jeweils vor Entnahme einer Gewebsbiopsie gemacht. Der histologische Befund entschied schließlich darüber, ob der Patient in die Studie eingeschlossen wurde. Ausgewertet wurden Patienten mit Normalgewebe, Dysplastischen Läsionen (Grad I-III),

Carcinoma in situ und PEC. Am Ende der Studie wurden die OCT-Bilder durch 2 verblindete Bewerter, unter Verwendung derselben Bewertungsskala wie in der histopathologischen Befundung, beurteilt. Die Interrater-Reliabilität zwischen den OCT-Bewertungen war mit einem Cohens Kappa von  $\kappa=0,870$  sehr gut. Die Übereinstimmung zwischen Histologie und OCT betrug 0,896 für beide Beobachter unter Verwendung des jeweils höheren Scores auf der Bewertungsskala. Für die Differenzierung zwischen PECs (n=11) und allen anderen Pathologien wird eine Sensitivität von 93,1% und eine Spezifität von 97,3% angegeben. Diese beiden Werte stimmen sehr gut mit den in unserer Studie erhaltenen Werten überein. Was die exakte Übereinstimmung zwischen OCT und Histopathologie betrifft, liegen die hier vorliegenden Angaben wesentlich höher als in der von uns durchgeführten Studie. Dies lässt sich vielleicht dadurch erklären, dass durch den histologischen Befund, wie bereits oben erwähnt, in vorliegender Studie viele untersuchte Patienten ausgeschlossen wurden. Dadurch beschränkte sich auch die OCT-Diagnostik im Gegensatz zu unserer Studie auf lediglich 6 mögliche diagnostische Befunde (1=Normalgewebe, 2=DI, 3=DII, 4=DIII, 5=Cis, 6=PEC) was die sehr hohe Übereinstimmung zwischen exakter Histologie und OCT erklären kann. Dadurch umging die Forschungsgruppe von Wilder Smith et al. die von uns angetroffenen Probleme in der Unterscheidung zwischen inflammatorischen Veränderungen, hyperplastischen Läsionen (und den damit verbundenen Schwierigkeiten) und Dysplasien.

- In einer weiteren wichtigen, prospektiven Studie, die 2008 von Kraft et al. [70] in „Head & Neck“ publiziert wurde, wurden bei 193 Patienten insgesamt 217 laryngeale Läsionen (60% benigne, 19% dysplastisch, 21% maligne) unter Vollnarkose mittels OCT untersucht. Viele informative OCT-Bilder von normaler laryngealer Schleimhaut und verschiedenen pathologischen Veränderungen wurden präsentiert. In dieser Studie wurde die intraoperative Verdachtsdiagnose, die sich aus der Mikrolaryngoskopie  $\pm$  OCT ergab, mit der definitiven histopathologischen Diagnose verglichen. In 80% der Fälle konnte dabei durch alleinigen Einsatz der Mikrolaryngoskopie eine korrekte spezifische Diagnose gestellt werden; mit der zusätzlichen Information aus der OCT-Untersuchung konnte die richtige spezifische Diagnose in 89% gestellt werden. Durch Messung der Epitheldicke auf den erhaltenen OCT-Bildern (und durch Vergleich mit bereits von Arens et al. 2007 publizierten mittleren Epitheldicken [46]), konnte sogar der exakte Grad der Dysplasie in 71% der präkanzerösen Läsionen korrekt

vorausgesagt werden. In der Mundhöhle mit ihrer großen Variabilität an Epitheldicken scheint es unwahrscheinlich, dass ähnlich gute Vorhersagen allein auf OCT-Daten basierend, gemacht werden können. Dies wird sich aber in folgenden Studien an einer größeren Anzahl von Patienten zeigen. In der Vorhersage von invasivem Tumorwachstum zeigte Kraft et al., dass die Mikrolaryngoskopie plus OCT eine höhere Sensitivität aufwies als die Mikrolaryngoskopie alleine (93% versus 87%), wohingegen sich die Spezifität kaum unterschied. Abgesehen von diesen vielversprechenden Ergebnissen erwähnen die Autoren drei häufiger angetroffene Probleme in der OCT-Diagnostik (die wir aus den Erfahrungen unserer eigenen Studie gerne teilen möchten): 1) wegen der starken Lichtreflexion in hyperkeratotischen Läsionen können tiefere Gewebsschichten nicht adäquat dargestellt werden und damit ist ein Ausschluss von Malignität oft nicht möglich, 2) kann ein Ulcus wegen fehlender Basalmembran mit einem invasiven Karzinom verwechselt werden, und 3) können mikroinvasive Karzinome aufgrund der begrenzten räumlichen Auflösung oft schwierig von einer Dysplasie III oder einem Carcinoma in situ abgegrenzt werden. Die Autoren kommen zu der Überzeugung, dass die OCT ein einfaches, schnelles und verlässliches Hilfsmittel in der Frühdiagnostik von Erkrankungen des Larynx sei.

Zusammenfassend kann man sagen, dass unsere Arbeit und unsere Ergebnisse mit den anderen klinischen Studien gut übereinstimmen. Um die Anzahl der Studienpatienten für die Imalux TD-OCT Studie zu vergrößern und damit bedeutendere Ergebnisse zu erhalten, wurde eine Forschungszusammenarbeit mit den beiden Zentren, die für die Publikation von Kraft et al. verantwortlich waren (die HNO-Abteilungen an der Justus Liebig Universität in Gießen, Deutschland und am Kantonsspital Aarau, Schweiz) und unserer HNO-Klinik initiiert. Zusätzlich (und um mit den neuen technischen Fortschritten mitzuhalten) wird unserer Klinik ein neues TD-OCT Gerät der Firma Imalux Corporation zur Verfügung gestellt.

In Tabelle 15 sind die statistischen Daten der wichtigsten bisher klinisch durchgeführten OCT Studien im HNO-Bereich nochmals zusammengefasst.

## 4. Diskussion

<b>Autoren</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>
Fomina et al. 2004 (Läsionen n=56)	83%	98%
Wilder-Smith et al. 2009 (Läsionen n=50)	93,1%	97,3%
Kraft et al. 2008 (Läsionen n=217; OCT + Mikrolaryngoskopie)	93,0%	94,0%
Eigene Studie	88,9%	89,0%

Tabelle 15: Statistische Ergebnisse aus den wichtigsten klinischen OCT Studien in der HNO. Die Spezifität und Sensitivität beziehen sich jeweils auf die Differenzierung zwischen benignen/prämaligen und frühmaligen Läsionen.

### **4.4 Vergleich unserer Ergebnisse mit Publikationen zur Anwendung der OCT an Haut und Schleimhäuten aus anderen Fachbereichen**

#### **4.4.1 Klinische Anwendung der OCT in der Gynäkologie**

- Erste Ergebnisse zur klinischen Anwendung der optischen Kohärenztomographie zur Bildgebung des weiblichen Genitaltraktes wurden 1997 von Sergeev et al. [55] publiziert. Dabei wurden 3 Frauen mit tumorartigen Veränderungen des Myo- bzw. Endometriums des Uterus und 8 Frauen mit bioptisch gesichertem Zervixkarzinom mittels OCT untersucht. Zusätzlich wurden OCT-Bilder von gesunder Schleimhaut angefertigt. Wie auch in der Mundschleimhaut findet man in der Zervix uteri mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel mit der typischen horizontalen Gewebeschichtung in der OCT. Bei Patienten mit mikroinvasiven Karzinomen der Cervix uteri konnte ein klarer Durchbruch der Basalmembran beobachtet werden. Die Autoren beschreiben, dass es mittels OCT möglich wäre, präkanzeröse und frühinvasive Läsionen zu differenzieren und Grenzen von Karzinomen aufzuzeigen.
- 2004 publizierte Zuluaga et al. [88] eine OCT-Studie an Zervix-Schleimhaut von 16 Frauen (42 Biopsiestellen) mit auffälligen Pap-Abstrichen. Er verglich OCT-Bilder normaler und pathologischer Schleimhaut anhand der Signalintensität des reflektierten Lichts an der Epithelschicht und anhand der Signalabnahme über die Epithelschicht. Die Ergebnisse aus der OCT-Untersuchung wurden schlussendlich mit dem histopathologischen Befund verglichen. Bei prämenopausalen Frauen waren die Intensitäten in pathologischem Gewebe signifikant höher als bei Normalgewebe ( $P=0,024$ ). Die durchschnittliche Signalintensität nahm mit dem Grad der Dysplasie

zu. Bei postmenopausalen Frauen hingegen waren die Intensitäten im Normalgewebe höher als im pathologischen Gewebe ( $P=0,062$ ).

