

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des endoskopischen Screenings

Im Zeitraum von Mai 2000 bis August 2001 wurde bei insgesamt 148 Kopf-Hals-Tumorpatienten eine einmalige Videoösophagoskopie mit routinemäßigen Biopsieentnahmen durchgeführt. Das Alter der untersuchten Patienten lag zwischen 34 und 89 Jahren, der Altersmedian betrug 61 Jahre.

75 der 148 untersuchten Patienten wurden innerhalb der ersten sechs Monate nach Erstdiagnose eines Kopf-Hals-Tumors (=synchron) untersucht, 73 Patienten später als sechs Monate nach Erstdiagnose (=metachron).

Einige Patienten mit Zweitneoplasien des Ösophagus hatten anamnestisch mehrere Kopf-Hals-Tumoren – hier wurde der zuerst diagnostizierte Kopf-Hals-Tumor als Indextumor für die Berechnung des Zeitintervalls zwischen Kopf-Hals-Tumor und Ösophaguszweitneoplasie gewertet.

Der größte Teil der Index-Kopf-Hals-Tumoren waren im Mundraum lokalisiert (39,8%), gefolgt von Karzinomen des Oropharynx (32,4%), Hypopharynx (15,5%) und des Larynx (12,2%).

Bei insgesamt 21 der 148 untersuchten Kopf-Hals-Tumorpatienten (14,2%) wurden neoplastische Veränderungen des ösophagealen Plattenepithels gefunden.

Tabelle 1: Zusammenfassung der klinischen Charakteristika der 148 Kopf-Hals-Tumorpatienten

Patientenzahl (n)	148
Altersmedian (Altersspanne) in Jahren	61,0 (34-89)
Geschlecht (m/w)	106/42
Anzahl an Kopf-Hals-Tumoren pro Patient	1,1
Lokalisation des Index-Kopf-Hals-Tumors:	
Mundhöhle (%)	59 (39,8%)
Oropharynx (%)	48 (32,4%)
Hypopharynx (%)	23 (15,5%)
Larynx (%)	18 (12,2%)

3.1.1 Plattenepitheldysplasien des Ösophagus

Plattenepitheldysplasien werden allgemein in niedriggradige und hochgradige Dysplasien unterteilt und nach der Wiener Klassifikation (Schlemper et al. 2000) auch als nicht-invasive intraepitheliale Neoplasien (IEN) bezeichnet (IEN der Kategorie 3 entsprechen niedriggradigen Dysplasien und IEN 4.1 hochgradigen Dysplasien). Bei zehn von 148 endoskopierte Patienten (6,8%) wurden Plattenepitheldysplasien der ösophagealen Schleimhaut gefunden (Tabelle 2).

Insgesamt wurden in diesen zehn Patienten 12 Plattenepitheldysplasien diagnostiziert. Es handelte sich dabei um acht niedriggradige sowie vier hochgradige Dysplasien. Sechs von 12 diagnostizierten Dysplasien befanden sich

im oberen Drittel des Ösophagus. Es fanden sich zudem in der Anamnese dieser zehn Patienten 13 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches, was 1,3 Karzinomen pro Patient entspricht. Die Dysplasien wurden in neun von zehn Fällen synchron diagnostiziert, sprich innerhalb der ersten sechs Monate nach Erstdiagnose des Kopf-Hals-Tumors.

Tabelle 2: Klinische Charakteristika der 10 Kopf-Hals-Tumorpatienten mit ösophagealen Plattenepitheldysplasien

Patientenzahl (% aller Untersuchten)	10 (6,8%)
Altersmedian (Altersspanne) in Jahren	57 (48-89)
Geschlecht (m/w)	9/1
Anzahl der Kopf-Hals-Tumoren pro Patient	1,3
Lokalisation des Index-Kopf-Hals-Tumors	
Mundhöhle	3
Oropharynx	3
Hypopharynx	3
Larynx	1
Chronologie der Diagnose der Ösophagus-dysplasie zur Diagnose des Kopf-Hals-Tumors	
synchron (innerhalb von sechs Monaten)	9
metachron (später als sechs Monate)	1
Lokalisation der Dysplasie in der Speiseröhre (n = 12)	
Oberes Drittel	6
Mittleres Drittel	2
Unteres Drittel	4

3.1.2 Zweitkarzinome des Ösophagus

Bei 11 der 148 untersuchten Patienten (7,4%) wurde ein invasives Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre diagnostiziert (Tabelle 3). Bei drei dieser 11 Patienten wurden zwei getrennte Plattenepithelkarzinome in der Ösophagusschleimhaut gefunden, so dass die insgesamt diagnostizierte Zahl an Ösophaguskarzinomen 14 betrug.

