

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde,
Kopf- und Halschirurgie "Otto Körner"
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. H.W. Pau

**Starre konfokale Endoskopie zur Diagnostik
von experimentell induzierten oralen
Vorläuferläsionen
eine tierexperimentelle Studie**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von Behnaz Farahati

geboren am 29.12.1982 in Teheran

Rostock, August 2013

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Tino Just,
Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-
Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie "Otto
Körner", Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr.med. Dr.med.dent. Bernhard Frerich
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und
plastische Gesichtschirurgie, Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr.med. Christoph Arens,
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde,
Universität Magdeburg

Datum der Einreichung: 09.08.2013

Datum der Verteidigung: 22.04.2014

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I - III</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>IV - V</i>
1. Einleitung	1
1.1 Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle	3
1.1.1 Risikofaktoren und Prädilektionsstellen oraler PEC	4
1.1.2 Vorläuferläsionen oraler Plattenepithelkarzinome	5
1.1.3 Klinik, Diagnostik und Therapie	8
1.2 Konfokale Mikroskopie.....	10
1.2.1 Grundlagen der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)	11
1.2.2 Entwicklung des starren konfokalen Endoskops	13
1.3 Tumorinduktion mit 4-Nitroquinolin-1-Oxid.....	14
1.4 Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Experimentelles Design	16
2.2 Bildgebendes System.....	17
2.2.1 Heidelberg-Retina-Tomograph II	17
2.2.2 Starres konfokales Endoskop	18
2.3 4- Nitroquinolin-1-Oxid (4-NQO)	20
2.4 Tiere und Tierhaltung.....	21
2.5 Untersuchungsablauf.....	22
2.5.1 Induktion von intraepithelialen Schleimhautläsionen	22
2.5.2 Gewebepräparation	22
2.5.3 Konfokalmikroskopische Untersuchungen	23
2.5.4 Auswertung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen	24
2.5.5 Histopathologische Untersuchungen	25
2.6 Statistische Analysen.....	26

2.6.1	Cohens-Kappa-Statistik	26
2.6.2	Bestimmung der diagnostischen Güte	27
2.7	Computersoftware	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Induktion von Schleimhautläsionen durch 4-NQO.....	28
3.2	Darstellung der morphologischen Charakteristika der gesunden Schleimhaut mit der SKE	29
3.3	Darstellung der morphologischen Charakteristika der Epithelveränderungen mit der SKE	32
3.4	Eindringtiefe des Lasers	33
3.5	Interraterreliabilität.....	34
3.6	Vergleich der konfokalmikroskopisch und histologisch ermittelten Befunde	35
3.7	Bestimmung von Sensitivität, Spezifität und prädiktiven Werten	35
3.8	SKE von induzierten Läsionen und Vergleich mit Histopathologie	36
3.8.1	Dysplasie I, Acht Wochen 4-NQO Ingestion	36
3.8.2	Dysplasie II, 18 Wochen 4-NQO Ingestion.....	37
3.8.3	Dysplasie III, 10 Wochen 4-NQO Ingestion.....	39
3.8.4	<i>Carzinoma in situ</i> , 18 Wochen 4-NQO Ingestion.....	41
3.8.5	Papillom, 12 Wochen 4-NQO Ingestion	43
4.	Diskussion	45
4.1	Fähigkeiten und Limitationen der SKE.....	45
4.2	adjuvante Ansätze zur Frühdiagnostik von Vorläuferläsionen oraler PEC.....	48
4.3	Stellenwert der "optischen Biopsie" in der Diagnostik von Vorläuferläsionen	51
4.4	Die SKE im Kontext der adjuvanten Ansätze zur Frühdiagnostik von Vorläuferläsionen oraler PEC	53
4.5	Methodenkritik	57
4.6	Ausblick.....	57
5.	Literaturverzeichnis.....	59

6.	Anhang	76
6.1	Zusammenfassung	76
6.2	Summary	77
6.3	Thesen	79
6.4	Selbstständigkeitserklärung	80
6.5	Danksagung	81

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
4-NQO	4- Nitroquinolin-1-Oxid
5-ALA	5- Aminolävulinsäure
5 JÜR	Fünf-Jahres-Überlebensrate
Abb.	Abbildung
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften
BM	Basalmembran
ca.	circa
CIS	Carzinoma in situ
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
Dm.	Durchmesser
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
<i>et al.</i>	und andere (<i>lat.: et alii</i>)
evtl.	eventuell
g	Gramm
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
HPV	Humanes Papilloma Virus
HRT II	Heidelberg Retina Tomograph II
i.d.R.	in der Regel
KPR	Kern-Plasma-Relation
LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie
MKG	Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
n	Anzahl
nm	Nanometer

o.ä.	oder ähnliches
OCT	Optische Kohärenz Tomographie
PEC	Plattenepithelkarzinom
RKI	Robert Koch Institut
SIL	squamous intraepithelial lesion
SIN	squamous intraepithelial neoplasia
SKE	starre konfokale Endoskopie
Tab.	Tabelle
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Karzinome der Mundhöhle und des Oropharynx sind die häufigsten Malignome des Kopf- und Halsbereiches (Krebs in Deutschland, 2012). In über 90% der Fälle handelt es sich hierbei um Plattenepithelkarzinome (PEC), deren Mehrzahl wiederum auf der Basis langfristig bestehender und klinisch erkennbarer Vorläuferläsionen entstehen (Forastiere *et al.*, 2001). Diese Läsionen sind vielseitig und imponieren makroskopisch zumeist als Hyperkeratosen, leicht blutenden Läsionen oder Ulzerationen, die nicht abheilen (Mashberg *et al.*, 1995).

Die Vielzahl der in den letzten Jahrzehnten unternommenen Bemühungen, neue diagnostische Methoden und Ansätze zu entwickeln, zeigen, dass die Identifikation der frühen und oft unscheinbaren, asymptomatischen Läsionen noch immer eine große diagnostische Herausforderung in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde sowie in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (MKG) darstellen. Die Erfassung und Diagnostik oraler Neoplasien beruht traditionell stark auf der klinischen Erfahrung des untersuchenden Arztes und seiner Motivation, die oft unscheinbaren und subtilen morphologischen Veränderungen als solche zu erkennen (Gillenwater *et al.*, 2006).

Bei persistierenden, suspekten Läsionen muss also zum Ausschluss eines malignen Prozesses deshalb frühestmöglich eine Gewebeprobe entnommen werden. Die Entscheidung über die Beurteilung der Schleimhautveränderung, der Entnahmeregion sowie dem Zeitpunkt der Gewebeprobe bleiben dabei in der Regel dem behandelnden Chirurgen überlassen (Gillenwater *et al.*, 2006).

Die Bedeutung der frühen Erfassung manifester Neoplasien hat zunehmend eine wichtige Rolle in der Krebsforschung eingenommen (O'Shaughnessy *et al.*, 2002). Die Mehrzahl oraler Plattenepithelkarzinome wird in Ländern mit hohen medizinischen Versorgungsstandards erst in fortgeschritteneren Stadien diagnostiziert (Vokes *et al.*, 1993). Hinzu kommt, dass die Diagnoseverzögerung durch die primär versorgenden Ärzte im Mittel bei zwei bis vier Monaten liegt (Pitiphat *et al.*, 2002). Weitgehend akzeptiert ist, dass eine Therapieverzögerung um zwei bis drei Wochen noch keine statistisch signifikante Verschlechterung der Überlebensprognose bewirkt (Teppo *et al.*, 2003; Koivunen *et al.*, 2001). Verzögerungen über vier Wochen haben jedoch einen signifikant negativen Einfluss auf die Prognose (Allison *et al.*, 1998). Daraus ergibt sich die Forderung, den Zeitpunkt der Biopsie bei unklaren Läsionen so zu wählen, dass die definitive Therapie innerhalb von maximal vier Wochen erfolgen sollte. Berücksichtigt werden muss dabei der Zeitbedarf für die histologische Aufarbeitung und die erforderliche präoperative Diagnostik (Kunkel *et al.*, 2010).

Abgesehen von der aggressiven Therapie, bestehend aus chirurgischer Tumorentfernung, Radiatio und Chemotherapie, ist die 5 Jahres-Überlebensrate (5 JÜR) aller oropharyngealer Karzinome gering (55%) und mit hoher Morbidität und Mortalität verbunden (Forastiere *et al.*, 2001). Frühe, asymptomatische orale Karzinome und deren Vorläuferläsionen hingegen unterscheiden sich in Klinik, Verlauf und Prognose ausgesprochen stark von fortgeschrittenen Karzinomen (Swango *et al.* 1996; Howaldt *et al.*, 1999). Um eine optimale operative Versorgung der Malignome im Kopf-Hals-Bereich mit minimalem Schaden des gesunden Gewebes gewährleisten zu können, benötigt es deshalb geeigneter komplementärer Verfahren, die in der Lage sind, objektiv und nicht-invasiv die Genauigkeit der intraoperativ zu entnehmenden Biopsien zu verbessern.

Die potenziell hohen Effekte der Laser Scanning Mikroskopie (LSM) in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und insbesondere in der Laryngologie sind auf ihre einmaligen Eigenschaften und die jüngsten technischen Entwicklungen zurück zu führen.

- Eine Bildgebung epithelialer Strukturen in einer Tiefe von bis zu 0,5 mm erlaubt die Beurteilung vielseitiger intraepithelialer Läsionen der oralen Schleimhaut sowie der des Kehlkopfes (Collier *et al.*, 2002; Rajadhyaksha *et al.*, 1995; White *et al.*, 1999).
- Laser Scanning Mikroskopie liefert optische Schnittbilder von Geweben und ermöglicht somit die morphologische Charakterisierung zellulärer Strukturen von normalem Schleimhautepithel sowie der Schleimhautveränderungen verschiedenen histogenetischen Ursprungs (Just *et al.*, 2006; Just *et al.*, 2007).
- Sowohl in gesundem als auch in histopathologisch veränderten, benignen sowie malignen Schleimhautveränderungen des Oropharynx (White *et al.*, 1999; Just *et al.*, 2008) und des Larynx (Just *et al.*, 2006; Just *et al.*, 2007) konnte in Voruntersuchungen eine gute Korrelation zwischen den LSM-Aufnahmen und der konventionellen Histologie gezeigt werden.
- Die Anwendung der LSM Technologie in Form der starren konfokalen Endoskopie eröffnet die Möglichkeit für eine schnelle, nicht-invasive *in vivo* Beurteilung von schwer erreichbaren Geweberegionen in zellulärer und subzellulärer Auflösung (Farahati *et al.*, 2010).

Diese Arbeit soll den Ansatz einer möglichen Anwendung der starren konfokalen Endoskopie zur Frühdiagnostik intraepithelialer Läsionen in einer tierexperimentellen Studie an induzierten Läsionen der Zungenschleimhaut von Mäusen aufzeigen. Im Gegensatz zu früher veröffentlichten Studien an LSM-Geräten, die hauptsächlich mit fiber-optischen konfokalen Endoskopen arbeiteten (Venkatesh *et al.*, 2009; Haxel *et al.*, 2009), wurde für diese Arbeit ein starres konfokales Endoskop verwendet.

1.1 Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle

Krebserkrankungen stellten im Jahre 2008 in der Bundesrepublik Deutschland nach den Herz-Kreislaufkrankungen mit 29,2% die zweithäufigste Todesursache für beide Geschlechter dar. Dabei stehen die Karzinome der Mundhöhle und des Rachens bei Männern mit einem Anteil von 4,0% an sechster Stelle und bei Frauen mit einem Anteil von 1,5% an 16. Stelle der Krebstodesursachenstatistik (Krebs in Deutschland, 2012).

Das PEC ist der häufigste maligne Tumor der Mundhöhle. Es handelt sich hierbei meist um infiltrativ wachsende, mäßig bis gut differenzierte epitheliale Neoplasien, mit einer Tendenz zur frühen und ausgedehnten Lymphknotenmetastasierung (Johnson *et al.*, 2005).

Inzidenz und Mortalität. Das Robert Koch - Institut (RKI) veröffentlichte 2012 Daten zu Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen in der Bundesrepublik. Die Inzidenz von Karzinomen der Mundhöhle und des Rachens betrug im Jahr 2008 für das männliche Geschlecht 9.520. Dabei stellte Mecklenburg Vorpommern mit 26,8 je 100.000 Einwohner, die höchste Rate an Neuerkrankungen pro Jahr im Vergleich zu den anderen Bundesländern dar. Für Frauen wurde die Inzidenz im selben Jahr mit 3.490 beziffert. Die höchste Inzidenzrate lag mit 9,6 je 100.000 Einwohner in den Stadtstaaten Bremen und Hamburg (im Vergleich Mecklenburg Vorpommern: 6,4). Die Prognose für die Neuerkrankungsrate von Karzinomen der Mundhöhle und des Rachens im Jahre 2012 wird für beide Geschlechter mit ansteigender Inzidenz vorhergesagt (Männer: 10.100 und Frauen: 3.800) (Krebs in Deutschland, 2012).

Die Mortalität von oralen und oropharyngealen Karzinomen in der BRD betrug im Jahr 2008 mit einer Fallzahl von 3776 für Männer durchschnittlich 7,4¹. Die höchste Mortalität erwies hierbei Mecklenburg Vorpommern (12,5¹). Bei den Frauen betrug die Mortalität oropharyngealer Karzinome für die gesamte Republik 1.170 und Mecklenburg Vorpommern lag bundeslandspezifisch mit einer Fallzahl von 35 erneut an erster Stelle (Krebs in Deutschland, 2012).

Prognose. Die Überlebensrate ist stark abhängig vom Tumorstadium und Differenzierungsgrad zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. So ergab eine von 1973 bis 1988 angelegte Studie des National Cancer Institute, *Surveillance, Epidemiology and End Results*, dass lokalisierte kleine Läsionen eine 5 JÜR von 81,9% haben. Mit regional ausgedehnten Tumoren reduzierte sich die 5 JÜR jedoch auf 46,4% und weiter auf 21,1% bei vorhandenen Fernmetastasen (Howalder *et al.*, 2011). Laut dem RKI liegt in der Bundesrepublik Deutschland die relative 5 JÜR bei 43 – 50% für Männer und 56 - 65% bei den Frauen. Frauen erkranken im Mittel im Alter von 66 Jahren, Männer hingegen bereits in einem Alter

¹ je 100.000 Personen, altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung

von 61 Jahren (Krebs in Deutschland, 2012). Mit zunehmendem Zigarettenkonsum unter Frauen und Jugendlichen (Chen *et al.*, 1990) sowie der zunehmenden Verbreitung HPV-assoziiertes PEC (Bisht *et al.*, 2011) nimmt allmählich die Rate der Tumorerkrankungen des oberen aerodigestiven Traktes auch in dieser Population zu (Martin-Hernan *et al.*, 2013).

1.1.1 Risikofaktoren und Prädilektionsstellen oraler PEC

Risikofaktoren. Tabak- und Alkoholkonsum sind als Hauptrisikofaktoren bekannt und unumstritten. Unzählige Studien haben in den letzten 20 Jahren fundierte Erkenntnisse über den Zusammenhang von Alkohol- und Tabakkonsum mit dem Auftreten von Malignomen im Bereich des oberen aerodigestiven Traktes geliefert (Talamini *et al.*, 2002; Figuero Ruiz *et al.*, 2004; Altieri *et al.*, 2002; Merletti *et al.*, 1989). Die synergistischen und sich potenzierenden Effekte dieser Substanzen, aber auch eine unabhängige Rolle des Alkoholkonsums in der Karzinogenese oraler PEC wurden in einer US-Studie beschrieben und bestätigt (Blot *et al.*, 1988). Eine französische Studie zeigte ein 30-fach höheres Risiko für Individuen mit einem Alkoholkonsum von über 100 g Alkohol pro Tag (Andre *et al.*, 1995). Auch „Snuff“ und Kautabak werden mit einem erhöhten Risiko, an oralen PEC zu erkranken, assoziiert (Gupta *et al.*, 1996). Patienten mit bereits behandelten oralen PEC, die weiterhin rauchen, haben ein 2-6-fach erhöhtes Risiko ein Zweitkarzinom im oberen aerodigestiven Trakt zu entwickeln, als Patienten, die aufhören zu rauchen (Silverman *et al.*, 1972). Andere Risikofaktoren wie Syphilis (Gillison *et al.*, 2000), Vitamin-Mangelzustände (Winn *et al.*, 1995), chronische Reizung der Schleimhäute durch scharfe und heiße Nahrungsmittel, mangelnde Mundhygiene (Balaram *et al.*, 2002) und einige weitere Noxen sind ebenfalls von bedeutender Relevanz. So wird z.B. die weltweite Zunahme der Inzidenz oropharyngealer Karzinome, vorrangig Tonsillenkarzinome, in der internationalen Literatur zunehmend auf die Infektion mit HPV16 zurückgeführt. Den HPV-positiven Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches werden inzwischen eine eigene Tumorentität zugeschrieben (Hoffmann *et al.*, 2012). Diese zeigen in ihrem biologischen Verhalten eine höhere Aggressivität, u.a. mit frühzeitiger Lymphknotenmetastasierung, welche jedoch eine deutlich bessere Überlebensrate aufweisen. Dies wird auf ein besseres Ansprechen auf die Therapie, insbesondere der Strahlentherapie, zurückgeführt (Hoffmann *et al.*, 2005).

Prädilektionsstellen. Grundsätzlich können Plattenepithelkarzinome in allen Regionen der Mundhöhle entstehen (Johnson *et al.*, 2005). Mashberg *et al.* haben in einer Studie von kleinen asymptomatischen Läsionen gezeigt, dass nunmehr drei spezifische Bereiche der Mundhöhle prädisponiert sind, v.a. bei Rauchern und Trinkern vermehrt Plattenepithelkarzinome zu entwickeln. Zu diesen Regionen gehören der Mundboden, die ventro-laterale Zunge sowie der weiche Gaumen mit *Trigonum retromolare* und vorderem Gaumenbogen. Annahme hierfür ist, dass sich die enthaltenen Karzinogene mit dem

Speichel vermischen und sich in diesen Regionen sammeln, bzw. hier eine längere Kontaktzeit zum Epithel haben (Mashberg *et al.*, 1976). Zudem besteht die Schleimhaut in diesen Regionen aus einem vergleichsweise dünneren und unkeratinisierten Epithel, wodurch sich eine (physiologische) Schutzfunktion gegenüber den Karzinogenen ebenfalls reduziert.

1.1.2 Vorläuferläsionen oraler Plattenepithelkarzinome

Terminologie und Definitionen. Angelehnt an die Terminologie in der Klassifikation der Kopf und Hals Tumore der WHO von 2005 (Barnes *et al.*, 2005) wird in dieser Arbeit der Begriff der Vorläuferläsionen (*engl., precursor lesions*) verwendet. Vorläuferläsionen sind definiert als morphologisch verändertes Gewebe, in dem sich ein Karzinom mit größerer Wahrscheinlichkeit entwickeln wird, als in dem ihm entsprechenden und normal erscheinenden Gewebe (Gale *et al.*, 2005). Für die Beschreibung dieses Sachverhalts werden in der internationalen Literatur unterschiedlichste Bezeichnungen wie *Präkanzerose, prämaligne Läsionen, intraepitheliale Neoplasien* oder *potentiell maligne Läsionen* verwendet.

Das klinische Erscheinungsbild der Schleimhautveränderungen kann sehr variabel ausfallen, weshalb eine histologische Beurteilung der Entität unerlässlich ist. Die sogenannten Vorläuferläsionen werden morphologisch und deskriptiv in homogene und inhomogene Leukoplakie, verruköse Leukoplakie, Erythroplakie und Erythroleukoplakie unterteilt (Gale *et al.*, 2005). Selten können sich Malignome auch aus morphologisch gesundem und normal erscheinendem Epithel entwickeln (Gale *et al.*, 2005). Des Weiteren sind Erkrankungen der Mundhöhle bekannt, die ein Potential zur malignen Entartung aufweisen. Zu diesen „prämaligen Konditionen“ gehören der *Lichen planus mucosae, diskoider Lupus erythematoses, Plummer-Vinson Syndrom, orale submuköse Fibrose, Syphilis, Xeroderma pigmentosum* sowie die *Epidermolysis bullosa* (Gale *et al.*, 2005).

Leukoplakie. Die orale Leukoplakie ist laut WHO definiert als eine weiße Schleimhautläsion, die nicht abstreifbar ist und nicht mit einer spezifischen Erkrankung assoziiert werden kann. Die Leukoplakie stellt eine rein klinische Bezeichnung dar. Hinter ihr können sich unterschiedliche Entitäten, wie Hyperplasie, Dysplasie oder gar invasive Karzinome, verbergen (Gale *et al.*, 2005).

Klinisch unterscheidet man grundsätzlich zwischen zwei Formen der Leukoplakie, der homogenen und der inhomogenen Form. Die homogenen Läsionen sind gleichmäßig, flach, dünn und weisen eine flache, oberflächige und rissige Keratinschicht auf. Das Risiko der malignen Entartung ist relativ gering. Inhomogene Leukoplakien haben hingegen ein deutlich höheres Risiko, maligne zu entarten. Sie können gesprenkelt, nodulär oder verrukös

erscheinen (Warnakulasuriya *et al.*, 2007). Differentialdiagnostische Erkrankungen der Mundhöhle müssen bei der Diagnose einer Leukoplakie beachtet werden (Warnakulasuriya *et al.*, 2007).

Die Prämisse, dass eine Leukoplakie der Vorläufer eines malignen Geschehens oder ein signifikanter Indikator eines Frühkarzinoms sei, ist fraglich. Keratin ist eine pathophysiologische Reaktion auf Irritation, sowohl neoplastischer als auch nicht-neoplastischer Art (Mashberg *et al.*, 1995). In der Literatur beschriebene Daten der malignen Transformation leukoplakischer Läsionen der Mundhöhle sind sehr unterschiedlich und reichen von 0,13% bis 18% Wahrscheinlichkeit (Reibel *et al.*, 2003).

Erythroplakie. Die WHO Definition der Erythroplakie von 1978 ist stets gängig und weit verbreitet (Axell *et al.*, 1996). Charakteristisch sind asymptomatische, harmlos erscheinende „feurig“ rote, atrophisch und entzündliche Läsionen mit oder ohne Keratinkomponente, welche klinisch oder pathologisch nicht einer anderen spezifischen Erkrankung zugeordnet werden können (Warnakulasuriya *et al.*, 2007). Der Erythroplakie wird das höchste Potential der malignen Entartung zugeschrieben (Mashberg *et al.*, 1977). Der erythroplastische Charakter dieser Läsionen scheint pathophysiologisch mit einer reaktiven inflammatorischen Front verbunden zu sein, die sich in einer submukosalen vaskulären Proliferation und einem Rundzellinfiltrat als Reaktion auf den sich entwickelnden Tumor darstellt (Mashberg *et al.*, 1977). Maligne Entzündungsreaktionen sind meist diskrete Läsionen, v.a. an Prädispositionsstellen lokalisiert und nicht mit spezifischen ätiologischen Faktoren zu erklären und persistieren auch bei Noxenkarenz. Entzündliche Reaktionen nicht-neoplastischer Art sind hingegen meist diffus, können i.d.R. einem spezifischen ätiologischen Faktor zugeordnet werden und sind innerhalb von 14 Tagen rückläufig, wenn Noxenkarenz erfolgt (Mashberg *et al.*, 1995). Bei Persistenz einer solchen Läsion ist die Biopsie obligat. Zudem sollten erythroplastische Läsionen nicht als Vorläuferläsionen, sondern als „echte Karzinome“ gesehen und behandelt werden, denn nahezu alle erythroplastische Läsionen beinhalten schwere Dysplasien, *Carzinoma in situ* (CIS) oder gar invasive Karzinome zum Zeitpunkt der Darbietung (Reichart *et al.*, 2005). Reine Erythroplakien sind selten. Häufiger erscheinen sie als Mischform, also als rot-weiße Läsionen und werden dann als Erythroleukoplakie bezeichnet (Warnakulasuriya *et al.*, 2007).

Histologie. Anerkannt ist, dass der histologische Befund einer Epitheldysplasie stark verknüpft ist mit einer erhöhten Rate, einen invasiven Tumor zu entwickeln (Silverman *et al.*, 1984). Traditionellerweise versteht man unter dem Begriff der Epitheldysplasie unterschiedliche zytologische und architekturelle Veränderungen von Zellen und Zellverbänden. Folgende Tabelle fasst die, für die Dysplasiediagnostik wichtigen histologischen Merkmale nach Gale *et al.* zusammen.

Tabelle 1: Histologische Kriterien der WHO für Epitheldysplasien nach Gale *et al.*, 2005

Kennzeichen der gestörten Epithelarchitektur	Kennzeichen der zytologischen Atypien
Irreguläre Epithelschichtung	Variation der Kerngröße (Anisonukleose)
Verlust der Polarität der Basalzellen	Variation der Kernform (nukleäre Pleomorphie)
Tropfenförmige Reteleisten	Variation der Zellgröße (Anisozytose)
Erhöhte Anzahl von Mitosefiguren	Variation der Zellform (zelluläre Pleomorphie)
Abnorme oberflächige Mitosen	Pathologische Kern-Plasma-Relation
Frühzeitige Keratinisierung in einzelnen Zellen (Dyskeratosen)	Atypische Mitosefiguren
Präsenz von Keratinperlen	Hyperchromasie der Zellkerne

Die aktuelle Klassifikation der epithelialen Vorläuferläsionen beinhaltet neben der WHO-Klassifikation von 2005 das Konzept der intraepithelialen Neoplasie (engl.: *Squamous Intraepithelial Neoplasia*; abgekürzt: *SIN*) sowie die Ljubljana Klassifikation (*squamous intraepithelial Lesions*, abgekürzt *SIL*). Diese drei Klassifikationssysteme werden gleichwertig nebeneinander geführt und sind sowohl für Läsionen der Mundhöhle, des Oro- und Hypopharynx als auch des Larynx und der Trachea anzuwenden (Gale *et al.*, 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren auf der Kategorie der squamösen inthraepithelialen Neoplasie, eingeteilt nach *Low grade* und *High grade* SIN.

Tabelle 2: Gängige Klassifikationssysteme zur Kategorisierung der epithelialen Vorläuferläsionen von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich (WHO) modifiziert nach Gale *et al.*, 2005, Driemel *et al.*, 2006 und van der Waal *et al.*, 2009.

WHO Klassifikation der Epitheldysplasien 2005	Ljubljana Klassifikation squamöse intraepitheliale Läsionen (SIL)	Squamöse intraepitheliale Neoplasie (SIN)	
Hyperplasie	Einfache Hyperplasie	-----	
Leichte Dysplasie (I)	Basale und parabasale Hyperplasie	SIN I	Low grade SIN
Moderate Dysplasie (II)	Atypische Hyperplasie (Risikoepithel)	SIN II	
Schwere Dysplasie (III)		SIN III	High grade SIN
Carzinoma in situ	Carzinoma in situ		
Invasives Karzinom	Invasives Karzinom	Invasives Karzinom	

1.1.3 Klinik, Diagnostik und Therapie

Klinik. Die Morphologie von frühen Mundschleimhautveränderungen kann sich vielseitig gestalten. Zu den wichtigen, makroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen maligner Läsionen oder deren Vorstufen gehören der persistierende Verlust des Oberflächenglanzes, eine gesteigerte Verhornungstendenz in Form von „weißlichen“ Läsionen (Leukoplakie), der flächige oder umschriebene Verlust der Oberflächenintegrität in Form von „rötlich-lividen“ Läsionen (Erythroplakie), Erosion, Ulzeration, Blasenbildung und Desquamation, Induration, Atrophie, Pigmentierung sowie Schmerzsensation und Brennen (Kunkel *et al.*, 2010). Van Oijen *et al.* berichten, dass 10 – 35% der Patienten mit oralen Karzinomen an einem Zweittumor im oberen aerodigestiven Trakt erkranken. Diese können synchron mit dem Indextumor auftreten oder aber zeitlich versetzt dazu (van Oijen *et al.*, 2000). Das sogenannte Phänomen der „Feldkanzerisierung“ wurde von Slaughter *et al.* 1953 beschrieben. Es wurde angenommen, dass die im Tabak und Alkohol enthaltenen Karzinogene mit dem gesamten aerodigestiven Trakt in Kontakt kommen und dadurch eine ausgedehnte Schädigung der Schleimhäute bewirken (Slaughter *et al.*, 1953). Neuere molekularbiologische Erkenntnisse gehen von genetischen Alterationen aus, bei der die multiplen Tumore von einer entarteten Progenitorzelle ausgehen (Bedi *et al.*, 1996; Tabor *et al.*, 2001).

Diagnostik. Die Diagnostik umfasst nach aktuellen Leitlinien der deutschen Krebsgesellschaft und ihren Arbeitsgruppen folgende Untersuchungen (Kunkel *et al.*, 2010; Zimmermann *et al.*, 2003):

- Erfassung des kompletten HNO-Status
- Palpation und ggf. Sonografie des Halses
- Panendoskopie zum Ausschluss eines synchronen Zweitkarzinoms mit Biopsie zur histologischen Diagnosesicherung
- Als Standardmethode der prätherapeutischen Ausbreitungsdiagnostik werden CT oder MRT eingesetzt
- Röntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen; ggf. CT-Thorax
- Knochenszintigrafie zum Ausschluss von Knochenmetastasen, falls klinische Zeichen einer Knochenbeteiligung vorliegen
- Abdomen-Sonografie; ggf. CT-Abdomen

Die klinische Untersuchung beinhaltet eine gründliche und kritische Inspektion und Palpation aller einsehbaren Schleimhautregionen. Zudem sollten eine bimanuelle Palpation des Mundbodens und der Wangenschleimhaut sowie eine klinische Beurteilung des Lymphknotenstatus erfolgen. Vor allem bei Patienten mit anamnestisch erhobenem, erhöhtem Risikoprofil sollten diese Untersuchungen regelmäßig und mit höherer Aufmerksamkeit erfolgen (Johnson *et al.*, 2005). Als verdächtig wird jede Schleimhautveränderung angesehen, die nach einer Beobachtungszeit oder einer Therapie von über zwei Wochen keine Rückbildungstendenz aufzeigt und nicht eindeutig einer definierten Grunderkrankung oder Ursache zu zuordnen ist (Kunkel *et al.* 2010). Bei jeder klinisch suspekten Läsion stellt die histologische Untersuchung einer repräsentativen Biopsie den Goldstandard der Diagnosesicherung dar (Johnson *et al.*, 2005).