- Zwei weitere wichtige Publikationen stammen aus Cleveland, Ohio, USA. Escobar et al. [89] publizierte 2004 eine OCT-Studie zur Differenzierung von verschiedensten Läsionen des weiblichen Genitaltraktes bei 50 Frauen mit auffälligem Pap-Abstrich oder morphologisch auffälligen Läsionen an Vulva und Zervix. Zusätzlich wurden bei allen Studienpatientinnen OCT-Bilder von gesunder Schleimhaut gemacht. Escobar et al. beschrieb dann die Charakteristika der OCT-Bilder von Normalschleimhaut (klare Dreischichtung des Gewebes- ähnlich wie in der Mundschleimhaut), von invasiven Karzinomen (Aufhebung der horizontalen Gewebsschichtung) sowie von Dysplasien und von Metaplasie/Inflammation. Bei den dysplastischen Läsionen beschreibt er eine vertikale, säulenartige Vorwölbung des Stromas ins Epithel. Schwierigkeiten bereitete v.a. die Unterscheidung zwischen hochgradigen Dysplasien/Carcinoma in situ und frühinvasiven Karzinomen.

2006 folgte eine weitere Publikation einer Studie von Escobar et al. [90], wo alle 212 Studienpatienten nach einem genau festgelegten Protokoll untersucht wurden. Nach Anfärbung mit Essigsäure wurde die Zervix visuell inspiziert, anschließend wurde ein Foto gemacht, daraufhin erfolgte die kolposkopische Untersuchung. Im Anschluss erfolgte die OCT-Untersuchung. Es wurden Bilder von allen vier Quadranten gemacht und zusätzlich wurden die bei der Essigsäure-Inspektion oder Kolposkopie auffällig erscheinenden Bereiche mittels OCT untersucht. Schlussendlich wurde dann in jedem Quadranten und von jeder auffälligen Stelle eine Biopsie entnommen. Die OCT-Bilder wurden insgesamt drei Mal beurteilt- einmal unter alleiniger Kenntnis des Alters der Patientin, ein zweites Mal mit Kenntnis der Essigsäure-Untersuchung und mithilfe eines Digitalfotos der Zervix, ein drittes Mal unter Kenntnis des Pap-Befundes, des kolposkopischen Befundes und mithilfe eines vergrößerten Digitalfotos der Zervix. Die zusätzliche OCT-Untersuchung erhöhte dabei, im Vergleich zur alleinigen Essigsäure-Untersuchung oder kolposkopischen Untersuchung, vor allem die Spezifität. Aus diesem Grunde scheint die OCT lt. Autoren ein geeignetes Hilfsmittel in der Diagnostik prä- und frühinvasiver Läsionen der Zervix in Kombination mit der Essigprobe und der Kolposkopie zu sein. Die OCT macht es lt. Autoren möglich, Schlüsselstellen für eine Biopsie innerhalb von größeren Läsionen zu detektieren.

- Im Februar 2010 wurde eine chinesische Studie von Liu et al. publiziert [91]. 299 nicht-schwangere erwachsene Frauen mit auffälligem Pap-Test oder positivem HPV-



Test wurden rekrutiert und mittels Kolposkopie und kolposkopisch gesteuerter OCT-Aufnahme untersucht. Es wurden jeweils OCT-Bilder von allen 4 Quadranten (2, 4, 8 und 10 Uhr) und von auffälligen Arealen aufgenommen- insgesamt 1237 Bilder. 96 biopsierte Stellen wiesen histologisch eine CIN2 oder mehr auf. Die OCT zusammen mit der Kolposkopie erhöhte die Spezifität in der Detektion von CIN2 oder höhergradigen Dysplasien/Karzinomen von 83% bei der Kolposkopie alleine auf 93%. Die Sensitivität hingegen nahm unter Zuhilfenahme der OCT ab, was die Autoren der technisch noch nicht ausgereiften Lichtquelle des OCT-Gerätes zuschreiben.

In unserem Hause wird an der Klinik für Gynäkologie & Geburtshilfe derzeit auch eine OCT-Studie durchgeführt. Wir erwarten die Ergebnisse aus dieser Studie in Bälde.

### **4.4.2 Klinische Anwendung der OCT in der Urologie**

In Normalgewebe kann die anatomische Dreischichtung der Blasenschleimhaut (Urothel, Lamina Propria, Muscularis Propria) mittels OCT gut dargestellt werden, wohingegen dies bei Blasenkarzinomen nicht möglich ist [92,93]. Im Bereich der Urologie gibt es mehrere klinische Studien, welche die OCT-Bildgebung mit dem definitiven histopathologischen Befund vergleichen.

- Manyak et al. [94] publizierte 2005 eine Studie an 24 Patienten mit 87 tumorverdächtigen Läsionen innerhalb der Blasenschleimhaut. Die Unterscheidung zwischen Blasenkarzinomen (n=16) und nicht- bzw. prämaligen Läsionen ergab eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 89%.
- Hermes et al. [92] untersuchte 142 Biopsate ex-vivo innerhalb von 1-6 Stunden nach invasiver Gewebentnahme. Es wurden Normalgewebe, Carcinoma in situ und frühinvasive Blasenkarzinome untersucht. Die OCT-Bilder wurden von 2 Untersuchern bewertet und einer der oben genannten drei Kategorien zugeordnet. Für die Detektion von malignen Veränderungen in der Blasenschleimhaut wurde eine Sensitivität von 83,8% und eine Spezifität von 78,1% errechnet. Die Autoren sehen die Detektion einer intakten Basalmembran als wichtigstes Kriterium für den Ausschluss eines malignen Geschehens an. Dabei ist zu erwähnen, dass die ex-vivo Anwendung der OCT gegenüber der in-vivo Anwendung entscheidende Nachteile mit sich bringt. Nach Entnahme einer Gewebeprobe ändern sich die optischen Eigenschaften des Gewebes nämlich rasch- dies erschwert die Interpretierbarkeit der Biopsie und könnte die geringe Sensitivität und Spezifität erklären.

- Goh et al. [95] konnte bei seinem retrospektiven Vergleich von 38 OCT-Bildern mit Biopsien von derselben Stelle zeigen, dass die Differenzierung von Blasenkarzinomen, die allein auf die Mukosa beschränkt waren, mittels OCT mit einer Sensitivität von 90% und einer Spezifität von 89% möglich war. Von 7 muskelinvasiven Karzinomen konnten alle 7 als solche erkannt werden (100% Sensitivität, 90% Spezifität). Mit einem negativen prädiktiven Wert von 100% (bei allerdings lediglich 7 muskelinvasiven Läsionen) bei muskelinvasiven Läsionen besteht laut Untersucher nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit, muskelinvasive Tumoren zu übersehen.
- Zagaynova et al. [96] publizierte eine Studie an 80 Patienten mit 114 Läsionen, welche mittels OCT, zystoskopisch und histopathologisch beurteilt wurden. Invasive Läsionen (n=2) konnten richtig identifiziert werden. Von den 194 benignen Gewebsalterationen konnten 165 als solche erkannt werden. In Kombination mit Weißlicht hätte in 85% der Fälle eine Biopsie vermieden werden können. Zusätzlich wurde die OCT zur prä- und intraoperativen Planung der Tumorsektion eingesetzt, unter anderem bei 44 transurethralen Resektionen von Blasenkarzinomen. Die mittels OCT bzw. histologisch ermittelten Tumorränder stimmten in 79% der Fälle überein.
- Im März 2010 [97] publizierte eine Forschungsgruppe der Ludwig-Maximilians-Universität München eine prospektive Studie an 52 Patienten mit 166 malignitätsverdächtigen Läsionen. Alle dieser Läsionen wurden im Zuge einer Zystoskopie biopsiert und mittels Videoanalyse wurde untersucht ob die Stelle der OCT-Aufnahme mit jener der Biopsie korrelierte. Schlussendlich konnten 102 Läsionen prospektiv ausgewertet werden. Von den 14 histologisch malignen Läsionen (dazu zählten Cis bis T2-Tumoren) wurden alle 14 mittels OCT als solche erkannt. Es konnte auch mit einer Sensitivität von 100% festgestellt werden, ob die Lamina propria überschritten war. Laut Autoren war die Spezifität in der Detektion von malignen urothelialen Läsionen (65%) eingeschränkt, da es einerseits eine Lernkurve gab und andererseits die technischen Limits keine bessere Beurteilung ermöglichten. Als besonders limitierend empfanden die Autoren die geringe räumliche Auflösung und die, zur Beurteilung von einigen Läsionen nötige, zu geringe Eindringtiefe. Die eben genannten technischen Limits wurden auch in vorliegender Studie, in der dasselbe OCT-Gerät verwendet wurde als besonders einschränkend empfunden.