Bei vier der 11 Patienten wurde das Ösophaguskarzinom synchron diagnostiziert, bei den restlichen sieben Patienten dagegen metachron. Bei metachroner Diagnose betrug das mittlere Intervall zwischen Diagnose des Kopf-Hals-Tumors und Diagnose des Ösophaguskarzinoms 29 Monate (10-114 Monate). Ösophageale Zweitkarzinome wurden somit überwiegend metachron zur Diagnose der Kopf-Hals-Tumoren erfasst, während nahezu alle dysplastischen Veränderungen (neun von zehn) synchron diagnostiziert wurden.

Auch die Anzahl der Kopf-Hals-Tumoren pro Patient war bei Patienten mit ösophagealem Zweitkarzinom mit 1,4 höher als bei Patienten mit dysplastischen Veränderungen des Ösophagus (1,3) und höher als in der Gesamtgruppe von 148 untersuchten Kopf-Hals-Tumor-Patienten (1,1). Sechs von 14 diagnostizierten Ösophaguskarzinomen befanden sich im UICC-Stadium I.

Zusätzlich zu den durch die Screeningstudie erfassten 11 Patienten mit einem ösophagealen Zweitkarzinom wurde im gleichen Zeitraum bei sieben weiteren Patienten ein stenosierendes Plattenepithelkarzinom des Ösophagus als Ursache dysphagischer Beschwerden diagnostiziert. Diese sieben Patienten hatten anamnestisch ein bzw. mehrere Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches durchgemacht, sich aber nicht primär zur Nachsorge dieser Tumoren, sondern wegen Dysphagie vorgestellt. Daher wurden ihre Proben zwar bezüglich des

COX-2-Gehaltes ausgewertet, sie wurden jedoch bei der Berechnung der durch das Screening erfassten Zweitneoplasien nicht einbezogen.

Die bei diesen sieben Patienten diagnostizierten Plattenepithelkarzinome traten alle metachron auf; Das mittlere Intervall zwischen Diagnose des Index-Kopf-Hals-Tumors und des Ösophaguszweitkarzinoms lag bei 72 Monaten (24-156 Monate). Alle sieben Fälle waren stenosierende Plattenepithelkarzinome des Ösophagus im UICC-Stadium III.

Tabelle 3: Klinische Charakteristika der 11 Kopf-Hals-Tumorpatienten mit Zweitkarzinomen des Ösophagus

Patientenzahl (% aller Untersuchten)	11 (7,4%)
Altersmedian (Altersspanne) in Jahren	61 (49-69)
Geschlecht (m/w)	8/3
Anzahl der Kopf-Hals-Tumoren pro Patient	1,4
Ort des Index-Kopf-Hals-Tumors	
Mundhöhle	3
Oropharynx	5
Hypopharynx	2
Larynx	1
Ort der Zweitkarzinome (14 Karzinome bei 11 Patienten)	
oberes Ösophagusdrittel	3
mittleres Ösophagusdrittel	8
unteres Ösophagusdrittel	3
Chronologie der Diagnose des Ösophagus-zweitkarzinoms zur Diagnose des Kopf-Hals-Tumors	
synchron (innerhalb von 6 Monaten)	4
metachron (später als 6 Monate)	7
UICC-Stadien der Ösophaguskarzinome (n = 14)	
Stadium I	6
Stadium II	2
Stadium III	6

3.2 COX-2-Expression während der ösophagealen Karzinogenese bei Kopf-Hals-Tumorpatienten

3.2.1 Etablierung der PCR

Die besten Ergebnisse in der Real-Time-PCR wurden mit einer $MgCl_2$ -Konzentration von $3\mu mol/l$, einer Annealingtemperatur von $62^\circ C$ und einer Primerkonzentration von $300nM$ für jeden Primer erzielt und folglich für die Quantifizierung verwendet. In jeder mittels PCR getesteten Probe wurden sowohl PBGD als auch COX-2 nachgewiesen (siehe Abbildung 8).

Die Ergebnisse der Real-Time-PCR korrelierten signifikant positiv mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung (im zweiseitigen Spearman-Test zeigte sich ein r von 0.64 bei einem $p < 0.05$). Proben, die eine hohe COX-2-mRNA-Expression aufwiesen, zeigten also auch auf Proteinebene eine hohe COX-2-Expression.

3.2.2 Vergleich der COX-2-Expression auf mRNA-Ebene mittels

Real-Time-PCR

Die relative Expression von COX-2 zu PBGD war in Ösophaguskarzinomen im Vergleich zu allen getesteten Proben aus normalem Plattenepithel von Kontrollpatienten signifikant erhöht ($p < 0,01$).

