

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Canis

**Evaluation der konfokalen Laserendomikroskopie und  
Optischen Kohärenztomographie zur in vivo Beurteilung von  
Leukoplakien und Erythroplakien im oberen Luft-/Speiseweg**



DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Susanne Girschick  
aus Starnberg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Stephan Betz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gabriele Kaepler  
Prof. Dr. Hjalmar Hagedorn

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. Veronika Volgger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2019

## **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1. Maligne Tumore des oberen Aerodigestivtraktes.....	7
1.1.1. <i>Inzidenz- und Mortalitätsraten.....</i>	<i>7</i>
1.1.2. <i>Intraepitheliale Plattenepithelläsionen.....</i>	<i>11</i>
1.1.3. <i>Risikofaktoren.....</i>	<i>14</i>
1.2. Bisherige Verfahren zur Tumorfrühdagnostik von Läsionen im oberen Luft-/ Speiseweg.....	15
1.2.1. <i>Wichtigkeit und Probleme der Tumorfrühdagnostik.....</i>	<i>15</i>
1.2.2. <i>Standarddiagnostik, Vorgehen und Therapie bei Tumorstufen und Tumoren des       OADT.....</i>	<i>17</i>
1.2.3. <i>Diagnostische Verfahren zur Tumorfrühdagnostik.....</i>	<i>19</i>
1.3. Optische Kohärenztomographie (OCT).....	21
1.3.1. <i>Technische Grundlagen.....</i>	<i>21</i>
1.3.2. <i>Systeme für optische Kohärenztomographie.....</i>	<i>23</i>
1.4. Konfokale Laserendomikroskopie (pCLE).....	24
1.4.1. <i>Technische Grundlagen.....</i>	<i>24</i>
1.4.2. <i>Systeme für konfokale Laserendomikroskopie.....</i>	<i>25</i>
1.5. Fragestellung und Zielsetzung.....	26
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.1. Patientenkollektiv.....	27
2.2. Optische Kohärenztomographie.....	28
2.3. Konfokale Laserendomikroskopie.....	29

2.4. Kriterien für die Auswertung der OCT- und pCLE-Bilder.....	30
2.5. Durchführung der klinisch prospektiven Studie.....	32
2.6. Durchführung der retrospektiven Auswertung.....	35
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
3.1. Übersicht aller Ergebnisse.....	36
3.1.1. OCT.....	36
3.1.2. pCLE.....	38
3.1.3. Probleme mit der Bildqualität.....	50
3.2. Auswertung.....	51
3.2.1. Auswertung der Untersuchungen mittels OCT.....	51
3.2.2. Auswertung der Untersuchungen mittels pCLE.....	53
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>58</b>
4.1. Material und Methoden.....	58
4.2. Ergebnisse.....	66
4.2.1. Ergebnisse der prospektiven Studie.....	66
4.2.2. Ergebnisse der retrospektiven Auswertung.....	67
4.3. Vergleich zu anderen pCLE-Studien in der HNO.....	68
<b>5. Zusammenfassung und Perspektive</b> .....	<b>71</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>73</b>
<b>7. Danksagung</b> .....	<b>79</b>
Eidesstattliche Versicherung.....	80

## Abkürzungsverzeichnis

ALA/5-ALA	Aminolävulinsäure/5-Aminolävulinsäure
ALDH1	Aldehyd-Dehydrogenase 1
CE-/FDA	Europäische Gemeinschaft-/Food and Drug Administration
Cis	Carcinoma in situ
CLE	Confocal laser endomicroscopy (konfokale Laserendomikroskopie)
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
D I-III	Dysplasie (Grad I-III)
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
eCLE	Endoscope-based CLE
EGFR	EGF-Rezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor)
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule (epitheliales Zelladhäsionsmolekül)
Et al.	lateinisch: et alii oder et aliae
FD-OCT	Fourier-Domain-OCT
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNO	Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
HPV	humanes Papilloma-Virus
HUS	Hochfrequenz-Ultraschallsystem
Hz/MHz	Hertz/Megahertz
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MLS	Mikrolaryngoskopie
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NBI	Narrow Band Imaging
nm	Nanometer
NPW	negativer prädiktiver Wert
OADT	oberer Aerodigestivtrakt

OCT	optische Kohärenztomographie
pCLE	Probe-based CLE
PEC	Plattenepithelkarzinom
PPIX	Protoporphyrin IX
PPW	positiver prädiktiver Wert
PVL	Proliferative verruköse Leukoplakie
RKI	Robert-Koch-Institut
s.	Siehe
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results Program
SS-OCT	Swept-Source-OCT
TD-OCT	Time-Domain-OCT
USA	United States of America
WHO	world health organization
µm	Mikrometer
z. B.	zum Beispiel
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
2D/3D	zweidimensional/dreidimensional

# 1. Einleitung

## 1.1 Maligne Tumore des oberen Aerodigestivtraktes

### 1.1.1. Inzidenz- und Mortalitätsraten

2014 erkrankten 249.215 Männer und 227.001 Frauen in der Bundesrepublik Deutschland an Krebs. Die Anzahl der Neuerkrankungen an Mundhöhlen-, Rachen- oder Kehlkopfkarzinomen betrug davon laut Robert-Koch-Institut 12.132 bei den Männern, was damit die vierthäufigste Krebsursache bei Männern darstellt. Dies verdeutlicht den Stellenwert dieser Erkrankung, deren Prognose sehr vom Zeitpunkt der Diagnosestellung abhängt. Die Neuerkrankungen teilen sich in 9.150 Karzinome des Mund-/Rachenraumes und 2.982 Karzinome des Kehlkopfes auf (s. Abbildung 1). [1]

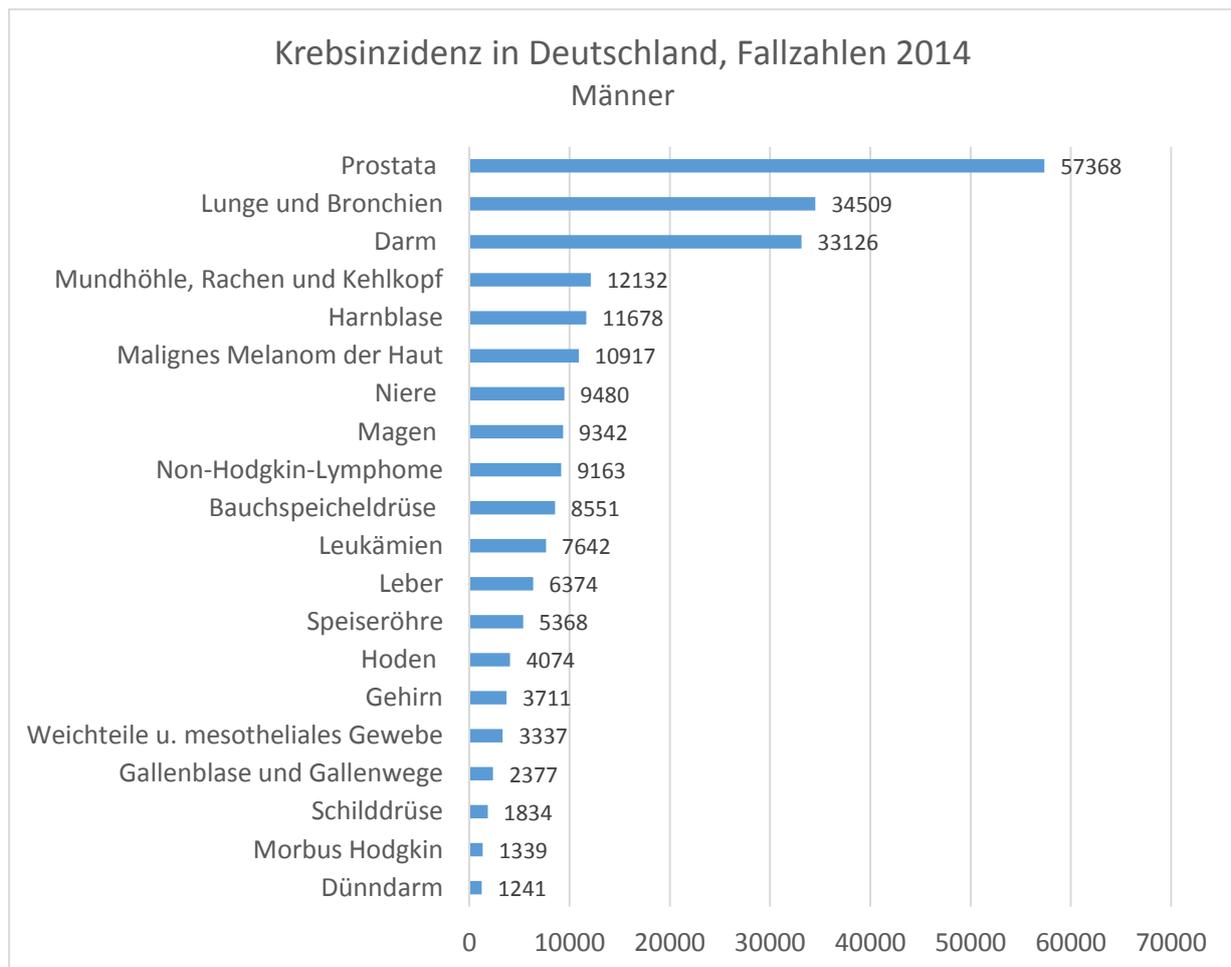


Abbildung 1: Krebsinzidenz der Männer in Deutschland, Fallzahlen 2014, Quelle: RKI [2]

Bei den Frauen ist die Inzidenz insgesamt geringer, erreicht jedoch mit 4.239 Neuerkrankungen immer noch eine bedeutende Anzahl. Damit sind laut Statistik Karzinome in Mundhöhle, Rachen und Kehlkopf in Deutschland die vierzehnthäufigste Krebsursache. Hierunter fallen 3.721 Karzinome der Mundhöhle und des Rachens und 518 Karzinome des Kehlkopfes (s. Abbildung 2). [1]

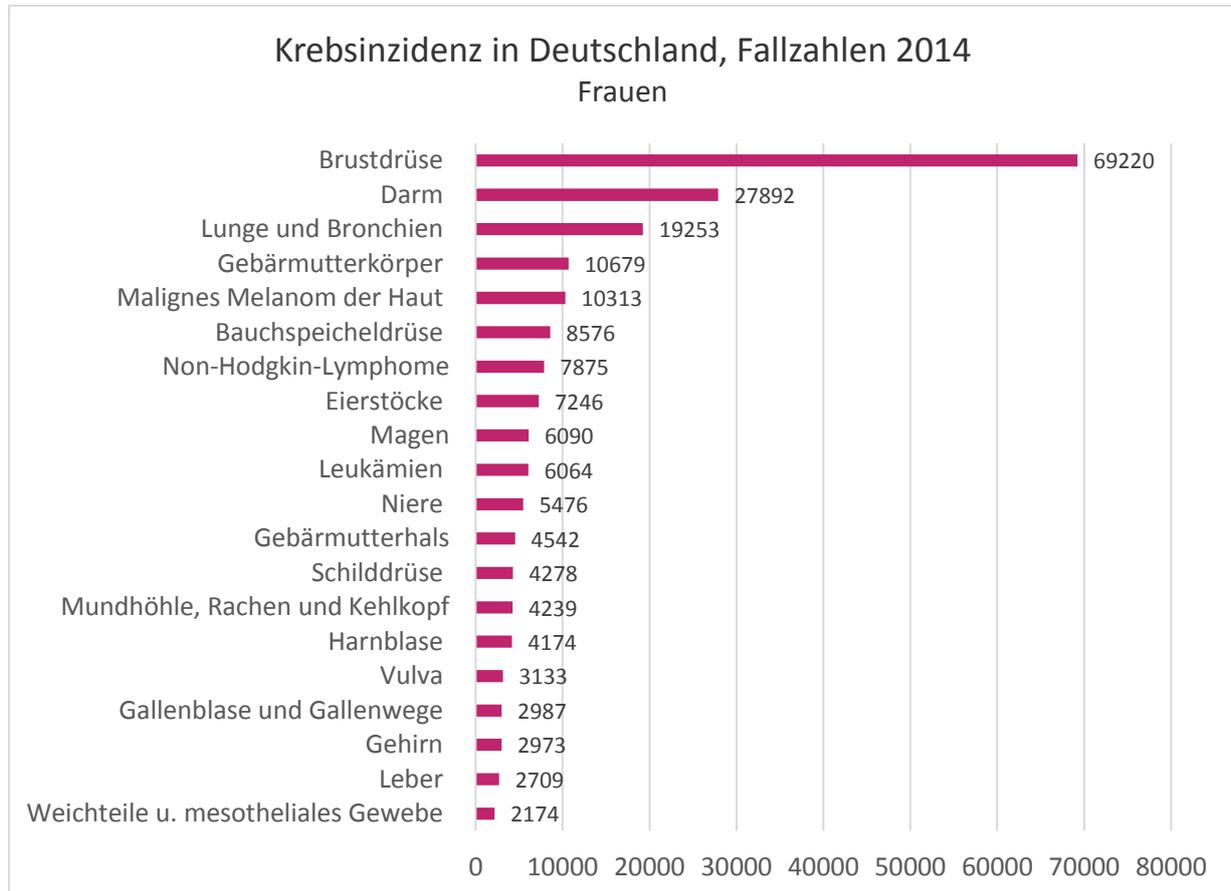


Abbildung 2: Krebsinzidenz der Frauen in Deutschland, Fallzahlen 2014, Quelle: RKI [2]

Weltweit liegt die Inzidenz an Kopf-Hals-Tumoren ebenfalls an fünfthäufigster Stelle mit mehr als 600.000 Fällen jährlich. [3] Dies verdeutlicht die Bedeutsamkeit dieser Krebsart sowohl auf nationaler als auch auf internationaler Ebene.

Betrachtet man die jährlichen Neuerkrankungsraten, zeigt sich bei den Männern in Deutschland von 1999 bis 2011 ein nahezu kontinuierlicher Anstieg an Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens. Während im Jahr 1999 insgesamt 8.144 Neuerkrankungen bei den Männern erfasst sind, zeigt sich bis zum Jahr 2011 eine deutliche Steigerung mit 9.987 Fällen. Seit 2011 zeigt sich jedoch erfreulicherweise ein rückläufiger Trend der Neuerkrankungen (s. Abbildung 3). Die Inzidenzrate

von Larynxkarzinomen bleibt annähernd konstant, seit 2008 ist sogar ein leicht rückläufiger Trend zu beobachten. [1]

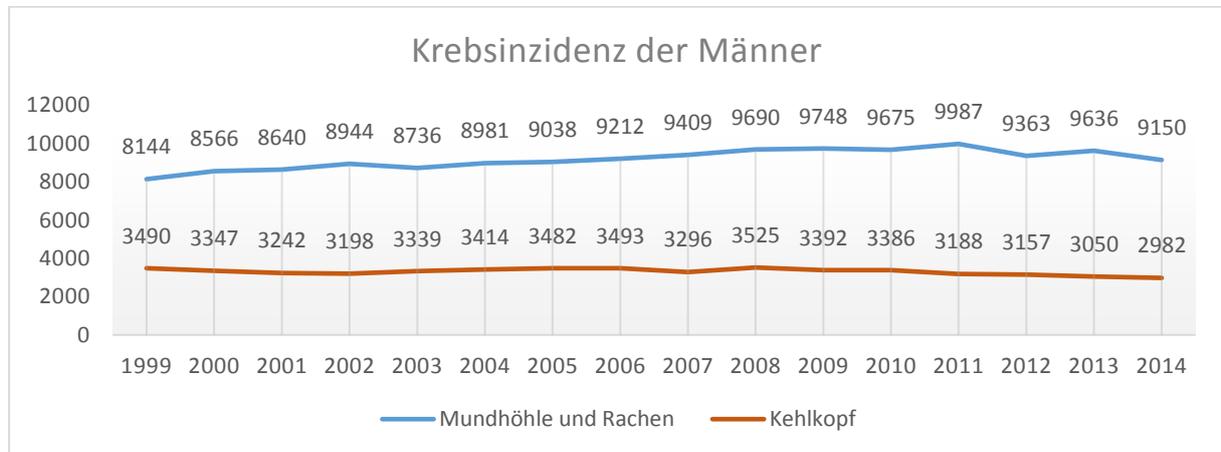


Abbildung 3: Jährliche Neuerkrankungsrate der Männer, Deutschland 1999-2014, Daten RKI [2]

Für Frauen ist bis 2008 ein geringer, aber dennoch stetiger Anstieg der Inzidenzzahlen bei Karzinomen der Mundhöhle und des Rachens zu vermerken. Danach bleiben diese annähernd stabil. Die Inzidenzzahlen der Larynxkarzinome verzeichnen keinen eindeutigen Trend. Hier sind die Zahlen in den letzten Jahren annähernd gleich geblieben (s. Abbildung 4). [4] Generell besteht ein deutlich höheres Erkrankungsrisiko für Männer.

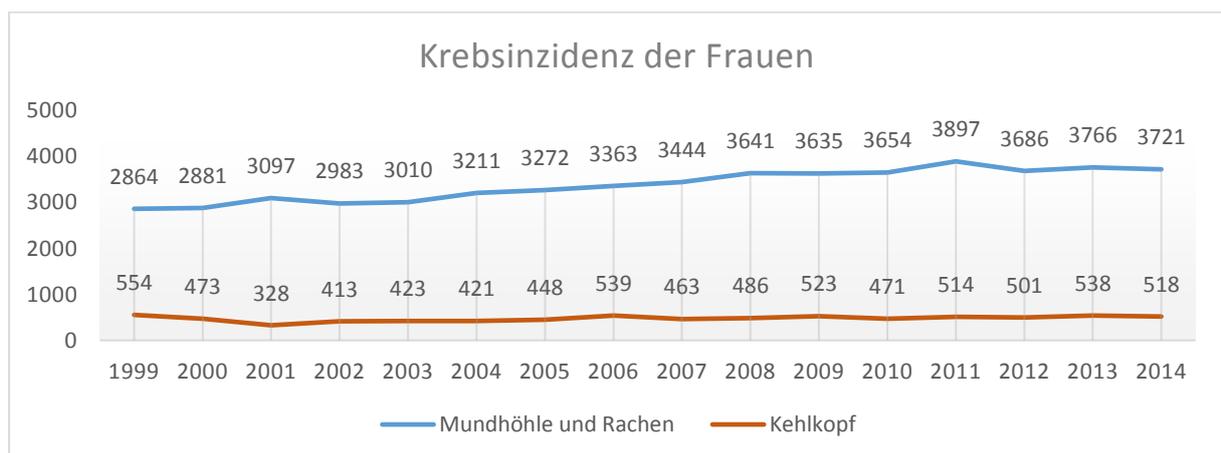


Abbildung 4: Jährliche Neuerkrankungsrate der Frauen, Deutschland 1999-2014, Daten RKI [2]

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Karzinomen der Mundhöhle und des Rachens für Männer bei 61 Jahren, für Frauen bei 63 Jahren. Dabei zeigt sich dennoch eine relativ weite Spannbreite. Die genauen Fallzahlen sind in Abbildung 5 dargestellt. [1]

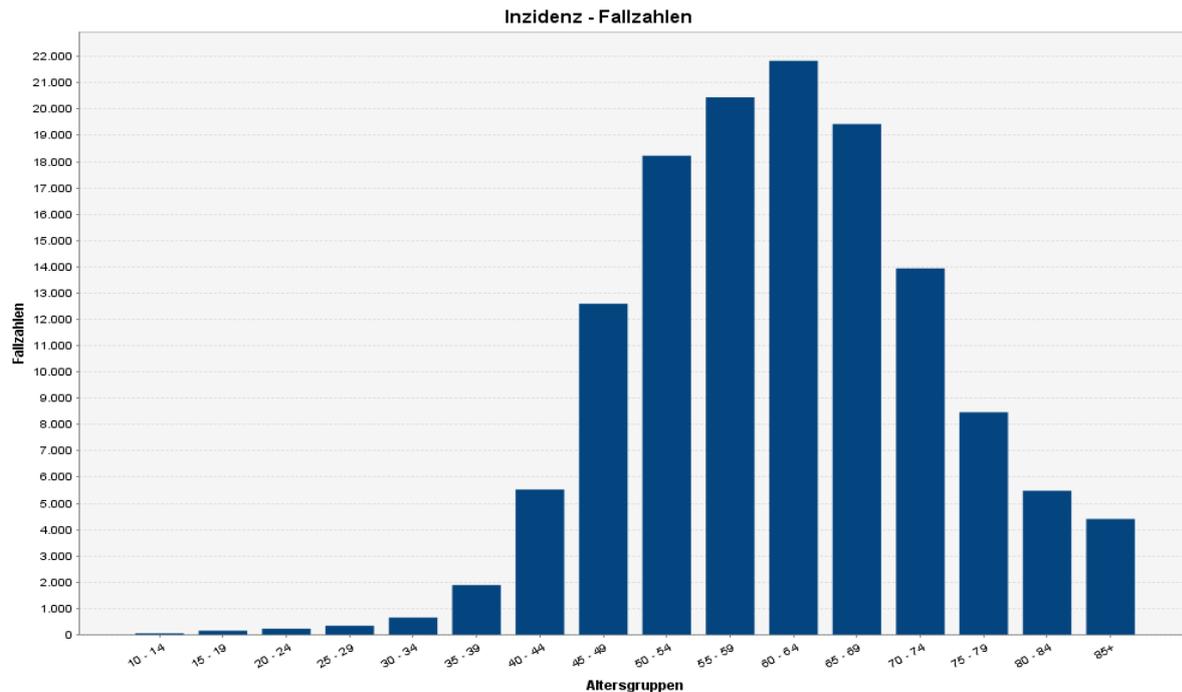


Abbildung 5: Altersabhängige Inzidenz an Karzinomen der Mundhöhle und des Rachens, Quelle RKI [2]

Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten (5-JÜR) sind laut amerikanischer Statistik für die verschiedenen Tumorlokalisationen recht unterschiedlich. So liegt die relative, stadienunabhängige 5-JÜR bei Tumoren der Lippe mit 89,5 % deutlich über der von Tumoren des Pharynx, die mit einer relativen und stadienunabhängigen 5-JÜR von 35,4 % die schlechteste Prognose besitzen. Karzinome der Zunge zeigen beispielsweise eine relative 5-JÜR von 62,7 %, Mundbodenkarzinome eine relative 5-JÜR von 51,4 % und Karzinome des Zahnfleisches und des restlichen Mundes von 59,7 %. Larynxkarzinome weisen mit einer relativen 5-JÜR von 64,5 % eine mittlere Prognose auf. [5]

Der Grund für die unterschiedlichen Prognosen ist neben biologischen und anderen Faktoren hauptsächlich, dass Tumoren mit schlechterer Prognose später entdeckt werden, wenn sie bereits größer oder metastasiert sind. Eine sinnvolle Tumorfürdiagnostik (z. B. mit optischen Verfahren) könnte hier eine deutliche Verbesserung herbeiführen.

Allgemein hat sich die kumulierte relative 5-JÜR bei Karzinomen der Mundhöhle und des Rachens erfreulicherweise seit Anfang der 1980er-Jahre bei den Frauen von 53 % auf 55 % und bei den Männern von 35 % auf 47 % verbessert. Für die schlechtere Prognose bei den Männern wird der höhere Anteil prognostisch ungünstiger Tumore des Rachenraums verantwortlich gemacht. [4]

### 1.1.2 Intraepitheliale Plattenepithelläsionen

Die meisten Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes sind Plattenepithelkarzinome (s. Abbildung 6). Diese können entweder neu auftreten oder sich aus verschiedenen Läsionen aus der Gruppe der „intraepithelialen Plattenepithelläsionen“ entwickeln. Die Entstehung eines invasiven Plattenepithelkarzinoms aus normaler Schleimhaut wird dabei als ein mehrere Stufen umfassender Prozess gesehen, der mit einer Anhäufung genetischer Veränderungen assoziiert ist. [6] So sind z. B. sechs bis zehn unabhängige Ereignisse für die Progression in ein Plattenepithelkarzinom erforderlich. [7]

Zu den intraepithelialen Plattenepithelläsionen zählt man alle histologischen Veränderungen des Plattenepithels von der Plattenepithelhyperplasie bis zum Carcinoma in situ, die im Verlauf zu einer Karzinomentstehung führen können.

Besondere Bedeutung haben die potentiell malignen oder riskanten (präkanzerösen) Veränderungen. Diese sind definiert als histomorphologische Plattenepithelveränderungen, aus denen sich in einem höheren Prozentsatz als aus anderen Epithelveränderungen ein invasives Karzinom entwickelt. [8] Hierzu zählen unter anderem Leukoplakien und Erythroplakien, wobei diese Begriffe rein deskriptiv sind. So kann sich hinter einer Leukoplakie sowohl eine einfache Hyperplasie als auch eine hochgradige Dysplasie verbergen. Bisher gilt die WHO-Klassifikation von 1994 unverändert: „Die orale Leukoplakie ist eine vorwiegend weiße, nicht abwischbare Veränderung der Mundschleimhaut, die weder klinisch noch histopathologisch einer anderen, genau bestimmbareren Läsion zugeordnet werden kann.“ [9]

**Leukoplakien** kommen epidemiologisch vor allem bei Männern im mittleren bis höheren Alter vor, wobei die Prävalenz mit dem Alter zunimmt. [10] So findet man bei den unter 30-jährigen Männern bei weniger als 1 % eine Leukoplakie und bei den über 70-jährigen Männern bereits bei 8 %. Frauen haben eine geringere Prävalenz von ca. 2 % bei den über 70-Jährigen. [11] Die häufigsten Lokalisationen sind dabei die Wangenschleimhaut, die Alveolarkämme und die Unterlippe. Dysplastische Areale finden sich am häufigsten bei Läsionen am Mundboden, am Zungenrand und an der Unterlippe. [10]

Eine **Erythroplakie** ist ein deskriptiver Begriff (analog zur Leukoplakie) für eine scharf begrenzte, rote Läsion der Schleimhaut. Diese kann induriert, umschrieben oder großflächig, samtartig gerötet und von spritzerartigen, leukoplakischen Arealen durchsetzt sein. [12] Erythroplakien kommen wesentlich seltener vor. Das Entartungsrisiko ist deutlich höher als bei Leukoplakien. Bei über 90 % der Erythroplakien findet man dysplastische oder frühmaligne Bereiche.

Die **proliferativ verruköse Leukoplakie** ist eine seltene, aber äußerst aggressive Variante der oralen Leukoplakie mit einer hohen Transformationstendenz. [13] Sie beginnt zunächst als plane Hyperkeratose. Im Verlauf kommt schließlich die verruköse Komponente hinzu. Sie spricht auf jegliche Therapie schlecht an und hat eine hohe Rezidivrate. [14]

Da, wie bereits erwähnt, die Begriffe Leukoplakie und Erythroplakie rein deskriptiv sind und klinisch verwendet werden, können sich aus histologischer Sicht diverse Befunde dahinter verbergen. Die wichtigsten sind nachfolgend erklärt:

- *Hyperplasie*: Epithelschicht mit erhöhter Zellzahl: Die Architektur des Epithels ist erhalten, man findet keine Zellatypien.
- *Dysplasie*: Präkanzeröse Läsion des Plattenepithels. Folgende Veränderungen der Architektur werden gefordert: irreguläre Epithelschichtung, Verlust der Polarität der Basalzellen, tropfenförmige Reteleisten, erhöhte Mitosezahl, oberflächliche Mitosen, Dyskeratose und Hornperlen in den Retezapfen. Die zytologischen Anomalien umfassen Anisonukleose, Kernpleomorphie, Anisozytose, erhöhte Kern-/Plasma-Relation, atypische Mitosen, Vermehrung und Vergrößerung der Nukleoli und Hyperchromasie. [6]

In der Literatur findet man heutzutage mehr als 20 verschiedene Klassifikationen bezüglich der epithelialen Veränderungen. Man unterscheidet je nach Klassifikation drei Grade (Klassifikation nach Kleinasser) bzw. vier Grade (WHO, 2005) der Dysplasie. [15]

Da das pathologische Institut, mit dem wir für diese Studie zusammengearbeitet haben, die WHO-Klassifikation verwendet, wird diese nachfolgend beschrieben.

