

**UNTERSUCHUNG ZUR KLASSIFIKATION  
VON BENIGNEN UND MALIGNEN  
LARYNXEPITHELLÄSIONEN MIT HILFE EINES  
MULTIPARAMETERATYPPIEINDEX**

**Inaugural – Dissertation zur  
Erlangung des Grades eines  
Doktors der Humanmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von  
Tojon Richard Straßburg**

**aus Lübbecke / Westfalen**

**Gießen 2004**

**Aus dem Institut für Pathologie  
Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Leiter: Prof. Dr. med. A. Schulz**

**Gutachter: PD Dr. T. Dreyer**

**Gutachter: Frau Prof. Dr. H. Glanz**

**Tag der Disputation: 07.03.2005**

---

## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	V	
Abbildungsverzeichnis.....	VII	
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII	
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>5</b>
2.1	Präparate.....	5
2.1.1	Gewinnung.....	5
2.1.2	Diagnostische Gruppen.....	5
2.1.2.1	Normalepithel.....	6
2.1.2.2	Epitheldysplasien.....	7
2.1.2.3	Larynxkarzinome.....	8
2.2	Quantitative Auswertung.....	9
2.2.1	Bildanalysesystem.....	9
2.2.2	Messvorgang.....	10
2.2.3	Untersuchungsparameter.....	11
2.2.4	Interpretation der IOD-Histogramme.....	12
2.2.5	Berechnung des Multiparameteratypieindex.....	13
2.2.6	Statistik.....	14
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>16</b>
3.1	Geschlecht, Alter und klinische Diagnosen.....	16
3.2	Ploidie-Status.....	18
3.3	Kernfläche.....	20
3.4	Kernflächenschwankung.....	25
3.5	Multiparameteratypieindex.....	30

---

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>37</b>
4.1	Klassifikationssysteme .....	37
4.2	Ploidie-Status .....	40
4.3	Kernfläche und Kernflächenschwankung .....	43
4.4	Methoden und Probleme der DNA-Zytometrie .....	45
4.5	Multiparameteratypieindex .....	49
4.5.1	Klassifikationsgenauigkeiten im Vergleich .....	50
4.5.2	Probleme in der Anwendung von Multiparametersystemen .....	52
<b>5</b>	<b>Schlussbetrachtung .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>72</b>

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Pathohistologische Diagnosen und Anzahl der Fälle des Untersuchungsgutes .....	6
Tab. 2.2:	Faktoren der nicht standardisierten kanonischen Diskriminationsfunktion zur Berechnung des MAI .....	14
Tab. 3.1:	Geschlechterverteilung der Larynxdysplasien und Larynxkarzinome sowie des Gesamtkollektivs .....	16
Tab. 3.2:	Altersverteilung der Larynxdysplasien und Larynxkarzinome sowie des Gesamtkollektivs .....	17
Tab. 3.3:	Klinische Diagnosen der untersuchten Fälle der Larynxdysplasien .....	17
Tab. 8.1:	Geschlechterverteilung aller Larynxdysplasien sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS .....	72
Tab. 8.2:	Geschlechterverteilung aller Larynxkarzinome sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3 .....	72
Tab. 8.3:	Anzahl der euploiden und aneuploiden Fälle aller Larynxdysplasien sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS .....	73
Tab. 8.4:	Anzahl der euploiden und aneuploiden Fälle aller Larynxkarzinome sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3 .....	73
Tab. 8.5:	Kernfläche aller Larynxdysplasien sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS .....	74
Tab. 8.6:	Kernfläche aller Larynxkarzinome sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3 .....	74
Tab. 8.7:	Kernflächenschwankung aller Larynxdysplasien sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS .....	75
Tab. 8.8:	Kernflächenschwankung aller Larynxkarzinome sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3 .....	75
Tab. 8.9:	Multiparameteratypieindex aller Larynxdysplasien sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS .....	76
Tab. 8.10:	Multiparameteratypieindex aller Larynxkarzinome sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3 .....	76
Tab. 8.11:	Anzahl der Fälle mit Kernflächenwerten $\leq 42,29 \mu\text{m}^2$ und Kernflächenwerten $> 42,29 \mu\text{m}^2$ aller Larynxdysplasien sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS .....	77
Tab. 8.12:	Anzahl der Fälle mit Kernflächenwerten $\leq 42,29 \mu\text{m}^2$ und Kernflächenwerten $> 42,29 \mu\text{m}^2$ aller Larynxkarzinome sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3 .....	77

---

Tab. 8.13: Anzahl der Fälle mit Kernflächenschwankungswerten $\leq 16,58 \mu\text{m}^2$ und Kernflächenschwankungswerten $> 16,58 \mu\text{m}^2$ aller Larynxdysplasien sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS .....	78
Tab. 8.14: Anzahl der Fälle mit Kernflächenschwankungswerten $\leq 16,58 \mu\text{m}^2$ und Kernflächenschwankungswerten $> 16,58 \mu\text{m}^2$ aller Larynxkarzinome sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3 .....	78
Tab. 8.15: Anzahl der Fälle mit MAI-Werten $\leq 0$ und MAI-Werten $> 0$ aller Larynxdysplasien sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS .....	79
Tab. 8.16: Anzahl der Fälle mit MAI-Werten $\leq 0$ und MAI-Werten $> 0$ aller Larynxkarzinome sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3 .....	79

---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1:	Anteil der euploiden und aneuploiden Fälle differenziert nach der diagnostischen Gruppe der Larynxdysplasien .....	19
Abb. 3.2:	Anteil der euploiden und aneuploiden Fälle differenziert nach der diagnostischen Gruppe der Larynxkarzinome .....	19
Abb. 3.3:	Kernfläche der Larynxdysplasien.....	21
Abb. 3.4:	Kernfläche der Larynxkarzinome .....	21
Abb. 3.5:	Kernfläche aller Fälle der Larynxdysplasien .....	23
Abb. 3.6:	Kernfläche aller Fälle der Larynxkarzinome .....	24
Abb. 3.7:	Kernflächenschwankung der Larynxdysplasien.....	25
Abb. 3.8:	Kernflächenschwankung der Larynxkarzinome .....	26
Abb. 3.9:	Kernflächenschwankung aller Fälle der Larynxdysplasien .....	28
Abb. 3.10:	Kernflächenschwankung aller Fälle der Larynxkarzinome .....	29
Abb. 3.11:	Multiparameteratypieindex der Larynxdysplasien.....	30
Abb. 3.12:	Multiparameteratypieindex der Larynxkarzinome.....	31
Abb. 3.13:	Anteil der als benigne und als maligne klassifizierten Fälle differenziert nach Larynxdysplasien und Larynxkarzinomen.....	32
Abb. 3.14:	Multiparameteratypieindex-Werte aller Fälle der Larynxdysplasien.....	33
Abb. 3.15:	Multiparameteratypieindex-Werte aller Fälle der Larynxkarzinome.....	34
Abb. 3.16:	Rate der falsch positiv und falsch negativ klassifizierten Fälle des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit von den Schwellenwerten der Kernfläche, der Kernflächenschwankung sowie des Multiparameteratypieindex .....	35

---

## Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
CAIS	Carcinoma in situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
HD	Hintergrunddichte
HD <sub>norm</sub>	abgegliche Hintergrunddichte
HE	Hämatoxylin-Eosin
IOD	integrierte optische Dichte
IOD <sub>s</sub>	integrierte optische Dichte am Schnitt gemessen
KF	Kernfläche (in Schnittebene)
LCA	Larynxkarzinom G1 = hoch differenzierte Plattenepithelkarzinome G2 = mittelgradig differenzierte Plattenepithelkarzinome G3 = niedrig differenzierte Plattenepithelkarzinome
LD	Larynxepitheldysplasie I = leicht II = mittelschwer III = schwer
MAI	Multiparameteratypieindex
MIOD	mittlere integrierte optische Dichte
MIOD <sub>ref</sub>	MIOD der Referenzzellpopulation
MOD	mittlere optische Dichte
MOD <sub>nm</sub>	abgegliche mittlere optische Dichte
n	Anzahl
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PS	Ploidie-Status
SDKF	Kernflächenschwankung (in Schnittebene)
TNM	Klassifikation maligner Tumore anhand von Tumorgröße, Lymphknotenmetastasierung und Fernmetastasen



---

## 1 Einleitung

In Europa ist das Larynxkarzinom der häufigste maligne Tumor des oberen Aerodigestivtraktes [Maier und Tisch 1997]. Eine weltweite Zunahme der Inzidenz wird nach Rafferty et al. [2001] angenommen. Als Ursachen für die Entstehung des Larynxkarzinoms sind vor allem das Rauchen aber auch Alkoholgenuss zu nennen [Baltzell und Putney 1954, Blümlein 1955, Cattaruzza et al. 1996, Wynder et al. 1956]. Männer erkranken deutlich häufiger als Frauen. Allerdings führte ein Wandel des Rauchverhaltens beider Geschlechter in den letzten Jahrzehnten zu einer Zunahme der Larynxkarzinominzidenz für Frauen [Sessions et al. 1997, Waterhouse 1993]. Der Erkrankungsgipfel liegt in Europa in der sechsten und siebten Lebensdekade [Delank und Stoll 2000].

Mit Blick auf den Umstand, dass Lungenkrebs 14 mal häufiger, Brustkrebs 15 mal häufiger, Prostatakrebs 16 mal häufiger und Dickdarmkrebs immerhin noch neun mal häufiger als Kehlkopfkrebs auftritt, mag die große Anzahl von Veröffentlichungen zum Thema Larynxkarzinom zunächst erstaunen. Diese Tatsache zeigt aber die besondere Bedeutung der Erkrankung im Hinblick auf die Kommunikationsfähigkeit des Menschen [Sessions et al. 1997]. Die Stimme und damit das Stimmorgan Kehlkopf ist das wichtigste Kommunikationsmittel des Individuums [Seiferth und Glanz 1971]. Eine Bedrohung dieses Organs durch die Krebserkrankung an sich, vor allem aber durch deren Therapie ist ein besonderes psychologisches Problem. Der durch eine Laryngektomie verursachte Verlust der Stimme mit Beeinträchtigung der Kommunikationsfähigkeit, aber auch das im Rahmen der operativen Therapie angelegte Tracheostoma mit seiner entstellenden Komponente führen häufig zu Störungen von Selbstbild, Partnerschaft sowie sexuellem Erleben des Patienten und in der Folge zu sozialer Isolation [DeSanto et al. 1995, Gritz et al. 1999, Nalbadian et al. 2001, Terrel et al. 1998]. Die relativ hohe Rate von Depressionen in diesem Patientengut [La Raja et al. 1997, Nalbadian et al. 2001], auch im Vergleich zu anderen Krebserkrankten [Gritz et al. 1999], erscheint nachvollziehbar. Eine hieraus resultierende Verschlechterung der Prognose wird diskutiert [La Raja et al. 1997].

---

Die Entwicklung der Mikrolaryngoskopie in den frühen sechziger Jahren hat zu schonenderen Methoden der Diagnostik und Therapie laryngealer Neoplasien geführt [Kleinsasser 1962]. Damit wurde es möglich präkanzeröse Schleimhautveränderungen frühzeitig einer Diagnostik zu zuführen und so eine bessere Therapieplanung zu ermöglichen. Als Ergebnis behält ein sehr viel größerer Anteil an Patienten trotz suffizienter Therapie einen funktionierenden Kehlkopf und damit sein Hauptkommunikationsorgan mit entsprechend positivem Effekt auf die Lebensqualität des Erkrankten [Sessions et al. 1997].

Über 95 % aller primären Larynxkarzinome sind Plattenepithelkarzinome [Sessions et al. 1997]. Diese entstehen meist aus laryngealen Dysplasien, d.h. präkanzerösen Epithelläsionen [Blackwell et al. 1995, Broders 1932, Jackson 1923, Klestadt 1931]. Da Gradingssysteme epithelialer Dysplasien auf subjektiven morphologischen Kriterien basieren [Blackwell et al. 1995], sind ihre Ergebnisse von der Erfahrung des Untersuchers abhängig; zur Zeit gibt es keine allgemein anerkannten Gradingssysteme.

Aus diesem Grund wurden verschiedene objektive Methoden wie Proliferationsmarker [Benazzo et al. 1995, Munck-Wikland et al. 1994], AgNOR-Analysen [Altemani et al. 1995, Bockmühl et al. 1992, Malusardi et al. 1992, Mauri et al. 1990, Öfner et al. 1995, Pich et al. 1995, Wang et al. 1995] und Morphometrie [Baak et al. 1989, Fleege et al. 1990, Olde Kalter und Delemarre 1986, Olde Kalter et al. 1986, Resta et al. 1992, Stenersen et al. 1992] durchgeführt. Die am weitesten verbreiteten quantitativen Gradingmerkmale sind auf den DNA-Gehalt der Zellkerne bezogen [Olofson et al. 1986], welcher z.Zt. überwiegend aus durchflusszytometrischen Messungen [Barona de Guzman et al. 1992, Barona de Guzman et al. 1993, Kusaba 1992, Miyagi et al. 1994, Sprenger et al. 1974, Stern et al. 1995, Toffoli et al. 1995, Zhou 1991] oder aus DNA-Bildzytometrie [Bjelkenkrantz et al. 1983, Maturri et al. 1997, Sudbø et al. 2001, Welkoborsky et al. 1995] ermittelt wird. Abgesehen von den Ungenauigkeiten, die hauptsächlich durch die Gewebefixation und die erforderliche Schnitttechnik bei den histologischen Schnittpräparaten verursacht werden, führen alle Methoden zu mehr oder weniger verlässlichen Korrelationen zwischen quantitativen Merkmalen und dem Grad der laryngealen Dysplasie.

---

Trotz einer Verbesserung der Klassifikationsgenauigkeit durch die o.g. Verfahren bestehen methodisch begründete Probleme weiter. Besonders im Fall kleiner Biopsien von Dysplasien oder hoch differenzierten Karzinomen, in welchen das Stroma fehlt oder zu klein ist um infiltratives Wachstum auszuschließen, ist eine verlässliche Dignitätsbestimmung problematisch. Die Messung des DNA-Gehaltes allein lässt keine definitive Klassifikation dieser Tumore zu. Verschiedene Malignitätsgrade innerhalb der Gruppe invasiver Plattenepithelzellkarzinome resultieren in unterschiedlichen Werten quantitativer Merkmale [Giardina et al. 1994]. Hier ist ein Überschneiden quantitativer Zellkernmerkmale von laryngealen Dysplasien und Plattenepithelkarzinomen zu erwarten. Besonders hypothetisch hochdifferenzierte Carcinomata in situ können allein aufgrund zytometrischer Befunde als leichtergradige Epitheldysplasie fehlklassifiziert werden. Vor allem in der bildanalytischen Auswertung von Schnittpräparaten ist das Auftreten von Schnittartefakten wie z.B. Zellkernüberlappungen, Kappungsdefekte an Zellkernen, Zellkernfragmente und inhomogene intranukleäre Chromatinverteilung ein nach wie vor nicht zufriedenstellend gelöstes Problem mit entsprechenden Auswirkungen auf Interpretation und Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten [Berryman et al. 1984, Gschwendtner und Mairinger 1995, Haroske et al. 1993, Xin et al. 1996].

Um den Zellkernpleomorphismus auch in Routineparaffinschnitten objektivieren zu können und die durch Schnittartefakte entstehenden Fehler zu reduzieren, wurde ein Multiparameteratypieindex entwickelt [Dreyer et al. 1994 und 1995]. Bei diesem Verfahren werden die routinemäßig leicht zu bestimmenden Parameter integrierte optische Dichte des Zellkerns, Kernfläche und Kernflächenschwankung kombiniert. Ausgehend von der Hypothese, dass ein solcher Index in der Unterscheidung von Larynxepitheldysplasien und Karzinomen sensitiver als einzelne Merkmale sein würde, wurden in der vorliegenden Arbeit 38 Larynxdysplasien und 38 Larynxkarzinome im Hinblick auf zellkernassoziierte Malignitätskriterien untersucht und der Multiparameteratypieindex berechnet.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Klassifikationsgenauigkeit des entwickelten Parameters zu überprüfen, um damit zu einer verlässlichen Klassifizierung von Larynxschleimhaut-

---

läsionen insbesondere der hoch differenzierten Plattenepithelkarzinome sowie ihrer Vorläuferläsionen beizutragen.

---

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Präparate**

#### **2.1.1 Gewinnung**

Alle Epithelproben wurden in der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen gewonnen. Die untersuchten Präparate wurden zwischen 1990 und 1993 im Rahmen der Routinediagnostik mikrolaryngoskopisch entnommen. Die histologische Aufbereitung und Archivierung erfolgte im Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Es wurden jeweils Hämatoxylin-Eosin (HE)- sowie Feulgenfärbungen angefertigt. Für die bildanalytischen Messungen wurden Feulgen gefärbte Paraffinschnitte verwendet. Die Mikrotomeinstellung wurde auf 4 µm festgelegt.

Die Plattenepithelproben wurden im Bereich der Stimmlippen, in einigen Fällen aus Schleimhaut der Taschenfalten, Ventrikelboden, Epiglottis, aryepiglottischer Falte, Aryregion und Subglottis entnommen.

Das Untersuchungsgut stammte von 10 Frauen im Alter zwischen 36 und 73 Jahren (mittleres Alter 58,0 Jahre) und 66 Männern im Alter zwischen 40 und 80 Jahren (mittleres Alter 55,7 Jahre).

#### **2.1.2 Diagnostische Gruppen**

Die Untersuchung wurde an einem Kollektiv von insgesamt 76 Larynxschleimhautpräparaten durchgeführt. Im Untersuchungsgut waren Larynxepitheldysplasien (LD) durch 38 Präparate vertreten davon elf leichte (LD I), elf mittelschwere (LD II) und 16 schwere Epitheldysplasien bzw. Carcinomata in situ (LD III/CAIS). Achtunddreißig Präparate gehörten zur Gruppe der Plattenepithelkarzinome (LCA). Diese teilen sich wiederum in 13 Fälle hoch differenzierter Karzinome (LCA-G1), 15 mittelgradig differenzierte (LCA-G2) sowie zehn niedrig differenzierte Karzinome (LCA-G3) auf (Tab. 2.1). Die Klassifizierungen der Epitheldysplasien und der

Karzinome sind in den Kapiteln 2.1.2.2 (S. 7 f) und 2.1.2.3 (S. 8 f) beschrieben. Bei dem untersuchten Material handelte es sich ausschließlich um Plattenepithelpräparate.

Tab. 2.1: Pathohistologische Diagnosen und Anzahl der Fälle des Untersuchungsgutes

<b>Diagnose</b>	<b>Anzahl</b>
Larynxepithelpräparate – Gesamt	76
Larynxepitheldysplasien – Gesamt (LD <sub>Gesamt</sub> )	38
Leichte Dysplasien (LD I)	11
Mittelschwere Dysplasien (LD II)	11
Schwere Dysplasien/Ca in situ (LD III/CAIS)	16
Larynxkarzinome – Gesamt (LCA <sub>Gesamt</sub> )	38
Hoch differenzierte Ca (LCA-G1)	13
Mittelgradig differenzierte Ca (LCA-G2)	15
Niedrig differenzierte Ca (LCA-G3)	10

### 2.1.2.1 Normalepithel

Die Stimmlippen sind normalerweise von einem nichtverhornenden Plattenepithel überzogen. Das Plattenepithel besteht aus einer einreihigen Basalschicht, der ca. 8-10 Lagen Stachelzellen aufsitzen. Diese werden in Richtung Oberfläche flacher bevor sie schließlich abschilfern [Kleinsasser 1963]. Die Taschenfalten sind von Flimmerepithel, z.T. aber auch von Plattenepithel bedeckt. Die Fläche dieser Plattenepithelinseln nimmt mit dem Lebensalter und durch Inhalationsnoxen im Sinne einer Metaplasie zu [Birmeyer 1959, Noell 1962].

---

### 2.1.2.2 Epitheldysplasien

Die Klassifikation der Dysplasien (LD<sub>Gesamt</sub>) wurde entsprechend Kleinsasser [1963] drei Schweregrade unterscheidend vorgenommen. Leichte Epitheldysplasien wurden in der Gruppe LD I, mittelschwere Epitheldysplasien in der Gruppe LD II und schwere Epitheldysplasien in der Gruppe LD III/CAIS zusammengefasst. Die Hauptkriterien für die Dysplasieklassifikation waren Nachweis, Menge und Verteilung von Zellatypien im Epithelverband sowie Veränderungen in der Zellanordnung.

#### Leichte Epitheldysplasien (LD I)

Bei der leichten Epitheldysplasie bestehen im Vergleich zu angrenzendem Normal-epithel bei erhaltener regelmäßiger Schichtung lediglich geringe Differenzen in Kerngröße, Kernanordnung und Epithelbreite. Leichte Keratosen kommen vor. Entsprechende Präparate wurden als zur Gruppe LD I zugehörig klassifiziert.

#### Mittelschwere Epitheldysplasien (LD II)

Gruppe LD II bildeten Fälle mit nur wenigen Zellkernatypien und/oder wenigen schweren strukturellen Epithelveränderungen wie z.B.: eingestreut Zellkerne mit auffallend hohem Chromatingehalt und/oder abnormer Größe, verhornende Zellen, intraepitheliale Einzelzellverhornungen oder abnorm große Stachelzellen mit auffällig hellem Zytoplasma. Die genannten Reifungsstörungen traten in dieser Gruppe nur innerhalb eines größeren unverdächtigen Epithelabschnittes vereinzelt und örtlich beschränkt auf.

#### Schwere Epitheldysplasien (LD III/CAIS)

In die dritte Gruppe wurden schwere Larynxepitheldysplasien und Carcinomata in situ entsprechend ihrer gleichen klinischen Erscheinung und ihrem gleichen biologischen Verhalten zusammengefasst.<sup>1</sup> Crissman und Zarbo [1989] konnten zeigen, dass schwere

---

<sup>1</sup> Diese Einteilung erfolgte abweichend von der TNM-Klassifikation, in der das Carcinoma in situ als präinvasives Karzinom klassifiziert ist.

---

Dysplasien gleich oft oder sogar häufiger als Carcinomata in situ in invasives Karzinomwachstum übergehen.

Die Gruppe LD III/CAIS bestand aus Fällen mit mehreren Zellkernatypien wie Vergrößerung, Verformung, erhöhtem Chromatingehalt oder veränderter Kern-Plasma-Relation. Diese Veränderungen durchsetzen nicht in jedem Fall die gesamte Epithelhöhe. Häufig treten stärkere Keratosen auf. Die karzinomatösen Veränderungen dieser Gruppe beziehen sich neben der Einzelzelle auch auf Zellverband und Interzellularraum. Merkmale waren z.B. verdicktes Epithel mit z.T. nur noch schmalen Stromaleisten, aufgehobene Epithelschichtung, aufgehobene Horizontalausrichtung der Zellen und aufgelockerter Zellverband mit verbreitertem Interzellularraum [Seiferth und Glanz 1971]. Ein infiltratives Wachstum fehlt bei intakter Basalmembran.

### **2.1.2.3 Larynxkarzinome**

In der Gruppe der Larynxkarzinome ( $LCA_{\text{Gesamt}}$ ) waren 38 untersuchte Plattenepithelkarzinome zusammengefasst. Das Plattenepithelkarzinom zeigt neben den für die Gruppe der schweren Epitheldysplasien und Carcinomata in situ beschriebenen histomorphometrischen Besonderheiten das wichtige Merkmal des infiltrativen Wachstums. Tumorzellen durchbrechen die Basalmembran und infiltrieren die Lamina propria [Seiferth und Glanz 1971].