### 4.4.3 Klinische Anwendung der OCT in der Gastroenterologie

Auch in der Gastroenterologie ist es möglich, mittels OCT die feingewebliche Struktur der Schleimhaut zu visualisieren. Zunächst wurden, wie auch in den anderen erwähnten Fachbereichen, ex-vivo Studien durchgeführt:

- Pitris et al. [98] beschreibt anhand von Gewebeproben von 14 Patienten, dass es möglich war, sowohl das mehrschichtig unverhornte Plattenepithel der Speiseröhre als auch das Zylinderepithel, welches den restlichen Gastrointestinaltrakt auskleidet, gut darzustellen. Die Autoren sehen den größten Nutzen der OCT in der Verlaufskontrolle von Patienten mit intestinaler Metaplasie und Barrett-Ösophagus (also auch hier einer in vivo Anwendung der OCT), da diese ein sehr hohes Risiko aufweisen, ein Adenokarzinom zu entwickeln.
- Westphal et al. [99] konnte in einer weiteren ex-vivo Studie zur Anwendung der OCT im Gastrointestinaltrakt eine starke Korrelation zwischen der in der OCT und auf den histologischen Schnittbildern ausgemessenen Epitheldicke nachweisen. Eine starke Korrelation konnte in vorliegender Studie zwischen in vivo OCT-Epitheldickenmessungen und histologisch ermittelten Epitheldicken beobachtet werden. Ob diese starke Korrelation auch bei ex-vivo Präparaten vorhanden ist wurde hier nicht überprüft.

Anschließend wurden mehrere in-vivo Studien zur Anwendung der OCT durchgeführt. Die Wichtigsten sollen hier im Anschluss diskutiert werden:

- Isenberg et al. [100] publizierte 2005 die erste prospektive, verblindete, klinische Studie zur Evaluation der OCT in der Diagnostik dysplastischer Areale bei Patienten mit Barrett-Ösophagus. 4 Prüfarzte interpretierten 314 OCT-Bilder von 33 Patienten. Ein Pathologe beurteilte die korrespondierenden Gewebeproben. Die Sensitivität und Spezifität zur Detektion dysplastischer Areale (n=74) betrug 68% bzw. 82%. Die diagnostische Präzision reichte bei den 4 Prüfarzten von 56%-98%. Die großen Unterschiede könnten daran liegen, dass sich die Prüfarzte unterschiedlich stark vom klinischen Bild leiten ließen- dass die Methode also subjektiv ist. Es konnte dabei kein Zusammenhang zwischen Prüfarzterfahrung und Präzision erkannt werden- der Prüfarzt mit der geringsten OCT Erfahrung erreichte mit 98% die höchste Präzision in der Diagnostik dysplastischer Läsionen.
- 2008 publizierte Zagaynova et al. [96] Ergebnisse von einer multizentrischen OCT-Studie an 554 Patienten- 164 Patienten mit Pathologien der Harnblase und 390

Patienten mit Pathologien im Gastrointestinaltrakt. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Früherkennung dysplastischer Areale bei 78 Patienten mit Barrett-Ösophagus. Als maligne wurden eine hochgradige Dysplasie (n=11) sowie Adenokarzinome (auf die Mukosa beschränkt (n=17) oder invasiv (n=17)) angesehen. Diese konnten mit einer Sensitivität von 83% und einer Spezifität von 85% von benignen Schleimhautveränderungen abgegrenzt werden. Bei Läsionen im Kolon (116 Polypen wurden analysiert) war es möglich, mit einer Sensitivität von 92% und einer Spezifität von 84% zwischen Adenomen (=Aufhebung der Gewebeschichtung) und hyperplastischen Polypen zu unterscheiden. Zusätzlich wurde die OCT auch intraoperativ zur Festlegung der Tumorgrenzen bei Ösophagus- und Kolonkarzinomen erfolgreich eingesetzt. In der gemeinsamen Anwendung der Fluoreszenzbildgebung und der OCT war es mittels OCT möglich, in der Detektion von frühinvasiven Karzinomen die Spezifität um bis zu 79% und den PPW um bis zu 43% zu verbessern. Lt. Autoren eignet sich die OCT zur frühen Detektion maligner Läsionen, zur Festlegung der Tumorgrenzen, zur Kontrolle bei Tumorresektionen und als Methode zur Differentialdiagnose verschiedener pathologischer Veränderungen.

- Hatta et al. [101] publizierte im Mai 2010 eine in-vivo Studie zum präoperativen Staging von oberflächlichen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus. 109 OCT-Bilder von 46 frühinvasiven PECs des Ösophagus wurden bezüglich ihrer Eindringtiefe (1. Epithel/Lamina propria, 2. Muscularis Mucosae, 3. Submukosa) beurteilt und es wurde eine zusammenfassende Genauigkeit der Schätzergebnisse von 92.7% erreicht. Den Autoren gelang es damit einen möglichen Nutzen der OCT im präoperativen Staging von frühinvasiven Karzinomen aufzuzeigen. Dies wurde bisher in der HNO noch nicht an einer ausreichenden Anzahl an Patienten evaluiert- ein möglicher Nutzen ist jedoch absolut vorstellbar.

### **4.4.4 Klinische Anwendung der OCT in der Dermatologie**

Die OCT eignet sich nicht nur zur Beurteilung von Schleimhäuten, sondern wird seit 1997 in der Dermatologie zur Beurteilung der äußeren Haut erfolgreich klinisch eingesetzt. Welzel et al. [102] konnte dabei Strukturen im Stratum corneum, die Epidermis und die papilläre Dermis differenzieren und bezeichnete die OCT als „hilfreich für die Diagnostik von bullösen Hautreaktionen, von Tumoren der Haut und für die in-vivo Erforschung von pharmakologischen Effekten.“

Gambichler et al. [103] untersuchten normale und entzündete Haut, bläschenbildende Hauterkrankungen und Hauttumore. An der Oberfläche der Haut wird viel Licht reflektiert- dies führt zu einer hellen signalreichen Schicht, welche auch als Eingangssignal bezeichnet wird. Handelt es sich um entzündete Haut, so ist das Eingangssignal verdickt und verstärkt. Die Epidermis ist normalerweise weniger signalreich als die darunterliegende Dermis. Lt. Autoren ist die Detektion von Tumoren und deren Grenzen mit einem konventionellen OCT-Gerät schwierig, da der Übergang zwischen Epidermis und Dermis oft unscharf ist. Bei invasivem Wachstum wäre die Grenze zwischen Epidermis und Dermis dann gänzlich aufgehoben, wie wir es auch bei oralen und laryngealen Plattenepithelkarzinomen beobachten konnten.

Es wurden auch einige prospektive, klinische Studien durchgeführt, die im Folgenden diskutiert werden sollen:

- 2003 publizierte Barton et al. [104] eine Studie an 20 Patienten. Er untersuchte dabei jeweils sonnengeschützte Hautstellen (Innenseite des Oberarmes) und sonnenexponierte Hautstellen (Außenseite des Unterarmes) im Vergleich. Er konnte Stellen mit aktinischer Keratose mit einer Sensitivität von 79% und einer Spezifität von 100% von gesunder Haut unterscheiden. Kriterium hierfür war jeweils die Anwesenheit einer dunklen Bande innerhalb der Epidermis, welche charakteristischerweise bei der aktinischen Keratose vorkommt.
- Korde et al. [105] publizierte eine ähnliche Studie an 112 Patienten. Es wurden jeweils 4 Stellen- 2 sonnenexponierte Hautstellen und 2 sonnengeschützte Hautstellen (Innenseite des Oberarmes)- mittels OCT und histopathologisch untersucht. Läsionen mit aktinischer Keratose (Strahlenkeratose) (n=123) konnten dabei anhand der Anwesenheit einer dunklen Bande innerhalb der Epidermis mit einer Sensitivität von 86% und einer Spezifität von 83% von gesunder Haut unterschieden werden. Im Vergleich dazu wurden durch die dermatoskopische Untersuchung eine Sensitivität von 98% und eine Spezifität von 62% erreicht. Die aktinische Keratose ist eine prämaligne Kondition, die durch eine epidermale Dysplasie, eine Hyperkeratose, eine Parakeratose und eine solare Elastose (chronisch lichtgeschädigte Haut) gekennzeichnet ist und die in ein PEC übergehen kann. Zudem beobachteten die Autoren bei einem großen Hautschaden durch Sonnenexposition eine rapide Signalabnahme über die Epidermis und dadurch eine geringere Eindringtiefe ins Gewebe. Das könnte entweder an einer Zunahme des Melanins, welches Licht stark streut, oder an der Signalabschwächung durch die solare Keratose liegen.

