

**Aus der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie  
des Universitätsklinikums Gießen**

**Direktorin: Frau Prof. Dr. med. H. Glanz**

# **Die Bedeutung der Autofluoreszenz in der Frühdiagnose des Larynxkarzinoms**

**Habilitationsschrift**

**zur Erlangung der Venia legendi**

**des Fachbereichs Humanmedizin**

**der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Dr. med. Christoph Arens**

**Gießen, Februar 2005**

*Meiner Frau Gabriele sowie  
meinen Kindern Maximilian und Luisa*

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>Seite</b>
Inhaltsverzeichnis	3
1. Einführung	5
1.1 Einleitung	5
1.2 Epidemiologie und Ätiologie des Larynxkarzinoms	6
1.3 Zielsetzung	8
2. Präkanzerosen	10
2.1 Terminologie der Präkanzerosen	10
2.2 Präkanzerosen und deren Klassifikation	11
2.3 Problematik des Präkanzerosebegriffs	13
3. Grundlagen der Kehlkopfanatomie und –histologie	13
4. Grundlagen der optischen Spektroskopie	16
4.1 Lichtabsorption	16
4.2 Fluoreszenz	18
4.3 Lichtstreuung	20
4.4 Eindringtiefe von Licht im Gewebe	20
5. Fluoreszenzdiagnostik	25
5.1 Photolumineszenz	25
5.2 Photodynamische Diagnostik	26
5.3 Relevante Fluorophore	27
6. Autofluoreszenzmikroskopie	30
6.1 Einleitung	30
6.2 Material und Methoden	31
6.3 Ergebnisse	33
6.4 Diskussion	40
7. Klinische Anwendung der Fluoreszenzdiagnostik	44
7.1 Untersuchungsverfahren	44
7.1.1 Indirekte Laryngoskopie	44
7.1.2 Mikrolaryngoskopie	44
7.2 Autofluoreszenzdiagnostik	46
7.2.1 Einleitung	46
7.2.2 Autofluoreszenzsystem	49
7.2.3 Material und Methoden	50

7.2.4	Laryngoskopische, mikrolaryngoskopische und pathohistologische Ergebnisse	51
7.2.5	Diskussion	58
7.3	Spektroskopische Fluoreszenzanalyse	63
7.3.1	Einleitung	63
7.3.2	Material und Methoden	64
7.3.3	Ergebnisse	66
7.3.4	Diskussion	70
7.4	Klinische Relevanz im Alltag	73
7.5	Methodenkritik	75
8.	Alternative und additive bildgebende Verfahren	77
8.1	Kompaktendoskopie	77
8.1.1	Einleitung	77
8.1.2	Material und Methoden	78
8.1.3	Ergebnisse	79
8.1.4	Diskussion	86
8.2	5-ALA induzierte Fluoreszenz	90
8.2.1	Einleitung	90
8.2.2	Material und Methoden	91
8.2.3	Ergebnisse	92
8.2.4	Diskussion	98
9.	Zusammenfassung	101
10.	Literatur	105
11.	Danksagung	114

# 1. Einführung

## 1.1 Einleitung

Erkrankungen, die ein chirurgisches Vorgehen erfordern, verlangen anders als viele internistisch betreute Leiden eine genaue Kenntnis von ihrer Ausbreitung. Dazu verhelfen immer weiter verbesserte, prä- und intraoperativ anwendbare diagnostische Verfahren. Sie machen ein differenzierteres chirurgisches Vorgehen möglich. Bei den präkanzerösen oder kanzerösen Schleimhautläsionen umfasst die Ausbreitungsdiagnostik die Erkennung der wahren Flächenausdehnung dieser Prozesse, die Wandinfiltrationstiefe sowie das Ausmaß lymphatischer und ggf. systemischer Metastasierung. Die Früherkennung und exakte Diagnose dieser malignen Veränderungen sind ausschlaggebend für den Therapieerfolg. Dies gilt im Kopf-Hals-Gebiet in besonderem Maße für Tumoren des Kehlkopfs. Nur so können radikale Operationen vermieden werden, die zu schweren Mutilationen mit äußerlich sichtbaren Defekten und zu erheblichen Funktionsverlusten führen.

Beim Larynxkarzinom sind die Heilungschancen günstig, wenn der Tumor frühzeitig behandelt werden kann <sup>Glanz et al, 1989; Kleinsasser, 1987; Večerina & Krajina, 1983</sup>. Auf der anderen Seite sind radikale chirurgische Maßnahmen bei fortgeschrittenen Karzinomen, wie die Laryngektomie, durch den Verlust der Stimme und durch die Anlage eines Tracheostoma mit starken Belastungen und Einschränkungen der Lebensqualität für den Patienten verbunden <sup>Dhooper, 1985; McQuellon & Hurt, 1997; Relic et al, 2001</sup>. Diese sind für die Patienten subjektiv größer als die Belastung durch andere Tumorerkrankungen mit schlechteren Heilungschancen <sup>DeSanto, 1994</sup>. Die Laryngektomie wird von jüngeren Patienten stärker als Verstümmelung empfunden, als von älteren Patienten <sup>Hammerlid et al, 2001</sup>.

Die Mehrheit laryngealer Tumoren sind Plattenepithelkarzinome, die in der Schleimhaut entstehen und zu 70-80% im Bereich der Stimmlippen lokalisiert sind. Das Leitsymptom des

Stimm lippenkarzinoms und seiner Vorstufen ist eine Stimmstörung, die von den meisten Patienten frühzeitig bemerkt wird. Bei supraglottischen Karzinomen hingegen treten die Symptome erst spät auf. Uncharakteristische Schluckstörungen, Globusgefühl und Schmerzen beim Sprechen sind die Symptome, der dann meist schon fortgeschrittenen Tumoren.

Die Verbesserung klinisch diagnostischer Maßnahmen und chirurgischer Techniken durch die Entwicklung der Laryngoskopie, deren Anfänge in das 19. Jahrhundert datiert werden <sup>Babington, 1829; Garcia, 1855</sup> und später der Mikrolaryngoskopie und Mikrochirurgie <sup>Kleinsasser, 1962</sup> haben dazu geführt, dass der Laryngologe nicht nur Fortschritte in der Diagnostik von bereits manifesten Karzinomen, sondern auch in der Diagnostik von präkanzerösen Schleimhautveränderungen macht, die eine frühzeitige Erkennung und exakte präoperative Diagnostik für eine kurative und funktionserhaltende Therapie ermöglichen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden in den letzten Jahrzehnten Verbesserungen nicht nur auf dem Gebiet der kurativen, sondern auch der präventiven Medizin erzielt. Zusätzlich zum Verzicht auf Karzinome und Kokarzinogene wie Tabakrauch und Alkohol durch die Patienten sind Früherkennungsuntersuchungen sinnvoll. Eine dadurch verbesserte Diagnostik von präkanzerösen oder kanzerösen Schleimhautläsionen, im Idealfall sogar im Rahmen von Screeninguntersuchungen, würde die Behandlungsmöglichkeiten schon in einem deutlich früheren Tumorstadium ermöglichen <sup>Harries et al, 1995</sup>.

## **1.2 Epidemiologie und Ätiologie des Larynxkarzinoms**

In der Bundesrepublik Deutschland stellen maligne Erkrankungen nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar <sup>Straßburg et al, 1991</sup>. Bei einer leicht rückläufigen Tendenz der altersbereinigten Krebssterblichkeit stirbt jedoch noch immer jeder 4. in Deutschland an Krebs und jeder 3. an der Folgen einer Herz-Kreislaufkrankung

<sup>Becker & Wahrendorf, 1997</sup>

Plattenepithelkarzinome der Schleimhäute des oberen Aerodigestivtrakts stehen mit einer weltweiten Inzidenz von über 500.000 Fällen pro Jahr an sechster Stelle aller malignen Neubildungen bei Menschen <sup>Parkin et al, 1999</sup>. In der Bundesrepublik Deutschland treten pro Jahr schätzungsweise 15.000 Neuerkrankungen auf, wovon rund 6.500 zum Tode des betroffenen Patienten führen <sup>Becker & Wahrendorf, 1997</sup>. 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 <sup>Burch et al, 1981; Macfarlane et al, 1995; Maier et al 1994b; Merletti et al, 1989</sup>. Daneben sind eine mangelnde Mundhygiene <sup>Moreno-Lopez et al, 2000</sup>, berufliche Expositionen <sup>Maier et al, 1994a</sup> sowie – besonders auf dem asiatischen Kontinent – der Genuss von Kautabak und Betelnuss ebenfalls von Bedeutung <sup>Zain et al, 1999</sup>.

Plattenepithelkarzinome des Kehlkopfs stellen mit einem Anteil von knapp 30% das häufigste Malignom im Kopf-Hals-Bereich dar. Das Larynxkarzinom ist in Europa das häufigste Karzinom des oberen Aerodigestivtraktes <sup>Maier et al, 1997</sup>. In der ehemaligen DDR lag die Neuerkrankungsrate bei 548 Fällen pro Jahr. Das sind etwa 1% der Neuerkrankungsrate aller malignen Tumoren im gleichen Zeitraum nach Kleinsasser (1987). Diese Angaben blieben bis 1989 weitgehend unverändert und decken sich mit den Häufigkeitsangaben aus alten Obduktionsstatistiken <sup>Köhn, 1969</sup>. Die Inzidenz von Larynxkarzinomen wird in einer neueren finnischen Studie mit 4,4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner / Jahr angegeben <sup>Raitiola et al, 1997</sup>. Die Arbeitsgemeinschaft Chirurgische Onkologie (ACO) gibt die Inzidenz des Larynxkarzinoms für Österreich mit 30-40% der Neoplasien im Kopf- Halsbereich an <sup>Jakse et al, 2001</sup>.

Die vom Robert-Koch-Institut 1999 veröffentlichten Zahlen zur Epidemiologie des Larynxkarzinoms bestätigen bei der Ermittlung der Altersverteilung mit einem Durchschnittswert von 61 Jahren die an unserem Krankengut ermittelte Altersverteilung. Vereinzelt wurden Larynxkarzinome allerdings auch bei Kindern beobachtet <sup>Kleinsasser, 1987</sup>. Der jüngste Patient mit einem Larynxkarzinom war bei eigener Beobachtung 16 Jahre alt. Das Verhältnis der Geschlechterverteilung (m/w) entspricht mit 11,5 in etwa den bisherigen Statistiken von Schön et al., der ein Geschlechterverhältnis von 12,4 ermittelte <sup>Schön, 1999</sup>.

Der Kehlkopfkrebs gehört zu denjenigen Tumorarten, die erfolgreich therapierbar sein 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 sogar mit 75,8% (West) und 66,4% (Ost) <sup>Krebsatlas, 2003</sup>.

Auf die Stimmlippen begrenzte Karzinome weisen mit rund 80% die höchsten 5-Jahres-Überlebensraten von allen Stadien auf, gefolgt von den supraglottischen mit knapp 70%. Patienten mit Oro- und Hypopharynxkarzinomen hingegen haben lediglich ein 5-Jahresüberleben von 25% beziehungsweise 20% leben <sup>Grau et al, 1997</sup>.

### **1.3. Zielsetzung**

Die heutige Standardmethode der Tumorerkennung ist die Inspektion des Kehlkopfs durch eine indirekte Laryngoskopie im Rahmen der primären endoskopischen Untersuchung <sup>Stuckrad & Lakatos, 1975</sup>. Der Erfolg einer chirurgischen oder auch strahlentherapeutischen Behandlung von laryngealen Tumoren ist im wesentlichen davon abhängig, ob alle entarteten Gewebebezirke erkannt werden. Der Operateur muss sich dabei in erster Linie auf sein geschultes Auge verlassen, bzw. das Ausmaß des Eingriffes durch Schnellschnitte von einem Pathologen absichern lassen.

In den letzten Jahren wurden ergänzende bildgebende Verfahren in die Endoskopie des Larynxkarzinoms eingeführt, um die prä- und intraoperative Diagnostik zu verbessern.

Neben der Kontaktendoskopie und dem Hochfrequenzultraschall steht die Fluoreszenzdiagnostik dem Laryngologen als zusätzliches endoskopisches bildgebendes Verfahren zur verfeinerten Erkennung von dysplastischen oder kanzerösem Gewebe zur Verfügung <sup>Arens et al, 1999a & 1999b</sup>. Für die Beurteilung der Flächenausdehnung ist die Fluoreszenzdiagnostik gut geeignet, da sie im Gegensatz zu röntgenologischen und nuklearmedizinischen Verfahren problemlos jederzeit im Rahmen einer endoskopischen Untersuchung anwendbar ist und gegenüber morphologischen Verfahren wie der Sonographie eine potentiell hohe Sensitivität für die Detektion kleinster Tumorzellgruppierungen aufweist <sup>Moesta et al, 2003</sup>. Die Fluoreszenzdiagnostik macht sich die Eigenschaft gewisser Fluorophore zunutze, Licht zu absorbieren und teilweise als Fluoreszenzlicht wieder abzustrahlen. Die Frühstadien der Tumoren können hierdurch besser wahrgenommen und Tumorränder in ihrer Ausdehnung richtig beurteilt werden.

In der vorliegenden Arbeit soll die Autofluoreszenzdiagnostik bezüglich ihrer Phänomene und klinischen Anwendung beim Larynxkarzinom und seinen dysplastischen Vorstufen näher untersucht werden.

## **2. Präkanzerosen**

### **2.1. Terminologie der Präkanzerosen**

Unter einer Präkanzerose versteht man morphologisch verändertes Gewebe, in dem sich häufiger als in normalem Vergleichsgewebe Krebs entwickelt <sup>Shanmugaratnam & Sobin, WHO, 1991</sup>, wobei eine solche Veränderung nicht entfernt, sondern beobachtet wird.

Laut einer weiteren WHO-Definition ist die Leukoplakie ein weißer, nicht wegwischarer Fleck der Schleimhaut, der keiner anderen Krankheit zugeordnet werden kann. Der Begriff Leukoplakie ist eine rein klinische Bezeichnung. Die Abwesenheit jeglicher histologisch spezifischer Bedeutung der Leukoplakie ist wichtig, weil diese Schleimhautveränderung histopathologisch von einer einfachen epithelialen Hyperplasie bis hin zum invasiven Plattenepithelkarzinom reichen kann.

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 verhornendem mehrschichtigen Plattenepithel besteht. Der komplette Ersatz des Zytoplasmas der oberflächlichen Epithelzellen durch Keratinfilamente und die Auflösung der Zellkerne führt zur Ausbildung der Keratinschicht. Ebenso ist die Dysplasie ein rein histopathologischer Begriff der sich an dem Grad der zellulären Proliferation und den epithelialen Alterationen, die zelluläre und nukleäre Veränderungen einschließen, orientiert. Weiterhin spielt die Dicke der Schleimhaut eine wichtige Rolle, die mehr oder weniger Abweichungen von der normalen Schichtung zeigen kann.

## 2.2. Präkanzerosen und deren 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 <sup>Benjamins, 1928; Broders, 1932; Klestadt, 1928</sup>.

Am Kehlkopf wurden systematische Untersuchungen von Präkanzerosen mit Einführung der Mikrolaryngoskopie möglich. Mit dieser Operation können Schleimhautveränderungen frühzeitig und sehr gewebeschonend reseziert werden <sup>Kleinsasser, 1963</sup>. Kleinsasser hat ein Gradingssystem entwickelt, das im Gegensatz zu dem System der WHO <sup>Schanmugaratnam & Sobin, 1991</sup> nur drei statt vier Schweregrade (Dysplasie Grad I, II, III und Carcinoma in situ) unterscheidet.

Nach Kleinsasser wird die einfache Epitheldysplasie überwiegend als gutartige Epithelveränderung gewertet, die im Rahmen von Entzündungen oder reaktiven Veränderungen beobachtet werden. Die schwere Epitheldysplasie sowie das Carcinoma in situ werden zu einer Gruppe zusammengefasst. Hierbei tritt ein Verlust der normalen Schichtung und zellulären Differenzierung auf. Es sind parabasal vermehrt Mitosen sowie atypische Mitosen nachweisbar. Als mittelgradige Dysplasien werden Veränderungen zusammengefasst, deren Erscheinungsbild zwischen der einfachen Epitheldysplasie und dem Carcinoma in situ eingeordnet werden können. Mittelgradige Dysplasien stuft Kleinsasser als fakultative Präkanzerosen ein. Da gezeigt werden konnte, dass sich schwere Epitheldysplasien klinisch ähnlich verhalten wie Carcinomata in situ <sup>Crissmann et al, 1989; Hellquist et al, 1982</sup>, wurden ähnliche dreistufige Klassifikationssysteme auch von anderen Untersuchern verwendet <sup>Antonelli et al, 1991; Resta et al, 1992</sup>.

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

der Dysplasiegrade hängt teilweise sowohl vom jeweiligen Untersucher und dessen Erfahrung als auch vom verwendeten Klassifikationssystem ab und ist damit partiell subjektiv. Aufgrund dieser Problematik gibt es derzeit vielfältige Bemühungen objektive Zuordnungskriterien zu entwickeln <sup>Dreyer & Glanz, 2004</sup>.

### **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 Patienten starben 32% am Tumor. 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 kann man noch einen biologischen Endpunkt (z.B. maligne Transformation, spontane Rückbildung) sehen <sup>Dreyer & Glanz, 2004</sup>. Größere prospektiv angelegte Verlaufsstudien, die für die Evaluation neuer klinischer und histopathologischer Prognoseparameter wichtig wären, sind somit aus ethischen Gründen nicht mehr durchführbar <sup>Kleinsasser, 1987</sup>. 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 Verbindung gebracht wurde <sup>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</sup>. Eine solche Beobachtung könnte Hinweise auf ein präkanzeröses Potential liefern, wenn der Übergang in eine höhergradige Dysplasie vorliegt <sup>Dreyer, 2001</sup>.

### **3. Grundlagen der Kehlkopfanatomie und -histologie**

Der Kehlkopf stellt ein doppeltes Sphinktersystem dar. Er umgibt den Abgang der Atemwege vom Oro-Hypopharynx und bildet mit der Glottis und den Taschenfalten den funktionell wichtigen Verschluss des Eingangs in die Luftröhre. Die Bewegungen des Kehlkopfes nehmen Einfluss auf die Phonation und Atmung. Aufbauend auf dem primären Sphinkter entwickelte sich später die Phonation als weitere Funktion des Kehlkopfes.

Die Sphinktersysteme werden physiologisch bei allen Körperaktivitäten genutzt, die einen Atmungsstopp benötigen. Aufgrund der unterschiedlichen anatomischen Ausrichtung und der funktionellen Kopplung von Atmungs- und Körperhaltungsmuskulatur bilden die Stimmlippen hierbei ein Einatmungsventil, die Taschenfalten in funktioneller Kopplung mit der ary-epiglottischen Region ein Ausatemungsventil <sup>Kruse, 1997</sup>.

Der Kehlkopf ist etwa 4-7 cm lang und besteht aus einem Gerüst von Knorpeln, die durch die Kehlkopfmuskeln gegeneinander bewegt werden können. Der Knorpel in der Larynxwand verhindert das Kollabieren des Atemweges in diesem Abschnitt.

Die das Kehlkopfinnere auskleidende Schleimhaut ist mit Ausnahme des von Plattenepithel bedeckten Anteiles 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 muskularis mucosae fehlt, ist eine scharfe Trennung zwischen Tunica mucosa und submucosa nur schwer durchzuführen. Unter der Mukosa des Kehlkopfeinganges liegt eine dünne Schicht elastischer Fasern, die bis in die Taschenfalten hineinreichen. 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 Mukosa und Submukosa.

Der größte Teil des Kehlkopfinnenen wird von 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. Das Vorkommen von Plattenepithel im Respirationstrakt wird vielfach mit einer erhöhten mechanischen Beanspruchung in Zusammenhang gebracht und als funktionelle Metaplasie bezeichnet. 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, Stratum spinosum und Stratum superficiale. 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 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  $\mu\text{m}$  <sup>Jelinek, 1966</sup>. Stell beschrieb Epitheldicken von Leichenkehlköpfen zwischen 400 – 500  $\mu\text{m}$  bei Männern und 300 - 400  $\mu\text{m}$  bei Frauen.

Über den Stimmlippen zeigt sich eine fusiforme Veränderung der Epitheldicke. Die Epitheldicke im Zentrum der Stimmlippe ist größer im Vergleich zur vorderen Kommissur oder dem Processus vocalis <sup>Stell, 1978</sup>.

Die Zellen des mehrreihigen Flimmerepithels haben in der obersten Schicht einen gut ausgebildeten Zilienbesatz. Der Übergang von mehrschichtigem Plattenepithel in das

mehrrichtige Flimmerepithel kann sich durch 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 als auch 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 Keratohyalin granula in Beziehung <sup>Behrendes, 1982</sup>.

## 4. Grundlagen der optischen Spektroskopie

Zunächst sollen die physikalischen Grundlagen, die der Arbeit zugrunde liegen, besprochen werden. Die Untersuchung von elektromagnetischen Wellen ist der wesentliche Bestandteil der Spektroskopie. Man untersucht die Wechselwirkungen von elektromagnetischer Strahlung bzw. Wellen mit Materie. Die Spektroskopie beruht darauf, dass jedes chemische Element sein eigenes charakteristisches Spektrum besitzt. Diese Tatsache wurde 1859 von Gustav Robert Kirchhoff und Robert Wilhelm Bunsen erkannt.

### 4.1 Lichtabsorption

Das elektromagnetische Spektrum von ultraviolettem und sichtbarem Licht umfasst den Wellenbereich von etwa 180nm bis 800nm. Der Zusammenhang zwischen Lichtwellenlänge  $\lambda$  und Energie wird beschrieben durch

$$E = h \cdot \nu$$

$$E = h \frac{c}{\lambda}$$

$$E = h \cdot c \cdot \tilde{\nu}$$

$c$	=	Lichtgeschwindigkeit $\approx 2.9988 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$
$h$	=	Planck'sches Wirkungsquantum = $6.626 \cdot 10^{-32} \text{ Js}$
$\lambda$	=	Wellenlänge des Lichtes [nm]
$\nu$	=	Frequenz des Lichtes [ $\text{s}^{-1}$ ]
$\tilde{\nu}$	=	Wellenzahl = $\lambda^{-1} [\text{cm}^{-1}]$

Licht kann nur absorbiert werden, wenn seine Quantenenergie  $E = h\nu$  gerade so groß ist wie die Energiedifferenz

$$\Delta E = E_1 - E_2 = h\nu$$

zwischen zwei Energieniveaus des absorbierenden Materials.

Sie setzt sich zusammen aus der Elektronenenergie, der Schwingungs- und der Rotationsenergie

$$\Delta E = E_{el} + E_{vib} + E_{rot}$$

- $E_{el}$  = Elektronenenergie  
 $E_{vib}$  = Schwingungsenergie  
 $E_{rot}$  = Rotationsenergie des Moleküls

Der Anteil des Lichtes, der durch Materie absorbiert wird, kann mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz beschrieben werden:

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

- $\epsilon$  = Molarer Extinktionskoeffizient [ $M^{-1} cm^{-1}$ ],  
 $c$  = Konzentration des absorbierenden Substanz [M],  
 $l$  = Länge der absorbierenden Schicht [cm].

Es gilt in dieser Form für Lösungen, bei denen die gelösten Moleküle nicht miteinander in Wechselwirkung treten.

Eine häufige Darstellung der Übergänge in einem Molekül, sowohl bei Lichtabsorption als auch bei Lichtemission, bedient sich des so genannten Jablonski-Diagramms (Abbildung 4.2). Bei der Absorption von Licht geht ein Molekül von seinem Grundzustand  $S_0$  in einen angeregten Singulettzustand  $S_1, S_2, \dots$  über.

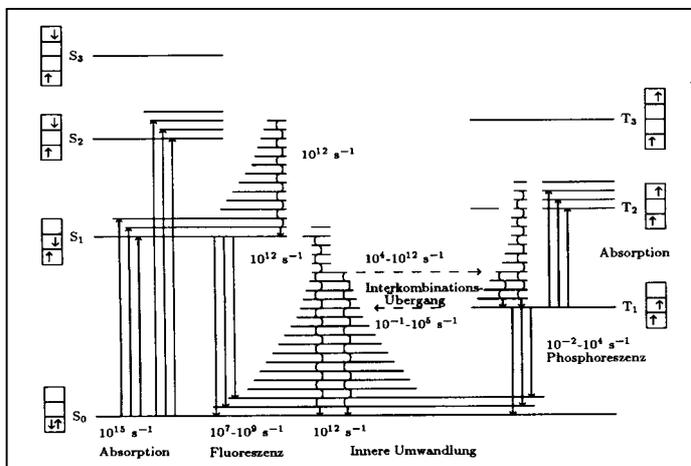


Abbildung 4.1.1: Energiediagramm mit absorbierendem und desaktivierenden Übergängen (Jablonski-Diagramm) und entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten. Der Spinzustand in den verschiedenen Energieniveaus ist symbolhaft durch Pfeile gekennzeichnet  
 Blume, 1976

## 4.2 Fluoreszenz

Fluoreszenz ist eine Bezeichnung für eine bestimmte Art von Lumineszenz. Bei der Fluoreszenz handelt es sich um ein Leuchtphänomen, das sich bei verschiedenen Stoffen nach Lichteinwirkung beobachten lässt. Der Name „Fluoreszenz“ stammt von dem Mineral Fluorit, an dem diese Erscheinung erstmals festgestellt wurde. Unmittelbar nach Anregung durch Licht-, Röntgen- oder Elektronenstrahlen geben die entsprechenden Stoffe die absorbierte Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung wieder ab.

Fluoreszenz eines Moleküls kann auftreten, wenn sich das Molekül nach Lichtabsorption in einem angeregten Singulettzustand befindet, aus dem es wieder in den Grundzustand  $S_0$  relaxiert. Der Übergang vom untersten Schwingungsniveau des ersten angeregten Singulettzustandes  $S_1$  zu einem der Schwingungsniveaus des Grundzustandes  $S_0$  kann mit Lichtemission, der Fluoreszenz, verbunden sein. Wie bei Absorptionsspektren können auch bei Fluoreszenzspektren Schwingungsbanden erkennbar sein.

Da die Fluoreszenz durch den Energieübergang vom untersten Schwingungsniveau des  $S_1$ -Zustandes in die Schwingungsniveaus des Grundzustandes  $S_0$  hervorgerufen wird, bei der Absorption hingegen das Molekül aus dem untersten Schwingungsniveau des  $S_0$ -Zustandes in die Schwingungsniveaus der Zustände  $S_1, S_2, \dots$  überführt wird, findet man eine Überlappung von Absorptions- und Fluoreszenzspektrum. Den Übergang zwischen den untersten Schwingungsniveaus von  $S_1$  und  $S_0$  findet man also in beiden Spektren. Die übrigen Übergänge sind im Fluoreszenzspektrum zum Absorptionsspektrum rot verschoben. Häufig liegt eine Spiegelbildsymmetrie des Fluoreszenzspektrums zur langwelligsten Absorptionsbande vor. Lösungsmittel beeinflussen den Grad der Überlappung von Absorptions- und Fluoreszenzspektrum. Sie kann sogar vollständig verloren gehen. Das Fluoreszenzspektrum ist wie das Absorptionsspektrum charakteristisch für eine Substanz. Es ist sehr empfindlich messbar.

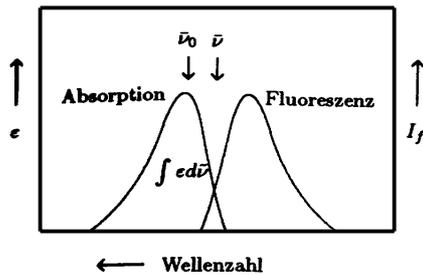


Abbildung 4.2.1: Spiegelbildsymmetrie zwischen Absorption und Fluoreszenz: linke Ordinate: molarer Extinktionskoeffizient, rechte Ordinate: normierte Fluoreszenzintensität,  $\tilde{\nu}_0$ : Wellenzahl des Absorptionsmaximums,  $\tilde{\nu}$ : Wellenzahl des Umkehrpunktes der Symmetrie,  $\int \epsilon d\tilde{\nu}$ : integrale Absorption <sup>Blume, 1976</sup>.

Die Intensität der Fluoreszenz  $I_F$ , die in alle Richtungen emittiert wird, hängt von der absorbierten Lichtintensität und der Quantenausbeute  $\phi_F$  ab, mit der die absorbierte Energie als Fluoreszenzlicht emittiert wird..

$$I_F = I_0[1 - 10^{-\epsilon \delta}] \phi_F$$

Wobei die Quantenausbeute  $\phi_F$  definiert ist als

$$\phi_F = \frac{\text{Zahl der emittierten Quanten}}{\text{Zahl der absorbierten Quanten}}$$

Durch Moleküle in der Nachbarschaft kann die Fluoreszenzintensität weiter reduziert werden. Das kann dadurch geschehen, dass mehr Energie strahlungslos verloren geht, wenn Nachbarmoleküle als Quencher wirken. Es kann aber auch passieren, dass unter gewissen Voraussetzungen die Energie aus dem absorbierenden Molekül an andere Moleküle der Nachbarschaft weitergeleitet wird.

Von den verschiedenen Energieübertragungsmechanismen sollen hier nur zwei erwähnt werden, von denen die Resonanzenergieübertragung (Förster-Mechanismus) in biologischen Systemen am häufigsten auftritt.

Die Resonanzenergieübertragung (Förster-Mechanismus) tritt auf, wenn sich das Emissionsspektrum des angeregten Moleküls mit dem Absorptionsspektrum eines Nachbarmoleküls, das selbst 50 – 100 Å entfernt sein kann, überlappt. Dieser Sachverhalt liegt in biologischen Systemen häufig vor <sup>Förster, 1968</sup>.

Ferner kann direkt zwischen benachbarten Molekülen eine sogenannte Austauschwechselwirkung stattfinden, wodurch auch die Energie des angeregten Moleküls auf seine Nachbarschaft übertragen wird.

Es ist also im allgemeinen in biologischen Systemen nicht davon auszugehen, dass die beobachtete Fluoreszenz auch tatsächlich von dem Molekül stammt, das ursprünglich Licht absorbiert hat.

### **4.3 Lichtstreuung**

Lichtabsorption eines Moleküls mit anschließender Fluoreszenzemission kann nur dann auftreten, wenn die Energie der Strahlung mit angeregten Energieniveaus übereinstimmt. Ist die Frequenz  $\nu_0$  des eingestrahlten Lichtes jedoch davon verschieden, so treten die verschiedenen Streueffekte auf. Man unterscheidet bei kleinen Streuzentren (kleiner als etwa  $\lambda / 20$ ) zwischen der elastischen Streuung (Rayleighstreuung) und inelastischer Streuung (Ramanstreuung). Bei größeren streuenden Teilchen treten Interferenzen des gestreuten Lichtes auf und die Verhältnisse werden komplizierter. Jedenfalls tritt eine starke Abhängigkeit des streuenden Lichtes von seiner Wellenlänge auf. Blaues Licht streut erheblich stärker als rotes, kann also auch nicht so tief ins Gewebe eindringen. Wenn die Streuzentren größer als die Wellenlänge werden, tritt Mie-Streuung auf.

### **4.4 Eindringtiefe von Licht im Gewebe**

Grundvoraussetzung für einen erfolgreichen Einsatz der Autofluoreszenzdiagnostik ist eine genaue Kenntnis der physikalischen Prozesse bei der Wechselwirkung des applizierten Lichtes mit dem biologischen Gewebe. Dies wiederum setzt die Kenntnis der optischen Eigenschaften des zu bestrahlenden Gewebes voraus. Diese bestimmen die Verteilung der Photonen im bestrahlten Areal und damit wesentlich die Art und die Lokalisation der Wechselwirkungen von Licht mit Zellen und Geweben. Beim Auftreffen der Strahlung auf die

Gewebeoberfläche wird ein geringer Teil der Photonen reflektiert. Die in das Gewebe eindringenden Photonen unterliegen Absorptions- und Streuprozessen.

Ein größerer Anteil davon kann das Gewebe infolge multipler Streueignisse auf der Einstrahlseite als Remissionsstrahlung wieder verlassen. Dieses zurückgestrahlte Licht kann für diagnostische Zwecke genutzt werden.

Die wesentlichen optischen Eigenschaften von Geweben lassen sich mit den Parametern Brechungsindex  $n$ , Absorptionskoeffizient  $\mu_a$ , Streukoeffizient  $\mu_s$  und Anisotropie-Faktor  $g$  der Streuung beschreiben.

Die lokalen Brechzahlunterschiede verursachen die Lichtstreuung, der Brechzahlunterschied zwischen Luft und Stratum superficiale oder corneum die direkte Reflexion und Brechung des einfallenden Strahls sowie die Totalreflexion der zurückgestreuten Strahlung im Gewebe. Die Brechzahl ist wellenlängenabhängig.

Das Absorptionsverhalten des Gewebes kann durch den Parameter Absorptionskoeffizient  $\mu_a$  beschrieben werden. Der Parameter hat die reziproke Längeneinheit  $\text{cm}^{-1}$  und gibt die mittlere Anzahl der Absorptionsereignisse pro cm Wegstrecke an. Die Wellenlängenabhängigkeit des Absorptionskoeffizienten wird durch das Absorptionsspektrum beschrieben. Biologische Gewebe bestehen überwiegend (je nach Typ bis zu 80 %) aus Wasser. Der Absorptionskoeffizient von Wasser hat daher eine wichtige Bedeutung für die Licht-Gewebe Wechselwirkung. Während Wasser im ultravioletten Bereich (UV)  $< 230 \text{ nm}$  und im infraroten Bereich (IR) mit Absorptionskoeffizienten  $> 100 \text{ cm}^{-1}$  gut absorbiert, gilt es im Bereich des sichtbaren Lichtes als transparent. Im mittleren und fernen infraroten Spektralbereich dominiert die Wasserabsorption im biologischen Gewebe. Im ultravioletten und teilweise im sichtbaren Spektralbereich überwiegt dagegen die Absorption von endogenen Fluorophoren.

Das Absorptionsverhalten von Blut wird durch die Hauptabsorptionsbande des Hämoglobins bei 400 nm (Soretbande) mit  $\mu_a \approx 1000 \text{ cm}^{-1}$  und zwei weiteren Banden ( $\mu_a \approx 200 \text{ cm}^{-1}$ ) im grüngelben Spektralbereich bestimmt. Weniger dominante Absorber im sichtbaren Bereich sind die Flavin-Coenzyme, das Lipid enthaltende Pigment Lipofuszin und Keratin.

