

**Autofluoreszenz – Diagnostik
bei Patienten mit Erkrankungen des
Mund – Rachen – Kehlkopfbereiches**

Thomas Makryniotis

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

**Autofluoreszenz – Diagnostik
bei Patienten mit Erkrankungen des
Mund – Rachen – Kehlkopfbereiches**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig – Maximilians – Universität
von München

vorgelegt von
Thomas Makryniotis

aus Thessaloniki, Griechenland

2010

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
Der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Christian Betz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Karl Häußinger
PD Dr. Patrick J. Bastian

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Andreas Leunig

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

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2010

*„σωφρονεῖν ἀρετὴ μεγίστη, καὶ σοφίη ἀληθέα
λέγειν καὶ ποιεῖν κατὰ φύσιν ἐπαίοντας.“
[Ἡράκλειτος ὁ Ἐφέσιος]*

*„Richtiges Bewusstsein ist die größte Tugend,
und Weisheit (ist es), Wahres zu sagen und zu
handeln nach der Natur, auf sie hinhörend.“
[Heraklit von Ephesos]*

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	7
1. Problemstellung.....	7
2. Biologische Grundlagen.....	11
2.1. <i>Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes</i>	11
2.2. <i>Präkanzerosen</i>	16
2.3. <i>Gutartige Neubildungen</i>	19
2.4. <i>Nicht - tumoröse Neubildungen</i>	20
3. Physikalische Grundlagen.....	21
4. Zielsetzung.....	26
III. Material und Methode	27
1. Auswahl der Patienten.....	27
2. Durchführung der Autofluoreszenzdiagnostik.....	29
3. Experimenteller Aufbau.....	30
3.1 <i>Modifiziertes Endoskop</i>	31
3.2 <i>Lichtleiter</i>	33
3.3 <i>Das D - Light (- C) - System</i>	34
3.4 <i>CCD - Kamera</i>	36
3.5 <i>Zusammenfassung der Unterschiede zwischen den beiden AF - Systeme</i>	38
3.6 <i>Dokumentation</i>	39
3.7 <i>Bilddarstellung</i>	40
3.8 <i>Begriffsklärungen</i>	41
III. Ergebnisse	42
1. Interpretation der dargestellten Autofluoreszenz.....	42
2. Zusammenfassende Ergebnisse.....	46
2.1 <i>Auswertung der Läsionen</i>	47
2.2 <i>Auswertung der Biopsien</i>	54
IV. Diskussionen	60
1. Auswahl der Patienten.....	60
2. Durchführung der Autofluoreszenzendoskopie.....	61
3. Experimenteller Aufbau.....	62
3.1 <i>Modifiziertes Endoskop</i>	62
3.2 <i>Lichtleiter</i>	63

3.3 Das D - Light (- C) - System.....	63
3.4 Mögliche Fehlerquellen.....	64
4. Diagnosestellung.....	65
5. Ergebnisse	67
5.1 Allgemeine Schlussfolgerungen.....	67
5.2 Ergebnisse hinsichtlich der untersuchten Läsionen.....	69
5.3 Ergebnisse hinsichtlich der entnommenen Biopsien.....	70
6. Vergleich der Autofluoreszenzdiagnostik mit dem STORZ – System mit anderen Untersuchungsmethoden	72
V. Schlussfolgerung und Perspektiven	78
VI. Zusammenfassung	79
VII. Literatur.....	83
VIII. Danksagung	89

I. Einleitung

1. Problemstellung

Bösartige Tumore des oberen Aerodigestivtraktes stehen hinsichtlich ihrer Häufigkeit an sechster Stelle aller Krebserkrankungen. Hierbei handelt es sich histologisch zu über 90% um Plattenepithelkarzinome, die hinsichtlich der Mortalitätsrate seit Jahrzehnten eine Stagnation aufweisen. Obwohl es verlässliche Angaben zur Gesamtzahl bösartiger Kopf-Hals-Tumoren nicht gibt, wird geschätzt, dass pro Jahr etwa 50 von 100.000 Deutschen an Krebs im Kopf – Halsbereich erkranken (Deutsche Krebsgesellschaft 2009).

In Deutschland erkrankten im Jahr 2004 etwa 3000 Männer und rund 400 Frauen an Kehlkopfkrebs. Beide Geschlechter erkranken im Mittel um das 64. Lebensjahr, etwa fünf Jahre früher als an Krebs gesamt. Bei Männern hat Kehlkopfkrebs einen Anteil an allen Krebserkrankungen von 1,3 %, bei Frauen hingegen nur von 0,2 %. Die relativen 5 – Jahres – Überlebensraten für Kehlkopfkrebs liegen für Männer bei 61 % und Frauen bei etwa 62 % (abhängig von Lokalisation und Stadium der Tumorerkrankung).

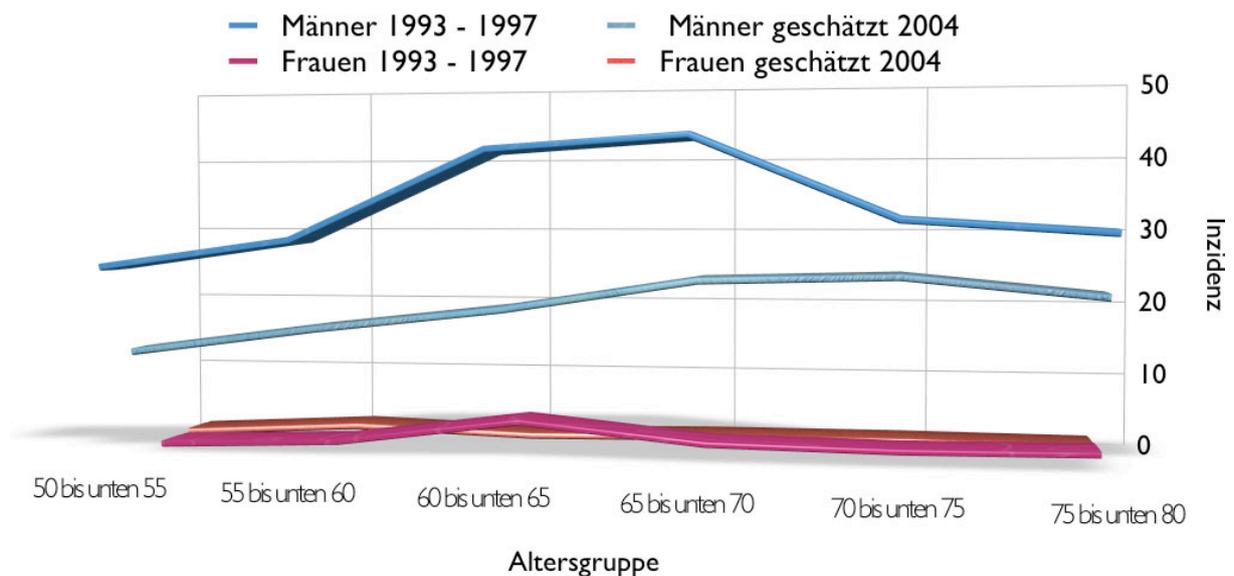
Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens umfassen bösartige Neubildungen der Lippe, der Zunge, des Mundbodens, des Gaumens, der Speicheldrüsen und des Rachens. Männer erkranken deutlich häufiger an Krebs von Mundhöhle und Rachen als Frauen. So ist die geschätzte Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland bei Männern mit 7.600 fast dreimal so hoch wie bei Frauen (2.800). Mit einem Anteil von 3,3 % an allen Krebsneuerkrankungen stehen diese Krebsformen bei Männern hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeit an siebter Stelle (Frauen 1,4 %, 15. Stelle). Die relativen 5 – Jahres – Überlebensraten für die zusammen betrachteten Lokalisationen der Mundhöhle und des Rachens betragen für Männer 47 % und für Frauen 55 % (Robert Koch Institut 2009).



Graphik I. 1 Die 5-Jahres-Überlebensrate von im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes lokalisierten Tumoren bei Männern und Frauen (Robert Koch Institut)

Faktoren, die die Anzahl der Neuerkrankungen und Mortalität beeinflussen, sind hauptsächlich wirtschaftliche, geographische und soziale Unterschiede zwischen den Patienten. So ist der Anteil der Neuerkrankten (Inzidenz) in Ländern wie zum Beispiel Uruguay und Polen relativ hoch, während diese in Länder wie Australien, Syrien und Singapur vergleichsweise kleiner ist (International agency for research on cancer 2009).

Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass von dieser Erkrankung am häufigsten Patienten zwischen dem 55. und 65. Lebensalter betroffen sind. Die Inzidenz von Rachenkarzinomen ist im 7. Lebensjahrzehnt, die von Mundhöhlen- und Larynxkarzinomen eher im 6. Lebensjahrzehnt am höchsten. Das Erkrankungsalter zeigt in den letzten Jahren eine Verlagerungstendenz in die jüngeren Jahrgänge. Männer erkranken an Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinomen dreimal häufiger, an Larynxkarzinome bis neunmal häufiger als Frauen, wobei die Anzahl der Neuerkrankungen bei Frauen eine steigende Tendenz aufweist (Deutsche Krebsgesellschaft 2009).



Graphik I. 2 Durchschnittliche jährliche Inzidenz pro 100,000 nach Altersgruppen in Deutschland für das Kehlkopfkarcinom (International Agency for Research in Cancer, World Health Organisation, Robert Koch Institut)

Mangelnde Mundhygiene, Alkohol – und Nikotinabusus, besonders bei Pfeifenrauchern, wirken sich zeitgleich auf verschiedene Bereiche des oberen Aerodigestivtraktes aus und verursachen so die Entwicklung multipler Primärtumoren, die unabhängig voneinander sind (Slaughter et al. 1953). Nur wenige Risikofaktoren haben eine so enge Beziehung zur verursachten Krankheit wie das Rauchen zum Karzinom des oberen Luft – und Speiseweges. Das Risiko eines Rauchers ist mindestens zehnmals höher als bei einem Nichtraucher. Die Dauer des Rauchens und das Alter spielt eine größere Rolle als die Menge der gerauchten Zigaretten pro Tag. Besonders auffällig ist das Risiko bei Rauchern, die vor dem 15. Lebensjahr mit dem Rauchen begonnen haben. Die Ergebnisse der größten epidemiologischen Studie der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation 2009) über den Zusammenhang u.a. zwischen Ernährung und Krebs bestätigen, zusätzlich zum offensichtlichen Einfluss des Tabaks auf Risiko von Lungenkrebs, die sehr starke Wirkung des Alkohol – und Tabakkonsums auf Krebserkrankungen des oberen Aerodigestivtraktes. Zum Beispiel ist das Risiko für eine dieser Krebsarten für jemanden, der über eine Schachtel Zigaretten pro Tag raucht, 8-mal höher als bei einem Nichtraucher.

Was den Zusammenhang von Alkoholkonsum und Larynxkarzinome angeht, ist relativ wenig erwiesen. Eine tägliche Ethanolaufnahme von über 60 Gramm (grob geschätzt der Konsum einer 0.75 Weinflasche jeden Tag) erhöht das Krebsrisiko ca. 9-fach. Die Kanzerogenese und die Tumorausbreitung werden auf jeden Fall durch die alkoholtoxischen Folgeerkrankungen begünstigt (Deutsche Krebsgesellschaft 2009). Hierbei ist zu betonen, dass die Kombination von Tabak und Alkohol einen Multiplikatoreffekt zeigt, welcher das Krebsrisiko für einen Raucher – Trinker ca. 50-fach erhöht (World Health Organisation 2009)!

Moderne Therapieverfahren wie zum Beispiel die Laserresektion oder die Radiochemotherapie sowie die aufeinander abgestimmte Kombinationen derselben konnten zwar die lokale Kontrolle von Kopf – Hals – Karzinomen verbessern, die 5 – Jahres – Überlebensrate hat sich in den letzten 25 Jahren jedoch nicht signifikant verändert. Daher ist die Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Verfahren, sowie die weitere ausführliche Untersuchung der Kanzerogenese nötig geworden (Bradley et al. 2006, Dietz et al. 2008, Lippert et al. 1994, Rudert et al. 1995, Werner et al. 1999, Werner et al. 2002). Die Sterblichkeit an Kehlkopfkrebs geht bei Männern erst seit 1990 zurück, bei Frauen bleibt sie seitdem weitgehend unverändert. Fast das Gleiche gilt auch für die Sterblichkeit an Karzinomen der Mundhöhle und des Rachens. Bei Männern ist seit 1990 ein deutlich fallender Trend zu verzeichnen, bei Frauen weist sie einen leichten Rückgang auf (Deutsche Krebsgesellschaft 2009, World Health Organisation 2009).

Eine Früherkennung von solchen bösartigen Veränderungen, sowie eine sichere intraoperative Methode zur Darstellung der Tumorgrenze können dieser ungünstigen Prognose entgegen wirken. Die bisher existierenden, diagnostischen Verfahren wie Inspektion, Endoskopie, Palpation und verschiedene radiologische Verfahren sind leider nicht in der Lage, solchen Anforderungen zu genügen. Außerdem sind spezifische Marker für Karzinome im Kopf – Hals – Bereich bisher nicht bekannt (Bohuslavizki et al. 2000, Werner et al. 2004). Vorstufen und Frühstadien von malignen Veränderungen wie Dysplasien 3. Grades, Carcinomata in situ und mikroinvasive Tumoren werden häufig übersehen, weil sie sich nur als kontrastarme Schleimhautveränderungen, Rauigkeiten oder Rötungen darstellen und selten morphologische Tumorcharakteristika aufweisen. Entscheidend wirkt sich hier auch

die schlechte Zugänglichkeit des erkrankten Gewebes aus. Zudem treibt die für Krebserkrankungen typische, initiale Symptomenarmut die Patienten erst spät zum Arzt. Folglich findet eine Erstdiagnose häufig erst im fortgeschrittenen Stadium statt, was wiederum das Therapieergebnis der konventionellen Methoden, wie Operation und Strahlentherapie, deutlich verschlechtert, weil dieses von der initialen Tumorausdehnung und –Größe abhängig ist (Dunne et al. 2004, Dunne et al. 2006, Werner et al. 2002). Zusätzlich wird die Prognose der Patienten bei später Erstdiagnose durch das gehäufte Auftreten lymphogener Metastasen weiter verschlechtert. Je nach Lokalisation haben bis zu 60 % der Patienten bei der Erstdiagnose bereits Halslymphknotenmetastasen. Gleichzeitig kommen bei fast 15 % der Fälle Zweitkarzinome an anderen Stellen des Schluckweges vor. Fernmetastasen sind meistens erst in den späten Krankheitsstadien zu finden und bestimmen nur selten den eigentlichen Krankheitsverlauf.

2. Biologische Grundlagen

2.1. Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes

Das Plattenepithelkarzinom ist ein bösartiger, epithelialer Tumor mit regionaler und Fernmetastasierung. Es stellt die häufigste bösartige Veränderung des oberen Luft – Speise – Wegs dar, und ist charakterisiert durch seine plattenepitheliale Differenzierung und zumeist auch die Bildung von Keratin (Horch 2007).

Malignome des Alveolarfortsatzes, des Ober – und Unterkiefers, der Retromolarregion, des Mundbodens, des harten und weichen Gaumens und der vorderen zwei Drittel der Zunge (begrenzt durch die Papillae vallatae) werden der Mundhöhle zugeordnet (Kademani et al. 2007). Meistens werden hierzu auch die Karzinome der Lippen hinzugezählt. Bösartige, epitheliale Geschwülste der Tonsillarregion, des hinteren Drittels der Zunge (Zungengrund), der lateralen und der dorsalen Pharynxwand, der Valleculae sowie der lingualen Epiglottisfläche werden als Oropharynxkarzinome bezeichnet. Leider entstehen Karzinome am häufigsten in der kaudalen Etage der Mundhöhle, die für die Patienten unsichtbar ist, obwohl theoretisch jede Stelle im Mund – Rachenraum denkbar ist (Bsoul et al. 2005,

Casiglia et al. 2001, Kademani et al. 2007). Solche maligne Veränderungen bedürfen einer besonders frühzeitigen Diagnose, weil sie relativ früh in die regionalen Lymphknoten metastasieren (Laskaris 2003, Schwenzer, Ehrenfeld 2000).

Der Kehlkopf wird in drei Etagen unterteilt: Die supraglottische Region erstreckt sich zwischen der laryngealen Fläche der Epiglottis und dem Sinus morgagni. Inferior schließt sich die glottische Region an, die sich nach kaudal bis ca. 10 mm inferior des freien Stimmlippenrandes ausdehnt. Die infraglottische Region schließlich befindet sich zwischen glottischer Region und der Unterkante des Ringknorpels. Entsprechend unterscheidet man bei den bösartigen Veränderungen im Kehlkopfbereich supraglottische, glottische und subglottische Tumoren. Im deutschsprachigen Raum handelt es sich bei über 65 % der malignen Veränderungen des Kehlkopfes, also bei etwa zwei Dritteln, um Tumoren im Bereich der Glottis. Supraglottische Tumoren sind mit etwa 30 % die zweithäufigsten bösartigen Veränderungen, wobei primär subglottische Tumore sehr selten sind. Larynxkarzinome können aus typischen Präkanzerosen, wie Leukoplakie oder Papillom des Erwachsenen hervorgehen oder sollen als Folge chronischer Laryngitiden entstehen. Heiserkeit bei glottischen und Schluckbeschwerden bei supraglottischen Karzinomen sind die charakteristischen Erstsymptome (Berghaus 1996, Lippert 2006, Schumacher 1997).

Auch der Pharynx wird anatomisch in drei Abschnitte unterteilt: Der Nasopharynx (od. Epipharynx), der Oropharynx (od. Mesopharynx), und der Laryngopharynx (od. Hypopharynx). In jedem dieser Abschnitte kann sich ein Tumor entwickeln (Nasopharynx-, Oropharynx-, und Hypopharynxkarzinom). Bei den meisten Rachentumoren handelt es sich histologisch um Plattenepithelkarzinome. Charakteristisch für diese Region sind die relativ frühen lokalen und lymphogenen Metastasen. Je nach Tumorlokalisation können Nasenbluten, Halsschmerzen, Schluckbeschwerden, Heiserkeit, sowie Atemnot auftreten (Berghaus 1996, Schumacher 1997).

Wie bereits oben erwähnt, ist die initiale Tumorgroße und – Ausdehnung entscheidend für die Therapie. Es ist demnach wichtig, ein Beschreibungsschema zu

benutzen, das Größe, Infiltrationsverhalten des Primärtumors, lokoregionäre Lymphknotenmetastasen und das Vorliegen von Fernmetastasen erfasst. In dieser Arbeit wurde die Tumorklassifikation nach U.I.C.C. (Union Internationale Contre le Cancer), das sog. TNM – Schema, verwendet. Die Abkürzung T steht hierbei für Tumor, N für Nodus und M für Metastasen. Das TNM – Schema ist tumor – und lokalisationsbezogen; dies bedeutet, dass Tumorklassifikationen für verschiedene Körperregionen unterschiedlich sind. Die folgenden Tabellen beschreiben dieses Schema für Mundhöhlen–, Oropharynx– und Larynxkarzinome (Horch 2007, Schwenger, Ehrenfeld 2000).

	Kurzbezeichnung	Beschreibung
Supraglottis	T1	Tumor auf einen Unterbezirk der Supraglottis begrenzt, mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
	T2	Tumor infiltriert mehr als einen Unterbezirk der Supraglottis oder Glottis, mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
	T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmbandfixation, und/oder Tumor mit Infiltration des Postkrikoidbezirks, der medialen Wand des Sinus piriformis oder des präepiglottischen Gewebes
	T4	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und / oder breitet sich auf andere Gewebe außerhalb des Larynx aus, z.B. Oropharynx oder Weichteile des Halses
Glottis	T1	Tumor auf Stimmband (Stimmbänder) begrenzt (kann auch vordere oder hintere Kommissur befallen), mit normaler Beweglichkeit
	T1a	Tumor auf ein Stimmband begrenzt
	T1b	Tumorbefall beider Stimmbänder
	T2	Tumor breitet sich auf Supraglottis und/ oder Subglottis aus und / oder Tumor mit eingeschränkter Stimmlippenbeweglichkeit
	T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmbandfixation
	T4	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und / oder breitet sich auf andere Gewebe außerhalb des Larynx aus, wie Oropharynx oder Weichteile des Halses
Subglottis	T1	Tumor auf die Subglottis begrenzt
	T2	Tumor breitet sich auf Stimmband (Stimmbänder) aus, mit normaler oder eingeschränkter Beweglichkeit
	T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmbandfixation
	T4	Tumor infiltriert Ring- oder Schildknorpel und/ oder breitet sich auf andere Gewebe außerhalb des Larynx aus, wie Oropharynx oder Weichteile des Halses

Tab. I. 1 T - Klassifikation für die drei Etagen des Kehlkopfes.

Beurteilungskriterium	Kurzbezeichnung	Beschreibung
Mundhöhle und Oropharynx	Tis	Carcinoma in situ
	T0	Keine Primärtumor vorhanden
	T1	Primärtumor mit einem maximalen Durchmesser von 2,0 cm
	T2	Primärtumor >2,0, ≤ 4,0cm im größten Durchmesser
	T3	Primärtumor > 4cm im maximalen Durchmesser
	T4	Primärtumor mit Invasion in Nachbarorgane (z.B. Knochen, Zungenmuskulatur)
	Tx	Primärtumor nicht bestimmbar

Tab. I. 2 T - Klassifikation für die Mundhöhle und den Oropharynx.

Beurteilungskriterium	Kurzbezeichnung	Beschreibung
Lymphknotenstatus	N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachweisbar
	N1	Metastasen in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten, ≤ 3 cm
	N2a	Metastasen in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten, >3 cm, ≤ 6 cm im maximalen Durchmesser
	N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, ≤ 6 cm im maximalen Durchmesser
	N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, ≤ 6 cm im maximalen Durchmesser
	N3	Eine oder mehrere Lymphknotenmetastasen, >6 cm im maximalen Durchmesser
	Nx	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
Fernmetastasen	M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
	M1	Fernmetastasen vorhanden
	Mx	Vorhandensein bzw. Fehlen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

Tab. I. 3 NM - Klassifikation für Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes.

In der Klinik findet üblicherweise eine Stadienklassifikation Verwendung, die auf Basis der TNM – Klassifikation erstellt worden ist. Die Tumoren im Kopf – Hals – Bereich werden demnach in vier Stadien unterteilt, welche in der folgenden Abbildung dargestellt sind.

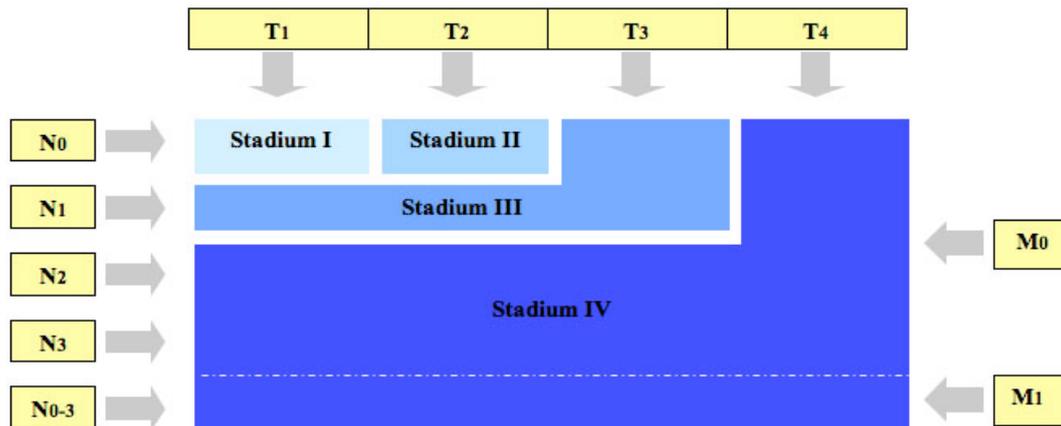


Abb. I. 2 Klinische Stadieneinteilung in Bezug auf die TNM – Klassifikation (Schwenzer, Ehrenfeld 2000)

Histologisch betrachtet werden maligne Tumoren in Grade unterteilt, die die Differenzierungseigenschaften und somit die Aggressivität des Karzinoms beschreiben („Tumorgrading“). Hierbei finden vornehmlich mikroskopische, zelluläre Anomalien im Bezug auf Wachstum, Invasivität und Kohäsionseigenschaften Beachtung und werden direkt mit dem Outcome der Patienten korreliert. Innerhalb eines Tumors existieren meist Areale mit unterschiedlichem Wachstumsverhalten und Differenzierungsgrad nebeneinander. Dieser Nachteil des Tumorgradings ist ganz entscheidend, wenn man bedenkt, wie unterschiedlich das Grading einer Biopsie von dem Grading des gesamten Tumors sein kann, und inwiefern diese Tatsache die folgende Therapie beeinflusst. Es können beispielsweise in einem langsam wachsenden, verrukösen Karzinom, welches kaum metastasiert, kleine Anteile eines aggressiveren Plattenepithelkarzinoms verborgen sein (Laskaris 2003, Schwenzer, Ehrenfeld 2000).

<i>Grading</i>	<i>Beschreibung</i>
G ₁	Gut differenziert
G ₂	Mäßig differenziert
G ₃	Schlecht differenziert
G ₄	Undifferenziert
G _x	Differenzierungsgrad nicht beurteilbar

Tab. I. 4 Das am häufigsten verwendete Schema für Tumorgrading

2. 2. Präkanzerosen

Eine andauernde Exposition der Mund-, Rachen- und Kehlkopfschleimhaut gegenüber bestimmten Toxinen (z.B. Tabak) führt zur Entstehung reaktiver, z.T. regenerativer Veränderungen im Bereich des Epithels, die differenzialdiagnostisch gegenüber echten Karzinomen abzugrenzen sind (Shibly et al. 2008). Andererseits sind bestimmte Schleimhautveränderungen bekannt dafür, dass auf deren Boden gehäuft maligne Tumoren entstehen. Aufgrund dieser Erkenntnis nennt man solche Schleimhauterkrankungen Präkanzerosen (Neville et al. 2002). Merkmal ist bei vielen Fällen eine vermehrte Verhornung, verbunden mit einer Zunahme der Durchmesser epithelialer Zellschichten. Die normale Schleimhautfarbe wird entweder durch eine weißliche Verfärbung ersetzt, die seit ihrer Erstbeschreibung vor über hundert Jahre als Leukoplakie bezeichnet wird, oder wird in Form eines roten, meistens homogenen Flecks verändert (Erythroplakie) (Reichart et al. 2003). Bei einer sog. fakultativen Präkanzerose liegt das Entartungsrisiko unter 30 % bei einer Zeitspanne von mehr als 5 Jahren zwischen Auftreten und Entartung der Präkanzerose. Obligate Präkanzerosen entarten mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 30 % in einer Zeitspanne von weniger als 5 Jahren zu einem bösartigen Tumor. Hierbei ist bei ausbleibender Behandlung mit einem nahezu 100-prozentigen Auftreten einer Krebserkrankung zu rechnen (Horch 2007).