WHO-Klassifikation (2005):

1. Geringgradige Dysplasie: Architekturstörung, begrenzt auf das untere Drittel des Epithels, begleitet von zytologischen Atypien.
2. Mäßiggradige Dysplasie: Architekturstörung, ausgedehnt bis in das mittlere Drittel des Epithels, begleitet von zunehmendem Schweregrad zytologischer Atypien.
3. Schwere Dysplasie: Architekturstörung in mehr als zwei Dritteln des Epithels mit assoziierten zytologischen Atypien oder Architekturstörung im mittleren Drittel des Epithels mit hinreichenden zytologischen Atypien, um eine mäßige zu einer schweren Dysplasie hochzustufen. [6]
4. Carcinoma in situ: Die ganze oder fast die ganze Breite des Epithels zeigen Architekturstörungen. Diese sind begleitet von ausgeprägten Zellatypien. Außerdem kommen atypische Mitosen und abnorme oberflächliche Mitosen vor. [6]

Die meisten Karzinome der Mundhöhle und des Rachens gehören zur Gruppe der Plattenepithelkarzinome (82,0 %). Die genaue Verteilung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Karzinome der Mundhöhle und des Rachens	
Histologie	Prozent
Plattenepithelkarzinome	82,0 %
Adenokarzinome	10,3 %
Andere spezifische Karzinome	1,1 %
Unspezifische Karzinome	3,4 %
Sarkome und Weichteilgewebe	0,3 %
Andere spezifische Arten	0,5 %
Unspezifisch	0,4 %
Gesamt	100,0 %

Tabelle 1: Prozentuale Verteilung der Karzinome von Mundhöhle und Rachen nach Histologie; alle Rassen; beide Geschlechter. Quelle: SEER Cancer Statistic Review [5]

### 1.1.3 Risikofaktoren

Tabakrauchen ist einer der größten Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen. [16] Besonders gefährlich ist der gleichzeitige regelmäßige Konsum von Alkohol. [17] Tabakrauchen ist dabei der Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Larynxkarzinomen. Der Alkoholkonsum spielt bei allen Karzinomen des Rachens eine wichtige Rolle, bei Hypopharynxkarzinomen ist er jedoch besonders bedeutsam. [17] Dabei ist das Risiko für einen starken Raucher ein Larynxkarzinom zu entwickeln im Vergleich zu einem Nichtraucher um das 16-fache erhöht. Verantwortlich werden dafür die im Rauch enthaltenen Nitrosamine und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe gemacht, die im laryngealen Epithel als Karzinogene wirken. Alkohol verstärkt dies als Kofaktor, der sich durch verschiedene Mechanismen auf lokale oder systemische Kanzerogenese auswirkt. [18] Auch das Kauen von Betelnüssen gilt als Risikofaktor. Die Pathogenese wird durch eine Veränderung des oralen Mikrobioms erklärt. [19]

Humane Papilloma-Viren (HPV) stellen einen immer bedeutsamer werdenden Risikofaktor dar. Die Inzidenz HPV-positiver Karzinome ist in den letzten Jahren kontinuierlich angestiegen. In den USA gelten HP-Viren bei bis zu 50 % aller Oropharynxkarzinome und bis zu 25 % aller Mundhöhlenkarzinome als Auslöser. [20] Besonders HPV 16 spielt hier als Hoch-Risiko-Typ eine wichtige Rolle. Wie in einer großen Studie gezeigt werden konnte, spielen vermutlich auch andere HP-Viren für die Tumorentstehung im Kopf-Hals-Bereich eine entscheidende Rolle. Dies sind beim Pharynxkarzinom vor allem die Typen HPV 18 E6, HPV 33 E6 und HPV 58 E7 und beim Mundhöhlenkarzinom HPV 52 E7. Dabei steigt bei zunehmender Anzahl an seropositiven HPV-Infektionen das Risiko für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms. [21] Diese Tumoren verhalten sich im Verlauf meist gutartiger. Die Patienten sind bei Erkrankungsbeginn im Mittel zehn Jahre jünger, haben eine bessere Prognose (30 % höhere Heilungschancen) und eine längere Überlebenszeit. So hatten HPV-positive Patienten, die an einem Oropharynxkarzinom erkrankt waren, ein signifikant längeres medianes Gesamtüberleben als HPV-negative Patienten (131 versus 20 Monate;  $p < 0,001$ ; Hazard Ratio 0,31). [20]

Als weitere Risikofaktoren gelten die gastroösophageale Refluxerkrankung, Z. n. Bestrahlung, Vererbung und bestimmte Gene, sog. Onkogene, die bei der Tumor-

entstehung im Larynx beteiligt sind. [18] Eine Studie zeigte, dass eine niedrige Expression des Tumorsuppressors SMAD4 und eine hohe Lymphozyteninfiltration im Bindegewebe die maligne Transformation einer Leukoplakie begünstigen. [22] Auch eine Expression der Proteine Aldehyd-Dehydrogenase 1 (ALDH1) und Podoplanin erhöhen das Risiko für die Entstehung eines Karzinoms aus einer Leukoplakie. [23]

Beim Mundhöhlenkarzinom sind als begünstigende Faktoren noch schlechte Mundhygiene und scharfe Zahnkanten zu nennen. [24]

Bei ca. 20 % der erkrankten Patienten spielen andere umwelt- und patientenbezogene Faktoren eine Rolle. [25] Neue Studien zeigen, dass Schwermetalle, vor allem hohe Nickelkonzentrationen, die Progression von prämaligen Veränderungen begünstigen. [26]

## **1.2 Bisherige Verfahren zur Tumorfrühdagnostik von Läsionen im oberen Luft-/Speiseweg**

### **1.2.1 Wichtigkeit und Probleme der Tumorfrühdagnostik**

Eine frühzeitige Diagnosestellung beeinflusst den Outcome der Patienten bedeutend. Abgesehen von Problemen, wie beispielsweise äußerer Entstellung oder eingeschränkter Lebensqualität durch Funktionsverlust nach radikaler Operation, verändert sich die Prognose entscheidend, wenn zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits eine lokoregionäre oder Fernmetastasierung vorliegt. [27]

In Tabelle 2 sind die 5-JÜR bei Karzinomen der Mundhöhle und des Rachens nach Tumorstadium dargestellt.

Während die relative 5-JÜR bei Karzinomen der Mundhöhle und des Rachens für Frauen in einem lokalisierten Stadium bei 85,3 % liegt, sinkt sie bei einem regional metastasierten Stadium auf 59,4 %. Ähnlich verhält es sich mit den Männern. Hier sinkt die 5-JÜR von 82,1 % bei einem lokalisierten Stadium auf 64,5 % bei einem regional metastasierten Stadium. Die Prognosen für fernmetastasierte Stadien sind mit einer für beide Geschlechter kumulierten 5-JÜR von 38,0 % deutlich schlechter, jedoch bei primären OADT-Tumoren (oberer Aerodigestivtrakt) sehr selten.

Stadium bei Diagnosestellung	Alle Rassen		
	Beide Geschlechter	Männer	Frauen
Alle Stadien	64,0	63,0	66,3
Lokal	83,3	82,1	85,3
Regional	63,3	64,5	59,4
Metastasiert	38,0	37,8	38,6
Ohne Staging	47,2	46,7	48,0

Tabelle 2: Relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Karzinomen der Mundhöhle und des Rachens (in Prozent) von 2006-2012 nach Diagnosestadium (lokal: T1-4, N0, M0; regional: T1-4, N1-3, M0; metastasiert: T1-4, N1-3, M1). Quelle SEER Cancer Statistic. [5]

Für Karzinome des Larynx sind die Prognosen etwas schlechter. Hier liegt die relative 5-JÜR bei Frauen im lokalisierten Stadium bei 72,6 % und bei Männern bei 77,0 %. Im regional metastasierten Stadium sinkt sie bei den Frauen auf 47,5 % und bei den Männern auf 43,4 % (s. Tabelle 3). [5]

Stadium bei Diagnosestellung	Alle Rassen		
	Beide Geschlechter	Männer	Frauen
Alle Stadien	60,7	61,6	57,4
Lokal	76,3	77,0	72,6
Regional	44,5	43,4	47,5
Metastasiert	35,1	35,0	35,3
Ohne Staging	56,4	57,8	50,2

Tabelle 3: Relative 5-Jahres-Überlebensraten bei Karzinomen des Larynx (in Prozent) von 2006-2012 nach Diagnosestadium (lokal: T1-4, N0, M0; regional: T1-4, N1-3, M0; metastasiert: T1-4, N1-3, M1). Quelle SEER Cancer Statistic Review. [5]

Die Früherkennung von Tumoren des oberen OADT ist somit für die Prognose entscheidend.

Der Hauptgrund für eine verspätete Diagnostik ist, dass Frühformen und kleine Tumoren häufig keine Symptome machen und die Patienten daher auch keinen Arzt aufsuchen, wenn sie diese nicht zufällig sehen können (wie beispielsweise am vorderen Zungenrand).

Als Goldstandard zur Diagnostik früh- und prämaligener Läsionen gelten die invasive Gewebeentnahme und eine anschließende histopathologische Beurteilung. Die Biopsie oder Abtragung von Veränderungen der Zunge und Mundhöhle kann in der Regel in Lokalanästhesie durchgeführt werden. Die Gewebeentnahme erfolgt bei

Läsionen im Pharynx und Larynx in aller Regel im Rahmen einer Panendoskopie in Intubationsnarkose. Probleme und Defizite im Rahmen dieses Standardvorgehens sind vielfältig. Schon die Gewebeentnahme selbst ist anfällig für diagnostische Fehler, denn Leukoplakien sind oft großflächig und entarten zum Teil nur an manchen Stellen, die makroskopisch nicht immer zu erkennen sind. So bleibt ein Risiko für Fehlbiopsien. Auch stellen sich frühinvasive Plattenepithelkarzinome teilweise als Erosion, Ulcus oder aufgeraute Schleimhaut dar und können aufgrund der untypischen makroskopischen Erscheinung einer Biopsie entgehen.

Auch die Risiken einer gegebenenfalls notwendigen Intubationsnarkose bei „tiefer“ im OADT liegenden Läsionen sind vor allem bei multimorbiden und älteren Patienten vielfältig. Bei einer hochgradigen Dysplasie an solcher Stelle sind aktuell eine erste Narkose zur Probenentnahme und eine zweite Narkose nach Erhalt der Histologie zur operativen Entfernung der Läsion nötig. Optisch diagnostische Methoden, die eine in vivo Differenzierung zwischen invasiven und nicht invasiven Läsionen und eine weitere Differenzierung diverser benignen und prämaligener Läsionen erlauben, wären daher extrem hilfreich und wünschenswert.

### **1.2.2 Standarddiagnostik, Vorgehen und Therapie bei Tumorstufen und Tumoren des OADT**

#### **Leukoplakie und Erythroplakie**

Wird eine Leukoplakie oder eine Erythroplakie entdeckt, wird empfohlen eine Biopsie zu entnehmen. Eine vollständige Exzision der Läsion wird zunächst nicht gefordert, kann jedoch bei inhomogenen Veränderungen statt Mehrfachbiopsien sinnvoll sein. [28]

Eine repräsentative Biopsie kann dabei bei Läsionen der Mundhöhle in Lokalanästhesie oder bei Läsionen des Rachens und Kehlkopfs in Intubationsnarkose entnommen werden. Die histologische Untersuchung stellt anschließend den Goldstandard dar. Eine andere Möglichkeit ist die Bürstenbiopsie mit anschließender zytologischer Untersuchung, für die mittlerweile eine hohe Treffsicherheit belegt ist. Bereits bei Diagnosestellung einer Leuko- oder Erythroplakie sollten mögliche ätiologische Faktoren wie Rauchen oder Alkohol eliminiert werden. [29]

Finden sich in dem entnommenen Gewebe keine Dysplasien oder Hinweise auf invasives Wachstum, werden die Läsionen in ihrem weiteren Verlauf engmaschig kontrolliert. Zeigt der histopathologische Befund jedoch eine hochgradige Dysplasie oder ein frühinvasives Wachstum, wird die Entfernung der Läsion im Gesunden empfohlen. [28]

Entsprechend dem histologischen Befund bestehen noch eine Reihe weiterer Therapiemöglichkeiten. Je nach Ausdehnung und Allgemeinzustand des Patienten sind neben der chirurgischen Exzision oder CO<sub>2</sub>-Laserresektion auch andere Verfahren wie Kryochirurgie, photodynamische Therapie, systemische Therapie mit Retinoiden und Betacarotin oder eine Therapie mit Calcipotriol möglich. Diese Therapien sind jedoch Einzelfällen vorbehalten. Zudem bilden sich bei diesen Methoden häufig Rezidive und es entstehen Nebenwirkungen. [29] [30]

### **Karzinome der Mundhöhle, des Pharynx und des Larynx**

Besteht der dringende Verdacht auf ein Mundhöhlen-, Pharynx oder Larynxkarzinom, sollte vor der Biopsieentnahme eine Schichtbildgebung mittels MRT oder CT zur Darstellung der lokalen Ausdehnung erfolgen. Das Staging sollte außerdem die Lymphknoten von der Schädelbasis bis zur oberen Thoraxapertur sowie die Lunge und ggf. das Abdomen einschließen. Gemäß der aktuellen Leitlinie schließt sich daraufhin die Probeentnahme aus dem Rand des Tumors an.

Die Behandlung sollte interdisziplinär nach Vorstellung des jeweiligen Falles im Tumorboard unter Beteiligung der Fachdisziplinen Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Strahlentherapie, Onkologie, Pathologie und Radiologie durchgeführt werden.

Bei resektablen Karzinomen sollte die Operation, ggf. in Kombination mit einer sofortigen Rekonstruktion durchgeführt werden. Wichtig ist hierbei eine vollständige Resektion mit Sicherheitsabstand. Bei Larynxkarzinomen kann die Resektion dabei mit Mikroinstrumenten oder laserchirurgisch erfolgen und deren Ausmaß je nach Befund von der transoralen Teilresektion bis zur transzervikalen Laryngektomie reichen.

Je nach Lokalisation und Ausdehnung des Primärtumors sowie klinischem Halslymphknotenstatus sollte eine elektive bzw. selektive Neck-Dissection erfolgen. [31]

Alternativ zur Operation können Karzinome bestrahlt werden. Die Strahlentherapie ist wie die Operation eine lokale Therapie. In großen klinischen Studien wurde belegt, dass die Effizienz der Strahlentherapie durch die zusätzliche Gabe bestimmter Zytostatika erhöht wird und ist deshalb einer alleinigen Strahlentherapie vorzuziehen. Bei fortgeschrittenen Karzinomen stellt auch die Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper (z. B. Cetuximab), der die Bindungsstelle des epidermalen Wachstumsfaktors EGFR blockiert, eine Therapieoption dar, die das Gesamtüberleben im Vergleich zu einer alleinigen Bestrahlung verbessern kann. [32]

Lymphogen metastasierte Karzinome werden daher in der Regel mit operativer Resektion, Neck-Dissection und anschließender Radio(chemo)therapie behandelt. [33] Die Indikation für eine adjuvante Radiotherapie hängt zudem von knappen oder positiven Resektionsrändern, perineuraler Invasion und/oder Gefäßinvasion ab.

Palliative Therapiekonzepte bei inoperablen Tumoren sind individuell festzulegen. [34]

### **1.2.3 Diagnostische Verfahren zur Tumorfürhdiagnostik**

In den letzten Jahren wurden diverse diagnostische Methoden erprobt, um früh- und prämaligne Läsionen schonender und sicherer erkennen zu können. Bestehende Verfahren wie MRT, CT oder Ultraschall ermöglichen aufgrund der geringen Auflösung meist erst die Darstellung fortgeschrittener Läsionen. Es gibt also ein Defizit an nichtinvasiven Verfahren zur Diagnostik von prämaligen Läsionen. Somit ist eine invasive Biopsieentnahme aktuell noch der Goldstandard in der Diagnostik, behaftet mit allen bereits beschriebenen Risiken.

Als „Basisuntersuchung“ zur Diagnostik prämaligener Läsionen dient die endoskopische Untersuchung am wachen Patienten, die dem Untersucher ein makroskopisches Bild der Läsion liefert.

Mittels der sogenannten Panendoskopie des oberen Luft-/Speisewegs ist es möglich, Läsionen hochaufgelöst zu visualisieren und zur besseren Einschätzung zu palpieren. Dennoch fällt es selbst erfahrenen Untersuchern schwer, die genaue Ausdehnung und Tiefeninfiltration von Tumoren auf diese Art und Weise zu beurteilen. [35]

**Schmalbandbildgebung** (Narrow Band Imaging (NBI)) ist ein minimalinvasives bildgebendes Verfahren, das zur Darstellung der oberflächlichen, horizontalen Tumorausbreitung eingesetzt werden kann. Die von Olympus Medical Systems

(Tokyo, Japan) vertriebene Technik verwendet zwei schmale Spektralbereiche um 415 nm und 540 nm, die von Hämoglobin stark absorbiert werden. Blutgefäße erscheinen somit sehr dunkel. Das Licht durchdringt die Schleimhaut und gelangt bis zum subepithelialen Bindegewebe. Das blaue Licht visualisiert dabei aufgrund der geringen Eindringtiefe die Gewebeoberfläche und die darunterliegenden Kapillaren, das längerwellige Licht die submukösen Gefäße. [36, 37] So ist es möglich den Bildkontrast oberflächlicher Gefäße deutlicher zu verstärken als bei reinem Weißlicht.

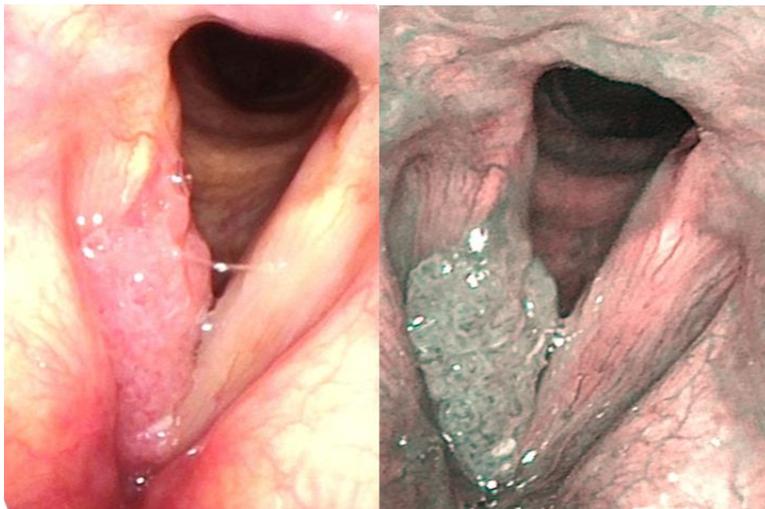


Abbildung 6: NBI bei einem Stimmlippenkarzinom. Links: Weißlicht; rechts: NBI

Die verschiedenen Tumorstufen sind durch spezielle Epithelveränderungen, vaskuläre Strukturen und sekundäre bindegewebige Veränderungen gekennzeichnet, die auf diese Weise besser dargestellt werden können. [38] Auch ist diese Technik interessant in Bezug auf bessere prä- und intraoperative Erfassung von Tumorausdehnung und Resektionsrändern. Sie erzielt in klinischen Studien gute Ergebnisse. [39, 40] Abbildung 6 zeigt ein Beispiel eines Weißlicht- und eines NBI-Bildes eines Patienten mit einem rechtsseitigen Stimmlippenkarzinom. Auffällig sind die Gefäßschlingen, sogenannte intraepithelial papillary capillary loops, die typisch für (prä)-maligne Schleimhautveränderungen sind.

Ein weiteres interessantes Verfahren ist die **Autofluoreszenz-Darstellung**. Diese ist wenig zeitaufwendig und einfach durchzuführen. Dabei werden endogene Fluorophore genutzt, um kanzeröse Läsionen von normalem Gewebe durch eine Farbveränderung zu unterscheiden und so maligne veränderte Schleimhaut besser erkennen und charakterisieren zu können. [41] Die Fluorophore werden dabei mit monochromatischem Licht spezifisch angeregt. Gesunde Schleimhaut fluoresziert bei

Anregung durch Licht des blauen Spektrums leuchtend grün, neoplastische Schleimhaut rot-violett. [42, 43] Auch dieses Verfahren dient der Beurteilung der oberflächlichen Ausdehnung der Läsion.

Als weiteres Fluoreszenzverfahren wurde bereits in mehreren Studien die durch **Aminolävulinsäure (ALA)** induzierte Fluoreszenz evaluiert. Hier kommt es in stoffwechselaktiven Tumorzellen durch die topische Anwendung von ALA zur Akkumulation von Protoporphyrin IX und somit zur induzierten Fluoreszenz. [35]

Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass durch die Autofluoreszenz-Darstellung im Vergleich zur reinen Weißlichtdiagnostik sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität bei der Identifikation prämaligener und maligner Läsionen des Larynx erhöht werden. [44] Beide Verfahren weisen vielversprechende Ansätze im Bereich der Früherkennung und auch der genauen Ausbreitungsdiagnostik zur Festlegung der Resektionsränder von Tumoren auf. [45]

All diese beschriebenen Verfahren visualisieren die oberflächliche Ausdehnung eines Tumors, können jedoch keine Aussagen über die Tiefeninfiltration liefern.

Hierfür wurden schon frühzeitig kommerziell erhältliche **Hochfrequenzultraschall-Systeme** (HUS) entwickelt. Bei gleichzeitiger Verwendung von HUS während der MLS kann die Tumordicke und somit die Tumorausdehnung genauer beurteilt werden. Für die Anwendung im Bereich des Larynx stehen Minisonden mit einer Dicke von etwa 3 mm und Frequenzen von 10-30 MHz zur Verfügung. Dies ist für alle endolaryngealen Tumoren über 3 mm möglich. [46] Hochgradige dysplastische und mikroinvasive Veränderungen können allerdings nicht dargestellt werden. [35]

## 1.3 Optische Kohärenztomographie (OCT)

### 1.3.1 Technische Grundlagen

Die optische Kohärenztomographie (OCT) ist ein nicht-invasives, hochauflösendes Bildgebungsverfahren, das ähnlich dem Ultraschall funktioniert und oberflächennahes Gewebe in Echtzeit darstellen kann. Bei dieser Technik wird meist Nah-Infrarotlicht verwendet. Somit ergibt sich eine deutlich verbesserte Auflösung bis in

den Mikrometerbereich hinein. [47] Mittels OCT können in der Regel Eindringtiefen ins Gewebe von 2-3 mm erreicht werden. [48] Die Dicke der Mundschleimhaut variiert durchschnittlich zwischen 0,1 mm bis 0,5 mm im gesunden Gewebe, [49] wohingegen die gesunde laryngeale Schleimhaut eine Dicke von etwa 0,15 mm aufweist. [50] Wie bereits in Studien nachgewiesen werden konnte, gehen prämaligne Läsionen mit einer Epithelverdickung einher. [49] Da die OCT genau diese Epithelverdickung darstellen kann, ist sie zur Beurteilung von Schleimhautläsionen des oberen Aerodigestivtraktes bestens geeignet.

Mittels OCT können zweidimensionale (2D) und dreidimensionale (3D) Datensätze erzeugt werden. Dabei muss das Gewebe nicht vorbereitet oder gefärbt werden. [48] Die Bildgebung bei der OCT funktioniert folgendermaßen (s. Abbildung 7):

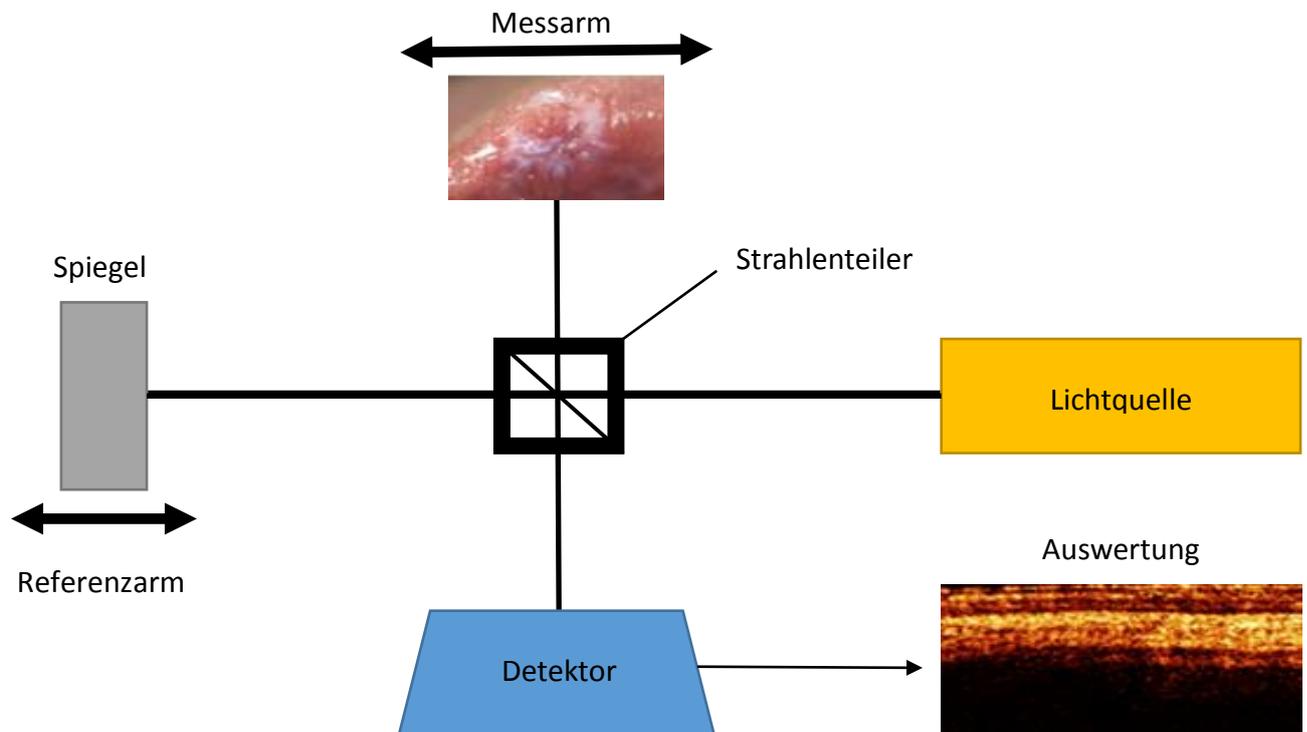


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips anhand eines TD-OCT-Geräts

Zur Generierung eines OCT-Bildes wird kohärentes Licht auf einen Strahlenteiler gerichtet. Der Lichtstrahl passiert einen dichroitischen Spiegel, durch den 50 % der Lichtwellen auf einen Referenzspiegel mit bekannter Entfernung abgelenkt werden, während die anderen 50 % passieren und somit auf das zu untersuchende Gewebe auftreffen. Die Strahlen werden vom Referenzspiegel und vom Gewebe reflektiert

und gelangen zurück zum Referenzspiegel. Hier werden sie nun rekombiniert und mit einem Fotodetektor gelesen. [51, 52]

Die Entstehung des Bildes basiert auf der Analyse der Interferenz der neu kombinierten Lichtwellen. [53] Die Tiefenauflösung ist dabei durch die Kohärenzlänge des verwendeten Lichts bestimmt, die laterale Auflösung durch den Durchmesser der Fokustaille des abtastenden Lichtstrahls. [54]

Es gibt sowohl Time-Domain- als auch Fourier-Domain-OCT-Geräte. Beim Time-Domain-OCT (TD-OCT) wird der Referenzarm in seiner Länge verändert und kontinuierlich die Intensität der Interferenz in einer oder mehreren Richtungen gemessen, um so eine Darstellung eines Objektes zu erlangen. Der Nachteil besteht in einer geringen Bildakquisitionsrate durch die mechanische Bewegung des Spiegels im Referenzarm. [55]

Seit Anfang der 2000er Jahre stehen Fourier-Domain-OCT-Geräte zur Verfügung, die eine deutlich schnellere Bildaufnahme (10-200-fach schneller) und höhere Sensitivität (= Empfindlichkeit zur Messung kleinster Reflektivitäten, 10-fach bis 100-fach höher) aufweisen. Dies ermöglicht die 3D-Darstellung von Gewebe in Echtzeit. Während eine konventionelle OCT das Interferenz-Signal direkt misst, wird bei der Fourier-Domain-OCT das Spektrum des Interferenz-Signals gemessen. Hierzu gehören das Spectral-Domain-OCT (SD-OCT) und das Swept-Source-OCT (SS-OCT). SD-OCT bedient sich dabei eines Spektrometers mit einer Hochgeschwindigkeitskamera, die Bilder mit sehr hoher Auflösung und eine 3D-Darstellung möglich macht. [56] Bei SS-OCT werden die einzelnen spektralen Komponenten zeitlich nacheinander aufgenommen. Es benötigt dafür kein Spektrometer, jedoch eine hinsichtlich der Wellenlänge durchstimmbare Strahlungsquelle. [57]

### **1.3.2 Systeme für optische Kohärenztomographie**

Auf dem Markt sind mittlerweile aufgrund der zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten, beispielsweise in der Augenheilkunde und Dermatologie, viele verschiedene OCT-Systeme von unterschiedlichen Firmen verfügbar. Sowohl Proben-basierte, Endoskop-basierte, als auch Mikroskop-basierte Systeme wurden bereits entwickelt.