Aufgrund physikalischer Prozesse wie Absorption und Streuung ist die Eindringtiefe von Licht in Geweben begrenzt. Gewebe besteht aus vielen unterschiedlichen Strukturelementen, die eine starke Anisotropie der optischen Eigenschaften von Geweben verursachen. Ein wesentliches Merkmal der optischen Eigenschaften von Gewebe ist, dass die Eindringtiefe signifikant von der Wellenlänge des verwendeten Lichts abhängt. Zum einen liegt das an den verschiedenen Substanzen im Gewebe, die Licht bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren und somit das Licht daran hindern, in größere Tiefen vorzudringen. Im wesentlichen sind dies Proteine (UV), Hämoglobin (UV, sichtbares Licht) und Melanin (UV, sichtbares Licht, NIR). Zum anderen wird Licht, von der Oberfläche kommend, an verschiedenen Bestandteilen (Zellen, Zellorganellen, Kollagen etc.) mehrfach gestreut, d.h. in verschiedene Richtungen vom ursprünglichen Weg in die Tiefe des Gewebes abgelenkt. Diese Ablenkung vom Weg kann mehrfach stattfinden und verlängert so die zurückgelegte Wegstrecke der Photonen gegenüber der Situation einer geradlinigen Ausbreitung. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Absorption des Lichts in den Fluorophoren des Gewebes oder des anwesenden Photosensitizers bereits in obersten Gewebeschichten deutlich

van Gemert et al, 1989

Das Streuverhalten von Gewebe wird durch Inhomogenitäten in Geweben und Zellen bestimmt und kann durch den Streukoeffizienten  $\mu_s$  und den g-Faktor charakterisiert werden. Zusätzlich nimmt die Streuung von Licht im Gewebe je nach Größe des Streuobjekts mehr oder weniger deutlich mit der Wellenlänge ab (Rayleigh-Gesetz, Mie-Streuung). Damit reduziert sich auch die Wechselwirkung von Licht mit absorbierenden Fluorophoren, was eine Zunahme der Eindringtiefe von Licht im Gewebe zur Folge hat <sup>Vargas, 2001</sup>.

Strukturen mit Dimensionen größer oder gleich der eingestrahnten Wellenlänge, wie z.B. Zellen (10-30  $\mu\text{m}$ ), Zellkerne (3-10  $\mu\text{m}$ ), Mitochondrien (1-3  $\mu\text{m}$ ) verursachen eine Mie-Streuung. Strukturen mit Dimensionen kleiner als die Wellenlänge, wie z.B. Kollagenfibrillen, supramolekulare Aggregate und Membranen, induzieren dagegen eine Rayleigh-Streuung. Bei Strukturen kleiner als etwa 1/20 der Wellenlänge liegt eine isotrope (gleichmässige) Verteilung vor, d.h. das Photon hat bereits nach einem Streueignis die Information über die ursprüngliche "Orientierung" verloren ("orientierungslos") und schlägt eine beliebige Richtung ein. Dagegen erfolgt bei der Mie-Streuung hauptsächlich eine Vorwärtsstreuung. Der Anisotropie-Faktor  $g$  kann Werte zwischen -1 (totale Rückstreuung) und 1 (totale Vorwärts-Streuung bzw.  $0^\circ$  Ablenkungswinkel) annehmen. Der Wert  $g = 0$  reflektiert den Fall isotroper Streuverteilung. Die Schleimhaut ist, wie die meisten Gewebe, ein stark vorwärts streuendes Medium. Das Photon behält zunächst die Information über die "Orientierung" und wird erst nach etwa  $1/(1-g)$  Streueignissen (im roten Bereich ca. 10), die Information über die ursprüngliche Richtung verloren haben ("Gedächtnisverlust") und eine Zufallsrichtung einschlagen.

Der Streukoeffizient  $\mu_s$  (typischerweise  $10\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ) nimmt im sichtbaren Bereich typischerweise höhere Werte als  $\mu_a$  an. Das bedeutet, Streueignisse sind wahrscheinlicher als Absorptionen und es liegt der Fall der Vielfachstreuung vor. Der reziproke Wert  $1/\mu_s$  entspricht derjenigen Wegstrecke ("mittlerer freier Weg"), bei dem nur noch  $1/e = 0.37 = 37\%$  der Photonen ohne Richtungswechsel, d.h. ungestreut (ballistische Photonen), vorhanden sind. Der mittlere freie Weg würde für 650 nm Photonen im verhornenden Plattenepithel typischerweise  $1/\mu_s = 55\text{ }\mu\text{m}$  betragen, für 337 nm Photonen dagegen nur 10  $\mu\text{m}$ . Das optische Fenster von Zellen und Gewebe (600 nm - 1200 nm) zeichnet sich demnach auch durch geringe Streukoeffizienten aus <sup>Beek, 1997</sup>.

Die Licht-Eindringtiefen in Gewebe ergeben sich aus den vier genannten optischen Gewebeparametern. Aus den optischen Eigenschaften von Gewebe lässt sich ableiten, dass es zu einem Lichtgradienten kommt, der sich von der Gewebeoberfläche in die Tiefe erstreckt. Die Lichtintensität nimmt also mit zunehmender Tiefe ab. Die gebräuchlichste Definition der Lichteindringtiefe bezieht sich auf diejenige Gewebetiefe, bei der der Abfall der eingestrahnten Lichtintensität  $I_0$  auf etwa  $I_0/e = 37\% I_0$  erfolgt ist. Sie liegt im Bereich von Mikrometern für den UV-Bereich und den IR-Bereich größer 1500 nm und kann bis zu mehreren Millimetern für den sichtbaren Bereich betragen. Das blaue Anregungslicht bei einer Wellenlänge von 400nm hat eine Eindringtiefe in die Mukosa und Submukosa von ungefähr  $500\mu\text{m}$  <sup>Wang, 1996</sup>. Leunig gibt eine optische Eindringtiefe des D-Light AF-Systems (375 – 440nm) von ca.  $300\mu\text{m}$  an <sup>Leunig & Betz, 2003</sup>.

## 5. Fluoreszenzdiagnostik

### 5.1 Photolumineszenz

Die Fluoreszenz-Diagnostik ist ein optisches Verfahren, das auf der Detektion von fluoreszierenden körpereigenen (endogenen) Stoffen sowie von applizierten (exogenen) Stoffen in den Zellen und Geweben beruht.

Die Fluoreszenz ist eine spezielle Form der Photolumineszenz. Licht kann generell als Temperaturstrahlung (z.B. von Sonne und Glühlampe) oder als Lumineszenz ("kaltes Leuchten") vorliegen. Die Aussendung einer Lumineszenz erfordert eine Energiezufuhr durch elektrische Felder (Elektrolumineszenz), chemische Reaktionen (Chemolumineszenz, Biolumineszenz) oder durch optische Anregung (Photolumineszenz). Bei der Photolumineszenz wird zwischen der Fluoreszenz und der Phosphoreszenz unterschieden. Typischerweise erfolgt die Emission von Fluoreszenzphotonen durch den Übergang vom energieärmsten Schwingungsniveau des ersten angeregten Energiezustandes  $S_1$  eines Moleküls in ein Schwingungsniveau des Grundzustandes  $S_0$ . Dagegen erfolgt die Phosphoreszenz durch den "unerlaubten" Übergang (Spinumkehr) des metastabilen Triplett-Niveaus  $T_1$  in den Grundzustand  $S_0$ . Bei organischen Molekülen ist die Wahrscheinlichkeit eines phosphoreszierenden Überganges sehr gering, sie steigt mit abnehmender Temperatur.

Ein größerer Teil der Fluoreszenzfarbstoffe lässt sich mit UV-Strahlung oder durch kurzwellige sichtbare Strahlung anregen.

Geeignete Lichtquellen sind die Wood-Lampe (WA-Emission), die Quecksilberhochdrucklampe (z.B. 365 nm) oder die Xenon-Hochdrucklampe (breites UV-VIS-Spektrum) sowie eine Vielzahl von Laserquellen.

## 5.2 Photodynamisch Diagnostik

Die Eigenfluoreszenz (Autofluoreszenz) von Zellen und Gewebe beruht auf der Anregung endogener Fluorophore durch Licht. Bei der in dieser Arbeit vorgestellten Autofluoreszenzdiagnostik werden fluoreszierende Farbstoffe im Gewebe durch Licht mit einer Wellenlänge von 375 – 440 nm angeregt und sichtbar gemacht. Das remittierte Fluoreszenzlicht wird der Analyse unterworfen. Aufgrund dieses Prozesses sollen insbesondere abnormale Gewebeveränderungen wie maligne Tumoren deutlicher sichtbar werden, als bei der normalen visuellen Beobachtung im Weißlicht.

Bestimmte Bedingungen und zwar die gewählten Anregungs- und Detektionswellenlängenbereiche, führen im Regelfall zu einer Überlagerung und Summation der Fluoreszenz von endogenen Substanzen (Autofluoreszenz). Dadurch kann keine Diskriminierung eines Hauptfluorophors erfolgen. Im Gewebe existieren einige endogene Substanzen, die zur Fluoreszenz anregbar sind. In der Literatur wird eine Vielzahl verschiedener Fluorophore als Quelle für die Autofluoreszenz genannt. Darunter sind: Lipofuszin, Kollagen, Elastin, NADH, oxidierte Flavine <sup>Alfano et al, 1984; Anderson-Engels et al, 1991; Benson et al, 1979; Dinghra et al, 1998; Richards-Kortum et al, 1990; Schomacker et al, 1992; Vo-Dinh et al, 1995</sup>. Jedes dieser Fluorophore besitzt ein anderes Anregungs- und Absorptionsspektrum.

Tabelle 5.1 Wichtige endogene Fluorophore <sup>Richards-Kortum & Sevick-Muraca, 1996</sup>

Fluorophore	Vorkommen	Anregungsmaxima (nm)	Emissionsmaxima (nm)
Pulverisiertes Kollagen	Extrazellulär/submukös	280, 330, 450	310, 390, 530
Pulverisiertes Elastin	Extrazellulär/submukös	350, 410, 450	420, 500, 520
NADH	Intrazellulär/ubiquitär	290, 340	440, 450
FAD	Intrazellulär/ubiquitär	450	515
Porphyryne	Intrazellulär/ubiquitär	405	630

Da nur die reduzierten Coenzyme FAD, NADH und NADPH fluoreszieren, kann die Coenzym-Fluoreszenz im blau-grünen Spektralbereich als sensitive Bioindikation für den Zellmetabolismus, den intrazellulären Redoxzustand, Sauerstoffmangel und für Störungen in

der Atmungskette genutzt werden. Eine Menge anderer Faktoren wie Blutfluss, Absorption durch Hämoglobin, Gewebestruktur und Streuung des anregenden Lichts durch das Gewebe sind fähig, auf den Prozess der Autofluoreszenz zu wirken<sup>Schomacker et al, 1992; Vo-Dinh et al, 1995</sup>. In mehreren Studien wurde versucht, mit Hilfe der Autofluoreszenz neoplastische Veränderungen von normalem Gewebe zu diskriminieren. Die Studien weisen darauf hin, dass verschiedene Tumorerkrankungen im Vergleich zum umliegenden gesunden Gewebe eine geringere Autofluoreszenz zeigen<sup>Hung, 1991; Ramanujam et al, 1994; Schomacker et al, 1992; Vo-Dinh et al, 1995; Zonios et al, 1996</sup>.

Zusätzlich kann die Zell-Autofluoreszenz durch einen Eingriff in die Hämsynthese stimuliert werden. Hierbei wird durch die externe Gabe des Häm-Zwischenproduktes 5-Aminolävulinsäure (ALA) in den Mitochondrien der Zellen eine deutlich höhere Konzentration des fluoreszierenden Stoffes Protoporphyrin IX (PPIX) erzeugt.

### **5.3 Relevante Fluorophore in der Fluoreszenzdiagnostik**

#### **5.3.1 Keratin**

Keratine sind Intermediärfilamente und intrazelluläre Bestandteile des Zytoskeletts. Der Durchmesser der Keratine beträgt 8-11nm. Die Keratine finden sich besonders in Epithelzellen. Sie sind obligate Heterodiere und bestehen aus einer 1:1 Mischung von sauren und basischen Keratinproteinen. Jedes Epithel zeigt daher eine charakteristische Kombination von Typ 1 und 2 Zytokeratinen. Es gibt über 30 Keratin-Isoformen, von denen 10 in "harten" Epithelzellen (Nägel, Haare) und über 20 in den übrigen Epithelzellen anzutreffen sind. Letztere werden als Zytokeratine bezeichnet.

### **5.3.2 Flavine**

Riboflavin und Flavin-Nucleotide sind gelbe, wasserlösliche Bestandteile vieler biologischer Redoxsysteme, deren Fluorophor sich vom Isoalloxazin ableitet. Flavine sind Coenzyme in Dehydrogenasen und Reduktasen und gleichen damit dem Nicotinamid. Darüber hinaus sind sie aber in Oxidasen und Monooxygenasen wirksam, in denen molekularer Sauerstoff als Elektronen-Akzeptor und Reagenz wirkt.

Die Flavine können durch unterschiedliche Fluoreszenz die intrazelluläre Stoffwechselaktivität anzeigen und sind in Tumoren oft reduziert. Die Flavine absorbieren Licht bei 380 nm, 440 nm und 460 nm und emittieren es im grünen Bereich des Lichtes bei 520 nm <sup>Bollag, 1994</sup>.

### **5.3.3 Elastische Fasern**

Ob die elastischen Fasern an sich fluoreszieren oder an sie gebundene Fluorophore ist nicht zu beurteilen. Das Elastin weist Brücken aus zwei benachbarten Lysinresten zwischen den Polypeptidketten des Desmosins und Isodesmosins auf. Diese Brücken bilden Ringstrukturen mit Doppelbindungen aus vier Kohlenstoff- und einem Stickstoffatom. Sie verursachen die nach Absorption des blauen Lichtes entstehende weißlich-gelbe Farbe des elastischen Gewebes <sup>Bollag, 1994</sup>. Elastin wird bei 365, 410 und 500nm stark angeregt und fluoresziert bei 440, 500 und 520 nm.

### **5.3.4 Protoporphyrin IX**

5-Aminolävulinsäure wird physiologisch aus Glycin und Succinyl-Coenzym A durch das Enzym 5-Aminolävulinsäure-Synthase in den Mitochondrien gebildet. Die nachfolgenden Syntheseschritte unter Beteiligung der Enzyme Porphobilinogen-Synthase, Hydroxybilan-Synthase/Uroporphyrinogen-III-Synthase und Uroporphyrinogen-Decarboxylase finden im Zytoplasma statt und führen zur Bildung von Coproporphyrinogen III. Das Enzym

Coproporphyrinogen-Oxidase, lokalisiert im Membranzwischenraum der Mitochondrien, decarboxyliert sein Substrat zu Protoporphyrinogen IX. Der vorletzte Schritt der Porphyrinbiosynthese wird durch das Enzym Protoporphyrinogen –Oxidase katalysiert und führt zur Bildung von Protoporphyrin IX, welches bei Anregung durch blaues Licht (375-440 nm) bei 635 nm fluoresziert. Abschließend wird durch den Einbau von zweiwertigem Eisen in den Porphyrinmakrozyklus durch das Enzym Ferrochelatase das Endprodukt Häm gebildet. Durch exogene Zufuhr von 5-Aminolävulinsäure wird dieser natürliche Regelkreis umgangen, wodurch die Grundlage für die Anreicherung des fluoreszierenden und photodynamisch aktiven Intermediates Protoporphyrin IX gelegt wird.

### **5.3.5 Anaerobe Glykolyse, PH-Wert, Vaskularisation**

Während der anaeroben Glykolyse in Tumoren entsteht durch steigende Laktatkonzentration eine Azidose. Diese löst Veränderungen des Zellstoffwechsels aus, sobald der intrazelluläre pH-Wert den optimalen Bereich für die Funktionen der Enzymsysteme unterschreitet. Die Mitochondrien benötigen hierbei einen Mindest-O<sub>2</sub>-Partialdruck von ca. 0,1 – 1 mmHg. Sinkt der Sauerstoffpartialdruck in der Nähe der Mitochondrien unter diesen Wert, z. B. durch das Tumorwachstum, so nehmen Wasserstoff- und Elektronentransport in der Atmungskette ab <sup>Bollag, 1994</sup>. Der Energiestoffwechsel der Zelle sinkt und somit ggf. auch die Fluoreszenz <sup>Lohmann, 1989</sup>. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass eine Ischämie zur Abnahme der Fluoreszenz <sup>Beuthan et al, 1990</sup> führt.

## **6. Autofluoreszenzmikroskopie**

### **6.1. Einleitung**

Die Suche nach einer Methode zur Früherkennung von präkanzerösen und kanzerösen Schleimhautläsionen ist schon seit langem ein entscheidendes Ziel in der Tumordiagnostik. In diesem Zusammenhang ist der Einsatz der Autofluoreszenz bei der Endoskopie unterschiedlicher Organsysteme als eine vielversprechende Methode anzusehen. Die Erscheinung und das Ausmaß der Autofluoreszenz sind abhängig von der Gewebebeschaffenheit, insbesondere dem Gehalt an fluoreszierenden Stoffen, sogenannten endogenen Fluorophoren.

Bei Aufsicht auf die Schleimhaut während der endoskopischen Autofluoreszenzuntersuchung des Larynx lässt sich in Regionen gesunder Schleimhaut eine glatte Schleimhautoberfläche mit leuchtend grüner Fluoreszenz nachweisen. Höhergradige Dysplasien und kanzeröse Läsionen zeichnen sich durch einen Verlust an Grünfluoreszenz mit rötlich bis violetter Färbung und verstärkter Kontrastierung zum umgebenden Gewebe aus. Insbesondere Grenzen dysplastischer Areale und flächenhafte Kanzerisierungen werden im Vergleich zur Betrachtung mit Weißlicht besser kontrastiert. Da es sich bei der autofluoreszenzendoskopischen Untersuchung um eine Summation der Fluoreszenz verschiedener Gewebekompartimente handelt, soll mittels der Autofluoreszenzmikroskopie bei verschiedenen Anregungswellenlängen, die den endoskopisch verwendeten blauen Bereich des Lichtes berücksichtigen, sowohl die Schleimhaut als auch das submuköse Bindegewebe in verschiedenen Dysplasiestadien untersucht werden, um das Phänomen des Autofluoreszenzverlustes präkanzeröser oder kanzeröser Schleimhaut besser zu verstehen.

## 6.2. Material und Methoden

Hierzu untersuchten wir im Rahmen einer Pilotstudie zunächst Schleimhautbiopsien (n=11) der Stimm lippen unterschiedlicher Dysplasiestadien (Normales Epithel/Epitheldysplasie I = 3, Epitheldysplasie II = 2, Carcinoma in situ = 2, Karzinom = 4). Bei den Patienten wurden Schleimhautbiopsien mikrolaryngoskopisch entnommen und topisch orientiert mit Nadeln auf gekühlte Gurken aufgespannt und in ca. 4-6 °C kühler Ringerlösung bis zur Weiterbearbeitung aufbewahrt.

Innerhalb einer halben Stunde nach der Exzision wurden die Präparate gekühlt (ca. 4-6 °C) in Ringerlösung gelagert und weiterverarbeitet. Die Konservierung der Proben erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Die Präparate wurden im CM 3050 S Mikrotom der Firma Leica bei einer Schneidetemperatur des Objektisches von -25 bis -22°C und einer eingestellten Schnittdicke von 5µm zugeschnitten. Als Einbettmedium wird Tissue – Tek.O.C.T. Compound der Firma Miles/USA verwendet. Die verwendeten Objektträger wurden zur Vermeidung von Artefakten bei der empfindlichen Autofluoreszenzmessung in Aceton gewaschen und entfettet.

Die Kryostatschnitte für die Autofluoreszenzmikroskopie wurden ungefärbt mit einem Deckglas eingedeckelt. Für das Eindeckeln wurde das Mikrokitt Nr. 233 der Pathologie verwendet. Eine Sequenz von 10 Serienschnitten wurde hergestellt. Hierbei wurden abwechselnd Schnitte für die Autofluoreszenzmikroskopie ungefärbt und HE gefärbten Parallelschnitten zur histologischen Diagnose gegenübergestellt. Zur Autofluoreszenzmikroskopie wurde UV-Licht, Blaulicht und Grünlicht induzierte Fluoreszenz verwendet.

Die Autofluoreszenzmikroskopie wurde mit dem Autofluoreszenzmikroskop der Firma Leica DMR durchgeführt. Die densitometrischen Messungen wurden mit der Software Metamorph 4.6r9 (Universal Imaging Corp., Licensed under US. Pat. No. 4,558,302) vorgenommen.

Tabelle 6.2.1 Standardisierte Messeinstellungen der Autofluoreszenzmikroskopie

Anregung	Anregungs- wellenlänge (nm)	Teilerspiegel	Sperrfilter (nm)	Belichtungszeit (sec)
UV	BP 360±40	400	BP 470±40	4
Blau	BP 480±40	505	BP 527±30	15
Grün	BP 546±12	565	BP 600±40	10

Hierbei wurden die densitometrischen Untersuchungen bei 200x Vergrößerung durchgeführt.

Die zu vermessende Schleimhaut wurde in 4 verschiedene Kompartimente unterteilt:

1. Subepitheliales Bindegewebe
2. Basale Epithelschicht
3. Epithelmitte
4. Apikaler Epithelrand.

Die unterschiedlichen Kompartimente wurden mit quadratischen Messfeldern von 10µm Kantenlänge vermessen. Von den Bildern wurde der Hintergrund abgezogen und ein Schwellenwert mit einem Minimum von 400 gesetzt. An jedem Schnitt wurden 10 Messungen pro Kompartiment durchgeführt. Die Messungen des Epitheldurchmessers wurden bei 10x Vergrößerung vorgenommen. Hierbei führten wir 10 Einzelmessungen pro Präparat durch, die im Anschluss ausgewertet wurden. Die histopathologische Diagnose erfolgte durch einen Pathologen (T.D.) anhand der HE-Schnitte. Reste des Materials wurden wie die übrigen Anteile der Exzisionsbiopsie im Rahmen der normalen Routinediagnostik aufgearbeitet, so dass kein Verlust für die klinische Diagnostik entstand.

### 6.3. Ergebnisse

Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigt sich in allen verwendeten Wellenlängen für den an die Zellfärbungen der konventionellen Lichtmikroskopie gewöhnten Betrachter ein ungewohntes Bild. Die Orientierung an den Zellen ist nur erschwert möglich, da hauptsächlich die Fasern des Bindegewebes fluoreszieren. Die Fluoreszenz einzelner Zellen tritt zumindest bei kleineren Vergrößerungen in den Hintergrund. Ebenso kann eine vermehrte Fluoreszenz im Bereich der oberen Epithelzelllagen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zum normal gefärbten und geschrumpften Formalinschnitt stellt sich das Bindegewebe im unfixierten und nicht geschrumpften Kryostatschnitt der Fluoreszenzmikroskopie unverändert dar. Die hell gegenüber dem Epithel leuchtenden Fasern verbleiben in ihrer ursprünglichen Lokalisation im Gewebsverband. Die Bedingungen für die Beurteilung von Veränderungen der Fasern des subepithelialen Bindegewebes sind hierdurch günstiger.

Die Identifikation der Bindegewebsfasern und der epithelialen Zellen erfolgt durch den Vergleich des Fluoreszenzbildes mit dem Hämatoxylin&Eosin gefärbten Parallelschnitt.

In der tumorfreien Stimmlippenschleimhaut fluoresziert die apikale Epitheloberfläche. In den darunter liegenden Epithelschichten ist die Fluoreszenz geringer, um dann im Stratum germinativum wieder leicht anzusteigen. Im Stratum germinativum scheinen hauptsächlich das Zytoplasma und die Interzellulärsubstanzen zu fluoreszieren. Hingegen weisen die Zellkerne keine Fluoreszenz auf. Die stärkste intraepitheliale Fluoreszenz kann unter der Blaulichtanregung beobachtet werden.

Häufig sind in der normalen oder leicht dysplastischen Stimmlippenschleimhaut dünne Schichten aus feinen elastischen Fasern subepithelial zu beobachten, die parallel zum Epithel im Bindegewebe verlaufen. Das Epithel weist ca. 5 – 10 Epithelzelllagen auf und zeigt eine Epithelschichtdicke zwischen 100 – 200 µm.

Während in normalem oder nur leicht dysplastischem Epithel entsprechend der ausdifferenzierten Zellen des Epithels keine oder nur geringe Verhornungen nachweisbar sind, weisen die Präkanzerosen und Karzinome häufig als Zeichen unterschiedlicher Differenzierung Verhornungen auf. Sie zeigen oberflächliche Keratinisierungen oder Verhornungen im Tumor. Dies lässt sich auch in der UV-Licht angeregten Fluoreszenz beobachten. In der Grünlichtfluoreszenz hingegen ist die Fluoreszenz am apikalen Epithelrand sehr gering ausgeprägt.

Bemerkenswert ist, dass die intraepitheliale Differenzierung der einzelnen Strukturen am besten unter Blaulichtanregung beurteilt werden kann. Zellkerne oder Zytoplasma sind bei der UV-Licht als auch der Grünlichtfluoreszenz nicht zu beurteilen, jedoch grenzt sich eindeutig das submuköse Bindegewebe von dem insgesamt dunklen Epithel ab. Insgesamt zeigt das submuköse Bindegewebe eine 2x – 3x höhere Intensität als das densitometrisch vermessene Epithel. Dies ist unabhängig vom Dysplasie- bzw. Tumorstadium zu sehen. Daher kann das subepitheliale Bindegewebe mit seinen elastischen als auch kollagenhaltigen Fasern als das Hauptfluorophor des normalen und leicht dysplastisch veränderten Plattenepithels angesprochen werden. Weiterhin geht ein deutlicher Einfluss auf die Autofluoreszenz von dem Grad der Keratinisierung des Tumors aus. Die Verhornung fluoresziert hell an der Epitheloberfläche.

Tabelle 6.3.1 Densidometrie – gemessene durchschnittliche Intensität UV-Licht-, Blaulicht- und Grünlichtfluoreszenz

n = 11	Apikaler Epithelrand	Epithelmitte	Basales Epithel	Epithel gesamt	Submuköses Bindegewebe
Einfache Epitheldysplasie	456	276	341	358	1032
Mittelgradige Epitheldysplasie	766	132	333	410	1263
Carcinoma in situ	763	232	555	517	1590
Invasives Karzinom	468	318	426	404	1128

Abbildung 6.3.12 Das Histogramm verdeutlicht die starke Fluoreszenz des submukösen Bindegewebes unabhängig von dem Dysplasiegrad oder dem tumorösen Wachstum. Weiterhin zeigt sich eine geringe Fluoreszenzintensität der einzelnen Epithelregionen.

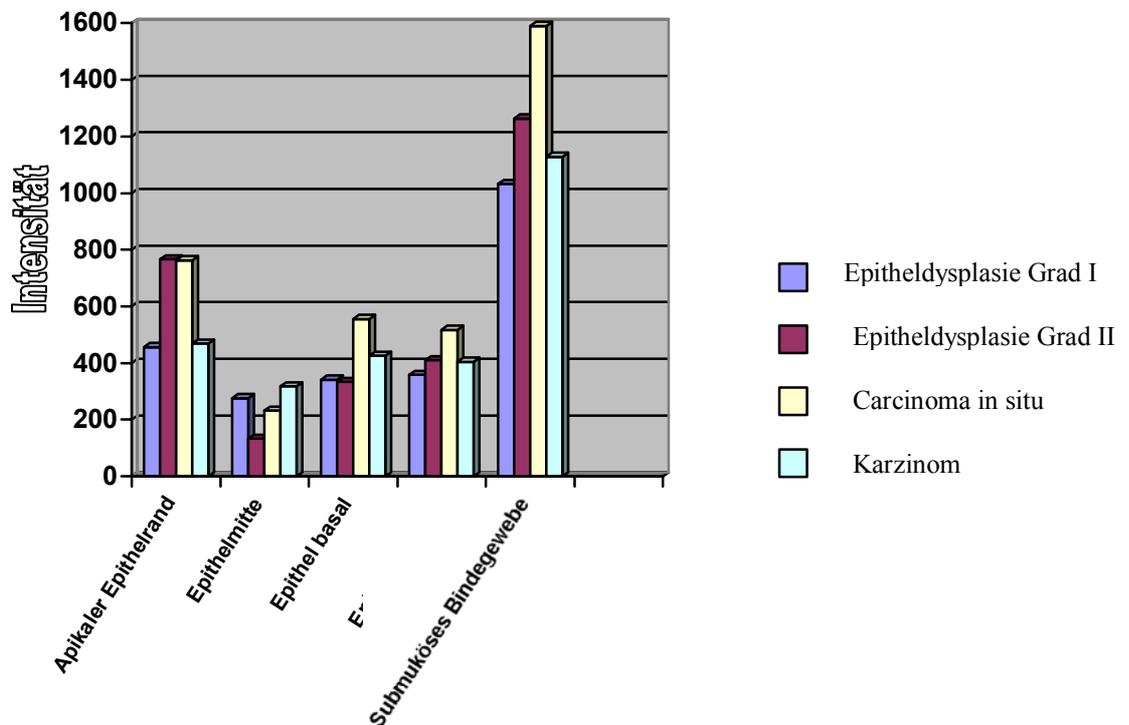
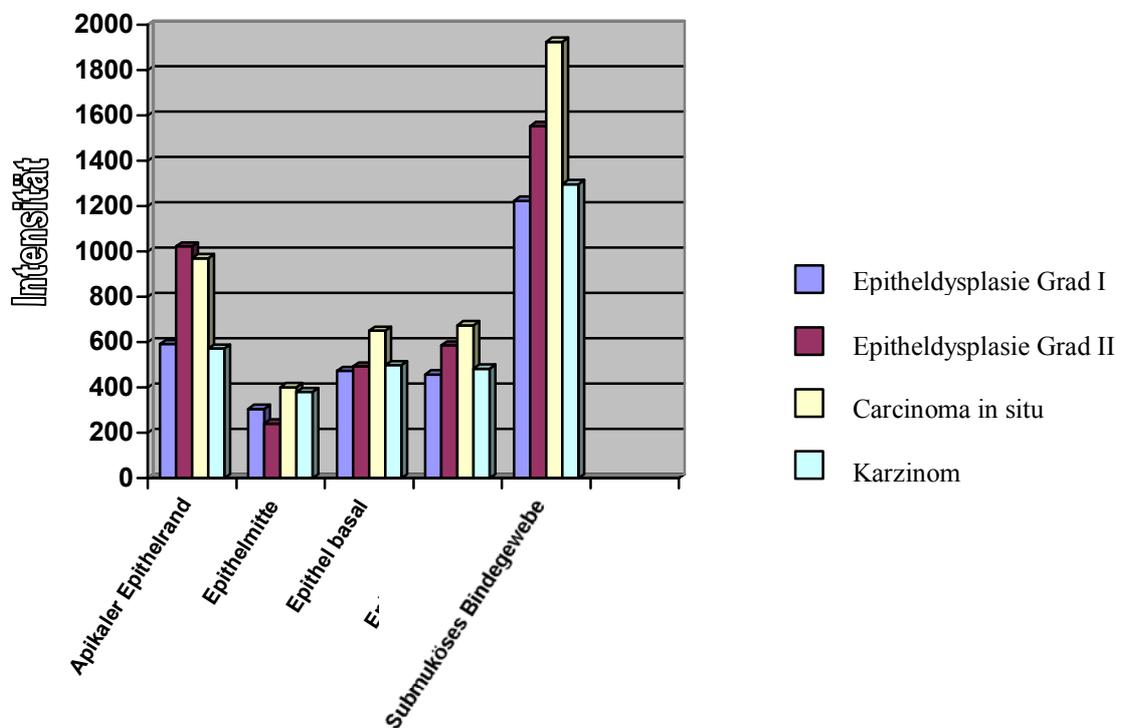


Tabelle 6.3.2 Densidometrie – gemessene Intensität bei ausschließlicher Blaulichtanregung

n = 11	Apikaler Epithelrand	Epithelmitte	Basales Epithel	Epithel gesamt	Submuköses Bindegewebe
Einfache Epitheldysplasie	591	305	473	457	1224
Mittelgradige Epitheldysplasie	1022	240	493	585	1554
Carcinoma in situ	970	401	651	674	1926
Invasives Karzinom	572	380	498	483	1297

Abbildung 6.2.13 Das Histogramm zeigt ebenfalls in der ausschließlichen Blaulichtanregung die starke Fluoreszenz des submukösen Bindegewebes. Weiterhin ist eine stärkere Fluoreszenz des apikalen Epithelrandes gegenüber der Gesamtdarstellung aller verwendeten Fluoreszenzen zu beobachten.



Das submuköse Bindegewebe zeigt bei Karzinomen im Vergleich zu den dysplastischen Vorstufen die gleiche densitometrisch gemessene Fluoreszenzintensität, jedoch erscheint das Gewebe durch den Tumor komprimiert. Die Grenzen zwischen Tumor- und Bindegewebe sind im Vergleich zum H&E-Schnitt deutlicher sichtbar. Vom Tumor infiltrierte Bindegewebe zeigt noch versprengte Bindegewebsfasern im Tumorareal. Die Intensitäten der Autofluoreszenz der unterschiedlichen Kompartimente Epithelrand, Epithelmitte, basales Epithel und subepitheliales Bindegewebe sind unabhängig von der Dysplasiestufe. Bei den densitometrischen Untersuchungen schwankt die gesamte epitheliale Fluoreszenz zwischen einer Intensität von 404 Counts bei den Karzinomen und 517 Counts bei den Carcinomata in situ. Die Intensität der leichtgradigen Epitheldysplasie liegt bei 358 Counts. Hingegen schwankt das subepitheliale Bindegewebe zwischen 1032 und 1590 Counts. Die intensivste Intensität findet sich im submukösen Bindegewebe. Bei der Blaulichtmikroskopie ist die Autofluoreszenz am apikalen Epithelrand, meist bedingt durch die Para- oder Orthokeratose, am stärksten. Basale Epithelschichten zeigen regelhaft eine etwas intensivere Autofluoreszenz als Zellreihen in den mittleren Schichten. Der Epitheldicke steigt mit Zunahme des Dysplasiegrades an. Die gemessene Epitheldicke der einfachen Dysplasien liegt bei ca. 140 µm. Epithelien der Dysplasiestufe II nach Kleinsasser können bereits ein Mehrfaches des Durchmessers des normalen Stimmlippenepithels betragen. Die durchschnittliche Epitheldicke der mittelgradigen Dysplasie lag bei ca. 760nm. Somit nimmt bereits in einem relativ frühen Dysplasiestadium der Epitheldurchmesser erheblich zu.

Atrophisches kanzerisiertes Epithel kann auch zu einem Autofluoreszenzverlust aufweisen. In diesem Falle wird der Autofluoreszenzverlust primär durch die pathologisch erweiterten submukösen Gefäße und Gefäßatypien bedingt. Dies ist bei erythroplakischen Läsionen der Fall.

