

Einfluss der Epitheldicke auf die Ergebnisse der Autofluoreszenzendoskopie bei pathologischen Veränderungen der Stimmlippen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Schöberlein, Selina Margret
aus Heidenheim an der Brenz

Gießen 2009

Aus dem Zentrum für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Direktorin: Frau Prof. Dr. med. H.Glanz

Gutachter: Herr Prof. Dr. Arens

Gutachter: Frau PD Dr. Wimmer-Röll

Tag der Disputation: 23.09.2009

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	Einleitung	4
1.1	Grundlagen der Kehlkopfanatomie und -histologie	6
1.1.1	Die Schleimhaut	8
1.2	Präkanzerosen	11
1.2.1	Terminologie der Präkanzerosen und Klassifikation	11
1.2.2	Klassifikation nach Kleinsasser	13
1.2.3	Problematik des Präkanzerosebegriffs	15
1.2.4	Laryngoskopie und Möglichkeiten	17
1.3	Das System der Fluoreszenz	21
1.3.1	Die Autofluoreszenz	24
1.3.2	Autofluoreszenzendoskopie	25
2	Material und Methoden	28
2.1	Bearbeitung der histologischen Präparate	29
2.2	Beurteilung der endoskopischen Autofluoreszenzbilder	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Die histologische Vermessung	32
3.2	Laryngoskopische Ergebnisse	42
4	Diskussion	52
5	Zusammenfassung	61
5.1	Deutsch	61
5.2	English	63
6	Literatur	66
7	Danksagung	78

1 Einleitung

In der Bundesrepublik Deutschland stellen maligne Erkrankungen nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar ^{Straßburg et al., 1991}. Bei einer leicht rückläufigen Tendenz der altersbereinigten Krebssterblichkeit stirbt jedoch noch immer jeder vierte in Deutschland an Krebs und jeder dritte an den Folgen einer Herz-Kreislaufkrankung ^{Becker & Wahrendorf, 1997}. Plattenepithelkarzinome der Schleimhäute des oberen Aerodigestivtraktes stehen mit einer weltweiten Inzidenz von über 500.000 Fällen pro Jahr an sechster Stelle aller malignen Neubildungen bei Menschen ^{Parkin et al., 1999}. Damit machen die Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes 3,6 % aller malignen Tumorerkrankungen und 2,2 % aller Krebstodesfälle aus.

Ätiologisch wird – wie bei nahezu allen Neubildungen – ein multifaktorielles Geschehen angenommen. Im Gegensatz zu zahlreichen anderen Tumorarten spielen bei der Entstehung eines Kopf-Hals-Karzinoms exogene Faktoren eine wichtige Rolle. Als Hauptrisikofaktoren konnten in mehreren epidemiologischen Studien der Zigaretten- und Alkoholkonsum identifiziert werden ^{Bosatra et al., 1997; Burch et al., 1981; Dietz, 2004; Laniado et al., 1981; Macfarlane et al., 1995; Maier et al., 1994b; Merletti et al., 1989}, die auch durch das Internationale Krebsforschungszentrum als Kausalzusammenhang benannt werden. Weiterhin wird dort eine epidemiologische Evidenz zu beruflicher Asbestexposition beschreiben. Daniilidis erkannte 1983 einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Umweltbelastung und der Ausbildung schwerer Epithelveränderungen ^{Daniilidis, 1983}.

Daneben sind eine mangelnde Mundhygiene ^{Moreno-Lopez et al., 2000}, weitere berufliche Expositionen ^{Maier et al., 1994a}, sowie – besonders auf dem asiatischen Kontinent – der Genuss von Kautabak und Betelnuss ebenfalls von Bedeutung ^{Zain et al., 1999}.

Plattenepithelkarzinome des Kehlkopfs stellen mit einem Anteil von knapp 30 % das häufigste Malignom im Kopf-Hals-Bereich dar. In Europa ist das Larynxkarzinom das häufigste Karzinom des oberen Aerodigestivtraktes ^{Maier, 1997}.

Kehlkopfkrebs gehört zu denjenigen Tumorarten, die erfolgreich therapiert werden können. Die relativen Fünfjahresüberlebensraten werden für Männer vom Saarländischen Krebsregister mit 65,4 % und vom Register der ehemaligen DDR mit 55,5 % angegeben, sowie für Frauen mit 75,8 % (West) und 66,4 % (Ost). Es sind signifikant mehr Männer als Frauen betroffen ^{Krebsatlas, 2003; Laniado et al., 1981}. Glanz et al. berichten über 63,3 % frühdiagnostizierte Stimmlippenkarzinome in den Stadien Tis und T1, die nach

primär chirurgischer Therapie eine Fünfjahresüberlebensrate von 100 % aufwiesen^{Glanz et al., 1989}.

Die Suche nach einer Methode zur Früherkennung von präkanzerösen und kanzerösen Schleimhautläsionen ist schon seit langem ein entschiedenes Ziel in der Tumordiagnostik. In diesem Zusammenhang wird der Autofluoreszenzendoskopie bereits in vielen Fachbereichen ein zukunftsweisendes Potential zugesprochen^{Arens et al., 1999; Arens et al., 2003; Arens et al., 2004; Baletic et al., 2004; Malzahn et al., 2002; Dhingra et al., 1996; Fryen et al., 1997; Gillenwater et al., 1998 a, b; Mostafa et al., 2007; Ramanujam et al., 1994; Rydell et al., 2008; Sadri et al., 2006; Zargi et al., 1997}. Unterstützend zur klinischen Untersuchung konnte mit der Autofluoreszenzendoskopie in der Unterscheidung einfacher Hyperplasien und präkanzeröser Läsionen eine Spezifität von 97,3 % bei einer Sensitivität von 83,3 % erreicht werden^{Malzahn et al., 2002}. Žargi et al. verwendeten 1997 das Lung Imaging Fluorescence Endoscope (LIFE) zur Autofluoreszenzerzeugung und stellten fest, dass die Kombination von Weißlicht-Laryngoskopie und dem LIFE-System zur Detektion fünfmal mehr Karzinome führt, als die Diagnostik mit reinem Weißlicht, bzw. viermal mehr Karzinome, als durch die alleinige Verwendung LIFE entdeckt wurden^{Zargi et al., 1997}.

Der besondere Vorteil dieser Methode ist die gut tolerable Anwendbarkeit für den Patienten verbunden mit dem geringen Zeitaufwand und den geringen Kosten.

Das Gewebe kann allein durch die Bestrahlung mit einer geeigneten Lichtquelle zur Eigenfluoreszenz angeregt werden. Es werden keine exogenen Fluorophore benötigt. Das Verfahren, fluoreszente Tumormarker wie Tetracycline oder Hematoporphyrinderivate zu applizieren, konnte sich auf Grund des hohen Kostenaufwandes und der erhöhten Photosensibilität der Patienten bei Tageslichtexposition nicht durchsetzen^{Leonard & Becker, 1971; Zargi et al., 1997}.

In der vorliegenden Arbeit soll die Autofluoreszenzdiagnostik bezüglich ihrer Phänomene bei der klinischen Anwendung bei pT1a Larynxkarzinomen und deren dysplastischen Vorstufen, bzw. die Verbindung zwischen Autofluoreszenzverlust und Epitheldicke untersucht werden.

Ziel dieser Studie ist es, verschiedene Epithelläsionen in ihrer vertikalen Ausdehnung zu vermessen, Orientierungsbereiche dieser Epitheldicken zu finden und zu vergleichen, ob sich diese Veränderungen in charakteristischer Art und Weise dem zugehörigen Autofluoreszenzbild zuordnen lassen.

1.1 Grundlagen der Kehlkopfanatomie und -histologie

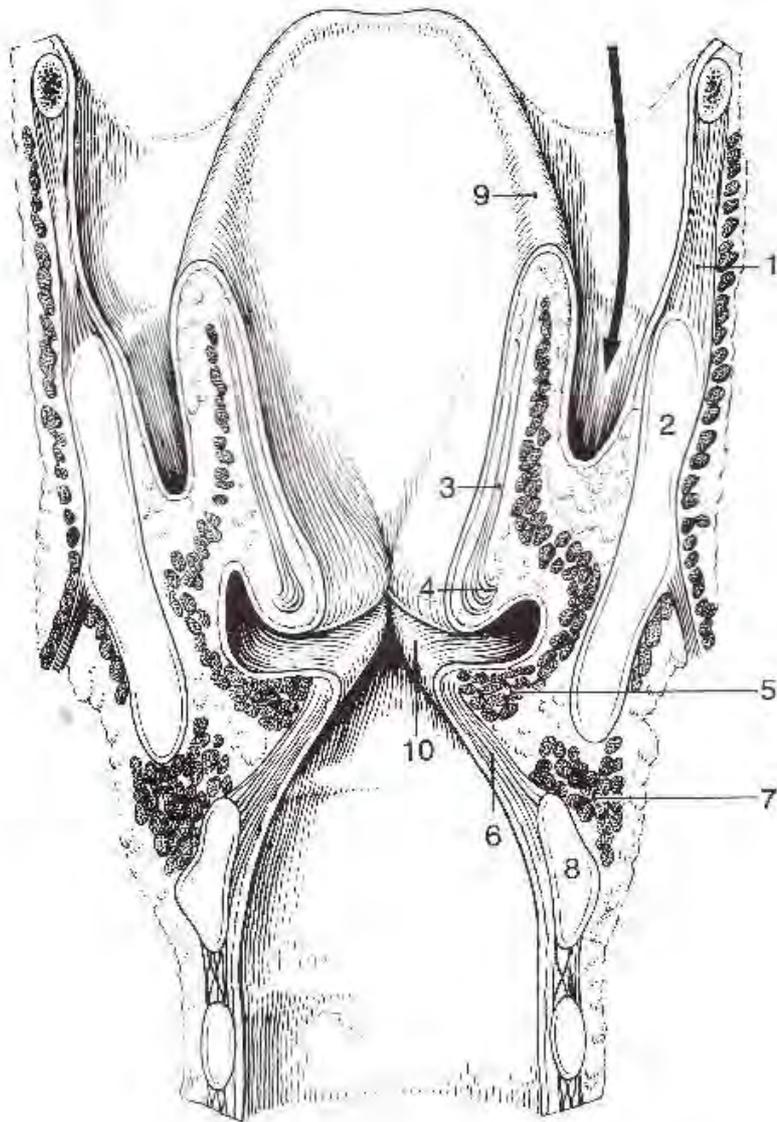
Der Kehlkopf stellt ein doppeltes Sphinktersystem dar. Er umgibt den Abgang der unteren Atemwege vom Oro-Hypopharynx und bildet mit der Glottis (terminologische Zusammenfassung der beiden Stimmlippen) und den unteren Taschenfalten den funktionell wichtigen Verschluss des Eingangs in die Luftröhre. Die Bewegungen des Kehlkopfes nehmen Einfluss auf die Phonation und die Atmung.

Friedrich unterteilt die Glottis in einen anterioren, bei der Phonation freischwingenden, und einen posterioren Abschnitt, der aus dem elastischen Anteil des Processus vocalis und dem hyalinen Aryknorpel besteht. Dabei nimmt der posteriore Anteil bei Männern 37%, bei Frauen 42% der Gesamtlängslänge ein ^{Friedrich, 1993}.

Die Sphinktersysteme werden physiologisch bei allen Körperaktivitäten genutzt, die einen Ausatemungsstopp benötigen, wie z.B. die Erhöhung des intraabdominellen Drucks. Auf Grund der unterschiedlichen anatomischen Ausrichtung und der funktionellen Kopplung von Atmungs- und Körpermuskulatur bilden die Stimmlippen hierbei ein Einatemungsventil, die Taschenfalten in funktioneller Kopplung mit der aryepiglottischen Region ein Ausatemungsventil ^{Kruse et al., 1997}.

Der Kehlkopf ist etwa 4-7 cm lang. Das Gerüst besteht aus Knorpeln, wobei die Stellknorpel in Funktion durch die Kehlkopfmuskeln gegeneinander bewegt werden können. Der Knorpel in der Larynxhinterwand verhindert das Kollabieren des Atemwegs in diesem Abschnitt.

Die paarig angelegten Stellknorpel bestehen größtenteils aus hyalinem Knorpel, ihr Processus vocalis hat eine elastische Struktur. Die Knorpelteile sind gelenkig verbunden und Bewegungen werden durch einen intercartilaginären Muskelkomplex gewährleistet, der bei Atmung, Phonation, und dem Verschluss der Luftröhre aktiviert wird. Die Innervation erfolgt über Äste des Nervus vagus.



Frontalschnitt durch den Kehlkopf.

- 1 Membrana thyrohyoidea
- 2 Schildknorpel
- 3 Membrana quadrangularis
- 4 Lig. vestibulare in der Plica vestibularis
- 5 M. vocalis
- 6 Conus elasticus
- 7 M. cricothyroideus
- 8 Ringknorpel
- 9 Plica ary-epiglottica
- 10 Plica vocalis. Pfeil im Recessus piriformis

(Abb.1.1), Rauber Kopsch Bd.2

1.1.1 Die Schleimhaut

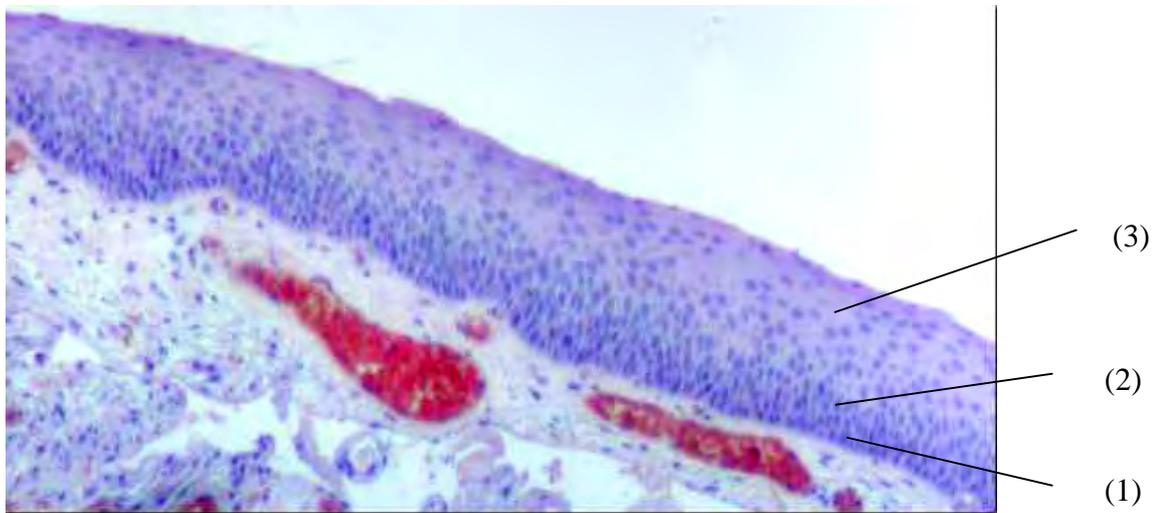
Die das Kehlkopfinnere auskleidende Schleimhaut ist mit Ausnahme des von Plattenepithel bedeckten Anteils der Plica vocalis blassrosa. An den Stellen, wo die Schleimhaut mit den Kehlkopfknorpeln fest verbunden ist, erscheint ihre Oberfläche glatt. In den übrigen Anteilen ist sie unterschiedlich stark in Falten gelegt. Da eine Tunica muscularis mucosae fehlt, ist eine scharfe Trennung zwischen Tunica mucosa und submucosa nur schwer durchzuführen. Unter der Mucosa des Kehlkopfeingangs liegt eine dünne Schicht elastischer Fasern, die bis in die Taschenfalten hineinreicht. Eine andere, kräftiger entwickelte Lage elastischer Fasern beginnt in dem Ligamentum vocale und zieht unter der Schleimhaut bis zur Innenseite des Ringknorpels und bildet als Conus elasticus eine Grenzschicht zwischen Mucosa und Submucosa.

Der größte Teil des Kehlkopfinnere wird von einem respiratorischem Epithel, einem mehrreihigen Flimmerepithel mit eingelagerten Becherzellen, ausgekleidet. Daneben kommen an einigen Stellen mit großer Regelmäßigkeit, an anderen jedoch individuell unterschiedlich große Inseln von mehrschichtigem unverhorntem Plattenepithel vor. Die Verteilung dieser Epithelarten kann individuell stark variieren und hängt von hereditären, konstitutionellen und exogenen Faktoren ab ^{Daniilidis et al., 1983; Kambič & Gale, 1995}.

Das Vorkommen von Plattenepithel im Respirationstrakt wird vielfach mit einer erhöhten mechanischen Beanspruchung in Zusammenhang gebracht und als funktionelle Metaplasie bezeichnet ^{Štiblar-Martinčič, 1997}, dort finden sich keine Becherzellen ^{Kleinsasser, 1959}.

Genau dies gilt für das Epithel im Bereich der Stimmlippen. Das Epithel der lingualen Fläche, der Epiglottis, sowie des Kehlkopfeingangs bis in die Kehlkopfhinterwand stammt aus der Schlundanlage und ist ähnlich wie die Schleimhaut des Oropharynx aufgebaut. Je nach Reiz und Alter können an der Plica ventricularis ebenfalls Plattenepithelmetaplasien auftreten. Die Verteilung der Epithelarten kann auf den Taschenfalten sowie im gesamten übrigen Bereich des Cavum laryngis individuell stark variieren.

Das mehrschichtige unverhornte Plattenepithel zeigt die typische Schichtung mit einem Stratum basale (1), Stratum spinosum (2) und Stratum superficiale (3) (siehe Abb.1.2).



(Abb.1.2)

Die Anzahl der Epithelschichten ist individuell verschieden. Einflussfaktoren der Epitheldicke sind das Alter, Geschlecht und die Lebensgewohnheiten. Beim Neugeborenen findet man ca. 5 – 7 Epithellagen ^{Kleinsasser, 1959}, während beim älteren Menschen in Abhängigkeit von Geschlecht und Lebensgewohnheiten das normale Epithel bis auf ca. 10 – 20 Epithellagen verdickt sein kann. Nach Jelinek schwankt die Dicke des normalen Stimmlippenepithels zwischen 120 und 200 μm ^{Jelinek, 1966}.

Stell beschrieb Epitheldicken von Leichenköpfen zwischen 400 – 500 μm bei Männern und 300 – 400 μm bei Frauen ^{Stell, 1978}. Dagegen berichten Ximenes Filho et al. in einer histomorphometrischen Studie an gesunden Leichenkehlköpfen davon, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Epitheldicke und dem Alter festzustellen sei ^{Ximenes Filho et al., 2003}.

Entlang des Stimmlippenverlaufs zeigt sich eine fusiforme Veränderung der Epitheldicke: Die Epitheldicke im Zentrum der Stimmlippe ist größer, als im Vergleich zur vorderen Kommissur und der Aryregion ^{Stell, 1978}.

Die Zellen des mehrreihigen Flimmerepithels haben in der obersten Schicht einen gut ausgebildeten Zilienbesatz. Der Übergang von mehrschichtigem Plattenepithel in das mehrreihige Flimmerepithel kann sich durch ein allmähliches Höherwerden der oberflächlichen Zellen vollziehen, wodurch das Bild eines mehrschichtigen Zylinderepithels (sog. Übergangsepithel) entsteht. An anderen Stellen, so vor allem an den inselförmigen

Plattenepithelnestern, gehen beide Epithelarten direkt ineinander über. Bei chronischen Noxen (z.B. Alkohol- und Nikotinkonsum) kann es zum Ersatz von Flimmerepithel durch Plattenepithel kommen. An den Zellen derartiger Übergangszonen lässt sich als Zeichen metaplastischer und regenerativer Vorgänge eine morphologische Vielgestaltigkeit beobachten. Sowohl an derartig umgewandelten Zellen als auch am übrigen Plattenepithel kann es durch chronisch schädigende Einwirkungen von außen und durch Entzündungen zu einer Epithelverdickung sowie zu Veränderungen der oberflächlichen Schichten mit einer echten Verhornung kommen. Man findet an solchen Stellen eine Verbreiterung des Stratum spinosum, an das sich ein Stratum corneum anschließt. Die Tonofilamente lagern sich hierbei zu größeren Bündeln zusammen und treten zu Keratohyalingranula in Beziehung ^{Behrendes, 1982}.

Unter der Schleimhaut verläuft die Membrana fibroelastica laryngis, die aus einem dichten elastischen Fasernetz besteht und um die Cavitas infraglottica einen kräftigen Conus elasticus bildet. Dieser entspringt von der Innenseite des Ringknorpels und setzt sich kranialwärts in die beiden Stimmbänder (Ligamenta vocalia) fort. Ventral inserieren sie an der Innenseite des Schildknorpels, nach dorsal sind sie mit dem jeweiligen Processus vocalis des zugehörigen Stellknorpels verwachsen.

Die Lamina propria ist im Eingangsbereich des Kehlkopfes sehr locker, es sind viele seromuköse Drüsen eingelagert ^{Štiblar-Martinčič, 1997}. Im Bereich der Stimmlippe kann man sie in drei Schichten unterteilen, man findet dort keine Drüsen. Tiefe Anteile der Lamina propria sind mit dem Perimysium des Musculus vocalis über Retikulinfasern verbunden ^{Tillmann & Schünke, 1989}.

1.2 Präkanzerosen

1.2.1 Terminologie der Präkanzerosen und Klassifikation

Die Frage nach einer morphologisch definierbaren Form einer Präkanzerose des Larynx wurde schon 1923 von Jackson diskutiert. Die ersten detaillierten Beschreibungen von Präkanzerosen des Larynx stammen von Benjamins und Klestadt sowie von dem Urheber der Bezeichnung „Carcinoma in situ“ Broders ^{Benjamins, 1928; Broders, 1932; Klestadt, 1928}.

Am Kehlkopf wurden systematische Untersuchungen von Präkanzerosen mit Einführung der Mikrolaryngoskopie möglich. Somit können Schleimhautveränderungen frühzeitig und sehr gewebeschonend resiziert werden ^{Kleinsasser, 1963}.

Die Unterteilung des veränderten Epithels erfolgt anhand verschiedener histologischer Kriterien und klassifiziert die verschiedenen Risikostufen vom hyperplastischen Epithel bis hin zum Karzinom.

Unter einer Präkanzerose versteht man morphologisch verändertes Gewebe, in dem sich häufiger, als in normalem Vergleichsgewebe Krebs entwickelt, wenn eine solche Veränderung nicht entfernt, sondern nur beobachtet wird ^{Shanmugaratnam & Sobin, WHO, 1991}.

Laut einer weiteren WHO-Definition ist die Leukoplakie ein weißer, nicht abwischbarer Fleck der Schleimhaut, der keiner anderen Krankheit zugeordnet werden kann. Der Begriff Leukoplakie ist eine rein klinische Bezeichnung. Die Abwesenheit jeglicher histologisch spezifischer Bedeutung ist wichtig, weil diese Schleimhautveränderung histopathologisch von einer einfachen epithelialen Hyperplasie bis hin zum invasiven Plattenepithelkarzinom reichen kann ^{Gale et al., 2008}, erst durch eine Biopsie erfolgt die definitive Diagnose ^{Isenberg et al., 2008; Kambič & Gale, 1995}.

Auch die Erythroplakie ist ein streng klinischer Begriff, der eine Rötung der Schleimhaut beschreibt, welche im Rahmen der Diagnostik zunächst nicht weiter differenziert werden kann. Erythroplakische Veränderungen stellen sich histologisch häufig als obligate Präkanzerosen dar.

Hingegen ist die Keratose ein histologischer Begriff und beschreibt die pathologische Produktion und Akkumulation von Keratin an der Oberfläche des laryngealen Epithels, welches normalerweise aus einem nicht verhornten mehrschichtigen Plattenepithel besteht ^{Shanmugaratnam & Sobin, WHO, 1991; Kambič & Gale, 1995}. Man unterscheidet weitere Subformen: Ist das Zytoplasma der aufliegenden Epithelzellen vollständig durch Keratinfilamente

ersetzt und der Zellkern als Strukturbaustein nicht mehr zu erkennen, bezeichnet man dies als Orthokeratose. Wenn die Zellkerne in der Keratinschicht vorliegen, spricht man von einer Parakeratose ^{Ferlito, 1993; Kambič et al., 1989}.

Durch eine derartige Schicht können die verschiedensten pathologischen Veränderungen maskiert werden. Eine Studie von Frangež et al., 1997 konnte zeigen, dass eine Keratinschicht in 62,6 % der untersuchten hyperplastischen Veränderungen vorlag. In nur 0,2 % wurden Keratosen ohne epitheliale Veränderungen beobachtet ^{Frangež et al., 1997}.

Nach Hellquist, 1982 gibt es keine morphologischen, oder photometrischen Gründe eine isoliert vorliegende Hyperplasie oder Hyperkeratose als prämaligne anzusehen.

Ebenso ist die Dysplasie ein rein histopathologischer Begriff, der sich an dem Grad der zellulären Proliferation und den epithelialen Alterationen, die zelluläre und die nukleäre Veränderungen einschließen, orientiert. Weiterhin spielt die Dicke der Schleimhaut eine wichtige Rolle, die mehr oder weniger Abweichungen von der normalen Schichtung zeigen kann.

Eine erhöhte Zellanzahl ohne zelluläre Atypien, die zu einer Verdickung des Gewebes führt, bezeichnet man als Hyperplasie ^{Hellquist, 1982}, sie ist eine unspezifische Reaktion des Gewebes auf verschiedene Reize und geht oft mit Entzündung und Regeneration einher ^{Burkhardt, 1997}.

Der Begriff der Dysplasie beschreibt dagegen verschieden schwere präneoplastische Zellatypien in Verbindung mit einer Störung im Epithelaufbau, die zu einer mehr oder weniger starken Verdickung im Epithel führen kann. Über den Begriff „Präneoplastisches Epithel“ herrscht unter den Autoren eine ähnliche Unstimmigkeit, wie in der graduellen Einteilung der Dysplasien. Hellquist beschreibt in einer photometrischen Studie von 1981 Untersuchungen, nach denen es keine Gründe gibt, mittelgradige Dysplasien als präneoplastisch anzusehen ^{Hellquist et al, 1981}.

In unserer Studie orientieren wir uns an der Klassifikation nach Kleinsasser (siehe Kapitel 1.2.3). Er hat ein Gradingssystem entwickelt, das im Gegensatz zu dem der WHO ^{Shanmugaratnam & Sobin, WHO, 1991} nur drei statt vier Schweregrade (Dysplasie Grad I, II, III und Karzinoma in situ) unterscheidet.

Eine weitere Erhöhung der atypischen Prozesse und eine völlige Auflösung der physiologischen Epithelschichtung bezeichnet man als Karzinoma in situ. Das zelluläre Bild entspricht dem eines Karzinoms, wobei keine Invasivität vorliegt, d.h. die Basalmembran bildet eine Grenze, die nicht überschritten wird ^{Eckel et al., 2008}.