Man unterscheidet außerdem zwischen Systemen, die für die klinische oder präklinische Anwendung hergestellt und zugelassen sind. [58] Die Ortsauflösung variiert dabei zwischen 3  $\mu\text{m}$  und 15  $\mu\text{m}$ . [59]

## **1.4 Konfokale Laserendomikroskopie (pCLE)**

### **1.4.1 Technische Grundlagen**

Die konfokale Laserendomikroskopie (pCLE) ist ein klinisch zugelassenes bildgebendes Verfahren, das von vielen Fachrichtungen bereits angewendet wird und in Echtzeit eine histologische Darstellung von Gewebe ermöglicht. [60]

Das Gewebe wird dabei mit Hilfe eines niedrigerenergetischen Laserlichts untersucht. Die Bildgebung kommt dadurch zustande, dass ein Laserstrahl so bewegt wird, dass der Fokuspunkt das Präparat abrastert. Ausschließlich die Strukturen, die sich in der Fokusebene befinden, tragen zur Bildgebung bei. Licht, das nicht aus der Fokusebene kommt, wird ausgeblendet (s. Abbildung 8). [54]

Die konfokale Laserendomikroskopie ermöglicht eine in vivo Bildgebung mit einer besonders hohen zellulären und räumlichen Auflösung. Diese variiert je nach verwendeter CLE-Sonde von 1-3,5  $\mu\text{m}$  bei einer Eindringtiefe von bis zu 250  $\mu\text{m}$  und einem Vergrößerungsfaktor von bis zu 1000. Sie übermittelt im Gegensatz zu histopathologischen Schnitten „live“ Informationen über vaskuläre und zelluläre Strukturen. Die CLE liefert außerdem, anders als die Histologie, keine Tiefenschnittbilder, sondern horizontale Schnittbilder („en face“) von lebendem Gewebe. Dadurch kann zwar keine mögliche Änderung im geschichteten Aufbau des Epithels gezeigt werden, die Betrachtung struktureller Gewebeveränderungen auf zellulärer Ebene ist jedoch möglich.

Der Bildgebung liegt Fluoreszenz oder bei manchen Systemen auch Reflexion zugrunde. Da die Eigenfluoreszenz des Gewebes für eine qualitativ hochwertige Bildgebung im Fluoreszenzmodus jedoch nicht ausreicht, ist in diesem Fall die Applikation von Kontrastmitteln erforderlich. Nach Applikation von Kontrastfarbstoffen können Schleimhautveränderungen durch Aufsetzen der Sonde untersucht werden.

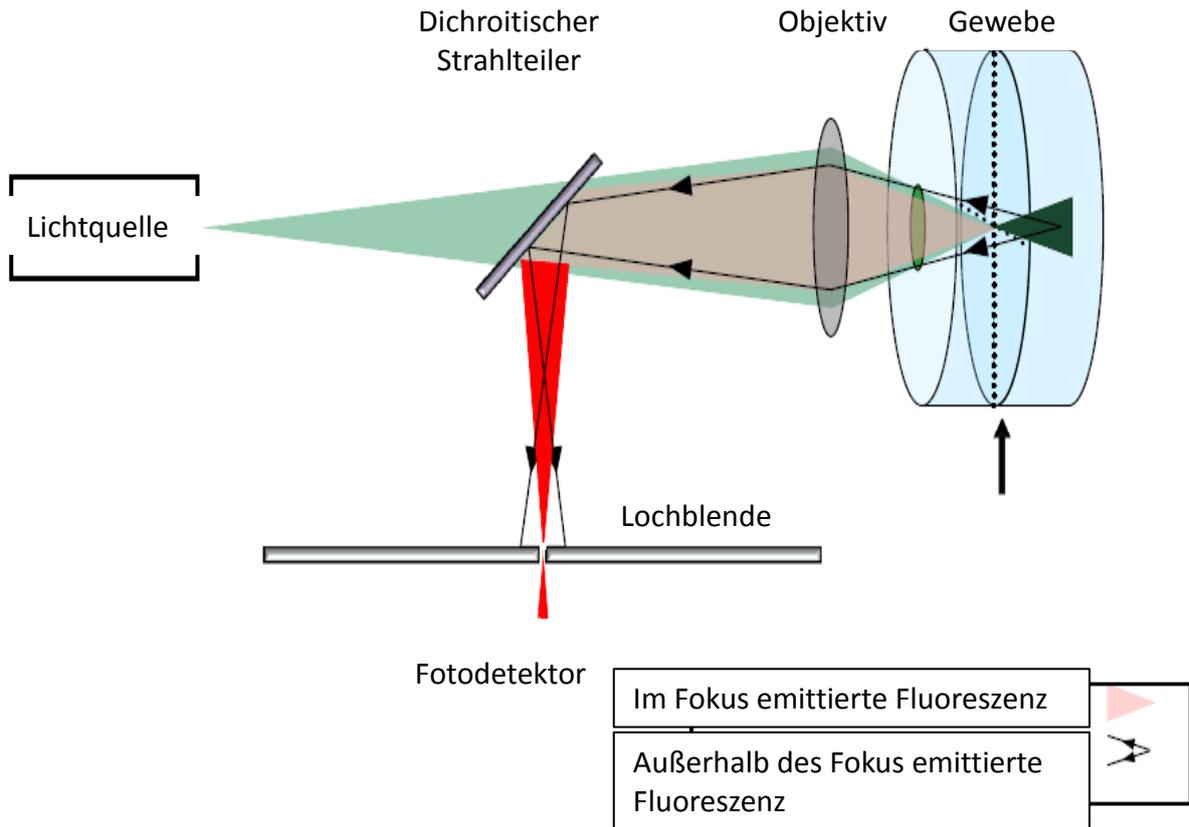


Abbildung 8: Konfokale Laserendomikroskopie; Funktionsweise

### 1.4.2 Systeme für konfokale Laserendomikroskopie

Im Moment gibt es zwei klinisch zugelassene Systeme für konfokale Laserendomikroskopie.

Das Cellvizio-System der Firma Mauna Kea Technologies (Paris, Frankreich) und das ISC 100 Endomicroscope (Pentax Life Care, Tokyo, Japan, und Optiscan Pty Ltd., Noting Hill, Victoria, Australien).

Das Cellvizio-System ist ein Sonden-basiertes System (verschiedene Sonden mit unterschiedlicher Auflösung und Eindringtiefe), wohingegen das ISC 100 Endomicroscope Endoskop-basiert ist und so die Eindringtiefe direkt am Endoskop variiert wird (maximal 250  $\mu\text{m}$ ). [61, 62]

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die Früherkennung von Tumoren des oberen Luft-/Speisewegs ist für die Prognose entscheidend. Es wurden bisher diverse optische Verfahren getestet, bei denen die Möglichkeit, die Dignität einer Leukoplakie oder Erythroplakie nichtinvasiv zu bestimmen, evaluiert wurde.

Sehr erfolgversprechend hat sich hierbei die optische Kohärenztomographie gezeigt. In einer vorhergehenden Studie von Volgger et al. [49] konnte bei n=100 Leukoplakien bzw. Erythroplakien des OADT mit einer Sensitivität von 89,0 % und Spezifität von 88,9 % zwischen invasiven und nichtinvasiven Läsionen unterschieden werden.

Probleme gab es in der Differenzierung zwischen simplen Hyperplasien und prä-malignen Dysplasien. Diese Veränderungen konnten nicht weiter differenziert werden, da hierfür ein Verfahren mit zellulärer Auflösung benötigt wird. Diese Unterscheidung ist allerdings wichtig, da sie therapeutische Konsequenzen bedingt. So müssen prä-maligne höhergradige Dysplasien nach den Leitlinien der Kopf-Hals-Chirurgie entfernt werden, wohingegen Hyperplasien ohne Malignität im Verlauf beobachtet werden können.

Als nichtinvasive diagnostische Methode mit zellulärer Auflösung stellt die konfokale Laserendomikroskopie ein möglicherweise geeignetes Verfahren dar, dessen Nutzen in dieser Studie evaluiert werden soll.

Ziel dieser Studie ist es, primäre Leuko- und Erythroplakien des OADT mittels OCT zu screenen und damit Karzinome und Normalgewebe zu identifizieren, was mittels OCT normalerweise zuverlässig möglich ist. Anschließend sollen die restlichen Läsionen mittels pCLE untersucht werden. Es wird überprüft, inwieweit die pCLE zur Differenzierung hyperplastischer und dysplastischer Läsionen des oberen Luft-/Speisewegs beitragen und somit die Diagnostik und Therapie für die betroffenen Patienten verbessern kann.

## **2. Material und Methoden**

Nach positivem Ethikvotum (Projekt Nr. 407-12) wurde diese klinische, prospektive, teilweise einfach verblindete Studie an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München in Zusammenarbeit mit dem Laser-Forschungslabor der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Alle Patienten wurden vorher ausführlich zu den Verfahren aufgeklärt und willigten schriftlich vor Beginn der Untersuchung in die Studienteilnahme ein.

### **2.1 Patientenkollektiv**

In die Studie wurden Patienten mit Leukoplakien und Erythroplakien des OADT eingeschlossen, die makroskopisch nicht eindeutig einer benignen, prämaligen oder frühmaligen Veränderung zugeordnet werden konnten. Es wurden nur Primärläsionen untersucht, also all jene Leukoplakien und Erythroplakien, die bisher keiner invasiven Diagnostik unterzogen wurden. Patienten mit bereits biopsierten Läsionen, Zweitläsionen, histologisch gesicherten Karzinomen oder dem dringenden Verdacht darauf nahmen nicht an der Studie teil.

Alle Patienten, die sich mit geeigneten Leukoplakien oder Erythroplakien an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München vorstellten und bei denen eine Biopsie oder chirurgische Entfernung vorgesehen war, wurden über die Studie informiert und aufgeklärt. Sofern sie einer Teilnahme zugestimmt hatten, wurden sie nach ihrer schriftlichen Einwilligung eingeschlossen. Minderjährige, nicht-einwilligungsfähige Patienten und Insassen von Anstalten wurden aus der Studie ausgeschlossen.

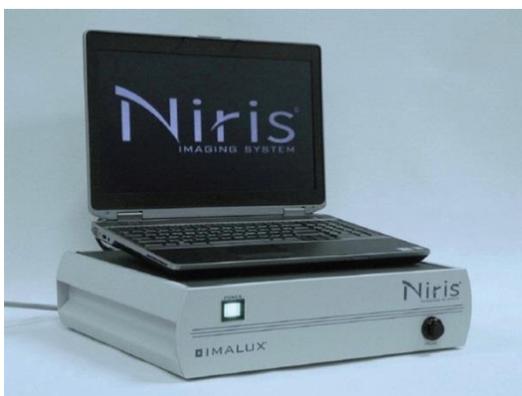
Alle eingeschlossenen Patienten wurden mittels OCT untersucht. Eine weitere Untersuchung mittels pCLE erfolgte nur, wenn der OCT-Befund bestimmte Kriterien erfüllte (s. „Durchführung der klinisch prospektiven Studie“). Die Untersuchungen wurden so lange durchgeführt, bis 30 Erythroplakien bzw. Leukoplakien vollständig, d. h. sowohl mit OCT als auch mit pCLE untersucht worden waren und somit im Sinne der Fragestellung ausgewertet werden konnten. Wenn bei Patienten an

verschiedenen Stellen (z. B. Zunge und Stimmlippe) Leukoplakien oder Erythroplakien gefunden wurden, wurden diese getrennt voneinander beurteilt und bewertet. Insgesamt wurden 23 Patienten (19 Männer und vier Frauen, Durchschnittsalter 57,74 Jahre, Altersbereich 33-75 Jahre, Standardabweichung 12,27 Jahre) mit 35 Läsionen in die Studie eingeschlossen und mittels OCT untersucht. Davon erfüllten 19 Patienten (16 Männer und drei Frauen, Durchschnittsalter 57,53 Jahre, Altersbereich 43-73 Jahre, Standardabweichung 10,72 Jahre) mit 30 Läsionen die Kriterien zur weiterführenden Untersuchung mittels pCLE und konnten somit in die Auswertung eingeschlossen werden. Bei den restlichen vier Patienten mit insgesamt fünf Läsionen wurde nach der OCT-Untersuchung leitliniengerecht eine Biopsie entnommen und ihre Teilnahme an der Studie endete damit.

## 2.2 Optische Kohärenztomographie

Für die Studie wurde das Niris® 1300e OCT-System der Firma Imalux (Cleveland, Ohio, USA) verwendet (s. Abbildung 9). Dieses Gerät ist sowohl CE- als auch FDA-zertifiziert. Es besteht aus einer zentralen OCT-Einheit, einem damit verbundenen Laptop und einem Fußschalter. Die Imalux-Sonde kann an die OCT-Einheit direkt angeschlossen werden.

Als Strahlungsquelle dient eine Superlumineszenz-Diode (und somit im Vergleich zur pCLE kein Laser) mit einer zentralen Wellenlänge von 1.310 nm. Das optische System wird in einer flexiblen Sonde mit einem Durchmesser von 2,7 mm und einer Länge von 3,0 m verarbeitet. Mit diesem System können laut Herstellerangaben



Aufnahmen mit einer Tiefenauflösung von 10-20  $\mu\text{m}$  bis zu einer Eindringtiefe von 1,6 mm erzeugt werden. Die Bildentstehungsrate beträgt 8 Hz bei einem Blickfeld von maximal 2x2 mm.

Abbildung 9: Niris® 1300e Epithelial OCT System der Firma Imalux (Quelle: <https://www.medgadget.com/2012/03/imalux-niris-1300e-epithelial-oct-system-cleared-in-europe.html>)

## 2.3 Konfokale Laserendomikroskopie

In der Studie verwendete man das Cellvizio-System der Firma Mauna Kea Technologies (Paris, Frankreich), dessen Aufbau in Abbildung 10 erklärt wird. Auch dieses Gerät erhielt sowohl die CE- als auch die FDA-Zertifizierung und ist somit für den klinischen Einsatz zugelassen.

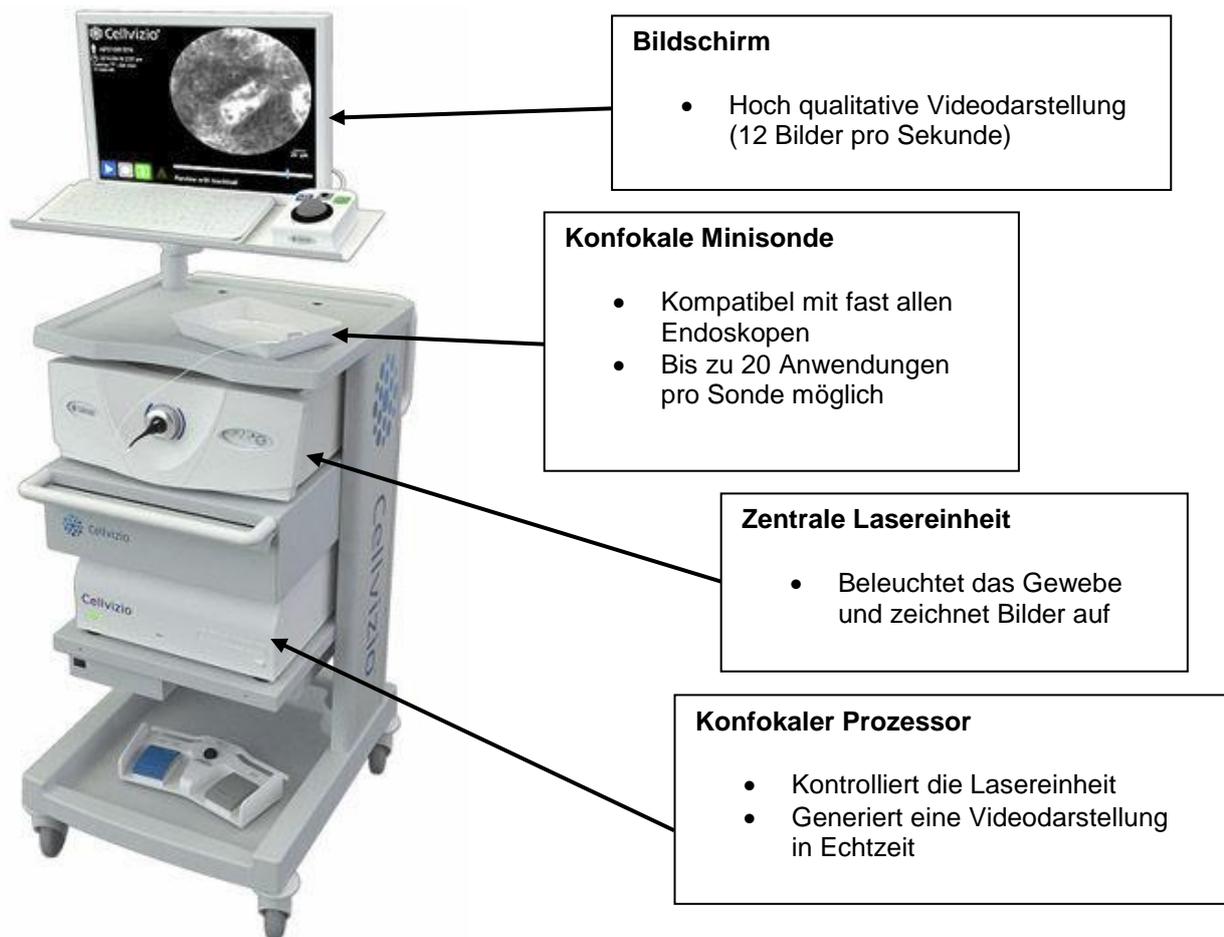


Abbildung 10: Cellvizio-System der Firma Mauna Kea Technologies; Aufbau  
(Quelle: <https://www.kebomed.no/produkter/fujifilm-epx-4450hd-videoprocessor-133/>)

An die zentrale Lasereinheit können verschiedene konfokale Sonden direkt angeschlossen werden. Für diese Studie wurden die Sonden Gastroflex und Gastroflex UHD des Cellvizio-Systems der Firma Mauna Kea Technology (Paris, Frankreich) verwendet. Da bei diesem System alle Sonden eine fixierte Eindringtiefe besitzen, kann mit jeder Sonde nur in der vorgegebenen Tiefe untersucht werden. Jede Sonde kann maximal für 20 Anwendungen benutzt werden. Die weiteren technischen Details der Sonden sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (s. Tabelle 4).

	Gastroflex	Gastroflex UHD
<b>Aufnahmefrequenz (Bilder/s)</b>	12	12
<b>Durchmesser der Sonde (mm)</b>	2,6	2,7
<b>Tiefe der Schichtaufnahme (µm)</b>	70-130 (fixiert)	55-65 (fixiert)
<b>Laterale Auflösung (µm)</b>	3,5	1
<b>Blickfeld (µm)</b>	Ø 600	Ø 240

Tabelle 4: In der Studie verwendete Sonden des Cellvizio System der Firma Mauna Kea Technology (Paris, Frankreich)

Über einen Fußschalter ist das Gerät bequem zu bedienen. Die integrierte Software und der hochleistungsfähige Laser ermöglichen die Darstellung in Echtzeit.

Als Kontrastmittel für die pCLE-Bildgebung wurden 2,5 ml Fluorescein 10 % (Alcon GmbH, Freiburg, Deutschland) intravenös verabreicht. Fluorescein ist ein für die intravenöse Applikation zugelassener Fluoreszenzfarbstoff, der in anderen Fachbereichen (z. B. Augenheilkunde) häufig verwendet wird.

## 2.4 Kriterien für die Auswertung der OCT- und pCLE-Bilder

Für die Auswertung der Studie wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Stephan Ihrler, Facharzt für Pathologie und Oralpathologie und assoziierter Mitarbeiter des Pathologischen Instituts der LMU München, folgende Kriterien festgelegt:

### Beurteilung der OCT-Bilder:

Zeigten die in die Studie eingeschlossenen Leukoplakien und Erythroplakien eine normale Gewebeschichtung (Epithelschicht und Lamina propria ließen sich klar voneinander abgrenzen) und Epitheldicke in der OCT-Bildgebung, wurden sie als Normalgewebe betrachtet und nicht weiter mittels pCLE untersucht. Wenn keine Gewebeschichtung mehr zu erkennen war, ging man nach aktuellem Wissensstand von einem invasiven Plattenepithelkarzinom aus. Auch in diesem Fall folgte keine weitere Untersuchung.

Veränderungen, die in der OCT bei einer normalen horizontalen Gewebeschichtung eine verbreitete Epitheldicke aufwiesen, waren in ihrer Dignität unklar und wurden daher im Anschluss mittels pCLE untersucht. Aussagen zur Epitheldicke basierten

dabei auf Vergleichen zu in der Literatur angegebenen durchschnittlichen Epitheldicken für die verschiedenen Lokalisationen [49, 50].

Zudem wurde die Epitheldicke des umgebenden Gewebes und des gegenüberliegenden Normalgewebes als Vergleich herangezogen.

Folgende Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus dem Protokoll, das für die Studie verwendet wurde.

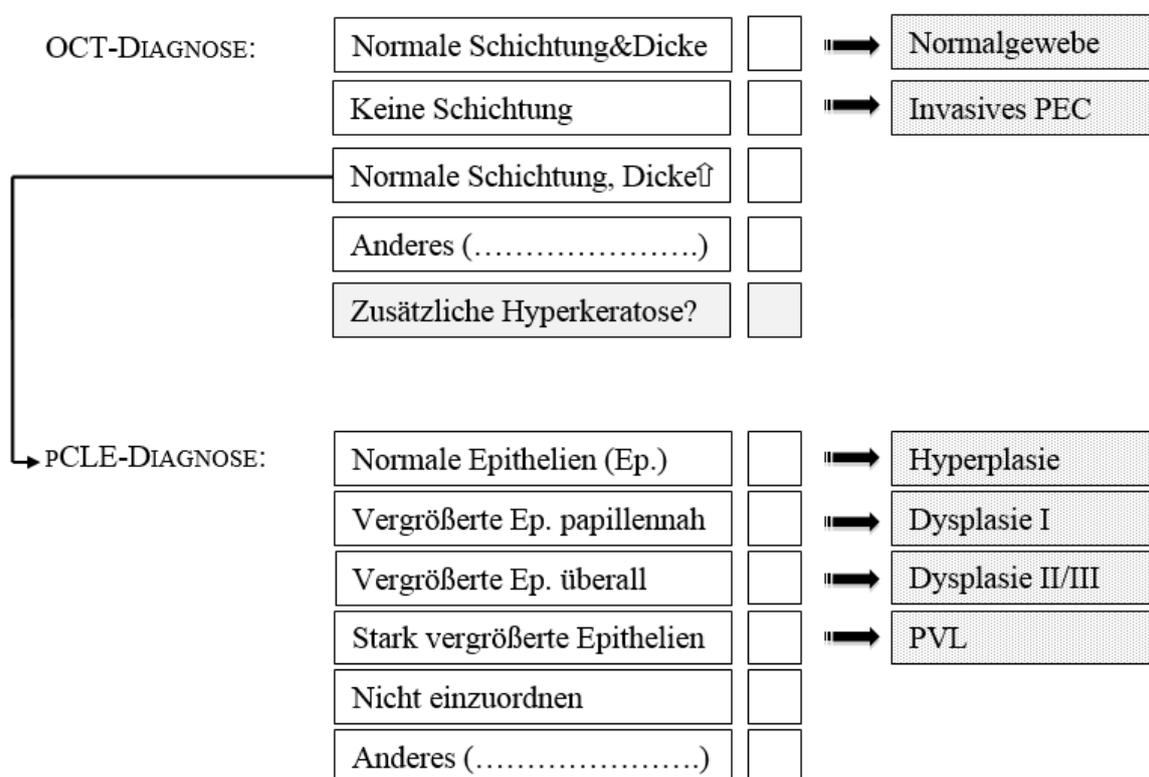


Abbildung 11: Ausschnitt aus dem Studienprotokoll zur Befundung der erhobenen Bilder

Bei einer Hyperplasie erwarteten wir ein normales Zellbild (Größe und Anordnung der Zellen, wie im gegenüberliegenden Normalgewebe), bei dysplastischen Läsionen hingegen vergrößerte Epithelzellen. Dabei wurden papillennah vergrößerte Epithelzellen als Dysplasie Grad I klassifiziert. Waren die Zellen überall vergrößert lautete die Verdachtsdiagnose Dysplasie Grad II-III. Bei sehr stark vergrößerten Epithelzellen wurde eine proliferative verruköse Leukoplakie angenommen.

## 2.5 Durchführung der klinisch prospektiven Studie

Alle Studienpatienten mit primären leukoplakischen oder erythroplakischen Läsionen des oberen Aerodigestivtraktes wurden zunächst mit OCT (Niris®, Imalux Corporation, Cleveland, USA) untersucht. Die Untersuchung erfolgte je nach Lokalisation der Läsion am wachen (Mundhöhle, Oropharynx) oder am narkotisierten Patienten (Pharynx, Larynx).



Abbildung 12: OCT-Sonde in einem OCT-Arbeitskanal



Abbildung 13: OCT-Sonde

Eine sterilisierte OCT-Sonde wurde per Hand gehalten und entweder direkt oder durch einen Endoskop-Arbeitskanal (70°/4 mm Hopkins II Endoskop, KARL STORZ GmbH, Tuttlingen, Deutschland, Abbildung 12 und 13) senkrecht auf die Läsion aufgesetzt und diese durch horizontale Bewegungen abgescannt. Da dies keine Schmerzen bereitete, war keine Lokalanästhesie notwendig. Alle Patienten und die erfassten Bilder und Befunde speicherte man anonymisiert in einen Rechner ein. Bei allen Untersuchungen war mindestens ein weiterer Untersucher anwesend, um die Geräte zu bedienen, Protokoll zu schreiben und eventuell zusätzliche Kommentare zu den Bildern festzuhalten. Für diese nur wenige Minuten in Anspruch nehmende Untersuchungen war keine spezielle Patientenvorbereitung erforderlich.

Bei der OCT-Untersuchung wurden standardisiert die Läsion, deren Randbereich, das umliegende normal erscheinende Gewebe und das kontralaterale Normalgewebe erfasst.

Dabei wurde die Ausdehnung und Lokalisation der jeweiligen Veränderung auf vorgefertigten Skizzen im Protokoll eingetragen und die exakte Positionierung der Sonde zu den entsprechenden Bildsequenzen vermerkt. Im Protokoll wurde ebenfalls die Entnahmestelle der Biopsien eingetragen, sodass die gespeicherten Bilder im Nachhinein den korrespondierenden histologischen Befunden zugeordnet werden konnten. Es wurde sowohl eine klinische Verdachtsdiagnose als auch direkt nach abgeschlossener Untersuchung eine Verdachtsdiagnose der OCT-Untersuchung gestellt. Die erhobenen Befunde wurden umgehend in das vorgefertigte Protokoll eingetragen. Die Befunde wurden dabei durch das Team bestehend aus Professor Dr. med. C. S. Betz, Dr. med. V. Volgger und S. Girschick gestellt, wobei jeweils unterschiedliche klinische Erfahrung im Umgang mit der OCT bei den Untersuchern vorlag. Während Professor Dr. med. C. S. Betz und Dr. med. V. Volgger bereits von sehr großer bzw. großer klinischer Erfahrung profitierten, bestand bei S. Girschick hauptsächlich theoretisches Wissen.

Bei der Beurteilung der OCT-Bilder wurde streng nach Protokoll auf die horizontale Schichtung des Gewebes (Epithelschicht, Basalmembran und Lamina propria) und auf die Dicke des Epithels geachtet, wie vorab ausführlich beschrieben.

Die Bilder wurden folgenden Gruppen zugeordnet:

1. Normale Gewebeschichtung und Epitheldicke; +/- Hyperkeratose
2. Keine Gewebeschichtung
3. Normale Gewebeschichtung, Epitheldicke erhöht
4. Anderes

Bei Veränderungen der Gruppe 1 wurde nach unseren bisherigen Erkenntnissen von Normalgewebe ausgegangen, bei Veränderungen der Gruppe 2 von einem invasiven Plattenepithelkarzinom. Bei allen Läsionen, die den Gruppen 1 oder 2 zugeordnet werden konnten, wurden nach aktuellem Goldstandard Gewebeproben entnommen. Da diese Befunde nicht den Kriterien für eine weitere Untersuchung mittels pCLE entsprachen, wurden diese Patienten nicht weiter untersucht und die Studienteilnahme endete an diesem Punkt.

Nur Veränderungen der Gruppe 3 wurden anschließend mittels pCLE untersucht. Dabei wurden dem Patienten zunächst 2,5 ml Fluorescein 10 % intravenös verabreicht und sofort im Anschluss die pCLE-Sonde auf die Schleimhaut aufgesetzt. Dies geschah wiederum analog zur OCT-Bildgebung durch direktes händisches Aufsetzen der Sonde oder durch Einführen in einen Endoskop-Arbeitskanal. Es wurden erneut möglichst alle Bereiche der Läsion (Zentrum der Läsion, Randgewebe) und umgebendes Normalgewebe untersucht. Diesmal wurden komplette Videosequenzen der definierten Regionen aufgezeichnet, alle wichtigen Informationen notiert und eine Verdachtsdiagnose direkt am Patienten nach den oben benannten Beurteilungskriterien durch das gleiche Untersucherteam, bestehend aus Professor Dr. med. C. S. Betz, Dr. med. V. Volgger und S. Girschick, gestellt. Hierbei gab es folgende mögliche Diagnosen:

1. Normalgewebe +/- Hyperkeratose
2. Hyperplasie / geringe Dysplasie
3. Mittel- bis hochgradige Dysplasie
4. Proliferative verruköse Leukoplakie
5. Andere

Die Risiken bei der OCT-Untersuchung entsprachen den üblichen Risiken einer Panendoskopie. Bei der pCLE-Untersuchung kam zusätzlich das Risiko für eine Nebenwirkung des klinisch zugelassenen Fluoreszenzmittels Fluorescein hinzu, über das man die Patienten vorher aufklärte.