Die Leukoplakie wird laut Definition der WHO (World Health Organisation 2009) als scharf begrenzte, weiße, nicht abwischbare Veränderung der Schleimhaut definiert, die klinisch keiner anderen Krankheit zugeordnet werden kann. Sie wurde zum ersten Mal im Jahre 1877 vom E. Schwimmer beschrieben (van der Waal et al. 2000). Die weißliche Verfärbung ist meist Zeichen der Verdickung der kernlosen

Hornschrift. Das klinische Erscheinungsbild reicht von planhomogenen, flachen oder leicht erhabenen Veränderungen mit glatt – weißer oder matt – grauweißer Farbe bis getüpfelten, bzw. gefleckten Veränderungen mit rauher, rissiger Oberfläche und ggf. Ulzerationen. Meistens besteht auch Beschwerdefreiheit und abhängig von der Lokalisation auch Symptomenarmut, so dass solche Veränderungen zumeist als Zufallsbefund diagnostiziert werden (Sciubba et al. 1995). Als kausal gelten mitunter chronischer Konsum von Alkohol und Nikotin, beruflich bedingte Chemikalienexposition, erhöhte, beruflich bedingte Stimmbelastung, chronisch – mechanische Irritationen, schlecht passender Zahnersatz, Hormonstörungen, Vitaminmangel und andere Krankheiten wie chronische Laryngitis, AIDS (Sonderform: Haarleukoplakie (Birnbauer et al. 2002, Dias et al. 2000)) und Syphilis. Eine sog. idiopathische Leukoplakie, also ohne erkennbare Ursachen, ist aber auch möglich. Makroskopisch unterscheidet man drei Leukoplakieformen:

1. einfache Leukoplakie (ca. 50 % der Fälle): sie ist charakterisiert durch eine gering höckerige, gut umschriebene, hyperkeratotische Epithelveränderung.
2. verruköse Leukoplakie (ca. 30 % der Fälle): die Schleimhautoberfläche ist warzenartig, unruhig, graurötlich verändert.
3. erosive Leukoplakie (ca. 20 % der Fälle): diese ist durch kleinfleckige, erythematöse Herde mit knötchenförmiger Oberfläche gekennzeichnet.

Das Entartungsrisiko ist bei der homogenen, einfachen Leukoplakie eher gering; die Wahrscheinlichkeit wird mit etwa 3 % innerhalb von fünf Jahren angegeben. Andererseits ist eine inhomogene Leukoplakie, mit Ulzera und Erosionen als klinisch suspekt einzustufen. Die Entartungsrate der verrukösen Form liegt bei 24 %, die der erosiven Form bei 38 %. Leukoplakische Veränderungen der Zunge, der Lippe, des Mundbodens und der Gingiva haben eine zweimalig höhere Entartungstendenz im Vergleich zu Lokalisationen am Gaumen oder an der Wange. Vorzeichen einer malignen Entartung sind Begleitentzündungen oder Schwellungen, Ulzera, und eine Zunahme der Verhornung (Cabay et al. 2007).

Eine zuverlässige Interpretation einer leukoplakischen Läsion ist klinisch – makroskopisch schwierig, jedoch bezüglich der weiteren Therapie sowie Einschätzung der Diagnose unerlässlich. Mischformen von homogener und

inhomogener Leukoplakie sind nicht selten, daher kann man auf eine histologische Abgrenzung zwischen der einfachen Epithelhyperplasie und den verschiedenen Schweregraden einer Epitheldysplasie nicht verzichten. Andererseits ist eine Unterscheidung zwischen schwergradiger Dysplasie, die noch teilweise eine regelmäßige Schichtung aufweist, und einem Carcinoma in situ nur von theoretischem Interesse, da der histologische Unterschied sehr gering ist und kaum den Ablauf der Therapie beeinflusst. Die folgende Tabelle zeigt die Klassifikation der Epitheldysplasien nach Neville et al., 1995, modifiziert nach Makek, die auch in dieser Arbeit benutzt wurde (Neville et al. 2002, Warnakulasuriya et al. 2008).

Klassifikation der Epitheldysplasie	
Ohne Dysplasie	Noch benigne Veränderung mit einfacher Hyperplasie. Normale Schichtung der Schleimhaut mit oder ohne Verhorungsanomalien. Normale Zellteilungsrate, ohne abnorme Mitosen, Stratum basale normal
Leichte bis mittelschwere Dysplasie; Grad I – II	Fakultative Präkanzerose. Die Epithelschichtung ist erhalten, erhöhte Mitoserate in den unteren zwei Dritteln des Epithels.
Schwere Dysplasie; Grad III	Im Sinne eines Carcinoma in Situ. Epithelschichtung ist erhalten, erhöhte Mitoserate in allen Epithelschichten.

Tab. I. 5 Klassifikation der Epitheldysplasien nach Neville et al., modifiziert nach Makek

Die Prognose einer Leukoplakie ist abhängig vom Dysplasiegrad, der Größe der Veränderung und einer eventuell bereits erfolgten Entartung. Eine unbehandelte Leukoplakie kann in eine schwergradige Epitheldysplasie übergehen, die irgendwann in die Basalmembran durchdringt, destruktiv – infiltrativ ins darunter liegende Stroma einwächst und später durch die Lymph- und Blutbahn metastasiert. Es handelt sich dann um ein Plattenepithelkarzinom, was unbehandelt letal endet (Reichart et al. 2003).

Anders als bei der Leukoplakie, handelt es sich bei der Erythroplakie um eine obligate Präkanzerose. Sie erscheint als rundliche oder ovale, gering erhabene und scharf begrenzte, dunkelrote Veränderung mit feinkörniger Oberfläche, die nicht abwischbar ist und kein Symptom einer anderen Erkrankung darstellt. Eine Kombination mit leukoplakischen Bezirken ist sehr oft und wird als gefleckte Erythroplakie bezeichnet. Sie tritt am häufigsten im Genitalbereich bei älteren

Menschen auf. Im Kopf – Hals – Bereich kommt sie vorwiegend im Oropharynx und im Bereich der dorsalen Wangen – und Mundbodenschleimhaut vor. Bei mechanischer Belastung kann die Oberfläche bluten, während chemische Reizung, beispielsweise durch Gewürze und Alkohol, brennende Beschwerden hervorruft.

Obwohl die Erythroplakie weitaus seltener als die Leukoplakie auftritt, muss ihr aufgrund ihres deutlich höheren Entartungspotentials besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden. Histologisch zeigt die Erythroplakie der Mundschleimhaut meist bereits hochgradige Dysplasien. Klinisch ist der Übergang in ein Carcinoma in Situ nicht differenzierbar. Soweit eine vollständige Exzision stattfindet und alle exogene Noxen ausgeschaltet oder eingestellt werden, ist die Prognose der Krankheit gut (Reichart et al. 2005, Suter et al. 2008, Suter et al. 2008).

Eine andere gutartige Neubildung, die bei 7 % der Fälle nach einer längeren Latenzzeit entartet, ist das Papillom des erwachsenen Patienten. Es handelt sich um eine solitäre Neubildung, die ein blumenkohl- oder warzenartiges Aussehen haben kann und entweder isoliert oder multipel – als Papillomatose – auftreten kann. Histologisch besteht das Papillom aus einem bindegewebigen Grundgerüst mit einem faserreichen Stroma und nur vereinzelt Gefäßen. An der Oberfläche lässt sich beim Erwachsenen ein regelrecht geschichtetes Plattenepithel finden. Das Papillom des Erwachsenen unterscheidet sich von den kindlichen Papillomen, die nichtverhornend sind, multipel auftreten und eine Virusgenese aufweisen.

Aggressive Papillomatosen treten häufiger bei Kindern auf und zeigen eine Ausbreitung in die Trachea und den Bronchien. Die Erwachsenenform ist weniger aggressiv, neigt aber zur Rezidivbildung und besitzt, wie bereits erwähnt, ein geringes präkanzeröses Potential (Hornstein 1996).

2. 3. Gutartige Neubildungen

Neben Malignomen treten im oberen Aerodigestivtrakt auch häufig benigne Geschwülste auf. Klinisch sind diese jedoch häufig nur schwer von Karzinomen

abzugrenzen. Aus diesem Grund ist selbst bei klinischem Verdacht auf einen benignen Tumor eine Panendoskopie der oberen Luftspeisewege empfohlen, damit durch Probeentnahme und histologische Untersuchung eine sichere Diagnose gestellt wird.

Eine der häufigsten Gewebeveränderungen, die vorwiegend durch eine hyperkinetische Stimmbandbelastung bedingt sein soll, ist der Stimmlippenpolyp. Er befindet sich im Bereich der freien Ränder der Stimmlippen und betrifft überwiegend Erwachsene. Die Frühphase ist durch ein ödematös aufgelockertes Stroma mit Fibrinausschwitzungen gekennzeichnet. Später bilden sich von Endothel ausgekleidete Hohlräume, die im Rahmen einer Organisation in der Spätphase durch ein gefäß- und kollagenfaserreiches Gewebe ersetzt werden. Mischformen der bereits beschriebenen Struktur, überzogen vom geschichteten Plattenepithel, sind ebenfalls möglich.

Makroskopisch findet sich ein kugelförmiger Tumor mit glatter Oberfläche. Seine Farbe reicht von rosarot bis grau oder etwas bläulich. Diese gutartige Veränderung manifestiert sich klinisch, wie die meisten Neubildungen im Kehlkopf, durch Heiserkeit und rauhe Stimme (Berghaus 1996).

Ähnlich wie der Stimmlippenpolyp sieht das Stimmlippenknötchen aus. Eine falsche, häufig beruflich bedingte Beanspruchung der Stimme verursacht am Übergang vom mittleren zum vorderen Drittel auf beiden Seiten eine epitheliale Verdickung und Vermehrung des Bindegewebes. Wenn die unphysiologische Beanspruchung der Stimme nachlässt, dann ist eine Rückbildung der Knötchen erwarten (Berghaus 1996).

2. 4. Nicht – tumoröse Neubildungen

Starke Stimmbelastung und gleichzeitiger Nikotinabusus können eine ödematöse Aufquellung des subepithelialen Reinke – Raumes der Stimmlippen verursachen,

das sog. Reinke – Ödem. Eine heisere, schnarrende Stimme mit tiefer Sprechstimmlage in Kombination mit einem ödematös – lappigen Aufquellen der Stimmbänder ist charakteristisch für diese Veränderung. Reinke – Ödeme tendieren zu Rezidivbildung (Berghaus 1996).

3. Physikalische Grundlagen

Die gute Prognose für Patienten mit malignen Veränderungen im Kopf – Hals – Bereich setzt eine sichere, frühzeitige Diagnose voraus. Die bisherigen diagnostischen Mittel sind jedoch oft nicht in der Lage, die Frühphasen eines Karzinoms oder einer Epitheldysplasie darzustellen. Mit Hilfe von bildgebenden Verfahren oder durch endoskopische Untersuchung der relativ gut zugänglichen Mund – , Rachen – , Kehlkopfreionen werden Tumorstufen oder frühe, bösartige Neubildungen teilweise übersehen oder unvollständig erkannt, was die Krankheitsprognose verschlechtert. Die Entwicklung eines wirksamen und einfachen diagnostischen Verfahrens, womit gesundes von maligne verändertem Gewebe sicher unterschieden werden kann, könnte sich günstig auf die Prognose der betroffenen Patienten auswirken.

Ein neuartiges Verfahren, welches die letzte Zeit viel wissenschaftliche Beachtung findet, ist die Fluoreszenzdiagnostik. Bei dieser Methode werden fluoreszierende Moleküle im Gewebe durch kurzwelliges, energiereiches Licht angeregt. Diese speziellen Moleküle reagieren dann mitunter durch Emission von Fluoreszenzlicht, was energieärmer als das Anregungslicht ist. Prinzipiell unterscheidet man zwei Fluoreszenzdiagnosearten. Einerseits die durch exogene Gabe verschiedener Fluorochrome induzierte Fluoreszenz, und andererseits die über geeignete Anregung körpereigener Fluorochrome induzierte Fluoreszenz, die sog. Autofluoreszenz.

Auf molekularer Ebene wird nach Bestrahlung von Gewebe ein Teil des Anregungslichts von bestimmten Molekülen absorbiert und ein weiterer Teil von der Gewebeoberfläche reflektiert. Die Lichtstrahlung besteht aus sog. Photonen, die eine bestimmte Lichtenergie tragen. Nach Bohr wird diese Energiemenge W mit Hilfe der

Formel $W=hf$ berechnet, wobei h das Plancksche Wirkungsquantum ist, eine allgemeine Naturkonstante. Die Energie eines Photons ist also direkt proportional zu seiner Frequenz f . Wie bei jedem Wellenvorgang gilt auch $c=\lambda f$, also die Ausbreitungsgeschwindigkeit c , die in dem Fall konstant bleibt, ist gleich die Wellenlänge des Photons λ multipliziert mit seiner Frequenz f . Die Wellenlänge ist also umgekehrt proportional zur Frequenz und damit auch zur Energie eines Photons, d.h. eine kurzwellige Lichtstrahlung, beispielsweise grüne oder blaue, besitzt eine große Energiemenge.

Durch die Lichtenergie, die während des Absorptionsprozesses von der Materie aufgenommen wurde, können die Valenzelektronen (die Elektronen in der äußersten Schale) ihrer Atome in einen energetisch höheren aber auch instabilen Zustand ionisiert werden. Das kann nur dann passieren, wenn die aufgenommene Photonenenergie gleich mit der Energiedifferenz zweier elektronischer Zustände des jeweiligen Atoms ist. Von diesem instabilen Energieniveau springen die Elektronen innerhalb von etwa 10^{-8} s auf ihrem Grundzustand meistens unter Abgabe von Wärme oder durch Wechselwirkungen mit der restlichen Molekularstruktur zurück. Nur wenige Moleküle (sog. „Fluorophore“) sind befähigt, die aufgenommene Lichtenergie wieder als Licht (sog. „Fluoreszenzlicht“) abzugeben. In dem Fall gibt jedes Elektron also ein Photon ab, wobei dessen Energie geringer ist als die des anregenden Photons. Auf diese Weise wird Fluoreszenz zum längerwelligen Bereich hin verschoben. Idealerweise stimmt die Summe von Wärme – und abgegebener Lichtenergie mit der Energie des anregenden Photons überein.

Das von den angeregten Valenzelektronen emittierte Fluoreszenzlicht ist um einige Potenzen weniger intensiv als das Anregungslicht und wird von diesem normalerweise überdeckt. Seine Messung ist demnach aufwendig und setzt ein empfindliches Messinstrumentarium mit geeigneten „cut – off“ - Filtern (Filtern, die nur für das Licht einer bestimmten Wellenlänge durchlässig sind) oder einem Monochromator voraus.

Typische Fluorophore des Gewebes sind in Tabelle I.5 dargestellt.

Fluorophore	Zytologisches Auftreten	Histologisches Auftreten	Anregungsgipfel	Emissionsgipfel
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

Tab. I. 6 Anregungs- und Emissionsgipfel für die wichtigsten endogenen Fluorochrome basierend auf (Wagnieres et al. 1998, Chang 2004).

Die Fluorophore NADH und FAD haben im Tumorgewebe eine ca. 100 mal niedrigere Konzentration als im gesunden Gewebe (Pollack et al. 1942, Schwartz et al. 1974, Schneckenburger et al. 1994, Uppal et al. 2003). Außerdem kommen Kollagen und Elastin fast ausschließlich in subepithelialen Gewebeschichten vor. Durch die epitheliale Verdickung des (prä –)malignen Gewebes leisten diese Strukturproteinen im tumorösen Gewebe einen niedrigeren Beitrag zu der totalen Fluoreszenzemission als im Gesunden (Schomacker et al. 1992, Koenig et al. 1996, Stepp 1999, Arens et al. 2007a). Das verhinderte Eindringen des Anregungslichtes in die submukösen Schichten aufgrund einer tumorbedingten Epithelverdickung, und die geringe Konzentration an NADH und FAD im neoplastischen Gewebe reduzieren die Gesamtfluoreszenz innerhalb von malignen Veränderungen.

Durch die Wahl einer geeigneten Anregungswellenlänge ist es möglich, die Fluoreszenz eines gewünschten Fluorochroms oder einer Gruppe von Fluorochromen zu optimieren. Außerdem kann man durch geeignete Filter das reflektierte Anregungslicht und das Fluoreszenzlicht anderer fluoreszierender Substanzen unterdrücken. Das Prinzip der Autofluoreszenzdiagnostik stellt die folgende Abbildung dar, der linke Teil bei einem Plattenepithelkarzinom, der rechte bei gesundem Gewebe.

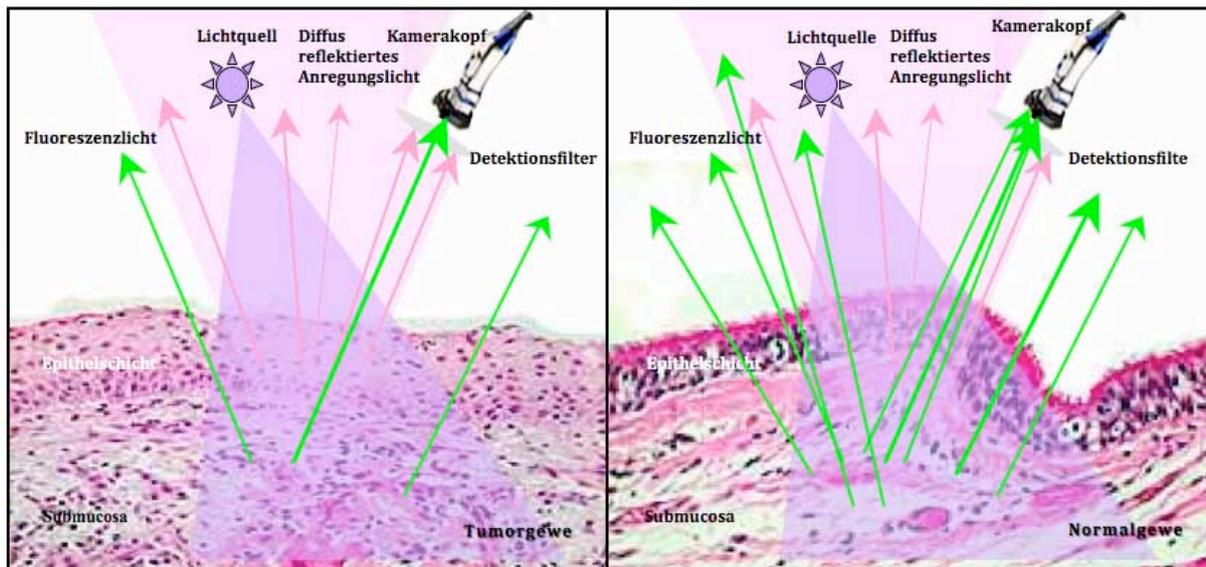


Abb. 1. 3 Schematische Darstellung der Autofluoreszenzdiagnostik durch Anregung endogener Fluorochrome

Viele Forschungsgruppen haben sich auch mit der Fluoreszenzdiagnostik von malignen Tumoren durch Darstellung mikrobiell synthetisierter Porphyrine auf exulzierend – nekrotischem Tumorgewebe beschäftigt. Die optimale Anregungswellenlänge liegt hier bei 405 nm, die relative Emission bei 635 nm. Wenn das betrachtete Gewebe von Bakterien besiedelt ist, dann erscheint es rot durch die starke Porphyrinfluoreszenz. Diese diagnostische Methode ist jedoch durch die inkonstante, inhomogene Verteilung porphyrinbildender Bakterien auf Tumoroberflächen eingeschränkt (Betz et al. 2002). Außerdem können tumor – unspezifische Bakterien (beispielsweise auf der Zungenoberfläche oder auf das Zahnfleisch) eine falsch – positive Rotfluoreszenz erzeugen.

Eine Alternative zur Autofluoreszenz stellt die exogene Zufuhr von Fluorophoren mit tumorselektiver Anreicherung dar. Diese Methode wird zwar in dieser Arbeit nicht untersucht, sie wird jedoch kurz in dieser Stelle beschrieben, weil sie ein gängiges, alternatives Verfahren zur Autofluoreszenzdiagnostik darstellt.

Am weitesten verbreitet für die Fluoreszenzdiagnostik im Mund– , Rachen– , Kehlkopfbereich ist die Verwendung von 5 – Aminolävulinsäure (5 – ALA) induziertem Protoporphyrin IX (PPIX). Eine lokale Eingabe von 5 – ALA führt zur erhöhten intrazellulären Aufnahme in Tumorzellen, vermutlich wegen der funktionsgestörten Lipidbarriere der Mucosa und folglich einer besseren Penetration (Betz et al. 2003).

Sowohl 5 – ALA als auch PPIX sind Zwischenprodukte der Häm – Biosynthese. Wie die folgende Abbildung zeigt beginnt die Häm – Biosynthese in den Mitochondrien mit der Synthese von 5 – ALA (Schlüsselenzym: 5 – ALA – Synthase), welche das Mitochondrium verlässt und ins Zytoplasma gelangt. Nach mehreren Reaktionsschritten entsteht Coproporphyrinogen III, welches zurück ins Mitochondrium wandert und zu Protoporphyrinogen oxidiert wird. Nach einem weiteren Oxidationsschritt und dem Einbau des zentralen Fe^{2+} – Ions (Enzym: Ferrochelatase) entsteht das Häm – Molekül.

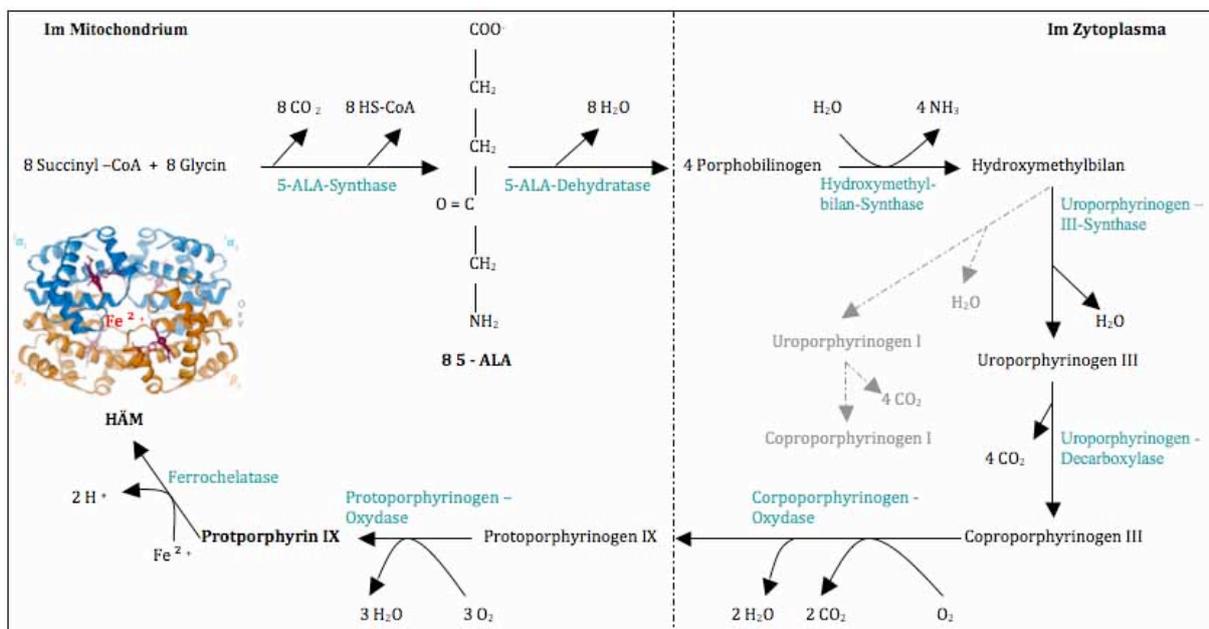


Abb. I. 4 Häm - Biosynthese

Tumorgewebe wird im Vergleich zum gesunden Gewebe häufig schlechter mit Blut versorgt. Wegen dem Sauerstoffmangel spielt also für Tumorgewebe die anaerobe Glucolyse eine wichtigere Rolle als für Normalgewebe. Die Produkte der anaeroben Glucolyse senken den pH – Wert in der Tumorzelle. Folglich liegt das Hämoglobin in seiner reduzierten Form vor. Ist die Tumorzelle jedoch gut mit Sauerstoff versorgt, dann wird Succinyl – CoA fast ausschließlich im Citratzyklus (aerobe Glucolyse) benötigt und die Häm – Biosynthese wird gedrosselt. Wird dann das Zwischenprodukt 5 – ALA exogen zugeführt, wird es schnell aufgenommen und in die Reaktionskette der PPIX – Biosynthese eingeschleust. Neben der gesteigerten 5 – ALA – Aufnahme scheint es im Tumorgewebe eine herabgesetzte Aktivität der

Ferrochelatase zu geben. Hiermit nimmt die Umwandlung von PPIX in Häm ab (Betz et al. 2003).

Diese Methode weist jedoch einige Nachteile auf. Man benötigt zwei Behandlungsschritte (erst Verabreichung von 5 – ALA, dann Fluoreszenzendoskopie) und somit mehr Zeit, sie kann nur schlecht eingeplant und routinemäßig eingesetzt werden und setzt die Verabreichung eines chemisch oder biologisch hergestellten Mittels, was nicht immer verfügbar ist, voraus.