Therapie. Die folgenden Therapieempfehlungen basieren auf der S2-k Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.

Klinisch homogene und histologisch als benigne oder als *S/N I* gewertete Läsionen können nach überwiegender Auffassung zunächst beobachtet werden (Kunkel *et al.*, 2010). Histologisch als *S/N II* oder *III* klassifizierte Läsionen sollen vollständig exzidiert werden. Bei Diskrepanz zwischen dem klinischen Erscheinungsbild und der histologischen Bewertung (z.B. inhomogene Leukoplakie ohne histologische Dysplasie) sollte eine erneute histologische Überprüfung erfolgen (Kunkel *et al.* 2010). Unabhängig von der Art der Therapie soll dem Patienten eine langfristige Kontrolle empfohlen werden. Bestrebungen, alle klinisch apparenten Bereiche von Vorläuferläsionen zu entfernen, haben sich in vielen

Umständen als unpraktisch erwiesen, weil die dadurch entstehenden Vernarbungen und Kontraktionen mit einer höheren Morbidität einhergehen. Ebenso ist die Effektivität der Therapie von Vorläuferläsionen hinsichtlich der malignen Transformation an der Stelle bzw. in der Umgebung bislang nicht abschließend geklärt (Lodi *et al.*, 2008; O'Shaughnessy *et al.*, 2002). Als Ursache wird das Phänomen der Feldkanzerisierung und die Persistenz genetisch bereits veränderter Zellen in der Umgebung der Läsion angenommen (Tabor *et al.*, 2001). Zudem führt die komplette Exzision von offensichtlichen Leukoplakien nicht zur Vermeidung oder Vorbeugung oraler Karzinome (Sudbo *et al.*, 2004). Deshalb werden langfristige Kontrollen in regelmäßigen Zeitabständen empfohlen (van der Waal, 2009).

Bei fortgeschrittenen Tumoren der Mundhöhle/Oropharynx stellt die Kombination von Operation und Strahlentherapie die erfolgversprechendste Behandlung dar (Forastiere *et al.*, 2008). Der primär kurative Therapieansatz besteht aus einer chirurgischen Tumorresektion mit suffizientem Sicherheitsabstand, gefolgt von einer selektiven Neck Dissektion. Der Resektionsdefekt sollte unter funktionellen Aspekten verschlossen oder rekonstruiert werden (Frerich, 2010). Eine primäre kurative Radiochemotherapie ist in den Stadien I und II bei internistischen Kontraindikationen bezüglich einer Operation indiziert. Auch in fortgeschrittenen Stadien kann eine simultane Radiochemotherapie alternativ zu einer Operation durchgeführt werden. Im Allgemeinen hängt die Therapieentscheidung von der Tumorgöße und Befall der umgebenden Strukturen ab. Die Komorbidität des Patienten stellt ebenfalls einen wichtigen Faktor zur Therapieentscheidung dar. Bei sonst gleichwertigen Behandlungsmaßnahmen oder bei schlechter Prognose erhält die Lebensqualität, als Entscheidungskriterium eine zentrale Bedeutung (Zimmermann *et al.*, 2003).

1.2 Konfokale Mikroskopie

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wurde 1955 von Marvin Minsky entwickelt. Die Fokussierung von weißem Licht auf einen Punkt der zu untersuchenden Probe sowie der Einsatz einer Lochblende im Strahlengang des detektierten Lichts, bestimmten den Aufbau des ersten konfokalen Mikroskops (Minsky, 1988). Mit einem konfokalen Mikroskop ist es möglich, aus einer „dicken“ Probe ausschließlich eine dünne Präparatschicht, einen sog. „optischen Schnitt“ abzubilden. Über eine kontrollierte Bewegung des Präparates in Richtung der optischen Achse ist es möglich, eine Vielzahl optischer Schnitte aus verschiedenen Präparatebenen aufzunehmen. Das Ergebnis ist ein dreidimensionaler Datensatz, mit dem Erkenntnisse über die räumliche Struktur sowie zelluläre und subzelluläre Informationen zur Morphologie des Objekts gewonnen werden können (Wilhelm *et al.*).

1.2.1 Grundlagen der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie(LSM)

Minskys Prinzip ist in allen modernen konfokalen Mikroskopen beibehalten. Heutzutage verwendete konfokale Mikroskope sind Laser-Scanning-Mikroskope. Als Lichtquelle wird Laserlicht verwendet (Semwogerere, 2005).

Abbildung 1 zeigt schematisch den Strahlengang der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie. Die zu untersuchende Probe wird mit einem Laserstrahl, mit ausreichend hoher Beleuchtungsstärke, im Auflichtverfahren beleuchtet. Dieses Licht kann nun von den Strukturen der Probe reflektiert, absorbiert oder gestreut werden. Von der Reflektions-Laser-Scanning Mikroskopie spricht man, wenn die reflektierten Strahlen nun mittels der Mikroskop-Optik zu einem vergrößerten Bild verarbeitet werden (Semwogerere, 2005). Das Laserlicht wird mit Hilfe eines so genannten *Beam-Splitters* in den Strahlengang des Mikroskops gebracht und auf die Probe projiziert. Der *Beam-Splitter* besteht aus einer beschichteten Glasscheibe, welches in einem bestimmten Winkel in den Strahlengang des Lasers eingebracht wird. Ein Teil des Lichts wird in einem Winkel von 90° reflektiert, die restlichen Strahlen passieren die Scheibe. Das Teilungsverhältnis ist abhängig von der Wellenlänge des Lichts (Semwogerere, 2005). Das Laserlicht wird zunächst auf einen möglichst kleinen Fokus (F1) in der Probe fokussiert. Im Vergleich zu den Schichten ober- und unterhalb des Fokus entsteht hier eine wesentlich höhere Beleuchtungsstärke. Das in der Probe reflektierte Licht gelangt in das Objektiv, wo es nach den Gesetzen der Strahlenphysik gebrochen wird. Dabei sammelt sich das gesamte Licht, welches genau aus dem Fokus kommt, in einem kleinen Punkt (F2), der in einem ganz bestimmten Abstand auf der entgegen gesetzten Seite des Objektivs liegt. Die entscheidende Besonderheit der konfokalen Mikroskopie gegenüber einem konventionellen Lichtmikroskops ist eine konfokale Blende (*Pinhole*), die in einer zur Objektebene des Mikroskops konjugierten Ebene angeordnet ist. Daraus ergibt sich, dass durch den Detektor nur Licht detektiert werden kann, welches die Blende passiert (Semwogerere, 2005). Der Durchmesser der Blende ist variabel und im Idealfall unendlich klein (punktförmige Beobachtung). Da der beugungsbegrenzt fokussierte Laserstrahl einer punktförmigen Beleuchtung des Objekts entspricht und Beleuchtungs- und Beobachtungspunkt ineinander abgebildet werden (konjugierte Ebenen), spricht man von einem konfokalen Strahlengang (Engelhardt *et al.*, 1993). Der Durchmesser der konfokalen Blende legt fest, in welchem Maß Licht von Objektpunkten außerhalb der Fokusebene ausgeblendet, also nicht detektiert werden. Die ausgeblendeten Bereiche des Objekts sind im Bild nicht sichtbar. Ein zusätzlicher Vorteilhafter Effekt der konfokalen Blende ist ihre streulichtunterdrückende und damit kontraststeigernde Wirkung. Mit Hilfe eines Sensors, bestehend aus einem lichtempfindlichen Material, dem sog. *Photomultiplier*, wird nun das Licht aufgefangen und in elektrische Signale umgewandelt, mit der dann vollständige zweidimensionale Daten des Objektes generiert werden (Wilhelm *et al.*). Um

nun die Probe Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abzutasten, muss der Fokus mechanisch verschoben werden (Semwogerere, 2005).

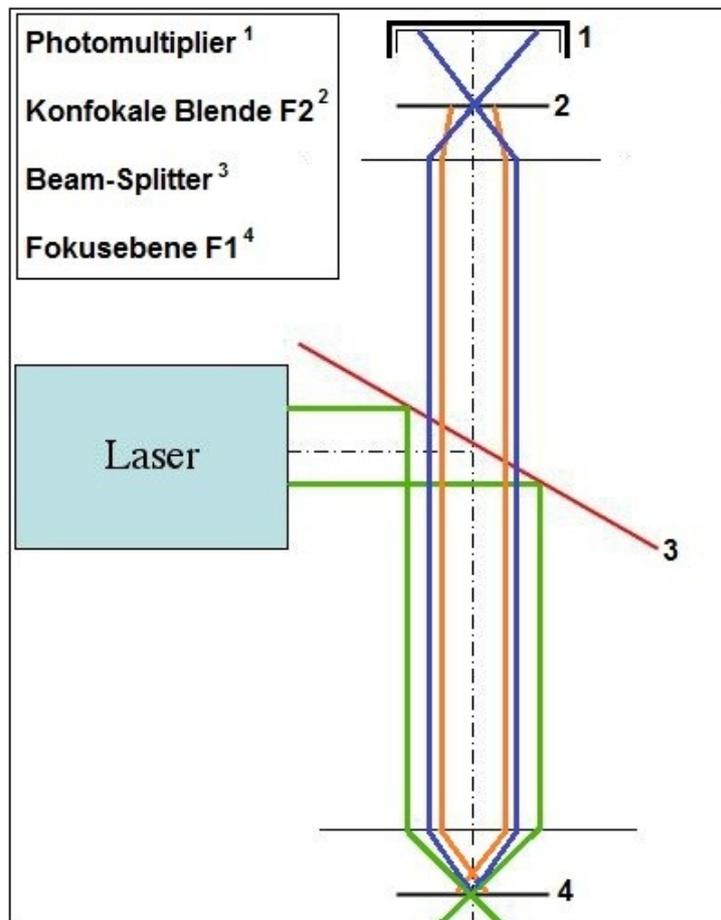


Abbildung 1: Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops

Das Laserlicht (grüne Linie) wird über einen *Beam Splitter* (3) in den Strahlengang des Mikroskops gebracht und über das Mikroskopobjektiv auf das Gewebe (F1) fokussiert. Die reflektierten Strahlen (blaue Linie) werden über das Objektiv gesammelt und weitergeleitet. Vor dem Detektor (*Photomultiplier*) befindet sich, in einer zum Objektiv konjugierten Ebene, eine konfokale Blende (F2). Reflektierte Strahlen aus Ebenen ober- oder unterhalb der Fokusebene treffen defokussiert auf die Blende (orangene Linie) und werden nicht vom Detektor erfasst und somit nicht abgebildet. Über den *Photomultiplier*, einem lichtempfindlichen Sensor, wird das aufgefangene Licht in elektrische Signale umgewandelt und zweidimensionale Daten werden mit hoher Auflösung generiert. Modifiziert nach Engelhardt *et al.*, 1993.

Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie wird in der konfokalen Mikroskopie die Probe punktweise bestrahlt und die physikalischen Wechselwirkungen, die das Licht in der bestrahlten Objektstelle hervorruft, werden ebenso punktweise gemessen. Informationen über die gesamte Probe werden erst dann erhalten, wenn der Laserstrahl über die Probe bewegt wird. Bilder mit mikroskopischer Auflösung entstehen in einem konfokalen LSM ausschließlich rechen-technisch (Wilhelm *et al.*). Deshalb ist auch ein integriertes Computersystem zur Kontrolle und Scannmechanik mit zugehöriger Software zur Datenverarbeitung mit genügend hoher Speicherkapazität von Bedeutung. Leistungsfähige

Arbeitsplätze zur 3D- Bildverarbeitung erlauben vielfältige Analysen der Objekte in kürzester Zeit (Engelhardt *et al.*, 1993).

1.2.2 Entwicklung des starren konfokalen Endoskops

Die hohen potenziellen Eigenschaften der konfokalen LSM zur Darstellung und Charakterisierung epithelialer Strukturen sowie die Darstellung und Identifizierung von Schleimhautveränderungen wurden in zahlreichen Studien belegt (Clark *et al.*, 2003; Just *et al.*, 2006; White *et al.*, 1999). Alle Studien konnten zeigen, dass Parameter wie Zellkerngröße, Zellkerndichte, Kern-Plasma-Relation (KPR), Zellverbindungen sowie die Gleichmäßigkeit und Morphologie der Zellen und Zellschichten gut darzustellen sind. Die potentielle Fähigkeit der LSM, die orale und laryngeale Schleimhaut bis zur Basalzellschicht nicht-invasiv und ohne Färbung in die Dysplasiediagnostik einzuführen, wurde in den o.g. Arbeiten bekräftigt.

Seit 2002 finden an der Universität Rostock konfokalmikroskopische Untersuchungen zur *in vivo* Darstellung der gesunden Mundschleimhaut sowie von Schleimhautveränderungen im Bereich der Mundhöhle, Oropharynx und Larynx statt (Just *et al.*, 2004; Just *et al.*, 2005b; Just *et al.*, 2008). Diese Untersuchungen erfolgten mit dem Heidelberg-Retina-Tomographen II (HRT II), das seinen klinischen Einsatz in der Augenheilkunde hat (Burk *et al.*, 2001). In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass dysplastische und kanzeröse Läsionen der Mundschleimhaut konfokalmikroskopisch bezüglich der Parameter Zellgröße, Kerndichte, Anzahl der Kerne pro Zelle, KPR, Zellschichtung und Zellverbindungen Unterschiede im Vergleich zu gesundem Epithel des Oropharynx aufweisen. Bei Patienten mit abgeschlossener simultaner Radiochemotherapie konnten neben Keratosen und geringgradigen Dysplasien vermehrt Zellödeme und Nekrosen sowie eine verstärkte Vaskularisation konfokalmikroskopisch beobachtet werden (Just *et al.*, 2005a). Starke Hyperplasien oder Leukoplakien verhinderten die Darstellung der Basalzellschicht. Die Basalmembran an sich konnte in keiner der Studien dargestellt werden.

Auf der Basis der Ergebnisse dieser Untersuchungen sowie der Bestrebung, die LSM für die Detektion von Vorläuferläsionen *in vivo* am Larynx einzusetzen, wurde ein Prototyp eines starren konfokalen Endoskops, mit den im Folgenden beschriebenen Eigenschaften entwickelt. Die Verlängerung des Strahlenganges des HRT II mit Verlagerung der Fokusebene in Form eines starren konfokalen Endoskops wurde von Prof. Stave, Universität Rostock, in Zusammenarbeit mit der Firma Storz, Tuttlingen, entwickelt und hergestellt, welches über einen speziellen Adapter an den Scannerkopf des HRT II gekoppelt werden kann (Stave, 2005). Weitere Details zum Gerät werden im Kapitel „Material und Methoden“ erläutert.

1.3 Tumorinduktion mit 4-Nitroquinolin-1-Oxid

Das starre konfokale Endoskop soll im Rahmen von präklinischen Studien auf seine Eignung zur *in vivo* Diagnostik für die Unterscheidung von intraepithelialen *Low-* und *High-grade* Läsionen untersucht werden. Hierzu wurde für diese Arbeit eine tierexperimentelle Studie mit chemisch induzierten Schleimhautläsionen an Mäusen gewählt. Ein gängiges Modell für die Induktion von PEC der oralen Schleimhaut stellt die Applikation von 4-Nitroquinolin-1-Oxid per os an Mäusen dar (Tang *et al.*, 2004).

4-Nitroquinolin-1-Oxid ist ein Quinolinderivat, dessen karzinogene Eigenschaft erstmalig im Jahre 1957 von Nakahara *et al.* beschrieben wurde. Die ursprünglich als Chemotherapeutikum entwickelte Substanz induzierte Plattenepithelkarzinome an der Haut (Nakahara *et al.*, 1957). Später wurde die Substanz von Fujino *et al.* durch lokale Applikation zur Induktion der oralen Karzinogenese in Mäusen eingesetzt (Fujino *et al.*, 1965). 4-NQO ist ein synthetisches, wasserlösliches Kanzerogen, das seitdem weit verbreitet in Tierexperimenten zur Induktion der oralen Karzinogenese zum Einsatz kommt (Tang *et al.*, 2004). Mit einer Applikation dieser Substanz können alle Stadien der oralen Karzinogenese, wie sie auch in humanen Schleimhautepithelien vorzufinden sind, erzeugt werden (Nauta *et al.*, 1995). Es ist bewiesen, dass die 4-NQO induzierte orale Karzinogenese in Mäusen sowohl histologisch, als auch hinsichtlich der ablaufenden biochemischen Prozesse, der oralen Karzinogenese im Menschen entspricht (Nauta *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2004).

1993 konnten Nunoshiba *et al.* in ihrer Arbeit zeigen, dass 4-NQO in der Lage ist, einen starken oxidativen Stress in der Zelle zu induzieren (Nunoshiba *et al.*, 1993). Die karzinogene Eigenschaft von 4-NQO wird in der Zelle durch die enzymatische Reduktion der Nitrogruppe zu 4-Hydroxyaminoquinolin-1-Oxid (4HAQO) durch 4NQO-Nitroreduktase und/oder Quinonreduktase eingeleitet (Benson, 1993). 4HAQO ist der eigentliche karzinogene Metabolit von 4-NQO, welches die Bildung von DNA-Addukten und somit Mutationen erzeugt (Benson, 1993).

1.4 Zielsetzung

Frühe, asymptotische orale Karzinome und deren Vorläuferläsionen unterscheiden sich in Klinik, Verlauf und Prognose ausgesprochen stark von fortgeschrittenen Karzinomen. Die Überlebensrate von Patienten mit oralen Malignomen ist stark abhängig vom Tumorstadium und Differenzierungsgrad zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Traditionell beruht die Erfassung und Diagnostik oraler Neoplasien stark auf der klinischen Erfahrung des untersuchenden Arztes und seiner Motivation, die oft unscheinbaren und subtilen morphologischen Veränderungen als solche zu erkennen. Eine optimale Diagnostik und operative Versorgung der Malignome im Kopf-Hals-Bereich mit minimalem Schaden des

gesunden Gewebes stellt bis dato eine große klinische und wissenschaftliche Herausforderung dar.

Die Beurteilung der Morphologie sowie der morphologischen Veränderungen durch Biopsie und histopathologischer Untersuchung ist in der Diagnostik von malignomsuspekten Läsionen der Goldstandard der Diagnosesicherung.

Diese Arbeit soll ein neues optisches System, das starre konfokale Endoskop, vorstellen, welches in der Lage ist, epitheliale Strukturen in zellulärer und subzellulärer Auflösung *in vivo*, nicht-invasiv und ohne zusätzlicher Färbungen des Gewebes, morphologisch darzustellen. Das vornehmliche Ziel dieser Arbeit ist, die Eignung der SKE für die zuverlässige Unterscheidung zwischen intraepithelialen *Low-grade* und *High-grade* Läsionen, im Konzert der verfügbaren optischen Systeme, zu untersuchen. Zu diesem Zweck werden über einen Zeitraum von 8 - 18 Wochen intraepitheliale Schleimhautläsionen an 50 Mäusezungen durch 4-NQO chemisch induziert. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen werden durch zwei Untersucher getrennt befundet und mit den histopathologischen Befunden der untersuchten Läsionen verglichen.

Zur Beurteilung der Eignung im klinischen Einsatz soll der analytische Nutzen sowie die klinische Relevanz dieser neuen *in vivo* Technologie evaluiert werden. Zu diesem Zweck werden die Parameter Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert sowie die gesamte Vorhersagegenauigkeit für die Bestimmung der diagnostischen Güte im Vergleich mit den histopathologischen Befunden als Goldstandard evaluiert.

Darüber hinaus soll die Untersucherabhängigkeit dieser nicht-objektiven Methode mit der Kappa-Statistik verifiziert werden. Zu diesem Zweck soll die Interraterreliabilität für zwei Untersucher der konfokalmikroskopischen Aufnahmen bestimmt werden.

Ferner sollen technisch bedingte Mängel, Praktikabilität, o.ä. Verbesserungsmöglichkeiten eruiert werden, um die Einführung der starren konfokalen Endoskopie in den klinischen Gebrauch bzw. für weitere Forschungsinhalte zu fördern. Insbesondere die Optimierung der Detektion sowie die gezielte, optisch-gestützte Probenentnahme von klinisch nicht eindeutig suspekten Schleimhautläsionen im Kopf-Hals-Bereich seien hier aufgeführt.

2. Material und Methoden

Zur Evaluation der starren konfokalen Laser-Scanning-Endoskopie auf eine klinische Eignung zur Frühdiagnostik des Mundhöhlenkarzinoms sollen in einem Tierversuch systematische Untersuchungen an experimentell induzierten Schleimhautläsionen durchgeführt werden. Eine Genehmigung der Ethikkommission Mecklenburg Vorpommern zum Design der Studie sowie die Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren gemäß § 8 Abs.5a des Tierschutzgesetzes liegen vor.

Die Studie "Starre konfokale Laser Scanning Endoskopie zur Frühdiagnostik des Oropharynxkarzinoms" wurde 2008 von FORUN (Projektnummer 889022) finanziert.

Ein Teil dieser Arbeit wurde 2010 im *Journal of Oral Pathology & Medicine* (2010) **39**: 318–327 publiziert.

2.1 Experimentelles Design

Zur Einschätzung der klinischen Eignung der starren konfokalen Endoskopie in der Tumordiagnostik wird, in der vorliegenden Arbeit, ein gängiges Karzinogenese Modell an 50 männlichen C57Bl/6 Mäusen angewendet. Zur experimentellen Induktion von oralen intraepithelialen Läsionen werden die Mäuse einer Behandlung mit 4-NQO über das Trinkwasser unterzogen. Als Kontrollgruppe erhalten zehn C57Bl/6 Mäuse über den gesamten Untersuchungszeitraum nicht kontaminiertes Trinkwasser. Aus der Versuchsgruppe werden jeweils zehn Mäuse nach 8, 10, 12, 14 und 18 Wochen getötet, die Läsionen im Bereich der Zunge makroskopisch beschrieben und videoendoskopisch dokumentiert. Nach Resektion der Zunge erfolgen direkt im Anschluss die *ex vivo* konfokalmikroskopischen Untersuchungen nach festgelegten morphologischen Kriterien mit direkter Visualisierung und Speicherung der Einzelbilder. Eingeschlossen werden alle SKE Untersuchungen zur Detektion von Epithelveränderungen im Bereich der Zungenunterseite und Zungenseitenränder. Der Goldstandard mit dem die SKE Untersuchungen verglichen werden sollen, ist die Befunderhebung durch Histologie. Dazu werden die resezierten Zungen in 4%igem Paraformaldehyd fixiert, konventionell histologisch aufgearbeitet und befundet. Gleiches Verfahren wird mit den Mäusen der Kontrollgruppe durchgeführt. Die Untersuchungen der Zungenschleimhaut der Kontrollgruppe erfolgen randomisiert über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg.

In einer weiteren Sitzung werden die konfokalmikroskopischen Aufnahmen, ohne Kenntnis der histologischen Befunde, verblindet und in zufälliger Reihenfolge von zwei Untersuchungsleitern nach festgelegten Kriterien befundet und in die Diagnosekategorien a) Keine Dysplasie b) Dysplasie I und II und c) Dysplasie III und CIS zugeordnet. Es folgen der

Vergleich der histopathologischen Querschnitte mit den konfokalmikroskopisch erstellten „optischen Flachschnitten“, sowie die statistischen Berechnungen der Interrater-Reliabilität, sowie der Parameter zur Beurteilung der Güte dieses diagnostischen Verfahrens für die Unterscheidung von *Low grade* Läsionen gegenüber den malignen *High grade* Läsionen.

2.2 Bildgebendes System

2.2.1 Heidelberg-Retina-Tomograph II

Der HRT II ist ein kommerziell erhältliches konfokales Laser Scanning Ophtalmoskop der Firma Heidelberg Engineering, welches sich in der Augenheilkunde international etabliert hat.

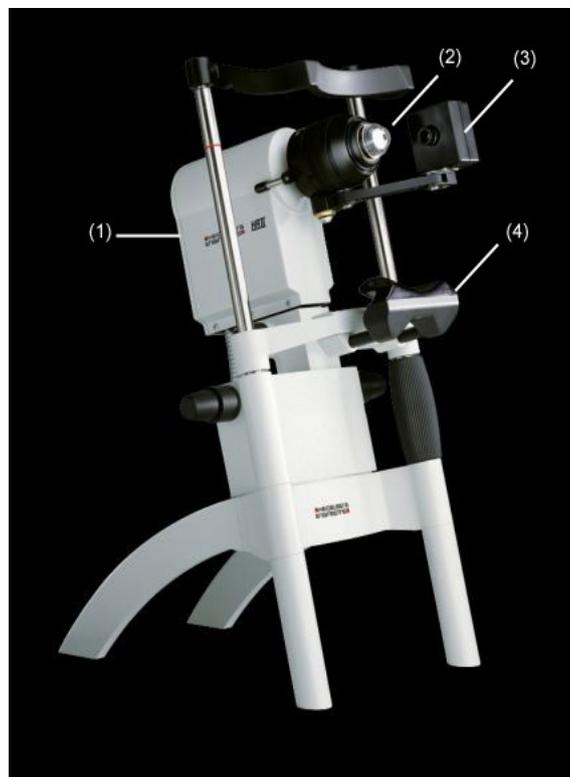


Abbildung 2: Heidelberg-Retina-Tomograph II mit Rostock-Cornea-Modul (Heidelberg Engineering).

Laser-Scanning-Ophtalmoskop mit abnehmbarem Scanner (1), PMMA-Kappe (2007/2008.), digitaler Kameravorrichtung (3) und Kinnstütze (4) für die dreidimensionale Strukturanalyse der Netzhaut und Kornea in der Ophtalmologie. (Foto: Heidelberg Engineering)

Der HRT II besteht aus einer Laser-Scanning-Kamera-Einrichtung, einer Kamerahalterung mit integrierter Kinnstütze, einem Netzteil zur Stromversorgung sowie einem Computer mit spezieller Anwendungssoftware (Rostock Cornea Module 1.3.3, Heidelberg Engineering). Der Scanner beinhaltet die Laserquelle, den Beam-Splitter, eine integrierte z-Scann

Vorrichtung zur Verschiebung der Fokusebene im Gewebe, sowie einen lichtempfindlichen Detektor und eine spezielle Steuerungselektronik (Stave *et al.*, 2002).

2.2.2 Starres konfokales Endoskop

Die konfokalmikroskopischen Untersuchungen erfolgen mit einem spezialgefertigten Prototyp eines starren konfokalen Endoskops (KARL STORZ GmbH & Co, Tuttlingen), welches über einen Adapter (KARL STORZ GmbH & Co, Tuttlingen) an den Scanner des HRT II-Komplexes (Heidelberg Engineering GmbH) gekoppelt wird.

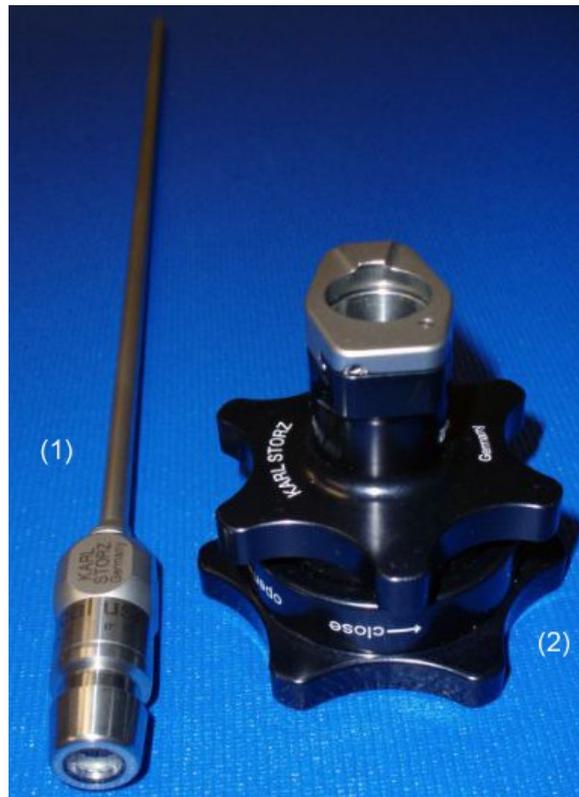


Abbildung 3: Starres konfokales Endoskop (1) mit Adapter (2). Fa. Storz, Tuttlingen

Das Endoskop hat eine Länge von 23 cm und einen Durchmesser von 0,5 cm. Die Ankopplung des SKE an den Scanner des Heidelberg-Retina-Tomographen II, sowie die Tiefenverstellung der Fokusebene im Gewebe erfolgt über den hier abgebildeten Adapter. Foto PD Dr.med. Just, mit freundlicher Genehmigung.