Zuletzt wurde nun nach aktuellem Goldstandard entweder eine Biopsie entnommen (n=11) oder die gesamte Läsion entfernt (n=19).

Abbildung 14 zeigt das intraoperative Vorgehen anhand eines Patientenbeispiels. Hier sind das Einstellen der Leukoplakie, das Aufsetzen der pCLE-Sonde durch einen Endoskop-Arbeitskanal und schließlich die Biopsieentnahme dargestellt.



Abbildung 14: A: Primäre Leukoplakie an der linken Stimmlippe eines in dieser Studie eingeschlossenen Patienten. Man erkennt außerdem auch eine kleine Leukoplakie am vorderen Stimmlippendrittel der rechten Stimmlippe; B: Aufsetzen der pCLE-Sonde auf die Leukoplakie durch einen Endoskop-Arbeitskanal; C: Biopsieentnahme an verdächtigen Stellen.

Nach erfolgter Untersuchung wurden die Ergebnisse in eine Tabelle (Microsoft Excel) eingetragen. Jedem Patienten wurde eine Nummer zugeordnet, unter der die Daten gespeichert wurden. Hierbei wurden alle zu dem Patienten verfügbaren Informationen und Befunde als Zahlen verschlüsselt. Diese wurden ausgewertet und schlussendlich der pathologische Befund mit der Verdachtsdiagnose der OCT- und pCLE-Untersuchung auf Übereinstimmung verglichen.

### **2.6. Durchführung der retrospektiven Auswertung**

Es erfolgte nach Abschluss der Untersuchungen außerdem eine verblindete Auswertung. Hierfür wurden in zufälliger Reihenfolge die OCT-Bilder gezeigt und aus den pCLE-Videosequenzen entsprechende Sequenzen und repräsentative Bilder herausgeschnitten. Als Bewerter dienten erneut Professor Dr. med. C. S. Betz und Dr. med. V. Volgger, die bereits die klinische Studie begleitet haben und dort Erfahrung sammeln konnten. Es wurden hier jedoch keine klinischen Befunde gezeigt, um den Einfluss einer vermuteten Diagnose wegen eines makroskopischen Aussehens ausschließen zu können.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Übersicht aller Ergebnisse

Sowohl die OCT- als auch die pCLE-Untersuchungen wurden von allen Patienten gut toleriert. Es gab keine Nebenwirkungen und keine (allergischen) Reaktionen auf das Kontrastmittel Fluorescein. Technisch ließen sich beide Untersuchungen gut durchführen. Die Auswertung der Video- und Bildsequenzen gestaltete sich bei wachen Patienten etwas schwieriger, da es durch die Bewegung der zu untersuchenden Region (z. B. Zunge) zu Verzerrungen der Bilder kam. Bei narkotisierten Patienten verlängerte sich die Operationszeit bei Anwendung von OCT und pCLE um ungefähr 10 Minuten.

##### 3.1.1 OCT

Die OCT-Untersuchung lieferte hochauflösende Schichtbilder von Gewebe bis in knapp 2 mm Tiefe, die gut mit den histologischen Schnittbildern korrelierten.

Normalgewebe und nichtinvasive Läsionen, d. h. intraepitheliale Plattenepithelläsionen, wiesen im Gegensatz zu Karzinomen eine gut abgrenzbare Epithelschicht und Lamina propria auf. Folgendes OCT-Bild zeigt exemplarisch Normalgewebe der Stimmlippe (s. Abbildung 15). Man erkennt eine dünne Epithelschicht und die darunterliegende Lamina propria. Alle Gewebsschichten lassen sich klar voneinander abgrenzen.

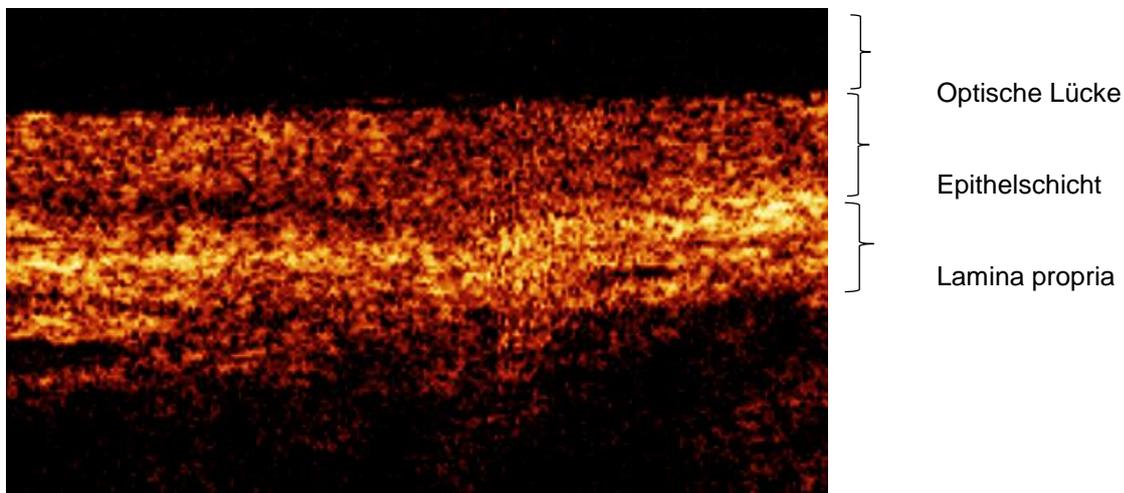


Abbildung 15: In vivo OCT von Normalgewebe der Stimmlippe

Probleme gab es in der Differenzierung intraepithelialer Plattenepithelläsionen, also zwischen simplen Hyperplasien und prämaligen Dysplasien. Beide Diagnosen zeigten in der OCT eine verbreitete Epithelschicht (s. Abbildung 16), bei der die Lamina propria aber noch zu erkennen war. Diese Veränderungen konnten nicht weiter differenziert werden, da hierfür ein Verfahren mit zellulärer Auflösung benötigt wird.

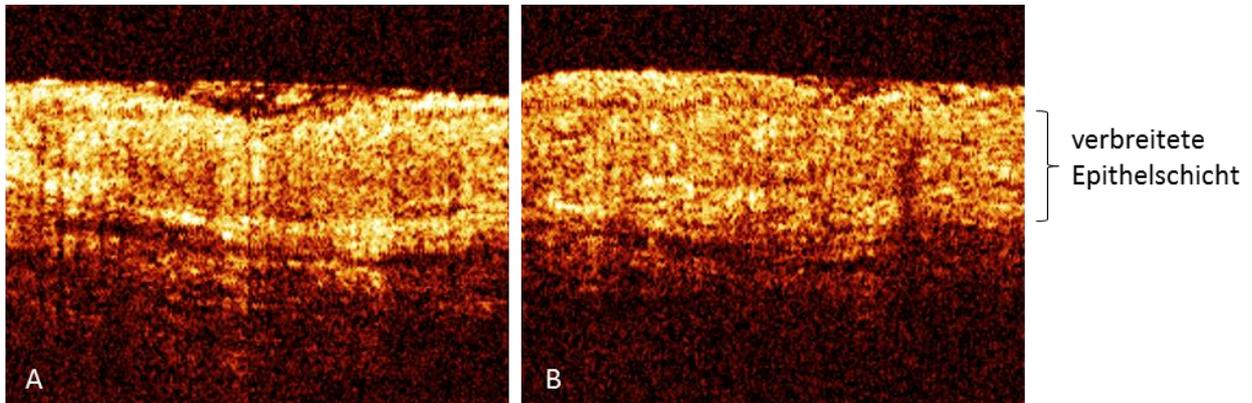


Abbildung 16: A: OCT-Bild einer hyperplastischen Läsion an der Stimmlippe; B: Hochgradig dysplastische Läsion an der Stimmlippe

Bei invasiven Läsionen ließ sich hingegen keine Gewebsschichtung mehr erkennen (s. Abbildung 17). Diese Läsionen konnten daher gut von Normalgewebe und intraepithelialen Plattenepithelläsionen differenziert werden. Folgende Bilder zeigen Normalgewebe der Epiglottis (links) und zum Vergleich das Bild eines invasiven Karzinoms der Epiglottis (rechts) des gleichen Patienten.

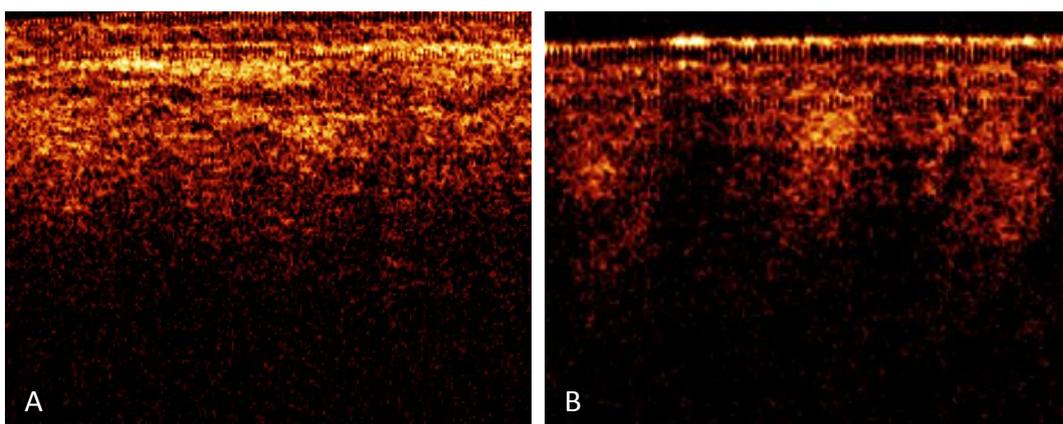


Abbildung 17: A: OCT-Bild eines Normalgewebes der Epiglottis; B: OCT-Bild eines invasiven Karzinoms der Epiglottis

Man erkennt auf dem linken Bild eine Epithelschicht und eine abgrenzbare Lamina propria. Auf dem rechten Bild ist diese Gewebsschichtung nicht mehr zu erkennen. Hier zeigen sich Tumorzapfen, die infiltrierend wachsen.

Zusammenfassend war es mit der OCT in den meisten Fällen möglich hyperplastische und dysplastische Läsionen zu identifizieren und dann einer weiteren Diagnostik mittels pCLE zuzuführen.

### 3.1.2 pCLE

Das in dieser Studie verwendete und klinisch zugelassene Kontrastmittel Fluorescein diffundierte ungefähr 30 Sekunden nach intravenöser Gabe in die Interzellularräume und verblieb dort für ungefähr 8 Minuten. Es gestattete somit die pCLE-Untersuchung in dieser Zeit. Durch dieses Verfahren war es möglich, Zellen mit ihrer Morphologie und Anordnung, Blutgefäße (Kapillaren) und Interzellularräume darzustellen.

Fluorescein diffundiert nicht in den Intrazellularraum, weshalb keine intrazellulären Strukturen, insbesondere Zellkerne, angefärbt werden konnten.

Die Bildqualität variierte. Die höchste Bildqualität konnte bei direktem Aufsetzen der pCLE-Sonde in einem Winkel von 90° auf das Gewebe erreicht werden. Ein harter und unbewegter Hintergrund, wie beispielsweise der Gaumen, erleichterte dies. Auch musste die Sonde sehr ruhig gehalten werden, da es anderenfalls zu verzerrten Bildern kam. Es durfte keine Bewegung von Seiten des Patienten stattfinden, weshalb eine Untersuchung in Narkose von Vorteil war. Die Interpretation der Bilder und somit die Diagnosestellung fiel bei Betrachtung der aufgezeichneten, zusammenhängenden Videosequenzen deutlich leichter als bei Beurteilung von lediglich einzelnen Standbildern.

Anhand von Veränderungen der Zellgröße, der Form, der Regularität des Zellbildes, der Interzellularräume und der mikroanatomischen Durchblutung erfolgte eine Vorhersage bezüglich der Art einer Läsion. Die Untersuchung mittels pCLE war bei der Unterscheidung zwischen Hyperplasien und Dysplasien hilfreich und konnte zusätzliche Informationen für eine Vorhersage der genauen Histologie liefern.

Im Folgenden sind beispielhafte Ergebnisse in Form von Bildern, geordnet nach den unterschiedlichen untersuchten Lokalisationen, dargestellt.

## **Epithel der Zunge**

Der Zungenrand und die Zungenunterseite zeigen in der pCLE regelmäßiges Plattenepithel (s. Abbildung 18). Hier lassen sich die einzelnen Verzahnungen von Epithel und Lamina propria, in denen Kapillarschlingen ziehen, sehr gut darstellen.

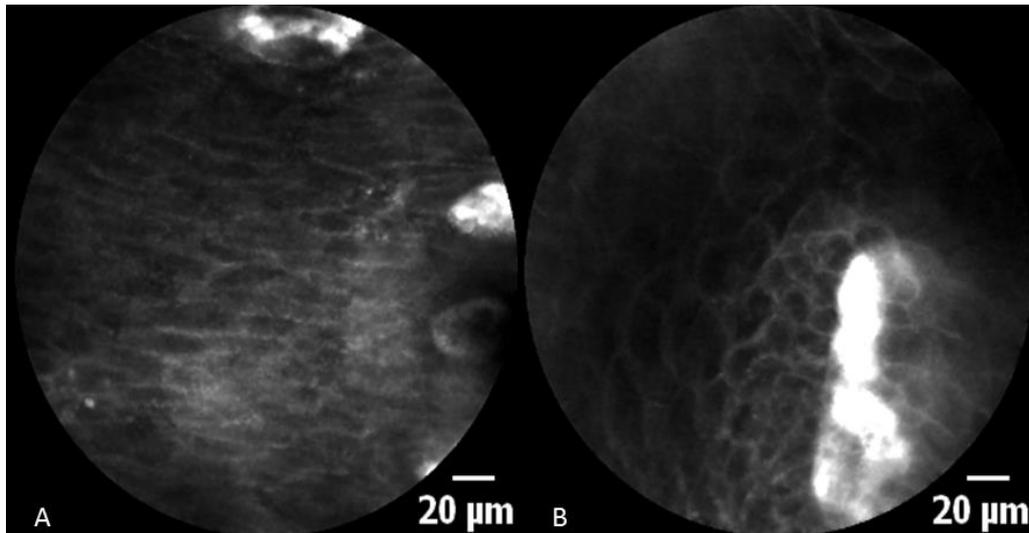


Abbildung 18: A und B: pCLE der Zunge, Normalgewebe (A) mit einer Papille (B)

Im Vergleich zum Normalgewebe erscheint dysplastisches Gewebe deutlich inhomogener mit in der Größe variierenden Zellen. Auch macht sich eine Angiogenese durch vermehrte Kapillaren bemerkbar (s. Abbildung 19).

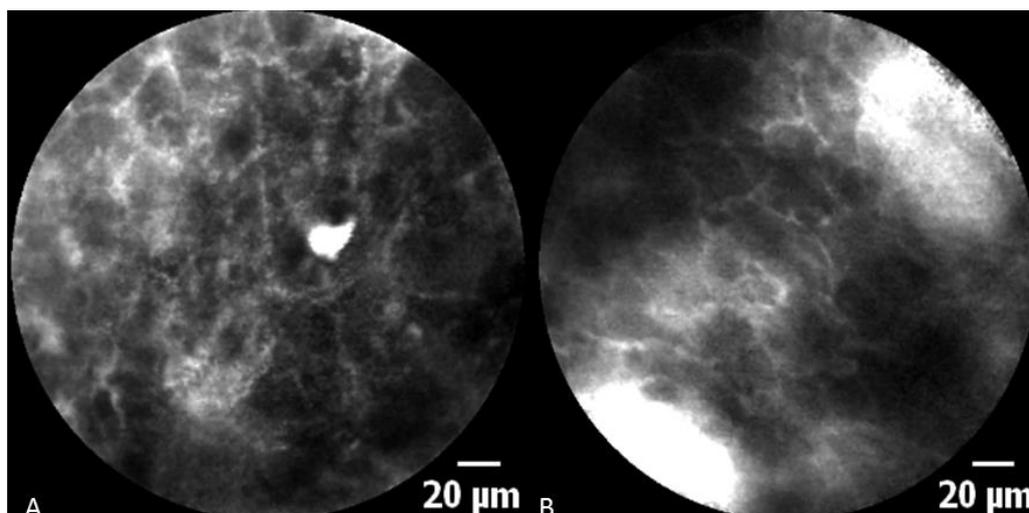


Abbildung 19: A und B: pCLE der Zunge, höhergradige Dysplasie

## Epithel der Stimmlippen

Bei gesundem Epithel der Stimmlippe zeigt sich eine recht homogene Anordnung der Zellen, die in ihrer Größe nur gering variieren. Das Kontrastmittel Fluorescein diffundiert gleichmäßig in die Interzellularräume, es besteht keine vermehrte Durchblutung.

Abbildung 20 weist den Normalbefund einer Stimmlippe auf (pCLE-Bilder, OCT-Bild und histologisches Schnittbild in HE-Färbung).

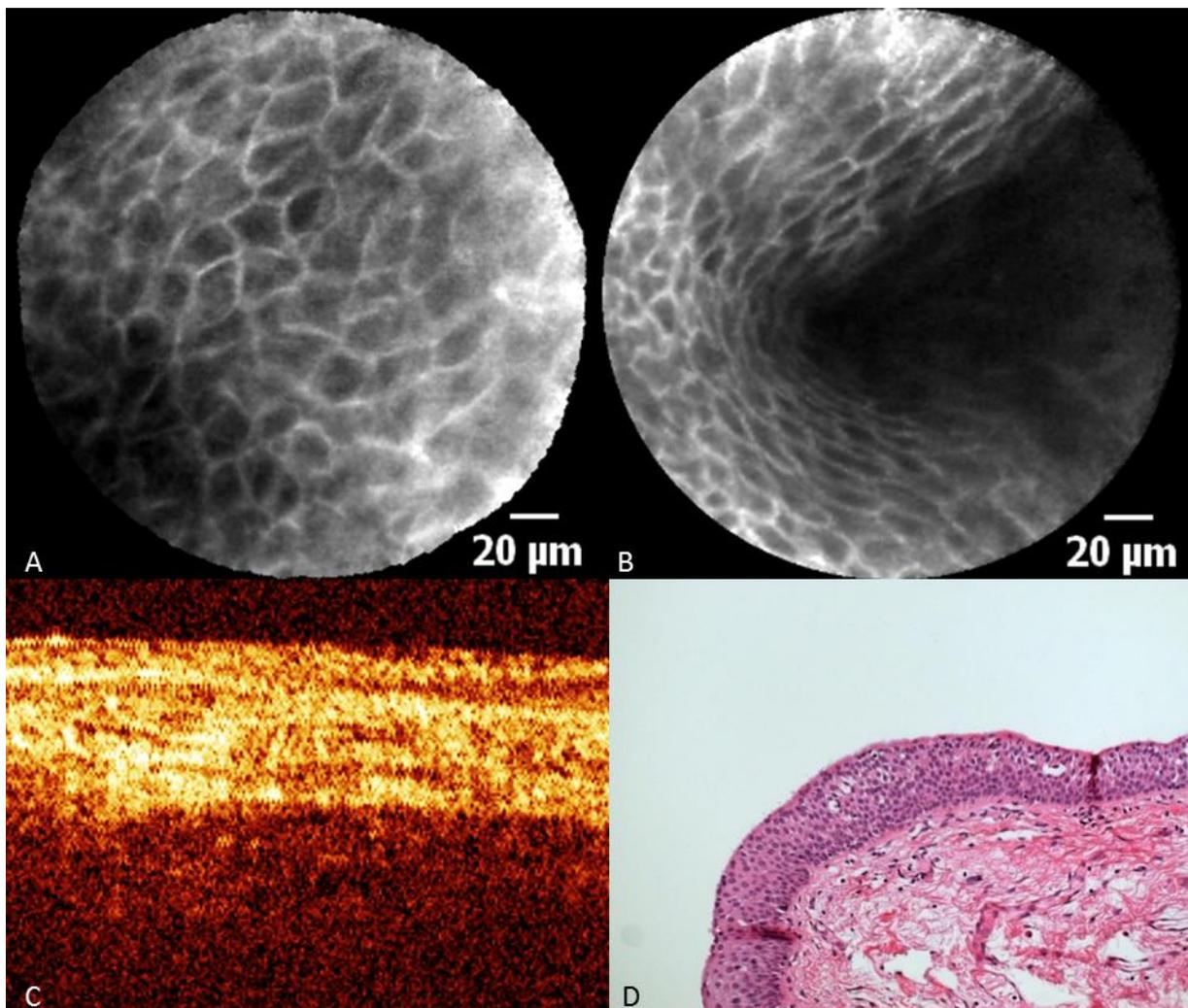


Abbildung 20: A und B: pCLE der Stimmlippe, Normalgewebe; C: korrespondierendes OCT der Stimmlippe; D: Stimmlippe, Normalgewebe, HE-Färbung

Auf den pCLE-Bildern sind die homogene Anordnung der Zellen und der gleichmäßige Kontrastmittelaustritt gut zu erkennen. Auf dem OCT-Bild sieht man eine vorhandene Schichtung des Epithels bei normwertiger Breite der Epithelschicht.

**Respiratorisches Epithel** (auch Flimmerepithel genannt) zeigt sehr regelmäßige Zellen, die deutlich kleiner als das umgebende Normalgewebe der Stimmlippen sind. Dieses hochprismatische, mit Zilien und Becherzellen ausgestattete Epithel, bedeckt den größten Teil der unteren Atemwege. Für diese Studie relevante anatomische Strukturen, die von respiratorischem Epithel ausgekleidet sind, sind die laryngeale Epiglottis und der Sinus morgagni. Alle Zellen stehen mit der Basalmembran in Verbindung. Dieses Gewebe ist in der pCLE durch ein sehr homogenes Zellbild geprägt (s. Abbildung 21).

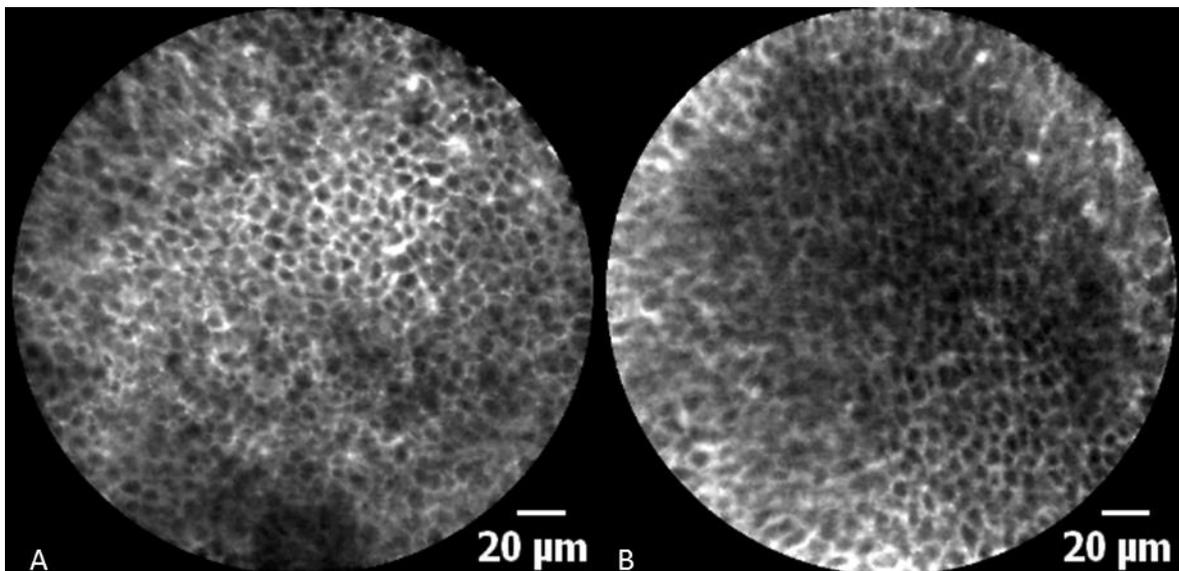


Abbildung 21: A und B: pCLE lateral der Stimmlippe, respiratorisches Epithel

### - Hyperplastische Läsionen

Hyperplastische Veränderungen (s. Abbildung 22 und 23) zeigen etwas größere Zellen im Vergleich zum Normalgewebe, die aber dennoch regelmäßig angeordnet sind. Es ist keine stärkere Durchblutung mittels vermehrter Anzahl an Kapillaren sichtbar.

Auf den Bildern kann man zusätzlich zu den pCLE-Bildern den histologischen Schnitt der Läsion in HE-Färbung (s. Abbildung 22 D), das makroskopische Bild intraoperativ (s. Abbildung 23 E) und die zuvor angefertigte Darstellung mittels OCT sehen. In der OCT sind die einzelnen Schichten gut darstellbar, es besteht jedoch eine verbreitete Epitheldicke.

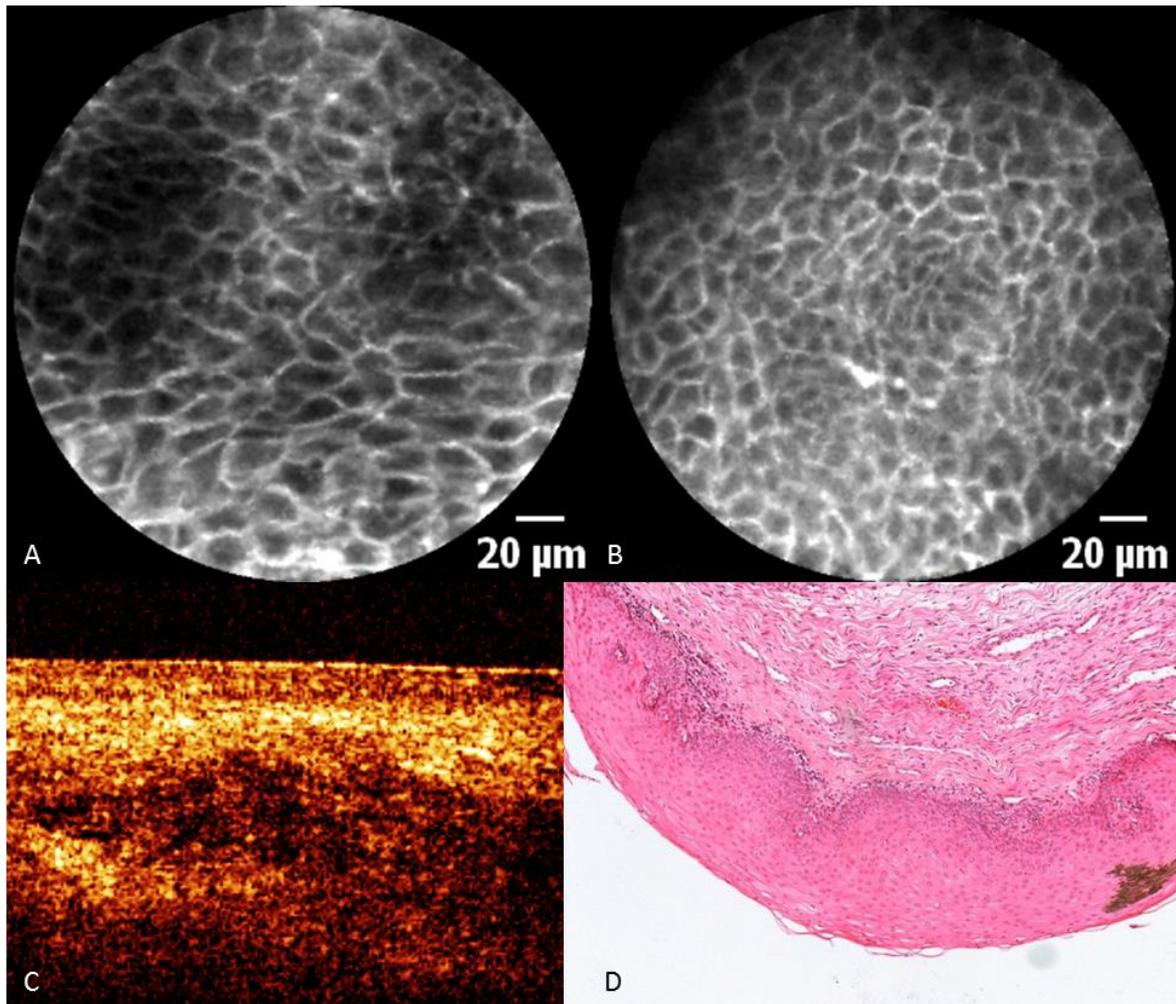


Abbildung 22: A: pCLE der Stimmlippe, Hyperplasie; B: pCLE der Stimmlippe, Normalgewebe; C: OCT der Stimmlippe, Hyperplasie; D: Biopsie der Stimmlippe. Hyperplasie, HE-Färbung

Die Abbildungen 23 A und B zeigen eine hyperplastische Veränderung, die Abbildung 23 D Normalgewebe der Stimmlippe desselben Patienten. Vergleicht man die Bilder miteinander, fällt zum einen ein Größenunterschied auf. Außerdem sind die Kontraste und die Bildschärfe der hyperplastischen Veränderungen etwas reduziert. Dies ist in den meisten Fällen einer begleitenden Hyperkeratose zu verdanken.