Wie bei den Epitheldysplasien wurde der Grad der Differenzierung der Larynxkarzinome überprüft, indem zwei erfahrene Untersucher unabhängig voneinander entsprechende HE-gefärbte Präparate klassifizierten.

Die Klassifikation der untersuchten Larynxkarzinome wurde, drei Differenzierungsgrade unterscheidend, in hoch (LCA-G1), mittelgradig (LCA-G2) und niedrig differenzierte Karzinome (LCA-G3) vorgenommen. Hierfür waren der subjektive Grad der Zellatypien, der strukturelle Aufbau sowie die Proliferationsaktivität maßgeblich.



---

### **Hoch differenzierte Larynxkarzinome**

Hoch differenzierte Plattenepithelkarzinome zeigen bei insgesamt erhaltener Schichtung nur geringe Differenzen in der Epithelbreite sowie Kernanordnung und Kerngröße. Es treten Keratosen und Hornperlen auf. Mitosen kommen vor, sind aber nicht häufig.

### **Mittelgradig differenzierte Larynxkarzinome**

Bei den mittelgradig differenzierten Plattenepithelkarzinomen fällt ein zunehmend diffuses Wachstumsmuster auf. Es finden sich vermehrt polymorphe Zellen mit erhöhtem Chromatingehalt und unscharfen Zellgrenzen. Strukturelle Epithelveränderungen und Mitosereichtum sind ausgeprägter.

### **Niedrig differenzierte Larynxkarzinome**

Die niedrig differenzierten Karzinome fallen durch ein ausgeprägt diffuses Wachstumsmuster mit völliger Aufhebung der Epithelschichtung sowie multiplen Zellkernatypien und Zellpolymorphismen auf. Sie imponieren durch großen Mitosereichtum.

## **2.2 Quantitative Auswertung**

### **2.2.1 Bildanalyzesystem**

Das Messsystem bestand aus einem Bildanalyzesystem IBAS der Firma Kontron, Deutschland, mit der installierten Standardsoftware IBAS 2.0 und einer 3 CCD-Kamera DXC-3000 P der Firma Sony, Japan, die an ein Universalmikroskop Axioplan des Herstellers Zeiss, Deutschland, angeschlossen war. Alle Messungen wurden mit 63-facher Objektivvergrößerung (Zeiss Plan-Neofluar 63x/1.25 Öl) durchgeführt. Die Bilder wurden durch den Grünfilter der Kamera aufgenommen (Wellenlängenintervall 490-575 nm) und zu einem Bildformat von 512 x 512 Pixel x 256 Graustufen digitalisiert. Die Endvergrößerung auf dem verwendeten 15 Zoll TV-Bildschirm betrug

---

1522. Die Bildgröße von 306,25 cm<sup>2</sup> repräsentierte eine Gewebefläche von 13225 μm<sup>2</sup>. Auf Bildschirmenebene entsprach die Pixelgröße von 0,16 cm<sup>2</sup> einer Gewebefläche von 0,05 μm<sup>2</sup>.

### 2.2.2 Messvorgang

Nach Aufsuchen des zu vermessenden Zellareales wurde der ausgewählte Abschnitt in seiner gesamten Schnittdicke durchmustert, um eine Messung überlappender Zellkerne oder Zellkernfragmente zu vermeiden. Darauffolgend wurde das Sichtfeld durch den Grünfilter der Kamera aufgenommen und digitalisiert auf dem Arbeitsmonitor abgebildet.

Vor jeder Messung wurde eine Shadingkorrektur durchgeführt um die systemabhängigen Ausleuchtungsfehler auszugleichen. Die zellkernumgebende Matrix und damit der Bildhintergrund war durch die Feulgenfärbung geringgradig mitangefärbt. Um diesen Effekt für die Messroutine zu eliminieren, wurde im digitalisierten Bild des zu vermessenden Zellareales eine interaktive Graustufendiskriminierung vorgenommen. Dadurch wurden die Graustufen der Pixel aller Zellabbildungen gegen den Hintergrund abgeglichen. Um zusätzlich die variierende Färbintensität innerhalb eines Präparates zu kompensieren, wurde die Differenz zwischen der abgeglichenen mittleren optischen Dichte ( $MOD_{norm}$ ) der zum Zellkern gehörigen Objektpixel und der lokalen Hintergrunddichte ( $HD_{norm}$ ) für jeden Zellkern bestimmt.

Die zur Messung vorgesehenen Zellkerne wurden mit Hilfe des Cursors umfahren und so für die folgende Bearbeitung markiert. Das umgebende Restbild wurde eliminiert. In einem weiteren Schritt wurden ungeeignet erscheinende Zellkerne und im Bereich der Zellkerngrenzen aufgefasste Artefakte interaktiv entfernt. Anschließend wurden die verbliebenen, definitiv zur Auswertung vorgesehenen Zellkernabbildungen durch das Bildanalyse-system farbkodiert. Das Bildanalyse-system führte dann die Messung der gewünschten Parameter an den digitalisierten Objekten durch.

---

Vorhergehende Studien zeigten, dass Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen im basalen Drittel des Epithels am ausgeprägtesten waren [Dreyer et al. 1994, Dreyer et al. 1995, Ferlito et al. 1995]. Aus diesem Grund wurden alle quantitativen Messungen auf diese Schicht beschränkt.

Messungen von Zellkernen wurden nur durchgeführt, wenn diese keine Überlappungen sowie klar sichtbare Konturen boten. In mindestens zehn Messfeldern wurden mindestens 100 Zellkerne pro Fall gemessen. Dabei wurden durchschnittlich acht Zellkerne pro Messfeld ausgewertet. Als Referenzzellen wurden zwischen 20 und 30 im selben Präparat befindliche, morphologisch unauffällige Epithelzellen gemessen. Die für jedes Präparat gemessenen Daten wurden gespeichert und durch einen angeschlossenen Drucker als Histogramm und Zahlenwert ausgedruckt.

### **2.2.3 Untersuchungsparameter**

In dieser Arbeit wurden ausschließlich zellkernassoziierte Malignitätskriterien gemessen und ausgewertet. Durch die Messung der integrierten optischen Dichte wurde für jeden Zellkern auf den DNA-Gehalt geschlossen. Für jedes Präparat wurde ein DNA-Histogramm erstellt, das als euploid oder aneuploid klassifiziert wurde. Die genannten Begriffe werden aus Gründen der besseren Verständlichkeit verwendet. Es handelt sich dabei aber keinesfalls um eine nachgewiesene Ploidie, sondern vielmehr um ein mathematisch errechnetes Ploidieäquivalent.

Die integrierte optische Dichte des Zellkernes ist das zytometrische Äquivalent seines DNA-Gehaltes [Haroske et al. 1998, Schulerud et al. 1998]. Sie entspricht dem Produkt aus der optischen Dichte des Zellkernes und der Zellkernfläche in Schnittebene. Die am Schnitt gemessene, integrierte optische Dichte ( $IOD_S$ ) wurde im Bildanalyzesystem wie folgt berechnet:

$$\text{IOD}_S = \text{KF} \cdot (\text{MOD}_{\text{norm}} - \text{HD}_{\text{norm}}) / \text{MIOD}_{\text{ref}}$$

$\text{IOD}_S$  = integrierte optische Dichte in Schnittebene

$\text{KF}$  = Zellkernfläche in Schnittebene

$\text{MOD}_{\text{norm}}$  = abgegliche mittlere optische Dichte des Zellkerns

$\text{HD}_{\text{norm}}$  = abgegliche lokale Hintergrunddichte

$\text{MIOD}_{\text{ref}}$  = mittlere integrierte optische Dichte der Referenzzellpopulation

Als morphometrische Merkmale wurden die Kernfläche (KF) und die Kernflächenschwankung (SDKF) ermittelt. Die Kernfläche ist der arithmetische Mittelwert der einzelnen gemessenen Kernflächen eines Präparates. Die Kernflächenschwankung ist die Standardabweichung der einzelnen gemessenen Kernflächen eines Präparates. Beide Parameter besitzen die Einheit Quadratmikrometer [ $\mu\text{m}^2$ ] und wurden im jeweiligen Messvorgang parallel gemessen und berechnet.

#### 2.2.4 Interpretation der IOD-Histogramme

Die Befundung der IOD-Histogramme erfolgte qualitativ. Dazu wurden die im Folgenden genannten Kriterien herangezogen. Menschliche Zellkerne, Keimzellen ausgenommen, enthalten je zweimal 23 Chromosomen, entsprechend einem doppelten Chromosomensatz, genannt 2c. Nach Abschluss der Synthesephase, in welcher der DNA-Gehalt des Zellkernes verdoppelt wurde (G2-M-Phase), wird entsprechend ein Messwert von 4c erreicht [Böcking 1990].

Epithelzellen welche im Ruhezustand Diploidie (2c) bzw. in der Proliferationsphase im Rahmen der physiologischen Zellteilung Tetraploidie (4c) aufweisen werden als euploid definiert. Als aneuploid gilt ein Zellkern-DNA-Gehalt dann, wenn er keinem normalen euploiden, oder polyploiden (ganzzahlige Potenz des 2c-Wertes) Chromosomensatz entspricht und wenn der gemessene Wert größer ist als 4c zuzüglich einer methodisch bedingten Messungenauigkeit, d.h. bei vorliegen von Messwerten größer als 5c.

---

Die IOD-Histogramme wurden nach der von Dreyer et al. [1995] modifizierten Methode von Crissman und Zarbo [1991] interpretiert. Eingipflige bzw. mehrgipflige Histogramme mit Spitzen im Bereich von 2c, 4c usw. wurden als euploid klassifiziert [Kysela et al. 1990]. Um einen Fall als euploid einzustufen, durfte die 5c-Überschreitungsrate nicht größer als 3 % sein. Fälle mit 0-3 % hypertetraploiden Zellen sowie Fälle ohne Nachweis von hypertetraploiden Zellen wurden also als euploid klassifiziert. Für diese Fälle hatte das Merkmal Ploidie den Wert eins, für aneuploid klassifizierte Fälle den Wert zwei.

Als aneuploid wurden zur Vermeidung einer falsch positiv klassifizierten Aneuploidie nur Fälle eingeordnet, welche mehr als 3 % hypertetraploide Zellen enthielten, also den 5c-Wert deutlich überschritten. Dieses Verfahren wurde gewählt, weil eine präzise DNA-Gehalt-Bestimmung des einzelnen Zellkernes in Schnittpräparaten nicht möglich ist. Das Vorgehen basierte auf Erfahrungen aus vorhergehenden Studien [Bjørnhaugen et al. 1993, Dreyer et al. 1994, Dreyer et al. 1995].

Um methodisch bedingte Fehler in ihrer Auswirkung zu reduzieren, den Zellkernpleomorphismus auch in Routineparaffinschnitten objektivieren zu können und die Klassifikationsgenauigkeit im Vergleich zu Einzelparametern zu verbessern wurde ein Multiparameteratypieindex [Dreyer et al. 1994, Dreyer et al. 1995] entwickelt.

### **2.2.5 Berechnung des Multiparameteratypieindex**

Der Multiparameteratypieindex (MAI) ist das Ergebnis einer multivariaten Diskriminanzanalyse [Dreyer et al. 1995]. Er wurde für jeden Fall mit Hilfe der drei am Schnitt gemessenen Parameter Ploidie, Kernfläche sowie Kernflächenschwankung berechnet. Die Ploidie findet als Faktor euploid oder aneuploid Niederschlag. Der MAI markiert einen Schwellenwert: ein MAI-Wert größer als Null weist eine Läsion als maligne aus, während ein MAI kleiner oder gleich Null eine Läsion als nicht maligne klassifiziert. Der Multiparameteratypieindex wurde wie folgt berechnet (s. Kap. 2.2.6 S. 14 f):

$$\text{MAI} = [(\text{PS} \cdot \mathbf{a}) + (\text{KF} \cdot \mathbf{b}) + (\text{SDKF} \cdot \mathbf{c})] - \mathbf{k}$$

MAI = Multiparameteratypieindex  
 PS = Ploidie-Status: euploid = 1, aneuploid = 2  
 KF = Kernfläche in Schnittebene [ $\mu\text{m}^2$ ]  
 SDKF = Kernflächenschwankung in Schnittebene [ $\mu\text{m}^2$ ]

Die im Rahmen der Diskriminanzanalyse ermittelten nicht standardisierten kanonischen Diskriminationsfunktionskoeffizienten, die in die Berechnung des MAI eingehen, sind in Tab. 2.2 aufgeführt.

Tab. 2.2: Faktoren der nicht standardisierten kanonischen Diskriminationsfunktion zur Berechnung des MAI

<b>Faktor</b>	<b>Wert</b>
a	1,8208495
b	0,0568546
c	0,0277696
k	4,72

### 2.2.6 Statistik

Die statistische Auswertung des Datenmaterials erfolgte mit Hilfe des Programmpaketes SPSS Version 9.0.

Die Normalverteilung der Variablen wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Mit Hilfe des Levene-Tests erfolgte die Überprüfung der Varianzhomogenität zwischen den Gruppen. Da für alle untersuchten Variablen eine Normalverteilung nachgewiesen werden konnte, wurden als statistische Kenngrößen das arithmetische Mittel und die Standardabweichung angegeben [Köhler et al. 1996].

---

Zur Hypothesenprüfung wurde beim Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben der t-Test herangezogen. Beim Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die Nullhypothese wurde nur dann zurückgewiesen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  ist.

Der Multiparameteratypieindex wurde anhand einer Diskriminanzanalyse berechnet (s. Kap. 2.2.5 S. 13 f). Mit Hilfe der Diskriminanzanalyse wird ein Individuum aufgrund von Merkmalen einer von zwei fest vorgegebenen Gruppen zugeordnet [Bühl und Zöfel 2000]. Grundlage der Diskriminanzanalyse ist die folgende Diskriminanzfunktion:

$$\mathbf{d} = [(x_1 \cdot \mathbf{b}_1) + (x_2 \cdot \mathbf{b}_2) + \dots + (x_n \cdot \mathbf{b}_n)] - \mathbf{k}$$

Dabei sind  $x_1$  bis  $x_n$  die Werte der einbezogenen Variablen,  $b_1$  bis  $b_n$  sowie die Konstante  $k$  die von der Analyse abzuschätzenden Koeffizienten. Das Ziel der Diskriminanzanalyse ist es, die Koeffizienten so zu ermitteln, dass die Werte der Diskriminanzfunktion beide Gruppen möglichst gut trennen [Bühl und Zöfel 1996].

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Geschlecht, Alter und klinische Diagnosen

Die Geschlechterverteilung der insgesamt 76 untersuchten Epithelveränderungen stellte sich wie folgt dar (Tab. 3.1): Insgesamt waren weibliche Fälle mit nur zehn (13 %) Individuen im Vergleich zu 66 (87 %) männlichen Fällen in der Minderheit. Bei den 38 Larynxepitheldysplasien fanden sich sechs (15,8 %) Präparate weiblicher Patienten bei 32 (84,2 %) männlichen Betroffenen. In Bezug auf die Geschlechterverteilung waren die Unterschiede bei den 38 Larynxkarzinomen noch stärker ausgeprägt. Hier gingen die Präparate von vier (10,5 %) weiblichen und 34 (89,5 %) männlichen Patienten in die Untersuchungen ein. Im Anhang sind die Geschlechterverteilungen differenziert nach den diagnostischen Gruppen der Larynxdysplasien (Tab. 8.1) sowie der Larynxkarzinome (Tab. 8.2) dargestellt.

Tab. 3.1: Geschlechterverteilung der Larynxdysplasien und Larynxkarzinome sowie des Gesamtkollektivs

		Larynxdysplasien n = 38	Larynxkarzinome n = 38	Gesamtkollektiv n = 76
weiblich	abs.	6	4	10
	%	15,8	10,5	13,2
männlich	abs.	32	34	66
	%	84,2	89,5	86,8



Das mittlere Alter aller an Epitheldysplasien erkrankten Patienten betrug 56,5 Jahre (42-77 Jahre), das der Karzinompatienten lag bei 60,8 Jahren (36-80 Jahre) (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Altersverteilung der Larynxdysplasien und Larynxkarzinome sowie des Gesamtkollektivs (Mittelwert und Spannweite)

	Larynxdysplasien n = 38	Larynxkarzinome n = 38	Gesamtkollektiv n = 76
Alter [Jahre]	56,5 (42 – 77)	60,8 (36 – 80)	58,6 (36 – 80)

Um die untersuchten Fälle der Larynxdysplasien näher zu charakterisieren, werden im folgenden die klinischen Diagnosen, die im Zusammenhang mit der Präparatgewinnung gestellt wurden, aufgeführt (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Klinische Diagnosen<sup>1)</sup> der untersuchten Fälle der Larynxdysplasien

	<b>LD I</b> n = 11		<b>LD II</b> n = 11		<b>LD III/CAIS</b> n = 16	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%
Larynxkarzinom	2	18,2	1	9,1	4	25,0
Verdacht auf Larynxkarzinom	-	-	-	-	7	43,8
Chronische Laryngitis	4	36,4	6	54,5	1	6,3
Reinke-Ödem	2	18,2	1	9,1	-	-
Leukoplakie	-	-	1	9,1	-	-
Stimmlippenpolyp	2	18,2	2	18,2	-	-
Taschenfaltenzyste	1	9,1	-	-	-	-
nicht bekannt	2	18,2	1	9,1	4	25,0

1) Mehrfachnennungen möglich

---

### 3.2 Ploidie-Status

Von den insgesamt 76 untersuchten histologischen Präparaten waren 33 (43,4 %) euploid und 43 (56,6 %) aneuploid.

In der Gruppe aller Epitheldysplasien waren 28 (73,7 %) Fälle euploid sowie zehn (26,3 %) Fälle aneuploid. In der Gruppe der Plattenepithelzellkarzinome waren fünf (13,2 %) Fälle euploid und 33 (86,8 %) aneuploid. Der Anteil der euploiden sowie aneuploiden Fälle differenziert nach den verschiedenen diagnostischen Gruppen ist in den folgenden Histogrammen (Abb. 3.1 und Abb. 3.2) dargestellt. Die Tab. 8.3 und Tab. 8.4 im Anhang zeigen die Anzahl der euploiden und aneuploiden Fälle der Larynxdysplasien. Bis auf die Ausnahme eines Falles in der Gruppe LD I waren alle aneuploiden Epitheldysplasien als zur Gruppe LD III/CAIS zugehörig klassifiziert worden. Alle fünf DNA-euploiden Karzinome waren histologisch als hoch differenzierte Karzinome klassifiziert worden.

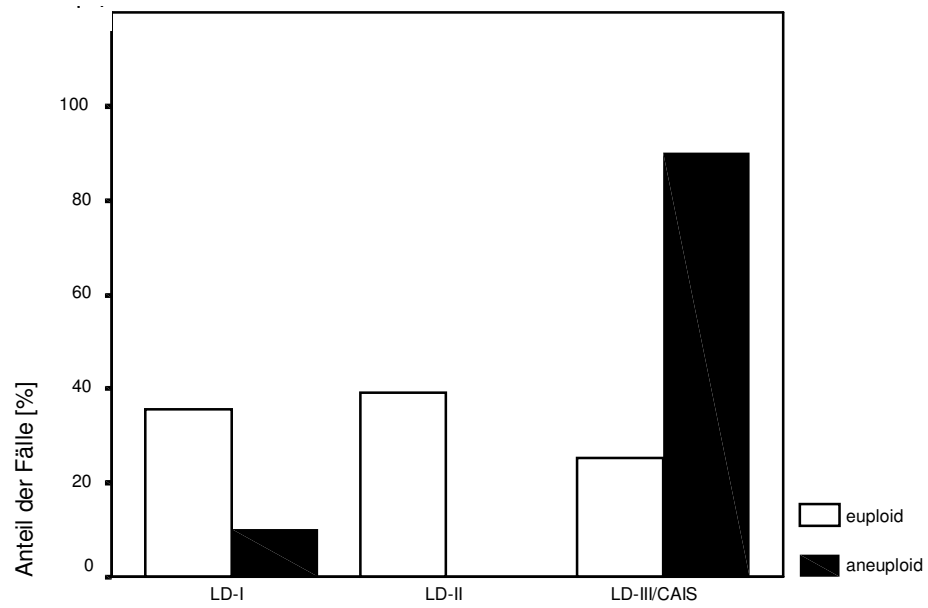


Abb. 3.1: Anteil der euploiden und aneuploiden Fälle differenziert nach der diagnostischen Gruppe der Larynxdysplasien

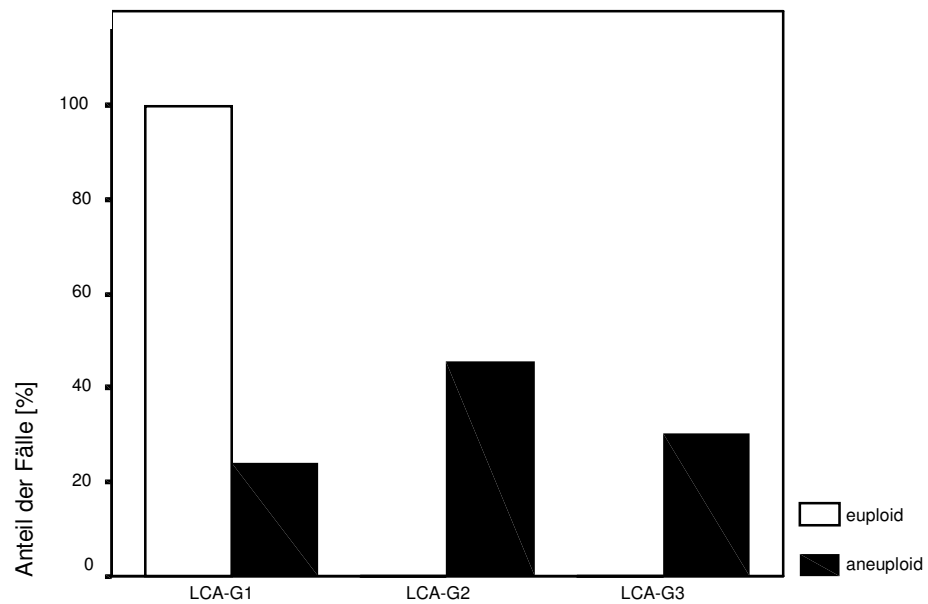


Abb. 3.2: Anteil der euploiden und aneuploiden Fälle differenziert nach der diagnostischen Gruppe der Larynxkarzinome

---

Ausgehend vom Malignitätskriterium Ploidie ergaben sich folgende Klassifikationsraten, wobei für dieses Merkmal bei Euploidie das Vorliegen einer benignen Läsion, im Falle von Aneuploidie das Vorliegen einer malignen Läsion angenommen wurde. Insgesamt wurden 80,3 % (n = 61) aller 76 untersuchten Präparate korrekt klassifiziert. Die Klassifikationsrate des Merkmals Ploidie für benigne Läsionen betrug im Kollektiv der Dysplasien 73,7 % (n = 28). Im Kollektiv der Karzinome wurden 86,8 % (n = 33) der Fälle zutreffend klassifiziert. Lediglich 61,5 % (n = 8) der hochdifferenzierten Karzinome wurden durch den Ploidie-Status korrekt klassifiziert. Für das hier beschriebene Merkmal ließ sich aufgrund seiner Nominalskalierung, anders als für die weiteren untersuchten Parameter, kein variabler Schwellenwert festlegen.