Das Endoskop mit einer Länge von 23 cm und einem Durchmesser von 0,5 cm besteht aus einem Gestängerohr mit einem integrierten Linsensystem. Das optische System des starren Endoskops wird durch zehn Stablinen erzielt, die sich innerhalb einer Röhre im Gestängerohr des Endoskops befinden. Ergänzt durch die Nutzung eines Wasserimmersionsobjektives mit einer Vergrößerung von x40 (Zeiss, Jena, Germany) mit 3,5 mm Durchmesser, welche sich am distalen Endoskopende befinden, wird die Bildgebung ermöglicht. Es werden Linsen mit antireflektions Eigenschaften verwendet, die mit einer

verpackenden Oberfläche versehen sind, um die ungünstigen Effekte der Lichtstreuung während der konfokalen Mikroskopie zu minimieren. Um einen gewissen Halt und ausreichenden Schutz der empfindlichen Linsen zu gewährleisten, sind die aus Glas bestehenden konvexen Flächen zweier benachbarter Linsen durch ein Zwischenglied, bestehend aus einer flexiblen und transparenten Kittsubstanz, innerhalb des Gestängerohrs miteinander verbunden. Das Material ist nicht lichtstreuend und hat somit keinen großen Einfluss auf die Bildqualität. Das Endoskop ist autoklavierbar und CE zertifiziert.

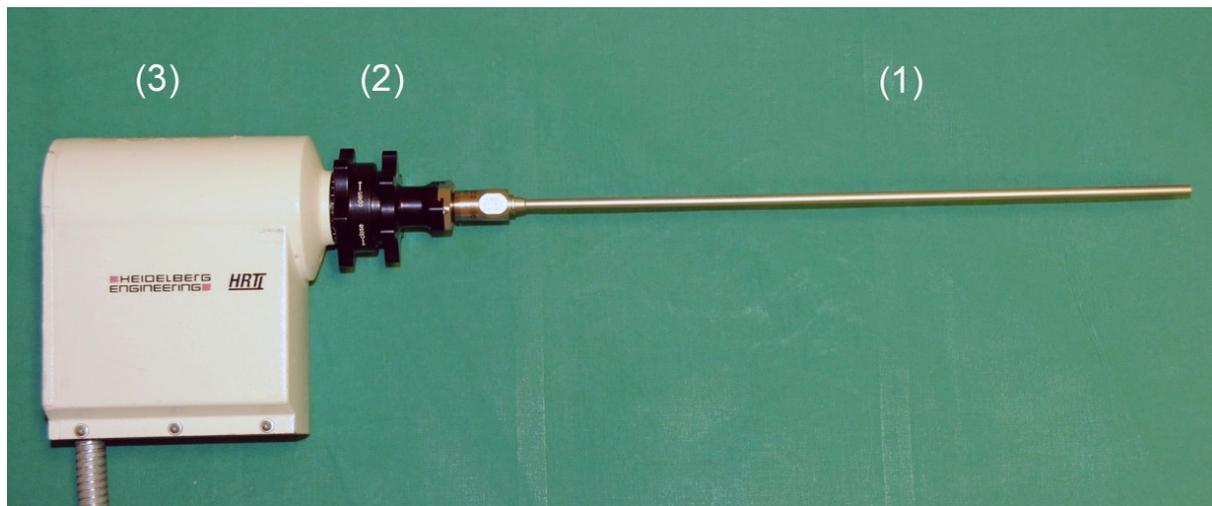


Abbildung 4: Starres konfokales Endoskop (1) über den Adapter (2) gekoppelt an den Scanner des HRT II (3) (Heidelberg Retina Tomograph II; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland). Foto PD Dr.med. Just, mit freundlicher Genehmigung.

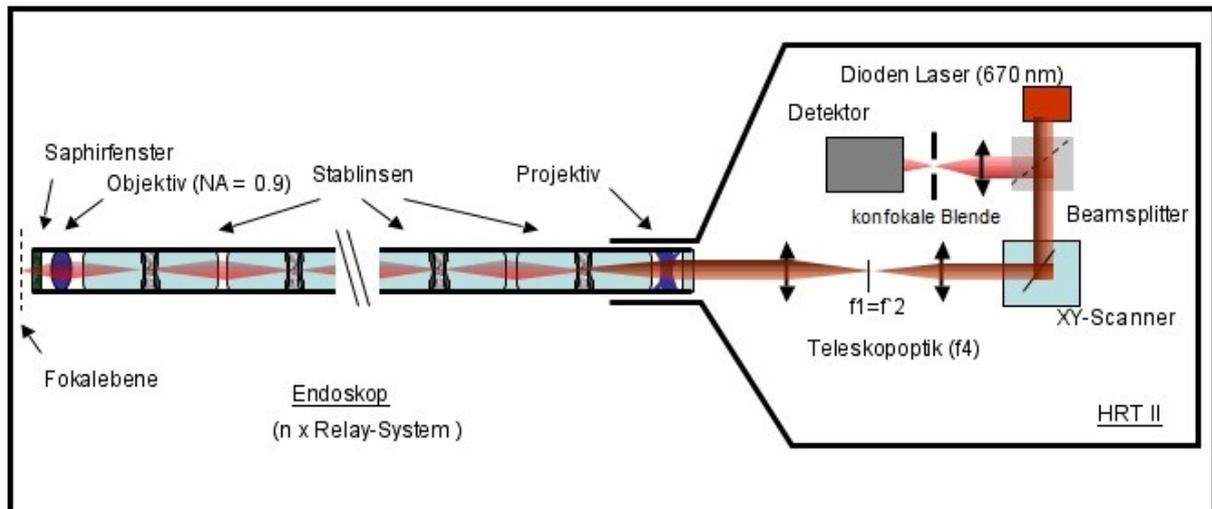


Abbildung 5: Schematischer Längsschnitt durch das SKE / HRT II System

Das Endoskop besteht aus einem Gestängerohr mit einem integrierten Linsensystem. Das optische System wird durch 10 Stablinsen mit anti-reflexions Eigenschaften sowie einem Wasserimmersionsobjektiv erzielt. Die Kopplung des Endoskops an den Scanner des HRT II mit integrierter Laserquelle, Beamsplitter, der konfokalen Blende, sowie einem Detektor, ermöglicht eine hoch auflösende Bildgebung in schwer erreichbaren Regionen des Kopf- und Halsbereiches. Limitiert durch das starre konfokale Endoskop besitzt dieses System eine numerische Apertur von 0,9 und liefert konfokalmikroskopische Bilder von $350 \times 350 \mu\text{m}$ bei einer lateralen und axialen Auflösung von 1-2 bzw. $5 \mu\text{m}$.

Die Beleuchtung wird durch einen 670 nm Dioden Laser erzeugt. Die Bildgebung erfolgt durch die Nutzung eines Wasserimmersionsobjektives mit einer Vergrößerung von $\times 40$ (Zeiss). Limitiert durch das Endoskop besitzt dieses System eine numerische Apertur von 0,9 und liefert Bilder von $350 \times 350 \mu\text{m}$ Größe.

Die laterale Auflösung, d.h. die kleinste Distanz zwischen zwei Punkten, die gerade noch unterschieden und als zwei Punkte abgebildet werden können, beträgt $1-2 \mu\text{m}$. Die axiale Auflösung des SKE beschreibt die Dicke der optischen Ebene, von der das reflektierte Licht zu einem bestimmten Zeitpunkt detektiert wird und beträgt in diesem System $5 \mu\text{m}$. Mit diesem System werden Eindringtiefen bis zu $250 \mu\text{m}$ erreicht.

2.3 4-Nitroquinolin-1-Oxid (4-NQO)

In Form feiner, gelblicher Kristalle wurde 4-NQO von der Firma Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA, bezogen. Das chemische Kanzerogen 4-NQO wurde im Trinkwasser auf eine Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ verdünnt. Die Lösung wurde bei 8°C gelagert. Jede Woche wurde eine frisch angesetzte Lösung zur Applikation an die Versuchstiere hergestellt. Pro Maus und Tag wurden 5 ml Wasser berechnet. Insgesamt wurde eine Menge von 2,17 g 4-NQO für die Induktion von oralen Schleimhautläsionen der Versuchsgruppe verwendet. Das Ansetzen der Lösung, dessen Aufbewahrung, die Applikation an die Tiere sowie die

fachgerechte Entsorgung erfolgten in der zentralen Versuchstierhaltung des Institutes für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock.

2.4 Tiere und Tierhaltung

Alle Versuche wurden an männlichen C57Bl/6 Mäusen durchgeführt. Die Mäuse wurden von der Firma Jackson River Lab., Maine, USA bezogen und unter kontrollierten und standardisierten Bedingungen durch geschultes Personal in der zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock gehalten. Jeweils fünf Mäuse wurden in spezielle Käfige (Typ II long, Thermoplast) für Mäuse bei einer kontrollierten Temperatur von 22 - 24°C, einer Raumfeuchtigkeit von 50 - 55% und einem Tag- Nachtzyklus von 8 / 16 Stunden gehalten. Alle Mäuse hatten freien Zugang zu Wasser und sterilem Standardfutter für Nagetiere. Als Untergrund wurde Einstreu aus Pappel-Granulat mit regelmäßigem Wechsel verwendet.

Die Untersuchungen erfolgten an insgesamt 60 C57Bl/6 Mäusen im Alter von sechs Wochen zu Beginn der Untersuchungen. Jeweils 10 Mäuse wurden randomisiert in sechs Gruppen eingeteilt. Die Gruppen wurden mit den Buchstaben A, B, C, D, E und F benannt. Nach 8, 10, 12, 14 und 18 Wochen wurden die Mäuse der jeweiligen Gruppen am Tag der Untersuchung durch CO₂ Begasung getötet. Dafür wurde die zu untersuchende Maus in einen dafür vorgesehenen, geschlossenen Käfig gesetzt und zwei bis drei Minuten mit CO₂, (medicAL) 100%, mit 0,2 – 0,3 bar begast und anschließend noch für weitere 3-5 min im geschlossenen Käfig belassen. Innerhalb von drei Stunden nach Tötung wurden die geplanten konfokalmikroskopischen Untersuchungen ausgeführt. Nach den abgelaufenen *ex vivo* Untersuchungen an den Mäusen wurden diese zur fachgerechten Kadaverentsorgung der zentralen Versuchstierhaltung übergeben.

Tabelle 3: Übersicht der 4-NQO Ingestionsdauer und Applikationsmenge im Tierexperiment.

Gruppe	Anzahl Mäuse (n)	Ingestionsdauer 4NQO	Ingestierte 4NQO Menge/Maus
A	10	keine	keine
B	10	8 Wochen	28 mg
C	10	10 Wochen	35 mg
D	10	12 Wochen	42 mg
E	10	14 Wochen	49 mg
F	10	18 Wochen	63 mg

2.5 Untersuchungsablauf

2.5.1 Induktion von intraepithelialen Schleimhautläsionen

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurde das chemische Kanzerogen 4-NQO im Trinkwasser auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt. Jede Woche wurde eine frisch angesetzte Lösung zur Applikation an die Versuchstiere hergestellt. Die Ingestion dieses Kanzerogens erfolgte über das für jede Maus gleichermaßen verfügbare Trinkwasser mit 5 ml pro Maus und Tag.

Für die ersten acht Wochen wurde eine Menge von 1,4 g 4-NQO für 50 Mäuse in Lösung gegeben. Ab Woche neun der Untersuchungsreihe erhielten die zehn Mäuse der Gruppe B nicht kontaminiertes Trinkwasser bis zum Tag ihrer Untersuchung (Tod und Resektion). Die weiteren verbliebenen 40 Mäuse bekamen ab Woche neun wie gewohnt ein mit 4-NQO kontaminiertes Trinkwasser derselben Konzentration wie zuvor. Ab der elften Woche der Untersuchungsreihe bekamen die Mäuse der Gruppe C (n=10) nicht kontaminiertes Trinkwasser, bis die jeweiligen Untersuchungen stattgefunden haben. Die restlichen Mäuse der Gruppen D bis F erhielten wiederum ein mit 4-NQO kontaminiertes Trinkwasser. Mit Beginn der Woche 13 der Untersuchungsreihe bekamen die Mäuse der Gruppe D (n=10) wiederum nicht kontaminiertes Trinkwasser und die Mäuse der Gruppen E und F (n=20) erhielten 100 µg/ml 4-NQO über das Trinkwasser verabreicht. Mit Beginn der Woche 15 erhielten dementsprechend die Mäuse der Gruppe E nicht kontaminiertes Trinkwasser und Gruppe F erhielt für weitere vier Wochen 100 µg/ml 4-NQO per os.

2.5.2 Gewebepreparation

Die Maus wurde zunächst in Rückenlage auf einer OP-Platte mit Leukotape fixiert. Die folgenden Präparationsschritte wurden unter einem Stereomikroskop (Fa. Zeiss, Jena) mit Hilfe einer feinen Pinzette und einer Mikroschere durchgeführt. Die Mandibula wurde vertikal abgesetzt und die Zunge am Zungengrund mobilisiert. Die Läsionen der ausgestreckten Zunge wurden zunächst zwecks Dokumentation, standardisiert gezählt, beschrieben und fotografiert. Es folgte eine Resektion der Zunge oberhalb der Epiglottis. Dann folgten die konfokalmikroskopischen Untersuchungen aller Läsionen der Zunge, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird. Anschließend wurden Querschnitte der Zunge inklusive der Läsionen herausgeschnitten und mithilfe bunter Stecknadeln auf zugeschnittene Korkplatten fixiert und topographisch markiert. In Behältern mit frisch hergestelltem, 4%igem Paraformaldehyd wurden die so gewonnenen Präparate in das Institut für Pathologie geschickt und dort konventionell histologisch aufgearbeitet. Dieses Verfahren wurde an allen

Mäusen der Versuchs- sowie Kontrollgruppe in gleicher Weise und unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

2.5.3 Konfokalmikroskopische Untersuchungen

Zunächst erfolgte die Dokumentation von makroskopisch sichtbaren Läsionen der Mundschleimhaut mit einem digitalen Endovideokamera-System und einer digitalen Videokette KARL STORZ AIDA® (Advanced Image and Data Archiving System) sowie dem zugehörigen zentralen Bild- und Datenarchivierungssystem AIDA Compact® (Storz, Tuttlingen). Mit diesem System wurden digitale Aufnahmen der zu untersuchenden, makroskopisch suspekten Schleimhautveränderungen im Bereich der Zungenseitenränder sowie der Zungenunterseite der Maus erstellt und dokumentiert.

Für die Untersuchungen im Tierexperiment wurde der Mikroskopschlitten mit dem HRT II Scanner vom HRT II Stativ entfernt und das Endoskop über den Adapter an den Scanner gekoppelt (Vergl. Abb. 4). Nach Resektion der Zunge wurde die zu untersuchende Region der Zungenschleimhaut zunächst mit einer dünnen Schicht Vidisic® (Dr. Mann Pharma, Berlin) bestrichen, um eine gute Kontaktfläche zum Endoskop herzustellen. Die Aufsatzfläche des Endoskops wurde mit Tacholiquin, einem Benetzungsmittel, behandelt um eventuelle Beschläge zu vermeiden. Nach Aufsetzen des Endoskops auf die zu untersuchende Läsion wurden die Aufnahmen durch Betätigung eines Fußpedals generiert. Es wurden Einzelbilder mit einer Größe von 350 x 350 µm angefertigt. Die Generierung der Einzelbilder erfolgte beginnend mit der oberflächigsten Zellschicht. Unter Verschiebung der Laserfokusebene in Richtung *Lamina propria* in 7 µm Schritten konnte das zu untersuchende Gewebe gescannt werden. Der Scannvorgang erfolgte so lange, bis keine Reflexionen mehr aus dem Gewebe erhalten wurden.

Die Tiefenverstellung erfolgte an dem Adapter, welches manuell zu betätigen war. Die Darstellung des Gewebes war zunächst nur ab 40 µm Tiefe möglich. Durch die fehlende Abstandstabilisierung, z.B. durch eine kalibrierte Abstandsscheibe, konnte keine exakte Untersuchung der oberflächigen Zellschichten erfolgen. Das Aufkleben einer Distanzscheibe während der Untersuchungen in Form einer selbstklebenden, 40 µm dicken Folie ermöglichte die Darstellung des zu untersuchenden Gewebes beginnend mit den oberflächigen Zellschichten.

Die aufgenommenen, digitalisierten Bildserien wurden direkt am HRT II-Rechner visualisiert, systematisch beschriftet und in einer Datenbank gespeichert. Dieser Ablauf wurde an allen Mäusen der Versuchs- sowie Kontrollgruppe in gleicher Weise und unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

2.5.4 Auswertung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen

In einer späteren Sitzung wurden die Aufnahmen durch zwei Untersucher ohne Kenntnis der histologischen Befunde, getrennt, verblindet und in einer zufälligen Reihenfolge nach den im Folgenden beschriebenen und vorher festgelegten Kriterien befundet. In Fällen mit nicht übereinstimmender Diagnose wurde in einem Konsensusverfahren mit einem erfahrenen Pathologen eine Zuordnung zu einem der Diagnosen vorgenommen.

Folgende Kriterien wurden zur Befunderhebung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen festgelegt.

Beurteilung von:

- Gleichmäßigkeit und Morphologie der Zellen und Zellverbände
- Vorhandensein von Hyperkeratosen, epitheliale Zellen ohne Zellkern
- Zellkerngröße und Kern-Plasma-Relation
- Vorhandensein doppelkerniger Zellen, polymorpher Zellen, atypischer Zellen
- Lokalisation der dysplastischen bzw. atypischen Zellen in der *Mukosa*
- Beurteilung der Zellverbindungen
- Vorhandensein von keratotischen Läsionen und ihre Reichweite im Epithel

Dysplasien wurden anhand der beschriebenen histologischen Kriterien nach Gale *et al.* diagnostiziert. Als Grad I Dysplasien wurden die Läsionen eingestuft, wenn nur das untere Drittel des Epithels betroffen und von minimalen zellulären Atypien begleitet war. Als Grad II Dysplasien wurden Schleimhautveränderungen zusammengefasst, wenn sich die strukturellen Veränderungen bis in das mittlere Drittel des Epithels erstreckten. Grad III Dysplasien lagen vor, wenn sich strukturelle Unruhen auch im oberen Dritten des Epithels abzeichneten.

Für die Unterscheidung Dysplasie und *Carzinoma in situ* wurden folgende Kriterien benutzt: Im Gegensatz zur Dysplasie wurde von Karzinomen im Allgemeinen ausgegangen, wenn zusätzlich zu irregulären Zellstrukturen auch die Zellverbindungen aufgehoben waren. Für die Differenzierung von CIS und invasiven Karzinomen wurde die Basalzellschicht bzw. die subepitheliale Schicht beurteilt. CIS war definiert als eine ausgesprochene Dysplasie mit intakter Basalmembran. Wohingegen ein invasives Karzinom dann vorlag, wenn die Integrität der Basalmembran beschädigt war und atypische Zellen in der subepithelialen Schicht gefunden wurden.

In dieser Studie soll entsprechend des Konzeptes der squamösen intraepithelialen Neoplasien (SIN) die Abgrenzung der nichtkarzinomatösen, benignen, *Low-grade*

Veränderungen, wie Entzündung, Hyperplasien, Hyperkeratosen, Papillome sowie leichte und moderate Dysplasien von den *High-grade* Läsionen der Zunge, wie schwere Dysplasien, CIS und invasiven Karzinomen aufgeführt werden, um die Sensitivität und Spezifität dieser Methode hinsichtlich der Unterscheidung von *Low- und High-grade* Läsionen zu berechnen. Deshalb erfolgte eine Einteilung der erhobenen Befunde in die folgenden Kategorien:

- Keine Dysplasie
- Dysplasie I und II
- Dysplasie III und *Carzinoma in situ*

Die Auswertung der konfokalmikroskopischen Befunde mit dem SKE erfolgte zunächst durch zwei Untersuchungsleiter getrennt. Dabei musste jeder Befund einer „Diagnose“ zugeordnet werden. „nicht beurteilbar“ oder „keine Diagnose“ waren nicht zulässig. Im Falle von nicht eindeutigen Befunden wurde zu Gunsten der schwerwiegenderen Läsion entschieden.

2.5.5 Histopathologische Untersuchungen

Das konfokalmikroskopisch untersuchte Gewebe wurde mithilfe eines Skalpells in Blöcken herausgeschnitten, in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Im Institut für Pathologie der Universität Rostock wurden aus diesen Blöcken mit Hilfe eines Mikrotoms 5 µm dicke Vertikalschnitte von oral nach aboral angefertigt. Um die typischen Merkmale des Gewebes sichtbar zu machen, wurden die Schnitte konventionell mit Hämatoxylin-Eosin eingefärbt. Mit einem Elektronenmikroskop Jenamed 2 der Firma C. Zeiss (Jena, Germany) unter einer Vergrößerung von 12,5x/ 0,25 und 25x/ 0,65 wurden die angefertigten HE Schnitte betrachtet und befundet.

Die histologische Befundung wurde vom Autor anhand der gewonnenen Gewebeproben durchgeführt. Repräsentative Fälle wurden mit einem erfahrenen Pathologen besprochen und in Zusammenarbeit die Klassifikation der Läsionen festgelegt. Es wurden Mikrophotografien von den für den Vergleich relevanten Epithelregionen erstellt.

Die Einteilung aller Läsionen erfolgte basierend auf die WHO Klassifikation von 2005. Dysplasien wurden anhand der beschriebenen histologischen Kriterien nach Gale *et al.* diagnostiziert (Vergl.Tab.1).

Die Dysplasien wurden in drei Grade eingeteilt. Als Grad I (milde Dysplasie) wurden die Läsionen eingestuft, wenn nur das untere Drittel des Epithels betroffen und von minimalen zellulären Atypien begleitet war. Als Grad II Dysplasien (moderate Dysplasien) wurden Schleimhautveränderungen zusammengefasst, wenn sich die strukturellen Veränderungen bis in das mittlere Drittel des Epithels erstreckten. Grad III Dysplasien (schwere Dysplasie) lagen vor, wenn sich strukturelle Unruhen auch im oberen Drittel abzeichneten.

Die Anwesenheit von ausgeprägten Atypien wurde als schwere Dysplasie eingestuft, obwohl sie die oberen Schichten des Epithels nicht erreichten. Für die Diagnose eines *Carzinoma in situ* wurden folgende Kriterien festgelegt: transepitheliale, architekturelle Abnormitäten, durchgehender Strukturverlust des Epithels, begleitet von ausgeprägten zytologischen Atypien bei Vorhandener Integrität der Basalmembran. Eine Frühinvasion lag vor, wenn eine Zellinvasion in die *Lamina propria* zu vermerken war. Im Falle von nicht eindeutigen Befunden wurde zu Gunsten der schwerwiegenderen Diagnose entschieden.

2.6 Statistische Analysen

2.6.1 Cohens-Kappa-Statistik

Für den Vergleich der beobachteten Befunde durch zwei Untersucher wurde die Cohens-Kappa Statistik verwendet. Diese Methode berechnet ein Maß für die Übereinstimmung nominaler, trennscharfer Werte unter Berücksichtigung der Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung (Cohen, 1968).

Tabelle 4: Kategorisierung von Cohens-Kappa Werten, modifiziert nach (Altmann, 1991)

Wert von κ	Ausmaß der Übereinstimmung
< 0,2	nicht ausreichend
0,21 – 0,4	hinreichend
0,41 – 0,6	moderat
0,61 – 0,8	gut
0,81 – 1,0	sehr gut

2.6.2 Bestimmung der diagnostischen Güte

Die diagnostische Güte der SKE zur Unterscheidung zwischen *Low-* und *High-grade* Läsionen wurde nach folgenden statistischen Definitionen ermittelt.

Tabelle 5: Definitionen zur statistischen Berechnung der diagnostischen Güte, modifiziert nach Kundt und Krentz, 2006.

Sensitivität	$\frac{RP}{RP + FN}$	Unter Sensitivität versteht man die Wahrscheinlichkeit, mit der eine vorhandene Läsion auch als solche erkannt wird.
Spezifität	$\frac{RN}{RN + FP}$	Unter Spezifität versteht man die Wahrscheinlichkeit, mit der eine fehlende Läsion auch als solche erkannt wird.
Positiver Vorhersagewert (PPV)	$\frac{RP}{RP + FP}$	Der PPV sagt aus, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Läsion tatsächlich vorliegt, wenn der Befund positiv ausfällt.
Negativer Vorhersagewert (NPV)	$\frac{RN}{RN + FN}$	Der NPV beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Läsion tatsächlich nicht vorliegt, wenn der Befund negativ ist.
Vorhersagegenauigkeit	$\frac{RP + RN}{RP + RN + FP + FN}$	Die gesamte prädiktive Genauigkeit sagt aus, mit welcher Wahrscheinlichkeit Patienten mit und ohne Läsion als richtig erkannt werden, wenn der Befund positiv bzw. negativ ausfällt.

(RP) richtig Positiv, (RN) richtig Negativ, (FP) falsch Positiv, (FN) falsch Negativ, (PPV) *positive predictive value*, (NPV) *negative predictive value*.

2.7 Computersoftware

Microsoft Office wurde zur Text- und Bildverarbeitung verwendet. Videoendoskopische-, konfokalmikroskopische- und histologische Aufnahmen sowie Zeichnungen und Abbildungen wurden mit Photoshop Elements 4.0 bearbeitet. Zur Erstellung des Literaturverzeichnisses wurde EndNote 7.0 verwendet. Excell Microsoft Office wurde für die statistischen Berechnungen verwendet.

3. Ergebnisse

Von 60 C57Bl/6 Mäusen wurden an 58 Mäusen konfokalmikroskopische Aufnahmen der Zungenschleimhaut mit dem starren konfokalen Endoskop (SKE) aufgenommen. Insgesamt wurden 1418 Einzelbilder mit dem SKE generiert. Zwei Mäuse sind im Verlauf des Expositionszeitraumes verstorben und deshalb von weiteren Untersuchungen und statistischen Berechnungen ausgeschlossen worden.

3.1 Induktion von Schleimhautläsionen durch 4-NQO

Die Behandlung der Mäuse mit 4-NQO kontaminiertem Trinkwasser lieferte progressive Schleimhautveränderungen, die makroskopisch als entzündliche, hyperämische Veränderungen bis hin zu leukoplakischen Läsionen oder exophytisch wachsenden Tumoren aufgefallen sind. Diese Läsionen waren überwiegend an den Zungenseitenrändern (n=29) aber auch an der Zungenunterseite (n=25), Zungenrücken (n=17) sowie Gaumen (n=1) lokalisiert. Invasive, infiltrierende, große Karzinome wurden im Untersuchungszeitraum von insgesamt 18 Wochen nicht beobachtet.



Abbildung 6: makroskopische Schleimhautveränderungen induziert durch 4-NQO.

(A) leicht erhabene Leukoplakie, (B) Erythroplakie, (C) Erythroleukoplakie.

In den Gruppen B – F (4-NQO- Ingestion über Trinkwasser) überlebten alle, ausgenommen zweier C57Bl/6 Mäuse der Gruppe F, die Behandlung mit 4-NQO *per os*.

Die histologischen Befunde der untersuchten Zungenläsionen ergaben in 13 Fällen gesunde bis entzündlich und hyperplastisch veränderte Schleimhäute, in 30 Fällen leichte bis moderate Dysplasien und in 15 Fällen schwere Dysplasien sowie Carzinomata *in situ*. In einem Fall wurde ein Papillom diagnostiziert, welches in die Kategorie der benignen Läsionen gezählt wurde. Mit zunehmender Dauer der Noxeningestion über das Trinkwasser waren schwerwiegendere Läsionen zu verzeichnen.