- 2009 berichtete König et al. [106] von einer kombinierten Anwendung von OCT, Multiphotonentomographie und Dermatoskopie an einem Studienkollektiv von 47 Patienten mit verschiedensten Hauterkrankungen an der Universitätsklinik von Jena. Es wurden verschiedene epitheliale Hauttumoren (Basalzellkarzinom n=5, PEC n=4, aktinische Keratose n=9), Naevi und maligne Melanome (n=11), entzündliche Hauterkrankungen, Autoimmunerkrankungen u.v.a.m. untersucht. Die Kombination von OCT und Multiphotonentomographie erlaubte eine Beurteilung der Haut bis in eine Tiefe von ca. 2 mm und ermöglichte eine hochauflösende, horizontale Aufnahme von besonders interessanten und relevanten Regionen. Lt. Autoren kann die OCT infiltratives Tumorwachstum in die Dermis aufzeigen und Informationen über die Tiefenausdehnung einer fraglichen Läsion liefern. Sie eignet sich zur Früherkennung von Hauterkrankungen, zur präoperativen Analyse verschiedener Läsionen und zur Therapiekontrolle.
- Eine Studie der Universität Kopenhagen [107] beschäftigte sich hauptsächlich mit der Beurteilung von „weißem Hautkrebs“ (BCC). Die Studienpopulation bestand aus 104 Patienten mit 176 Läsionen- von jeder Läsion wurden mindestens zwei OCT-Bilder angefertigt. Anschließend erfolgte durch 2 Bewerter eine verblindete Evaluation aller OCT-Bilder von 64 BCC (Basalzellkarzinomen), 1 PEC, 39 AKs (aktinische Keratosen), 2 malignen Melanomen, 9 benignen Läsionen und 105 Bildern von periläsionaler, gesunder Haut. Die Differenzierung zwischen normaler Haut und Hautläsionen war 76% bzw. 94% sensitiv und 85% bzw. 96% spezifisch. Die Unterscheidung zwischen AK und BCC wies eine Fehlerrate von 50-52% auf. Lt. Autoren ist es möglich, typische Kriterien des „weißen Hautkrebses“ im OCT zu erkennen- eine Unterscheidung zwischen AK und BCC ist mittels OCT jedoch nicht möglich. Damit ist die OCT bislang weniger exakt in der Diagnostik von Hauttumoren als die klinische Diagnose. Auffallend in dieser Studie ist auch die deutlich unterschiedliche Bewertung der OCT-Bilder durch die beiden verblindeten Bewerter. Dies lässt sich vermutlich nicht ausschließlich aus der Lernkurve erklären. Die Bewertung der OCT-Bilder ist sehr subjektiv- aus diesem Grund ist es in Zukunft notwendig Algorithmen zu entwickeln, die eine objektive Bewertung der OCT-Bilder erlauben. In erster Linie ist die OCT hilfreich als Zusatzinformation zur klinischen Erscheinung
- In einer Studie von Jørgensen et al. [108] wurde ein computergestützter Algorithmus entwickelt (ähnlich wie in der weiter oben erwähnten Studie von Lingley-

Papadopoulos), um zwischen BCC (n=41) und AK (n=37) auf OCT-Bildern zu unterscheiden. Dazu wurden zur Beurteilung der einzelnen OCT-Bilder 14 verschiedene Kriterien herangezogen, die dem bloßen Auge oft verborgen bleiben. Durch diesen Lernalgorithmus konnten AKs von BCCs mit einer Erfolgsrate von 73% und BCCs von AKs mit einer Erfolgsrate von 81% unterschieden werden.

Die optische Kohärenztomographie wird, wie aus obigen Ausführungen ersichtlich, im Zuge von klinischen Studien zur Diagnostik von Haut- und Schleimhauterkrankungen auf breiter Front eingesetzt. Hauptaugenmerk liegt dabei in den meisten Fachbereichen, wie dies auch in der HNO und unserer Studie der Fall ist, in der Frühdiagnostik prämaligener und maligner Läsionen, und die Ergebnisse erscheinen durchaus vergleichbar. Allerdings ist noch nicht klar, welche Stellung die OCT in diesem Bereich in Zukunft einnehmen kann- dazu sind weitere, prospektive, verblindete klinische Studien an größeren Studienkollektiven nötig. Das große Interesse an der Methode, die bisherigen Ergebnisse und die rapide technische Weiterentwicklung sind jedoch vielversprechend. Die OCT könnte in Zukunft standardmäßig als Hilfsmittel zur Diagnostik unklarer Läsionen eingesetzt werden und die Spezifität anderer Diagnostikmethoden verbessern (dies wurde vor allem aus den Bereichen Gynäkologie und Gastroenterologie berichtet). Somit können möglicherweise in Zukunft, durch den Einsatz der OCT teilweise unnötige, invasive Biopsieentnahmen vermieden werden.

Ein weiterer Bereich, in welchem die OCT sehr hilfreich sein könnte, ist die Abgrenzung von malignem Gewebe zu Normalgewebe. Die OCT wurde in allen oben genannten Fachbereichen, sowie auch in unserer Studie, erfolgreich intraoperativ zur Festlegung der Tumorgrenzen eingesetzt. Dies resultiert in einer höheren Rate an R0-Resektionen. Was dabei zu beachten ist, ist, dass die OCT dabei die laterale Abgrenzung verbessert- abgesehen von frühinvasiven Läsionen jedoch nicht eine Abgrenzung des Tumors in die Tiefe erlaubt. Allerdings gibt es dazu noch keine statistischen Ergebnisse.

Ein wichtiger Aspekt ist sicherlich auch die rapide technische Weiterentwicklung- so erlauben immer bessere OCT-Geräte eine detaillierte Beurteilung des Gewebes und ausgefeilte computergestützte Algorithmen, wie sie klinisch experimentell schon in einigen Fachgebieten eingesetzt wurden, könnten möglicherweise in Zukunft eine objektive Beurteilung von OCT-Bildern ermöglichen.

### **4.5 Die OCT im Vergleich zu anderen optischen Methoden in der Tumorfrühdagnostik im OADT**

Auch wenn es noch nicht zufriedenstellend gezeigt werden konnte, scheint sich die optische Kohärenztomographie sowohl für die Differenzierung zwischen prä- und frühmalignen Läsionen als auch für ein dreidimensionales Mapping von höhergradigen Dysplasien und kleineren PECs (mit einem Durchmesser  $\leq 2$  mm) gut zu eignen. Um die Information aus der OCT-Untersuchung zu komplettieren und die oberflächlichsten Schichten einer Läsion mit einer subzellulären Auflösung besser und genauer darzustellen, bieten sich die konfokale Mikro(endo)skopie und die Multiphotonenmikro(endo)skopie an [86,109-111]. Im Hamsterbacken-Modell hat die Forschungsgruppe der Universität Kalifornien Irvine die MPM zur Differenzierung von Schleimhautveränderungen im Zuge der oralen Karzinogenese angewendet. Sie konnten dabei „Kollagenmatrix und -fasern, zelluläre Infiltrate, Blutgefäße und Mikrotumoren“ mit einer hohen Auflösung und einer Eindringtiefe bis zu circa 900  $\mu\text{m}$  (was reichlich tief für die MPM erscheint) darstellen. Bei 70 Tieren stimmten die Ergebnisse der MPM Untersuchung in 88,6% mit dem histopathologischen Befund überein [109]. Wurden OCT und MPM kombiniert eingesetzt, so konnte eine Übereinstimmung in 91% der Fälle erzielt werden [109]. Aus diesen experimentellen Daten kann man nun schlussfolgern, dass– aufgrund ihrer verschiedenen Fähigkeiten- eine kombinierte Anwendung von OCT und MPM den Informationsgehalt einer alleinigen Anwendung einer der beiden Methoden verbessern könnte. In einer weiteren ex vivo Studie an pädiatrischen, humanen Kehlkopf-Gewebeproben wurden FD-OCT und CM direkt miteinander verglichen [111]. Während die FD-OCT einen “globalen Überblick über die Mikrostrukturen der pädiatrischen Stimmlippe bis zu einer Tiefe von 1,2 mm liefern konnte, aber keine (sub)zellulären Strukturen unterscheiden konnte”, zeigte die CM „gute (sub)zelluläre Details bis zu einer Tiefe von 250  $\mu\text{m}$ “. Es wurde gefolgert, dass beide Methoden, vor allem kombiniert angewendet, vielversprechend in der in vivo zellulären und subzellulären Bildgebung von Epithelschicht, Basalmembran und Lamina propria wären.

Die in vivo Anwendbarkeit der konfokalen Mikro(endo)skopie im OADT wurde auch von Just et al. 2008 [112] in einer Studie überprüft und lieferte ähnliche Ergebnisse wie die vorher beschriebenen ex vivo Studien. Es wurde allerdings kein direkter Vergleich mit der OCT gemacht. Der Wert einer kombinierten Anwendung (CM/MPM und OCT) im klinischen Alltag muss noch in in-vivo Studien in nächster Zeit gezeigt werden. Dabei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass die Anschaffungskosten für zwei verschiedene Geräte ziemlich hoch sind und eine Kosten-Nutzen-Analyse erfolgen sollte. Eine interessante neue



#### 4. Diskussion

---

Technik in diesem Zusammenhang, welche „subzelluläre Auflösung der konfokalen Mikroskopie und Interferenzbildung der OCT“ miteinander kombiniert, stellt die sogenannte optische Kohärenzmikroskopie dar, die eine Auflösung von 2  $\mu\text{m}$  bei einer Eindringtiefe von 600  $\mu\text{m}$  besitzt. In einer kleineren, deskriptiven Studie an oralen Gewebeproben unter Anwendung dieser Methode durch Clark et al. 2004 [113] konnten die Autoren zwischen normaler, dysplastischer und maligner Schleimhaut unterscheiden. Auch hier (wie schon bei der CM und MPM) besteht noch ein Mangel an in vivo Studien, um das Potenzial dieses kombinierten technischen Ansatzes zu verifizieren.