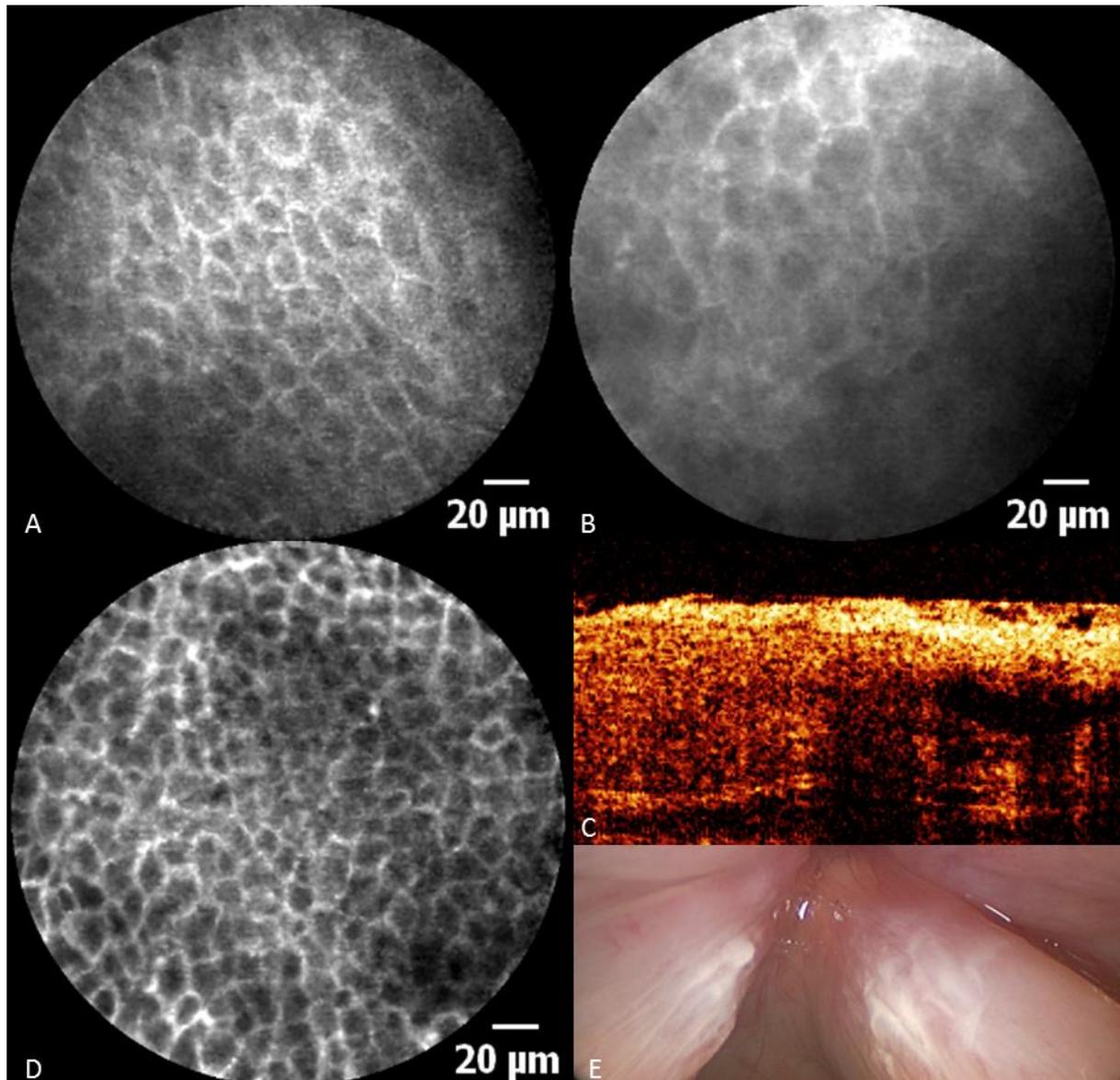


Abbildung 23: A: pCLE der Stimmlippe, Hyperplasie; B: pCLE der Stimmlippe, Hyperplasie; C: OCT der Stimmlippe, Hyperplasie  
D: pCLE der Stimmlippe, Normalgewebe; E: makroskopisches Bild der Läsion

## - Dysplastische Läsionen

**Mäßiggradige Dysplasien** erscheinen im Vergleich zu Normalgewebe etwas inhomogener mit teilweise vergrößerten Zellen. Das Interstitium ist unregelmäßig konfiguriert und gelegentlich verbreitert. Auch sind vermehrt Kapillaren darstellbar. Dies weist auf Angiogenese hin.

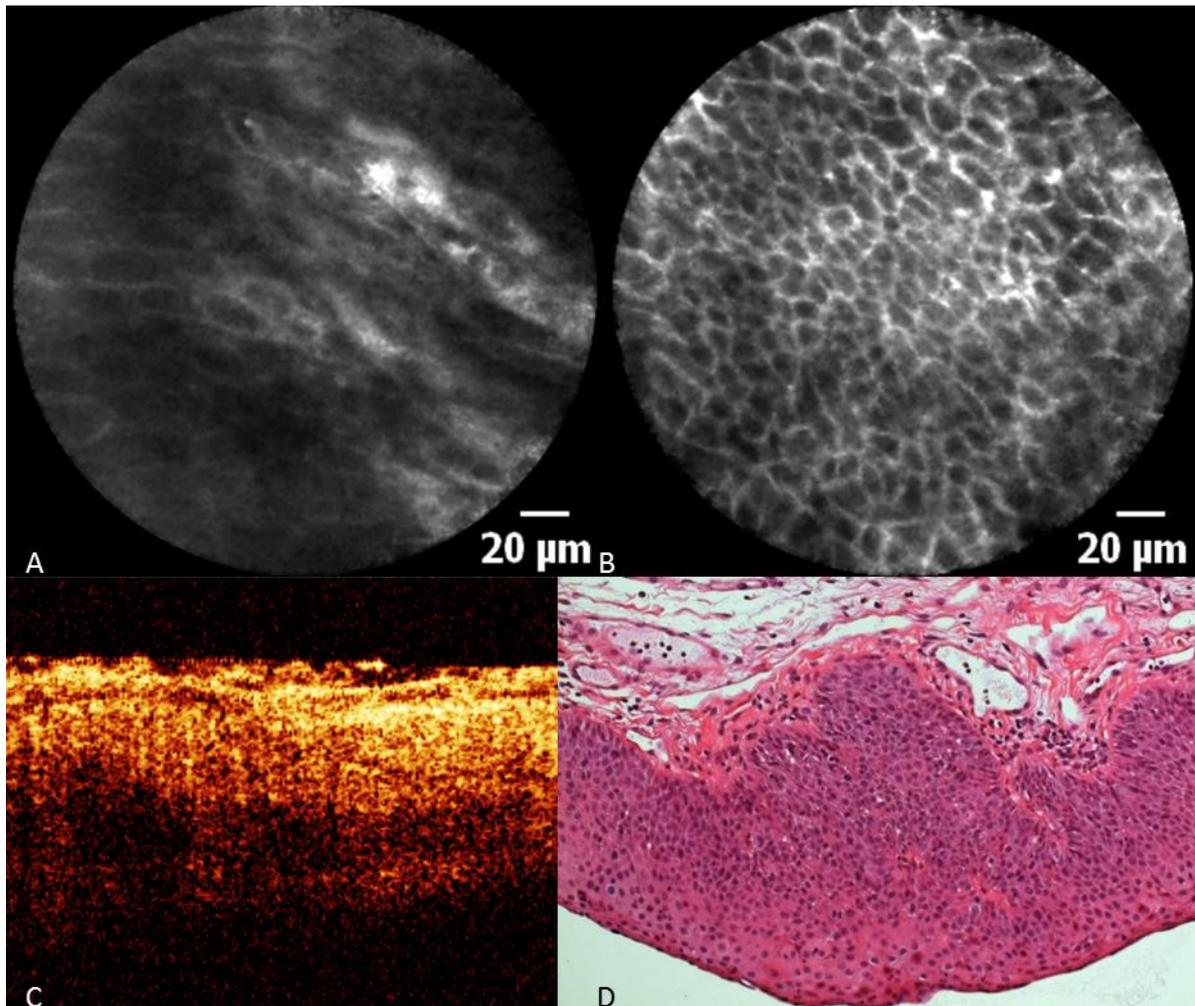


Abbildung 24: A: pCLE der Stimmlippe, Dysplasie II. Grades; B: pCLE der Stimmlippe desselben Patienten, Normalgewebe; C: OCT der Stimmlippe, Dysplasie II. Grades; D: Biopsie der Stimmlippe, Dysplasie II. Grades, HE-Färbung

Die Abbildungen 24 und 25 zeigen beispielhafte Bilder von mäßiggradigen Dysplasien.

Abbildung 24 A zeigt das pCLE-Bild aus dem Zentrum der dysplastischen Läsion, wohingegen Abbildung 24 B homogenes Normalgewebe und teils respiratorisches Epithel desselben Patienten aufzeigt. Auf Abbildung 24 A sieht man größere und unregelmäßiger geformte Zellen als auf Abbildung B. Auch sind Kapillaren miterfasst. Abbildung 24 C zeigt das vor der pCLE-Untersuchung angefertigte OCT-Bild mit typischerweise verbreiteter Epithelschicht und Abbildung 24 D den dazugehörigen histologischen Schnitt.

Auch in Abbildung 25 A und B (jeweils unterschiedliche Stellen im Zentrum der Läsion) fallen unregelmäßige Zellen mit inhomogenem Kontrastmittelaustritt und vereinzelte Kapillaren auf.

Die Abbildung 25 C stellt das dazugehörige OCT-Bild mit verbreiteter Epithelschicht dar. Im Vergleich dazu erscheint das Gewebe auf Abbildung 25 D wieder deutlich homogener. Hier ist ein Blutgefäß im Zentrum des Bildes miterfasst, einzelne Erythrozyten sind auch zu erkennen.

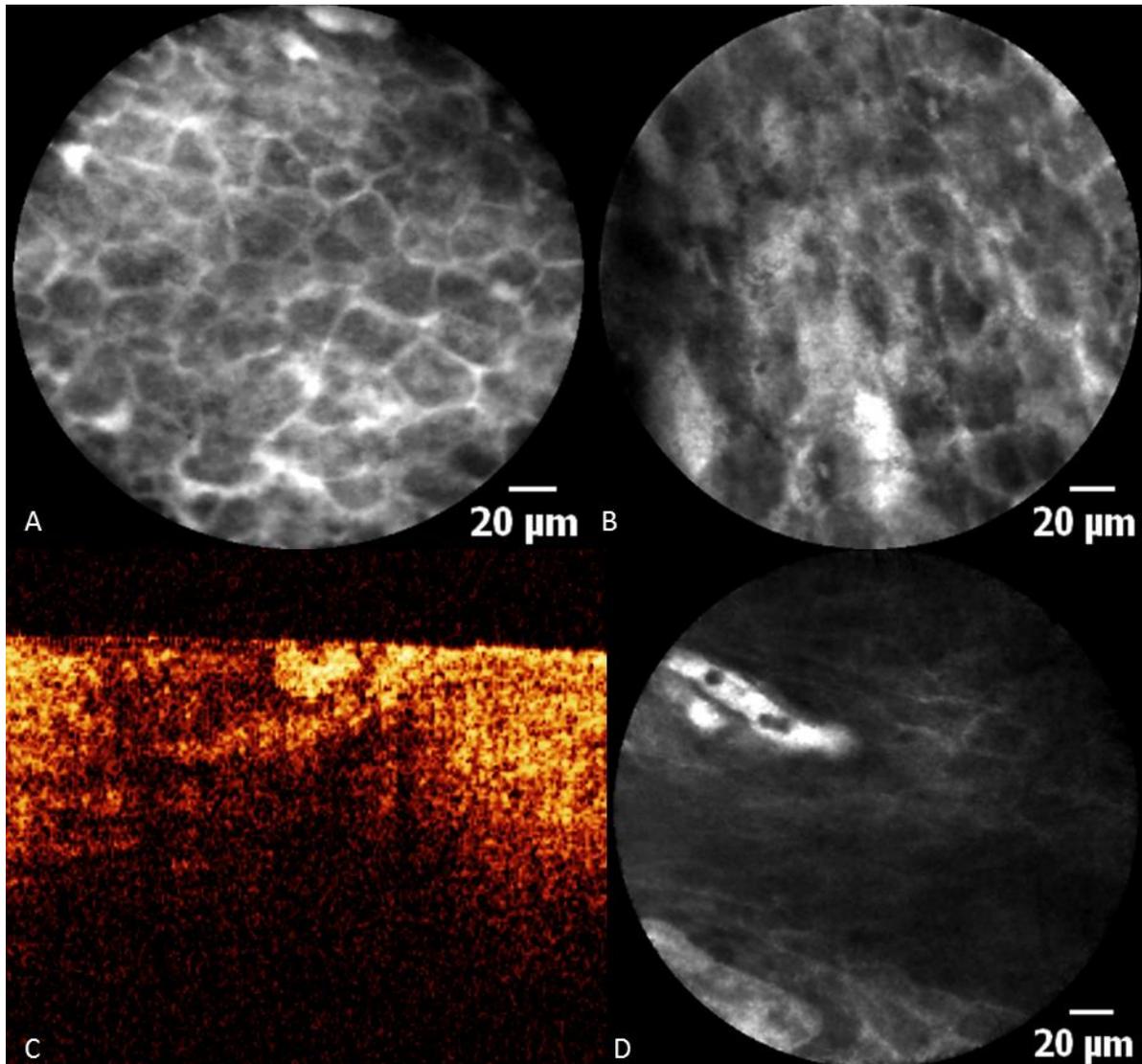


Abbildung 25: A und B: pCLE der Stimmlippe, Dysplasie II. Grades; C: OCT der Stimmlippe, Dysplasie II. Grades; D: Normalgewebe der Stimmlippe mit erfasstem Blutgefäß

**Höhergradige Dysplasien** stellen sich als sehr inhomogene Veränderungen dar, teils mit deutlich vergrößerten Zellen und intermittierend schwarzen Stellen. Das Kontrastmittel scheint hier nicht mehr regelmäßig in die Interzellularräume zu diffundieren. Diese erweisen sich auch recht unregelmäßig. Auch Kapillaren können als Zeichen einer gesteigerten Vaskularisation vermehrt visualisiert werden.

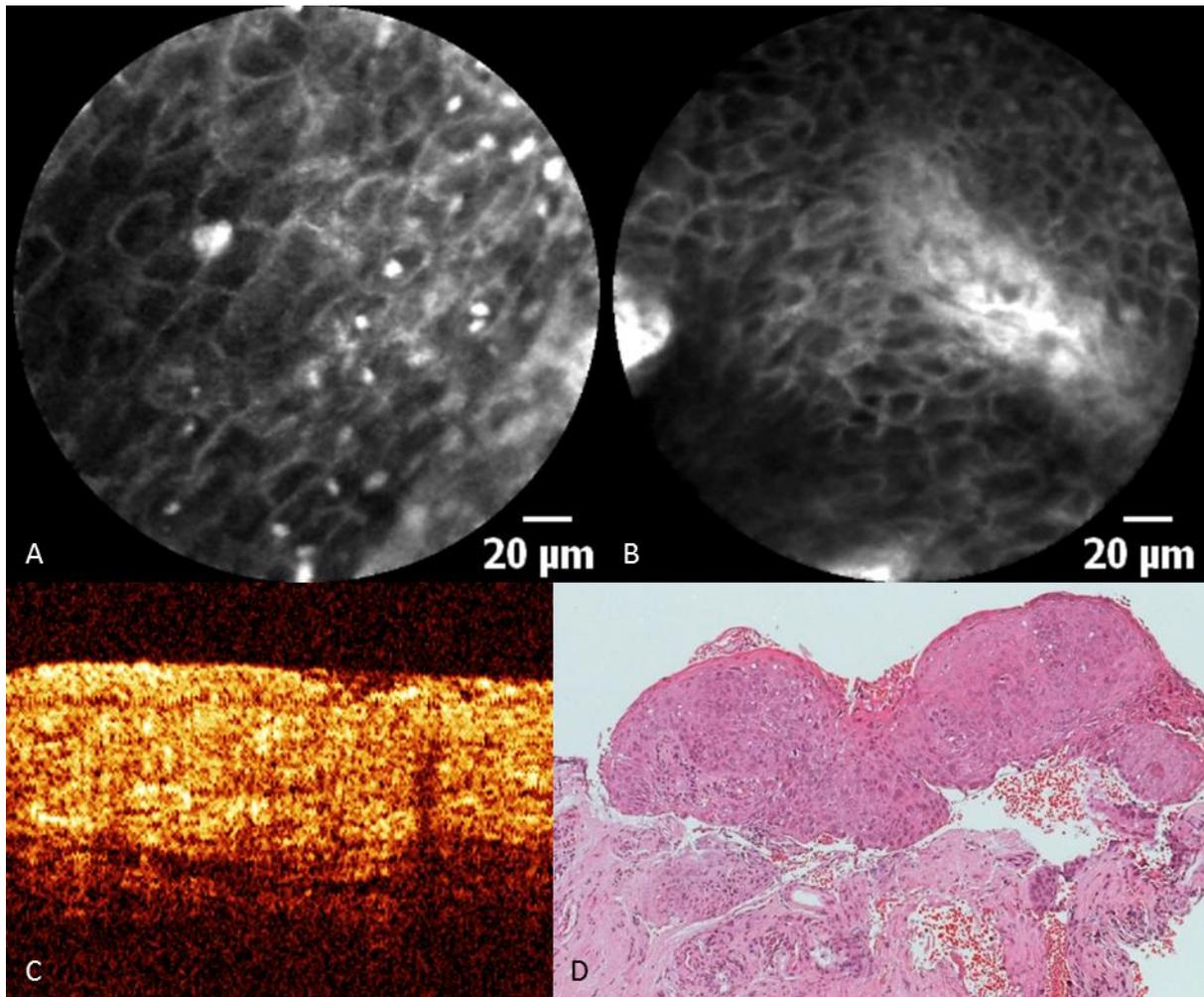


Abbildung 26: A und B: pCLE der Stimmlippe, Dysplasie III. Grades; C: OCT der Stimmlippe, Dysplasie III. Grades; D: Biopsie der Stimmlippe, Dysplasie III. Grades, HE-Färbung

Abbildung 26 zeigt beispielhaft eine hochgradige Dysplasie an der Stimmlippe mit einem sehr inhomogenen Zellbild und deutlicher Angioneogenese. Auf Abbildung 26 C (OCT der Läsion) erkennt man wieder eine gut sichtbare Gewebsschichtung mit vorhandener Lamina propria und deutlich verbreiteter Epithelschicht, passend zu einer dysplastischen Veränderung.

Das **Carcinoma in situ** zählt laut WHO-Definition ebenfalls zu den höhergradigen Dysplasien. Hier imponiert, ähnlich einer Dysplasie III. Grades, ebenfalls ein sehr inhomogenes Zellbild mit in der Größe stark variierenden Zellen. Eine unregelmäßige Kontrastmittelaufnahme und gelegentliche Kontrastmittelaustritte ins Interstitium sind sichtbar. Außerdem lassen sich vermehrt Kapillaren darstellen. Beispiele für Carcinomata in situ finden sich in Abbildung 27 und 28.

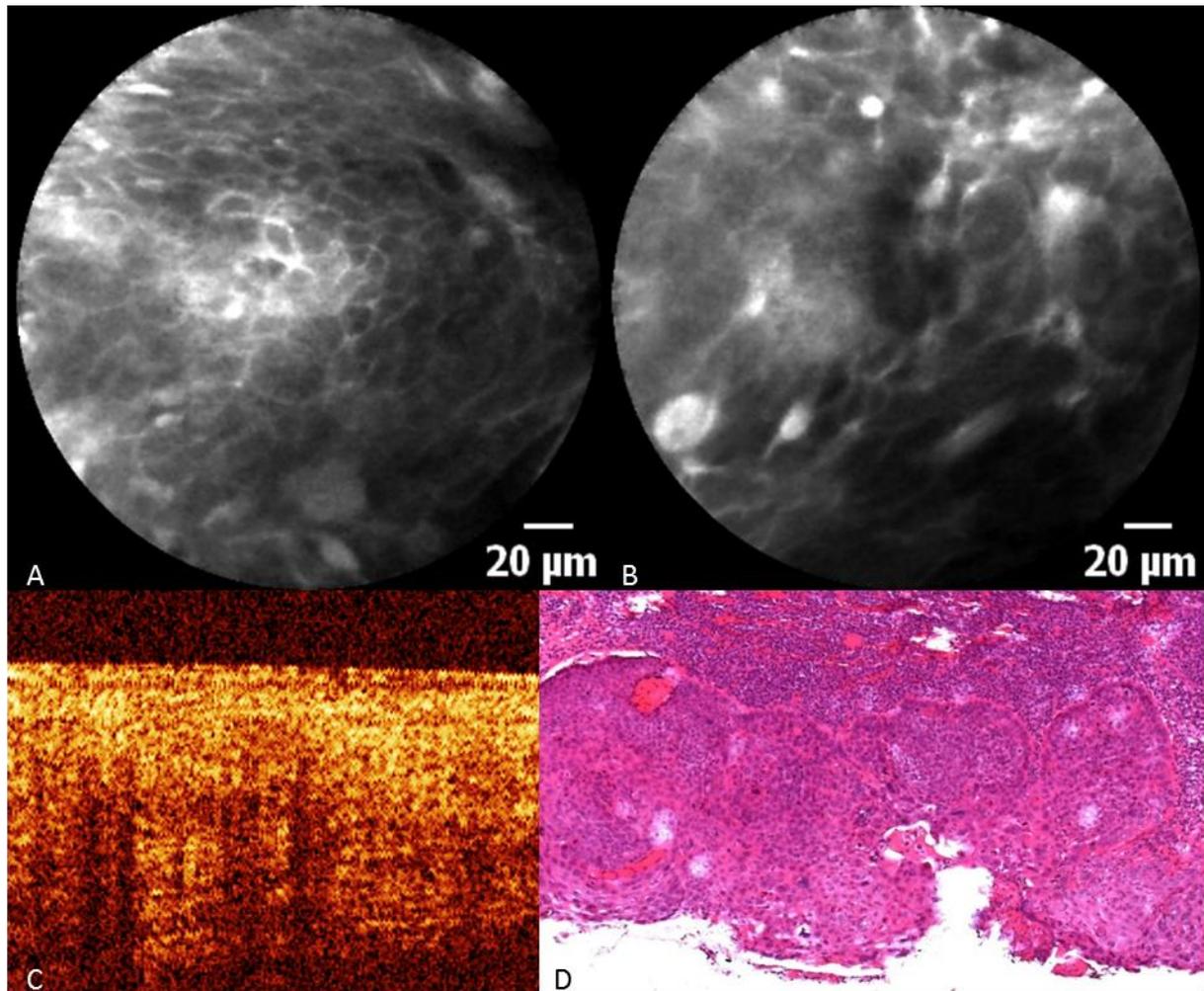


Abbildung 27: A und B: pCLE der Stimmlippe, CIS; C: OCT der Stimmlippe, CIS; D: Biopsie der Stimmlippe, CIS, HE-Färbung

Abbildung 27 A und B zeigen das typische Bild einer höhergradigen Dysplasie. Unregelmäßige Zellen, inhomogener Kontrastmittelaustritt und begleitende Hypervaskularisierung sind deutlich zu erkennen.

Abbildung 28 A stellt sehr unregelmäßige Zellen dar, Abbildung 28 B das zugehörige OCT-Bild. Abbildung 28 C zeigt ein ähnlich inhomogenes Zellbild, man erkennt hier aber bereits eine deutlich reduzierte Bildqualität durch begleitende Hyperkeratose. Auf Abbildung 28 D sind vor allem im unteren Bildrand vermehrt Kapillaren als Zeichen einer Hypervaskularisation zu sehen. Hier gab es jedoch deutliche Fokussierungsprobleme, die zum einen durch eine ungerade Auflagefläche bedingt waren und zum anderen durch Hyperkeratose und Speichel entstanden. Auf Probleme in der Darstellung wird weiter unten im Text noch genauer eingegangen.

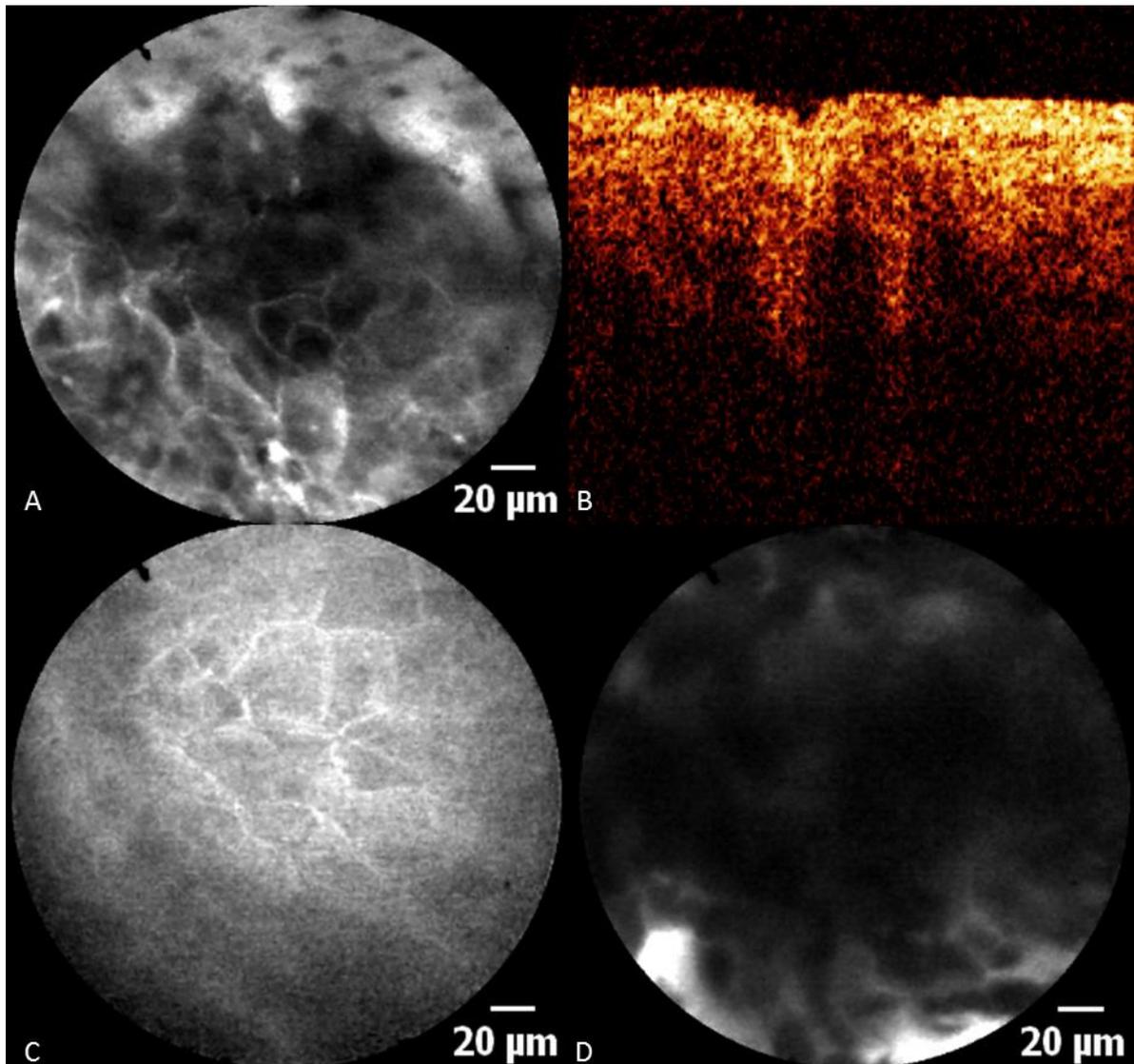


Abbildung 28: A: pCLE der Stimmlippe, CIS; B: OCT der Stimmlippe, CIS; C: pCLE der Stimmlippe, CIS; D: pCLE der Stimmlippe, CIS

### - PVL (Proliferative verruköse Leukoplakie)

Auch die proliferativ verruköse Leukoplakie (s. Abbildung 29) stellt sich mit einem teils inhomogenen Zellbild dar. Neben homogenen größeren Zellen sind aufgrund der hohen Proliferationsaktivität des Gewebes auch unterschiedlich kleine Zellen sichtbar. Es imponiert ein deutlicher Kontrast zwischen Zellen und Interstitium mit teils unregelmäßig angefärbten Interzellularräumen. Auf der Darstellung mittels OCT erkennt man wieder eine breite Epithelschicht bei noch vorhandener Gewebsschichtung.