Karzinome werden in der TNM-Klassifikation an Hand ihrer Ausdehnung in verschiedene Stadien eingeteilt. Wir werden uns in der vorliegenden Arbeit auf die Betrachtung der pT1a-Karzinome beschränken. Dabei bedeutet das p, dass eine histologische Diagnosesicherung erfolgte. Im anatomischen Bezirk „Glottis“ beschreibt T1a, dass der Tumor auf ein Stimmband begrenzt ist, es liegt eine normale Stimmbandbeweglichkeit vor.

1.2.2 Klassifikation nach Kleinsasser

In der Literatur können heute über 20 verschiedene Klassifikationen bezüglich der epithelialen Veränderungen gefunden werden, wobei manche bereits eine Hyperplasie als Präkanzerose einstufen, während andere fortgeschrittene Dysplasien noch als prä-maligne Läsion bezeichnen ^{Kambič, 1978}. Viele sind ähnlich, doch meist werden drei Stufen epithelialer Veränderungen unterschieden, denn eine größere Anzahl der Untergruppen führt nach Kleinsasser, 1987 meist zu einer subjektiveren Beurteilung - und kann in einer falschen Interpretation der Läsion enden.

Allen Publikationen gemeinsam ist ein Staging nach morphologischen Gesichtspunkten, wobei besonders häufig die drei folgenden Kriterien als Basis der Einteilung benannt werden:

- die Dicke der Keratinschicht ^{Gabriel & Jones, 1962; Putney & O'Keefe, 1953}
- Grad der zellulären Atypie, sowie das Vorhandensein und die Dicke der Keratinschicht ^{Crissman, 1979; Goodman, 1984; Norris & Peale, 1963}
- Grad der zellulären Atypie und Hyperplasie ^{Hellquist et al., 1982; Kambič & Lenart, 1971; Kleinsasser, 1963; Leroux-Robert & Poncet, 1974; Lubsen & Olde Kalter, 1992; Sugár 1976}

Der Grad der Keratinisierung wird von diversen Autoren als Allgemeinreaktion auf die verschiedensten schädigenden Einflüsse beschrieben, und stellt lediglich ein Stadium der zellulären Reife, bzw. des Verfalls dar. Ihr wird keine wichtige prognostische Information zugeschrieben ^{Crissman et al., 1993; Kambič & Gale, 1986}.

Bereits 1959 erstellte Kleinsasser eine 3-stufige Einteilung zur histologischen Klassifikation. 1963 modifizierte er selbige in 1. Einfach hyperplastisches Epithel, 2. Hyperplastisches Epithel mit vereinzelt örtlichen Atypien, 3. Präkanzeröses Epithel oder Karzinoma in situ ^{Neumann, 1977}. In 1987 überarbeitete er das System erneut und fand so

seine aktuelle Form. Die Klassifikation beinhaltet prognostische Signifikanz, denn das Risiko einer späteren Entartung in ein Karzinom erhöht sich von Grad 1 zu Grad 3 ^{Olde Kalter, 1986; Kleinsasser 1959, 1963, 1987}.

Grad 1 bezeichnet die einfache Epithelhyperplasie, Grad 2 die mittelschwere und Grad 3 beinhaltet schwere Hyperplasie und Karzinoma in situ. Kleinsasser verwendet den Begriff der Hyperplasie, der heute allgemein als Bezeichnung für eine nichtneoplastische Veränderung gilt. In Anlehnung an eine Studie von Dreyer et al., 2004 werden wir uns in unserer Studie zwar auf die Einteilung nach Kleinsasser beziehen, aber den Begriff der Hyperplasie durch „Dysplasie“ modifizieren ^{Dreyer et al., 2004}.

Die einfache Epitheldysplasie wird überwiegend als gutartige Epithelveränderung gewertet, die im Rahmen von Entzündungen oder reaktiven Veränderungen beobachtet wird.

Bei erhaltener Schichtung und Polarität der Epithelzellen liegt eine verzögerte Zellreifung vor, die Grenze zum Stratum spinosum ist unscharf. Leichte Dysplasien sind rückbildungsfähig.

Die schwere Epitheldysplasie sowie das Karzinoma in situ werden zu einer Gruppe zusammengefasst, eine Unterscheidung zwischen schwerer Dysplasie und Karzinoma in situ, wie sie im 4-stufigen Gradingssystem der WHO ^{Shanmugaratnam & Sobin, WHO, 1991}, oder der Kambič - Lenart – Klassifikation ^{Kambič-Lenart, 1971} vorliegt, findet bei Kleinsasser nicht statt. Es tritt ein Verlust der normalen Schichtung und zellulären Differenzierung auf. Parabasal sind vermehrt Mitosen, sowie atypische Mitosen nachweisbar. Nur in den oberen Zellschichten befinden sich ausdifferenzierte, sonst atypische Zellen mit deutlicher Kernpolymorphie. ^{Franz, 1978; Kambič, 1997; Laniado et al., 1981; Shanmugaratnam & Sobin, WHO, 1991}.

Diese Befunde kennzeichnen das Bild einer obligaten Präkanzerose. Es konnte gezeigt werden, dass sich schwere Dysplasien klinisch ähnlich verhalten, wie Karzinomata in situ ^{Hellquist et al., 1982}. Analog dazu konnten auch in Untersuchungen des DNA-Gehaltes der beiden Gruppen keine Differenzen gefunden werden, die eine Unterscheidung rechtfertigen würden ^{Crissman & Zarbo, 1989; Dreyer et al., 1995}.

Als mittelgradige Dysplasien werden Veränderungen zusammengefasst, deren Erscheinungsbild zwischen der einfachen Epitheldysplasie und dem Karzinoma in situ eingeordnet werden kann. Im basalen Epitheldrittel finden sich vermehrt Mitosen, man kann polymorphe und hyperchromatische Zellkerne erkennen, die bis in das Stratum spinosum reichen. Eine Schichtung ist noch zu erkennen. Mittelgradige Dysplasien stuft Kleinsasser als fakultative Präkanzerosen ein.

Da gezeigt werden konnte, dass sich schwere Epitheldysplasien klinisch ähnlich verhalten wie Karzinomata in situ ^{Crissmann et al., 1989; Hellquist et al., 1982}, wurden ähnliche dreistufige Klassifikationssysteme auch von anderen Untersuchern verwendet ^{Antonelli et al., 1991; Resta et al., 1992}.

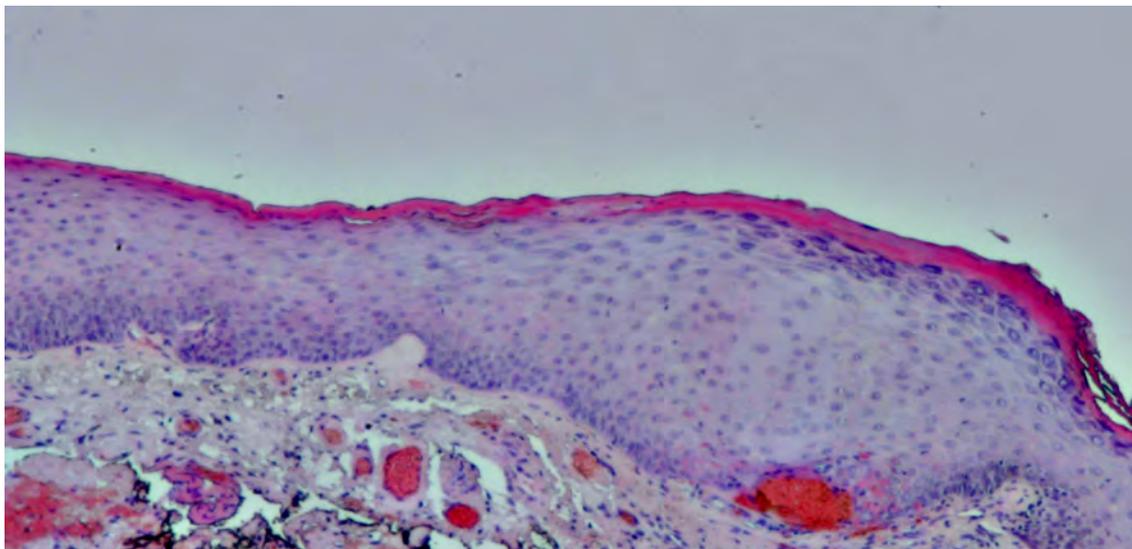
Auch wenn das von Kleinsasser eingeführte Gradingssystem gute Kriterien für die weitere klinische Vorgehensweise liefert, lässt sich das biologische Verhalten der Epitheldysplasien hieraus nicht immer ableiten.

Die histologische Zuordnung der Dysplasiegrade hängt sowohl vom jeweiligen Untersucher und dessen Erfahrung, als auch von dem verwendeten Klassifikationssystem ab und ist somit partiell subjektiv. Aufgrund dieser Problematik gibt es derzeit vielfältige Bemühungen objektive Zuordnungskriterien zu entwickeln ^{Dreyer & Glanz, 2004}.

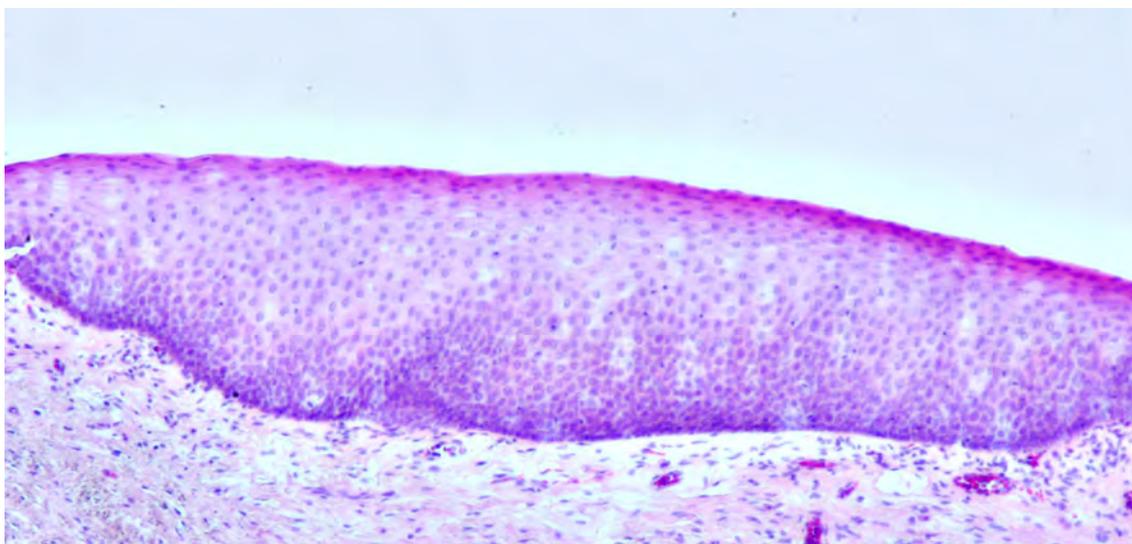
1.2.3 Problematik des Präkanzerosebegriffs

Seiferth und Glanz publizierten 1971 die Daten der Beobachtung von Spontanverläufen präkanzeröser Läsionen. Hierbei trat in 53 % eine maligne Entartung auf. Von diesen starben 32 % am Tumor ^{Seiferth & Glanz, 1971}. Da verdächtige Epithelveränderungen heute in der Regel im Rahmen einer Mikrolaryngoskopie durch eine Exzisionsbiopsie für den Patienten wenig belastend entfernt werden können, kommt die Möglichkeit einer Beobachtung nicht mehr in Betracht. Nur selten ergibt sich noch die Beobachtung des biologischen Endpunktes (z.B. maligne Transformation, spontane Rückbildung) ^{Dreyer & Glanz, 2004}. Größere prospektiv angelegte Verlaufsstudien, die für die Evaluation neuer klinischer und histopathologischer Diagnoseparameter wichtig wären, sind somit aus ethischen Gründen nicht mehr durchführbar ^{Kleinsasser, 1987}. Das erschwert Entwicklung, Test und Anwendung von Gradingssystemen für dysplastische Epithelveränderungen in diesem Bereich, vor allem für Fälle mit nur leichten Zellatypien und minimalen strukturellen Veränderungen. Sie können gutartig sein, oder auch Vorläuferläsionen hochdifferenzierter Karzinome entsprechen. Das bedeutet, dass man den Begriff Präkanzerose nur auf Gewebe- bzw. Zelleigenschaften beziehen kann, die sich in älteren Beobachtungsstudien als prognostisch relevant erwiesen haben, d.h. deren Nachweisbarkeit überzufällig mit einem günstigen oder weniger günstigen Krankheitsverlauf in Verbin-

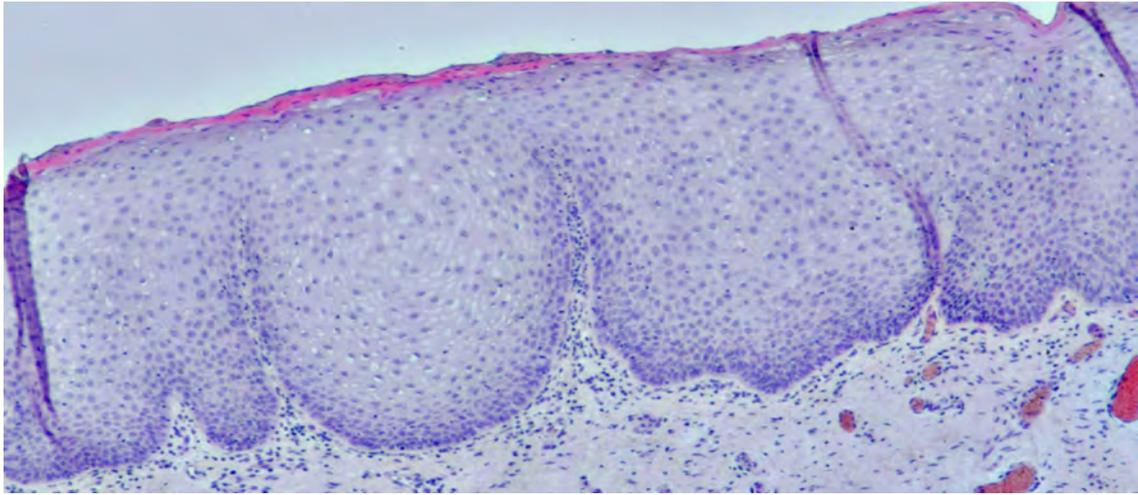
ung gebracht wurde^{Derout et al., 1971; Friedberg et al., 1971; Hellquist et al., 1982; Kleinsasser, 1959; Kleinsasser, 1963; Maguire, 1974; Quante et al., 1976; Robbett, 1972; Seiferth & Glanz, 1971}. Eine solche Beobachtung könnte Hinweise auf ein präkanzeröses Potential liefern, wenn der Übergang in eine höhergradige Dysplasie vorliegt^{Dreyer, 2001}.



(Abb.1.3a)



(Abb.1.3b)



(Abb.1.3c)

Man unterscheidet fakultative (niedrige Entartungsfrequenz) von obligaten (hohes Entartungsrisiko in relativ kurzer Zeit) Präkanzerosen ^{Pschyrembel, 258.Auflage}. Eine fakultative Präkanzerose liegt demnach immer bei Dysplasien Grad 2 (Abb.1.3b) vor, aber nicht unbedingt bei Dysplasien Grad 1 (Abb.1.3a). Obligate Präkanzerosen beinhaltet die Gruppe der Dysplasien Grad 3 (Abb.1.3c), beziehungsweise die, der Karzinomata in situ.

1.2.4 Laryngoskopie und Möglichkeiten

1.2.4.1 Indirekte Laryngoskopie

„Eine Vorrichtung, welche die Strahlen des Lichtes in innere Höhlen des lebenden animalischen Körper führt und aus diesem wieder in das Auge zurückleitet, heiße ich einen Lichtleiter.“ ^{Bozzini, 1806} Mit diesen Worten hatte Philipp Bozzini bereits 1806 die grundlegende Idee für die erst viel später entwickelten Endoskope. Er benutzte eine Kerze als Lichtquelle, die sich für eine ausreichende Sicht als zu schwach herausstellte. In 1829 führte Babington die erste indirekte Laryngoskopie mit dem von ihm entwickelten „Glottiscope“ durch. Hierbei diente ihm die Sonne als adäquate Lichtquelle, die durch einen Spiegel fokussiert wurde ^{Babington, 1829}.

Der Spanier Garcia war 1855 der erste, der seinen eigenen Kehlkopf zu Gesicht bekam. Unter Verwendung des Sonnenlichts stellte er einen Spiegel vor sich, den anderen legte er an den weichen Gaumen ^{Garcia, 1855}. Eine weite Verbreitung fand die Laryngologie durch den Wiener Mediziner Ludwig Türck und den in Budapest tätigen Johannes Nepomuk Czermak, die sich in einem heftigen Streit um die Priorität der Laryngoskopie befanden ^{Feldmann, 2003; Luckhaupt, 1997; Zeitels, 1995}. Czermak führte 1861 die Photographie in die Laryngoskopie ein ^{Sauer, 1936}.

Gert Sauer entwickelte ein starres Photo-Laryngoskop, das er 1936 in die Diagnostik und zur Dokumentation des Krankheitsverlaufs bei Kehlkopftuberkulose einführte ^{Sauer, 1936}. 1975 berichteten Stuckrad und Lakatos über ihre neu entwickelte „...Hochleistungs-optik, mit deren Hilfe die diagnostische Lücke zwischen der indirekten Spiegeluntersuchung und den direkten Endoskopieverfahren ausgefüllt werden kann.“ ^{Stuckrad & Lakatos, 1975}. Seit dieser Zeit werden starre Endoskope mit 70° oder 90° Optik routinemäßig verwendet. Das Endoskop kann bei vorgezogener Zunge durch die Mundhöhle in den Pharynx eingeführt werden, wobei die Oropharynxhinterwand mit Oberflächenanästhetikum (z.B. Xylocainspray) betäubt werden kann. Das Blickfeld wird allseitig gut ausgeleuchtet und durch die Apparatur leicht vergrößert, so dass man die laryngealen Strukturen gut einsehen kann.

Ein flexibles Endoskop kann bei eingeschränkter Mundöffnung oder mangelnder Patientencompliance eingesetzt werden und führt bei schwierig zu spiegelnden Patienten zu ähnlich guten Untersuchungsergebnissen.

1.2.4.2 Direkte Laryngoskopie

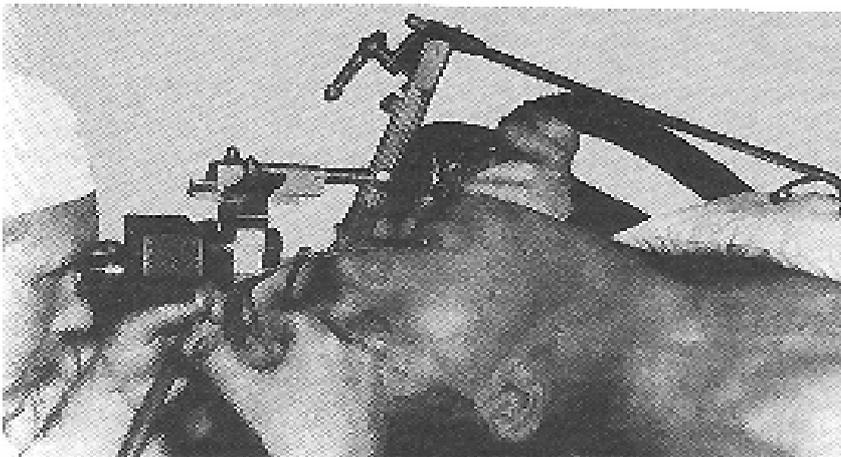
1895 veröffentlichte Alfred Kirstein sein „Autoskop“, das erste Gerät zur direkten Laryngoskopie.

Brünings untersuchte 20 Jahre später die Patienten im Sitzen und verwendete eine monokulare Vergrößerung ^{Brünings, 1915}. Killian lagerte seine Probanden auf dem Rücken und stellte die anatomische Situation mit Larynxspateln dar. Er sah sich der Schwierigkeit gegenüber, dass kein stabiles System für eine gezielte Chirurgie herzustellen war, da die Patienten nicht relaxiert wurden. Man bezeichnet dieses Verfahren als Schwebelaryngoskopie ^{Killian, 1920}.

Albrecht empfahl 1954 die Untersuchung mit einem Kolposkop (hier Epithelioskopie genannt), da es sich zur Detektion kleiner präkanzeröser Epithelveränderungen gut bewährt hatte ^{Albrecht, 1954}.

Im Verlauf der Weiterentwicklungen publizierte Kleinsasser 1962 ein Stützlarngoskop mit einem angeschlossenen Mikroskop und in den folgenden Jahren verfeinerte er die mikrolaryngoskopische Technik ^{Kleinsasser 1962, 1965}, die heutzutage als Standardverfahren für die Diagnostik und Therapie im laryngealen System verwendet wird.

Die Abb.1.4 zeigt eine Untersuchung mit dieser Technik im Jahre 1964, der Patient befindet sich in Intubationsnarkose, am Stützautoskop ist ein Operationsmikroskop montiert ^{Feldmann, 2003}.



(Abb.1.4)

Rosemarie Albrecht und Oskar Kleinsasser stehen für den Beginn der Mikrolaryngoskopie in Deutschland und Europa ^{Nawaka et al, 1997}, Kleinsasser begründete darüber hinaus zusätzlich die laryngeale Mikrochirurgie ^{Luckhaupt, 1997}.

Bei der Mikrolaryngoskopie wird der Patient in Narkose mit endotrachealer Intubation auf dem Rücken gelagert. Die anatomischen Gegebenheiten können bei der Auswahl der geeigneten Endoskope berücksichtigt werden, die in vielen, in Größe und Form variablen Ausführungen, angeboten werden ^{Kleinsasser, 1974a, 1974b}. Im Grundaufbau besteht ein Laryngoskop aus einem röhrenförmigen Arbeits- bzw. Sichtkanal, an dem im rechten Winkel ein Handgriff angebracht ist, über den Position und Lage im Operationsgebiet verändert werden können. Eine Stabilisierung und Fixation des Gerätes erfolgt durch eine Haltevorrichtung, die auf dem Brustkorb des Patienten angebracht ist. In

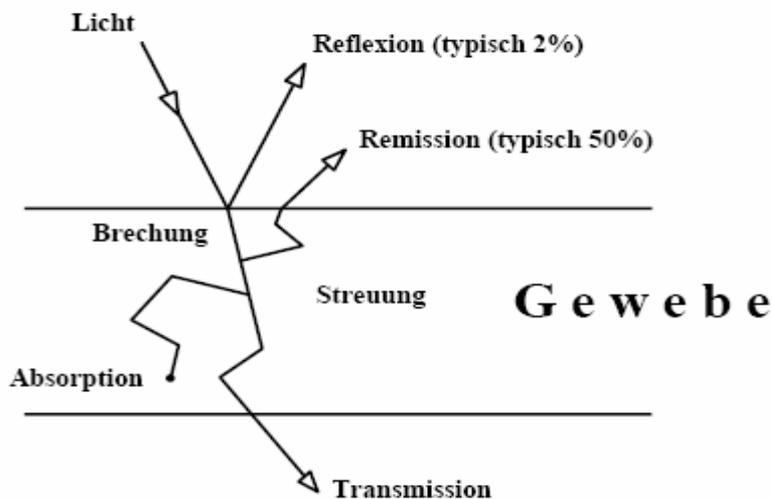
Kombination mit einem Mikroskop und Endoskop können so alle Strukturen genauestens inspiziert, palpiert, und bei Bedarf, noch in der gleichen Sitzung, operiert werden. Die Operation erfolgte bei den von uns untersuchten Läsionen als Excisionsbiopsie und Chordektomie Typ 1 und 2.

Die Frühdiagnostik von laryngealen Tumorerkrankungen erfolgt heutzutage mittels direkter und indirekter Laryngoskopie, wobei Erkennung und Einschätzung tumorverdächtiger Läsionen wesentlich von der Erfahrung des Untersuchers abhängig sind ^{Kleinsasser, 1962}. Die von Kleinsasser entwickelte Mikrolaryngoskopie ermöglicht unter Zuhilfenahme der Palpation eine verbesserte Einschätzung pathologischer Stimmlippenveränderungen. Trotzdem fällt es auch dem erfahrenen Laryngologen hierbei gelegentlich schwer, die genaue Ausdehnung und Tiefeninfiltration gewisser Tumoren zu beurteilen ^{Kleinsasser, 1965}. In diesem Zusammenhang sind in den letzten Jahren mehrere Methoden entwickelt worden, um einen besseren Aufschluss über den Charakter einer laryngealen Läsion zu erhalten. Hierzu gehören die Stroboskopie, die Hochgeschwindigkeitsglottophographie, die Kontaktendoskopie, die Fluoreszenzendoskopie mit oder ohne fluoreszenzverstärkende Hilfsmittel, der Hochfrequenzultraschall und die optische Kohärenztomographie (OCT) ^{Andrea et al., 1995a, 1995b; Arens & Glanz, 1999; Betz et al., 2003; Fleischer et al., 2006; Kraft et al., 2007; Lierßen et al., 2006; Schade et al., 2005}). Während indirekte und direkte Laryngoskopie, Autofluoreszenzendoskopie und Kontaktendoskopie eine bessere Einschätzung der horizontalen Ausbreitung von tumorverdächtigen Läsionen zulassen, ermöglichen die OCT und der Hochfrequenzultraschall grundsätzlich eine vertikale Ausdehnungsbestimmung von Tumoren. Da sich hierdurch möglicherweise auch Rückschlüsse auf die Dignität einer laryngealen Läsion ziehen lassen, wären verlässliche Angaben zur Epitheldicke von Dysplasien und Karzinomen von Interesse.

1.3 Das System der Fluoreszenz

Die Fluoreszenzdiagnostik basiert auf der Detektion endogener und exogener Fluorophore, die durch Licht des sichtbaren Spektrums angeregt werden, wobei das remittierte Licht analysiert wird.

Wenn ein Gewebe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt wird, wird ein Teil der Photonen reflektiert, ein anderer kann in das Gewebe eindringen und unterliegt dort Absorptions- und Streuungsprozessen.



(Abb. 1.5)

Abb.1.5 Skizzierung der so genannten „gewebeerleuchtungs Grundlagen“. Dabei unterliegt auf Gewebe treffendes Licht unterschiedlichen Einflüssen, die in ihrer Gesamtheit die Lichtausbreitung definieren.

Zu welchen Anteilen das Licht in das Gewebe eindringen kann, oder reflektiert wird, ist abhängig von dem lokalen Brechzahlunterschied zwischen Luft und Stratum superficiale, bzw. Stratum corneum des Gewebes. Die Brechzahl ist gewebespezifisch und wellenlängenabhängig.

Licht

Licht ist eine elektromagnetische Wellenstrahlung, die sich im Vakuum mit einer Geschwindigkeit von

$$c = 3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$$

ausbreitet.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit c ist abhängig von der Wellenlänge λ und der Frequenz ν

$$c = \lambda \cdot \nu$$

Die Energie E des Lichtes ist nach der Wellenvorstellung kontinuierlich über den Raum verteilt, betrachtet man allerdings nur ein einzelnes Photon im Lichtstrom, so lässt sich seine Energie mit der Formel

$$E = h \cdot \nu$$

ausdrücken.

h bezeichnet den Proportionalitätsfaktor Planck'sches Wirkungsquantum = $6,62 \cdot 10^{-34} \text{ Ws}^2$.