#### 6.4. Diskussion

Trotz der schon 1984 von Alfano durchgeführten Autofluoreszenzuntersuchungen zur Unterscheidung von benignem und malignem Gewebe findet man in der Literatur nur vereinzelt Untersuchungen, die sich mit der Fluoreszenzmikroskopie von Karzinomen im oberen Aerodigestivtrakt beschäftigen<sup>Fryen et al, 1997a & b; Leunig et al, 2001</sup>. Um das Phänomen des endoskopisch nachweisbaren Autofluoreszenzverlustes bei malignen Veränderungen der Schleimhaut besser verstehen zu können, wurde diese Methode zur Untersuchung von dysplastischen Veränderungen des Stimmlippenepithels eingesetzt.

Während die klinisch genutzte Autofluoreszenzendoskopie nur eine Summationsfluoreszenz darstellt, ermöglicht die histologische Untersuchungstechnik am Kryostatschnitt die mikroskopische Detektion der Fluoreszenzintensität einzelner Schleimhautschichten sowie des submukösen Bindegewebes.

Interessanterweise zeigt hierbei das submuköse Bindegewebe sowohl bei unterschiedlicher Anregung als auch in den verschiedenen Dysplasiestadien die stärkste Intensität aller untersuchten Abschnitte im Gewebe. Hierbei liegt die Fluoreszenzintensität unabhängig von der Anregungswellenlänge 2x - 3x über der des Epithels, das nur eine geringe Eigenfluoreszenz in den verwendeten Absorptionsspektren besitzt. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass hauptsächlich endogene Fluorophore des submukösen Bindegewebes für die helle Grünfluoreszenz des normalen Epithels verantwortlich sind.

Von den einzelnen Epithelschichten fluoresziert das Stratum superficiale bei vorhandener Keratinisierung (Stratum corneum) am intensivsten. Die schwächste Fluoreszenz findet sich im Stratum spinosum. Das Stratum germinativum zeigt wiederum eine etwas stärkere Fluoreszenz im Bereich des Interzellularraumes und Zytoplasmas. Hierfür werden unter anderem der intensivere Stoffwechsel als auch die elastischen Fasern im interzellulären Raum verantwortlich gemacht<sup>Fryen, 1997a</sup>.

Einige Autoren <sup>Coghlan, 2000; Betz, 1999</sup> machen für das Phänomen der Autofluoreszenz die endogenen Fluorophore oxydierte Flavine (FAD), Elastin und Kollagen verantwortlich. In diesem Zusammenhang führt Hung eine endoskopisch nachweisbare Reduktion der Autofluoreszenzaktivität im Tumorgewebe auf eine erniedrigte Konzentration der oxydierten Flavine zurück <sup>Hung, 1991</sup>.

Im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnten zusätzlich noch andere Aspekte zur Klärung der Ursachen des endoskopisch nachweisbaren Autofluoreszenzverlustes herausgearbeitet werden.

Karzinomatöse Veränderungen führen zu einer Verschiebung der Kern-Plasma-Relation und Zunahme der kernhaltigen Zellen. So stellen sich im fluoreszenzmikroskopischen Bild die Zellkerne wie dunkle ausgestanzte Löcher im Epithel dar. Dies beruht darauf, dass die Purine und Pyrimidine von DNA und RNA im Zellkern UV-Licht mit einem Absorptionsmaximum bei 254 nm absorbieren. Das von uns zur Endoskopie verwendete längerwellige blaue Licht hingegen regt die Zellkerne nicht zur Fluoreszenz an. Außerdem können die Kerne in einem geringen Maße zur Streuung der Photonen und damit zur Schwächung des Autofluoreszenzlichtes beitragen.

Die in unsere Studie ermittelte Epitheldicke reichte von 140µm bei einer einfachen Epitheldysplasie bis zu Epitheldicken von über 1mm bei einem mikroinvasiven Karzinom. Interessanterweise änderte sich während der Fluoreszenzmikroskopie die Intensität der epithelialen Autofluoreszenz von der geringgradigen Epitheldysplasie bis zum Karzinom nicht merklich. Dies bestätigt die Befunde von Fryen, der keine statistisch signifikanten Unterschiede der Autofluoreszenzintensitäten der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes von tumornahem, tumorfernem und kanzerisiertem Epithel nachweisen konnte <sup>Fryen, 1997</sup>.

Hieraus lässt sich folgern, dass primär nicht ein Fluoreszenzverlust der Tumorzellen für den endoskopisch beobachteten Fluoreszenzverlust verantwortlich ist, sondern hauptsächlich die

Epithelverdickung sowie evtl. die Zunahme der Kernanzahl mit einer Veränderung der Kern-Plasma-Relation.

Eine Epithelverdickung von mehr als einem halben Millimeter bewirkt, dass das einfallende Licht während der endoskopischen Untersuchung nicht in ausreichender Intensität das submuköse Bindegewebe erreichen kann. Dadurch werden weniger sowie energieärmere Photonen remittiert. Die energieärmeren Photonen besitzen eine größere Wellenlänge und fluoreszieren somit rötlich-violett. Die Farbveränderung im Emissionsspektrum spiegelt daher am ehesten eine energetische Abschwächung der detektierbaren remittierten Photonen wider.

Der sogenannte Umbrellaefekt der ausgeprägten Keratose lässt sich durch die starke Keratinfloreszenz in den apikalen Epithelschichten im mikroskopischen Schnitt erklären. Bei einer einfachen Hyperkeratose führt dies endoskopisch zu einer helleren Grünfluoreszenz. Diese intensivere Fluoreszenz im Bereich der Epitheloberfläche kann eine präkanzeröse Veränderung, die sich parabasal manifestiert, verdecken, so dass eine exakte Beurteilung des Autofluoreszenzverlustes nicht mehr möglich ist. In diesem Fälle neigt man bei der endoskopischen Beurteilung der Autofluoreszenz dazu, die betrachtete Läsion hinsichtlich des Dysplasiegrades zu unterschätzen. Daher ist bei stärker verhornenden Läsionen das Ergebnis kritisch zu betrachten und das umgebaute Epithel in die Gesamtbeurteilung mit einzubeziehen, da selten die Hornkappe die gesamte Läsion bedeckt.

Bei der chronischen Laryngitis kommt es ebenfalls zu einer Verdickung des Epithels aber mit einer Hyperämie und auch einer Einwanderung von Entzündungszellen. Der hierbei entstehende Autofluoreszenzverlust ist folgendermaßen erklärbar: Die Epithelverdickung führt zu einer Absorption und Streuung des Lichtes, das Häm absorbiert in den erweiterten subepithelialen Gefäßen ebenfalls das einfallende Licht und trägt somit zu einem weiteren Autofluoreszenzverlust bei.

Durch diese Phänomene lassen sich der auftretende Autofluoreszenzverlust bei der Entstehung des Larynxkarzinoms als auch die möglichen „Pitfalls“, d.h. falsch positive Ergebnisse wie bei einer chronischen Laryngitis und falsch negative wie bei einer Keratose erklären. Sie sollten bei der Deutung der endoskopischen Autofluoreszenzbefunde hinsichtlich der Diagnostik einer Epithelveränderung immer mit einbezogen werden.

## 7. Klinische Anwendung der Fluoreszenztechniken

### 7.1 Untersuchungsverfahren

#### 7.1.1 Indirekte Laryngoskopie

Die Idee zur endoskopischen Darstellung von Hohlorganen hatte 1806 der praktische Arzt Bozzoni: „Eine Vorrichtung, welche die Strahlen des Lichtes in innere Höhlen des lebenden animalischen Körpers führt und aus diesem wieder auf das Auge zurückleitet, heiße ich einen Lichtleiter“<sup>Bozzoni, 1806</sup>. Die erste indirekte Laryngoskopie, die 1829 von Babington in die Untersuchung des Kehlkopfs eingeführt wurde, erfolgte jedoch zunächst mit dem Kehlkopfspiegel<sup>Babington, 1829</sup> mittels durch einen Hohlspiegel fokussiertes Licht. Am weitesten verbreitet ist die Ansicht, dass der Gesangslehrer Garcia 1855 den Kehlkopf mit Hilfe des Sonnenlichtes als Erster betrachtete<sup>Garcia, 1855</sup>. Czermak führte die Photographie in die Laryngoskopie ein. Er platzierte an die Stelle des Beobachters Kameras und konnte so schon 1861 die ersten Fotos von seinem eigenen Larynx vorstellen<sup>Brücke, 1863</sup>.

Gert Sauer führte 1936 ein starres Photo-Laryngoskop in die Diagnostik und Dokumentation der Kehlkopftuberkulose ein<sup>Sauer, 1936</sup>. Seit den 70er Jahren werden routinemäßig starre Endoskope mit einem Winkel von 70 oder 90 Grad verwendet, die eine detaillierte Information über die Schleimhaut der endolaryngealen Strukturen geben können<sup>Stuckrad und Lakatos, 1975</sup>. Das Endoskop kann einfach über die Mundhöhle in den Pharynx eingeführt werden und ermöglicht einen guten Aufblick auf den Endolarynx, eine exzellente Ausleuchtung der laryngealen Strukturen und eine leichte Vergrößerung des betrachteten Bildausschnittes.

Zusätzlich kann auch bei behinderter Mundöffnung, bei schwierigen anatomischen Gegebenheiten oder mangelnder Mitarbeit des Patienten die flexible Endoskopie eingesetzt werden. Hierbei bleibt der Kehlkopf in seiner physiologischen Position und kann über einen längeren Zeitraum beim Sprechen und Singen beobachtet werden.

### 7.1.2 Direkte Laryngoskopie und Mikrolaryngoskopie

Kirstein führte 1895 die direkte Laryngoskopie als Autoskopie in die Diagnostik und Therapie laryngealer Veränderungen ein <sup>Kirstein, 1895</sup>. Während Brünings die Patienten noch im Sitzen und mit monokularer Vergrößerung untersuchte, stellte Killian den Larynx mit Spateln am in Rückenlage positionierten Patienten ein <sup>Brünings & Albrecht, 1915; Killian, 1920</sup>. Albrecht untersuchte in den 50er Jahren Leukoplakien und Karzinome des Kehlkopfs mit einem Kolposkop <sup>Albrecht, 1954</sup>.

Die von Kleinsasser 1962 publizierte Methode der direkten Stützlaryngoskopie mit einem Mikroskop ist heutzutage ein Standardverfahren für Diagnostik und Therapie benigner und maligner laryngealer Veränderungen. Ebenso wegweisend war in den darauffolgenden Jahren die Einführung der mikrolaryngoskopischen Technik zur kurativen Behandlung von präkanzerösen Läsionen der Stimmlippen durch den gleichen Autor <sup>Kleinsasser, 1962; 1964</sup>.

Die Mikrolaryngoskopie kann sowohl in Allgemeinnarkose mit endotrachealer Intubation als auch in Jetventilation erfolgen. Die Einstellung des Endolarynx erfolgt mit Hilfe spezieller, in Form und Größe variabler Laryngoskope. Diese Laryngoskope besitzen einen röhrenförmigen Arbeits- und Sichtkanal sowie in annähernd rechtem Winkel dazu einen Handgriff. Über diesen Handgriff kann die Lage und Position des Arbeitskanals im Endolarynx verändert werden. Über eine Haltevorrichtung wird das Laryngoskop auf dem Brustkorb des Patienten fixiert (Stützauskopie). Hierdurch ist eine Beurteilung des Endolarynx sowie die Durchführung diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen durch den Arbeitskanal mittels geeigneter Instrumente beidhändig möglich. In Kombination mit einem stark vergrößernden Mikroskop erhält der Operateur eine exzellente Übersicht über die endolaryngealen Strukturen. Durch Palpation als auch weiterführende Endoskopie via Laryngoskop kann sich der Operateur zusätzlich ein detaillierteres Bild von der Schleimhautveränderung machen.

Wird während der Mikrolaryngoskopie der Verdacht auf das Vorliegen einer umschriebenen präkanzerösen Läsion oder eines kleinen Stimmlippentumors bestätigt, so kann in gleicher

Sitzung eine mikrochirurgische Resektion des gesamten Befundes mit geringer Einschränkung der Lebensqualität durch Erhalt bzw. Wiederherstellung der Stimmfunktion erfolgen. Bestrebungen zur Fortführung und Erweiterung dieser Operationstechnik führten zu mikrolaryngoskopischen laserassistierten Resektionen größerer endolaryngealer Tumoren  
Steiner, 1993; Rudert, 1994

Die Mikrolaryngoskopie erlaubt allerdings nicht mit letzter Sicherheit zu differenzieren, ob es sich um einen malignen Tumor oder eine gutartige Veränderung handelt. Insbesondere sind Vorläufer und Ausläufer von Karzinomen, die sich in der Umgebung des infiltrierenden Tumors befinden schwer einzuschätzen und vom nicht veränderten Gewebe zu unterscheiden. Der Erfahrene wird zwar mit großer Sicherheit ein Karzinom erkennen, für die Diagnose entscheidend ist aber letztendlich der histopathologische Befund.

## **7.2 Autofluoreszenzdiagnostik**

### **7.2.1 Einleitung**

Das Plattenepithelkarzinom des Kehlkopfes zählt zu den häufigsten malignen Tumoren der oberen Atemwege in Europa. Seine Prognose wird entscheidend durch Lage, Ausdehnung und Differenzierung des Tumors bestimmt. Daher ist eine genaue prä- und perioperative Diagnostik der Läsion entscheidend für das erforderliche Ausmaß der Therapie. Verbleiben im Rahmen der chirurgischen Therapie Tumorreste in situ, so ist mit Lokalrezidiven zu rechnen. Demgegenüber kann die Überschätzung von Dysplasien Läsionen und dem Carcinoma in situ bei zu großzügiger Resektion zu unnötigem Verlust des funktionell bedeutsamen Reinke'schen Raumes und zu übermäßiger Vernarbung führen.

Üblicherweise erfolgt heute die Erstdiagnose einer dysplasie- oder tumorverdächtigen Larynxläsion durch eine indirekte endoskopische Untersuchung des Kehlkopfes. Die Erkennung und Einschätzung von tumorverdächtigen Läsionen des Kehlkopfes ist hierbei

wesentlich von der Erfahrung des Untersuchers abhängig. Bis heute gilt die indirekte Laryngoskopie als eine einfache und gleichzeitig aussagekräftige Methode zum Nachweis und zur Dokumentation von Kehlkopferkrankungen. Moderne starre Kaltlichtendoskope mit einem Untersuchungswinkel von 70 oder 90° ermöglichen eine gute Ausleuchtung und gleichzeitig eine leichte Lupenvergrößerung bei der Kehlkopfuntersuchung <sup>Stuckrad und Lakatos, 1975</sup>.

Der von Kleinsasser entwickelte direkte laryngoskopische Zugang lässt einen mikroskopischen Blick auf die Oberfläche laryngealer Strukturen zu und ermöglicht dadurch aber auch unter Zuhilfenahme der Palpation die verbesserte Einschätzung pathologischer Veränderungen und deren Größe und Ausdehnung. Trotzdem fällt es in manchen Fällen schwer, die genaue Ausdehnung dysplastischer Veränderungen oder laryngealer Tumoren im Rahmen der Mikrolaryngoskopie zu beurteilen. Vor allem ist die Erfassung von Vorläuferläsionen und Folgeveränderungen, wie z.B. Kapillaratypien, auch bei mikroskopischer Betrachtung nicht immer leicht. Überdies kann die Beurteilung der Tiefeninfiltration durch Palpation selbst für erfahrene Laryngologen gelegentlich schwierig sein. Daher können endoskopische bildgebende Verfahren die Mikrolaryngoskopie ergänzen, um eine genauere prätherapeutische Diagnostik hinsichtlich dieser Problematik zu erlangen.

Seit Mitte der 90er Jahre wurden zusätzliche Techniken angewendet, um die endoskopische Information während der Mikrolaryngoskopie zu verbessern. Hierzu zählen verschiedene starre Winkelendoskope zur Betrachtung des subglottischen Raumes und des Ventrikels, die Kontaktendoskopie <sup>Andrea et al, 1995</sup> als zytologische in-vivo Methode, in wenigen Fällen beschrieben die Fluoreszenzendoskopie <sup>Harries et al, 1995; Zargi et al, 1997; Arens et al, 1999a</sup> mit oder ohne fluoreszenzverstärkende Hilfsmittel und nicht zuletzt der endoskopische Hochfrequenzultraschall <sup>Arens, 1999b</sup> zur Beurteilung der Infiltrationstiefe von Larynxkarzinomen.

Komplementäre diagnostische Verfahren könnten somit die Abgrenzung gutartiger Läsionen von präkanzerösen und malignen Veränderungen erleichtern. Darüber hinaus sollten sie von hoher diagnostischer Sensitivität und Spezifität und möglichst nicht invasiv sein. Wünschenswert sind auch eine einfache Anwendung und möglichst geringe Kosten der Untersuchung.

In jüngster Zeit fand die Methode der Autofluoreszenzendoskopie vermehrt vielversprechende Anwendung in der Frühdiagnostik von Tumoren unterschiedlichster Fachgebiete, wie beispielsweise der Urologie, Pulmologie und Gastroenterologie <sup>Hung et al, 1991; Kriegmair et al, 1994; Lam et al, 1993; Panjehpour et al, 1996</sup>. Die Autofluoreszenzendoskopie ist ein nicht invasives bildgebendes Verfahren, bei dem die unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften von Karzinomen und präkanzerösen Epithelläsionen zu einem erhöhten farblichen Kontrast gegenüber normalem Gewebe führen.

Die Eigenfluoreszenz des Gewebes wird hierbei durch kurzwelliges Blaulicht des sichtbaren Spektrums induziert. Bestimmte Moleküle sind in der Lage, die photonische Energie des Blaulichtes in langwelliges Fluoreszenzlicht zu transformieren. Hierbei besitzt jedes Molekül sein eigenes charakteristisches Fluoreszenzspektrum in Abhängigkeit vom Anregungslicht mit spezifischen Maxima sowohl im Exzitations- als auch im Emissionsbereich. Aus der Fülle der möglichen Fluorophore im menschlichen Gewebe, ihrer Verteilung und nicht zuletzt aus morphologischen Gegebenheiten resultieren charakteristische Summenspektren für menschliche Gewebe.

Das Ziel der in diesem Kapitel besprochenen Arbeit ist es, anhand einer größeren Zahl indirekten Laryngoskopien und Mikrolaryngoskopien die diagnostische Wertigkeit und die Einschränkungen der Autofluoreszenzendoskopie im Vergleich zur histopathologischen Diagnostik als Goldstandard zu beurteilen.

## 7.2.2 Das Autofluoreszenzsystem

In verschiedenen Studien konnte herausgearbeitet werden, dass die Anregung der Schleimhaut im blauen Bereich sehr günstig für die Unterscheidung zwischen normalen und dysplastischen oder kanzerisierten Schleimhautveränderungen ist <sup>Coghlan et al, 2000; Ingrams et al, 1997</sup>.

Das System D-Light AF der Fa. STORZ sowie die zugehörigen starren Endoskope wurden in den letzten Jahren entwickelt. Als Lichtquelle dient ein spezielles Xenon-Lichtsystem zur Erzeugung des speziellen Blaulichtes zur Fluoreszenzanregung.

Diese speziellen Lampen basieren auf einer elektrischen Entladung des Xenon-Gases, wodurch eine Ionisierung verursacht wird. Das abgestrahlte Lichtspektrum einer Leistung von etwa 50-500W ist proportional zum Gasdruck. Das weiße Licht der Xenon-Lampe kann zunächst zur normalen Ausleuchtung des Endolarynx im Weißlichtmodus verwendet werden. Durch die spektrale Einengung des weißen Lichtes mittels eines optischen Bandpassfilters auf den Bereich von etwa 375 – 440nm entsteht blaues Licht.

Die Lichtübertragung zum Endoskop geschieht mittels Flüssiglichtleitern deren Blaulichtübertragung ca. 10x höher ist als dies mit herkömmlichen Glasfaserlichtkabeln erzielt werden kann. Zur videoendoskopischen Untersuchung sind hochauflösende Kameras mit elektronischer Verstärkung notwendig. Diese verstärken das schwache sehr selektive Lichtsignal, so dass es für das Auge besser sichtbar wird. Die Fluoreszenzphotonen werden hierbei durch ein CCD (Charged Coupled Device) Kamerasystem (Telecam SLPAL, 20212020/37, K. Storz, Tuttlingen) erfasst. Die Wirkungsweise basiert typischerweise auf dem lichtelektrischen Effekt, wobei ein auf das Detektormaterial auftreffendes Photon ein Elektron herausschlägt, das mittels elektrischer Felder beschleunigt wird. Dieses herausgeschlagene Elektron induziert beim Auftreffen auf bestimmte Materialien sogenannte Sekundärelektronen. Der Detektor stellt somit elektrische Ladungsträger zur Verfügung, deren Anzahl möglichst direkt proportional der Anzahl detektierter Photonen ist.

Üblicherweise wird das elektrische Signal der Photonendetektoren als relative Fluoreszenzintensität angegeben.

Es ermöglicht somit die Beobachtung über einen Monitor sowie die Bilddokumentation. Die Umschaltung zwischen Blau- und Weißlichtmodus der Kamerasoftware und Lichtquelle kann anwenderfreundlich mit Funktionstasten am Kamerakopf, per Fußschalter oder direkt am Gerät erfolgen.

### **7.2.3 Material und Methoden**

In der Zeit von 1999 bis 2003 wurden insgesamt 109 Patientinnen und Patienten indirekt laryngoskopisch und anschließend mikrolaryngoskopisch mit Hilfe der Autofluoreszenzendoskopie untersucht. Alle Patienten waren mit unklaren oder karzinomverdächtigen Kehlkopfbefunden in unsere Klinik überwiesen worden. Die Untersuchungen erfolgten nach Aufklärung und Einverständnis der Patienten.

Nach präoperativer indirekt laryngoskopischer Weißlicht- und Autofluoreszenzendoskopie erfolgte eine erste Einschätzung der Diagnose im Hinblick auf Dignität, Dysplasiegrad, Invasivität und Ausdehnung der Läsionen. Bei allen Patienten bestand hiernach der Verdacht auf eine fakultative oder obligate Präkanzerose oder bereits ein invasives Karzinom. Im Rahmen der anschließenden Mikrolaryngoskopie wurde die Autofluoreszenzuntersuchung wiederholt und die Diagnose entsprechend zusätzlicher Befunde, z.B. Tastbefund und Ausdehnung der Läsion, gegebenenfalls neu eingeschätzt.

Für die indirekte Laryngoskopie in Weißlicht und Autofluoreszenz wurde ein 70° Winkelendoskop (8700CP, Karl Storz, Tuttlingen) verwendet. Intraoperativ wurde nach Einstellen der Stimmlippenebene mit dem Mikrolaryngoskop nach Kleinsasser eine direkte Autofluoreszenzendoskopie unter Verwendung starrer 0° und 30° Endoskope (8711AP und 7230BP, Karl Storz, Tuttlingen) durchgeführt. Zur Autofluoreszenzanregung wurde bei beiden Untersuchungen das D-light-AF System (K. Storz, Tuttlingen) verwendet. Bei diesem

System wird das fluoreszenzanregende Blaulicht mit einer Wellenlänge von 375 bis 440 nm aus einer Xenon Lichtquelle gefiltert. Ein hochauflösendes CCD-Kamera-System (Telecam SLPAL, 20212020/37, K. Storz, Tuttlingen) verstärkt und prozessiert hierbei das emittierte Autofluoreszenzlicht. Dieses System ermöglicht die Untersuchung in Echtzeit mit der Möglichkeit, zwischen Weißlichtendoskopie und Autofluoreszenzendoskopie umzuschalten. Die Befunde wurden zur Dokumentation und klinischen Analyse auf einem digitalen Videosystem gespeichert.

Abhängig von der klinischen Diagnose und der Ausdehnung der Läsionen erfolgten mikrolaryngoskopische Exzisionsbiopsien, Dekortikationen der Stimmlippen sowie oberflächliche oder partielle Chordektomien. 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 des 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.

#### **7.2.4 Laryngoskopische, mikrolaryngoskopische und pathohistologische Ergebnisse**

Im Autofluoreszenzlicht betrachtete gesunde Larynxschleimhaut zeigte eine typische helle Grünfluoreszenz. Übergänge mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften zwischen gesundem Plattenepithel der Stimmlippen und dem respiratorischen Epithel der supra- und subglottischen Region waren nicht erkennbar. Kapilläre und insbesondere ektatische und pathologisch verlaufende Blutgefäße wurden durch die umgebende Grünfluoreszenz deutlicher kontrastiert.

Plattenepitheliale Hyperplasien mit oder ohne geringgradige Zelldysplasien waren im Weißlicht durch eine teilweise diffuse weißliche oder fleckige milchige Trübung der sonst zarten, feucht schimmernden Schleimhaut erkennbar. Autofluoreszenzendoskopisch stellten sich diese Regionen mit intensiver hellgrüner bis weißlicher Fluoreszenz dar.

Epithelläsionen, die eine rötlich bis violette Verfärbung aufwiesen, zeigten histopathologisch präkanzeröse dysplastische oder bereits kanzeröse Veränderungen. In manchen Fällen von schwergradiger Epitheldysplasie und bereits infiltrierenden Karzinomen erschien das rötlich-violette Fluoreszenzsignal intensiver als bei mittelgradigen Epitheldysplasien. Eine sichtbare Abstufung der Fluoreszenzintensität war innerhalb der höhergradigen Dysplasien und vor allem zwischen Carcinoma in situ und bereits infiltrierendem Tumor jedoch nicht erkennbar.

Einzelne Fälle bereits invasiver Larynxkarzinome wiesen Anteile einer orangefarbenen Fluoreszenz auf, die typischerweise auf eine bakterielle Besiedelung zurückzuführen ist.

Sofern z. B. bei ulzerierten Tumoren im Rahmen der Intubation oder durch Einsetzen des Laryngoskopes Blutungen oder Hämatombildung auftraten, war das Autofluoreszenzsignal nur eingeschränkt beurteilbar, da das Häm-Molekül des Blutfarbstoffes zu einer starken Absorption des Blaulichtes führt.

Vernarbungen im Bereich der Larynxschleimhaut, wie sie nach wiederholten Eingriffen oder Strahlentherapie zu beobachten sind, zeigten ebenfalls einen Verlust der typischen Grünfluoreszenz, mit einer Fluoreszenzfärbung ähnlich der in dysplastischen Arealen. In bilateralen, einseitig bereits operierten Stimmlippenläsionen wurden diese Vernarbungen oft als Nebenbefund dokumentiert. Da klinisch kein Verdacht auf ein Rezidiv bestand, wurden sie nicht routinemäßig biopsiert.

In acht Fällen fanden sich chronisch entzündlichen Veränderungen im Sinne einer chronischen Laryngitis, die mit einfacher Hyperplasie oder geringgradiger Dysplasie des Epithels einhergingen.

Zusammenfassend ließen sich bei 109 Patienten folgende histopathologischen Diagnosen feststellen: 21 Fälle von einfacher Epithelhyperplasie, 28 Fälle von geringgradiger Epitheldysplasie, 18 Fälle von mittelgradiger Epitheldysplasie, 13 Fälle von schwergradiger Epitheldysplasie übergehend in ein Carcinoma in situ und 29 Fälle von infiltrierendem Plattenepithelkarzinom des Larynx.

Besonders hervorgehoben werden muss, dass mit Hilfe der Autofluoreszenzendoskopie jene Fälle mit präkanzerösen und kanzerösen Veränderungen (mittel- und schwergradige Epitheldysplasie, Carcinoma in situ, invasive Karzinome: n=60) von solchen Fällen mit einfacher Epithelhyperplasie oder leichtgradiger Epitheldysplasie (n=49) prä- und intraoperativ unterschieden werden konnten.

Im Vergleich der präoperativen Diagnosen mit dem histopathologischen Befund als Goldstandard ergab sich in der indirekten Laryngoskopie unter reiner Weißlichtbetrachtung eine Übereinstimmung der Diagnosen in 78% (85 von 109), unter Verwendung der Autofluoreszenzendoskopie stieg der Anteil auf 90% (98 von 109). Dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant ( $p=0.0003$ ), basierend auf einem Test für die Differenz korrelierter Proportionen. Die Sensitivität der indirekten Laryngoskopie unter regulärem Weißlicht für den Nachweis präkanzeröser und kanzeröser Läsionen betrug 85%, die Spezifität 69%. Im Vergleich dazu erhöhte sich die Sensitivität durch Verwendung der Autofluoreszenzendoskopie auf 92% ( $p=0.0455$ ), die Spezifität auf 87% ( $p=0.0027$ ). Interessant ist hierbei die vergleichsweise hohe Verbesserung der Spezifität um 18%.

Demgegenüber wiesen mikrolaryngoskopische Untersuchungen unter Weißlicht zunächst eine höhere Rate von 89% (97 von 109) an übereinstimmenden Diagnosen mit dem histopathologischen Befund auf <sup>Arens et al, 2004b</sup>. Die Autofluoreszenzendoskopie erhöhte diesen Anteil auf 95% (103 von 109,  $p=0.0143$ ). Die Sensitivität der Mikrolaryngoskopie unter Weißlicht von 92% wurde durch die Autofluoreszenzuntersuchung auf 97% erhöht ( $p=0.0836$ ), die Spezifität von 86% auf 92% ( $p=0.0836$ ).

Falsch positive Diagnosen resultierten sowohl in der indirekt laryngoskopischen (6 Fälle) als auch in der mikrolaryngoskopischen Autofluoreszenzendoskopie (4 Fälle) in Fällen mit Vernarbungen oder histologisch nachweisbarem chronischem Entzündungsinfiltrat. In den Narben überwiegen die zwar reißfesten, aber kaum elastischen Kollagenfasern Typ I, die ebenfalls zu veränderten Fluoreszenzeigenschaften führen. Trotzdem zeigt sich in diesen Fällen im Gegensatz zur Dysplasie ein homogener Autofluoreszenzverlust. Weiterhin fanden sich indirekt laryngoskopisch 5, mikrolaryngoskopisch 2 falsch negative Diagnosen in Fällen mit ausgeprägter Keratose. Hier verdeckte histologisch die verbreiterte, teils dicht verhornende Hyperparakeratose die darunter gelegene schwergradige Dysplasie.

Tabelle 7.2.1 Zusammengefasste Vierfeldertafeln der direkten und indirekten Autofluoreszenzlaryngoskopie.

n=109	Histologie		
		Positiv	Negativ
<b>Indirekte Weißlicht -Laryngoskopie</b>	Positiv	51	15
	Negativ	9	34
<b>Indirekte Autofluoreszenz - Laryngoskopie</b>	Positiv	55	6
	Negativ	5	43
<b>Weißlicht - Mikrolaryngoskopie</b>	Positiv	55	7
	Negativ	5	42
<b>Autofluoreszenz - Mikrolaryngoskopie</b>	Positiv	58	4
	Negativ	2	45

### 7.2.5 Diskussion

Das Plattenepithelkarzinom des Kehlkopfes zählt mit rund einem Drittel zu den häufigsten Malignomen des Kopf-Hals-Bereiches. Auch Plattenepitheldysplasien der Larynxschleimhaut können als Präkanzerosen in ein infiltrierendes Karzinom übergehen, wobei mittelgradige und höhergradige Plattenepitheldysplasien obligate Präkanzerosen darstellen. Kleinsasser ermittelte Latenzphasen zwischen fünf und sieben Jahren, bis ein Carcinoma in situ in ein invasives Karzinom übergeht <sup>Kleinsasser, 1987</sup>.

Die operative Therapie des Kehlkopfkarcinoms und seiner Vorstufen stellt an den Larynxchirurgen hohe Ansprüche. Neben dem kurativen Aspekt einer Behandlung sollte die Erhaltung der grundlegenden Kehlkopffunktionen, wie Atmung, verbale Kommunikation und Aspirationsschutz beim Schluckakt, berücksichtigt werden. Um diese Erwartungen zu erfüllen, verbindet das Prinzip der Phonomikrochirurgie des Kehlkopfes onkologische mit funktionserhaltenden Anforderungen unter Verwendung fortschrittlicher mikrochirurgisch laryngoskopischer Techniken. Hierbei trägt eine möglichst genaue prä- und perioperative Diagnostik mit Einschätzung des Ausmaßes der Läsion und Bestimmung der Tumorgrenzen

wesentlich zu dem Konzept der funktionserhaltenden Phonochirurgie maligner Kehlkopfveränderungen bei <sup>Colden et al, 2001</sup>.

Die Prognose für Patienten mit präkanzerösen und kanzerösen Veränderungen der laryngealen Schleimhaut steigt durch eine Verbesserung in der Prävention, d.h. einer frühen Abklärung der Schleimhautläsion. Die herkömmlichen diagnostischen Methoden sind auch für den erfahrenen Kliniker begrenzt, da sowohl die Laryngoskopie als auch die konventionellen bildgebenden Verfahren oft keine verlässlichen Ergebnisse in der Erkennung dieser flachen, frühen Veränderungen der Larynxschleimhaut liefern.

Die präoperative Diagnostik erfolgt üblicherweise bereits ambulant mittels indirekter Lupenlaryngoskopie. Die klinischen Diagnosen können hierbei oftmals ungenau in ihrer Einschätzung der Dignität und der Ausdehnung der Läsionen sein. Daher sind die Bezeichnungen wie Leukoplakie, Erythroplakie und Pachydermie rein deskriptive Beschreibungen der Veränderung die dennoch sehr unterschiedliche Dignitäten aufweisen können.

Um dem Laryngologen die präoperative Einschätzung einer Kehlkopfläsion zu erleichtern, sind komplementäre Untersuchungsmethoden somit von großem Wert. Neben der Stroboskopie, die in der Einschätzung der Invasivität von Tumoren von Nutzen ist, eröffnet die Autofluoreszenzendoskopie neue Möglichkeiten in der Beurteilung der Dignität und der lateralen Ausdehnung präkanzeröser und kanzeröser Veränderungen an der Oberfläche der Läsion.