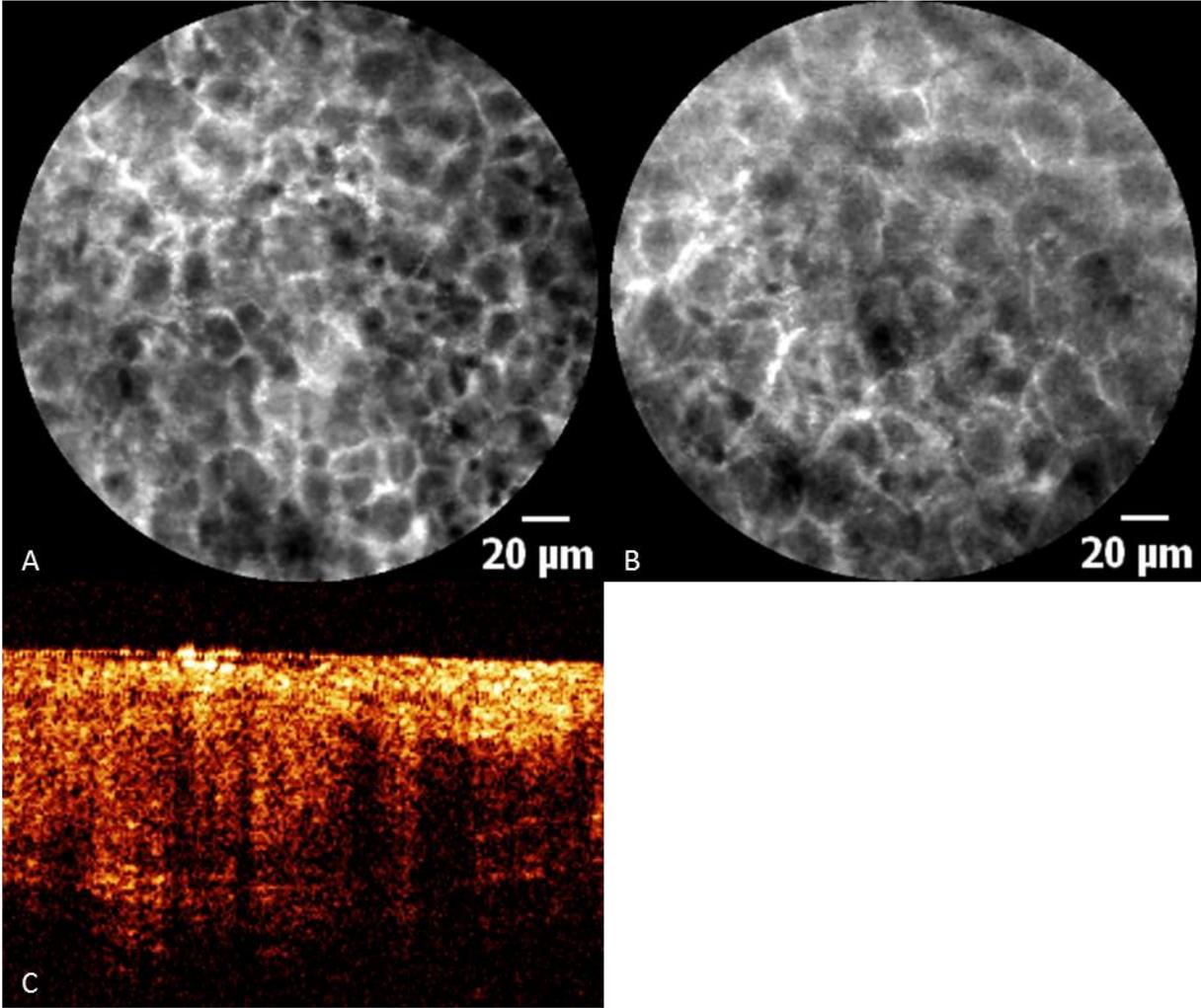


Abbildung 29: A und B: pCLE der Stimmlippe, PVL; C: OCT der Stimmlippe, PVL

Weitere Veränderungen:

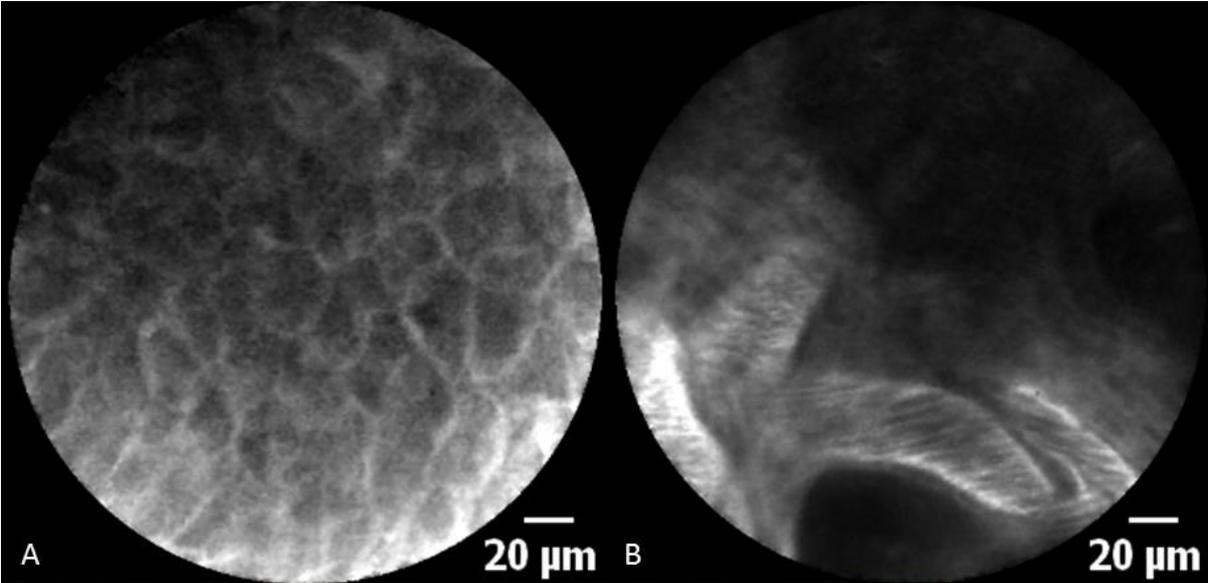


Abbildung 30 a: A und B: pCLE der Stimmlippe, Ulcus

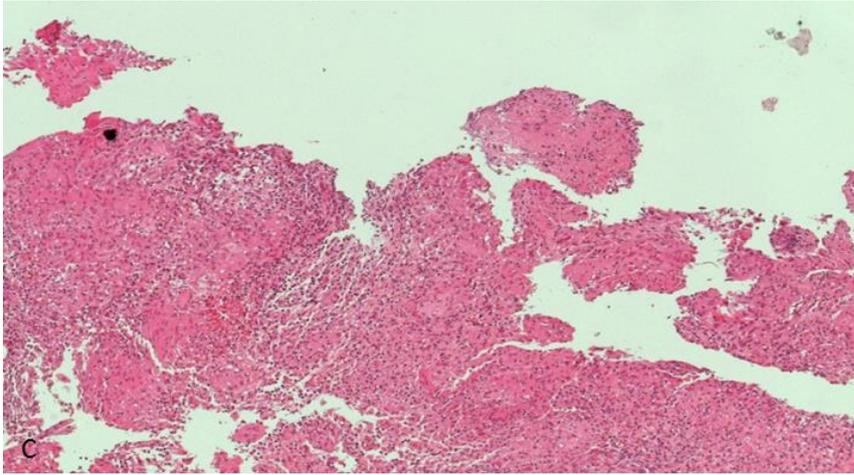
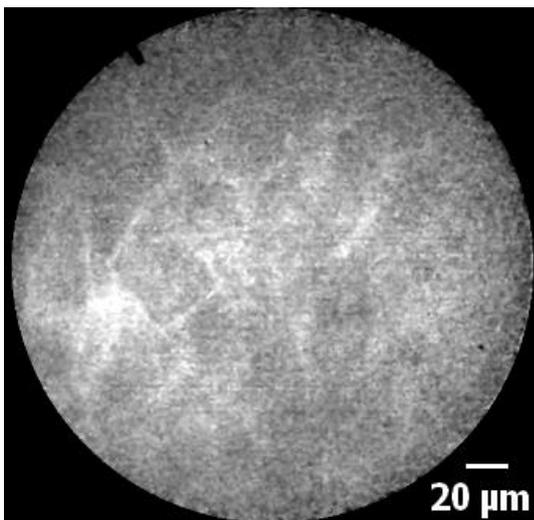


Abbildung 30 b: C: Biopsie der Stimmlippe, Ulcus, HE-Färbung

Abbildung 30 hingegen zeigt ein **Ulcus der Stimmlippe**. Auf den pCLE-Bildern sieht man relativ geordnete, vergrößert wirkende Zellen und eine auffallend starke Durchblutung.

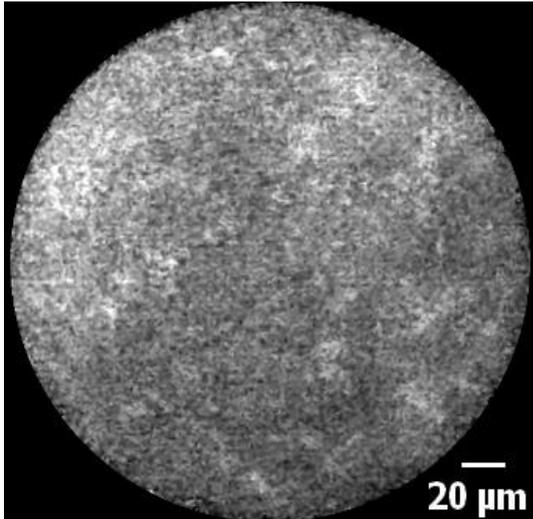
### 3.1.3 Probleme mit der Bildqualität

Nicht immer konnten gut beurteilbare Bilder mittels pCLE erfasst werden. Folgende Befunde zeigen Probleme bei der Durchführung:



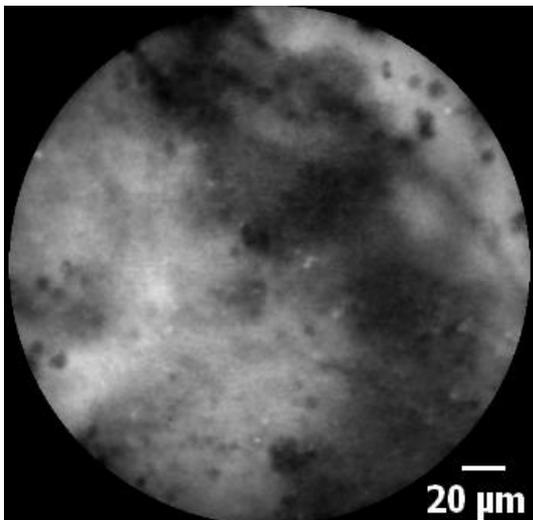
Bei stark hyperplastischen und hyperkeratotischen Läsionen reichte die Eindringtiefe der Sonden nicht aus. Da dysplastische Veränderungen von der Basalmembran und nicht von der Oberfläche her entstehen, konnten diese tiefer liegenden Gewebsschichten bei Läsionen mit zu breiter Epithelschicht nicht dargestellt werden (s. Abbildung 31).

Abbildung 31: Schlechte Bildqualität bei einer hyperkeratotischen Läsion



Dieser Ausschnitt (s. Abbildung 32) zeigt Fokussierungsprobleme bei einer Läsion im Mundboden. Gelegentlich führte diese technische Störung zu schlechter Bildqualität. Weshalb derartige Probleme auftraten, konnte von uns nicht eruiert werden.

Abbildung 32: Schlechte Bildqualität durch Fokussierungsprobleme



Auch führte Speichel zu Überlagerungen, weshalb darunterliegende Zellen nicht dargestellt werden konnten. Das Gewebe und die Sonde mussten zunächst von Speichelauflagerungen gereinigt werden, um die Untersuchung fortsetzen zu können.

Abbildung 33: Schlechte Bildqualität durch Speichelauflagerung

## 3.2 Auswertung

### 3.2.1 Auswertung der Untersuchungen mittels OCT

Insgesamt wurden 35 primär leuko- oder erythroplakische Läsionen des OADT mittels OCT und davon 30 Läsionen weiterführend mittels pCLE untersucht.

Von den 35 mittels OCT untersuchten Läsionen befanden sich 29 Läsionen an der Stimmlippe, eine Läsion an der Wange, drei Läsionen am Zungenrand, eine Läsion an der Gingiva und eine Läsion an der lingualen Epiglottis. Von den 30 mittels pCLE

untersuchten Läsionen hingegen befanden sich drei in der Mundhöhle und 27 an den Stimmlippen.

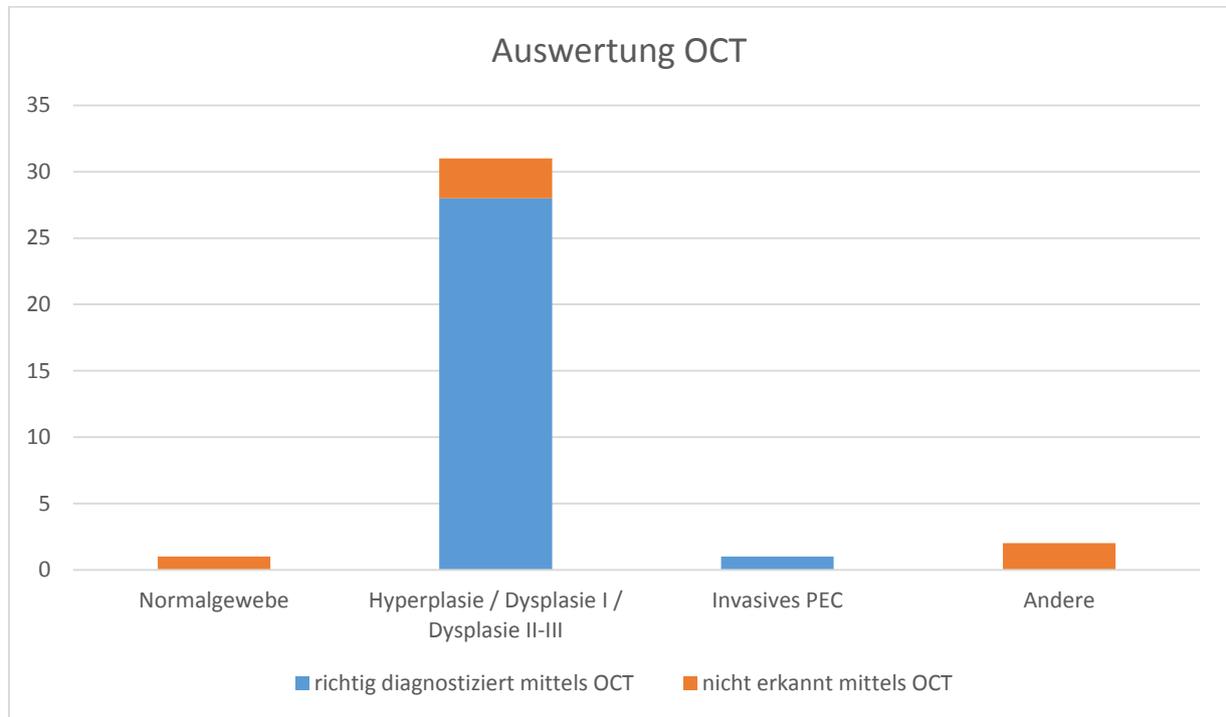


Abbildung 34: Gesamtdarstellung der Auswertung mittels OCT

Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen mittels OCT in der Übersicht. Farblich blau markiert sind dabei die richtig diagnostizierten Befunde. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse nochmals in Zahlen dargestellt, Tabelle 6 zeigt eine Auswertung der mittels OCT fehlerhaft erhobenen Befunde.

Histologischer Befund	Anzahl der Läsionen mit dieser Histologie	Richtige Diagnose mittels OCT	Richtige Diagnose in %
Normalgewebe	1	0	0 %
Hyperplasie / Dysplasie	31	28	90,3 %
Invasives PEC	1	1	100 %
Andere	2	0	0 %
<b>Gesamt</b>	<b>35</b>	<b>29</b>	<b>82,9 %</b>

Tabelle 5: Auswertung der mittels OCT erhobenen Befunde direkt am Patienten

Fehlerhafte Diagnose mittels OCT	Anzahl der fehlerhaften Diagnosen	Histologischer Befund
Normalgewebe	2	1 x Hyperplasie 1 x Dysplasie II-III
Hyperplasie / Dysplasie I / II-III	2	2 x Andere
Invasives PEC	2	1 x Normalgewebe 1 x Hyperplasie

Tabelle 6: Auswertung der mittels OCT fehlerhaft erhobenen Befunde direkt am Patienten

Aus den Tabellen geht hervor, dass mittels OCT 28 von 31 intraepithelialen Plattenepithelläsionen (Hyperplasien und Dysplasien) richtig eingestuft wurden.

Eine Läsion wurde mit OCT als Normalgewebe klassifiziert, in der Histologie zeigte sich jedoch eine mäßiggradige Dysplasie. Eine weitere Läsion, die als Normalgewebe klassifiziert wurde, war histologisch eine Hyperplasie. Zwei Läsionen wurden der Gruppe „Hyperplasie/Dysplasie“ zugeordnet. Laut Histologie gehörten sie beide zur Gruppe „Andere“.

Zwei Läsionen wurden in Ihrer Malignität überschätzt. Ein Normalgewebe und eine Hyperplasie wurden als invasives Plattenepithelkarzinom eingestuft (s. Tabelle 6). Nach Protokoll lag die Rate der richtig eingeschätzten Läsionen mittels OCT bei 82,9 %.

### 3.2.2 Auswertung der Untersuchungen mittels pCLE

Um homogenere Gruppen zu bekommen, ist die Auswertung aufgeteilt. Es werden zunächst die Ergebnisse der drei Läsionen aus der Mundhöhle dargestellt. Die anschließenden, statistischen Auswertungen beziehen sich dann ausschließlich auf die 27 laryngealen Läsionen.

Histologisch zeigten sich bei den drei Läsionen aus dem Bereich der Mundhöhle eine Hyperplasie an der Wange und zwei höhergradige Dysplasien am Zungenrand. Davon wurden die Hyperplasie und eine Dysplasie richtig mittels pCLE diagnostiziert, eine Dysplasie wurde in ihrer Ernsthaftigkeit unterschätzt. Bei dieser Läsion gestal-

tete es sich aufgrund deutlicher Bewegungsartefakte allerdings als sehr schwierig, verwertbare Bilder zu bekommen.

Die Untersuchung der folgenden 27 laryngealen Läsionen erfolgte in Allgemein-anästhesie. Die unverblindete Bewertung geschah direkt am Patienten, die verblindete Bewertung erst deutlich später nach Abschluss der klinischen Untersuchungen. Auf Abbildung 37 ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse in der unverblindeten Beurteilung dargestellt.

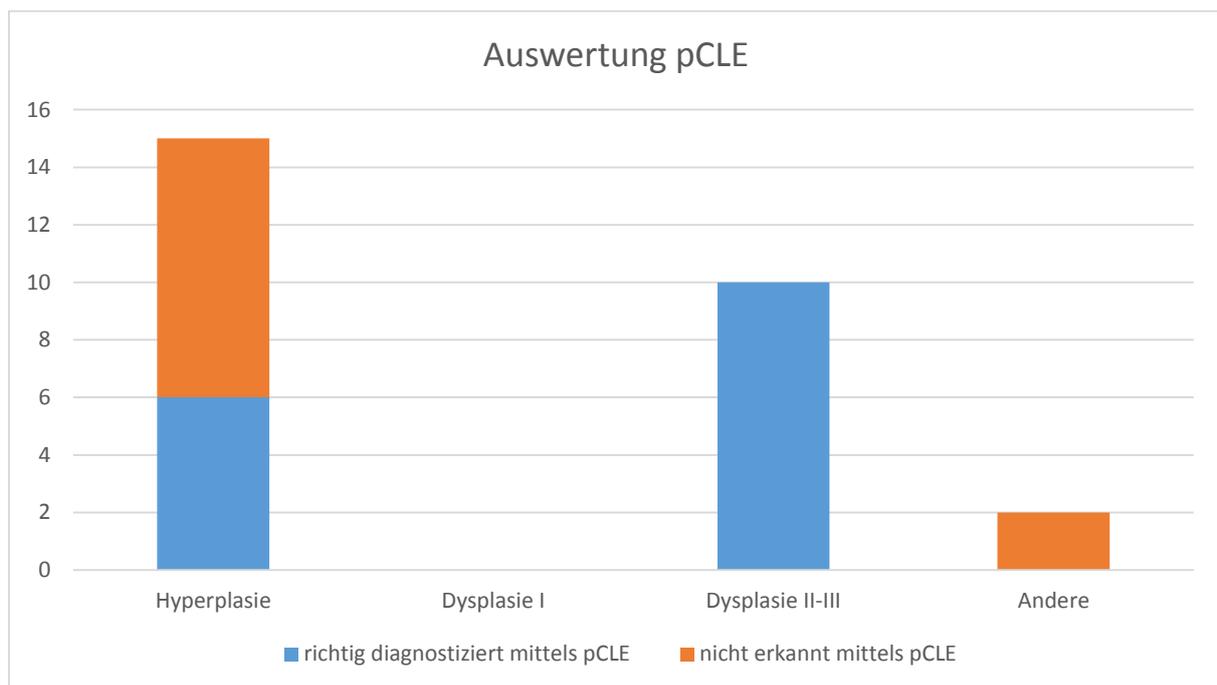


Abbildung 35: Gesamtdarstellung der unverblindeten Auswertung mittels pCLE

Die einzelnen Ergebnisse sind in den Tabellen 7 und 8 erneut dargestellt, hier finden sich außerdem prozentuale Angaben.

In der unverblindeten Bewertung wurden von den zehn mittel- bis höhergradigen Dysplasien alle mittels pCLE richtig erkannt und im Befund als solche eingestuft (100 %). Bei den Hyperplasien ist die Quote geringer. Hier wurden sechs der 15 Hyperplasien (40 %) als solche identifiziert. Von den restlichen neun Läsionen konnten zwei Läsionen aufgrund schlechter Bildqualität nicht klassifiziert werden. Die verbleibenden sieben Läsionen wurden als höhergradige Dysplasien eingestuft und somit in ihrer Ernsthaftigkeit überschätzt. Letztlich konnte keine geringgradige Dysplasie in die Studie eingeschlossen werden. Es wurde ebenfalls keine Läsion als solche klassifiziert.

Histologischer Befund	Anzahl der Läsionen mit dieser Histologie	Richtige Diagnose mittels pCLE	Richtige Diagnose in %
Hyperplasie	15	6	40 %
Dysplasie I	0	0	100 %
Dysplasie II-III	10	10	100 %
Andere	2	0	0 %
<b>Gesamt</b>	<b>27</b>	<b>16</b>	<b>59,3 %</b>

Tabelle 7: Ergebnisse der unverblindeten Auswertung der mittels pCLE erhobenen Befunde direkt am Patienten

Diagnose mittels pCLE	Anzahl der fehlerhaften Diagnosen	Histologischer Befund
Hyperplasie	1	1 x Andere
Dysplasie II-III	8	7 x Hyperplasie 1 x Andere
Sonstiges: Läsionen nicht klassifizierbar	2	2 x Hyperplasie

Tabelle 8: Ergebnisse der unverblindeten Auswertung der fehlerhaft mittels pCLE erhobenen Befunde direkt am Patienten

Somit ergibt sich für die Differenzierung von mittel- bis hochgradigen Dysplasien im Vergleich zu Hyperplasien eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 40 %. Der positiv prädiktive Wert (PPW) beträgt 52,6 % und der negativ prädiktive Wert (NPW) 100 %.

Diese Werte wurden dabei folgendermaßen berechnet:

$$\text{Sensitivität} = \frac{RP}{RP+FN} = \frac{10}{10+0} = 100 \%$$

$$\text{Spezifität} = \frac{RN}{RN+FP} = \frac{6}{6+9} = 40 \%$$

$$\text{PPW} = \frac{RP}{RP+FP} = \frac{10}{10+9} = 52,6 \%$$

$$\text{NPW} = \frac{RN}{RN+FN} = \frac{6}{6+0} = 100 \%$$

Alle 27 laryngealen Läsionen wurden retrospektiv verblindet ausgewertet. In den Tabellen 9 und 10 sind die Ergebnisse dargestellt.

Evaluation	Histologischer Befund	Anzahl der Läsionen mit dieser Histologie	Richtige Diagnose mit pCLE	Richtige Diagnose in %
<b>Bewerter A</b>	Hyperplasie	15	10	66,7 %
	Dysplasie I	0	0	100 %
	Dysplasie II-III	10	7	70 %
	Andere	2	0	0 %
<b>Bewerter B</b>	Hyperplasie	15	7	46,7 %
	Dysplasie I	0	0	100 %
	Dysplasie II-III	10	8	80 %
	Andere	2	0	0 %

Tabelle 9: Retrospektive verblindete Bewertung der erhobenen Befunde mittels pCLE

Bewerter A identifizierte dabei 10 von 15 Hyperplasien korrekt (66,7 %), Bewerter B sieben von 15 Hyperplasien (46,7 %). Geringgradige Dysplasien waren bei den untersuchten Läsionen nicht vertreten, es wurde auch bei beiden keine Läsion als eine solche klassifiziert. Von den zehn mittel- bis höhergradigen Dysplasien wurden von Bewerter A sieben Läsionen richtig identifiziert (70 %), von Bewerter B acht Läsionen (80 %).

Evaluation	Diagnose mittels pCLE	Anzahl der fehlerhaften Diagnosen	Histologischer Befund
<b>Bewerter A</b>	Hyperplasie	4	1 x Andere 3 x Dysplasie II-III
	Dysplasie I	0	-
	Dysplasie II-III	6	5 x Hyperplasie 1 x Andere
<b>Bewerter B</b>	Hyperplasie	3	1 x Andere 2 x Dysplasie II-III
	Dysplasie I	0	
	Dysplasie II-III	9	8 x Hyperplasie 1 x Andere

Tabelle 10: Retrospektive verblindete Bewertung der fehlerhaft erhobenen Befunde mittels pCLE

Somit ergeben sich für die Bewerter A und B für die Differenzierung von mittel- bis hochgradigen Dysplasien im Vergleich zu Hyperplasien jeweils eine Sensitivität von 70 % und 80 %, eine Spezifität von 66,7 % und 46,7 %, ein positiv prädiktiver Wert von 58,3 % und 50 % und ein negativ prädiktiver Wert von 76,9 % und 77,8 %. Alle diese Berechnungen führte man nach oben genannten Formeln durch.

## 4. Diskussion

Eine nichtinvasive Tumordiagnostik wäre für die betroffenen Patienten erstrebenswert. Sie würde effektives, zeit- und kostensparendes Arbeiten ermöglichen und ggf. Zweitoperationen und Narkosen vermeiden. In der Literatur sind in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde bisher mehrere optisch diagnostische Verfahren beschrieben. Die OCT und die pCLE scheinen zwei Verfahren zu sein, die eine nichtinvasive, hochauflösende Darstellung von Gewebe und somit nichtinvasive Diagnostik im HNO-Trakt möglich machen könnten. Während die OCT die oberflächliche Gewebearchitektur aufzeigt und damit eine Unterscheidung zwischen Normalgewebe, prämaligen Läsionen und invasiven Läsionen ermöglicht, erlaubt die pCLE durch zelluläre Auflösung verschiedene prämalige Läsionen (wie die Hyperplasie und Dysplasie) weiter zu differenzieren. Dies hätte im klinischen Alltag eine direkte therapeutische Konsequenz und ggf. eine sofortige Behandlung zur Folge.

Die Studie wurde so angelegt diese Hypothese entweder bestätigen oder verwerfen zu können. In den folgenden Abschnitten werden die Methoden und Ergebnisse kritisch diskutiert und mit anderen wissenschaftlichen Ergebnissen verglichen.

### 4.1. Material und Methoden

Die OCT und pCLE-Untersuchungen waren in den meisten Fällen technisch einfach durchzuführen und wurden von den Patienten gut toleriert. Es gab jedoch einige Punkte, die genauer betrachtet werden sollten:

#### Technische Probleme:

Der obere Aerodigestivtrakt ist für den Einsatz optischer Verfahren wie OCT und pCLE eigentlich gut geeignet. Es besteht, z. B. im Gegensatz zur Haut mit ihrer stark lichtstreuenden Keratinschicht, eine relativ regelhafte Schleimhautauskleidung mit günstigen optischen Eigenschaften. Außerdem ist der obere Aerodigestivtrakt im Vergleich zu anderen Organsystemen (z. B. Gastrointestinaltrakt) leicht zugänglich. [63] Dennoch zeigten sich in der Studie einige Probleme.

Zur Darstellung von Gewebe muss die Sonde beider Geräte direkt und idealerweise im 90°-Winkel auf die zu untersuchende Region aufgesetzt werden. Dies gestaltete sich bei wachen Patienten und an schwer ruhig zu haltenden bzw. schlecht erreichbaren Körperstellen aufwendig und führte zu Artefakten. Zusätzlich wogen Bewegungsartefakte bei der pCLE aufgrund der höheren Auflösung deutlich schwerer. So mussten mit unserem System z. B. Untersuchungen der Stimmlippen in Narkose durchgeführt werden. In dieser Studie konnte das Problem umgangen werden, da von den eingeschlossenen Läsionen gemäß den aktuellen Leitlinien in der gleichen Sitzung Gewebeproben für die feingewebliche Untersuchung entnommen und die Patienten daher ohnehin in Allgemeinanästhesie untersucht wurden. Für den niedergelassenen Bereich stellt dies allerdings ein Problem dar. Aufgrund der Bewegungsartefakte scheint die Untersuchung am wachen Patienten prinzipiell nur mit qualitativen Einschränkungen möglich zu sein.