Wenn ein Atom durch den Einfang eines Lichtquants angeregt werden soll, kann dies nur geschehen, wenn die Quantenenergie E gerade so groß ist, wie die Energiedifferenz zwischen zwei Energieniveaus des absorbierenden Materials.

Das Lambert-Beersche-Gesetz beschreibt das Absorptionsverhalten von Licht durch eine Lösung, bei der die gelösten Moleküle nicht miteinander in Wechselwirkungen treten:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon cd}$$

I = Intensität nach

I_0 = Intensität vor dem Durchgang durch die Lösung

ϵ = Molarer Extinktionskoeffizient [$M^{-1}cm^{-1}$]

c = Konzentration der absorbierenden Substanz [M]

d = Dicke der absorbierenden Schicht [cm]

Der Empfindlichkeitsbereich des menschlichen Auges liegt im Bereich von etwa 400nm (violett) bis 750 nm (rot).

Streuung

Bei der Streuung ändern die Photonen ihre Richtung im Raum. Dabei steigt die Intensität des gestreuten Lichts proportional mit der 4. Potenz der Frequenz. Je höher die Frequenz, desto geringer ist der Anteil an Absorptionsprozessen, und desto höher ist die Streuung. Blaues Licht streut demnach stärker als rotes, kann aber nicht so tief in das Gewebe eindringen.

Absorption

Ein gewebespezifischer Parameter, der das Absorptionsverhalten beschreibt, ist der Absorptionskoeffizient μ_a . Er hat die reziproke Längeneinheit 1/cm und gibt die mittlere Anzahl der Absorptionsereignisse pro cm Wegstrecke an. Die Wellenlängenabhängigkeit beschreibt das Absorptionsspektrum.

Wasser gilt im sichtbaren Bereich des Lichtes als transparent, es hat einen $\mu_a > 100 \text{ cm}^{-1}$ und absorbiert somit nur im ultravioletten (UV)-Bereich $< 230 \text{ nm}$ und im infraroten Bereich gut. Da biologische Gewebe je nach Zusammensetzung aus bis zu 80% Wasser bestehen, wird eine Absorption überwiegend durch endogene Fluorophore generiert.

Eindringtiefe des Lichtes

Die Eindringtiefe wird durch die physikalischen Parameter Streuung und Absorption begrenzt. Das Gewebe besteht aus vielen, unterschiedlich großen Strukturelementen (Hämoglobin, Melanin, ...) die das Licht bei verschiedenen Wellenlängen absorbieren und so die Eindringtiefe verringern. Außerdem erfolgt eine mehrfache Streuung, wenn das Licht auf die Zellen und ihre Organellen trifft, die es von der ursprünglichen, geraden Bahn ablenkt. Dies bewirkt eine Verlängerung der zurückgelegten Wegstrecke, und erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Absorption deutlich ^{van Gemert, 1989}. Das monochromatische Licht kann etwa 300µm-500µm in biologische Gewebe eindringen ^{Arens et al., 2007; Gillenwater, 1998a, 1998b; Gottschalk, 1993; Wang, 1996}.

Fluoreszenz

Wenn ein Molekül durch Lichtstrahlen angeregt wurde, sich also in einem energetisch höheren Zustand S1 befindet, aus dem es im Folgenden wieder in den Grundzustand relaxiert, wird Energie frei. Dies kann in Form einer Lichtemission geschehen und wird dann als Fluoreszenz bezeichnet. Ähnlich wie bei der Absorption liegt auch hier ein gewebsspezifisches Fluoreszenzspektrum vor.

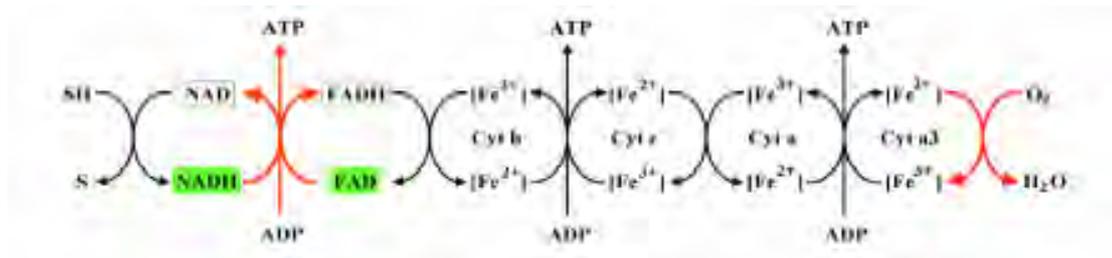
Ein großer Teil der Fluoreszenzfarbstoffe lässt sich mit UV-Strahlung, oder durch kurzwellige, sichtbare Strahlung anregen. Geeignete Lichtquellen dafür sind die Wood-Lampe, die Quecksilberhochdrucklampe, oder die Xenon-Hochdrucklampe sowie eine breite Anzahl von Laserquellen ^{Arens, 2005}.

1.3.1 Die Autofluoreszenz

Die Eigenfluoreszenz (Autofluoreszenz) von Geweben beruht auf der Anregung endogener Fluorophore durch Licht. In der Literatur wird eine Vielzahl verschiedener Fluorophore als Autofluoreszenzquelle benannt. Zu Ihnen zählen: Kollagen, Elastin, NADH, oxidierte Flavine,... ^{Alfano et al., 1984; Benson et al., 1979; Dhingra et al., 1998; Richards-Kortum & Sevick, 1996; Schomacker et al., 1992; Vo-Dinh et al., 1995}.

In einem Gewebeverband liegen diese Fluorophore in den unterschiedlichsten Verhältnissen nebeneinander vor, sodass das remittierte Licht nie ein spezifisches Fluoreszenzspektrum beschreibt, sondern durch eine Überlagerung der verschiedenen Spektren ent-

steht ^{Arens et al., 1999}. Viele Co-Faktoren wie z.B. Absorption durch Hämoglobin und Blutfluss sind in der Lage, auf den Prozess der Autofluoreszenz (AF) zu wirken ^{Fryen et al., 1997; Malzahn, 2002; Schomacker et al., 1992; Vo-Dinh et al., 1995}. Außerdem können die oben genannten Fluorophore als sensitive Bioindikatoren für den Zellmetabolismus genutzt werden, da sie nur in der reduzierten Form fluoreszieren, die für den intrazellulären Redoxzustand, Sauerstoffmangel, bzw. Störungen in der Atmungskette stehen ^{Arens, 2005}.



(Abb.1.6)

Abb.1.6: Darstellung der Abhängigkeit der Gewebe-Autofluoreszenz vom Energiestoffwechsel der einzelnen Zellen. Eine Steigerung der aeroben Glykolyse (rechts im Bild skizziert) bewirkt eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten von fluoreszierendem NADH und FAD. Die Fluoreszenzintensität nimmt also ab.

1.3.2 Autofluoreszenzendoskopie

Auf der Suche nach einer Untersuchungsmethode zur Detektion präneoplastischer Veränderungen wurde in einer Reihe von Studien gezeigt, daß solche Läsionen im Vergleich zum umliegenden, gesunden Gewebe, eine geringere Autofluoreszenz zeigen ^{Arens, 1999; Betz et al., 1999; Dhingra, 1998; Fryen, 1997; Gillenwater et al., 1998a, 1998b; Hung, 1991; Kolli et al., 1995b; Malzahn et al., 2002; Schomacker et al., 1992; Vo-Dinh et al., 1995; Žargi, 1997; Zonios, 1996}. Man spricht vom Autofluoreszenzverlust.

Eine gesunde Larynxschleimhaut stellt sich bei Bestrahlung mit Licht des Frequenzbereichs von 375-440 nm als glatte, leuchtend grüne Oberfläche dar. Fryen et al. stellten 1997 fest, dass diese Fluoreszenz stärker durch die elastischen als die kollagenen Fasern bedingt wird ^{Fryen et al., 1997}. Arens identifizierte 2005 das subepitheliale Bindegewebe als

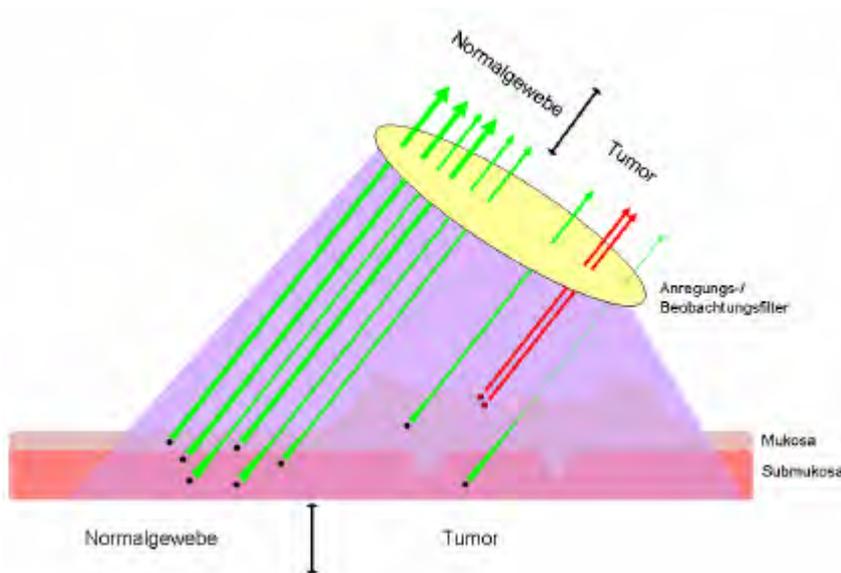
Hauptfluorophor des normalen bis leicht dysplastischen Gewebes, das Epithel selbst besitzt nur eine sehr geringe Eigenfluoreszenz, die sich im apikalen Bereich befindet ^{Arens, 2005}

Keratinisierte Areale fluoreszieren stärker in einem hellgrünen bis weißlichen Licht.

Der Autofluoreszenzverlust bei kanzerösen Prozessen ist ein multifaktorielles Geschehen. Das subepitheliale Gewebe fluoresziert densitometrisch gemessen zwar in gleicher Intensität, wie bei gesundem Gewebe, allerdings begünstigen pathologisch vermehrte und vergrößerte Zellkerne ^{Fryen et al., 1997}, bzw. erweiterte submuköse Gefäße die oben beschriebenen Absorptionsprozesse.

Malzahn et al. konnten einen deutlichen Autofluoreszenzverlust bei mittelgradigen Dysplasien feststellen, der im Bereich höhergradiger Präkanzerosen, bzw. Karzinomen noch intensiver im dunkelrot-violetten Bereich zu finden war ^{Malzahn et al., 2002}. Außerdem wurde in dieser Studie deutlich, dass auch gutartige Veränderungen wie z.B. teleangiektische Polypen oder Granulationsgewebe Verluste in der normalen Grünfluoreszenz zeigen können. Leichte Dysplasien zeigten das physiologische Bild der Grünfluoreszenz, während solche in Verbindung mit einer chronischen Laryngitis eine Abnahme in 23 % der Fälle aufwiesen. Reinke-Ödeme fluoreszierten in gleicher Art und Weise, wie normales Gewebe, während narbige Veränderungen, die durch den Heilungsprozess einem Umbau der elastischen zu kollagenen Fasern unterliegen, einen gleichmäßigen Autofluoreszenzverlust nach sich ziehen.

Arens et al. stellten 2007 fest, dass ein Autofluoreszenzverlust in erster Linie durch epitheliale Verdickung verursacht wird. Weiterhin werden dort die Zellkernvergrößerung und der veränderte Metabolismus einer Tumorzelle als weitere Kofaktoren benannt ^{Arens et al., 2007}



(Abb.1.7)

Abb.1.7: Schematische Darstellung der Autofluoreszenzdiagnostik durch Anregung endogener Fluorophore in unterschiedlichen Gewebeschichten. Im Tumorgewebe (rechts) sind im Vergleich zum Normalgewebe

1. weniger grün fluoreszierende Fluorophore vorhanden
2. die Fluoreszenzintensität durch die verdickte epitheliale Schicht abgeschwächt und
3. teilweise rot fluoreszierende, porphyrinhaltige Bakterienbeläge vorhanden.

Die Fluoreszenz ist demnach vergleichsweise schwächer und weist teilweise eine rötliche Färbung auf.

Auf Grund der subjektiven Einschätzung der oben genannten Veränderungen, ist der diagnostische Erfolg einer Untersuchung mit dem Autofluoreszenzlicht von der Erfahrung des Untersuchers mit dem System abhängig ^{Arens, 2003; Gillenwater et al., 1998a, 1998b}.

Aus diesen Beobachtungen entwickelt sich die Fragestellung, ob es möglich ist, dysplastische oder kanzeröse Läsionen der Stimmlippen mittels der Autofluoreszenzdiagnostik genauer zu detektieren und zu klassifizieren. Weiterhin soll untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen endoskopischem Autofluoreszenzbefund und der Epitheldicke unterschiedlicher Stimmlippenveränderungen hergestellt werden kann.

2 Material und Methoden

Aus dem Archiv der Abteilung für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Justus-Liebig-Universität (JLU) Giessen wurden 194 Patienten ausgewählt, die in den Jahren 1999-2004 per Autofluoreszenzendoskopie an den Stimmlippen untersucht und befundet worden waren. Davon waren 165 (85,5 %) Männer und 28 (14,5 %) Frauen im Altersbereich von 32-92 Jahren. Vorhandene Läsionen wurden im jeweiligen Behandlungszeitraum im Rahmen von Mikrolaryngoskopien als Stimmlippenbiopsien oder Chordektomiepräparate exzidiert. Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach Entnahme auf Kork ausgebreitet, ihrer topografischen Orientierung entsprechend markiert und in 4 %-igem Formaldehyd fixiert. Die weitere routinemäßige Einbettung in Paraffinblöcke und deren Aufarbeitung in Serienschnitten von 4µm erfolgte durch das Institut für Pathologie der Universitätsklinik Gießen. Die histopathologische Beurteilung erfolgte in erster Linie durch unabhängige Pathologen dieses Institutes. Zusätzlich wurden die Präparate durch eine histopathologisch erfahrene Hals-Nasen-Ohrenärztin (H.G.) sowie durch den in dieser Studie involvierten laryngologisch erfahrenen Pathologen (T.D.) überprüft, jeweils ohne vorherige Kenntnis des klinischen Befundes.

Die Einteilung der histologischen Befunde erfolgte nach der Klassifikation von Prof. Kleinsasser. Folgende Befunde wurden untersucht (Tabelle 2.1):

Die Biopsiepräparate der Gruppe 1.) wurden aus Randbereichen von pathologisch verändertem Gewebe gewonnen, das durch die Pathologen eindeutig als „physiologisch“ klassifiziert worden war. In den Gruppen 6.) und 7.) wurden Befunde mit - und ohne Laryngitis zusammengefasst. Gruppe 8.) enthält Befunde der histologischen Klassifizierungen: schwere Dysplasie mit – und ohne Laryngitis sowie Karzinoma in situ.

Diagnose	Patienten (m/w)
1.) Normales Epithel	16 (14/2)
2.) Reinke-Ödem	9 (7/2)
3.) Papillome	4 (2/2)
4.) Polypen	10 (8/2)
5.) Laryngitis ohne Dysplasie	16 (11/5)
6.) Leichte Dysplasie	42 (37/5)
7.) Mittelschwere Dysplasie	31 (27/4)
8.) Karzinoma in situ	42 (38/4)
9.) Karzinom (pT1a)	24 (22/2)

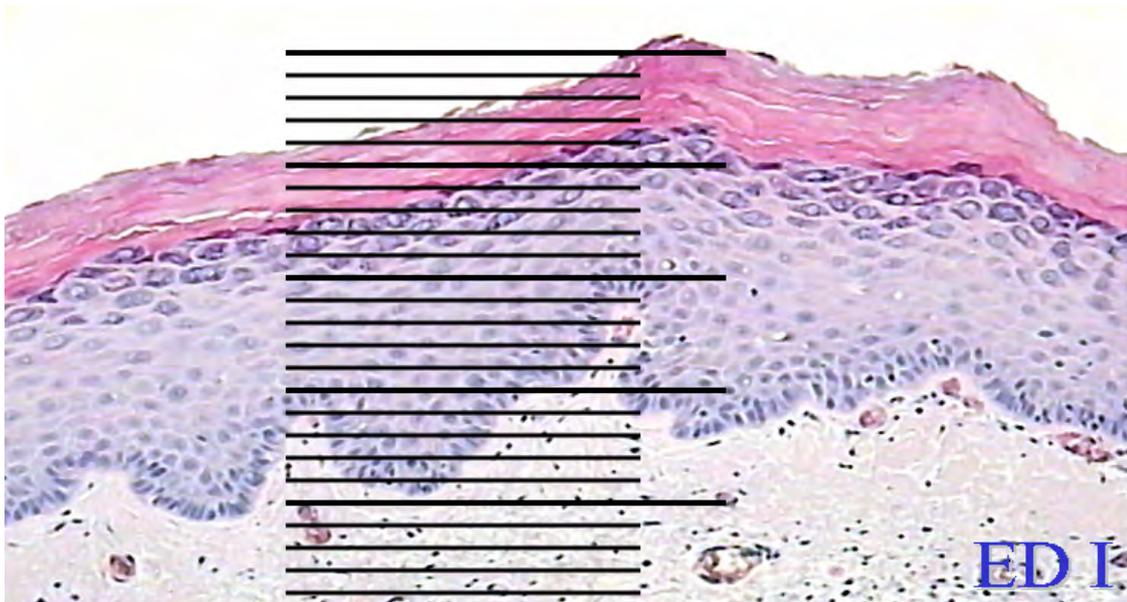
(Tab.2.1)

2.1 Bearbeitung der histologischen Präparate

Die einzelnen Schnittstufen wurden in einem Lichtmikroskop (DMLB, Leica, Deutschland) mit plan2,5-, plan5- bzw. plan10-facher Vergrößerung dargestellt, und mit einer Kamera (Eos 300D, Canon, Japan) fotografiert. Zusätzlich wurde ein Objektmikrometer (Zeiss, Deutschland) in derselben Apparatur und den identischen Vergrößerungen digitalisiert.

Die Vermessung des epithelialen Anteils erfolgte mit dem kommerziellen Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop Version 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) an jeweils 10 Stellen senkrecht zur Basalmembran, wobei die maximale Epithelbreite zu erfassen war. Durch die Paraffinfixierung unterlagen die Präparate einer Schrumpfung von ca. 20 Vol. %, dies wurde durch Addition von 20 % des jeweiligen Messwertes kompensiert. Aus diesen Daten wurde der jeweilige Minimal-, Maximal- und Mittelwert gebildet, daran schloss sich eine graphische Auswertung an.

Das Versuchsprotokoll entsprach dabei den ethischen Standards der Deklaration von Helsinki 1964 in seiner gültigen Fassung.



(Abb.2.1)

Die Abbildung 2.1 zeigt den Ausschnitt einer Schnittstufe eines Hämatoxylin & Eosin fixierten Präparatanteils der Diagnose leichte Dysplasie, der in 10 facher plan-Vergrößerung mit dem Objektmikrometer überlagert wurde.

2.2 Beurteilung der endoskopischen Autofluoreszenzbilder

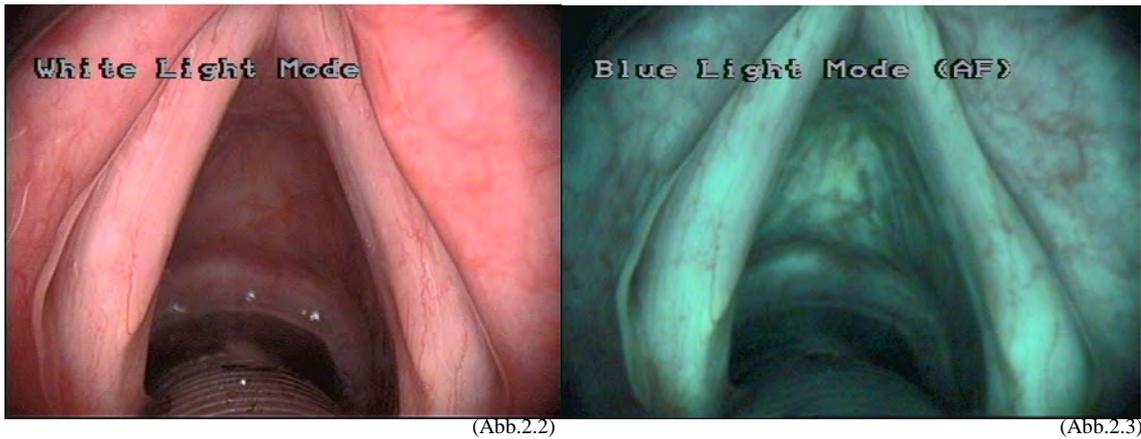
Im Rahmen der prä- bzw. intraoperativen Mikrolaryngoskopie wurde ein 70° Endoskop (8700 CP, Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) verwendet. Zur Autofluoreszenzanregung erfolgte der Einsatz des D-light-AF-Systems (Karl Storz, Tuttlingen). Bei diesem System wird das fluoreszenzanregende Blaulicht mit einer Wellenlänge von 375 bis 440 nm aus einer Xenon-Lichtquelle gefiltert. Eine hochauflösende CCD-Kamera (Telecam SLPAL, 20212020/37, Karl Storz, Tuttlingen) verstärkt und prozessiert hierbei das remittierte Autofluoreszenzlicht. Die Untersuchung verläuft wie folgt: Zur Orientierung beginnt man die Untersuchung im Weißlichtmodus und schaltet bei Bedarf nur durch Knopfdruck in den Autofluoreszenzmodus um. Hierbei wird die Schleimhaut mit Blaulicht im Spektralbereich von 375 – 440 nm ausgeleuchtet, und so zu einer physiologischen Gewebsfluoreszenz angeregt. Der Anteil des remittierten Lichtes ist abhängig von der Epitheldicke, und reicht vom charakteristischen Grün bei normalem Stimmlippengewebe bis zu Blau- und Violetttönen bei dysplastischen Veränderungen. Dies bezeichnet man als Autofluoreszenzverlust. Außerdem kann es bei karzinomatösen Prozessen durch eine bakterielle Besiedlung zu einer orangefarbenen Fluoreszenz kommen.

Die Untersuchungsvideos wurden mit dem Programm „RP – Szene“ abfotografiert, es erfolgte eine patientenspezifische Zuordnung der Weißlicht- zu den Autofluoreszenzbildern. Selbige wurden an Hand ihres Autofluoreszenzverlustes in eine 3-stufige Skala eingeordnet (AF-V0 bis AF-V2) (Tabelle 2.2):

Grad	Autofluoreszenz
0	Kein Autofluoreszenzverlust, Grünfluoreszenz
1	Leichter Autofluoreszenzverlust, bläuliche Fluoreszenz
2	Schwerer Autofluoreszenzverlust, rötlich bis violette Fluoreszenz

(Tab. 2.2)

Grad 0:



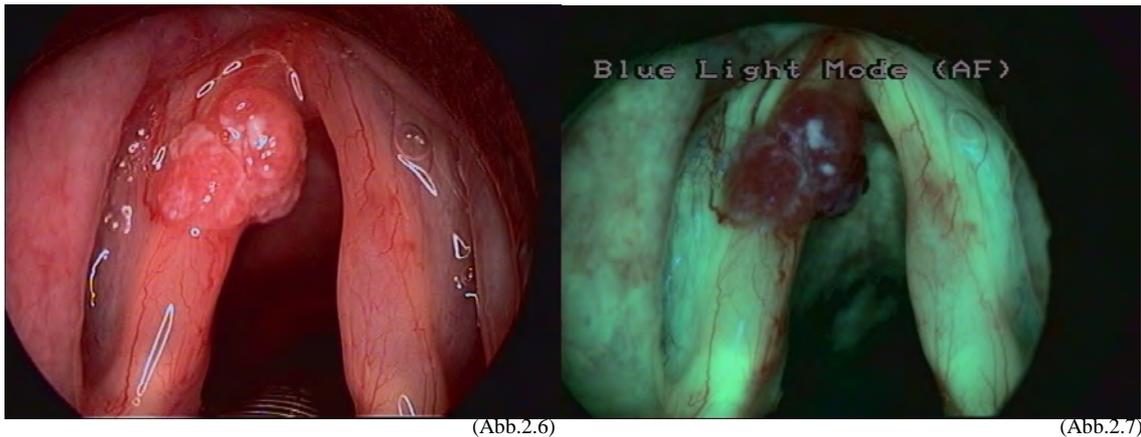
Die Abb.2.2 zeigt das Weislichtbild einer vollständig gesunden Stimmlippenregion, beim Umschalten in den Blaulicht-Modus (Abb.2.3) stellt sich das Gewebe durch eine gleichmäßig helle Grünfluoreszenz dar.

Grad 1:



In Abb.2.4 und 2.5 ist eine rechtsseitige Stimmlippenleukoplakie (Epitheldysplasie Grad 1) zu erkennen. Im Autofluoreszenzbild zeigt sich zusätzlich ein leichter Verlust an Grünfluoreszenz.

Grad 2:



In Abb.2.6 lässt sich bereits bei der Untersuchung mit Weislicht ein prominenter Tumor mit atypischer Gefäßzeichnung der linken Stimmlippe erkennen. Im Blaulicht-Modus (Abb.2.7) erkennt man in dieser Region einen starken Verlust der Grünfluoreszenz, das Signal dieses Gewebes lässt sich im Rot-Violetten-Bereich einordnen.

Die ermittelten Werte aus der Vermessung der histologischen Schnitte wurden anschließend dem jeweiligen AF-Untersuchungsbild des gleichen Patienten zugeordnet, und geprüft, ob sich Regelmäßigkeiten in Dickenzunahme und Autofluoreszenzverlust feststellen ließen.

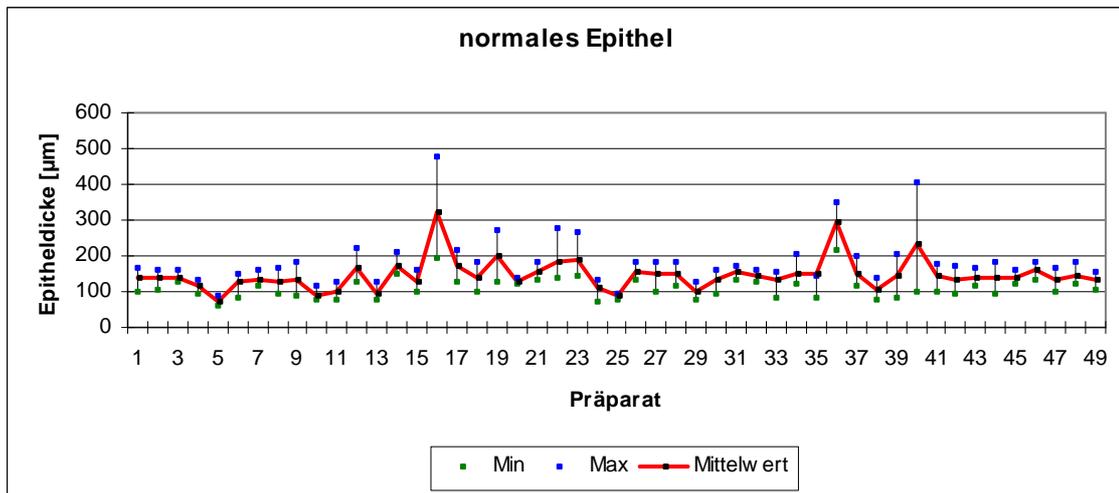
3 Ergebnisse

3.1 Die histologische Vermessung

Untersucht wurden die histologischen Präparate von 194 Patienten, die man morphologisch in 9 verschiedene Gruppen einteilte (siehe Tabelle 3.1).