4. Zielsetzung

Die Autofluoreszenzdiagnostik kann ein hilfreiches diagnostisches Mittel darstellen, um den bestehenden diagnostischen Mängeln bei der Detektion von (prä –) malignen Läsionen zu entgegnen. Basierend auf Experimenten und grundlegendem Wissen aus früheren Publikationen zu diesem Thema (Betz et al. 1999, Leunig et al. 2000, Leunig et al. 2002) war es das Ziel dieser Studie:

- Die Autofluoreszenzbefunde systematisch zu kategorisieren,
- den klinischen Wert der Autofluoreszenzdiagnostik für die Diagnostik von (prä-)malignen Läsionen des oberen Aerodigestivtraktes statistisch auszuwerten,
- und schließlich zwei Generationen des bildgebenden Autofluoreszenzsystems der Firma KARL STORZ hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur subjektiven Identifikation und Abgrenzung von Tumorstufen und –frühformen miteinander, sowie mit der konventionellen Weißlicht – Endoskopie zu vergleichen.

III. Material und Methode

1. Auswahl der Patienten

In dieser klinischen Studie sind insgesamt 158 Patienten (109 Männer, 49 Frauen) mit Verdacht auf bzw. histopathologisch gesicherter Neoplasie des Mund-, Rachen-, Kehlkopfraumes untersucht worden. Im Laufe der Studie kamen zwei konsekutive Autofluoreszenz – Systemgenerationen der Firma KARL STORZ zum Einsatz (siehe Abschnitt 3 dieses Kapitels), wobei 70 Patienten mit einem ersten (System 1. Generation) und 88 mit einem weiterentwickelten Autofluoreszenzsystem (System 2. Generation) untersucht worden sind.

	Männlich	Weiblich	Total
1. Generation	53	17	70
2. Generation	56	32	88
Total	109	49	158

Tab. II. 1 Patientengut

Das mittlere Alter „ μ “ der Patienten lag bei 60,4 Jahre, die Standardabweichung „ σ “ bei 11,4. Hinsichtlich des Alters unterscheidet sich das Patientengut zwischen AF – System 1. und 2. Generation nur gering, wie die folgende Tabelle darstellt.

	Mittleres Alter μ	Standard- Abweichung σ	Range
1. Generation	59	10	34 – 82
2. Generation	61.7	12.8	41 – 90
Total	60.4	11.4	34 – 90

Tab. II. 2 Statistische Auswertung des Patientenalters

Die Patienteneinwilligung, die gute allgemeine Gesundheit des Patienten und seine Operabilität (wenn er in Vollnarkose untersucht worden ist) haben die Grundvoraussetzungen für die Durchführung der Autofluoreszenzendoskopie dargestellt. Die gleichzeitige oder zeitnahe Operation (Tumorresektion od. Biopsieentnahme) und die folgende histologische Untersuchung des neoplastischen Gewebes ist als die beste Methode betrachtet worden, um das Ergebnis der Autofluoreszenzuntersuchung auszuwerten. In Fällen, wo die klinische Untersuchung den reibungslosen Operationsablauf gestört hätte, und somit den Operationserfolg negativ hätte beeinflussen können, ist sie nicht durchgeführt worden.

Patientenbezogene Faktoren, die in dieser Studie zwar dokumentiert worden sind, aber kein Aufnahmekriterium dargestellt haben sind das Alter und Geschlecht des Patienten sowie Nikotinabusus und Alkoholkonsum. In wenigen Fällen ist eine operative Therapie nicht sinnvoll gewesen, oder die Patienten haben sich keine operative Therapie gewünscht. Hierbei sind sie nur präoperativ untersucht worden. Die wichtigsten Kriterien für Aufnahme und Ausschluss der Patienten in die Studie sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Aufnahmekriterien	Patienteneinwilligung Compliance Gesundheitsstatus und Operationsfähigkeit
Ausschlusskriterien	Psychische Instabilität fehlendes Einverständnis, fehlende Compliance

Tab. II. 3 Aufnahme- und Ausschlusskriterien

Darüber hinaus sind klinische Untersuchungen hinsichtlich Tumorstaging (cTNM) und Tumorgrading (cG) durchgeführt worden. Zusätzlich ist der histologische Keratinisationsgrad für jede neoplastische Läsion dokumentiert worden.

Die beiden Systeme weisen zahlreiche technische Unterschiede auf, die später in diesem Kapitel abgehandelt werden. Ziel dieser Studie ist nicht nur die Wirksamkeit der Autofluoreszenzdiagnostik im oberen Aerodigestivtrakt zu überprüfen, sondern auch die beiden AF – Systeme in Vergleich miteinander zu ziehen.

2. Durchführung der Autofluoreszenzdiagnostik

Zunächst erfolgte die Aufnahme in die Studie mit Anamneseerhebung, dann die Weißlicht- und Autofluoreszenz – Endoskopie mit anschließender Probenentnahme und schließlich die Korrelation mit der Histopathologie. Die Endoskopie erfolgte entweder in Lokalanästhesie oder in Vollnarkose. In manchen Fällen sind die Patienten sowohl einen Tag vor der Operation in Lokalanästhesie als auch noch unmittelbar vor der Biopsieentnahme in Vollnarkose untersucht worden.

Nach Exposition des Situs findet zunächst die Weißlichtendoskopie statt. Die interne Beleuchtung des Stürzlaryngoskops und sonstige starke Lichtquellen sind auszuschalten, weil es sonst zu Verfälschungen der erhaltenen Bildsequenzen kommen kann. Die Autofluoreszenzendoskopie beginnt durch manuelles Umschalten der Kamera und Lichtquelle in den Blaulichtmodus. Alternativ können die Kamera und die Lichtquelle über einen angeschlossenen Fußschalter umschaltet werden. Bei erfolgreicher Umschaltung erscheint auf dem angeschlossenen Monitor die Anzeige „Blue Light Mode“ und aus dem Endoskop tritt ein violett – blaues Licht aus.



Abb. II. 1: Filterregler des modifizierten Endoskops mit “WL” – Stellung für die Weißlichtendoskopie, “AF” – Stellung für die Autofluoreszenzuntersuchung, sowie “ALA” – Stellung für die Fluoreszenzuntersuchung nach Einnahme von 5 – ALA.

Während der Endoskopie kann die Bildschärfe eingestellt werden, indem man den Abstand zwischen Endoskopende und Gewebe ändert, oder den goldfarbenen Fokusring des Kamerakopfes entsprechend verdreht. Auch die Verwendung von Antibeschlag - Sprays ist zum Erhalt eines scharfen Bildes unerlässlich. Bei schlechter Lichtausbeute oder bei der Untersuchung eines wachen, unruhigen Patienten muss ein Kompromiss zwischen Bildschärfe und Helligkeit gemacht

werden. Aufgrund der starken Absorption des Häm – Moleküls wird durch eine Blutung oder sogar durch Blutreste das Ergebnis der Autofluoreszenzendoskopie zusätzlich negativ beeinflusst.

3. Experimenteller Aufbau

Der experimentelle Aufbau besteht aus einem fluoreszenztauglichen Endoskop (HOPKINS® PDD Optiken, KARL STORZ, Tuttlingen, Deutschland), einem Fluid – Lichtkabel (Art. # 495 FP, KARL STORZ, Tuttlingen, Deutschland), eine ans Endoskop adaptierte Kamera mit einer Steuerungseinheit (TRICAM® SL II Kontrolleinheit und TRICAM® PDD Kamerakopf, Art. # 20223011 – 1 & 20221037, KARL STORZ, Tuttlingen, Deutschland), und einer speziellen Lichtquelle. Das AF – System der 1. Generation hat eine sog. D –Light – (Art. # 20133220, KARL STORZ, Tuttlingen, Deutschland), das AF – System 2. Generation verfügt über eine sog. D – Light – C Lichtquelle (Art. # 20133620 – 133, KARL STORZ, Tuttlingen, Deutschland). Ferner verfügt das AF – System über einen Farbmonitor (Trinitron Color Monitor, Art. # PVM-20M7MDE, Sony, Tokyo, Japan), einen Videorecorder (Universal S-VHS-Recorder, Art. # AG-7350, Panasonic, Osaka, Japan) und einen hochauflösenden Farbdrucker (High – resolution color video printer, Art. # UP-1800EPM, Sony, Tokyo, Japan). Er unterscheidet sich damit aus der Sicht des Anwenders nur geringfügig von der Standardausrüstung bei der Endoskopie des oberen Luft-Speisewegs. Im Detail beinhaltet jedoch die technische Ausführung der einzelnen Komponenten erhebliche Modifikationen, um das schwache optische Fluoreszenzsignal zufriedenstellend darzustellen (siehe auch Text von II. 2. 1. bis II. 2. 5). Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Apparatur.

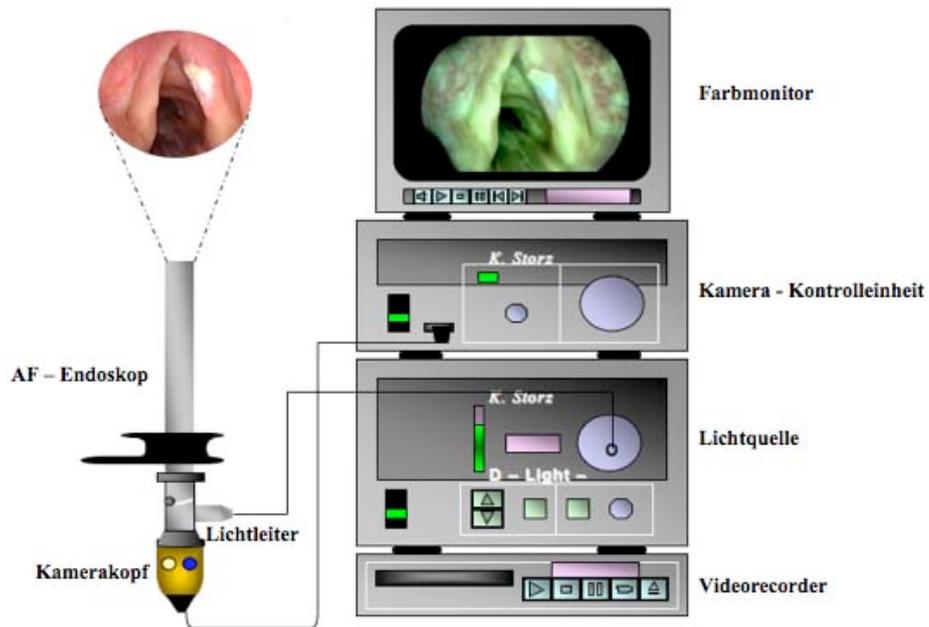


Abb. II. 2 Autofluoreszenz - Untersuchungseinheit der Fa. KARL STORZ

3.1 Modifiziertes Endoskop

In dieser Studie sind modifizierte, speziell für die Autofluoreszenzdiagnostik angefertigte Endoskope der Firma KARL STORZ, Tuttlingen, Deutschland benutzt worden. Für Untersuchungen am wachen Patienten wurden Endoskope mit 10 mm Durchmesser und 0 bzw. 90 Grad Blickwinkel verwendet, für die intraoperative Untersuchung in Vollnarkose meist nur die Geradeausblick - Optik mit 10 mm Durchmesser. Bei Patienten mit einem extremen Würgereiz und bei schwer erreichbaren Tumorlokalisationen, wie z.B. Nasopharynx oder Hypopharynx, kamen gelegentlich auch 4 mm - Optiken mit 0-, 30-, und 70-Grad Abwinkelung zum Einsatz. Zu beachten ist allerdings, dass Endoskope mit größerer Abwinkelung oder geringerem Durchmesser weniger Anregungslicht transmittieren.

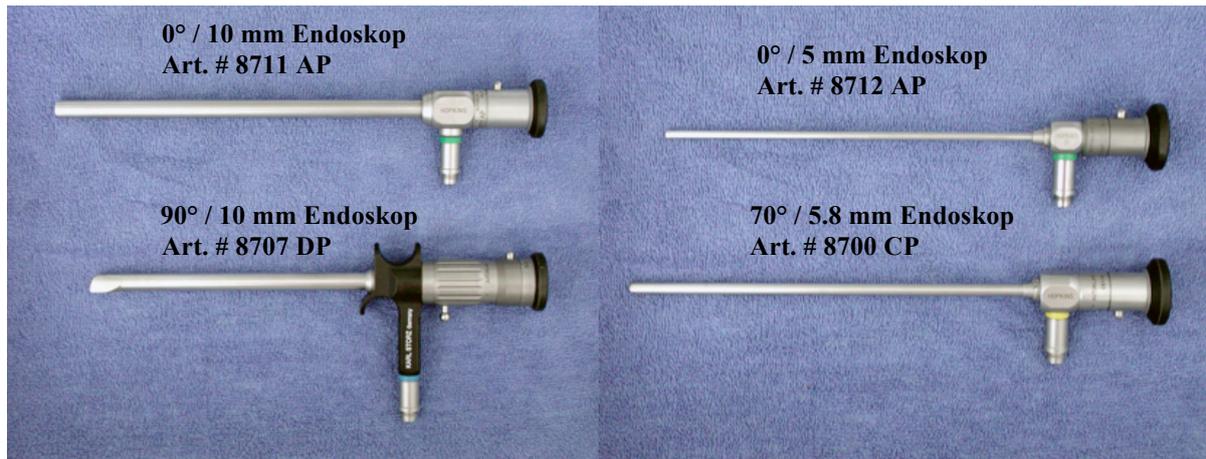


Abb. II. 3 HOPKINS® - Optiken der Fa. KARL STORZ in verschiedenen Formaten und Blickwinkel.

Das Anregungslicht übersteigt das Fluoreszenzsignal hinsichtlich seiner Intensität um ein vielfaches. Damit die Beobachtung der Fluoreszenz überhaupt ermöglicht wird, ist es nötig, das reflektierte, remittierte Anregungslicht herauszufiltern. Hierfür sind in den Endoskopoptiken Beobachtungsfiler wahlweise einschwenkbar.

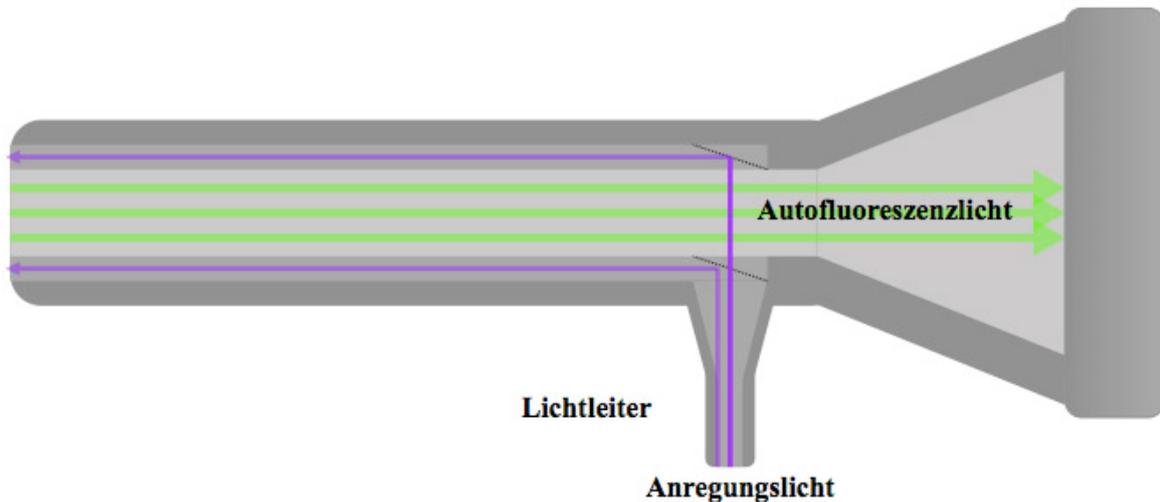


Abb. II. 4 Lichtübertragung im modifizierten Endoskop 2. Generation. In violett - blau wird das Anregungslicht, in grün das Autofluoreszenzlicht dargestellt.

Das Beleuchtungsbündel wird beim System der ersten Generation von der Koppelstelle bis zum distalen Ende der Optik durchgezogen, um die Lichtübertragung zu optimieren. Die Optik verfügt also über einen integrierten Lichtleiter. Bei den modifizierten Endoskopen der zweiten Generation wird das

Anregungslicht über ein Fluidlichtkabel an das Endoskop angekoppelt. Das AF – Endoskop 1. Generation weist eine Lichtleistung von ca. 100 mW in „blue – light – mode“ auf, das der 2. Generation von ca. 200 mW (gemessen am distalen Ende eines 30° / 4 mm AF – Endoskops). Die Übertragungscharakteristik von Fluidlichtleitern ist also der von Faserlichtleitern weit überlegen; ein Teil dieses Vorteils geht jedoch durch die zusätzliche Koppelstelle wieder verloren.

Die Beobachtung der Fluoreszenz ist nur möglich, wenn das Anregungslicht von einem BeobachtungsfILTER geblockt wird. Dieser ist in den modifizierten Optiken zweiter Generation mittels eines eingebauten Filterrades wahlweise einschwenkbar. Die Endoskope der ersten Generation verfügten nicht über solch ein Filterrad; der BeobachtungsfILTER muss jeweils manuell aufgeschnappt werden. Durch die genaue Abstimmung des Beobachtungsfilters im Endoskop und des Anregungsfilters in der Lichtquelle wird ein optimaler Farbkontrast erzielt. Hieraus wird es ersichtlich, dass nur spezielle Autofluoreszenzoptiken mit eingebautem oder aufschnappbaren BeobachtungsfILTER benutzt werden dürfen, und Lichtquelle und Endoskop aufeinander abgestimmt sein müssen.

3.2 Lichtleiter

Das Autofluoreszenzsystem der ersten Generation verfügte über einen konventionellen Glasfaserlichtleiter. Hierbei traten in Vorversuchen erhebliche Lichtverluste auf, aufgrund der ungenauen Passung des Lichtleiters mit dem Endoskop. Um die Intensität des Anregungslichts an dem distalen Optikende zu erhöhen und die Lichtverluste zu minimieren, gab es keine Steck- oder sog. Connector - Bereiche. Das Lichtfaserbündel war direkt mit der Lichtquelle verbunden.

Bei dem Autofluoreszenzsystem der zweiten Generation erfolgt die Lichtübertragung optimalerweise mittels Fluidlichtleitern. Ein Fluidfaserlichtkabel wird über eine ausgeführte Kopplerstelle mit der Optik verbunden. Trotz der zusätzlichen Kopplungsstelle ist die Lichtausbeute in diesem Falle besser als bei der Benutzung konventioneller Lichtleiter, da die Lichtübertragung in Fluidlichtleitern deutlich verbessert ist.

Die Vorteile und Nachteile des Fluidsystems werden in die folgende Tabelle zusammengefasst:

Vorteile	- Bessere Transmissionseigenschaften - Blockung des residualen infraroten Lichtes - Geringere Eigenfluoreszenz
Nachteile	- Nicht autoklavierbar

Tab. II. 4 Vor- und Nachteile des Fluidlichtleiters

3.3 Das D - Light (- C) - System

Die Lichtquelle des AF – Systems 1. Generation (D – Light) ist vom Laser – Forschungs – Labor der L.M.U. München in Zusammenarbeit mit der Fa. KARL STORZ, Tuttlingen, Deutschland entwickelt worden. Mittlerweile verfügt das AF – System der 2. Generation über eine potentere Lichtquelle, das sog. D – Light – C. Bei beiden Systemen handelt es sich um eine Hochleistungslichtquelle der auf Basis einer Xenon - Kurzbogenlampe.

Das Licht entsteht durch die elektrische Entladung von Xenon - Gas in der Lampe. Xenon wird ionisiert und emittiert somit ein helles Licht. Die Leistung der Lichtquelle liegt im Bereich zwischen 50 – 500 W und ist proportional mit dem Gasdruck. Im Weißlichtmodus wird die Lichtleistung (die zu hell für das Auge ist) auf etwa 10 % der theoretisch verfügbaren Leistung der Lichtquelle begrenzt. Hierfür wird ein spezielles Gitter benötigt (sog. „Taper“), welches nur die geraden Lichtstrahlen passieren lässt (siehe auch Abb. II. 5.). Im AF – Modus wird der Taper umgangen, so dass für die Anregung der Autofluoreszenz die gesamte Lichtleistung zur Verfügung steht. Die höhere Leistung des D – Light – C ist auf die strategisch günstigere Position der lichtführenden Elemente in der Lichtquelle zurück zu führen.

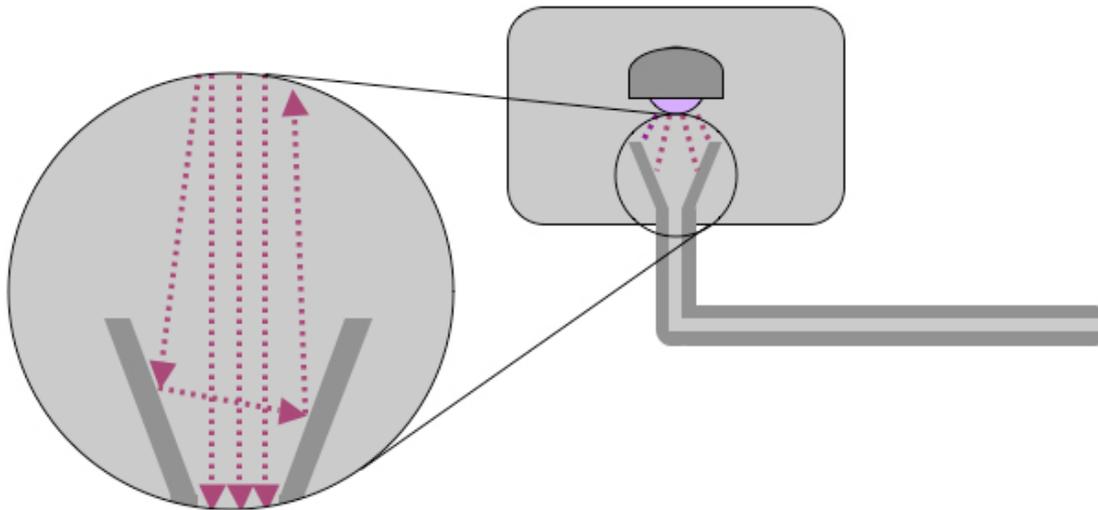


Abb. II. 5 Schematische Darstellung des sog. „Tapers“ in der Hochleistungslichtquelle.

Durch den optimierten Aufbau bietet die Lichtquelle der 2. Generation (D – Light – C / AF, KARL STORZ GmbH, Tuttlingen, Deutschland) eine fast doppelt so hohe Lichtleistung wie diejenige der 1. Generation (D - Light / AF, KARL STORZ GmbH, Tuttlingen, Deutschland). Durch die spektrale Einengung des weißen Lichtes mittels eines einschwenkbaren, optischen Anregungsfilters auf den Bereich von etwa 375 – 440 nm entsteht violett – blaues Licht. Die Xe – Kaltlichtquelle wurde mit einem einschwenkbaren, optischen Sperrfilter ausgerüstet, der bei einer bestimmten Anregungswellenlänge transmittiert, jedoch alle anderen spektralen Anteile abblockt. Der Anregungsfilter in der Lichtquelle ist auf einem Filterrad montiert, sodass ein Wechsel zwischen Weißlicht– und Fluoreszenzendoskopie erleichtert wird. Das blaue Licht entsteht durch die Einengung des weißen Lichtes auf den Bereich von etwa 375 – 440 nm. Hierdurch gelangen Kollagene, Elastine, NADH, FAD, sowie endogene Porphyrine zur Anregung.

Die Fluoreszenz kann sowohl mit dem Auge als auch mit einem geeigneten Kamerasystem beobachtet werden. Der Wechsel zwischen Weisslicht – und Fluoreszenz – Anregungslicht wird entweder über einen Fußschalter, eine Taste an der Anregungslichtquelle oder eine Funktionstaste am Kamerakopf erreicht.

3.4 CCD - Kamera

Ein Fluoreszenzbild aus der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes ist im Vergleich zu einem Weißlichtbild viel lichtschwächer. Aufgrund der hohen Helligkeitsempfindlichkeit des menschlichen Auges reicht jedoch die Intensität des Fluoreszenzbildes für eine Inspektion des Weichgewebes aus. Die gängigen Endoskopkameras sind jedoch zur Aufnahme der lichtschwachen Fluoreszenzbilder nicht geeignet.

Zur videoendoskopischen Darstellung der Autofluoreszenz sind hochauflösende Videokameras mit elektronischer Verstärkung notwendig. Das durch das Endoskop erfasste und vom Lichtleiter übertragene Bild wird mittels eines CCD (Charged Coupled Device) - Kamerasystems aufgenommen. CCD - Kameras funktionieren nach dem Prinzip der Umwandlung eines Lichtsignals in ein elektrisches Signal. Elementarer Bestandteil der Kamera ist der CCD - Sensorchip. Letzter besteht aus einer Matrix mit lichtempfindlichen Zellen, sog. Pixels. Ein CCD - Sensorchip ist in ca. 440000 Pixel aufgeteilt, so dass ein Bild in drei Farbauszüge mit einer Auflösung von insgesamt 752 x 582 Pixel zerlegt wird.

Gelangt ein Photon auf solch eine Detektoreinheit, wird dort absorbiert und wandelt durch den so genannten "inneren photoelektrischen Effekt" ein gebundenes Elektron in ein freies Elektron um. Die frei gewordenen Elektronen werden nun mittels wechselnder Spannungen einer über dem Halbleiter angebrachten Elektrodenschicht zu einem Ausleseverstärker verschoben, welcher von der Ladung abhängige elektrische Spannungen produziert. Dieses Spannungssignal wird über einen Monitor als Fernsehbild dargestellt. Als "Verstärkung" des optischen Signals bezeichnet man das Verhältnis zwischen den von dem CCD - Sensorchip gemessenen Elektronen und dem Ausgangssignal der Kamera.

Im System 1. Generation kam noch eine Ein - Chip - Kamera zum Einsatz. Die ganze Lichtleistung ist also von einem einzelnen Chip ausgelesen worden, mit Hilfe dieser Daten konnte dann ein Farbbild erstellt werden. Für das System 2. Generation hat sich eine sog. Drei - Chip - Kamera bewährt, aufgrund der besseren Farb- und Ortsauflösung. Hierbei wird die Lichtstrahlung mittels Farbfiltern oder Prismen in

grüne, rote und blaue Lichtstrahlung getrennt. Die drei Lichtstrahlungen werden von separaten Chips ausgelesen. Aus den Daten der drei Chips kann ein Farbbild erstellt werden, wobei die Farb- und Ortsauflösung optimiert wird.