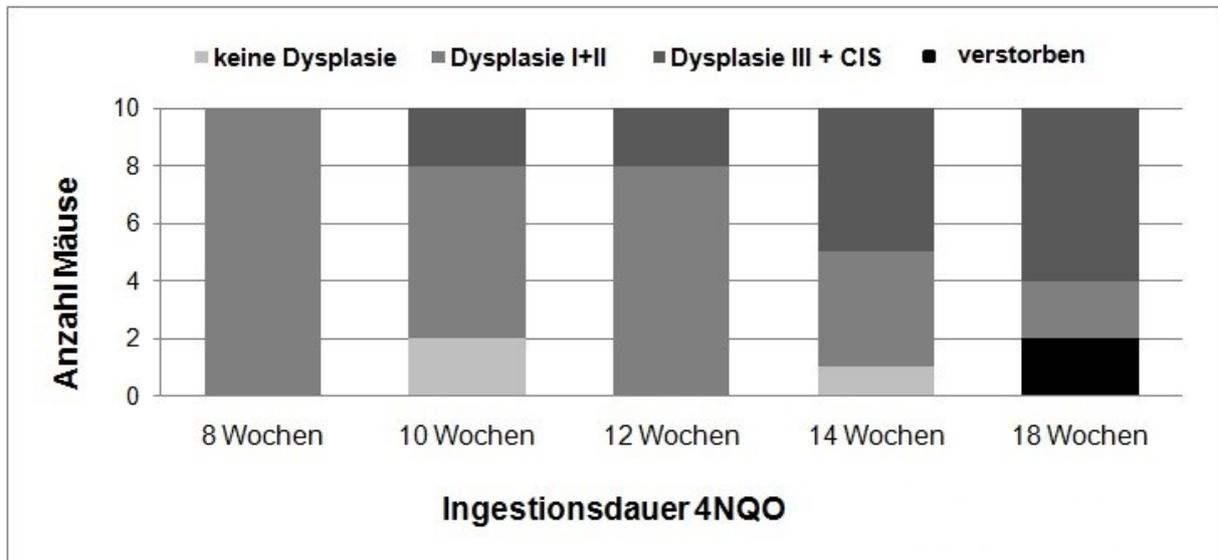


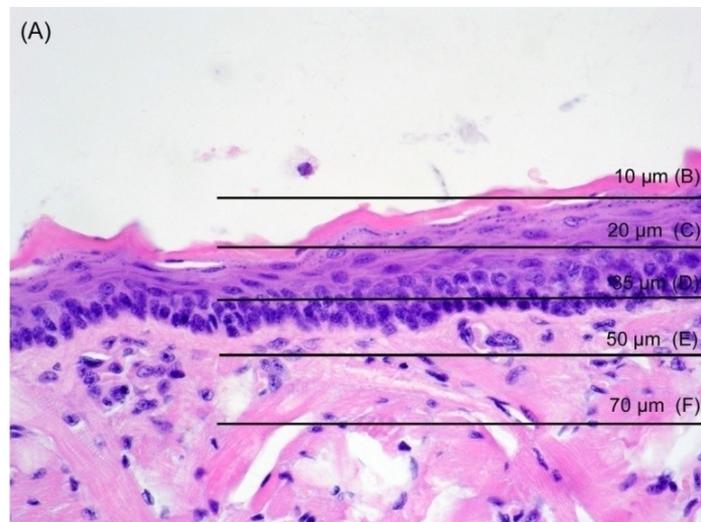
Abbildung 7: Histologische Befundhäufigkeiten in Abhängigkeit von der Noxingestionsdauer

3.2 Darstellung der morphologischen Charakteristika der gesunden Schleimhaut mit der SKE

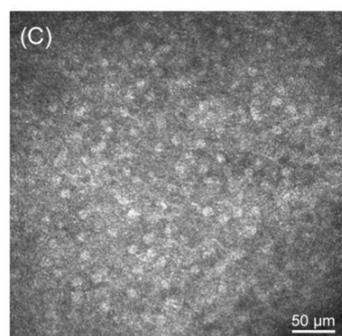
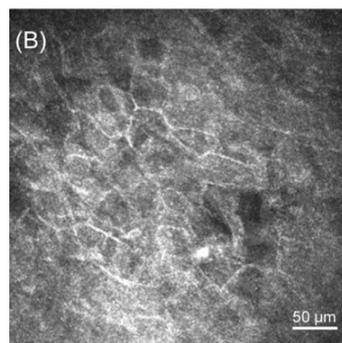
Bei der Betrachtung der gesunden Zungenschleimhaut durch das starre konfokale Endoskop zeigen die Zellen des normal geschichteten Epithels der Mäusezunge in den oberen Schichten eine polyedrische Form auf. Hierbei erscheinen die Zellwände hell, das Zytoplasma hingegen dunkel. Die Zellkerne zeigen eine runde bis ovale Form und erscheinen hell. Mit Zunahme der Eindringtiefe der Fokusebene bis zu 40 µm variieren Zellgröße, Zelldichte sowie die Kerngröße. Je tiefer die fokussierte Ebene, desto kleiner erscheinen die Zellen und umso größer und dichter die Zellkerne. Das heißt, in der Basalzellschicht erscheinen die Zellen am Kleinsten und die Zellkerne am Größten. Bei allen untersuchten Mäusezungen der Kontrollgruppe zeigte sich ein morphologisch homogenes Erscheinungsbild des Plattenepithels bezüglich der Zellgröße, Anzahl der Kerne pro Zelle, der Zellverbindungen sowie der Epithelschichtung und -architektur. Im gesunden, nicht verbreiterten Epithel der Zungenschleimhaut konnte das Epithel bis zu einer Tiefe von 104 bis 240 µm dargestellt werden.

Abbildung 8 zeigt eine Gegenüberstellung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen der gesunden Schleimhaut der Zungenunterseite der Maus zum einen erstellt mit dem konventionellen HRT II (linke Spalte) sowie mit der SKE (rechte Spalte). Die Aufnahmen der obersten Zellschicht (Abb. 8B) der Schleimhaut zeigen deutlich epitheliale Zellen ohne Zellkerne, wie sie im *Stratum superfiziale* der Zungenschleimhaut im histologischen Schnittpräparat (Abb. 8A) ebenfalls erkenntlich sind. In einer Tiefe von ca. 20 µm (Abb. 8C) sind die Zellen des *Stratum intermedium* dargestellt. Man erkennt groß erscheinende Zellen

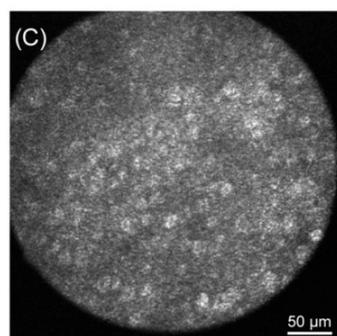
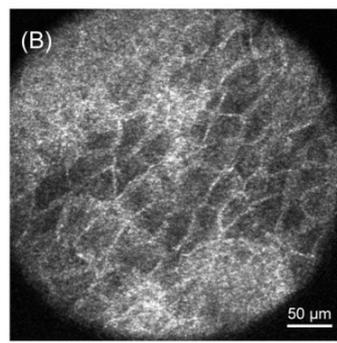
mit deutlich abgrenzbaren Zellkernen. Ebenfalls gut ersichtlich sind die Zellmembranen. Diese können in den oberen Zellschichten deutlich dargestellt werden. Die Darstellung der Zellgrenzen in den unteren Zellschichten ist mit der SKE jedoch nicht immer gelungen. In der Basalzellschicht (Abb. 8D) erscheinen die Zellen am Kleinsten und dichtgepackt mit groß erscheinenden Zellkernen, ähnlich der Histologie. In Abbildung 8E ist das lockere Bindegewebe der *Lamina propria mucosae* dargestellt. Deutlich sichtbar sind die geflechtartig angeordneten Bindegewebsfasern und angedeutet sichtbar sind „kernartige“ Strukturen, die vermutlich die Zellkerne der Fibroblasten darstellen. Muskelfasern können in einer Tiefe von 70 μm (Abb. 8F) dargestellt werden. Die Faserarchitektur ist deutlich zu erkennen.



KM Aufnahmen mit dem HRT II



KM Aufnahmen mit dem SKE



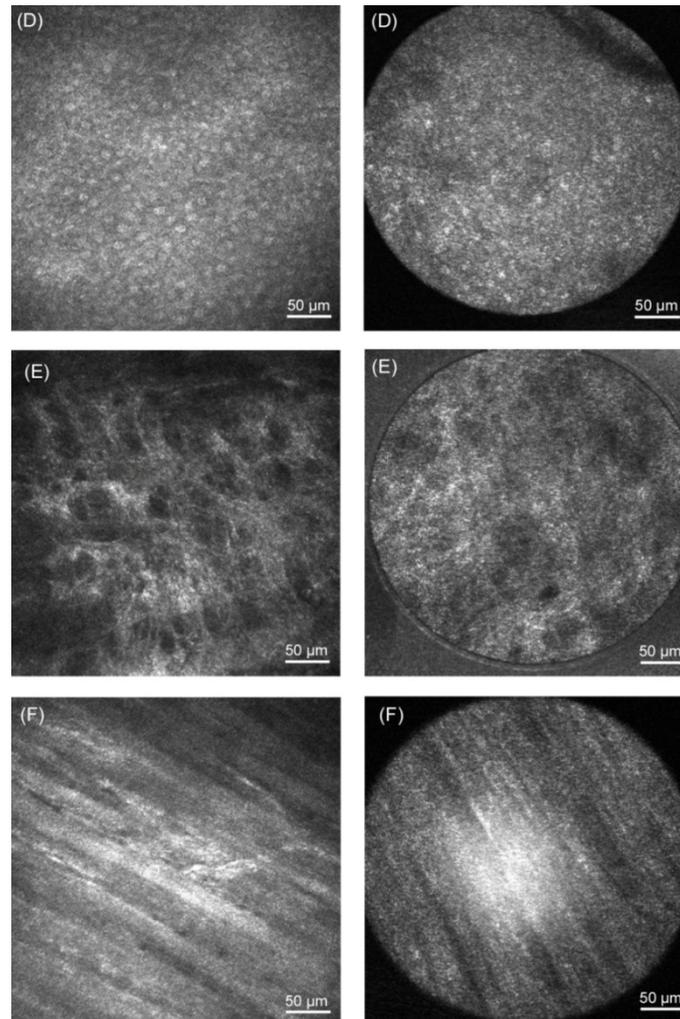


Abbildung 8: Morphologische Charakteristika der gesunden Schleimhaut.

Abgebildet sind konfokalmikroskopische Aufnahmen der Zungenunterseite, erstellt mit dem HRT II (linke Spalte) und dem SKE (rechte Spalte). (A) stellt den histologischen Querschnitt dar. Die korrespondierenden KM-Aufnahmen aus den markierten Tiefenlagen sind für beide Methoden in (B) bis (F) dargestellt. (B) *Stratum superfiziale*, (C) *Stratum intermedium*, (D) *Stratum basale*, (E) *Lamina propria* und (F) *Lamina muscularis mucosae*. Hervorzuheben ist, dass Zelldichte und Kerngröße mit zunehmender Eindringtiefe zunehmen und dass Zellstruktur und Zellschichtung insgesamt homogen erscheinen.

Alle zehn Mäuse der Gruppe A lieferten sowohl histologisch, als auch konfokalmikroskopisch normale Befunde. Der Vergleich der histologischen und konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Zungenunterseite der gesunden Schleimhaut zeigen eine sowohl für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen mit dem HRT II, als auch für die Aufnahmen mit dem SKE eine gute Bildqualität.

3.3 Darstellung der morphologischen Charakteristika von Epithelveränderungen mit der SKE

Zytologische Parameter. In den Anfangsstadien der Schleimhautveränderungen fiel auf, dass trotz homogener Struktur des Plattenepithels vermehrt vergrößerte Zellkerne mit Verschiebung der Kern-Plasma-Relation aufgetreten sind. Im Verlauf der Untersuchungen konnten die für die Diagnose der Epitheldysplasien charakteristischen zytologischen Veränderungen mit dem SKE vermehrt erfasst werden. Zu diesen Epithelveränderungen gehören die Präsenz von ausgeprägten Kernatypien wie Anisonukleosen (unterschiedlich große Kerne), Kernpleomorphien (unterschiedliche Kernformen) und vergrößerte Zellkerne mit konsekutiver Verschiebung der Kern-Plasma-Relation. Auch konnten in einigen Fällen Zellen mit mehreren Kernen beobachtet werden. Zelluläre Atypien wie Anisozytosen (unterschiedlich große Zellen) und zelluläre Pleomorphien (unterschiedliche Zellformen) konnten ebenfalls erfasst werden (vergl. Abb. 9). Diese genannten Veränderungen konnten sowohl basal als auch in den oberflächigen Zellschichten beobachtet werden und ermöglichten somit eine Beurteilung der Dysplasiegrade.

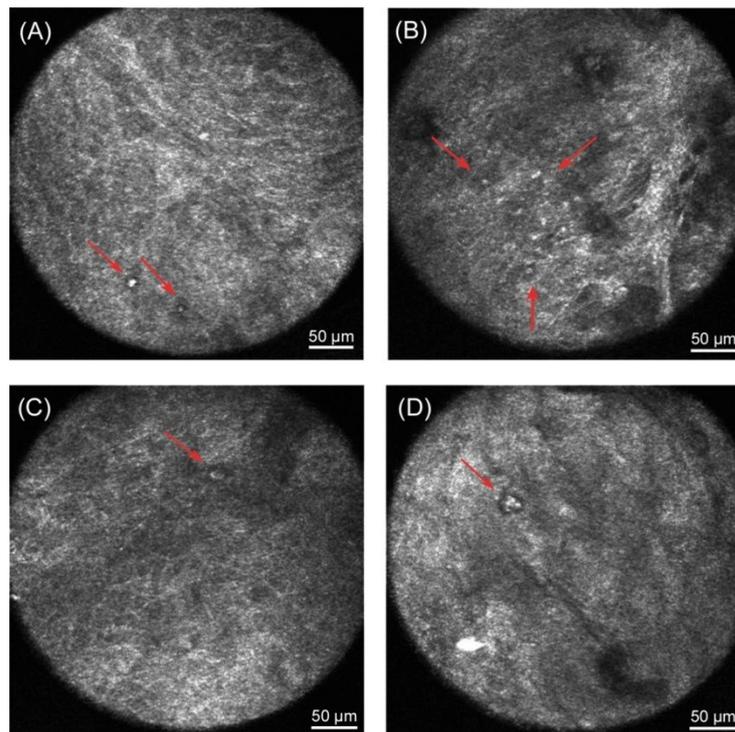


Abbildung 9: Darstellung der zytologischen Atypien mit dem SKE

Die Pfeile markieren unterschiedliche Zell- und Kernatypien in der dysplastisch veränderten Zungenschleimhaut der mit 4-NQO behandelten Mäuse. Vergrößerte, atypische Zellen in inhomogenem Zellverband (A), Anisonukleosen und nukleäre Pleomorphien (B), vergrößerte Zelle mit pathologischer KPR (C), multinukleäre Zelle (D).

Architekturelle Parameter. Beobachtungen bezüglich der Epithelschichtung reichten von „regelrechter“ über mehr oder weniger „angedeutet erhaltener“ sowie „aufgehobener“

Epithelschichtung bis hin zum vollständigen Schichtungsverlust in den mit 4-NQO behandelten Schleimhäuten. Auch Dyskeratosen, also eine frühzeitige Keratinisierung einzelner Zellen im Epithelverband, sowie der Verlust von interzellulären Kontakten konnten mit der SKE beobachtet werden. Strukturelle Veränderungen lassen sich in Einzelbildern nur schwierig darstellen, sie werden in den dynamischen Echt-Zeit Aufnahmen deutlich.

Keratinisierung. Bezüglich der Keratinisierung der oberen Zellschichten konnte ebenfalls eine Progredienz in Abhängigkeit von der Dauer der 4-NQO-Ingestion verzeichnet werden. Zunächst fielen vereinzelt Zellen ohne Zellkerne auf. Im weiteren Verlauf zeigten sich größere Verbände kernloser Zellen, in dessen Grenzen zum Teil auch regelrecht erscheinende, kernhaltige Zellen sichtbar waren. In den fortgeschrittenen Stadien der Hyperkeratinisierung konnten nur noch große und zum Teil tief in das Epithel reichende Keratosen beobachtet werden, die zunehmend auch die Bildgebung mit dem starren konfokalen Endoskop erschwerten, bzw. die Beurteilung der basalen Zellschichten verhinderten.

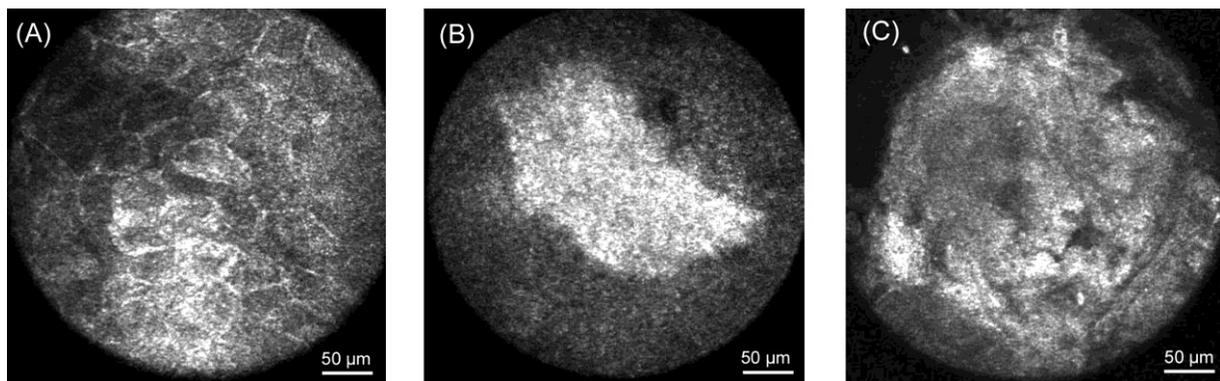


Abbildung 10: Darstellung von Verhornungsstörungen mit der SKE

Keratosen weisen in den konfokalmikroskopischen Aufnahmen eine stark reflektierende und somit „helle“ Morphologie auf. Verglichen mit „gesunden“ Zellen, zeigen die in (A) markierten Zellen eine deutlich stärkere Reflexion aus den zytoplasmatischen und nicht-kernhaltigen Regionen. Auch größere Verbände von keratinisierten Zellen, in dessen Grenzen kernhaltige Zellen zu sehen sind (B), können mit der SKE dargestellt werden. In fortgeschrittenen Stadien der Hyperkeratinisierung verhindern jedoch große und z.T. tief in das Epithel reichende Keratosen die Beurteilung des Epithels (C).

3.4 Eindringtiefe des Lasers

Die Eindringtiefe variierte im gesunden Gewebe der Zungenunterseite im Verlauf der gesamten Studie zwischen 104 und 240 µm. In keratinisierten Läsionen verringerte sich die Eindringtiefe und lag zwischen 80 und 140 µm. Stark verhornte Läsionen ließen eine Beurteilung des Epithels nicht zu. Eine begrenzte Eindringtiefe zeigte sich auch bei großen Tumoren und erschwerte somit die Beurteilung dieser. Im Gegenzug konnte man jedoch die Epithelschichten und zellulären Strukturen am Tumorrand gut einsehen und beurteilen.

Die manuelle Tiefenverstellung erfolgte am Verbindungsstück des Endoskops zum Scanner des HRT II. Dies erwies sich in einigen Fällen, v.a. bei großen und unebenen Läsionen, als unpraktisch, da die Drehung des Adapters eine Drehung des Endoskops um seine eigene Achse bewirkte. Dies führte dazu, dass eine exakte und gleich bleibende Position des Endoskops auf der zu untersuchenden Läsion nicht immer einzuhalten war.

3.5 Interraterreliabilität

Die zwei Untersuchungsleiter diagnostizierten die konfokalmikroskopischen Aufnahmen, wobei nur die Aufnahmen der Zungenunterseite und der Zungenseitenränder in die statistischen Berechnungen einbezogen wurden. Die Befundung der gespeicherten KM-Aufnahmen durch zwei Untersucher erfolgten getrennt, in einer zufälligen Reihenfolge und ohne Kenntnis des histopathologischen Befundes.

In 43 Fällen (74%) kam es zu übereinstimmenden Diagnosen. In 15 Fällen (26%) kam es zu abweichenden Diagnosen. Im Einzelnen siehe Tabelle 6. Um die Übereinstimmung unter Berücksichtigung der Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung zu bewerten, wurde die Cohens-Kappa-Statistik verwendet. Als Maß der Übereinstimmung berechnet sich der Kappa-Koeffizient nach folgender Formel:

$$K = (p_0 - p_e) / 1 - p_e$$

Dabei ist p_0 die Summe aller konkordanten Befunde dividiert durch die Anzahl der Untersuchten Befunde. p_e ist die Summe der zufälligen Übereinstimmungen. Die *Interraterreliabilität* für zwei Beobachter der konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurde ermittelt und ergab **Kappa = 0,59**.

Tabelle 6: Übereinstimmung für konfokalmikroskopische Befunde durch 2 Untersucher (n=58)

		Untersucher 2			n
		Keine Dysplasie	Dysplasie I/ II	Dysplasie III/ CIS	
Untersucher 1	Keine Dysplasie	11	2	1	14
	Dysplasie I/ II	4	22	3	29
	Dysplasie III/ CIS	2	3	10	15
n		17	27	14	58

In einem Konsensusverfahren mit einem erfahrenen Pathologen und den zwei Untersuchungsleitern erfolgte erneut eine Beurteilung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen. Wobei die Befunde kritisch diskutiert und klassifiziert wurden. Im Falle von nicht eindeutigen Befunden wurde die schwerwiegendere Läsion gewertet. Nach dem

Konsensusverfahren ergab die Verteilung der Schleimhautveränderungen, beurteilt mit der starren konfokalen Endoskopie, folgende Häufigkeiten:

1. Keine Dysplasie (n= 24)
2. Dysplasie I und II (n= 18)
3. Dysplasie III und *Carzinoma in situ* (n= 16)

3.6 Vergleich der konfokalmikroskopisch und histopathologisch ermittelten Befunde

Eine Übereinstimmung der konfokalmikroskopisch ermittelten Befunde mit den histopathologischen Befunden trat in 40 Fällen (68,9%) auf. In 18 Fällen konnte mit dieser Methode keine Übereinstimmung zur Histologie erreicht werden. Davon waren fünf Fälle als falsch positiv und 13 Fälle als falsch negativ zu bewerten.

Tabelle 7: Übereinstimmung der konfokalmikroskopischen und histopathologischen Befunde

		SKE			n
		Keine Dysplasie	Dysplasie I/ II	Dysplasie III/ CIS	
Histopathologie	Keine Dysplasie	12	0	1	13
	Dysplasie I/ II	9	17	4	30
	Dysplasie III/ CIS	3	1	11	15
n		24	18	16	58

3.7 Bestimmung von Sensitivität, Spezifität und prädiktiven Werten

Unter Betrachtung der Kriterien für Dysplasie und CIS wurde eine Sensitivität von 73%, eine Spezifität von 88%, ein positiver Vorhersagewert von 69% sowie ein negativer Vorhersagewert von 90% für die Unterscheidung zwischen *Low grade* und *High grade* SIN mit der starren konfokalen Endoskopie erreicht.

Tabelle 8: Diagnostische Güte der SKE für die Differenzierung von intraepithelialen *Low-grade* und *High-grade* Läsionen

	Anzahl	Prozent (%)
Sensitivität	11/15	73
Spezifität	38/43	88
Positiver Vorhersagewert	11/16	69
Negativer Vorhersagewert	38/42	90
Vorhersagegenauigkeit	49/58	84

3.8 SKE von induzierten Läsionen und Vergleich mit Histopathologie

In diesem Abschnitt werden repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen zu den Diagnosen leichte, moderate und schwere Dysplasie, Papillom sowie *Carzinoma in situ* aufgeführt und den korrespondierenden histopathologischen Befunden gegenübergestellt.

3.8.1 Dysplasie I, acht Wochen 4-NQO Ingestion

Klinisch erscheint die Läsion am linken Zungenrand mit Übergang auf den Zungenrücken als flächige Leukoplakie. Histopathologisch liegt eine Hyperkeratose mit leichter Dysplasie vor. Die korrespondierenden konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen in einer Tiefe von 20 µm kernlose Zellen mit deutlich abgrenzbaren Zellwänden (Abb. 11C). Im *Stratum intermedium* (Abb. 11D) stellt die zentrale, rundliche und stark reflektierende Struktur vermutlich einen Schnitt durch die sich in die Tiefe ziehende Keratose dar. In der Basalzellschicht (Abb. 11E) werden Anisonukleosomen und nukleäre Pleomorphien deutlich. Das subepitheliale Bindegewebe (Abb. 11F) erscheint frei von dysplastischen Zellen. Aufgrund der isolierten Präsenz von dysplastischen Zellen in der Basalzellschicht wurde diese Schleimhautveränderung konfokalmikroskopisch von beiden Untersuchern als leichte Dysplasie befundet.

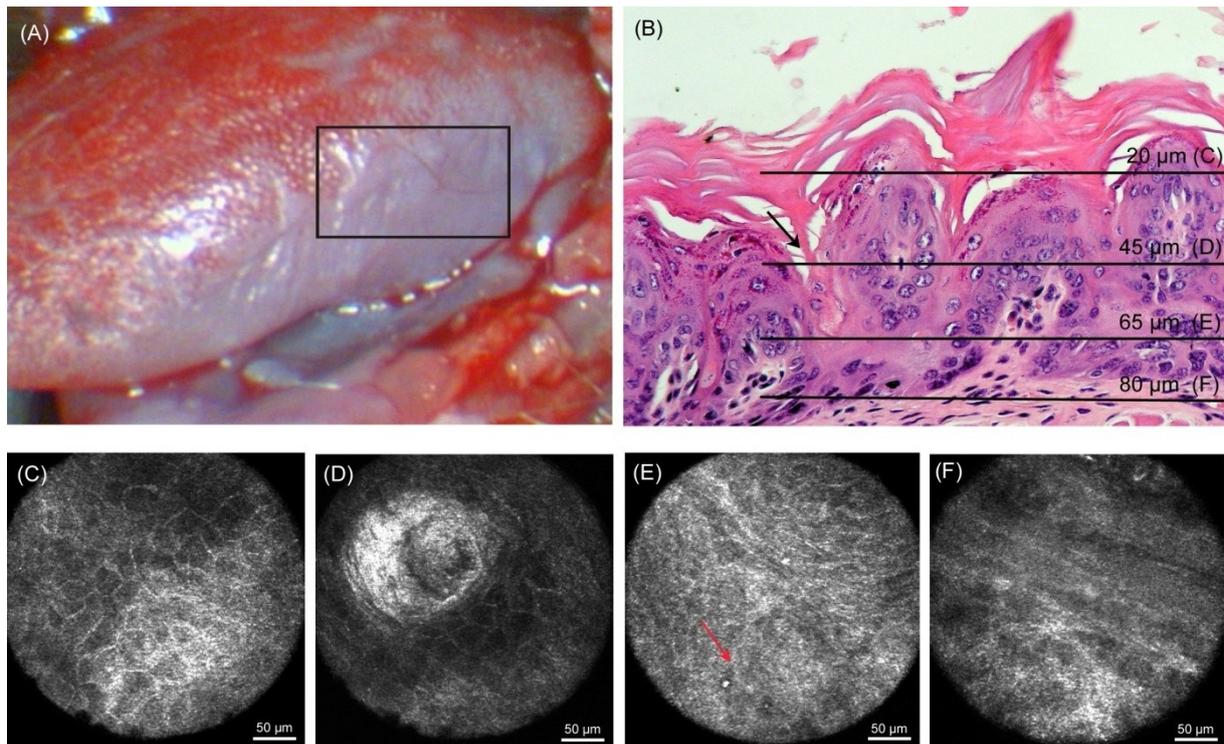


Abbildung 11: leichte Epitheldysplasie nach 8 Wochen 4-NQO Ingestion p.os

Das klinische Erscheinungsbild einer homogenen, flächigen Leukoplakie des Zungenseitenrandes (A) zeigt histologisch den Befund einer Hyperkeratose mit leichter Dysplasie (B). Die korrespondierenden SKE-Aufnahmen (C-F) zeigen kernlose Zellen mit deutlich abgrenzbaren Zellbegrenzungen (C) in der oberflächigen Schicht. Eine in das *Stratum intermedium* einziehende Keratose (D) ist in SKE-Aufnahmen als runde, stark reflektierende Struktur erkennbar. In der Basalzellschicht (E) sind atypische Zellen deutlich abgebildet (Pfeil). Die subepitheliale Schicht der *Lamina propria* (F) ist frei von atypischen Zellen. Aufgrund der isolierten Präsenz von atypischen Zellen in der Basalzellschicht wurde mit der SKE, von beiden Untersuchern, der Befund einer leichten Dysplasie erhoben.

3.8.2 Dysplasie II, 18 Wochen 4-NQO Ingestion

Klinisch erscheint die Schleimhautläsion der linken Zungenunterseite als ein 2 mm großer, exulzierter Tumor mit oberflächlichen Keratosen. Unter Verwendung des SKE erscheinen dysplastische Zellen schon im Bereich des *Stratum spinosum*. Ausgewählte konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigen isolierte dysplastische Zellen zwischen 30 (Abb. 12D) und 60 µm (Abb. 12E) Tiefe. Eine reguläre Epithelschichtung kann konfokalmikroskopisch nicht nachvollzogen werden, zudem sind Verschmelzungen von Zellen sichtbar und die Zellverbindungen scheinen aufgehoben zu sein. Die konfokalmikroskopische Aufnahme in Abb. 12C zeigt des Weiteren starke Keratinisierung in den oberflächigen Zelllagen. Die zunehmende Keratinisierung der epithelialen Schichten erschwert die Bildgebung mit dem SKE. Hier kann nicht eindeutig gesagt werden, ob die Aufhebung der Zellverbindungen tatsächlich vorliegt oder ob es sich um eine verschlechterte Auflösung aufgrund der hyperkeratotischen Regionen handelt. Die subepitheliale Schicht erscheint regelrecht und frei von veränderten Zellen. Konfokalmikroskopisch wurde diese

Läsion von beiden Beobachtern als moderate Dysplasie befundet. Histologisch handelt es sich bei dieser Läsion ebenfalls um eine moderate Dysplasie.