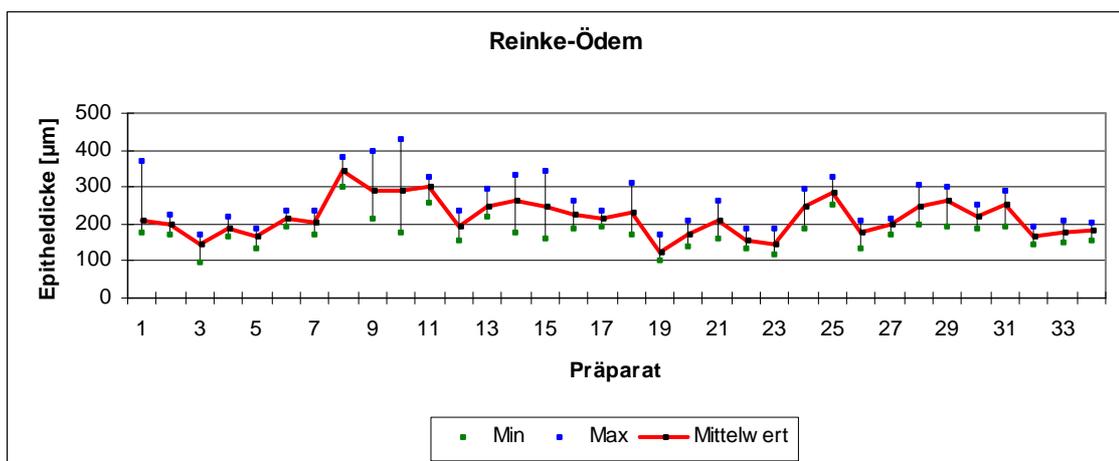
Die Ergebnisse der photometrischen Epithelvermessung werden übersichtlich in Tabelle 3.1 und graphisch in Abbildung 3.1 dargestellt, die ausführliche Erläuterung erfolgt in der anschließenden Darstellung der einzelnen Gruppen und dem zugehörigen Text.

In der Gruppe 1.) (Abb.3.1.1) wurden Normalbefunde zusammengefasst. Es wurden 16 Patienten untersucht, 49 Schnittbilder waren auswertbar. Es handelte sich um 14 Männer und 2 Frauen, deren Epitheldicke von minimal 109,59 μm bis maximal 186,37 μm betrug, mittelwertig wurden 146,93 μm erreicht. Die Standardabweichung betrug 43,97 μm .



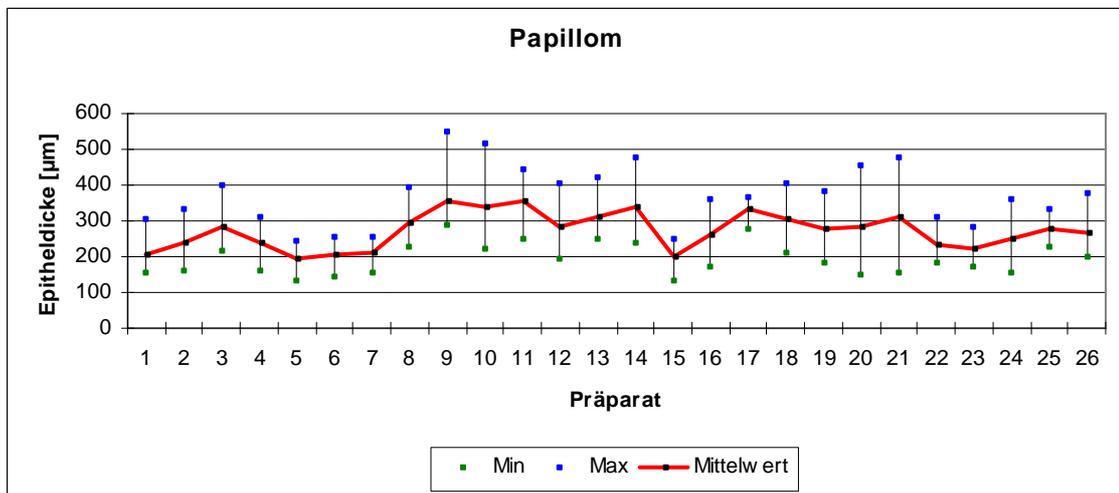
(Abb.3.1.1)

In Gruppe 2.) befanden sich 9 Fälle des Reinke Ödems, davon waren 7 Männer und 2 Frauen. Das Epithel war mindestens 175,24 μm und maximal 265,59 μm dick, der Mittelwert betrug 217,84 μm , die Standardabweichung erreichte 50,05 μm . Die Auswertung erfolgte an 34 Schnittpräparaten.



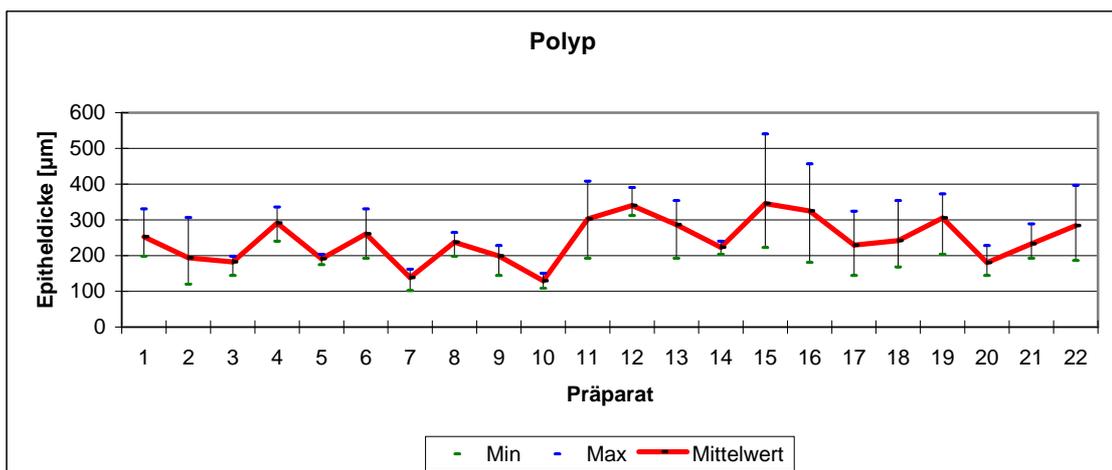
(Abb.3.1.2)

Papillome wurden in Gruppe 3.) zusammengefasst, dabei waren von 4 Patienten 2 Männer und 2 Frauen. Es wurden 26 Schnittpräparate ausgewertet, dabei bewegte sich die Epitheldicke von mindestens 193,38 μm bis maximal 373,38 μm , mittelwertig konnten 272,63 μm gemessen werden. Die Standardabweichung betrug 48,11 μm .



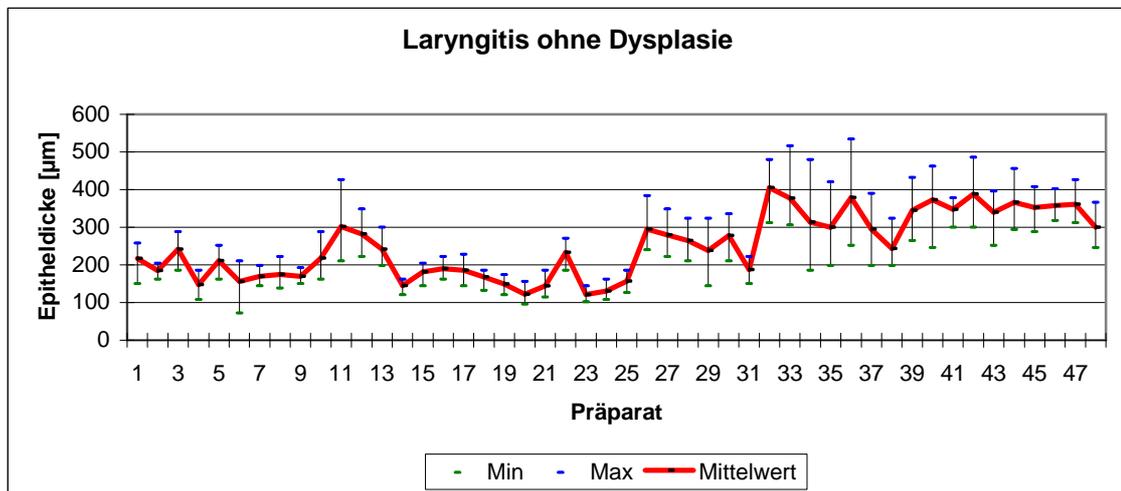
(Abb.3.1.3)

Ein Minimalwert von 180 μm zeigte sich in Gruppe 4.), die Standardabweichung betrug 60,15 μm , maximal wurden 311,73 μm erreicht, mittelwertig 244,23 μm . Von 10 Polypen waren 8 Männer und 2 Frauen, es konnten 22 Schnittbilder ausgewertet werden.



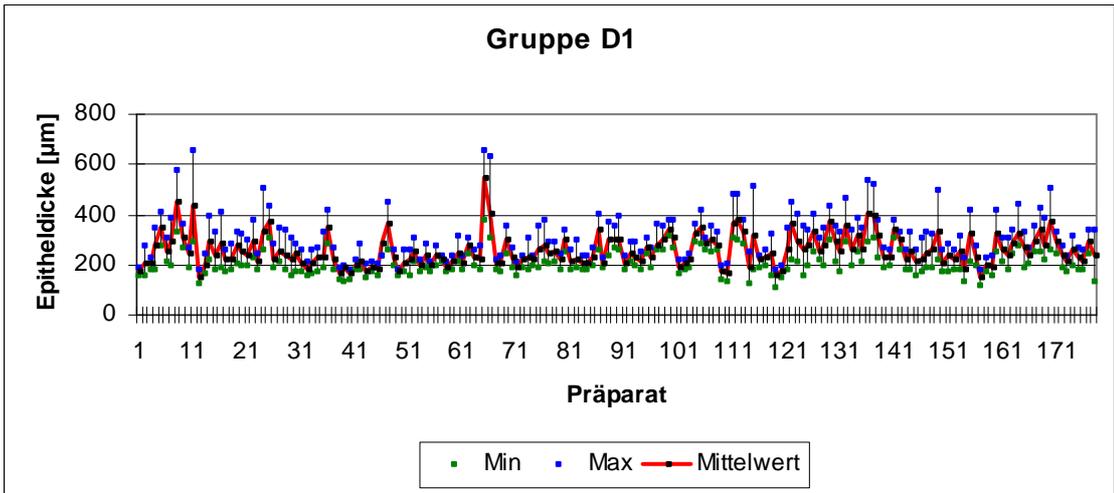
(Abb.3.1.4)

Gruppe 5.) beinhaltete 16 Fälle mit der Diagnose Laryngitis ohne Dysplasie, davon waren 49 Schnittstufen auszuwerten. Es handelte sich um 11 Männer und 5 Frauen, die eine minimale Epitheldicke von 193 μm , bei einem Maximalwert von 311,38 μm und einem Mittelwert von 247,78 μm aufwiesen. Die Standardabweichung entsprach 62,87 μm .

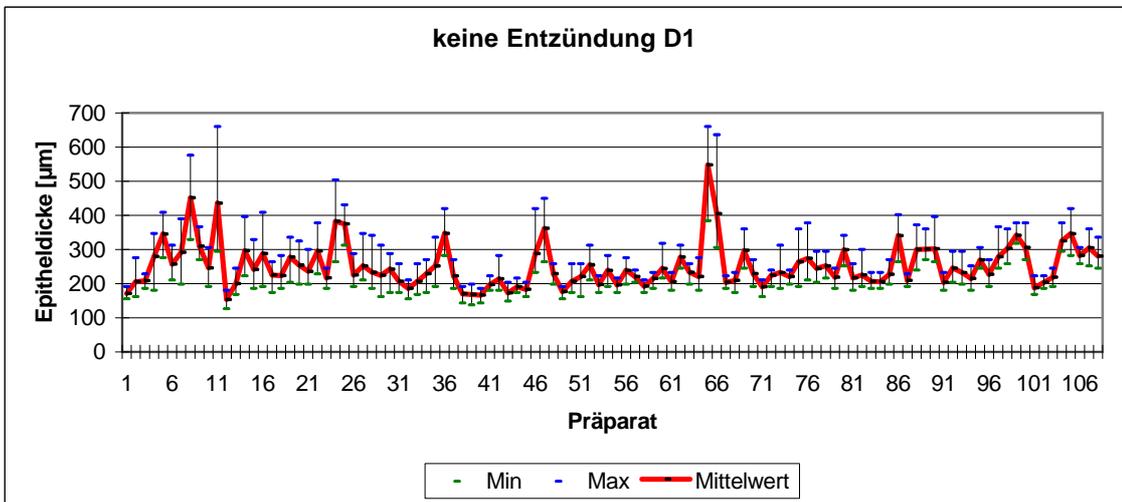


(Abb.3.1.5)

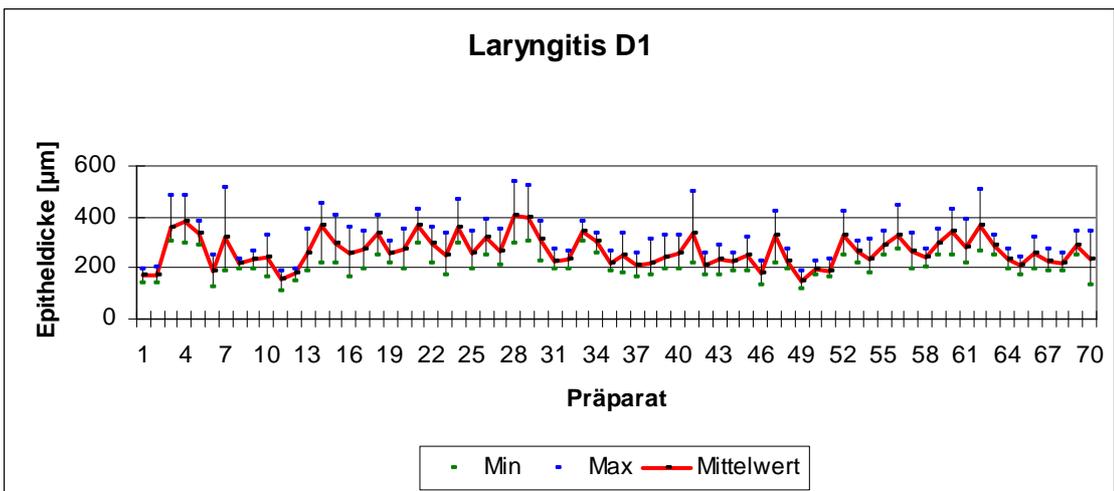
In Gruppe 6.) befanden sich insgesamt 42 Patienten, die 178 auswertbare Schnittstufen aufwiesen. Die Gruppe setzte sich aus 37 Männer und 5 Frauen zusammen. Der hierbei insgesamt erreichte Minimalwert betrug 207,51 μm , maximal wurden 317,43 μm und mittelwertig 257,67 μm gemessen, dabei lag eine Standardabweichung von 62,87 μm vor. Es muss berücksichtigt werden, dass bei 14 dieser Patienten (13 Männer, 1 Frau) zusätzlich eine Laryngitis vorlag (vgl. Gruppe 6.b)). Der Messbereich erstreckte sich hierbei von minimal 207,51 μm bis maximal 336,43 μm , während er bei nicht entzündlich alteriertem Gewebe (vgl. Gruppe 6.a)) im Bereich von 207,5 μm bis 305,11 μm lag. Im Mittel erreichte das leicht dysplastische Gewebe ohne Laryngitis einen Wert von 251,08 μm , der sich bei Vorliegen einer Laryngitis auf 267,61 μm erhöhte. Die Standardabweichung erreichte in Gruppe 6.a) bei einer Vermessung von 108 Schnittpräparaten einen Wert von 63,77 μm , während in Gruppe 6.b) 60,43 μm bei der Vermessung von 70 histologischen Schnittbildern zu verzeichnen waren.



(Abb.3.1.6)

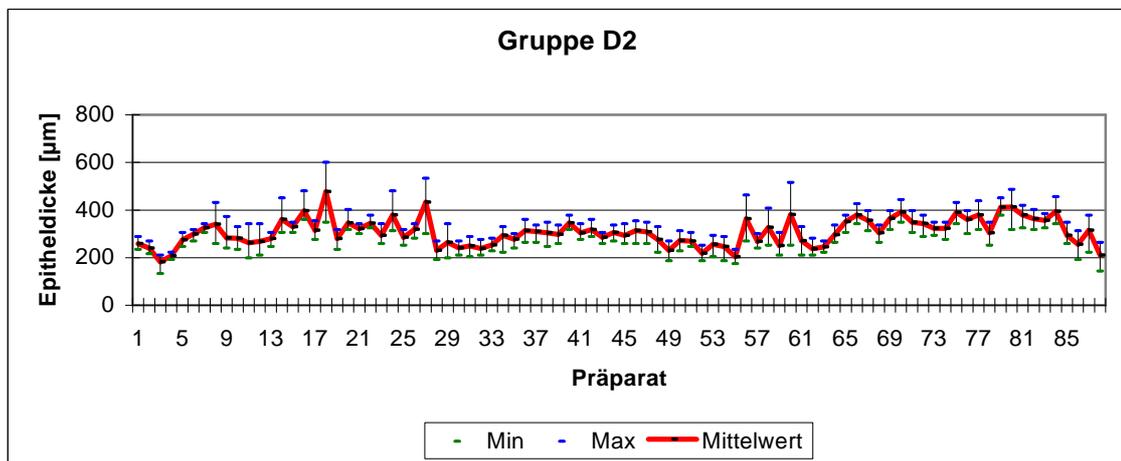


(Abb.3.1.7)

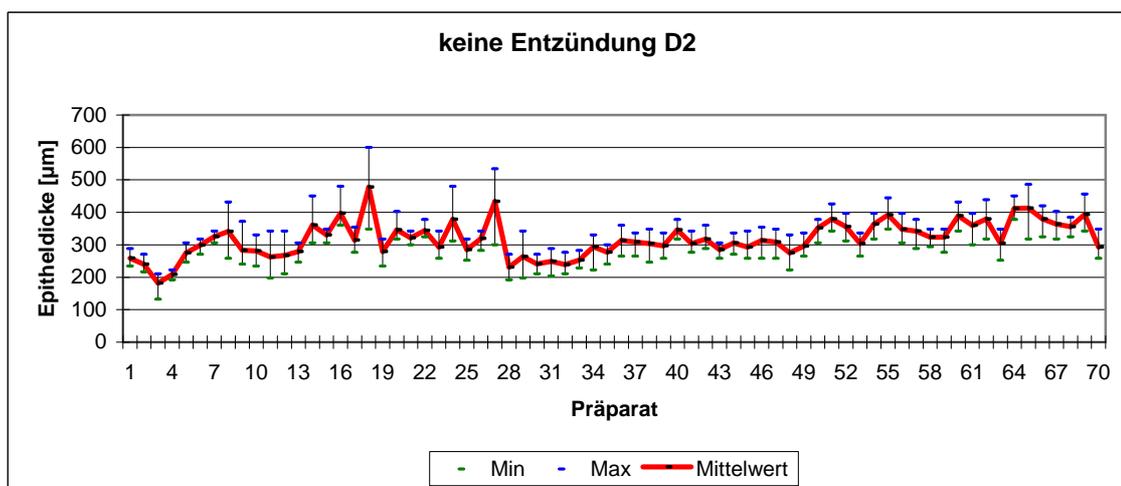


(Abb.3.1.8)

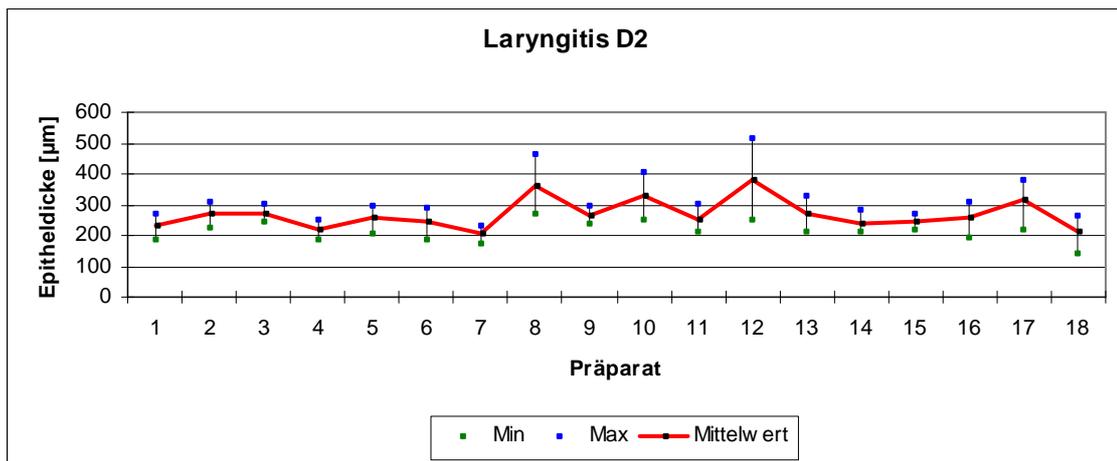
Die Gruppe der mittelschweren Dysplasien 7.) erfasste insgesamt 31 Patienten in 88 Schnittstufen, davon waren 27 Männer und 4 Frauen. Im Vergleich mit den leichten Dysplasien konnte eine leichte Epithelverdickung festgestellt werden, die minimal 261,14 μm , maximal 353,18 μm und mittelwertig 300,87 μm betrug (Standardabweichung 51,43 μm). Bei dieser Art von dysplastischen Veränderungen betrug die Messwerte des entzündlichen Gewebes (vgl. Gruppe 7.b)) minimal 213 μm , maximal 321,33 μm und mittelwertig 267,8 μm (Standardabweichung 47,92 μm bei Auswertung von 70 Schnittpräparaten), die an 8 Patienten (5 Männer und 3 Frauen) ermittelt wurden. Der restliche Teil der Patienten (vgl. Gruppe 7.a)), bei denen keine Laryngitis vorlag, wies Werte von minimal 273,51 μm , maximal 361,37 μm und mittelwertig 309,38 μm . Hier erreichte die Standardabweichung einen Wert von 48,80 μm bei 18 ausgewerteten histologischen Schnittpräparaten.



(Abb.3.1.9)



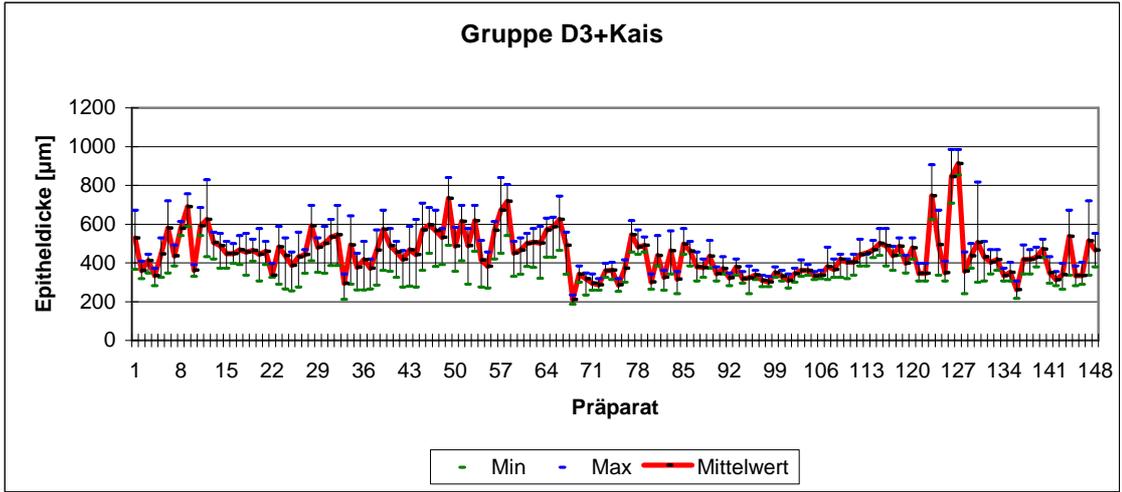
(Abb.3.1.10)



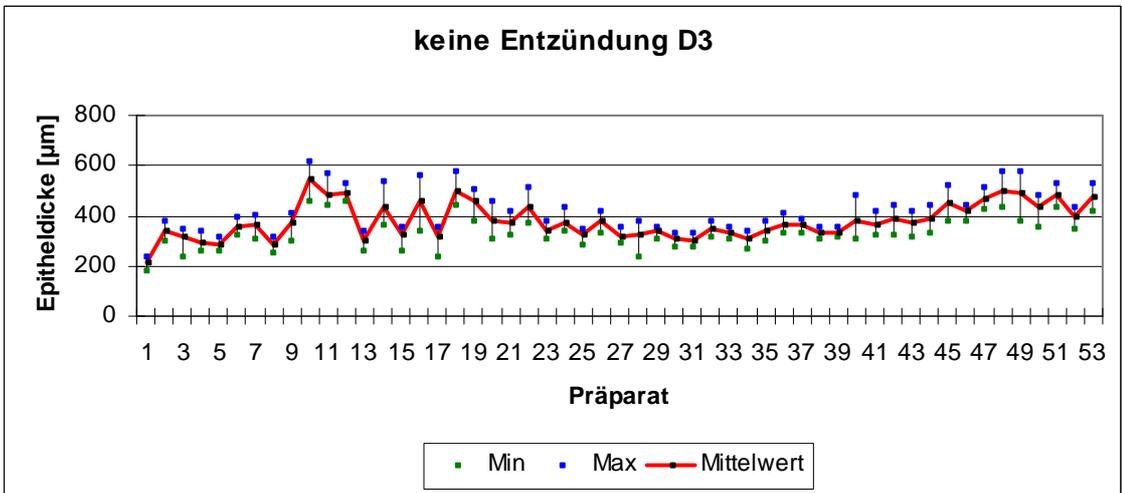
(Abb.3.1.11)

Eine deutliche Erhöhung der Epitheldicke konnte bei der Betrachtung von Gruppe 8.) festgestellt werden. Es wurden insgesamt 42 Patienten (38 Männer und 4 Frauen) untersucht, die Auswertung betraf 148 Schnittbilder.