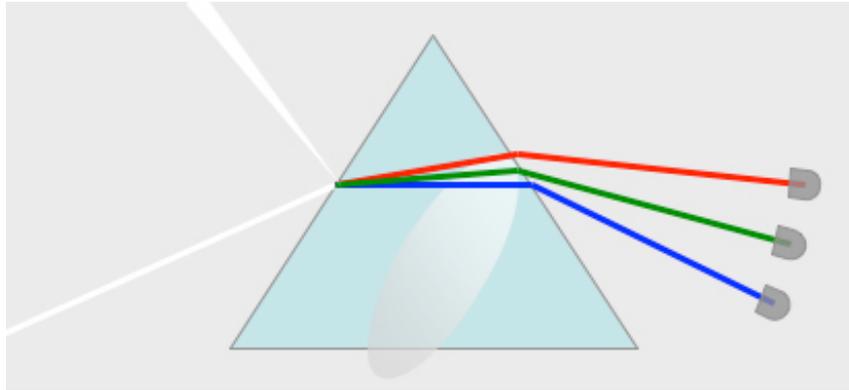


Abb. II. 6 Funktionsprinzip der 3 - Chip - CCD Kamera der Fa KARL STORZ (Tuttlingen, Deutschland)

Die relative Intensitätsschwäche des zu detektierenden Fluoreszenzlichts setzen an das Kamerasystem besondere Anforderungen. Um diese Art von Kamera für die Anforderungen der Autofluoreszenz - Diagnostik tauglich zu machen, wurden mehrere Modifikationen vorgenommen:

1. Durch eine Veränderung der Übertragungscharakteristik im Autofluoreszenzmodus (AF - Modus) wurde die Sensitivität im roten Spektralbereich der Porphyrinfluoreszenz und im grünen Bereich der Fluoreszenz von endogenen Strukturproteinen und Nikotinsäurederivaten erhöht, zu Ungunsten des blauen Spektralbereiches. Dadurch werden diese endogenen Fluorophore hinsichtlich ihrer Wellenlängencharakteristik besser abgebildet. Im Weißlichtmodus (WL - Modus) werden die einzelnen Farbkanäle mittels Weißlichtabgleich wieder angepasst.
2. Bei reduzierter Bildfolgefrequenz und Intensität des optischen Fluoreszenzsignals sorgt ein Integrationsmodus für ausreichende Bildhelligkeit. Bildintegrationszeiten von bis zu 2 sec / Bild sind im Gegensatz zu anderen konventionellen Endoskopkameras möglich. Allerdings lassen sich

bei größeren Integrationszeiten "Wackel - Artefakte" in der Bildgebung, selbst bei maximal ruhiger Handhabung des Endoskops, nicht mehr vermeiden.

- Optimierte Verstärkungseinstellungen passen die Empfindlichkeit der Kamera an die Lichtverhältnisse an. Je höher der Verstärkungsgrad des optischen Signals ist, desto höher ist demnach die Bildhelligkeit. Hierbei tritt auch eine zeitgleiche Verstärkung des Rauschens auf, so dass ein Kompromiss zwischen Bildhelligkeit und -qualität getroffen werden muss.

3.5 Zusammenfassung der Unterschiede zwischen den beiden AF - Systeme

Wie aus den letzten Kapiteln hervorgeht, weisen die beiden Autofluoreszenzsysteme zahlreiche Unterschiede hinsichtlich der Leitung des Anregungslichtes, des Filterwechsels im Endoskop und der Lichtquelle auf. Zur besseren Veranschaulichung werden diese in die folgende Tabelle nochmals zusammengefasst.

AF - System 1ter Generation	AF – System 2ter Generation
Modifiziertes Endoskop mit aufgeschnaptem Beobachtungsfiler	Modifiziertes Endoskop mit integriertem Beobachtungsfiler (, welcher wahlweise mit Hilfe eines Filtrrades eingeschwenkt werden kann).
AF – Anregung mit gefilterter Xenon - Kurzbogenlampe	AF – Anregung mit potenterer Lichtquelle (Lichtausbeute etwa verdoppelt)
Konventioneller Glasfaser Lichtleiter	Fluidfaserlichtleiter
Das Beleuchtungsbündel wird von der Koppelstelle bis zum distalen Ende der Optik durchgezogen	Weitere Koppelstelle zwischen Lichtfaserbündel des Endoskops und Fluid-Lichtleiter
Ein – Chip – Kamera	Drei – Chip - Kamera

Tab. II. 5 Unterschiede zwischen den AF - Systeme 1. und 2. Generation

3.6 Dokumentation

Die Befunde sind mit Hilfe eines Videorekorders (Universal S-VHS-Recorder, Art. # AG-7350, Panasonic, Osaka, Japan) analog gespeichert worden. Außerdem wurden mit Hilfe einer Farbdruckers Momentaufnahmen erstellt und in die Patientenakte integriert.

Zur sinnvollen Archivierung und Auswertung der für diese Studie relevanten Patientendaten ist eine Datenbank erstellt worden, die farblich abgesetzt in 4 Teile untergliedert worden ist:

1. Grün: Patientendaten und allgemeine Anamnese
2. Blau: 1. Untersuchung (Weisslicht- und Autofluoreszenzendoskopie in Lokalanästhesie oder Vollnarkose)
3. Violett: 2. Untersuchung (Weisslicht- und Autofluoreszenzendoskopie in Lokalanästhesie oder Vollnarkose)
4. Gelb: Pathologische Diagnose und Korrelationsanalyse

KLINISCHE STUDIE ZUR AUTOFLUORESCENZ-DIAGNOSTIK BEI PATIENTEN MIT ERKRANKUNGEN DES RACHEN-KEHLKOPFBEREICHES (DR. C. S. BETZ; PD DR. A. LEUNIG)							
Fallnummer	Nachname	Vorname	Geburtsdatum	Aufnahme in Studie	Klinische Diagnose	Wenn ja, dann Diagnose	
Lokalisation des Zielgewebes nach ICD10				Lokalisation in Worten	Klinisches Staging bei malignen Veränderungen	Erkrankungsfortschritt	
Makroskopische Verhornung <input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein <input type="radio"/> ?				Seite <input type="radio"/> bds. <input type="radio"/> li.	re. <input type="radio"/> mit. <input type="radio"/> bereits gesicherte Histologie <input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein	<input type="radio"/> Maligne Neubildungen (Karzinom) <input type="radio"/> PEC <input type="radio"/> Dysplasie <input type="radio"/> Prämaligne Veränderungen (Leukopl.) <input type="radio"/> CIS <input type="radio"/> Papillom <input type="radio"/> Benigne Neubildung (Papillom) <input type="radio"/> Polyp/Gran. <input type="radio"/> anderes <input type="radio"/> Benigne Neubildung (Polyp/Gran.) <input type="radio"/> Chron. Entz. <input type="radio"/> Chronische Entzündung <input type="radio"/> Unklarer Befund	
Untersuchung 1				Untersuchung unter <input type="radio"/> o.N. <input type="radio"/> ITN <input type="radio"/> LA	Verwendete Lampe <input type="radio"/> D-L-C <input type="radio"/> D-L	Verwendete Optik <input type="radio"/> 0 Grad Optik 4mm	Arztnummer: <input type="text"/>
WL-Untersuchung <input type="radio"/> Zielg. erkennbar <input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein <input type="radio"/> ?				AF-Untersuchung <input type="radio"/> Zielg. erkennbar <input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein <input type="radio"/> ?			
Zielg. abgrenzbar <input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein <input type="radio"/> ?				Zielg. abgrenzbar <input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein <input type="radio"/> ?			
Biopsie entnommen <input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein				Zahl der Biopsien <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 <input type="radio"/> 6			
Biopsie 1				Biopsie 2			
Biopsie 3				Biopsie 4			
Biopsie 5				Biopsie 6			
Tätowierung <input type="checkbox"/>							
Untersuchung 2				Untersuchung unter <input type="radio"/> o.N. <input type="radio"/> ITN <input type="radio"/> LA	Verwendete Lampe <input type="radio"/> D-L-C <input type="radio"/> D-L	Verwendete Optik <input type="radio"/> 0 Grad Optik 4mm	Arztnummer: <input type="text"/>
WL-Untersuchung <input type="radio"/> Zielg. erkennbar <input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein <input type="radio"/> ?				AF-Untersuchung <input type="radio"/> Zielg. erkennbar <input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein <input type="radio"/> ?			
Zielg. abgrenzbar <input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein <input type="radio"/> ?				Zielg. abgrenzbar <input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein <input type="radio"/> ?			
Biopsie entnommen <input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein				Zahl der Biopsien <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 <input type="radio"/> 6			
Biopsie 1				Biopsie 2			
Biopsie 3				Biopsie 4			
Biopsie 5				Biopsie 6			
Tätowierung <input type="checkbox"/>							
Abschlussbeurteilung				cTNM <input type="radio"/> cT <input type="radio"/> cN <input type="radio"/> M	pTNM <input type="radio"/> pT <input type="radio"/> pN <input type="radio"/> M	Weitere Behandlung <input type="radio"/> OP <input type="radio"/> Radiatio <input type="radio"/> Nein	Endgültige Histologie <input type="radio"/> PEC <input type="radio"/> Dysplasie <input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein <input type="radio"/> ?
				<input type="radio"/> CIS <input type="radio"/> Papillom			
				<input type="radio"/> Polyp/Gran. <input type="radio"/> Anderes			
				<input type="radio"/> Chron. Entz.			

Abb. II. 7 Aufnahme der Datenbank, die der Speicherung und Auswertung der Ergebnisse dieser Studie gedient hat.

3.7 Bilddarstellung

Essentiell für das optische Ergebnis der Endoskopie ist die richtige Einstellung der Apparatur (siehe Abschnitt 2. und 3. dieses Kapitels). Der Weißlichtabgleich erfolgt mit dem Filter – Regler des Endoskops in Stellung „WL“ und die Lichtquelle sowie die Kamera in Weißlichtmodus. Alternativ kann mit dem neuen Autofluoreszenzsystem der Weißlichtabgleich mit dem Endoskop in Position „AF“ erfolgen, dann muss das Filterrad nicht mehr umgeschaltet werden. Die Kameraeinstellung „white light auto exposure mode“ sollte aktiv sein. Somit werden wackel- und rauschfreie Bilder, auch bei minimal unruhiger Hand, erzeugt. Wie auch bei der konventionellen Endoskopie, sind die adäquate Blutstillung und die Reinigung des Operationssitus von großer Bedeutung.

Der Beobachtungsfiler filtert Lichtstrahlung bis ca. 510 nm aus. Durch die Abstimmung von Beobachtungs- und Anregungsfiler miteinander wird das Fluorezenz-Anregungslicht aus dem Beobachtungskanal vollständig herausgefiltert. Dies bedeutet, dass nur echte Fluoreszenzsignale auf dem Bildschirm zur Darstellung gelangen. Auf dieser Weise entsteht ein Autofluoreszenzbild, welches (aufgrund der Fluoreszenz – Spektren der verschiedenen Autofluorophore) verschiedene Grün – Schattierungen zeigt.

Obwohl es verschiedene Theorien über die Bildentstehung bei der Autofluoreszenzendoskopie gibt, ist noch keine davon bewiesen worden. Es handelt sich dabei mehr um Vorstellungen, die weiteren Untersuchungen bedürfen. Die Beurteilung des auf dem Bildschirm dargestellten Bildes richtet sich im Großen und Ganzen nach dreierlei Gesichtspunkten:

„Normale“ Autofluoreszenz	Das Gewebe zeigt eine helle, satte Grünfluoreszenz, homogen in Intensität und Verteilung. Diese Fluoreszenz stammt vor allem aus den Eigenfluorophoren in der Submucosa (z.B. Strukturproteine). Da das Epithel dünn und normal geschichtet ist, kann sie das Gewebe verlassen und vom Endoskop erfasst werden. Blutgefäße werden aufgrund der verstärkten Absorption des Hämoglobins dunkler dargestellt.
------------------------------	--

„Verstärkte“ Aufgrund der verstärkten Keratinfloreszenz beispielsweise bei
Autofluoreszenz Hyperkeratosen entstehen intensive hellgrüne bis weißliche
Areale.

„Abgeschwächte“ Wie bereits im Kapitel I erwähnt („Einleitung“), liegt die Ursache
Autofluoreszenz für die verringerte Autofluoreszenz in der niedrigen
Konzentration von Eigenfluorophoren im neoplastischem
Gewebe, und in der Abschattung des Autofluoreszenzlichtes aus
der Submucosa durch tumorös verdicktes Plattenepithel. Ein
dritter Grund könnte in der Trophik des Tumorgewebes liegen.
Gewöhnlich werden Tumoren sehr gut durchblutet, was
wiederum zu einer verstärkten Absorption des Anregungslichtes
durch das Hämoglobin führt.

3.8 Begriffsklärungen

Unter dem Begriff „(prä-) maligne – tumoröse“ Erkrankungen werden in dieser Studie das Plattenepithelkarzinom (PEC), das Basalzellkarzinom (BCC), das Adenoid – Zystische Karzinom (ACC), das in situ Karzinom (CiS), die proliferativ – verruköse Leukoplakie (PVL), sowie die Dysplasien zweiten und dritten Grades (DII und DIII) zusammengefasst. Mit „nicht – malignen“ Erkrankungen sind der Lichen ruber, Hyperplasien und Hyperkeratosen ohne Malignitätszeichen, Dysplasien ersten Grades (DI), Papillome, Granulome, sowie kapilläre Hämangiome (Kap. Häm.) gemeint. Rein entzündliche Läsionen (Entz.) ohne Zellvermehrung und ohne Malignitätszeichen, werden zu den Normalbefunden hinzugezählt. Für die statistische Auswertung sind folgende Abkürzungen benutzt worden:

- RP** Richtig positiver Befund; erkrankte Patienten, bzw. histopathologisch veränderte Biopsien (positiv), die als solche erkannt worden sind.
- RN** Richtig negativer Befund; gesunde Patienten, bzw. histopathologisch unveränderte Biopsien (negativ), die als solche erkannt worden sind.
- FP** Falsch positiver Befund, entsprechend „RP“
- FN** Falsch negativer Befund, entsprechend „RN“

III. Ergebnisse

1. Interpretation der dargestellten Autofluoreszenz

Die Beurteilung des auf dem Bildschirm dargestellten Bildes richtet sich im Großen und Ganzen nach dreierlei Gesichtspunkten:

„Normale“
Autofluoreszenz

Normalgewebe (also normale Schleimhaut und Subkutanverhältnisse) waren durch normale AF (wie im Methodenteil definiert) charakterisiert. Regionen mit unterschiedlichem Epithelgewebe und folglich unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften konnten nicht differenziert werden. So ist beispielsweise der Übergang zwischen Plattenepithel der Stimmlippen und respiratorischem Epithel der supra- und subglottischen Region nicht erkennbar gewesen. Auch ödematöse Schwellungen der Schleimhaut und der Submucosa, die nicht direkt mit Schleimhautveränderungen einhergehen, können dieses Bild zeigen, z.B. das Reinke – Ödem.

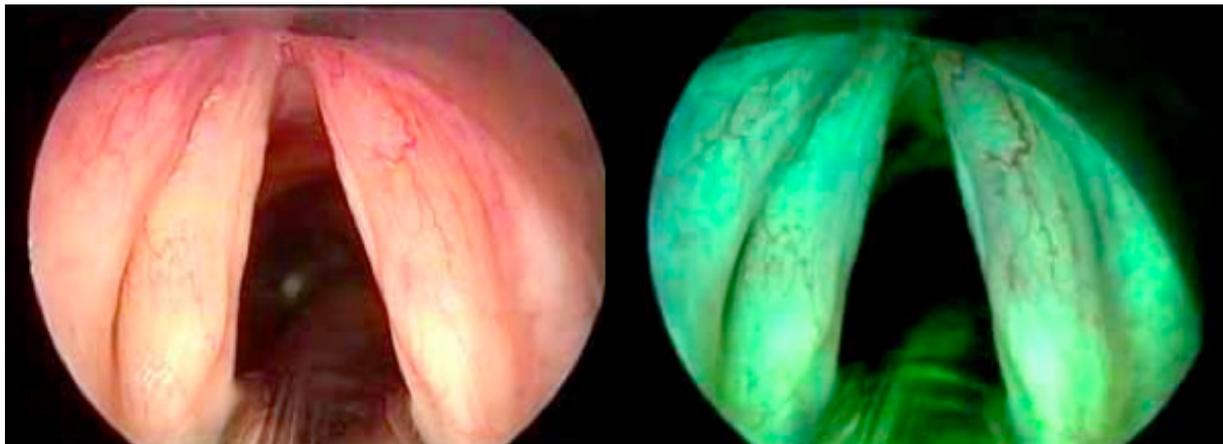


Abb. III. 1 Normale Autofluoreszenz der Stimmlippen.

„Verstärkte“
Autofluoreszenz

Das typische Bild einer Leukoplakie, mit verstärkter Verhornung des Läsionenzentrums, erzeugt intensive hellgrüne bis weißliche Areale. Hierbei steht die verstärkte Keratinfloreszenz im Vordergrund. Eine starke Verhornung der Läsion verhindert also den Blick in die Tiefe des Gewebes und maskiert dadurch die für (prä-)malignes Gewebe typische Autofluoreszenz.



Abb. III. 2 Hyperkeratose der rechten Stimmlippe.

„Abgeschwächte“
Autofluoreszenz

(Prä-)maligne Läsionen sowie gutartige Veränderungen zeigten scharf abgegrenzte Areale mit reduzierter Fluoreszenz, die manchmal rötliche Punkte enthielten. Das Tumorigradung hat keinen Einfluss auf die Erscheinung der Autofluoreszenz gehabt, Präkanzerosen oder benigne Veränderungen konnten nicht anhand des Autofluoreszenzbildes von invasiven Tumoren abgegrenzt werden.

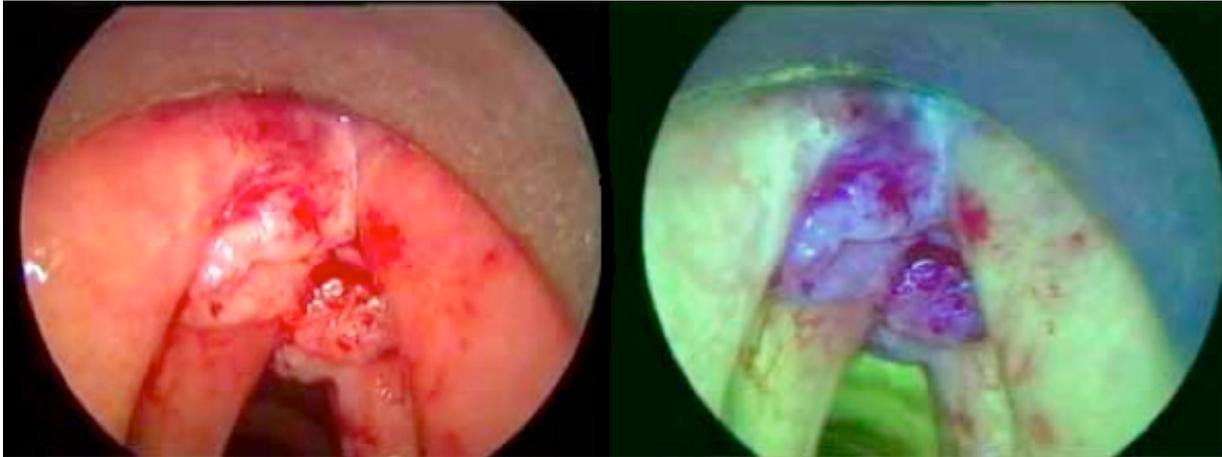


Abb. III. 3 pT_{1b} Plattenepithelkarzinom des Larynx. Die anteriore Kommissur und die vorderen Drittel beider Stimmlippen sind betroffen.

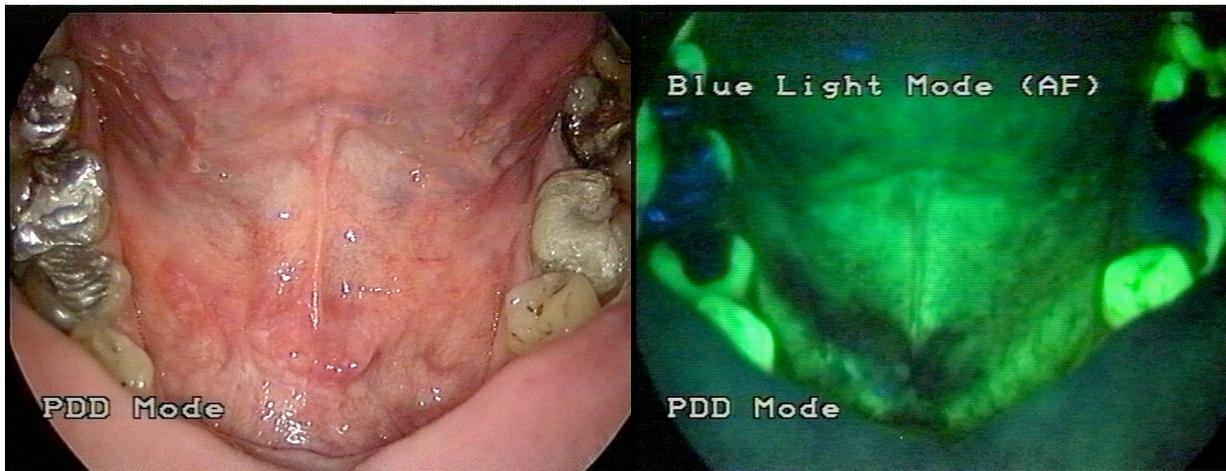


Abb. III. 4 Carcinoma in situ des anterioren Mundbodens.

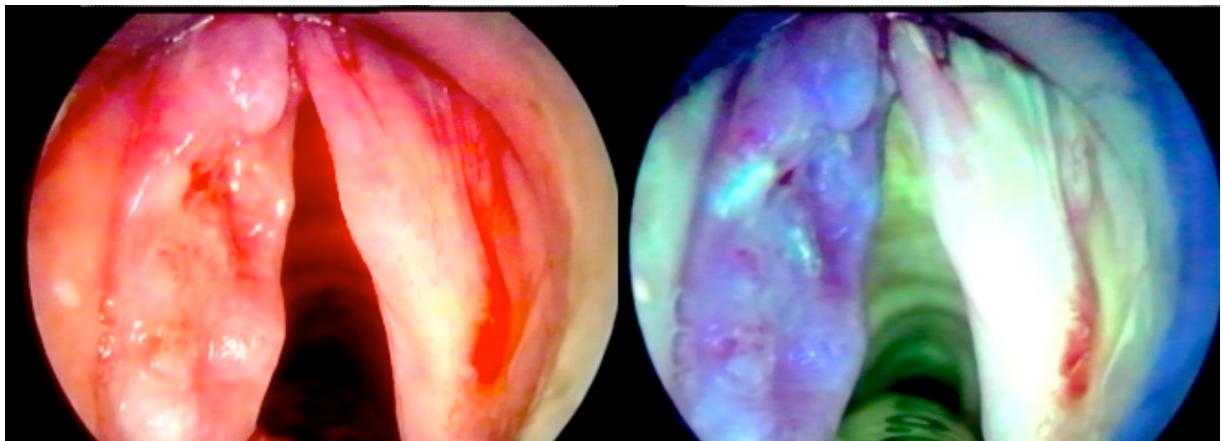


Abb. III. 5 Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms der linken Stimmlippe.

In den oben dargestellten Fällen lassen die Autofluoreszenzbilder eine gute Erkennung und Abgrenzung des erkrankten Gewebes vom Gesunden zu. Abgesehen von (prä)malignen Schleimhautveränderungen haben jedoch auch chronische Entzündungen, Vernarbungen von früheren Operationen, sowie submuköse Hämorrhagien oder Hyperämien auch eine falsch – positive, abgeschwächte Autofluoreszenz gezeigt. Außerdem sind schwer endoskopisch erreichbare Stellen, wie der Hypopharynx oder der Zungengrund, nicht besonders geeignet für eine effiziente Autofluoreszenzuntersuchung gewesen, da die Ausleuchtung nicht suffizient möglich war.

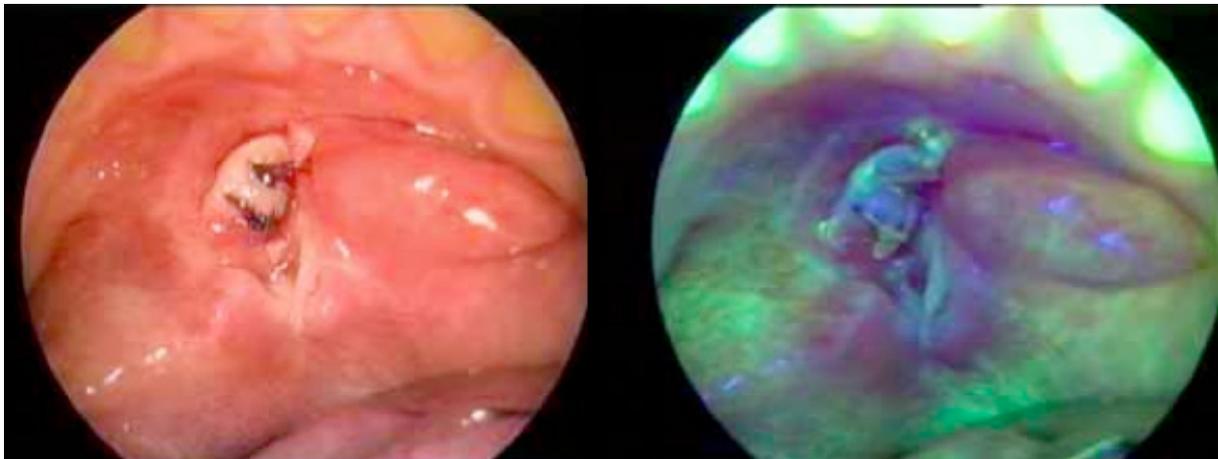


Abb. III. 6 Beispiel für eine falsch – positive Diagnose. Die Abbildung zeigt vernarbtes Gewebe sowie lokale entzündliche Reaktion 7 Tage nach der Resektion eines pT₁ G₃ Plattenepithelkarzinoms des anterioren Mundbodens.