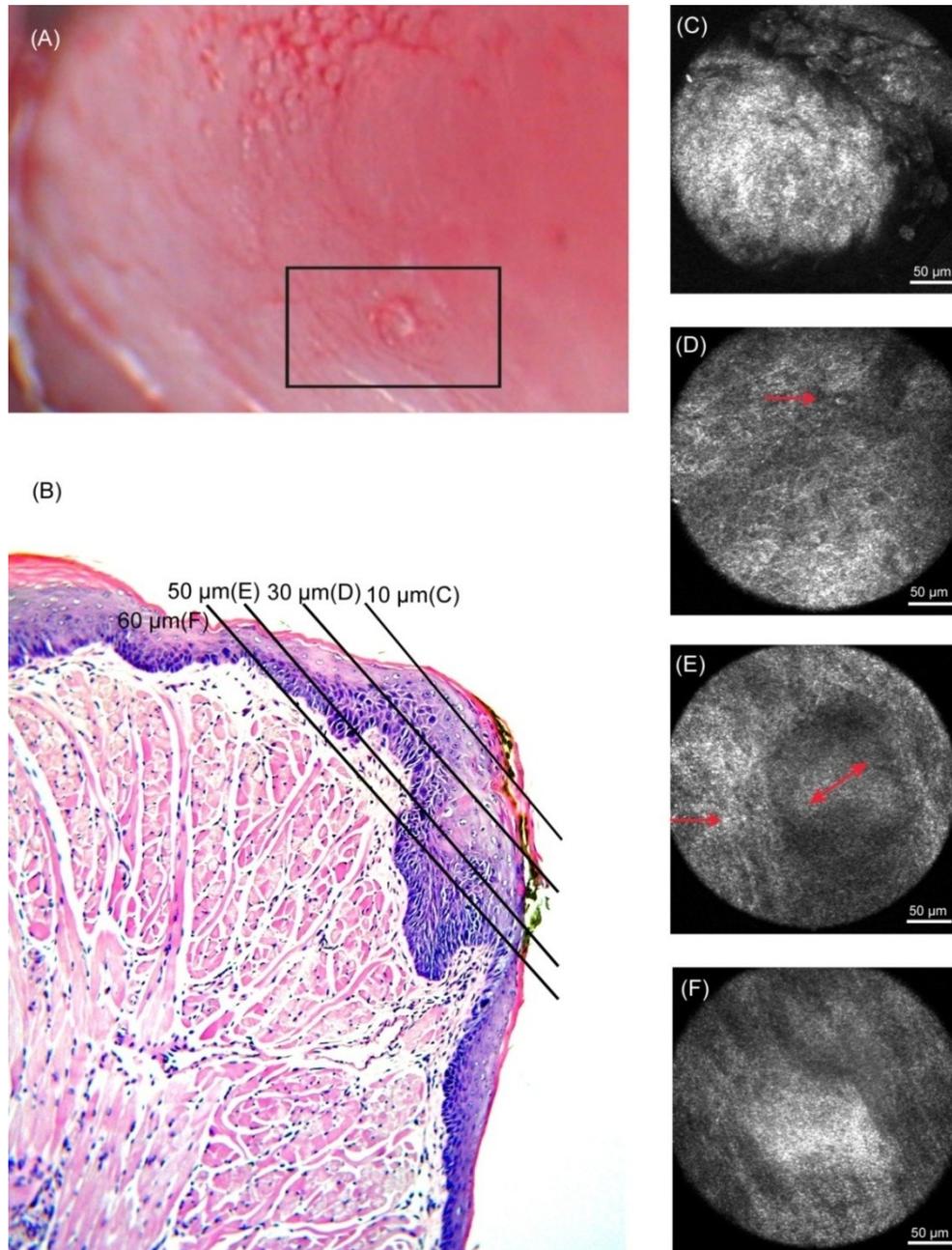


Abbildung 12: moderate Dysplasie nach 18 Wochen 4-NQO Ingestion p.os.

Nach 18 Wochen 4-NQO Applikation konnten vermehrt große erythro-leukoplakische Läsionen, wie in (A) dargestellt beobachtet werden. Korrespondierende SKE-Aufnahmen (C-F) decken sich gut mit dem histologischen Befund in (B). Das *Stratum superfiale* (C) ist charakterisiert durch stark reflektierende und unregelmäßige keratotische Strukturen. Bereits im *Stratum spinosum* (D) sind atypische Zellen zu vermerken (Pfeil). Eine in das Epithel hineinragende Bindegewebspapille korrespondiert in der SKE-Aufnahme in (E) mit der „dunkel“ erscheinenden zentralen Struktur (Doppelpfeil) mit deutlich abgrenzbaren und z.T. atypischen Zellen (Pfeil) in der Umgebung. Das subepitheliale Gewebe erscheint intakt (F).

3.8.3 Dysplasie III, 10 Wochen 4-NQO Ingestion

Klinisch imponierten am linken basalen Zungenrand, lateral der Blutgefäße, zwei Läsionen, wovon eine leukoplakisch und leicht erhaben erschien. Konfokalmikroskopisch fielen an korrespondierender Stelle die in Abbildung 13 gezeigten Befunde auf. In Abb. 13C sind multinukleäre Zellen mit großen Zellkernen in einer Tiefe von 20 µm sichtbar. Die Zellbegrenzungen erscheinen inhomogen. Im *Stratum intermedium* (Abb. 13D) fallen die irregulären Zellstrukturen deutlicher auf, des Weiteren sind vereinzelt vergrößerte Zellen und Nukleoli zu vermerken. Bei der zentralen, dunklen Struktur auf Höhe der Basalzellschicht (Abb. 13E) handelt es sich vermutlich um einen optischen Schnitt durch eine Bindegewebspapille. In der Umgebung dieser, sind unterschiedlich große atypische Zellen zu erkennen. Ebenfalls gut zu sehen, ist der vorliegende Strukturverlust des Zellverbandes. Das subepitheliale Bindegewebe (Abb. 13F) erscheint frei von dysplastischen bzw. atypischen Zellen. Rechts im Bild ist die Faserzeichnung der Muskulatur angedeutet. Konfokalmikroskopisch wurde diese Läsion als schwere Dysplasie befundet. Das histologische Korrelat wird in Abb. 13A dargestellt. Histologisch liegt eine moderate Dysplasie vor.

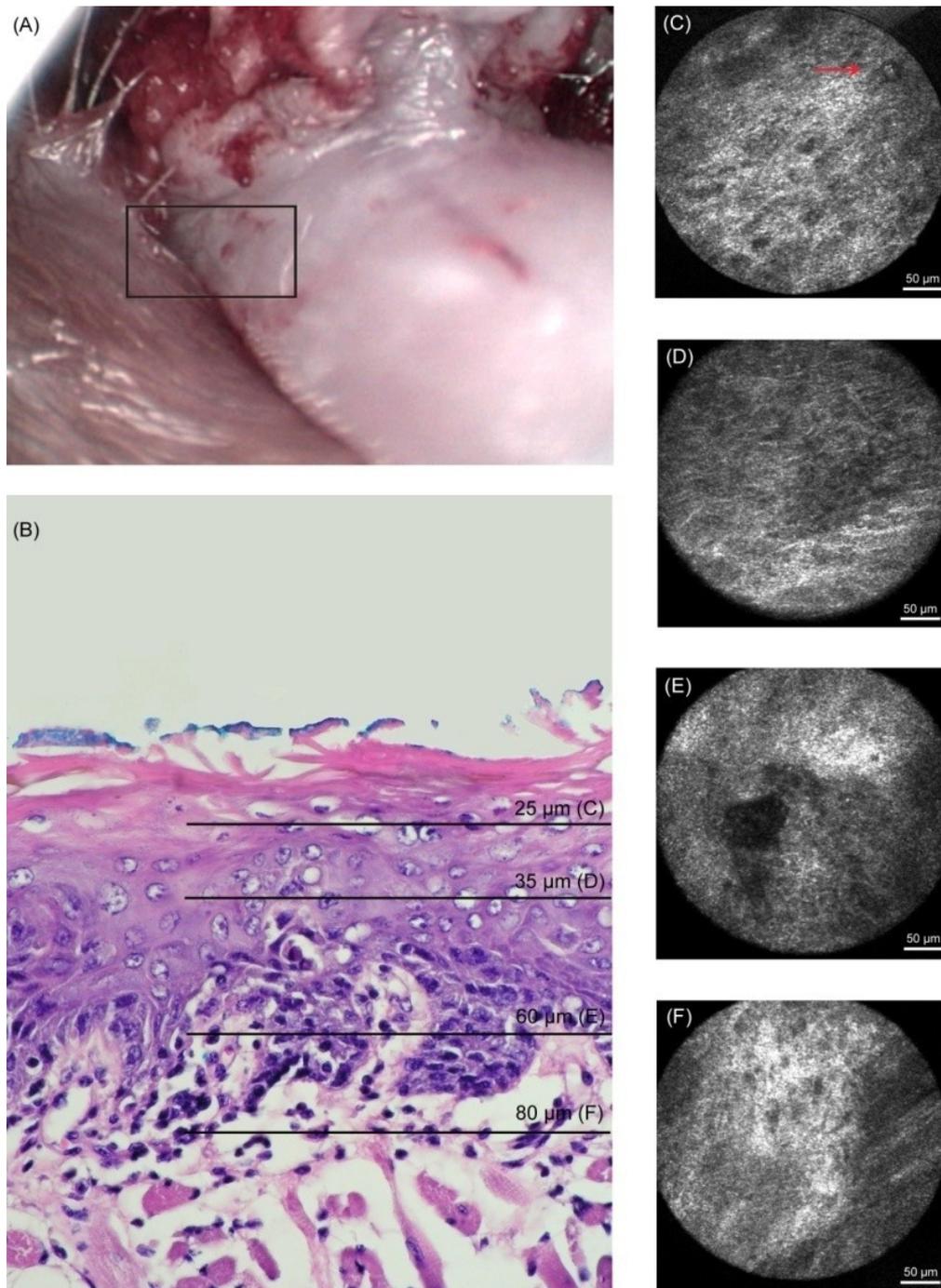


Abbildung 13: schwere Dysplasie nach 10 Wochen 4-NQO Ingestion p.os.

Die leicht erhabene leukoplakische Läsion (A) zeigt konfokalmikroskopisch bereits in einer Tiefe von 25 μm (C) eine multinukleäre Zelle (Pfeil). Im *Stratum intermedium* (D) erscheinen zudem die Zellbegrenzungen inhomogen. Die zentrale, kaum reflektierende Struktur (E) zeigt einen optischen Flachschnitt durch eine Bindegewebspapille, in dessen Umgebung sich unterschiedlich große und dichte atypische Zellen abbilden. Das subepitheliale Bindegewebe erscheint frei von atypischen Zellen, zudem ist rechts im Bild die Faserzeichnung der Muskulatur angedeutet. Auch hier besteht ein guter Vergleich zum histologischen Querschnitt (B).

3.8.4 Carzinoma *in situ*, 18 Wochen 4-NQO Ingestion

Der exophytisch wachsende Tumor des linken Zungenrandes (Abb. 14A) erscheint im histopathologischen Befund (Abb. 14B) als *Carzinoma in situ*. In den konfokalmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 14C+D) sind die weißen und dicht erscheinenden Regionen als keratotische Formationen anzusehen, die weit in die tieferen Epithelschichten reichen, wie es im histologischen Schnittpräparat ebenfalls zu erkennen ist. Um diese zentrale verhornte Formation sind jedoch deutlich dysplastische Zellen mit Zell- und Kernpolymorphien sowie verschobener Kern-Plasma-Relation zu Gunsten des Kernes bereits in einer Tiefe von 10 bis 40 μm zu sehen (Abb. 14D). Die weitere Evaluation des Gewebes im Bereich des Tumors ist nicht gelungen. Die maximale Penetrationstiefe lag hier bei 80 μm .

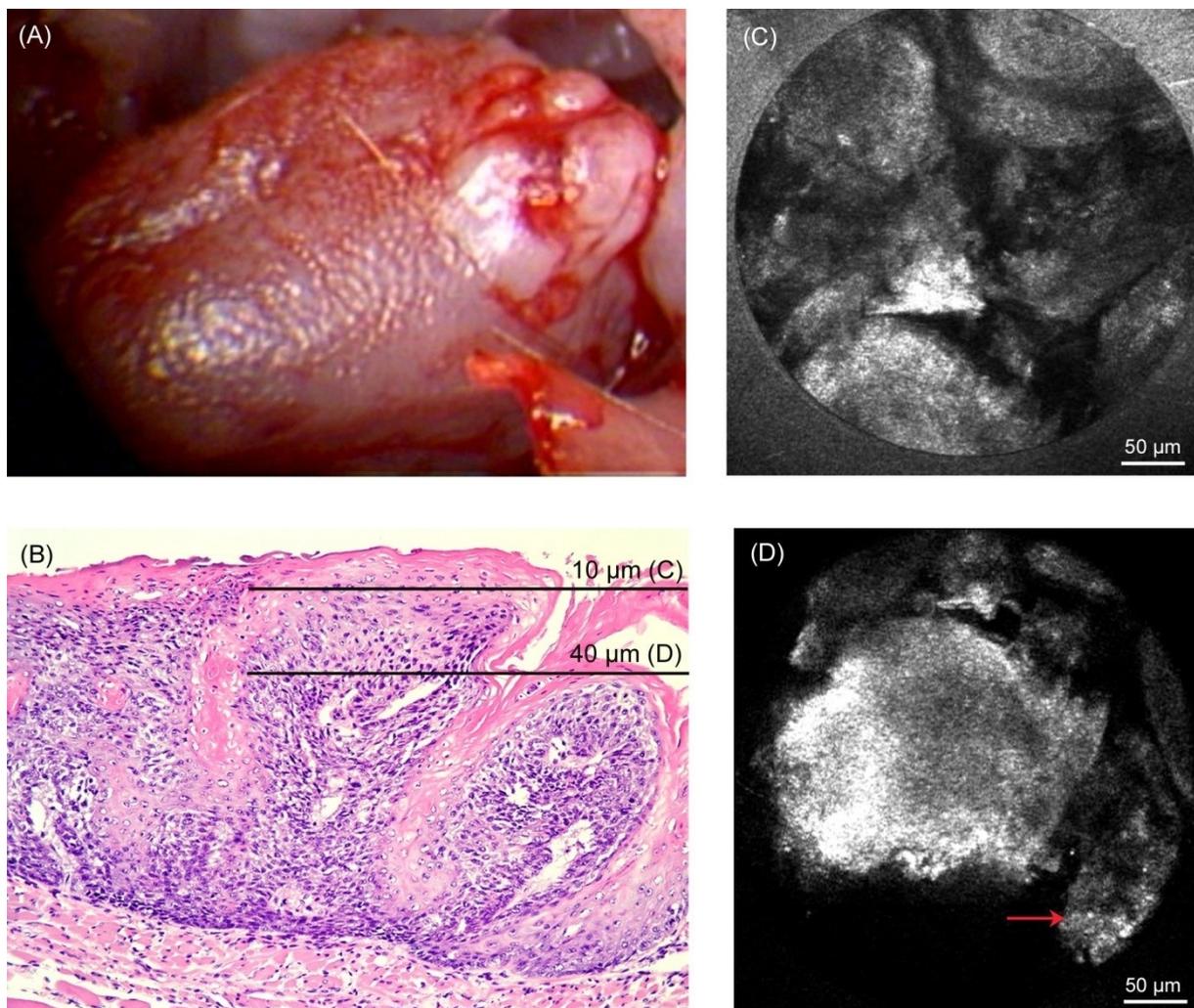


Abbildung 14: Carzinoma *in situ* nach 18 Wochen 4-NQO Ingestion p.os.

Der exophytisch gewachsene Tumor des linken Zungenrandes (A) erscheint histologisch eindeutig als CIS (B). Die konfokalmikroskopische Darstellung der intraepithelialen Strukturen, unmittelbar im exophytischen Tumor, gelingt nicht. Starke Keratosen verhindern die Bildgebung der tiefer liegenden Strukturen mit dem SKE (C+D). Dennoch sind in dieser Auflösung auch zytologische Atypien zu verzeichnen (Pfeil).

Abbildung 15 zeigt konfokalmikroskopische Aufnahmen im Randbereich des exophytisch wachsenden Tumors. In Abb. 15A sind am linken Rand die verhornten Spitzen der *Papillae filiformes* zu sehen. Der Pfeil markiert eine atypische, große Zelle mit großem Kern in der oberflächlichsten Schicht. Auch in tieferen Zellschichten sind atypische Zellen zu erkennen (Abb. 15B). Die Zellverbindungen erscheinen unregelmäßig, sind jedoch abzugrenzen. In der subepithelialen Schicht sind keine dysplastischen Zellen zu erkennen. Die Basalmembran ist in den konfokalmikroskopisch generierten Bildern nicht zu sehen. Die freie subepitheliale Schicht (Abb. 15C) lässt jedoch annehmen, dass kein invasives Karzinom vorliegt. Diese Läsion wurde von beiden Untersuchern als *Carzinoma in situ* befundet.

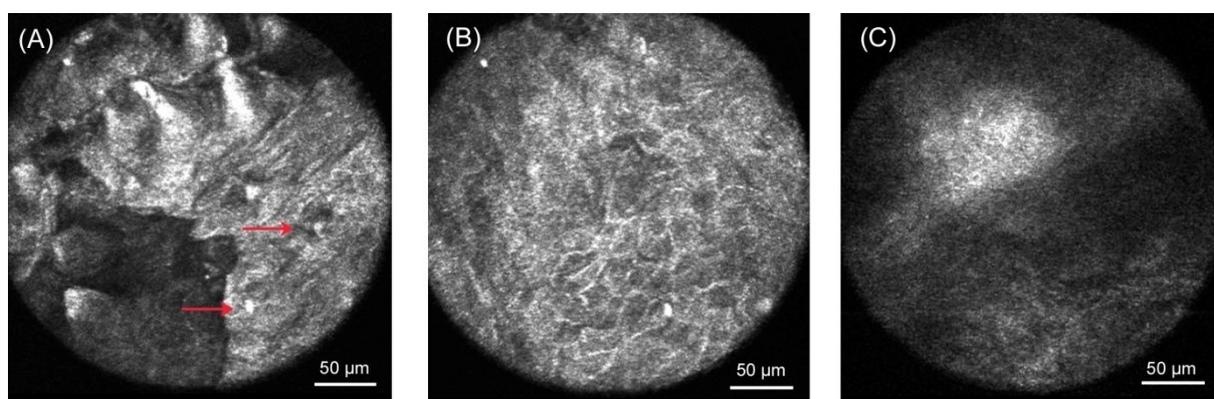


Abbildung 15: SKE-Aufnahmen im unmittelbaren Randbereich des in Abb. 14 gezeigten exophytischen Tumors

(A) *Stratum superfiziale*. Links oben sind die verhornten Spitzen der *papillae filiformes* als stark reflektierende Strukturen abgebildet. Pfeil markiert zelluläre Atypien mit begleitenden architekturellen Unruhen, die sich in tiefere Zellschichten fortsetzen. Die mittleren Zellschichten sind ebenfalls gekennzeichnet durch nukleäre und zelluläre Atypien sowie gestörter Epithelarchitektur (B). Die der *Lamina propria* korrespondierenden Schichten der SKE Aufnahmen jedoch, lassen ein intaktes Subepithelium annehmen (C), zumindest in diesem kleinen Bereich der Läsion.

Die in Abbildung 14 dargestellte Läsion wurde zusätzlich zur starren konfokalen Endoskopie auch mit dem HRT II untersucht. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen mit dem HRT II sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Aufnahmen A – C zeigen die Strukturen im Bereich der exophytischen Läsion. Wie auch in den mit dem SKE erstellten Aufnahmen verhindern die starken Keratosen die Visualisierung der epithelialen Strukturen, sodass die Zellen der basalen Zellschicht nicht dargestellt werden können. Die mit D – F bezeichneten Aufnahmen zeigen die epithelialen Strukturen im Randbereich des Tumors. Abb. 16D zeigt deutlich abgrenzbare Zellkerne unterschiedlicher Größen. Auch die Zellverbindungen erscheinen intakt. Abb. 16E zeigt einen optischen Schnitt durch die basale Zellschicht. Die Zellverbindungen sind hier nicht mehr vollständig abgegrenzt, des Weiteren sind atypische Zellen sichtbar. Vergleichend mit den SKE Aufnahmen sind die zellulären und subzellulären

Strukturen in den HRT II Aufnahmen subjektiv deutlicher abgegrenzt und die Penetrationstiefe im Bereich des Tumorrandes ist mit dem HRT II besser.

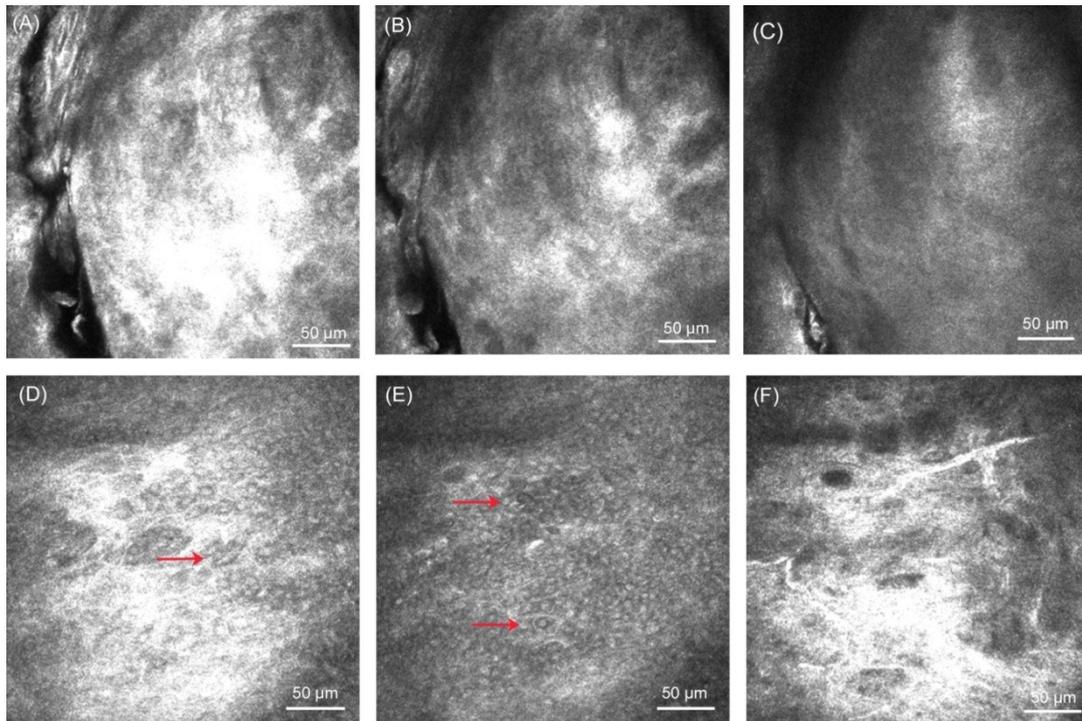


Abbildung 16: Untersuchung des in Abbildung 14 gezeigten exophytischen Tumors mit dem HRT II.

(A - C) zeigen konfokalmikroskopische Aufnahmen im Bereich des Tumors. Wie auch in den Aufnahmen mit dem SKE verhindern starke Keratosen die Beurteilung der intraepithelialen Strukturen. (D - F) sind HRT II Aufnahmen im unmittelbaren Randbereich des exophytischen Tumors. Subjektiv erscheinen die Strukturen klarer und stärker abgegrenzt als in den korrespondierenden SKE-Aufnahmen. Insbesondere, in den tiefen Zellschichten (E) und *Lamina propria* (F). Pfeile markieren zytologische Atypien.

3.8.5 Papillom, 12 Wochen 4-NQO Ingestion

Abbildung 17 zeigt im klinischen Befund die typische Erscheinungsform eines Papillomes auf der Zungenoberseite. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen verschiedene Papillen auf. Die Basalzellschicht konnte mit dem SKE nicht dargestellt werden. Die Eindringtiefe des Lasers und die damit verbundene Bildausleuchtung sind durch die erhabene keratotische Läsion behindert. Gut dargestellt sind jedoch die einzelnen papillomatösen Strukturen.

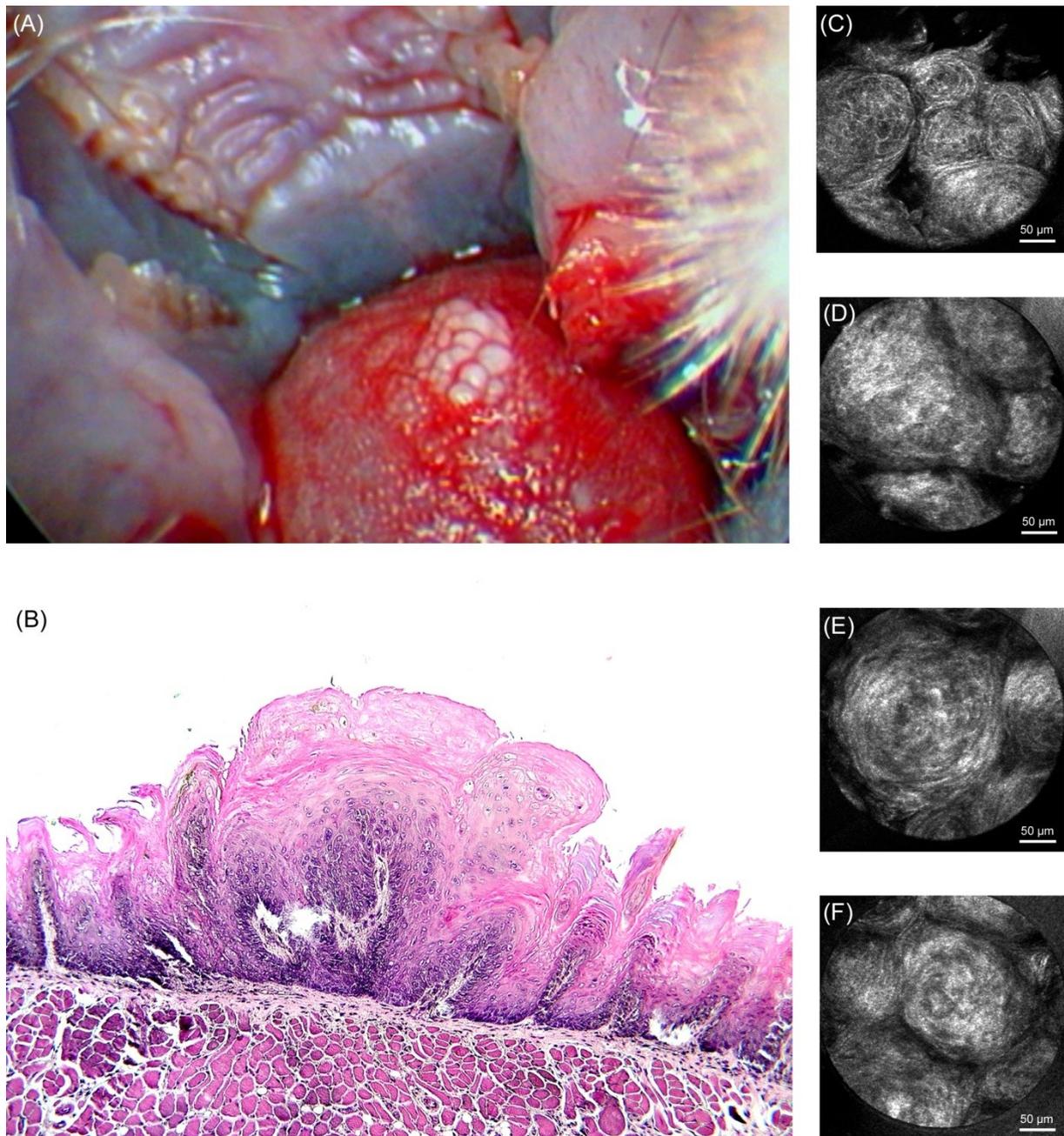


Abbildung 17: Papillom nach 12 Wochen 4-NQO Ingestion p.os.

Hier sieht man im klinischen Befund die typische Erscheinungsform eines Papillomes auf der Zungenoberseite (A). Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen (C – F) zeigen die einzelnen papillomatösen Strukturen auf, die auch im histologischen Schnittpräparat (B) zu erkennen sind. Die Basalzellschicht konnte mit dem SKE nicht dargestellt werden. Die Eindringtiefe des Lasers und die damit verbundene Bildausleuchtung sind durch die erhabene keratotische Läsion behindert.

4. Diskussion

Ziel der Arbeit war, die diagnostische Wertigkeit der starren konfokalen Endoskopie zur Unterscheidung von oralen *Low-* und *High-grade* Läsionen zu untersuchen und zu beurteilen. Die Verlängerung des Strahlenganges des HRT II, in Form eines starren konfokalen Endoskops, wurde entwickelt, um auch die schwer erreichbaren Regionen der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, insbesondere der Laryngologie, der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie hinsichtlich der *in vivo* Diagnostik früher Epithelveränderungen zugänglich zu machen (Just *et al.*, 2006).

4.1 Fähigkeiten und Limitationen der SKE

In dieser präklinischen, tierexperimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass die in der HNO neue Technologie der starren konfokalen Endoskopie in der Lage ist, mit einer Sensitivität von 73%, einer Spezifität von 88% und einer Vorhersagegenauigkeit von 84% zwischen *Low-* und *High-grade* Läsionen zu unterscheiden. Die *Interraterreliabilität* ergab nach der Cohens-Kappa-Statistik $\kappa=0.59$. Somit ist die Übereinstimmungsrate für zwei Untersucher als „moderat“ und damit als untersucherabhängig zu bewerten.

Die **potentielle Fähigkeit der SKE** für den Einsatz in der Beurteilung von frühen Schleimhautveränderungen basiert auf dem hohen **Auflösungsvermögen** dieses Systems. Der in dieser Arbeit verwendete Prototyp des starren konfokalen Endoskops ermöglicht mit der Fähigkeit der lateralen Auflösung von 1-2 μm , einer axialen Auflösung von 5 μm sowie durch die Nutzung eines stark vergrößernden Objektivs mit einer numerischen Apertur von 0,9 eine nicht-invasive Echt-Zeit Darstellung von oberflächennahen Schleimhäuten in zellulärer und subzellulärer Auflösung. Die starre konfokale Endoskopie vereint die hochauflösende Bildgebung mit der Fähigkeit der *in vivo* Visualisierung histologischer Malignitätskriterien in unverhornt mehrschichtigen Plattenepithelien. Diese neue Technologie ermöglicht die therapeutisch wichtige Unterscheidung der epithelialen *Low-grade* Läsionen von *High-grade* Läsionen. Die Methode ist nicht-invasiv und bedarf keiner zusätzlichen Färbungen des Gewebes.