### **3.3 Kernfläche**

Der Mittelwert der Kernfläche aller 38 Dysplasien betrug  $40,37 \mu\text{m}^2$  mit einer Standardabweichung von  $11,31 \mu\text{m}^2$ . Für die Gruppe der 38 Larynxkarzinome lag die mittlere Kernfläche bei  $44,21 \mu\text{m}^2$  und die Standardabweichung bei  $12,95 \mu\text{m}^2$ .

Die Larynxkarzinome ( $\text{LCA}_{\text{Gesamt}}$ ) hatten zwar tendenziell eine größere Kernfläche als die Larynxdysplasien ( $\text{LD}_{\text{Gesamt}}$ ), der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die mittleren Kernflächen der drei Dysplasieschweregrade sowie der drei Differenzierungsgrade der Larynxkarzinome sind in den folgenden beiden Abbildungen (Abb. 3.3 und Abb. 3.4) sowie in Tab. 8.5 und Tab. 8.6 im Anhang dargestellt.

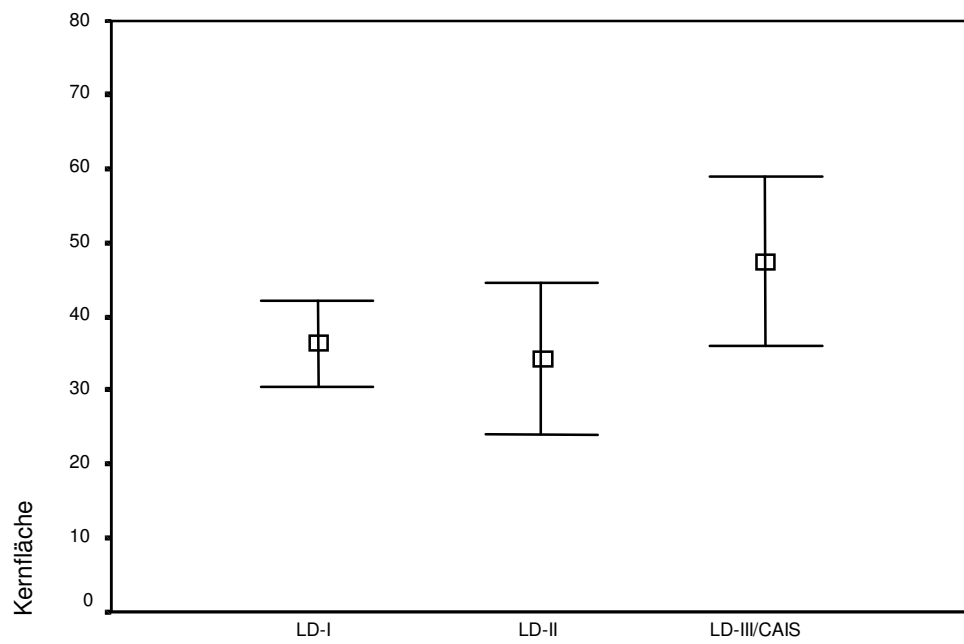


Abb. 3.3: Kernfläche [ $\mu\text{m}^2$ ] der Larynxdysplasien (Mittelwert und Standardabweichung)

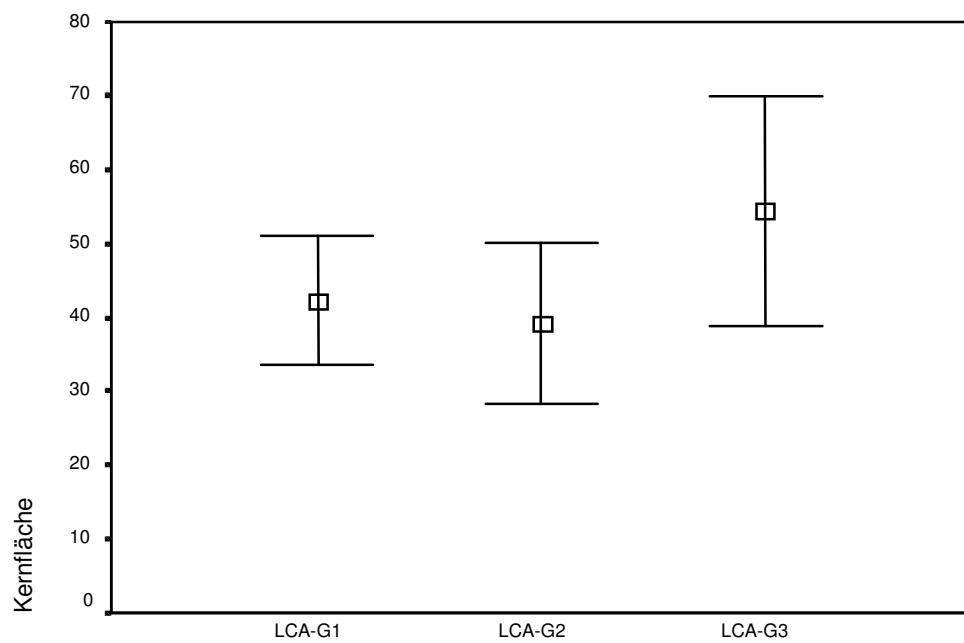


Abb. 3.4: Kernfläche [ $\mu\text{m}^2$ ] der Larynxkarzinome (Mittelwert und Standardabweichung)

---

Im Vergleich der Larynxepitheldysplasien untereinander fiel eine signifikant größere Kernfläche der schweren Epitheldysplasien jeweils gegenüber den leichten ( $p < 0,01$ ) und mittelschweren ( $p < 0,01$ ) Dysplasien auf. Leichte und mittelschwere Dysplasien zusammengefasst ließen sich ebenfalls durch signifikant kleinere Kernflächen von der Gruppe LD III/CAIS abgrenzen ( $p < 0,01$ ). Zwischen den leichten und mittelschweren Dysplasien bestand kein signifikanter Unterschied. Der Mittelwert der Gruppe LD II lag sogar leicht unter dem von Gruppe LD I.

Die Gruppe der niedrig differenzierten Karzinome wies sowohl eine signifikant höhere Kernfläche im Vergleich zu den mittelgradig ( $p < 0,01$ ) als auch zu den hoch differenzierten ( $p < 0,01$ ) Larynxkarzinomen auf. Hoch und mittelgradig differenzierte Karzinome unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Der Mittelwert der Gruppe LCA-G2 lag leicht unter dem von Gruppe LCA-G1.

Leichte und mittelschwere Dysplasien unterschieden sich jeweils und auch zusammengefasst durch signifikant kleinere Kernflächen von der Gruppe der gesamten Karzinome ( $p < 0,01$ ). Auch im Vergleich der leichten sowie mittelschweren Dysplasien mit der Gruppe der niedrig differenzierten Karzinome konnten signifikant geringere Kernflächen der dysplastischen Epithelveränderungen beobachtet werden ( $p < 0,01$ ). Leichte und mittelschwere Epitheldysplasien zu einer Gruppe zusammengefasst, boten signifikant kleinere Kernflächen als hoch ( $p < 0,01$ ) und auch als niedrig differenzierte ( $p < 0,01$ ) Larynxkarzinome, zu den mittelgradig differenzierten Tumoren bestand jedoch kein signifikanter Unterschied. Die Fälle der Gruppe LD III/CAIS zeigten weder zur Gruppe der gesamten Karzinome noch zu den verschiedenen diagnostischen Gruppen der malignen Läsionen signifikante Unterschiede in Bezug auf die Kernfläche.

Eine für die Diagnostik entscheidende Größe ist die Klassifikationsrate eines Parameters. Hierin drückt sich aus, wieviel Prozent der Fälle zweier verglichener Gruppen durch den untersuchten Parameter jeweils korrekt klassifiziert werden. Eine möglichst genaue Trennung von Dysplasien und Karzinomen ergab für die Kernfläche der Schwellenwert von  $42,29 \mu\text{m}^2$ . Für das Überschreiten des Schwellenwertes wurde

das Vorliegen einer malignen Läsion, für das Unterschreiten oder bei gleichem Wert das Vorliegen einer benignen Läsion angenommen. So wurden 55,3 % (n = 42) aller untersuchten Präparate korrekt klassifiziert. In der diagnostischen Gruppe der Dysplasien lagen 63,2 % (n = 24) der Fälle ihrer Dignität entsprechend unter dem Schwellenwert. Die einzelnen Klassifikationsraten sind in Tab. 8.11 im Anhang dargestellt. In der folgenden Abb. 3.5 sind die Werte der Kernfläche, geordnet nach entsprechenden Gruppen der Larynxdysplasien, oberhalb und unterhalb des Schwellenwertes gezeigt.

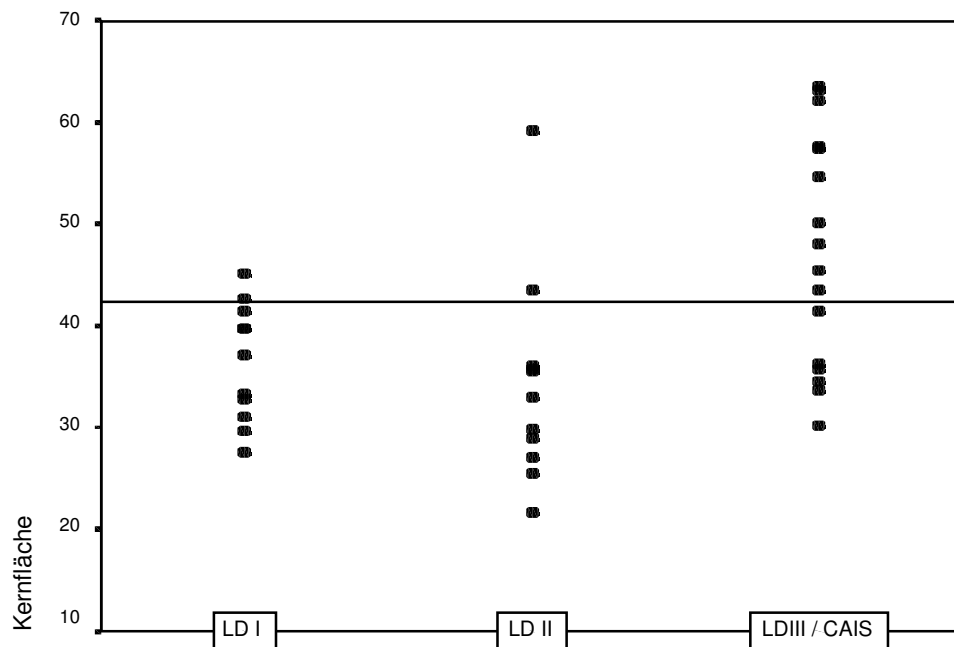


Abb. 3.5: Kernfläche [ $\mu\text{m}^2$ ] aller Fälle der Larynxdysplasien

Von den 38 ausgewerteten Karzinomen lagen 18 über dem Schwellenwert und wurden damit korrekt klassifiziert. Es ergab sich somit eine Klassifikationsrate von 47,4 % für die Gruppe der Karzinome. Die einzelnen Klassifikationsraten sind in Tab. 8.12 im Anhang dargestellt. Abb. 3.6 zeigt die Kernflächenwerte der diagnostischen Gruppen der Larynxkarzinome oberhalb und unterhalb des Schwellenwertes von  $42,29 \mu\text{m}^2$ .

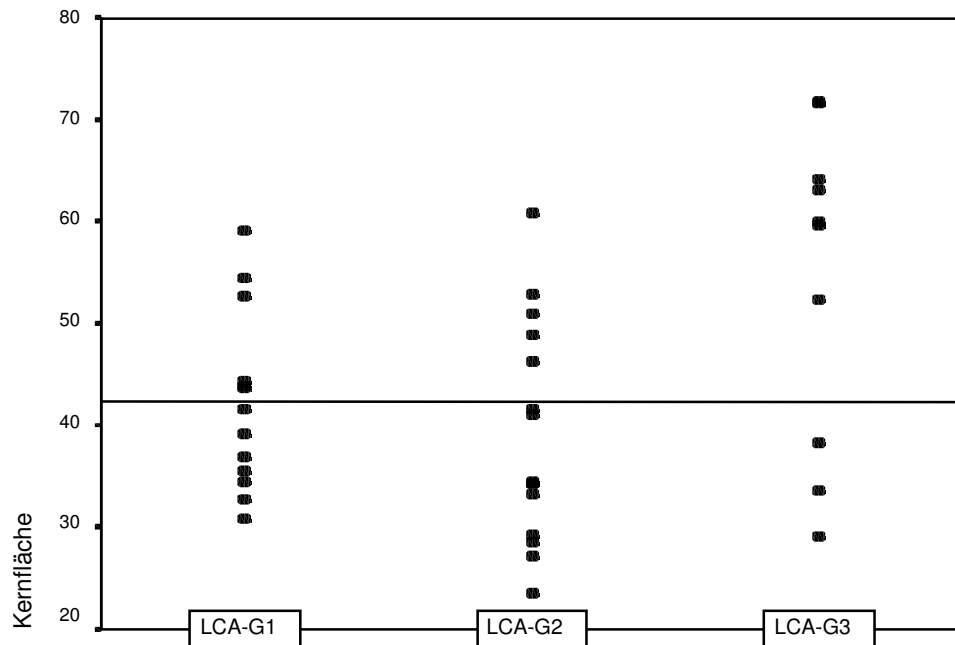


Abb. 3.6: Kernfläche [ $\mu\text{m}^2$ ] aller Fälle der Larynxkarzinome

Der Schwellenwert der Kernfläche stellt eine grundsätzlich variable Größe dar. Die Rate der falsch positiv oder falsch negativ klassifizierten Fälle eines Kollektivs ist vom gewählten Schwellenwert abhängig. Zur Berechnung der Anzahl der falsch klassifizierten Läsionen wurde der Schwellenwert schrittweise um  $1 \mu\text{m}^2$  erhöht bzw. vermindert und der prozentuale Anteil der falsch positiven Larynxdysplasien sowie der falsch negativen Larynxkarzinome ermittelt. Die Rate der falsch positiv und falsch negativ klassifizierten Fälle wird für die verschiedenen Schwellenwerte der Kernfläche im Vergleich zu den entsprechenden Klassifikationsraten der Kernflächenschwankung und des Multiparameteratypieindex in Abb. 3.16 (S. 35) dargestellt.



### 3.4 Kernflächenschwankung

Der Mittelwert der Kernflächenschwankung aller untersuchten Larynxepitheldysplasien betrug  $16,66 \mu\text{m}^2$  mit einer Standardabweichung von  $8,45 \mu\text{m}^2$ . Die Gruppe der Larynxkarzinome bot eine Kernflächenschwankung von  $16,49 \mu\text{m}^2$  mit einer Standardabweichung von  $6,79 \mu\text{m}^2$ .

Die Mittelwerte von Larynxdysplasien ( $\text{LD}_{\text{Gesamt}}$ ) und Karzinomen ( $\text{LCA}_{\text{Gesamt}}$ ) unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die mittleren Kernflächenschwankungen der drei Dysplasieschweregrade sowie der drei Differenzierungsgrade der Larynxkarzinome sind in den folgenden beiden Abbildungen (Abb. 3.7 und Abb. 3.8) sowie in Tab. 8.7 und Tab. 8.8 im Anhang dargestellt.

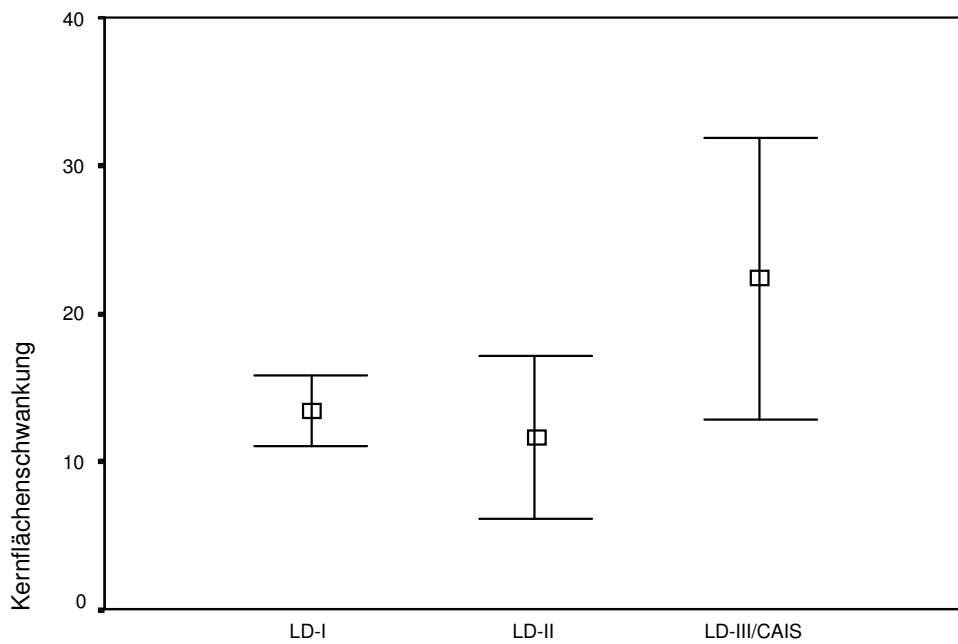


Abb. 3.7: Kernflächenschwankung [ $\mu\text{m}^2$ ] der Larynxdysplasien (Mittelwert und Standardabweichung)

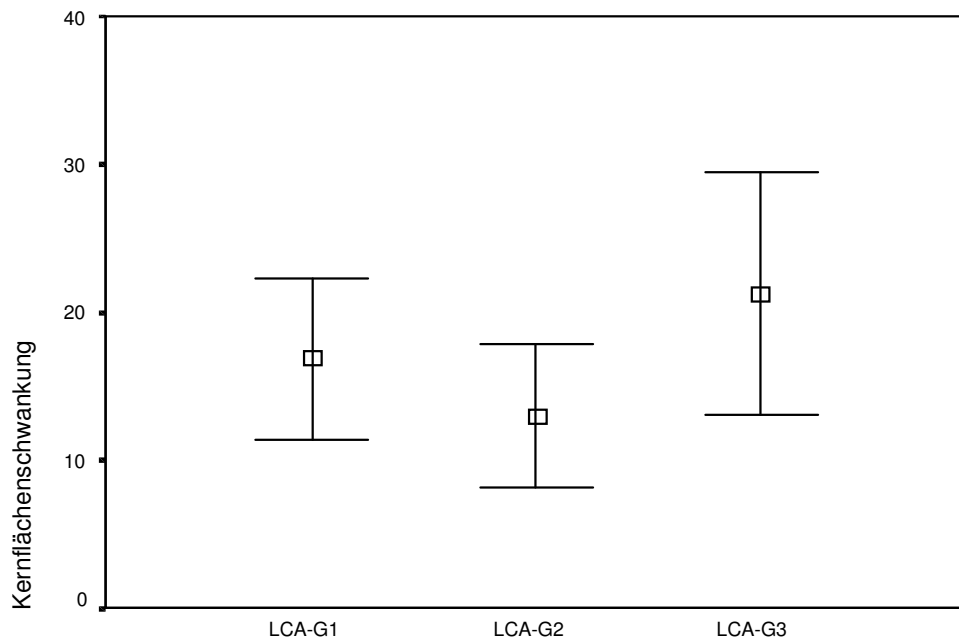


Abb. 3.8: Kernflächenschwankung [ $\mu\text{m}^2$ ] der Larynxkarzinome (Mittelwert und Standardabweichung)

Der Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander ergab für die Larynxepitheldysplasien eine signifikant größere Kernflächenschwankung der Gruppe LD III/CAIS sowohl gegenüber den leichten ( $p < 0,01$ ) als auch mittelschweren ( $p < 0,01$ ) Dysplasien. Leichte und mittelschwere Dysplasien in einer Gruppe zusammengefasst ließen sich ebenfalls durch signifikant kleinere Kernflächenschwankungen von der Gruppe LD III/CAIS abgrenzen ( $p < 0,01$ ). Zwischen den leichten und mittelschweren Dysplasien bestand kein signifikanter Unterschied. Der Mittelwert der Kernflächenschwankung der Gruppe LD II lag unter dem von Gruppe LD I.

Die niedrig differenzierten Karzinome wiesen eine signifikant höhere Kernflächenschwankung als die Gruppe der mittelgradig differenzierten Karzinome auf ( $p < 0,01$ ). Im Vergleich zu den hoch differenzierten Larynxkarzinomen waren die Werte der niedrig differenzierten Karzinome zwar tendenziell, jedoch nicht signifikant höher. Der Mittelwert der hoch differenzierten Malignome war etwas höher als der der mittelgradig

---

differenzierten. Zwischen diesen Gruppen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Kernflächenschwankung nachgewiesen werden.

Leichte ( $p < 0,01$ ) und auch mittelschwere ( $p < 0,01$ ) Epitheldysplasien wiesen signifikant geringere Kernflächenschwankungen auf als niedrig differenzierte Karzinome. Die Gruppen der hoch differenzierten ( $p < 0,01$ ) sowie der niedrig differenzierten ( $p < 0,01$ ) Karzinome ließen sich durch ihre signifikant größere Kernflächenschwankung von der aus leichten und mittelschweren Dysplasien zusammengefassten Gruppe abgrenzen. Beide genannten Karzinomgruppen wiesen auch signifikant größere Kernflächenschwankungen als die mittelschweren Epitheldysplasien auf ( $p < 0,01$ ). Von der diagnostischen Gruppe der schweren Epitheldysplasien unterschieden sich lediglich die mittelgradig differenzierten Karzinome ( $p < 0,01$ ) sowie die Gruppe der gesamten Karzinome ( $p < 0,01$ ) signifikant durch eine größere Kernflächenschwankung. Zu den leichten und den mittelschweren Dysplasien sowie zur beide Kollektive zusammenfassenden Gruppe, zeigte die Gruppe der mittelgradig differenzierten Karzinome keine signifikant unterschiedlichen Werte.

Der Schwellenwert der Kernflächenschwankung von  $16,58 \mu\text{m}^2$  ergab die optimale Klassifikationsrate für Dysplasien und Karzinome. Für das Überschreiten des Schwellenwertes wurde das Vorliegen einer malignen Läsion, bei gleichem Wert oder Unterschreiten das Vorliegen einer benignen Läsion angenommen. So wurden 55,0 % ( $n = 42$ ) aller 76 untersuchten Präparate korrekt klassifiziert. In der diagnostischen Gruppe der Dysplasien lagen 60,5 % ( $n = 23$ ) der Fälle ihrer Dignität entsprechend unter dem Schwellenwert. Die einzelnen Klassifikationsraten sind in Tab. 8.13 im Anhang dargestellt. Die folgende Abb. 3.9 zeigt die Werte der Kernflächenschwankung geordnet nach entsprechenden Gruppen der Larynxdysplasien oberhalb und unterhalb des Schwellenwertes von  $16,58 \mu\text{m}^2$ .