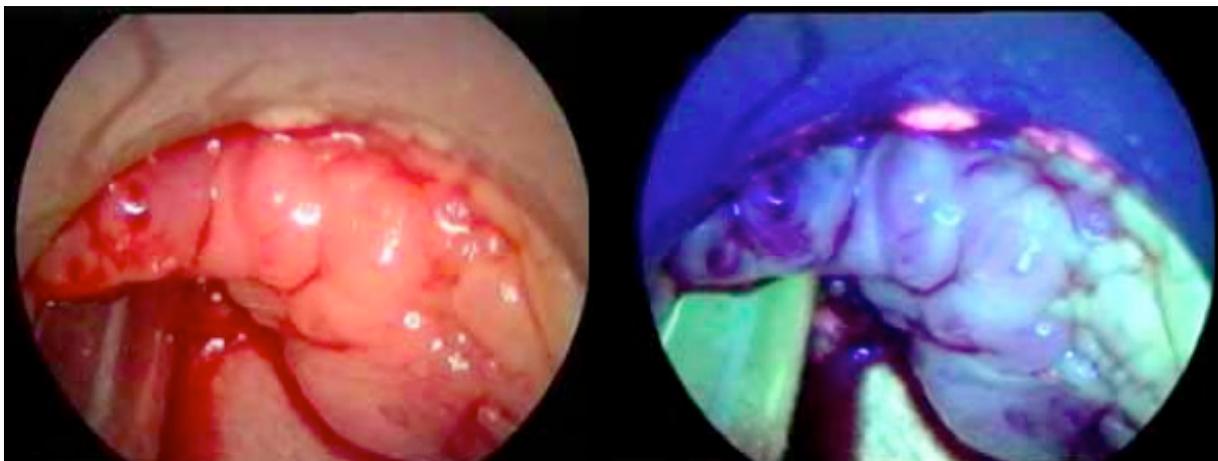


Abb. III. 7 Infiltration des Zungengrundes bei einem T₄ G₂ Tonsillenkarzinom. Eine effiziente Endoskopie ist wegen der Tumorlokalisierung nur schwer durchführbar.

2. Zusammenfassende Ergebnisse

Wie bereits erwähnt sind insgesamt 158 Patienten untersucht worden, 70 davon mit dem AF – System der 1. Generation der Fa. KARL STORZ, 88 mit dem AF – System 2. Generation. Von diesen Patienten sind insgesamt 281 Biopsien aus auffälligen Arealen entnommen worden, um das klinische Ergebnis der Weißlicht- und Autofluoreszenzendoskopie zu bestätigen. Die folgende Tabelle zeigt die Zahl der Patienten und der Biopsien, die mit dem ersten und mit dem zweiten System untersucht worden sind.

	Patienten	Biopsien
Insgesamt	158	281
System 1er Generation	70	129
System 2er Generation	88	152

Tab. III. 1 Anzahl der Patienten und der entnommenen Biopsien.

Bei 152 dieser Patienten bestand ein Verdacht auf eine (prä-) maligne Veränderung des oberen Aerodigestivtraktes, oder lag bereits eine histopathologische Diagnose vor. Die abschließende histologische Untersuchung hat gezeigt, dass 113 davon tatsächlich an einer malignen Tumorerkrankung und 39 Patienten an einer nicht – malignen Erkrankung litten.

Bei den restlichen 6 Patienten lag kein Verdacht auf eine Erkrankung („WL – normal“) vor. Diese sind untersucht worden, um die Spezifität der Untersuchung besser beurteilen zu können. Bei diesen Patienten ist auch keine Biopsie entnommen worden, sondern es erfolgte ein reiner Vergleich der Weißlicht- mit der Autofluoreszenzendoskopie.

Die „gesunden“ Biopsien hingegen stammen aus makroskopisch normalen oder nicht beurteilbaren Arealen, wo die Autofluoreszenzintensität abgeschwächt war. Diese Biopsien stammen also nicht aus den gesunden Patienten, sondern aus nicht suspekten Arealen der erkrankten Patienten.

Die folgende Tabelle zeigt die abschließende, histologische Diagnose aller 158 Patienten:

	Total	Autofluoreszenzsystem 1. Generation	Autofluoreszenzsystem 2. Generation
PEC	86	57	29
BCC	1		1
ACC	1		1
CiS	14	4	10
PVL	2		2
D III	2	1	1
D II	7	1	6
D I	5		5
Lichen	5		5
Kapilläres Hämatom	2		2
Hyperkeratose	8	1	7
Hyperplasie	2		2
Papillom	1		1
Granulom	2		2
Entzündung	14	6	8
Normal	6		6
Total	158	70	88

Tab. III. 2 Pathohistologische Diagnose der Patienten

Wie die Tabelle III. 2. zeigt, sind 63 Patienten mit malignen Erkrankungen mit Hilfe des AF – Systems der 1. Generation und 50 mit dem System 2. Generation untersucht worden. Die Anzahl der Patienten mit gutartigen Veränderungen lautet jeweils 7 und 32. Alle gesunden Patienten sind mit dem AF – System der zweiten Generation untersucht worden.

2.1 Auswertung der Läsionen

Damit ein direkter Vergleich der beiden Untersuchungsarten ermöglicht wird, erfolgte unmittelbar vor der Autofluoreszenzuntersuchung eine konventionelle

Weißlichtendoskopie. Beurteilt wurden jeweils die subjektiv beurteilte Erkennung des betroffenen Gewebes, sowie die subjektive, oberflächliche Abgrenzung der Läsion. Die Befunde der Untersuchung sind subjektiv in drei Gruppen unterteilt worden. Als „AF – normal“, bzw. „WL - normal“ werden Schleimhautbezirke bezeichnet, die keinerlei Erkrankungszeichen aufweisen. Mit „AF (od. WL) – erkennbar“ werden Areale bezeichnet, die eine makroskopisch malignitätsverdächtige Läsion ohne klare Abgrenzung zum umliegenden Gewebe aufweisen. „AF (od. WL) – abgrenzbar“ sind betroffene Regionen mit gut erkennbarer und abgrenzbarer, malignitätsverdächtigem Veränderung. Die folgende Tabelle stellt die Ergebnisse der AF – Untersuchung dar, verglichen mit der Weißlichtuntersuchung.

	WL			AF		
	normal	nur erkennbar	erkennbar u. abgrenzbar	normal	nur erkennbar	erkennbar u. abgrenzbar
PEC	3	50	33	13	24	49
BCC		1				1
ACC	1					1
CiS	4	7	3	2	7	5
PVL		1	1		1	1
D III	2				1	1
D II		4	3		1	6
D I		4	1		1	4
Lichen		2	3	1	2	2
Kap. Häm.			2			2
Hyperkeratose		3	5	2		6
Hyperplasie		1	1		1	1
Papillom		1				1
Granulom		2				2
Entz.	4	5	5	3	4	7
Normal	6			6		
Total	20	81	57	27	42	89

Patienten	158
Patienten	158

Tab. III. 3 Detaillierte Auswertung der untersuchten Läsionen mit Weiß- und Autofluoreszenzlicht.

Aus den oberen Tabellen wird deutlich, dass insgesamt 10 von 113 (prä-) malignen Veränderungen mit der Weißlichtendoskopie keine sicheren, optisch erkennbaren Zeichen eines Tumors gezeigt haben. Die restlichen 103 (prä-) malignen Läsionen

konnten als solche erkannt werden, 40 davon mit einer deutlichen Abgrenzung zum umliegenden normalen Gewebe. Zusätzlich konnte bei allen 25 Patienten mit einer nicht – malignen Erkrankung die jeweilige Läsion als solche erkannt werden.

Die Tabelle III. 3. zeigt auch, dass mit der Autofluoreszenzendoskopie allein 15 von 113 Patienten mit (prä-)malignen Veränderungen wahrscheinlich unerkannt bleiben würden. 98 (prä-) malignen Läsionen sind korrekt als solche erkannt worden, bei 64 davon wies die tumoröse Läsion eine deutliche Abgrenzung gegenüber dem umliegenden Normalgewebe auf (siehe rotes Feld in Tabelle III. 3, Seite 48). Die nicht – malignen Läsionen sind bei 22 Patienten erkannt worden.

Das folgende Diagramm zeigt die Ergebnisse für alle Formen von Läsionen, für die (prä-) malignen Veränderungen und für entzündliche Schleimhautveränderungen, die mit der Weißlicht- und mit der Autofluoreszenzendoskopie entweder nur erkennbar oder sowohl erkennbar als auch abgrenzbar waren (in %). Obwohl die Erkennbarkeit von gut- und bösartigem Gewebe sich nicht wesentlich zwischen WL- und AF – Untersuchung unterscheidet, ist die Abgrenzbarkeit mit der Autofluoreszenzuntersuchung tendenziell besser. Dies gilt auch allein für die (prä-) malignen Veränderungen. Auf der anderen Seite wird rein entzündlich verändertes Gewebe häufiger fälschlicherweise als suspekt eingestuft als mit der Weißlichtendoskopie.

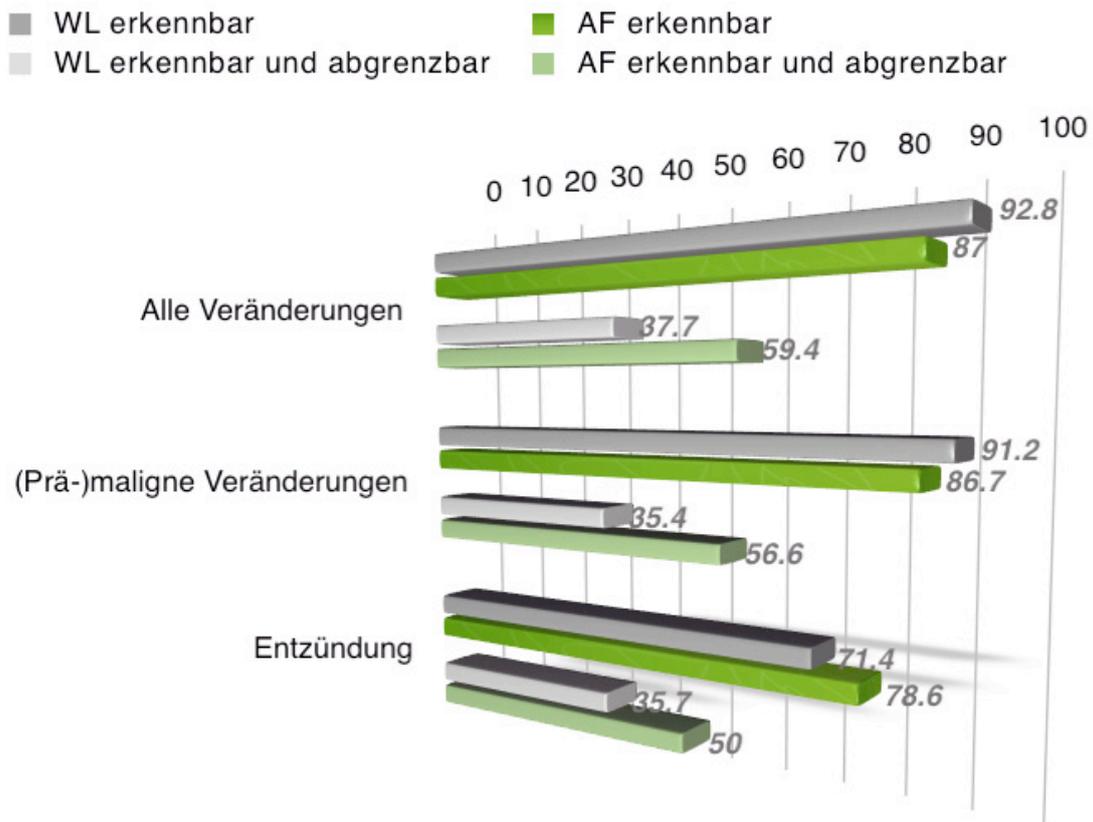


Abb. III. 8 Darstellung des Anteils der Läsionen, die nur erkannt, oder erkannt und abgegrenzt worden sind für die Weißlicht- und Autofluoreszenzendoskopie. Mit "erkennbar" sind alle Werte aus den Feldern „nur erkennbar“ und „erkennbar und abgrenzbar“ der Tabelle III. 3 gemeint.

Die wichtigsten statistischen Werte für die Diagnose von tumorösen Läsionen werden im Folgenden dargestellt.

$$\text{Sensitivität}_{(WLU \text{ Läsionen})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{128}{128 + 10} \times 100\% = 92,8\%$$

$$\text{Sensitivität}_{(AFU \text{ Läsionen})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{120}{120 + 18} \times 100\% = 87,0\%$$

$$\text{Spezifität}_{(WLU \text{ Läsionen})} = \frac{RN}{RN + FP} \times 100\% = \frac{10}{10 + 10} \times 100\% = 50,0\%$$

$$\text{Spezifität}_{(AFU \text{ Läsionen})} = \frac{RN}{RN + FP} \times 100\% = \frac{9}{9 + 11} \times 100\% = 45,0\%$$

$$\text{Korrektklassifikationsrate}_{(WLU \text{ Läsionen})} = \frac{RP + RN}{RP + FP + RN + FN} \times 100\% = \frac{128 + 10}{128 + 10 + 10 + 10} \times 100\% = 87,3\%$$

$$\text{Korrektklassifikationsrate}_{(AFU \text{ Läsionen})} = \frac{RP + RN}{RP + FP + RN + FN} \times 100\% = \frac{120 + 9}{120 + 11 + 18 + 9} \times 100\% = 81,6\%$$

$$\text{Positiver Prädiktiver Wert}_{(WLU \text{ Läsionen})} = \frac{RP}{RP + FP} \times 100\% = \frac{128}{128 + 10} \times 100\% = 92,8\%$$

$$\text{Positiver Prädiktiver Wert}_{(AFU \text{ Läsionen})} = \frac{RP}{RP + FP} \times 100\% = \frac{120}{120 + 11} \times 100\% = 91,6\%$$

$$\text{Negativer Prädiktiver Wert}_{(WLU \text{ Läsionen})} = \frac{RN}{RN + FN} \times 100\% = \frac{10}{10 + 10} \times 100\% = 50,0\%$$

$$\text{Negativer Prädiktiver Wert}_{(AFU \text{ Läsionen})} = \frac{RN}{RN + FN} \times 100\% = \frac{9}{9 + 18} \times 100\% = 33,3\%$$

Anschließend sind noch die Sensitivitätswerte für die Gruppe der (prä-) malignen und nicht – malignen Erkrankungen getrennt voneinander berechnet worden.

$$\text{Sensitivität}_{(WLU \text{ (prä-) maligne Läsionen})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{103}{103 + 10} \times 100\% = 91,2\%$$

$$\text{Sensitivität}_{(AFU \text{ (prä-) maligne Läsionen})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{98}{98 + 15} \times 100\% = 86,7\%$$

$$\text{Sensitivität}_{(WLU \text{ nicht-maligne Läsionen})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{25}{25 + 0} \times 100\% = 100,0\%$$

$$\text{Sensitivität}_{(AFU \text{ nicht-maligne Läsionen})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{22}{22 + 3} \times 100\% = 88,0\%$$

Die ausführliche Auswertung der Ergebnisse der Autofluoreszenzsysteme 1. und 2. Generation zeigt eine tendenzielle Verbesserung der Diagnose bei dem System der 2. Generation. Bei der alleinigen Autofluoreszenzuntersuchung mit dem System der 1. Generation würden 15 Patienten mit (prä-) malignen Veränderungen

voraussichtlich unerkannt bleiben (siehe auch Tabelle III. 4.). Außerdem sind 4 entzündliche Läsionen als malignitätsverdächtig erkannt worden.

Mit dem AF – System 2. Generation sind die meisten tumorösen Läsionen nicht nur erkannt, sondern auch deutlich demarkiert worden. Trotzdem wäre die Diagnose bei 3 Patienten mit nicht malignen Läsionen vermutlich falsch gewesen (siehe auch Tabelle III. 4.). Zusätzlich sind 7 Läsionen mit einer chronischen Entzündung fälschlicherweise als malignitätsverdächtig diagnostiziert worden.

Die folgende Tabelle zeigt die ausführliche Auswertung der AF – Ergebnisse im Bezug auf das verwendete AF – System.

	AF (1. Generation)			AF (2. Generation)		
	normal	nur erkennbar	erkennbar u. abgrenzbar	normal	nur erkennbar	erkennbar u. abgrenzbar
PEC	13	19	25		5	24
BCC						1
ACC						1
CiS	2	1	1		6	4
PVL					1	1
D III		1				1
D II			1		1	5
D I					1	4
Lichen				1	2	2
Kap. Häm.						2
Hyperkeratose			1	2		5
Hyperplasie					1	1
Papillom						1
Granulom						2
Entz.	2	3	1	1	1	6
Normal				6		
Total	17	24	29	10	18	60

Patienten 70

Patienten 88

Tab. III. 4 Detaillierte Auswertung der untersuchten Läsionen mit beiden AF - Systemen.

Hinsichtlich der Diagnostik von gutartigen Veränderungen ist ein Vergleich zwischen den beiden AF – Systeme nur schlecht möglich, da nur eine einzige gutartige Läsion mit dem AF – System 1. Generation untersucht worden ist.

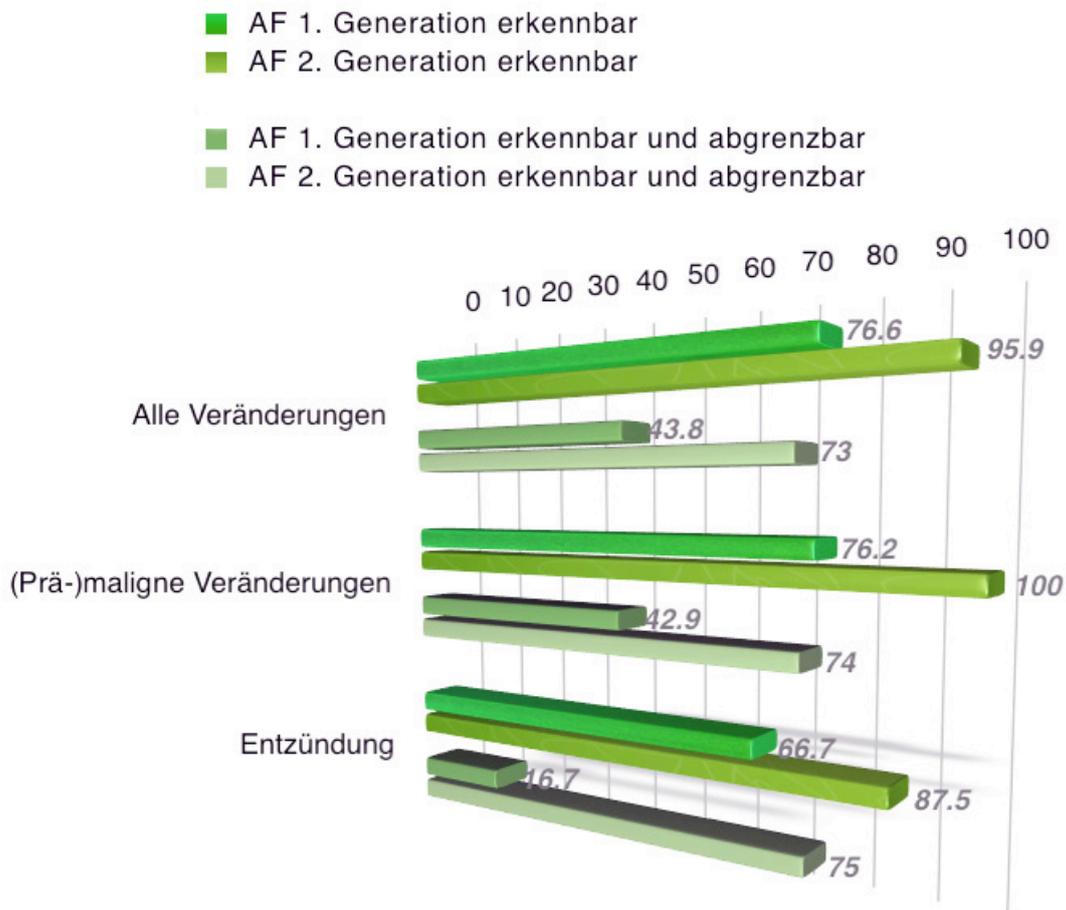


Abb. III. 9 Vergleich beider AF - Systeme hinsichtlich der Erkennbarkeit und Abgrenzbarkeit des veränderten Gewebes. Wie bereits erwähnt, werden sind mit "erkennbar" alle Werte aus den Feldern "nur erkennbar" und "erkennbar und abgrenzbar" der Tabelle III. 4. gemeint.

Wie auf dem obigen Diagramm ersichtlich wird, ist die Erkennung und Abgrenzung des pathologisch veränderten Gewebes mit dem AF – System der 2. Generation tendenziell besser. Darüber hinaus ist das (prä-) maligne Gewebe mit dem AF – System 2. Generation nicht nur besser erkannt, sondern auch deutlicher abgegrenzt worden. Problematisch ist erneut, besonders beim System 2. Generation, die häufige Einschätzung des entzündlichen Gewebes als suspekt. Im Folgenden werden die Sensitivitäten für die Diagnose von Schleimhautläsionen, sowie von (prä-) malignen Veränderungen mit beiden AF – Systemen dargestellt.

Die folgenden Diagramme zeigen einen Vergleich der Sensitivitäten der WL- und AF – Endoskopie bei der Untersuchung aller, sowie nur der (prä-) malignen Läsionen.

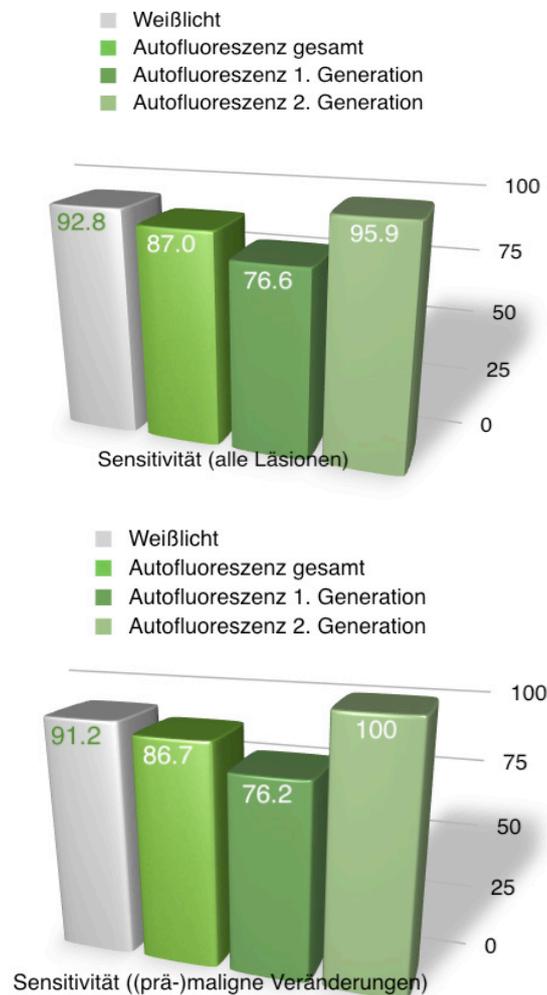


Abb. III. 10 Vergleich der Sensitivitäten der WL- und AF - Endoskopie bei der Untersuchung aller, sowie nur der (prä-)malignen Veränderungen.

2.2 Auswertung der Biopsien

Ähnlich wie bei den untersuchten Läsionen sind auch die entnommenen Biopsien ausgewertet worden. Die Ergebnisse für die Weißlicht- und Autofluoreszenzendoskopie werden in der folgenden Tabelle dargestellt.

	Total	WL		AF	
		normal	suspekt	normal	suspekt
PEC	99		99	9	90
BCC	1		1		1
ACC	1	1			1
CiS	14	2	12		14
PVL	2		2		2
D III	8	2	6		8
D II	13	1	12	2	11
D I	17		17	3	14
Lichen	5		5	1	4
Kap. Häm.	2		2		2
Hyperkeratose	10		10	2	8
Hyperplasie	7		7	5	2
Papillom	1		1		1
Granulom	2		2		2
Entz.	46	9	37	8	38
Normal	53	31	22	41	12
Total	281	46	235	71	210

Tab. III. 5 Detaillierte Auswertung der entnommenen Biopsien mit der Weißlicht- und Autofluoreszenzuntersuchung.

Die obige Tabelle zeigt, dass insgesamt 11 von 138 Gewebeproben aus (prä-) malignem Gewebe allein mit der AF – Untersuchung, und 6 von 138 Biopsien aus (prä-) malignem Gewebe mit der Weißlichtuntersuchung fälschlicherweise nicht als solche erkannt würden. Die 44 Biopsien aus den gutartigen Veränderungen sind alle mittels Weißlichtuntersuchung als solche erkannt worden, 11 davon sind in der Autofluoreszenzuntersuchung als normal bewertet worden. Das rein entzündlich veränderte Gewebe ist mit beiden Methoden zumeist als suspekt eingestuft worden.