Hyperkeratosen verhindern aufgrund sehr starker Reflexionen die Darstellung und somit die Beurteilung der darunterliegenden Zellschichten. Angenommen wird, dass eine erhöhte Keratinisierung, insbesondere in den oberen Zellschichten, die Fähigkeit der Beleuchtung der tieferen Schichten aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindices von Keratin ($n=1,58$) und Zytoplasma ($n=1,37$) limitiert oder gar unterbindet (Brunsting und Mullaney, 1974). Somit können tiefere Regionen mit einer für die Bildgebung notwendigen, hohen Beleuchtungsstärke nicht belichtet und letztlich nicht abgebildet werden. Damit stellen

Hyperkeratosen einen bedeutenden Faktor für die falsch negativen Befunde dar und können für die geringe Sensitivität der SKE verantwortlich gemacht werden.

Die **manuelle Tiefenverstellung** erfolgte am Verbindungsstück des Endoskops zum Scanner des HRT II. Dies erwies sich in einigen Fällen, v.a. bei großen und unebenen Läsionen, als unpraktisch, da die Drehung des Adapters eine Drehung des Endoskops um seine eigene Achse bewirkte. Dies führte dazu, dass eine exakte und gleich bleibende Position des Endoskops auf der zu untersuchenden Läsion nicht immer einzuhalten war. Die Bestimmung der Fokusebene erfolgte im Anschluss an die konfokalmikroskopischen Aufnahmen bzw. bei der Auswertung dieser. Bekannt war die Startebene und dass jede Verstellung am Adapter eine Verschiebung der konfokalen Ebene um 7 µm bewirkt. Anhand der Reihenfolge der aufgenommenen und gespeicherten Einzelbilder wurde dann die Tiefe ermittelt. Somit handelt es sich bei den Tiefenangaben um keine absoluten Werte, sondern vielmehr um relative Tiefenangaben der „optischen Schnittebene“. Die Entwicklung eines automatischen Tiefenscannmechanismus, wie es im HRT II RCM etabliert ist (Stave *et al.*, 2002), stellt daher einen wichtigen Schritt für die weitere Entwicklung dieses Gerätes dar.

Anwendung histomorphologischer Diagnosekriterien in der konfokalen Endoskopie.

Die morphologische Beurteilung von Geweben im Sinne der konventionellen Histopathologie wird in der internationalen Literatur unumstritten als Goldstandard in der Diagnosesicherung von Karzinomen und deren Vorläuferläsionen gesehen.

In der konfokalen Endoskopie wird die Intensität der reflektierten Strahlen in Graustufen wiedergegeben. Abhängig von den Reflexionseigenschaften der Gewebestrukturen (Zellmembrane, Zytoplasma, Zellkerne, Bindegewebe) entstehen digitale, zweidimensionale konfokalmikroskopische Aufnahmen mit einer der Histologie nahen Auflösungskapazität. Somit bieten einem an die Strukturen der konventionellen Weißlichtmikroskopie gewöhnten Betrachter, diese SKE Aufnahmen ein relativ vertrautes Bild. Ein Unterschied liegt darin, dass die mit dem SKE erstellten Aufnahmen parallel zur Oberfläche liegende, „optische Flachschnitte“ darstellen, während in der konventionellen Histopathologie i.d.R. Sagittalschnitte zur Beurteilung angefertigt werden. Ebenso entfallen in den *in vivo* generierten Aufnahmen durch die SKE Schrumpfungsprozesse, die während der histologischen Aufarbeitung der Gewebeböcke durch Dehydrierung und Fixierung auftreten (Rohen, 1994). Dennoch ist es möglich, histologische Kriterien zur Beurteilung gesunder sowie dysplastisch veränderter Schleimhaut auf konfokalmikroskopische Aufnahmen zu übertragen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass die Beurteilung epithelialer Strukturen und deren Veränderungen in gutem Maße gelingt. So können im gesunden, nicht veränderten Schleimhautepithel zytologische Parameter wie Zellgröße, Zellform, Kerngröße,

Kernform und die Kern-Plasma-Relation sowie architekturelle Parameter wie die Regelmäßigkeit der epithelialen Schichtung und die Polarität der basalen Zellreihen zufrieden stellend visualisiert werden. Mit Zunahme der Eindringtiefe der Fokusebene bis zu 40 µm fällt auf, dass Zellgröße, Zelldichte sowie Kerngröße im Vergleich zu den höheren Schichten variieren. Je tiefer die fokussierte Ebene, desto kleiner erscheinen die Zellen und umso größer die Zellkerne. In vorliegenden Studien zu konfokalmikroskopischen Untersuchungen wurde dies ebenfalls beschrieben (Clark *et al.*, 2003; Just *et al.*, 2006) und ist als Ausdruck der zunehmenden Differenzierung der unreifen Zellen von basal nach superfizial physiologisch (Lüllmann-Rauch, 2003) und dessen Verlust in der histopathologischen Diagnostik als Kriterium für Epitheldysplasien verwurzelt (Vergl. Tab. 1).

Gut darzustellen und zu erkennen waren Veränderungen der zytologischen und architekturellen Gewebeparameter wie atypische Zellen mit großen Zellkernen, bi- oder multinukleäre Zellen, Anisozytosen und Anisonukleosomen, sowie nukleäre und zelluläre Pleomorphien aber auch Schichtungsstörungen des Epithelverbandes sowie starke Dyskeratosen. Diese genannten Veränderungen konnten in den unterschiedlichsten Zellschichten beobachtet werden und ermöglichten abhängig von der Tiefenlage zur Oberfläche eine Beurteilung der Schweregrade der Epitheldysplasien.

Der Übergang der *Mukosa* zur *Lamina propria* konnte in der Mehrzahl der Fälle mit der SKE problemlos und sicher ermittelt werden. Die Basalmembran an sich, mit seiner typischen Zweischichtung (*Basallamina und Lamina fibroreticularis*) (Lüllmann-Rauch, 2003), konnte nicht dargestellt werden, auch nicht in der gesunden Schleimhaut. Somit scheitert die SKE bereits per Definitionem daran, schwere Dysplasien und CIS von mikroinvasiven Karzinomen zu differenzieren. Invasive Prozesse können zwar indirekt durch die Beurteilung der subepithelialen Schichten ermittelt werden, wenn jedoch Hyperkeratosen die Beurteilung der tiefer gelegenen Schichten verhindern, können invasive Prozesse nicht ausgeschlossen werden.

Inflammatorische Prozesse oder die Beurteilung einer verstärkten Vaskularisation in den Schleimhautläsionen, wie sie in anderen *in vivo* - Studien mit intravenöser Kontrastmittelapplikation und anschließender Bildgebung mit der konfokalen Mikroskopie beobachtet wurden (Goetz *et al.*, 2008), wurden in dieser Arbeit nicht untersucht und können somit nicht beurteilt werden. Inflammatorische Prozesse, verursacht durch 4-NQO, könnten jedoch als mögliche Quellen für die falsch positiven Befunde der konfokalmikroskopisch ermittelten Diagnosen in Betracht gezogen werden.

Kerneinschlusskörperchen sowie atypische Mitosefiguren, Hyperchromasien oder eine vermehrte zytoplasmatische Basophilie, wie sie in histologischen Untersuchungen in maligne entarteten Geweben vorzufinden sind (Gale *et al.*, 2005), können mit der konfokalen Laser-

Scanning-Mikroskopie aus technisch und methodischen Gründen nicht als diagnostische Kriterien herangezogen werden.

Subjektivität der Methode und erforderliche Lernkurve. Dysplasien stellen ein „Spektrum“ für intraepitheliale Veränderungen dar und es existieren keine Kriterien, die eine eindeutige Unterteilung in leichte, moderate und schwere Dysplasien erlauben (Gale *et al.*, 2005). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass selbst in der konventionellen Histopathologie die *Intrarater-* und *Interraterreliabilität* hinsichtlich der Präsenz von epithelialen Dysplasien variieren (Karabulut *et al.*, 1995; Abbey *et al.*, 1995; Fischer *et al.*, 2004). Hervorzuheben ist, dass die Diagnose der Schweregrade von Epitheldysplasien subjektiv ist. Die Genauigkeit der Interpretation ist also abhängig von der Schulung und Erfahrung des Untersuchers und unterliegt dementsprechend einer gewissen Lernkurve, ähnlich dem der konventionellen Histopathologie, Sonographie oder anderen Bildgebenden Verfahren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Interpretation der konfokal mikroskopisch generierten Bilder eine genaue Kenntnis über die zellulären morphologischen Charakteristika normaler und pathologisch veränderter Schleimhaut erfordert und dass die Zusammenarbeit mit erfahrenen Pathologen für die Befundung mit dieser neuen Methode unausweichlich ist (Wells *et al.*, 2007). In der internationalen Literatur werden diesbezüglich vermehrt telepathologische Ansätze oder aber die Entwicklung von speziellen Algorithmen für die Befundung konfokalmikroskopischer *in vivo* Aufnahmen diskutiert, wodurch die Einführung in den klinischen Gebrauch dieser Geräte (im Sinne von Point of Care Pathology) vereinfacht werden soll und gleichzeitig eine ausreichende Qualitätskontrolle erhalten bleibt (Weinstein *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Eine abschließende Beurteilung dieser Ansätze kann jedoch anhand der bisherigen Datenlage noch nicht erfolgen.

4.2 Adjuvante Ansätze zur Frühdiagnostik von Vorläuferläsionen oraler PEC

Die Notwendigkeit einer präzisen, objektiven und nicht-invasiven Methode, mit dessen Hilfe die Identifikation, Lokalisation und Diagnostik von Vorläuferläsionen zufrieden stellend gelingen soll, hat in den letzten 20 Jahren zur Entwicklung unterschiedlicher, adjuvanter Ansätze geführt. Alle neuen Errungenschaften haben das Ziel, die Erfassung früher Veränderungen des oralen Schleimhautepithels, die ein erhöhtes Risiko aufweisen maligne zu entarten, im klinischen Alltag möglichst nicht-invasiv zu objektivieren und zu erleichtern. Im Folgenden sollen einige der bisherigen Ansätze zur unterstützenden prä- und intraoperativen Diagnostik in der Früherkennung von oralen Schleimhautläsionen grob vorgestellt werden.

Tabelle 9 zeigt eine Synopsis der Studienlage der bisher entwickelten adjuvanten Methoden zur Lokalisation und Differenzierung oraler PEC und deren Vorläuferläsionen. Aufgeführt sind die diagnostischen Gütekriterien, die in den genannten Studien ermittelt werden konnten.

Tabelle 9: Übersicht der Studienlage über die Wertigkeit der diagnostischen Hilfsmittel zur Lokalisierung und Differenzierung von Plattenepithelkarzinomen und dessen Vorläuferläsionen im Kopf- und Halsbereich.

Methode	Studie	Studiendesign	Anzahl untersuchter Läsionen	Diagnostische Wertigkeit				
				Unterscheidung von:	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	PPV (%)	NPV (%)
Vitalfärbung	Rosenberg et al. 1989	Metaanalyse	KA	#	93,5 – 97,8	73,3 – 92,2	KA	KA
	Ram, Sjar et al. 2005	Prospektiv	46	#	70	25	86	11
	Epstein et al. 1997	Prospektiv	81	#	100	52	51	100
Photodynamische Diagnostik (5-ALA)	Leunig et al. 2000	Prospektiv	58	×	99	60	77	97
	Zheng et al. 2004	Prospektiv	118	#	98	92	KA	KA
Autofluoreszenzdiagnostik	Arens et al. 2004	Prospektiv	109	×	97	92	KA	KA
	Poh et al. 2006	Prospektiv	122	×	97	94	KA	KA
Bürstenzytologie + Computer assistierte Bildanalyse (OralCDx®)	Sciubba et al. 1999	Multizenterstudie	945	#	100	93	90	100
	Poate et al. 2004	Prospektiv	49	#	71,4	32	44,1	60
Bürstenzytologie + DNA Zytometrie	Remmerbach et al. 2009	Prospektiv	332	#	97,8	100	100	98,1
Starre konfokale Endoskopie	Farahati et al. 2009	Tierexperiment	58	¥	73	88	69	90

Unterscheidung von benignen Läsionen gegenüber Dysplasien und CIS. × Unterscheidung von gesunder Schleimhaut und leichten Dysplasien gegenüber moderaten und schweren Dysplasien, CIS und invasiven Karzinomen. ¥ Unterscheidung von *Low-grade SIN* gegenüber *High-grade SIN*.

Die **Fluoreszenzdiagnostik** beruht auf den physikalischen Effekt der Fluoreszenz, bei dem fluoreszierende Stoffe, sogenannte Fluorophore, mit Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt werden (Semwogerere, 2005). Durch die Absorption des ankommenden Lichtes (Photons) wird ein Elektron auf ein höheres Energieniveau gehoben. Hier verweilt das Elektron für einige Nanosekunden, bevor es wieder zurück fällt und dabei ein neues, längerwelligeres und energieärmeres Photon aussendet (Noomnarm und Clegg, 2009). In der Fluoreszenzdiagnostik wird nun das emittierte Licht genutzt, um Zellen oder Stoffwechselfvorgänge optisch darzustellen. Die Fluorophore können hierbei endogener oder exogener Natur sein. In der Tumordiagnostik werden die Unterschiede der fluorophoren Eigenschaften von normalem und neoplastischem Gewebe genutzt, um verändertes Gewebe optisch sichtbar zu machen (Poh *et al.*, 2006). Natürliche Fluorophore wie u.a. NADH und FAD, Kollagen und Elastin besitzen bei Anregung eine Eigenfluoreszenz und eignen sich deshalb zur nicht-invasiven Darstellung mit dieser Methode (Arens *et al.*, 2004).

Neoplastische Zellen haben im Vergleich zu normalen Zellen aufgrund der gesteigerten Zellteilungsrate einen gesteigerten Metabolismus (Gulledge und Dewhirst, 1996). Da viele Enzyme in den unterschiedlichen Stoffwechselprozessen beteiligt sind und NADH und FAD im Verlauf binden, ändert sich auch die Verteilung dieser Moleküle innerhalb der Zelle. Auch der Nachweis der Änderungen der relativen Konzentrationen von NADH und FAD kann als Anhaltspunkt für den gesteigerten Metabolismus in neoplastischen Zellen genutzt werden (Ramanujam *et al.*, 2001). In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass neoplastisch verändertes Gewebe im Vergleich zu normalem Gewebe eine geringere Autofluoreszenzintensität aufzeigt (Hung *et al.*, 1991; Poh *et al.*, 2006) und somit optisch dargestellt werden kann. Die Fluoreszenzdiagnostik ist für die Lokalisation von Schleimhautveränderungen und deren rein horizontale Flächenausdehnung gut geeignet (Arens, 2005) vermag jedoch nicht, einzelne Dysplasiegrade zu differenzieren, sowie intraepitheliale Läsionen von invasiven Prozessen zu unterscheiden (Arens *et al.*, 2004).

Die **photodynamische Diagnostik** basiert auf die gezielte Anregung von applizierten Photosensibilisatoren, die vermehrt in dysplastischen oder atypischen Zellen aufgenommen und in einer aktiven Form retiniert werden (Leunig *et al.*, 2001). 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) ist ein Stoffwechselprodukt der Hämbiosynthese und selbst nicht fluoreszierend. Durch die exogene Zufuhr von 5-ALA kommt es durch physiologische Feedback-Mechanismen zur intrazellulären Akkumulation von endogen gebildetem, fluoreszierendem *Protoporphyrin IX* in den Mitochondrien. Somit können Zellen mit gesteigerter Zellteilungsrate optisch dargestellt werden (Kennedy, 1990). Nachteil dieser Methode ist die benötigte Inkubationszeit von 1 bis 2,5 Stunden, um dysplastisch verändertes Gewebe durch Fluoreszenzmikroskopie darstellen zu können. Zheng *et al.* konnten durch die digitale Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten beeindruckende Werte für Sensitivität und Spezifität für die Unterscheidung von benignen Läsionen gegenüber Dysplasien und Karzinomen erreichen (Zheng *et al.*, 2004).

Färbemethoden, bei denen eine exogene Substanz auf die *Mukosa*oberfläche aufgesprüht wird, um nicht wahrnehmbare Schleimhautveränderungen für eine gezielte Biopsie und Histologie aufzudecken, werden als **Vitalfärbung** bezeichnet. **Toluidinblau** ist ein azidophiles, metachromatisches Färbemittel, das selektiv Zellkerne anfärbt. Als Grundprinzip wird eine vermehrte Bindung des DNA- affinen Farbstoffes in Gewebe mit gesteigertem Zellumsatz angenommen (Patton *et al.*, 2008). Da die Differenzierung ungefärbter Areale in entzündliche und maligne Schleimhaut nur selten gelingt, ist die Vitalfärbung in der Dysplasiediagnostik nur wenig spezifisch (Zhang *et al.*, 2005). So variieren die Angaben zwischen 38 und 98% für Sensitivität und 9 bis 93% für Spezifität (Patton *et al.*, 2008). Trotz der einfachen und kostengünstigen Methode, die v.a. keiner dritten Person für die

Interpretation des Befundes gebrauch, scheint die Anwendung in der Praxis gering zu sein (Kunkel *et al.*, 2010).

Eine weitere viel versprechende Methode stellt die **transepitheliale Bürstenbiopsie** dar. Zellen aus suspekten Läsionen werden mit Hilfe rigider „Cyto-brush-Borsten“ aus den mittleren und tiefen Zellschichten gewonnen und nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin oder Papanicolaou konventionell zytologisch ausgewertet (Sciubba *et al.*, 1999). Da eine alleinige zytomorphologische Betrachtung nicht alle malignen Läsionen identifizieren kann (Remmerbach *et al.*, 2001), wurden unterschiedliche unterstützende Maßnahmen entwickelt. Neben Computer-assistierten Verfahren zur Bildanalyse (OralCDx®) (Sciubba *et al.*, 1999) wird in anderen Studien die konventionelle Zytologie mit einer quantifizierbaren DNA-Gehaltsmessung kombiniert (Remmerbach *et al.*, 2001). Im Gegensatz zur konventionellen Biopsie geht die transepitheliale Bürstenbiopsie mit speziellen rigiden Bürsten mit einer für den Patienten geringeren Belastung einher. So ist die Untersuchung nicht schmerzhaft, mit geringerer Blutung assoziiert und erfordert keine Infiltrationsanästhesie oder Maßnahmen zum Wundverschluss (Zunt, 2001). Vorteile dieser Methode liegen darin, dass sie schnell und kostengünstig sind und durch die einfache Handhabung beliebig oft wiederholt werden können (Christian, 2002). Nachteile liegen darin, dass diese Methode sich „nur“ für die Identifikation bereits sichtbarer Läsionen eignet, die OralCDx lizenzgebunden ist und in Deutschland nur durch einen Anbieter zur Verfügung steht, sowie eine hohe Qualifikation des Untersuchers für die Auswertung der DNA-Zytometrie erfordert (Driemel *et al.*, 2007; Hullmann *et al.*, 2007).

Von all diesen neuen Entwicklungen konnte sich bis dato jedoch keines dieser Verfahren für den alltäglichen klinischen Einsatz bewähren. Die Gründe hierfür sind unterschiedlich und reichen von zu geringen Spezifitäten, über methodische Mängel in der Evaluation dieser Methoden in klinischen oder präklinischen Studien. Zudem spielen auch der zu hohe Zeit- und Kostenaufwand und der Bedarf an qualifiziertem Personal eine wichtige Rolle, sodass die klinische Akzeptanz sowie die wissenschaftliche Abklärung dieser Methoden zum heutigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt sind.

4.3 Stellenwert der "optischen Biopsie" in der Diagnostik von frühen intraepithelialen Schleimhautveränderungen

Moderne unterstützende Verfahren zur Früherkennung sollten nicht-invasiv sein und eine *in vivo* Diagnostik erlauben. Sie sollten möglichst objektive Befunde liefern und einen geringen Zeit – und Kostenaufwand aufweisen. Sie sollten unscheinbare Läsionen sichtbar machen können sowie zuverlässig benigne und maligne Läsionen unterscheiden, Differenzierung der Dysplasiegrade beurteilen und zwischen intraepithelialen Läsionen und invasiven Prozessen

unterscheiden können und schließlich auch eine Beurteilung zur Tumorausdehnung ermöglichen.

Unterschiedliche bildgebende Verfahren wurden in den letzten Jahrzehnten entwickelt und beschrieben, um im Sinne von hochauflösenden, bildgebenden *in vivo* Verfahren "optische Biopsien" zu ermöglichen.

Die klinischen Schwerpunkte liegen, wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, in der Beurteilung der Schleimhautveränderungen, der Entnahmeregion sowie dem optimalen Zeitpunkt der zu entnehmenden Gewebeprobe. Vor allem in klinisch nicht eindeutigen Schleimhautveränderungen sowie bei Vorliegen von multiplen Schleimhautläsionen soll die optische Biopsie ihren Einsatz finden. Komplikationen aus dem leitliniengerechten konservativen Vorgehen bei Mundschleimhautveränderungen, wie iatrogene Verzögerungen der Therapie, unnötige Morbidität durch die Biopsie harmloser Schleimhautläsionen sowie eine starke psychische Belastung der Patienten durch längere diagnostische Unsicherheit (Kunkel *et al.*, 2010) könnten durch die "optische Biopsie" minimiert werden. Der Einsatz der bildgebenden Verfahren dieser technologischen Kategorie in klinisch bereits malignomverdächtigen oder suspekten Läsionen wäre nicht sinnvoll, denn dann ist die Biopsie mit histopathologischer Untersuchung obligat (Johnson *et al.*, 2005). Perspektivisch kann die spezifische klinische Anwendung optischer Biopsieverfahren nach internationalem Literaturstand zusammenfassend in folgenden Punkten beschrieben werden:

- Einsatz zur *in vivo* Detektion von frühen, intraepithelialen Veränderungen
- Durchführung von optisch gestützten Biopsien
- Beurteilung von Tumorrandbereichen
- Monitoring von epithelialen Veränderungen nach Therapie
- Erfassung von Rezidiven

Nennenswerte Verfahren in diesem Zusammenhang sind die Kontaktendoskopie, die konfokale Endomikroskopie, die Optische-Kohärenz-Tomographie (OCT) sowie die Autofluoreszenzbasierte Endoskopie.

Die Kontaktendoskopie wurde als erste *in-vivo* Technologie in der Laryngologie 1995 eingeführt. Basierend auf einer Färbung des Oberflächenepithels mit Methylenblau wird eine konventionelle, starre Endoskopie im Kontaktverfahren durchgeführt (Andrea *et al.*, 1995). Es konnten zelluläre Strukturen unter 60-150 facher Vergrößerung dargestellt werden. Nachteil dieser Methode war jedoch, dass die zellulären Veränderungen nur in den oberflächigen Schichten darzustellen waren, die Basalzellschichten jedoch nicht.

Unter den bisher entwickelten adjuvanten bildgebenden *in vivo* Verfahren vermag die OCT als einzige die Grenzschicht zwischen Epithel und *Lamina propria* vollständig darzustellen. Das Prinzip beruht auf der Interferometrie, bei der, ähnlich der Ultraschalldiagnostik, Reflexionen an Grenzflächen mit unterschiedlichen Brechzahlen gemessen und dann als 3D Bild rekonstruiert werden (Huang *et al.*, 1991). Mit diesem hochauflösenden Verfahren können Querschnitte von Geweben in Echt-Zeit und annähernd histologischer Auflösung (5-10µm) generiert werden (Swanson *et al.*, 1993). Mit dieser Methode gelingt die Darstellung des Oberflächenepithels, der *Lamina propria* sowie der Basalmembran mit dem subepithelialen Bindegewebe und ermöglicht somit die morphologische Unterscheidung von benignen und dysplastischen Läsionen (Just *et al.*, 2010; Wilder-Smith *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2005). Der Ausprägungsgrad von Dysplasien wird hingegen in der OCT "nur" durch die Messung der Epitheldicke bestimmt. D.h., je dicker das Epithel, desto wahrscheinlicher ist eine dysplastische Veränderung im Vergleich zum normalen Epithel zu vermuten (Kraft *et al.*, 2008). Eine genaue Diagnose der Entität mit ausreichender Sicherheit kann jedoch nicht gemacht werden.

Ein weiteres umforschtes Verfahren für die Diagnose und Charakterisierung von Vorläuferläsionen stellt die Applikation von optisch aktiven und kontrastgebenden Substanzen dar (Sokolov *et al.*, 2003). Als ein idealer molekularer Marker hat sich das *epidermal growth factor receptor* (EGFR) erwiesen, welches in epithelialen Neoplasien stark überexprimiert wird. In einigen Studien wurde der Einsatz von optisch aktiven Substanzen, z.B. fluoreszierende Moleküle, gekoppelt an monoklonalen Antikörpern gegen EGFR getestet (Soukos *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass eine spezifische EGFR Markierung gelingt und somit z.B. kolorektale Karzinome mit der topischen Applikation dieser kontrastgebenden Substanzen mit der konfokalen Endoskopie dargestellt werden können (Goetz *et al.*, 2010).

4.4 Die SKE im Kontext der adjuvanten Ansätze zur Frühdiagnostik von Vorläuferläsionen oraler PEC

Die starre konfokale Endoskopie vereint die Bildgebung im zellulären und subzellulären Bereich mit der Fähigkeit der *in vivo* Visualisierung histologischer Malignitätskriterien in unverhornt mehrschichtigen Plattenepithelien. Die Methode ist nicht-invasiv und bedarf keiner zusätzlichen Färbungen des Gewebes. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde diese Methode von einigen Autoren auch als „virtuelle Biopsie“ (Amos und White, 2003) oder „*in vivo* Histologie“ (Kiesslich *et al.*, 2004) bezeichnet. Mit der SKE können *Low-grade* Läsionen von *High-grade* Läsionen unterschieden werden. Die Schweregrade der Epitheldysplasien sowie Unterscheidung von intraepithelialen und invasiven Läsionen können zudem auch

beurteilt werden. Die Methode ist jedoch nicht objektiv und eignet sich nicht für die Lokalisation von unscheinbaren Schleimhautveränderungen. D.h., die Anwendung ist zunächst auf bereits makroskopisch veränderte Schleimhautregionen beschränkt und daher nicht zum Screening geeignet.

Der Vergleich des Auflösungsvermögens der SKE gegenüber den in der Diagnostik etablierten und nicht-invasiv bildgebenden Verfahren verdeutlicht die potenzielle Stärke dieser Methode. So beträgt z.B. die Auflösung in der Sonografie 100-200 μm (Mansotti und Guzzardi, 1987), in der MRT und CT werden Auflösungen zwischen 0,5 und 1 mm erreicht (Markisz und Aquilia, 1996; Allemond, 198), die konventionelle Weißlichtendoskopie vermag Gewebsstrukturen mit einer Auflösung von nur 5 mm darzustellen (Boppart *et al.*, 1999). Eine neue und ebenfalls hochauflösende Technologie stellt die OCT dar und kann geräteabhängig Auflösungen zwischen 5 und 10 μm erreichen (Just *et al.*, 2010; Tearney *et al.*, 1997).

Das Problem der Hyperkeratinisierung als limitierenden Faktor für die Bildgebung intraepithelialer Strukturen wurde in unterschiedlichen Publikationen berichtet. So ist aus vorangegangenen konfokalmikroskopischen Untersuchungen bekannt, dass Hyperkeratinisierung sowie starke Epithelhyperplasien die Darstellung der basalen Zellschichten verhinderten (Clark *et al.*, 2003; Just *et al.*, 2006). Auch in Untersuchungen mit der OCT wurde beschrieben, dass oberflächige Keratosen oder Hyperkeratinisierungen die Eindringtiefe und damit verbunden, die Darstellung der basalen Zellschichten sowie der Basalmembran limitierten (Just *et al.*, 2010). Arens *et al.* beschreiben falsch negative Befunde in der Autofluoreszenzendoskopie des Larynx, bei der hochgradig dysplastische Zellen in den basalen Zellschichten durch Hyperkeratosen der oberflächigen Zellschichten verdeckt werden (Arens, 2005). Dieses Phänomen wird in der Fluoreszenzdiagnostik auch als „Umbrella-Effekt“ beschrieben (Dreyer *et al.*, 1995).

Verglichen mit Penetrationstiefen anderer LSM-Geräte im Gewebe erscheint die Bildgebung mit der SKE nicht minderwertiger zu sein. So z.B. konnten in Untersuchungen mit dem HRT II intraepitheliale Strukturen der gesunden Larynx- sowie der Wangenschleimhaut ebenfalls bis zu einer Tiefe von 250 μm dargestellt werden (Just *et al.*, 2008). Abgesehen von der konfokalmikroskopischen Darstellung der Lippenschleimhaut bis zu 490 μm (White *et al.*, 1999) haben andere Autoren die maximale Penetrationstiefe der verwendeten LSM-Geräte in Oberflächenepithelien ebenfalls mit 250 μm angegeben (White *et al.*, 1999; Goetz *et al.*, 2008).