Normales Plattenepithel dieser Kontrollgruppe (Abbildung 8, Kontrolle 1) unterschied sich hinsichtlich der COX-2-Expression nicht von normalem Plattenepithel von Kopf-Hals-Tumorpatienten (Kontrolle 2) oder Patienten mit sowohl Kopf-Hals-Tumor als auch Zweitkarzinom im Ösophagus (Kontrolle 3). Bei Kopf-Hals-Tumorpatienten, die ein Zweitkarzinom im Ösophagus hatten, exprimierte das normale ösophageale Plattenepithel (Abbildung 8, Kontrolle 3 und Abbildung 9, schwarze Balken) deutlich weniger COX-2 als das

Karzinomgewebe derselben Patienten (Abbildung 8, Gruppe Karzinom und Abbildung 9, weiße Balken).

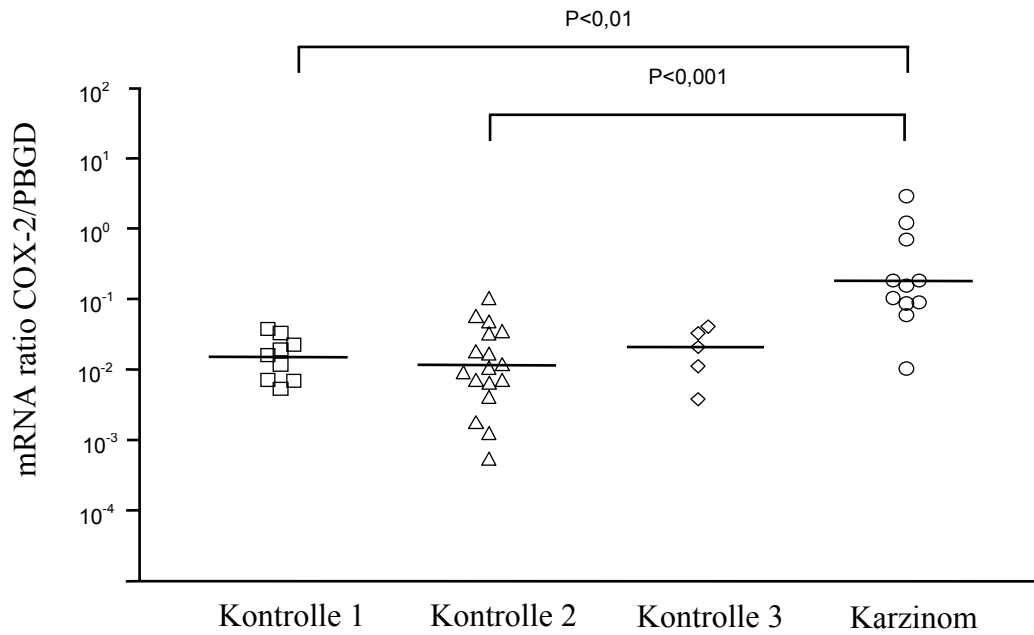


Abbildung 8: Kontrolle 1: normales Plattenepithel (PE) von Kontrollpatienten ohne anamnestischen Tumor. Kontrolle 2: normales PE von Patienten mit Kopf-Hals-Tumor. Kontrolle 3: normales PE von Patienten mit Kopf-Hals-Tumor und Ösophaguszweitkarzinom. Karzinom: Proben aus Ösophaguszweitkarzinomen