Die wichtigsten statistischen Werte für die Diagnose von suspekten Biopsien werden im Folgenden dargestellt.

$$\text{Sensitivität}_{(WLU\ Biopsien)} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{176}{176 + 6} \times 100\% = 96,7\%$$

$$\text{Sensitivität}_{(AFU\ Biopsien)} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{160}{160 + 22} \times 100\% = 87,9\%$$

$$\text{Spezifität}_{(WLU \text{ Biopsien})} = \frac{RN}{RN + FP} \times 100\% = \frac{40}{40 + 59} \times 100\% = 40,4\%$$

$$\text{Spezifität}_{(AFU \text{ Biopsien})} = \frac{RN}{RN + FP} \times 100\% = \frac{49}{49 + 50} \times 100\% = 49,5\%$$

$$\text{Korrektklassifikationsrate}_{(WLU \text{ Biopsien})} = \frac{RP + RN}{RP + FP + RN + FN} \times 100\% = \frac{176 + 40}{176 + 59 + 40 + 6} \times 100\% = 76,9\%$$

$$\text{Korrektklassifikationsrate}_{(AFU \text{ Biopsien})} = \frac{RP + RN}{RP + FP + RN + FN} \times 100\% = \frac{160 + 49}{160 + 50 + 49 + 22} \times 100\% = 74,4\%$$

$$\text{Positiver Prädiktiver Wert}_{(WLU \text{ Biopsien})} = \frac{RP}{RP + FP} \times 100\% = \frac{176}{176 + 59} \times 100\% = 74,9\%$$

$$\text{Positiver Prädiktiver Wert}_{(AFU \text{ Biopsien})} = \frac{RP}{RP + FP} \times 100\% = \frac{160}{160 + 50} \times 100\% = 76,2\%$$

$$\text{Negativer Prädiktiver Wert}_{(WLU \text{ Biopsien})} = \frac{RN}{RN + FN} \times 100\% = \frac{40}{40 + 6} \times 100\% = 87,0\%$$

$$\text{Negativer Prädiktiver Wert}_{(AFU \text{ Biopsien})} = \frac{RN}{RN + FN} \times 100\% = \frac{49}{49 + 22} \times 100\% = 69,0\%$$

Anschließend sind noch die Sensitivitätswerte für die Gruppe der (prä-) malignen und nicht – malignen Erkrankungen getrennt voneinander berechnet worden.

$$\text{Sensitivität}_{(WLU (prä-) \text{ maligne Biopsien})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{132}{132 + 6} \times 100\% = 95,7\%$$

$$\text{Sensitivität}_{(AFU (prä-) \text{ maligne Biopsien})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{127}{127 + 11} \times 100\% = 92,0\%$$

$$\text{Sensitivität}_{(WLU \text{ nicht-maligne Biopsien})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{44}{44 + 0} \times 100\% = 100,0\%$$

$$\text{Sensitivität}_{(AFU \text{ nicht-maligne Biopsien})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{33}{33 + 11} \times 100\% = 75,0\%$$

Die folgende Tabelle zeigt analytisch das Ergebnis aus dem Vergleich der beiden AF – Systeme miteinander hinsichtlich der Erkennung von suspektem Gewebe.

	Total	AF 1. Generation		AF 2. Generation	
		normal	suspekt	normal	suspekt
PEC	99	9	59		31
BCC	1				1
ACC	1				1
CiS	14		6		8
PVL	2				2
D III	8		4		4
D II	13		2	2	9
D I	17		5	3	9
Lichen	5			1	4
Kap. Häm.	2				2
Hyperkeratose	10			2	8
Hyperplasie	7			5	2
Papillom	1				1
Granulom	2				2
Entz.	46	6	10	2	28
Normal	53	22	6	19	6
Total	281	37	92	34	118

Tab. III. 6 Vergleich der beiden AF - Systeme hinsichtlich der Erkennbarkeit vom suspektem Gewebe bei den entnommenen Biopsien.

Aus der oberen Tabelle wird deutlich, dass mit dem AF – System 1. Generation 9 von 80 Biopsien aus (prä)maligne verändertem Gewebe fälschlicherweise als normal eingestuft worden sind. 10 von 16 Biopsien aus entzündlich verändertem und 6 von 28 aus gesundem Gewebe sind (ebenfalls fehlerhaft) als suspekt diagnostiziert worden.

Mit dem AF – System der 2. Generation sind 2 von 58 Proben aus prämaligem Gewebe und 11 von 39 aus nicht – maligne – verändertem Gewebe verkannt worden. 28 von 30 Biopsien aus entzündlichem und 6 von 25 aus normalem Gewebe sind als suspekt eingestuft worden.

Wie bereits erwähnt, ist ein Vergleich der beiden AF – Systeme hinsichtlich der nicht – malignen Biopsien nur schlecht möglich. Mit dem AF – System 1. Generation sind nur 5 solche Proben untersucht worden, mit dem AF – System 2. Generation dagegen 39.

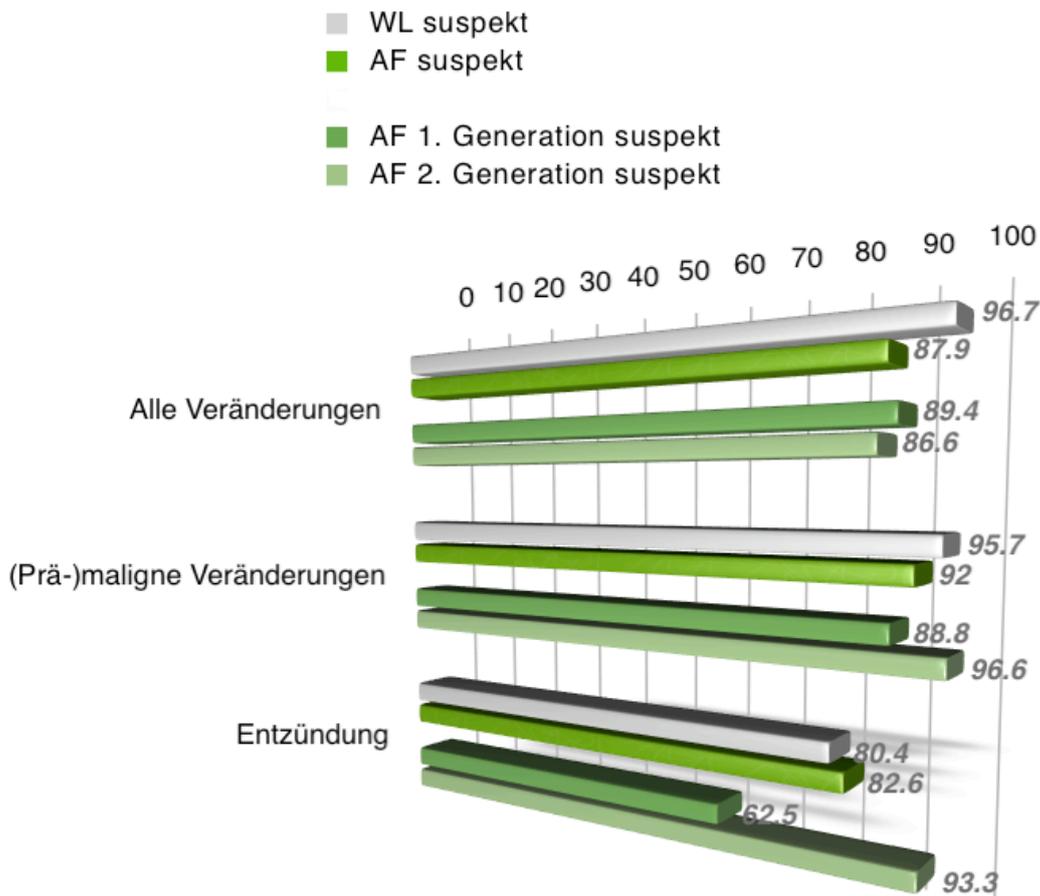


Abb. III. 11 Anteil der Biopsien, die mit der Weißlicht- und Autofluoreszenzendoskopie (insgesamt, sowie für die beiden Systemgenerationen getrennt) korrekterweise als suspekt erkannt worden sind. Zuerst werden die Werte für alle Veränderungen dargestellt, dann die Werte für die (prä-) malignen Veränderungen, und schließlich die Werte für das entzündliche Gewebe.

Insgesamt wird aus dem oberen Diagramm deutlich, dass die Erkennbarkeit von pathologischen Schleimhautveränderungen mit der Kombination von Weißlicht- und Autofluoreszenzendoskopie sehr gut ist. Die zweite Systemgeneration hat sehr gute Ergebnisse bei der Erkennung von (prä-) malignen Biopsien gezeigt, die tendenziell schlechter werden, wenn man alle Veränderungen betrachtet. Rein entzündliche Biopsien werden mit beiden Methoden (Weißlicht und Autofluoreszenzlicht) und mit

der 2. Systemgeneration häufiger als mit der 1. fälschlicherweise als suspekt diagnostiziert.

Im Folgenden werden die Sensitivitäten für die Diagnose von Schleimhautläsionen, sowie von (prä-) malignen Veränderungen mit beiden AF – Systemen dargestellt.

$$\text{Sensitivität}_{(AFU \text{ Biopsien } 1. \text{ Generation})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{76}{76+9} \times 100\% = 89,4\%$$

$$\text{Sensitivität}_{(AFU \text{ Biopsien } 2. \text{ Generation})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{84}{84+13} \times 100\% = 86,6\%$$

$$\text{Sensitivität}_{(AFU \text{ (prä-)maligne Biopsien } 1. \text{ Generation})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{71}{71+9} \times 100\% = 88,8\%$$

$$\text{Sensitivität}_{(AFU \text{ (prä-)maligne Biopsien } 2. \text{ Generation})} = \frac{RP}{RP + FN} \times 100\% = \frac{56}{56+2} \times 100\% = 96,6\%$$

Hieraus wird deutlich, dass allein die Autofluoreszenzuntersuchung insgesamt eine relativ hohe Sensitivität aufweist, insbesondere bei der Diagnose von (prä-) malignen Biopsien, fast genau so hoch wie die Weißlichtuntersuchung (95,7 % für die Weißlicht– gegen 96,6 % für die Autofluoreszenzuntersuchung mit dem System 2. Generation; siehe auch Abb. III. 11). Darüber hinaus macht die AF – nur in Kombination mit einer WL – Endoskopie einen Sinn. Schwachpunkt beider Methoden und beider AF – Systemgenerationen bleibt die fehlerhafte Einordnung vom entzündlichen Gewebe als suspekt.

IV. Diskussionen

Die Indikation und Effizienz der bildgebenden Fluoreszenzdiagnostik ist anfangs überwiegend bei der Diagnose von Harnblasen – und intrazerebralen Tumoren beschrieben worden, gewann dann aber auch im oberen Aerodigestivtrakt immer mehr an Bedeutung (Origitano et al. 1989, Baumgartner et al. 1992). Allgemeinen Charakteristika, Befunde und Ergebnisse dieser Technik sind in den vergangenen Jahren von unserer Forschungsgruppe publiziert und diskutiert worden (Betz et al. 1999, Betz et al. 2000, Betz et al. 2006). Die Bedeutung der Autofluoreszenzdiagnostik liegt in der Detektion oberflächlicher, pathologischer Veränderungen sowie der Festlegung der Grenzen zwischen Tumor und normaler Schleimhaut und somit zur besseren Planung der weiteren Therapie. Die Autofluoreszenzdiagnostik ist eine einfache Technik, die eine relativ hohe Selektivität für Tumorgewebe aufweist, wodurch sie sich für die Diagnose und Kontrolle von (prä –)malignen Läsionen des oberen Aerodigestivtraktes eignet. Sie kann prä– und intraoperativ dazu beitragen, die Läsionsgrenzen besser zu definieren, und somit die Therapieentscheidung maßgeblich beeinflussen. Darüber hinaus kann die AF – Untersuchung postoperativ bei der Diagnostik von Rezidiven oder bei der Kontrolle anderer Therapiearten (z.B. photodynamische Therapie, Kryochirurgie) ein wichtiges Hilfsmittel darstellen.

1. Auswahl der Patienten

In dieser Studie haben insgesamt 158 Patienten mit einer Erkrankung des oberen Aerodigestivtraktes teilgenommen. 69% davon sind Männer gewesen, das mittlere Alter betrug 60,4 Jahre. Bei den meisten Patienten lag bereits ein relativ sicherer klinischer Verdacht auf eine pathologische Schleimhautläsion oder sogar eine histopathologisch bestätigte Diagnose vor. Dies ermöglichte die Betrachtung des AF – Bildes mit einem etwas kritischeren Blick.

Es sind jedoch auch Patienten mit Krankheitsrezidiven, die oft ein undeutliches und variables Erscheinungsmuster aufweisen, sowie solche mit diagnostisch unklaren Veränderungen eingeschlossen worden, da hier die rein optische Diagnose oft kein

zufriedenstellendes Ergebnis liefert. Bereits therapierte, rezidivierende Läsionen weisen beispielsweise die Besonderheit auf, dass Tumorgewebe und Narbengewebe zum Teil gemischt vorkommen. Dadurch wird die Erkennung und Abgrenzung des betroffenen Gewebes zusätzlich erschwert.

2. Durchführung der Autofluoreszenzendoskopie

Die Autofluoreszenzendoskopie ist entwickelt worden, um die Erkennung und Abgrenzung von (prä –)malignen Läsionen zu erleichtern (Arens et al. 2006). Sie ist einfach durchführbar und kann problemlos in die konventionelle Weißlichtendoskopie integriert werden. Es handelt sich dabei um eine nicht – invasive und leicht reproduzierbare Untersuchungsmethode (Betz et al. 2002, Zalesska - Krecicka et al. 2005), die sowohl am wachen, als auch am narkotisierten Patienten durchgeführt werden kann. Sie wird genau so gut wie die konventionelle Endoskopie toleriert, und beeinträchtigt weder funktionell, noch kosmetisch, im Gegensatz zu anderen diagnostischen Methoden, wie z. B. die Biopsieentnahme (Fritsch et al. 2006). Dieser kosmetische Faktor ist beispielsweise wichtig bei der Untersuchung der sichtbaren Gesichtsbereiche (Alkalay et al. 2008). Sie verlängert kaum die konventionelle Endoskopie und bietet als ergänzende Methode zahlreiche Vorteile. Die Autofluoreszenzuntersuchung kann sofort, ohne die vorherige Applikation von Medikamenten oder sonstigen Tumormarkern, und komplikationslos eingesetzt werden. Allein für die diagnostische Untersuchung von Haut – und Schleimhautläsionen in rezidivierenden, (prä –)malignen Veränderungen postoperativ zeigt die Fluoreszenzuntersuchung mit 5 – ALA induziertem PPIX scheinbar bessere Ergebnisse (Fritsch et al. 1998, Csanady et al. 2004, Arens et al. 2007).

Als weitere Vorteile können die leichte Durchführung der Untersuchung, auch ohne Assistenz, die praktische Umschaltung von WL– auf AF – Modus über Fußschalter und die gleichzeitige Dokumentation des Befundes mit Hilfe des hochauflösenden Videorekorders und eines Fotodruckers angesehen werden. Um die Vorteile der HD – Technologie („high definition“) nutzbar zu machen, hat die Firma KARL STORZ (Tuttlingen, Deutschland) mittlerweile das verwendete Dokumentationssystem AIDA

Compact weiterentwickelt und verbessert (AIDA Compact HD). So können mit dem neuen System Standbilder in Full – HD – Auflösung (1920 x 1080 Bildpunkten) aufgenommen und für Archivierungs– und Präsentationszwecke abgespeichert werden. Zusätzlich können durch die konsequente Weiterverarbeitung des sog. Progressive Scan Signals der HD – Kamera qualitativ hochwertige Videoaufnahmen in HD – Format realisiert werden. Nach Abschluss der Behandlung sichert das AIDA Compact HD die Daten auf DVD, CD – ROM, oder externen Speichermedien (Festplatte, USB – Stick). Zusätzlich besteht die Option, die gewonnenen Daten direkt in einer elektronischen Patientenakte ab zu legen.

3. Experimenteller Aufbau

Bereits 1995 hat die Firma KARL STORZ das erste System zur photodynamischen Diagnose (PDD) entwickelt (AF – System 1. Generation). Dieser Setup mit den einzelnen Komponenten (Hochleistungslichtquelle, spezielle Optiken und lichtempfindliche Endokamera) hat sich für die (Auto–) Fluoreszenzuntersuchung gut bewährt. Ausgehend von den guten Erfahrungen wurde diese Technik modifiziert und am Ende des letzten Jahrhunderts (1998) ein System zur Autofluoreszenz auf dem Markt gebracht, zunächst für die Frühdiagnose des Bronchialkarzinoms. Erst am Anfang dieses Jahrhunderts ist das AF – System der 2. Generation für weitere Anwendungsbereiche, wie die HNO, zugelassen worden. Hierbei sind die einzelnen Geräte verbessert worden, das Setup ist jedoch gleich geblieben.

3.1 Modifiziertes Endoskop

Der für die AF-Bildgebung benötigte Beobachtungsfiter ist in den modifizierten Optiken 2. Generation mittels eines eingebauten Filterrades wahlweise einschwenkbar. Dies macht das Endoskop besonders benutzerfreundlich und ermöglicht eine leichtere Umschaltung zwischen AF – und Weißlichtuntersuchung. Die Endoskope der ersten Generation verfügten nicht über solch ein Filterrad; der Beobachtungsfiter muss hier manuell zwischen Kamerakopf und Endoskop zwischengeschaltet werden. Dadurch war das Handling und somit die Durchführung der Endoskopie durch eine einzelne Person wesentlich erschwert.

Als nachteilig für beide Systeme gilt die Sensitivität der Optik gegenüber Alterungsprozessen. Hierbei wird ihr Brennfleck vergrößert, aufgrund der nicht optimalen Einkoppelung des Anregungslichts in das Beleuchtungsfaserbündel der Optik.

3.2 Lichtleiter

Der Lichtleiter ist für die optimale Lichtübertragung bis zum distalen Ende des Endoskops verantwortlich. Das AF – System 1. Generation verfügte über einen konventionellen Glasfaserlichtleiter, bei dem gewisse Lichtverluste auftreten (insbesondere im Vergleich zum Fluidlichtleiter). Die Lichtverluste sind hier durch eine direkte Verbindung zwischen Lichtleiter und Lichtquelle minimiert worden; sonstige, sog. Connector – Bereiche fehlten. Bei der 2. Systemgeneration wird zwar der Leiter durch einen zusätzlichen Connector – Bereich mit der Lichtquelle verbunden, die Lichtverluste werden jedoch durch die bessere Übertragungscharakteristik des Fluidlichtleiters kompensiert. Schließlich konnte die Lichtübertragung durch die Benutzung von einem Fluidlichtleiter im System der 2. Generation um ca. 10 % verbessert werden.

3.3 Das D - Light (- C) - System

Wie im zweiten Kapitel bereits beschrieben, verfügen die Lichtquellen beider Systemgenerationen über ein spezielles, integriertes Gitter („taper“), der die (für das Auge viel zu helle) Lichtleistung beim WL - Modus auf 10 % der Gesamtleistung reduziert, beim AF - Modus jedoch 100 % des Lichtes passieren lässt (weil es für die AF – Anregung benötigt wird). Das macht das Autofluoreszenzsystem benutzerfreundlich und praktisch auch im Operationssaal. Einziger Unterschied der beiden Lichtquellen-Generationen ist die insgesamt höhere Lichtleistung des D – Light – C – Systems, die durch eine strategisch günstigere Position der lichtführenden Elemente in der Lichtquelle erreicht wird.

Der Anregungsfilter ist in den beiden Systemgenerationen gleich geblieben. In unserer Apparatur ist die Umschaltung mit Hilfe von am Kamerakopf befindlichen Drucktasten möglich gewesen. Hierfür wird eine elektronische Verbindung zwischen Kamera und Lichtquelle benötigt. Alternativ kann ein Hand – oder Fußschalter zum Einsatz kommen. Beide Methoden sind sehr praktisch und erlauben es dem Operateur, zwischen den beiden Lichtarten umzuschalten, ohne den Blick vom Untersuchungsfeld zu entfernen.

3.4 Mögliche Fehlerquellen

Obwohl die Verwendung des Autofluoreszenzsystems der Fa. Karl Storz unkompliziert erscheint, kann vor allem der unerfahrene Untersucher mit Problemen konfrontiert werden. Diese kommen hauptsächlich bei Nichtbeachtung der Bedienungshinweise des Herstellers vor. Nach unserer Erfahrung sind solche Probleme nach regelmäßiger Benutzung leicht zu vermeiden. Ursachen für eine fehlerhafte Bilddarstellung sind:

1. Eingeschaltete interne Beleuchtung des bei der Untersuchung verwendeten Laryngoskopes (Abb. IV.1).
2. Fehlerhafte Verschaltung des Kameracontrollers mit der Lichtquelle. Dieses Problem führt zum Ausbleiben der konzertierten Umschaltung beider Geräte.
3. Ausbleiben des Weißlichtabgleichs führt zur Verfälschung der Farbtöne.
4. Fehlerhafte Manipulationen der Integrationszeit sowie der Verstärkung („gain“) verursachen oft wackelige Bilder oder solche, die entweder nicht ausreichend hell oder zu stark gekörnt erscheinen.
5. Schlechte Bildschärfe kann mit Hilfe des Fokusringes am Kamerakopf, durch Optimierung des Abstandes zwischen Endoskopende und Gewebe, und mit Hilfe von Antibeschlagmittel korrigiert werden.

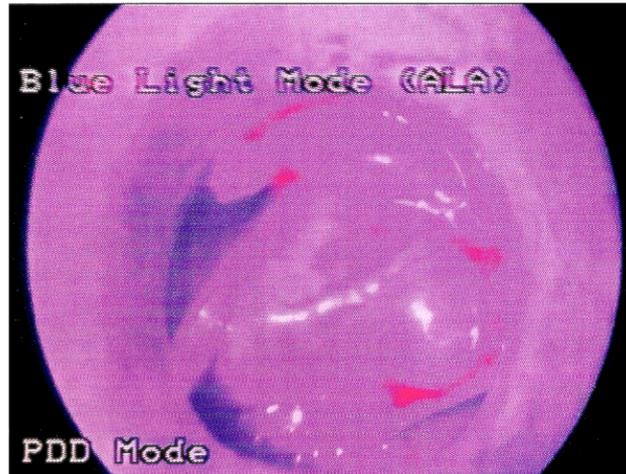


Abb. IV. 1 Autofluoreszenzdarstellung bei eingeschalteter interner Beleuchtung des Stürzlaryngoskops.

4. Diagnosestellung

Aufgrund der Ansammlung von unterschiedlichen Fluorophoren in den verschiedenen Schichten des normalen und des tumorösen Gewebes, kann die Autofluoreszenzendoskopie kein Gewebe – spezifisches Ergebnis liefern. Eine alternative Methode wäre die selektive Abbildung bestimmter Fluorophore und die Abfilterung der Restfluoreszenz (wie z. B. bei der im Laser-Forschungslabor der LMU entwickelten, multiplen Fluorophorenanalyse (Pauli et al. 2007). Dies ist bisher jedoch nur auf punktspektroskopischer Basis möglich, da das Lichtsignal für ein gutes endoskopisches Bild zu schwach ausfallen würde. Die Autofluoreszenzendoskopie ist eine Methode mit einer hohen Sensitivität, die im Rahmen eines optischen „Screening“ in der Lage ist, sonst unsichtbare, kleinste pathologische Veränderungen der Gewebeschichten zu demarkieren. In so einem Fall wäre zwar eine gute Spezifität ebenfalls wünschenswert, steht jedoch hier nicht so sehr im Vordergrund.

Das Autofluoreszenzsystem, das in dieser Studie benutzt wurde, ist von der Firma KARL STORZ in Zusammenarbeit mit dem LASER – Forschungslabor der LMU entwickelt worden. Es kann sowohl für die AF – als auch für die Fluoreszenzdiagnostik nach Applikation von 5 – ALA verwendet werden. Bei der 1. Systemgeneration hat die Fluoreszenzuntersuchung mit 5 – ALA hinsichtlich der

Tumorerkennung bessere Ergebnisse gezeigt als die AF – Diagnostik (Betz 2000, Betz et al. 2002). Mit der Entwicklung der 2. Systemgeneration am Anfang des neuen Jahrhunderts ist die Bildqualität jedoch wesentlich besser geworden, aufgrund der höheren Lichtleistung und des besseren Kamerasystems. Als die AF – Untersuchung tendenziell immer bessere Ergebnisse lieferte, wurde zumindest in unserer Arbeitsgruppe schnell auf die Applikation von 5 – ALA verzichtet, da diese zum einen überflüssig erschien und zudem praktische Nachteile aufweist, wie:

1. Die Untersuchung mit 5 – ALA ist teurer als die AF und nicht zugelassen.
2. Sie ist unpraktischer durchzuführen aufgrund der Dauer der lokalen Substanzapplikation und der langen Inkubationszeit.

Es gibt jedoch bisher keinen direkten Vergleich der ALA– und AF – Bildgebung mit dem System der 2. Generation, der diesen Eindruck bestätigen könnte.

Ein großes Problem der Autofluoreszenzuntersuchung ist die Subjektivität bei der Auswertung der erzeugten Bilder. Die Unterschiede in der Autofluoreszenz zwischen normalen und malignen Gewebe bieten zwar neue Möglichkeiten bei der Diagnose von epithelialen, pathologischen Läsionen (Palasz et al. 2003), es ist jedoch manchmal sehr schwer zwischen “gesund” und “suspekt” zu unterscheiden und über die Läsionsgrenze zu entscheiden. Die AF – Untersuchung liefert qualitativen Informationen, keine quantitative Messungen, und es gibt oft mehrere Interpretationsmöglichkeiten. Zusätzlich können weitere Faktoren, wie die Belichtungsverhältnisse, der hohe Kontrast zwischen Anregungs– und AF – Licht, sowie die Überschaubarkeit der betroffenen Region das endoskopische Bild stark beeinflussen.

Alle diese Parameter beeinflussen den Faktor „Subjektivität“ und haben deutlich gezeigt, dass ein gewisser Lerneffekt für die richtige Interpretation der AF – Bilder nötig ist. Die Endoskopie und die Auswertung der AF – Bilder in dieser Studie sind immer entweder von einem oder von zwei Untersuchern durchgeführt worden (Prof. Dr. med. Andreas Leunig und Dr. med. Christian Betz). Am Ende sind alle aufgenommenen Bilder und Sequenzen nochmal ausgewertet worden, um diesen Lerneffekt nochmals auszunutzen.

Trotz dieser Sicherheitsmaßnahmen, die unsere Forschungsgruppe getroffen hat, kann der Einfluss der Subjektivität nicht komplett ausgeschlossen werden. Eine potentielle, computerisierte Auswertung der erhaltenen Bildsequenzen mittels sog. „neuronaler Netzwerke“, also aus Erfahrung lernenden Softwarelösungen, könnte hier zu einer Verbesserung der Situation beitragen und ist für die nähere Zukunft anvisiert.