Auch wenn Photoakustische Methoden geeignet erscheinen, in Kombination mit oder anstelle der OCT eingesetzt zu werden, da ihre Eindringtiefe durch optische Eigenschaften nicht so sehr limitiert wird, gibt es noch keine Publikationen zur Anwendung dieser Methode im oberen Luft-Speiseweg.

Mit einer Eindringtiefe bis zu 8 mm und einer relativ hohen Auflösung (circa 80  $\mu\text{m}$  Tiefenauflösung und 200  $\mu\text{m}$  laterale Auflösung), scheint der Hochfrequenzultraschall bei 20-25 MHz die OCT optimal zu ergänzen, indem er die nicht-invasive Diagnostik in tieferen Gewebsschichten erlaubt. Der Einsatz des Hochfrequenzultraschalls für die Bildgebung und das Mapping mittelgroßer laryngealer maligner Tumoren wurde in mehreren Publikationen von Arens et al. [114,115] diskutiert und als sinnvoll erachtet. Bei 23 PECs und 15 weiteren laryngealen Läsionen wurden endoskopische Ultraschalluntersuchungen (unter Flutung des Larynx mit NaCl) während der Mikrolaryngoskopie, unter Verwendung eines neu entwickelten Ultraschallgerätes mit 10 MHz und 20 MHz Kathetern, durchgeführt [114]. Die Methode erlaubte eine Messung der vertikalen Ausdehnung von Larynxkarzinomen, die größer als 3 mm im Durchmesser waren. Waren der Schildknorpel oder die vordere Kommissur involviert, konnte dies ebenfalls dargestellt werden (und somit konnten kritische T1b und T2 Stadien besser evaluiert werden). In einer zweiten Studie an 60 Patienten mit dysplastischen Läsionen, Carcinomata in situ oder PECs zeigten sich dieselben Vorteile. Allerdings konnte der Hochfrequenzultraschall bei präkanzerösen Läsionen und mikroinvasiven Karzinomen keine Zusatzinformation zum mikrolaryngoskopisch erhaltenen Bild liefern. Die Autoren kamen zur Ansicht, dass „endoluminal durchgeführte Hochfrequenzultraschall-Untersuchungen die Mikrolaryngoskopie in der Beurteilung bestimmter laryngealer Läsionen unterstützen könnten, insbesondere in der Evaluation der Größe und Infiltration von Larynxkarzinomen, und dass sie zu einem präziseren präoperativen Staging beitragen könnten“. Auch wenn die Kombination von OCT und Hochfrequenzultraschall der nächste logische Schritt in der nicht-invasiven Beurteilung von

#### 4. Diskussion

---

Läsionen aller Größen zu sein scheint (und so auch bereits für Haut- und Blasenläsionen angewandt wurde [116,117]), wurde die kombinierte Anwendung im OADT noch nicht ausreichend überprüft.

Die OCT kann also sowohl mit der konfokalen Mikro(endo)skopie und der Multiphotonenmikro(endo)skopie als auch mit dem Hochfrequenzultraschall (und möglicherweise auch mit der Photoakustischen Bildgebung) kombiniert werden, um ihren Anwendungsbereich zu erweitern. Nichtsdestotrotz muss der Nutzen dieser kombinierten Anwendungen im klinischen Bereich noch genau überprüft und gezeigt werden.

### **5. Zusammenfassung und Perspektive**

Den Goldstandard in der Diagnostik von Tumoren im oberen Luft-Speiseweg stellt bis dato die invasive Gewebeentnahme und anschließende histopathologische Begutachtung von visuell auffälligen Schleimhautveränderungen dar. Dieses Vorgehen ist allerdings mit einigen Problemen behaftet: Es besteht das Risiko eines falsch negativen Befundes durch fehlerhafte Biopsieentnahme, da innerhalb einer Läsionen mehrere Pathologien nebeneinander existieren können, und zum Teil weisen frühinvasive PECs überhaupt keine typischen morphologischen Eigenschaften von malignen Tumoren auf und fallen deshalb entweder gar nicht auf oder werden als harmlos erachtet. Um diesen offensichtlichen diagnostischen Mängeln entgegenzuwirken, wurden in den letzten Jahren verschiedene sensitive, nicht-invasive Techniken zusätzlich zur invasiven Gewebebiopsie klinisch erprobt und evaluiert. In diesem Sinne wurde in der vorliegenden Studie überprüft, inwieweit die optische Kohärenztomographie zur Detektion, Differenzierung und Abgrenzung von prä- und frühmalignen Schleimhautläsionen des oberen Aerodigestivtraktes beitragen kann, und damit die Tumorfrühdagnostik von Tumoren des oberen Luft-Speiseweges verbessern kann.

Die optische Kohärenztomographie ist ein neuartiges Verfahren ähnlich der Sonographie (das allerdings mit Licht anstatt mit Ultraschallwellen arbeitet), das zwei- oder sogar dreidimensionale Bilder von lebendem Gewebe in Mikrometer-Auflösung und bis in eine Tiefe von etwa 2 mm liefert. Es wird vor allem in der Ophthalmologie und Dermatologie schon seit längerem erfolgreich klinisch angewendet und etabliert sich zunehmend in weiteren Fachbereichen. Auch im Bereich der Hals-, Nasen- & Ohrenheilkunde gibt es schon Ergebnisse aus klinischen Studien, v. a. im Bereich des Kehlkopfes, die vielversprechend sind.

Die hier durchgeführte in vivo Studie zeigt, dass das Verfahren

- 1) das Potential besitzt, prä-maligne von frühinvasiven Läsionen des oberen Luft-Speisewegs abzugrenzen, indem es eine Beurteilung der Integrität der Basalmembran erlaubt (die Verletzung der Basalmembran wird als Zeichen für eine Frühinvasion erachtet). Dafür wurde aus den Daten von 100 untersuchten leuko- und erythroplakischen Läsionen eine Spezifität von 89,0% errechnet. Auch die Sensitivität war tendenziell sehr hoch (88,9% bei allerdings „nur“ 9 invasiven Läsionen).
- 2) es tendenziell ermöglicht, die Tumorgrenzen von klinisch oder histologisch gesicherten Karzinomen des OADT aufzuzeigen und somit intraoperativ als therapeutisches Hilfsmittel eingesetzt werden kann.

## 5. Zusammenfassung und Perspektive

---

- 3) zur Verlaufskontrolle bei länger bestehenden oder rezidivierenden Leukoplakien herangezogen werden kann und damit die Notwendigkeit und ggf. die Frequenz invasiver Biopsieentnahmen reduzieren kann.
- 4) sich dazu eignet, die Epitheldicke der oralen Schleimhaut auf nicht-invasive Art und Weise auszumessen. Bei der Messung der Epitheldicke an 52 gesunden Probanden zeigte sich eine große interindividuelle Variabilität v.a. am Zungenrand und an der Lippe. Zudem konnten Mittelwerte für Epitheldicken an 8 verschiedenen Stellen innerhalb der Mundhöhle angegeben werden, welche von durchschnittlich 126  $\mu\text{m}$  am Mundboden bis zu 487  $\mu\text{m}$  am Zungenrücken reichten. Die Korrelation der mittels OCT und histologisch gemessenen Epitheldicken wurde an 38 Studienpatienten überprüft– es errechnete sich ein Korrelationskoeffizient von  $\kappa=0,63$ .
- 5) möglicherweise in Zukunft dazu beitragen könnte, durch die Intensitätsanalyse, Hyperplasien von Dysplasien zu unterscheiden und damit die Notwendigkeit einer Therapie zu eruieren. Bei den hierzu untersuchten Dysplasien ( $n=20$ ) war im unteren Epithel noch durchschnittlich 61,3% der Ursprungsintensität vom oberen Epithel erhalten, bei den Hyperplasien ( $n=28$ ) waren es noch 81,1%. Am Übergang zwischen Epithel und Lamina propria hingegen kam es bei den Hyperplasien zu einer Intensitätszunahme von durchschnittlich 21,0%, bei den Dysplasien um 29,4%.

Da die Methode einer rapiden technischen Weiterentwicklung (hinsichtlich der Bildakquisitionsrate, der Auflösung sowie einer automatisierten Bildanalyse) unterliegt, muss der echte Wert des Verfahrens jedoch noch ermittelt werden.