Wie wir in unseren Untersuchungen nachweisen konnten, treten Veränderungen der gewebstypischen Fluoreszenz durch folgende mögliche Ursachen auf:

- a. Verdickung des Epithels
- b. Kerndichte der Epithelzellen
- c. Veränderter Stoffwechsel in Tumorzellen, vermehrtes Vorliegen von Flavinen in der nicht fluoreszierenden reduzierten Form

So zeigen bereits mittelgradig dysplastisch veränderte Schleimhautareale eine signifikante Verminderung der Grünfluoreszenz. Hochgradige Dysplasien und infiltrierende Tumoren imponieren durch eine Verschiebung der Fluoreszenz in den Rotbereich <sup>Zargi et al, 1997 & 2000, Arens et al, 1999a, Malzahn et al, 2002</sup>. Streng genommen wird für Autofluoreszenzuntersuchungen an der Schleimhaut möglichst monochromatisches Exzitationslicht, wie in Lasersystemen, gefordert <sup>Lam et al, 1998</sup>. Das in unserer Studie verwendete D-Light AF-System mit seinem schmalbandigen Exzitationsspektrum ( $\lambda = 375 - 440\text{nm}$ ) zeigte jedoch in der klinischen Anwendung eine exzellente Bildqualität, wobei die Anwendung sehr einfach und der Kostenaufwand im Vergleich zu den Lasersystemen deutlich geringer ist. Zusätzlich konnte Coghlan tierexperimentell zeigen, dass gerade die Exzitationswellenlängen zwischen 400 - 440nm besonders hilfreich bei der Erkennung von Fluoreszenzänderungen durch Dysplasien oder Karzinome des Plattenepithels sind <sup>Coghlan et al, 2000</sup>.

Die beste Bildqualität der indirekten Autofluoreszenzendoskopie war vergleichbar mit derjenigen der Mikrolaryngoskopie. Variationen in der Bildgebung erklären sich durch die Bewegung des Patienten und die etwas geringere Lichtausbeute während der indirekten Autofluoreszenzendoskopie. Die Mikrolaryngoskopie erlaubte hingegen noch bessere Exposition der Läsionen sowie eine genauere Untersuchung der Ventrikelschleimhaut, der vorderen Kommissur und der subglottischen Region. Diese Vorteile zeigten sich vor allem bei Patienten mit hyperplastischen Taschenfalten.

Die vorliegenden Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen eine generelle Tendenz, keratotische Veränderungen der Kehlkopfschleimhaut klinisch als obligat präkanzerös einzustufen. Hier konnte bereits die indirekte Autofluoreszenzlaryngoskopie die Spezifität der Untersuchung um 18% erhöhen, die Sensitivität um 6% gegenüber der normalen Weißlichtendoskopie.

Die mikrolaryngoskopische Autofluoreszenzendoskopie ermöglichte eine Unterscheidung zwischen maximal geringgradig dysplastischen Schleimhautveränderungen und obligaten

Präkanzerosen mit einer Sensitivität von 97% und einer Spezifität von 92%. So konnten mit Hilfe der indirekten Autofluoreszenzendoskopie in 12%, mit Hilfe der direkten Autofluoreszenzendoskopie in 6% der Patienten mit malignitätsverdächtigen Schleimhautveränderungen der endgültigen histologischen Diagnose entsprechend besser eingeschätzt werden. Ferner wurden dysplastische Ausläufer von invasiven Tumoren durch das Autofluoreszenzlicht deutlich besser gegenüber der normalen Schleimhaut kontrastiert. Zusätzlich wurde bei vier Patienten mit bilateralen Schleimhautveränderungen anhand der Autofluoreszenzendoskopie das ursprüngliche Behandlungskonzept geändert und zunächst die gegenseitige Stimmlippe operiert. Auch Befunde mit autofluoreszenzendoskopisch wenig verdächtigen Leukoplakien führten wir funktionserhaltende partielle Dekortikationen durch.

Während der indirekten Autofluoreszenzendoskopie fanden sich fünf und während der Mikrolaryngoskopie zwei falsch negative Einschätzungen der Diagnose. In allen Fällen breiteten sich höhergradig dysplastische Zellverbände vorwiegend in den basalen Schichten aus und wurden zudem durch hyperkeratotische Zellschichten an der Oberfläche überdeckt (Umbrella-Effekt) <sup>Dreyer et al., 1995</sup>. Der fluoreszenzverstärkende Effekt der Keratose überdeckte somit die dysplastische Region mit dem zu erwartenden Fluoreszenzverlust.

In einigen Untersuchungen wurde aufgrund von Vernarbungen der Stimmlippenbefund als präkanzerös fehleingeschätzt. Hier zeigt sich der Zusammenhang der zarten Grünfluoreszenz mit einem intakten submukösen Fasergerüst. Bei Vernarbungen kommt es zu einem Umbau mit unregelmäßigen kollagenen Fasern und bei relativ frischen Narben auch zu einem vermehrten Zellgehalt z.B. an Fibroblasten und Makrophagen, die ebenfalls zu veränderten Fluoreszenzeigenschaften führen. Trotzdem zeigt sich in diesen Fällen im Gegensatz zur Dysplasie ein homogener Autofluoreszenzverlust. In Kenntnis dieses Effektes sollten

irreguläre Autofluoreszenzveränderungen innerhalb einer Vernarbung eines vormals behandelten Malignoms beachtet und im Zweifelsfall biopsiert werden.

Drei der falsch positiven Fälle sehen wir in Zusammenhang mit einer begleitenden chronischen Laryngitis. Hierbei handelte es sich um Patienten mit einfacher Plattenepithelhyperplasie oder geringgradiger Plattenepitheldysplasie mit begleitendem chronisch entzündlichem Rundzellinfiltrat und beginnendem narbigem Umbau mit Vermehrung von kollagenen Fasern sowie epithelialer Verdickung. Zusammen mit häufig vermehrter Durchblutung in diesen Arealen führen offensichtlich chronische Entzündungsinfiltrate, ebenfalls zu einem Verlust der Grünfluoreszenz und können somit zu einer Überschätzung des Befundes führen.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass sowohl die indirekte, als auch die mikrolaryngoskopische Autofluoreszenzendoskopie eine gute Differenzierung zwischen gutartiger Plattenepithelhyperplasie einerseits und obligat präkanzerösem und kanzerösem Epithel andererseits ermöglicht. Die Genauigkeit der Diagnoseeinschätzung zeigt sich in beiden Anwendungen durch erhöhte Sensitivität und Spezifität im Vergleich zur reinen Weißlicht-Endoskopie. Weiterhin erleichtert der erhöhte farbliche Kontrast die Abgrenzung dysplastischer Ausläufer bei infiltrierenden Tumoren. Die indirekte Autofluoreszenz kommt dabei in der präoperativen Diagnostik bereits bei ambulanten Patienten zum Einsatz, während die mikrolaryngoskopische Autofluoreszenzendoskopie als komplementäre intraoperative Methode verwendet wird. Aufgrund der teilweise hochsignifikanten Unterschiede zwischen der Autofluoreszenz- und Weißlichtendoskopie sollte diese Methode wegen der zusätzlichen Informationen über die Tumorausdehnung und Dignität der epithelialen Veränderung als nützliche Ergänzung zur Verbesserung der regulären endoskopischen Untersuchung eingestuft werden.

## 7.3 Spektroskopische Fluoreszenzanalyse

### 7.3.1 Einleitung

Neben der Autofluoreszenzendoskopie wird die aufwendigere Autofluoreszenzspektroskopie als vielversprechende Methode angesehen, um neoplastisches von normalem Gewebe zu unterscheiden. Dieses Verfahren konnte bisher erfolgreich an verschiedenen Organsystemen, wie z.B. der Lunge, der Brust <sup>Tang et al, 1989</sup>, den Bronchien <sup>Hung et al, 1991</sup>, der Cervix <sup>Ramanujam et al, 1994</sup> sowie im Kopf-Hals-Gebiet <sup>Betz et al, 1999; Gillenwater et al, 1998; Ingrams et al, 1997; Eker et al, 2001</sup>, eingesetzt werden. Im Unterschied zur Autofluoreszenzendoskopie bei der die Farbveränderung visuell durch den Untersucher beurteilt wird, erfolgt bei der Autofluoreszenzspektroskopie die detaillierte Messung der Intensität verschiedener Emissionswellenlängen. Die hierbei erzielten objektiven Messergebnisse können anhand des endoskopischen Bildes subjektiv nachvollzogen werden.

Gillenwater zeigte bei einer Anregung des Gewebes bei 337nm, dass er dysplastische oder kanzerisierte Mundschleimhaut mit einer Sensitivität von 88% und Spezifität von 100% von normaler Schleimhaut differenzieren konnte <sup>Gillenwater et al, 1998</sup>. Ingrams verwendete zur Beurteilung der Mundschleimhaut eine Exzitationswellenlänge von 410nm, wodurch eine Differenzierung in benigne und maligne Schleimhautläsionen mit einer Sensitivität, Spezifität und diagnostischen Genauigkeit von 90, 91 und 91% erzielt werden konnte <sup>Ingrams et al, 1997</sup>.

Eker war in der bisher einzigen Studie einer *in-vivo*-Spektroskopie beim Larynxkarzinom in der Lage, durch Anregung der Schleimhaut mittels Laserlicht bei 337nm und 405 nm eine spektroskopische Differenzierung zwischen benignem und malignem Gewebe in 85% der untersuchten Fälle herbeizuführen <sup>Eker et al, 2001</sup>.

Im Rahmen der in dieser Arbeit vorgestellten spektrometrischen Untersuchungen beim Stimmlippenkarzinom und seiner Vorstufen sollten die in der Autofluoreszenzendoskopie nachgewiesenen Farbveränderungen in ihrer Intensität und Zusammensetzung objektiviert

werden. Zusätzlich sollte geklärt werden, in wie weit die Autofluoreszenzspektroskopie in der Lage ist die einzelnen Dysplasiestadien voneinander zu unterscheiden

### **7.3.2 Material und Methoden**

42 Patienten mit Verdacht auf präkanzeröse oder kanzeröse Veränderungen der Stimmlippen, die sich einer Mikrolaryngoskopie unterzogen, wurden intraoperativ spektrometrisch untersucht. Hierbei erfolgte die Anregung mit gefiltertem Blaulicht ( $\lambda = 375 - 440\text{nm}$ ) einer Xenon-Lichtquelle. Zur Quantifizierung der Autofluoreszenz von den laryngealen Schleimhautveränderungen wurden im Vergleich die vom Tumor befallene Stimmlippe sowie die gesunde, nicht betroffene Stimmlippe als Kontrolle untersucht. Die Untersuchungen fanden im Kontakt mit der Stimmlippenschleimhaut statt.

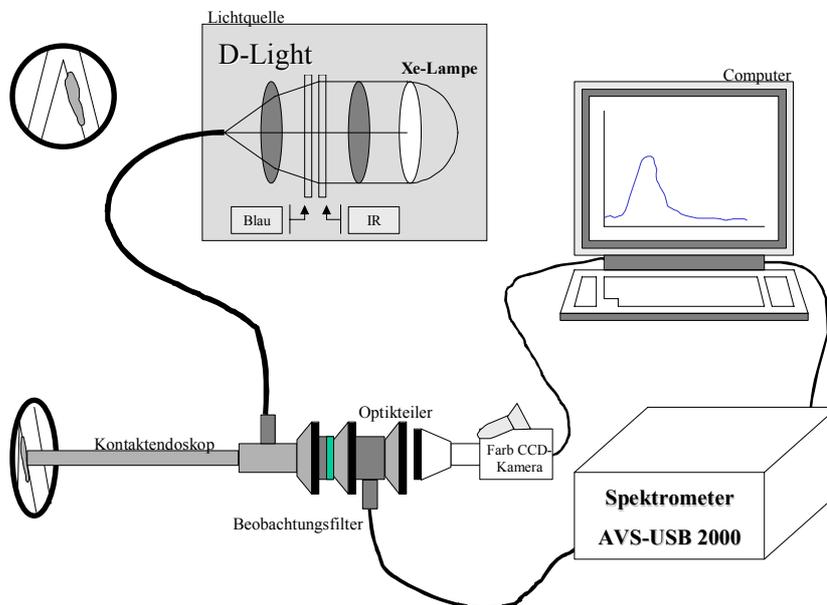
Hierzu wurde ein Kontaktendoskop (Karl Storz 8715 A) bei 60x Vergrößerung ohne Anfärbung des Stimmlippenepithels verwendet. Die Kontaktendoskopie ermöglicht normalerweise während der Mikrolaryngoskopie die *in-vivo*-Betrachtung verschiedener zellulärer Veränderungen durch Anfärbung der oberen Zellschichten mit Methylenblau 1%.

Alle Spektraldaten wurden im abgedunkelten Raum erhoben, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das Umgebungslicht zu verhindern. Die Eichung des Spektrometers erfolgte über eine Argon-Quecksilberlampe.

Ein Strahlenteiler (Fa. Storz, Tuttlingen) am Okular des Endoskopes sorgte für eine 70% Auskopplung des Fluoreszenzlichtes über eine 200 $\mu\text{m}$ -Lichtfaser zu einem optischen Vielkanalanalysator (AVS-USB200). Die verbleibenden 30% des remittierten Lichtes ermöglichten dem Untersucher die videoendoskopische Kontrolle des ausgewählten Schleimhautareals. Die Integrationszeit betrug 100 msec für die Weißlichtendoskopie und 2000 msec für die Blaulichtendoskopie. Die endoskopisch fluoreszenzspektrometrisch vermessene Fläche betrug  $7\text{mm}^2$ . Zur Auswertung wurde die Software der Fa. Aventis verwendet.

Zur genauen Analyse der Fluoreszenzbanden wurde ein Differenzspektrum sowie deren erste Ableitung zwischen dem spektrometrischen Ergebnis normaler und pathologisch veränderter Schleimhaut durchgeführt. Anschließend wurden die selektierten Fluoreszenzbanden bezüglich der Intensitätsunterschiede zwischen normaler und pathologischer Schleimhaut untersucht. Hierzu wurde eine integrierte Fläche unterhalb der selektierten Peaks untersucht. Diese Fläche umfasste 18 Einheiten mit insgesamt 6,6nm.

Abbildung 7.3.1 Versuchsaufbau der intraoperativen Autofluoreszenzspektroskopie



Versuchsaufbau der intraoperativen Spektroskopie

Abhängig von der klinischen Diagnose und der Ausdehnung der Läsionen erfolgten mikrolaryngoskopische Exzisionsbiopsien, Dekortikationen der Stimmlippen, oberflächliche oder partielle Chordektomien sowie Gewebsbiopsien aus repräsentativen Regionen bei mikrolaryngoskopisch nicht operablen, ausgedehnteren Tumoren oder Feldkanzerisierungen. 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

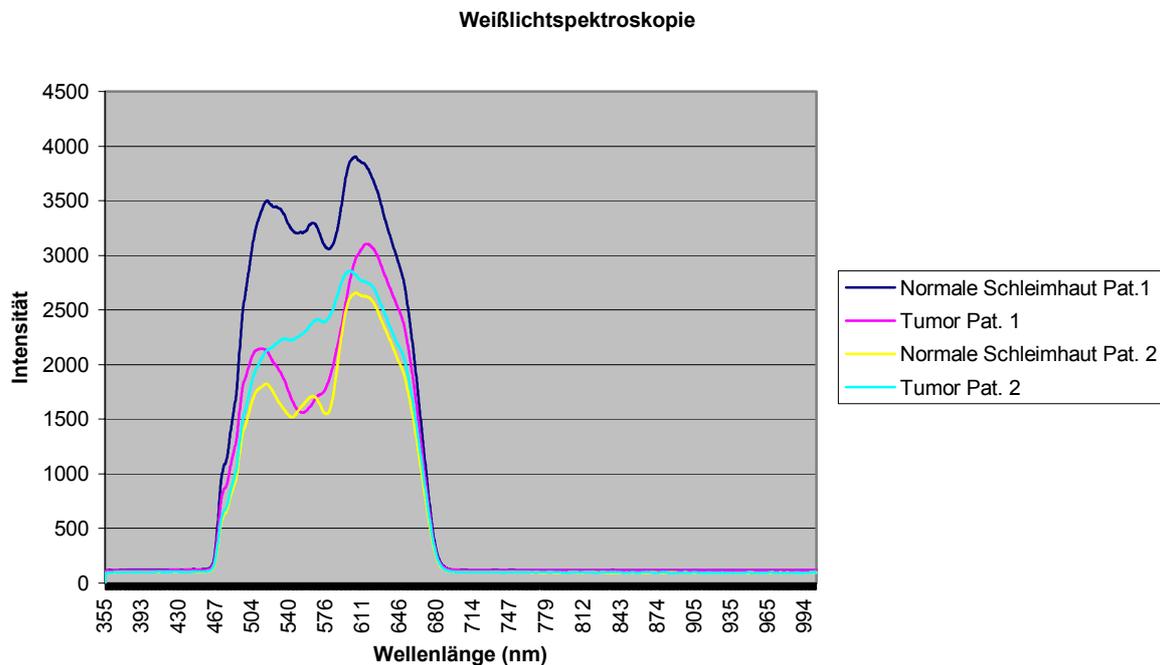
Gießen. Die histopathologische Beurteilung erfolgte in erster Linie durch unabhängige Pathologen des Institutes. Zusätzlich wurden die Präparate durch eine histopathologisch erfahrene Hals-Nasen-Ohrenärztin (H. G.) oder durch den in dieser Studie involvierten laryngologisch erfahrenen Pathologen (T. D.) überprüft, jeweils ohne vorherige Kenntnis des klinischen Befundes.

### **7.3.3 Ergebnisse**

Das im Weißlicht erstellte Spektrum verhält sich uneinheitlich. Die Maxima sind im Bereich zwischen 460 – 695 nm nachweisbar. Zumeist findet sich eine breite Kurve mit hoher Intensität in allen Wellenlängenbereiche. Die Peaks liegen bei 515, 560 und 605 nm. Hierbei kann es durch den Tumor sowohl zu einem Intensitätsverlust als auch zu einer Zunahme der Intensität kommen. Die klare Zuordnung von Absorptionsbanden ist hier nur schlecht möglich. Dies zeigt, dass sich das Weißlichtbild eher uneinheitlich darstellt und eine durch den Tumor hervorgerufene Farbverschiebung für den Untersucher schwierig zu erkennen ist. Durch das Endoskop kann nur eine Farbschwankung von blassrosa bis intensiv rot beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu konnte im Kontaktverfahren bei normaler Schleimhaut unter Blaulichtanregung eine deutliche Grünfluoreszenz beobachtet werden, wobei die Intensität der Grünfluoreszenz von den Taschenfalten über die Stimmlippen bis in den subglottischen Bereich hin zunahm. Gemittelte Spektren der gesunden laryngealen Schleimhaut zeigten Fluoreszenzmaxima bei 475, 515, 550, 600 und 630 nm. Bei 475 nm betrug die Intensität durchschnittlich 5865 Counts, bei 515 nm 11200, bei 550 nm 8173, bei 600 nm 5683 und bei 630 nm nur 3935. Die hohe Anzahl der Counts bei 515 nm demonstrierte die Dominanz dieser Wellenlänge beim normalen Epithel, das fluoreszenzendoskopisch hellgrün erschien.

Abbildung 7.3.2 Die Spektroskopie der Stimmlippenschleimhaut im Weißlicht zeigt die unterschiedlichen Intensitäten sowohl im Weißlicht der normalen als auch der tumorösen Schleimhaut. Hierbei wird die Problematik der unregelmäßigen Kontrastierung des Tumors im Weißlichtbild deutlich herausgestellt.

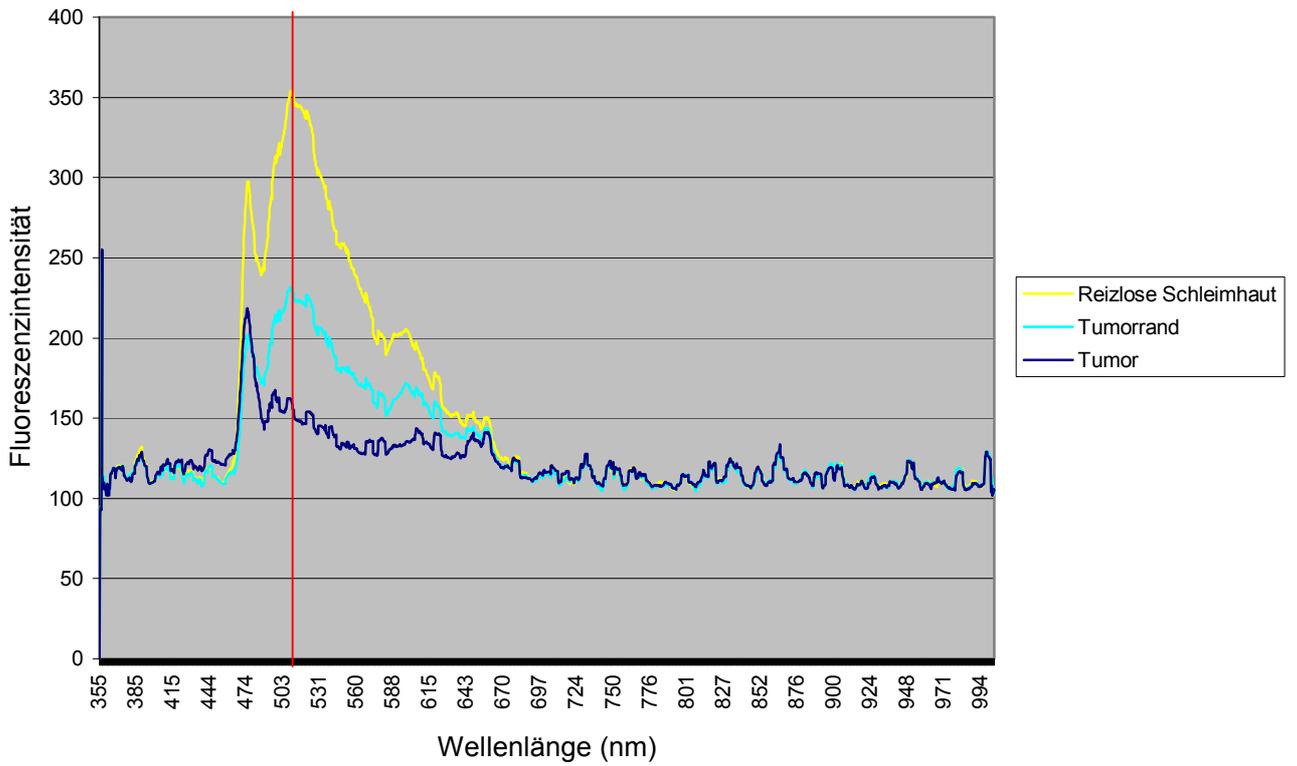


Präkanzeröse und kanzeröse Veränderungen wiesen zwischen 450 und 700 nm eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität über das gesamte Spektrum auf. Hierbei fiel der Autofluoreszenzverlust im Bereich von 515 nm am stärksten aus. Beim invasiven Karzinom sank die Autofluoreszenzintensität bei 515 nm gegenüber dem gesunden Epithel der kontralateralen Stimmlippe um durchschnittlich 70%. Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests konnten wir einen hoch signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) für die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten in den beiden Gruppen Tumor und Normalgewebe feststellen. Bei 630 nm im roten Bereich des Spektrums hingegen betrug der Autofluoreszenzverlust lediglich 38%. Die Zunahme des Intensitätsverlust war bei 515 nm zwischen einfach dysplastischem Epithel und mittelgradig dysplastischem Epithel am größten. Zwischen diesen beiden Dysplasiestadien kam es zu einem 30% Intensitätsverlust der Grünfluoreszenz. Dies erklärt die auch fluoreszenzendoskopisch gute Differenzierbarkeit zwischen normalem und einfach dysplastischem Gewebe auf der einen und präkanzerösem sowie kanzerösem Epithel

auf der anderen Seite. Auch bei 550 nm kommt es zu einem starken Abfall auf 36,2 % der Ausgangsintensität beim infiltrierenden Karzinom. Jedoch beträgt auch bei einer einfachen Epitheldysplasie der Verlust schon ca. 50 % der Ausgangsintensität.

Abbildung 7.3.3 Autofluoreszenzspektren einer Patientin mit linksseitigem Stimmlippenkarzinom (M.R.). Anhand der drei spektrometrischen Messungen lässt sich der ausgeprägte Intensitätsverlust bei 515 nm darstellen. Das darunterliegende Differenzspektrum stellt das Resultat der Subtraktion der Spektroskopiekurve der normalen Schleimhaut von der tumorösen Schleimhaut dar (Abbildung 7.3.4).

### Autofluoreszenzspektroskopie des Stimmlippenkarzinoms



### Differenzspektrum zwischen Tumor und normaler Stimmlippen Schleimhaut

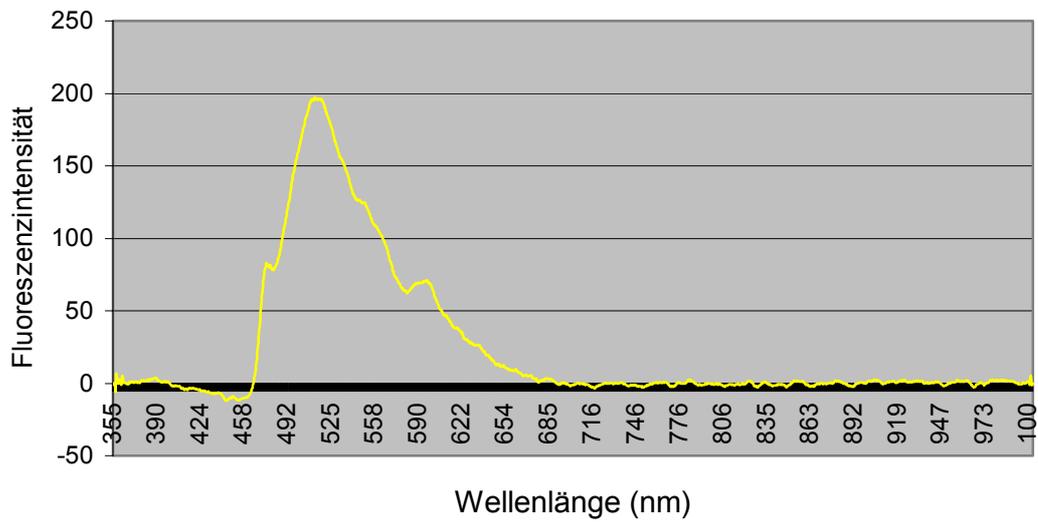
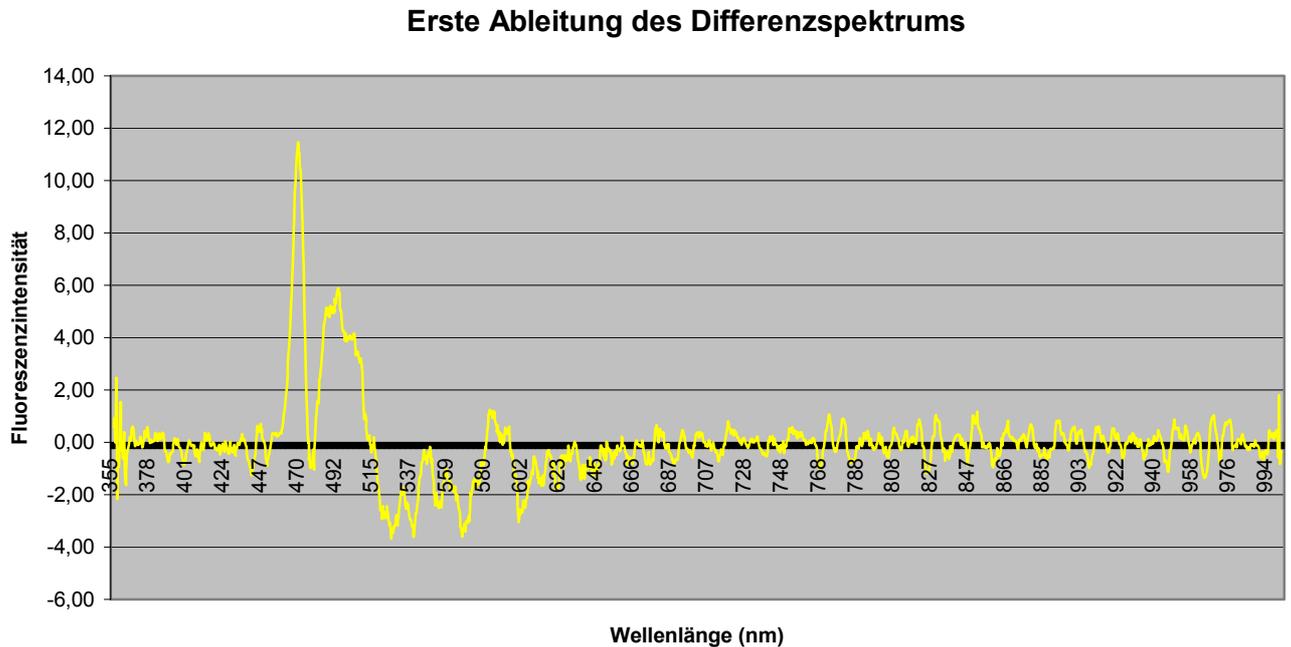


Abbildung 7.3.4 Die erste Ableitung des Differenzspektrums hilft bei der weiteren Herausarbeitung von Peaks der Spektroskopie.



Durch diese Ergebnisse wird offensichtlich, dass die Grünfluoreszenz in Relation deutlich stärker abfällt als die violette und rote Fluoreszenz, wodurch sich das Autofluoreszenzbild zwischen den beiden Farben deutlich verändert. Das Verhältnis der Intensitäten von grün zu rot verschiebt sich von 2,8:1 der normalen endolaryngealen Schleimhaut zu 1,5:1 der präkanzerösen bzw. kanzerösen Läsionen. Hierdurch wird es möglich die normale Schleimhaut von der maligne veränderten Schleimhaut zu differenzieren. Trotzdem ist es auch mit der Autofluoreszenzspektroskopie am laryngealen Epithel nicht möglich, die Übergänge zwischen den einzelnen Dysplasiestadien messtechnisch zu erfassen. Im Vergleich zur Autofluoreszenzendoskopie zeigt sich hierbei ein annähernd identisches Bild. Schon die mittelgradigen Dysplasien zeigen einen deutlichen Autofluoreszenzverlust, der sich in der Farbveränderung von grün zu rot-violett ausdrückt. Interessanterweise zeigte sich bei stärker verhornenden Läsionen ein stärker ausgeprägtes Maximum bei 475 nm.

### 7.3.4 Diskussion

Die ersten experimentellen Fluoreszenzuntersuchungen an Tumorgeweben wurden bereits 1924 von Policard unter Verwendung der Wood-Lampe durchgeführt <sup>Policard, 1924</sup>. Jahrzehnte später griff Alfano diese Methode wieder auf und führte erstmalig spektroskopische Autofluoreszenzuntersuchungen an nativem Mammagewebe zur Unterscheidung von gutartigem und malignem Gewebe durch <sup>Alfano et al, 1984</sup>. Im Jahre 1995 schließlich konnte Kolli diese Ergebnisse für Schleimhautveränderungen des oberen Aerodigestivtraktes bestätigen <sup>Kolli et al, 1995a, 1995b</sup>. Fluoreszenzspektroskopische Techniken zur Erkennung maligner Veränderungen *in vivo* werden in verschiedenen Untersuchungen seit einigen Jahren eingesetzt. Die meisten der frühen Studien verwendeten exogene Fluorophore, wie z.B. Hämatoporphyrin, die vornehmlich im malignen Gewebe kumulieren <sup>Harris & Werkhaven, 1987</sup>. Obwohl heute noch die topische Applikation von 5-ALA induzierter Fluoreszenz häufig zur photodynamischen Diagnostik und Therapie eingesetzt wird, kann, wie gezeigt wurde, die Autofluoreszenz ebenso effektiv zur primären Diagnostik eingesetzt werden.

Die für jedes Gewebe charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften resultieren im wesentlichen durch den Gehalt fluoreszierender Moleküle und durch unterschiedliche Gewebsstrukturen. Die Autofluoreszenzdiagnostik der laryngealen Schleimhaut ist eine reine Ausbreitungsdiagnostik zur Erfassung der Läsion sowie der wahren horizontalen Flächenausdehnung präkanzeröser und kanzeröser Schleimhautveränderungen. Die Tumordicke eines Malignoms wird dabei nicht berücksichtigt.

Blaues Licht ( $\lambda = 375\text{--}440\text{ nm}$ ) induziert hierbei in der Submukosa Fluoreszenzlicht mit einem schwächeren Rot- und einem stärkeren Grünanteil. Normales Gewebe lässt beide Komponenten passieren und erscheint daher grün. Das bedeutet, dass unter normalen Umständen das während der Untersuchung applizierte Licht die Kehlkopfschleimhaut

vollständig penetriert und bis in die Submukosa gelangt. Dadurch wird auch teilweise Elastin und Kollagen der Submukosa mit angeregt.

In der spektrometrischen Messung lag das Maximum der Autofluoreszenzintensität im grünen Bereich bei 515 nm. Alle Tumoren zeigten gegenüber der gesunden Schleimhaut einen deutlichen Autofluoreszenzverlust, der sich auch vor allem im grünen Bereich des Spektrums manifestierte. Das gemittelte Autofluoreszenzspektrum der mittelgradigen Dysplasien, Carcinomata in situ und Karzinome war in seiner Intensität niedriger als das mittlere Spektrum des jeweils umgebenden gesunden Epithels. Weißlicht hingegen wird von tumorösem und normalem Gewebe in etwa gleichstark remittiert, so dass die Kontrastunterschiede gering sind. Durch die starke Kontrastierung in der Autofluoreszenzuntersuchung wird es bei einer Detektionsrate von 95% möglich, die untersuchten Schleimhautveränderungen präzise vom normalen Gewebe abzugrenzen.

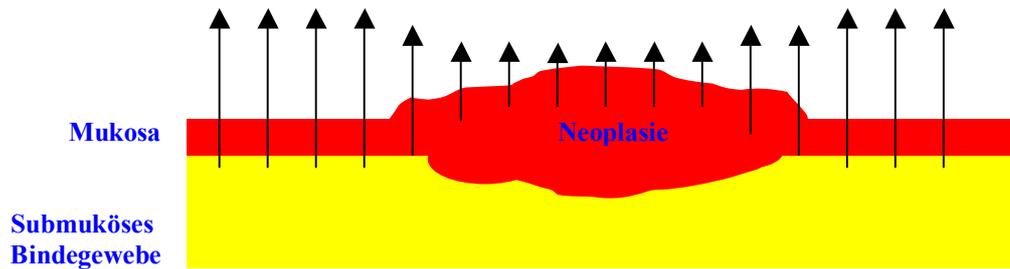
Eine Unterscheidung der einzelnen Dysplasiestadien gelingt mit der Autofluoreszenzspektroskopie nicht. Der Autofluoreszenzverlust ist bei einer mittelgradigen Epitheldysplasie in einem ähnlichen Maße ausgeprägt wie bei einem Carcinoma in situ oder Karzinom. Sobald das eingestrahlte blaue Licht bei einer Epitheldicke von  $>500\text{nm}$  nicht mehr die Submukosa erreicht und nur noch im Epithel absorbiert wird, ist es gleichgültig ob die Läsion  $750\text{nm}$  oder  $1500\text{nm}$  dick ist, da das bestrahlte Gewebe nur noch die ausschließliche Epithelfluoreszenz remittiert, die wiederum unabhängig vom Dysplasiegrad ist. Ebenso kann auch durch diese Methode nicht zwischen einem noch intraepithelialen und einem infiltrativen Prozess unterschieden werden, d.h. bevor es zur Anregung der Bindegewebsfluoreszenz kommt, wird das Anregungslicht durch das schwächer fluoreszierende Epithel abgeschwächt. An Stellen mit verdicktem Epithel ist diese Abschwächung größer und auch das emittierte Fluoreszenzlicht wird stärker gedämpft.