Auch ist das Erreichen bestimmter Stellen (z. B. vordere Kommissur) mit der flexiblen Sonde nicht ohne weiteres möglich. Für die OCT gibt es bereits unterschiedliche Lösungsansätze. Es können beispielsweise OCT-Systeme in starre und flexible Laryngoskope und chirurgische Mikroskope eingebaut werden. [64-66] Vor kurzem wurde erstmalig die OCT-Untersuchung von Stimmlippen an wachen Patienten beschrieben. Hierzu integrierte man die OCT-Kamera in ein starres Endoskop. [67] Für das in der Studie verwendete pCLE-Gerät gibt es bislang keine vorgesehene Vorrichtung, die die jeweilige Sonde führt und somit die Anwendung vereinfacht. Diese kann jedoch durch ein konventionelles Endoskop mit Arbeitskanal eingeführt werden und so direkt auf die Schleimhaut aufgesetzt werden. Wir verwendeten ein Endoskop mit Albarran, um die Sondenspitze neigen zu können und somit (meistens) einen 90°-Winkel zum Gewebe zu ermöglichen. Hier wäre jedoch eine Optimierung der Technik wünschenswert.

Eine Zeit lang gab es ein zweites auf dem Markt befindliche CLE-System, Pentax eCLE-System (ISC 100 Endomicroscope, Pentax Life Care, Tokyo, Japan, und Optiscan Pty Ltd., Notting Hill, Victoria, Australia), mit dem auch einige Studien durchgeführt wurden. Es arbeitete mit einem endomikroskopischen System (12,8 mm Durchmesser), das in ein flexibles Endoskop integriert war. Dies bereitet jedoch laut einer Gruppe aus Wiesbaden (Deutschland), die es für eine Studie im oberen Luft-/Speiseweg verwendet haben, allein schon wegen des beträchtlichen Durchmessers Schwierigkeiten bei der exakten Positionierung der Sonde auf der entsprechenden

anatomischen Struktur. Das starre System wird jedoch in der Anwendung als etwas angenehmer beschrieben als das flexible System. [68, 69]

#### Limitation der Sonden:

Je nach Sonde konnten mit dem von uns verwendeten pCLE-Gerät nur definierte Eindringtiefen untersucht werden. Eine bedeutende Anzahl der Läsionen wies jedoch begleitend Hyperkeratosen auf. Hier ergaben sich Schwierigkeiten bei der Generierung der Bilder, da die Eindringtiefe nun nicht mehr ausreichend war. In dieser Studie wurde in solchen Fällen gelegentlich eine andere Sonde mit höherer Eindringtiefe verwendet (s. Tabelle 4 „In der Studie verwendete Sonden“). Daraus entstehen jedoch auch doppelte Kosten von ca. 400 € pro Sonde pro Untersuchung. Zur Behebung des Problems müssten gegebenenfalls zunächst Hyperkeratosen abgetragen werden, bevor die Untersuchung durchgeführt werden kann. Eine dadurch entstandene Blutung könnte das erhaltene Bild jedoch wieder verfälschen. Besser in der Anwendung wäre hier ein System, bei dem die Eindringtiefe der Sonde direkt am Gerät verändert werden könnte, wie es das Pentax-System erlaubt.

#### Einschränkungen der Bildqualität:

Wie bereits erwähnt, gingen Hyperkeratosen in der Mehrzahl der Fälle mit Einschränkungen der Bildqualität einher (nicht ausreichende Eindringtiefe der Sonden, Reflexion von Licht an der Oberfläche). Es gab außer Hyperkeratosen gelegentlich noch weitere Probleme mit der Bildqualität. Bei Kontamination der Optik mit Speichel entstanden fehlerhafte Bilder und es traten Fokussierungsprobleme auf. Nach ausgiebiger Spülung und Reinigung der Optik verbesserte sich die Bildqualität schlagartig.

In seltenen Fällen ließen sich dennoch keine verwertbaren Bilder erzeugen. Hier ergaben sich Fokusprobleme ohne erkennbare und behebbare Ursache.

Zusammenfassend konnten jedoch lediglich bei zwei der dreißig Läsionen keine für die Auswertung brauchbaren Bilder gemacht werden.

#### Horizontale Schnittbilder – erschwerte Interpretation:

Die Interpretation der entstandenen pCLE-Bilder war auch bei guter Bildqualität schwierig. Das in unserer Studie verwendete pCLE-Gerät erzeugt horizontale Schnittbilder einer definierten Eindringtiefe parallel zur Geweboberfläche. Die

Untersuchung findet dabei in dem durch die Sonde festgelegten Abstand von der Oberfläche statt. Abhängig von der Ausprägung einer eventuell vorhandenen Hyperkeratose liegt diese jedoch eventuell unterschiedlich tief in der Epithelschicht.

Die Epithelveränderungen gehen von der Lamina propria aus. Laut den histologischen Kriterien liegt eine geringgradige Epitheldysplasie vor, wenn neben den pathologischen Veränderungen der Zellkerne und der Architektur die zytologischen Veränderungen der Keratinozyten auf das basale Drittel des Plattenepithels begrenzt sind. Entsprechend dazu reichen bei einer mittelgradigen Epitheldysplasie die zytologischen und architekturellen Veränderungen bis in das mittlere Drittel des Epithels und bei schweren Epitheldysplasien darüber hinaus. [70]

In den pCLE-Untersuchungen können daher Malignitätskriterien für Zellveränderungen gefunden werden, jedoch ist eine Graduierung der Dysplasien nach histologischen Standards durch die horizontalen Schnittbilder der pCLE kaum möglich, da sie mit den vertikalen histologischen Schnitten nicht korrelieren.

Es ist auch nicht immer möglich, geringgradige Dysplasien bei deutlicher Hyperkeratose zu erfassen, da die Eindringtiefe der Sonde zu gering sein kann, um basale Veränderungen aufzuzeigen. Des Weiteren wird die Interpretation auch für einen erfahrenen Pathologen durch die Tatsache deutlich erschwert, dass Fluorescein nicht nach intrazellulär diffundieren und damit keine Zellkerne darstellen kann.

In einer Studie wurde bereits ein konfokales Endoskop mit eingebautem Rechner-system evaluiert, das 3D-Bilder zu erzeugen vermag. [71] Dies wäre ein technischer Fortschritt, der vielversprechende Ergebnisse liefern könnte und die Interpretation der erhaltenen Bilder sicher erleichtern würde.

### Stichprobenfehler:

Leukoplakien stellen sich oft als flächige Veränderungen dar, bei denen lediglich von suspekt erscheinenden Stellen Biopsien entnommen werden. So besteht auch im klinischen Alltag ein Risiko, (prä-)maligne Stellen zu übersehen, da diese direkt neben histologisch benignen Schleimhautveränderungen in derselben Läsion auftreten können.

In dieser Studie wurde die gesamte Läsion mittels OCT und pCLE nach einem standardisierten Protokoll untersucht. Die auffälligen Stellen wurden genau dokumentiert und alle Aufzeichnungen gespeichert. Direkt im Anschluss wurden von

diesen Stellen Biopsien entnommen und die OCT- und pCLE-Bilder mit der Referenzhistologie verglichen.

Von den 30 untersuchten Läsionen wurden insgesamt 19 komplett exzidiert (darunter 15 der 27 eingeschlossenen laryngealen Läsionen) und histologisch untersucht. So minimiert sich auch hier das Risiko für Stichprobenfehler.

Eine nichtinvasive Diagnostik könnte so einen großen Vorteil bieten, da die gesamte Läsion untersucht werden kann und somit nicht nur makroskopisch auffällige Stellen. Sie könnte hier hilfreich sein, die aussagekräftigste Stelle für eine Biopsie zu identifizieren.

#### Kontrastmittel:

Ein wichtiges Malignitätskriterium zur Beurteilung von Zellen im histologischen Schnitt ist die Kern-Plasma-Relation. Leider gibt es bisher kein zugelassenes Kontrastmittel, das intrazelluläre Strukturen und somit Zellkerne in der CLE darstellbar macht. Für eine exakte Gewebebeurteilung ist dies jedoch entscheidend.

Man unterscheidet zwischen systemisch und topisch applizierbaren Stoffen.

Von den systemisch applizierbaren Kontrastmitteln besitzt aktuell nur **Fluorescein** eine klinische Zulassung für die Verwendung mit der pCLE. Da dieses lediglich in die Interzellularräume diffundiert, können die Zellen nach ihrer Morphologie, nicht jedoch nach intrazellulären Strukturen beurteilt werden. Fluorescein hat man bereits in mehreren klinischen Studien getestet. Dabei wurde es in den meisten Fällen gut vertragen. Es kam nur selten zu milden Nebenwirkungen. [72] In mehreren Studien erprobte man die optimale Dosierung des Fluorescein, die Ergebnisse variieren jedoch stark. Einige Studien empfehlen eine Dosis von 5,0 ml Fluorescein für optimale pCLE-Bilder. [73, 74] In einer aktuellen Studie zeigte sich, dass auch eine Reduktion der Dosis möglich ist. Bei einer Dosierung von 0,02 ml/kg Körpergewicht ergaben sich gute pCLE-Bilder für Metaplasien des Magens. [75] Eine weitere Studie wies nach, dass auch eine topische Applikation von Fluorescein auf Gewebe eine Färbung der Mukosa erbringt und somit Bilder mittels pCLE generiert werden können. [76]

Auch die Substanzen **Hypericin** [77] und **5-Aminolävulinsäure** (5-ALA) wurden bereits in Verbindung mit pCLE getestet. Beide Substanzen können sowohl topisch

als auch systemisch verabreicht werden. Für beide Substanzen ist in Studien im Bereich der Kopf- und Halstumoren in Verbindung mit der pCLE bisher nur die topische Anwendung beschrieben, in anderen Bereichen wurden sie aber bereits in vivo auf verschiedene Applikationsarten verwendet. [77, 78]

Bei Hypericin handelt es sich um einen Arzneistoff, der hauptsächlich als Antidepressivum wirkt. Da er sich aber vorzugsweise in neoplastischem Gewebe ansammelt, wird er in der Fluoreszenzdiagnostik eingesetzt.

5-ALA wird hauptsächlich in der photodynamischen Therapie, aber auch in der Fluoreszenzdiagnostik genutzt. 5-ALA reichert sich in neoplastischen Zellen an und wird in diesen zu dem rot fluoreszierenden Molekül Protoporphyrin IX (PPIX) umgewandelt. In einer Studie von Leunig et al. konnte bereits gezeigt werden, dass 5-ALA induzierte Fluoreszenz von Protoporphyrin IX bereits außerhalb der pCLE-Diagnostik zur Detektion (prä-)maligner Läsionen und zur Festlegung von Tumorsektionsrändern äußerst nützlich sein kann. [79, 80] Beide Substanzen führen zum Zelltod, wenn sie als Photosensitizer benutzt werden. Nachteil in der Diagnostik mittels pCLE ist für Hypericin und 5-ALA eine relativ lange Inkubationszeit von mindestens 30 Minuten in der Mundhöhle bei topischer Anwendung. [81, 82]

Von den topisch applizierbaren Stoffen wäre zur Beurteilung der Kern-Plasma-Relation beispielsweise **Acriflavin** oder **Proflavin** (Hauptkomponente des Acriflavin) geeignet. Acriflavin hat eine sehr kurze Einwirkzeit, eine Untersuchung des Gewebes ist nach wenigen Sekunden möglich. Da dies aber auf Grund möglicher mutagener Effekte für den klinischen Gebrauch nicht zugelassen ist, wurde die Substanz in dieser in vivo Studie nicht angewandt. [83] Dennoch hat man es bereits in Studien getestet. Eine davon beschreibt eine für die pCLE am besten geeignete Konzentration von 0,02 %. [84]

Auch **Patentblau V**, eine als Lebensmittelfarbstoff und zur Markierung von Sentinel-Lymphknoten verwendete Substanz, **Toludinblau** und **Methylenblau** hat man bereits 2015 in einer ex vivo Studie topisch an Gewebeproben nach Kopf-/Halsoperationen in Verbindung mit der pCLE getestet. [85, 86] Die gleiche Gruppe veröffentlichte 2016 eine Studie, in der Patentblau V und **Indocyaningrün**, ein in der Medizin zugelassener Fluoreszenzfarbstoff bei Peritonealkarzinose, in einer ex vivo Studie topisch in Verbindung mit pCLE getestet wurden. Hier zeigte sich zumindest für die Peritonealkarzinose eine sehr gute Färbung mittels Indocyaningrün, für den Mund-/Rachenbereich gibt es dazu bislang leider keine Daten. [87] Indocyaningrün

ist für die intravenöse Verabreichung zugelassen und wird in zahlreichen Studien im Zusammenhang mit Kopf-/Halstumoren bereits getestet. [88, 89]

Trotz einiger bereits erprobter Fluoreszenzfarbstoffe gibt es noch keine optimale Substanz, die klinisch zugelassen ist und Zellkerne darstellen kann bzw. tumorspezifische Eigenschaften besitzt. Hier wären z. B. auch spezifische, fluoreszenzgekoppelte Antikörper wie EpCAM oder EGFR ein sehr interessanter Ansatz. [90]

Eine Entwicklung von weiteren, für diese Untersuchung besser geeigneten Kontrastmitteln, wäre wünschenswert.

### Fehlendes Klassifikationssystem:

Es existiert bislang kein allgemein akzeptiertes Klassifikationssystem zur Beurteilung der pCLE-Bilder des oberen Aerodigestivtraktes. Da die Methode aktuell nur für andere Organe zugelassen ist, existieren zwar spezielle Klassifikationssysteme für andere Organsysteme, jedoch können diese auf Grund der unterschiedlichen Mikroanatomie nicht einfach übertragen werden.

Es wurde daher vor Studienbeginn in Zusammenarbeit mit unserem eingebundenen Pathologen ein eigenes System zur Bewertung erstellt. Dieses basierte auf bereits gesammelter klinischer Erfahrung und Fachwissen.

In dieser Studie erstellte man deshalb eine Klassifikation basierend auf dem Kriterium „Größe der Zellen“. Es zeigte sich jedoch schon relativ bald, dass außer der Größe noch weitere Faktoren wie Regelmäßigkeit der Zellen, Variation der Interzellularräume, Architektur und Durchblutung eine entscheidende Rolle spielen. Ähnliche Kriterien wurden auch in anderen Studien gefunden. Hier werden je nach verwendetem Kontrastmittel hauptsächlich ein irreguläres Zellbild, Variation der Zellgröße, Kontrastmittelaustritt aus Zellen, der ein verschwommenes Bild hervorruft, und ein vermehrtes Vorhandensein von Kapillaren in tieferen Schichten im Sinne einer gesteigerten Vaskularisation beschrieben. [68, 69] Nathan et al. assoziierte Malignität mit dunklem Epithel mit dunkelgrauem Hintergrund bei zunehmend fehlender Identifikation von mukösen Strukturen, begleitet von zunehmender Vaskularisation. [91] Die hier präsentierte Studie wurde dennoch nach den zuvor festgelegten Kriterien weitergeführt. Retrospektiv würden wir anderen Kriterien größere Bedeutung schenken und haben diesbezüglich ein anderes Klassifikationssystem entwickelt. Dieses wird im folgenden Text (4.2.1) sowie Tabelle 11 ausführlicher dargestellt und behandelt.

2016 entwickelte eine Gruppe aus Nürnberg-Erlangen/Deutschland mit dem DOC-Score (diagnosing oral cancer with the help of cle) ein Klassifikationssystem, das in einer vorläufigen Testung sowohl in der Beurteilung durch Experten als auch Nicht-Experten gute Ergebnisse erbrachte. Dieses beinhaltet die Kriterien Homogenität, interzelluläre Abstände, Zellmorphologie, Austritt des Fluoreszenzmittels und Blutgefäße. Zu jedem der fünf Punkte gibt es unterschiedliche Kriterien, die eine festgelegte Anzahl an Punkten liefern. Ab einem bestimmten Wert wird dann von einem Karzinom ausgegangen. In diesem Score sind Kriterien für hyperplastische oder dysplastische Veränderungen jedoch nicht integriert. [92]

Eine interessante Methode wäre auch ein automatisches Programm zur Bildinterpretation. In einer ex vivo Studie wurde eine Software entwickelt, die malignes Gewebe von nicht-neoplastischem Gewebe im oberen Aerodigestivtrakt mit einer relativ hohen Sensitivität und Spezifität unterscheiden konnte. [93]

In weiteren Studien testete man automatische Programme bereits bei Barrett Ösophagus [94] und bei kolorektalen Polypen [95]. Auch hier lieferten die Programme sehr gute Ergebnisse. Pathologen konnten teilweise geringfügig bessere Ergebnisse erzielen. Diese gelten jedoch als Experten in diesem Gebiet. Für Chirurgen und HNO-Ärzte würde die Interpretation dadurch in Zukunft möglicherweise einfacher und objektiver werden.

### Finanzierung:

Ein weiteres Problem ist aktuell die Finanzierung der Untersuchung. So wurde das in dieser Studie verwendete pCLE-System und die zugehörigen Sonden klinikübergreifend über einen Großgeräteantrag (DFG-Geschäftszeichen INST 409/88-1 FUGG) erworben. Neben dem pCLE-Gerät verursachen die speziellen Sonden, die nur für eine exakt definierte Anzahl an Untersuchungen verwendet werden dürfen, erhebliche Kosten von etwa 400 € pro Untersuchung, die im Moment zumindest für Untersuchungen im OADT nicht erstattungsfähig sind. Für spezielle Untersuchungen in anderen Fachbereichen gibt es hierfür schon eine Zulassung, in der HNO muss die Evidenz erst noch evaluiert werden. Aktuell ist die Technik also noch sehr teuer. Es ist aber gut denkbar, dass die Geräte in den nächsten Jahren günstiger werden und somit in den Kliniken mehr verfügbar sein könnten.

## 4.2. Ergebnisse

### 4.2.1. Ergebnisse der prospektiven Studie

Bislang existiert kein nichtinvasives Verfahren zur Darstellung von Gewebe in vivo in einer vergleichbar hohen Auflösung.

Mittels pCLE ist es möglich, oberflächliches Gewebe in zellulärer Auflösung und dabei schmerzfrei und nebenwirkungsarm darzustellen. Es konnten verschiedene Stellen des Oropharynx und des Larynx eingesehen und erstmals Bilder dieser Strukturen generiert und miteinander verglichen werden. Weiter ist es gelungen, harmlose epitheliale Hyperplasien von möglicherweise bedrohlichen höhergradigen Dysplasien mit einer hohen Sensitivität (100 %) und einem hohen negativen prädiktiven Wert (100 %) zu unterscheiden.

Bedauerlicherweise wurden gutartige Hyperplasien oft überbewertet und in sieben von 15 Fällen als Dysplasien klassifiziert. In zwei weiteren Fällen waren die Ergebnisse aufgrund schlechter Bildqualität nicht verwertbar. Dies bringt eine geringe Spezifität (40 %) und einen positiven prädiktiven Wert von 52,6 % mit sich.

Da bisher keine Erfahrungen in der pCLE des oberen Aerodigestivtraktes vorhanden waren und somit keine Kriterien oder Vergleichsbilder zur histologischen Befunderstellung existieren, ist dies zum einen durch fehlende Erfahrung und eine erst beginnende Lernkurve und zum anderen durch nicht optimal gewählte Kriterien verschuldet.

Aussehen in der pCLE	Dargestellte Zellen	Verdachtsdiagnose
- kleine, geordnete Zellen	Normale	Normalgewebe
- keine/wenige Gefäße	Epithelzellen	Epitheliale Hyperplasie
- enge Interzellularräume		
- (unterschiedlich) große Zellen	Dysplastische	Epitheliale Dysplasie
- variierende Formen	Epithelzellen	Invasives Karzinom
- viele Gefäße		
- erweiterte Interzellularräume		

Tabelle 11: Überarbeitetes Klassifikationssystem zur Beurteilung von Läsionen des oberen Luft-/Speisewegs mittels pCLE

Trotz Zugewinn an Erfahrungen während der Studie und der Erkenntnis über veränderungswürdige Kriterien wurde die Studie strikt nach dem bestehenden Protokoll weitergeführt. Retrospektiv würden wir ein anderes Klassifikationssystem zur Beurteilung von Läsionen im oberen Luft-/Speiseweg mittels pCLE vorschlagen. Dieses wird in Tabelle 11 dargestellt.

Alle histologischen Schnitte wurden mit unserem kooperierenden Pathologen und Experten für Oralpathologie nachbesprochen und mit dem Standardbefund aus dem pathologischen Labor der Klinik verglichen. Hier wurden teilweise leichte Diskrepanzen in der Beurteilungen deutlich, obgleich diese jeweils durch Experten in der feingeweblichen Untersuchung am fixierten und unbewegten Schnitt durchgeführt wurden. Da die pCLE-Technik im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes hauptsächlich von klinisch tätigen Fachärzten für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde und nicht von in der Beurteilung von Zellverbänden ausgebildeten Fachärzten für Pathologie angewendet werden soll, ergibt sich hier eine zusätzliche Hürde und es muss eine gute Schulung vorausgesetzt werden.

Da sowohl die Studie als auch die retrospektive Auswertung streng nach den zu Beginn festgelegten Kriterien durchgeführt wurde als auch die Bewerter anfangs nur geringe Erfahrung mit pCLE in dieser Fragestellung hatten, zeigt die Methode in jedem Fall hohes Potential.

Die pCLE erwies sich daher als geeignetes Verfahren zur nichtinvasiven Diagnostik, da sie als einziges Verfahren Erkenntnisse über die Fragestellung dieser Studienhypothese bringen kann und dabei eine sehr hohe Sensitivität aufweist, die in der klinischen Anwendung einer hohen Spezifität vorzuziehen ist, da durch eine hohe Sensitivität keine potentiell malignen Läsionen übersehen werden.

#### **4.2.2. Ergebnisse der retrospektiven Auswertung**

Die Auswertung erfolgte nach demselben Studienprotokoll wie die Auswertung der klinischen Studie. Wie bereits beschrieben wurden jedoch keine makroskopischen Bilder gezeigt. Die Auswertung erfolgte an ausgewählten, vermeintlich repräsentativen OCT-Einzelbildern und pCLE-Einzelbildern und Videosequenzen in zufälliger Reihenfolge.

Vergleicht man die Ergebnisse miteinander, so zeigt sich eine höhere Spezifität von 66,7 % bzw. 46,7 % im Vergleich zur prospektiven Studie (40 %). Dies ist vermutlich durch die bereits gesammelten Erfahrungen bedingt.

Im Gegenzug ist die Sensitivität auf 70 % bzw. 80 % gesunken. Dies könnte durch den fehlenden klinischen Eindruck erklärt werden. Zusätzlich gestaltet sich die Bewertung eines einzelnen statischen Bildes oder Videoausschnittes schwieriger als eine dynamische „Live“-Untersuchung, die neben Untersuchung der Läsion auch eine Visualisierung der Randbereiche und des Normalgewebes zum Vergleich ermöglicht.

#### **4.3. Vergleich zu anderen pCLE-Studien in der HNO**

Zu Beginn dieser Studie fanden sich noch kaum Publikationen zu der bearbeiteten Thematik in der Literatur. Eine aktuelle Literaturrecherche zeigt eine leicht ansteigende Tendenz.

2004 veröffentlichte eine singhalesische Forschergruppe eine Studie, bei der sie erstmals pCLE im Bereich der Mundhöhle an einer sehr kleinen Gruppe von Patienten angewandt haben. Hier wurde die CLE an normalem und neoplastisch verändertem Zungengewebe mit ALA-induzierter Fluoreszenz von Protoporphyrin IX getestet und lieferte erste erfolgversprechende Ergebnisse zur Differenzierung der Gewebearten. [96]

Die gleiche Gruppe veröffentlichte 2007 eine weitere Studie über die Anwendung von pCLE in der Mundhöhle. Hier wurden als Kontrastmittel Fluorescein und 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) sowohl in vivo als auch an Gewebeproben eingesetzt. Außerdem verglich man Fluoreszenzbilder der gesunden humanen Zunge mittels ALA-induziertem Protoporphyrin IX (PpIX) mit Plattenepithelkarzinomen und setzte am Rattenmodell Bilder von normalen Zungen Bildern von induzierten Karzinomen gegenüber. [97]

Eine französische Gruppe (M. Abbaci et al.) publizierte erstmals 2009 ihre ex vivo Studie. Dabei wurden von 27 Pharyngo-/Laryngektomie-Präparaten jeweils gesundes Gewebe, prämalignes Gewebe und Tumorgewebe analysiert und nach Färbung mit Fluorescein und Acriflavin mittels pCLE untersucht. Es zeigten sich vielversprechende Ergebnisse. Die pCLE wurde als geeignete Methode zur Diskriminierung

maligner und nicht-maligner Veränderungen beschrieben. [98] Dennoch muss man bedenken, dass eine Doppelfärbung, v. a. mit Acriflavin, nicht ohne weiteres in ein klinisches Setting umzusetzen ist.

Eine Gruppe aus Mainz/Wiesbaden/Deutschland publizierte 2010 ihre ersten Ergebnisse einer ex vivo Studie, in der man verschiedene Regionen der oropharyngealen Mucosa untersuchte und unterschiedliche Kontrastmittel verwendete. Hierbei zeigte sich, dass mittels Fluorescein Details von oberflächlichem und auch tiefer liegendem Gewebe dargestellt werden können. Acriflavin kontrastierte die Zellkerne von oberflächlichem Gewebe. [69]

2012 veröffentlichte die gleiche Gruppe eine Studie, bei der sie 15 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des oberen Aerodigestivtraktes intraoperativ mittels pCLE untersuchten. In dieser Studie wurden sowohl intravenös Fluorescein (in vivo) als auch topisch Acriflavin (ex vivo) verwendet. Die in vivo Bilder ließen im neoplastischen Gewebe vermehrt verbreitete Kapillaren, Angiogenese und inhomogene Zellverbände erkennen. Nach Färbung mit Acriflavin waren ebenfalls inhomogene Zellverbände sichtbar, begleitend außerdem in der Größe differierende Zellkerne und Kontrastmittelaustritt in den Zellzwischenraum. Als Nachteil der Färbung mit Acriflavin wird hier eine verminderte Eindringtiefe von 50 µm beschrieben. Durch Färbung mit Fluorescein war teilweise sogar eine Bestimmung der Eindringtiefe durch serielle Bilder in unterschiedlichen Tiefen möglich. [68]

Eine Gruppe der Louisiana State University publizierte 2014 eine weitere Studie. Hierbei wurden 21 Patienten (Leukoplakie, n=12 (davon fünf nicht dysplastische und sieben dysplastische Läsionen); Karzinom, n=9) mit pCLE untersucht. Man verwendete ebenfalls das Cellvizio System und als Kontrastmittel Fluorescein. Die Studie zeigte sehr gute Ergebnisse. Es konnten dysplastische Läsionen gegenüber nicht-dysplastischen Läsionen mit einer Sensitivität von 80,0 % und einer Spezifität von 100,0 % bestimmt werden. Der NPW betrug dabei 80,0 %, der PPW 100,0 %. Die überwiegende Anzahl der Leukoplakien befand sich dabei an der Zunge. Karzinome konnten mit einer Sensitivität von 85,7 % und einer Spezifität von 100,0 % von dysplastischen Veränderungen unterschieden werden. [91] Somit zeigt sich für diese Studie im Vergleich zu unserer Studie eine niedrigere Sensitivität für die Differenzierung von nicht-dysplastischen gegenüber dysplastischen Läsionen (80,0 % vs. 100,0 %), jedoch eine deutlich höhere Spezifität (100,0 % vs. 40,0 %). Der PPW ist ebenfalls höher (100,0 % vs. 42,6 %), der NPW dementsprechend niedriger (80,0 %

vs. 100,0 %). Diese Studie wurde hauptsächlich an Leukoplakien der Zunge durchgeführt, wohingegen bei unserer eigenen Studie hauptsächlich Leukoplakien der Stimmlippen untersucht und nur diese statistisch ausgewertet wurden. Die zwei mittels pCLE untersuchten Leukoplakien am Zungenrand (einmal richtige Diagnose, einmal Bewegungsartefakte) wurden aus der endgültigen Auswertung herausgerechnet, um eine homogene Gruppe zu bekommen. Kritisch anmerken muss man, dass in dieser Studie lediglich 16 der 21 Patienten in die Statistik eingeschlossen wurden. Bei fünf Patienten wurden die Bilder wegen schlechter Bildqualität nicht ausgewertet. Dadurch ergibt sich eine geringe Stichprobenzahl.