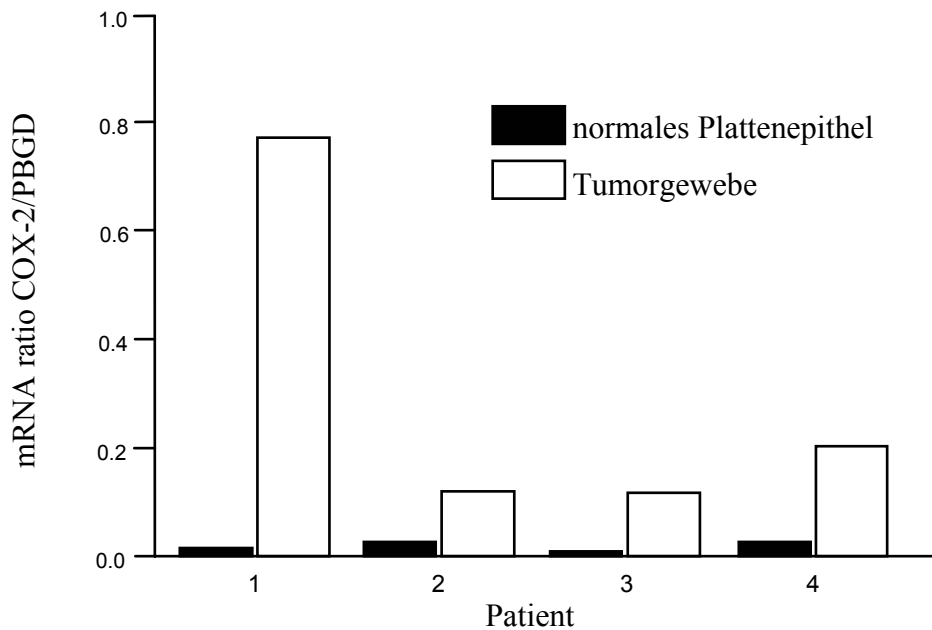


Abbildung 9: COX-2-Expression in normalem Plattenepithel im Vergleich zu Ösophaguskarzinomgewebe bei vier Einzelpatienten

Dysplasien können endoskopisch selbst unter Zuhilfenahme Lugolscher Lösung nicht immer sicher identifiziert werden; zudem können sie disseminiert auftreten, wobei die einzelne Dysplasie sehr klein sein kann. Da die einzelne Biopsie nicht sowohl histologisch als auch molekularbiologisch für die Bestimmung von COX-2-mRNA aufgearbeitet werden konnte, wurde die COX-2-Expression auf mRNA-Ebene in dysplastischem Gewebe nicht bestimmt.

3.2.3 Untersuchungen zur COX-2-Expression auf Proteinebene während der ösophagealen Karzinogenese

In der immunhistochemischen Färbung wurde in nahezu allen Proben eine positive COX-2-Färbung gefunden (siehe Abbildungen 10a und 10b). Neben den 18 Karzinompräparaten konnten im Fall von drei Ösophagektomiepräparaten nicht nur das Ösophaguskarzinom, sondern auch ösophageale Plattenepitheldysplasien separat ausgewertet werden. Es handelte sich dabei um zwei hochgradige Dysplasien und eine niedriggradige Dysplasie. Insgesamt wurden zudem zehn Proben mit normalem Plattenepithel auf COX-2 gefärbt und ausgewertet. Die Färbungen von drei Präparaten (einer niedriggradigen Dysplasie und zweier hochgradiger Dysplasien) waren leider nicht verwertbar.

In normaler plattenepithelialer Schleimhaut lag der Median des COX-2-Färbescores mit 1 signifikant unter dem Median der Tumorproben (siehe Abbildungen 10a und 10b: Spalten Kontrollen und Karzinome). Die Proben aus Tumoren erreichten sehr unterschiedliche Punktzahlen im gewählten Färbescore – der maximale Wert lag bei 12, während der geringste Wert drei betrug. Die mediane Punktzahl aller ausgewerteten Tumorpräparate lag bei fünf.

Auch die COX-2-Expression in den Proben aus dysplastischem Plattenepithel war mit einer medianen Punktzahl von vier im Vergleich zu normalem Plattenepithel signifikant erhöht. Wertet man niedriggradige und hochgradige Dysplasien getrennt aus (siehe Abbildung 10b), so ist aufgrund der geringen Anzahl der Proben die COX-2-Expression gegenüber normalem Plattenepithel nicht signifikant verschieden.