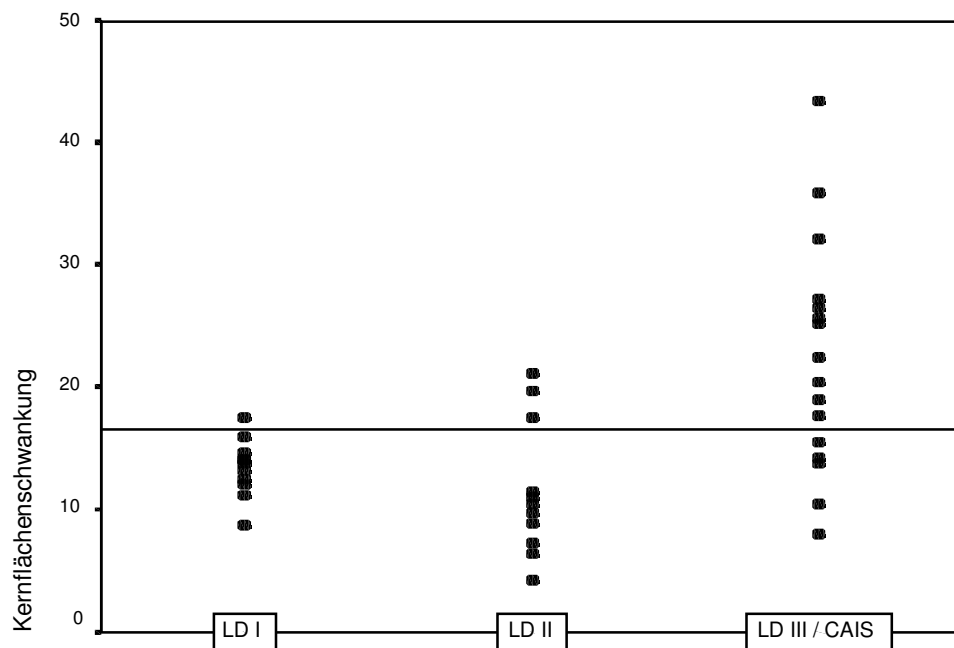


Abb. 3.9: Kernflächenschwankung [ $\mu\text{m}^2$ ] aller Fälle der Larynxdysplasien

Von den 38 ausgewerteten Karzinomen lagen 19 über dem Schwellenwert von  $16,58 \mu\text{m}^2$  und wurden damit zutreffend klassifiziert. In der Gruppe der Karzinome ergab sich somit eine Klassifikationsrate von 50,0 %. Lediglich 46,2 % ( $n = 6$ ) der hochdifferenzierten Karzinome wurden durch die Kernfläche korrekt klassifiziert. Die einzelnen Klassifikationsraten sind in Tab. 8.14 im Anhang dargestellt. In Abb. 3.10 sind die Werte der Kernflächenschwankung der diagnostischen Gruppen der Larynxkarzinome oberhalb und unterhalb des Schwellenwertes dargestellt.

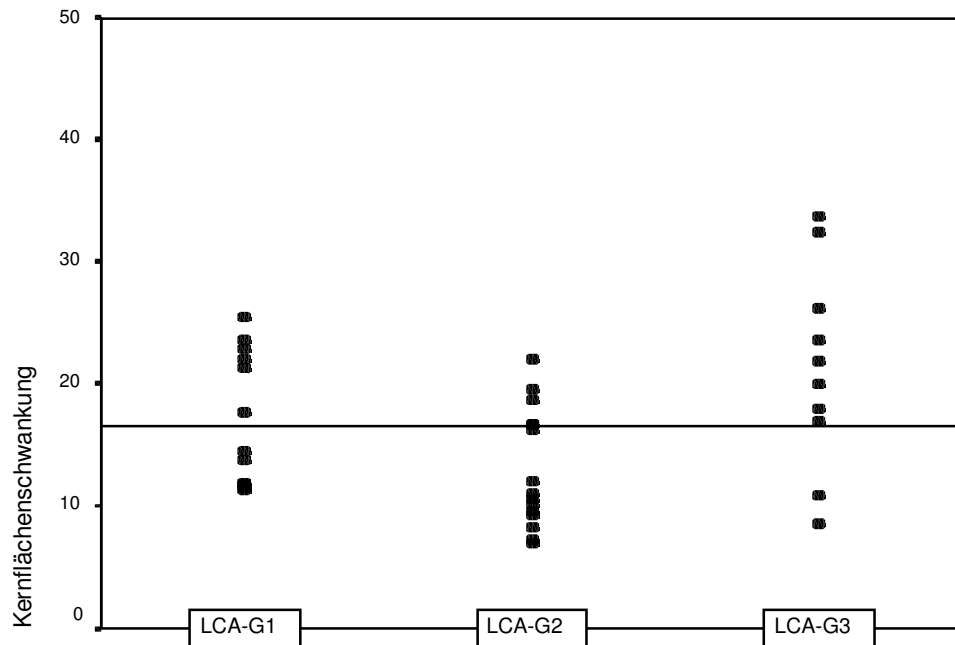


Abb. 3.10: Kernflächenschwankung [ $\mu\text{m}^2$ ] aller Fälle der Larynxkarzinome

Der Schwellenwert der Kernflächenschwankung stellt wiederum eine variable Größe dar. Zur Berechnung der Anzahl der falsch klassifizierten Läsionen bei verschiedenen Schwellenwerten wurde dieser schrittweise um  $1 \mu\text{m}^2$  erhöht bzw. vermindert und der prozentuale Anteil der falsch positiven Larynxdysplasien sowie der falsch negativen Larynxkarzinome ermittelt. Die Rate der anhand der Kernflächenschwankung falsch positiv und falsch negativ klassifizierten Fälle wird im Vergleich zu den entsprechenden Klassifikationsraten der Kernfläche und des Multiparameteratypieindex in Abb. 3.16 (S. 35) dargestellt.

### 3.5 Multiparameteratypieindex

Der Mittelwert des MAI aller Dysplasien betrug 0,34 mit einer Standardabweichung von 1,45. Für die alle Larynxkarzinome zusammenfassende Gruppe betrug der Mittelwert des MAI 1,65 mit einer Standardabweichung von 1,10. Die mittleren MAI-Werte der drei Dysplasieschweregrade sowie der drei Differenzierungsgrade der Larynxkarzinome sind in den folgenden beiden Abbildungen (Abb. 3.11 und Abb. 3.12) sowie in Tab. 8.9 und Tab. 8.10 im Anhang dargestellt.

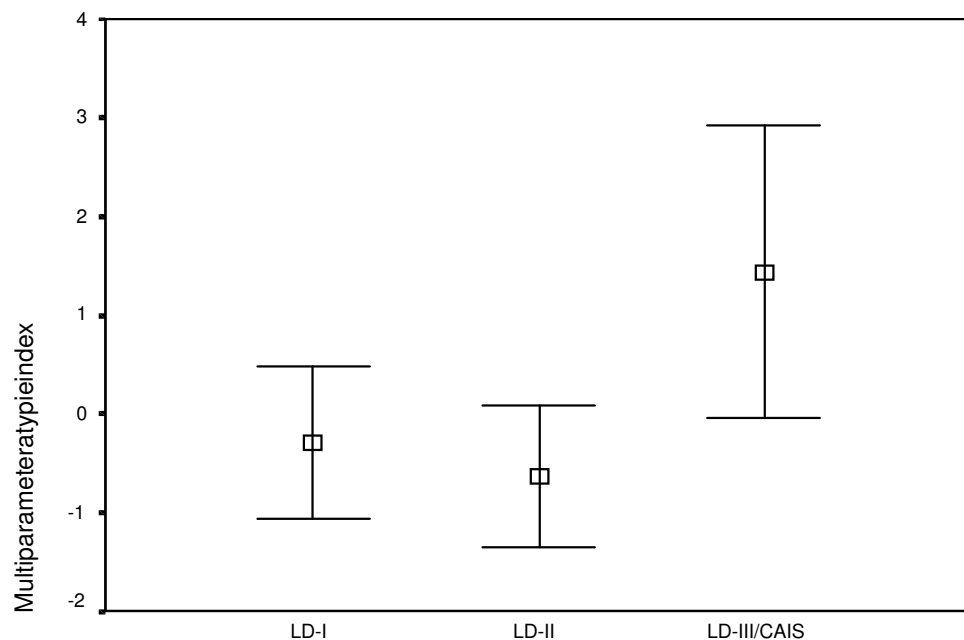


Abb. 3.11: Multiparameteratypieindex der Larynxdysplasien (Mittelwert und Standardabweichung)

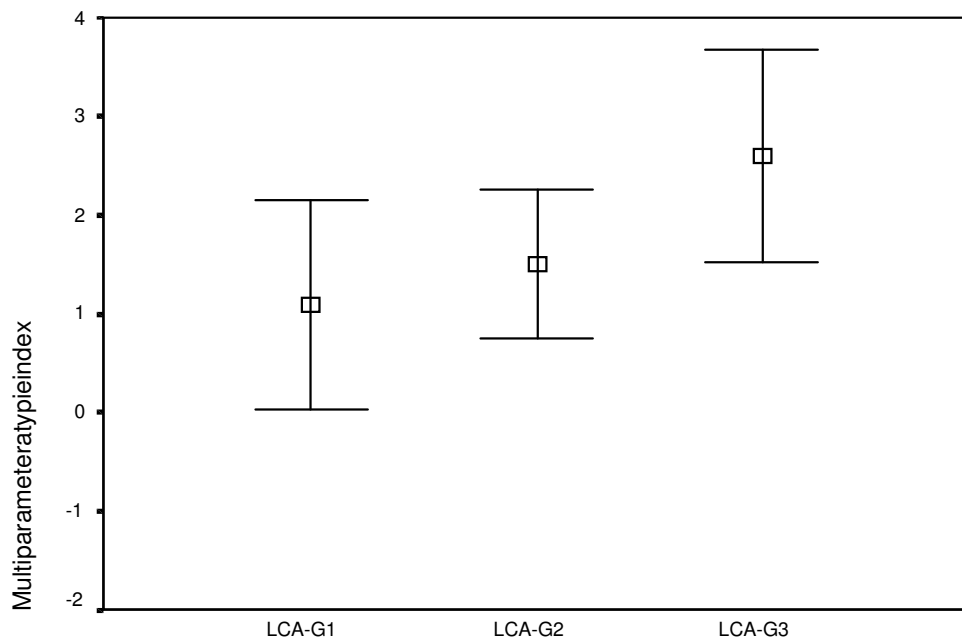


Abb. 3.12: Multiparameteratypieindex der Larynxkarzinome (Mittelwert und Standardabweichung)

Die Epitheldysplasien untereinander vergleichend, zeigten sich tendenziell geringere MAI-Werte der leichten und mittelschweren Dysplasien im Vergleich zur Klasse der schweren Dysplasien. Der mittlere MAI-Wert der Gruppe LD II war geringer als der der Gruppe LD I.

Im Vergleich der Karzinome untereinander stiegen die Mittelwerte des MAI von den hoch bis niedrig differenzierten Karzinomen an (s. Tab. 8.10 im Anhang).

Sowohl die Gruppen der leichten als auch der mittelschweren Dysplasien wiesen tendenziell geringere MAI-Werte auf als die Gruppen der gesamten Karzinome sowie der hoch, mittelgradig und niedrig differenzierten Karzinome. Das Kollektiv der schweren Larynxepitheldysplasien bot einen geringeren MAI-Mittelwert als die Gruppe der gesamten, niedrig und mittelgradig differenzierten Karzinome. Die hoch differenzierten Karzinome wiesen einen geringeren MAI-Mittelwert auf als die Präparate der Gruppe der schweren Larynxepitheldysplasien.

Von den 38 ausgewerteten Dysplasien ergab sich für 21 (55,3 %) Fälle ein MAI kleiner als Null. Diese Präparate wurden also durch den MAI als benigne klassifiziert. Siebzehn (44,7 %) Fälle zeigten einen MAI-Wert größer als Null und wurden entsprechend als maligne klassifiziert.

Im Vergleich dazu boten 36 Fälle (94,7 %) der 38 untersuchten Larynxkarzinome einen MAI-Wert über Null und konnten damit als maligne klassifiziert werden. Nur zwei (5,3 %) Fälle wurden durch einen MAI-Wert kleiner als Null in die Kategorie benigner Fälle eingestuft. Der Anteil an Fällen mit MAI-Werten kleiner oder gleich bzw. größer als Null differenziert nach Dysplasien und Karzinomen ist im folgenden Histogramm (Abb. 3.13) dargestellt. In Tab. 8.15 und Tab. 8.16 im Anhang wird die Anzahl der Fälle der diagnostischen Gruppen mit MAI-Werten kleiner oder gleich bzw. größer als Null gezeigt.

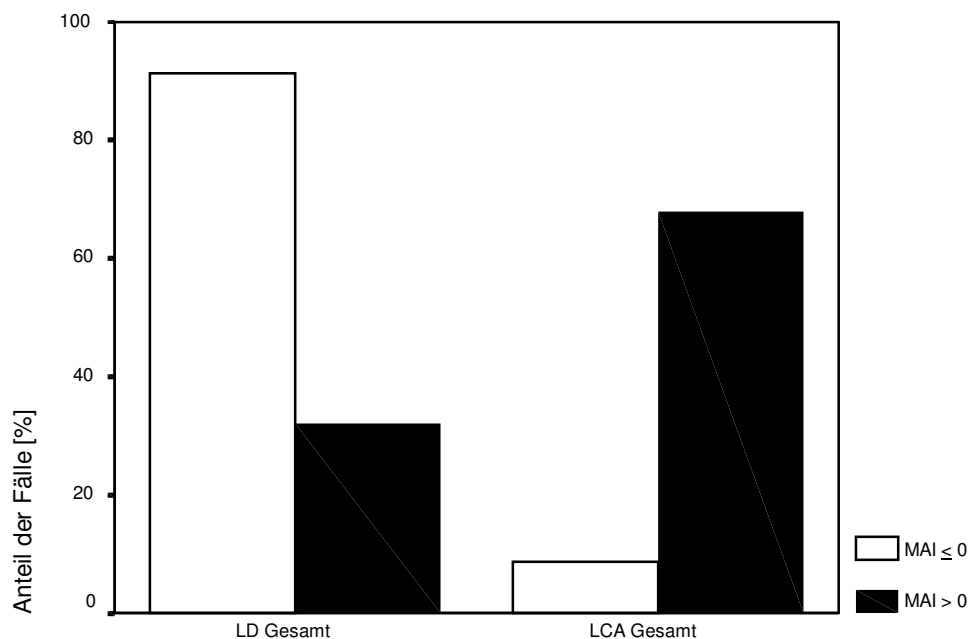


Abb. 3.13: Anteil der als benigne (MAI-Werte  $\leq 0$ ) und als maligne (MAI-Werte  $> 0$ ) klassifizierten Fälle differenziert nach Larynxdysplasien (LD) und Larynxkarzinomen (LCA)



Das folgende Streudiagramm (Abb. 3.14) zeigt die MAI-Werte aller Fälle, geordnet nach den entsprechenden diagnostischen Gruppen der Larynxdysplasien. Die MAI-Werte der leichten Larynxdysplasien lagen mit Ausnahme von zwei Fällen (18,2 %) im Bereich unter Null. Für die Gruppe der mittelschweren Dysplasien wurde ebenfalls für alle bis auf zwei Präparate (18,2 %) ein MAI-Wert kleiner als Null bestimmt. Es wurden also für die Gruppe LD I sowie für die Gruppe LD II jeweils neun (81,8 %) der Fälle, ihrer histomorphologischen Klassifikation entsprechend, als nicht maligne ausgewiesen. Die 16 untersuchten schweren Epitheldysplasien und Carcinomata in situ boten lediglich drei Fälle (18,8 %) mit MAI-Werten kleiner als Null. Alle 13 (81,2 %) verbliebenen Präparate wiesen MAI-Werte größer als Null auf. Diese wurden durch den MAI-Wert entsprechend als maligne klassifiziert.

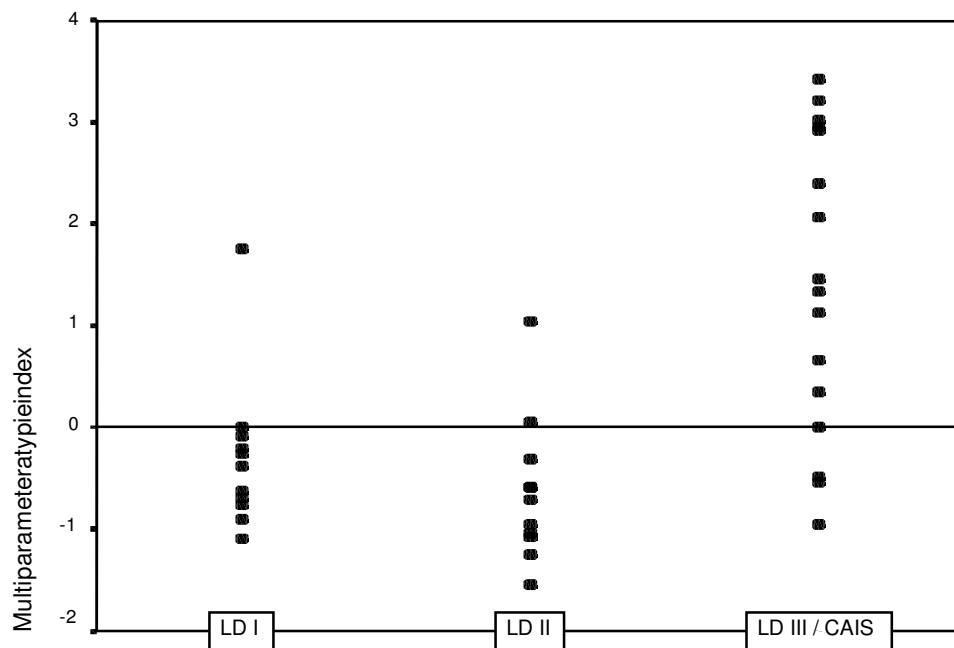


Abb. 3.14: Multiparameteratypieindex-Werte aller Fälle der Larynxdysplasien

Unter den hoch differenzierten Karzinomen wurden lediglich zwei Fälle (15,4 %) durch den MAI-Wert als gutartig klassifiziert, die restlichen 11 (84,6 %) boten ihrer Dignität entsprechend einen MAI-Wert größer als Null (Abb. 3.15). In den Gruppen der

mittelgradig differenzierten und der niedrig differenzierten Larynxkarzinome wurden jeweils für alle 15 bzw. zehn Fälle MAI-Werte größer als Null ausgewiesen und damit entsprechend jeweils 100 % der Präparate als maligne erkannt.

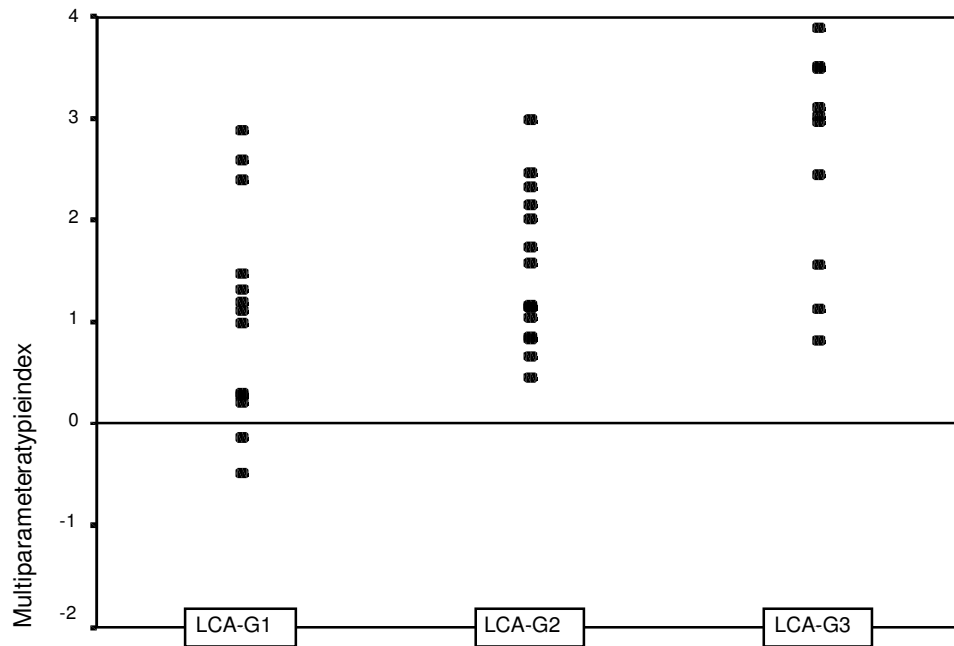


Abb. 3.15: Multiparameteratypieindex-Werte aller Fälle der Larynxkarzinome

Der Schwellenwert des MAI ist ebenfalls eine variable Größe. Zur Berechnung der Anzahl der falsch klassifizierten Läsionen wurde der Schwellenwert schrittweise um den Betrag 0,2 erhöht bzw. vermindert und der prozentuale Anteil der falsch positiven Larynxdysplasien sowie der falsch negativen Larynxkarzinome ermittelt. Die Rate der falsch positiv und falsch negativ klassifizierten Fälle wird für die verschiedenen Schwellenwerte des MAI sowie der morphometrischen Parameter in der folgenden Abb. 3.16 dargestellt.

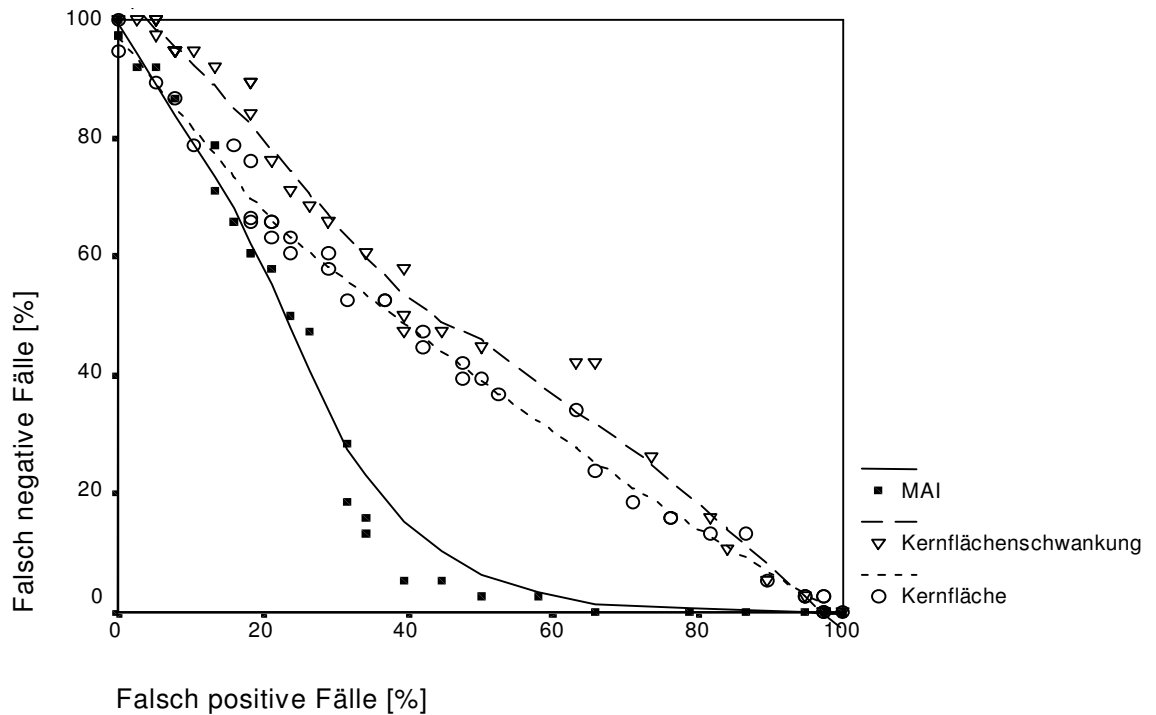


Abb. 3.16: Rate der falsch positiv und falsch negativ klassifizierten Fälle des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit von den Schwellenwerten der Kernfläche, der Kernflächenschwankung sowie des Multiparameteratypieindex (MAI) (Prozentuale Anteile und Anpassungslinie<sup>2</sup>)

Der Kurvenverlauf veranschaulicht die deutlich bessere Klassifikationsgenauigkeit des Multiparameteratypieindex im Vergleich zu den morphometrischen Parametern Kernfläche und Kernflächenschwankung. Für den Ploidie-Status ließ sich aufgrund der Nominalskalierung dieses Parameters kein variabler Schwellenwert festlegen und entsprechend keine Grafik bzw. Anpassungslinie zur Darstellung der schwellenwertabhängigen Rate falsch positiv oder negativ klassifizierter Läsionen erstellen.