Das blaue Anregungslicht bei einer Wellenlänge von 400nm hat eine Eindringtiefe in die normale Mukosa und Submukosa von ungefähr 500µm <sup>Wang, 1996</sup>. Gottschalk gibt eine optische Eindringtiefe für das verwendete Anregungslicht von ca. 300µm an <sup>Gottschalk, 1993</sup>.

Die einzigen endogenen Fluorophore, die bei dem von uns verwendeten Anregungswellenlängenbereich in Summation für einen erheblichen Beitrag zur Autofluoreszenz infrage kommen, sind Keratin, oxydierte Flavine (FAD), Porphyrine, Elastin und Kollagen. Jedoch kann aufgrund der Summation der Effekte nicht einer dieser Gewebekomponenten isoliert für die Erklärung des Autofluoreszenzverlustes herangezogen werden.

Insgesamt kommt es also bei präkanzerösen und kanzerösen Schleimhautveränderungen zu einer Verringerung der beobachtbaren Autofluoreszenzintensität. Überschreitet die Epitheldicke hierbei eine gewisse Grenze (ca. 600 µm), kann das anregende Fluoreszenzlicht die stark fluoreszierende Submukosa mit Elastin und Kollagen nicht mehr erreichen und dringt lediglich bis ins Epithel vor. Bei hyperkeratotischen Arealen konnte eine vermehrte Intensität bei 475 nm beobachtet werden, die auf eine vermehrte Anregung von Keratin hindeuten. Das helle Aufleuchten des Keratins an dem auch eine Reflexion des anregenden Lichtes auftritt, kann die Beurteilung des darunterliegenden Gewebes deutlich erschweren. Die Verdickung des Oberflächenepithels führt daraufhin durch Absorption und Streuung des anregenden blauen Lichtes zu einer Abschwächung des remittierten grünen Anteils und erscheint daher in dem veränderten Schleimhaut Areal rötlich-violett <sup>Koenig et al, 1996; Schomacker et al, 1992</sup>. Pollack und Hung führen eine Reduktion der Autofluoreszenzintensität über Tumorgewebe auf eine niedrigere Konzentration von oxydierten Flavinen in Tumoren zurück <sup>Pollack et al, 1942; Hung, 1991</sup>.

Abbildung 7.3.6 Schematische Darstellung der remittierten Fluoreszenz



## 7.4 Klinische Relevanz im Alltag in Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchers

### 7.4.1 Material und Methode

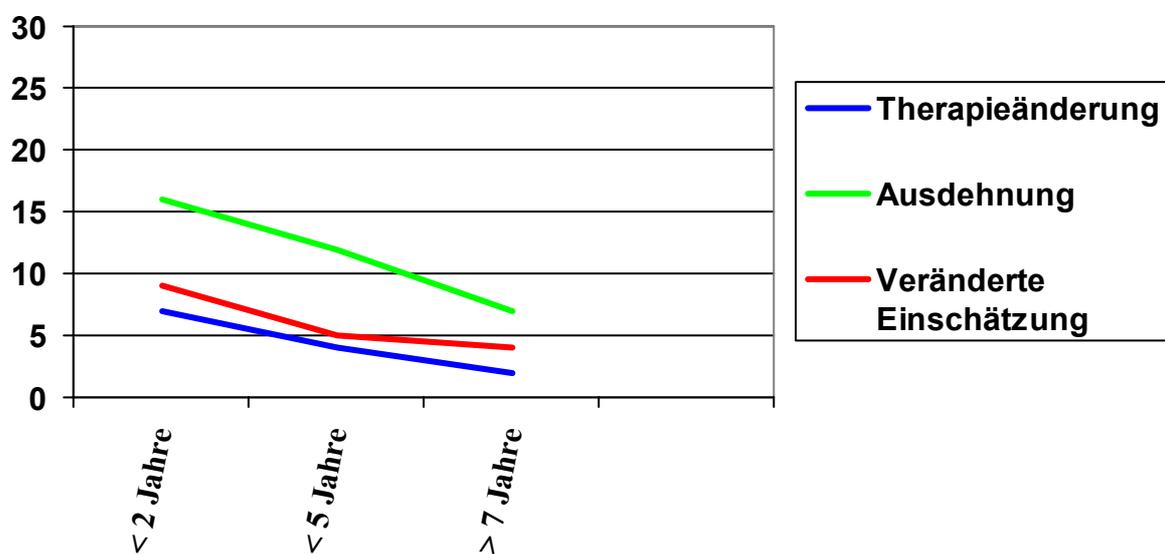
Zur Beurteilung der Methode in Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchers wurden 12 Probanden nach einer kurzen Einführung in die Methode 30 Dia-Paare mit mikrolaryngoskopischen Befunden im Weißlicht und anschließend im Autofluoreszenzmodus gezeigt. 6 der Probanden hatten weniger als 2 Jahre, 3 weniger als 5 Jahre und 3 mehr als 7 Jahre HNO-Erfahrung. Hierbei sollten die Probanden auf einem Ankreuzbogen die Einschätzung der gezeigten Schleimhautläsion im Weißlicht und Blaulicht abgeben. Außerdem wurde nach dem subjektiven Informationsgewinn durch die Autofluoreszenzendoskopie für die Probanden gefragt. Hierbei wurde Unterschieden in den Informationsgewinn bezüglich der Ausdehnung und Therapieentscheidung.

### 7.4.2. Ergebnisse

Von den 30 gezeigten Fällen änderten die wenig erfahrenen Kollegen in durchschnittlich 9 (30%) Fällen ihre Einschätzung zum Weißlicht wohingegen die erfahreneren Kollegen nur 5 (16%) bzw. 4 (13%) Änderungen angaben. Die Einschätzung der Läsion durch die unerfahreneren Kollegen wurde durch die Korrektur in 78% verbessert. Weiterhin gaben die unerfahrenen Kollegen einen Informationsgewinn bezüglich der Ausdehnung in 16 Fällen

(53%) an. Selbst die erfahrenen Assistenten gaben eine verbesserte Einschätzung der Ausdehnung in 12 Fällen (40%) an. Die erfahreneren Ärzte hingegen änderten in 7 (23%) Fällen ihre Einschätzung bzgl. der Ausdehnung. In der Beurteilung der möglichen Therapieentscheidung gaben die unerfahrenen Assistenten in 7 (23%) Fällen eine Änderung an bei den erfahreneren in 4 (13%) bzw. 2 (7%) Fällen.

Abbildung 7.4.1 Diese Darstellung zeigt die Wertigkeit der Autofluoreszenz in Abhängigkeit von dem Ausbildungsstand und der Erfahrung des Untersuchers



### 7.4.3. Diskussion

Bei allem Enthusiasmus für die endoskopische Autofluoreszenzdiagnostik in der Tumordiagnostik wird von einigen Klinikern die klinische Relevanz der Methode hinterfragt. Diese Kollegen geben an, dass sie die Veränderungen auch mit Hilfe der Weißlichtendoskopie ähnlich eingeschätzt hätten.

Die präsentierten Ergebnisse zeigen, dass gerade unerfahrenere Kollegen ihre Einschätzung bezüglich der suspekten Schleimhautläsionen verbessern können. Je erfahrener ein Laryngologe ist, desto weniger profitiert er von der zusätzlichen Information durch die Autofluoreszenzdiagnostik. Diese neue Untersuchungstechnik ist vor allem für

niedergelassene Kollegen hilfreich, da sie seltener tumorverdächtige Befunde in ihrer Praxis endoskopieren.

## **7.5 Methodenkritik**

Durch die Autofluoreszenzendoskopie ist trotz einer größeren Sensitivität bei der Früherkennung von präkanzerösen und kanzerösen Schleimhautveränderungen keine eindeutige Zuordnung hinsichtlich der Beurteilung der Dignität möglich. Im Gewebe befindet sich auch ohne exogene Gabe bereits eine Vielzahl von fluoreszierenden Farbstoffen. Viele Forschergruppen untersuchen die Verteilung dieser endogenen Fluorophore in den unterschiedlichen Gewebetypen, insbesondere wird nach Unterschieden zwischen Tumoren und umgebendem Normalgewebe geforscht.

Das in dieser Arbeit verwendete Blaulicht regt in erster Linie die grüne Fluoreszenz von Elastin, Kollagen, Porphyrinen und Flavinen an. Die Epithelschicht zeigt mit Ausnahme von keratinisierten Bereichen in der Regel eine schwächere Fluoreszenz als das darunter liegende Bindegewebe. Karzinome, die in der Epithelschicht zu wachsen beginnen, machen sich als dunklere Bereiche in der Autofluoreszenz bemerkbar, da sie das hell fluoreszierende Bindegewebe in größere Gewebetiefe verdrängen. Die ebenfalls zur Fluoreszenz beitragenden Flavine zeigen die intrazelluläre Stoffwechselaktivität an und sind in Tumoren ebenfalls oft reduziert. Die Verschiebung von der Grünfluoreszenz zur Rotfluoreszenz, die eine Verschiebung von kurzweiliger höher energetischer zu längerweiliger niedrig energetischer Strahlung darstellt, zeigt neben der gleichen Autofluoreszenzintensität der verschiedenen präkanzerösen und kanzerösen Epithelveränderungen im Vergleich zum normalen Epithel, dass das Phänomen des Autofluoreszenzverlustes vornehmlich auf die Verdickung des Epithels zurückgeführt werden kann. Durch den Autofluoreszenzverlust kommt es zu einer deutlich verbesserten Erkennung und farblichen Kontrastierung, wodurch sich die Dysplasie- oder Tumorgrenzen besser demarkieren. Eine Differenzierung in die einzelnen

Dysplasiestadien kann jedoch sowohl durch die Autofluoreszenzendoskopie als auch die Autofluoreszenzspektroskopie nicht vorgenommen werden.

Dies bedeutet, dass bei der Durchführung der endoskopischen Untersuchungen lediglich zwischen dem normalen und leicht dysplastischen Epithel auf der einen Seite und den präkanzerösen und kanzerösen Läsionen auf der anderen Seite unterschieden werden kann. Eine Abgrenzung des Carcinoma in situ vom mikroinvasiven Karzinom kann ebenfalls nicht vorgenommen werden. Dies bedeutet, dass die mit diesem bildgebenden Verfahren generierten Bilder kritisch zu betrachten sind.

Einblutungen oder Blutauflagerungen die im Rahmen der Mikrolaryngoskopie, bei der Intubation oder der Einstellung des Kehlkopfs mit dem Laryngoskop auftreten können, schränken die Qualität der Autofluoreszenzuntersuchungen durch die Absorption des Fluoreszenzlichtes durch das Häm ein oder machen die Untersuchung unmöglich. Vor allem die chronische Laryngitis die stark hyperämische Areale aufweisen kann, verleitet den Betrachter möglicherweise zu einer falsch positiven Einschätzung.

Im Gegensatz hierzu können Keratosen ein helleres Fluoreszenzlicht als die gesunde Schleimhaut emittieren und die darunterliegenden epithelialen Veränderungen maskieren und falsch negative Befunde provozieren. Als weiterer Störfaktor wird von Kulkens die Bakterienbesiedlung an der Oberfläche von Tumoren angesprochen <sup>Kulkens, 2000</sup>. Bakterienbeläge auf nekrotischen Tumorarealen können in der Autofluoreszenz- als auch bei der 5-ALA-induzierten Fluoreszenzdiagnostik eine deutliche unspezifische Orange fluoreszenz zeigen. Eine mikrobiologische Analyse der hierfür verantwortlichen Bakterien durch Zenk in der Mundhöhle ergab als dominierende Stämme *Prevotella oralis*, *Porphyromonas gingivalis* und *Staphylococcus aureus* <sup>Zenk et al, 1999</sup>. Ein Vorkommen dieser Bakterien fluoreszenz zeigte sich in unseren Untersuchungen nur bei Tumoren und führte nicht zu falsch positive Befunden oder einer Fehleinschätzung der Tumorausdehnung..

Dies bedeutet, dass die Autofluoreszenzendoskopie ein hilfreiches zusätzliches Verfahren in der Frühdiagnose des Larynxkarzinoms mit Verbesserung der Diagnosegenauigkeit darstellt, jedoch auch keine 100%ige Diagnosesicherheit bieten kann.

## **8. Alternative und additive bildgebende Verfahren**

### **8.1 Kompaktendoskopie**

#### **8.1.1 Einleitung**

Die Autofluoreszenz- und Kontaktendoskopie sind unabhängig voneinander entwickelt worden, um eine verbesserte prätherapeutische Identifikation des Kehlkopfkarcinoms und seiner Vorstufen zu gewährleisten <sup>Harries et al, 1995; Andrea et al, 1995</sup>. Die Kompaktendoskopie führt beide ergänzenden bildgebenden Verfahren in einem Untersuchungsablauf zusammen <sup>Arens et al, 2003</sup>. In der direkten Autofluoreszenzendoskopie, wie schon vorher beschrieben, können präkanzeröse dysplastische Regionen und kanzeröse Läsionen im Rahmen einer Autofluoreszenzendoskopie relativ einfach durch einen Verlust des normalen grünen Fluoreszenzsignals infolge verschiedener intraepithelialer Veränderungen erkannt werden. Auf der anderen Seite erlaubt die Kontaktendoskopie die zytologische Untersuchung einer suspekten epithelialen Läsion und kann eine Unterteilung in die verschiedenen dysplastischen Stufen vornehmen. Eine Differenzierung zwischen Carcinoma in situ und mikroinvasivem Karzinom gelingt nicht.

Da größere dysplastische Areale vor allem bei der Feldkanzerisierung in der Untersuchung sehr zeitaufwendig sind, sollten lediglich die relevanten Areale durch die Kontaktendoskopie untersucht werden.

Daher wurden sowohl die Autofluoreszenz- und Kontaktendoskopie in ihrer kombinierten Anwendung als auch die diagnostischen Möglichkeiten in der Evaluation der präkanzerösen und kanzerösen Schleimhautläsionen untersucht.

### 8.1.2 Material und Methoden

In einer Studie wurden 83 Patienten während der Mikrolaryngoskopie mit beiden endoskopischen bildgebenden Verfahren untersucht und anhand der Befunde eine intraoperative Bewertung der Läsion abgegeben. Das exzidierte Präparat wurde topographisch orientiert auf Kork aufgesteckt und zur histopathologischen Untersuchung in das Institut für Pathologie eingesandt. Die endoskopischen Befunde waren dem beurteilenden Pathologen nicht bekannt. Abschließend wurden die endoskopischen und histopathologischen Resultate miteinander verglichen.

Die Mikrolaryngoskopie mit normalem Weißlicht sowie die Autofluoreszenzendoskopie gingen im Untersuchungsablauf stets der Kontaktendoskopie bei der Evaluation der Schleimhautveränderung voraus. Für die Autofluoreszenzendoskopie verwendeten wir ein starres 0°-Endoskop (Karl Storz Germany, 8711AP) und das D-Light AF –System (Karl Storz Germany). In diesem System wird das anregende blaue Licht (375-440nm) generiert. Die Aufzeichnung der Untersuchung erfolgte mit einer CD-Kamera (Telecam SLPAL, 20212020/37, Karl Storz Germany). Die Kontaktendoskopie erfolgte mit einem speziellen Kontaktendoskop mit der Möglichkeit einer 60x und 150x Vergrößerung (8715 A, Karl Storz Germany). Die Verwendung dieser bildgebenden Technik ermöglicht während der Mikrolaryngoskopie die *in-vivo*-Betrachtung verschiedener zellulärer Veränderungen im oberflächlichen Stimmlippenepithel. Die Ergebnisse wurden auf einem digitalen Videosystem zur Dokumentation und Analyse aufgenommen.

An die Durchführung der schon vorher beschriebenen Autofluoreszenzendoskopie schloss sich die Kontaktendoskopie an. Hierbei wurde zunächst die Epitheloberfläche mit physiologischer Kochsalzlösung gereinigt. Nach sorgfältigem Absaugen dieser Region färben wir das Stimmlippenepithel mit 1% Methylenblau an. Hierdurch erfolgt die Anfärbung von den Zellkernen und dem Zytoplasma der oberflächlichen Epithelschichten.

Durch die vorsichtige Berührung der Stimmlippenmukosa mit dem Kontaktendoskop kommen die oberen Zellschichten des Epithels zur Darstellung.

Die Anfärbung hält für ca. 4-5 min an und verblasst dann zunehmend. Methylenblau wird - falls notwendig- erneut aufgetragen. Durch die Beurteilung der morphologischen Veränderungen in den abgefärbten Epithelschichten können Rückschlüsse auf den Charakter der Läsion insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Karzinomentstehung gezogen werden. In Abhängigkeit von dem klinischen Aussehen und der Lokalisation der Läsion, dauert der gesamte Untersuchungsablauf ca. 10 – 15min. Die dysplasieverdächtigen Läsionen des gesamten Kehlkopfs wurden untersucht, jedoch waren die Schleimhautveränderungen vornehmlich an den Stimmlippen lokalisiert (77 Fälle).

### **8.1.3 Ergebnisse**

Zusätzlich zur Autofluoreszenzuntersuchung wiesen die Zellen des normal geschichteten Plattenepithels bei der Betrachtung durch das Kontaktendoskop eine polyedrische Form auf und bildeten miteinander eine Kontinuität aus. Die Zellkerne waren rund oder oval und dunkel angefärbt, während sich das Zytoplasma nur leicht bläulich anfärbte. Das-Kern-Plasma-Verhältnis war regulär und das gesamte morphologische Erscheinungsbild homogen. Bei der Betrachtung von Flimmerepithel gesunder Ventrikelschleimhaut beobachtete man runde und dunkel angefärbte Zellkerne. Zytoplasmatische Begrenzungen waren jedoch nicht so klar definiert wie beim Plattenepithel. An regelrecht geschichtetem Plattenepithel der Stimmlippen wurde histologisch und elektronenmikroskopisch gezeigt, dass nur die oberen Epithelschichten angefärbt und damit durch die Kontaktendoskopie einzusehen waren. Da das Kontaktendoskop trotzdem in der Lage ist, auch subepitheliale Gefäße darzustellen, scheint die Nichtanfärbung der basalen Zellschichten an der mangelnden Penetration von Methylenblau in das Epithel zu liegen. Die Kontaktendoskopie erlaubt die Dokumentation von normalem Plattenepithel bis hin zu malignen epithelialen Veränderungen.

Bei chronisch entzündlich veränderten Stimmlippen konnte im Rahmen der Kontaktendoskopie eine homogene plattenepitheliale Struktur beobachtet werden. Im Gegensatz zu normalem Epithel waren die Zellkerne jedoch vergrößert, wodurch auch die Kern-Plasma-Relation verändert wurde. An der Epitheloberfläche wurden in erhöhtem Maße unreife Zellen beobachtet, das durch eine erhöhte Zellerneuerungsrate im entzündlich veränderten Epithel bedingt ist.

In den Anfangsstadien der Keratinisierung fielen einzelne Zellen ohne Kern auf. Weiter fortgeschrittene Stadien zeigten Gruppen kernloser Zellen, wobei jedoch auch die Identifizierung normaler Zellen möglich war. Im Endstadium konnten nur große Areale mit einer amorphen oder laminären Struktur beobachtet werden.

Die meisten histologischen und zytologischen Veränderungen, die für die Diagnose der Epitheldysplasie charakteristisch sind, konnten in der Untersuchung mit dem Kontaktendoskop nachgewiesen werden.

Diese Dysplasien beinhalten den Nachweis von ausgeprägten Kernatypien, Verschiebungen in der Kern-Plasma-Relation, Dyschromasien und die Präsenz von Mitosen und Anisokariosen. Vergleichende histopathologische Untersuchungen zeigten, dass die Beobachtung von einfachen Dysplasien mit dem Kontaktendoskop nicht die Erkennung der einfachen Dysplasie erlaubt, da die Ausreifung des Epithels in aller Regel normal war. Mittel- bis schwergradige Dysplasien, die auch Kernveränderungen in den oberen Schleimhautschichten aufwiesen, konnten durch das Verfahren der Kontaktendoskopie beurteilt werden.

Abbildung: 8.2.1 Pathohistologische Diagnosen (n = 83)	
Einfache Dysplasie	n = 29
Mittelgradige Dysplasie	n = 15
Höhergradige Dysplasie oder Carcinoma in situ	n = 8
Karzinom	n = 31

Beim Kehlkopfkarzinom zeigte die Kontaktendoskopie eine Unregelmäßigkeit in der Zellverteilung und extreme Heterogenität der Zellen. Man beobachtete Kerngrößenschwankungen, Kernpolymorphismen und verschiedene Färbereigenschaften der Kerne. Die Kern-Plasma-Relation war noch irregulärer im Vergleich zu den Dysplasien. Kerneinschlusskörperchen, prominente Nucleoli sowie Mitosen konnten vermehrt beobachtet werden. Ebenso gelang die Darstellung submuköser atypischer Kapillaren mit irregulären Verläufen. Die histopathologischen Ergebnisse der 83 Patienten ergaben in 29 Fällen eine einfache Epitheldysplasie, in 15 Fällen eine mittelgradige und in 8 Fällen höhergradige Dysplasien oder Carcinoma in situ. In 31 Fällen wurde ein Karzinom diagnostiziert. In 73 Fällen (88%) korrespondierte das Resultat der Kontaktendoskopie mit der histopathologischen Diagnose. In nahezu allen Fällen bestätigte die Kontaktendoskopie die Autofluoreszenzdiagnostik und war in der Lage dysplastische Läsionen weiter in mittel- oder höhergradig dysplastische Veränderungen zu unterscheiden. Nur in zwei Fällen traten während der Endoskopie abweichende Resultate zwischen der Kontakt- und Autofluoreszenzendoskopie auf. Hierbei zeigten sich autofluoreszenzendoskopisch höhergradige Dysplasien im Vergleich zu einfachen Dysplasien und chronischer Laryngitis in der Kontaktendoskopie. Es erfolgte die korrekte Diagnose durch die Kontaktendoskopie.

Abbildung: 8.2.2 Vergleich der histopathologischen Diagnose mit dem Resultat der <b>Kontaktendoskopie</b>	Übereinstimmung	n = 73 (88%)
	Falsch positiv	n = 5 (6%)
	Falsch negativ	n = 5 (6%)

Bei fünf Patienten wurden die Schleimhautveränderungen durch die Kompaktendoskopie überbewertet. Die histopathologische Nachbereitung dieser speziellen Fälle zeigte, dass viermal plasmalymphozytische Zellinfiltrate der Submukosa vorlagen. Zusätzlich traten zweimal chronisch zelluläre Infiltrate mit einer akuten Entzündung und Leukozytenmigration in die oberen epithelialen Schichten auf. Bei drei weiteren Patienten waren die submukösen Fluorophore durch vorausgegangene Operationen mit sekundärer Vernarbung bei therapierten Carcinomata in situ oder mikroinvasiven Karzinomen reduziert. Zusätzlich zeigten zwei dieser drei Patienten eine lymphozytische plasmazelluläre Infiltration als Resultat einer Entzündung in der Submukosa. Die vorangegangenen Operationen lagen mindestens sechs Monate zurück.

In weiteren fünf Fällen unterschätzten wir das histopathologische Ergebnis. In vier dieser Fälle dysplastischer oder sogar kanzeröser Schleimhautveränderungen war die Epithelläsion unter einer hyperkeratotischen Zellschicht verborgen oder suprabasale Zellschichten wiesen kanzeröse Zellen auf. Eine dieser Fälle zeigte eine zentrale Ulceration mit einer Fibrinschicht über den basalen Zelllagen. In einem anderen Fall wurde nahezu normales Epithel von kanzerisierten Zellen unterschichtet. Hierbei hinderten uns die hyperkeratotischen oberen Zellschichten daran, die gesamte Schleimhautläsion zu beurteilen, da sie sich wie ein Schirm über der Läsion ausbreiteten (Umbrella-Effekt). Aufgrund der begrenzten Eindringtiefe beider bildgebender Verfahren war eine Differenzierung zwischen einem Carcinoma in situ und einem invasiven Karzinom nicht möglich.

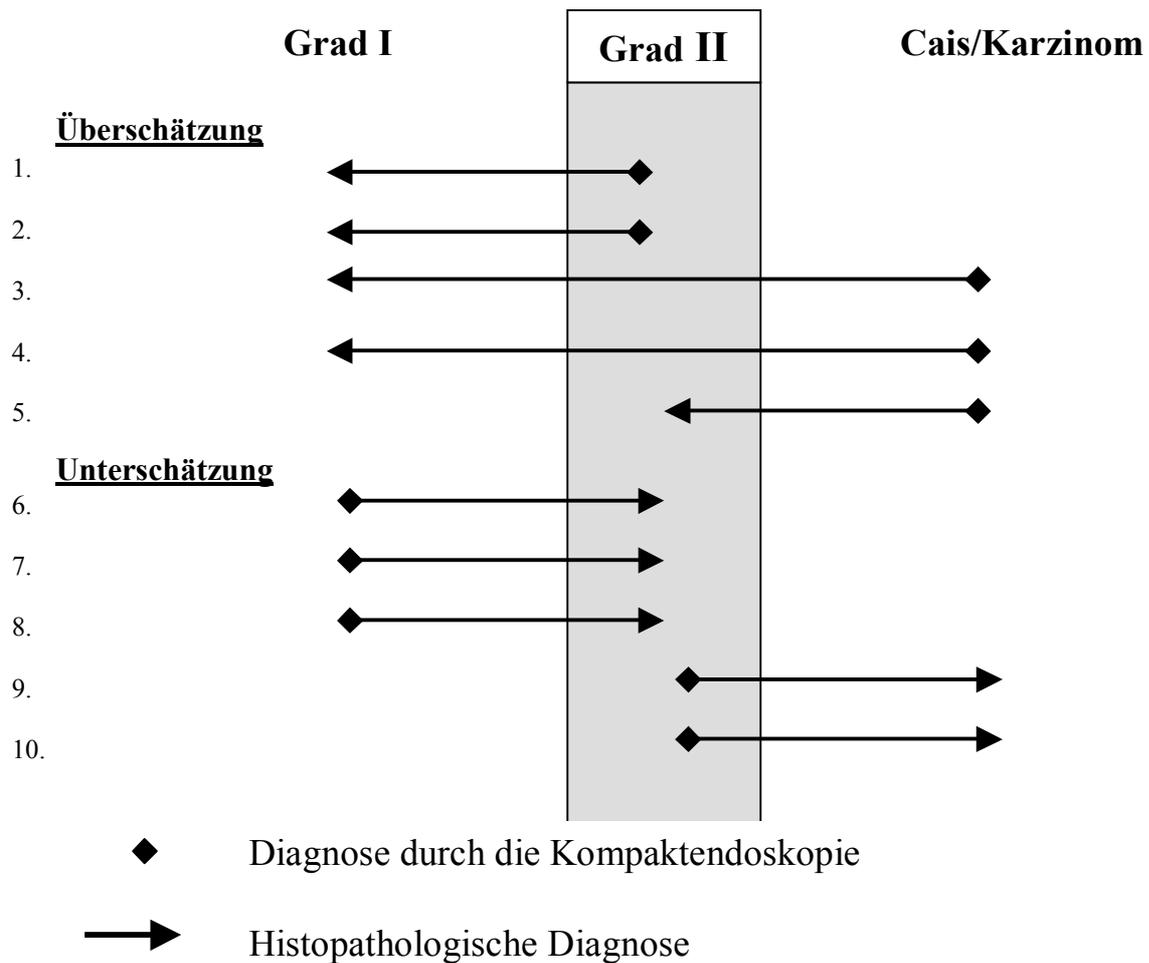


Abbildung 8.2.3 Vergleich der kompaktendoskopischen Fehldiagnosen mit der Histologie

#### 8.1.4 Diskussion

Die bisher in der Literatur beschriebenen endoskopischen bildgebenden Verfahren zur verbesserten Analyse der Ausbreitung bzw. Tiefeninfiltration von Dysplasien respektive Tumoren der laryngealen Schleimhaut weisen jede für sich unterschiedliche Nachteile auf. Die endoskopische Hochfrequenzsonographie ist derzeit nicht in der Lage intraepitheliale Schleimhautveränderungen abzubilden und scheidet für die Diagnostik der kleinen und flachen Tumoren vollständig aus. Die vorgestellte Autofluoreszenzendoskopie bietet im

Rahmen der Mikrolaryngoskopie den kompletten Überblick über die laryngeale Schleimhaut, wodurch suspekta Schleimhautareale schnell erkannt und analysiert werden können. Die Methode lässt eine Unterscheidung in gutartige Schleimhautveränderungen auf der einen und präkanzeröse bzw. kanzeröse Läsionen auf der anderen Seite mit einer Sensitivität von 97% zu. Eine genauere Differenzierung in die verschiedenen Dysplasiestadien bzw. eine Unterteilung in intraepitheliale oder infiltrative Prozesse ist nicht möglich.

Die Kontaktendoskopie, die erstmals von Hamou im Rahmen einer Studie über epitheliale Zellen des Uterus beschrieben und durch Andrea in die direkte Laryngoskopie zur besseren Beurteilung von pathologischen laryngealen Veränderungen eingeführt wurde <sup>Hamou, 1981; Andrea et al, 1995</sup>, erlaubt nach Anfärbung der Schleimhaut eine *in-vivo*-Darstellung von Zellen der oberen Epithellagen und damit die Dokumentation von normal geschichtetem unverhornendem Plattenepithel bis hin zu spezifischen pathologischen Veränderungen wie der chronischen Laryngitis, Dysplasien, Papillomen und malignen Tumoren. Dieses bildgebende Verfahren erlaubt ebenso die Beobachtung des mikrovaskulären Netzwerkes der Schleimhaut. Nachteilig hat sich jedoch das langwierige „Abscannen“ der laryngealen Schleimhaut herausgestellt, um die „region of interest“ mit dem Kontaktendoskop zu finden. Daher erscheint es sinnvoll, die positiven Seiten der infragekommenden Kontaktendoskopie und der Autofluoreszenzendoskopie miteinander zu kombinieren.

Die Kontaktendoskopie erlaubt eine Analyse der zytologischen Charakteristik der oberen Epithelschichten der laryngealen Mukosa. Bei höhergradigen Dysplasien oder dem undifferenzierten Carcinoma in situ sind die zellulären Atypien so verdächtig wie beim infiltrierenden Karzinom. Daher können diese Veränderungen einfach durch die Kontaktendoskopie diagnostiziert werden. Ebenso ist die einfache Dysplasie ohne eine Veränderung ihrer regulären Struktur und in der Abwesenheit zellulärer Atypien oder Differenzierungsstörungen problemlos zu erkennen.

Hingegen kann die Identifikation der mittel- und höhergradiger Dysplasien mit zellulären und strukturellen Veränderungen vor allem in den basalen Schichten schwierig zu diagnostizieren sein. Eine maligne Transformation der basalen Epithelschichten, die das normalgeschichtete Epithel unterminieren, kann übersehen werden, wie z.B. in einem speziellen Fall eines hoch differenzierten Carcinoma in situ.

Da die Kontaktendoskopie nur einen schmalen Ausschnitt ( $7\text{mm}^2$ ) bei 60 – 150 x Vergrößerung des Epithels zeigt, sollte die Autofluoreszenzuntersuchung zur Detektion und Auswahl der relevanten Lokalisation stets der Kontaktendoskopie vorausgehen.

Die Reliabilität der Kontaktendoskopie wurde durch die histopathologische Kontrolle überprüft. Bezugnehmend auf unsere Ergebnisse wurden nur zwei mikroinvasiven Karzinome der 39 Fälle von höhergradigen Dysplasien/Carcinoma in situ und frühen infiltrierenden Karzinome unterschätzt und als mittelgradige Epitheldysplasien eingestuft. Hierbei sah man in der Autofluoreszenzendoskopie dicke hyperkeratotische Zelllagen, die das kanzerisierte Epithel in den basalen Schichten überdeckte, d.h. die helle Keratinschicht verschleierte den Autofluoreszenzverlust. In der Histologie unterminierten die atypischen Zellen die oberflächlichen Zellschichten mit gut differenzierten ortho- und parakeratotischen Zelllagen, so dass die atypischen Zellen ebenfalls nicht durch die Kontaktendoskopie erkennbar war.

Drei der 39 kanzerisierten Läsionen wurden überschätzt. In zwei dieser Fälle wurde durch die Kontaktendoskopie fälschlicherweise das Rezidiv eines Carcinoma in situ sowie in einem Fall das Rezidiv eines Karzinoms diagnostiziert. In allen dieser Fälle wurde der Autofluoreszenzverlust offensichtlich durch Narbengewebe im Bereich des Reinkeschen-Raumes mit Verlust an elastischen Fasern und der regulären Faserstruktur hervorgerufen. Im Fall des vermuteten Karzinoms mag zusätzlich eine histologisch nachweisbare plasmazelluläre Infiltration zu dem Autofluoreszenzverlust beigetragen haben. Die

Kontaktendoskopie könnte durch die Migration und Penetration von Entzündungszellen sowie durch anhaltende regenerative Prozesse nach einer primären Resektion vor 6 Monaten beeinflusst worden sein.

Bei 44 Patienten mit einfachen und mittelgradigen Epitheldysplasien konnten 5 Fälle von Über- und Unterschätzung beobachtet werden. Drei Fälle die durch die Kontaktendoskopie als einfache Epitheldysplasie eingestuft wurden, stellten sich histologisch als mittelgradige Epitheldysplasien heraus. Wohingegen zwei mittelgradige Epitheldysplasien überschätzt und histologisch als einfache Epitheldysplasie diagnostiziert wurden. In den letzteren Fällen war eine entzündliche zelluläre Infiltration der Grund für die Überschätzung sowohl durch die Autofluoreszenz als auch durch die Kontaktendoskopie.

Drei Läsionen wurden durch die Kontaktendoskopie als einfache Epitheldysplasie klassifiziert, jedoch histologisch als mittelgradige Epitheldysplasie eingestuft. In zwei dieser Fälle sah man histologisch lediglich fokal mittelgradige Epitheldysplasien, welche die Ursache für die Unterschätzung durch die Kontaktendoskopie waren. Der dritte Fall zeigte histologisch normales oberflächliches Epithel mit nur diskreter Parakeratose.