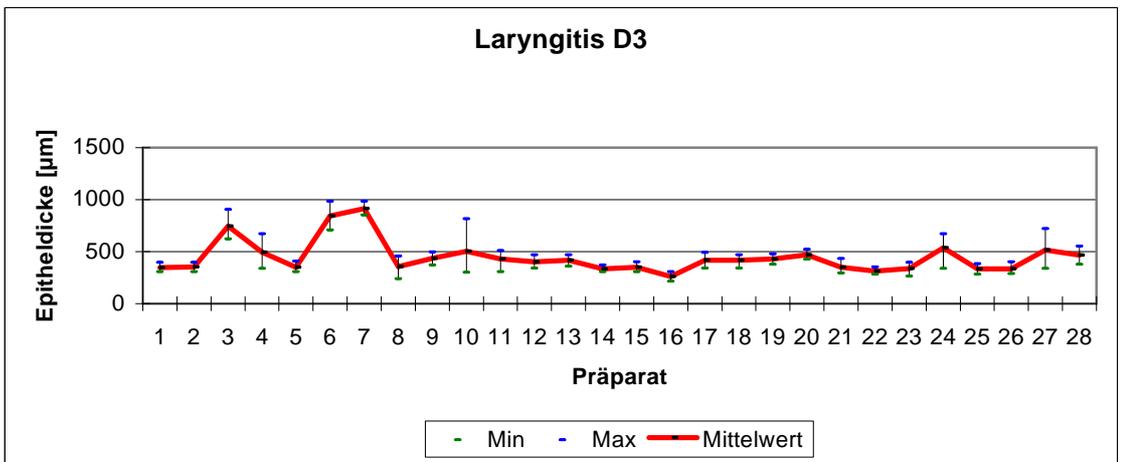
18 von ihnen (53 auswertbare Schnittbilder von 14 Männern und 4 Frauen) hatten eine diagnostizierte schwere Dysplasie ohne Laryngitis (vgl. Gruppe 8.a.)), bei 6 Patienten (28 Schnittpräparate von 6 Männern und 0 Frauen) lag eine schwere Dysplasie mit Laryngitis vor (vgl. Gruppe 8.b)), und 18 Patienten (67 Schnittpräparate von 18 Männern und 0 Frauen) wiesen ein Karzinoma in situ (vgl. Gruppe 8.c)) auf. Bei der Gesamtbeurteilung dieser Gruppe wurden Messwerte von minimal 349,99 µm, maximal 515,96 µm und mittelwertig 444,81 µm bei einer Standardabweichung von 122,34 µm erreicht. Untersuchte man die einzelnen Untergruppen, so ließen sich die niedrigsten Werte bei der Diagnose schwere Dysplasie ohne Laryngitis finden: Minimal 329,32 µm, maximal 427,36 µm und mittelwertig 380,76 µm, Standardabweichung 70,78 µm. Lag eine zusätzliche Laryngitisdiagnose vor, so erhöhten sich alle Werte auf: Minimal 361,93 µm, maximal 532,71 µm und mittelwertig 444,73 µm, Standardabweichung 152,06 µm. Man kann eine weitere Erhöhung der Messwerte bei Betrachtung der Karzinomata in situ feststellen: Minimal wurden 361,34 µm, maximal 579,04 µm und mittelwertig 495,51 µm erreicht, die Standardabweichung betrug 91,84 µm.



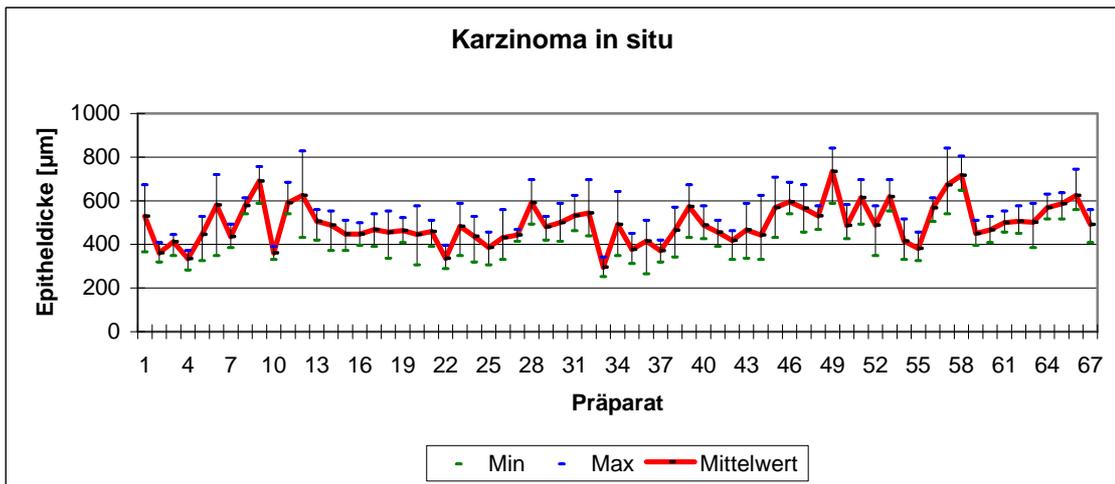
(Abb.3.1.12)



(Abb.3.1.13)

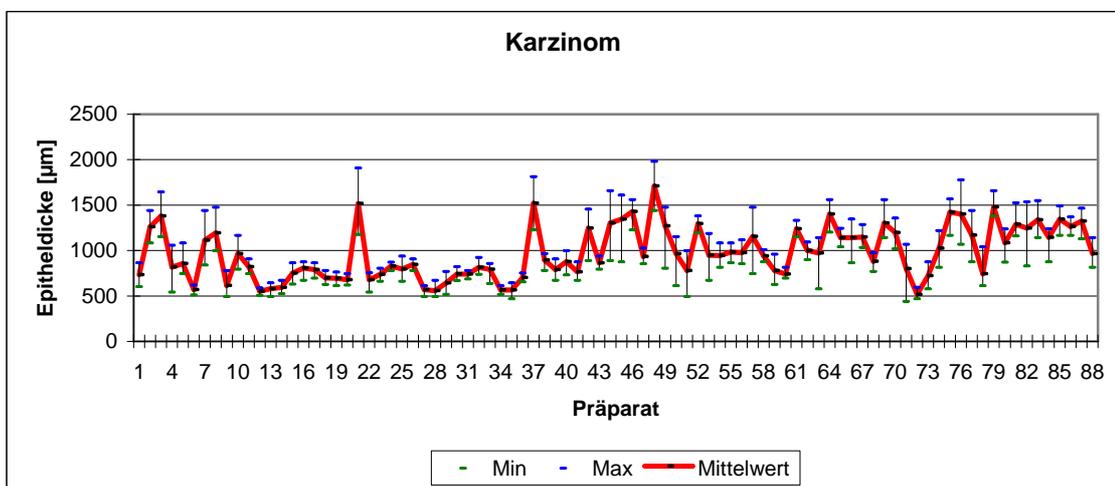


(Abb.3.1.14)



(Abb.3.1.15)

Die Gruppe 9.) beinhaltet 24 Patienten (88 Schnittpräparate von 22 Männern und 2 Frauen) mit pT1a-Karzinomen. Im Vergleich zu den vorhergehenden Gruppen war hier der deutlichste Epithelanstieg zu verzeichnen. Die Epitheldicke betrug minimal 804,95 μm , maximal 1125,41 μm und mittelwertig 974,22 μm . Die Standardabweichung betrug 284,95 μm .

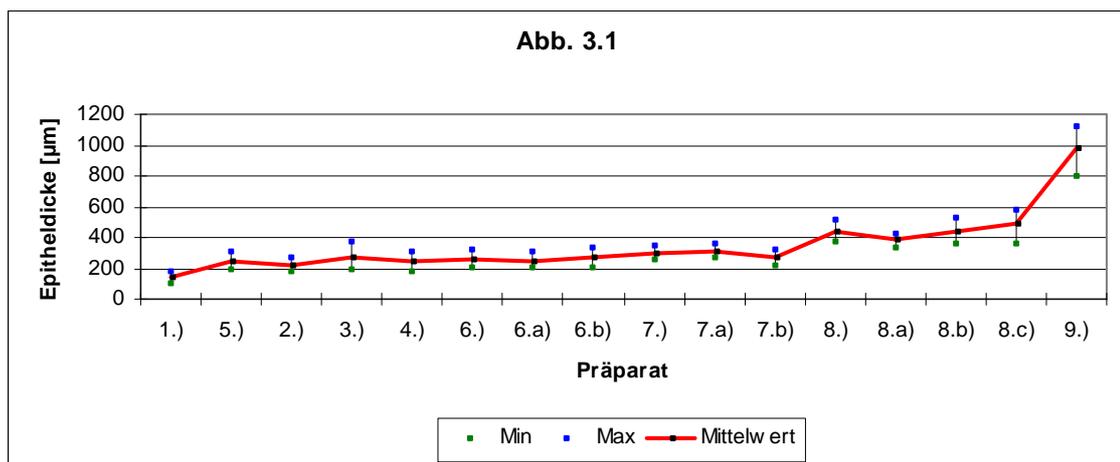


(Abb.3.1.16)

Abschließend sollen noch einmal alle untersuchten Gruppen übersichtlich tabellarisch (Tabelle 3.1) und graphisch (Abb.3.1) zusammengefasst dargestellt werden:

Gruppe	Diagnose	Minimal [µm]	Maximal [µm]	Mittel [µm]	Standard Abweichung [µm]
1.)	Normales Epithel	109,59	186,37	146,93	43,97
2.)	Reinke Ödem	175,24	265,59	217,84	50,05
3.)	Papillom	193,38	373,38	272,63	48,11
4.)	Polyp	180	311,73	244,23	60,15
5.)	Laryngitis ohne Dysplasie	193	311,38	247,78	86,77
6.)	Gruppe leichte Dysplasie (D1)	207,51	317,43	257,67	62,87
6.a)	Leichte Dysplasie	207,5	305,11	251,08	63,77
6.b)	Leichte Dysplasie mit Laryngitis	207,51	336,43	267,61	60,43
7.)	Gruppe mittelschwere Dysplasie (D2)	261,14	353,18	300,87	51,43
7.a)	Mittelschwere Dysplasie	273,51	361,37	309,38	48,80
7.b)	Mittelschwere Dysplasie mit Laryngitis	213	321,33	267,80	47,92
8.)	Gruppe schwere Dysplasie (D3) und Carzinoma in situ	349,99	515,96	444,81	122,34
8.a)	Schwere Dysplasie	329,32	427,36	380,76	70,78
8.b)	Schwere Dysplasie mit Laryngitis	361,93	532,71	444,73	152,06
8.c)	Karzinoma in situ (Kais)	361,34	579,04	495,51	91,84
9.)	pT1a-Karzinom	804,95	1125,41	974,22	284,95

(Tabelle 3.1)



(Abb. 3.1)

3.2 Laryngoskopische Ergebnisse

Gesunde Larynxschleimhaut (n = 16) stellt sich, im Autofluoreszenzlicht betrachtet, mit einer typisch hellgrünen Fluoreszenz dar. Durch das Gewebe verlaufende Blutgefäße werden, in diesem Licht betrachtet, deutlicher kontrastiert. Das Häm-Molekül im Blutfarbstoff führt zu einer sehr starken Blaulicht-Absorption, die in Fällen von ulzerierenden Tumoren, oder einer Einblutung z.B. in Folge einer Gewebsverletzung durch den Intubationstubus, eine eingeschränkte Beurteilbarkeit des Autofluoreszenzsignals nach sich ziehen kann. Daher schrumpfte der photometrisch vermessene Patientenpool von 194 auf 186 Patienten, die ein verwertbares Autofluoreszenzsignal aufwiesen.

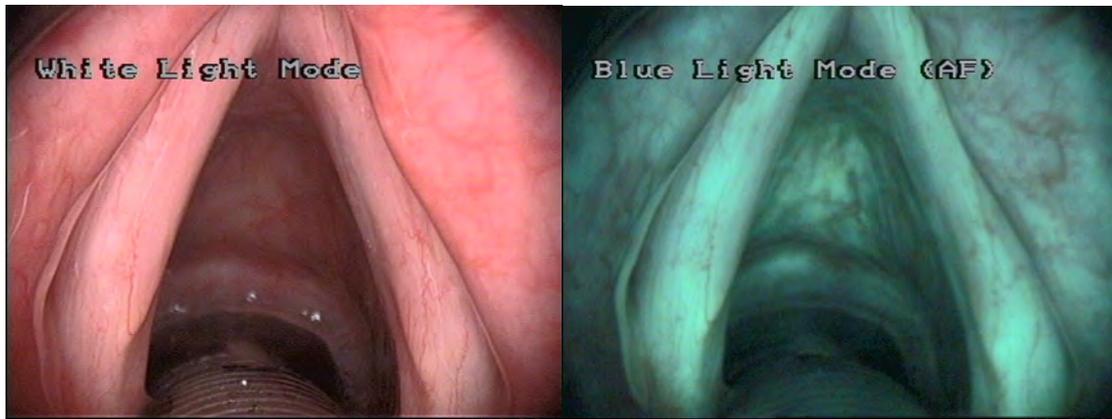
Analog zu dem normalen Epithel wiesen die Reinke Ödeme keinen Autofluoreszenzverlust auf, sofern sie nicht eingeblutet waren (s. Abb.3.2.36). Polypen fluoreszierten in einem leicht abgeschwächten Grünton mit der Tendenz eines leichten Fluoreszenzverlustes.

Leichte Fluoreszenzverluste zeigten sich bei leicht-mittelgradigen Dysplasien durch eine bläuliche Färbung des Gewebes. Eine ebensolche Farbgebung wiesen auch vernarbte Areale auf, wie sie z.B. nach wiederholten Eingriffen entstehen. Die Unterscheidung zwischen Narbe und dysplastischer Veränderung konnte meist durch die Oberflächenbeschaffenheit der Schleimhaut getroffen werden. Narbiges Gewebe zeigt im Autofluoreszenzlicht eine glatte Struktur, die scharf begrenzt ist und in einigen Fällen durch eine Sulcusbildung begleitet wird. Außerdem verlaufen so genannte Narbengefäße nicht parallel zur Stimmlippenoberfläche, sondern strahlen horizontal gerichtet in den narbigen Komplex ein. Plattenepitheliale Dysplasien erscheinen schon bei der Weislichtbetrachtung als unscharf weißliche, oder fleckig milchige Trübung, der sonst zart rosa schimmernden Schleimhaut. Dieser ungleichmäßige Grenzverlauf wird auch bei der Betrachtung im Blaulichtmodus deutlich.

Präkanzeröse höhergradige Dysplasien, bzw. kanzeröse Prozesse charakterisierten sich durch ein tiefblau/violett bis rötliches Fluoreszenzsignal. Ein starker Autofluoreszenzverlust zeigte sich außerdem auch bei den betrachteten Papillomen. Eine sichtbare Abstufung der Fluoreszenzsignale von schwerer Dysplasie, Karzinoma in situ und mikroinvasivem Karzinom war in unserer Untersuchung nicht erkennbar (Alles oder nichts - Prinzip). Einzelne Fälle der pT1a-Karzinome wiesen Regionen von deutlich orangefarbener Fluoreszenz auf, die typischerweise auf eine bakterielle Besiedelung zurückzuführen ist.

Keratotische Prozesse in den oberen Epithellagen fluoreszierten sehr stark im hellgrünen bis weißlichen Bereich und konnten somit oft präkanzeröse Prozesse maskieren.

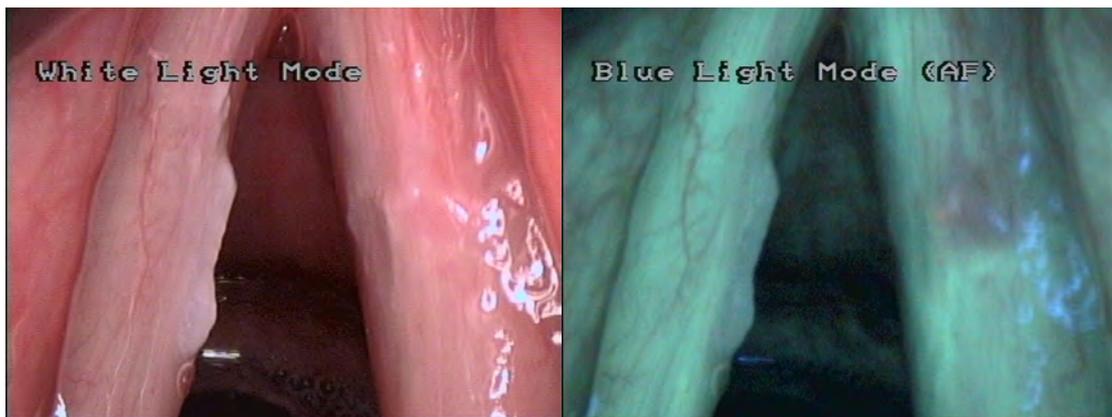
Gruppe 1.) normales Epithel



(Abb.3.2.1)

(Abb. 3.2.2)

Die Abbildung 3.2.1 zeigt das mikrolaryngoskopische Weißlichtbild physiologisch ausgebildeter Stimmlippen. Es liegen keinerlei histologische Veränderungen vor. Dementsprechend sind im autofluoreszenzendoskopischen Bild (Abb.3.2.2) keine Signalverluste zu erkennen, die Stimmlippen fluoreszieren in einem hellen Grün.

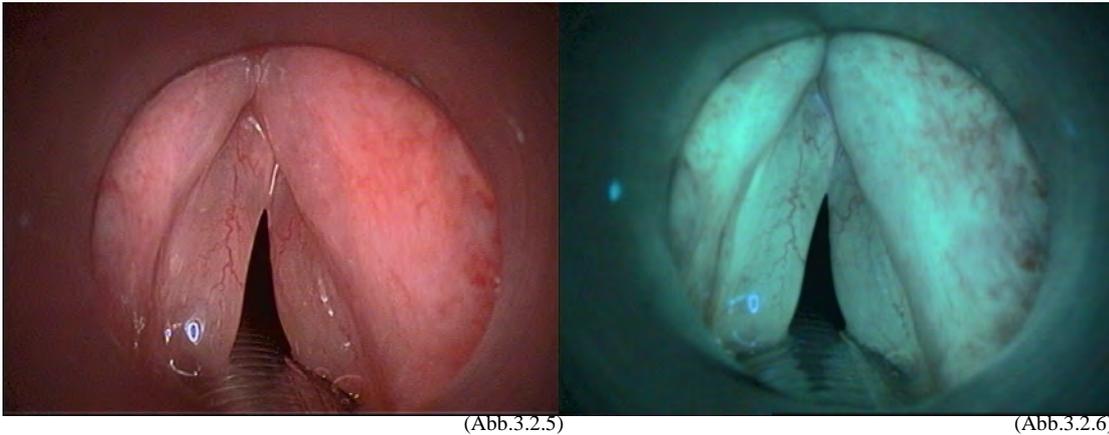


(Abb.3.2.3)

(Abb.3.2.4)

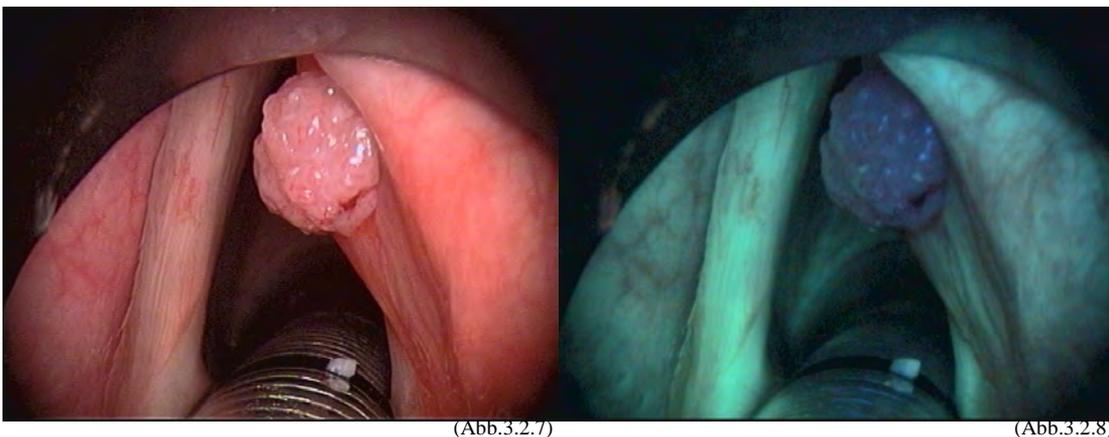
Darstellung einer hyperkeratotischen Verdickung der linken Stimmlippe in Weißlicht- (Abb.3.2.3) und Autofluoreszenzendoskopie (Abb.3.2.4). Es liegt kein Autofluoreszenzverlust vor.

Gruppe 2.) Reinke Ödem



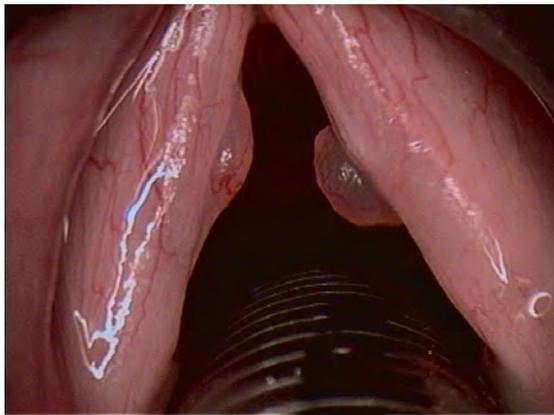
In der Weißlichtendoskopie (Abb.3.2.5) erkennt man ödematös verdickte Stimmlippen mit glatt glänzender Oberfläche und scharfer Randbegrenzung. Es liegt eindeutig ein Reinke-Ödem vor. Die Untersuchung im Autofluoreszenzmodus (Abb.3.2.6) lässt keine AF-Verluste erkennen.

Gruppe 3.) Papillom



Bereits im mikrolaryngoskopischen Weißlichtbild (Abb.3.2.7) ist ein prominentes Papillom der rechten Stimmlippe erkennbar, das beim Umschalten auf den Blaulicht-Modus (Abb.3.2.8) einen gleichmäßigen, starken AF-Verlust (Grad 2) aufweist. Die linke Stimmlippe fluoresziert in einem helleren Grünton, der auf eine Keratose hindeutet.

Gruppe 4.) Polyp



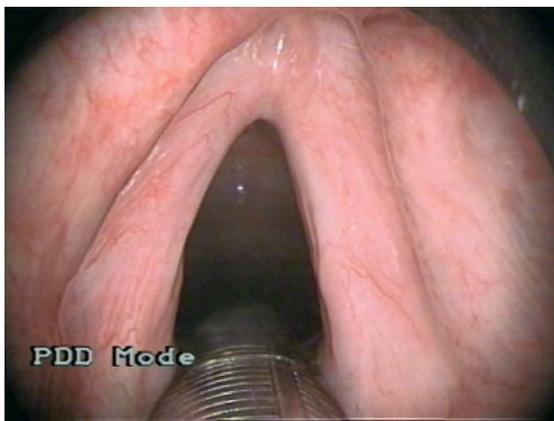
(Abb.3.2.9)



(Abb.3.2.10)

Die Abbildung 3.2.9 zeigt das mikrolaryngoskopische Weislichtbild eines myxoiden Stimmlippenpolyps. Dieser weist beim Umschalten in den Blaulicht-Modus (Abb.3.2.10) keinerlei AF-Verlust auf.

Gruppe 5.) Laryngitis ohne Dysplasie



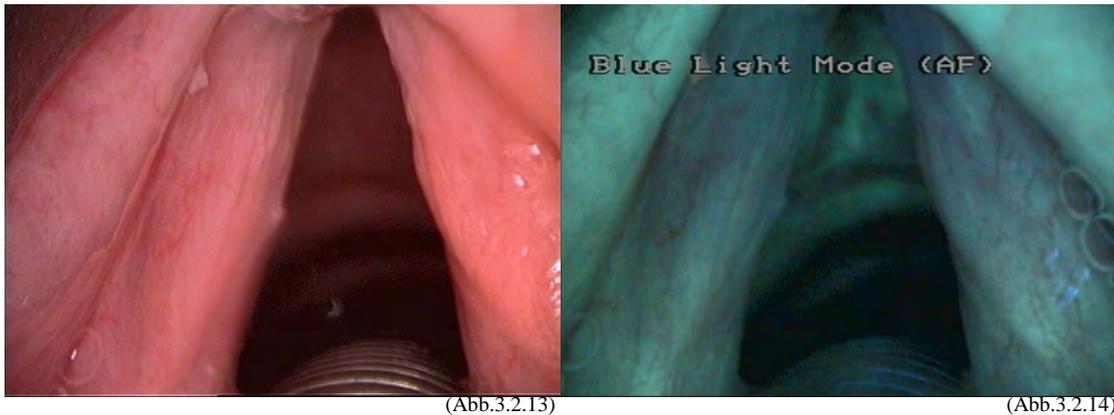
(Abb.3.2.11)



(Abb.3.2.12)

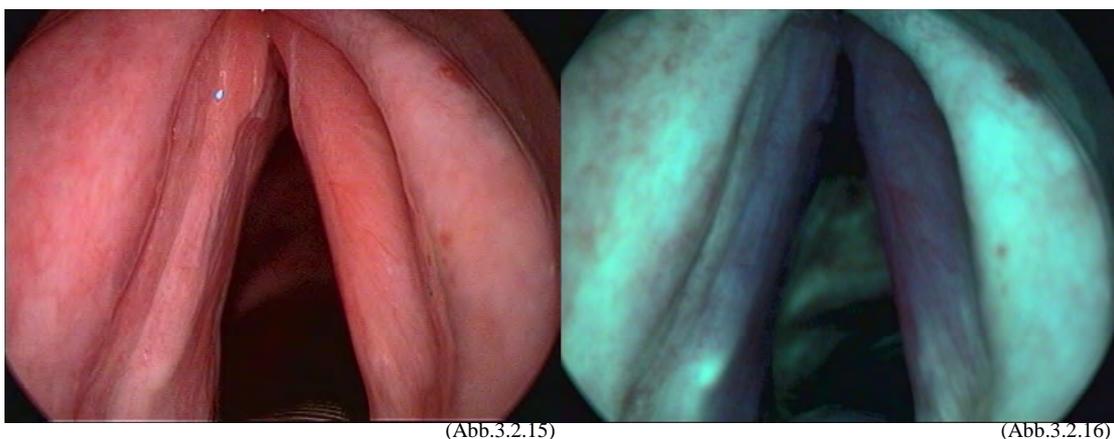
Das Weislichtbild in Abb. 3.2.11 zeigt scheinbar physiologische Stimmlippen, doch im AF-Modus (Abb.3.2.12) zeigt sich ein leichter AF-Verlust auf beiden Seiten, wobei die atypisch verlaufenden Gefäße der linken Stimmlippe auf eine narbige Veränderung hindeuten. Die unscharfe Begrenzung spricht für eine laryngitische Veränderung.