Im Vergleich zum Ploidie-Status allein steigerte die Verwendung des MAI die Rate als maligne klassifizierter Fälle für die Gruppe LD III von 56,2 % auf 81,2 %, die Rate entsprechend klassifizierter Fälle der hoch differenzierten Karzinome von 61,5 % auf

<sup>2</sup> Lokal gewichtete Anpassungslinie nach der Methode der kleinsten Quadrate (Lowess)

---

84,6 % und die Rate als maligne klassifizierter Fälle für die Gruppe  $LCA_{\text{Gesamt}}$  von 86,8 % auf 94,7 %.

---

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Parameter zellkernassoziierter Malignitätskriterien von Plattenepithelzell dysplasien und -karzinomen des Larynx im Hinblick auf eine exaktere Unterscheidung von Karzinomen und ihren möglichen Vorläuferläsionen untersucht. Als morphometrische Parameter wurden hierzu die Kernfläche sowie die Kernflächenschwankung und als qualitativer Parameter des DNA-Gehalts der Ploidie-Status herangezogen. Abschließend wurde untersucht inwieweit der mit Hilfe der oben genannten Merkmale berechnete Multiparameteratypieindex geeignet ist, benigne bzw. maligne Larynxepithelveränderungen zu unterscheiden sowie hochdifferenzierte Larynxkarzinome bzw. Vorläuferläsionen zu klassifizieren.

### 4.1 Klassifikationssysteme

Derzeit existieren eine Reihe von Klassifikationssystemen für laryngeale Neoplasien. Vor allem im Hinblick auf die Prognose von Karzinomen wurden verschiedene Parameter einzeln, immer häufiger aber auch in Kombination miteinander untersucht.

Bosatra et al. [1997] untersuchten Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches welche aus Dysplasien hervorgegangen waren und klassifizierten anhand der Kriterien der WHO. Ein Zusammenhang zwischen Patientenalter sowie Schweregrad der Larynxepitheldysplasie und maligner Entartung konnte nachgewiesen werden.

Silvestri et al. [1997] unterteilten in ihrer Studie zur Untersuchung der prognostischen Wertigkeit histopathologischer Marker bei Plattenepitheldysplasien und -karzinomen von Kopf und Hals das Kollektiv der Dysplasien lediglich in gering und hochgradige Läsionen. Carcinomata in situ bildeten eine separate Klasse. Die Karzinome wurden nach dem invasive cell grading score nach Bryne et al. [1992] eingeordnet. In diesem Klassifikationssystem wurden Charakteristika wie Keratinisierung, Zellkernpolymorphismus, Invasionsmuster und Leukozyteninfiltration des angrenzenden Gewebes bewertet. Genannte Parameter wurden ausschließlich in den 4-6 distalsten Zellschichten des invasiven Tumorzellverbandes ausgewertet. Diese Beschränkung auf die tiefe

---

Tumorregion grenzt das Verfahren gegen andere ab. Begründet wurde die Analyse eines relativ kleinen Tumorareales mit der lokalisationsbedingten, geringeren Invasionskapazität tumorzentral gelegener Zellen. Ausgehend von einer Heterogenität des Tumorgewebes [Nicholson 1987] durch Beobachtungen zunehmender Entdifferenzierung der Zellen Richtung Tumorgrund [Bryne 1991, Bryne et al. 1992, Hambræus et al. 1988], erscheinen biologische Unterschiede in verschiedenen Tumorarealen wahrscheinlich. Ein erhöhter Nachweis von Proliferationsmarkern [Kearsley et al. 1990], Adhäsionsmolekülen [Aruffo et al. 1992, Mattijsen et al. 1993] und Blutgruppenantigenen [Bryne et al. 1991] in Zellen der Tumorfront unterstützen diese These. Nach Bryne et al. [1995] erwies sich dieses Klassifikationssystem im Hinblick auf die Prognose von Glottiskarzinomen sogar der T-Kategorie der TNM-Klassifikation als überlegen. Ein weiterer Vorteil sollte eine erhebliche Zeitersparnis aufgrund des kleinen zu untersuchenden Tumorabschnittes sein.

Der inhomogene Aufbau invasiver Karzinome mit Zunahme von malignitätsassoziierten Veränderungen (z.B. in Bezug auf Zellkerngröße, Zellkerndichte oder DNA-Gehalt) in Richtung Basalmembran bzw. angrenzendem Stroma konnte auch eindrucksvoll von Dreyer et al. [1994 und 1995], Lindholm und Rubio [1989] sowie Stenersen et al. [1992] gezeigt werden.

Nativ et al. [1996] verglichen histologisches Tumorgrading mit Parametern der Zellkernmorphometrie im Hinblick auf die Prognose von Nierenzellkarzinomen. Zellkernfläche und Zellkernlängenfaktor zeigten sich dem histologischen Grading in Bezug auf Vorhersage von erkrankungsfreiem Intervall und Überlebenszeit überlegen. Auch die TNM-Klassifikation wurde weiterentwickelt. Von Glanz et al. [1993] wurde vorgeschlagen, die T-Kategorie der Larynxkarzinome nach Millimetern größter Oberflächen- und Tiefenausdehnung und nicht mehr nach anatomischen Regionen anzugeben.

Ein weit verbreitetes Gradingmerkmal ist auf den DNA-Gehalt der Zellkerne bezogen, welcher überwiegend aus durchflusszytometrischen Messungen [Barona de Guzman et al. 1992, Barona de Guzman et al. 1993, Kusaba 1992, Miyagi et al. 1994, Sprenger et al. 1974, Stern et al. 1995, Toffoli et al. 1995, Zhou 1991] sowie DNA-Bildzytometrie

---

[Bjelkenkrantz et al. 1983, Welkoborsky et al. 1995, Sudbø et al. 2001] ermittelt wird. Im Hinblick auf die Quantifizierung von Zellkern-DNA ergeben sich Probleme die in Kap. 4.4 (S. 45 ff) noch ausführlich erläutert werden.

Alle diskutierten Faktoren repräsentieren wichtige Aspekte der Tumorbiologie. Die Bedeutung von Proliferationsmarkern wie p53, ki67, PCNA aber auch AgNOR [Altemani et al. 1995, Bockmühl et al. 1992, Öfner et al. 1995] sowie des Zellkern-DNA-Gehaltes liegt in der Identifikation proliferierender Tumorzellen. Die invasive Tumorfront bzw. basale Zellschicht [Bryne et al. 1992 und 1995, Welkoborsky et al. 1995] stellen die unmittelbare Proliferationszone des Tumors dar. Hieraus lassen sich Hinweise auf zukünftiges Zellverhalten ableiten [Shabana et al. 1987]. Die Invasionsfront erscheint zudem als die Lokalisation mit der unmittelbarsten morphologischen Information über Tumorbiologie und Reaktion des Organismus [Bryne et al. 1992 und 1995]. Aufgrund der oben diskutierten Faktoren wurden die tumorgrundnahen Areale auch in vorliegender Arbeit untersucht.

Die Gradingssysteme laryngealer Neoplasien basieren auf subjektiven morphologischen Kriterien und sind daher stark untersucherabhängig. Alle entwickelten und vorgeschlagenen Systeme haben das gemeinsame Ziel, möglichst untersucherunabhängige, reproduzierbare Klassifikationssysteme zu etablieren. Bisher ergab sich keine umfassend befriedigende Lösung, so dass zumindest in Bezug auf morphologische Veränderungen das bewährte System der Klassifikation nach Kleinsasser [1963] weiter Verwendung findet [Lubsen und Olde Kalter 1992]. Auch in vorliegender Untersuchung fand, aufgrund der weiten Verbreitung und allgemeinen Akzeptanz, Kleinsassers [1963] Klassifikationssystem Anwendung.

Mit Blick auf die Prognose bei invasiven Karzinomen ist das Malignitätsgrading jedoch nur ein Kriterium, welches neben Parametern wie Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung entsprechend eingeordnet werden sollte [Donhuijsen et al. 1991].

Die heutigen Diagnose- und Therapiemöglichkeiten erfassen und eliminieren Larynxepithelläsionen immer frühzeitiger, so dass es kaum mehr möglich ist, Verläufe oder gar

---

Endpunkte einer Erkrankung zu beobachten. Für die Erstellung aktueller Klassifikationen bzw. deren Weiterentwicklung ist man stets auf Verlaufs- und Fallbeobachtungen aus der länger zurückliegenden Vergangenheit mit den damaligen technischen Beschränkungen und dem begrenzten Wissen angewiesen. Das bedeutet, dass vielversprechende neue diagnostische Ansätze heute kaum noch auf ihre biologische und prognostische Bedeutung hin überprüft werden können.

## 4.2 Ploidie-Status

Der Zellkern-DNA-Gehalt als Malignitätsmarker wird heute allgemein anerkannt. Entsprechende Ergebnisse sind aus zahlreichen Studien bekannt [Böcking et al. 1985, Danic et al. 2000, Dietel et al. 1983, Dreyer et al. 1995, Friedlander et al. 1984, Höfken et al. 1995, Kashyap et al. 1990, Makiyama et al. 1995, Mellin et al. 1990, Motherby et al. 1998 I und 1998 II, Sachs et al. 1974, Smith et al. 1996, Sudbø et al. 2001]. Die chromosomale Aneuploidie wurde von Böcking und Motherby [1999] als wesentlicher kausaler Faktor für die neoplastische Transformation selbst beschrieben.

Nur wenige Autoren konnten keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem DNA-Gehalt und maligner Entartung feststellen [Benazzo et al. 1995, Crissman und Zarbo 1991]. So erwiesen sich in der Studie von Benazzo et al. [1995] lediglich 50 % aller untersuchten Karzinome als aneuploid. Dieser relativ geringe Anteil aneuploider Karzinome ist vor dem Hintergrund zu interpretieren, dass hier eine zumindest für die DNA-Analyse ungewöhnliche Bromodeoxyuridin-Färbung angewendet wurde und der Anteil an hoch differenzierten Karzinomen relativ hoch war. Die Ergebnisse, welche die Autoren in Zusammenhang mit der Tumorverdoppelungszeit und dem Differenzierungsgrad aufzeigten, unterstützen die zahlreich demonstrierte Beziehung zwischen Malignität und Aneuploidie.

Durch die Messung der integrierten optischen Dichte am Schnittpräparat (IOD<sub>S</sub>) wurde in vorliegender Arbeit auf den DNA-Gehalt der Zellkerne geschlossen. Da eine exakte Bestimmung des DNA-Gehaltes mit Hilfe der Bildanalyse an Schnittpräparaten nicht möglich ist, wurde lediglich qualitativ zwischen euploiden und aneuploiden Kollektiven



---

unterschieden. Die ausgewerteten Histogramme der als euploid und aneuploid klassifizierten Läsionen unterschieden sich deutlich voneinander. Es handelt sich bei dieser Klassifikation aber nicht um eine nachgewiesene Ploidie, sondern um ein mathematisch errechnetes Ploidieäquivalent, in dieser Arbeit als Ploidie-Status bezeichnet. In den meisten anderen Untersuchungen wird zur Eruiierung des DNA-Gehaltes von Zellverbänden die Durchflusszytometrie genutzt. Die Vor- und Nachteile der Durchflusszytometrie im Vergleich zur Bildzytometrie werden in Kap. 4.4 (S. 45 ff) ausführlich diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit waren 28 (73,7 %) aller Epitheldysplasien euploid und nur zehn Fälle (26,3 %) aneuploid. Lediglich ein aneuploider Fall gehörte zur Gruppe der leichten Dysplasien. Die anderen neun aneuploiden Fälle waren zuvor als zur Gruppe der schweren Dysplasien zugehörig klassifiziert worden. Unter den aneuploiden Dysplasien war ein Fall histologisch als leichte Dysplasie klassifiziert worden (s. Tab. 8.3 im Anhang). Ein Grund hierfür ist vermutlich die Tatsache, dass die Gruppe LD I auch Fälle mit reaktiven Veränderungen einschließt, was sich in erhöhter proliferativer Aktivität und damit auch in höheren Werten der integrierten optischen Feulgendichte äußert.

In Übereinstimmung mit anderen Studien [Bjelkenkrantz et al. 1983, El-Naggar et al. 1996, Munck-Wikland et al. 1991, Rua et al. 1991] waren auch in dieser Untersuchung die meisten Fälle der Karzinome bzw. der Carcinomata in situ und schweren Epitheldysplasien aneuploid. Im Kollektiv der untersuchten Larynxkarzinome fanden sich nur fünf (13,2 %) euploide Tumoren. Die große Mehrzahl der Karzinome, d.h. 33 (86,8 %) waren jedoch aneuploid. Alle fünf euploiden Karzinome waren histologisch als hoch differenzierte Karzinome klassifiziert worden (s. Tab. 8.4 im Anhang).

Ansteigende Grade der Dysplasien des Plattenepithels entsprechen zunehmenden Wahrscheinlichkeiten, dass sich die entsprechende Läsion in ein In-situ- bzw. später in ein invasives Plattenepithelkarzinom weiterentwickelt [Böcking und Motherby 1999]. Das Ausmaß der Aneuploidie korreliert nach [Böcking und Motherby 1999] eng mit dem Grad der Malignität der Tumoren. Folglich eignet sich eine Quantifizierung von

---

chromosomaler bzw. DNA-Aneuploidie zum Malignitätsgrading [Sudbø et al. 2001]. In der Zunahme aneuploider Fälle mit zunehmendem Schweregrad der Gewebläsionen (s. Tab. 8.3 und Tab. 8.4 im Anhang) spiegelt sich die Bedeutung der Aneuploidie als Malignitätsmarker auch an Schnittpräparaten wieder. Einen Zusammenhang zwischen diagnostischer Gruppe und DNA-Gehalt zeigen beispielsweise auch die Untersuchungen von Bockmühl et al. [1992], Crissman und Zarbo [1991], Dreyer et al. [1994], Fu et al. [1982], Munck-Wikland et al. [1991] sowie Smith et al. [1996]. Im Einzelfall ist morphologisch aber nicht zu entscheiden, ob sich eine Dysplasie zurückbildet oder maligne entarten wird [Böcking und Motherby 1999].

Zumindest im Bereich der Stimmlippen wird das Auftreten des reinen Carcinoma in situ als eher selten vermutet. Eine relevante Anzahl als Carcinoma in situ klassifizierter Läsionen enthalten wahrscheinlich Zonen mikroinfiltrativen Wachstums, welche u.U. trotz chirurgischer Intervention verbleiben und im Verlauf zu einem Rezidiv führen können [Sessions et al. 1997]. In der vorliegenden Arbeit boten sieben Präparate (43,8 %) der Gruppe LD III und fünf Fälle (13,2 %) der Gruppe hoch differenzierter Karzinome einen unauffälligen Ploidie-Status. Betroffene Fälle konnten also allein auf Basis dieses Parameters nicht als maligne erkannt werden. Diese Beobachtung lässt sich vermutlich nicht auf technische oder methodische Probleme in Verbindung mit der Messung histologischer Schnittpräparate zurückführen, da viele invasive Karzinome [Benazzo et al. 1995, Bjelkenkrantz et al. 1983, El Nagggar et al. 1996, Rua et al. 1991, Smith et al. 1996] und ebenso einige Tumormetastasen [Smith et al. 1996, Syms et al. 1995] sowohl in durchflusszytometrischen Messungen als auch mittels statischer DNA-Analyse als euploid bestimmt wurden. Es ist anzunehmen, dass die Vorläuferläsionen gerade von hoch differenzierten Karzinomen ebenfalls euploid sind. In diesen Fällen kann das maligne Potential weder durch eine histologische Untersuchung noch durch die Analyse des Zellkern-DNA-Gehaltes erkannt werden. Dieses ist ein wichtiger Grund, weitere relevante Parameter in entsprechende Messroutinen mit einzubeziehen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Parameter Aneuploidie in histologischen Schnittpräparaten spezifisch für maligne Transformationen ist. Sudbø et al. [2001] konnten zeigen, dass Dysplasien der Mundhöhle mit nachgewiesener Aneu-

---

ploidie gehäuft in Karzinome übergingen, während euploide Läsionen nur ausnahmsweise maligne entarteten. Auch in der vorliegenden Arbeit waren, mit einer Ausnahme, aneuploide Fälle auf die Gruppe der schweren Dysplasien und Karzinome begrenzt. Eine relevante Anzahl von Karzinomen waren jedoch auch hier euploid. Mit dem Ziel, auch diese Läsionen d. h. vor allem hochdifferenzierte Karzinome und ihre Vorläufer frühzeitig und adäquat klassifizieren zu können, wurde der Ploidie-Status mit weiteren Parametern bei der Berechnung des Multiparameteratypieindex kombiniert.

### **4.3 Kernfläche und Kernflächenschwankung**

Dysplasien des Plattenepithels sind neben den Chromatinmusterabnormitäten zytologisch im Wesentlichen durch Normabweichungen der Zellkerngröße und -form gekennzeichnet [Böcking et al. 1999]. Entsprechend geben diese Parameter, neben der Analyse des DNA-Gehaltes, weitere Hinweise auf eine Tumorzellproliferation [Donhuijsen 1998]. Die in vorliegender Arbeit ermittelte Zellkernfläche stellt ein Äquivalent der Kerngröße dar, was auch für die in diesem Zusammenhang diskutierte Literatur gilt, da entsprechende Messungen bisher lediglich in zweidimensionaler Umgebung möglich sind. Der weitverbreitete Terminus Zellkerngröße liegt in der Modellvorstellung kugelförmiger Zellkerne begründet. Der Parameter Kernflächenschwankung reflektiert den visuellen Eindruck der Anisonukleose und ermöglicht so Tumore mit gesteigerter Variation der Kerngröße als maligne zu klassifizieren.

Eine Reihe von Autoren konnte einen Zusammenhang zwischen den Parametern Kerngröße sowie Kerngrößenschwankung und maligner Entartung feststellen. So konnten Hellquist et al. [1984] in ihrer photometrischen Untersuchung verschiedener Larynxepithelläsionen zeigen, dass schwere Dysplasien und Carcinomata in situ neben einem erhöhten DNA-Gehalt auch, den Karzinomen vergleichbare, abnorme mittlere Kernflächen aufwiesen. Dreyer et al. [1995] zeigten in einer, auf ihrer Studie von 1994 basierenden Untersuchung eine signifikante Zunahme der Kernfläche in den Präparaten der schweren Epitheldysplasien. Auch Cowpe et al. [1995] konnten eine erhöhte mittlere Kernfläche der dysplastisch bzw. maligne veränderten Läsionen im Vergleich zu normaler Mucosa nachweisen. Blackwell et al. [1995] wiesen u.a. einen Zusammen-

---

hang zwischen abnormer Zellkernvergrößerung und dem Risiko maligner Entartung nach. Vor dem Hintergrund, dass in vielen Geweben auch diploide Tumore nachgewiesen wurden, empfahlen Cowpe und Mitarbeiter [1995] eine Kombination von Morphometrie und DNA-Gehaltmessungen.

Auch an anderen Geweben wurden Untersuchungen zur Kernmorphologie und Dignität durchgeführt. So konnten Talve et al. [1997] sowie Williams et al. [1999] Zusammenhänge zwischen Malignität und Kernfläche im Bereich der Dermatologie demonstrieren, von Tosi et al. [1986] wurde entsprechendes für das Nierenzellkarzinom dokumentiert.

In vorliegender Arbeit zeigten sich in Bezug auf die Parameter Kernfläche und Kernflächenschwankung keine signifikanten Unterschiede zwischen Larynxdysplasien ( $LD_{\text{Gesamt}}$ ) und -karzinomen ( $LCA_{\text{Gesamt}}$ ). Ursache hierfür könnte die relativ große Anzahl schwerer Dysplasien und Carcinomata in situ im Kollektiv der Dysplasien sein. Die Kernfläche und Kernflächenschwankung der leichten und mittelschweren Dysplasien waren signifikant kleiner als bei schweren Dysplasien und der Gruppe der gesamten Karzinomen (s. Tab. 8.5 - Tab. 8.8 im Anhang). Einige der zur Gruppe der mittelschweren Dysplasien gehörenden Läsionen zeigten strukturell verändertes Epithel, ohne aber Hinweise auf Kernatypien zu bieten. Andererseits schloss die Gruppe der leichten Dysplasien Epithelläsionen mit reaktiven Veränderungen ein, was sich in erhöhter proliferativer Aktivität und damit auch in erhöhter Kernfläche äußerte. Hierdurch lassen sich vermutlich die erhöhten Werte der Kernfläche und der Kernflächenschwankung der Gruppe LD I im Vergleich zur Gruppe LD II erklären. Eine Ursache für das genannte Phänomen kann das auf subjektiven Kriterien basierende Gradingssystem laryngealer Epitheldysplasien und die damit verbundene untersucherabhängige Klassifizierung sein.

Im Hinblick auf die im folgenden Kapitel diskutierten möglichen Fehler der Bildzytometrie lässt sich festhalten, dass die Parameter Kernfläche und Kernflächenschwankung relativ unempfindlich gegenüber der Schnittdicke und anderen Einflüssen bei der Fixation und Aufarbeitung der Präparate sind. Baak et al. [1989] konnten zeigen das lediglich der pH-Wert des Fixationsmediums die Kernfläche in Schnittpräparaten

---

beeinflusst. Die ausschließlich im Fall von extremen pH-Schwankungen auftretenden Messungenauigkeiten besitzen aber kaum relevante Bedeutung.

Insgesamt kann aus den verschiedenen Arbeiten geschlossen werden, dass sowohl die Kernfläche als auch die Kernflächenschwankung malignitätsassoziierte Merkmale epithelialer Neoplasien darstellen. Beide Parameter weisen jedoch – auch in der vorliegenden Arbeit – große Schwankungsbereiche auf, so dass eine verlässliche Klassifizierung von Larynxepithelläsionen allein anhand dieser Parameter nicht möglich ist. Der Multiparameteratypieindex bietet hinsichtlich der genannten Problematik die Möglichkeit die Parameter Kernfläche und Kernflächenschwankung mit einem densitometrischen Parameter zu kombinieren.

#### **4.4 Methoden und Probleme der DNA-Zytometrie**

Der DNA-Gehalt von Zellkernen stellt derzeit eines der am weitesten verbreiteten, quantitativen aber auch qualitativen Gradingmerkmale dar. Der prognostische Wert des Zellkern-DNA-Gehaltes [Fu et al. 1982, Nenning et al. 1997, Schimming et al. 1998, Sudbø et al. 2001] sowie seine Eignung als Malignitätsmarker [Dreyer et al. 1995, Höfken et al. 1995, Kashyap et al. 1990, Kysela et al. 1990, Makiyama et al. 1995, Motherby et al. 1998 I und 1998 II, Smith et al. 1996] ist allgemein anerkannt. Die DNA-Quantifizierung erfolgt überwiegend mit Hilfe der Durchflusszytometrie oder aber bildzytometrischer Auswertung von Schnittpräparaten bzw. Zytologien [Mairinger und Gschwendtner 1998].