Nur zwei Schleimhautveränderungen sämtlicher 83 Fälle (2,4%) wurden nicht als kanzerös eingestuft, die histologisch hochdifferenzierte frühe kanzeröse Läsionen waren. Da die zytologischen Aberrationen vornehmlich in den basalen Zellschichten auftreten, kann die Differenzierung zwischen der einfachen und mittelgradigen Epitheldysplasien schwierig sein. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass drei Fälle unter- und zwei überschätzt wurden, die innerhalb dieser Gruppe lagen.

Die dargestellten Ergebnisse mit einer Diagnosegenauigkeit bezogen auf die Histologie von 88% demonstrieren, dass eine gute Differenzierung der präkanzerösen als auch kanzerösen Schleimhautveränderungen mit der Kompaktendoskopie möglich ist. Trotzdem zeigen die aufgeführten Fehldiagnosen die Grenzen der Methode auf und sollten auch zu einer kritischen Betrachtung der endoskopischen Bilder Anlass geben.

## **8.2 5-Aminolävulinsäure induzierte Fluoreszenz**

### **8.2.1 Einleitung**

Die frühzeitige Erkennung von Veränderungen der Schleimhäute des oberen Aerodigestivtraktes ermöglicht in vielen Fällen eine minimal invasive, organerhaltende Therapie. In diesem Zusammenhang vereinfacht die indirekte Autofluoreszenzendoskopie des Larynx die Erkennung und Abgrenzbarkeit von präkanzerösen und kanzerösen Läsionen mit einer diagnostischen Genauigkeit von 89% <sup>Arens et al, 2004a</sup>. Diese Methode ist einfach zu handhaben und kann beim ambulanten Patienten durch Anregung des Gewebes mit blauefiltertem Licht durchgeführt werden.

Parallel hat sich die induzierte Fluoreszenzdiagnostik mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) etabliert. 5-ALA ist das erste Stoffwechselprodukt der Hämbiosynthese und selbst nicht fluoreszierend. Durch exogene Zufuhr von 5-ALA kommt es unter Umgehung des physiologischen Feedback-Mechanismus zur intrazellulären Akkumulation von endogen gebildeten Protoporphyrin IX (PPIX). PPIX reichert sich vermehrt in kanzerisierten Zellen an. Aufgrund der ungünstigen Lichtverhältnisse im Larynx bei nahezu fehlendem Umgebungslicht wird die Bildqualität durch das Zulassen eines kleinen Anteils remittierten blau-violetten Anregungslichtes mit der hierbei verwendeten Filterkombination wesentlich verbessert. Dadurch stellt sich das stoffwechselaktivere Tumorgewebe im Vergleich zum umliegenden Normalgewebe im Rot/Blaukontrast dar.

Beide Fluoreszenztechniken sind dazu geeignet, die Erkennung und Abgrenzbarkeit von Dysplasien und Karzinomen zu verbessern. Das Ziel der vorliegenden Studie besteht darin, die beiden Fluoreszenzverfahren während der indirekten Laryngoskopie von Patienten mit Larynxkarzinomen und deren Vorstufen im Hinblick auf deren diagnostisches Potential zu vergleichen.

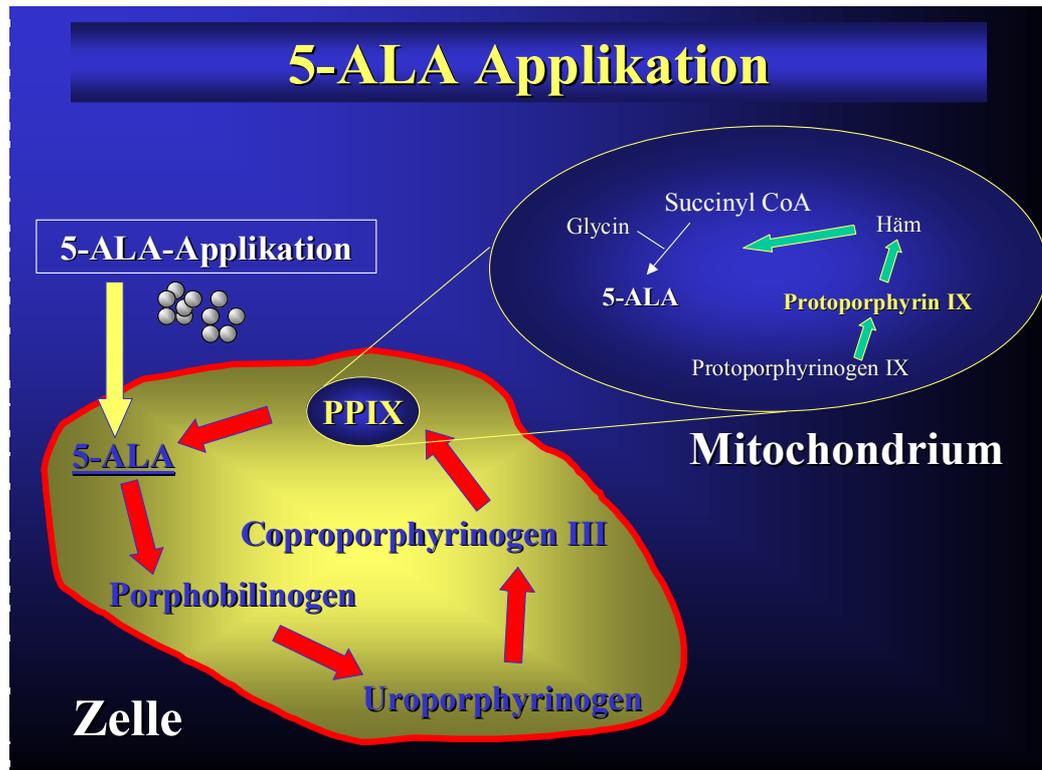
### **8.2.2 Material und Methode**

Im Rahmen der Studie wurden 56 Patienten mit dysplasie- bzw. karzinomverdächtigen Stimmlippenbefunden mittels indirekter Laryngoskopie untersucht. Hierbei kamen neben der routinemäßig durchgeführten Weißlichtdiagnostik, die Autofluoreszenzendoskopie und 5-ALA-induzierte Fluoreszenzendoskopie zum Einsatz.

Nach Durchführung der Weißlicht- und Autofluoreszenzendoskopie erfolgte in einem zweiten Schritt die topische Applikation mittels Inhalation von 0,6%iger 5-ALA-NaCl-Lösung. Hierzu wurden 30mg 5-ALA-Hydrochlorid (Fa. Medac GmbH, Wedel) in 5ml 0.9% NaCl-Lösung gelöst und mit einem Ultraschallvernebler appliziert. Die Inhalationszeit betrug zwischen 15-20 min. Die indirekte 5-ALA-induzierte Fluoreszenzendoskopie erfolgte 90 – 120 min nach der Applikation von 5-ALA. Am folgenden Tag wurde die Mikrolaryngoskopie mit Entfernung der Läsion durchgeführt. Weißlicht- und Fluoreszenzbilder wurden digital aufgenommen und mit den pathohistologischen Ergebnissen korreliert.

Sowohl die Autofluoreszenz als auch die 5-ALA-induzierte Fluoreszenz wurden durch gefiltertes Licht (375 – 440nm) einer Xenon-Kaltlichtquelle angeregt und mit einer speziellen CCD-Kamera aufgenommen (D-light-AF System, STORZ, Tuttlingen). Dieses System ermöglicht ein problemloses Umschalten zwischen Weiß- und Fluoreszenzlicht. Um einen Teil des blauen Anregungslichtes abzublocken, kam eine neue starre 70°-Optik (8700CP, STORZ, Tuttlingen) mit einem integrierten Filter zum Einsatz.

Abbildung 8.2.1 Hämstoffwechsel



### 8.2.3 Ergebnisse

Es kamen bei allen untersuchten Patienten die in der indirekten Laryngoskopie sichtbaren Schleimhautveränderungen sowohl bei der Autofluoreszenz als auch der 5-ALA-induzierten Fluoreszenz zur Darstellung. Die erhaltene Bildqualität war teilweise mikrolaryngoskopischen Bildern vergleichbar. Variationen der Bildqualität konnten auf Bewegungen der Patienten und eine unterschiedliche Lichtintensität zurückgeführt werden. Insgesamt war die Bildqualität der 5-ALA-induzierten Fluoreszenz schlechter.

Gesunde Schleimhaut zeigte eine typische hellgrüne (AF) bzw. bläuliche Fluoreszenz (5-ALA). Eine Unterscheidung zwischen respiratorischer Schleimhaut und Plattenepithel war nicht möglich. Hyperplastische Schleimhautareale wiesen einen zusätzlichen milchigen Aspekt auf. Keratosen zeigten eine heller leuchtende Fluoreszenz, die bei entsprechender

Dicke die darunterliegenden Gewebsschichten völlig überlagern konnte. Höhergradige Dysplasien (Grad II-III) und kanzeröse Läsionen zeichneten sich in der Autofluoreszenz durch einen Fluoreszenzverlust mit rötlicher bis violetter Färbung und verstärkter Kontrastierung zum umliegenden Gewebe aus. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach der Inhalation von 5-ALA in präkanzerösen und kanzerösen Schleimhautarealen eine intensive Rotfluoreszenz (PPIX), die jedoch meist inhomogen in der epithelialen Veränderung verteilt war. Bei der 5-ALA-induzierten Fluoreszenz zeigte sich häufiger ein Unterschied im Fluoreszenzkontrast und in der –intensität.

Die histologische Aufarbeitung der Operationspräparate ergab folgende Diagnosen: 7 hyperplastische Epithelveränderungen, 15 einfache Epitheldysplasien, 7 mittelgradige Epitheldysplasien, 10 schwere Epitheldysplasien oder Carcinomata in situ und 17 invasive Karzinome.

In beiden Fluoreszenzverfahren konnten alle invasiven Karzinome eindeutig identifiziert werden. Von den 56 untersuchten Patienten konnten in der Autofluoreszenz 89% und der PPIX-Fluoreszenz 84% diagnostiziert werden ( $p=0.1802$ ). Während die Sensitivitäten mit 97% für die PPIX-Fluoreszenz und 94% für die Autofluoreszenz ähnlich waren ( $p=0.3173$ ), erreichte die Autofluoreszenz mit 82% eine höhere Spezifität als die PPIX-Fluoreszenz mit 64% ( $p=0.045$ ). Der positive Vorhersagewert betrug damit für die Autofluoreszenz 89% und für die PPIX-Fluoreszenz 80%. Allerdings sprechen diese Ergebnisse nicht für einen bedeutenden Unterschied zwischen beiden Diagnosetechniken, sodass beide Verfahren in der Diagnostik des Larynxkarzinoms als gleichwertig eingestuft werden müssen.

Die höhere Anzahl von falsch positiven Befunden der 5-ALA-induzierten Fluoreszenz erklärt sich aus einer vermehrten Anreicherung in entzündlichen Geweben, z.B. bei der chronischen Laryngitis. Falsch negative Fälle waren in beiden Fluoreszenztechniken durch eine „abschirmende Hyperkeratose“ bedingt, die die basalen Zellschichten überdeckte. Drei Patienten mit Vernarbungen durch vorangegangene Operationen an den Stimmlippen zeigten

lediglich eine Anreicherung von Protoporphyrin IX in den betroffenen dysplastischen Arealen.

Tabelle 8.2.1 Vierfeldertafel der indirekten Autofluoreszenzlaryngoskopie im Vergleich zum pathohistologischen Befund

<b>Indirekte Autofluoreszenz- laryngoskopie</b>	<b>Histologie</b>		
		positiv	Negativ
positiv	32	4	36
negativ	2	18	20
total	34	22	<b>56</b>
Sensitivität: 94%    Spezifität: 82%			

Tabelle 8.2.2 Vierfeldertafel der indirekten 5-ALA induzierten Fluoreszenz im Vergleich zum pathohistologischen Befund

<b>Indirekte 5-ALA induzierte Fluoreszenz- laryngoskopie</b>	<b>Histologie</b>		
		positiv	Negativ
positiv	33	8	41
negativ	1	14	15
total	34	22	<b>56</b>
Sensitivität: 97%    Spezifität: 64%			

## 8.2.4 Diskussion

Die 5-Aminolävulinsäure induzierte Fluoreszenzdiagnostik ist ein neuartiges Verfahren zur In-vivo-Diagnostik von dysplastischen Geweben und oberflächlichen Tumoren. Ähnlich wie bei der photodynamischen Therapie wird ein Farbstoff (Photosensitizer) lokal oder systemisch appliziert, der sich vornehmlich in Tumorzellen anreichert. Durch die Bestrahlung mit Licht werden die Farbstoffmoleküle in energetisch höherliegende Zustände angeregt und geben die dabei gespeicherte Energie, z.T. als Fluoreszenzlicht wieder ab. Unter physiologischen Bedingungen wird die Bildung von 5-ALA aus Glycin und Succinyl-CoA in den Mitochondrien durch die ALA-Synthase reguliert. Führt man ALA exogen zu, wird der Feedbackmechanismus umgangen, und es kommt zur Anreicherung von Porphyrinen, insbesondere PPIX <sup>Kennedy & Pottier, 1992; Heyerdahl et al, 1997</sup>.

Die klinische Nutzbarkeit der ALA-induzierten Fluoreszenz konnte erstmals in der Urologie gezeigt werden <sup>Kriegsmair et al, 1994</sup>. Wegen seiner Selektivität und guten Verträglichkeit wird in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde fast ausschließlich Protoporphyrin IX (PPIX), das nach topischer Gabe von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) im Rahmen der Hämbiosynthese entsteht, als Farbstoff verwendet. Nach Untersuchungen von Leunig eignet sich die Fluoreszenzdiagnostik nach topischer 5-ALA-Applikation als Mundspülung oder Inhalation zu einer – im Vergleich zu normaler Inspektion und bildgebender Diagnostik – verbesserten Identifikation von Karzinomvorstufen und kleinen Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes <sup>Mehlmann et al, 1999; Leunig et al, 2000, 2001; Betz, 2002</sup>.

Bei unseren Untersuchungen konnten alle invasiven Karzinome eindeutig erkannt werden. Obwohl mittels Autofluoreszenz das korrekte Ergebnis in 89% und bei der PPIX-Fluoreszenz in 84% nachgewiesen werden konnte, lag die Sensitivität der PPIX-Fluoreszenz bei 97% gegenüber 94% für die Autofluoreszenz. Statistisch konnte keine signifikanter Unterschied beider Verfahren bezüglich der Erkennung von dysplastischen Veränderungen oder

Karzinomen beobachtet werden. Beide Verfahren können daher gleichwertig im Rahmen der indirekten Laryngoskopie zur primären Tumordiagnostik eingesetzt werden.

Narben zeigen in der Autofluoreszenzendoskopie einen homogenen Autofluoreszenzverlust. Daher können sie oftmals nicht eindeutig von möglichen Rezidiven abgegrenzt werden. Da Narben eher bradytroph sind und sich das Protoporphyrin IX vermehrt in stoffwechselaktivem Gewebe wie z.B. Tumoren anreichert, erscheint die indirekte Fluoreszenzlaryngoskopie mit 5-Aminolävulinsäure der Autofluoreszenzendoskopie bei mehrfach rezidivierenden präkanzerösen und kanzerösen Läsionen der Stimmlippen in der Diagnostik des Rezidivs überlegen.

Die 5-Aminolävulinsäure scheint derzeit der ideale exogene Farbstoff für die induzierte Fluoreszenz zu sein und steht kurz vor der Zulassung für den urologischen Bereich. Die Nachteile der exogenen Sensibilisierung, insbesondere die Lichtempfindlichkeit, lassen sich durch eine lokale Verabreichung, wie in unserem Falle durch Inhalation, reduzieren oder vermeiden. Hingegen weist die Autofluoreszenzdetektion keinerlei Kontraindikationen oder Nebenwirkungen auf.

Fluoreszenzmikroskopische Studien von Tumorexzidaten von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes haben Penetrationstiefen von durchschnittlich 900 µm nach topischer Applikation von 5-ALA ergeben <sup>Leunig et al, 2001</sup>. Bei der bekannten Eindringtiefe des verwendeten Fluoreszenzanregungslichtes von ca. 300µm ist die nur begrenzte Eindringtiefe des Photosensitizers bei der oberflächlichen Detektion und Abgrenzung maligner Schleimhautläsionen zu vernachlässigen. Eine fluoreszenzgestützte Tumorexzision mit Identifizierung möglicher Neoplasieausläufer im Resektionsbett hingegen erscheint nur nach systemischer Gabe von 5-Aminolävulinsäure denkbar <sup>Leunig & Betz, 2003</sup>.

Im Vergleich zwischen AF-Endoskopie und 5-ALA-induzierte Endoskopie im Rahmen der primären Diagnostik durch die indirekte Laryngoskopie sind keine signifikanten Unterschiede bezüglich der diagnostischen Aussagekraft nachweisbar (Abb. 8.2.1 – 8.2.9.), jedoch ist bei

der induzierten Fluoreszenz eine schwankende Lichtintensität zu erwähnen, die die Erhebung qualitativ hochwertiger Fluoreszenzbilder deutlich erschwert. Außerdem sind für die Durchführung der 5-ALA-induzierten Fluoreszenz mindestens zwei Stunden anzusetzen. Weitere Einschränkungen der induzierten Fluoreszenz bestehen in einer zeitlichen Limitierung durch sog. Photobleaching-Effekte sowie einer unspezifischen Rotfluoreszenzbildung bei Bakterienbelägen oder in vorbestrahlter Schleimhaut <sup>Leunig & Betz , 2003; Lippert et al, 2000; Zenk, 1999</sup>. Lediglich bei der Beurteilung vernarbter Areale scheint die induzierte Fluoreszenz vorteilhaft zu sein. Im Gegensatz dazu ist bei der Autofluoreszenzlaryngoskopie die einfache Handhabung hervorzuheben, da keine vorherige medikamentöse Sensibilisierung durch eine Photosensitizer vorzunehmen ist und somit die Untersuchung jederzeit und beliebig wiederholbar durchgeführt werden kann.

Diese Argumente lassen die indirekte Autofluoreszenzlaryngoskopie vorteilhaft erscheinen, vor allem wenn sie in der täglichen Routinediagnostik des Hals-Nasen-Ohrenarztes angewendet wird. Die 5-ALA-induzierte Fluoreszenz sollte als zusätzliche Methode bei suspekten Befunden in narbigen Regionen Anwendung finden.

## 9. Zusammenfassung

Unter den Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege sind die im Kehlkopf lokalisierten am häufigsten an den Stimmlippen oder ihrer unmittelbaren Umgebung angesiedelt. Sie rufen anders als supraglottische Tumoren frühzeitig eine Stimmstörung hervor, die dann eine frühe Diagnose ermöglicht. Daher ist sowohl die chirurgische als auch die primär strahlentherapeutische Behandlung des frühen Larynxkarzinoms durch eine hohe Heilungsrate gekennzeichnet. Aufgrund der vergleichsweise günstigen Prognose sind die exakte Diagnostik und die daraus resultierende Therapie ein besonderes Anliegen für optimale Heilungsergebnisse. Neben einer Aufklärung der Bevölkerung über die Tumorrisiken, wie z.B. Nikotin und Alkohol, und Notwendigkeit einer frühen ärztlichen Konsultation ist die Weiterentwicklung der bildgebenden Diagnostik zur möglichst schnellen und exakten Diagnosefindung gerade auch der dysplastischen Vorstufen des Larynxkarzinoms notwendig. Nur so lassen sich Screening-Techniken für Risikopatienten entwickeln, die dazu beitragen können, diese Tumoren in früheren Stadien als bisher zu diagnostizieren.

Das Ziel der Arbeit war es, die Autofluoreszenzendoskopie beim Larynxkarzinom und seinen Vorstufen bezüglich seines diagnostischen Potentials gegenüber den gebräuchlichen endoskopischen Verfahren zu untersuchen.

In einem ersten Ansatz wurde versucht mittels der Autofluoreszenzmikroskopie das Phänomen der Autofluoreszenz beim Larynxkarzinom näher zu untersuchen. Hierbei konnte eine dreifach höhere Intensität im submukösen Bindegewebe gegenüber dem Larynxepithel nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich unabhängig vom Dysplasiestadium eine gleich schwache Fluoreszenzintensität des Epithels. Dies unterstreicht, dass für den Autofluoreszenzverlust bei dysplastischen Veränderungen primär die Verdickung des Larynxepithels verantwortlich ist und die helle Grünfluoreszenz des normalen Epithels durch das submuköse Bindegewebe hervorgerufen wird.

In einer zweiten Untersuchung wurde das Larynxepithel im Kontaktverfahren spektrometrisch analysiert. Hierbei wurde nach Anregung des Larynxepithels mit Licht zwischen (375-440 nm) das Emissionsspektrum gemessen. Die gemessenen Peaks lagen bei 475, 515, 550 sowie 600 nm. Die am stärksten fluoreszierende Bande wurde um 515 nm gemessen. Durch die dysplastischen Epithelveränderungen kam es zu einem deutlich messbaren Autofluoreszenzverlust, der sich vor allem im grünen Bereich niederschlug. Hierdurch kam es zu einem relativen Überwiegen des längerwelligen roten Lichtes. Dies erklärt die endoskopisch sichtbare Fluoreszenzveränderung von der grün erscheinenden normalen Schleimhaut gegenüber der pathologischen roten Schleimhaut. Veränderte Stoffwechselprozesse scheinen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die stark schwankende Verteilung der Farbbanden im Weißlicht zeigt, dass es im Vergleich zur Autofluoreszenz anhand der Farbe sehr viel schwieriger ist ein Karzinom in seiner Dignität und Ausdehnung zu beurteilen.

In dem Kapitel der endoskopischen Autofluoreszenzuntersuchungen konnte mittels der indirekten Autofluoreszenzlaryngoskopie die Spezifität der Untersuchung im Vergleich zur Weißlichtendoskopie um 18%, der Sensitivität um 6% verbessert werden. Die mikrolaryngoskopische Autofluoreszenzendoskopie ermöglichte eine Unterscheidung zwischen maximal geringgradig dysplastischen Schleimhautveränderungen und obligaten Präkanzerosen mit einer Sensitivität von 97% und einer Spezifität von 92%. So konnten mit Hilfe der indirekten Autofluoreszenzendoskopie 12% und der direkten Autofluoreszenzendoskopie 6% der Patienten mit malignitätsverdächtigen Schleimhautveränderungen bezüglich der endgültigen histologischen Diagnose besser eingeschätzt werden.

Im letzten Kapitel wurden dann die Kompaktendoskopie sowie die indirekte 5-ALA-induzierte Fluoreszenz als alternative bzw. ergänzende bildgebende Verfahren vorgestellt.

Die Kompaktendoskopie vereint die Autofluoreszenz- sowie die Kontaktendoskopie während der Mikrolaryngoskopie in einem prätherapeutischen Untersuchungsgang. In 73 Fällen (88%) korrespondierte das Resultat der Kompaktendoskopie mit der histopathologischen Diagnose.

In nahezu allen Fällen bestätigte die Kontaktendoskopie die Autofluoreszenzdiagnostik und war in der Lage dysplastische Läsionen weiter in mittel- oder höhergradig dysplastische Veränderungen zu unterscheiden. Eine Unterscheidung zwischen einem Carcinoma in situ und mikroinvasiven Karzinom konnte durch keine der endoskopischen bildgebenden Verfahren vorgenommen werden.

Die indirekte Fluoreszenzendoskopie ist ein bildgebendes Verfahren zur Optimierung der Früherkennung von Karzinomen des Kehlkopfs und deren Vorstufen im Rahmen der ambulanten Tumordiagnostik und Nachsorge. Hierdurch wird das gewohnte laryngoskopische Bild ohne messtechnischen Aufwand im Echtzeitverfahren durch den erhöhten farblichen Kontrast veränderter Gewebsareale ergänzt. Präkanzeröse und kanzeröse Läsionen werden besser wahrgenommen und in ihrer epithelialen Ausdehnung deutlicher hervorgehoben. Die 5-ALA-induzierte Fluoreszenz während der indirekten Laryngoskopie zeigte sich gegenüber der indirekten Autofluoreszenzlaryngoskopie gleichwertig. In den Untersuchungen konnten alle invasiven Karzinome eindeutig erkannt werden. Obwohl mittels Autofluoreszenz in 89% und der PPIX-Fluoreszenz in 84% die korrekte Unterscheidung in nicht kanzerisierte und kanzerisierte Veränderungen vorgenommen werden konnte, lag die Sensitivität der PPIX-Fluoreszenz bei 97% gegenüber 94% für die Autofluoreszenz. Statistisch konnte kein signifikanter Unterschied beider Verfahren bezüglich der Erkennung von dysplastischen Veränderungen oder Karzinomen beobachtet werden. Beide Verfahren können gleichwertig im Rahmen der indirekten Laryngoskopie zur primären Tumordiagnostik eingesetzt werden, wobei die Autofluoreszenzendoskopie in wenigen Minuten ohne die Applikation von Medikamenten nur durch Knopfdruck während der indirekten Laryngoskopie

durchgeführt werden kann. Dies scheint vor allem in der routinemäßigen Anwendung durch den niedergelassenen Hals-Nasen-Ohrenarzt von großem Vorteil zu sein.

Zusätzlich zeigte die Auswertung der klinischen Relevanz in Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchers, dass gerade unerfahrenere Kollegen ihre Einschätzung bezüglich der suspekten Schleimhautläsionen durch die Autofluoreszenzendoskopie verbessern können. Je erfahrener ein Laryngologe ist, desto weniger profitiert er von der Autofluoreszenzdiagnostik. Daher erscheint diese Methode gerade auch im Bereiche der niedergelassenen Ärzte hilfreich, da hier seltener tumorverdächtige Befunde im Vergleich zu einer Klinik mit selektiertem Krankengut diagnostiziert und behandelt werden.

Insgesamt ist die Autofluoreszenzendoskopie ein nicht invasives bildgebendes Verfahren, dass die Beurteilung des Larynxkarzinoms und seiner Vorstufen sowohl im Praxis- als auch im Klinikalltag deutlich verbessert. Sowohl in der methodologischen Entwicklung neuer und Optimierung bereits bestehender Verfahren zur Fluoreszenzuntersuchung erscheinen die Grenzen derzeit noch nicht erreicht. In groß angelegten, prospektiv randomisierten Studien muß in Zukunft mittels hoher Fallzahlen der klinische Nutzen dieser neuen Methoden belegt werden, damit sie einen festen Platz in der Routinediagnostik der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde finden können.

## 10. Literatur

1. Albrecht R (1954) Über den Wert kolposkopischer Untersuchungsmethoden bei Leukoplakien und Carcinomen des Mundes und Kehlkopfes. Arch Ohrenheilk 165: 459-463
2. Alfano R, Tata D, Cordeo J (1984) Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue. IEEE J Quant Electron 20: 284-291
3. Andersson-Engels S, Beart L, Berg R, D'Hallewin MA, Johansson J, Stenram U, Svanberg K, Svanberg S (1991) Fluorescence characteristics of atherosclerotic plaques and malignant tumors. Optical Methods for Tumor Treatment and Early Diagnosis: Mechanisms and Techniques, SPIE 1426: 31-43
4. Antonelli AR, Micolai P, Cappiello J, Peretti G, Molinari-Tosatti MP, Rosa D, Grigolato PG, Favret M, Maroccolo D (1991) Basement membrane components in normal, dysplastic, neoplastic laryngeal tissue and metastatic lymph nodes. Acta Otolaryngol Stockh 111: 437-443.
5. Andrea M, Dias O, Santos A (1995) Contact endoscopy during microlaryngeal surgery : a new technique for endoscopic examination of the larynx. Ann Otol Rhinol Laryngol 104: 333-339
6. Arens C, Malzahn K, Dias O, Andrea M, Glanz H (1999a) Endoskopische bildgebende Verfahren in der Diagnostik des Kehlkopfkarzinoms und seiner Vorstufen. Laryngo Rhino Otol 78: 685-691
7. Arens C, Glanz H (1999b) Endoscopic high-frequency ultrasound of the larynx. Eur Arch Otorhinolaryngol 256: 316-322
8. Arens C, Dreyer T, Glanz H, Malzahn K (2003) Compact endoscopy of the larynx. Ann Otorhinolaryngol 112: 113-119
9. Arens C, Dreyer T, Glanz H, Malzahn K (2004a) Indirect autofluorescence laryngoscopy in the diagnosis of laryngeal carcinoma and its precursor lesions. Eur Arch Otorhinolaryngol 261: 71-76
10. Arens C, Dreyer T, Malzahn K, Glanz H (2004b) Indirect and direct autofluorescence laryngoscopy in the diagnosis of laryngeal carcinoma and its precursor lesions. Otolaryngologia Polska 58: 197-203
11. Babington BG (1829) Glottiscope. Hunterian Society, London. Med. Gaz. 3: 555
12. Becker N, Wahrendorf J (1997) Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990, Springer Verlag, Berlin
13. Beek JF, Blokland P, Posthumus P, Aalders M, Pickering JW, Sterenborg HJ, van Gemert MJ (1997) In vitro double-integrating-sphere optical properties of tissues between 630 and 1064 nm. Phys Med Biol 42: 2255-2261
14. Behrendes J (1982) Histologie In: Behrendes J, Link R, Zöller F: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in Praxis und Klinik, Bd. IV/1. Thieme Verlag, Stuttgart

15. Benjamins, CE (1928) Aandieningen van de stembanden in verband met de herkomst van het epitheel; tevens bijdrage tot de kennis van het praecarcinom. *Ned T Geneesk* 2: 5050-5064
16. Benson RC, Meyer RA, Zaruba ME, McKhann GM (1979) Cellular Autofluorescence - Is it Due to Flavins? *J Histochem Cytochem* 27: 44-48
17. Betz CS, Mehlmann M, Rick K, Stepp H, Grevers G, Baumgartner R, Leunig A (1999) Autofluorescence imaging and spectroscopy of normal and malignant mucosa in patients with head and neck cancer. *Lasers Surg Med* 25: 323-334
18. Betz CS, Stepp H, Janda A, Arbogast S, Grevers G, Baumgartner R, Leunig A (2002) A comparative study of normal inspection, autofluorescence and 5-ALA-induced PPIX fluorescence for oral cancer diagnosis. *Int J Cancer* 97: 245-252
19. Beuthan J, Zur CH, Fink F, Müller G (1990) Laser fluorescence spectroscopic experiments for metabolism monitoring. *Laser Med Surg* 6: 72-75
20. Blume H (1976) Ultraviolette Strahlen. Hrsg. J. Kiefer, de Gruyter, Berlin-New York
21. Bollag W (1994) Experimental basis of cancer combination chemotherapy with retinoids, cytokines, vit. D3, and analogs. *J Cell Biochem* 56: 427-435
22. Bozzoni P (1806) Lichtleiter, eine Erfindung zur Anschauung innerer Theile und Krankheiten nebst der Abbildung. *J pract Arzneykunde und Wundarzneykunde* 24: 107-124
23. Broders AC (1932) Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. *J Am med Ass* 99: 1670-1674
24. Brücke EW (1863) Neue Methode der phonetischen Transscription. Wien
25. Burch JD, Howe GR, Miller AB, Semenciw R (1981) Tobacco, alcohol, asbestos, and nickel in the etiology of cancer of the larynx: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 67: 1219-1224
26. Coghlan L, Utzinger U, Drezek R, Heintzelman D, Zuluaga A, Brookner C, Richards-Kortum R, Gimenez-Conti I, Follen M (2000) Optimal fluorescence excitation wavelength for detection of squamous intra-epithelial neoplasia: results from an animal model. *Optics Express* 7: 436-446
27. Colden, D., Zeitels SM, Hillman RE, Jarboe J, Bunting G, Spanou K (2001) Stroboscopic assessment of vocal fold keratosis and glottic cancer. *Annals Otol Rhinol Laryngol* 110: 293-298
28. Crissmann JD, Zarbo RJ (1989) Dysplasia, in situ carcinoma, and progression to invasive squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg Pathol* 13 Suppl 1: 5-16
29. Brünings W, Albrecht W (1915) Direkte Endoskopie der Luft- und Speisewege. Enke Verlag, Stuttgart

30. Derout J, de Brux J, Leroux-Robert J (1971) Circonstances d'apparition morphologique et potentiel évolutif des lésions précancéreuses du larynx. *J franç Oto-rhinolaryng* 20: 1057-1058
31. DeSanto LW (1994) Cancer of the larynx-psychosocial aspects. In: Hrsg. Smee R und Bridger GP. *Laryngeal cancer. Excerpta Medica. International congress series 1063*, Elsevier, Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford-Shannon-Tokyo
32. Dhingra JK, Zang X, Mc Millan K, Kabani S, Manoharan R, Itzkan I, Feld MS, Shapshay SM (1998) Diagnosis of head and neck precancerous lesions in an animal model using fluorescence spectroscopy. *Laryngoscope* 108: 471-475
33. Dreyer T, Popella C, Hinrichs B, Bohle RM, Pohlmann U, Schulz A, Glanz H (1995) Grading of precancerous laryngeal lesions by multiparameter image analysis at separate epithelial layers. *J Pathol* 177: 385-393
34. Dreyer T (2001) Die Kanzerisierung des Larynxepithels. Habilitationsschrift, Pathologie, Justus-Liebig-Universität Gießen
35. Dreyer T, Glanz H (2004) Laryngeale Epitheldysplasie vs. laryngeale intraepitheliale Neoplasie. *Pathologie* 25: 9-13
36. Dhooper SS (1985) Social work with laryngectomees. *Health-Soc-Work* 10:217-227
37. Eker C, Rydell R, Svanberg K, Andersson-Engels S (2001) Multivariate Analysis of Laryngeal Fluorescence Spectra Recorded In Vivo. *Lasers in Surgery and Medicine* 28: 259-266
38. Förster, Th (1968) Mechanism of Energy Transfer. *Energetics Mechanisms In "Radiation Biology"*, Hrsg. G.O. Phillips, Academic Press, New York
39. Friedberg SA, Stagman R, Hass GM (1971) Papillary lesions of the larynx in adults. A pathologic study. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 80(5): 683-692
40. Fryen A (1997a) Autofluoreszenzmikroskopische und -spektroskopische Untersuchungen von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes. Inaugural-Dissertation, Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
41. Fryen A, Glanz H, Lohmann W, Dreyer T, Bohle RM (1997b) Significance of autofluorescence for optical demarcation of field cancerisation in the upper aerodigestive tract. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 117: 316-319
42. Garcia M (1855) Observations on the Human Voice. *Proc Royal Soc London* 7: 399-410