Gruppe 6.) leichte Dysplasie



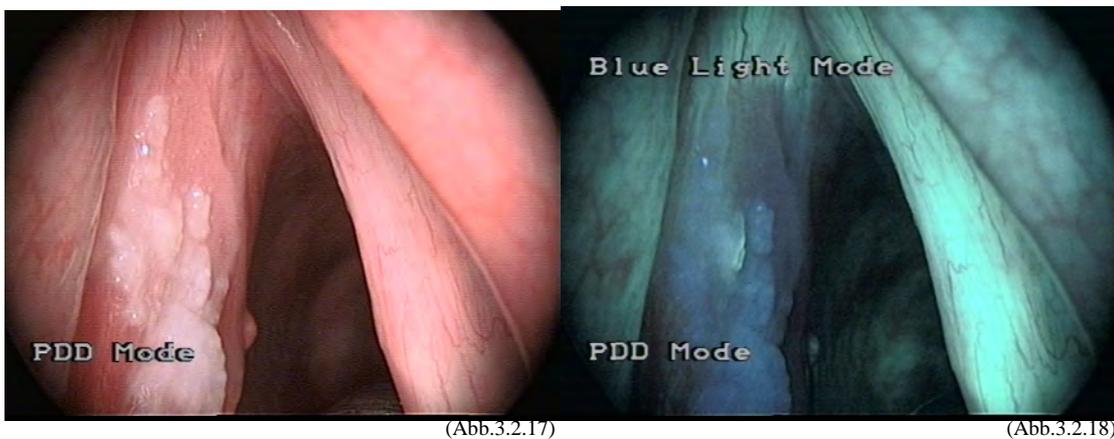
Das endoskopische Weißlichtbild (Abb.3.2.13) des hier untersuchten Reflux - Patienten lässt auf der rechten Seite einen Sulcus erkennen. Im Bereich der vorderen Kommissur ist die Randbegrenzung beider Stimmlippen etwas unruhig. In der autofluoreszenz-endoskopischen Untersuchung (Abb.3.2.14) lässt sich ein leichter AF-Verlust der vorderen Kommissur feststellen. Dieser beruht auf einer postoperativen Narbenbildung. Ein weiteres Charakteristikum ist die netzförmige Streifung der ausgeleuchteten Areale, die typischerweise bei Refluxpatienten auftritt.

Gruppe 7.) mittelschwere Dysplasie



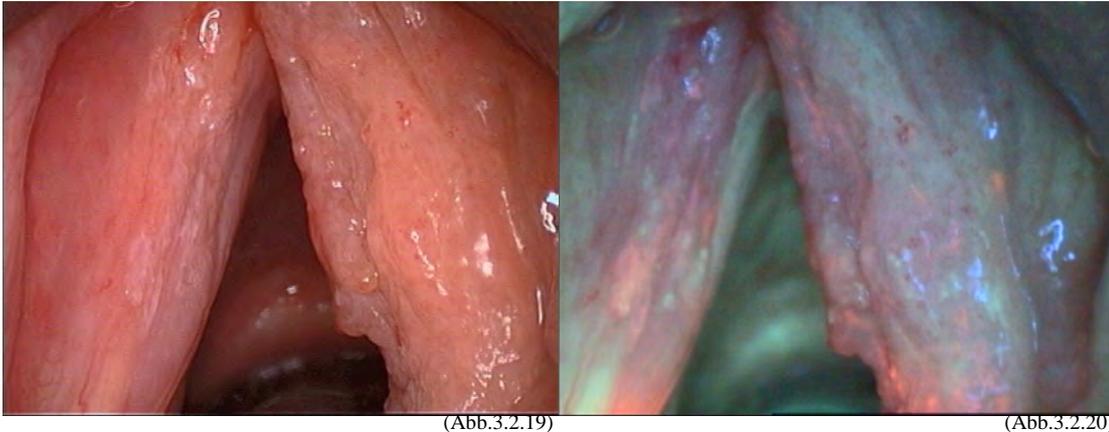
Die Abb.3.2.15 zeigt das Weislicht-Untersuchungsbild bei Zustand nach Chordektomie Typ 1 rechts. Linksseitig beobachtet man eine längliche leukoplakische Veränderung. Im Blaulicht-Modus (Abb.3.2.16) ist beidseitig ein deutlicher AF-Verlust zu erkennen, der rechtseitig auf die Narbe und linksseitig auf die dysplastische Läsion zurückzuführen ist.

Gruppe 8.) schwere Dysplasie



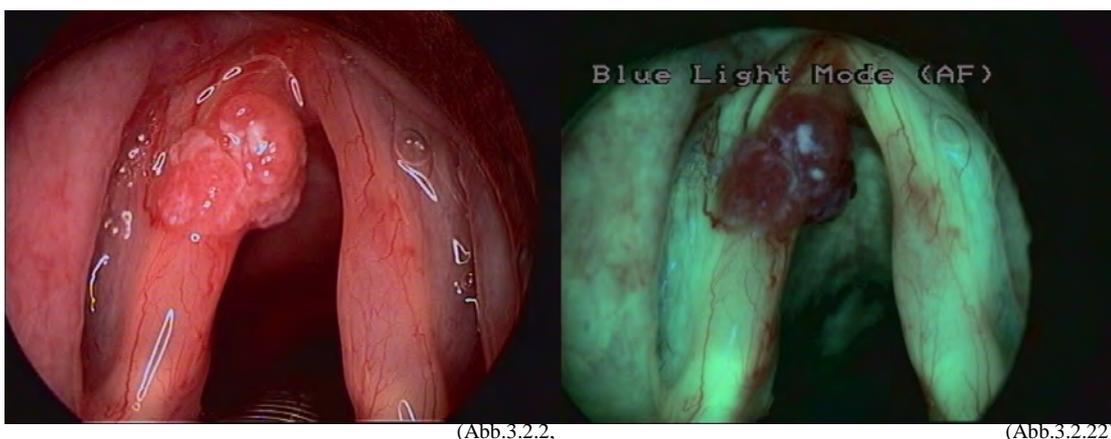
Bereits bei Betrachtung im Weislicht-Modus lässt sich in Abb.3.2.17 eine pathologische Veränderung der linken Stimmlippe feststellen. Man erkennt eine höckerige, fleckförmige Veränderung der linken Stimmlippe, die beim Umschalten in den Blaulicht-Modus (Abb.3.2.18) einen starken AF-Verlust aufweist.

Gruppe 8.c) Karzinoma in situ



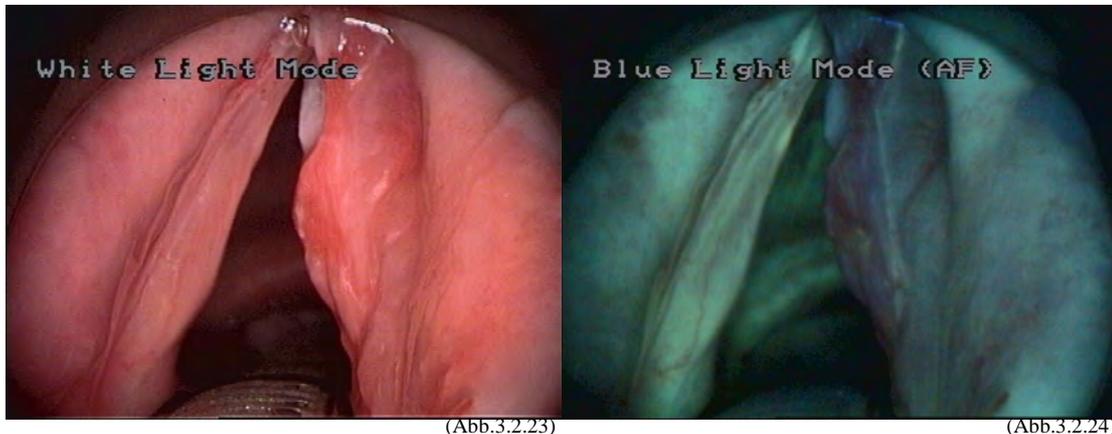
Die unruhige Oberflächenbeschaffenheit mit leukoplakischen Veränderungen und atypischen Gefäßzeichnungen lässt bereits bei Betrachtung der endoskopischen Weislicht-Untersuchung (Abb.3.2.19) mindestens die Diagnose eines Karzinoma in situ zu. Im Blaulicht-Modus (Abb.3.2.20) zeigt sich auf beiden Stimmlippen und den angrenzenden Bereichen ein starker, unscharf begrenzter AF-Verlust im Rot-Violetten Bereich. Weiterhin sind die Gefäßtypen deutlicher kontrastiert.

Gruppe 9.) pT1a-Karzinome



Schon in der Weislichtendoskopie (Abb.3.2.21) erkennt man deutlich einen unizentrischen wenig verhornenden, prominenten Tumor der linken Stimmlippe mit einer kontralateralen Hyperämie durch die mechanische Belastung. In der Autofluoreszenzendosko-

pie (Abb.3.2.22) zeigt der Tumor einen deutlichen Verlust der Grünfluoreszenz. Die Tumorgrenzen lassen sich im Autofluoreszenzmodus durch die vermehrte Kontrastierung eindeutiger beurteilen, als in der reinen Weißlichtuntersuchung.



Diese Abbildungen zeigen erneut einen, bereits im Weißlicht-Modus (Abb.3.2.23) als solchen zu identifizierenden, teilweise verhornenden Tumor mit ulzerierender Oberfläche. Bei Betrachtung in Autofluoreszenzendoskopie (Abb.3.2.24) erkennt man einen starken AF-Verlust der gesamten rechten Stimmlippe, das Signal ist rot-violett. Anteile der linken Lippe sind hyperkeratotisch verdickt und fluoreszieren in einem helleren Grünton.

Betrachtet man die einzelnen Erkrankungen in Zusammenhang mit den von ihnen aufgewiesenen AF-Signalen, so lässt sich folgendes feststellen (Tab.3.2):

Von 33 untersuchten Fällen mit der Diagnose einer leichten Dysplasie wiesen 12 % keinen AF-Verlust auf, bei 73 % war das Signal leicht abgeschwächt, und lediglich bei 15 % zeigte sich ein starker AF-Verlust, der auf eine Hyperämie im Rahmen einer chronischen Laryngitis zurückgeführt werden konnte.

21 Fälle ließen sich insgesamt einer mittelschweren dysplastischen Veränderung zuordnen, davon hatten 29 % keinen AF-Verlust, das Signal war bei 38 % leicht und bei 33 % stark abgeschwächt.

Schwere Dysplasien lagen in 19 aller AF-untersuchten Fälle vor, davon hatte kein untersuchter Patient keinen AF-Verlust, ein leichter zeigte sich in 26 %, ein schwerer in 74 %. Karzinomata in situ wiesen zu 100 % der 12 vorliegenden Fälle einen schweren

AF-Verlust auf. Fasst man die Gruppe der schweren Dysplasien mit der, der Karzinomata in situ zu einer Gruppe zusammen, wie es bei der Vermessung der epithelialen Schichtdicke bereits ebenfalls erfolgte, so weisen von 31 insgesamt untersuchten Fällen 16 % einen leichten, und 84 % einen starken AF-Verlust auf.

Die 31 untersuchten pT1a-Karzinome hatten in 3 % ein leicht, in 97 % der Fälle ein stark abgeschwächtes AF-Signal. Karzinome ohne AF-Verlust wurden nicht gefunden.

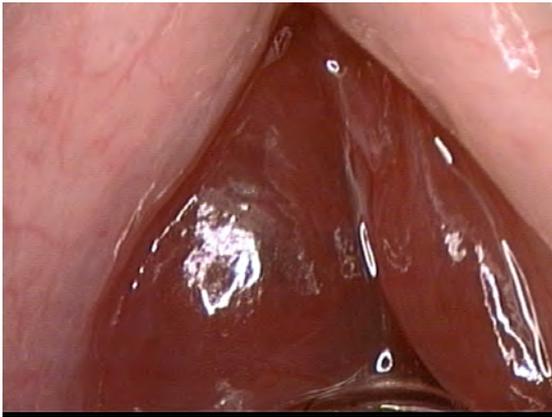
Diagnose	Fälle	gesamt	AF-V 0	AF-V1	AF-V2
	Anzahl	(=100%)	Anzahl (=x%)	Anzahl (=x%)	Anzahl (=x%)
Leichte Dysplasie	33		4 (12%)	24 (73%)	5 (15%)
Mittelschwere Dysplasie	21		6 (29%)	8 (38%)	7 (33%)
Schwere Dysplasie	19		0 (0%)	5 (26%)	14 (74%)
Karzinoma in situ	12		0 (0%)	0 (0%)	12 (100%)
Gruppe schwere Dysplasie	31		0 (0%)	5 (16%)	26 (84%)
pT1a-Karzinom	31		0 (0%)	1 (3%)	30 (97%)

(Tab.3.2.)

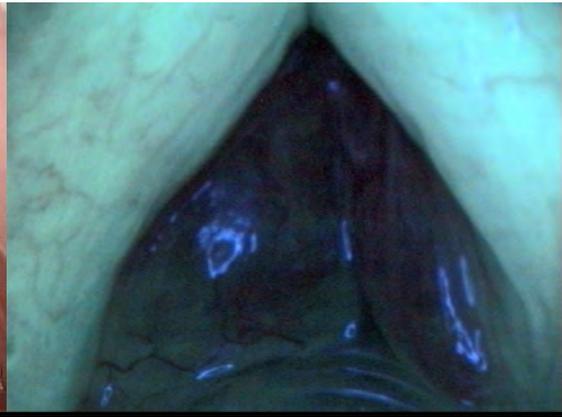
Falsch positive Ergebnisse entstehen, wenn der Patientenfall im Blaulicht-Modus zwar einen Autofluoreszenzverlust aufweist, dieser aber nicht durch eine Verdickung der Epithelschicht, sondern durch einen anderen Faktor, der ebenfalls einen Autofluoreszenzverlust bewirken kann, hervorgerufen wird.

Eindrucksvoll zeigt sich ein solcher Fall in Abb.3.2.25 und Abb.3.2.26. Hier erkennt man ein eingeblutetes Reinke Ödem. Der deutliche Autofluoreszenzverlust im Blaulicht-Modus in Abb.3.2.6 wird durch eine Änderung des charakteristischen Absorptionsspektrums hervorgerufen, die durch eine vermehrte Einlagerung des Häm-Moleküls verursacht wird.

Eingeblutetes Reinke Ödem

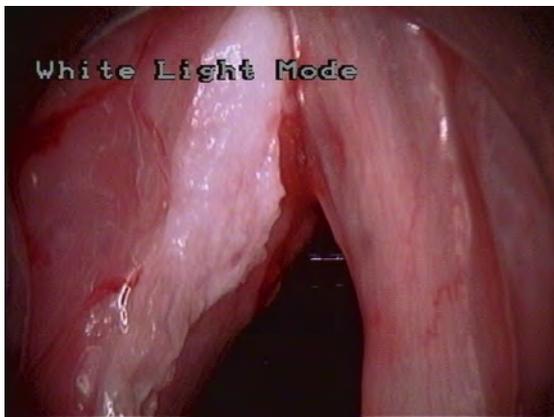


(Abb.3.2.25)



(Abb.3.2.26)

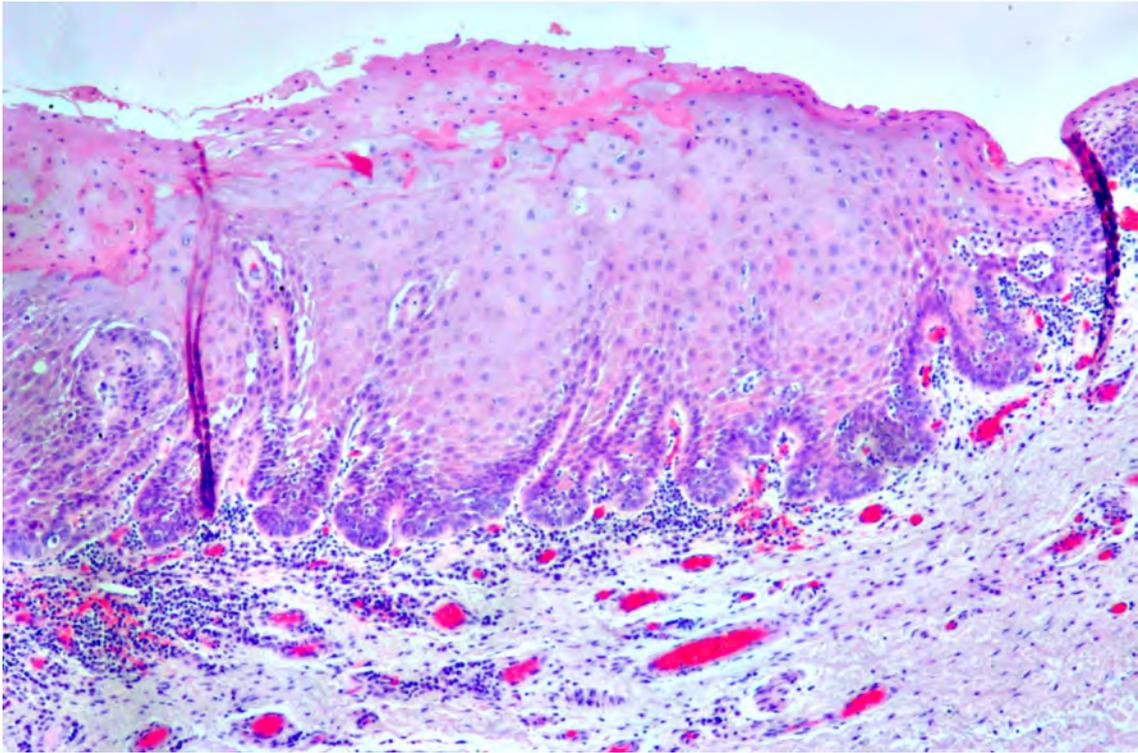
Ebenso können basale Veränderungen durch aufliegendes Epithel und insbesondere Hyperkeratosen maskiert werden. Dies führt zu falsch negativen Ergebnissen, wie in Abb.3.2.27 und Abb. 3.2.28 deutlich wird. Es liegt nur ein leichter AF-Verlust vor, doch bei der histologischen Untersuchung der Stufenserienschnitte zeigt sich eindeutig ein stark verhornendes pT1a-Karzinom (Abb.3.2.29) (Hämatoxylin & Eosin, x 5).



(Abb.3.2.27)



(Abb.3.2.28)



(Abb.3.2.29)

4 Diskussion

Das Plattenepithelkarzinom des Kehlkopfes zählt mit rund 30 % zu den häufigsten Malignomen im Kopf- Halsbereich. Auch Plattenepitheldysplasien der Larynxschleimhaut können als Präkanzerosen in ein infiltrierendes Karzinom übergehen, wobei mittelschwere und schwere Dysplasien obligate Präkanzerosen darstellen. Kleinsasser gibt eine Latenzzeit von 5 – 7 Jahren an, bis ein Karzinoma in situ in ein invasives Karzinom übergeht ^{Kleinsasser, 1963, 1987}.

Die primär chirurgische Behandlung laryngealer Karzinome hat sich, insbesondere bei der frühen Diagnostik laryngealer Läsionen gut bewährt ^{Glanz et al., 1989}. Neben dem kurativen Aspekt sollen die grundlegenden Kehlkopffunktionen weitestgehend erhalten bleiben. Hierbei trägt die prä- und perioperative Diagnostik mit Einschätzung des Ausmaßes der Läsion und Bestimmung der Tumorgrenzen wesentlich zu dem Konzept der funktionserhaltenden Chirurgie bei ^{Colden et al., 2001}. Čupič beruft sich in einer Studie aus dem Jahre 1997 darauf, dass er eine starke Diskrepanz zwischen klinischer und histologischer prämaligener Diagnosestellung gefunden hat, und daher jede Läsion, die ein po-

tentiell malignes Risiko trägt, zu biopsieren ist ^{Čupič, 1997}. Dagegen sehen andere Autoren in der Autofluoreszenzlaryngoskopie eine gute Untersuchungstechnik obligate und präkanzeröse Schleimhautveränderungen noninvasiv zu unterscheiden. Kolli führte 1995 Untersuchungen an der oralen- und pharyngealen Schleimhaut durch, und konnte signifikante Unterschiede in den Fluoreszenzspektren von normalen und neoplastischen Geweben feststellen ^{Kolli et al., 1995}. In der gleichen anatomischen Region konnten Dhingra et al. nur 1 Jahr später in 17 von 19 autofluoreszenzmikroskopisch untersuchten und histologisch kontrollierten Läsionen (differenziert wurden: normales, hyperkeratotisches, dysplastisches Epithel) korrekte Diagnosen stellen, und die Gewebeproben in die Kategorien normal, gutartig und neoplastische Veränderungen einteilen. Zwei Resultate waren falsch-positiv ^{Dhingra et al., 1996}. Ein Tierversuch des gleichen Autors in 1998 brachte ebenso vielversprechende Ergebnisse ^{Dhingra et al., 1998} wie eine Untersuchung von Žargi, 2000 ^{Žargi, 2000}.

Wir konnten in der vorliegenden Untersuchung das große Potenzial der Autofluoreszenzlaryngoskopie bestätigen, denn auch einem ungeübten Untersucher ist es möglich, die Befunde im Autofluoreszenzlicht in Gruppen von keinem, leichtem und starkem Autofluoreszenzverlust einzuordnen.

Die Epithelvermessung unterliegt einem Ablesefehler von bis zu 0,5 μm . Da alle Daten von ein und demselben Untersucher erhoben wurden, wird dieser Fehler auf alle Werte normalverteilt sein. Diesen Messfehler kann man bei der Betrachtung der Werte in Verbindung mit dem korrelierenden Autofluoreszenzverlust vernachlässigen, denn um eine sichtbare Änderung des Fluoreszenzspektrums zu erreichen ist eine Abweichung vom Normalwert von ca. 100 μm notwendig.

Das Stimmlippenepithel weist im Normalfall etwa 5–10 Zellschichten und eine Schichtdicke von 100–200 μm auf ^{Jelinek, 1966}. Der von uns ermittelte Wert betrug in Übereinstimmung damit 146,93 μm . Die kontinuierliche Epithelverdickung in Abhängigkeit vom Dysplasiegrad kommt sowohl durch eine Vergrößerung der Zellkerne mit Veränderung der Kern-Plasma-Relation als auch durch eine Zunahme kernhaltiger Zellen zustande. Dieser Prozess beginnt in der basalen Schicht und erstreckt sich mit fortschreitender Dysplasie auf alle 3 Epithelschichten. Zunehmend treten eine submuköse Ent-

zündung, eine vorzeitige Verhornung, Kernatypien, Mitosen und ein Verlust der natürlichen Schichtung hinzu ^{Crissman, 1993}.

Am genauesten lässt sich die Epitheldicke an Kryostatschnitten bestimmen, die jedoch nur selten routinemäßig eingesetzt und nachträglich nicht mehr angefertigt werden können. Abhängig von Gewebeart und Formaldehydkonzentration kommt es beim Fixations- und Bearbeitungsprozess zu einer Schrumpfung der Präparate. Diese beträgt im Bereich des Stimmlippenepithels und des darunter liegenden Bindegewebes ungefähr 20%, weshalb unsere Messwerte entsprechend korrigiert wurden ^{Kimura, 2003}.

Trotzdem dürfen unsere Resultate lediglich als Richt- und keinesfalls als Absolutwerte angesehen werden.

Unabhängig vom verwendeten Korrekturfaktor bleibt die Tendenz einer zunehmenden Epithelverdickung bei steigendem Dysplasiegrad erhalten. In der Literatur fehlen bisher Angaben über Normal- und Grenzwerte für das Stimmlippenepithel, und nur in wenigen Studien wurde eine morphometrische Vermessung der Epitheldicke bei Stimmlippenveränderungen durchgeführt. So hat Olde Kalter bereits vor einigen Jahren eine kontinuierliche Epithelverdickung in Abhängigkeit vom Dysplasiegrad festgestellt.

Er gibt in seiner Studie die mittlere Epitheldicke des Carcinoma in situ mit 430 μm an und liegt somit relativ nahe an unserem Messwert ^{Olde Kalter, 1985}. Cör hingegen beschreibt beim Carcinoma in situ eine mittlere Epithelbreite von nur 350 μm und bleibt damit deutlich unter dem von uns bestimmten Wert. Die Ursache hierfür könnte an der kleinen Probandenzahl in dieser Studie liegen, an denen jeweils 100 Einzelmessungen vorgenommen wurden, um dennoch aussagekräftige Resultate zu erhalten ^{Cör, 1997}.

Die in unserer Studie ermittelten Epitheldicken reichen von 146,93 μm beim normalen Stimmlippenepithel bis zu 974,22 μm beim mikroinvasiven Karzinom, wobei die mittelgradige Dysplasie eine doppelte, die schwere Dysplasie und das Carcinoma in situ eine 3-fache und das mikroinvasive Karzinom sogar eine 6-fache Zunahme der mittleren Epitheldicke gegenüber der normalen Schleimhaut zeigte.

Ausgehend von physiologischem Epithel mit einer durchschnittlichen Dicke von 146,93 μm , lässt sich eine leichte Erhöhung der Werte bei der Betrachtung reaktiver Veränderungen, bzw. der untersuchten fakultativen Präkanzerosen feststellen. Deren Mittelwerte bewegten sich in einem Bereich von durchschnittlich 217,84 μm (Gruppe 2.) – 257,67 μm (Gruppe 6.)). Dabei zeigte sich, dass das laryngitische Epithel in Verbindung

mit einer leichten Dysplasie (Gruppe 6.b)) gegenüber dem rein leicht dysplastischen Epithel (Gruppe 6.a)) zusätzlich leicht verdickt war. Die Standardabweichung dieser beiden Untergruppen war ähnlich groß (vgl. Tabelle 3.1).

Vergleicht man laryngitisches Epithel ohne Dysplasie (Gruppe 5.)) mit dem physiologischen Gewebe aus Gruppe 1.), so lässt sich eine Verdickung von 100 μm feststellen.

Bei Befunden, die mit chronischer Laryngitis assoziiert sind, kommt es, wie im Folgetext erläutert, trotz Einwanderung von Entzündungszellen und vermehrter Durchblutung nur zu einer leichten Verbreiterung des Epithels. Dies ist wahrscheinlich auch der Grund, weshalb das zusätzliche Vorliegen einer Entzündung im Rahmen von dysplastischen Stimmlippenveränderungen keinen wesentlichen Einfluss auf die Gesamtepitheldicke hat.

Im Vergleich zur Epitheldicke des physiologischen Gewebes ließ sich in Gruppe 7.) eine Verdoppelung feststellen, es wurden durchschnittlich 300,87 μm gemessen. Die Standardabweichung bewegte sich auch in den Untergruppen 7.a) und 7.b) in einem ähnlichen Bereich (vgl. Tabelle 3.1). Dennoch bleibt hierbei festzustellen, dass auf Grund der erheblich unterschiedlichen Zahl der untersuchten Fälle (23 Fälle in Gruppe 7.a) gegenüber 8) in Gruppe 7.b)) eine gewisse Relativierung der Ergebnisse erfolgen muss, denn die erwartete Verdickung des entzündlich veränderten Gewebes im Vergleich zu dem rein dysplastischen Gewebe konnte hier nicht festgestellt werden.