Elsheikh et al. [1992] zeigten eine erheblich größere Genauigkeit der Bildzytometrie im Vergleich zur Durchflusszytometrie beim Entdecken aneuploider Zellpopulationen. Zbieranowski et al. [1992] empfehlen im Fall von archiviertem Gewebe eine Analyse mittels Bildzytometrie an Schnittpräparaten zumindest als Ergänzung durchzuführen, um kleinere aneuploide Zellpopulationen nicht zu übersehen. Aufgrund therapeutischer Fortschritte können heute schon Epithelläsionen sehr geringer Größe aus dem Larynx entfernt werden. Solche sehr kleinen Präparate müssen dementsprechend immer häufiger pathologisch untersucht werden. Um Frühstadien maligner Entartung auch

---

anhand der Epithelarchitektur zu erkennen, muss das Gesamtpräparat in Serienschritten aufgearbeitet werden [Dreyer et al. 2001]. Die Quantifizierung des Zellkern-DNA-Gehaltes mit Hilfe der Bildzytometrie an Schnittpräparaten ist aufgrund der geringen Größe dieser Präparate die einzig praktikable Methode [Dawson et al. 1990, Koss et al. 1989, Mairinger und Gschwendtner 1998, Shankey et al. 1993]. Um sehr kleine Zellgruppen auffinden zu können, wurden verschiedene Ansätze entwickelt. So verbanden Park und Kimler [1994] monoklonale Antikörper gegen Zytokeratin mit einer DNA-spezifischen Färbung und konnten mit dieser Methode eine deutlich präzisere DNA-Analyse maligne entarteter Zellpopulationen kleiner Ausdehnung erreichen.

Bei einer an Schnittpräparaten erfolgenden DNA-Analyse müssen in der Methode begründete Fehlerquellen berücksichtigt werden. Insbesondere Tumorzellkerne haben meist nicht die theoretisch angenommene Kugelform. Da die Dicke des einzelnen Schnittes in der Routine nicht exakt zu bestimmen ist, führen selbst Schnittdickekorrekturformeln häufig nicht zu korrekten Ergebnissen [Böcking und Motherby 1999]. Die Variation der Schnittdicke nicht nur zwischen verschiedenen Präparaten, sondern auch innerhalb eines Schnittes [Xin et al. 1996], bedingen ebenfalls Ungenauigkeiten [Gschwendtner et al. 1994, Gschwendtner und Mairinger 1995, Haroske et al. 1993, Mairinger und Gschwendtner 1998]. Xin et al. [1996] nennen drei Hauptfehlerquellen bei der DNA-Bestimmung an Schnittpräparaten:

- die Variation der Gesamtschnittdicke zwischen den einzelnen Präparaten verursacht durch Schnittvorgang und Streckartefakte,
- die Variation der Schnittdicke innerhalb eines Schnittes verursacht durch Schnittunregelmäßigkeiten und Druckschwankungen während der Fixation,
- das inkomplette Schneiden von Zellkernen mit Verschleppung von Kernmaterial innerhalb eines Präparates oder aber zum folgenden Schnittpräparat.

Berryman et al. [1984] sehen als Hauptfehlerquellen der DNA-Messung an Schnittpräparaten die inhomogene Größe und Form von Tumorzellkernen, die Tendenz zur Bildung von Zellkernhaufen in tumorösem Gewebe mit Kernkappungsdefekten. Aufgrund der genannten Faktoren ist ein sinnvoller Vergleich gemessener DNA-Werte

---

von Schnittpräparaten mit Zytologien nicht möglich. Schnittbedingte Kernkappungsdefekte werden ebenfalls als Fehlerquelle angesehen [Gschwendtner und Mairinger 1995, Haroske et al. 1993, Xin et al. 1996].

Messungenauigkeiten können gerade im Fall von Kappungsdefekten an Zellkernen mit entsprechendem Chromatinverlust durch eine inhomogene Chromatinverteilung im Kern noch verstärkt werden. Die verbreiteten Korrekturmodelle sind im Allgemeinen auf der Grundlage von kugelförmigen Zellkernen mit homogener Chromatinverteilung und äquatorialer Schnittführung erstellt [Haroske et al. 1993]. Sie entsprechen also nur sehr bedingt der Realität. Dieser Umstand sollte bei Interpretation von Ergebnissen, die mit Hilfe solcher Korrekturmodelle erzielt wurden, Berücksichtigung finden. Die bekannten Korrekturmethode sind im Fall von Schnittpräparaten nicht geeignet, die so erzeugten IOD-Histogramme mit denen zytologischer Präparate zu vergleichen [Haroske et al. 1993]. Haroske et al. [1993] sehen auch das Vorliegen von Zellkernfragmenten als ein Problem der DNA-Bildzytometrie an. Weitere mögliche Fehlerquellen sind die Überlappung von Kernen [Berryman et al. 1984] und die Abweichungen innerhalb von Fixationsverfahren [Baak et al. 1989]. Diese Probleme können aber zumindest teilweise durch aufmerksames Durchmustern der Präparation, im Gegensatz zu den automatisierten Messverfahren, reduziert werden.

Die Möglichkeit der subjektiven Auswahl des auszuwertenden Gewebeareals im Rahmen der Bildzytometrie an Schnittpräparaten bietet den Vorteil Zellen in Gebieten auffälliger Epithelarchitektur gezielt untersuchen zu können. Ungewolltes Messen von unauffälligem bzw. Normalepithel, Zellkernfragmenten etc. kann so vermieden werden. Die subjektive Auswahl der zu analysierenden Zellen ist aber auch eine potentielle Fehlerquelle. Die Methode ist untersucherabhängig, dadurch hervorgerufene Fehler sind durch keine Art von Korrekturformel oder technische Maßnahmen eliminierbar.

Bei bildzytometrischen DNA-Messungen an Abstrichen bzw. Zytologien sind die im vorhergehenden Abschnitt diskutierten Schnittartefakte, aus naheliegenden Gründen in dieser Form nicht zu erwarten. Aber auch diese Methode bietet eine Reihe möglicher Fehlerquellen wie Zellreste, beschädigte Zellkerne und Zellfragmentaggregate. Ein

---

massiver Einfluss der genannten Artefakte auf die ermittelten DNA-Gehalt-Messwerte konnte von Boudry et al. [1997] nachgewiesen werden. Die mit dieser Methode analysierten Zellen sind willkürlich aus den Epithelverbänden herausgelöst, weisen also keine Lagebeziehung mehr zueinander auf. Eine gezielte Untersuchung histologischer Strukturen ist so kaum möglich. Die Messobjekte und die dadurch gewonnenen Ergebnisse sind damit u.U. nur eingeschränkt repräsentativ für ein zu untersuchendes Tumorareal.

Die Einzelzellmessung aus desintegrierten Präparationen stellt eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Zellkern-DNA-Gehaltes dar. Wie die Durchflusszytometrie bietet sie den Vorteil der zeitsparenden Automatisierung und Messung großer Zellkollektive. Schnittartefakte, wie angeschnittene Zellkerne, kommen kaum vor. Die Analyse histologischer Strukturen sowie eine gezielte Auswahl von Tumorzellen zur Messung und damit möglicher Identifikation gerade kleiner aneuploider Tumorzellpopulationen, wie mit statischen bildzytometrischen Verfahren an Schnittpräparaten, ist jedoch auch mit dieser Methode problematisch. Mairinger und Gschwendtner [1998] konnten eine höhere Sensitivität der DNA-Bildzytometrie für den Nachweis aneuploider Tumorzellpopulationen in einem Vergleich beider Methoden zeigen. Diskutierte Ursachen sind eine mögliche Beschädigung von Zellen mit hohem DNA-Gehalt durch enzymatische Prozesse bei der Zellvereinzelnung [Liung et al. 1989], Verlust von Tumorzellen mit erhöhtem Durchmesser durch Filtration sowie eine überdurchschnittlich hohe Rate zerstörter Tumorzellen durch Zentrifugieren im Rahmen der Materialaufarbeitung [Auer et al. 1993]. Ein weiterer aus der Durchflusszytometrie bekannter Nachteil auch der Einzelzellmessung ist eine in Bezug auf die Gesamtheit gemessener Zellen relativ geringe Anzahl von Tumorzellen in der auszuwertenden Präparation [Mairinger und Gschwendtner 1998].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit der Durchflusszytometrie im Vergleich zur Bildzytometrie eine weit höhere Anzahl von Zellen in einem deutlich kürzeren Zeitraum automatisiert und unter standardisierten Bedingungen untersucht werden kann. Fehlerquellen, wie sie gerade bei Untersuchungen an Schnittpräparaten vorkommen, werden vermieden. Die Methode bietet daher eine größere Genauigkeit in Bezug auf



---

den Zellkern-DNA-Gehalt, bessere Reproduzierbarkeit sowie Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Eine exakte Tumorzellanalyse wird jedoch durch die regelmäßige Kontamination des Messmediums mit einer erheblichen Anzahl nicht maligner Zellen gestört. Aus diesem Grund sind die gewonnenen Daten für die Tumorzellpopulation häufig nicht repräsentativ [Park und Kimler 1994]. Die Möglichkeit, die Epithelarchitektur zu untersuchen und für das Tumorgewebe wirklich repräsentative Zellen auszuwerten, bleibt aufgrund der untersuchergesteuerten Auswahl der Messobjekte allein der Bildzytometrie an Schnittpräparaten vorbehalten [Baldetorp et al. 1992, Dawson et al. 1990, Elsheikh et al. 1992, Höfken et al. 1995]. Im Fall der Auswertung von kleinen Tumorzellpopulationen und Biopsaten besitzt die Bildzytometrie an Schnittpräparaten, trotz nach wie vor ungelöster Probleme und resultierender Ungenauigkeiten einen wichtigen Stellenwert, da sich derzeit keine verlässliche Alternative bietet.

Aufgrund o.g. potentieller Fehlerquellen können Malignitätsindexe, die für durchflusszytometrische Methoden oder zytologische Präparate entwickelt wurden [Böcking et al. 1984], auf die Untersuchung von Schnittpräparaten nicht übertragen werden

#### **4.5 Multiparameteratypieindex**

Die Methode der DNA-Analyse ist wenigstens im Falle von Paraffinschnitten aufgrund der bereits diskutierten, methodenbedingten Fehlerquellen nicht sensitiv genug, hoch differenzierte Tumoren, deren DNA-Gehalt nur geringfügig von der Norm abweicht, korrekt zu klassifizieren. Aus diesem Grund wurden schon in der Vergangenheit Versuche unternommen, die Klassifikationsgenauigkeit der DNA-Analyse mit Hilfe von Mehrparametermessungen zu verbessern [Klöppel et al. 1986, Munck-Wikland et al. 1994, Nakanishi et al. 1996, Olde Kalter und Delemarre 1986, Olde Kalter et al. 1986, Schutte et al. 1995].

Durch die Analyse des Ploidie-Status wurden auch in dieser Untersuchung nicht alle Karzinome als maligne erkannt. Hoch differenzierte Karzinome sowie schwere Dysplasien bzw. Carcinomata in situ stellten in Bezug auf eine verlässliche Klassifikation

---

ein Problem dar. Immerhin waren fünf (38,5 %) von 13 Präparaten der Gruppe LCA-G1 sowie sieben (43,8 %) von 16 Fällen der Gruppe LD III euploid (s. Tab. 8.3 und Tab. 8.4 im Anhang). Der Ploidie-Status stellte also gerade in diesen Fällen auch morphologisch schwerer zu klassifizierender Gewebeveränderungen ein nur ungenügend sensitives Merkmal dar.

Auch anhand der Parameter Kernfläche und Kernflächenschwankung alleine ist eine verlässliche Klassifizierung von Larynxepithelläsionen nicht möglich (s. Kap. 3.3 S. 20 ff und Kap. 3.4 S. 25 ff). Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der in Kap. 2.2.5 (S. 13 f) beschriebene Multiparameteratypieindex untersucht, in dem die Parameter Ploidie-Status, Kernfläche und Kernflächenschwankung kombiniert wurden.

Verschiedene andere Arbeiten hatten ebenfalls das Ziel die Klassifikation bzw. die Prognose durch eine Kombination verschiedener Merkmale zu verbessern. Durch die Kombination von Grading, Staging und Messung des DNA-Gehaltes konnten Klöppel et al. [1986] die Vorhersagegenauigkeit des klinischen Verlaufs von Nierenzellkarzinomen verbessern. Ähnliche Ergebnisse konnten Nakanishi et al. [1996] an Blasenadenokarzinomen und Schutte et al. [1995] an Lungenkarzinomen zeigen. Im Bereich des Larynx entwickelten Munck-Wikland et al. [1994] einen Prognoseindex, um die Progression laryngealer Carcinomata in situ zu invasivem Wachstum vorherzusagen zu können. Olde Kalter und Delemarre [1986] und Olde Kalter et al. [1986] ermittelten eine prognostische Formel bei laryngealen Hyperplasien. In den genannten Arbeiten wurden zumeist neben histomorphometrischen Merkmalen weitere histochemische Parameter herangezogen. Das Ziel für die Praxis stellt die Entwicklung eines Indexes mit möglichst leicht zu erfassenden Parametern dar.

#### **4.5.1 Klassifikationsgenauigkeiten im Vergleich**

Die im Folgenden angegebenen Klassifikationsgenauigkeiten beruhen jeweils auf den Schwellenwerten, die benigne und maligne Läsionen optimal trennen. Durch den in Kap. 2.2.5 (S. 13 f) beschriebenen Multiparameteratypieindex konnte mit 94,7 % eine höhere Klassifikationsgenauigkeit zur Erkennung maligner Läsionen, als mit Hilfe des

---

Ploidie-Status (86,8 %), der Kernfläche (47,4 %) oder der Kernflächenschwankung (50,0 %) möglich, erreicht werden. Der Kurvenverlauf der Klassifikationsraten des Multiparameteratypieindex (s. Abb. 3.16 S. 35) veranschaulicht die deutlich bessere Klassifikationsgenauigkeit des MAI im Vergleich zu den morphometrischen Parametern im Hinblick auf die Unterscheidung benigner und maligner Larynxepithelläsionen. In der Gruppe der schweren Larynxepitheldysplasien und Carcinomata in situ (LD III/CAIS) wurden durch den MAI 81,2 %, durch den Ploidie-Status 56,5 %, durch die Kernfläche 62,5 % und durch die Kernflächenschwankung 68,7 % als maligne klassifiziert. Betrachtet man allein die hoch differenzierten Larynxkarzinome (LCA-G1) zeigt sich, dass die Klassifikationsgenauigkeit durch den MAI mit 84,6 % im Vergleich zu 61,5 % für den Ploidie-Status und jeweils 46,2 % für Kernfläche und Kernflächenschwankung verbessert werden konnte. Der Grund für diese gesteigerten Klassifikationsgenauigkeiten des MAI ist die Tatsache, dass der MAI eine größere Vielfalt morphologischer Veränderungen maligner Tumoren erkennt.

Ein Fall der LD I-Gruppe wurde sowohl aufgrund seines Ploidie-Status als auch aufgrund des MAI als maligne klassifiziert. Ein weiterer Fall der Gruppe LD I sowie zwei Fälle der Gruppe LD II wurden aufgrund des MAI als maligne klassifiziert (s. Abb. 3.14 S. 33). Möglicherweise waren diese vier scheinbar falsch positiven Fälle durch den MAI richtig klassifiziert worden, boten aber aufgrund der histologischen Untersuchung keine eindeutig malignen Veränderungen [Böcking et al. 1986].

Auf der anderen Seite wurden zwei eindeutig maligne Läsionen der hoch differenzierten Karzinome durch einen MAI kleiner als Null als benigne klassifiziert. Dieses zeigt, dass einige wenige Karzinome eine klare Malignitätsdiagnose allein aufgrund von Zellkernparametern nicht zulassen.

Der verwendete Multiparameteratypieindex ist im Fall von kleinen Biopsien von karzinomatösen Larynxepithelläsionen besonders geeignet. Diese enthalten häufig eine nicht ausreichend große Menge an Gewebe, um eine histologische Diagnose invasiven Wachstums zu erlauben und bieten meist aufgrund ihrer hohen Differenzierung keine Aneuploidie. Die vorliegende Arbeit konnte ebenfalls zeigen, dass der MAI geeignet ist,

---

eine bessere Charakterisierung als bisher möglich von Vorläuferläsionen hoch differenzierter Karzinome des Larynx zu erreichen.

#### **4.5.2 Probleme in der Anwendung von Multiparametersystemen**

Zweck der Zellkernbildanalyse ist eine exakte Klassifikation mit dem Ziel der Krebsprävention, Früherkennung sowie individuellen Therapie des Erkrankten. Die Früherkennung maligner Neoplasien sowie möglichst präzise Aussagen über die Prognose, d.h. die Gewinnung von Informationen über das biologische Verhalten maligner Neoplasien [Schulerud et al. 1998] sind hier von besonderer Bedeutung.

Eine simultane Analyse mehrerer verschiedener Parameter ermöglicht eine genauere Abdeckung des morphologischen Spektrums sowohl intra- als auch interneoplastisch [Dreyer et al. 1994]. Die für den MAI ausgewählten Parameter wurden aufgrund bekannter tumorbiologischer und -morphologischer Erkenntnisse verwendet. Grundsätzlich ist jedoch nicht auszuschließen, dass andere Parameter eine genauere Klassifikation laryngealer Neoplasien gewähren. Generell sollten bei allen Multiparameter-Analysen Fehler in der Selektion von Parametern d.h. Verwendung suboptimal trennender bzw. unbrauchbarer Parameter in Betracht gezogen werden [Schulerud et al. 1998].

Durch Berechnung von Diskriminanzfunktionen und Evaluation ihrer Klassifikationsgenauigkeit mit Hilfe ein und desselben Kollektivs entstehen möglicherweise verfälschte Klassifikationsergebnisse. Die Ursache dafür liegt in der Tatsache begründet, dass Zellkerne eines Präparates als nicht vollkommen unabhängig voneinander zu betrachten sind. Die einzelnen Zellkerne eines zu analysierenden Präparates werden stets unter identischen Bedingungen, z.B. Fixation, Temperatur, Färbung aufbereitet [Dreyer et al. 2000 und 2001]. Die errechneten Funktionen führen möglicherweise zu einer Identifikation der einzelnen Präparate, ohne eine wirkliche Klassifikation aufgrund der diagnostischen Gruppen vorzunehmen [Larsen et al. 1971, Raudys und Jain 1991]. In letzter Konsequenz muss in diesem Zusammenhang die Frage gestellt werden, ob Tumorzellen eines Individuums überhaupt als unabhängig

---

voneinander angesehen werden können. Relevanz bzw. Ausmaß dieses Problems für in der Vergangenheit durchgeführte Untersuchungen und deren Ergebnisse sind bisher nicht exakt abzuschätzen. Um übertrieben optimistischen, unrealistischen Ergebnissen entgegenzuwirken empfehlen Schulerud et al. [1998] die Anwendung mathematischer Korrekturen und warnen vor der Analyse einer großen Anzahl von Parametern bei gleichzeitig niedriger Fallzahl. Aus diesem Grund wurde in vorliegender Arbeit die Zahl untersuchter Einzelmerkmale auf vier beschränkt. Im Hinblick auf genannte Problematik und die wichtige Frage, ob und wie exakt prognostische Aussagen mit Hilfe des MAI möglich sind, sollten in Zukunft weitergehende, prospektive Studien durchgeführt werden.

---

## 5 Schlussbetrachtung

Ausgehend von der Hypothese, dass eine Kombination von Merkmalen gegenüber der Auswertung von Einzelmerkmalen im Ergebnis exakter und damit von Vorteil ist, um die Vielfalt morphologischer Formen von laryngealen Plattenepithelzellkarzinomen zu erkennen, wurde ein Multiparameteratypieindex entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass der Multiparameteratypieindex eine deutlich bessere Unterscheidung von benignen bzw. malignen Gewebeveränderungen anhand von Schnittpräparaten des Larynxepithels ermöglicht als die untersuchten Einzelparameter Ploidie-Status, Kernfläche und Kernflächenschwankung. Insbesondere im Falle von hoch differenzierten Larynxkarzinomen konnte durch den MAI eine bessere Klassifikationsgenauigkeit als durch die genannten Einzelparameter erreicht werden.

Im Bereich des Larynx werden meist kleine Biopsien gewonnen. Diese erlauben in einigen Fällen nicht die Unterscheidung zwischen epithelialen Dysplasien und Karzinomen, da mikrolaryngoskopisch gewonnene Proben nicht in allen Fällen die Malignitätskriterien einer Stromainvasion zeigen. Die Entdeckung von hoch differenzierten Karzinomen, in denen morphologische intraepitheliale Veränderungen sehr gering sind, ist ebenfalls schwierig. Folglich sind objektiv und präzise messbare Merkmale epithelialer Dysplasien und Neoplasien, welche aus kleinen Biopsien gewonnen werden können, nötig. Zu diesem Zweck eignen sich DNA-zytometrische und morphometrische Parameter sowie Kombinationen aus beidem. Gerade im Fall von kleinen Läsionen bietet die Bildzytometrie an histologischen Schnittpräparaten trotz unbestrittener Fehlerquellen [Baak et al. 1989, Berryman et al. 1984, Gschwendtner et al. 1994, Xin et al. 1996], mit der Möglichkeit einer visuellen Identifikation von dysplastischen Läsionen und damit histologischen Korrelation der gewonnenen Ergebnisse, im Vergleich zur Durchflusszytometrie und zur Bildzytometrie einzelner Zellen Vorteile [Elsheikh et al. 1992, Mairinger und Gschwendtner 1998, Munck-Wikland et al. 1994, Sudbø et al. 2001].

In Zukunft kann eine Erweiterung des MAI um zusätzliche leicht zu erfassende Parameter in Betracht gezogen werden. Bei der Betrachtung einer größeren Anzahl relevanter Parameter müssen mögliche Fehlerquellen [Dreyer et al. 2001], die in ihrer

---

Wirkung vor allem bei großer Anzahl analysierter Parameter und niedriger Fallzahl [Schulerud et al. 1998] bisher scheinbar unterschätzt wurden, berücksichtigt werden. Die so erzielten Ergebnisse müssen sorgfältig im Hinblick auf eine bessere Trennung laryngealer Dysplasien und Karzinome überprüft werden. Dazu sind besonders prospektive Kohortenstudien empfehlenswert.

Retrospektive Untersuchungen an archiviertem Material von Fällen mit bekanntem klinischem Verlauf [Bosatra et al. 1997, Schimming et al. 1998, Syms et al. 1995] können prospektive Untersuchungen, die aus unterschiedlichen Gründen nur eingeschränkt möglich sind, ersetzen bzw. ergänzen. [McCready und Papadimitriou 1983]. Solche retrospektiven Untersuchungen können genutzt werden, um den MAI auf seine prognostische Relevanz hin zu überprüfen. Da Langzeitverläufe im Allgemeinen nur noch anhand, meist in Form von Schnittpräparationen vorliegendem, archiviertem Material untersucht werden können, sind bildzytometrische Messungen an Schnittpräparaten hier möglicherweise hilfreich. Vor dem Hintergrund Daten über die Prognose von Erkrankungen bzw. Effektivität therapeutischer Maßnahmen zu erhalten, kann die Methode der Bildzytometrie daher neben den Verfahren der automatisierten Zellmassenmessungen orientierende Daten liefern.

Im Vergleich zu anderen Arbeiten, die sich mit der Klassifikation von Larynxgewebe durch Kombination verschiedener Parameter beschäftigt haben [Munck-Wikland et al. 1994, Olde Kalter und Delemarre [1986] und Olde Kalter et al. [1986], bietet der in der vorliegenden Arbeit überprüfte Multiparameteratypieindex den für die Praxis relevanten Vorteil anhand weniger, einfach zu bestimmender Parameter auch an archiviertem Material ermittelt werden zu können.