43. Gillenwater A, Jacob R, Ganeshappa R, Kemp B, El-Naggar AK, Palmer JL, Clayman G, Mitchell MF, Richards-Kortum R (1998) Noninvasive diagnosis of oral neoplasia based on fluorescence spectroscopy and native tissue autofluorescence. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124: 1251–1258
44. Glanz H, Kimmich T, Eichhorn T, Kleinsasser O (1989) Behandlungsergebnisse bei 584 Kehlkopfcarcinomen an der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität Marburg. *HNO* 37: 1-10
45. Gottschalk W (1993) Ein Messverfahren zur Bestimmung der optischen Parameter biologischer Gewebe in vitro, Inaugural Dissertation, Universität Karlsruhe
46. Grau JJ, Cuchi A, Traserra J, Firviada JL, Arias C (1997) Follow-up study in head and neck cancer: cure rate according to tumor location and stage. *Oncology* 54: 38 – 42
47. Hammerlid E, Bjordal K, Ahlner-Elmqvist M, Boysen M, Evensen JF, Biorklund A, Jannert M, Kaasa S, Sullivan M, Westin T (2001) A prospective study of quality of life in head and neck cancer patients. Part I: at diagnosis. *Laryngoscope* 111: 669-680
48. Hamou JE (1981) Hysteroscopie et microhysteroscopie avec un instrument nouveau: le microhysteroscope. *Atti II Simposio Internazionale di Endoscopia Ginecologica*, COFESE Publisher, Palermo
49. Harries ML, Lam S, MacAulay C, Qu J, Palcic B (1995) Diagnostic imaging of the larynx: autofluorescence of laryngeal tumors using the helium-cadmium laser. *J Laryngol Otol* 109: 108-110
50. Harris DM, Werkhaven J (1987) Endogenous porphyrin fluorescence in tumors. *Lasers Surg Med* 7: 467-472
51. Hellquist H, Lundgren J, Olofsson J (1982) Hyperplasia, keratosis, dysplasia and carcinoma in situ of the vocal cords-a follow up study. *Clin Otolaryngol* 7: 11-27
52. Heyerdahl H, Wang I, Liu DL, Berg R, Anderson-Engels S, Peng Q, Moan J, Svanberg S, Svanberg K (1997) Pharmacokinetic studies on 5- aminolevulinic acid- induced protoporphyrin IX accumulation in tumour and normal tissue. *Cancer Lett* 112: 225-231
53. Hung J, Lam S, Leriche JC, Palcic B (1991) Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue. *Lasers Med* 11: 99-105
54. Ingrams DR, Dhingra JK, Roy K, Perrault DF Jr, Bottrill ID, Kabani S, Rebeiz EE, Pankratov MM, Shapshay SM, Manoharan R, Itzkan I, Feld MS (1997) Autofluorescence characteristics of oral mucosa. *Head Neck* 19: 27-32.
55. Jackson C (1923) Cancer of the larynx: is it preceded by a recognizable precancerous condition? *Ann. Surg* 77:1-14

56. Jakse R, Vinzenz K, Auberger T, Beck-Managetta J, Beer A, Böheim K, Frommhold H, Würinger E  
Kopf/Hals Malignome, Internet April 2001
57. Jelinek R (1966) Die Ausbreitung des Platten- und Flimmerepithels im Kehlkopf. *Z Laryngol Rhinol* 45: 1-5
58. Kennedy JC, Pottier RH (1992) Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 14: 275-292
59. Killian G (1920) Die Schwebelaryngoskopie und ihre praktische Verwertung. Urban & Schwarzenberg, Wien
60. Kirstein A (1895) Autoskopie des Larynx und der Trachea (Laryngoscopia directa, Euthyskopie, Besichtigung ohne Spiegel). *Arch Laryngol Rhinol* 3: 156-164
61. Kleinsasser O (1959) Über die verschiedenen Formen der Plattenepithelhyperplasien im Kehlkopf und ihre Beziehungen zum Carcinom. *Arch Ohr- Nas- u. Kehlk- Heilk* 174: 290-313
62. Kleinsasser O (1962) Die Laryngomikroskopie (Lupenlaryngoskopie) und ihre Bedeutung in der Erkennung von Vorerkrankungen und Frühformen des Stimmlippenkarzinoms. *Arch Ohrenheilk* 180: 724-727
63. Kleinsasser O (1963) Die Klassifikation und Differentialdiagnose der Epithelhyperplasien der Kehlkopfschleimhaut auf Grund histomorphologischer Merkmale. *Z Laryngol Rhinol* 42: 339-362
64. Kleinsasser O (1964) Über die Behandlung einfacher und präkanzeröser Epithelhyperplasien der Kehlkopfschleimhaut. *Laryngol Rhinol Otol* 43: 14-24
65. Kleinsasser O (1987) Tumoren des Larynx und des Hypopharynx. Thieme Verlag, Stuttgart-New York
66. Klestadt W (1928) Beitrag zur Frage hyperkeratotischer und präcanceröser Bildungen im Kehlkopf. *Z Hals- Nas- u. Ohrenheilk* 19: 500-504
67. Köhn R (1969) Kehlkopf und Luftröhre. In: Spezielle pathologische Anatomie. Hrsg. Doerr W, Seifert G, Uehlinger E, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
68. Koenig F, McGovern FJ, Althausen AF, Deutsch TF, Schomacker KT (1996) Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer. *J Urol* 156: 1597-1601
69. Kolli VR, Savage HE, Yao TJ, Schantz SP (1995a) Native cellular fluorescence of neoplastic upper aerodigestive mucosa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121: 1287 – 1292
70. Kolli VR, Shaha AR, Savage HE et al. (1995b) Native cellular fluorescence can identify changes in epithelial thickness in-vivo in the upper aerodigestive tract. *Am J Surg* 170: 495-498
71. Krebsatlas: Kapitel Kehlkopf (2003) Deutsches Krebsforschungszentrum-Internet:www.dkfz.de

72. Kriegsmair M, Baumgartner R, Knüchel R, Lumper W, Steinbach P, Ehsan A, Hofstätter F, Hofstetter A (1994) Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-Aminolevulinic acid (ALA). *Urology* 44: 836-841
73. Kruse E, Michaelis D, Zwirner P, Bender E (1997) Stimmfunktionelle Qualitätssicherung in der kurativen Mikrochirurgie der Larynxmalignome. *HNO* 45: 712–718
74. Külkens C, Lippert BM, Broßmann P, Folz BJ, Werner JA (2000) Autofluoreszenz-Endoskopie bei tumorösen Veränderungen des Kehlkopfs. In: *Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie*. Hrsg. Lippert BM, Schmidt S, Werner JA. Shaker Verlag, Aachen
75. Lam S, Kennedy T, Unger M (1998) Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy. *Chest* 113: 696-702
76. Lam S, MacAulay C, Hung J, LeRiche J, Profio AE, Palcic B (1993) Detection of dysplasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device. *J Thorac Cardiovasc Surg* 105: 1035-1040.
77. Leunig A, Betz CS, Mehlmann M, Stepp H, Arbogast S, Grevers G, Baumgartner R (2000) Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX fluorescence. *Laryngoscope* 110: 78-83
78. Leunig A, Mehlmann M, Betz CS, Stepp H, Arbogast S, Grevers G, Baumgartner R (2001) Fluorescence staining of oral cancer using topical application of 5-aminolevulinic acid: fluorescence microscopic studies. *J Photochem Photobiol B* 60: 44-49
79. Leunig A, Betz CS (2003) Fluoreszenzdiagnostik in der HNO-Heilkunde. In „Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie“. Hrsg. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M, Blackwell Verlag, Berlin-Wien
80. Lippert BM, Külkens C, Klahr N, Folz BJ, Werner JA (2000) 5-Delta-Aminolävulinsäure induzierte Fluoreszenzdiagnostik bei Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege – erste Ergebnisse. In *Fluoreszenzdiagnostik und photodynamische Therapie*. Hrsg. Lippert BM, Schmidt S, Werner JA, Shaker Verlag, Aachen
81. Malzahn K, Dreyer T, Glanz H, Arens C (2002) Autofluorescence endoscopy in the diagnosis of early laryngeal cancer and its precursor lesions. *Laryngoscope* 112: 488-493
82. Maier H, Tisch M (1997) Epidemiology of laryngeal cancer. In: *Advances in Laryngology in Europe* Hrsg. Kleinsasser O, Glanz H, Olofsson J, Elsevier, Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford-Shannon-Tokyo

83. Maier H, Fischer G, Sennewald E, Heller WD (1994a): Berufliche Risikofaktoren für Rachenkrebs. Ergebnisse der Heidelberger Rachenkrebsstudie. HNO 42: 53 -540
84. Maier H, Senewald E, Heller GF, Weidauer H (1994b) Chronic alcohol consumption – the key risk factor for pharyngeal cancer. Otolaryngol Head Neck Surg 110: 168-173
85. Macfarlane GJ, Zheng T, Marshall JR, Bofetta P (1995): Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. Eur J Cancer Oral Oncol 31B: 181–187
86. Maguire AJ (1974) Leukoplakia laryngis: problems in management. Canad J Otolaryngol 3: 70-73
87. McQuellon RP, Hurt GJ (1997) The psychosocial impact of the diagnosis and treatment of laryngeal cancer. Otolaryngol Clin North Am 30: 231-241
88. Mehlmann M, Betz CS, Stepp, Arbogast S, Baumgartner R, Grevers G, Leunig A (1999) Fluorescence staining of laryngeal neoplasms after topical application of 5-Aminolaevulinic acid: preliminary results. Lasers Surg Med 25: 414-420
89. Merletti F, Bofetta P, Ciccone G, Mashberg A, Terracini B (1989): Role of tobacco and alcoholic beverages in the etiology of cancer of the oral cavity/oropharynx in Torino, Italy. Cancer Res 49: 4919 – 4924
90. Moesta KT, Ebert B, Handke T, Rinneberg H, Schlag PM (2003) Fluorimetrische Methoden in der chirurgischen Diagnostik. In Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie Hrsg. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M, Blackwell Verlag, Berlin-Wien
91. Moreno-Lopez LA, Esparza-Gomez GC, Gonzales-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, Gonzales-Hernandez MJ, Dominguez-Rojas V (2000) Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. Oral Oncol 36: 170–19174
92. Panjehpour M, Overholt BF, Vo-Dinh T, Haggitt RC, Edwards DH, Buckley FP3rd (1996) Endoscopic fluorescence detection of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. Gastroenterology 111: 93-101
93. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999) Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. Int J Cancer 80: 827 – 841
94. Policard A (1924) Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinées a la lumière de Wood. CR Soc Biol 91: 742-743
95. Pollack MA, Taylor A, Taylor J, Williams RJ (1942) B vitamins in cancerous tissues. I. Riboflavins. Cancer Res 2: 739-743
96. Quante M, Strauss P, Korte W, Edinger D (1976) Verlaufsbeobachtung der Leukoplakie im Kehlkopf. Laryngol Rhinol Otol 55: 99-102

97. Raitiola HS, Pukander JS (1997) Changing trends in the incidence of laryngeal cancer. *Acta Oncol* 36: 33-36
98. Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan A, Warren S, Thomsen S, Silva E (1994) *In vivo* diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence. *Proc Natl Acad Sci* 91: 10193-10197
99. Relic A, Mazemda P, Arens C, Koller M, Glanz H (2001) Investigating quality of life and coping resources after laryngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 258: 514-517
100. Resta L, Colucci GA, Troia M, Russo S, Vacca E, Pesce Delfino V (1992) Laryngeal intraepithelial neoplasia (LIN). An analytical morphometric approach. *Pathol Res Pract* 188: 517-523
101. Richards-Kortum R, Rava R, Baraga J, Fitzmaurice M, Kramer J, Feld M (1990) In: *Optronic techniques in diagnostic and therapeutic medicine*. Hrsg. Pratesi R, Plenum, New York
102. Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E (1996) Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu Rev Phys Chem* 47: 555-606
103. Robbett WF (1972) Premalignant changes in the vocal cord. *Laryngoscope* 82: 1007-1012
104. Rudert H, Werner JA (1994) Endoskopische Teilresektionen mit dem CO<sub>2</sub>-Laser bei Larynxkarzinomen. I. Resektionstechniken. *Laryngo Rhino Otol* 73: 71-77
105. Sauer G (1936) Ein neues Photo-Laryngoskop. *Z Hals- Nas- u Ohrheilk* 41: 187-189
106. Schanmugaratnam K, Sobin LH (1991) *Histological typing of tumors of the upper respiratory tract and ear*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
107. Schön D (1999) *Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland*. Verlag Robert Koch Institut, Berlin
108. Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, Flotte TJ, Richter JM, Nishioka NS, Deutsch TF (1992) Ultraviolet Laser-Induced Fluorescence of Colonic Tissue: Basic Biology and Diagnostic Potential. *Laser Surg Med* 12: 63-78
109. Seiferth LB, Glanz H (1971) Carcinoma in situ laryngis. *Klinik und Pathologie. Laryngol Rhinol Otol* 50: 827-854
110. Stell PM, Gregory I, Watt J (1978) Morphometry of the epithelial lining of the human larynx. *Clinical Otolaryngology* 3: 13-20
111. Steiner W (1993) Results of curative laser microsurgery of laryngeal carcinoma. *Am J Otolaryngol* 14: 116-121

112. Straßburg M, Knolle G (1991) Farbatlas und Lehrbuch der Mundschleimhautrekrankungen. Quintessenz, Chicago-London-Berlin-Sao Paulo-Tokio
113. Stuckrad Hv, Lakatos I (1975) Über ein neues Lupenlaryngoskop (Epipharyngoskop). *Laryngol Rhinol Otol* 54: 336-340
114. Tang GC, Pradhan A, Alfano RR (1989) Spectroscopic differences between human cancer and normal lung and breast tissues. *Lasers Surg Med* 9: 290-295.
115. Van Gemert M, Jacques S, Sterenborg H, Star W (1989) Skin optics. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 36: 1146-1154
116. Vargas G, Chan KF, Thomsen SL, Welch AJ (2001) Use of osmotically active agents to alter optical properties of tissue: effects on the detected fluorescence signal measured through skin. *Lasers Surg Med* 29: 213-220
117. Večerina S, Krajina (1983) Phonatory function following unilateral laser cordectomy. *J Laryng* 97: 1139-1144
118. Vo-Dinh T, Panjehpour M, Overholt BF, Farris C, Buckley FP, Sneed R (1995) In Vivo Cancer Diagnosis of the Esophagus Using Differential Normalized Fluorescence (DNF) Indices. *Laser Surg Med* 16: 41-47
119. Wang TD, van Dam J, Crawford JM, Preisinger EA, Wang Y, Feld M (1996) Fluorescence Endoscopic Imaging of Human Colonic Adenomas. *Gastroenterology* 111: 1182-1191
120. Zain RB, Ikeda N, Gupta PC, Warnakulasuriya S, van Wyk CW, Shrestha P, Axell T (1999) Oral mucosal 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* 28: 1-4
121. Zargi M, Smid L, Fajdiga I, Bubnic B, Lenarcic J, Oblak P (1997) Laser induced fluorescence in diagnostics of laryngeal cancer. *Acta Otolaryngol Suppl* 527: 125-127
122. Zargi M, Fajdiga I, Smid L (2000) Autofluorescence imaging in the diagnosis of laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 257: 17-23
123. Zenk W, Dietel W, Schleier P, Gunzel S (1999) Visualizing carcinomas of the mouth cavity by stimulating synthesis of fluorescent protoporphyrin IX. *Mund Kiefer Gesichtschir* 3: 205-209
124. Zonios GI, Cothren RM, Arendt JT, Wu J, Van-Dam J, Crawford JM, Manoharan R, Feld MS (1996) Morphological model of human colon tissue fluorescence. *IEEE Trans Biomed Eng* 43: 113-122

## 11. Danksagung

Mein Dank gilt besonders meiner Lehrerin *Frau Prof. Dr. Hiltrud Glanz*, die mir das Thema gestellt und die Betreuung der Habilitationsarbeit übernommen hat. Ohne ihre stetige vertrauensvolle Unterstützung aber auch kritische Begleitung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Weiterhin richtet sich mein Dank an *Priv.-Doz. Dr. Thomas Dreyer*, der in den häufigen gemeinsamen Gesprächen neue Anregungen gab und maßgeblich zum Gelingen der Habilitationsschrift vor allem dem pathohistologischen Teil beigetragen hat.

Für die Mitbetreuung und wichtige Unterstützung im physikalischen Teil der Arbeit danke ich *Dr. Harald Neubacher* vom Institut für Strahlenphysik. Seine stete Diskussionsbereitschaft über biophysikalische Aspekte, die Hinweise bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse waren sehr wertvoll. Ebenso danke ich *Frau Dr. Hersemeyer* und *Prof. Dr. Preissner* aus dem Institut der Biochemie für die Hilfe beim Mikroskopieren am Fluoreszenzmikroskop und der Auswertung der erstellten Bilder.

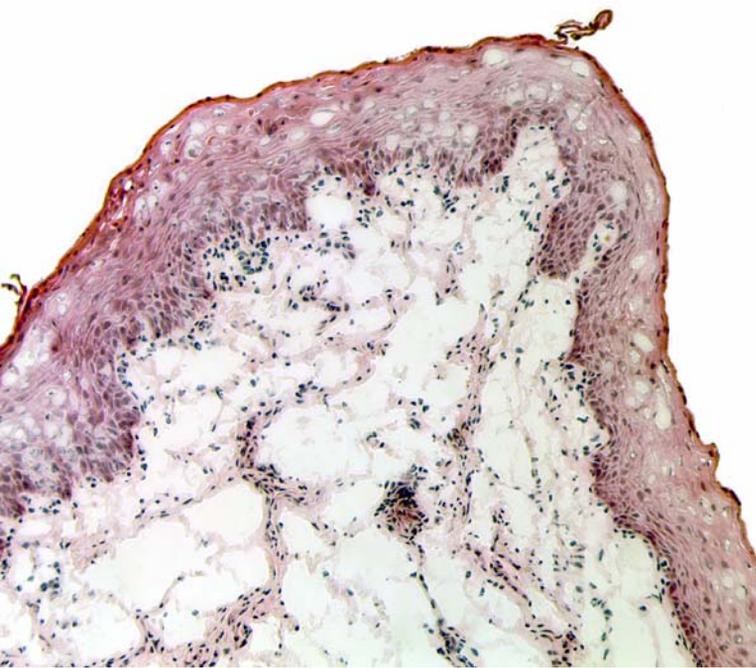
Einen besonderen Dank gilt auch meinen Kollegen *Dr. Karin Malzahn*, *Dr. Dirk Reußner*, *Dr. Andreas Fryen* und *Dr. Michael Sippmann*, die durch ihre Mitarbeit entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Für die Beratung in statistischen Fragen bedanke ich mich sehr herzlich bei meinem Freund *Dr. Michael Hauptmann*.

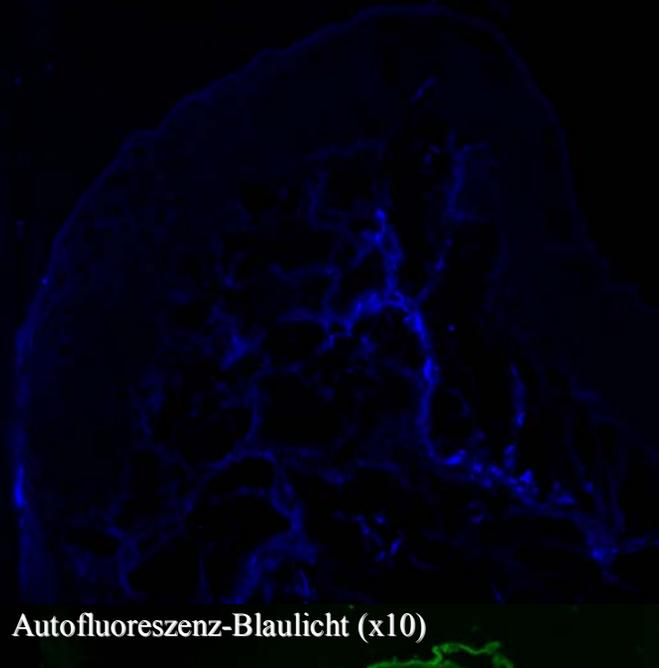
Last but not least möchte ich meiner Familie danken, die mich während meiner Studien- als auch Arbeitszeit nach vereinten Kräften unterstützt hat und ohne deren Mithilfe diese Arbeit sicher niemals entstanden wäre.



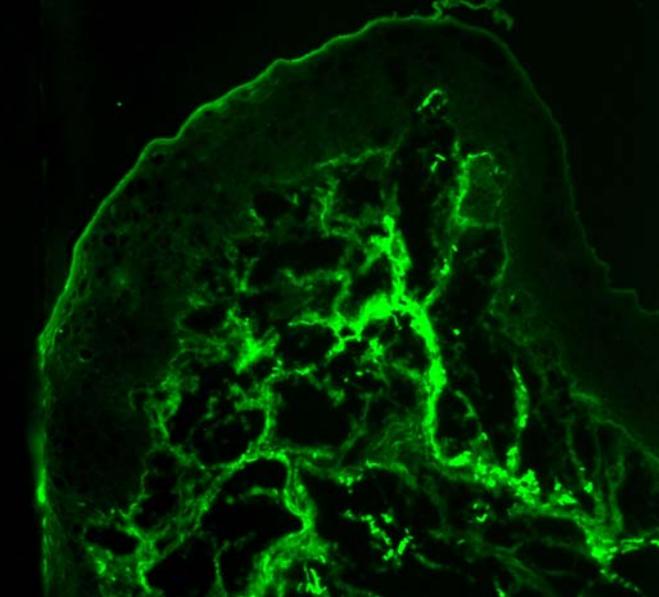
Hämatoxylin & Eosin (x10)



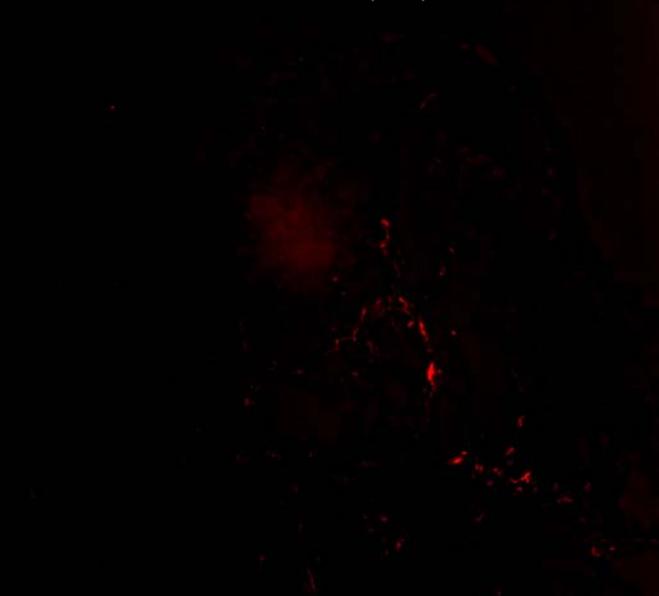
Autofluoreszenz-UV-Licht (x10)



Autofluoreszenz-Blaulicht (x10)



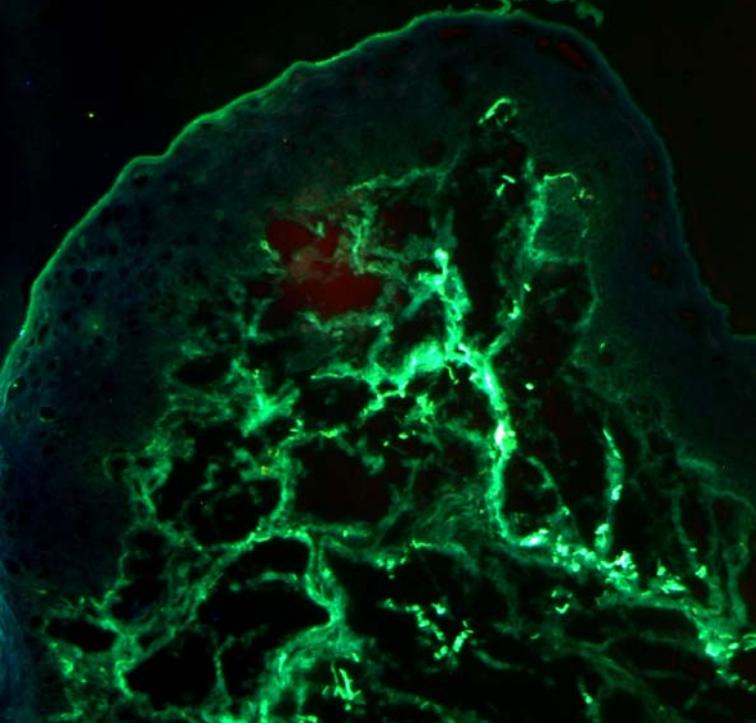
Autofluoreszenz-Grünlicht (x10)

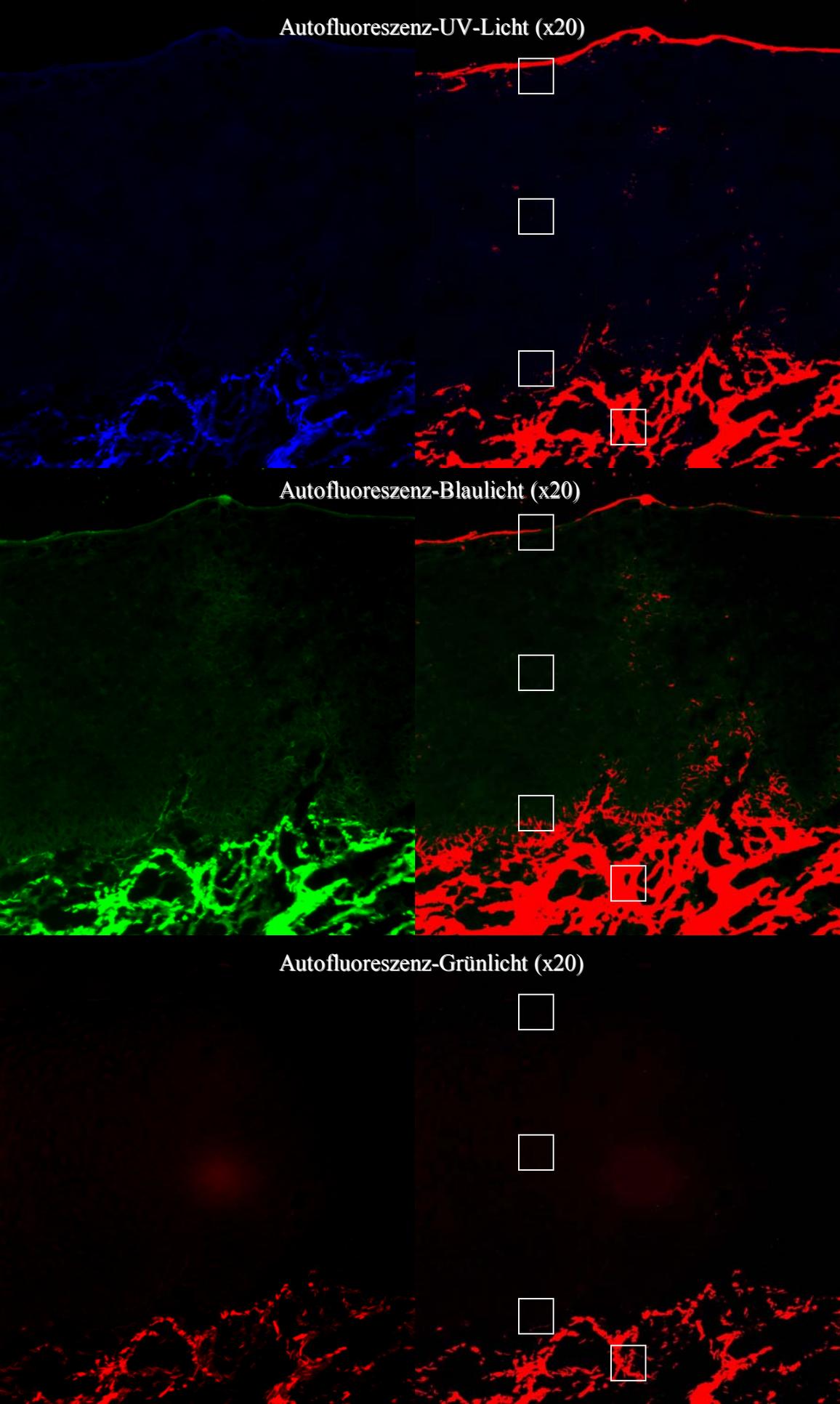


Abbildungen 6.3.1 – 6.3.5

Auf den Abbildungen beobachtet man die Kryoschnitte eines max. mittelgradig dysplastischen Stimmlippenepithels, dass zur Kontrolle mit Hämatoxylin & Eosin eingefärbt wurde. Die übrigen Schnitte zeigen das gleiche Areal unter unterschiedlicher Autofluoreszenzanregung. Die mit dem Computer erzeugte Overlaydarstellung, bildet eine Synthese aus den drei verschiedenen Autofluoreszenzverfahren in einem Schnittbild.

Autofluoreszenz-Overlay (x10)





Abbildungen 6.3.6 – 6.3.11

Die linken Abbildungen zeigen die unterschiedlichen histologischen Autofluoreszenzdarstellungen des Stimmrippenepithels bei x20 Vergrößerung. Die Autofluoreszenzintensitäten wurden mit densitometrischen Messungen bei definierten Schwellenwerten anhand der rechtsseitig dargestellten binären Bilder ermittelt. Die Quadrate zeigen die unterschiedlich positionierten Meßkammern an.



rechts

Abbildung 7.2.1

Das mikrolaryngoskopische Weißlichtbild zeigt eine Leukoplakie der rechten Stimmlippe als Grund für die Exzisionsbiopsie. Zusätzlich fällt eine irreguläre linke Stimmlippenkante mit einer leichten Erythroplakie auf.

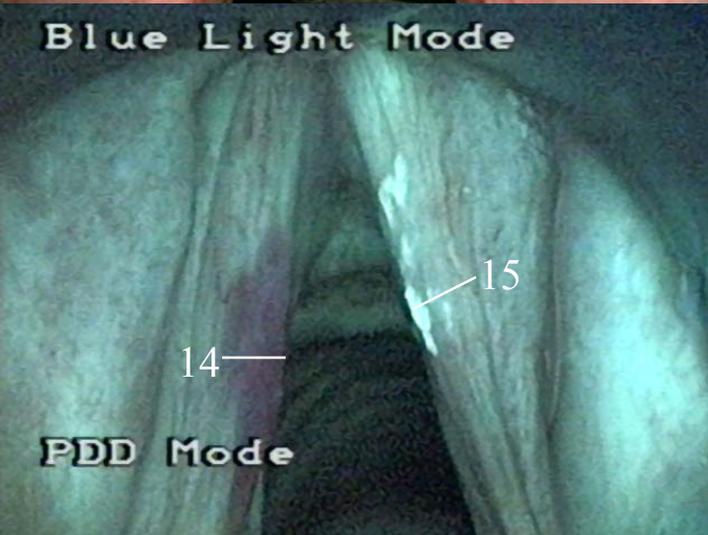


Abbildung 7.2.2

Das autofluoreszenzendoskopische Bild zeigt eine scharf abgegrenzte Läsion der linken Stimmlippe, in der das Autofluoreszenzsignal in den roten und violetten Bereich im Gegensatz zur Grünfluoreszenz des normalen Gewebes im vorderen und hinteren Teil der Stimmlippe verändert ist. Die Leukoplakie der rechten Stimmlippe zeigt ein verstärktes grünes Fluoreszenzsignal und eine normale Grünfluoreszenz des umgebenden Gewebes. Die histopathologischen Veränderungen der markierten Regionen sind in der unteren Abbildungen dargestellt.

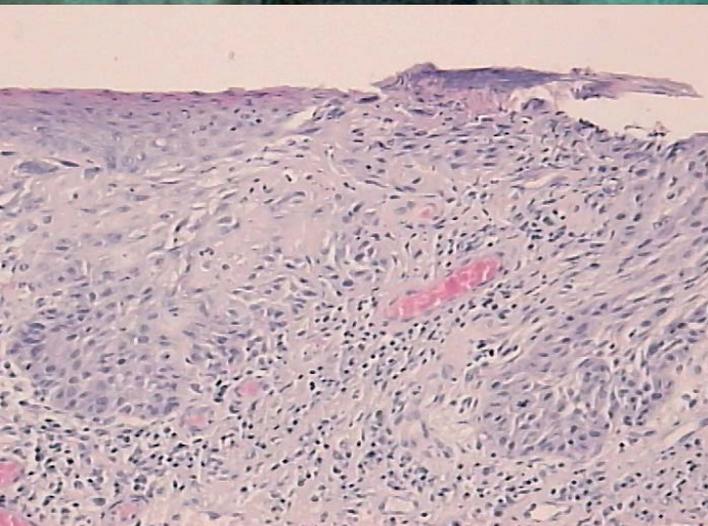


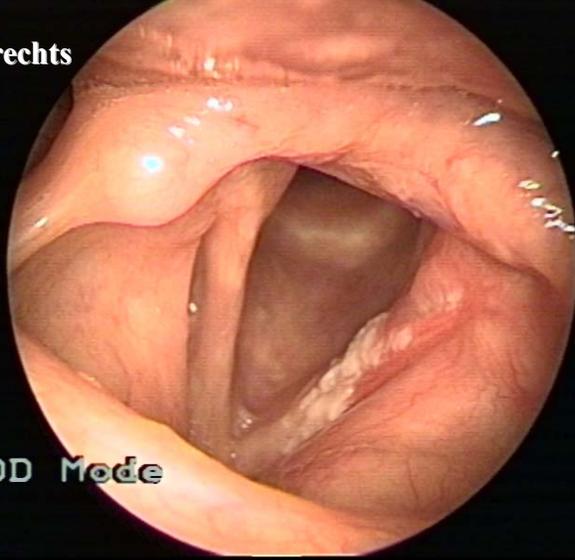
Abbildung 7.2.3

Histologischer Stufenserienschnitt (Hämatoxylin & Eosin, x20) der linken Stimmlippe: Ein Karzinoma in situ mit Akanthose, Verlust der Differenzierung und Stratifikation, irregulär geformte dysplastische Zellen und hyperchromatische Nuklei. Die Basalmembran war nicht durchbrochen.