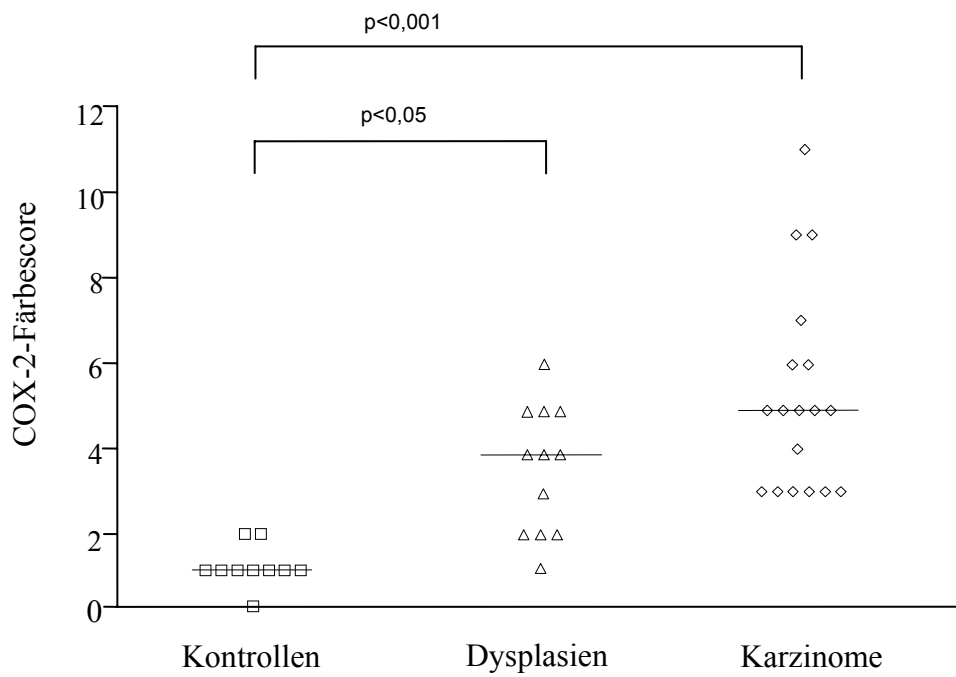


Abbildung 10a: COX-2-Immunreaktivität in normaler Ösophagusschleimhaut (Kontrollen), in ösophagealen Plattenepitheldysplasien (niedriggradige und hochgradige Dysplasien zusammengefasst) und in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

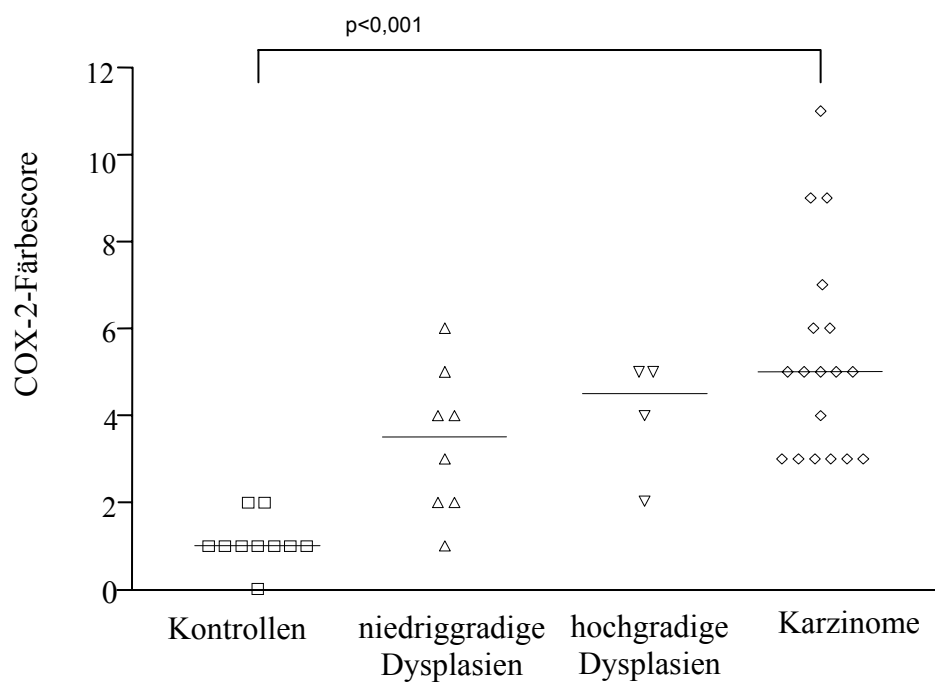


Abbildung 10b: COX-2-Immunreaktivität in normalem Plattenepithel (Kontrollen), in Dysplasien und in Karzinomen des Ösophagus. In dieser Abbildung sind niedriggradige und hochgradige Dysplasien separat aufgeführt

3.2.4 Histologische Auswertung

In Präparaten mit normal geschichtetem Plattenepithel des Ösophagus wurde COX-2-Protein schwach exprimiert. Wurde eine positive COX-2-Färbung gefunden, so beschränkte sich diese auf das Stratum basale des Epithels (siehe Abbildung 11, S. 45). Das subepitheliale Bindegewebe exprimiert kein COX-2. Allerdings fanden sich in manchen Präparaten vereinzelt intraepithelial liegende COX-2-hochexprimierende Zellen, die als Leukozyten identifiziert werden konnten und nicht in den Färbescore miteinbezogen wurden. Der Prozentsatz COX-2-positiver Zellen in allen ausgewerteten normal geschichteten Plattenepithelien lag bei ungefähr 20%, die mediane Punktzahl somit bei einem Punkt.