Bei Betrachtung der Gruppe der obligaten Präkanzerosen (Gruppe 8.)) erfolgt ein sprunghafter Anstieg der Schichtdicke des Oberflächenepithels (besonders deutlich in Abb. 3.1). Mittelwertig wurden nun 444,81 μm gemessen, dies entspricht fast einer Verdoppelung des Mittelwertes der Gruppe der mittelschweren Dysplasien und einer Verdreifachung des Wertes, der bei dem physiologischen Gewebe in Gruppe 1.) festgestellt wurde.

Die Standardabweichung ist in dieser Gruppe auf 122,34 μm erhöht, was sich darauf zurückführen lässt, dass hier schwer dysplastisches Epithel mit (Gruppe 8.b)) und ohne Dysplasie (Gruppe 8.a)) mit Karzinomata in situ (Gruppe 8.c)) zusammengefasst wurden. In Gruppe 8.c) wurde bereits ein Mittelwert von fast 500 μm erreicht. Dies entspricht mehr als einer Verdreifachung des Wertes aus Gruppe 1.).

Außerdem konnten leider nur 6 Fälle in Gruppe 8.b) gegenüber 18 Fällen jeweils in den beiden anderen Gruppen 8.a) und 8.c) untersucht werden, daher sind diese Werte deut-

lich inhomogener (hohe Standardabweichung in Gruppe 8.b) von 152,06 μm) und dementsprechend leider nicht vergleichbar valide.

Der größte Sprung in der Epithelverdickung findet sich beim Übergang in Gruppe 9.) mit durchschnittlich gemessenen 974,22 μm . Der Mittelwert ist hier dementsprechend fast doppelt so hoch, wie in Gruppe 8.c) und fast siebenmal so hoch, wie in Gruppe 1.)!

Die Werte sind ähnlich valide, denn obwohl die Standardabweichung im Vergleich zu der, des normalen Gewebes deutlich zugenommen hat, sind Minimal- und Maximalwerte ebenfalls deutlich angestiegen (vgl. Tabelle 3.1).

In der Autofluoreszenzendoskopie stellen sich normale Stimmlippenschleimhaut und Reinke Ödeme in einem hellen Grünton dar, der bei Betrachtung der Stimmlippenpolypen deutlich abgeschwächt ist. Betrachtet man die korrelierend gemessene Dicke des Epithels, so lässt sich zwar ein zahlenmäßiger Anstieg der Schichtdicke von bis zu 100 μm feststellen, dieser ist aber anscheinend nicht groß genug, um eine deutliche Abschwächung des remittierten Lichtes hervorzurufen. In der Literatur werden Reinke-Ödem und Polyp als gutartige Veränderungen der Stimmlippe beschrieben die beide durch eine mechanische Überbelastung ausgelöst werden ^{Kambič, 1989; Dikkers, 1997}. Histologisch findet man bei beiden ein gering verdicktes Epithel mit subepitheliales Ödem. Dabei zeigt sich bei den Polypen oft eine reaktive Veränderung des Epithels in Form von Atrophie oder Hyperplasie, während beim Reinke-Ödem eher die Basalmembran unter dem Plattenepithel verdickt ist. Das Reinke-Ödem ist außerdem häufiger mit verschiedenen schweren Hyperplasien, Keratosen und Dysplasien assoziiert ^{Kosoković, 1976; Glanz et al., 1997; Pastuszek et al., 2003}. Polypen und Papillome zeichnen sich beide dadurch aus, dass sie subepithelial ein dichtes Gefäßnetz besitzen, das eine zusätzliche Lichtabsorption begünstigt. Beide gelten als reaktive Veränderungen, denen weiterhin ein Verlust der elastischen Fasern gemeinsam ist.

In den Fällen, bei denen eine Laryngitis ohne Dysplasie vorlag, konnten Werte ähnlich denen des Polypen gemessen werden. Dagegen konnte in dieser Gruppe im Einzelfall ein bis zu starker Autofluoreszenzverlust festgestellt werden. Eine Erklärung findet sich bei der histologischen Betrachtung dieser Läsion. Kleinsasser beschreibt die Laryngitis bereits 1962 als eine Läsion, deren Charakteristik eine Epithelverdickung ist, sodass die subepithelialen Kapillaren nicht mehr zu erkennen sind ^{Kleinsasser, 1962}. In einer Studie

von Andrea et al. aus dem Jahre 1995 wird eine erhöhte Zell - Plasma - Relation der Zellen im laryngitischen Gewebe beschrieben, neben der auch eine Vergrößerung der Zellkerne in den oberen Schichten zu erkennen ist ^{Andrea et al., 1995a, 1995b}. In der vorliegenden Untersuchung konnte dieser Sachverhalt bestätigt werden; eine beobachtete Vergrößerung der Zellkerne bewirkte eine erhöhte Absorption, somit tritt, bei ausreichend großer zusätzlicher Absorption, ein Autofluoreszenzverlust auf.

Münzel stellt eine Verbindung zwischen Hyperplasie und subepithelialen Veränderungen her, und diskutiert eine Verbindung zwischen starker, subepithelialer Entzündung und dadurch möglicherweise hervorgerufener stärkerer Proliferationstendenz der basalen Epithelabschnitte ^{Münzel, 1976}. In unserer Studie zeigte sich in den Gruppen eine ähnliche Tendenz, die nach der Besprechung der dysplastischen Epithelveränderungen diskutiert werden soll.

Die Gruppen der leichten- und die der mittelschweren Dysplasien erzeugten einen leichten Autofluoreszenzverlust, der sich messtechnisch auf einen weiteren Anstieg der Epitheldicke zurückführen lässt, denn der Mittelwert ist bei mittelschweren Dysplasien doppelt so hoch, wie in der Gruppe des normalen Gewebes. Wir stimmen mit einer Studie von Arens et al. überein, die auf die Möglichkeit einer autofluoreszenzmikroskopischen Abgrenzung höherer Dysplasien und kanzeröser Veränderungen von niedrigen Dysplasien und entzündlichen Veränderungen abzugrenzen ^{Arens et al., 1999} hinweist, gleichwohl ist die Einteilung der mittelschweren Dysplasien für den unerfahrenen Betrachter die schwierigste. Diese Tatsache verdeutlicht eine Arbeit von Arens et al. aus dem Jahre 2003, dabei entstanden in dieser Gruppe die größten Diskrepanzen zwischen Autofluoreszenzdiagnostik und histologischer Diagnose ^{Arens et al., 2003}. Der Meinung von Lam et al., 1993 können wir uns nicht anschließen. Dort wird eine autofluoreszenzgestützte Bronchoskopie vorgenommen, und die Autoren stellen fest, dass sich normales Gewebe in seinem Fluoreszenzspektrum zwar deutlich von dysplastischem und präkanzerösem Gewebe unterscheidet, allerdings keine Differenzierung zwischen Dysplasien und einem Karzinoma in situ erfolgen kann ^{Lam et al., 1993}. Diese scheint uns zumindest zwischen leichten Dysplasien und schweren Dysplasien beziehungsweise Karzinomata in situ sehr wohl möglich. Wir schließen uns einer Aussage von Arens et al. aus dem Jahre 2006 an, wonach sehr wohl zwischen normalem und kanzerösen Gewebe unterschieden werden kann, eine Differenzierung aber beispielsweise zwischen Karzinoma in situ und mikroinvasivem Karzinom nicht möglich ist ^{Arens et al., 2006}!

Dem Papillom wird eine virale Genese zugrunde gelegt. Histologisch wird eine abnorme plattenepitheliale Reifung in Form von Parakeratosen, eine retardierte Reifung der obersten Schichten und eine basale Hyperplasie beschrieben ^{Abramson et al., 1987; Glanz et al., 1997}. Diese basale Hyperplasie wird auch in den Messwerten der Epithelbreite deutlich. Die Werte bewegen sich im Bereich derer der mittelschweren Dysplasie, lösen allerdings alle einen starken Autofluoreszenzverlust aus. Im Unterscheid zu den mittelschweren Dysplasien, die einen eher leichten Autofluoreszenzverlust verursachen, kann man in dem papillomatösen Gewebe kaum noch normale Keratinfilamente finden, es herrscht weitestgehend ein Bild abnormer Filamente vor ^{Abramson et al., 1987}. Darin vermuten wir den zusätzlichen Faktor, der eine Abschwächung des Fluoreszenzsignals bewirkt. Malzahn et al. führen weiterhin an, dass das Vorliegen vieler gewundener und dilatierter Gefäße, sowie eine große Menge inflammatorischer Zellen zu einem erhöhten Autofluoreszenzverlust beitragen ^{Malzahn et al., 2002}.

Betrachtet man die Gruppe 7.) in Abb. 3.1.1, so fällt eine deutliche Zunahme der gemessenen Werte auf. In diesem Stadium scheint eine sprunghafte Verdickung des Epithels vorzuliegen. Im Vergleich zum normalen Epithel sind die Werte mehr als dreimal so hoch. Diese Tatsache wurde bereits 1986 ebenfalls von Olde Kalter et al. beschrieben ^{Olde Kalter et al., 1986}. In der Mehrzahl lösen schwere Dysplasien und höherwertige Veränderungen einen starken Autofluoreszenzverlust aus. Dabei war es nicht möglich zwischen schwerer Dysplasie und Karzinoma in situ, bzw. einem mikroinvasiven Karzinom zu unterscheiden. Dieser Sachverhalt wird ebenso auch von Arens et al., 1999; Gillenwater, 1998; Malzahn et al., 2002; Zargi et al., 2000; beschrieben ^{Arens et al., 1999; Gillenwater et al., 1998a, 1998b; Malzahn et al., 2002; Žargi et al., 2000}.

Die Tatsache, dass monochromatisches Licht nur ca. 500 µm tief in das Gewebe eindringen kann ^{Wang, 1996}, erzeugt hier erste Schwierigkeiten, denn bei Messwerten von bis zu 579,04 µm als Maximalwert des Karzinoma in situ kann diese Läsion schon nicht mehr in ihrer gesamten Ausdehnung untersucht werden, und das, obwohl noch keinerlei Mikroinvasion vorzufinden ist ^{Gillenwater, 1998}. Die für gesundes Gewebe charakteristische Grünfluoreszenz wird durch submuköse Fluorophore generiert, die unter derartig verdickten Epithelien nicht mehr vom Licht erreicht werden können. Es ist im Folgenden gleichgültig, wie viel dicker die Läsion ist, die verbleibende Restfluoreszenz basiert auf endo-epithelialen Fluorophoren, die unabhängig von dem Dysplasiegrad sind.

In der Literatur wird allerdings auch über Fälle des „atrophischen Karzinoms“ berichtet Kambič & Gale, 1995, dieser Begriff beschreibt Karzinomata in situ mit nur 7-8 Zellagen, die deutlich schmaler ausgeprägt sind, als die in unserer Studie untersuchten Karzinomata in situ, man kann also nicht in jedem Fall von der Dicke des Epithels auf den Befund schließen.

Rufen wir uns noch einmal die o.g. Studie von Münzel et al. ins Gedächtnis, in der einer starken submukösen Entzündung das Potential zur Erhöhung der basalen Zellproliferation zugeschrieben wird. In den Gruppen 6.) und 8.) kann man deutlich erkennen, dass dysplastische Fälle gleicher Schwere ein dickeres Epithel aufweisen, wenn eine subepitheliale Entzündung vorliegt. Zu dem gleichen Ergebnis kommt man beim Vergleich der Gruppen 4.) und 5.). Dass diese Tatsache in der Gruppe 7.) nicht ersichtlich ist, könnte an der geringeren Anzahl der in Gruppe 7.b) vorgenommenen Messwerte liegen, da hier weniger histologische Schnittstufen vorlagen, als in den anderen Gruppen.

In Abb.3.1.1 erkennt man erneut einen deutlichen Sprung in der Epitheldicke, wenn man die Gruppe 9.) betrachtet. Im Vergleich mit der vorangehenden Gruppe haben sich die Werte im Durchschnitt verdoppelt. Die pT1a-Karzinome lösten, ebenso wie die Gruppe 8.) einen starken Autofluoreszenzverlust aus. Eine Unterscheidung dieses Signals von einem aus der Gruppe 8.) war nicht möglich. Lediglich, wenn sich auf der leicht ulzerierenden Tumoroberfläche ein Bakterienrasen angesiedelt hatte, der im Blaulicht in einem intensiven Orangeton fluoreszierte Malzahn et al., 2002, konnte die Diagnose eines Karzinoms auch an Hand des vorliegenden AF-Signals erfolgen. Die Invasionstiefe kann auf Grund der stark begrenzten Eindringtiefe des monochromatischen Lichtes nicht mit der Autofluoreszenzendoskopie bestimmt werden, denn die gemessenen Minimalwerte betragen bereits 804,95 µm.

Außerdem ist die Absorption im kanzerösen Gewebe vielfach höher, als in normalem Gewebe, da die Kern-Plasma-Relation verschoben ist, und viele polymorphe Zellkerne und atypische Mitosen vorliegen, die zusätzlich in einem geringen Maß zur Streuung der Photonen und somit zu einer weiteren Schwächung des Autofluoreszenzlichtes beitragen. Der Zellmetabolismus ist in karzinomatösen Geweben ebenfalls deutlich erhöht, dementsprechend liegen die endogenen Fluorophore in der oxidierten und damit nicht

fluoreszierenden Form vor, woraus sich eine weitere Abschwächung des Signals erklären lässt.

In allen betrachteten Gruppen konnten keratotische Prozesse identifiziert werden. Klestadt bemerkte bereits 1928: "... Man kann der Hyperkeratose ja nicht, oder nur in begrenztem Umfange ansehen, was dahinter steckt, denn hinter täuschend ähnlichen Gesichtern können sich verschiedene Charaktere verbergen. ..." Klestadt, 1928.

Diese Schwierigkeit kommt bei der Autofluoreszenzuntersuchung ganz besonders deutlich zur Geltung, denn durch ein vermeintlich oberflächlich gutartiges Bild können ausgedehnte präkanzeröse Prozesse maskiert werden^{Fryen et al., 1997; Malzahn et al., 2002; Žargi et al., 1997}. Die verstärkte Fluoreszenz der Keratinfilamente ist in der Lage jeglichen Fluoreszenzverlust zu verdecken. Eine Studie von Frangež et al. beschreibt das Vorhandensein einer Keratinschicht in 62,6 % aller untersuchten Fälle^{Frangež et al., 1997}. In unseren Untersuchungen zeigte sich nur in 25,9 % der untersuchten Fälle eine Keratinschicht.

Wir sehen die Autofluoreszenzdiagnostik der laryngealen Schleimhaut als eine reine Ausbreitungsdiagnostik zur grundsätzlichen Detektion einer Läsion, sowie der tatsächlichen horizontalen Flächenausdehnung präkanzeröser und kanzeröser Schleimhautveränderungen. Sie stellte sich in unserer Untersuchung als ungeeignet dar, Epithelveränderungen ab einer bestimmten vertikalen Schichtdicke vollständig zu erfassen, oder Rückschlüsse auf die exakte Dignität der Läsion zu ziehen.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsch

Die Suche nach einer Methode zur Früherkennung von präkanzerösen und kanzerösen Schleimhautläsionen ist schon seit langem ein entschiedenes Ziel in der Tumordiagnostik. In diesem Zusammenhang wird der Autofluoreszenzendoskopie bereits in vielen Fachbereichen ein zukunftsweisendes Potential zugesprochen ^{Arens et al., 1999; Arens, 2003; Dhingra et al., 1996; Fryen et al., 1997; Gillenwater et al., 1998a, 1998b; Malzahn et al., 2002; Ramanujam et al., 1993; Žargi et al., 1997}. Unterstützend zur klinischen Untersuchung konnte mit der Autofluoreszenzendoskopie in der Unterscheidung einfacher Hyperplasien und präkanzeröser Läsionen eine Spezifität von 97,3 % bei einer Sensitivität von 83,3 % erreicht werden ^{Malzahn et al., 2002}. In der vorliegenden Arbeit soll die Autofluoreszenzdiagnostik bezüglich ihrer Phänomene bei der klinischen Anwendung bei pT1a Larynxkarzinomen und deren dysplastischen Vorstufen, bzw. die Verbindung zwischen Autofluoreszenzverlust und Epitheldicke untersucht werden.

Ziel dieser Studie ist es, verschiedene Epithelläsionen in ihrer vertikalen Ausdehnung zu vermessen, Orientierungsbereiche dieser Epitheldicken zu finden und zu vergleichen, ob sich diese Veränderungen in charakteristischer Art und Weise dem zugehörigen Autofluoreszenzbild zuordnen lassen.

Aus dem Archiv der Abteilung für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Justus-Liebig-Universität (JLU) Giessen wurden 194 Patienten ausgewählt, die in den Jahren 1999-2004 per Autofluoreszenzendoskopie an den Stimmlippen untersucht und befundet worden waren. Davon waren 165 (85,5 %) Männer und 28 (14,51 %) Frauen im Altersbereich von 32-92 Jahren. Vorhandene Läsionen wurden im jeweiligen Behandlungszeitraum im Rahmen von Mikrolaryngoskopien als Excisionsbiopsie, Dekortikations-, oder Chordektomiepräparat exzidiert.

Betrachtet man die einzelnen Erkrankungen in Zusammenhang mit den von ihnen aufgewiesenen AF-Signalen, so lässt sich folgendes feststellen (Tab. 3.2):

Physiologisches Epithel (Gruppe1.) war im Mittel 147 µm dick, und wies wie die Reinke Ödeme (Gruppe 2.), deren Epithel im Durchschnitt 218 µm dick war, keinen AF-Verlust auf.

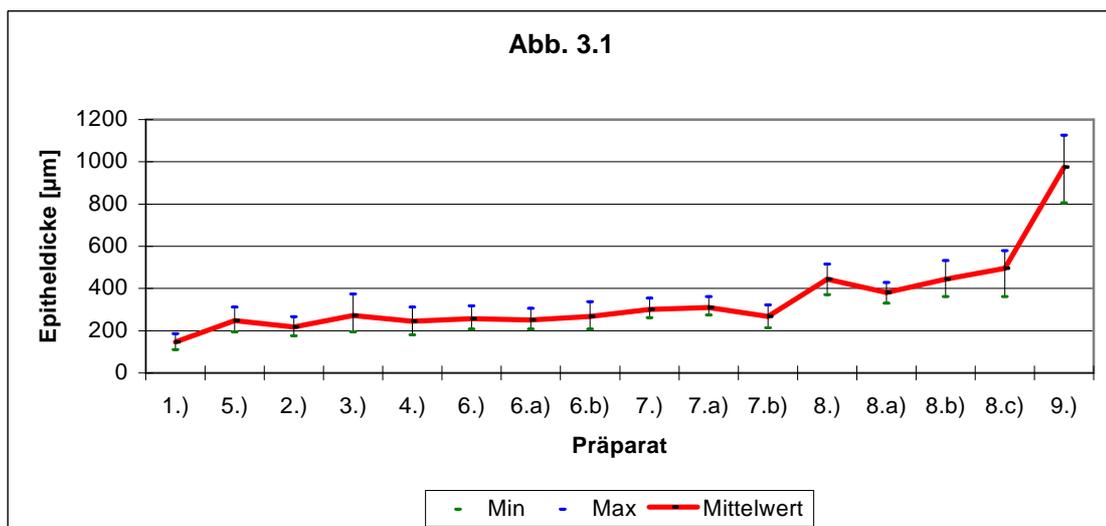
Veränderungen wie Papillome (Gruppe 3.)), Polypen (Gruppe 4.)) oder laryngitisches Gewebe ohne Dysplasie (Gruppe 5.)) wiesen einen leichten AF-Verlust auf, ihre Epithelschicht war mittelwertig 244-273 μm dick.

Fälle mit der Diagnose einer leichten Dysplasie (Gruppe 6.a)ohne- und 6.b)mit Laryngitis) wiesen in 12 % keinen AF-Verlust auf, bei 73 % war das Signal leicht abgeschwächt, und bei 15 % zeigte sich ein starker AF-Verlust, wobei das Epithel auf 258 μm verdickt war.

Eine Epitheldicke von 300 μm erreichten mittelschwere dysplastische Veränderungen (Gruppe 7.a)ohne- und 7.b) mit Laryngitis), sie hatten in 29 % keinen AF-Verlust, das Signal war bei 38 % leicht und bei 33 % stark abgeschwächt.

Schwere Dysplasien (Gruppe 8.a)ohne- und 8.b) mit Laryngitis) enthielten keinen Fall ohne AF-Verlust, ein leichter zeigte sich in 26 %, ein schwerer in 74 %. Karzinomata in situ wiesen zu 100 % der vorliegenden Fälle einen schweren AF-Verlust auf. Fasst man die Gruppe der schweren Dysplasien mit der, der Karzinomata in situ (Gruppe 8.c)) zu einer Gruppe zusammen, wie es bei der Vermessung der epithelialen Schichtdicke bereits ebenfalls erfolgte (Gruppe 8.)), so weisen von 31 insgesamt untersuchten Fällen 16 % einen leichten, und 84 % einen starken AF-Verlust auf, wobei die mittlere Epitheldicke 444 μm betrug, bei alleiniger Betrachtung der Gruppe 8.c) wurden sogar fast 500 μm erreicht. Die untersuchten pT1a-Karzinome (Gruppe 9.)) erreichten im Mittel Werte von 975 μm , und hatten in 3 % ein leicht, in 97 % der Fälle ein stark abgeschwächtes AF-Signal. Karzinome ohne AF-Verlust wurden nicht gefunden.

Wie erwartet, korrelierte die Stärke des AF-Verlustes mit dem Anstieg der Epitheldicke:



(Abb. 3.1)

Wir sehen die Autofluoreszenzdiagnostik der laryngealen Schleimhaut als eine reine Ausbreitungsdiagnostik zur grundsätzlichen Detektion einer Läsion, sowie der tatsächlichen horizontalen Flächenausdehnung präkanzeröser und kanzeröser Schleimhautveränderungen. Sie stellte sich in unserer Untersuchung als ungeeignet dar, Epithelveränderungen ab einer bestimmten vertikalen Schichtdicke vollständig zu erfassen, oder Rückschlüsse auf die exakte Dignität der Läsion zu ziehen.

5.2 English

Searching a method for early diagnosis of precancerous and cancerous lesions of the mucous membrane has been a long known aim in the department of tumor diagnosis Arens et al., 1999; Arens, 2003; Dhingra et al., 1996; Fryen et al., 1997; Gillenwater et al., 1998a, 1998b; Malzahn et al., 2002; Ramanujam, 1993; Žargi et al., 1997. With this, autofluorescence endoscopy is regarded to have high potentials in further diagnosis for several medical departments. By using the method of autofluorescence endoscopy in clinical examination to differentiate between simple dysplasia and precancerous lesion, it was possible to reach a specificity of 97.3 % and a sensitivity of 83.3 % ^{Malzahn et al., 2002}.

In the following, auto florescence endoscopy will be examined of its phenomena on clinical application of pT1a-caricnomata of the larynx and their early stages of dysplasia. Additionally, the interconnection between the reduction of auto fluorescence signal and the thickness of epithelia will also be analyzed.

In this examination it is to measure the extension of vertical epithelia of several epithelial lesions and to find values of references of this thickness in order to compare, if the characteristic changes are responsible for images of auto fluorescence.

Between 1999 – 2004 194 patients, between the age of 32 and 92, had been selected at the University Giessen in the department of Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde (department of Head and Neck surgery), of which the demographic features were 165 men (85.5 %) and 28 women (14.5 %). These patients were examined using the method of auto fluorescence endoscopy and lesions were found on their vocal cords. These lesions were excised as decortications or chordektomie during the microlaryngoscopy.

While inspecting the different lesions and the signal of their autofluorescence the followings could be observed (tab. 3.2):

Physiologic epithelial (group 1) had an average thickness of 147 μm and proved no reduction of autofluorescence signal similar to the group Reinke's Endema (group 2), which has an average thickness of 218 μm . Modification of lesions such as papillomas (group 3.), polyps (group 4.), or laryngitic mucosa without dysplasia (group 5.), which have a thickness between 244-273 μm , displayed a slight reduction of autofluorescence signal.

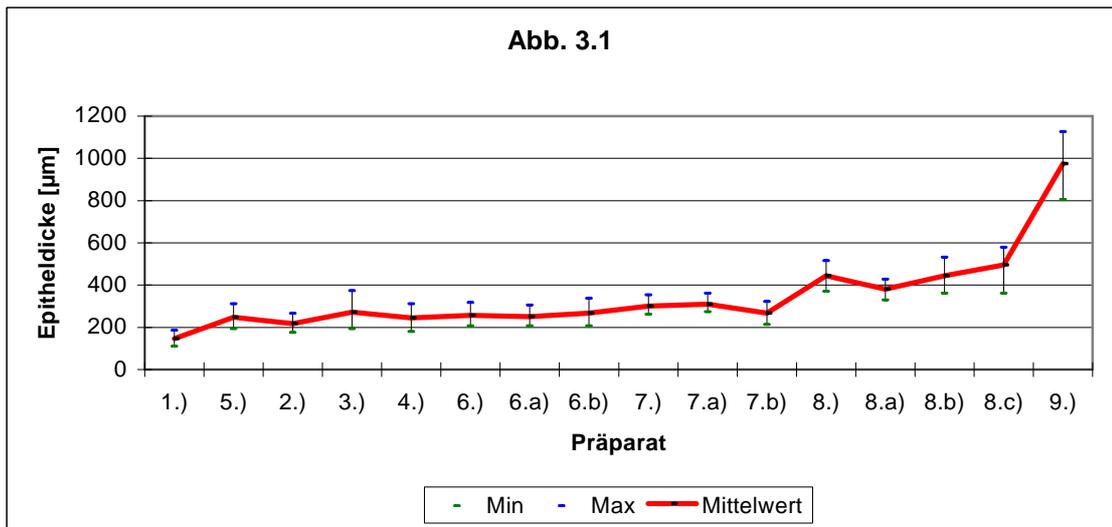
In cases of small dysplasia diagnosis with laryngitic (group 6.b) and without (group 6.a), out of which 12 % indicated no reduction of autofluorescence, 73 % indicated a slight and 15 % indicated an extreme reduction. The epithelial thickness of these two groups constitute of 258 μm .

301 μm epithelial thickness was met in the group with slight dysplastic modification with (group 7a) and without laryngitic (group 7b). 29 % of this group their level of autofluorescence signal were not reduced, 38 % had a slight reduction and 33 % displayed a tremendous reduction.

In group 8, severe dysplasia with laryngitic modification (8a) and without modification (8b), it can be seen that the level of autofluorescence signal in all cases showed a decrease, 26 % of the cases displayed only a slight decrease and 74 % the decrease of autofluorescence signal were extremely high. Like the severe dysplasia, carcinomata in situ (group 8.c) also had no case, in which the level of autofluorescence signal did not prove an extreme decline. Combining the severe dysplasia with the carcinomata in situ, as it was done in the epithelial measurement, it can be seen that their average epithelial thickness was 445 μm and 16 % of 31 examined cases had a slight decrease of autofluorescence signal, 84 % of the cases were extremely reduced. When regarding group 8.c separately, the epithelial thickness was nearly 500 μm .