Die bisherigen technischen Gegebenheiten der konfokalen Endoskopie erlauben die Abbildung der oberflächigen Epithelstrukturen in Geweben bis zu 250 μm . Um größere Penetrationstiefen zu erreichen, könnte man kleinere Objektive verwenden, die jedoch mit

Einbußen in der Auflösungsfähigkeit einhergehen würden (White *et al.*, 1999). Die Darstellung intraepithelialer Strukturen bis zu 250 µm korreliert jedoch gut mit der Epithelbreite der oralen und insbesondere der laryngealen Schleimhaut mit darunter liegender Lamina propria. Da die Entstehung von Dysplasien und die Karzinogenese in genau diesen epithelialen Strukturen i.d.R. ihren Ursprung haben (O'Shaughnessy *et al.*, 2002), erscheint diese hochauflösende Methode für die Beurteilung von frühen Epithelveränderungen interessant und vielversprechend zu sein.

Die potenziellen Fähigkeiten der starren konfokalen Endoskopie zur nicht-invasiven *in vivo* Diagnostik von frühen Schleimhautveränderungen könnten, nach Behebung einiger technischer Mängel, dem Kopf und Hals Chirurgen neben den Standarddiagnoseverfahren als zusätzliches endoskopisches und bildgebendes Verfahren zur verfeinerten Erkennung von dysplastischen oder kanzerösen Gewebe zur Verfügung stehen, um zukünftig exakte und *in vivo*-kontrollierte Gewebebiopsien entnehmen zu können. Prinzipiell stellt diese neue Technologie ein potenzielles Verfahren dar, um in allen medizinischen Bereichen, in denen die Endoskopie zum Einsatz kommt, nicht-invasiv und *in vivo* Epithelien oder Oberflächenstrukturen beurteilen sowie Biopsien mit einer erhöhten Genauigkeit entnehmen zu können. Für die Diagnostik und Therapie entscheidend wird zunächst jedoch der histopathologische Befund bleiben.

In diesem Zusammenhang zeigt die wissenschaftliche Entwicklung im Bereich der starren konfokalen Endoskopie eine deutliche Tendenz zur fortlaufenden Verbesserung und Erprobung von unterschiedlichen Einsatzmöglichkeiten in der diagnostischen Medizin. So wurden allein an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock einige Untersuchungen zur Beurteilung der Fähigkeiten der starren konfokalen Endoskopie evaluiert. Nohr-Westphal *et al.* untersuchten die Eignung der starren konfokalen Laser Scanning Endoskopie zur Beurteilung des Urothels in einer *ex vivo* Studie des Harnblasenkarzinoms an 35 Gewebeproben nach radikaler Zystektomie (Nohr-Westphal *et al.*, 2009). Holtfreter *et al.* nutzten die konfokale Endomikroskopie für die Visualisierung und Detektion von *Schistosoma mansoni* Eiern im Darm von infizierten Mäusen (Holtfreter *et al.*, 2011).

Tabelle 10: Übersicht über einige bis dato publizierte konfokale Endomikroskope mit detaillierten technischen Beschreibungen der Geräte, modifiziert nach Jabbour *et al.*, 2012.

Referenz	Charakteristik	numerische Apertur	laterale Auflösung (μm)	axiale Auflösung (μm)	Sichtfeld ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}$)
Lane et al. 2009	Flexibel, optischer Bildleiter mit 30.000 Glasfasern, 2 GRIN Linsen in einem 10 mm langen Stahlgehäuse (18 G), Gerät wird in 3.2 mm Arbeitskanal eines Bronchoskops eingeführt	0.5	1.4	16-26	230
Sung et al. 2002	Flexibel, optischer Bildleiter mit 30.000 Glasfasern, spezialgefertigtes Objektiv mit 8 Linsen, 7 mm Durchmesser, 22 mm Länge	1	2	10	180 x 170
Kim et al. 2010	Starres Endoskop, 3 GRIN Linsen und Seitenprismen, starres Gehäuse, 1.25 mm Durchmesser, 50 mm Länge	0.45	1	10	250 Dm.
Farahati et al. 2010	Starres Endoskop, 10 Stablinsen, Wasserimmersionsobjektiv, starres Gehäuse, 5 mm Durchmesser, 230 mm Länge	0.9	1-2	5	400 Dm.
Kumar et al. 2010	Flexibel, optischer Bildleiter mit Einzelglasfaser, 2 Achsen MEMS Scanner, Objektiv aus 2 paarigen und einer großen NA Linse, Linsen und Scannergehäuse: 18 mm Durchmesser, 54 mm Länge	0.48	0.5	4.2	200 x 125
Shin et al. 2007	Flexibel, optischer Bildleiter mit Einzelglasfaser, 2 Achsen MEMS Scanner, Objektiv aus 2 achromatischen und 1 aspherischen Linse, Linsengehäuse: 5 mm Durchmesser, 35 mm Länge	0.33	0.83	9.55	140 x 70
Piyawattanametha et al. 2009	Dual axis, 2 Achsen MEMS Scanner, 2 parabolische Spiegel, 1 hemisphärische Linse, Linsen und Scannergehäuse 10 mm Durchmesser	0.12	5	7	800 x 450
Pitris et al. 2003	optischer Bildleiter mit Einzelglasfaser, spektralkodiert mit dualtem Gitterprisma, große NA Linse, starres Gehäuse: 10 mm Durchmesser	0.9	1.1	KA	658 Dm.

GRIN gradient index lens; *MEMS* microelectromechanical systems; *Dm.* Durchmesser; *KA* keine Angaben

Die Entwicklung der konfokalen Endomikroskopie hat sich in dem letzten Jahrzehnt rasant entwickelt. Tabelle 10 zeigt modifiziert nach Jabbour *et al.* eine Zusammenstellung einiger bisher publizierter konfokaler Endomikroskope. Prinzipiell unterscheidet man die fluoreszenzbasierte konfokale Endomikroskopie von der reflexionsbasierten konfokalen Endomikroskopie. Neuere Varianten wie die *Dual axis confocal microscopy* vermögen beide Modi in einem System zu vereinen und erreichen größere Eindringtiefen im Gewebe (Liu *et al.*, 2008). Die Mehrzahl der entwickelten konfokalmikroskopischen Endoskope sind flexible Geräte. Unterschiedliche Linsensysteme und damit unterschiedliche bildgebende Eigenschaften, die Größe der Geräte sowie Auflösungsvermögen und Sichtfeldgrößen bestimmen den möglichen klinischen Gebrauch dieser Geräte.

Es liegen Arbeiten zum Einsatz der konfokalen Laser Scanning Endoskopie vor, in denen die *in vivo* Diagnostik von unterschiedlichen epithelialen Erkrankungen im Bereich des Gastrointestinaltraktes untersucht wurden (Goetz *et al.*, 2011). Diese erfolgten in den meisten Fällen in Form flexibler, fiberoptischer Geräte in klinischen Studien. Hierfür wurden für den Gastrointestinaltrakt geeignete, konventionelle Endoskope mit großem Durchmesser, in dem ein konfokales Endoskop mit einem Durchmesser von 5 mm eingebaut wurde, verwendet. Durch eine intravenöse Kontrastmittelgabe (*Fluoreszin-Natrium*) ist es gelungen,

intraepitheliale Veränderungen wie z.B. Barrett Ösophagus (Kiesslich *et al.*, 2006), Ösophagus- und Magenkarzinome (Goetz *et al.*, 2008) sowie Schleimhautveränderungen beim Kolorektalen Karzinom (Goetz *et al.*, 2011) zufrieden stellend darzustellen. Auch in der Laparoskopie gibt es Bestrebungen, die Fähigkeiten der starren konfokalen Endoskopie für die Visualisierung von zellulären Strukturen der Leber zu nutzen und Möglichkeiten für die differentialdiagnostische Beurteilung verschiedener Lebererkrankungen zu untersuchen (Goetz *et al.*, 2008). In der Gynäkologie wurde die konfokale Endomikroskopie für den Einsatz in der Detektion und Differenzierung von *cervicalen intraepithelialen Neoplasien* untersucht (Carlson *et al.*, 2005).

4.5 Methodenkritik

Um die Beurteilung der *Interraterreliabilität* aussagekräftiger zu machen, wäre es interessant, eine Befundung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen in Abhängigkeit von der Erfahrung der Untersucher durchzuführen. So wäre die Beurteilung durch mehrere Ärzte mit unterschiedlicher klinischer und/oder histopathologischer Erfahrung repräsentativer. Mit einer zusätzlichen Befundung derselben konfokalmikroskopischen Aufnahmen durch die selben Untersucher nach z.B. sechs Monaten, könnte die Bestimmung der *Intraraterreliabilität* erfolgen und bessere Aussagen zur Reproduzierbarkeit dieser Methode liefern.

4.6 Ausblick

Die Früherkennung und die exakte Diagnose von Schleimhautveränderungen im Bereich der Mundhöhle und insbesondere im Bereich des Larynx, stellen einen maßgeblichen Faktor für einen optimierten Therapieerfolg dar (O'Shaughnessy *et al.*, 2002). Neben der Prävention ist die Vermeidung von radikalen, entstellenden Operationen sowie die Vermeidung von Funktionsverlusten mit einhergehender gesellschaftlicher Isolation und Verlust an Lebensqualität von großer Bedeutung (Kunkel *et al.*, 2010).

Diese Technologie weist ein hohes Potenzial auf, Erfassungsraten, Prävention und Therapie von Karzinomen und seinen Vorläuferläsionen signifikant zu verbessern (Kiesslich *et al.*, 2004; Maitland *et al.*, 2008; Pogorzelski *et al.*, 2012). Die intraoperative Applikation dieser Methode erscheint sowohl klinisch als auch wissenschaftlich von großer Bedeutung und könnte nach Behebung einiger technischer Mängel dem Kopf- und Halschirurgen neben den Standarddiagnoseverfahren der Anamnese, Inspektion und Palpation als zusätzliches endoskopisches und bildgebendes Verfahren zur verfeinerten und nicht-invasiven Erkennung von dysplastischen oder kanzerösen Gewebe, vor allem bei klinisch nicht eindeutigen Schleimhautläsionen, zur Verfügung stehen.

Die Methode, die in dieser Arbeit aufgezeigt wurde, soll mit einigen Verfeinerungen und nach Behebung der technisch bedingten Mängel in klinischen Studien während der Mikrolaryngoskopie zur *in vivo* Beurteilung von Stimmlippenveränderungen evaluiert werden.

Die Verbesserung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie ist ein fortlaufender Prozess. Zukünftige Forschungsinhalte werden sich auf die Verbesserung der diagnostischen Güte durch Behebung einiger technischer Mängel, die sich in dieser Studie offenbart haben, konzentrieren. So sollen die Verbesserung der Bildqualität, die Fähigkeit einer manuellen Einstellung der Startebene des Scans sowie die Möglichkeit eines automatischen Tiefenscannmechanismus des Prototypen des starren konfokalen Endoskops in Anlauf genommen werden. Eine Miniaturisierung des Scanners für eine bessere Handhabung des Gerätes im klinischen Alltag wäre von Vorteil. Des Weiteren erscheint eine Objektivierung, z.B. im Sinne einer Computer-assistierten Quantifizierung von Merkmalen wie Kern-Plasma-Relation oder atypischer Zellen oder aber die Entwicklung geeigneter Scores oder Algorithmen zur Befunderhebung mit der SKE unausweichlich. Auch die Entwicklung einer Methode zur Markierung der mithilfe der SKE untersuchten Gewebsregion z.B. in Form von Laserspots o.ä., wäre von großem praktischem Nutzen.

In Anbetracht der bisherigen technologischen Entwicklungen scheint die Kombination von unterschiedlichen Methoden ebenfalls interessant zu sein. So könnten bei der Kombination der SKE mit der OCT sowohl die zellulären und subzellulären Strukturen hochauflösend dargestellt, als auch die Epithelarchitektur einschließlich der Integrität der Basalmembran zuverlässig beurteilt werden. Auch die Kombination der SKE mit „lokalisierenden“ diagnostischen Hilfsmitteln, wie der Einsatz von fluoreszierenden Molekülen als molekulare Marker könnte in Erwägung gezogen werden, bei der krankheitsspezifische molekulare Veränderungen sowie die morphologischen epithelialen Veränderungen optisch dargestellt werden könnten. Auch der Einbau des konfokalen Systems in Endoskope mit verschiedenen Winkeloptiken, um die schwer erreichbaren anatomischen Stellen in der Mundhöhle, dem Hypopharynx sowie dem sub- und supraglottischen Raum untersuchen zu können, wäre von praktischem Nutzen.

In dieser Hinsicht bietet diese Technologie ein großes Spektrum für weitere wissenschaftliche Forschungsinhalte.

5. Literaturverzeichnis

- Abbey, L.M., Kaugars, G.E., Gunsolley, J.C., Burns, J.C., Page, D.G., Svirsky, J.A., Eisenberg, E., Krutchkoff, D.J., and Cushing, M. (1995). Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 80(2), 188-191.
- Allemond, R. (198). Basic technical aspects and optimization problems in x-ray computed tomography. In: *Physics and Engineering of Medical Imaging*, ed. R. Guzzardi, Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 207-217.
- Allison, P., Franco, E., Black, M., and Feine, J. (1998). The role of professional diagnostic delays in the prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma. *Oral Oncol* 34(2),147-153.
- Altieri, A., Bosetti, C., Talamini, R., Gallus, S., Franceschi, S., Levi, F., Dal Maso, L., Negri, E., and La Vecchia, C. (2002). Cessation of smoking and drinking and the risk of laryngeal cancer. *Br J Cancer* 87, 1227-1229.
- Altmann, D. (ed.) (1991). *Practical statistics for medical research*: Oxford.
- Amos, W.B., and White, J.G. (2003). How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biol Cell* 95(6), 335-342.
- Andre, K., Schraub, S., Mercier, M., and Bontemps, P. (1995). Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 31B(5), 301-309.
- Andrea, M., Dias, O., and Santos, A. (1995). Contact endoscopy during microlaryngeal surgery: a new technique for endoscopic examination of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104(5), 333-339.
- Arens, C. (2005). *Die Bedeutung der Autofluoreszenz in der Frühdiagnostik des Larynxkarzinoms*. Habilitationsschrift., Gießen.
- Arens, C., Dreyer, T., Malzahn, K., and Glanz, H. (2004). Direct and indirect autofluorescence laryngoscopy in the diagnosis of laryngeal cancer and its precursor lesions. *Otolaryngol Pol* 58(1), 197-203.

- Axell, T., Pindborg, J.J., Smith, C.J., and van der Waal, I. (1996). Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco- related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J Oral Pathol Med* 25(2), 49-54.
- Balaram, P., Sridhar, H., Rajkumar, T., Vaccarella, S., Herrero, R., Nandakumar, A., Ravichandran, K., Ramdas, K., Sankaranarayanan, R., Gajalakshmi, V., Munoz, N., and Franceschi, S. (2002). Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paan-chewing and oral hygiene. *Int J Cancer* 98(3), 440-445.
- Barnes, L., Eveson, J., Reichard, M., and Sidransky, D. (2005). World Health Organisation - lassification of Tumors. In: Pathology & Genetics. Head and Neck Tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon: IARC Press, 177-179.
- Bedi, G.C., Westra, W.H., Gabrielson, E., Koch, W., and Sidransky, D. (1996). Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. *Cancer Res* 56(11), 2484-2487.
- Benson, A.M. (1993). Conversion of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) to 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide by a dicumarol-resistant hepatic 4NQO nitroreductase in rats and mice. *Biochem Pharmacol* 46(7), 1217-1221.
- Bisht, M., and Bist, S.S. (2011). Human papilloma virus: a new risk factor in a subset of head and neck cancers. *J Cancer Res Ther* 7, 251-255.
- Blot, W.J., McLaughlin, J.K., Winn, D.M., Austin, D.F., Greenberg, R.S., Preston-Martin, S., Bernstein, L., Schoenberg, J.B., Stemhagen, A., and Fraumeni, J.F., Jr. (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48(11), 3282-3287.
- Boppart, S.A., Deutsch, T.F. and Rattner, D.W. (1999). Optical imaging technology in minimally invasive surgery. Current status and future directions. *Surg Endosc* 13(7), 718-722.
- Brunsting, A., and Mullaney, P.F. (1974). Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophys J* 14(6), 439-453.
- Burk, R.O., and Rendon, R. (2001). Clinical detection of optic nerve damage: measuring changes in cup steepness with use of a new image alignment algorithm. *Surv Ophthalmol* 45 Suppl 3, S297-303; discussion S332-294.

- Carlson, K., Pavlova, I., Collier, T., Descour, M., Follen, M., and Richards-Kortum, R. (2005). Confocal microscopy: imaging cervical precancerous lesions. *Gynecol Oncol* 99, S84-88.
- Chen, J.K., Katz, R.V., and Krutchkoff, D.J. (1990). Intraoral squamous cell carcinoma. Epidemiologic patterns in Connecticut from 1935 to 1985. *Cancer* 66(6), 1288-1296.
- Christian, D.C. (2002). Computer-assisted analysis of oral brush biopsies at an oral cancer screening program. *J Am Dent Assoc* 133(3), 357-362.
- Clark, A.L., Gillenwater, A.M., Collier, T.G., Alizadeh-Naderi, R., El-Naggar, A.K., and Richards-Kortum, R.R. (2003). Confocal microscopy for real-time detection of oral cavity neoplasia. *Clin Cancer Res* 9(13), 4714-4721.
- Cohen, J. (1968). Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol Bull* 70(4), 213-220.
- Collier, T., Lacy, A., Richards-Kortum, R., Malpica, A., and Follen, M. (2002). Near real-time confocal microscopy of amelanotic tissue: detection of dysplasia in ex vivo cervical tissue. *Acad Radiol* 9(5), 504-512.
- Dreyer, T., Popella, C., Hinrichs, B., Bohle, R.M., Pohlmann, U., Schulz, A., and Glanz, H. (1995). Grading of precancerous laryngeal lesions by multiparameter image analysis at separate epithelial layers. *J Pathol* 177(4), 385-393.
- Driemel, O., Hertel, K., Reichert, T.E. and Kosmehl, H. (2006). Current classification of precursor lesions of oral squamous cell carcinoma principles of the WHO classification 2005. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 10(2), 89-93.
- Engelhardt, J. and Knebel, W. (1993). Konfokale Mikoskopie. *Physik in unserer Zeit* 29(3), 70-78.
- Epstein, J.B., Oakley, C., Millner, A., Emerton, S., van der Meij, E. and Le, N. (1997). The utility of toluidine blue application as a diagnostic aid in patients previously treated for upper oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 83(5), 537-47.
- Farahati, B., Stachs, O., Prall, F., Stave, J., Guthoff, R., Pau, H.W., and Just, T. (2010). Rigid confocal endoscopy for in vivo imaging of experimental oral squamous intra-epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 39(4), 318-327.

- Figuro Ruiz, E., Carretero Pelaez, M.A., Cerero Lapiedra, R., Esparza Gomez, G., and Moreno Lopez, L.A. (2004). Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer. *Med Oral* 9, 14-23.
- Fischer, D.J., Epstein, J.B., Morton, T.H., and Schwartz, S.M. (2004). Interobserver reliability in the histopathologic diagnosis of oral pre-malignant and malignant lesions. *J Oral Pathol Med* 33(2), 65-70.
- Forastiere, A., Koch, W., Trotti, A., and Sidransky, D. (2001). Head and neck cancer. *N Engl J Med* 345(26), 1890-1900.
- Forastiere, A., Weber, R., and Ang, K. (2008). Treatment of head and neck cancer. *N Engl J Med* 358(10), 1076; author reply 1077-1078.
- Frerich, B. (2010). Standardtherapie von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle gemäß Leitlinien. *Der MKG-Chirurg* 3, 16-24.
- Fujino, H., Chino, T., and Imai, T. (1965). Experimental production of labial and lingual carcinoma by local application of 4-nitroquinoline N-oxide. *J Natl Cancer Inst* 35(6), 907-918.
- Gale, N., Pilch, B.Z., Sidransky, D., Westra, W.H., and Califano, J. (2005). Epithelial precursor lesions. In World Health Organization. *Classification of Tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors*. IARC Press: Lyon.
- Gillenwater, A., Papadimitrakopoulou, V., and Richards-Kortum, R. (2006). Oral premalignancy: new methods of detection and treatment. *Curr Oncol Rep* 8(2), 146-154.
- Gillison, M.L., Koch, W.M., Capone, R.B., Spafford, M., Westra, W.H., Wu, L., Zahurak, M.L., Daniel, R.W., Viglione, M., Symer, D.E., Shah, K.V., and Sidransky, D. (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92(9), 709-720.
- Goetz, M., and Kiesslich, R. (2008). Confocal endomicroscopy: in vivo diagnosis of neoplastic lesions of the gastrointestinal tract. *Anticancer Res* 28(1B), 353-360.
- Goetz, M., Kiesslich, R., Dienes, H.P., Drebber, U., Murr, E., Hoffman, A., Kanzler, S., Galle, P.R., Delaney, P., and Neurath, M.F. (2008). In vivo confocal laser endomicroscopy of the human liver: a novel method for assessing liver microarchitecture in real time. *Endoscopy* 40(7), 554-562.

- Goetz, M., Watson, A., and Kiesslich, R. (2011). Confocal laser endomicroscopy in gastrointestinal diseases. *J Biophotonics* 4(7-8), 498-508.
- Goetz, M., Ziebart, A., Foersch, S., Vieth, M., Waldner, M.J., Delaney, P., Galle, P.R., Neurath, M.F., and Kiesslich, R. (2010). In vivo molecular imaging of colorectal cancer with confocal endomicroscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology* 138(2), 435-446.
- Gulledge, C.J., and Dewhirst, M.W. (1996). Tumor oxygenation: a matter of supply and demand. *Anticancer Res* 16(2), 741-749.
- Gupta, P.C., Murti, P.R., and Bhonsle, R.B. (1996). Epidemiology of cancer by tobacco products and the significance of TSNA. *Crit Rev Toxicol* 26(2), 183-198.
- Haxel, B.R., Goetz, M., Kiesslich, R., and Gosepath, J. (2009). Confocal endomicroscopy: a novel application for imaging of oral and oropharyngeal mucosa in human. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 267(3), 443-448.
- Hoffmann, M., Gorogh, T., Gottschlich, S., Lohrey, C., Rittgen, W., Ambrosch, P., Schwarz, E., and Kahn, T. (2005). Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8 year-survival-analysis of 73 patients. *Cancer Lett* 218, 199-206.
- Hoffmann, M., Hoffmann, A.S., and Tribius, S. (2012). Humane Papillomvirusinfektionen im Kopf-Hals-Bereich im öffentlichen Bewusstsein. *HNO* 60, 968-973.
- Holtfreter, M.C., Stachs, O., Reichard, M., Loebermann, M., Guthoff, R.F., and Reisinger, E.C. (2011). Confocal laser scanning microscopy for detection of *Schistosoma mansoni* eggs in the gut of mice. *PLoS One* 6(4), e18799.
- Howalder, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Aminou, R., Waldron, W., Altekruse, S., Kosary, C.L., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Cho, H., Mariotto, A., Eisner, M.P., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E., Cronin, K.A., and Edwards, B.K.e. (2011). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute, Bethesda, MD.
- Howaldt, H.P., Kainz, M., Euler, B., and Vorast, H. (1999). Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. *DOSAK. J Craniomaxillofac Surg* 27(5), 275-288.
- Hsu, E.R., Anslyn, E.V., Dharmawardhane, S., Alizadeh-Naderi, R., Aaron, J.S., Sokolov, K.V., El-Naggar, A.K., Gillenwater, A.M., and Richards-Kortum, R.R. (2004). A far-

- red fluorescent contrast agent to image epidermal growth factor receptor expression. *Photochem Photobiol* 79(3), 272-279.
- Huang, D., Swanson, E.A., Lin, C.P., Schuman, J.S., Stinson, W.G., Chang, W., Hee, M.R., Flotte, T., Gregory, K., Puliafito, C.A., and et al. (1991). Optical coherence tomography. *Science* 254(5035), 1178-1181.
- Hullmann, M., Reichert, T.E., Dahse, R., von Eggeling, F., Pistner, H., Kosmehl, H., and Driemel, O. (2007). [Oral cytology: historical development, current status, and perspectives]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 11(1), 1-9.
- Hung, J., Lam, S., LeRiche, J.C., and Palcic, B. (1991). Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue. *Lasers Surg Med* 11(2), 99-105.
- Jabbour, J.M., Saldua, M.A., Bixler, J.N., and Maitland, K.C. (2012). Confocal endomicroscopy: instrumentation and medical applications. *Ann Biomed Eng* 40(2), 378-397.
- Johnson, N., Franceschi, S., Ferlay, J., Ramadas, K., Schmid, S., Macdonald, D.G., Bouquot, J., and Slootweg, P.J. (2005). World Health Organization. Squamous cell carcinoma. IARC Press: Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Just, T., Lankenau, E., Prall, F., Huttmann, G., Pau, H.W., and Sommer, K. (2010). Optical coherence tomography allows for the reliable identification of laryngeal epithelial dysplasia and for precise biopsy: a clinicopathological study of 61 patients undergoing microlaryngoscopy. *Laryngoscope* 120(10), 1964-1970.
- Just, T., Pau, H.W., Bombor, I., Guthoff, R.F., Fietkau, R., and Hummel, T. (2005a). Confocal microscopy of the peripheral gustatory system: comparison between healthy subjects and patients suffering from taste disorders during radiochemotherapy. *Laryngoscope* 115(12), 2178-2182.
- Just, T., Stave, J., Boltze, C., Wree, A., Kramp, B., Guthoff, R.F., and Pau, H.W. (2006). Laser scanning microscopy of the human larynx mucosa: a preliminary, ex vivo study. *Laryngoscope* 116(7), 1136-1141.
- Just, T., Stave, J., Bombor, I., Kreutzer, H.J., Guthoff, R., and Pau, H.W. (2008). [In vivo diagnosis of epithelial changes of the oropharynx using confocal microscopy]. *Laryngorhinotologie* 87(3), 174-180.

- Just, T., Stave, J., Kreutzer, H.J., Guthoff, R., and Pau, H.W. (2007). Konfokalmikroskopische Untersuchungen des Kehlkopfepithels. *Laryngorhinootologie* 86, 644-648.
- Just, T., Stave, J., Pau, H.W., and Guthoff, R. (2005b). In-vivo observation of papillae of the human tongue using confocal laser scanning microscopy. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 67(4), 207-212.
- Just, T., Zeisner, C., Stave, J., and Pau, H.W. (2004). [Confocal laser-scanning microscopy to analyse the epithelium of the tongue]. *Laryngorhinootologie* 83(2), 108-112.
- Karabulut, A., Reibel, J., Therkildsen, M.H., Praetorius, F., Nielsen, H.W., and Dabelsteen, E. (1995). Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. *J Oral Pathol Med* 24(5), 198-200.
- Kennedy, J. (1990). Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: Basic principles and present clinical experience. *Journal of Photochemistry and Pathobiology* 6(1-2), 143-148.
- Kiesslich, R., Burg, J., Vieth, M., Gnaendiger, J., Enders, M., Delaney, P., Polglase, A., McLaren, W., Janell, D., Thomas, S., Nafe, B., Galle, P.R., and Neurath, M.F. (2004). Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology* 127(3), 706-713.
- Kiesslich, R., Gossner, L., Goetz, M., Dahlmann, A., Vieth, M., Stolte, M., Hoffman, A., Jung, M., Nafe, B., Galle, P.R., and Neurath, M.F. (2006). In vivo histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4(8), 979-987.
- Kim, P., Chung, E., Yamashita, H., Hung, K.E., Mizogushi, A., Kucherlapati, R., Fukumura, D., Jain, R.K. and Yun, S.H. (2010). In vivo wide-area cellular imaging by side-view endomicroscopy. *Nat Methods* 7, 303-305.
- Koivunen, P., Rantala, N., Hyrynkangas, K., Jokinen, K., and Alho, O.P. (2001). The impact of patient and professional diagnostic delays on survival in pharyngeal cancer. *Cancer* 92(11), 2885-2891.
- Kraft, M., Luerssen, K., Lubatschowski, H., Woenckhaus, J., Schoberlein, S., Glanz, H., and Arens, C. (2008). [Mucosal lesions in the larynx: predictive value of new imaging modalities for a histological diagnosis]. *HNO* 56(6), 609-613.

- Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012.
- Kumar, K., Avritscher, R., Wang, Y.M., Lane, N., Madoff, D.C., Yu, T.K., Uhr, J.W. and Zhang, X.J. (2010). Handheld histology-equivalent sectioning laser-scanning confocal optical microscope for interventional imaging. *Biomed. Microdevices* 12, 223-233.
- Kundt, G. and Krentz, H. (2006). Statistik, Epidemiologie und Medizinische Biometrie. Shaker Verlag, Aachen.
- Kunkel, M. and Hertrampf, K. (2010). Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). S2k-Leitlinie: Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde.
- Lane, P.M., Lam, S., McWilliams, A., Leriche, J.C., Anderson, M.W. and Macaulay, C.E. (2009). Confocal fluorescence microendoscopy of bronchial epithelium. *J Biomed Opt* 14(2), 24-8.
- Leunig, A., Betz, C.S., Mehlmann, M., Stepp, H., Arbogast, S., Grevers, G. and Baumgartner, R. (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., Mehlmann, M., Betz, C., Stepp, H., Arbogast, S., Grevers, G., and Baumgartner, R. (2001). Fluorescence staining of oral cancer using a topical application of 5-aminolevulinic acid: fluorescence microscopic studies. *J Photochem Photobiol B* 60(1), 44-49.
- Liu, J.T., Loewke, N.O., Mandella, M.J., Levenson, R.M., Crawford, J.M., and Contag, C.H. (2011). Point-of-care pathology with miniature microscopes. *Anal Cell Pathol (Amst)* 34(3), 81-98.
- Liu, J.T., Mandella, M.J., Crawford, J.M., Contag, C.H., Wang, T.D., and Kino, G.S. (2008). Efficient rejection of scattered light enables deep optical sectioning in turbid media with low-numerical-aperture optics in a dual-axis confocal architecture. *J Biomed Opt* 13, 034020.