5. Ergebnisse

5.1 Allgemeine Schlussfolgerungen

Wie aus dem 3. Kapitel (Ergebnisse) ersichtlich, ist mit beiden Systemgenerationen eine möglichst gleiche Anzahl von Patienten mit malignen Erkrankungen untersucht worden, damit ein sinnvoller Vergleich angestellt werden kann (63 Patienten mit dem AF – System 1. Generation, 50 mit dem System 2. Generation). In beiden Fällen haben wir die Studie auf Patienten mit frühen Schleimhautveränderungen fokussiert, mit einer relativ sicheren klinischen, oder sogar einer pathologischen Diagnose.

Ein direkter Vergleich zwischen Weißlicht- und Autofluoreszenzendoskopie ist nur dann möglich, wenn beide Untersuchungen zeitnah, oder besser unmittelbar nacheinander stattfinden. Auf dieser Weise wird es ermöglicht, dass alle sonstigen Faktoren, die die subjektive Beurteilung des endoskopisch betrachteten Gewebes beeinflussen könnten, wie z.B. das Umgebungslicht oder das Auge des Betrachters, gleich sind.

Die AF – Endoskopie ist leichter durchführbar bei gut zugänglichen Regionen des oberen Aerodigestivtraktes (z. B. Mundhöhle, Oropharynx und Endolarynx). Areale wie der Zungenrund und Hypopharynx, die schlecht zugänglich sind sowie Regionen mit einer häufig auftretenden, unspezifischen bakteriellen Porphyrinfluoreszenz (Zahnfleisch und Zungenkörper) sind weniger geeignet für eine AF – Untersuchung. Im Allgemeinen kann man über Veränderungen des Erscheinungsbildes der natürlichen, satt – grünen Autofluoreszenz folgende Aussagen treffen:

„Verstärkte“
Autofluoreszenz

Eine starke Autofluoreszenz ist das Ergebnis einer verstärkten Keratinfloreszenz, also einer gesteigerten Verhornungstendenz. Die intensiven hellgrünen bis weißlichen Bilder, die dadurch erzeugt werden, können nur schlecht ausgewertet werden. Eine verstärkte Verhornung oder eine Bakterienansiedlung (in dem Fall dann eine rote Fluoreszenz) der Schleimhaut verhindert den Einblick in die Tiefe der Läsion, und somit ihre genauere Beurteilung.

Eine starke Verhornung ist jedoch auch mit der Weißlichtuntersuchung gut erkennbar und bedarf sowieso einer histologischen Abklärung. Das Ergebnis der Autofluoreszenzendoskopie beeinflusst also nicht so stark die folgende Therapie.

„Abgeschwächte“
Autofluoreszenz

(Prä –)maligne Veränderungen zeigen typischerweise eine abgeschwächte Autofluoreszenz. Maligne Veränderungen sind jedoch von Tumorstufen nicht sicher zu unterscheiden. Wie bereits im Kapitel I erwähnt („Einleitung“), liegt die Ursache für die abgeschwächte Autofluoreszenz in der niedrigen Konzentration von Eigenfluorophoren im Tumorgewebe, und in der Abschattung des Autofluoreszenzlichtes aus der Submucosa durch tumorös verdicktes Plattenepithel.

Das Anregungslicht besitzt eine Eindringtiefe von etwa 300 Mikrometer und erreicht daher beim neoplastisch verdickten Tumorgewebe nicht so leicht die submuköse Schichten, wie beim Normalgewebe. Dadurch wird bei Veränderungen mit einem großen vertikalen Durchmesser ein erheblicher, bei Veränderungen mit einer geringeren Dicke nur ein leichter Verlust an Autofluoreszenz beobachtet. Zusätzlich zeigt das submuköse Gewebe eine viel größere AF – Intensität als das darüber liegende Epithel, aufgrund der höheren Konzentration an Eigenfluorophoren. Im Beispiel des Kehlkopfes zeigt das

Larynxepithel während der Tumorentwicklung eine progressive Verdickung, die wiederum zu einem erheblichen Verlust von Autofluoreszenz führt (Arens et al. 2007a).

Ein weiterer Grund für die Abschwächung der AF-Intensität in (prä –)malignen Bereichen könnte in der Trophik des Tumorgewebes liegen. Gewöhnlich werden Tumoren sehr gut durchblutet, was wiederum zu einer verstärkten Absorption des Anregungslichtes durch Hämoglobin führt.

Auch andere Schleimhautveränderungen, beispielsweise chronische Entzündungen, weisen eine verringerte Autofluoreszenz auf. In dem Fall ist jedoch die Intensitätsminderung meist deutlich geringer, das betroffene Gewebe sieht also heller aus, und die Läsionsgrenze ist oft eher diffus. Das Ergebnis einer solchen Autofluoreszenz - Untersuchung ist hinsichtlich der Diagnose und späteren Therapie daher meist nicht aussagekräftig (Bruls et al. 1984, Arens et al. 2004).

5.2. Ergebnisse hinsichtlich der untersuchten Läsionen

Durch die kombinierte Verwendung von AF – und WL – Endoskopie sind 10 (prä –) maligne Veränderungen (3 Plattenepithelkarzinome, 1 adenoid – zystisches Karzinom, 4 Carcinomata in situ und 2 Dysplasien III. Grades) mehr erkannt worden als mit der alleinigen Weißlichtuntersuchung; durch die alleinige Durchführung der AF – Endoskopie hätte man 15 (prä –)malignen Läsionen (13 ,3%) voraussichtlich nicht erkannt. Obwohl die Bildinterpretation sehr subjektiv ist, man kann die Kombination von beiden Methoden als positiv für den Patient betrachten.

Die Sensitivität der AF – Untersuchung bei der Erkennung von Schleimhautläsionen jedweder Art, (prä –)malignen Läsionen oder nicht – malignen Läsionen gegenüber entzündlichem oder gesundem Gewebe ist im Vergleich zu der der Weißlichtendoskopie leicht schlechter. Das gleiche gilt auch für die Genauigkeit und

den positiven prädiktiven Wert. Hinsichtlich der Spezifität und den negativen prädiktiven Werten zeigen beide Untersuchungsmethoden eher schlechte Ergebnisse mit Werten unter 50%. Dies bestätigt unsere Schlussfolgerung, dass die AF – Untersuchung insgesamt für Schleimhautläsionen unspezifisch ist.

Betrachtet man die zwei Systemgenerationen getrennt voneinander, dann ändert sich das Bild leicht. Das System 1. Generation hat bei der Detektion aller, sowie nur der (prä –)malignen Läsionen, eine Sensitivität von leicht über 75% gezeigt. Die 2. Systemgeneration hat auf der anderen Seite Sensitivitätswerte erreicht, die über den Werten der Weißlichtuntersuchung liegen (95,9% gegen 92,8% für alle Läsionen, 100,0% gegen 91,2% für die (prä –)malignen Läsionen). Die Ursache könnte an der verbesserten Bildqualität liegen, mit der beispielsweise sog. „jiggle“ – Artefakte (Artefakte aufgrund der langen Integrationszeit) vermeidbar geworden sind.

Die richtige Abgrenzung der untersuchten Schleimhautveränderungen ist ein weiterer Aspekt gewesen, der uns intensiv beschäftigt hat. Diesbezüglich konnte man mit dem AF – System 2. Generation (sowohl bei allen, als auch nur bei den (prä –) malignen Veränderungen) die oberflächliche Läsionsgrenze besser vom gesunden oder entzündlichen Gewebe unterscheiden als mit der Weißlichtuntersuchung. Natürlich ist die Delimitation der Läsionsgrenze ebenso subjektiv die alleinige Tumorerkennung. Die Tatsache jedoch, dass jede Verdickung der Mucosa zu einer Reduktion der Autofluoreszenz führen müsste, kann als Argument für unsere Ergebnisse gesehen werden.

5.3 Ergebnisse hinsichtlich der entnommenen Biopsien

Das Ergebnis der Korrelation der histopathologischen Diagnose mit dem makroskopischen Befund sollte sehr vorsichtig betrachtet werden. Einerseits weil die Biopsieentnahme sich am klinischen Bedarf ausgerichtet hat (Biopsien sind nicht aus zufällig ausgewählten Stellen entnommen worden), andererseits weil bei bereits vordiagnostizierten Tumoren keine Biopsieentnahme stattgefunden hat. Die statistische Auswertung der entnommenen Biopsien bestätigt jedoch zum größten Teil das Ergebnis der untersuchten Läsionen. Insgesamt erscheint die Erkennung

und oberflächliche Abgrenzung vom (prä –)malignen sowie nicht – malignen Gewebe besser zu sein, wenn die Weißlichtendoskopie kombiniert mit der AF – Untersuchung stattfinden. Die wiederum hohe Zahl der falsch – positiven Befunde aufgrund vom hyperkeratotischem, vernarbtem oder entzündlichem Gewebe verdeutlichen, dass die AF – Untersuchung nicht nur eine hochsensitive, sondern auch relativ unspezifische Methode für die Diagnostik von Schleimhautveränderungen ist.

Diese Schlussfolgerungen werden von zahlreichen Publikationen unserer, sowie anderer Forschungsgruppen bestätigt (Betz et al. 1999, Betz et al. 2002, Malzahn et al. 2002, Paczona et al. 2003, Arens et al. 2006). Diese Studien beinhalten auch eine Spektralanalyse, die eine deutliche AF – Reduktion beim Tumorgewebe zeigt und somit die theoretische Basis für die AF – Untersuchung (zusammen mit der histopathologischen Korrelation) nochmals bestätigt. Mit Sensitivitätswerten zwischen 66,6% und 97,4% und Spezifitätswerten zwischen 56,4% und 86,8% konnten diese Studien bestätigen, dass eine Kombination von Weißlicht– und Autofluoreszenzendoskopie die Sensitivität und Spezifität der Diagnose von (prä –) malignen Schleimhautläsionen des oberen Aerodigestivtraktes wesentlich verbessern kann.

Die Autoren der o.g. Studien haben immer auch die bessere Erkennung der oberflächlichen Läsionsgrenze betont, die eine chirurgische Tumorsektion mit Schonung des umliegenden gesunden Gewebes erleichtert. Falsch – positive Befunde (aufgrund des vernarbten oder entzündlichen Gewebes) sind auch bei diesen Studien relativ häufig gewesen. Falsch – negative Diagnosen sind auf der anderen Seite relativ selten vorgekommen und haben sich meistens aus hyperkeratotischem Gewebe ergeben, welches die eigentliche Läsion optisch maskierte.

Zusammenfassend erscheint es ratsam, die AF – Untersuchung als ein zusätzliches diagnostisches Hilfsmittel zu sehen, welches standardmäßig für die Diagnose von (prä –) malignen Veränderungen des oberen Luft – und – Speiseweges eingesetzt werden kann, insbesondere bei Risikopatienten, wo es wichtiger ist keine Läsion zu übersehen, als das gesunde vom erkrankten Gewebe eindeutig zu unterscheiden.

6. Vergleich der Autofluoreszenzdiagnostik mit dem STORZ – System mit anderen Untersuchungsmethoden

Die Vorteile einer routinemäßigen Untersuchung, insbesondere der Risikopatienten, sind für die Frühdiagnose von Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes unbestritten. Die beste, und meist getestete Methode ist die regelmäßige Untersuchung durch erfahrene Ärzte oder anderer „Health Care Professionals“ (Sankaranarayanan et al. 2005). Andere Methoden, wie die Toluidinblau Färbung oder die Fluoreszenzdiagnostik werden als vorteilhaft beschrieben, es gibt jedoch bisher keine Evidenz dafür, dass sie nützlich oder gar schädlich sind und sie sollten daher auf jeden Fall weiter untersucht werden (Kujan et al. 2006). Alle Methoden, die zur Verbesserung der Tumordiagnostik im oberen Aerodigestivtrakt heutzutage verwendet werden, werden von drei neuen Literaturübersichten abgehandelt (Driemel et al. 2007, Lingen et al. 2008, Patton et al. 2008). Die Autoren folgern aus den bisher veröffentlichten Arbeiten, dass alle diese vielversprechenden Untersuchungsmethoden weiter erforscht werden sollten um festzustellen, ob sie wirklich besser bei der Erkennung von (prä –) malignen Läsionen sind als die konventionelle Untersuchung. Obwohl diese Studie nichts an dieser Tatsache ändert, bestätigen unsere Ergebnisse den vielfach geäußerten Eindruck, dass die AF – Diagnostik ein nützliches, leicht durchführbares und unschädliches Hilfsmittel bei der Tumordiagnostik des oberen Aerodigestivtraktes darstellt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Toluidinblau Färbung (Gray et al. 2000) mit diesen aus unserer Studie, dann bekommt man den Eindruck, dass die AF – Untersuchung leicht sensitiver gegenüber Schleimhautläsionen ist, besonders bei Dysplasien. Einen direkten Vergleich zwischen AF und Toluidinblau Färbung gibt es jedoch noch nicht. Jedoch haben Arens et al. (Arens et al. 2003) eine Studie über den kombinierten Einsatz der Kontaktendoskopie nach Methylenblau – Applikation in Verbindung mit Autofluoreszenzuntersuchung durchgeführt. Bei 73 von 83 Patienten (88%) mit (prä –)malignen Läsionen bestätigte die histopathologische Korrelation das Ergebnis der von den Autoren genannten „Kompaktendoskopie“. Sie behaupten, dass die beiden Methoden sich miteinander ergänzen und empfehlen die Kompaktendoskopie für eine bessere Diagnostik von Kehlkopftumoren und seiner

Vorstufen. Diese Daten stammen jedoch aus nur einer Studie, deshalb bedarf diese Methode weiteren in vivo Untersuchungen.

Die von der Fa. Olympus Corp. (Tokyo, Japan) und ihrer Tochtergesellschaft Olympus Medical Systems Corp. (Tokyo, Japan) vermarkteten EVIS EXERA II und EVIS LUCERA SPECTRUM – Systeme führen ein sog. „Narrow – Band – Imaging“ (NBI) durch. Sie werden hauptsächlich für die chirurgische Endoskopie des Magens und der Bronchien angeboten und basieren auf das Prinzip, dass schmalbandiges Licht in der Mucosa anders absorbiert und gestreut wird als das Weißlicht (Internet Link: www.olympus-europa.com/endoscopy). Dadurch kann die Sichtbarkeit von kleinen Gefäßen sowie kleinsten Strukturen in den oberen Mucosaschichten erhöht werden. In der medizinischen Literatur gibt es bisher nur zwei Studien, die sich mit dem Einsatz der Methode im oberen Aerodigestivtrakt befassen. Bei der ersten Studie haben Watanabe et al. den oberen Aerodigestivtrakt von 217 Patienten mit Oesophaguskarzinom mit NBI und Weißlichtendoskopie untersucht und 6 Zweittumore gefunden, 4 davon ausschließlich dank Einsatzes des NBI (Watanabe et al. 2006). Bei der zweiten Studie, durchgeführt von Ugumori et al., sind 50 Frühkarzinome des OADT bei 29 Patienten mit Hilfe des NBI und der Weißlichtendoskopie diagnostiziert worden (Ugumori et al. 2009). Hierbei sind die Läsionen (subjektiv) besser identifiziert und abgegrenzt worden als allein mit der Weißlichtuntersuchung. Aufgrund des Datenmangels hinsichtlich der Anwendung von NBI im OADT kann diese Methode bis jetzt in ihrer Wertigkeit weder abgeschätzt noch mit der Autofluoreszenzuntersuchung verglichen werden.

Die Fluoreszenzendoskopie nach 5 – ALA – Applikation erscheint, wie die Autofluoreszenzuntersuchung, eine hohe Sensitivität für die Detektion (prä –) maligner Schleimhautveränderungen mit Werten zwischen 83% und 99% und eine geringe Spezifität zu haben (Mehlmann et al. 1999, Leunig et al. 2000, Leunig et al. 2002, Zheng et al. 2002, Sharwani et al. 2006a). Durch die Anwendung des sog. „red – to – blue“ Intensitätsratios ($\frac{I_R}{I_B}$) als diagnostischen Algorithmus konnten Zheng et al. sogar eine Spezifität von 96% für die Unterscheidung benignen von (prä –) malignem Gewebe, und 92% für die Unterscheidung dysplastischen von Tumorgewebe erreichen. In einer Vergleichsstudie von Fluoreszenzuntersuchung

nach 5 – ALA – Applikation und Autofluoreszenzendoskopie mit dem System 1. Generation der Fa. KARL STORZ haben Betz et al. einen leichten Vorteil der ersten Methode bei der Erkennung und Abgrenzung vom (prä –)malignen Gewebe festgestellt (Betz et al. 2002). Mit dem System der 2. Generation ist eine noch bessere (hinsichtlich der Diagnostik) und leichtere (hinsichtlich der Handhabung) Durchführung der AF – Endoskopie ermöglicht worden, deshalb ist die Untersuchung nach 5 – ALA – Applikation immer seltener angewendet worden. Es gibt nur eine einzelne publizierte Vergleichsstudie der zwei Methoden (Arens et al. 2007b). Die Autoren haben bei 56 Kehlkopfläsionen keinen wesentlichen Vorteil für eine der beiden bei der Diagnostik von (prä –)malignen Veränderungen des Kehlkopfes finden können. Die Fluoreszenzuntersuchung ist leicht effizienter beim vernarbten Gewebe gewesen, die Autofluoreszenzuntersuchung kann auf der anderen Seite ohne vorheriger 5 – ALA – Applikation und somit ohne Nebenwirkungen stattfinden. Die Autoren empfehlen die erste Methode somit ausschließlich bei der Diagnostik von rezidivierenden, (prä –)malignen Veränderungen durchzuführen.

Es gibt verschiedene, kommerziell verfügbare Systeme auf dem Markt für die klinische Durchführung der AF – Endoskopie:

1. D – Light – C /AF – System (KARL STORZ, Tuttlingen, Germany)
2. DAFE – System (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Germany)
3. VELscope (LED Dental, White Rock, British Columbia, Canada)
4. EVIS LUCERA SPECTRUM (Olympus Medical Systems Corporation, Tokyo, Japan)
5. Pinpoint System (Novadaq Technologies Inc., Ontario, Canada)
6. SAFE-3000 Autofluorescence System (Pentax, Asahi Optical Tokyo, Japan)

Die ersten zwei Systeme sind für den Lungen–, Kopf–, und Halsbereich gedacht, das dritte ist ein AF – System für die Diagnose von Mundschleimhautveränderungen und die restlichen drei werden für den gastrointestinalen Bereich angeboten. Bei dem EVIS LUCERA SPECTRUM sind zusätzlich NBI, sowie „Infra – Red – Imaging“ eingebaut für die Darstellung der Gefäße in der Mucosa und die Informationsgewinnung über die Blutversorgung.

Hinsichtlich der Anwendung des DAFE – Systems (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Germany) im Kopf- und Halsbereich gibt es bis jetzt nur zwei Publikationen (Fielding et al. 2006, Morawiec – Sztandera et al. 2008). Die Untersuchung von 96 Patienten mit Frühkarzinomen (T_1 und T_2) des oberen Aerodigestivtraktes mit diesem System hat die Detektion von 9 zusätzlichen Läsionen und die verbesserte Erkennung der oberflächlichen Abgrenzung von 2 Läsionen ermöglicht (Fielding et al. 2006). Morawiec – Sztandera et al. haben 47 Patienten mit einer (prä –)malignen Läsion des oberen Luft- und Speiseweges untersucht und festgestellt, dass das AF – Ergebnis fast immer von der histopathologischen Diagnose bestätigt worden ist (Morawiec – Sztandera et al. 2008). Obwohl das DAFE – System die detektierte AF bearbeitet und in Pseudo – Farben abbildet und obwohl es noch keinen direkten Vergleich beider Systeme gibt, scheint das System ähnlich effektiv wie das STORZ – System zu funktionieren.

Novadaq's minimal – invasives Pinpoint – System (Novadaq Technologies Inc., Ontario, Canada) ist für die chirurgische Bronchoskopie und Coloskopie (Pinpoint GI) zugelassen. Sein Vorläufer, das sog. LIFE – System (Xillix Technologies Corporation, Vancouver, Canada) wurde jedoch auch im oberen Aerodigestivtrakt verwendet. Die Gewebsanregung erfolgte mit einem Helium – Cadmium – Laser ($\lambda=442$ nm) und die AF wurde in Falschfarben dargestellt (Harries et al. 1995, Kulapaditharom et al. 1998, Zargi et al. 2000). Kulapaditharom and Boonkitticharoen konnten mit Hilfe der AF alle 16 Läsionen in einer Gruppe von 25 Hochrisiko – Patienten erkennen, wobei allein mit der WL – Endoskopie nur 87,5% der Läsionen erkannt worden sind (Kulapaditharom et al. 1998). Zarghi et al. haben bei der Untersuchung von 105 Patienten mit (prä –)malignen Kehlkopfläsionen durch die Kombination von AF – und Weißlichtuntersuchung eine signifikante Sensitivitätserhöhung festgestellt (Zargi et al. 2000). Die einzige Komparativstudie für LIFE – und D – Light – System (STORZ AF – System der 1. Generation) haben Herth et al. durchgeführt, jedoch für Lungenkarzinom (Herth et al. 2003). Nach AF – Bronchoskopie von 332 Patienten konnten sie keine wesentliche Unterschiede hinsichtlich der Wertigkeit zwischen den beiden Systeme feststellen. Das LIFE System schien etwas unhandlich und erlaubte keinen unmittelbaren Vergleich von WL und AF. Eine Komparativstudie für LIFE – und D – Light – C – System im oberen

Aerodigestivtrakt ist nicht mehr möglich, denn das System wurde vom Markt genommen.

Über das VELscope (LED Dental, White Rock, British Columbia, Canada) gibt es ebenso sehr wenige Studien. In einer Initialstudie von Lane et al. sind 50 (prä –) maligne Läsionen von 44 Patienten diagnostiziert worden (Lane et al. 2006). Die Autoren erreichten eine Sensitivität von 98% und eine Spezifität von 100% bei der Erkennung von Mundschleimhautveränderungen. Das VELscope ist von Poh et al. bei 20 Patienten mit Mundkrebs zusätzlich zur WL – Untersuchung benutzt worden (Poh et al. 2006). Die Autoren haben schließlich Biopsien von den Läsionszentren und –Grenzen entnommen und das AF – Bild mit der histopathologischen Diagnose korreliert. Sie stellten fest, dass die AF – Untersuchung die Identifikation von subklinischen Bereichen mit (prä –)malignen Veränderungen ermöglicht. Huff et al. haben innerhalb eines Zeitraums von zwei Jahren eine zufällige Fraktion von Patienten, die eine Zahnarztpraxis besucht haben auf Schleimhautveränderungen untersucht (Huff et al. 2009). Im ersten Jahr sind 959 Patienten nur mit Weißlicht und im Zweiten 905 Patienten mit Weißlicht und VELscope untersucht worden. Allein mit WL sind 8 Mundschleimhautveränderungen erkannt worden (jedoch keine davon ist eine Epitheldysplasie gewesen). Durch die Kombination von WL und VELscope auf der anderen Seite sind 12 Läsionen diagnostiziert worden (8 davon sind Epitheldysplasien gewesen). Die Autoren folgerten daraus, dass die routinemäßige Anwendung von VELscope in einer allgemeinen Zahnarztpraxis nützlich sein kann bei der Detektion von potenziellen (prä –)malignen Mundschleimhautläsionen. Diese Ergebnisse für das VELscope scheinen sehr ähnlich wie unsere für das D – Light – System der Fa. STORZ, ein direkter Vergleich ist jedoch nötig, um mögliche Unterschiede zu ermitteln.

Zusammenfassend erscheint das AF – System der Fa. KARL STORZ mindestens genauso gut zu funktionieren wie die alternativen Methoden zur Detektion von (prä –) malignen Veränderungen des OADT. Aufgrund des Datenmangels und des Fehlens von komparativen Studien können hier jedoch keine detaillierten Aussagen getroffen werden. Schließlich kann keine der oben erwähnten Methoden zur wahren Diagnosefindung herangezogen werden; es handelt sich dabei eher um ergänzende

Screening – Hilfen. Eine sichere Diagnostik bleibt weiterhin der histopathologischen Untersuchung.

V. Schlussfolgerung und Perspektiven

Als optisches Screening - Verfahren scheint die Autofluoreszenzdiagnostik eine sehr hilfreiche Methode für den Nachweis von (prä –)neoplastischem Gewebe in vorveränderter Schleimhaut zu sein. Sie ermöglicht die Erkennung und Abgrenzung von (prä –)malignen Läsionen, Carcinomata in situ, und mikroinvasiven Larynxkarzinomen genauer als die klinische Beobachtung allein (Malzahn et al. 2002). Die Autofluoreszenz – Endoskopie ist eine nicht invasive Untersuchung zur Verbesserung der Diagnose von Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes und ihrer Vorläufer, die leicht zu handhaben ist und eine relativ hohe Sensitivität aufweist. Andererseits führt die Methode zu erheblich vielen falsch-positiven Diagnosen (Arens et al. 1999, Li et al. 2005). Narbenbildung, Hyperkeratosen, und Entzündungen können die Aussagekraft der Methode limitieren (Bruls et al. 1984, Arens et al. 2004). Maligne Veränderungen sind von Tumorvorstufen oder nicht – malignen Läsionen nicht sicher zu unterscheiden; hier sollte auf alle Fälle eine histologische Untersuchung des betroffenen Gewebes stattfinden.

Nach unseren Ergebnissen ermöglicht die Autofluoreszenzuntersuchung, in Kombination mit der standard Weißlichtendoskopie, eine effektivere Tumorerkennung und deutlichere oberflächliche Abgrenzung im oberen Aerodigestivtrakt. Die relativ vielen, falsch – positiven Ergebnisse haben durch die Kombination mit der Weißlichtendoskopie keinen Nachteil für unsere Patienten ergeben.

Die Autofluoreszenz - Endoskopie scheint eine vielversprechende Ergänzung zur Früherkennung von (prä –)malignen Veränderungen im Mund–, Rachen– und Kehlkopfbereich zu sein, mit Ihren eigenen Stärken und Schwächen. Sie kann zudem als Orientierungshilfe für die weitere Diagnostik (z.B. optische Biopsie, optisches Mapping oder Biopsieentnahme) oder bei der Therapiewahl dienen. Dies könnte für den Patient einen erheblichen Zeitgewinn, eine Verbesserung der Krankheitsprognose oder eine Verbesserung seiner Lebensqualität bedeuten.