Kombiniert mit anderen, nicht-invasiven Methoden könnte die OCT gegebenenfalls als wertvolles Hilfsmittel zur Tumorfrühdagnostik im oberen Luft-Speiseweg dienen; möglicherweise sogar bis zu dem Punkt, an dem invasive Maßnahmen wie Gewebebiopsien überflüssig werden und durch „optische Biopsien“ ersetzt werden können. Daraus würde sich letztendlich ein Zeitgewinn und möglicherweise sogar eine Verbesserung der Prognose für die betroffenen Patienten ergeben. Zudem könnte die komplett fehlende Invasivität zu einer Verbesserung der Lebensqualität der Patienten beitragen.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P: Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18(3):581-592.
- [2] Robert Koch Institut. Krebsinzidenzschätzungen für Deutschland bis 2004. [http://www.rki.de/cIn\\_091/nn\\_204082/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Datenbankabfragen/datenbankabfragen\\_\\_node.html?\\_\\_nnn=true-](http://www.rki.de/cIn_091/nn_204082/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Datenbankabfragen/datenbankabfragen__node.html?__nnn=true-). 2009.
- [3] Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A: Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102(1):67-76.
- [4] Axell T, Pindborg JJ, Smith CJ, van dW, I: Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J Oral Pathol Med* 1996; 25(2):49-54.
- [5] Neville BW, Day TA: Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52(4):195-215.
- [6] Bouquot JE, Gorlin RJ: Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986; 61(4):373-381.
- [7] Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I: Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. 2th ed. WHO International Histological Classification of Tumours, 1997, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- [8] Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P: Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31B(5):301-309.
- [9] Chuang SC, Scelo G, Tonita JM, Tamaro S, Jonasson JG, Kliever EV et al: Risk of second primary cancer among patients with head and neck cancers: A pooled analysis of 13 cancer registries. *Int J Cancer* 2008; 123(10):2390-2396.
- [10] Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; 6(5):963-968.
- [11] US Cancer Statistics Working Group. SEER Cancer Statistics Review 1975-2005. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2005](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005). 2009.
- [12] Sankaranarayanan R, Ramadas K, Thomas G, Muwonge R, Thara S, Mathew B et al: Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a cluster-randomised controlled trial. *Lancet* 2005; 365(9475):1927-1933.
- [13] Morgenroth K: Neue Untersuchungen mit dem Kolposkop nach Hinselmann und der Vitalfärbung der Mundschleimhaut zur Frühdiagnose von Tumoren im Kieferbereich. *Dtsch Zahnärztl Z* 1957; 12[3], 192-201.

- [14] Richart RM: A clinical staining test for the in vivo delineation of dysplasia and carcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol* 1963; 86:703-12.:703-712.
- [15] Epstein JB, Scully C, Spinelli J: 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(4):160-163.
- [16] Gray M, Elley K: Oral cancer screening. *Br Dent J* 2000; 189(3):125.
- [17] Epstein JB, Sciubba J, Silverman S Jr, Sroussi HY: Utility of toluidine blue in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma: continuing research and implications for clinical practice. *Head Neck* 2007; 29(10):948-958.
- [18] Lingen MW, Kalmar JR, Karrison T, Speight PM: Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. *Oral Oncol* 2008; 44(1):10-22.
- [19] Patton LL, Epstein JB, Kerr AR: Adjunctive techniques for oral cancer examination and lesion diagnosis: a systematic review of the literature. *J Am Dent Assoc* 2008; 139(7):896-905.
- [20] Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Muller-Richter U, Kosmehl H et al: Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *J Dtsch Dermatol Ges* 2007; 5(12):1095-1100.
- [21] Kellokoski J, Syrjanen S, Kataja V, Yliskoski M, Syrjanen K: Acetowhite staining and its significance in diagnosis of oral mucosal lesions in women with genital HPV infections. *J Oral Pathol Med* 1990; 19(6):278-283.
- [22] Fedele S: Diagnostic aids in the screening of oral cancer. *Head Neck Oncol* 2009; 1(1):5.
- [23] Andrea M, Dias O, Santos A: Contact endoscopy during microlaryngeal surgery: a new technique for endoscopic examination of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104(5):333-339.
- [24] Andrea M, Dias O, Santos A: Contact endoscopy of the vocal cord: normal and pathological patterns. *Acta Otolaryngol* 1995; 115(2):314-316.
- [25] Wardrop PJ, Sim S, McLaren K: Contact endoscopy of the larynx: a quantitative study. *J Laryngol Otol* 2000; 114(6):437-440.
- [26] Arens C, Glanz H, Dreyer T, Malzahn K: Compact endoscopy of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003; 112(2):113-119.
- [27] Upile T, Fisher C, Jerjes W, El Maaytah M, Singh S, Sudhoff H et al: Recent technological developments: in situ histopathological interrogation of surgical tissues and resection margins. *Head Face Med* 2007; 3:13.:13.
- [28] Cikojevic D, Gluncic I, Pesutic-Pisac V: Comparison of contact endoscopy and frozen section histopathology in the intra-operative diagnosis of laryngeal pathology. *J Laryngol Otol* 2008; 122(8):836-839.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- [29] Sciubba JJ: Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. *J Am Dent Assoc* 1999; 130(10):1445-1457.
- [30] Poate TW, Buchanan JA, Hodgson TA, Speight PM, Barrett AW, Moles DR et al: An audit of the efficacy of the oral brush biopsy technique in a specialist Oral Medicine unit. *Oral Oncol* 2004; 40(8):829-834.
- [31] Scheifele C, Schmidt-Westhausen AM, Dietrich T, Reichart PA: The sensitivity and specificity of the OralCDx technique: evaluation of 103 cases. *Oral Oncol* 2004; 40(8):824-828.
- [32] Svirsky JA, Burns JC, Carpenter WM, Cohen DM, Bhattacharyya I, Fantasia JE et al: Comparison of computer-assisted brush biopsy results with follow up scalpel biopsy and histology. *Gen Dent* 2002; 50(6):500-503.
- [33] Johannson A, Kromer K, Sroka R, Stepp H: Clinical optical diagnostics – Status and perspectives. *Med Las Appl* 2008. 23[4], 155-174.
- [34] Zhou L, El Deiry WS: Multispectral fluorescence imaging. *J Nucl Med* 2009; 50(10):1563-1566.
- [35] DaCosta RS, Wilson BC, Marcon NE: Fluorescence and spectral imaging. *ScientificWorldJournal* 2007; 7:2046-71.:2046-2071.
- [36] Backman V, Wallace MB, Perelman LT, Arendt JT, Gurjar R, Muller MG et al: Detection of preinvasive cancer cells. *Nature* 2000; 406(6791):35-36.
- [37] De Veld DC, Witjes MJ, Sterenborg HJ, Roodenburg JL: The status of in vivo autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology. *Oral Oncol* 2005; 41(2):117-131.
- [38] Wagnieres GA, Star WM, Wilson BC: In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem Photobiol* 1998; 68(5):603-632.
- [39] Pollack MA, Taylor A, Taylor J, Williams RJ: B vitamins in cancerous tissues. I. Riboflavins. *Cancer Res* 2[11], 739-742. 1942.
- [40] Schwartz JP, Passonneau JV, Johnson GS, Pastan I: The effect of growth conditions on NAD<sup>+</sup> and NADH concentrations and the NAD<sup>+</sup>:NADH ratio in normal and transformed fibroblasts. *J Biol Chem* 1974; 249(13):4138-4143.
- [41] Schneckenburger H, Schneckenburger H, Gschwend MH, Gschwend MH, Paul RJ, Paul RJ et al: Time-gated spectroscopy of intrinsic fluorophores in cells and tissues. *Proc SPIE* 1995; 2324(1):187-195.
- [42] Uppal A, Gupta PK: Measurement of NADH concentration in normal and malignant human tissues from breast and oral cavity. *Biotechnol Appl Biochem* 2003; 37(Pt 1):45-50.