- Lodi, G. and Porter, S. (2008). Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *J Oral Pathol Med* 37(2), 63-69.
- Lüllmann-Rauch, R. (2003). *Histologie Verstehen-Lernen-Nachschießen*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York, 282-297.
- Maitland, K.C., Gillenwater, A.M., Williams, M.D., El-Naggar, A.K., Descour, M.R., and Richards-Kortum, R.R. (2008). In vivo imaging of oral neoplasia using a miniaturized fiber optic confocal reflectance microscope. *Oral Oncol* 44(11), 1059-1066.
- Mansotti, L. and Guzzardi, R. (1987). Basic principles and advanced technical aspects of ultrasound imaging. In: *Physics and Engineering of Medical Imaging*, Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 263-317.
- Markisz, J. and Aquilia, M. (1996). *Technical Magnetic Resonance Imaging*. Appleton & Lange: Stanford.
- Martin-Hernan, F., Sanchez-Hernandez, J.G., Cano, J., Campo, J., and Del Romero, J. (2013). Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*.
- Mashberg, A. (1977). Erythroplasia vs. leukoplakia in the diagnosis of early asymptomatic oral squamous carcinoma. *N Engl J Med* 297(2), 109-110.
- Mashberg, A. and Meyers, H. (1976). Anatomical site and size of 222 early asymptomatic oral squamous cell carcinomas: a continuing prospective study of oral cancer. II. *Cancer* 37(5), 2149-2157.
- Mashberg, A. and Samit, A. (1995). Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *CA Cancer J Clin* 45, 328-351.
- Merletti, F., Boffetta, P., Ciccone, G., Mashberg, A., and Terracini, B. (1989). Role of tobacco and alcoholic beverages in the etiology of cancer of the oral cavity/oropharynx in Torino, Italy. *Cancer Res* 49(17), 4919-4924.
- Minsky, M. (1988). Memoir on inventing the confocal microscope. *Scanning* 10, 128-138.
- Nakahara, W., Fukuoka, F., and Sugimura, T. (1957). Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide. *Gan* 48(2), 129-137.

- Nauta, J.M., Roodenburg, J.L., Nikkels, P.G., Witjes, M.J., and Vermey, A. (1995). Comparison of epithelial dysplasia--the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 24(1), 53-58.
- Nauta, J.M., Roodenburg, J.L., Nikkels, P.G., Witjes, M.J., and Vermey, A. (1996). Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the Wistar rat palatal mucosa: 4NQO model. *Head Neck* 18(5), 441-449.
- Nohr-Westphal, C., Stachs, O., Kroger, M., Kram, W., Guthoff, R., and Hakenberg, O.W. (2009). [Confocal laser scanning microscopy of the urothelium]. *Urologe A* 48(9), 1025-1026, 1028, 1030-1031.
- Noomnarm, U. and Clegg, R.M. (2009). Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations. *Photosynth Res* 101(2-3), 181-194.
- Nunoshiba, T., and Demple, B. (1993). Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Res* 53(14), 3250-3252.
- O'Shaughnessy, J.A., Kelloff, G.J., Gordon, G.B., Dannenberg, A.J., Hong, W.K., Fabian, C.J., Sigman, C.C., Bertagnolli, M.M., Stratton, S.P., Lam, S., Nelson, W.G., Meyskens, F.L., Alberts, D.S., Follen, M., Rustgi, A.K., Papadimitrakopoulou, V., Scardino, P.T., Gazdar, A.F., Wattenberg, L.W., Sporn, M.B., Sakr, W.A., Lippman, S.M., and Von Hoff, D.D. (2002). Treatment and prevention of intraepithelial neoplasia: an important target for accelerated new agent development. *Clin Cancer Res* 8(2), 314-346.
- Patton, L.L., Epstein, J.B., and Kerr, A.R. (2008). Adjunctive techniques for oral cancer examination and lesion diagnosis: a systematic review of the literature. *J Am Dent Assoc* 139(7), 896-905.
- Pitiphat, W., Diehl, S.R., Laskaris, G., Cartsos, V., Douglass, C.W., and Zavras, A.I. (2002). Factors associated with delay in the diagnosis of oral cancer. *J Dent Res* 81, 192-197.
- Pitris, C., Bouma, B.E., Shiskov, M. and Tearney, G.J. (2003). A GRISM-based probe for spectrally encoded confocal microscopy. *Opt. Express* 11, 120-124.
- Piyawattanametha, W., Ra, H., Mandella, M.J., Loewke, K., Wang, T.D., Kino, G.S., Solgaard, O. and Contag, C.H. (2009). 3-D near-infrared fluorescence imaging using an MEMS-based miniature dual-axis confocal microscope. *IEEE J. Sel.Top Quant.* 15, 1344-1350.

- Poate, T.W., Buchanan, J.A., Hodgson, T.A., Speight, P.M., Barret, A.W., Moles, D.R., Scully, C. and Porter, S.R. (2004). An audit of the efficacy of the oral brush biopsy technique in a specialist Oral Medicine unit. *Oral Oncol* 40(8), 829-34.
- Pogorzelski, B., Hanenkamp, U., Goetz, M., Kiesslich, R., and Gosepath, J. (2012). Systematic intraoperative application of confocal endomicroscopy for early detection and resection of squamous cell carcinoma of the head and neck: a preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 138(4), 404-411.
- Poh, C.F., Zhang, L., Anderson, D.W., Durham, J.S., Williams, P.M., Priddy, R.W., Berean, K.W., Ng, S., Tseng, O.L., MacAulay, C., and Rosin, M.P. (2006). Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients. *Clin Cancer Res* 12(22), 6716-6722.
- Rajadhyaksha, M., Grossman, M., Esterowitz, D., Webb, R.H., and Anderson, R.R. (1995). In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J Invest Dermatol* 104(6), 946-952.
- Ram, S. and Siar, C.H. (2005). Chemiluminescence as a diagnostic aid in the detection of oral cancer and potentially malignant epithelial lesions. *Int J Oral Maxillofac Surg* 34(5), 521-7.
- Ramanujam, N., Chen, J., Gossage, K., Richards-Kortum, R., and Chance, B. (2001). Fast and noninvasive fluorescence imaging of biological tissues in vivo using a flying-spot scanner. *IEEE Trans Biomed Eng* 48(9), 1034-1041.
- Reibel, J. (2003). Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 14(1), 47-62.
- Reichart, P.A., and Philipsen, H.P. (2005). Oral erythroplakia--a review. *Oral Oncol* 41(6), 551-561.
- Remmerbach, T.W., Weidenbach, H., Pomjanski, N., Knops, K., Mathes, S., Hemprich, A., and Bocking, A. (2001). Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol* 22(4), 211-221.
- Remmerbach, T.W., Meyer-Ebrecht, D., Aach, T., Wurflinger, T., Bell, A.A., Schneider, T.E., Nietzke, N., Frerich, B. and Bocking, A. (2009). Toward a multimodal cell analysis of brush biopsies for the early detection of oral cancer. *Cancer* 117(3), 228-35.

- Rohen, J. (1994). Der Werdegang des histologischen Präparates und die Artefakte. In: Histologische Differentialdiagnose: Anleitung zur Diagnose histologischer Präparate, vol. 5, Stuttgart: Schattauer Verlag, 3-5.
- Rosenberg, D. and Cretin, S. (1989). Use of meta-analysis to evaluate tolonium chloride in oral cancer screening. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 67(5), 621-7.
- Sciubba, J.J. (1999). Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. *J Am Dent Assoc* 130(10), 1445-1457.
- Semwogerere, D. (2005). Confocal Microscopy. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering.* Taylor & Francis.
- Shin, H.J., Pierce, M.C., Lee, D., Ra, H., Solgaard, O. and Richards-Kortum, R. (2007). Fiber-optic confocal microscope using a MEMS scanner and miniature objective lens. *Opt. Express* 15, 9113-9122.
- Silverman, S., Jr., Gorsky, M., and Lozada, F. (1984). Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 53(3), 563-568.
- Silverman, S.Jr. and Griffith, M. (1972). Smoking characteristics of patients with oral carcinoma and the risk for second oral primary carcinoma. *J Am Dent Assoc* 85(3), 637-640.
- Slaughter, D.P., Southwick, H.W., and Smejkal, W. (1953). Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6(5), 963-968.
- Sokolov, K., Aaron, J., Hsu, B., Nida, D., Gillenwater, A., Follen, M., MacAulay, C., Adler-Storthz, K., Korgel, B., Descour, M., Pasqualini, R., Arap, W., Lam, W., and Richards-Kortum, R. (2003). Optical systems for in vivo molecular imaging of cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2(6), 491-504.
- Soukos, N.S., Hamblin, M.R., Keel, S., Fabian, R.L., Deutsch, T.F., and Hasan, T. (2001). Epidermal growth factor receptor-targeted immunophotodiagnosis and photoimmunotherapy of oral precancer in vivo. *Cancer Res* 61(11), 4490-4496.
- Stave, J. (2005). Anordnung zur konfokalen Laser Scanning Endoskopie: in-vivo Abbildung von oberflächennahen Gewebstrukturen in engen und tiefen Öffnungen des menschlichen Körpers, Germany.

- Stave, J., Zinser, G., Grummer, G., and Guthoff, R. (2002). [Modified Heidelberg Retinal Tomograph HRT. Initial results of in vivo presentation of corneal structures]. *Ophthalmologie* 99(4), 276-280.
- Sudbo, J., Lippman, S.M., Lee, J.J., Mao, L., Kildal, W., Sudbo, A., Sagen, S., Bryne, M., El-Naggar, A., Risberg, B., Evensen, J.F., and Reith, A. (2004). The influence of resection and aneuploidy on mortality in oral leukoplakia. *N Engl J Med* 350(14), 1405-1413.
- Sung, K.B., Liang, C., Descour, M., Collier, T., Follen, M., Malpica, A. and Richards-Kortum, R. (2002). Near real time in vivo fibre optic confocal microscopy: sub-cellular structure resolved. *J Microsc* 207(Pt2), 137-45.
- Swango, P.A. (1996). Cancers of the oral cavity and pharynx in the United States: an epidemiologic overview. *J Public Health Dent* 56(6), 309-318.
- Swanson, E.A., Izatt, J.A., Hee, M.R., Huang, D., Lin, C.P., Schuman, J.S., Puliafito, C.A., and Fujimoto, J.G. (1993). In vivo retinal imaging by optical coherence tomography. *Opt Lett* 18(21), 1864-1866.
- Tabor, M.P., Brakenhoff, R.H., van Houten, V.M., Kummer, J.A., Snel, M.H., Snijders, P.J., Snow, G.B., Leemans, C.R., and Braakhuis, B.J. (2001). Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res* 7(6), 1523-1532.
- Talamini, R., Bosetti, C., La Vecchia, C., Dal Maso, L., Levi, F., Bidoli, E., Negri, E., Pasche, C., Vaccarella, S., Barzan, L., and Franceschi, S. (2002). Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control* 13, 957-964.
- Tang, X.H., Knudsen, B., Bemis, D., Tickoo, S., and Gudas, L.J. (2004). Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clin Cancer Res* 10(1Pt1), 301-313.
- Tearney, G.J., Brezinski, M.E., Bouma, B.E., Boppart, S.A., Pitris, C., Southern, J.F., and Fujimoto, J.G. (1997). In vivo endoscopic optical biopsy with optical coherence tomography. *Science* 276(5321), 2037-2039.
- Teppo, H., Koivunen, P., Hyrynkangas, K., and Alho, O.P. (2003). Diagnostic delays in laryngeal carcinoma: professional diagnostic delay is a strong independent predictor of survival. *Head Neck* 25(5), 389-394.

- van der Waal, I. (2009). Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* 45(4-5), 317-323.
- van Oijen, M.G., Leppers Vd Straat, F.G., Tilanus, M.G., and Slootweg, P.J. (2000). The origins of multiple squamous cell carcinomas in the aerodigestive tract. *Cancer* 88(4), 884-893.
- Venkatesh, K., Cohen, M., Evans, C., Delaney, P., Thomas, S., Taylor, C., Abou-Taleb, A., Kiesslich, R., and Thomson, M. (2009). Feasibility of confocal endomicroscopy in the diagnosis of pediatric gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* 15(18), 2214-2219.
- Vokes, E.E., Weichselbaum, R.R., Lippman, S.M., and Hong, W.K. (1993). Head and neck cancer. *N Engl J Med* 328(3), 184-194.
- Warnakulasuriya, S., Johnson, N.W., and van der Waal, I. (2007). Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 36(10), 575-580.
- Weinstein, R.S., Graham, A.R., Richter, L.C., Barker, G.P., Krupinski, E.A., Lopez, A.M., Erps, K.A., Bhattacharyya, A.K., Yagi, Y., and Gilbertson, J.R. (2009). Overview of telepathology, virtual microscopy, and whole slide imaging: prospects for the future. *Hum Pathol* 40(8), 1057-1069.
- Wells, W.A., Barker, P.E., MacAulay, C., Novelli, M., Levenson, R.M., and Crawford, J.M. (2007). Validation of novel optical imaging technologies: the pathologists' view. *J Biomed Opt* 12(5), 051801.
- White, W.M., Rajadhyaksha, M., Gonzalez, S., Fabian, R.L., and Anderson, R.R. (1999). Noninvasive imaging of human oral mucosa in vivo by confocal reflectance microscopy. *Laryngoscope* 109(10), 1709-1717.
- Wilder-Smith, P., Lee, K., Guo, S., Zhang, J., Osann, K., Chen, Z., and Messadi, D. (2009). In vivo diagnosis of oral dysplasia and malignancy using optical coherence tomography: preliminary studies in 50 patients. *Lasers Surg Med* 41(5), 353-357.
- Wilhelm, S., Gröbler, B., Gluch, M., and Heinz, H. *Konfokale Laser Scanning Mikroskopie - Grundlagen: Carl Zeiss.*

- Winn, D.M. (1995). Diet and nutrition in the etiology of oral cancer. *Am J Clin Nutr* 61(2), 437S-445S.
- Wong, B.J., Jackson, R.P., Guo, S., Ridgway, J.M., Mahmood, U., Su, J., Shibuya, T.Y., Crumley, R.L., Gu, M., Armstrong, W.B., and Chen, Z. (2005). In vivo optical coherence tomography of the human larynx: normative and benign pathology in 82 patients. *Laryngoscope* 115(11), 1904-1911.
- Zhang, L., Williams, M., Poh, C.F., Laronde, D., Epstein, J.B., Durham, S., Nakamura, H., Berean, K., Hovan, A., Le, N.D., Hislop, G., Priddy, R., Hay, J., Lam, W.L., and Rosin, M.P. (2005). Toluidine blue staining identifies high-risk primary oral premalignant lesions with poor outcome. *Cancer Res* 65(17), 8017-8021.
- Zheng, W., Olivo, M., and Soo, K.C. (2004). The use of digitized endoscopic imaging of 5-ALA-induced PPIX fluorescence to detect and diagnose oral premalignant and malignant lesions in vivo. *Int J Cancer* 110(2), 295-300.
- Zimmermann, R., Budach, W., Dammann, F., Einsele, H., Ohle, v.C., Preßler, H., Ruck, P., Wehrmann, M., and Zenner, H.-P. (2003). Interdisziplinäres Tumorzentrum Tübingen - Therapieempfehlungen bei Pharynx- und Larynx-tumoren. Internetauftritt: <http://www.itz-tuebingen.de/itztlon.html>
- Zunt, S.L. (2001). Transepithelial Brush Biopsy: an adjunctive diagnostic procedure. *J Indiana Dent Assoc* 80,(2), 6-8.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strahlengang eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops	12
Abbildung 2:	Heidelberg-Retina-Tomograph II.....	17
Abbildung 3:	Starres konfokales Endoskop mit Adapter	18
Abbildung 4:	Starres konfokales Endoskop gekoppelt an den Scanner des HRTII.....	19
Abbildung 5:	Schematischer Längsschnitt durch das SKE / HRT II System	20
Abbildung 6:	makroskopische Schleimhautveränderungen induziert durch 4-NQO.....	28
Abbildung 7:	Histologische Befundhäufigkeiten in Abhängigkeit von der Noxeningestionsdauer	29
Abbildung 8:	Morphologische Charakteristika der gesunden Schleimhaut	31
Abbildung 9:	Darstellung der zytologischen Atypien mit dem SKE.....	32
Abbildung 10:	Darstellung von Verhornungsstörungen mit der SKE	33
Abbildung 11:	Leichte Epitheldysplasie nach 8 Wochen 4-NQO Ingestion p.os	37
Abbildung 12:	Moderate Dysplasie nach 18 Wochen 4-NQO Ingestion p.os.....	38
Abbildung 13:	Schwere Dysplasie nach 10 Wochen 4-NQO Ingestion p.os.....	40
Abbildung 14:	<i>Carzinoma in situ</i> nach 18 Wochen 4-NQO Ingestion p.os.....	41
Abbildung 15:	SKE-Aufnahmen im unmittelbaren Randbereich des in Abb. 14 gezeigten exophytischen Tumors.....	42
Abbildung 16:	Untersuchung des in Abbildung 14 gezeigten exophytischen Tumors mit dem HRT II	43
Abbildung 17:	Papillom nach 12 Wochen 4-NQO Ingestion p.os.	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Histologische Kriterien der WHO für Epitheldysplasien nach Gale <i>et al.</i> 2005... 7
Tabelle 2:	Gängige Klassifikationssysteme zur Kategorisierung der epithelialen Vorläuferläsionen von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich 8
Tabelle 3:	Übersicht der 4-NQO Ingestionsdauer und Applikationsmenge21
Tabelle 4:	Kategorisierung von Cohens-Kappa Werten26
Tabelle 5:	Definitionen zur statistischen Berechnung der diagnostischen Güte27
Tabelle 6:	Übereinstimmung für konfokalmikroskopische Befunde durch 2 Untersucher ..34
Tabelle 7:	Übereinstimmung der konfokalmikroskopischen und histopathologischen Befunde.....35
Tabelle 8:	Diagnostische Güte der SKE für die Differenzierung von intraepithelialen <i>Low-grade</i> und <i>High-grade</i> Läsionen35
Tabelle 9:	Übersicht der Studienlage über die Wertigkeit der diagnostischen Hilfsmittel zur Lokalisierung und Differenzierung von Plattenepithelkarzinomen und dessen Vorläuferläsionen im Kopf- und Halsbereich.....49
Tabelle 10:	Übersicht über einige bis dato publizierte konfokale Endomikroskope56

6. Anhang

6.1 Zusammenfassung

Das starre konfokale Endoskop (SKE) wurde entwickelt, um auch die schwer erreichbaren Regionen der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, insbesondere der Laryngologie, der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie hinsichtlich der *in vivo* Diagnostik früher Epithelveränderungen zugänglich zu machen.

Der in dieser Arbeit verwendete Prototyp des starren konfokalen Endoskops wurde über einen spezialgefertigten Adapter an den Scanner eines kommerziell erhältlichen konfokalen Laser Scanning Ophthalmoskops, dem Heidelberg Retina Tomographen II (HRT II) gekoppelt. Die Beleuchtung wird durch einen 670 nm Dioden Laser erzeugt. Die Bildgebung erfolgt durch die Nutzung eines Wasserimmersionsobjektives mit einer Vergrößerung von x 40. Limitiert durch das Endoskop besitzt dieses System eine numerische Apertur von 0,9 und liefert konfokalmikroskopische Bilder von 350 x 350 µm mit einer der Histologie nahen lateralen und axialen Auflösung von 1-2 bzw. 5 µm.

Das starre konfokale Endoskop soll im Rahmen von präklinischen Studien auf seine Eignung zur *in vivo* Diagnostik für die Unterscheidung von intraepithelialen *Low-* und *High-grade* Läsionen untersucht werden. Hierzu wurde für diese Arbeit eine tierexperimentelle Studie mit chemisch induzierten Schleimhautläsionen an Mäusen gewählt, in der vorrangig frühe Vorläuferläsionen der oralen Schleimhaut untersucht werden sollen. Ein gängiges Modell für die Induktion von Plattenepithelkarzinomen der oralen Schleimhaut stellt die Applikation von 4-Nitroquinolin-1-Oxid (4-NQO) per os dar. Hierfür wurden insgesamt 50 männliche C57Bl/6 Mäuse in einem Alter von sechs Wochen einer Behandlung mit 4-NQO mit einer Konzentration von 100 µg/ml über das Trinkwasser unterzogen. Als Kontrollgruppe erhielten zehn C57Bl/6 Mäuse über den gesamten Untersuchungszeitraum nicht kontaminiertes Trinkwasser. Aus der Versuchsgruppe wurden jeweils zehn Mäuse nach 8, 10, 12, 14 und 18 Wochen getötet, die Läsionen im Bereich der Zunge makroskopisch beschrieben und videoendoskopisch dokumentiert. Nach Resektion der Zunge erfolgten direkt im Anschluss die *ex vivo* konfokalmikroskopischen Untersuchungen nach festgelegten morphologischen Kriterien mit direkter Visualisierung und Speicherung der Einzelbilder. Eingeschlossen wurden alle konfokalmikroskopischen Untersuchungen zur Detektion von Epithelveränderungen im Bereich der Zungenunterseite und Zungenseitenränder. Anschließend erfolgten konventionell histopathologische Untersuchungen der beobachteten Läsionen, mit denen die konfokalmikroskopischen Befunde verglichen werden sollten.

Die *Interraterreliabilität* für zwei Beobachter der konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurde ermittelt und ergab $\kappa = 0,59$. Somit ist dieses Verfahren als Untersucherabhängig zu bewerten. Die Eindringtiefe variierte im gesunden Gewebe der Zungenunterseite zwischen 104 und 240 μm . In keratotischen Läsionen verringerte sich die Eindringtiefe und lag zwischen 80 und 140 μm . Stark verhornte Läsionen ließen eine Beurteilung des Epithels nicht zu. In dieser tierexperimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass diese neue Technologie der starren konfokalen Endoskopie in der Lage ist, mit einer Sensitivität von 73%, einer Spezifität von 88% und einer Vorhersagegenauigkeit von 84% zwischen intraepithelialen *Low-* und *High-grade* Läsionen zu unterscheiden.

Die potenziellen Fähigkeiten der starren konfokalen Endoskopie zur nicht-invasiven *in vivo* Diagnostik von frühen Schleimhautveränderungen könnten, nach Behebung einiger technischer Mängel, dem Kopf- und Halschirurgen neben den Standarddiagnoseverfahren als zusätzliches endoskopisches und bildgebendes Verfahren zur verfeinerten Erkennung von epithelialen Vorläuferläsionen zur Verfügung stehen, um zukünftig exakte und *in vivo*-kontrollierte Gewebebiopsien entnehmen zu können. Prinzipiell stellt diese neue Technologie der starren konfokalen Endoskopie ein potenzielles Verfahren dar, um in allen medizinischen Bereichen in denen die Endoskopie zum Einsatz kommt, nicht-invasiv und *in vivo* Epithelien oder oberflächennahe Strukturen beurteilen sowie Biopsien mit einer erhöhten Genauigkeit entnehmen zu können. In dieser Hinsicht bietet diese neue Technologie ein großes Spektrum für weitere wissenschaftliche Forschungsinhalte. Diese neue nicht-invasive Technologie, die in dieser Arbeit aufgezeigt wurde, soll mit einigen Verfeinerungen und nach Behebung der technisch bedingten Mängel in klinischen Studien während der Mikrolaryngoskopie zur *in vivo* Beurteilung von Stimmlippenveränderungen evaluiert werden.

6.2 Summary

A rigid confocal endoscope has been developed to assess the oral squamous epithelium and to determine sensitivity, specificity and accuracy of this novel technology.

The endoscope has been connected to the commercially available Heidelberg Retina Tomograph (HRT II). HRT II is a device with a 670-nm diode laser designed to acquire topographical measurements of the optic nerve head. Real-time rigid confocal endoscopy is demonstrated by imaging epithelial lesions in a murine model. Six-week-old male C57Bl/6 mice were randomly assigned to a control-group ($n=10$) and into a 4-nitro-quinoline-1-oxide (4-NQO)-treated group ($n=50$). In the 4-NQO-treated group, mice obtained 4-nitroquinoline-1-oxide diluted in the drinking water (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to induce tumourigenesis in the tongue. After an 8-18 week carcinogen treatment with 4-NQO (*ad libitum*), mouse tongues were dissected within 3 h after CO_2 overdose. After confocal microscopy of all lesions of the tongue, conventional histopathological investigation was performed.

The interrater-reliability for the two observers of the confocal microscopical findings was found to be Kappa = 0.59. The penetration depth varied in the healthy tissue of the underside of the tongue throughout this study and measured between 104 and 240 µm. In keratotic lesions, the penetration depths were diminished and varied between 80 and 140 µm. Strong keratinisation inhibits the evaluation of the epithelium. For differentiation between *Low-grade* and *High-grade* squamous intra-epithelial lesions, a sensitivity and specificity of 73% and 88% with a predictive accuracy of 84% was reached.

The animal experiment with this non-invasive new technology indicates that this imaging technology could facilitate the detection of pre-cancerous lesions of the oropharynx. Clinical trials on oropharyngeal and laryngeal lesions in humans are needed to prove the applicability of this method in the field of otorhinolaryngology.

Published in: *Journal of Oral Pathology & Medicine* (2010) **39**: 318–327

6.3 Thesen

- Die Früherkennung von Vorläuferstadien von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle ist entscheidend für die Prognose.
- Bisher gibt es wenig *in vivo* Verfahren, die geeignet sind, die Präzision der Probenentnahme zu verbessern oder eine Dignitätsbestimmung von Schleimhautveränderungen *in vivo* und nicht-invasiv zu erlauben.
- Diese Arbeit soll ein neues optisches System, das starre konfokale Endoskop (SKE), vorstellen, welches in der Lage ist, epitheliale Strukturen in zellulärer und subzellulärer Auflösung *in vivo*, nicht-invasiv und ohne zusätzlicher Färbungen des Gewebes, morphologisch darzustellen.
- Das SKE liefert optische Schnittbilder von Geweben und ermöglicht eine morphologische Charakterisierung zellulärer und subzellulärer Strukturen.
- Das SKE ermöglicht einen Tiefenscann durch die Epithelien der Zungenschleimhaut bis in die *Lamina propria*, eine Voraussetzung um die Schwere der intraepithelialen Schleimhautveränderungen beurteilen zu können.
- Die Behandlung von C57Bl/6 Mäusen mit 4-Nitroquinolin-1-Oxid kontaminiertem Trinkwasser liefert progressive Schleimhautveränderungen, die histologisch mit Vorläuferläsionen von oralen PEC in humanen Schleimhäuten identisch sind.
- Mit der SKE können *Low-grade* von *High-grade* Läsionen differenziert werden. Sensitivität und Spezifität dieser Methode liegen bei 73 und 88%.
- Die Beurteilung und Befundauswertung ist allerdings Untersucherabhängig und unterliegt ähnlich wie die Interpretation in der konventionellen Histopathologie gewissen Schwankungen. Die Interraterreliabilität bei der SKE liegt bei $\kappa=0.59$.
- Hyperkeratosen verhindern aufgrund sehr starker Reflexionen die Darstellung und somit die Beurteilung der darunterliegenden Zellschichten.
- Diese Technologie weist ein hohes Potenzial auf, Erfassungsrate, Prävention und Therapie von Karzinomen und seinen Vorläuferläsionen signifikant zu verbessern.
- Die tierexperimentellen Untersuchungen lassen einen *in vivo* Einsatz am Menschen zur Beurteilung von unklaren Schleimhautläsionen des Oropharynx, Hypopharynx und des Larynx sinnvoll erscheinen.
- Zukünftige Forschungsinhalte werden sich auf die Verbesserung der diagnostischen Güte durch Behebung einiger technischer Mängel, die sich in dieser Studie offenbart haben, konzentrieren.
- Ferner soll die Kombination mit einem komplementären optischen System, beispielsweise der optischen Kohärenz Tomographie angestrebt werden.

6.4 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Behnaz Farahati, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema "Starre konfokale Endoskopie zur Diagnostik von experimentell induzierten oralen Vorläuferläsionen - eine Tierexperimentelle Studie" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe.

Rostock, den 09.08.2013

Behnaz Farahati

6.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen dafür danken, die mich in der Zeit meiner Promotion fachlich und moralisch unterstützt haben.

Insbesondere gilt dieser Dank Herrn Prof. Dr. med. Tino Just für die Bereitstellung des interessanten Themas, der freundlichen Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für die engagierte und fachliche Betreuung während all den Jahren.

Ein großes Dankeschön geht an die Kolleginnen und Kollegen der Versuchstierhaltung des Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, ganz besonders an Frau Karin Gerber für die stets freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Des weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Oliver Stachs bedanken, der immer geduldig in allen technischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein großer Dank gilt auch dem Institut für Pathologie der Universität Rostock für die zügige Anfertigung der histologischen Präparate sowie der Bereitstellung des Arbeitsplatzes für die histopathologischen Untersuchungen. Besonderer Dank gilt hierbei Herrn PD Dr. med. Friedrich Prall, der mir geholfen hat mich in die Thematik der Histopathologie von Plattenepithelkarzinomen einzuarbeiten und der versucht hat, mir die Kunst des Mikroskopierens nahe zu bringen.

Meinen Eltern danke ich für alles, was Sie mir bisher beigebracht haben.