VI. Zusammenfassung

Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes stehen an sechster Stelle aller Krebserkrankungen weltweit. Aufgrund der relativen Symptomlosigkeit und der erschwerten Detektion mit den üblichen bildgebenden Verfahren ist die Erstdiagnose in vielen Fällen verzögert. In Deutschland werden jährlich rund 16.500 Neuerkrankungen registriert. Mangelnde Mundhygiene, Nikotin und Alkoholkonsum erhöhen das Risiko für eine Tumorentstehung. Erst seit Anfang der 90er Jahren ist die 5 – Jahres – Überlebensrate (als Ausdruck der Patientenprognose), möglicherweise durch die Entwicklung moderner Diagnose – und Therapieverfahren, leicht ansteigend.

Basierend auf die bisherigen Kenntnisse hat sich die Autofluoreszenzuntersuchung, die als optische Screening – Methode entwickelt worden ist, als leicht durchzuführende, hochsensitive Ergänzung zur regulären Weißlichtuntersuchung des oberen Aerodigestivtraktes erwiesen, die pathologische Veränderungen der Schleimhaut visuell hervorhebt.

Das Prinzip der Autofluoreszenz-Diagnostik beruht auf:

- der niedrigeren Konzentration bestimmter, grün-fluoreszierender, endogener Fluorophore im (prä –) malignen Gewebe im Vergleich zur normalen Schleimhaut.
- der vergleichsweise verdickten Epithelschicht im Tumorgewebe; das Anregungs- und Fluoreszenzlicht kann diese nicht ebenso leicht passieren wie beim normalen Gewebe.
- die teilweise auftretende Bakterienbesiedlung von Tumoroberflächen; diese produzieren bestimmte, rot – fluoreszierende Zwischenprodukte der Häm – Biosynthese (Porphyrine).

Schleimhautmalignome oder deren Vorstufen lassen sich also durch eine visuell deutliche Abschwächung der Grünfluoreszenz sowie teilweise einer zusätzlichen und relativ unspezifisch auftretenden Rotfluoreszenz vom umliegenden Normalgewebe abgrenzen.

Ziel dieser Studie war es, die Ergebnisse der Autofluoreszenzuntersuchung mit Hilfe des AF – Systems der Fa. KARL STORZ (Tuttlingen, Deutschland) zu kategorisieren und statistisch auszuwerten sowie zwei Generationen dieses AF – Systems hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur subjektiven Identifikation und Abgrenzung von Tumor(vorstufen) miteinander und mit der konventionellen Weißlicht – Endoskopie (WL) zu vergleichen.

In dieser klinischen Studie wurden 158 Patienten mit einer (prä –)malignen Erkrankung des oberen Aerodigestivtraktes mit dem AF – System der Firma KARL STORZ (Tuttlingen, Deutschland) untersucht. Dieses System besteht aus einer speziellen Lichtquelle (Xe – Kurzbogenlampe, $\lambda=375-440\text{nm}$), die wahlweise Anregungslicht für die Weißlicht– und Autofluoreszenzuntersuchung liefert, einem Lichtleiter, speziellen modifizierten, starren Endoskopen mit integrierten (System 2. Generation) oder aufschnappbaren (System 1. Generation) Beobachtungsfilttern, und eine an das Endoskop adaptierte, integrierbare Endoskopie-Kamera. Für die histopathologische Korrelation sind insgesamt 281 Biopsien entnommen worden.

Prinzipiell können AF-Befunde in 3 unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden:

- Normale Autofluoreszenz: eine normale, satt-grüne Autofluoreszenz weist auf eine fehlende Pathologie hin
- Verstärkte Autofluoreszenz: Hyperkeratotische Areale zeigen häufig eine hellgrün imponierende, verstärkte Autofluoreszenz. Darunter liegende, möglicherweise pathologische Prozesse können hier nicht beurteilt werden, so dass in jedem Falle eine bioptische Gewebedignitätsbestimmung erfolgen sollte
- Verminderte Autofluoreszenz: Areale mit verminderter Autofluoreszenz weisen auf pathologische Prozesse hin; eine Differenzierung unterschiedlicher Pathologien ist jedoch nicht möglich, so dass auch in diesem Falle eine Biopsieentnahme zur weiteren Gewebedifferenzierung erfolgen sollte

Wie die Tabelle VI. 1. zeigt, war die Erkennung des (prä –)malignen Gewebes mit der Autofluoreszenz – Untersuchung in 98 von 113 Läsionen erfolgreich. Bei 64 Läsionen davon war die oberflächliche Läsionsgrenze auch deutlich zu differenzieren. Von 25 nicht – malignen Läsionen waren 22 mit der AF –

Untersuchung richtig erkennbar, 18 davon auch eindeutig abgrenzbar. Das gesunde (bzw. entzündliche) Gewebe ist in 9 von 20 Fällen als nicht suspekt eingestuft worden. Ein Vergleich zwischen AF – und Weißlicht – Endoskopie mit beiden Systemgenerationen zeigte, dass die Identifikation der (prä –)malignen Läsionen mit Weißlicht tendenziell besser war als mit der AF – Untersuchung. Die oberflächlichen Läsionsgrenzen waren jedoch subjektiv besser mittels AF – Licht zu bestimmen.

Läsionen	Weißlicht – Untersuchung			Autofluoreszenz - Untersuchung		
	Normal	Nur erkennbar	Erkennbar und abgrenzbar	Normal	Nur erkennbar	Erkennbar und abgrenzbar
(prä –)maligne Läsionen	10	63	40	15	34	64
Nicht – maligne Läsionen	0	13	12	3	4	18
Normales Gewebe	10	5	5	9	4	7
	Total 158			Total 158		

Tab. VI. 1 Zusammenfassung der Ergebnisse der untersuchten Läsionen.

Die Analyse der Ergebnisse zeigte, dass das AF – System der 2. Generation deutliche Vorteile gegenüber dem System der 1. Generation hinsichtlich der Erkennbarkeit und Abgrenzbarkeit von (prä –)malignem Gewebe (2. Generation: 100% der (prä –) malignen Läsionen erkennbar, 74% erkennbar und abgrenzbar; 1. Generation: 76,2% erkennbar, 42,9% erkennbar und abgrenzbar) aufwies. Wenn man alle untersuchten Läsionen (also (prä –)maligne und nicht – maligne) betrachtete, war das Ergebnis sehr ähnlich (2. Generation: 95,9% aller Läsionen erkennbar, 73% erkennbar und abgrenzbar; 1. Generation: 76,6% erkennbar, 43,8% erkennbar und abgrenzbar). Durch eine Kombination der AF – mit der WL – Untersuchung konnten insgesamt 10 zusätzliche (prä –)maligne Läsionen richtig identifiziert werden.

Die Korrelation der klinischen Endoskopie mit der histopathologischen Untersuchung hat für die AF – Untersuchung eine Sensitivität von 92,0% für die (prä –)malignen Biopsien und 87,9% für (prä –)maligne und nicht – maligne Biopsien ergeben. Die

entsprechenden Werte für die Weißlicht – Untersuchung lagen bei 95,7% für die (prä –)malignen, und 96,7% für alle Proben.

Nach den eigenen Ergebnissen ist diese Methode hilfreich, Schleimhautläsionen zu identifizieren und abzugrenzen, die andernfalls möglicherweise übersehen würden. Das Verfahren erscheint jedoch nicht dazu geeignet, unterschiedliche Läsionstypen und Dignitäten zu unterscheiden, so dass unter Autofluoreszenz - Bildgebung als suspekt gewertete Regionen zunächst einer sachgerechten Gewebediagnostik unterzogen werden müssen, bevor eine Behandlung empfohlen werden kann.

VII. Literatur

- Alkalay, R., Alcalay, J., et al. (2008). "Fluorescence imaging for the demarcation of basal cell carcinoma tumor borders." J Drugs Dermatol **7**(11): 1033-7.
- Arens, C., Malzahn, K., et al. (1999). "[Endoscopic imaging techniques in the diagnosis of laryngeal carcinoma and its precursor lesions]." Laryngorhinootologie **78**(12): 685-91.
- Arens, C., Glanz, H., et al. (2003). "Compact endoscopy of the larynx." Ann Otol Rhinol Laryngol **112**(2): 113-9.
- Arens, C., Dreyer, T., et al. (2004). "Direct and indirect autofluorescence laryngoscopy in the diagnosis of laryngeal cancer and its precursor lesions." Otolaryngol Pol **58**(1): 197-203.
- Arens, C., Reussner, D., et al. (2006). "Spectrometric measurement in laryngeal cancer." Eur Arch Otorhinolaryngol **263**(11): 1001-7.
- Arens, C., Reussner, D., et al. (2007). "Indirect fluorescence laryngoscopy in the diagnosis of precancerous and cancerous laryngeal lesions." Eur Arch Otorhinolaryngol **264**(6): 621-6.
- Arens, C., Glanz, H., et al. (2007a). "Histologic assessment of epithelial thickness in early laryngeal cancer or precursor lesions and its impact on endoscopic imaging." Eur Arch Otorhinolaryngol **264**(6):645-649.
- Arens, C., Reussner, D., et al. (2007b). "Indirect fluorescence laryngoscopy in the diagnosis of precancerous and cancerous laryngeal lesions." Eur Arch Otorhinolaryngol **264**(6):621-626.
- Baumgartner, R., Fuchs, N., et al. (1992). "Pharmacokinetics of fluorescent polyporphyrin Photofrin II in normal rat tissue and rat bladder tumor." Photochem Photobiol **55**(4): 569-74.
- Berghaus, A., Rettinger, G. (1996). Hals-Nasen-Ohrenheilkunde. Stuttgart, Hippokrates.
- Betz, C. S., Mehlmann, M., et al. (1999). "Autofluorescence imaging and spectroscopy of normal and malignant mucosa in patients with head and neck cancer." Lasers Surg Med **25**(5):323-334.
- Betz, C. S. (2000). "Combined fluorescence diagnosis (5 - ALA induced PPIX and autofluorescence) for the detection and delimitation of oral carcinomas: fluorescence imaging, spectral analysis and kinetics." Dissertation aus der Ludwig Maximilian Universität, München.
- Betz, C. S., Stepp, H., et al. (2002). "A comparative study of normal inspection, autofluorescence and 5 - ALA - induced PPIX fluorescence for oral cancer diagnosis." Int J Cancer **97**(2):245-252.

- Betz, C. S., Leunig, A. (2003). "Möglichkeiten und Grenzen der Fluoreszenzdiagnostik und photodynamischen Therapie. Teil 1: Fluoreszenzdiagnostik." HNO **51**(12):1019-1035.
- Betz, C. S., Arens, C., et al. (2006). "Autofluorescence Diagnosis of Cancers of the Upper Aerodigestive Tract - Principles, Techniques and Results." Endo Press Tuttingen.
- Betz, C. S., Stepp, H., et al. (2008). "A set of optical techniques for improving the diagnosis of early upper aerodigestive tract cancer." Med Las Appl **23**(4):175-185.
- Birnbaum, W., Hodgson, T. A., et al. (2002). "Prognostic significance of HIV – associated oral lesions and their relation to therapy." Oral Dis **2**: 110-4.
- Bohuslavizki, K. H., Klutmann, S., et al. (2000). "FDG PET detection of unknown primary tumors." J Nucl Med **41**(5): 816-22.
- Bradley, P. J., Ferlito, A., et al. (2006). "Options for salvage after failed initial treatment of anterior vocal commissure squamous carcinoma." Eur Arch Otorhinolaryngol **263**(10): 889-94.
- Bruls, W. A., Slaper, H., et al. (1984). "Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths." Photochem Photobiol **40**(4): 485-94.
- Bsoul, S. A., Huber, M. A., et al. (2005). "Squamous cell carcinoma of the oral tissues: a comprehensive review for oral healthcare providers." J Contemp Dent Pract **6**(4): 1-16.
- Cabay, R. J., Morton, T. H. Jr., et al. (2007). "Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature." J Oral Pathol Med **36**(5): 255-61.
- Casiglia, J., Woo, S. B. (2001). "A comprehensive review of oral cancer." Gen Dent **49**(1): 72-82.
- Chang, S. K. (2004). "Understanding the variations in fluorescence spectra of gynecologic tissue." Dissertation aus der Universität von Texas in Austin, USA.
- Csanady, M., Kiss, J. G. et al. (2004). "ALA (5-aminolevulinic acid)-induced protoporphyrin IX fluorescence in the endoscopic diagnostic and control of pharyngo-laryngeal cancer." Eur Arch Otorhinolaryngol **261**(5): 262-6.
- Deutsche Krebsgesellschaft: "Tumore der oberen Luft- und Speisewege, Kehlkopfkrebs." Internet Link: www.krebsgesellschaft.de/pat_ka_kehkopfkrebs_definition
- Dias, E. P., Rocha, M. L., et al. (2000). "Oral hairy leukoplakia. Histopathologic and cytopathologic features of a subclinical phase." Am J Clin Pathol.
- Dietz, A., Keilholz, U., et al. (2008). "Current role for induction chemotherapy in head and neck tumors." Laryngorhinootologie **87**(4): 237-43; discussion 244.
- Driemel, O., Kunkel, M., et al. (2007). "Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions." J Dtsch Dermatol Ges **5**(12):1095- 1100.

- Dunne, A. A., Folz, B. J., et al. (2004). "Extent of surgical intervention in case of N0 neck in head and neck cancer patients: an analysis of data collection of 39 hospitals." Eur Arch Otorhinolaryngol **261**(6): 295-303.
- Dunne, A. A., Davis, R. K., et al. (2006). "Early supraglottic cancer: how extensive must surgical resection be, if used alone?" J Laryngol Otol **120**(9): 764-9.
- Fielding, D., Agnew, J., et al. (2006). "DAFE autofluorescence assessment of oral cavity, larynx and bronchus in head and neck cancer patients." Photodiagn Photodyn Ther **3**(4):259-265.
- Fritsch, C., Lang, K., et al. (1998). "Photodynamic diagnosis and therapy in dermatology." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol **11**(6): 358-73.
- Fritsch, C., Ruzicka, T. (2006). "Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy in dermatology from experimental state to clinic standard methods." J Environ Pathol Toxicol Oncol **25**(1-2): 425-39.
- Gray, M., Gold, L., et al. (2000). "The clinical effectiveness of toluidine blue dye as an adjunct to oral cancer screening in general dental practice." Bericht bei dem Department of Public Health and Epidemiology, University of Birmingham, UK.
- Harries, M. L., Lam, S., et al. (1995). "Diagnostic imaging of the larynx: autofluorescence of laryngeal tumours using the helium - cadmium laser." J Laryngol Otol **109**(2): 108-10.
- Horch, H. - H. (2007). Mund – Kiefer – Gesichtschirurgie. München, Elsevier.
- Hornstein, O. P., Mohr, W., et al. (1996). Erkrankungen des Mundes. Ein interdisziplinäres Handbuch und Atlas. Stuttgart / Berlin / Köln, Kohlhammer.
- Huff, K., Stark, P. C., et al. (2009). "Sensitivity of direct tissue fluorescence visualization in screening for oral premalignant lesions in general practice." Gen Dent **57**(1):34-38.
- International Agency for Research on Cancer: "Cancer Incidence in Five Continents (CI5)." Internet Link: www-dep.iarc.fr/ ; "EPIC Project" Internet Link: www.epic.iarc.fr/
- Kademani, D. (2007). "Oral cancer." Mayo Clin Proc **82**(7): 878-87.
- Koenig, F., McGovern, F. J., et al. (1996). "Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer." J Urol **156**(5):1597-1601.
- Kujan, O., Glenny, A. M., et al. (2006). "Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer." Cochrane Database Syst Rev **3**:CD004150.
- Kulapaditharom, B., Boonkitticharoen, V. (1998). "Laser - induced fluorescence imaging in localization of head and neck cancers." Ann Otol Rhinol Laryngol **107**(3):241-246.
- Lane, P. M., Gilhuly, T., et al. (2006). "Simple device for the direct visualization of oral – cavity tissue fluorescence." J Bio- med Opt **11**(2):024006.
- Laskaris, G. (2003). Color Atlas of Oral Diseases. Athens, Thieme.

- Leunig, A., Betz, C. S., et al. (2000). "Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5 - aminolevulinic acid - induced protoporphyrin IX fluorescence." Laryngoscope **110**(1):78-83.
- Leunig, A., Betz, C. S., et al. (2002). "Fluoreszenzdiagnostik von Karzinomen im Mund - Rachen - Kehlkopf - Bereich nach Applikation von 5 - Aminolävulinsäure." Laryngorhinootologie **81**(11):807-814.
- Li, Y., Arens, C., et al. (2005). "Autofluorescence endoscopy for diagnosing early laryngeal cancer and its precursor lesions." Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi **40**(9): 696-700.
- Lingen, M. W., Kalmar, J. R., et al. (2008). "Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer." Oral Oncol **44**(1):10-22.
- Lippert, B. M., Werner, J. A., et al. (1994). "Laser tissue effects with regard to otorhinolaryngology." Otolaryngol Pol **48**(6): 505-13.
- Lippert, H. (2006). Lehrbuch Anatomie. München, Elsevier.
- Malzahn, K., Dreyer, T., et al. (2002). "Autofluorescence endoscopy in the diagnosis of early laryngeal cancer and its precursor lesions." Laryngoscope **112**(3): 488-93.
- Mehlmann, M., Betz, C. S., et al. (1999). "Fluorescence staining of laryngeal neoplasms after topical application of 5 - aminolevulinic acid: preliminary results." Lasers Surg Med **25**(5):414-420.
- Morawiec - Sztandera, A., Zimmer - Nowicka, J., et al. (2008). "Use of tissue autofluorescence in the diagnostics and assessment of treatment efficacy of the head end neck cancer." Otolaryngol Pol **62**(5):540-544.
- Neville, B. W., Day, T. A. (2002). "Oral cancer and precancerous lesions." CA Cancer J Clin **52**(4): 195-215.
- Origitano, T. C., Karesh, S. M., et al. (1989). "Indium-111-Photofrin-II scintillation scan." Neurosurgery **24**(4): 547-56.
- Paczona, R., Temam, S., et al. (2003). "Autofluorescence videoendoscopy for photodiagnosis of head and neck squamous cell carcinoma." Eur Arch Otorhinolaryngol **260**(10):544-548.
- Palasz, Z., Grobelny, A., et al. (2003). "Investigation of normal and malignant laryngeal tissue by autofluorescence imaging technique." Auris Nasus Larynx **30**(4): 385-9.
- Patton, L. L., Epstein, J. B., et al. (2008). "Adjunctive techniques for oral cancer examination and lesion diagnosis: a systematic review of the literature." J Am Dent Assoc **139**(7):896-905.
- Pauli, R., Betz, C. S., et al. (2007). "Multiple fluorophore - analysis (MFA) for qualitative tissue diagnosis in the oral cavity." Proceedings of SPIE - Volume 6628; Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine IV; Schweitzer, D., Fitzmaurice, M. (Hrsg.), 66280D.

- Poh, C. F., Zhang, L., et al. (2006). "Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients." Clin Cancer Res **12**(22):6716-6722.
- Pollack, M. A., Taylor, A., et al. (1942). "B vitamins in cancerous tissues. I. Riboflavins." Cancer Res **2**(11):739-743.
- Reichart, P. A. (2003). "Oral precancerous conditions – an overview." Mund – Kiefer – Gesichtschir **7**(4): 201-7.
- Reichart, P. A., Philipsen, H. P. (2005). "Oral erythroplakia – a review." Oral Oncol **41**(6): 551-61.
- Robert Koch – Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister: "Krebs in Deutschland 2003 – 2004 Häufigkeiten und Trends." Internet Link: www.rki.de
- Rudert, H. H., Werner, J. A. (1995). "Endoscopic resections of glottic and supraglottic carcinomas with the CO2 laser." Eur Arch Otorhinolaryngol **252**(3): 146-8.
- Sankaranarayanan, R., Ramadas, K., et al. (2005). "Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a cluster - randomised controlled trial." Lancet **365**(9475):1927-1933.
- Schneckenburger, H., Gschwend, M., et al. (1994). "Time - gated spectroscopy of intrinsic fluorophores in cells and tissues." Proceedings of SPIE. **2324**:187-195.
- Schomacker, K. T., Frisoli, J. K., et al. (1992). "Ultraviolet laser - induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential." Lasers Surg Med **12**(1):63-78.
- Schumacher, G. – H. (1997). Anatomie für Zahnmediziner. Stuttgart / Hüthig, Thieme.
- Schwartz, J. P., Passonneau, J. V., et al. (1974). "The effect of growth conditions on NAD⁺ and NADH concentrations and the NAD⁺ : NADH ratio in normal and transformed fibroblasts." J Biol Chem **249**(13):4138-4143.
- Schwenzer, N., Ehrenfeld, M. (2000). Spezielle Chirurgie. Tübingen / München, Thieme.
- Schwenzer, N., Ehrenfeld, M. (2000). Zahnärztliche Chirurgie. Tübingen / München, Thieme.
- Sciubba, J. J. (1995). "Oral leukoplakia." Crit Rev Oral Biol Med **6**(2): 147-60.
- Sharwani, A., Jerjes, W., et al. (2006a). "Fluorescence spectroscopy combined with 5 - aminolevulinic acid - induced protoporphyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy." J Photochem Photobiol B **83**(1):27-33.
- Shibly, O., Cummings, K. M., et al. (2008). "Resolution of oral lesions after tobacco cessation." J Periodontol **79**(9): 1797-801.
- Slaughter, D., Southwick, H., et al. (1953). "Field cancerization in oral stratified squamous epithelium." Cancer **6**:963-968.
- Stepp, H. (1999). "Biological Principles of Fluorescence Cystoscopy." in "Fluorescence Diagnosis of bladder tumor using 5-aminolevulinic acid – Fundamentals and Results", Baumgartner, R., Kriegmair, M., Hofstetter, A. (Hrsg.). Tuttlingen, Endo Press 18-24.

- Suter, V. G., Morger, R., et al. (2008). "Oral erythroplakia and erythroleukoplakia: red and red-white dysplastic lesions of the oral mucosa--part 1: epidemiology, etiology, histopathology and differential diagnosis." Schweiz Monatsschr Zahnmed **118**(5): 390-7.
- Suter, V. G., Morger, R., et al. (2008). "Oral erythroplakia and erythroleukoplakia: red and red-white dysplastic lesions of the oral mucosa--part 2: cytodiagnosis, pathogenesis, therapy, and prognostic aspects." Schweiz Monatsschr Zahnmed **118**(6): 510-8.
- Ugumori, T., Muto, M., et al. (2009). "Prospective study of early detection of pharyngeal superficial carcinoma with the narrowband imaging laryngoscope." Head Neck **31**(2):189-194.
- Uppal, A., Gupta, P. K. (2003). "Measurement of NADH concentration in normal and malignant human tissues from breast and oral cavity." Biotechnol Appl Biochem **37**(1):45-50, 2003.
- Van der Waal, J. E., et al. (1997). „Oral leukoplakia: a clinopathological review.“ Oral Oncol **33**: 291-301.
- Wagnieres, G. A., Star, W. M., et al. (1998). "In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications." Photochem Photobiol **68**(5):603-632.
- Warnakulasuriya, S., Reibel, J., et al. (2008). "Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement." J Oral Pathol Med **37**(3): 127-33.
- Watanabe, A., Tsujie, H., et al. (2006). "Laryngoscopic detection of pharyngeal carcinoma in situ with narrowband imaging." Laryngoscope **116**(4):650-654.
- Werner, J. A., Dunne, A. A., et al. (1999). "Studies on significance of sentinel lymphadenectomy in pharyngeal and laryngeal carcinoma." Laryngorhinootologie **78**(12): 663-70.
- Werner, J. A., Dunne, A. A., et al. (2002). "Transoral laser microsurgery in carcinomas of the oral cavity, pharynx, and larynx." Cancer Control **9**(5): 379-86.
- Werner, J. A., Dunne, A. A., et al. (2002). "Sentinel node detection in N0 cancer of the pharynx and larynx." Br J Cancer **87**(7):711-5.
- Werner, S. L., Jones, R. A., et al. (2004). "Sonographic assessment of the epiglottis." Acad Emerg Med **11**(12):1358-60.
- World Health Organisation, Internet Link: www.who.int/topics/cancer/en/
- Zalesska – Krecicka, M., Krecicki, T. et al. (2005). "Autofluorescence laryngoscopy in the diagnosis of laryngeal cancer - early results." Otolaryngol Pol **59**(2):195-9.
- Zargi, M., Fajdiga, I., et al. (2000). "Autofluorescence imaging in the diagnosis of laryngeal cancer." Eur Arch Otorhinolaryngol **257**(1):17-23.
- Zheng, W., Soo, K. C., et al. (2002). "Detection of squamous cell carcinomas and precancerous lesions in the oral cavity by quantification of 5 - aminolevulinic acid induced fluorescence endoscopic images." Lasers Surg Med **31**(3):151-157.

VIII. Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater bedanken, PD Dr. med. Christian Betz von der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der LMU, München, ohne den ich niemals ein Licht am Ende dieser Dissertation gesehen hätte. Sein fundiertes Fachwissen gab mir viele Anregungen für die Fertigstellung dieses Forschungsprojekts.

Ein großer Dank geht auch an Prof. Dr. med. Andreas Leunig von der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der LMU, München. Dank seiner konstruktiven Kritik, seines Fachwissens und seiner Ideen ist diese Doktorarbeit soweit gekommen.

Mein Dank richtet sich auch an Dr. rer. nat. Reinhold Baumgartner, Dr. rer. biol. hum. Herbert Stepp, Dr. rer. biol. hum. Ronald Sroka und alle Mitarbeiter des Laser – Forschungslabors der LMU, München, die mich bei technischen und physikalischen Fragestellungen immer unterstützt haben und damit einen wichtigen Beitrag zum Gelingen meiner Arbeit geleistet haben.

Alle Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der LMU, München haben mir stets bei dem klinischen Teil dieser Arbeit den Weg frei gehalten, wofür ich mich ebenfalls an dieser Stelle bedanken möchte.

Zuletzt ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Eltern richten, die mich nicht nur in finanzieller Hinsicht unterstützt haben, sondern auch meine Zeiten der überstrapazierten Nerven und der schlechten Laune geduldet haben. Ohne sie wäre ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich.