- [43] Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, Flotte TJ, Richter JM, Nishioka NS et al: Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential. *Lasers Surg Med* 1992; 12(1):63-78.
- [44] Koenig F, McGovern FJ, Althausen AF, Deutsch TF, Schomacker KT: Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer. *J Urol* 1996; 156(5):1597-1601.
- [45] Stepp H, Baumgartner R, Kriegmair M, Hofstetter A (Hrsg.): Biological Principles of Fluorescence Cystoscopy. In: Fluorescence Diagnosis of bladdertumor using 5-aminolevulinic acid - Fundamentals and Results. 1999. Endo Press, Tuttlingen, 18-24.
- [46] Arens C, Glanz H, Wonckhaus J, Hersemeyer K, Kraft M: Histologic assessment of epithelial thickness in early laryngeal cancer or precursor lesions and its impact on endoscopic imaging. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007; 264(6):645-649.
- [47] Betz CS, Leunig A: Potential and limitations of fluorescence diagnosis and photodynamic therapy. Part I: Fluorescence diagnosis. *HNO* 2003; 51(12):1019-1033.
- [48] Branzan AL, Landthaler M, Szeimies RM: In vivo confocal scanning laser microscopy in dermatology. *Lasers Med Sci* 2007; 22(2):73-82.
- [49] Nehal KS, Gareau D, Rajadhyaksha M: Skin imaging with reflectance confocal microscopy. *Semin Cutan Med Surg* 2008; 27(1):37-43.
- [50] Kaufman SC, Musch DC, Belin MW, Cohen EJ, Meisler DM, Reinhart WJ et al: Confocal microscopy: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2004; 111(2):396-406.
- [51] Dhaliwal JS, Kaufman SC, Chiou AG: Current applications of clinical confocal microscopy. *Curr Opin Ophthalmol* 2007; 18(4):300-307.
- [52] Tahwinder U: Head & neck optical diagnostics: vision of the future of surgery. *Head & Neck Oncology*, 2009. 1[25].
- [53] Wang LV: Prospects of photoacoustic tomography. *Med Phys* 2008; 35(12):5758-5767.
- [54] Burns JA, Zeitels SM, Anderson RR, Kobler JB, Pierce MC, de Boer JF: Imaging the mucosa of the human vocal fold with optical coherence tomography. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005; 114(9):671-676.
- [55] Sergeev A, Gelikonov V, Gelikonov G, Feldchtein F, Kuranov R, Gladkova N et al: In vivo endoscopic OCT imaging of precancer and cancer states of human mucosa. *Opt Express* 1997; 1(13):432-440.
- [56] Ridgway JM, Armstrong WB, Guo S, Mahmood U, Su J, Jackson RP et al: In vivo optical coherence tomography of the human oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 132(10):1074-1081.
- [57] Ridgway JM, Ahuja G, Guo S, Su J, Mahmood U, Chen Z et al: Imaging of the Pediatric Airway Using Optical Coherence Tomography. *Laryngoscope* 2007; 117(12):2206-2212.



- [58] Armstrong WB, Ridgway JM, Vokes DE, Guo S, Perez J, Jackson RP et al: Optical coherence tomography of laryngeal cancer. *Laryngoscope* 2006; 116(7):1107-1113.
- [59] Bibas AG, Podoleanu AG, Cucu RG, Bonmarin M, Dobre GM, Ward VM et al: 3-D optical coherence tomography of the laryngeal mucosa. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2004; 29(6):713-720.
- [60] Guo S, Hutchison R, Jackson RP, Kohli A, Sharp T, Orwin E et al: Office-based optical coherence tomographic imaging of human vocal cords. *J Biomed Opt* 2006; 11(3):30501.
- [61] Klein AM, Pierce MC, Zeitels SM, Anderson RR, Kobler JB, Shishkov M et al: Imaging the human vocal folds in vivo with optical coherence tomography: a preliminary experience. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006; 115(4):277-284.
- [62] Kraft M, Luerssen K, Lubatschowski H, Glanz H, Arens C: Technique of optical coherence tomography of the larynx during microlaryngoscopy. *Laryngoscope* 2007; 117(5):950-952.
- [63] Luerssen K, Lubatschowski H, Ursinus K, Gasse H, Koch R, Ptok M: Optical coherence tomography in the diagnosis of vocal folds. *HNO* 2006; 54(8):611-615.
- [64] Wong BJ, Jackson RP, Guo S, Ridgway JM, Mahmood U, Su J et al: In vivo optical coherence tomography of the human larynx: normative and benign pathology in 82 patients. *Laryngoscope* 2005; 115(11):1904-1911.
- [65] Wilder-Smith P, Hammer-Wilson MJ, Zhang J, Wang Q, Osann K, Chen Z et al: In vivo imaging of oral mucositis in an animal model using optical coherence tomography and optical Doppler tomography. *Clin Cancer Res* 2007; 13(8):2449-2454.
- [66] Podoleanu AG: Optical coherence tomography. *Br J Radiol* 2005; 78(935):976-988.
- [67] Cahill RA, Asakuma M, Trunzo J, Schomisch S, Wiese D, Saha S et al: Intraoperative virtual biopsy by fibered optical coherence tomography (OCT) at natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES). *J Gastrointest Surg* 2010; 14(4):732-738.
- [68] Davis C, Kuang W: Optical coherence tomography: a novel modality for scrotal imaging. *Can Urol Assoc J* 2009; 3(4):319-322.
- [69] Djalilian HR, Ridgway J, Tam M, Sepehr A, Chen Z, Wong BJ: Imaging the human tympanic membrane using optical coherence tomography in vivo. *Otol Neurotol* 2008; 29(8):1091-1094.
- [70] Kraft M, Glanz H, von Gerlach S, Wisweh H, Lubatschowski H, Arens C: Clinical value of optical coherence tomography in laryngology. *Head Neck* 2008; 30(12):1628-1635.
- [71] Choma MA, Sarunic MV, Yang C, Izatt JA: Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography. *Optics Express* 2003; 11[18], 2183-2189.

- [72] Sepehr A, Armstrong WB, Guo S, Su J, Perez J, Chen Z et al: Optical coherence tomography of the larynx in the awake patient. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 138(4):425-429.
- [73] Guo S, Yu L, Sepehr A, Perez J, Su J, Ridgway JM et al: Gradient-index lens rod based probe for office-based optical coherence tomography of the human larynx. *J Biomed Opt* 2009; 14(1):014017.
- [74] Just T, Lankenau E, Huttmann G, Pau HW: Intra-operative application of optical coherence tomography with an operating microscope. *J Laryngol Otol* 2009;1-4.
- [75] Tsai MT, Lee HC, Lee CK, Yu CH, Chen HM, Chiang CP et al: Effective indicators for diagnosis of oral cancer using optical coherence tomography. *Opt Express* 2008; 16(20):15847-15862.
- [76] Tsai MT, Lee HC, Lu CW, Wang YM, Lee CK, Yang CC et al: Delineation of an oral cancer lesion with swept-source optical coherence tomography. *J Biomed Opt* 2008; 13(4):044012.
- [77] Lingley-Papadopoulos CA, Loew MH, Manyak MJ, Zara JM: Computer recognition of cancer in the urinary bladder using optical coherence tomography and texture analysis. *J Biomed Opt* 2008; 13(2):024003.
- [78] Lingley-Papadopoulos CA, Loew MH, Zara JM: Wavelet analysis enables system-independent texture analysis of optical coherence tomography images. *J Biomed Opt* 2009; 14(4):044010.
- [79] Shakhov AV, Terentjeva AB, Kamensky VA, Snopova LB, Gelikonov VM, Feldchtein FI et al: Optical coherence tomography monitoring for laser surgery of laryngeal carcinoma. *J Surg Oncol* 2001; 77(4):253-258.
- [80] Fomina I, Gladkova ND, Leont'ev VK, Urutina MN, Gazhva SI, Snopova LB et al: [Optical coherence tomography in the evaluation of the oral cavity mucosa. Part II. Benign and malignant diseases]. *Stomatologiya (Mosk)* 2004; 83(4):25-32.
- [81] Fomina I, Urutina MN, Leont'ev VK, Gladkova ND, Gazhva SI, Snopova LB et al: [Optic coherent tomography in evaluation of the buccal mucosa status. Communication 1. Normal mucosa]. *Stomatologiya (Mosk)* 2004; 83(3):15-21.
- [82] Hanna NM, Waite W, Taylor K, Jung WG, Mukai D, Matheny E et al: Feasibility of three-dimensional optical coherence tomography and optical Doppler tomography of malignancy in hamster cheek pouches. *Photomed Laser Surg* 2006; 24(3):402-409.
- [83] Karamzadeh AM, Jackson R, Guo S, Ridgway JM, Wong HS, Ahuja GS et al: Characterization of submucosal lesions using optical coherence tomography in the rabbit subglottis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 131(6):499-504.
- [84] Nassif NA, Armstrong WB, de Boer JF, Wong BJ: Measurement of morphologic changes induced by trauma with the use of coherence tomography in porcine vocal cords. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 133(6):845-850.