In dysplastischem Plattenepithel war die Expression von COX-2 im Vergleich zu normalem Plattenepithel stärker heterogen. Vier Präparate – drei niedriggradige und eine hochgradige Dysplasie – erreichten nur einen Färbescore von zwei oder weniger Punkten. Das Ausmaß und Muster der COX-2-Expression war in diesen vier Fällen von der COX-2-Expression in normal geschichtetem Plattenepithel nicht zu unterscheiden.

Bei den restlichen Präparaten (fünf niedriggradigen und drei hochgradigen Dysplasien) allerdings war eine insgesamt verstärkte COX-2-Expression in den dysplastischen Anteilen des Epithels zu beobachten (siehe Abbildung 12, S. 46). Dabei gab es in diesen Präparaten ein Nebeneinander von Epithelzellen, die verschieden stark COX-2 exprimierten. Neben Zellen der Färbeintensität eins waren in diesen Präparaten auch stärker COX-2-exprimierende Zellen der Färbeintensität zwei zu beobachten. Eine stärkere COX-2-Expression in hochgradig dysplastischem Epithel im Vergleich zu niedriggradig dysplastischem Epithel war nicht zu beobachten.

Der größte Teil der Proben aus ösophagealen Zweitkarzinomen (siehe Abbildungen 13 und 14, S. 47f.) zeigte ein Nebeneinander zwischen COX-2-positiven Zellen mehrerer Färbeintensitäten sowie COX-2-negativen Zellen. Auch die Karzinomresektate zeigten, dass COX-2 nur in einem Teil der Zellen exprimiert wurde. Lediglich in einem Karzinompräparat exprimierten alle Zellen sehr stark COX-2, so dass dieses Präparat im Färbescore die volle Punktzahl von 12 erreichte. Ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad der Tumoren und der COX-2-Expression war nicht feststellbar.

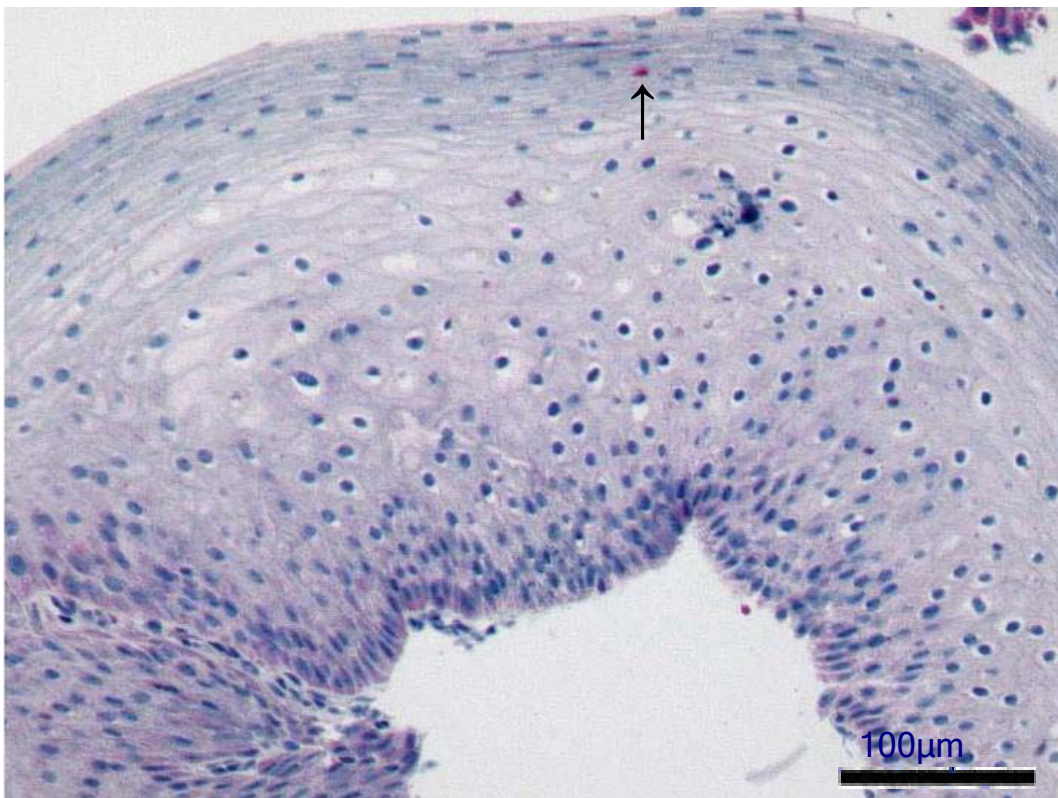


Abbildung 11: COX-2-Expression in normal geschichtetem Plattenepithel.