The examined pT1a-carcinomata (group 9.) had a thickness of 975 μm and 3 % of this group displayed a slight and 97 % a tremendous reduction of autofluorescence level. Carcinomata without any decline of the signal were not found.

The level of reduction of autofluorescence signal and their rising epithelial thickness correlated as follows (see Abb.3.1):



(Abb. 3.1)

Auto fluorescence diagnosis of the larynx is only a method of finding out information about the horizontal extension and the detection of any precancerous and cancerous lesions of the mucosal membrane. In our examination it was not possible to determine vertical extensions of epithelial lesions from a certain thickness. It was also not possible to distinguish between several histologic findings using auto fluorescence.

6 Literatur

1. Abramson AL, Steinberg BM, Winkler B. Laryngeal papillomatosis: clinical, histopathologic and molecular studies. *Laryngoscope* 1987; 97: 678-685
2. Albrecht R: Über den Wert kolposkopischer Untersuchungsmethoden bei Leukoplakien und Carzinomen des Mundes und des Kehlkopfes. *Arch Ohrenheilk* 1954; 165: 459-463
3. Alfano R, Tata D, Cordeo J: Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue. *IEEE J Quant Electron* 1984 ; 20: 284-291
4. Andrea M, Dias O, Santos A: Contact endoscopy during microlaryngeal surgery: a new technique for endoscopic examination of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995a; 104: 333-339
5. Andrea M, Dias O, Santos A: Contact endoscopy of the vocal cord : normal and pathological patterns. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1995b; 115: 314-316
6. Antonelli AR, Micolai P, Cappiello J, Peretti G, Molinari-Tosatti MP, Rosa D, Grigolato PG, Favret M, Maroccolo D: Basement membrane components in normal, dysplastic, neoplastic laryngeal tissue and metastatic lymph nodes. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1991; 111: 437-443
7. Arens C: Die Bedeutung der Autofluoreszenz in der Frühdiagnostik des Larynxcarzinoms. *Habilitationsschrift 2005, Abteilung Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen*
8. Arens C, Dreyer T, Glanz H, Malzahn K: Compact endoscopy of the larynx. *Ann Otorhinolaryngol* 2003; 112:113-119
9. Arens C, Dreyer T, Malzahn K, Glanz H: Direct and indirect autofluorescence laryngoscopy in the diagnosis of laryngeal cancer and its precursor lesions. *Otolaryngol Pol* 2004; 58 (1): 197-203
10. Arens C, Glanz H: Endoscopic high-frequency ultrasound of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999; 256: 316-322
11. Arens C, Glanz H, Wönckhaus J, Hersemeyer K, Kraft M: Histologic assessment

- of epithelial thickness in early laryngeal cancer or precursor lesions and its impact on endoscopic imaging. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007; 264: 645-649
12. Arens C, Malzahn K, Dias O, Andrea M, Glanz H: Endoskopische bildgebende Verfahren in der Diagnostik des Kehlkopfkarzinoms und seiner Vorstufen. *Laryngo-Rhino-Otol.* 1999; 78: 685-691
 13. Arens C, Reußner D, Neubacher H, Woenckhaus J, Glanz H: Spectrometric measurement in laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006; 263: 1001-1007
 14. Arens C, Reußner D, Woenckhaus J, Leuning A, Betz CS, Glanz H: Indirect fluorescence laryngoscopy in the diagnosis of precancerous and cancerous laryngeal lesions. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007; 264: 621-626
 15. Babington BG: Glottiscope. Hunterian Society, London. *Med. Gaz.* 1829; 3: 555
 16. Baletic N, Petrovic Z, Pendjer I, Malicevic H: Autofluorescent diagnostics in laryngeal pathology. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004; 261: 233-237
 17. Becker N, Wahrendorf J: Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990. Springer Verlag, Berlin 1997
 18. Behrendes J, Histologie In: Behrendes J, Link R, Zöller F: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in Praxis und Klinik, Bd. IV/1. 1982; Thieme Verlag, Stuttgart
 19. Benjamins CE: Aandieningen van de stembanden in verband met de herkomst van het epitheel; tevens bijdrage tot de kennis van het praecarcinom. *Ned T Geneesk* 1928; 2: 5050-5064
 20. Benninghoff, Anatomie Bd. 1. Urban & Fischer, 16. Auflage
 21. Benson RC, Meyer RA, Zaruba ME, McKhann GM: Cellular Autofluorescence- is it due to flavins? *J Histochem Cytochem* 1979; 27: 44-48
 22. Betz CS, Leuning A: Möglichkeiten und Grenzen der Fluoreszenzdiagnostik und photodynamischen Therapie. Teil 1: Fluoreszenzdiagnostik. *HNO* 2003; 51: 1019-1033
 23. Betz CS, Mehlmann K, Rick K, Stepp H, Grevers G, Baumgartner R, Leunig A: Autofluorescence imaging and spectroscopy of normal and malignant mucosa in patients with head and neck cancer. *Lasers Surg Med* 1999; 25: 323-334

24. Bosatra A, Bussani R, Silvestri F: From epithelial dysplasia to squamous carcinoma in the head and neck region: an epidemiological assessment. *Acta Otolaryngol (Stockh)*1997; Suppl 527: 47-48
25. Bozzini P: Lichtleiter, eine Erfindung zur Anschauung innerer Theile und Krankheiten nebst der Abbildung. *J pract Arzneykunde und Wundarzneykunde* 1806; 24: 107-124
26. Broders AC: Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. *J Am med Ass* 1932; 99: 1670-1674
27. Brünings W, Albrecht W: Direkte Endoskopie der Luft- und Speisewege. Enke-Verlag, Stuttgart, 1915
28. Burch JD, Howe GR, Miller AB, Semenciw R: Tabacco, alcohol, asbestos and nickel in the etiology of cancer of the larynx: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67: 1219-1224
29. Burkhardt A: Morphological assessment of malignant potential of epithelial hyperplastic lesions. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; Suppl 527: 12-16
30. Cör A, Gale N, Kambič V: Quantitative pathology of laryngeal epithelial hyperplastic lesions. *Acta Otolaryngol (Stockh)*1997; Suppl 527: 57-61
31. Colden D, Zeitels SM, Hillman RE, Jarboe J, Bunting G, Spanou K: Stroboscopic assessment of vocal fold keratosis and glottic cancer. *An Otol Rhinol Laryngol* 2001; 110: 293-8
32. Crissman JD: Laryngeal keratosis and subsequent carcinoma. *Head Neck Surg* 1979; 1: 386-91
33. Crissman JD, Visscher DW, Sarkar FH: Premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: biomarkers of genetic alterations, proliferation, and differentiation. *J Cell Biochem Suppl* 1993; 17F: 192-8
34. Crissman JD, Zarbo RJ: Dysplasia, in situ carcinoma, and progression to invasive squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg Pathol* 1989; 13 Suppl 1: 5-16
35. Čupič H, Krušlin B, Belicza M: Epithelial hyperplastic lesions of the larynx in biopsy specimens. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; Suppl 527: 103-104

36. Daniilidis J, Keramidas G, Petropoulos P: Histologische Befunde an der Kehlkopfschleimhaut bei gesunden Individuen. *Laryng. Rhinol. Otol.* 1983; 62: 38-43
37. Derout J, de Brux J, Leroux-Robert J: Circonstances d'apparition morphologique et potentiel évolutif des lésions précancéreuses du larynx. *J franc Oto-rhinolaryng* 1971; 20: 1057-1058
38. Dhingra JK, Perrault DF, McMillan K, Rebeiz EE, Kabani S, Manoharan R, Itzkan I, Feld MS, Shapshay SM: Early diagnosis of upper aerodigestive tract cancer by autofluorescence. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122: 1181-1186
39. Dhingra JK, Zang X, Mc Millian K, Kabani S, Manoharan R, Itzkan I; Feld MS, Shapshay SM: Diagnosis of Head and Neck Precancerous Lesions in an Animal Model Using Fluorescence Spectroscopy. *Laryngoscope* 1998; 108: 471-475
40. Dikkers FG, Nikkels P: Histopathology of benign vocal fold lesions. In: Kleinsasser et al.: *Advances in Laryngology in Europe.* Elsevier Verlag 1997
41. Dietz A: Epidemiology of the laryngeal cancer. *Laryngo Rhino Otol* 2004; 83: 771-772
42. Dreyer T: Die Kanzerisierung des Larynxepithels. *Habilitationsschrift, Pathologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2001*
43. Dreyer T, Glanz H: Laryngeale Epitheldysplasie vs. Laryngeale intraepitheliale Neoplasie. *Pathologe* 2004; 25: 9-13
44. Dreyer T, Popella C, Hinrichs B, Bohle RM, Pohlmann U, Schulz A, Glanz H: Grading of precancerous laryngeal lesions by multiparameter image analysis at separate epithelial layers. *J Pathol* 1995; 117: 385-393
45. Eckel HE, Raunik W, Rogatsch H: Laryngeale intraepitheliale Neoplasien. *Laryngorhinootologie* 2008; 87: 425-38
46. Feldmann H: *Bilder aus der Geschichte der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde.* S. 401, Median Verlag 2003
47. Ferlito A: The World Health Organisation's revised classification of tumours of the larynx, hypopharynx, and trachea. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993; 102: 666-669
48. Fleischer S, Hess M: Die Bedeutung der Stroboskopie in der laryngologischen

- Praxis. HNO 2006; 54: 628-634
49. Frangež I, Gale N, Luzar B: The Interpretation of Leukoplakia in Laryngeal Pathology. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; Suppl. 527: 142-144
 50. Franz B, Neumann OG: Leukoplakien des Kehlkopfes -Histologisch-zytologische Klassifizierung. *Laryng Rhinol* 1978; 57: 428-433
 51. Friedberg SA, Stagman R, Hass GM: Papillary lesions of the larynx in adults. A pathologic study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1971; 80 (5): 683-692
 52. Friedrich G, Kainz J, Friedl W: Zur funktionellen Struktur der menschlichen Stimmlippe. *Laryngo-Rhino-Otol.* 1993; 72: 215-224
 53. Fryen A, Glanz H, Lohmann W, Dreyer T, Bohle RM: Significance of Autofluorescence for the Optical Demarcation of Field Cancerisation in the upper Aerodigestive Tract. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 117: 316-319
 54. Gabriel CE, Jones DG: Hyperkeratosis of the larynx. *J Laryngol Otol* 1962; 76: 947-57
 55. Gale N, Michaels L, Luzar B, Poljak M, Zidar N, Fischinger J, Cardesa A: Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx. *Histopathology.* 2008 Aug.25 [Epub ahead of print]
 56. Garcia M: Observations on the Human Voice. *Proc Royal Soc London* 1855; 7: 399-410
 57. Gillenwater A, Jacob R, Ganeshappa R, Kemp B, El-Naggar AK, Palmer JL, Clayman G, Mitchell MF, Richards-Kortum R: Noninvasive Diagnosis of Oral Neoplasia Based on Fluorescence Spectroscopy and Native Tissue Autofluorescence. *Arch Otolaryngol Head Neck Surgery* 1998a; 124: 1251-1258
 58. Gillenwater A, Jacob R, Richards-Kortum R: Fluorescence spectroscopy: A technique with potential to improve the early detection of aerodigestive tract neoplasia. *Head Neck* 1998b; 20: 556-562
 59. Glanz H, Kimmich T, Eichhorn Th, Kleinsasser O: Behandlungsergebnisse bei 584 Kehlkopfcarcinomen an der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität Marburg. *HNO* 1989; 37: 1-10
 60. Glanz H, Schulz A, Kleinsasser O, Schulze W, Dreyer T, Arens C: Benign lesions

- of the larynx: basic clinical and histopathological data. In: Kleinsasser et al.: Advances in Laryngology in Europe. Elsevier Verlag 1997
61. Goodman ML: Keratosis (leukoplakia) of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am.* 1984; 17: 179-83
 62. Gottschalk W: Ein Messverfahren zur Bestimmung der optischen Parameter biologischer Gewebe in vitro. Inaugural Dissertation, 1993, Universität Karlsruhe, Karlsruhe
 63. Hellquist H, Lundgren J, Olofsson J: Hyperplasia, keratosis, dysplasia and carcinoma in situ of the vocal cords-a follow up study. *Clin Otolaryngol* 1982; 7:11-27
 64. Hellquist H, Olofsson J: Photometric evaluation of laryngeal epithelium exhibiting hyperplasia, keratosis and moderate dysplasia. *Acta Otolaryngol* 1981; 92: 157-165
 65. Hung J, Lam S, Leriche JC, Palcic B: Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue. *Lasers Med* 1991; 11: 99-105
 66. Isenberg JS, Crozier DL, Dailey SH: Institutional and comprehensive review of laryngeal leukoplakia. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2008; 117(1): 74-79
 67. Jackson C: Cancer of the larynx: is it preceded by a recognizable precancerous condition? *Ann. Surg* 1923; 77: 1-14
 68. Jelinek R: Die Ausbreitung des Platten- und Flimmerepithels im Kehlkopf. *Z Laryngol Rhinol Otol* 1966; 45: 1-5
 69. Kambič V: Difficulties in management of vocal cord precancerous lesions. *J Laryngol Otol* 1978; 92: 305-15
 70. Kambič V: Epithelial hyperplastic lesions-a challenging topic in laryngology. *Acta Otolaryngol Suppl* 1997; 527:7-11
 71. Kambič V, Gale N: Epithelial hyperplastic lesions of the larynx. Elsevier Verlag 1995
 72. Kambič V, Gale N: Significance of keratosis and dyskeratosis for classifying hyperplastic aberrations of laryngeal mucosa. *Am J Otolaryngol* 1986; 7: 323-33
 73. Kambič V, Gale N, Radšel: Die anatomischen Merkmale des Reinke-Raumes und

- die Ätio-Pathogenese des Reinke-Ödems. *Laryngo-Rhino-Otol* 1989; 68: 231-235
74. Kambič V, Lenart I: [Our classification of hyperplasia of the laryngeal epithelium from the prognostic point of view]. *J Fr Otorhinolaryngol Audiophonol Chir Maxillofac* 1971; 20: 1145-50
 75. Kilian G: *Die Schwebelaryngoskopie und ihre praktische Verwertung*. Urban & Schwarzenberg, Wien 1920
 76. Kimura M, Tayama N, Chan RW: Geometrical deformation of vocal fold tissues induced by formalin fixation. *Laryngoscope* 2003; 113: 607-613
 77. Kleinsasser O: Mikrolaryngoskopie und endolaryngeale Mikrochirurgie, Teil 1. Technische Entwicklung der Methode. *HNO* 1974a; 22: 33-38
 78. Kleinsasser O: Mikrolaryngoskopie und endolaryngeale Mikrochirurgie, Teil 2. Rückblick auf 2500 Fälle. *HNO* 1974b; 22: 69-83
 79. Kleinsasser O: Über den Krankheitsverlauf bei Epithelhyperplasien der Kehlkopfschleimhaut und die Entstehung von Karzinomen. *Z Laryngol Rhinol Otol* 1963; 8: 541-558
 80. Kleinsasser O: Über die verschiedenen Formen der Epithelhyperplasien im Kehlkopf und ihre Beziehung zum Carzinom. *Arch. Ohr- Nas- und Kehlk- Heilkunde* 1959; 174 : 275-292
 81. Kleinsasser O: Die Laryngomikroskopie (Lupenlaryngoskopie) und ihre Bedeutung für die Erkennung der Vorerkrankungen und Frühformen des Stimmlippen-carcinoms. *Arch Ohrenheilk* 1962; 180: 724-727
 82. Kleinsasser O: *Tumoren des Larynx und des Hypopharynx*. Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1987
 83. Kleinsasser O: Weitere technische Entwicklung und erste Ergebnisse der „endolaryngealen“ Mikrochirurgie. *Z Laryngol Rhinol* 1965; 44: 711-727
 84. Klestadt W: Beitrag zur Frage hyperkeratotischer und präcanceröser Bildungen im Kehlkopf. *Z Hals- Nas- u. Ohrenheilk* 1928; 19: 500-504
 85. Kolli VR, Savage HE, Yao TJ, Schantz SP: Native cellular fluorescence of neoplastic upper aerodigestive mucosa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121: 1287-1292

86. Kosoković F, Večerina S, Konić: Über einige Veränderungen an der Stimmlip-penschleimhaut und im Reinkeschen Raum. *Laryng. Rhinol.* 1976; 55: 91-95
87. Kraft M, Lüerssen K, Lubatschowski H, Glanz H, Arens C: Technique of optical coherence tomography of the larynx during microlaryngoscopy. 2007; 117(5): 950-952
88. Krebsatlas: Kapitel Kehlkopf (2003) Deutsches Krebsforschungszentrum-Internet: www.dkfz.de
89. Kruse E, Michaelis D, Zwirner P, Bender E: Stimmfunktionelle Qualitätssiche-rung in der kurativen Mikrochirurgie der Larynxmalignome – Postoperative Stimmrehabilitation auf Basis der „laryngealen Doppelventilfunftion“. *HNO* 1997; 45: 712-718
90. Lam S, MacAulay C, Hung J, LeRiche J, Profio AE, Palcic B: Detection of dys-plasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105: 1035-1040
91. Laniado K, Mann W, Metzner A: Untersuchungen zur Entstehung eines Karzi-noms aus einer Epitheldysplasie der Kehlkopfschleimhaut. *Laryng.-Rhinol.* 1981; 60: 571-572
92. Leonard JR, Beck WL: Hematoporphyrin fluorescence: an aid in diagnosis of ma-lignant neoplasms. *Laryngoscope* 1971; 81: 365-72
93. Leroux-Robert J, Poncet P: Dysplasia and cancers of the laryngeal mucosa. *Can J Otolaryngol* 1974; 3: 546-8
94. Lubsen H, Olde Kalter PH: Premalignant laryngeal lesions *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1992; 46: 117-26
95. Luckhaupt H: The history of laryngology in europe. In: Kleinsasser et al.: Ad-vances in laryngology in europe. Elsevier Verlag 1997
96. Luerßen K, Lubatschowski H, Ursinus K et al.: Charakterisierung von Stimmlip-pen mittels optischer Kohärenztomographie. *HNO* 2006; 54: 611-615
97. Macfarlane GJ, Zheng T, Marshall JR, Bofetta P: Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1995; 31B: 181-187

98. Maguire AJ: Leukoplakia laryngis: problems in management. *Canad J Otolaryngol* 1974; 3:70-73
99. Maier H, Fischer G, Sennewald E, Heller WD: Berufliche Risikofaktoren für Rachenkrebs. Ergebnisse der Heidelberger Rachenkrebsstudie. *HNO* 1994a; 42: 53-540
100. Maier H, Sennewald E, Heller GF, Weidauer H: Chronic alcohol consumption – the key risk factor for pharyngeal cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994b; 110: 168-173
101. Maier H, Tisch M: Epidemiology of laryngeal cancer. Results of the Heidelberg case-control study. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; Suppl 527: 160-164
102. Malzahn K, Dreyer T, Glanz H, Arens C: Autofluorescence Endoscopy in the Diagnosis of Early Laryngeal Cancer and Its Precursor Lesions. *Laryngoscope* 2002; 112: 488-493
103. Merletti F, Bofetta P, Ciccone G, Mashberg A, Terracini B: Role of tobacco and alcoholic beverages in the etiology of cancer of the oral cavity/oropharynx in Torino, Italy. *Cancer Res* 1989; 49: 4919-4924
104. Moreno-Lopez LA, Esparza-Gomez GC, Gonzales-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, Gonzales-Hernandez MJ, Dominguez-Rojas V: Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* 2000; 36: 170-9174
105. Mostafa BE, Shafik AG, Fawaz S: The role of flexible autofluorescence laryngoscopy in the diagnosis of malignant lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol.* 2007; 127(2):175-9
106. Münzel M, Meister P: Subepitheliale Veränderungen bei der einfachen leukoplakischen Hyperplasie der Kehlkopfschleimhaut. *Laryng. Rhinol.* 1976; 55: 96-99
107. Nawaka T (Hrsg.) et al.: Endoskopische Diagnostik und Therapie in der HNO Gustav Fischer Verlag 1997; 121-157
108. Neumann OG, Franz B: Leukoplakien des Kehlkopfes. *Laryng. Rhinol.* 1997; 56: 828-831
109. Norris CM, Peale AR: Keratosis of the larynx. *J Laryngol Otol* 1963; 77: 635-47

110. Olde Kalter P, Delemarre JFM, Alons CL, Meyer CJLM, Snow GB: The clinical relevance of classification of squamous cell hyperplasia of the larynx by morphometry. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1986; 101: 331-340
111. Olde Kalter P, Lubsen H, Delemarre JFM, Alons CL, Veldhuizen RW, Meyer CJLM, Snow GB: Quantitative morphometry of squamous cell hyperplasia of the larynx. *J Clin Pathol* 1985; 38: 489-495
112. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J: Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80: 827-841
113. Pastuszek P, Kręcicki T, Zalessa- Kręcicki M, Jeleń M, Rak J, Krajewska B: Histological and electron microscopic investigation of Reinke's edema. *Pol J Pathol* 2003; 54 (1): 61-64
114. Pschyrembel, 258. Auflage de Gruyter, Berlin, 1998
115. Putney FJ, O'Keefe JJ: The clinical significance of keratosis of the larynx as a premalignant lesion. *Trans Am Laryngol Rhinol Otol Soc* 1953; 74: 117-28
116. Quante M, Strauss P, Korte W, Edinger D: Verlaufsbeobachtung der Leukoplakie im Kehlkopf. *Laryngol Rhinol Otol* 1976; 55: 99-102
117. Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan A, Warren S, Thomsen S, Silva E, Richards-Kortum R: In vivo diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91: 10193-10197
118. Rauber Kopsch Band 2 Innere Organe, Hrsg. Leonhardt H. Thieme Verlag 1987
119. Resta L, Colucci GA, Troia M, Russo S, Vacca E, Pesce Delfino V: Laryngeal intraepithelial neoplasia (LIN). An analytical morphometric approach. *Pathol Res Pract* 1992; 188: 517-523
120. Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E: Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu Rev Phys Chem* 1996; 47: 555-606
121. Robbett WF: Premalignant changes in the vocal cord. *Laryngoscope* 1972; 82: 1007-1012
122. Rydell R, Eker C, Andersson-Engels S, Krogdahl A, Wahlberg P, Svanberg K: Fluorescence investigations to classify malignant laryngeal lesions in vivo. *Head*

- Neck 2008; 30 (4): 419-426
123. Sadri M, McMahon J, Parker A: Management of laryngeal dysplasia: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006; 263: 843-852
 124. Sauer G: Ein neues Photo-Laryngoskop. *Z Hals-, Nas- u. Ohrenheilk* 1936; 41: 187-189
 125. Schade G, Müller F: Hochgeschwindigkeitsglottographische Diagnostik in der Laryngologie. *HNO* 2005; 53: 1085-1091
 126. Shanmugaratnam K, Sobin LH: Histological typing of tumors of the upper respiratory tract and ear. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1991
 127. Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, Flotte TJ, Richter JM, Nishioka NS, Deutsch TF: Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential. *Laser Surg Med* 1992; 12 : 63-78
 128. Seiferth LB, Glanz H: Carcinoma in situ laryngis. *Klinik und Pathologie. Laryngol Rhinol Otol* 1971; 50: 827-854
 129. Stell PM, Gregory I, Watt J: Morphometry of the epithelial lining of the human larynx. *Clinical Otolaryngology* 1978; 3: 13-20
 130. Štiblar-Martinčič D: Histology of laryngeal mucosa. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; Suppl 527: 138-141
 131. Straßburg M, Knolle G: Farbatlas und Lehrbuch der Mundschleimhautrekrankungen. Quintessenz, Chicago-London-Berlin-Sao Paulo-Tokio 1991
 132. Stuckrad H, Lakatos I: Über ein neues Lupenlaryngoskop (Epipharyngoskop). *Laryng Rhinol* 1975; 54: 336-340
 133. Sugár J: Pathology of human precanceroses. Skin, larynx and breast. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 1976; 24: 401
 134. Tillmann B, Schünke M: Structure of the plica vocalis in the human. *Arch Otorhinolaryngol Suppl* 1989; 2: 11-8
 135. Van Gemert MJ, Jacques SL, Sterenborg HJ, Star WM: Skin optics. *IEEE Trans Biomed Eng* 1989; 36: 1146-54
 136. Vo-Dinh T, Panjehpour M, Overholt BF, Farris C, Buckley FP, Sneed R: In vivo

- cancer diagnosis of the oesophagus using differential normalized fluorescence (DNF) indices. *Laser Surg Med* 1995; 16: 41-47
137. Vodovnik A, Gale N, Kambič V, Luzar B: Correlation of histomorphological criteria used in different classifications of epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol (Stockh)*1997; Suppl 527: 116-119
 138. Wang TD, van Dam J, Crarford JM, Preisinger EA, Wang Y, Feld M: Fluorescence endoscopic imaging of human colonic adenomas. *Gastroenterology* 1996; 111: 1182-1191
 139. Ximenes Filho JA, Tsuji DH, do Nascimento PHS, Sennes LU: Histologic changes in human vocal folds correlated with aging: a histomorphometric study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003; 112: 894-898
 140. Zain RB, Ikeda N, Gupta PC, Warnakulasuriya S, van Wyk CW, Shrestha P, Axell T: Oral mucosa lesions associated with betel quid, areca nut and tobacco chewing habits: consensus from a workshop held in Kuala Lumpur, Malaysia, November 25-27, 1996. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 1-4
 141. Žargi M, Fajdiga I, Šmid L: Autofluorescence imaging in diagnostics of laryngeal cancer. *Arch Otorhinolaryngol* 2000; 257: 17-23
 142. Žargi M, Šmid L, Fajdiga I, Bubnič B, Lenarčič J, Oblak P: Laser induced fluorescence in diagnostics of laryngeal cancer. *Acta Otolaryngol* 1997; Suppl. 527: 125-127
 143. Zeitels S: Premalignant epithelium and microinvasive cancer of the vocal fold: The evolution of phonosurgical management. *Laryngoscope* 1995; 105: 1-47
 144. Zonios GI, Cothren RM, Arendt JT, Wu J, Van-Dam J, Crawford JM, Manoharan R, Feld MS: Morphological model of human colonic tissue fluorescence. *IEEE Trans Biomed Eng* 1996; 43: 113-122

7 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Cristoph Arens für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit, seine Anleitung und Anregung zum wissenschaftlichen Arbeiten, sowie für seine engagierte Unterstützung insbesondere bei der Auswertung der Operationsvideos im Autofluoreszenzlicht.

Ich danke Herrn Gerlach und seinem Team für ihre Geduld und ihr Verständnis während meiner Patientenaktenrecherche, und ihre Unterstützung bei der Organisation und Verwendung der OP-Kamera.

Den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie möchte ich für die Überlassung der histologischen Untersuchungsmaterialien herzlich danken.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Freundin Sandra Purz, die diese Arbeit mit pädagogischem Feingefühl mehrfach Korrektur gelesen hat.

Ohne die allgegenwärtige Unterstützung meiner Familie wäre diese Arbeit sicher nie zu Stande gekommen. Ich danke Euch!