---

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die integrierte optische Dichte sowie morphometrische Parameter von Zellkernen von Larynxepitheldysplasien und Plattenepithelzellkarzinomen des Larynx im Hinblick auf eine möglichst exakte Unterscheidung von Karzinomen und ihren Vorläuferläsionen untersucht. Insgesamt wurden 76 Larynxschleimhautpräparate ausgewertet. Dieses Kollektiv beinhaltete 38 laryngeale Dysplasien und Carcinomata in situ sowie 38 Fälle laryngealer Plattenepithelzellkarzinome. Die Klassifikation der Dysplasien wurde nach Kleinsasser [1963] in leichte, mittelschwere und schwere Dysplasien/Carcinomata in situ vorgenommen. Die Plattenepithelkarzinome wurden als hoch differenzierte, mittelgradig differenzierte und niedrig differenzierte Karzinome klassifiziert.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich zellkernbezogene Merkmale gemessen und ausgewertet. Die Bestimmung der am Schnitt gemessenen integrierten optischen Zellkerndichte sowie der Parameter Kernfläche und Kernflächenschwankung wurde mit einem interaktiven Bildzytometriesystem (Kontron, Deutschland) durchgeführt. Für die bildanalytischen Messungen wurden Feulgen gefärbte Paraffinschnitte verwendet. Der Ploidie-Status wurde als qualitatives Merkmal einer Läsion, euploid oder aneuploid, ausgedrückt.

Um eine bessere Unterscheidung zwischen benignen und prämaligen bzw. malignen Läsionen zu erreichen, wurden tumormorphologische Parameter mit den Ergebnissen einer optischen Dichtemessung kombiniert. Dazu wurde aus den Parametern Ploidie-Status, Kernfläche und Kernflächenschwankung mit Hilfe der Diskriminanzanalyse der Multiparameteratypieindex (MAI) entwickelt. Ein MAI-Wert kleiner oder gleich Null klassifizierte die untersuchten Schleimhautläsionen als benigne, MAI-Werte größer als Null klassifizierten die Läsionen als maligne.

In der Gruppe aller Epitheldysplasien waren 28 Fälle (73,7 %) euploid sowie zehn Fälle (26,3 %) aneuploid. Von den zehn aneuploiden Fällen gehörten neun zur Gruppe der schweren Dysplasien bzw. Carcinomata in situ und ein Fall in die Gruppe der leichten Dysplasien. In der Gruppe der Plattenepithelkarzinome waren fünf Fälle (13,2 %)



---

euploid und 33 (86,8 %) aneuploid. Die fünf euploiden Karzinome waren histologisch sämtlich als hoch differenzierte Karzinome klassifiziert worden.

Die Larynxkarzinome hatten im Mittel eine tendenziell größere Kernfläche als die Dysplasien. Hierbei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Mit dem eine möglichst genaue Trennung zwischen benignen und malignen Epithelläsionen ergebenden Schwellenwert von  $42,29 \mu\text{m}^2$  ließen sich 63,2 % der Dysplasien und 47,4 % der Karzinome ihrer Dignität entsprechend klassifizieren.

Die mittlere Kernflächenschwankung von Larynxdysplasien und Karzinomen unterschied sich nicht signifikant. Bei dem Schwellenwert von  $16,58 \mu\text{m}^2$ , der benigne und maligne Epithelläsionen optimal diskriminiert, ergab sich eine korrekte Klassifikation von 60,5 % der Dysplasien und 50,0 % der Karzinome.

Durch den Multiparameteratypieindex wurden von den 38 ausgewerteten Dysplasien 21 (55,3 %) ihrer Dignität entsprechend als benigne und 17 (44,7 %) als maligne klassifiziert. Von den 17 als maligne klassifizierten Dysplasien gehörten 13 zur Gruppe der schweren Dysplasien bzw. Carcinomata in situ. Durch den Multiparameteratypieindex konnten 36 (94,7 %) der 38 untersuchten Larynxkarzinome zutreffend als maligne klassifiziert werden. Nur zwei Fälle (5,3 %) wurden in die Kategorie benigner Fälle eingestuft. Beide Fälle waren zuvor histologisch als hoch differenzierte Karzinome klassifiziert worden.

Mit Hilfe des Multiparameteratypieindex konnte eine höhere Klassifikationsgenauigkeit (94,7 %) zur Erkennung maligner Läsionen als mittels Ploidie-Status (86,8 %), der Kernfläche (47,4 %) oder der Kernflächenschwankung (50,0 %) möglich, erreicht werden. In Bezug auf die aufgrund sehr geringer epithelialer Veränderungen schwer zu entdeckenden hoch differenzierten Larynxkarzinome verbesserte sich die Klassifikationsgenauigkeit des Multiparameteratypieindex auf 84,6 % im Vergleich zu 61,5 % für den Ploidie-Status und jeweils 46,2 % für Kernfläche und Kernflächenschwankung.

---

## 7 Literaturverzeichnis

- Altemani AM, Crespo A, Cardinalli IA, Norato D (1995)  
Nucleolar organizer region (NORs) in pseudocarcinomatous hyperplasia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa.  
Rev Paul Med 113: 693-697
- Aruffo A, Dietsch MT, Wan H, Hellstrom KE, Hellstrom I (1992)  
Granule membrane protein 140 (GMP 140) binds to carcinomas and carcinoma-derived cell lines.  
Proc Natl Acad Sci USA 89: 2292-2296
- Auer G, Askenstein U, Ahrens O (1993)  
Cytophotometry.  
Hum Pathol 20: 518-527
- Baak JP, Noteboom E, Koevoets JJ (1989)  
The influence of fixatives and other variations in tissue processing on nuclear morphometric features.  
Anal Quant Cytol Histol 11: 219-224
- Baldetorp B, Fernö M, Fallenius A, Fallenius-Vecchi G, Idvall I, Olsson H, Sigurdsson H, Åkerman M, Killander D (1992)  
Image cytometric DNA analysis in human breast cancer analysis may add prognostic information in diploid cases with low s-phase fraction by flow cytometry.  
Cytometry 13: 577-585
- Baltzell WH, Putney FJ (1954)  
Cancer of the Larynx.  
Arch Otolaryngol 60: 478-482
- Barona de Guzman R, Martorell MA, Basterra J, Armengot M, Montoro A, Montoro J (1993)  
Analysis of DNA content in supraglottic epidermoid carcinoma.  
Otolaryngol Head and Neck Surg 108: 706-710
- Barona de Guzman R, Martorell MA, Basterra J, Montoro A, Montoro J, Garin L, Armengot M (1992)  
An analysis of the DNA content in a stage T1 epidermoid carcinoma of the vocal cord. The methodology and results.  
Acta Otorhinolaringol Esp 43: 245-249
- Benazzo M, Mevio E, Occhini A, Franchini G, Danova M (1995)  
Proliferative characteristics of head and neck tumors.  
ORL 57: 39-43

- 
- Berryman I, Sterrett GF, Papadimitriou JM (1984)  
Feulgen DNA cytophotometry in histologic sections of mammary neoplasms.  
Anal Quant Cytol 6: 19-23
- Birmeyer G (1959)  
Inhalationsnoxen und ortfremdes Pflasterepithel im Kehlkopf.  
Arch Gewebepath Gewebehyg 17: 294
- Bjelkenkrantz K, Lundgren J, Olofsson J (1983)  
Single cell DNA measurement in hyperplastic, dysplastic and carcinomatous laryngeal epithelia, with special reference to the occurrence of hypertetraploid cell nuclei.  
Anal Quant Cytol 5: 184-188
- Björnhagen V, Månsson-Brahme E, Lindholm J, Mattson A, Auer G (1993)  
Morphometric, DNA and PCNA analyses in thin malignant melanomas.  
Med Oncol Tum Pharmacother 10: 87-94
- Blackwell KE, Fu YS, Calterra TC (1995)  
Laryngeal dysplasia. A clinicopathological study.  
Cancer 75: 457-463
- Blümlein H (1955)  
Zur kausalen Genese des Larynxkarzinoms unter Berücksichtigung des Tabakrauchens.  
Arch Hyg 139: 349-404
- Böcking A (1990)  
DNA-Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik.  
Beitr Onkol 38: 298-347
- Böcking A, Adler CP, Common HH, Hilgarth M, Granzen B, Auffermann W (1984)  
Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy.  
Anal Quant Cytol 6: 1-8
- Böcking A, Auffermann W, Vogel H, Schlöndorff G, Goebbels R (1985)  
Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA-cytophotometry.  
Cancer 56: 1600-1604
- Böcking A, Hilgarth M, Auffermann W, Hack-Werdier C, Fischer-Becker D, von Kalkreuth G (1986)  
DNA cytometric diagnosis of prospective malignancy in borderline lesions of the uterine cervix.  
Acta Cytol 30: 608-615
- Böcking A, Motherby H (1999)  
Abklärung zervikaler Dysplasien mittels DNA-Bild-Zytometrie.  
Pathologie 20: 25-33

- 
- Böcking A (1997)  
Die Bedeutung der statischen DNA-Zytometrie bei Dysplasien des  
Plattenepithels.  
Fortschritt und Fortbildung in der Medizin. Bd 21.  
Deutscher Ärzte Verlag, Köln: 21-49
- Bockmühl U, Bockmühl F, Dimmer V, Kunze KD (1992)  
„Nucleolar Organizer Regions“ (AgNORs) als Faktor für die Prognose des  
Larynxkarzinoms?  
Laryngo Rhino Otol 71: 137-141
- Bosatra A, Bussani R, Silvestri F (1997)  
From epithelial dysplasia to squamous carcinoma in the head and neck Region:  
An epidemiological assessment.  
Acta Otolaryngol (Stockh), Suppl. 527: 47-48
- Boudry C, Herlin P, Coster M, Sola B, Chermant JL (1997)  
Influence of debris and aggregates on image cytometry DNA measurement of  
archival tumors.  
Analyt Quant Cytol Histol 19: 153-157
- Brodens AC (1932)  
Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium.  
JAMA 12: 1670-1674
- Bryne M (1991)  
Prognostic value of various molecular and cellular features in oral squamous cell  
carcinomas: A review.  
J Oral Pathol Med 20: 413-420
- Bryne M, Jenssen N, Boysen M (1995)  
Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell  
carcinomas has high prognostic value.  
Virchows Arch 427: 277-281
- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A (1992)  
Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell  
carcinoma has high prognostic value.  
J Pathol 166: 375-381
- Bryne M, Thrane PS, Dabelsteen E (1991)  
Loss of expression of blood group antigen H is associated with cellular invasion  
and spread of oral squamous cell carcinomas.  
Cancer 67: 613-618
- Bühl A, Zöfel P (1996)  
Professionelle Datenanalyse mit SPSS für Windows.  
Addison Wesley, München

- 
- Bühl A, Zöfel P (2000)  
SPSS Version 9. Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows.  
Addison Wesley, München
- Cattaruzza MS, Maisonneuve P, Boyle P (1996)  
Epidemiology of laryngeal cancer.  
Eur J Cancer B Oral Oncol 32B: 293-305
- Cowpe JG, Ogden GR, Thompson M (1995)  
Comparison of nuclear area measurements carried out on normal and dysplastic oral smears.  
Anal Quant Cytol Histol 17: 241-246
- Crissman JD, Zarbo RJ (1989)  
Dysplasia, in situ carcinoma, and progression to invasive squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract.  
Am J Surg Pathol 13 (Suppl 1): 5-16
- Crissman JD, Zarbo RJ (1991)  
Quantitation of DNA ploidy in squamous intraepithelial neoplasia of the laryngeal glottis.  
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 117: 182-188
- Danic D, Maruic M, Uzarevic B, Milicic D (2000)  
Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx.  
ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 62 (3): 143-148
- Dawson AE, Norton JA, Weinberg DS (1990)  
Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry.  
Am J Pathol 136: 1115-1124
- Delank KW, Stoll W (2000)  
Moderne Diagnostik und Therapie bei Kehlkopftumoren: ein Überblick.  
Dtsch Med Wschr 125: 1169-1172
- DeSanto LW, Olsen KD, Perry WC, Rohde DE, Keith RL (1995)  
Quality of life after surgical treatment of cancer of the larynx.  
Ann Otol Rhinol Laryngol 104 (10 Pt 1): 763-769
- Dietel M (1983)  
Discrimination between benign, borderline, and malignant epithelial ovarian tumors using tumor markers: an immunohistochemical study.  
Cancer Detect Prev 6: 255
- Donhuijsen K (1998)  
Histologisches Malignitätsgrading. Prinzipien, Möglichkeiten und klinische Relevanz.  
Dt Ärzteblatt 95 (39): A2391-A2395

- 
- Donhuijsen K, Schulz S, Leder LD (1991)  
Nuclear grading of renal cell carcinomas - is morphometry necessary?  
J Cancer Res Clin Oncol 117 (1): 73-78
- Doudkine A, Macaulay C, Poulin N, Palcic B (1995)  
Nuclear texture measurements in image cytometry.  
Path 87: 286-299
- Dreyer T (2001)  
Die Kanzerisierung des Larynxepithels. Cytometrische Untersuchungen im zeitlichen und räumlichen Umfeld von Plattenepithelkarzinomen.  
Habilitationsschrift im Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
- Dreyer T, Knoblauch I, Doudkine A, MacAulay CE, Garner D, Palcic B, Popella C (2001)  
Nuclear texture features for classifying benign vs. dysplastic or malignant squamous epithelium of the larynx.  
Anal Quant Cytol Histol 23: 193-200
- Dreyer T, Knoblauch I, Garner D, Doudkine A, MacAulay CE, Palcic B, Popella C (2000)  
Specific changes of chromatin structure in nuclei of normal epithelium adjacent to laryngeal squamous cell carcinoma.  
Anal Cell Pathol 20: 141-150
- Dreyer T, Popella C, Hinrichs B, Bohle RM, Pohlmann U, Schulz A, Glanz H (1995)  
Grading of precancerous laryngeal lesions by multiparameter image analysis at separate epithelial layers.  
J Pathol 177: 385-393
- Dreyer T, Popella C, Schulte E, Hinrichs B, Bohle RM, Pohlmann U, Schulz A, Glanz H (1994)  
Image analysis in precancerous laryngeal lesions.  
In: Smees R and Bridger GP (eds.) Laryngeal cancer. Elsevier, Amsterdam
- El-Naggar AK, Dinh M, Tucker S, Luna MA, Goepfert H, Hsu P, Batsakis JG (1996)  
Genotypic analysis of primary head and neck carcinoma by combined fluorescence in situ hybridization and DNA flow cytometry.  
Am J Clin Pathol 105: 102-108
- Elsheikh TM, Silverman JF, McCool JW, Riley RS (1992)  
Comparative DNA analysis of solid tumors by flow cytometric and image analyses of touch imprints and flow cell suspensions.  
Am J Clin Pathol 98: 296-304

- 
- Enchev V (1998)  
DNA ploidy and morphometric features of normal, hyperplastic, premalignant and malignant specimens.  
Anal Quant Cytol Histol 20 (4): 288-296
- Ferlito A (1995)  
The natural history of early vocal cord cancer.  
Acta Otolaryngol 115: 345-347
- Fleege JC, Van Diest PJ, Baak JP (1990)  
Computer assisted efficiency testing of different sampling methods for selective nuclear graphic tablet morphometry.  
Lab Invest 63: 270-275
- Friedlander ML, Russel P, Taylor IW, Hedley DW, Tattersall MHN (1984)  
Flow cytometric analysis of cellular DNA content as an adjunct to the diagnosis of ovarian tumors of borderline malignancy.  
Pathol 16: 301-306
- Fu YW, Reagan JW, Fu AS, Janiga KE (1982)  
Adenocarcinoma and mixed carcinoma of the uterine cervix. 2: Prognostic value of nuclear DNA analysis.  
Cancer 49: 2571-2577
- Giardina C, Serio G, Caniglia DM, Lettini T, Ricco R, Renzulli G, Pesce Delfino V (1994)  
Nuclear morphology and histological grading of oral squamous cell carcinoma (OSCC). A morphometric study.  
Boll Soc Ital Biol Sper 70: 271-279
- Glanz H, Hermanek P, Kleinsasser O, Popella C (1993)  
Weiterentwicklung der TNM-Klassifikation der Larynxkarzinome.  
Laryngo Rhino Otol 72: 568-573
- Gritz ER, Carmack CL, de Moor C, Coscarelli A, Schacherer CW, Meyers EG, Abemayor E (1999)  
First year after head and neck cancer: Quality of life.  
J Clin Oncol 17 (1): 352-360
- Gschwendtner A, Kreczy A, Prein K, Schonthaler C, Mairinger T (1994)  
DNA cytometry: Diploid standard and section thickness.  
Am J Clin Pathol 102: 558-559
- Gschwendtner A, Mairinger T (1995)  
How thick is your section? The influence of section thickness on DNA-cytometry on histological sections.  
Anal Cell Pathol 9: 29-37

- 
- Hambraeus GM, Mercke CE, Willen R, Ranstam J, Samuelson L, Lamm IL, Landberg T (1988)  
Prognostic factors influencing survival in combined radiotherapy and surgery of squamous cell carcinoma of the esophagus with special reference to a histopathologic grading system.  
*Cancer* 62: 895-904
- Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A (1998)  
1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation.  
*Anal Cell Path* 17: 189-200
- Haroske G, Meyer W, Dimmer V, Kunze KD, Theissing F (1993)  
Feasibility and limitations of a cytometric DNA ploidy analysis procedure in tissue sections.  
*Zentralbl Pathol* 139: 407-417
- Hellquist H, Olofsson J, Lundgren J, Gröntoft O (1984)  
Photometric studies on nuclear DNA content and area in different laryngeal epithelia.  
*Cancer Detect Prev* 7: 275-277
- Höfken F, Welkoborsky HJ, Jakob R, Mann W (1995)  
DNA-zytometrische Untersuchungen von Mund und Rachenspülflüssigkeit als Screening-Verfahren zur Diagnose von Malignomen der Mundhöhle und des Oropharynx.  
*Laryngo-Rhino Otol* 74: 678-683
- Jackson C (1923)  
Cancer of the larynx: is it preceded by a recognizable precancerous condition?  
*Ann Surg* 77: 1-14
- Kambic V, Gale N (1986)  
Significance of keratosis and dyskeratosis for classifying hyperplastic aberrations of laryngeal mucosa.  
*Am J Otolaryngol* 7: 323-333
- Kashyap V, Das DK, Luthra UK (1990)  
Microphotometric nuclear DNA analysis in cervical dysplasia of the uterine cervix: Its relation to the progression to malignancy and regression to normalcy.  
*Neoplasma* 37: 497-500
- Kearsley JH, Furlong KL, Cooke RA, Waters MJ (1990)  
An immunohistochemical assessment of cellular proliferation markers in head and neck squamous cell cancers.  
*Br J Cancer* 61: 821-827



- 
- Kleinsasser O (1962)  
Die Laryngomikroskope (Lupenlaryngoskopie) und ihre Bedeutung für die Erkennung der Vorerkrankungen und Frühformen des Stimmlippencarcinomas.  
Arch Ohren Nasen Kehlkopfheilkd 180: 724-727  
Zitiert nach Kleinsasser O: Tumors of the larynx and hypopharynx. Thieme, Stuttgart 1988
- Kleinsasser O (1963)  
Die Klassifikation und Differentialdiagnose der Epithelhyperplasien der Kehlkopfschleimhaut aufgrund histomorphologischer Merkmale.  
Z Laryngol Rhinol 42: 339-362
- Klestadt W (1931)  
Zur Frage des Pachyderma laryngis als Vorkrankheit des Karzinoms.  
Laryngo Rhino Otol 20: 20-33
- Klöppel G, Knöfel WT, Baisch H, Otto U (1986)  
Prognosis of renal carcinoma related to nuclear grade, DNA-content and Robson stage.  
Euro Urol 12: 426-431
- Köhler W, Schachtel G, Voleske P (1996)  
Biostatistik.  
2. Aufl., Springer, Berlin
- Koss LG, Wersto RP, Simmons DA, Deitch D, Herz F, Freed SZ (1989)  
Predictive value of DNA measurements in bladder washings.  
Comparison of flow cytometry, image cytophotometry and cytology in patients with a past history of urothelial tumors.  
Cancer 64: 916-924
- Kusaba Y (1992)  
Clinicopathological study on the proliferation and differentiation of laryngeal carcinoma and dysplasia.  
Fukuoka Igaku Zasshi 83: 426-433
- Kysela B, Siracky J, Redecha M, Bardos A (1990)  
Flow cytometry (FCM) analysis of endometrial hyperplasia and carcinoma.  
Neoplasma 37: 489-495
- LaRaja MC, Virno F, Mechella M, D' Adrea M, D' Alessio A, Ranieri E, Pagr~~o~~ (1997)  
Depression secondary to tumors in patients who underwent surgery for mammary carcinoma: Psycho-pharmaceutical and psycho-therapeutic care.  
J Exp Clin Cancer Res 16: 209-216
- Larsen LE, Walter DO, McNew JJ, Adey WR (1971)  
On the problem of bias in error rate estimation for discriminant analysis.  
Pattern Recogn 3: 217-223

- 
- Lee AK, Dugan J, Hamilton WM, Cook L, Heatly G, Kamat B, Silverman ML (1991)  
Quantitative DNA analysis in breast carcinomas: A comparison between image analysis and flow cytometry.  
Mod Pathol 4: 178-182
- Lindholm J, Rubio CA (1989)  
A morphometric method to discriminate normal from dysplastic / carcinoma in situ squamous epithelium in the human esophagus.  
Path Res Pract 184: 297-305
- Liung BM, Mayal B, Lottich C, Boyer C, Sylvester SS, Leight GS, Siegler HF, Smith HS (1989)  
Cell dissociation techniques in human breast cancer - Variations in tumor cell viability and DNA ploidy.  
Breast Cancer Res Treat 13: 153-159
- Lubsen H, Olde Kalter P (1992)  
Premalignant laryngeal lesions.  
Acta Otorhinolaryngol Belg 46: 117-126
- Maier H, Tisch M (1997)  
Epidemiology of laryngeal cancer: results of the Heidelberg case-control study.  
Acta Otolaryngol Suppl (Stockh.) 527: 160-164
- Mairinger T, Gschwendtner A (1998)  
Ploidy determination in prostatic adenocarcinoma using thin histological sections: A more sensitive way of detecting aneuploid tumor clones.  
Prostate 37: 30-35
- Makiyama K, Tokunaga M, Itsuno M, Zea-Iriarte W, Hara K (1995)  
DNA aneuploidy in a case of rectosigmoid adenocarcinoma complicated by ulcerative colitis.  
J Gastroenterol 30: 258-263
- Malusardi G, Oldini C, Leopardi O (1992)  
The quantitative study of nucleolar organizers (AgNOR) in the diagnosis of laryngeal dysplasias and in the assessment of the prognosis in invasive carcinoma.  
Acta Otorhinolaryngol Ital 12: 3-12
- Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, Manni JJ, Grootenboer B van t Hof, Mulder PH, de Ruiter DJ (1993)  
E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome.  
Int J Cancer 55: 580-585
- Matturri L, Biondo B, Tamplenizza P, Ottaviani A, Lavezzi AM (1997)  
DNA content and thymidine labeling index correlate with prognosis in squamous cell carcinoma of the larynx.  
Cancer Detect Prev 21 (4): 319-325