Der Pfeil zeigt einen intraepithelial gelegenen Leukozyten

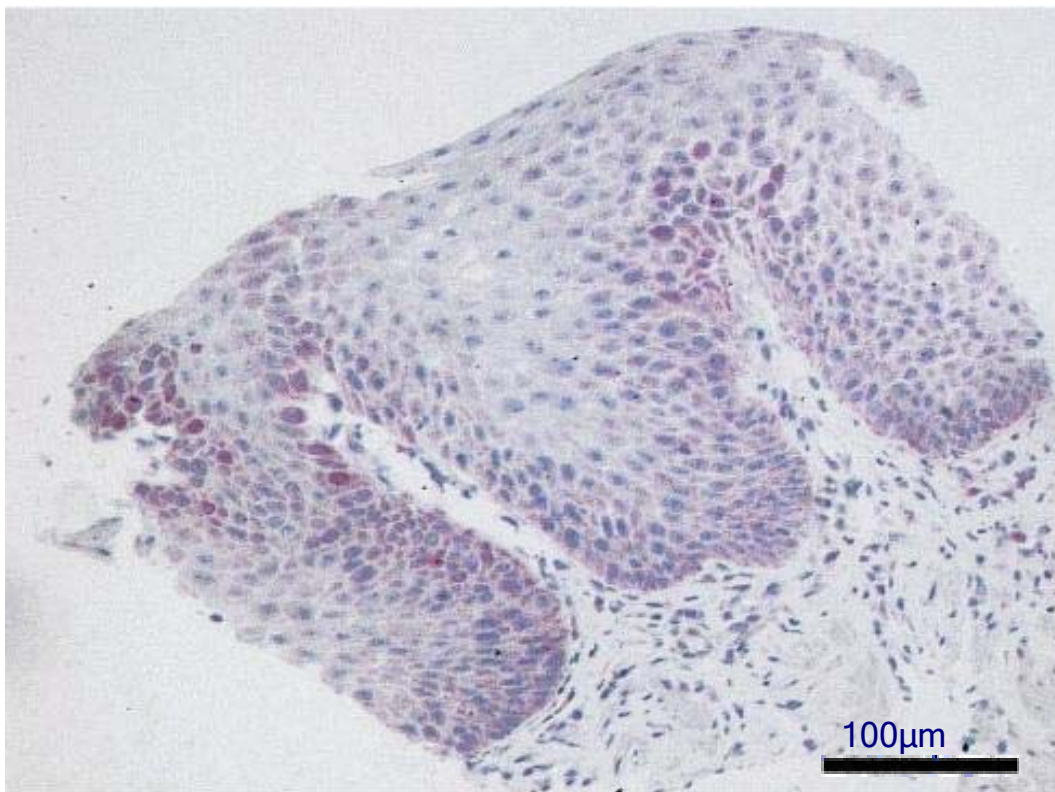


Abbildung 12: COX-2-Expression in dysplastischem Plattenepithel. Der basale, dysplastische Anteil des Epithels zeigt eine deutlich stärkere COX-2-Expression