Abbildung 7.2.4

Histologischer Stufenserienschnitt (Hämatoxylin & Eosin, x40) der rechten Stimmlippe: Einfache plattenepitheliale Hyperplasie ohne zelluläre Atypien bedeckt mit einer Hornschicht.

rechts



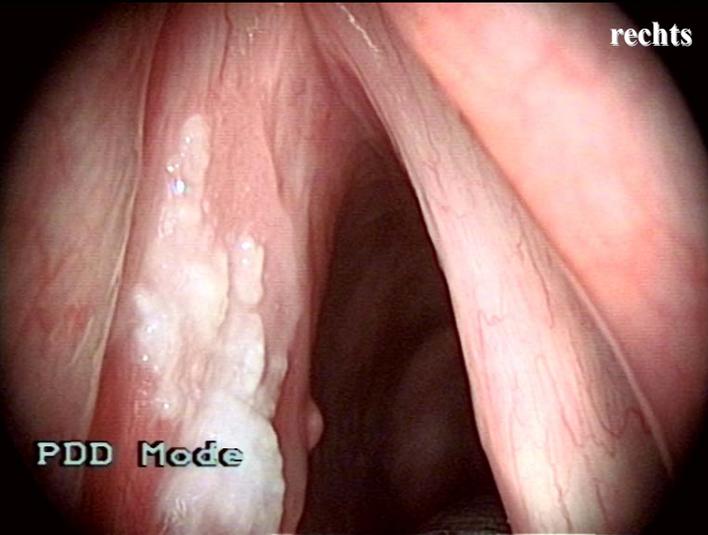
PDD Mode

Blue Light Mode



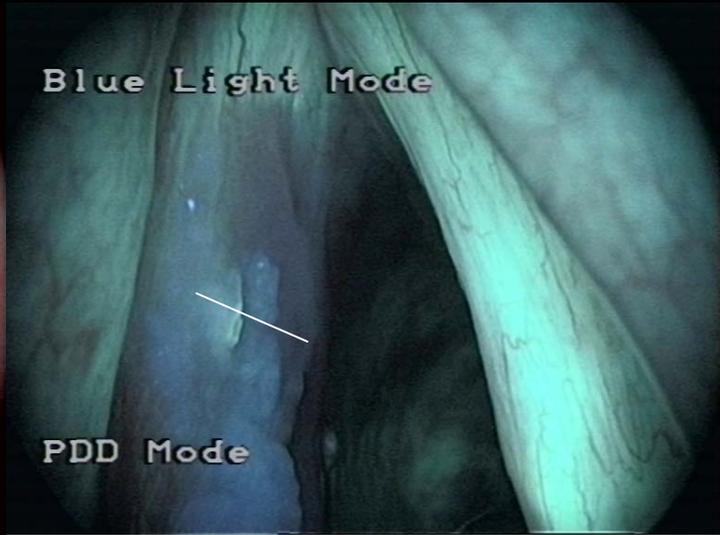
PDD Mode

rechts



PDD Mode

Blue Light Mode



PDD Mode

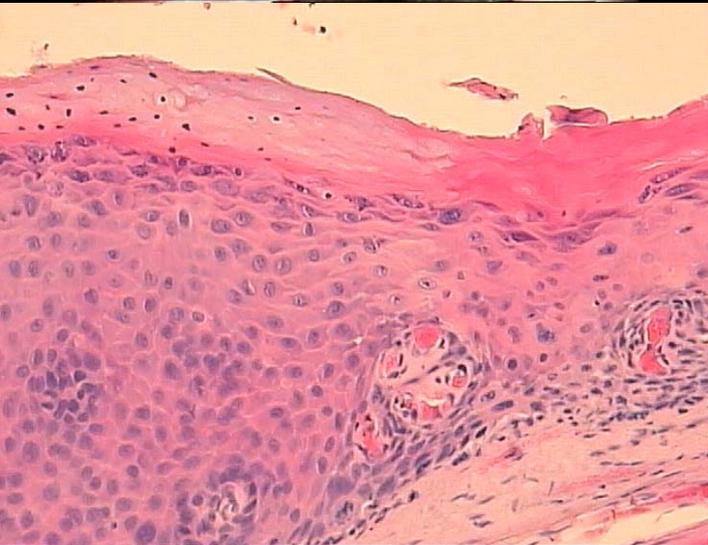


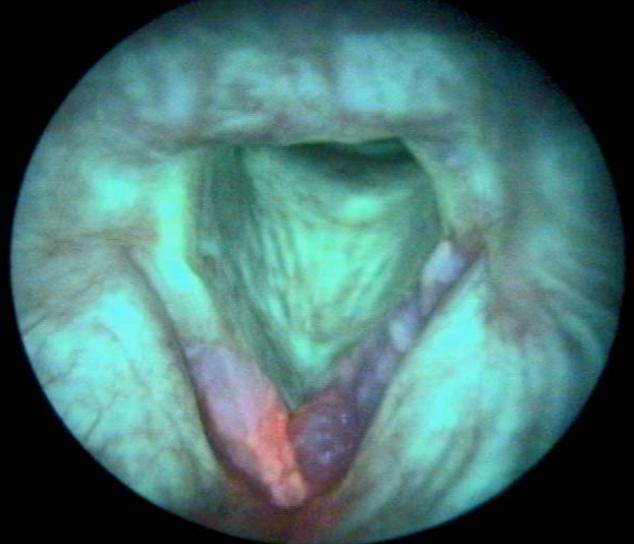
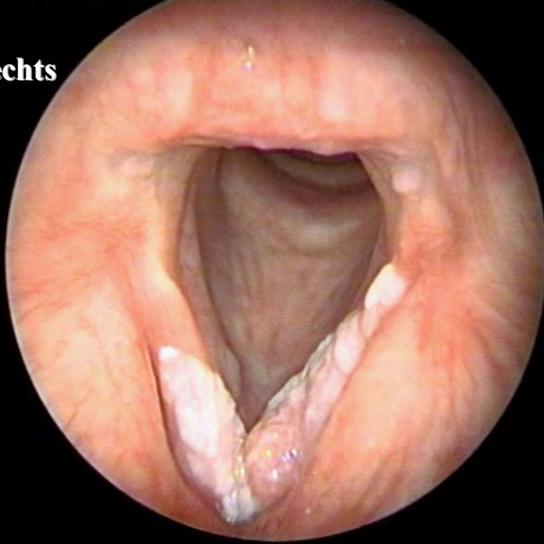
Abbildung 7.2.9

Histologischer Stufenserienschnitt (Hämatoxylin & Eosin, x40) der linken Stimmlippe mit einer mittelgradigen Epitheldysplasie. Die Oberfläche ist mit einer keratotischen Schicht bedeckt.

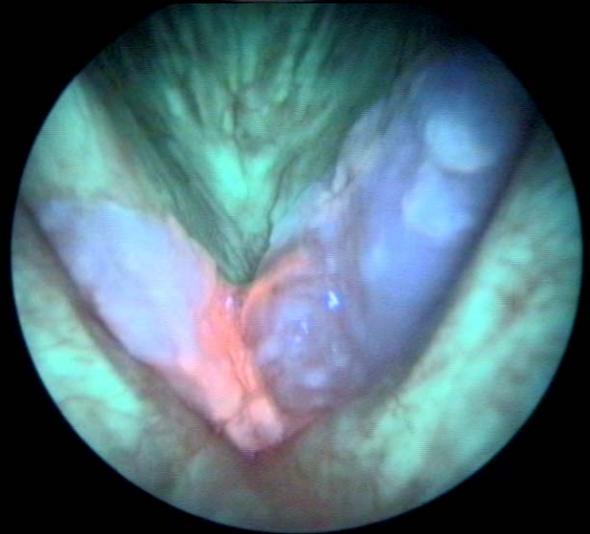
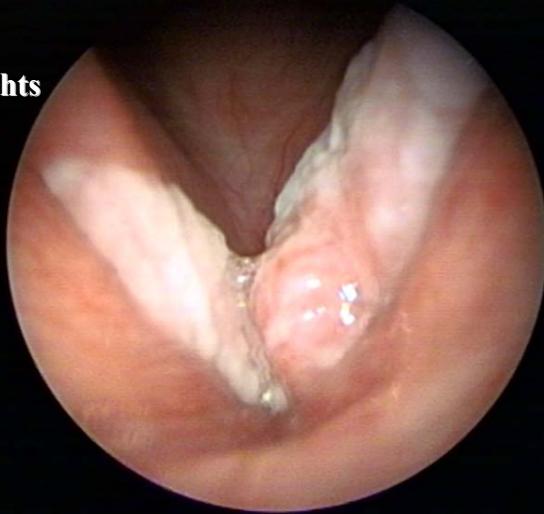
Abbildungen 7.2.5 – 7.2.8

In den endoskopischen Darstellungen wird die gleiche Läsion der linken Stimmlippe während indirekter (7.2.5 – 7.2.6) und direkter (7.2.7 – 7.2.8) Laryngoskopie im Weißlicht- und Autofluoreszenzmodus dargestellt. Die rechte Stimmlippe zeigt weder in der Lupenlaryngoskopie noch in der Autofluoreszenzendoskopie sichtbare Schleimhautveränderungen. Im Gegensatz dazu zeigt die linke Stimmlippe eine leukoplakische Veränderung, die im Autofluoreszenzmodus einen deutlichen Autofluoreszenzverlust aufweist. Typischerweise ändert sich in präkanzerösen und kanzerösen Läsionen das Fluoreszenzsignal der Schleimhaut von einer Grünfluoreszenz in eine rötlich-violette Färbung.

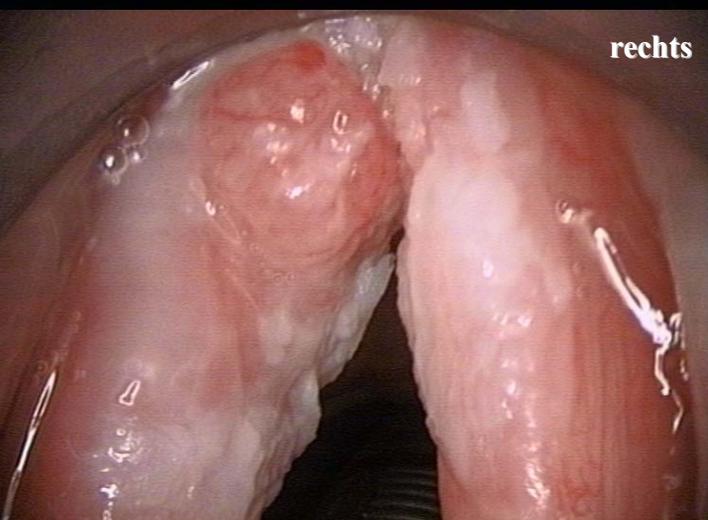
rechts



rechts



rechts



Die Abbildungen (7.2.10 – 7.2.15) der indirekten und direkten Laryngoskopie im Weißlicht- und Autofluoreszenzmodus zeigen ein verhornendes Plattenepithelkarzinom der linken Stimmlippe mit Überschreiten der vorderen Kommissur. Im vorderen Drittel der linken Stimmlippe kann eine papillär-exophytische Veränderung nachgewiesen werden. Die Autofluoreszenzdarstellungen zeigen einen ausgeprägten Autofluoreszenzverlust der linken Stimmlippe und vorderen Kommissur, der typisch für eine kanzeröse Veränderung ist. Rechtsseitig finden sich höhergradig dysplastische Veränderungen. Zwischen der indirekten und direkten Darstellung ist in der Aufsicht kein deutlicher Informationsgewinn zu erzielen. Die orangefarbene Fluoreszenz im Bereich der vorderen Kommissur wird durch eine bakterielle Besiedlung

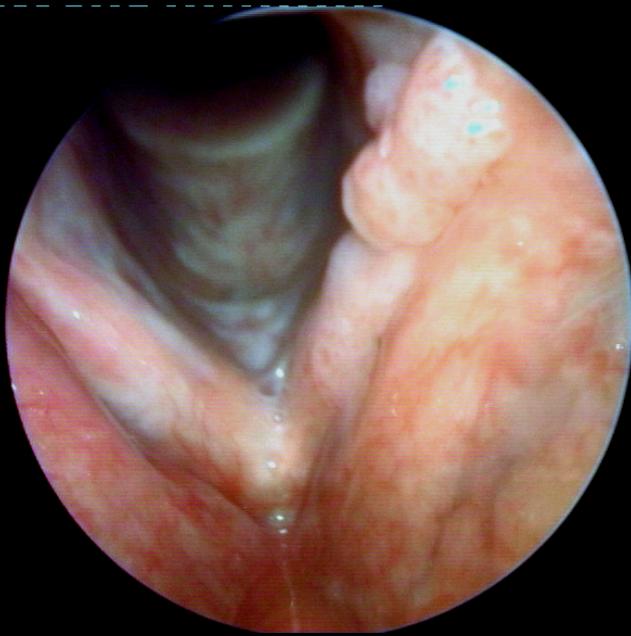


Abbildung 8.2.2

Die Lupenlaryngoskopie zeigt eine papilläre Veränderung der linken Stimmlippe, die sich vom Proc.vocalis bis in das vordere Drittel erstreckt. Die histologische Aufarbeitung ergab ein Papillom der linken Stimmlippe.



Abbildung 8.2.3

Im indirekten autofluoreszenz-laryngoskopischen Bild zeigt sich ein deutlicher Autofluoreszenzverlust des Papilloms, der einen Tumor imitieren kann. Jedoch ist die Veränderung scharf begrenzt und weist keine Keratosen auf.

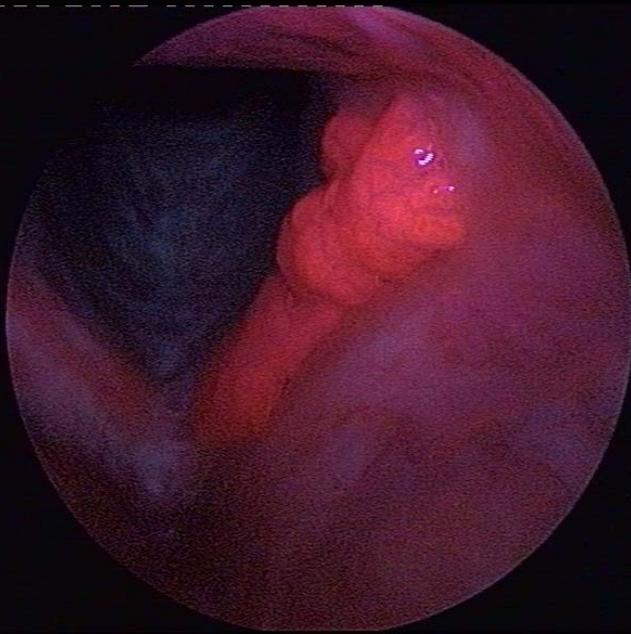


Abbildung 8.2.4

Auch die induzierte Fluoreszenz zeigt nach topischer Applikation von 5-Aminolävulinsäure eine deutliche Fluoreszenz des Papilloms. Die 5-ALA-induzierte PPIX-Fluoreszenz ist nicht tumorselektiv. Beide Fluoreszenzverfahren erleichtern zusätzlich die Detektion von versprengten Papillomen oder Rezidivpapillomen.

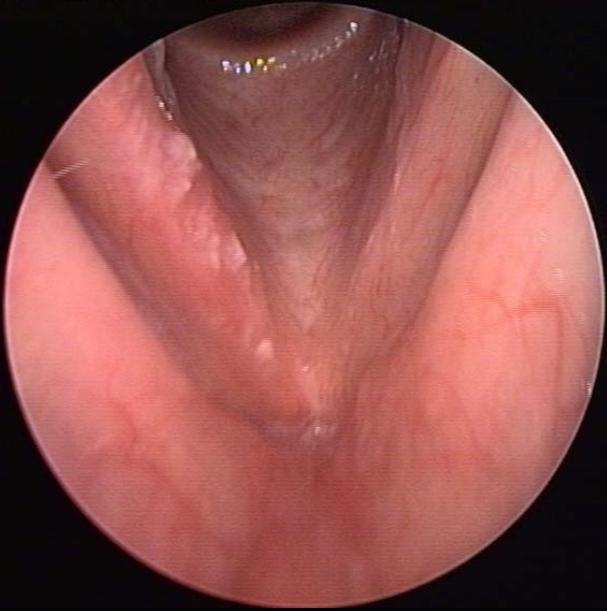


Abbildung 8.2.5

Im laryngoskopischen Bild findet sich eine irreguläre Leukoplakie an der medialen Kante der rechten Stimmlippe. Zusätzlich können Gefäßtypen beobachtet werden. Die linke Stimmlippe erscheint unauffällig.

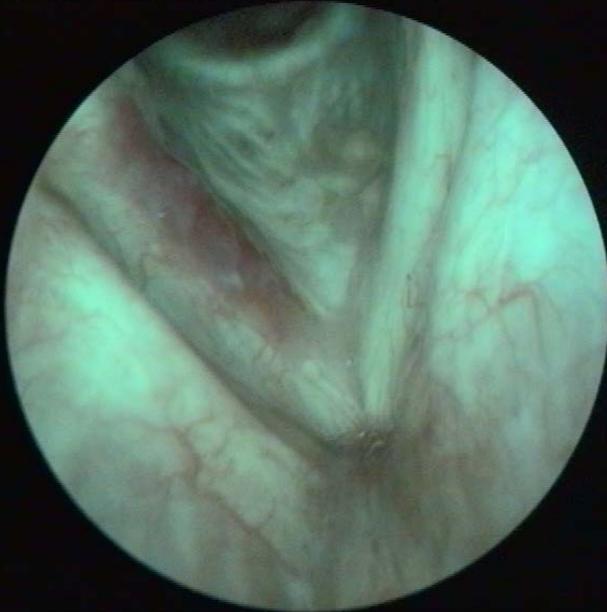


Abbildung 8.2.6

In der indirekten Autofluoreszenzlaryngoskopie kann im Bereich der Leukoplakie ein deutlicher Verlust der Grünfluoreszenz nachgewiesen werden. Die Grenzen der Läsion sind deutlich sichtbar. Die Veränderungen in der Autofluoreszenz zeigen eindeutig den kanzerösen Charakter der Läsion, die sich in der histopathologischen Untersuchung als mikroinvasives Stimmlippenkarzinom herausstellte.



Abbildung 8.2.7

Darstellung der PPIX-Fluoreszenz nach Inhalation von 5-Aminolävulinsäure. Durch die Akkumulation von Protoporphyrin IX in den kanzerisierten Zellen wird der Tumor unter Fluoreszenzbetrachtung in seiner vollen Ausdehnung sichtbar. Zusätzlich erscheint die Veränderung im Vergleich zur normalen Weißlichtbetrachtung klarer abgrenzbar.

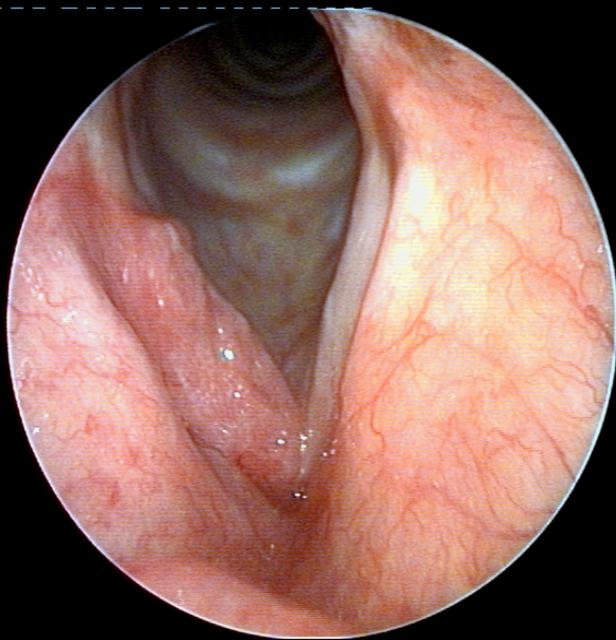


Abbildung 8.2.8

Schon in der Weißlichtendoskopie erkennt man deutlich einen wenig verhornenden und ulzerierenden Tumor der rechten Stimmlippe. Das Epithel der linken Stimmlippe ist hyperkeratotisch verdickt. Das Chordektomiepräparat ergab ein Plattenepithelkarzinom der linken Stimmlippe.

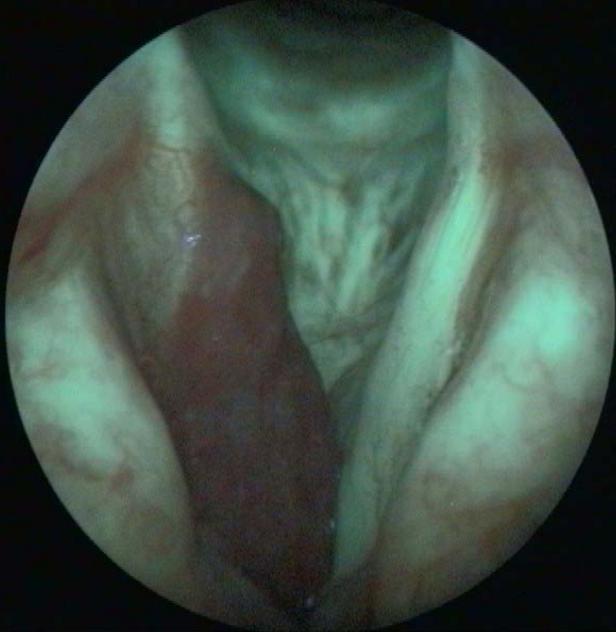


Abbildung 8.2.9

In der Autofluoreszenzendoskopie zeigt der Tumor einen deutlichen Verlust der Grünfluoreszenz. Hierdurch zeigt sich ein scharfer Kontrast des kanzerösen zum normalen Gewebe. Dies wird vor allem im Bereich der vorderen Kommissur und im hinteren Stimmlippendrittel deutlich. Die Tumorgrenzen sind deutlich besser sichtbar im Vergleich zur normalen Lupenlaryngoskopie.

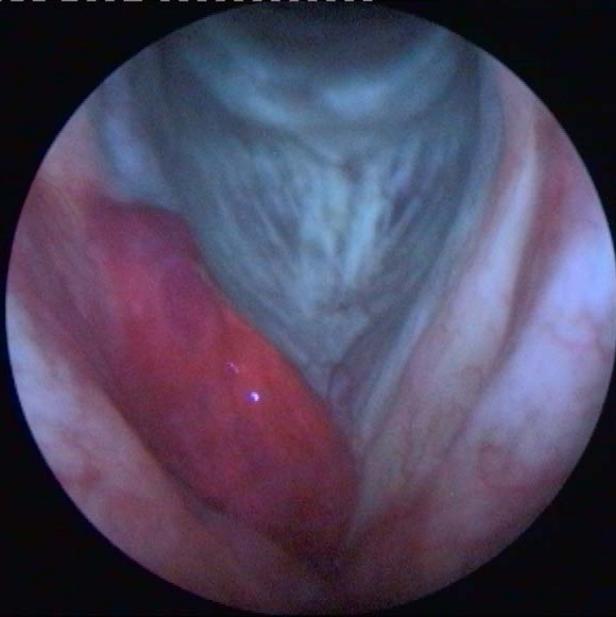


Abbildung 8.2.10

Der Tumor zeigt eine deutliche PPIX-Fluoreszenz der rechten Stimmlippe und eine scharfe Abgrenzung zum gesunden Epithel. Auch hierdurch kann eine deutlich kontrastreichere Darstellung der Läsion erzielt werden. Die Fluoreszenzdarstellung ist erneut augenscheinlich eindeutiger hinsichtlich des Befundes als die normale Weißlichtdiagnostik.

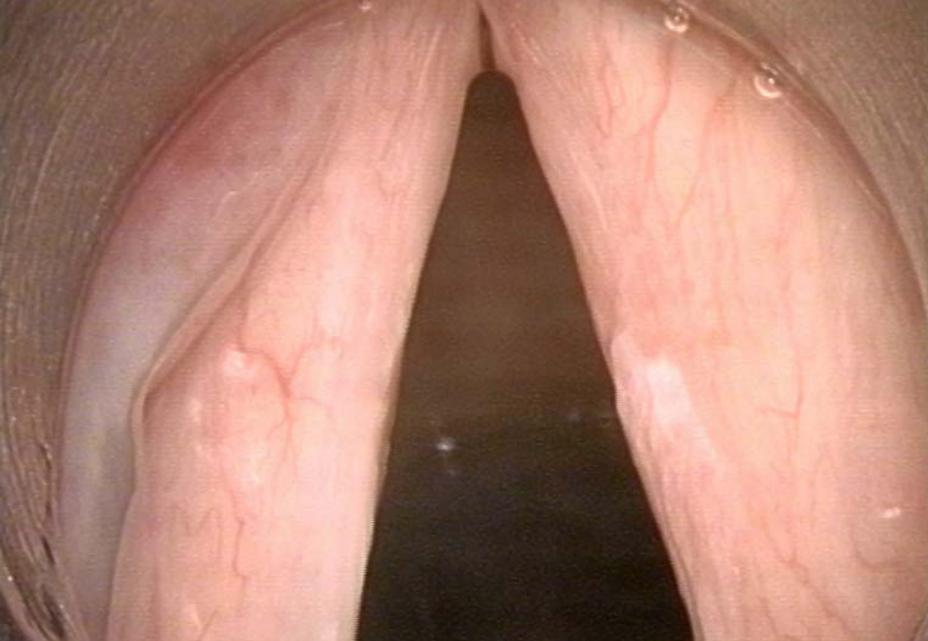


Abbildung 8.1.1

Mikrolaryngoskopisches Weißlichtbild einer histologisch nachgewiesenen leichten plattenepithelialen Dysplasie mit hyperkeratotischer Verdickung der linken und irregulärer Verdickung der rechten Stimmlippe.



Abbildung 8.1.2

Das autofluoreszenzendoskopische Bild zeigt keinen Signalverlust an beiden Stimmlippen. Taschenfalten und Stimmlippen zeigen die gleiche Autofluoreszenzintensität in Regionen ohne pathologische Veränderungen. Die linke hyperkeratotische Läsion zeigt die typische helle Grünfluoreszenz.

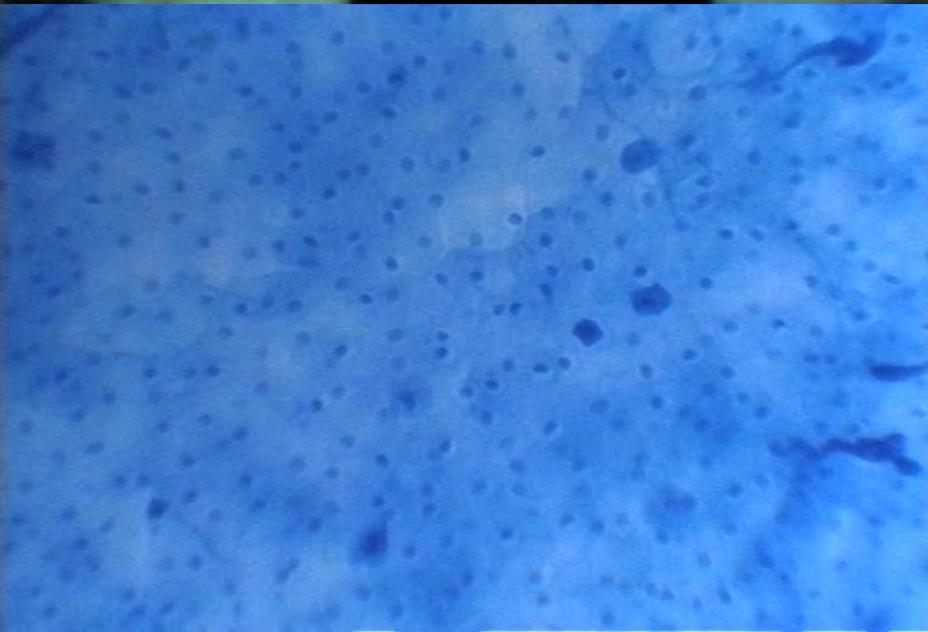


Abbildung 8.1.3

Die Kontaktendoskopie (x60) zeigt annähernd reguläre Zellformationen und Kern-Plasma-Relationen. Die Zellverteilung erscheint homogen und demonstriert ein hellblaues Zytoplasma auf. Die plattenepithelialen Zellen weisen runde oder ovale sowie dunkel angefärbte Zellkerne auf.



Abbildung 8.1.4

Mikrolaryngoskopisches Weißlichtbild mit einer bilateralen hyperkeratotischen Verdickung und irregulärem Rand der Stimmlippen.



Abbildung 8.1.5

Die Autofluoreszenzendoskopie zeigt einen rechtsbetonten Autofluoreszenzverlust beider Stimmlippen. Das Autofluoreszenzsignal wechselt von einer grünen in eine rötlich-violette Färbung. Die histologische Untersuchung zeigte eine mittelgradige Epitheldysplasie

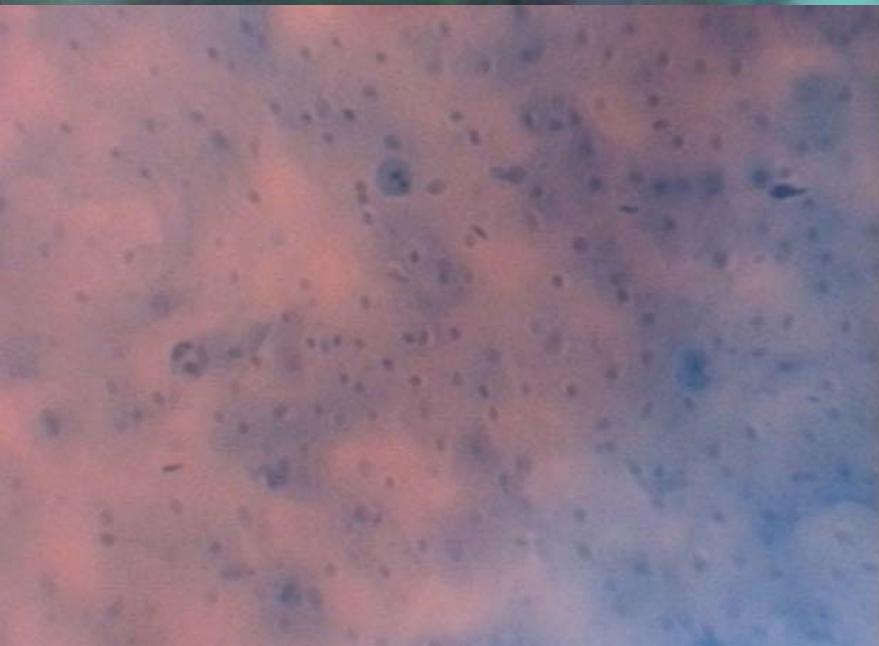


Abbildung 8.1.6

Die bei der Kontaktendoskopie (x60) beobachteten zytologischen Veränderungen zeigen moderate Verschiebungen der Kern-Plasma-Relation, eine leichte Irregularität der Zellformation und -verteilung sowie eine erhöhte nukleäre Dichte und Dyschromasien.

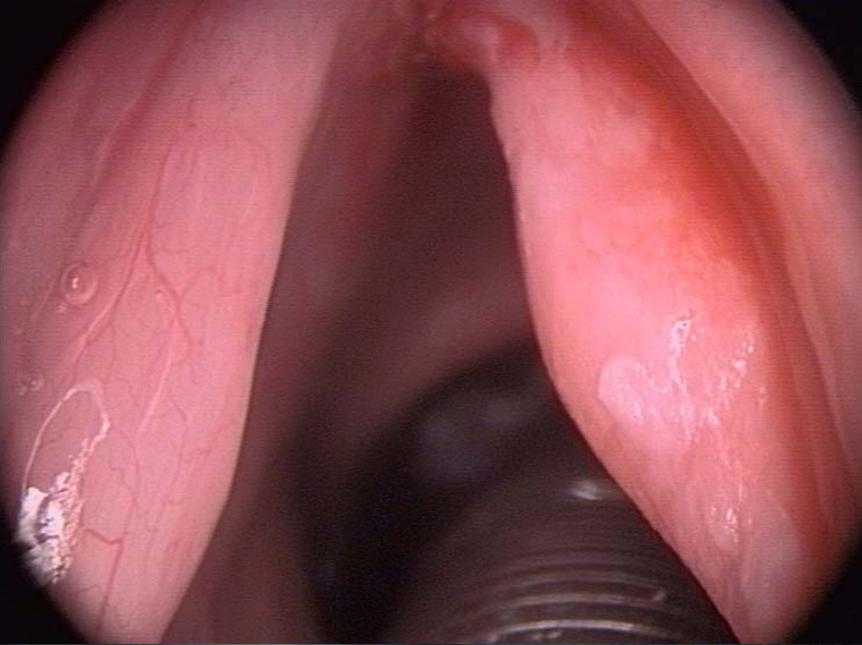


Abbildung 8.1.7

Mikrolaryngoskopisch findet sich eine tumoröse Verdickung der rechten Stimmlippe mit einer Hyperkeratose im Bereich der medialen Kante. Die linke Stimmlippe erscheint reizlos.

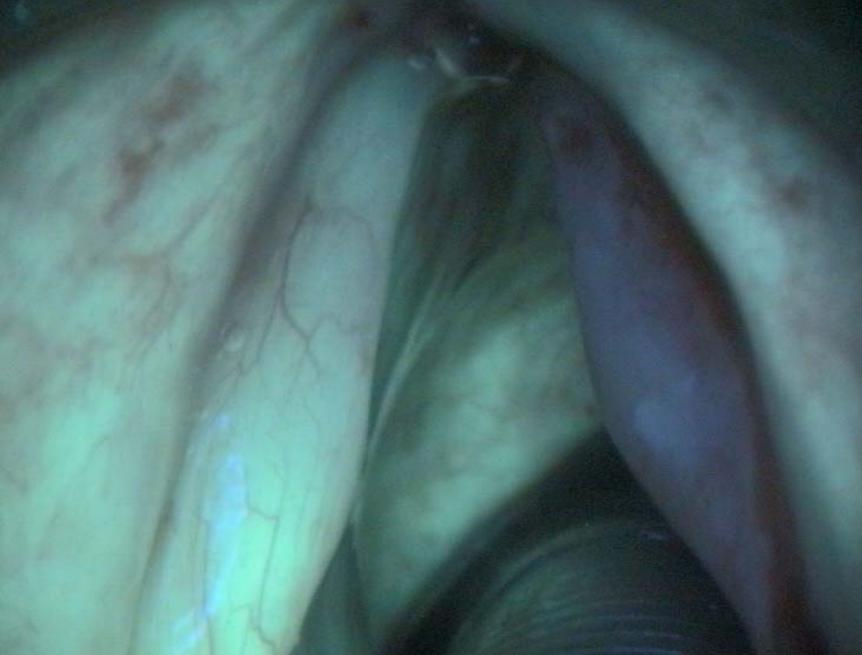


Abbildung 8.1.8

Die mikrolaryngoskopische Autofluoreszenzendoskopie zeigt einen deutlichen Autofluoreszenzverlust über die gesamte rechte Stimmlippe. Im Gegensatz dazu zeigt die linke Stimmlippe eine normale Grünfluoreszenz. Die vordere Kommissur wird vom Tumor nicht überschritten.



Abbildung 8.1.9

Die Kontaktendoskopie zeigt eine irreguläre Zellverteilung mit extremer Heterogenität. Eine erhöhte zelluläre Dichte und Dyschromasien sowie Dyskaryosen und Veränderungen der Kern-Plasma-Relation werden sichtbar.