- [85] Torkian BA, Guo S, Jahng AW, Liaw LH, Chen Z, Wong BJ: Noninvasive measurement of ablation crater size and thermal injury after CO<sub>2</sub> laser in the vocal cord with optical coherence tomography. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 134(1):86-91.
- [86] Wilder-Smith P, Krasieva T, Jung WG, Zhang J, Chen Z, Osann K et al: Noninvasive imaging of oral premalignancy and malignancy. *J Biomed Opt* 2005; 10(5):051601.
- [87] Wilder-Smith P, Lee K, Guo S, Zhang J, Osann K, Chen Z et al: In vivo diagnosis of oral dysplasia and malignancy using optical coherence tomography: preliminary studies in 50 patients. *Lasers Surg Med* 2009; 41(5):353-357.
- [88] Zuluaga AF, Follen M, Boiko I, Malpica A, Richards-Kortum R: Optical coherence tomography: a pilot study of a new imaging technique for noninvasive examination of cervical tissue. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193(1):83-88.
- [89] Escobar PF, Belinson JL, White A, Shakhova NM, Feldchtein FI, Kareta MV et al: Diagnostic efficacy of optical coherence tomography in the management of preinvasive and invasive cancer of uterine cervix and vulva. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14(3):470-474.
- [90] Escobar PF, Rojas-Espaillet L, Tisci S, Enerson C, Brainard J, Smith J et al: Optical coherence tomography as a diagnostic aid to visual inspection and colposcopy for preinvasive and invasive cancer of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16(5):1815-1822.
- [91] Liu Z, Belinson SE, Li J, Yang B, Wulan N, Tresser NJ et al: Diagnostic efficacy of real-time optical coherence tomography in the management of preinvasive and invasive neoplasia of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2010; 20(2):283-287.
- [92] Hermes B, Spoler F, Naami A, Bornemann J, Forst M, Grosse J et al: Visualization of the basement membrane zone of the bladder by optical coherence tomography: feasibility of noninvasive evaluation of tumor invasion. *Urology* 2008; 72(3):677-681.
- [93] Wang Z, Lee CS, Waltzer WC, Liu J, Xie H, Yuan Z et al: In vivo bladder imaging with microelectromechanical-systems-based endoscopic spectral domain optical coherence tomography. *J Biomed Opt* 2007; 12(3):034009.
- [94] Manyak MJ, Gladkova ND, Makari JH, Schwartz AM, Zagaynova EV, Zolfaghari L et al: Evaluation of superficial bladder transitional-cell carcinoma by optical coherence tomography. *J Endourol* 2005; 19(5):570-574.
- [95] Goh AC, Tresser NJ, Shen SS, Lerner SP: Optical coherence tomography as an adjunct to white light cystoscopy for intravesical real-time imaging and staging of bladder cancer. *Urology* 2008; 72(1):133-137.
- [96] Zagaynova E, Gladkova N, Shakhova N, Gelikonov G, Gelikonov V: Endoscopic OCT with forward-looking probe: clinical studies in urology and gastroenterology. *J Biophotonics* 2008; 1(2):114-128.

- [97] Karl A, Stepp H, Willmann E, Buchner A, Hocaoglu Y, Stief C et al: Optical coherence tomography for bladder cancer -- ready as a surrogate for optical biopsy? Results of a prospective mono-centre study. *Eur J Med Res* 2010; 15(3):131-134.
- [98] Pitris C, Jesser C, Boppart SA, Stamper D, Brezinski ME, Fujimoto JG: Feasibility of optical coherence tomography for high-resolution imaging of human gastrointestinal tract malignancies. *J Gastroenterol* 2000; 35(2):87-92.
- [99] Westphal V, Rollins AM, Willis J, Sivak MV, Izatt JA: Correlation of endoscopic optical coherence tomography with histology in the lower-GI tract. *Gastrointest Endosc* 2005; 61(4):537-546.
- [100] Isenberg G, Sivak MV, Jr., Chak A, Wong RC, Willis JE, Wolf B et al: Accuracy of endoscopic optical coherence tomography in the detection of dysplasia in Barrett's esophagus: a prospective, double-blinded study. *Gastrointest Endosc* 2005; 62(6):825-831.
- [101] Hatta W, Uno K, Koike T, Yokosawa S, Iijima K, Imatani A et al: Optical coherence tomography for the staging of tumor infiltration in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Gastrointest Endosc* 2010; 71(6):899-906.
- [102] Welzel J, Lankenau E, Birngruber R, Engelhardt R: Optical coherence tomography of the human skin. *J Am Acad Dermatol* 1997; 37(6):958-963.
- [103] Gambichler T, Moussa G, Sand M, Sand D, Altmeyer P, Hoffmann K: Applications of optical coherence tomography in dermatology. *J Dermatol Sci* 2005; 40(2):85-94.
- [104] Barton JK, Gossage KW, Xu W, Ranger-Moore JR, Saboda K, Brooks CA et al: Investigating sun-damaged skin and actinic keratosis with optical coherence tomography: a pilot study. *Technol Cancer Res Treat* 2003; 2(6):525-535.
- [105] Korde VR, Bonnema GT, Xu W, Krishnamurthy C, Ranger-Moore J, Saboda K et al: Using optical coherence tomography to evaluate skin sun damage and precancer. *Lasers Surg Med* 2007; 39(9):687-695.
- [106] Konig K, Speicher M, Buckle R, Reckfort J, McKenzie G, Welzel J et al: Clinical optical coherence tomography combined with multiphoton tomography of patients with skin diseases. *J Biophotonics* 2009; 2(6-7):389-397.
- [107] Mogensen M, Joergensen TM, Nurnberg BM, Morsy HA, Thomsen JB, Thrane L et al: Assessment of Optical Coherence Tomography Imaging in the Diagnosis of Non-Melanoma Skin Cancer and Benign Lesions Versus Normal Skin: Observer-Blinded Evaluation by Dermatologists and Pathologists. *Dermatol Surg* 2009 Jun;35(6):965-72.
- [108] Jorgensen TM, Tycho A, Mogensen M, Bjerring P, Jemec GB: Machine-learning classification of non-melanoma skin cancers from image features obtained by optical coherence tomography. *Skin Res Technol* 2008; 14(3):364-369.
- [109] Wilder-Smith P, Jung WG, Brenner M, Osann K, Beydoun H, Messadi D et al: In vivo optical coherence tomography for the diagnosis of oral malignancy. *Lasers Surg Med* 2004; 35(4):269-275.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- [110] Just T, Lankenau E, Huttmann G, Pau HW: Intra-operative application of optical coherence tomography with an operating microscope. *J Laryngol Otol* 2009;1-4.
- [111] Boudoux C, Leuin SC, Oh WY, Suter MJ, Desjardins AE, Vakoc BJ et al: Optical microscopy of the pediatric vocal fold. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 135(1):53-64.
- [112] Just T, Stave J, Bombor I, Kreutzer HJ, Guthoff R, Pau HW: In vivo diagnosis of epithelial changes of the oropharynx using confocal microscopy. *Laryngorhinootologie* 2008; 87(3):174-180.
- [113] Clark AL, Gillenwater A, Alizadeh-Naderi R, El Naggari AK, Richards-Kortum R: Detection and diagnosis of oral neoplasia with an optical coherence microscope. *J Biomed Opt* 2004; 9(6):1271-1280.
- [114] Arens C, Glanz H: Endoscopic high-frequency ultrasound of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999; 256(6):316-322.
- [115] Arens C, Malzahn K, Dias O, Andrea M, Glanz H: Endoscopic imaging techniques in the diagnosis of laryngeal carcinoma and its precursor lesions. *Laryngorhinootologie* 1999; 78(12):685-691.
- [116] Vogt M, Knüttel A, Hoffmann K, Altmeyer P, Ermert H: Comparison of high frequency ultrasound and optical coherence tomography as modalities for high resolution and non invasive skin imaging. *Biomed Tech (Berl)* 2003; 48(5):116-121.
- [117] Yuan Z, Wang Z, Pan R, Liu J, Cohen H, Pan Y: High-resolution imaging diagnosis and staging of bladder cancer: comparison between optical coherence tomography and high-frequency ultrasound. *J Biomed Opt* 2008; 13(5):054007.

## **7. Danksagung**

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Christian S. Betz für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung dieser Dissertation. Vielen Dank für die motivierenden Worte, die fruchtbaren Diskussionen, die Durchsicht des Manuskripts und die nette Zusammenarbeit.

Großer Dank gebührt dem gesamten Team der HNO-Poliklinik des Klinikums Großhadern, für die Hilfe bei der Patientenrekrutierung und für die geduldige Unterstützung meiner Forschungsarbeit.

Herrn Dr. rer. biol. hum. Herbert Stepp und allen Mitarbeitern des Laserforschungslabors danke ich für die herzliche Aufnahme ins Team, für das Bereitstellen meines Arbeitsplatzes, für die Betreuung der physikalischen Aspekte meiner Doktorarbeit und für die vielen wertvollen Anregungen und das stets offene Ohr für alle meine Fragen.

Ein weiterer großer Dank geht an den Pathologen Herrn PD Dr. Stephan Ihrler für die gemeinsame Besprechung der histologischen Schnittbilder, für die aufgebrauchte Geduld und die konstruktive Kritik.

Weiters bedanken möchte ich mich bei der Imalux Corporation für die Bereitstellung des Niris OCT-Gerätes und ganz besonders bei Dr. Nancy Tresser für die verblindete Beurteilung meiner OCT-Bilder.

Vielen Dank auch an PD Dr. Marcel Kraft, HNO Kantonsspital Aarau, für die verblindete Bewertung meiner OCT-Bilder.

Last but not least möchte ich meiner Familie für ihre aufmunternde Unterstützung und für ihren Glauben an mich danken- ohne sie wäre das alles nicht möglich gewesen.