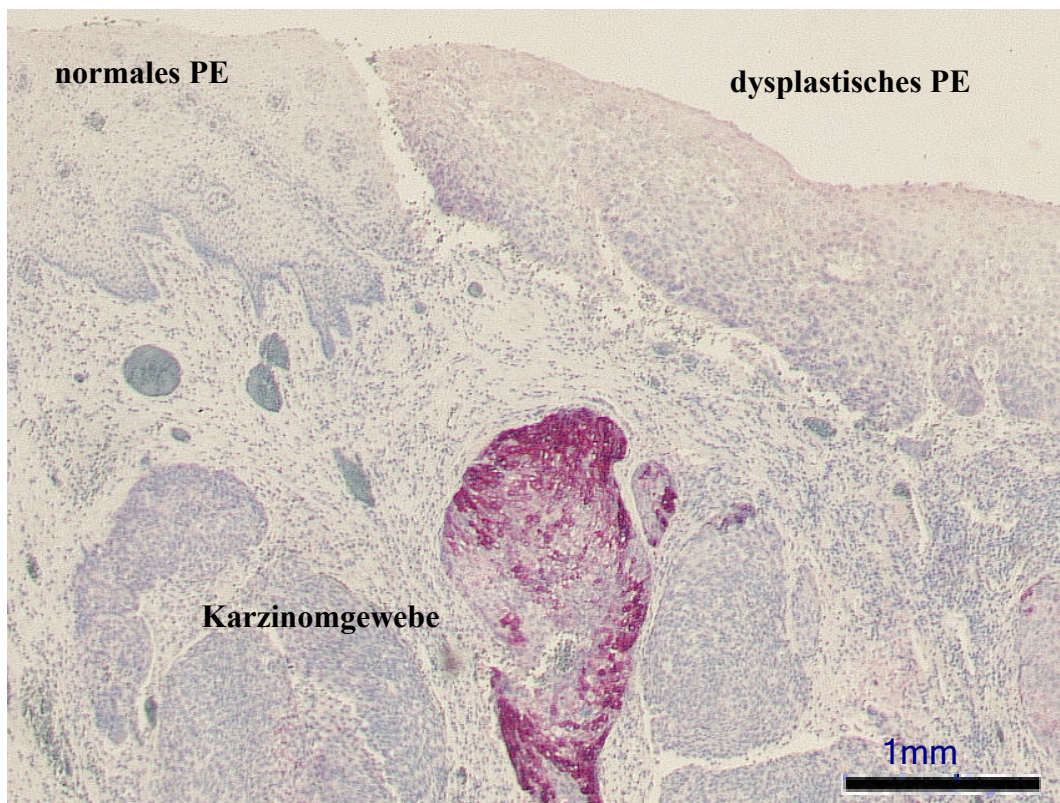


Abbildung 13: COX-2-Expression in normalem Plattenepithel (PE), dysplastischem PE und Karzinomgewebe des Ösophagus. In normalem PE ist keine bis allenfalls geringe positive Färbung zu sehen, während das dysplastische PE eine deutlich sichtbare positive Färbung aufweist. In dem angeschnittenen Tumorgewebe imponiert ein Nebeneinander von COX-2-negativen und COX-2-positiven Tumorzellen aller drei Intensitäten

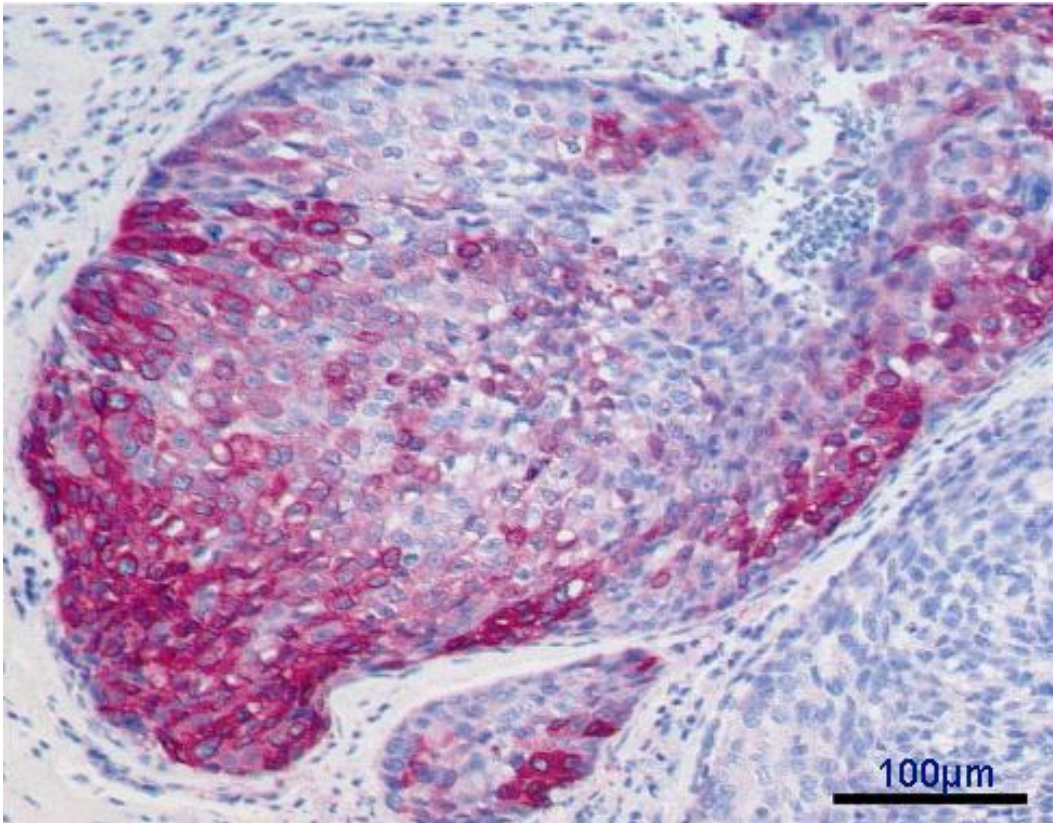


Abbildung 14: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 13. Hier zeigt sich das unterschiedliche Färbeverhalten innerhalb des Karzinomgewebes