- 
- Mauri FA, Ferrero S, Barbareschi M, Scampini S, Muscara M, Motta M (1990)  
AgNOR distribution in normal and dysplastic laryngeal mucosa and in laryngeal epidermoid carcinomas.  
*Pathologica* 82: 493-497
- McCready RW, Papadimitriou JM (1983)  
An analysis of DNA cytophotometry on tissue sections on a rat liver model.  
*Analyt Quant Cytol* 5: 117-123
- Mellin W (1990)  
Cytophotometry in Tumor Pathology. A critical review of methods and applications, and some results of DNA analysis.  
*Path Res Pract* 186: 37-62
- Miyagi M, Soda T, Nakashima T (1994)  
Flow cytometric analysis and chemosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck.  
*Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 97: 2247-2258
- Motherby H, Marcy T, Hecker M, Ross B, Nadjari B, Auer H, Müller KM, Häussinger D, Strauer BE, Böcking A (1998 I)  
Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology. I. DNA aneuploidy for identification and differentiation of primary and secondary tumors of the serous membranes.  
*Analyt Quant Cytol Histol* 20: 153-161
- Motherby H, Nadjari B, Remmerbach T, Marcy T, Pomjanskaja N, Müller W, Knops K, Häussinger D, Strauer BE, Böcking A (1998 II)  
Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology. II. DNA aneuploidy for identification of neoplastic cells in equivocal effusions.  
*Analyt Quant Cytol Histol* 20: 162-168
- Munck-Wikland E, Edström S, Jungmark E, Kuylenstierna R, Lindholm J, Auer G (1994)  
Nuclear DNA content, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 immunostaining in predicting progression of laryngeal cancer in situ lesions.  
*Int J Cancer* 56: 95-99
- Munck-Wikland E, Kuylenstierna R, Lindholm J, Auer G (1991)  
Image cytometry DNA analysis of dysplastic squamous epithelial lesions in the larynx.  
*Anticancer Res* 11: 597-600
- Nakanishi K, Kawai T, Suzuki M, Torikata C (1996)  
Prognostic factors in urachal adenocarcinoma: A study in 41 specimens of DNA status, proliferating cell-nuclear antigen immunostaining, and argyrophilic nucleolar-organizer region counts.  
*Human Pathol* 27: 240-247

- 
- Nalbadian M, Nikolaou A, Nikolaidis V, Petridis D, Themelis C, Daniilidis I (2001)  
Factors influencing quality of life in laryngectomized patients.  
Eur Arch Otorhinolaryngol 258: 336-340
- Nativ O, Sabo E, Bejar J, Halachmi S, Moskovitz B, Miselevich I (1996)  
A comparison between histological grade and nuclear morphometry for predicting  
the clinical outcome of localized renal cell carcinoma.  
Br J Urol 78 (1): 33-38
- Nenning H, Hering B, Horn LC, Kühndel K (1997)  
Prognostischer Wert der DNA-Zytometrie bei Zervixzytologien PAP III D.  
Verh Dtsch Ges Path 81: 651
- Nicholson GL (1987)  
Tumor cell instability, diversification and progression to the metastatic phenotype:  
From oncogene to oncofetal expression.  
Cancer Res 47: 1473-1487
- Noell G (1962)  
Zur Frage der altersbedingten Veränderungen der Larynxschleimhaut.  
Arch Ohrenheilk 179: 361
- Öfner D, Riedmann B, Maier H, Hittmair A, Rumer A, Tötsch M, Spechtenhauer B,  
Böcker W, Schmid KW (1995)  
Standardized staining and analysis of argyrophilic nucleolar organizer region  
associated proteins (AgNORs) in radically resected colorectal adenocarcinoma -  
correlation with tumour stage and long-term survival.  
J Pathol 175: 441-448
- Olde Kalter P, Delemarre FJ (1986)  
The clinical relevance of classification of squamous cell hyperplasia of the larynx  
by morphometry.  
Acta Oto-Laryngol 101: 331-340
- Olde Kalter P, Delemarre FJ, Alons CL, Meijer CJ, Snow GB (1986)  
The prognostic significance of morphometry for squamous cell hyperplasia of the  
laryngeal epithelium.  
Acta Oto-Laryngol 102: 124-130
- Olofson J, Franzen G, Lundgren J (1986)  
Hypertetraploid cells in vocal cord epithelia.  
Clin Otolaryngol 11: 345-351
- Park CH, Kimler BF (1994)  
Tumor cell-selective flow cytometric analysis for DNA content and cytokeratin  
expression of clinical tumor specimens by "cross-gating".  
Anticancer Res 14: 29-36

- 
- Pich A, Chiusa L, Margaria E (1995)  
Role of the argyrophilic nucleolar organizer regions in tumor detection and prognosis.  
*Cancer Detect Prev* 19: 282-291
- Raudys S, Jain A (1991)  
Small sample size effects in statistical pattern recognition: Recommendations for practitioners.  
*IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* 13: 252-264
- Resta L, Colucci GA, Troia M, Russo S, Vacca E, Pesce Delfino V (1992)  
Laryngeal intraepithelial neoplasia (LIN). An analytical morphometric approach.  
*Pathol Res Pract* 188: 517-523
- Rua S, Comino A, Fruttero A, Cera G, Semeria C, Lanzilotta L, Boffetta P (1991)  
Relationship between histologic features, DNA flow cytometry, and clinical behavior of squamous cell carcinoma of the larynx.  
*Cancer* 67: 141-149
- Sachs H, Wambach EU, Wirthner K (1974)  
Zytophotometrisch ermittelter DNA-Gehalt im normalen, hyperplastischen und karzinomatösen Endometrium.  
*Arch Gynäkol* 217: 349-365
- Schimming R, Hlawitschka M, Haroske G, Eckelt U (1998)  
Prognostic relevance of DNA image cytometry in oral cavity carcinomas.  
*Analyt Quant Cytol Histol* 20: 43-51
- Schulerud H, Kristensen GB, Liestøl K, Vlatkovic L, Reith A, Albregtsen F, Danielsen HE (1998)  
A review of caveats in statistical nuclear image analysis.  
*Anal Cell Pathol* 16: 63-82
- Schutte B, Tinnemans MMFJ, Pijpers GFP, Lenders MHJH, Ramaekers FCS (1995)  
Three parameter flow cytometric analysis for simultaneous detection of cytokeratin, proliferation associated antigens and DNA content.  
*Cytometry* 21: 177-186
- Seiferth LB, Glanz H (1971)  
Karzinoma in situ laryngis.  
*Laryngol Rhinol* 50: 827-854
- Sessions RB, Harrison LB, Forastière AA (1997)  
Tumors of the larynx and hypopharynx.  
In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds.)  
*Cancer: principles and practice of oncology*.  
Lippincott, Philadelphia

- 
- Shabana AHM, El-Labban NG, Lee KW (1987)  
Morphometric analysis of basal cell layer in oral premalignant white lesions and squamous cell carcinoma.  
J Clin Pathol 40: 454-458
- Shankey TV, Kallioniemi OP, Koslowski JM, Lieber ML, Mayall BH, Miller G, Smith GJ (1993)  
Consensus review of the clinical utility of DNA content cytometry in prostate cancer.  
Cytometry 14: 497-500
- Silvestri F, Bussani R, Pavletic N, Mannone T, Bosatra A (1997)  
From epithelial dysplasia to squamous carcinoma in the head and neck Region: Evolutive and prognostic histopathological markers.  
Acta Otolaryngol (Stockh), Suppl. 527: 49-51
- Smith AL, Hung J, Walker L, Rogers TE, Vuitch F, Lee E, Gazdar AF (1996)  
Extensive areas of aneuploidy are present in the respiratory epithelium of lung cancer patients.  
Br J Cancer 73: 203-209
- Sprenger E, Hilgarth M, Schaden M (1974)  
A follow up of doubtful findings in cervical cytology by Feulgen DNA cytophotometry.  
Beitr Pathol 152: 58-65
- Stenersen TC, Boysen M, Juhng SW, Reith A (1992)  
Quantitative histopathological evaluation of vocal cord dysplasia with particular emphasis on nuclear orientation.  
Pathol Res Pract 188: 524-530
- Stern Y, Aronson M, Shpitzer T, Nativ O, Medalia O, Segal K, Feinmesser R (1995)  
Significance of DNA ploidy in the treatment of T1 glottic carcinoma.  
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 121: 1003-1005
- Sudbø J, Kildal W, Risberg B, Koppang HS, Danielsen HE, Reith A (2001)  
DNA content as a prognostic marker in patients with oral leucoplakia.  
NEJM 344, 17: 1270-1278
- Syms CA, Eibling DE, McCoy JP, Barnes L, Emanuel B, Fowler C, Wagner R, Johnson JT (1995)  
Flow cytometric analysis of primary and metastatic squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx.  
Laryngoscope 105: 149-155
- Talve LAI, Collan YUI, Ekfors TO (1997)  
Primary malignant melanoma of the skin. Relationships of nuclear DNA-content, nuclear morphometric variables, clark level and tumor thickness.  
Analyt Quant Cytol Histol 19: 62-74

- 
- Terrel JE, Fisher SG, Wolf GT (1998)  
Long term quality of life after treatment of laryngeal cancer. The veterans affairs laryngeal cancer study group.  
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 124: 964-971
- Toffoli G, Franchin G, Barzan L, Cernigoi C, Carbone A, Sulfaro S, Franceschi S, Boiocchi M (1995)  
Brief report: Prognostic importance of cellular DNA content in T1-2 N0 laryngeal squamous cell carcinomas treated with radiotherapy.  
Laryngoscope 105: 649-652
- Tosi P, Luzi P, Baak JPA, Miracco C, Santopietro R, Vindigni C, Mattei FM, Acconcia A, Massai MR (1986)  
Nuclear morphometry as an important prognostic factor in stage I renal cell carcinoma.  
Cancer 58: 2512-2518
- Wang E, Liu G, He M (1995)  
PCNA-Expression and AgNORs image analysis as factors in judging the prognosis of lung cancer.  
Chung Hua Ping Li Hsueh Tsa Chih 24: 143-145
- Welkoborsky HJ, Hinni M, Dienes HP, Mann WJ (1995)  
Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers.  
Ann Otol Rhinol Laryngol 104: 503-510
- Williams RA, Baak JPA, Gerrit AM, Charlton IG (1999)  
DNA ploidy and nuclear morphometry for the classification of dysplastic naevi.  
Anal Quant Cytol Histol 21: 437-444
- Wynder EL, Bross IJ, Day E (1956)  
Epidemiological approach to the etiology of cancer of the larynx.  
J Am Med Ass 160: 1384-1391
- Xin X, Sudbi J, Boysen, M, Reith A (1996)  
Caveats in the use of paraffin sections for DNA assessment in nuclei as demonstrated by confocal laser scanning microscopy.  
Anal Quant Cytol Histol 18: 104
- Zbieranowski I, Le Riche JC, Palcic B, Gascoyne R, Connors J (1992)  
Determination of DNA ploidy in archival tissue from non-Hodkin's lymphoma using flow and image cytometry.  
Anal Cell Pathol 4: 303-313
- Zhou W (1991)  
Flow cytometric DNA analysis and its relationship with pathology and prognosis in lung carcinoma.  
Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi 20: 184-186

## 8 Anhang

Tab. 8.1: Geschlechterverteilung (absolut und %) aller Larynxdysplasien ( $LD_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS

		Diagnose			
		<b><math>LD_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LD I</b> <b>n = 11</b>	<b>LD II</b> <b>n = 11</b>	<b>LD III/CAIS</b> <b>n = 16</b>
weiblich	abs.	6	2	2	2
	%	15,8	18,2	18,2	12,5
männlich	abs.	32	9	9	14
	%	84,2	81,8	81,8	87,5

Tab. 8.2: Geschlechterverteilung (absolut und %) aller Larynxkarzinome ( $LCA_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3

		Diagnose			
		<b><math>LCA_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LCA-G1</b> <b>n = 13</b>	<b>LCA-G2</b> <b>n = 15</b>	<b>LCA-G3</b> <b>n = 10</b>
weiblich	abs.	4	2	1	1
	%	10,5	15,4	6,7	10,0
männlich	abs.	34	11	14	9
	%	89,5	84,6	93,3	90,0



Tab. 8.3: Anzahl der euploiden und aneuploiden Fälle (absolut und %) aller Larynxdysplasien ( $LD_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS

		Diagnose			
		<b><math>LD_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LD I</b> <b>n = 11</b>	<b>LD II</b> <b>n = 11</b>	<b>LD III/CAIS</b> <b>n = 16</b>
euploid	abs.	28	10	11	7
	%	73,7	90,9	100	43,8
aneuploid	abs.	10	1	0	9
	%	26,3	9,1	0	56,2

Tab. 8.4: Anzahl der euploiden und aneuploiden Fälle (absolut und %) aller Larynxkarzinome ( $LCA_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3

		Diagnose			
		<b><math>LCA_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LCA-G1</b> <b>n = 13</b>	<b>LCA-G2</b> <b>n = 15</b>	<b>LCA-G3</b> <b>n = 10</b>
euploid	abs.	5	5	0	0
	%	13,2	38,5	0	0
aneuploid	abs.	33	8	15	10
	%	86,8	61,5	100	100

Tab. 8.5: Kernfläche (Mittelwert und Standardabweichung) aller Larynxdysplasien ( $LD_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS

	<b>Diagnose</b>			
	<b><math>LD_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LD I</b> <b>n = 11</b>	<b>LD II</b> <b>n = 11</b>	<b>LD III/CAIS</b> <b>n = 16</b>
Kernfläche [ $\mu\text{m}^2$ ]	40,37 ± 11,31	36,38 ± 5,85	34,18 ± 10,26	47,36 ± 11,44

Tab. 8.6: Kernfläche (Mittelwert und Standardabweichung) aller Larynxkarzinome ( $LCA_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3

	<b>Diagnose</b>			
	<b><math>LCA_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LCA-G1</b> <b>n = 13</b>	<b>LCA-G2</b> <b>n = 15</b>	<b>LCA-G3</b> <b>n = 10</b>
Kernfläche [ $\mu\text{m}^2$ ]	44,21 ± 12,95	42,24 ± 8,74	39,15 ± 10,90	54,35 ± 15,50

Tab. 8.7: Kernflächenschwankung (Mittelwert und Standardabweichung) aller Larynxdysplasien ( $LD_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS

	<b>Diagnose</b>			
	<b><math>LD_{\text{Gesamt}}</math> n = 38</b>	<b>LD I n = 11</b>	<b>LD II n = 11</b>	<b>LD III/CAIS n = 16</b>
Kernflächenschwankung [ $\mu\text{m}^2$ ]	16,66 ± 8,45	13,41 ± 2,36	11,61 ± 5,54	22,37 ± 9,53

Tab. 8.8: Kernflächenschwankung (Mittelwert und Standardabweichung) aller Larynxkarzinome ( $LCA_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3

	<b>Diagnose</b>			
	<b><math>LCA_{\text{Gesamt}}</math> n = 38</b>	<b>LCA-G1 n = 13</b>	<b>LCA-G2 n = 15</b>	<b>LCA-G3 n = 10</b>
Kernflächenschwankung [ $\mu\text{m}^2$ ]	16,49 ± 6,79	16,88 ± 5,45	12,99 ± 4,88	21,23 ± 8,22

Tab. 8.9: Multiparameteratypieindex (Mittelwert und Standardabweichung) aller Larynxdysplasien ( $LD_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS

	<b>Diagnose</b>			
	<b><math>LD_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LD I</b> <b>n = 11</b>	<b>LD II</b> <b>n = 11</b>	<b>LD III/CAIS</b> <b>n = 16</b>
MAI	0,34 ± 1,45	- 0,30 ± 0,77	- 0,64 ± 0,72	1,44 ± 1,48

MAI = Multiparameteratypieindex

Tab. 8.10: Multiparameteratypieindex (Mittelwert und Standardabweichung) aller Larynxkarzinome ( $LCA_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3

	<b>Diagnose</b>			
	<b><math>LCA_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LCA-G1</b> <b>n = 13</b>	<b>LCA-G2</b> <b>n = 15</b>	<b>LCA-G3</b> <b>n = 10</b>
MAI	1,65 ± 1,10	1,09 ± 1,06	1,50 ± 0,75	2,60 ± 1,07

MAI = Multiparameteratypieindex

Tab. 8.11: Anzahl der Fälle (absolut und %) mit Kernflächenwerten  $\leq 42,29 \mu\text{m}^2$  (Klassifikation als benigne) und Kernflächenwerten  $> 42,29 \mu\text{m}^2$  (Klassifikation als maligne) aller Larynxdysplasien ( $\text{LD}_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS

		Diagnose			
		<b><math>\text{LD}_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LD I</b> <b>n = 11</b>	<b>LD II</b> <b>n = 11</b>	<b>LD III/CAIS</b> <b>n = 16</b>
$\leq 42,29 \mu\text{m}^2$ (benigne)	abs.	24	9	9	6
	%	63,2	81,8	81,8	37,5
$> 42,29 \mu\text{m}^2$ (maligne)	abs.	14	2	2	10
	%	36,8	18,2	18,2	62,5

Tab. 8.12: Anzahl der Fälle (absolut und %) mit Kernflächenwerten  $\leq 42,29 \mu\text{m}^2$  (Klassifikation als benigne) und Kernflächenwerten  $> 42,29 \mu\text{m}^2$  (Klassifikation als maligne) aller Larynxkarzinome ( $\text{LCA}_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3

		Diagnose			
		<b><math>\text{LCA}_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LCA-G1</b> <b>n = 13</b>	<b>LCA-G2</b> <b>n = 15</b>	<b>LCA-G3</b> <b>n = 10</b>
$\leq 42,29 \mu\text{m}^2$ (benigne)	abs.	20	7	10	3
	%	52,6	53,8	66,7	30,0
$> 42,29 \mu\text{m}^2$ (maligne)	abs.	18	6	5	7
	%	47,4	46,2	33,3	70,0

Tab. 8.13: Anzahl der Fälle (absolut und %) mit Kernflächenschwankungswerten  $\leq 16,58 \mu\text{m}^2$  (Klassifikation als benigne) und Kernflächenschwankungswerten  $> 16,58 \mu\text{m}^2$  (Klassifikation als maligne) aller Larynxdysplasien ( $\text{LD}_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS

		Diagnose			
		<b><math>\text{LD}_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LD I</b> <b>n = 11</b>	<b>LD II</b> <b>n = 11</b>	<b>LD III/CAIS</b> <b>n = 16</b>
$< = 16,58 \mu\text{m}^2$ (benigne)	abs.	23	10	8	5
	%	60,5	90,9	72,7	31,3
$> 16,58 \mu\text{m}^2$ (maligne)	abs.	15	1	3	11
	%	39,5	9,1	27,3	68,7

Tab. 8.14: Anzahl der Fälle (absolut und %) mit Kernflächenschwankungswerten  $\leq 16,58 \mu\text{m}^2$  (Klassifikation als benigne) und Kernflächenschwankungswerten  $> 16,58 \mu\text{m}^2$  (Klassifikation als maligne) aller Larynxkarzinome ( $\text{LCA}_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3

		Diagnose			
		<b><math>\text{LCA}_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LCA-G1</b> <b>n = 13</b>	<b>LCA-G2</b> <b>n = 15</b>	<b>LCA-G3</b> <b>n = 10</b>
$< = 16,58 \mu\text{m}^2$ (benigne)	abs.	19	7	10	2
	%	50,0	53,8	66,7	20,0
$> 16,58 \mu\text{m}^2$ (maligne)	abs.	19	6	5	8
	%	50,0	46,2	33,3	80,0

Tab. 8.15: Anzahl der Fälle (absolut und %) mit MAI-Werten  $\leq 0$  (MAI-Klassifikation als benigne) und MAI-Werten  $> 0$  (MAI-Klassifikation als maligne) aller Larynxdysplasien ( $LD_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LD I, LD II und LD III/CAIS

		Diagnose			
		<b><math>LD_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LD I</b> <b>n = 11</b>	<b>LD II</b> <b>n = 11</b>	<b>LD III/CAIS</b> <b>n = 16</b>
$\leq 0$ (benigne)	abs.	21	9	9	3
	%	55,3	81,8	81,8	18,8
$> 0$ (maligne)	abs.	17	2	2	13
	%	44,7	18,2	18,2	81,2

Tab. 8.16: Anzahl der Fälle (absolut und %) mit MAI-Werten  $\leq 0$  (MAI-Klassifikation als benigne) und MAI-Werten  $> 0$  (MAI-Klassifikation als maligne) aller Larynxkarzinome ( $LCA_{\text{Gesamt}}$ ) sowie der Differenzierungsgrade LCA-G1, LCA-G2 und LCA-G3

		Diagnose			
		<b><math>LCA_{\text{Gesamt}}</math></b> <b>n = 38</b>	<b>LCA-G1</b> <b>n = 13</b>	<b>LCA-G2</b> <b>n = 15</b>	<b>LCA-G3</b> <b>n = 10</b>
$\leq 0$ (benigne)	abs.	2	2	0	0
	%	5,3	15,4	0	0
$> 0$ (maligne)	abs.	36	11	15	10
	%	94,7	84,6	100	100

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. A. Schulz, Leiter des Institutes für Pathologie am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen, danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seinem Labor.

Mein besonderer und auch herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Dreyer für die hervorragende fachliche Unterstützung, die konstruktive Kritik, für seine engagierte Betreuung und die vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Julia, Martin, Ilka sowie Lore und Edi Schmidt möchte ich meinen herzlichen Dank für die sorgfältige und kritische Durchsicht des Manuskripts aussprechen.

Meiner lieben Frau Andrea danke ich für den liebevollen Rückhalt und die wertvollen Anregungen, die mir unendlich bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben. Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern, die mit großer Geduld, Empathie und Diskussionsbereitschaft diese Arbeit begleitet haben. Auch meinen Großeltern und Geschwistern möchte ich an dieser Stelle herzlich für die verständnisvolle Unterstützung danken.



Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Biebertal, 14.06.2004

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Tojon Richard Straßburg  
Geboren am: 29.11.1968 in Lübbecke / Westfalen  
Familienstand: verheiratet

## Schulbildung

1985 – 1988 Gymnasium Espelkamp  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
1979 – 1985 Realschule Rahden  
1975 – 1979 Grundschule Rahden

## Wehrdienst

1988 – 1989 Feldartilleriebataillon 31, Lüneburg

## Hochschulbildung

1990 – 1997 Studium der Medizin an der  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
1996 – 1997 Praktisches Jahr:  
Chirurgie, Innere Medizin:  
Evangelisches Krankenhaus Gießen  
Orthopädie: Klinikum der JLU Gießen,  
University of North Carolina at Chapel Hill, USA

## Arzt im Praktikum

1998 – 1999 Chirurgie Evangelisches Krankenhaus, Gießen  
Chefarzt Prof. Dr. med. K.-H. Muhrer,  
Lehrtätigkeit in der Krankenpflegeschule des  
Evangelischen Krankenhauses Gießen

## Assistenzarzt

2000 – 2001 Park-Klinik, Bad Nauheim  
Klinik für Orthopädie, Rheumatologie und  
Stoffwechselkrankheiten  
Chefarzt Dr. med. U. Müller  
2001 – 2002 Werner-Wicker-Klinik, Bad Wildungen  
Zentrum für Wirbelsäulenchirurgie /  
Deutsches Skoliose Zentrum  
Chefarzt Dr. med. P. Metz-Stavenhagen  
seit 2002 Orthopädische Klinik Braunfels  
Chefarzt Dr. med. B. Jung