Eine deutsche Gruppe untersuchte 135 in Formalin fixierte Gewebeproben von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes und 50 Kontrollen von gesundem Gewebe. Sie veröffentlichte 2016 ihre Ergebnisse. In dieser, bislang größten, jedoch ex vivo Studie, wurden die Gewebeproben mit und ohne topischer Färbung mittels Acriflavin mit pCLE untersucht. Man verwendete dafür ebenfalls das Cellvizio System. Nach einer Einweisung in die Morphologie des Gewebes mittels pCLE wurden die Tumorgrenzen und die Tumorlokalisierung von jeweils verschiedenen Gruppen markiert. Die Gruppe der Pathologen erreichte dabei eine korrekte Identifikation in 97 % der Fälle, die Gruppe der HNO-Ärzte in 85 % der Fälle und die Gruppe der Laien in 70 % der Fälle. Alle 185 Proben wurden erneut nach topischer Applikation von Acriflavin untersucht. Hierbei zeigte sich jedoch, dass sich entgegen anderer Studien die Bildqualität weder bei gesundem noch bei kanzerösem Gewebe signifikant verbesserte. Es erfolgte zwar eine Färbung der Zellkerne, jedoch wurde die Autofluoreszenz der Kollagenfasern und der inneren Membran der Blutgefäße unterdrückt. [99]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bis zum heutigen Zeitpunkt immer noch relative wenig Erfahrung mit pCLE im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes im Vergleich zu anderen Organsystemen gibt. Da Fluorescein aktuell das einzig für den klinischen Gebrauch zugelassene Kontrastmittel darstellt, verwenden alle in vivo Studien bislang Fluorescein. Acriflavin bleibt weiterhin den ex vivo Studien vorbehalten. Einige wenige kleine Studien zeigen vielversprechende Ergebnisse, jedoch sind sie meist, vor allem im in vivo Bereich, durch eine geringe Patientenzahl begrenzt. Es fehlt eine harte Evidenz anhand von großen, multizentrischen Studien.

## 5. Zusammenfassung und Perspektive

In dieser Studie sollte evaluiert werden, inwieweit Leukoplakien und Erythroplakien des oberen Aerodigestivtraktes in ihrer Dignität mittels optischer Kohärenztomographie und konfokaler Laserendomikroskopie beurteilt werden können. Bisher ist der Goldstandard eine Gewebeentnahme, die wegen der schwierigen Erreichbarkeit oft in Allgemeinanästhesie erfolgen muss, und anschließend eine histologische Untersuchung derselben. Ziel wäre eine nichtinvasive Diagnostik und gegebenenfalls eine operative Entfernung der Läsion in gleicher Sitzung, um zusätzliche Narkosen, invasive Maßnahmen und auch daraus resultierende Kosten einzusparen.

In Zusammenschau aller Ergebnisse kann die OCT in der Differenzierung zwischen invasiven und nichtinvasiven Läsionen helfen. Wie bereits von Volgger et al. gezeigt, besitzt die Methode eine hohe Sensitivität und Spezifität für die genannte Fragestellung. [59] Die Methode hat ihre Limitation in der Differenzierung prämaligener Läsionen. Hierfür wurde die konfokale Laserendomikroskopie, als ein Verfahren mit zellulärer Auflösung, in dieser Studie getestet und scheint als eine weiterführende Diagnostik zur Differenzierung zwischen Hyperplasien und Dysplasien nützlich zu sein. Mittels pCLE war es möglich, Live-Bilder von Gewebe in unterschiedlichen Tiefen und Vergrößerungen zu erhalten und diese unmittelbar zu interpretieren. Hierfür wurden 30 prämaligene Läsionen mittels pCLE untersucht. Die Untersuchungen erfolgten dabei je nach Lokalisation an wachen und an narkotisierten Patienten. Alle Bilder wurden aufgezeichnet und sowohl direkt am Patienten (unverblindet) als auch retrospektiv (verblindet) bewertet. Es zeigte sich schließlich eine hohe Sensitivität in der Differenzierung dysplastischer Läsionen (100 %) von benignen Läsionen am Larynx. Die hyperplastischen Veränderungen wurden relativ häufig überbewertet. Da es bisher leider keine festgelegten Diagnosekriterien für die HNO gibt, legten wir in Zusammenarbeit mit unserem Pathologen vor Studienbeginn Kriterien fest, die sich während der Studie bereits als veränderungswürdig zeigten. Die geringe Spezifität (40,0 %) im Rahmen der Studie ist mitunter darauf zurückzuführen.

Technischer Aufwand und hohe Kosten verhindern aktuell einen routinemäßigen Einsatz der OCT und pCLE im klinischen Alltag. Da sich die Technik jedoch stetig weiterentwickelt und Potential hat, in Zukunft günstiger zur Verfügung zu stehen, wäre ein klinischer Einsatz denkbar. Möglicherweise könnten beide Methoden auch

in einem Gerät kombiniert werden, um den technischen Aufwand zu reduzieren und die gesamte diagnostische Breite zur Verfügung zu stellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die pCLE eine vielversprechende Methode zur nichtinvasiven Bildgebung im oberen Luft-/Speiseweg darstellt. Größere weiterführende Studien wären sehr wünschenswert zur abschließenden Beurteilung der Methode und zur Evaluation des möglichen Einsatzes im klinischen Alltag.

## Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland 2011/12, Al. KPE, Robert Koch Institut GDEKIDEV, 2015, [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/krebs\\_in\\_deutschland\\_inhalt.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_inhalt.html).
2. Datenbankabfrage des Zentrums für Krebsregisterdaten, Institut RK, [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Datenbankabfrage/datenbankabfrage\\_stufe1\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe1_node.html).
3. Heck EJ, Berthiller J, Vaccarella S, Winn MD, Smith EM, et al., *Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium*. International Journal of Epidemiology 2009. **39(1):166-81**.
4. Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Kurth BM, et al., *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland - Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010 - Eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI*. 2010.978-3-89606-208-6.
5. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, Institute NC, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2012/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/).
6. Cardesa A, Rudolph P, Mentzel T and Slootweg PJ, *Pathologie Kopf-Hals-Region, Weichgewebstumoren, Haut*. 978-3-540-72884-9 (Print) 978-3-540-72885-6 (Online)2009.
7. Renan MJ, *How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data*. Mol Carcinog 1993. **7(3):139-46**.
8. Gale N, Kambic V, Michaels L, Cardesa A, Hellquist H, et al., *The Ljubljana classification: a practical strategy for the diagnosis of laryngeal precancerous lesions*. Adv Anat Pathol., 2000. **7(4):240-51**.
9. Axéll T, Pindborg JJ, Smith CJ and Van Der Waal I, *Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994*. International Collaborative Group on Oral White Lesions. J Oral Pathol Med, 1996. **25(2):49-54**.
10. Neville BW and Day TA, *Oral cancer and precancerous lesions*. CA Cancer J Clin, 2002. **52(4):195-215**.
11. Bouquot J and Gorlin R, *Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol., 1986. **61(4):373-81**.
12. Altmeyer P, *Die Online Enzyklopädie der Dermatologie, Venerologie, Allergologie und Umweltmedizin*.
13. Munde A and Karle R, *Proliferative verrucous leukoplakia: An update*. J Cancer Res Ther., 2016. **12(2):469-73**.
14. Capella DL, Gonçalves JM, Abrantes AA, Grandó LJ and Daniel FI, *Proliferative verrucous leukoplakia: diagnosis, management and current advances*. Braz J Otorhinolaryngol., 2016. **83(5):585-593**.
15. Schöberlein SM, *Einfluss der Epitheldicke auf die Ergebnisse der Autofluoreszenzendoskopie bei pathologischen Veränderungen der Stimmlippen*, in Zentrum für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie. 2009, Justus-Liebig-Universität Gießen.
16. Baumeister P, Reiter M, Welz C, Becker S, Betz CS, et al., *Surgically treated oropharyngeal cancer: risk factors and tumor characteristics*. J Cancer Res Clin Oncol, 2014. **140(6):1011-9**.
17. Kopf-Hals-Tumoren - Ursachen und Risikofaktoren, [http://www.krebsgesellschaft.de/pat\\_ka\\_kopf\\_hals\\_tumor\\_ursache,108200.html](http://www.krebsgesellschaft.de/pat_ka_kopf_hals_tumor_ursache,108200.html).
18. Markou K, Christoforidou A, Karasmanis I, Tsiropoulos G, Triaridis S, et al., *Laryngeal cancer: epidemiological data from Nuorthern Greece and review of the literature*. Hippokratia, 2013. **17(4): p. 313-8**.
19. Hernandez BY, Zhu X, Goodman MT, Gatewood R, Mendiola P, et al., *Betel nut chewing, oral premalignant lesions, and the oral microbiome*. PLoS One., 2017. **12(2):e0172196**.

20. Leinmüller R, *Oropharynxkarzinom: Patienten mit viraler Genese haben bessere Prognose*. Dtsch Arztebl 2012; 109(24): A-1236 / B-1062 / C-1049, 2012.
21. Michaud DS, Langevin SM, Eliot M, Nelson HH, Pawlita M, et al., *High-risk HPV types and head and neck cancer*. Int J Cancer, 2014. **135(7)**: p. 1653-61.
22. Sakata J, Yoshida R, Matsuoka Y, Nagata M, Hirotsue A, et al., *Predictive value of the combination of SMAD4 expression and lymphocyte infiltration in malignant transformation of oral leukoplakia*. Cancer Med., 2017. **6(4):730-738**.
23. Habiba U, Hida K, Kitamura T, Matsuda AY, Higashino F, et al., *ALDH1 and podoplanin expression patterns predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia*. Oncol Lett., 2017. **13(1): 321–328**.
24. Bösartige Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs allgemein, <https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Boesartige-Erkrankungen-des-Kopf-Hals-Bereiches.9371.0.html>.
25. Kopf-Hals-Tumore, [http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Klinik-und-Poliklinik-fuer-Strahlentherapie-und-Radioonkologie/de/behandlungsspektrum/Kopf\\_Halstumore/index.html](http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Klinik-und-Poliklinik-fuer-Strahlentherapie-und-Radioonkologie/de/behandlungsspektrum/Kopf_Halstumore/index.html).
26. Tsai KY, Su CC, Chiang CT, Tseng YT and Lian IB, *Environmental heavy metal as a potential risk factor for the progression of oral potentially malignant disorders in central Taiwan*. Cancer Epidemiol., 2017. **47:118-124**.
27. Garzino-Demo P, Zavattero E, Franco P, Fasolis M, Tanteri G, et al., *Parameters and outcomes in 525 patients operated on for oral squamous cell carcinoma*. J Craniomaxillofac Surg, 2016 **44(9):1414-21**.
28. Deutsche Gesellschaft Für Mund- K, Gesichtschirurgie, *Leitlinie - Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms*. 2010.
29. Reichart PA, *Orale Leukoplakie / Erythroplakie*. Wissenschaftliche Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, 2007.
30. Lodi G, Franchini R, Warnakulasuriya S, Varoni EM, Sardella A, et al., *Interventions for treating oral leukoplakia to prevent oral cancer*. Cochrane Database Syst Rev., 2016. **7:CD001829**.
31. PDQ Cancer information Summaries, <https://www.cancer.gov/publications>.
32. Mesía R, Garcia-Saenz JA, Lozano A, Pastor M, Grau JJ, et al., *Could the Addition of Cetuximab to Conventional Radiation Therapy Improve Organ Preservation in Those Patients With Locally Advanced Larynx Cancer Who Respond to Induction Chemotherapy? An Organ Preservation Spanish Head and Neck Cancer Cooperative Group Phase 2 Study*. Int J Radiat Oncol Biol Phys., 2017. **97(3):473-480**.
33. Forastiere AA, Zhang Q, Weber RS, Maor MH, Goepfert H, et al., *Long-Term Results of RTOG 91-11: A Comparison of Three Nonsurgical Treatment Strategies to Preserve the Larynx in Patients With Locally Advanced Larynx Cancer*. J Clin Oncol., 2013. **31(7): 845–852**.
34. Mundhöhlenkarzinom LO-SL, *"Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms"*. 2012.
35. Arens C, Vorwerk U, Just T, Betz CS and Kraft M, *Fortschritte der endoskopischen Diagnostik von Dysplasien und Karzinomen des Larynx*. HNO, 2012. **60(1):44-52**.
36. Arens C, Betz CS, Kraft M and Voigt-Zimmermann S, *"Narrow Band Imaging" zur Früherkennung epithelialer Dysplasien und mikroinvasiver Karzinome im oberen Luft-Speise-Weg*. HNO, 2016. **64(1):19-26**.
37. Volgger V, Felicio A, Lohscheller J, Englhard AS, Al-Muzaini H, et al., *Evaluation of the combined use of narrow band imaging and high-speed imaging to discriminate laryngeal lesions*. Lasers Surg Med., 2017. **49(6):609-618**.
38. Arens C, Betz C, Kraft M and Voigt-Zimmermann S, *Narrow band imaging for early diagnosis of epithelial dysplasias and microinvasive tumors in the upper aerodigestive tract*. HNO, 2016. **65(Suppl 1):5-12**.
39. Tirelli G, Piovesana M, Gatto A, Tofanelli M, Biasotto M, et al., *Narrow band imaging in the intra-operative definition of resection margins in oral cavity and oropharyngeal cancer*. Oral Oncol., 2015. **51(10):908-13**.

40. Tirelli G, Piovesana M, Gatto A, Torelli L and Boscolo Nata F, *Is NBI-Guided Resection a Breakthrough for Achieving Adequate Resection Margins in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma?* Ann Otol Rhinol Laryngol., 2016. **125(7):596-601**.
41. Fostiropoulos K, Arens C, Betz C and Kraft M, *Noninvasive imaging using autofluorescence endoscopy: Value for the early detection of laryngeal cancer.* HNO, 2016. **64(1):13-8**.
42. Arens C, Dreyer T, Glatz H and Malzahn K, *Indirect autofluorescence laryngoscopy in the diagnosis of laryngeal cancer and its precursor lesions.* Eur Arch Otorhinolaryngol., 2004. **261(2):71-6**.
43. Upile T, Jerjes W, Sterenborg HJ, El-Naggar AK, Sandison A, et al., *Head & neck optical diagnostics: vision of the future of surgery.* Head Neck Oncol., 2009. **1:25**.
44. Kraft M, Betz CS, Leunig A and Arens C, *Value of fluorescence endoscopy for the early diagnosis of laryngeal cancer and its precursor lesions.* Head Neck, 2011. **33(7):941-8**.
45. Betz CS, Stepp H, Janda P, Arbogast S, Grevers G, et al., *A comparative study of normal inspection, autofluorescence and 5-ALA-induced PPIX fluorescence for oral cancer diagnosis.* Int J Cancer., 2002. **97(2):245-52**.
46. Arens C, Malzahn K, Dias O, Andrea M and Glanz H, *Endoskopische bildgebende Verfahren in der Diagnostik des Kehlkopfkarzinoms und seiner Vorstufen.* Laryngorhinootologie, 1999. **78(12): 685-691**.
47. Wilder-Smith P, Lee K, Guo S, Zhang J, Osann K, et al., *In Vivo Diagnosis of Oral Dysplasia and Malignancy Using Optical Coherence Tomography: Preliminary Studies in 50 Patients.* Lasers in Surgery and Medicine, 2009. **41(5): 353–357**.
48. Tadrous P, *Methods for imaging the structure and function of living tissues and cells: 1. Optical coherence tomography.* The Journal of pathology, 2000. **191(2):115-9**.
49. Volgger V, Stepp H, Ihrler S, Kraft M, Leunig A, et al., *Evaluation of optical coherence tomography to discriminate lesions of the upper aerodigestive tract.* Head Neck, 2013. **35(11):1558-66**.
50. Arens C, Glanz H, Wönckhaus J, Hersemeyer K and Kraft M, *Histologic assessment of epithelial thickness in early laryngeal cancer or precursor lesions and its impact on endoscopic imaging.* Eur Arch Otorhinolaryngol., 2007. **264(6):645-9**.
51. Wilder-Smith P, Hammer-Wilson MJ, Zhang J, Wang Q, Osann K, et al., *In vivo imaging of oral mucositis in an animal model using optical coherence tomography and optical Doppler tomography.* Clin Cancer Res, 2007. **13(8):2449-54**.
52. Podoleanu AG, *Optical coherence tomography.* J Microsc., 2012. **78(935):976-88**.
53. Calantog A, Hallajian L, Nabelsi T, Mansour S, Le A, et al., *A Prospective Study to Assess In Vivo Optical Coherence Tomography Imaging for Early Detection of Chemotherapy-Induced Oral Mucositis.* Lasers Surg Med., 2013. **45(1):22-7**.
54. Volgger V, *Evaluation der optischen Kohärenztomographie in der Tumorfrühdagnostik im oberen Luft- Speiseweg - klinisch prospektive Evaluation einer neuen Methode in vivo -.* in Medizinische Fakultät. 2012, LMU München.
55. Gandhi V, Semenov D, Honkanen S and Hauta-Kasari M, *Optical identification based on time domain optical coherence tomography.* Appl Opt., 2015. **54(25):7514-9**.
56. Tsai TH, Fujimoto JG and Mashimo H, *Endoscopic Optical Coherence Tomography for Clinical Gastroenterology.* Diagnostics (Basel), 2014. **4(2): 57–93**.
57. Optik LZHEVaB, *Messprinzip der Optischen Kohärenztomographie.*
58. Schmitz L, Reinhold U, Bierhoff E and Dirschka T, *Optische Kohärenztomographie: Einsatz in der täglichen dermatologischen Praxis.* Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2013. **11(6):499-508**.
59. Volgger V, Arens C, Kraft M, Enghard AS and Betz CS, *Optische Kohärenztomographie zur Früherkennung epithelialer Dysplasien und mikroinvasiver Karzinome im oberen Luft-Speiseweg.* HNO, 2016. **64(1)**.
60. Moore C, Mehta V, Ma X, Chaudhery S, Shi R, et al., *Interobserver agreement of confocal laser endomicroscopy for detection of head and neck neoplasia.* The Laryngoscope, 2015. **126(3):632-7**.

61. Volgger V, Conderman C and Betz CS, *Confocal laser endomicroscopy in head and neck cancer: steps forward?* Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg., 2013. **21(2):164-70**.
62. <http://www.maunakeatech.com/en-gb>.
63. Betz CS, Kraft M, Arens C, Schuster M, Pfeffer C, et al., *Optische Diagnoseverfahren zur Tumorfrühdiagnostik im oberen Luft-Speise-Weg. Quo vadis?* HNO, 2016. **64(1):41-48**.
64. Burns JA, Kim KH, Deboer JF, Anderson RR and Zeitels SM, *Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography Imaging of Benign and Malignant Laryngeal Lesions: An In Vivo Study*. Otolaryngol Head Neck Surg., 2011. **145(1):91-9**.
65. Enghard AS, Betz T, Volgger V, Lankenau E, Ledderose GJ, et al., *Intraoperative assessment of laryngeal pathologies with optical coherence tomography integrated into a surgical microscope*. Lasers Surg Med., 2017. **49(5):490-497**.
66. Sepehr A, Armstrong WB, Guo S, Su J, Perez J, et al., *Optical coherence tomography of the larynx in the awake patient*. Otolaryngol Head Neck Surg., 2008. **138(4):425-9**.
67. Coughlan CA, Chou LD, Jing JC, Chen JJ, Rangarajan S, et al., *In vivo cross-sectional imaging of the phonating larynx using long-range Doppler optical coherence tomography*. Sci Rep., 2016. **6: 22792**.
68. Pogorzelski B, Hanenkamp U, Goetz M, Kiesslich R and Gosepath J, *Systematic intraoperative application of confocal endomicroscopy for early detection and resection of squamous cell carcinoma of the head and neck: a preliminary report*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg., 2012. **138(4):404-11**.
69. Haxel BR, Goetz M, Kiesslich R and Gosepath J, *Confocal endomicroscopy: a novel application for imaging of oral and oropharyngeal mucosa in human*. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 2009. **267(3):443-448**.
70. Ehardt H and Schmidt-Westhausen AM, *Die Leukoplakie der Mundschleimhaut: Diagnostik – Therapie – Prognose*. Oralchirurgie Journal, 2010.
71. Thong PSP, Tandjung SS, Movania MM, Chiew W-M, Olivo M, et al., *Toward real-time virtual biopsy of oral lesions using confocal laser endomicroscopy interfaced with embedded computing*. Journal of Biomedical Optics, 2012. **17(5):056009**.
72. Wallace MB, Meining A, Canto MI, Fockens P, Miehle S, et al., *The safety of intravenous fluorescein for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract*. Aliment Pharmacol Ther., 2010. **31(5):548-52**.
73. Shahid MW, Crook JE, Meining A, Perchant A, Buchner A, et al., *Exploring the optimal fluorescein dose in probe-based confocal laser endomicroscopy for colonic imaging*. J Interv Gastroenterol., 2011. **1(4):166-171**.
74. Becker V, Van Den Broek FJ, Buchner AM, Dekker E, Wallace MB, et al., *Optimal fluorescein dose for intravenous application in miniprobe-based confocal laser scanning microscopy in pigs*. Journal of Biophotonics, 2011. **4(1-2):108-113**.
75. Zhang YL, Bai L, Li Z, Ji R, Li CQ, et al., *A lower dose of fluorescein sodium is more suitable for confocal laser endomicroscopy: a feasibility study*. Gastrointest Endosc., 2016. **84(6):917-923**.
76. Nonaka K, Ohata K, Ban S, Ichihara S, Takasugi R, et al., *Histopathological confirmation of similar intramucosal distribution of fluorescein in both intravenous administration and local mucosal application for probe-based confocal laser endomicroscopy of the normal stomach*. World J Clin Cases., 2015. **3(12): 993–999**.
77. Thong PSP, Olivo M, Chin WWL, Bhuvanewari R, Mancor K, et al., *Clinical application of fluorescence endoscopic imaging using hypericin for the diagnosis of human oral cavity lesions*. British Journal of Cancer, 2009. **101(9):1580-1584**.
78. Jendželovská Z, Jendželovský R, Kuchárová B and Fedoročko P, *Hypericin in the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin*. Front Plant Sci, 2016.
79. Leunig A, Betz CS, Mehlmann M, Stepp H, Arbogast S, et al., *Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence*. Laryngoscope, 2000. **110(1):78-83**.

80. Leunig A, Betz CS, Baumgartner R, Grevers G and Issing WJ, *Initial experience in the treatment of oral leukoplakia with high-dose vitamin A and follow-up 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX fluorescence*. Eur Arch Otorhinolaryngol., 2000. **257(6):327-31**.
81. Thong PSP, Olivo M, Tandjung SS, Movania MM, Lin F, et al., *Review of confocal fluorescence endomicroscopy for cancer detection*. IEEE J Sel Top Quantum Electron., 2012. **18(4):1355-1366**.
82. Thong PSP, Kho KW, Zheng W, Harris M, Soo KC, et al., *Development of a laser confocal endomicroscope for in vivo fluorescence imaging*. J Mech Med Biol., 2007. **07:11-18**.
83. Burleson GR, Caulfield MJ and Pollard M, *Ozonation of mutagenic and carcinogenic polyaromatic amines and polyaromatic hydrocarbons in water*. Cancer Res., 1979. **39(6 Pt 1):2149-54**.
84. Li C-Q, Yu T, Zuo X-L, Xie X-J, Li W-B, et al., *Effects on confocal laser endomicroscopy image quality by different acriflavine concentrations*. Journal of Interventional Gastroenterology, 2011. **1(2):59-63**.
85. Abbaci M, Breuskin I, Casiraghi O, De Leeuw F, Ferchiou M, et al., *Confocal laser endomicroscopy for non-invasive head and neck cancer imaging: A comprehensive review*. Oral Oncol., 2014. **50(8):711-6**.
86. Abbaci M, Casiraghi O, Temam S, Ferchiou M, Bosq J, et al., *Red and far-red fluorescent dyes for the characterization of head and neck cancer at the cellular level*. J Oral Pathol Med., 2015. **44(10):831-41**.
87. Abbaci M, Dartigues P, De Leeuw F, Soufan R, Fabre M, et al., *Patent blue V and indocyanine green for fluorescence microimaging of human peritoneal carcinomatosis using probe-based confocal laser endomicroscopy*. Surg Endosc., 2016. **30(12):5255-5265**.
88. Wang Y, Xie D, Wang Z, Zhang X, Zhang Q, et al., *Kinetics of indocyanine green: Optimizing tumor to normal tissue fluorescence in image-guided oral cancer surgery applications*. Head Neck, 2018.
89. Al-Dam A, Precht C, Barbe A, Kohlmeier C, Hanken H, et al., *Sensitivity and specificity of sentinel lymph node biopsy in patients with oral squamous cell carcinomas using indocyanine green fluorescence imaging*. J Craniomaxillofac Surg., 2018. **46(8):1379-1384**.
90. Enghard AS, Palaras A, Volgger V, Stepp H, Mack B, et al., *Confocal laser endomicroscopy in head and neck malignancies using FITC-labelled EpCAM- and EGF-R-antibodies in cell lines and tumor biopsies*. J Biophotonics., 2017. **10(10):1365-1376**.
91. Nathan CA, Kaskas NM, Ma X, Chaudhery S, Lian T, et al., *Confocal Laser Endomicroscopy in the Detection of Head and Neck Precancerous Lesions*. Otolaryngol Head Neck Surg., 2014. **151(1):73-80**.
92. Oetter N, Knipfer C, Rohde M, Wilmowsky C, Maier A, et al., *Development and validation of a classification and scoring system for the diagnosis of oral squamous cell carcinomas through confocal laser endomicroscopy*. J Transl Med., 2016. **14:159**.
93. Dittberner A, Rodner E, Ortman W, Stadler J, Schmidt C, et al., *Automated analysis of confocal laser endomicroscopy images to detect head and neck cancer*. Head Neck., 2016. **38(1):1419-26**.
94. Muldoon TJ, Thekkek N, Roblyer D, Maru D, Harpaz N, et al., *Evaluation of quantitative image analysis criteria for the high-resolution microendoscopic detection of neoplasia in Barrett's esophagus*. J Biomed Opt., 2010. **15(2):026027**.
95. André B, Vercauteren T, Buchner AM, Krishna M, Ayache N, et al., *Software for automated classification of probe-based confocal laser endomicroscopy videos of colorectal polyps*. World J Gastroenterol., 2012. **18(39):5560-9**.
96. Zheng W, Harris M, Kho KW, Thong PSP, Hibbs A, et al., *Confocal endomicroscopic imaging of normal and neoplastic human tongue tissue using ALA-induced-PPIX fluorescence: a preliminary study*. Oncology Reports, 2004. **12(2):397-401**.
97. Thong PSP, Olivo M, Kho K-W, Zheng W, Mancor K, et al., *Laser confocal endomicroscopy as a novel technique for fluorescence diagnostic imaging of the oral cavity*. Journal of Biomedical Optics, 2007. **12(1):014007**.

98. Abbaci M, Temam S, Casiraghi O, Vielh P, Bosq J, et al., *Characterization of laryngeal carcinoma by confocal endomicroscopy*. *Head & Neck Oncology*, 2009. **1(1):O14**.
99. Linxweiler M, Al Kadah B, Bozzato A, Bozzato V, Hasenfus A, et al., *Noninvasive histological imaging of head and neck squamous cell carcinomas using confocal laser endomicroscopy*. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, 2016. **273(12):4473-4483**.

## **Danksagung**

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Christian Stephan Betz für die Überlassung des Themas, die Patientenrekrutierung und die stetige Unterstützung bei allen Problemen und offenen Fragen. Durch die gemeinsamen Gespräche und Anregungen ist die Entwicklung der Arbeit erst möglich geworden. Ein besonderer Dank gilt auch Dr. med. Veronika Volgger für die perfekte Betreuung, für ihre sympathische und ermutigende Art, die gesamte Studie und das Verfassen der Arbeit zu begleiten und voranzubringen und für die vielen Korrekturen und Änderungsvorschläge.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Stephan Ihrler für die produktive Zusammenarbeit, die histologische Befundung aller Gewebeproben und die gemeinsame Betrachtung und Entwicklung von Kriterien zur Befundung der pCLE-Bilder.

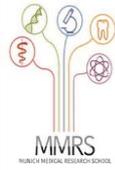
Der weiteren bedanke ich mich bei dem gesamten Team des Laserforschungslabors der Universität München, die mich vor allem in der Phase der klinischen Studie sehr unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt hier Dr. rer. nat. Herbert Stepp und Sebastian Fiedler für den physikalischen und technischen Support und die Hilfe bei Aufbau und Bedienung der Geräte im Operationssaal und Untersuchungsraum.

Ich danke von Herzen meinen Eltern, dass sie mich immer nach all ihren Möglichkeiten unterstützt und das Studium finanziert haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Ohne sie wäre diese berufliche Ausbildung nicht möglich gewesen. Ein großer Dank gilt ebenfalls meiner Schwester und meiner ganzen restlichen Familie, die mich auf dem Weg begleitet haben.



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



**Eidesstattliche Versicherung**

Girschick, Susanne

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Evaluation der konfokalen Laserendomikroskopie und Optischen Kohärenztomographie zur in vivo Beurteilung von Leukoplakien und Erythroplakien im oberen Luft-/Speiseweg**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Garmisch-Partenkirchen, 22.04.2019

---

Ort, Datum

Susanne Girschick

---

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand