

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. Dr. Peter Sieg

**Einfluss von Tumor Budding und Tumorzellvereinzelung auf das Überleben  
und die lokoregionale Kontrolle bei Patienten mit einem lokal  
fortgeschrittenen Mundschleimhautkarzinom (pT3 und pT4) mit und ohne  
Lymphknotenmetastasen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -



vorgelegt von

Justus Uwe Jensen

aus Hamburg

Lübeck 2024

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Samer Hakim

Amts-Kobetreuung: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dirk Rades

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2024

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13.05.2024

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

# I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS .....	2
II.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	4
1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....	5
1.1.	EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE .....	5
1.2.	HISTOPATHOLOGIE UND TUMORBIOLOGIE .....	7
1.3.	TNM-KLASSIFIKATION .....	8
1.4.	STAGING-UNTERSUCHUNG .....	12
1.5.	GRADING .....	15
1.6.	TUMOR BUDDING UND TUMORZELLVEREINZELUNG .....	16
1.7.	THERAPIE DES MUNDHÖHLENKARZINOMS .....	19
1.8.	THERAPIEBEEINFLUSSENDE HISTOPATHOLOGISCHE RISIKOFAKTOREN.....	21
1.9.	FRAGESTELLUNG .....	23
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1.	UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIV .....	24
2.2.	NACHSORGE UND ENDPUNKTE .....	26
2.3.	DATENERHEBUNG .....	27
2.3.1.	DEMOGRAPHISCHE UND TUMORSPEZIFISCHE DATEN .....	27
2.3.2.	RISIKOFAKTOREN UND KOMORBIDITÄT.....	27
2.3.3.	STRALENTHERAPEUTISCHE DATEN .....	28
2.3.4.	HISTOPATHOLOGISCHE AUSWERTUNG.....	28
2.3.4.1.	AUSWERTUNG DES TUMOR-BUDDING UND TUMORZELLVEREINZELUNG.....	29
2.4.	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	31

3.	ERGEBNISSE.....	32
3.1.	DEMOGRAPHISCHE DATEN UND MORBIDITÄT .....	32
3.2.	RISIKOFAKTOREN.....	33
3.3.	TUMORSPEZIFISCHE DATEN.....	34
3.4.	THERAPIE.....	37
3.5.	EREIGNISRATEN.....	38
3.6.	ÜBERLEBENSZEITANALYSE .....	39
3.7.	PROPORTIONALES HAZARD-REGRESSIONSMODELL.....	42
4.	DISKUSSION .....	44
5.	ZUSAMMENFASSUNG .....	54
III.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	55
IV.	TABELLENVERZEICHNIS.....	55
V.	LITERATURVERZEICHNIS .....	56
VI.	DANKSAGUNG.....	65

## II. Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CCI	Charlson-Komorbiditätsindex
CI	Konfidenzintervalle
CT	Computertomographie
DOI	Depth of Invasion/Tiefe der Invasion/Infiltrationstiefe
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transformation
ENE	Extranodal Extension/extranodale Wachstum
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPF	High Power Field/Hauptgesichtsfeld
HPV	Humanen-Papilloma-Virus
HR	Hazard Ratio
IHC	Immunhistochemie
IQR	Interquartilsbereiche
ITBCC	Tumor Budding Consensus Conference
LRFS	Locoregional Recurrence Free Survival
MRT	Magnetresonanztomographie
OCSS	Oral Cancer Specific Survival/krebsspezifisches Überleben
OS	Overall Survival/Gesamtüberleben
POI	Pattern of Invasion
UICC	International Union for Cancer Control
WHO	World-Health-Organization
WSI	Whole Slide Image

Hinweis: In der vorliegenden Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Es bezieht sich zugleich auf die männliche, die weibliche und diverse Geschlechteridentitäten.

## 1. Einleitung und Fragestellung

### 1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Karzinome der Mundhöhle zählen zu den häufigsten Krebserkrankungen des Menschen. Die weltweite Inzidenz lag im Jahre 2020 bei 377.713 Neuerkrankungen. Hiermit machen sie 2% aller malignen Tumore aus. Mit 264.211 Fällen erkrankten mehr als doppelt so viele Männer (70%) wie Frauen (30%). Insgesamt verstarben im Jahr 2020 177.757 Personen an einem Karzinom der Mundhöhle. Das entspricht 1,8% der krebsbedingten Todesfälle in diesem Jahr. [1]

Weltweit zeigt sich eine sehr heterogene Verteilung der Erkrankungsraten. Besonders betroffen sind Entwicklungsländer und Schwellenländer im asiatischen Raum. [2] International zeigt sich eine Zunahme der Inzidenz über die vergangenen Jahrzehnte. [3] In Deutschland ist die Erkrankungsrate seit 2011 in der weiblichen Bevölkerung nahezu konstant, während in der männlichen Bevölkerung eine leicht rückläufige Tendenz beobachtet wird. [4]

Plattenepithelkarzinome machen mit mehr als 90% den Großteil der malignen Tumore der Mundhöhle aus. Die restlichen Entitäten umfassen Tumore ausgehend vom Bindegewebe, der kleinen Speicheldrüsen, des lymphatischen Gewebes und der Melanozyten. Zudem kann es sich um Metastasen eines entfernten Tumors handeln. [5]

Die häufigste Tumorlokalisation ist die Zunge gefolgt vom Mundboden und dem Zahnfleisch. [6]

Bei Männern liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter zwischen dem 50. und dem 60. Lebensjahr und bei Frauen zwischen dem 50. und dem 75. Lebensjahr. [7] Die 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit liegt je nach Publikation und Tumorstadium beim Gesamtüberleben (OS) zwischen 33 – 71% und beim krebsspezifischen Überleben (OCSS) zwischen 48 – 81%. [6]

In der Hälfte der Fälle wird die Erkrankung erst in einem fortgeschrittenen Stadium (Stadium III und IV) diagnostiziert, da die meisten Patienten in den frühen Stadien keine Symptome zeigen. Eine ärztliche Vorstellung erfolgt erst, wenn die Patienten

erhebliche Symptome wie Schmerzen, Blutungen oder eine deutliche Raumforderung im Mund oder am Hals bemerken. [8]

Bei Diagnosestellung haben 1,5% der Patienten einen weiteren synchronen Primärtumor in der Mundhöhle oder im aero-digestiven Trakt (Larynx, Pharynx, Ösophagus oder Lunge). Metachrone Tumore entwickeln sich in 10% bis 40% der Fälle im ersten Jahrzehnt nach der Behandlung des primär diagnostizierten Karzinoms. Zurückzuführen ist dieser Zusammenhang auf dieselben Risikofaktoren in der Tumorentstehung der verschiedenen Lokalisationen. [5]

Zu den wichtigsten ätiologischen Risikofaktoren für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen in der Mundhöhle zählen Tabakkonsum, einschließlich rauchlosen Tabaks, und starker Alkoholkonsum. Einzeln oder in Kombination werden diese Risikofaktoren für 75% der Mundhöhlenkarzinome verantwortlich gemacht. [9] Personen, die entweder regelmäßig Tabak rauchen oder Alkohol konsumieren (drei oder mehr alkoholhaltige Getränke pro Tag), haben ein zweifach erhöhtes Risiko an einem Mundhöhlenkarzinom zu erkranken. Kombiniert haben beide Risikofaktoren einen synergistischen Effekt und das Erkrankungsrisiko steigt um ein Vielfaches. [9-11]

Als weitere Risikofaktoren gelten: Eine chronische Reizung der Mundschleimhaut, schlechte Mundhygiene, Mangelernährung sowie eine Ernährung mit wenig Obst und Gemüse. [9, 11]

Ebenfalls werden genetische Variationen, die mit dem Alkoholstoffwechsel, DNA-Reparaturwegen und Genen, die am Nikotinstoffwechsel beteiligt sind, als Faktoren für die Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen diskutiert. [10] Hereditär besteht ein 1,7-fach erhöhtes Risiko, wenn ein Verwandter ersten Grades an einem Kopf-Halstumor erkrankt ist. [9]

Chronische Infektionen mit dem Humanen-Papilloma-Virus (HPV) sind ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen im Oropharynx. HPV 16 liegt bei mehr als 90% der HPV-assoziierten Oropharynxkarzinome vor und ist somit der am weitesten verbreitete Subtyp. [12] HPV-assoziierte Tumore in der

Mundhöhle werden jedoch aktuell auf unter 5% geschätzt und spielen bei dieser Entität im Vergleich eine untergeordnete Rolle. [13]

## 1.2. Histopathologie und Tumorbiologie

Das orale Plattenepithelkarzinom geht von Schleimhautepithelzellen aus, welche die Mundhöhle und den Rachen auskleiden. Klinisch imponieren exophytisch wachsende Tumore als eine über das Schleimhautniveau erhabene Tumormasse, welche sich induriert tastet und häufig Ulzerationen aufweist. Bei endophytisch wachsenden Tumoren zeigt sich eine unterhalb des Schleimhautniveaus liegende Ulzeration mit aufgeworfenem Randwall. Am häufigsten handelt es sich um den verhornenden Subtyp mit Ausbildung von intra- und extrazellulärem Keratin und pathognomonischen Hornperlen. [14, 15]

Histologisch gesehen verläuft die Transformation der Epithelzellen in ein invasives Karzinom in Teilschritten. Zuerst entsteht eine zelluläre Hyperplasie, gefolgt von einer Dysplasie, welche mit zunehmender Entartung in ein Carcinoma in situ mit intakter Basalmembran und schließlich in ein invasives Karzinom übergeht. [16]

Zunächst primär benigne Schleimhautveränderungen, auf dessen Basis ein invasives Karzinom entstehen kann, werden Präkanzerosen genannt. Hierzu zählen die Leukoplakie, die Erythroplakie, der orale Lichen Ruber Planus und die submuköse Fibrosierung. Die Wahrscheinlichkeit in ein invasives Plattenepithelkarzinom überzugehen, variiert je nach Entität stark. Mit einer Transformationsrate von 85% pro Jahr gehört die Erythroplakie zu den obligaten Präkanzerosen. Die restlichen Dysplasien gehören mit deutlich geringeren Entartungswahrscheinlichkeiten zu den fakultativen Präkanzerosen. Die frühe Detektion dieser Schleimhautläsionen ist entscheidend, da das klinische und pathologische Stadium bei Diagnosestellung entscheidend die Prognose beeinflusst. In Anbetracht der hohen Sterblichkeitsrate bei fortgeschrittenen Karzinomen, führt die frühzeitige Erkennung zu einer besseren Prognose und Überlebensrate sowie einer geringeren Morbidität durch die Behandlung. [8]

Plattenepithelkarzinome weisen ein invasives Wachstum auf, für welches eine Unterbrechung der Basalmembran und eine Ausdehnung in das darunter liegende Gewebe charakteristisch ist. [14]

Es werden verschiedene Invasionsmuster (Pattern of Invasion (POI)) unterschieden. Beim mikroinvasiven Karzinom dringen Tumorzellen nur bis in die Lamina Propria vor und weisen eine maximale Infiltrationstiefe von 1 – 2 mm gemessen ab der Basalmembran auf. Tiefer infiltrierende Tumore können als breite Invasionsfront mit gut definierten Rändern verdrängend wachsen. Alternativ kann eine Infiltration in tieferliegende Gewebsschichten mit fingerförmigen, unregelmäßigen Strängen oder mit kleinen Tumorzellverbänden sowie mit einzelnen Tumorzellen erfolgen. Hier ist die Infiltrationsgrenze schwer zu bestimmen und die Tumore weisen ein aggressiveres Verhalten mit einer schlechteren Prognose auf. [14, 15, 17]

Plattenepithelkarzinome können sich entlang von anatomischen Strukturen ausbreiten. Dringen Tumorzellen in eine Nervenscheide ein und wachsen an dieser entlang, spricht man von einer perineurale Invasion. Sie ist mit einer erhöhten lokalen Rezidivrate, regionalen Lymphknotenmetastasen und einem geringeren Überleben verbunden. [14, 18] In ähnlicher Weise kann es zur Infiltration von Lymph- oder Blutgefäßen kommen. Beides ist mit einer erhöhten Rezidivrate und regionalen Lymphknotenmetastasen vergesellschaftet. [14, 19, 20]

### 1.3. TNM-Klassifikation

Die krebsspezifische Stadieneinteilung erfolgt nach der im Jahr 1959 durch das American Joint Committee on Cancer (AJCC) und die International Union for Cancer Control (UICC) in gemeinsamer Arbeit entwickelten TNM-Klassifikation. [21] Die TNM-Klassifikation beschreibt die anatomische Tumorausdehnung anhand der Attribute Tumor (T), Lymphknoten (N) und Metastasen (M). Der T-Status gibt hierbei die Größe und Ausdehnung des Primärtumors an, der N-Status bezieht sich auf das Vorhandensein und die Ausdehnung von regionalen Lymphknoten und der M-Status beschreibt das Vorliegen oder Fehlen von Fernmetastasen. [22] Unter Berücksichtigung des T-, N- und M-Status kann der Tumorerkrankung ein übergeordnetes Stadium von I – IV zugeordnet werden. [23]

Dieses Klassifizierungssystem ist von entscheidender Bedeutung für die Bestimmung des Ausmaßes einer Krebserkrankung, die stadiengerechte Therapie, die Vergleichbarkeit in klinischen Studien sowie zur Beurteilung der Prognose. [21]

Sie wird in regelmäßigen Abständen überarbeitet und aktualisiert. Aktuell befindet sie sich in der 8. Auflage. Die TNM-Klassifikation ist für die Tumore der Lippen und Mundhöhle in Abbildung 1 und 2 dargestellt. [22]

## **cTNM: Klinische Klassifikation**

### **T Primärtumor**

- TX Primärtumor kann nicht bestimmt werden
- T0 Kein Anhalt für Primärtumor
- Tis Carcinoma in situ
- T1 Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung und 5 mm oder weniger maximale Invasionstiefe
- T2 Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung und mehr als 5 mm aber nicht mehr als 10 mm maximale Invasionstiefe Tumor mehr als 2 cm aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung und nicht mehr als 10 mm maximale Invasionstiefe
- T3 Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder maximale Invasionstiefe von mehr als 10 mm
- T4a Lippe: Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen, den N. alveolaris inferior, in Mundhöhlenboden oder in Haut (Kinn oder Nase)
- T4a Mundhöhle: Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen der Maxilla oder Mandibula, in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hypoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
- T4b Lippe und Mundhöhle: Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

#### **Anmerkung:**

Eine nur oberflächliche Erosion des Knochens oder eines Zahnfaches durch einen Primärtumor der Gingiva berechtigt nicht zur Einordnung des Tumors als T4a.

### **N Regionäre Lymphknoten**

- Nx Regionäre Lymphknoten können nicht bestimmt werden
- N0 Keine Regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung ohne extranodale Ausbreitung
- N2 Metastase(n) wie nachfolgend beschrieben:
- N2a Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N2b Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N2c Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N3a Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- N3b Metastase(n) in einem einzelnen oder multiplen Lymphknoten, klinisch mit extranodaler Ausbreitung

#### **Anmerkung**

Das Vorhandensein einer Beteiligung (Invasion) der Haut oder der Weichteile oder klinische Zeichen einer Nervenbeteiligung wird als klinische extranodale Ausbreitung angesehen. In der Mittellinie gelegene Lymphknoten gelten als ipsilateral.

Abbildung 1: TNM-Klassifikation der malignen Tumore, 8. Auflage, Lippen und Mund, Teil 1 [23]

<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

**pTNM: Pathologische Klassifikation**

- pN0 Selektive Neck-Dissection und histologische Untersuchung üblicherweise von 6 oder mehr Lymphknoten oder radikale oder modifiziert-radikale Neck-Dissection und histologische Untersuchung üblicherweise von 10 oder mehr Lymphknoten. Wenn die Größe ein Kriterium für die pN-Klassifikation ist, werden die Metastasen, nicht die Lymphknoten gemessen.
- pNX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden.
- pN0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- PN1 Metastase(n) in solitären ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung ohne extranodale Ausbreitung
- pN2 Metastase(n) wie nachfolgend beschrieben:
- pN2a Metastase(n) in solitären ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung mit extranodaler Ausbreitung oder mehr als 3 cm aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
  - pN2b Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keine mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
  - pN2c Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- pN3a Metastase(n) in einem Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung
- pN3b Metastase(n) in einem Lymphknoten mehr als 3 cm in größter Ausdehnung mit extranodaler Ausbreitung oder in multiplen ipsilateralen, kontralateralen oder bilateralen Lymphknoten mit extranodaler Ausbreitung

**Stadien - Lippen und Mundhöhle**

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IVA	T4a	N0, N1	M0
	T1, T2, T3, T4b	N2	M0
Stadium IVB	jedes T	N3	M0
	T4b	jedes N	M0
Stadium IVC	jedes T	jedes N	M1

Abbildung 2: TNM-Klassifikation der malignen Tumore, 8. Auflage, Lippen und Mund, Teil 2 [23]

In der aktuellen Auflage wurden folgende Änderungen bezogen auf die Kopf-Hals Tumore eingeführt. Das HPV-assoziierte (p16-vermittelte) Oropharynxkarzinom hat seine eigene Tumorentität und TNM-Klassifikation bekommen. Ein größeres Verständnis des biologischen Verhaltens und der prognostischen Ungenauigkeit unter der vorherigen Klassifikation hatten zu diesem Entschluss geführt. [21, 22]

Zudem erfolgte zur Verbesserung der prognostischen Genauigkeit die Modifizierung des T-Status durch Aufnahme der Variable „depth of invasion“ (DOI) (Tiefe der Invasion) für Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle. [21, 22] Diese Neuerung basiert auf mehreren Studien, die gezeigt haben, dass die Invasionstiefe ein wichtiger Prädiktor für die Prognose ist. [24, 25] Anstelle der gesamten Tumordicke wird hier die maximale Infiltrationstiefe in Bezug auf die intakte Schleimhaut betrachtet. Somit unterscheidet sie sich von der klinischen Tumordicke vor allem bei exophytisch wachsenden Tumoren und Tumoren mit Ulzerationen. [26] Lee et al. zeigten in einer retrospektiven Studie, dass es unter Einbeziehung der DOI in 12,4% der Fälle zu einem Upstaging des T-Status kam. Patienten, die sich aufgrund der neuen Klassifikation in einem höheren Tumorstadium befanden, wiesen eine geringere 5-Jahres-Überlebensrate auf als die Patienten des vorherigen Tumorstadiums. [27]

Der N-Status wurde durch Aufnahme der Variable „extranodal extension“ (ENE) (extranodales Wachstum) für nicht-viral bedingte Kopf-Hals-Tumore erweitert. Es beschreibt den Durchbruch von Tumorzellen durch die Kapsel eines Lymphknotens und die Infiltration des umliegenden Gewebes. [21, 22]

#### 1.4. Staging-Untersuchung

Bei klinischem Verdacht auf eine maligne Neubildung erfolgt zunächst die Probenbiopsie. [21] Nach der aktuellen Leitlinie besteht die Empfehlung Schleimhautveränderungen im Mundraum, die länger als zwei Wochen persistieren, abzuklären. [13]

Die histopathologische Begutachtung und Bestimmung der Entität und Dignität ist entscheidend, um nach der zutreffenden TNM-Klassifikation zu bewerten. [21] Bei klinisch nahezu eindeutigem Befund eines Mundhöhlenkarzinoms wird die

Probiopsie erst nach Anfertigung der Bildgebung empfohlen, um diese nicht zu verfälschen. [28]

Man unterscheidet im Staging den klinischen TNM-Status mit dem Präfix "c" von dem histopathologischen TNM-Status mit dem Präfix "p". Der cTNM-Status wird prätherapeutisch erhoben und beruht auf klinischen sowie endoskopischen Untersuchungen und bildgebenden Verfahren. Er ist maßgeblich für die Entscheidungsfindung über die Art und das Ausmaß der primären Therapie. Der pTNM-Status wird postoperativ an dem Tumor- und Lymphknotenpräparat bestimmt. Dieser Befund ist für die Stadieneinteilung gültig und ersetzt bei Abweichungen zum cTNM-Status diesen. [23]

Die Übereinstimmung des zunächst klinisch erhobenen Stadiums mit dem histopathologischen Stadium liegt bei 87,3% (T-Status) beziehungsweise 82,5% (N-Status). Wobei es jeweils in ca. 70% der Nichtübereinstimmungen zu einem Upstaging nach histologischer Aufbereitung kommt. [29]

Zur Bestimmung der lokalen Ausdehnung des Primärtumors und der regionalen Metastasierung in Lymphknoten erfolgt eine Bildgebung des Halses, um den cT- und cN-Status festzulegen. Als Untersuchungsmethoden werden die kontrastmittelgestützte Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) empfohlen. [13]

Mit Hilfe der CT lässt sich die Tumorausdehnung und lokale Knocheninfiltration gut darstellen. Die Sensitivität der CT beim Nachweis von Tumoren liegt bei 41 – 82% (Spezifität 82 – 100%) und beim Nachweis von Knocheninfiltration bei 63 – 80% (Spezifität 81 – 100%). Lymphknotenmetastasen lassen sich mit einer Sensitivität von 74% und Spezifität von 85% ausschließen. Das CT ist einfach verfügbar und wird aufgrund der kurzen Untersuchungszeit gut von den Patienten toleriert. Limitationen der Untersuchung sind kleine und hoch differenzierte Karzinome. [30] Zudem ist die Untersuchung im Vergleich zur MRT anfälliger für Artefakte durch metallische Restaurationen oder Implantate [13] und erfordert jodhaltigen Kontrast und ionisierende Strahlung. [31]

Die MRT ermöglicht eine Untersuchung ohne ionisierende Strahlung oder jodhaltige Kontrastmittel. [31] Sie besitzt im Vergleich zur CT eine höhere Sensitivität in Bezug auf die Darstellung und Beurteilung von Weichteilen. [30] Hierdurch lassen sich vor allem sehr kleine Karzinome detektieren und das intramuskuläre Wachstum sowie das Wachstum entlang von Gefäßen oder Nerven besser beurteilen. [13, 31] Lymphknotenmetastasen lassen sich mit einer Sensitivität von 51 – 74% (Spezifität 95 – 100%) beurteilen. [30] Die Patientenverträglichkeit ist bei deutlich längerer Untersuchungszeit geringer als beim CT. Zudem ist sie anfällig für Bewegungsartefakte. [31]

Bei guter Beurteilbarkeit und leichter Verfügbarkeit wird häufig die CT für die Erstuntersuchung, die präoperative Planung und die postoperative Nachsorge genutzt. Die MRT wird vor allem bei Tumoren genutzt, bei denen eine perineurale, knorpelige oder knöcherne Invasion im CT verdächtig ist oder eine Kontraindikation gegen eine CT (Allergie oder Niereninsuffizienz) besteht. [31]

Die Kombination der CT oder MRT mit einer Positronen-Emissions-Tomographie ermöglicht die Erhöhung der Sensitivität. Diese liegt deutlich über der diagnostischen Genauigkeit der einzelnen Untersuchungsmodalitäten. [29] Bei einer hohen Rate an falsch positiven Befunden vor allem bei kleinen Lymphknoten, wird diese Methode im Staging als ungeeignet angesehen. [13]

Zur Standarduntersuchung der Halslymphknoten zählt der Ultraschall. Es ist eine kosteneffektive Untersuchungsmethode, die ohne ionisierende Strahlung eine gute Beurteilung der zervikalen Lymphknoten ermöglicht. [32] Zur Beurteilung sind die oberflächlichen Regionen des Halses zugänglich. Daher ist sie als allein stehende Untersuchung zur Beurteilung des Lymphknotenstatus unzureichend. [30] Die Sonographie kann jedoch bei der Untersuchung der submentalen und submandibulären Regionen nützlich sein, bei welchen eine CT-Untersuchung aufgrund von Artefakten durch den Unterkiefer, metallische Füllungen oder Implantate keine genaue Darstellung ermöglicht. [31]

Das Vorhandensein von zervikalen Lymphknotenmetastasen ist eine der wichtigsten prognostischen Parameter. Sie treten bei 40% der Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle auf. Bei 15 – 34% werden diese nicht

klinisch oder radiologisch diagnostiziert, sondern erst in der pathologischen Begutachtung entdeckt. [21]

Abhängig von der Größe des Primärtumors liegt die Inzidenz von Fernmetastasen eines synchronen Zweittumors bei 4,3 – 30%. Die Fernmetastasierung ist selten und erfolgt vorwiegend in die Lunge. [7] Zur Festlegung des M-Status und Ausschluss von Zweitkarzinomen wird vor Therapiebeginn bei Patienten mit einem cT3- oder cT4-Status ein CT des Thorax empfohlen. Zudem wird bei allen Patienten die endoskopische Untersuchung des Larynx und Pharynx und ein Ultraschall des Abdomens empfohlen. Bei auffälligen Untersuchungsbefunden sollte eine Panendoskopie erfolgen. [13]

## 1.5. Grading

Das Grading wurde erstmals 1920 von Broders beschrieben und später von der World-Health-Organization (WHO) zur Klassifizierung von Kopf-Hals-Tumoren übernommen. Hierbei werden Tumore anhand von histopathologischen Merkmalen in vier Differenzierungsgrade eingeteilt. [26] Es werden hochgradig differenzierte (G1), mittelgradig differenzierte (G2), geringgradig differenzierte (G3) und undifferenzierte Tumore (G4) unterschieden. [23] Berücksichtigt wird der Grad der Keratinisierung, zellulären und nukleären Pleomorphie und die mitotische Aktivität der Tumorzellen. [33] Gut differenzierte Plattenepithelkarzinome ähneln weitestgehend dem normalen Plattenepithel. Je niedriger der Differenzierungsgrad der Zellen ist, desto ausgeprägter ist der Kernpleomorphismus und die mitotische Aktivität. Die Keratinisierung nimmt ab. Die meisten Karzinome der Mundschleimhaut sind mäßig differenziert (G2). [14]

Die prognostische Vorhersagewahrscheinlichkeit basierend auf diesem Klassifizierungssystem ist jedoch umstritten. Zahlreiche Studien zeigten eine mangelnde Korrelation zwischen den oben genannten morphologischen Parametern und dem klinischen Ergebnis. [33]

Alternative Grading-Systeme beziehen sich auf das Wachstumsmuster an der Invasionsfront und auf das Ausbilden kleiner Tumorzellnester. Verglichen mit dem

histologischen Grading der WHO zeigte diese in einigen Untersuchungen eine höhere prognostische Wertigkeit. [17, 34, 35]

Die zuletzt durch Brandwein-Gensler modifizierte Einteilung des Infiltrationsmusters bzw. Pattern of Invasion (POI) teilt das Wachstumsverhalten des Tumors an der Invasionsfront in 5 Grade ein.

- POI 1: verdrängende, breite und gut abgrenzbare Invasionsfront
- POI 2: fingerförmiges Infiltrationsmuster
- POI 3: kleine Tumorzellnester oder -stränge > 15 Zellen
- POI 4: kleine Tumorzellnester < 15 Zellen oder Zellvereinzelnung
- POI 5: Tumorsatelliten, mindestens 1 mm vom Haupttumor entfernt

[34]

POI 4 und besonders POI 5 zeigen sich in vielen Untersuchungen als negativer Prognosefaktor. [36-38]

Parallel existiert das Konzept des Tumor Buddings. Es beschreibt das Auflösen des Tumorzellverbandes in kleine Zellnester an der Invasionsfront. Es findet in dem Grading-System von Boxberg et al. Anwendung. Betrachtet wird hier zum einen die Budding Aktivität als maximale Anzahl von Tumor Buds in einem Hauptgesichtsfeld (HPF) und zum anderen die geringste Größe eines vorliegenden Zellnestes. Das Vorhandensein von einzelnen Tumorzellen im Stroma wurde als kleinste Form eines Tumorzellnestes definiert und „single cell invasion“ (Zellvereinzelnung) benannt. Mithilfe eines Punktesystems erfolgt die Einteilung in drei Differenzierungsgrade (G1-G3). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Grading-System mit der Überlebensrate und der lokoregionalen Kontrolle stark korreliert. [39, 40]

## 1.6. Tumor Budding und Tumorzellvereinzelnung

Tumor Budding beschreibt die Ausbildung kleiner Tumorknospen von einzelnen oder wenigen Tumorzellen an der Invasionsfront des Tumors. Diese sind von der Haupttumormasse abgelöst und infiltrieren in das umliegende Gewebe. [41, 42] Das Auflösen des Zellverbundes und die aktive Invasion sind Merkmale für ein besonders aggressives Wachstum. [43] Erstmals erfolgte die Beschreibung dieses

histopathologischen Merkmals durch Imai et al. im Jahre 1949 für das kolorektale Karzinom. [44] Seither wird es in vielen Publikationen als histopathologischer Risikofaktor für die Prognose solider Tumorerkrankungen unterschiedlicher Lokalisationen beschrieben. [45-50]

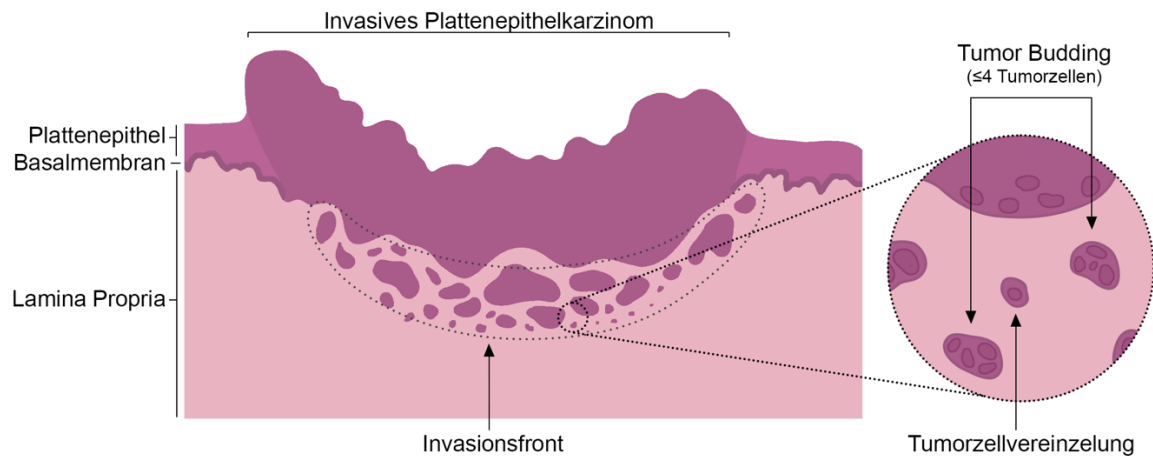


Abbildung 3: Grafische Darstellung eines Plattenepithelkarzinoms mit Ausbildung von Tumor Buds und Tumorzellvereinzelung. Angelehnt an Kawachi et al. 2015, Abbildung 1 [47]

In der International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) wurde 2016 eine standardisierte Methode zur Auswertung des Tumor Buddings für das kolorektale Karzinom erarbeitet, da die Relevanz als unabhängiger prognostischer Faktor vor allem für diese Tumorentität in vielen Studien gezeigt werden konnte. [41, 47-49] Ein Tumor Bud wurde in dieser Konferenz als eine einzelne Tumorzelle oder ein Zellverbund von bis zu vier Tumorzellen definiert. Die Bestimmung erfolgt an einem Präparat mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) innerhalb der Invasionsfront. Betrachtet wird ein Bereich mit einer besonders hohen Dichte an Tumor Buds (Hotspotmethode) und gezählt werden die vorhandenen Tumor Buds in einem HPF von  $0.785 \text{ mm}^2$ . [41] In Übereinstimmung mit der Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum wurde sich für eine dreistufige Einteilung entschieden:

- Geringes Tumor Budding: 0 – 4 Buds
- Mäßiges Tumor Budding: 5 – 9 Buds
- Hohes Tumor Budding: 10 oder mehr Buds

[47]

Xie et al. zeigte, dass die von der ITBCC empfohlenen Bewertungskriterien auch für das Mundhöhlenkarzinom eine zuverlässige und einfache Methode zur Beurteilung des Tumor Buddings darstellt. [51]

In einer Metaanalyse aus 2018, durchgeführt von Almangush et al., wurde unter Einbeziehung von 16 Studien der prognostische Wert des Tumor Buddings bei Mundhöhlenkarzinomen untersucht. Hierbei konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Tumor Budding und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen gezeigt werden. Zudem zeigte sich das Tumor Budding als signifikanter negativer Prognosefaktor für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben. [52]

Eine aktuellere Metaanalyse von Dolens et al. aus 2021 konnte diesen Zusammenhang für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben ebenfalls nachweisen und wies zusätzlich eine signifikant reduzierte krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit bei vorhandenem Tumor Budding nach. [53]

Das rezidivfreie Überleben zeigte sich auch in der Analyse von Wahab et al. aus 2022 signifikant reduziert. [52] Weitere Publikationen zeigten eine signifikante Assoziation von Tumor Budding mit der Tumorgröße, der Infiltrationstiefe, dem Differenzierungsgrad und Lymphknotenmetastasen. [43, 51, 54-56] In der Studie von Boxberg et al. konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Tumorzellen innerhalb eines Tumor Buds einen signifikanten Einfluss auf die Prognose hat. Das geringste Gesamtüberleben sowie krebsspezifische und rezidivfreie Überleben wiesen Tumore mit Zellvereinzelnung. [39]

Als zugrunde liegender Mechanismus für das Tumorbudding wird von mehreren Autoren eine Epitheliale-Mesenchymale-Transformation (EMT) der Zellen vermutet. [43, 57, 58] Im Rahmen der EMT unterlaufen polarisierte Epithelzellen, die regulär über Membranproteine mit der Basalmembran und Nachbarzellen interagieren, biochemische Veränderungen und nehmen einen mesenchymalen Phänotyp an. Dieses ermöglicht das Lösen aus dem Zellverbund und erhöht die Migrationsfähigkeit, die Invasivität sowie Apoptoseresistenz. [59] Zellen innerhalb der Tumorbuds weisen eine verringerte Expression von E-Cadherin und eine Zunahme von Vimentin auf. [43] Zudem ist die Expression der

Transkriptionsfaktoren Snail und Twist erhöht. [57] Diese biochemischen Veränderungen sprechen für eine EMT als biochemischer Mechanismus des Tumor-Buddings. [43, 57]

## 1.7. Therapie des Mundhöhlenkarzinoms

Die Therapieempfehlung wird unter Berücksichtigung aller vorliegenden Befunde und den aktuellen Leitlinien im interdisziplinären Tumorboard für Kopf-Hals-Tumore beschlossen und mit dem Patienten besprochen. [13] Für die Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms in kurativer Absicht besteht die Möglichkeit der primär chirurgischen Resektion mit oder ohne anschließender Radiotherapie bzw. Radiochemotherapie. Alternativ kann eine primäre Radio-(chemo-)therapie erfolgen. [13, 60-62]

Die Art und der Umfang der Therapie wird an das Risikoprofil der Tumorerkrankung angepasst. Die Risikostratifizierung wird anhand der Lokalisation, der lokalen Ausdehnung und histopathologischen Risikofaktoren des Primarius vorgenommen. [60, 61]

Für die Therapieentscheidung ist darüber hinaus maßgeblich der Allgemeinzustand des Patienten, die voraussichtlichen funktionellen und ästhetischen Einschränkungen sowie die Erfolgsaussichten und der Patientenwunsch entscheidend. [13, 61]

Etwa 30% bis 40% der Patienten weisen eine Erkrankung im Stadium I oder II auf, die mit einer alleinigen Operation oder einer alleinigen definitiven Strahlentherapie heilbar ist. Beide Therapieoptionen können Patienten mit Tumoren im Frühstadium eine ähnliche onkologische Kontrolle und Überleben bieten. [28] Das rezidivfreie Überleben liegt nach alleiniger chirurgischer Therapie für Tumore im Frühstadium (T1 und T2) ohne weitere Risikofaktoren nach 5 Jahren bei über 90%. [63]

Okkulte Metastasen in den ableitenden Halslymphknoten können bereits bei kleinen, invasiven Primärtumoren vorhanden sein. [16] Auch ohne klinischen Hinweis auf Lymphknotenmetastasen bestehen sie in ca. 30% der Fälle. [64]

Aus diesem Grund besteht die Empfehlung unabhängig vom T-Status in Kombination mit der chirurgischen Resektion des Primarius eine Ausräumung der Halslymphknoten durchzuführen. Dies erfolgt im Sinne einer selektiven Neck-Dissection von Level I-III nach Robbins. Zeigen sich in der histopathologischen Begutachtung Lymphknotenmetastasen oder liegt bereits klinisch der Verdacht vor, sollte eine radikale oder modifiziert radikale Neck-Dissection bis einschließlich Level V erfolgen. [13, 16]

Zudem kann in Kombination mit der Operation eine adjuvante Nachbehandlung in Form einer Radio-(chemo-)therapie erfolgen. Diese führt bei Tumoren mit großer Ausdehnung, Lymphknotenbefall oder ungünstigen histopathologischen Risikofaktoren zu einer Verbesserung der lokoregionalen Kontrolle. [13, 60, 61, 65-68] Bei der Radiotherapie beträgt die übliche Gesamtstrahlendosis 60-66 Gy. Die Applikation erfolgt bei der konventionell fraktionierten Bestrahlung einmal täglich und fünfmal wöchentlich mit 1,8 - 2,0 Gy. [13, 69]

Die adjuvante Nachbehandlung sollte innerhalb von 6 Wochen nach erfolgter Operation beginnen. Bei Überschreiten dieses Zeitfensters steigt das Risiko für ein Rezidiv. [70]

Die Indikation zu einer adjuvanten Strahlentherapie wird nach der aktuellen S3 Leitlinie - Mundhöhlenkarzinome wie folgt definiert:

- Lokal fortgeschrittenes Tumorstadium (T3 und T4)
- Lymphknotenbefall (N+)
- Perineurale Invasion (Pn1) oder Gefäßinvasion (V1) [13]

Lokal fortgeschrittene Karzinome der Mundhöhle (T3 und T4) weisen nach alleiniger primär chirurgischer Therapie oder Radiotherapie eine erhöhte Rezidivrate auf. [62] Bei dieser Tumorausdehnung wird eine primär chirurgische Therapie mit einer adjuvanten Bestrahlung empfohlen. [13] Im Vergleich zur alleinigen chirurgischen Therapie zeigen Patienten mit einer adjuvanten Radiotherapie ein signifikant erhöhtes krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben. [67]

Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen stellt ebenfalls einen bedeutenden Risikofaktor dar und ist mit einem signifikant reduzierten Überleben

assoziiert. [6, 71] Bereits früh konnten Studien eine verbesserte Überlebensrate durch die Kombination einer chirurgischen Therapie mit einer adjuvanten Bestrahlung zeigen. [72, 73] Die Studie von Lavaf et al. untersuchte 8795 Patienten mit positivem Lymphknotenbefall. Für Patienten, die eine adjuvante Therapie erhalten haben, konnte ein absoluter Anstieg der krebspezifischen 5-Jahres-Überlebensrate und der Gesamtüberlebensrate um etwa 10% beobachtet werden. [74]

Zusätzlich zu einer adjuvanten Bestrahlung kann die Gabe eines platinhaltigen Chemotherapeutikums (Cisplatin, Carboplatin) im Sinne einer Radio-Chemotherapie erfolgen. Sie ist beim Vorliegen folgender histopathologischer Risikofaktoren nach der aktuellen S3 Leitlinie - Mundhöhlenkarzinome empfohlen:

- extrakapsuläres Tumorwachstum (ENE +)
- Resektionsrand < 5 mm oder Tumor randbildend (R 1) [13]

Ein positiver R- und/oder ENE -Status gilt als Hochrisiko für ein Tumorrezidiv. [61] Die zusätzliche Gabe einer Chemotherapie zur postoperativen Radiotherapie bei diesen Patienten führt im Vergleich zu einer alleinigen adjuvanten Bestrahlung nach Bernier et al. und Cooper et al. zu einer signifikant verbesserten lokoregionalen Kontrolle und Überleben. [68, 75, 76]

## 1.8. Therapiebeeinflussende histopathologische Risikofaktoren

Neben dem T- und dem N-Status sind zunehmend histopathologische Risikofaktoren in der Beurteilung und Therapieempfehlung von Bedeutung. [13] Dies zeigt sich durch die Aufnahme der Kriterien DOI und ENE in die Klassifizierung und Stadieneinteilung von Mundhöhlenkarzinomen nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation. [23]

Mundhöhlenkarzinome, die ehemals unter alleiniger Betrachtung der Gesamttumorgroße einem pT1- oder pT2-Status entsprachen, werden bei Überschreiten einer Infiltrationstiefe von 10mm zu einem pT3 Tumor hochgestuft. [27] Leitliniengerecht erfolgt eine aggressivere Therapie im Sinne einer adjuvanten Radiotherapie. [13] Die Therapierelevanz histopathologischer Merkmale

zeigt sich ebenfalls beim ENE-Status. Dieser wird in der aktuellen TNM-Klassifikation miteinbezogen und kann zu einer Hochstufung des N-Status führen. [23] Zusätzlich besteht nach der aktuellen Leitlinie die Empfehlung zu einer kombinierten Radiochemotherapie bei positivem ENE-Status. [13]

Weitere in die Leitlinie aufgenommene histopathologische Risikofaktoren stellen die perineurale Invasion und die Infiltration von Blutgefäßen dar. Für beide Risikofaktoren besteht die Empfehlung zu einer adjuvanten Radiotherapie. Andere histopathologische Risikofaktoren, wie das Tumor Budding, werden aktuell nicht in der Therapieplanung berücksichtigt. [13]

Die Relevanz des Tumor Buddings in der Therapieplanung zeigt sich in der aktuellen Leitlinie zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms. Laut dieser kann das Tumor Budding bei pT1 Tumoren als zusätzlicher Parameter herangezogen werden, um zwischen einer Situation mit einem niedrigen oder hohen Risikoprofil zu unterscheiden. [77] Diese Empfehlung basiert auf mehreren Studien, welche ein erhöhtes Risiko für Lymphknotenmetastasen bei vorhandenem Tumor Budding zeigten. [47-49] Demnach ist bei pT1-Karzinomen mit einem geringen Risikoprofil eine lokale endoskopische Abtragung ausreichend. Demgegenüber wird bei pT1-Karzinom mit einem erhöhten Risikoprofil die radikale chirurgische Behandlung empfohlen. [77] Zusätzlich spricht sich die ITBCC für eine Berücksichtigung des Tumor Buddings bei der Indikationsstellung für eine adjuvante Chemotherapie bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom im Stadium II nach UICC aus. [41]

Bezogen auf das Mundhöhlenkarzinom konnte in mehreren Publikationen gezeigt werden, dass eine hohe Budding Aktivität mit einer signifikant schlechteren Prognose und mit Lymphknotenmetastasen assoziiert ist. [36, 37, 43, 50-53, 55-58] Hinweise auf eine Therapierelevanz liefert die Publikation von Attramadal et al.. In dieser zeigten Patienten mit einer hohen Budding Aktivität tendenziell eine geringere Rezidivrate, wenn die chirurgische Therapie mit einer adjuvanten Radiotherapie kombiniert wurde. [78]

Trotz dieser Erkenntnisse findet die Betrachtung des Tumor Budding in der leitlinienorientierten Therapie des Mundhöhlenkarzinoms derzeit noch keine Anwendung. [13].

## 1.9. Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Beeinflusst das Vorhandensein von Tumor Budding die Überlebens-Outcomes (OS, OCSS und LRFS) bei Patienten mit pT3/pT4 Tumor und pN0/pN+ Hals?
2. Beeinflusst die Tumorzellvereinzelung bei diesen Patienten zusätzlich die genannten Überlebens-Outcomes?

Hieraus lassen sich folgende Hypothesen formulieren:

1. H0: Es gibt keinen Unterschied in den Überlebens-Outcomes (OS, OCSS und LRFS) bei Patienten mit einem pT3/pT4 Tumor und pN0/pN+ Hals mit und ohne Tumor Budding.

H1: Die Alternativhypothese besagt, dass es einen Unterschied in den Überlebens-Outcomes (OS, OCSS und LRFS) bei Patienten mit einem pT3/pT4 Tumor und pN0/pN+ Hals mit und ohne Tumor Budding gibt.

2. H0: Es gibt keinen Zusammenhang zwischen Tumorzellvereinzelung und den Überlebens-Outcomes (OS, OCSS, LRFS).

H1: Die Alternativhypothese besagt, dass es einen Zusammenhang zwischen Tumorzellvereinzelung und den Überlebens-Outcomes (OS, OCSS, LRFS) gibt.

## 2. Material und Methoden

Für die vorliegende Studie wurden Patienten der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck betrachtet. Die Patienten sind in den Jahren zwischen 1992 und 2019 an einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle erkrankt. Die archivierten Tumorpräparate wurden digitalisiert und nach den im Folgenden beschriebenen histopathologischen Kriterien nachuntersucht. Zudem wurde auf die interne Tumordatenbank und das Archiv der Strahlentherapie zugegriffen.

Alle Teilnehmer der Studie unterzeichneten eine Einverständniserklärung, in der sie der Verwendung der gesammelten Daten in anonymisierter Form für die wissenschaftliche Forschung zustimmten. Die Ethikkommission der Universität zu Lübeck hat die Verwendung der Daten in anonymisierter Form am 06.10.2016 genehmigt (ID: 16 – 272A)

### 2.1. Untersuchungskollektiv

Für diese Studie wurde eine Single-Center-Kohorte von insgesamt 1089 Patienten betrachtet, welche in einer prospektiv geführten Tumordatenbank der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Lübeck, Deutschland, dokumentiert wurde. Bei allen Patienten wurden zwischen 1992 und Ende 2019 ein maligner Tumor diagnostiziert und sie unterzogen sich einer tumorspezifischen Therapie. In diese Studie wurden alle Patienten eingeschlossen, welche ein primäres Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle in einem lokal fortgeschrittenen Tumorstadium hatten. Dazu gehörten Tumore mit einem pT-Status von 3 oder 4 mit und ohne Absiedelung in regionale Lymphknoten (pN0-pN3). Zudem wurden nur Patienten eingeschlossen, die eine primär chirurgische Therapie mit oder ohne adjuvante Nachbehandlung im Sinne einer Radiotherapie oder Radiochemotherapie erhalten haben. Patienten die eine primäre oder neoadjuvante Radio-(chemo-)therapie erhalten haben wurden von der Studie ausgeschlossen. Zudem wurden Patienten ausgeschlossen, bei denen eine Fernmetastasierung (M 1) vorlag. Tumore mit einer anderen Entität, Lokalisation außerhalb der Mundhöhle, Tumorrezidive oder Zweittumore des Kopf-Hals-Bereichs wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Als Rezidiv wurden Tumore in direkter Lagebeziehung zum Primarius gewertet, welche innerhalb von fünf Jahren nach erfolgter Therapie entstanden sind und dieselbe Dignität und Entität aufwiesen. Insgesamt wurden 129 Patienten in die Studie eingeschlossen (Abbildung 4).

Alle Patienten wurden im Zeitraum von 1992 bis 2019 an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, operiert und die Therapie erfolgte in einem kurativen Ansatz. Im Falle einer adjuvanten Nachbehandlung erfolgte diese entweder durch die Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck oder auf Patientenwunsch durch eine andere Klinik oder Praxis. Die Tumor- und Lymphknotenpräparate wurden durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, aufgearbeitet und nach den jeweils aktuellen Kriterien untersucht.

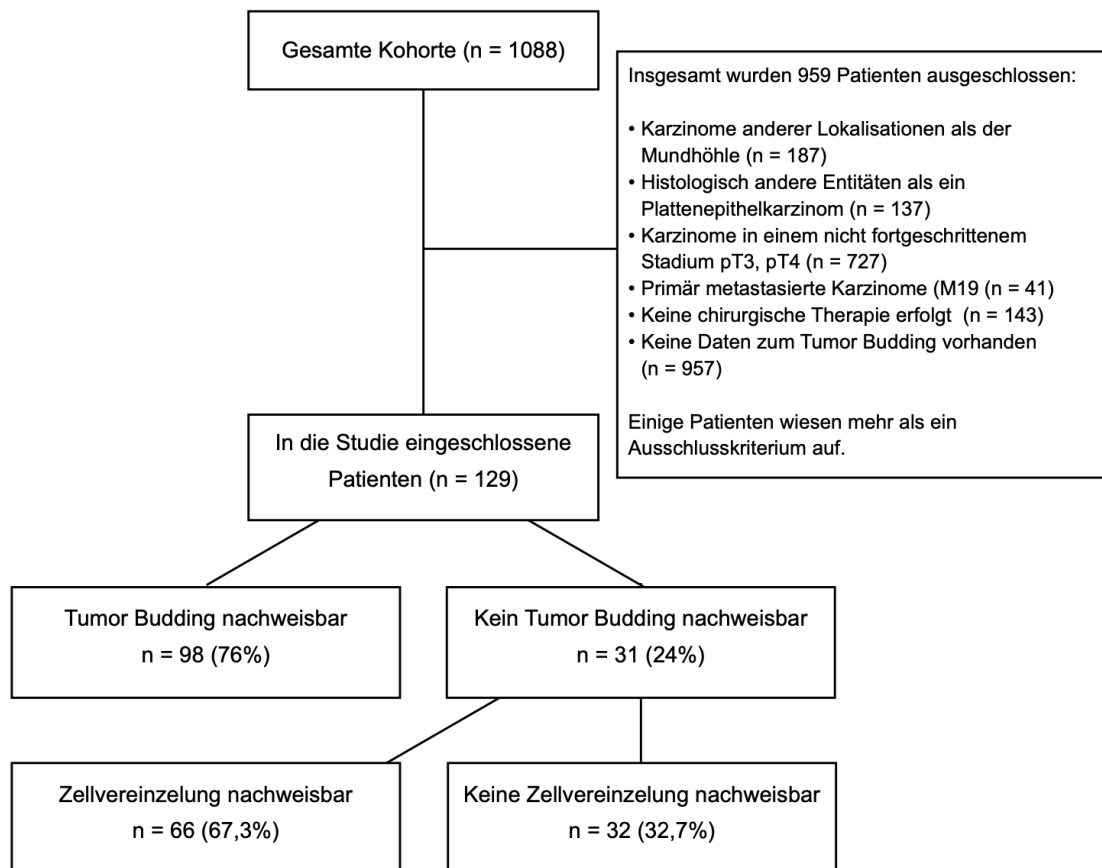


Abbildung 4: Flussdiagramm der Patientenselektion: Ausschlusskriterien und Anzahl der eingeschlossenen Patienten nach Gruppen.

## 2.2. Nachsorge und Endpunkte

Alle Patienten wurden nach Abschluss der erfolgten Therapie in die strukturierte Tumornachsorge eingeschlossen. Die Vorstellung erfolgt initial nach 6 Wochen und im Verlauf der ersten zwei Jahre in einem vierteljährlichen und in den darauffolgenden drei Jahren in einem halbjährlichen Abstand. Die Patienten wurden in diesem Rahmen klinisch untersucht und die regionalen Lymphknoten sonographisch kontrolliert um ein Tumorrezidiv, Zweitkarzinom oder Lymphknotenmetastasen auszuschließen. Bei auffälligen Befunden wurden Probebiopsien oder eine erweiterte Bildgebung veranlasst. Bei einer 5 Jahre anhaltenden Remission wurden die Patienten aus der Tumornachsorge ausgeschlossen.

Remission, Rezidive und das Versterben des Patienten wurde über die Tumornachsorge in eine prospektiv geführte interne Tumordatenbank eingepflegt, sodass hieraus die Überlebens-Outcomes abgeleitet werden konnten.

Die Überlebensdauer wurde ab dem Zeitpunkt der Erstdiagnose gemessen. Der Endpunkt des Gesamtüberlebens (OS) beschreibt die Dauer bis zum Tod aus beliebiger Ursache, wohingegen der Endpunkt des krebsspezifischen Überlebens (OCSS) den Tod durch das orale Plattenepithelkarzinom darstellt. Patienten, die nach Abschluss des Beobachtungszeitraumes von 5 Jahren nach chirurgischer Therapie noch am Leben waren, wurden als zensiert betrachtet. Das lokoregionale rezidivfreie Überleben (LRFS) wurde bis zum Auftreten eines lokalen oder Lymphknotenrezidivs gemessen.

Patienten bei denen für das Studiendesign relevante Variablen weder vorlagen noch retrospektiv erhoben werden konnten, wurden ausgeschlossen.

## 2.3. Datenerhebung

### 2.3.1. Demographische und tumorspezifische Daten

Alle Tumorpatienten, die in der Klinik für Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie behandelt wurden, werden seit 1992 in einer internen prospektiv geführten Datenbank erfasst. In dieser werden demographische Daten wie das Geburtsdatum und das Geschlecht sowie tumorspezifische Daten wie der Zeitpunkt der Diagnosestellung und das Tumorstadium erfasst. Ebenfalls sind in der Datenbank das Operationsdatum und die Art der primären Therapie und ggf. adjuvanten Therapie hinterlegt. Zudem existierten Daten über die Dauer der Remission bzw. die Dauer bis zum Eintreten eines Rezidivs oder dem Versterben des Patienten.

Die Datenbank wurde im Verlauf der Zeit erweitert, sodass sie bezogen auf die vorliegende Studie nicht vollständig war. Fehlende Daten konnten mithilfe der Krankenakten und Arztbriefe komplettiert werden, welche seit 2015 in digitalisierten Archiven und seit 2019 im Krankenhaus-Informationssystem, ORBIS, hinterlegt sind. Nicht digitalisierte Patientenakten konnten im Original aus den Archiven des UKSH Campus Lübeck herausgesucht werden.

### 2.3.2. Risikofaktoren und Komorbidität

Als relevante Risikofaktoren wurden aktiver und terminierter Nikotinkonsum und starker Alkoholkonsum erhoben.

Die aktualisierte Version des Charlson-Komorbiditätsindex (CCI) wurde verwendet, um Komorbiditäten zu erfassen. Hierbei wird anhand von zwölf prognostisch relevanten Nebendiagnosen eine Punkteanzahl vergeben, welcher mit der tumorunabhängigen Mortalität innerhalb eines Jahres korreliert. [79] In dieser Arbeit wurde zwischen einem CCI-Score von 0 (keine signifikanten Komorbiditäten) und einen CCI-Score von  $\geq 1$  (mindestens eine prognostisch signifikante Nebendiagnose) unterschieden.

### 2.3.3. Strahlentherapeutische Daten

Die Information, ob eine adjuvante Bestrahlung ggf. in Kombination mit einer Chemotherapie nach erfolgter chirurgischer Therapie stattgefunden hat, war größtenteils in der internen Datenbank hinterlegt. Gründe für eine trotz Indikation nicht erfolgte Bestrahlung waren nicht dokumentiert. Diese konnten mithilfe der Strahlentherapieberichte und Arztbriefe aus den Digital- und Papierarchiven ermittelt werden. Ebenfalls bestand zum Teil die Möglichkeit die fehlenden Daten über die Gerätesoftware der Bestrahlungsgeräte und die Datenbank der Klinik für Strahlentherapie abzurufen. Die Befunde zu extern durchgeführten Bestrahlungen lagen in der Regel in den Patientenakten vor oder konnten angefordert werden.

### 2.3.4. Histopathologische Auswertung

Die TNM-Klassifikation wurde bereits in die interne Datenbank übertragen und konnte direkt übernommen werden. Das Tumor Budding und die Tumorzellvereinzelung wurde bisher nicht erfasst. Zur Erhebung dieser Daten wurden alle originalen Tumorpräparate in Form von histologischen Schnitten anhand der Journalnummer aus dem Archiv herausgesucht. Diese lagen zum Zeitpunkt der Datenerhebung bis zum Jahr 1996 vor. Die Präparate entstammten aus der Routine-Diagnostik und wiesen alle eine Hämatoxylin- Eosin (HE)-Färbung auf. Präparate, die nicht vorhanden, beschädigt oder verblasst waren, wurden anhand der ebenfalls archivierten Parafinblöcke neu geschnitten und mit HE gefärbt.

Die histopathologische Auswertung wurde mit der Unterstützung eines erfahrenen Kopf- und Halspathologen des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, durchgeführt. Dieser war gegenüber den klinischen Daten zum Zeitpunkt der Bewertung verblindet.

Zunächst erfolgte die Sichtung aller histologischen Schnitte unter dem Lichtmikroskop und es wurde pro Fall ein repräsentatives Präparat mit maximaler Tumorausdehnung und Bezug zur gesunden Mundschleimhaut ausgewählt. Diese wurden anschließend mit dem Ventana iScan HT eingescannt und in Form eines Whole Slide Image (WSI) digitalisiert. Die Betrachtung und Auswertung der WSI

erfolgte in der Software QuPath (Version 0.2.1). Die Bestimmung des Tumor Buddings und der Tumorzellvereinzelung erfolgte nach der im Folgenden beschriebenen Methode.

#### 2.3.4.1. Auswertung des Tumor-Budding und Tumorzellvereinzelung

Der Empfehlung der ITBCC folgend wurde ein Tumor Bud als ein Zellnest mit weniger als fünf Tumorzellen und ohne Kontakt zur Haupttumormasse definiert. [41] Tumorzellvereinzelung wurde als isolierte, vom restlichen Tumor abgesonderte, einzelne Tumorzellen definiert. [39, 40]

Die Beurteilung erfolgte innerhalb der Invasionsfront in einem Bereich mit einer hohen Dichte an Tumor Buds (Hotspot-Region). [41] Dieses ist in Abbildung 5 exemplarisch dargestellt.

Die Anzahl an Tumor Buds wurde bei einer hohen Vergrößerung (x300) innerhalb eines digitalen Hauptgesichtsfelds (HPF) von 795 x 960  $\mu\text{m}$  nummerisch erfasst. Als kleinste Form eines Tumor Buds wurden isolierte Tumorzellen zu der Gesamtheit der Tumor Buds gezählt. Zusätzlich wurde das Vorhandensein von Tumorzellvereinzelung als Variable dichotom erfasst.

In der Beurteilung des Tumor budding wurde kein Grenzwert angelegt. Bereits ab einem Tumor Bud wurde Tumor Budding als vorhanden gewertet.

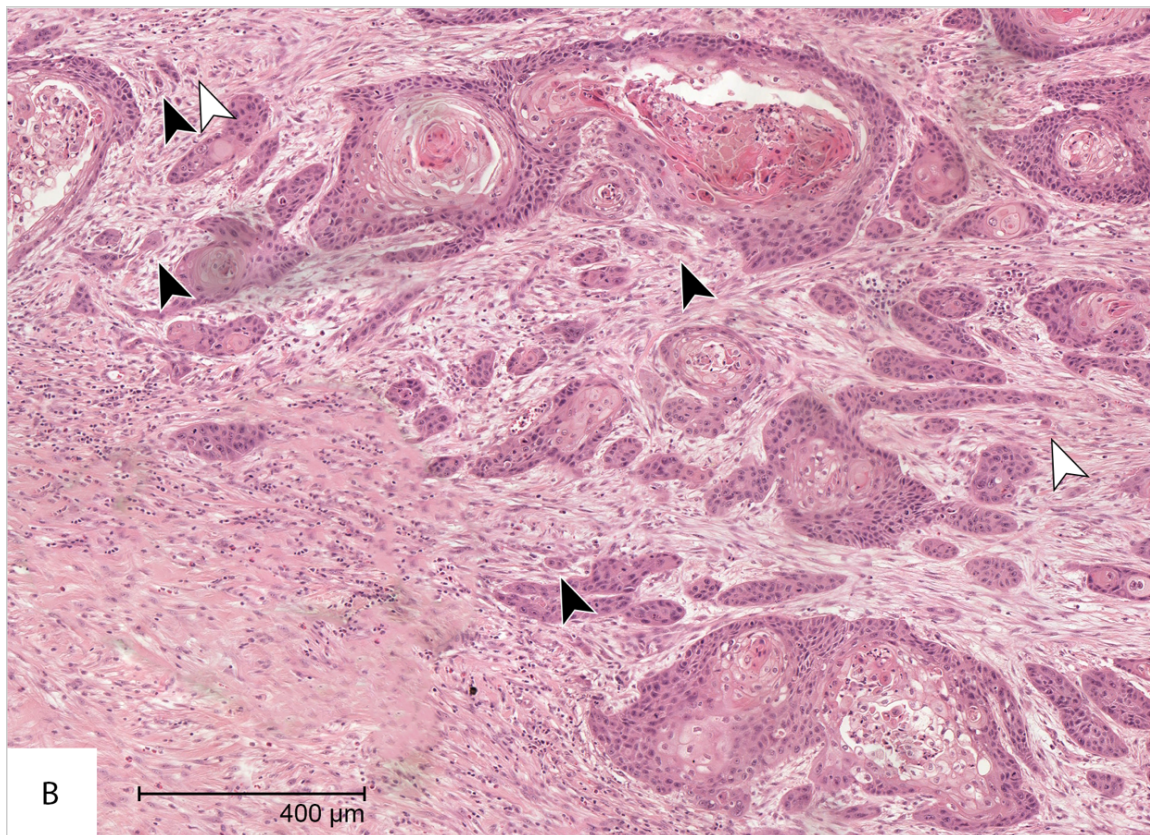
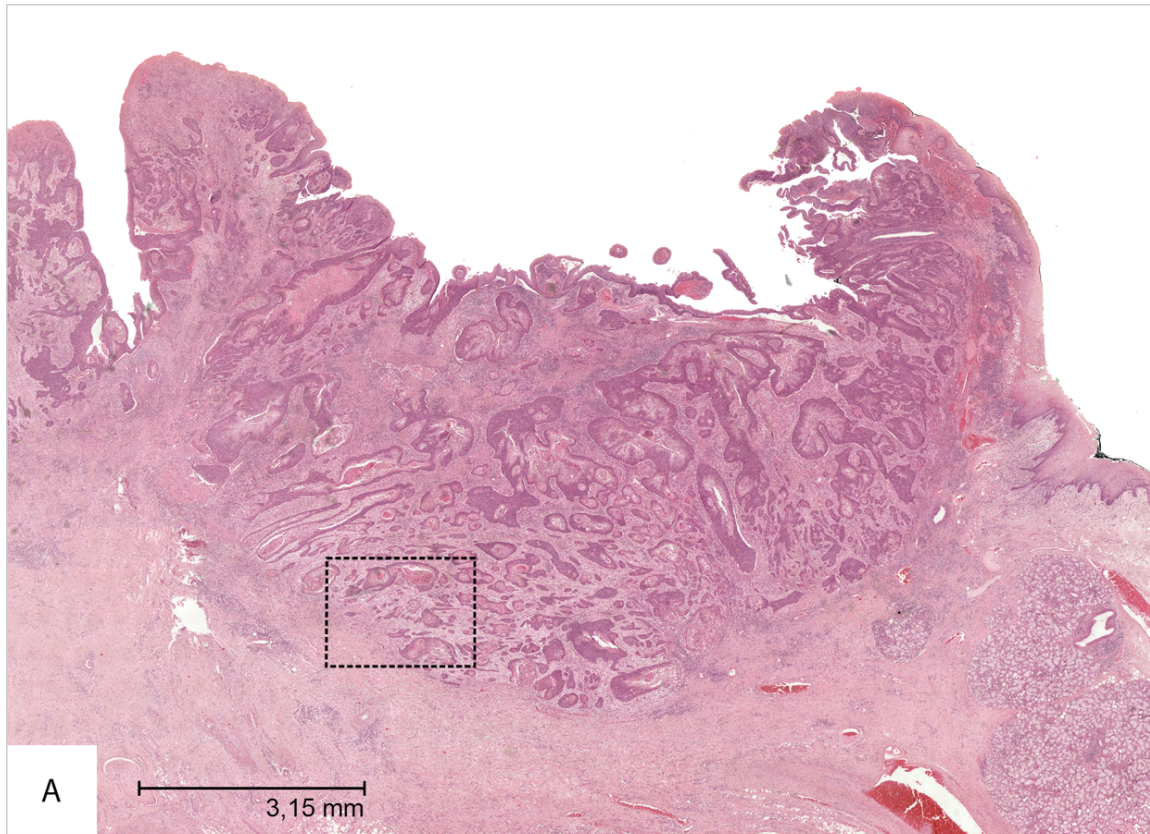


Abbildung 5: Mikroskopische Aufnahme eines Plattenepithelkarzinoms mit vorhandenem Tumor Budding in Hämatoxylin-Eosin-Färbung. A: Übersichtsaufnahme des Tumors mit Markierung der Invasionsfront. B: Vergrößerung der rechteckigen Region in A, die das Vorhandensein von Tumor Budding (schwarze Pfeile) und Tumorzellvereinzelnung (weiße Pfeile) zeigt.

## 2.4. Statistische Auswertung

Innerhalb der betrachteten Kohorte wurden die absoluten und relativen Häufigkeiten der demographischen Merkmale (Geschlecht, CCI), der Risikofaktoren (Rauchen und Alkoholkonsum), der tumorspezifischen Merkmale (TNM-Klassifikation, Lokalisation und Grading) sowie der Überlebensendpunkte (Tod, Todesursache und Rezidive) tabellarisch erfasst. Es wurden Mediane und Interquartilsbereiche (IQR) für die kontinuierlichen Variablen (Alter bei Diagnosestellung und Anzahl der Tumor Buds) berechnet und ebenfalls tabellarisch erfasst. Es erfolgte eine Stratifizierung nach vorhandenem Tumor Budding und Tumorzellvereinzelung.

Die Median-, 2- und 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten sowie die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle (CI) wurden mit der Kaplan-Meier-Methode für die Überlebensanalyse für OS und kumulative Ereignisse für OCSS, und LRFS geschätzt.

Es wurde eine bereinigte Hazard Ratios (HR) und entsprechende 95%-KI für assoziierte Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, CCI, Tumor Budding, Tumorzellvereinzelung und Budding Aktivität) mit Hilfe von adjustierten Cox's proportionalen Hazard-Regressionsmodellen geschätzt.

Für OCSS und LRFS wurden die bereinigten ursachenspezifischen HRs in Szenarien mit konkurrierendem Risiko geschätzt, was bedeutet, dass für beide Ergebnisse der Tod durch eine andere Ursache als Mundkrebs als konkurrierendes Risiko gilt. [80] Alle statistischen Analysen wurden mit der R Statistical Software (Version 4.2.0; R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Demographische Daten und Morbidität

In diese Studie wurden insgesamt 129 Patienten der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, mit einem diagnostizierten Mundhöhlenkarzinom eingeschlossen. Die Stratifizierung innerhalb der deskriptiven Statistik erfolgte nach vorhandenem Tumor Budding und zusätzlich nach Tumorzellvereinzelung.

Insgesamt konnte bei 98 Patienten (76%) in der histopathologischen Begutachtung das Vorliegen von Tumor Budding nachgewiesen werden. Hiervon konnte bei 66 Patienten zusätzlich zum Tumor Budding eine Tumorzellvereinzelung nachgewiesen werden. Bei den restlichen 32 Patienten lag ausschließlich Tumor Budding, jedoch keine Tumorzellvereinzelung vor. 31 Patienten (24%) wiesen kein Tumor Budding auf.

Die Verteilung in Bezug auf die demographischen Kenndaten und die Komorbidität ist in Tabelle 1 dargestellt.

Das mediane Alter lag bei der gesamten Kohorte bei 62 Jahren. Der Interquartilsabstand reichte von 52 bis zu 71 Jahren. Die Patientenkohorte mit einem nachgewiesenen Tumor Budding und Tumorzellvereinzelung hatte im Median das geringste Patientenalter (60 Jahre) gefolgt von Patienten mit ausschließlich Tumor Budding (64 Jahre) und Patienten ohne nachweisbarem Tumor Budding (66 Jahre).

87 Patienten (67%) waren männlich und 42 (33%) waren weiblich. Der Anteil von männlichen Patienten war im Vergleich zur Gesamtkohorte in der Gruppe ohne Tumor Budding mit 77% und in der Gruppe mit Tumor Budding und ohne Tumorzellvereinzelung mit 69% erhöht. In der Gruppe mit Budding und Tumorzellvereinzelung war der Anteil männlicher Patienten mit 62% vergleichsweise geringer.

Der Charlson-Komorbiditätsindex (CCI) betrug bei 88 Patienten (68%) 0. Bei 41 (32%) betrug er 1 oder mehr. In den Gruppen ohne Tumor Budding und mit Tumor Budding und Tumorzellvereinzelung war der prozentuale Anteil von Patienten mit wesentlichen Nebendiagnosen (CCI  $\geq$  1) höher als in der Gruppe mit ausschließlich nachgewiesenem Tumor Budding.

Tabelle 1: Deskriptive Darstellung des Alters, Geschlechts und CCI stratifiziert nach Tumor Budding und Tumorzellvereinzelung.

<b>Variable</b>	<b>Gesamt</b>	<b>Kein Budding</b>	<b>Budding ohne Tumorzellvereinzelung</b>	<b>Budding mit Tumorzellvereinzelung</b>
	N=129 <sup>1</sup>	N=31 (24%) <sup>1</sup>	N=32 (25%) <sup>1</sup>	N=66 (51%) <sup>1</sup>
<b>Alter</b>	62 (55-71)	66 (55-72)	64 (56-73)	60 (53-69)
<b>Geschlecht</b>				
Männlich	87 (67%)	24 (77%)	22 (69%)	41 (62%)
Weiblich	42 (33%)	7 (23%)	10 (31%)	25 (38%)
<b>CCI score</b>				
0	88 (68%)	19 (61%)	25 (78%)	44 (67%)
1 $\leq$	41 (32%)	12 (39%)	7 (22%)	22 (33%)
<sup>1</sup> Median (25%-75%); n (%)				

### 3.2. Risikofaktoren

Tabelle 2 stellt Risikofaktoren innerhalb der betrachteten Kohorte dar. 99 Patienten (80%) gaben einen aktiven oder terminierten Nikotinkonsum an. 24 Patienten (20%) hatten bisher noch nie geraucht. Bei 77 Patienten (65%) lag ein exzessiver Alkoholkonsum vor. 42 (35%) Patienten tranken keinen oder moderate Mengen Alkohol. In den Gruppen mit Budding mit und ohne Tumorzellvereinzelung waren verglichen mit der Gruppe ohne Budding prozentual mehr Patienten mit anamnestischem Nikotin- und/ oder starkem Alkoholkonsum.

Tabelle 2: Deskriptive Darstellung des Nikotin- und Alkoholkonsums stratifiziert nach Tumor Budding und Tumorzellvereinzelung.

Variable	Gesamt N=129 <sup>1</sup>	Kein Budding N=31 (24%) <sup>1</sup>	Budding ohne Tumorzell- vereinzelung N=32 (25%) <sup>1</sup>	Budding mit Tumorzell- vereinzelung N=66 (51%) <sup>1</sup>
<b>Rauchen</b>				
Nie	24 (20%)	10 (36%)	6 (19%)	8 (13%)
Ehemalig oder Aktiv	99 (80%)	18 (64%)	25 (81%)	56 (88%)
Fehlend	6	3	1	2
<b>Alkoholkonsum</b>				
Kein oder gelegentlich	42 (35%)	14 (50%)	10 (34%)	18 (29%)
Exzessive	77 (65%)	14 (50%)	19 (66%)	44 (71%)
Fehlend	10	3	3	4
<sup>1</sup> n (%)				

### 3.3. Tumorspezifische Daten

Die tumorspezifischen Daten der betrachteten Kohorte sind in Tabelle 3 dargestellt. Die häufigste Tumorlokalisation war der Mundboden (48 Patienten, 37%), gefolgt von der Gingiva/ Alveolarkamm (40 Patienten, 31%) und der Zungenspitze (17 Patienten, 13%). Die Mehrheit wies mit 79 Patienten (61%) eine Tumorausdehnung pT4 auf. Die restlichen 50 Patienten (39%) hatten einen pT3 Status.

Regionale Lymphknotenmetastasen lagen in 47% (60 Patienten) der Fälle vor. Hiervon zeigte die Mehrheit einen pN2a/b Status (24 Patienten), gefolgt von einem pN2c/3 Status (20 Patienten). Der geringste Anteil von Patienten mit Lymphknotenmetastasen hatte einen pN1 Status (16 Patienten). 69 Patienten (53%) wiesen keine Lymphknotenmetastasen auf. Der Anteil von Patienten mit Lymphknotenmetastasen war im Vergleich zur gesamten Kohorte in den Gruppen mit Tumor Budding mit und ohne Tumorzellvereinzelung größer.

Der Großteil (68%) der untersuchten Plattenepithelkarzinome wies eine mittelgradige Differenzierung auf (G2). Gefolgt hiervon lag bei 26% eine schlechte Differenzierung (G3) und bei 5,4% eine gute Differenzierung vor (G1).

Der Anteil an Karzinomen mit einer geringgradigen Differenzierung war in der Gruppe ohne Tumor Budding geringer (16%) und in den Gruppen mit Budding mit und ohne Tumorzellvereinzelung größer (31% und 29%).

Die Anzahl der der Tumorknospen (Buds) lag bei der gesamten Kohorte im Median bei 4 Buds pro HPF. Die Verteilung ist in Abbildung 6 dargestellt. In der Gruppe ohne Tumor Budding lag die mediane Anzahl definitionsgemäß bei 0 Buds. In der Gruppe mit Tumor Budding und Tumorzellvereinzelung lagen im Median 9.5 Tumor Buds vor. Im Vergleich hierzu zeigte sich in der Gruppe mit Tumor Budding und ohne Tumorzellvereinzelung mit einem Median von 3 Tumor Buds eine geringere Budding Aktivität.

Tabelle 3: Deskriptive Darstellung der tumorspezifischen und histopathologische Daten stratifiziert nach Tumor Budding und Tumorzellvereinzelung.

<b>Variable</b>	<b>Gesamt</b> N=129 <sup>1</sup>	<b>Kein Budding</b> N=31 (24%) <sup>1</sup>	<b>Budding ohne Tumorzell- vereinzelung</b> N=32 (25%) <sup>1</sup>	<b>Budding mit Tumorzell- vereinzelung</b> N=66 (51%) <sup>1</sup>
<b>Lokalisation</b>				
Mundboden	48 (37%)	11 (35%)	9 (28%)	28 (42%)
Zunge	17 (13%)	3 (9.7%)	3 (9.4%)	11 (17%)
Alveolarkamm	40 (31%)	7 (23%)	14 (44%)	19 (29%)
Vestibulum, Retromolar	11 (8.5%)	6 (19%)	2 (6.3%)	3 (4.5%)
Gaumen	13 (10%)	4 (13%)	4 (13%)	5 (7.6%)
<b>Tumorgröße (pT)</b>				
T3	50 (39%)	13 (42%)	12 (38%)	25 (38%)
T4	79 (61%)	18 (58%)	20 (63%)	41 (62%)
<b>Nodal-Status (pN)</b>				
N0	69 (53%)	23 (74%)	15 (47%)	31 (47%)
N1	16 (12%)	3 (9.7%)	4 (13%)	9 (14%)
N2a/b	24 (19%)	3 (9.7%)	9 (28%)	12 (18%)
N2c/3	20 (16%)	2 (6.5%)	4 (13%)	14 (21%)
<b>Differenzierungs- grad</b>				
hochgradig	7 (5.4%)	4 (13%)	2 (6.3%)	1 (1.5%)
mittelgradig	88 (68%)	22 (71%)	20 (63%)	46 (70%)
geringgradig	34 (26%)	5 (16%)	10 (31%)	19 (29%)
<b>Anzahl der Tumor Buds</b>	4 (1.0-10.0)	0 (0.0-0.0)	3 (2.0-4.0)	9.5 (6.0-13.8)
<sup>1</sup> n (%); Median (25%-75%)				

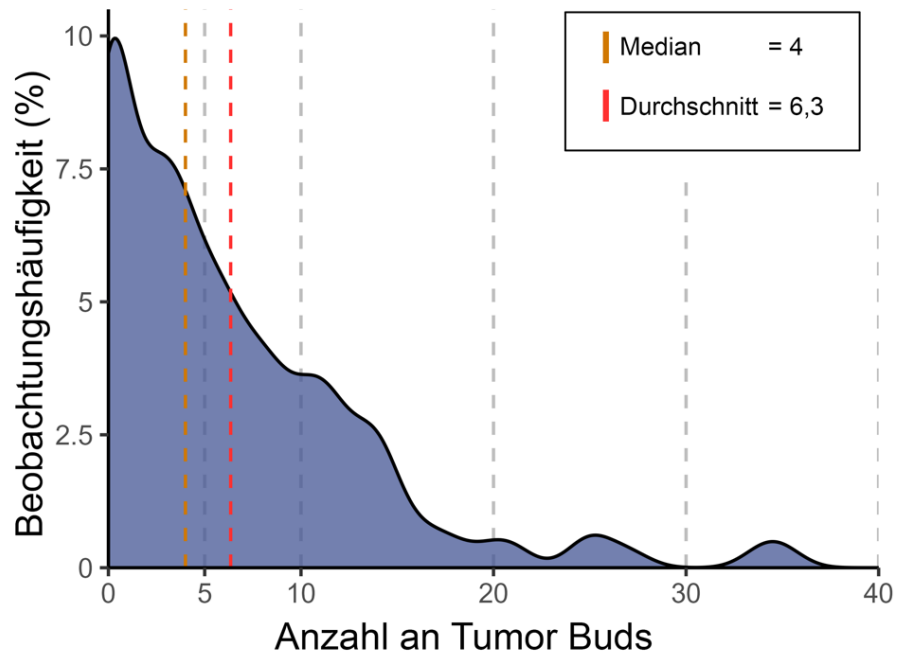


Abbildung 6: Prozentuale Verteilung der gemessenen Anzahl von Buds bezogen auf die Gesamtheit von Patienten mit nachgewiesenem Budding

### 3.4. Therapie

Eine chirurgische Primärtherapie erfolgte bei allen Patienten. Wie in Tabelle 4 dargestellt erfolgte eine adjuvante Nachbehandlung im Sinne einer Radio-(chemo)-therapie bei 89 Patienten (69%). Bei 40 Patienten (31%) wurde auf eine adjuvante Therapie verzichtet. Die Indikation für eine adjuvante Radio-(chemo-)therapie bestand, für die in dieser Kohorte vorliegende Tumorausdehnung, bei jedem Patienten. Die Gründe für eine nicht erfolgte Strahlentherapie waren folgende:

- Ablehnung des Patienten oder der betreuenden Person nach Aufklärung durch die Strahlentherapeuten (n = 8)
- Verzicht auf die Strahlentherapie bei stark reduziertem Allgemeinzustand (n = 7)
- Ein protrazierter Heilungsverlauf und daraus resultierendes Überschreiten des empfohlenen Bestrahlungsfensters von sechs Wochen nach chirurgischer Therapie (n = 8)
- Das postoperative Versterben des Patienten (n = 9)
- Beschluss des Tumor-Boards (n = 2)
- Grund für nicht erfolgte adjuvante Nachbehandlung unklar (n = 6)

Tabelle 4: Deskriptive Darstellung der erfolgten Therapie stratifiziert nach Tumor Budding und Tumorzellvereinzelung.

Variable	Gesamt	Kein Budding	Budding ohne Tumorzellvereinzelung	Budding mit Tumorzellvereinzelung
	N=129 <sup>1</sup>	N=31 (24%) <sup>1</sup>	N=32 (25%) <sup>1</sup>	N=66 (51%) <sup>1</sup>
<b>Therapie</b>				
Alleinige chirurgische Therapie	40 (31%)	11 (35%)	7 (22%)	22 (33%)
Adjuvante Radio (-chemo)-therapie	89 (69%)	20 (65%)	25 (78%)	44 (67%)
<sup>1</sup> n (%)				

### 3.5. Ereignisraten

Die deskriptive Darstellung der Ereignisraten ist in Tabelle 5 dargestellt. Im Rahmen der 5-jährigen postoperativen Nachsorge verstarben 78 (60%) von den 129 Patienten. 42 Patienten verstarben in direkter Folge der Tumorerkrankung. Bei 29 Patienten war der Tod Folge anderer Erkrankungen und konnte nicht auf die Tumorerkrankung zurückgeführt werden. Bei den restlichen 7 Patienten war die Todesursache unbekannt.

In 40 Fällen entwickelten Patienten innerhalb der ersten 5 Jahre ein lokoregionales Rezidiv. Der Anteil der Patienten mit einem Rezidiv lag in der Gruppe mit ausschließlich Budding bei 28% und in der Gruppe mit zusätzlich Tumorzellvereinzelung bei 36%. Im Vergleich hierzu war die Rezidivrate bei den Patienten ohne eines dieser histopathologischen Merkmale mit 23% geringer.

Tabelle 5: Deskriptive Darstellung der Ereignisraten stratifiziert nach Tumor Budding und Tumorzellvereinzelung.

Variable	Gesamt N=129 <sup>1</sup>	Kein Budding N=31 (24%) <sup>1</sup>	Budding ohne Tumorzell- vereinzelung N=32 (25%) <sup>1</sup>	Budding mit Tumorzell- vereinzelung N=66 (51%) <sup>1</sup>
<b>Tod aus beliebiger Ursache</b>				
Lebendig oder zensiert	51 (40%)	11 (35%)	15 (47%)	25 (38%)
Tod	78 (60%)	20 (65%)	17 (53%)	41 (62%)
<b>Todesursache</b>				
Lebendig oder zensiert	51 (40%)	11 (35%)	15 (47%)	25 (38%)
Tod in Folge der Krebserkrankung	42 (33%)	10 (32%)	10 (31%)	22 (33%)
Tod in Folge anderer Gründe	29 (22%)	9 (29%)	6 (19%)	14 (21%)
Todesursache unklar	7 (5.4%)	1 (3.2%)	1 (3.1%)	5 (7.6%)
<b>Lokoregionale Rezidive in 5 Jahren</b>				
Zensiert	89 (69%)	24 (77%)	23 (72%)	42 (64%)
Lokoregionale Rezidive	40 (31%)	7 (23%)	9 (28%)	24 (36%)
<sup>1</sup> n (%)				

### 3.6. Überlebenszeitanalyse

Die Nachbeobachtungszeit reichte von 4 Monaten bis zu 12 Jahren mit einem medianen Overall-Survival von 1,7 (1,3 – 3,6) Jahren in der gesamten Kohorte. Bei einer kumulativen Nachbeobachtungszeit von 326 Personenjahren starben 82 Patienten, was einer Sterberate von 25,2 Todesfällen pro 100 Personenjahre entspricht.

Die Endpunkte Tod, Tod an dem oralen Plattenepithelkarzinom und lokoregionale Rezidive wurden nach dem Kaplan-Meier-Verfahren für die ersten fünf postoperativen Jahre in der Abbildung 7 graphisch dargestellt. Je nach histopathologischen Merkmalen (Tumor Budding und Tumorzellvereinzelung) sind eigene Überlebens- und Ereigniskurven abgebildet. Die jeweiligen Überlebens- und Ereigniswahrscheinlichkeiten sind für den Zeitpunkt nach zwei und nach fünf Jahren in der Tabelle 6 aufgetragen.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit lag in der gesamten Kohorte nach 2 Jahren bei 50% (CI 41% – 59%) und nach 5 Jahren bei 32% (CI 25% – 43%). Insgesamt wiesen Patienten ohne Budding nach 2 Jahren mit 54% eine höhere und nach 5 Jahren mit 29% eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit Budding und mit Tumorzellvereinzelung auf (OS<sub>2 Jahre</sub> 43% und OS<sub>5 Jahre</sub> 32%). Die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit Budding und ohne Tumorzellvereinzelung lag nach beiden Beobachtungszeitpunkten über der von Patienten ohne Budding (OS<sub>2 Jahre</sub> 59% und OS<sub>5 Jahre</sub> 37%).

Die Wahrscheinlichkeit an einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle zu versterben, lag für die gesamte Kohorte nach fünf Jahren bei 39% (CI 30% – 49%). Bei Patienten ohne ein nachgewiesenes Tumor Budding war die krebsbezogene Sterbewahrscheinlichkeit sowohl nach 2 Jahren (23% (CI 12% – 45%)) als auch nach 5 Jahren (37% (CI 22% - 62%)) im Vergleich zu Patienten mit Tumor Budding geringer (OCSS<sub>2 Jahre</sub> 30% (CI 17% – 53%) und OCSS<sub>5 Jahre</sub> 40% (CI 24% – 65%)). Die krebsspezifische Sterbewahrscheinlichkeit bei Patienten, welche zusätzlich eine Tumorzellvereinzelung aufwiesen, war im Vergleich zu Patienten ohne Budding ebenfalls höher (OCSS<sub>2 Jahre</sub> 33% (CI 23% – 48%) und OCSS<sub>5 Jahre</sub> 40% (CI 28% – 55%)).

Ein ähnlicher Zusammenhang zeigte sich auch in der lokoregionalen Rezidivwahrscheinlichkeit. Für das gesamte Untersuchungskollektiv lag diese nach 5 Jahren bei 37% (CI 29% – 48%). Patienten ohne Budding zeigten nach 5 Jahren mit 26% (CI 14% – 51%) die geringste Rezidivwahrscheinlichkeit. Im Vergleich hierzu war die Rezidivwahrscheinlichkeit bei Patienten mit nachgewiesenem Budding mit 33% (CI 19% – 57%) höher. Mit 45% (CI 33% – 61%) war die Rezidivwahrscheinlichkeit bei Patienten mit zusätzlicher Tumorzellvereinzelung am höchsten.

Tabelle 6: Ereignisraten nach 2 und 5 Jahren stratifiziert nach Tumor Budding und Tumorzellvereinzelung.

Variable	Gesamtüberleben (OS)		Tod in Folge des Karzinoms (OCSS)		Lokoregionale Rezidive (LRFS)	
	nach 2 Jahren	nach 5 Jahren	nach 2 Jahren	nach 5 Jahren	nach 2 Jahren	nach 5 Jahren
<b>Gesamt</b>	50% (41%-59%)	32% (25%-43%)	30% (22%-39%)	39% (30%-49%)	34% (26%-44%)	37% (29%-48%)
<b>Budding</b>						
Kein Budding	54% (39%-75%)	29% (15%-53%)	23% (12%-45%)	37% (22%-62%)	17% (7.7%-38%)	26% (14%-51%)
Budding ohne Tumorzellvereinzelung	59% (44%-80%)	37% (22%-62%)	30% (17%-53%)	40% (24%-65%)	33% (19%-57%)	33% (19%-57%)
Budding mit Tumorzellvereinzelung	43% (32%-57%)	32% (22%-47%)	33% (23%-48%)	40% (28%-55%)	42% (31%-58%)	45% (33%-61%)

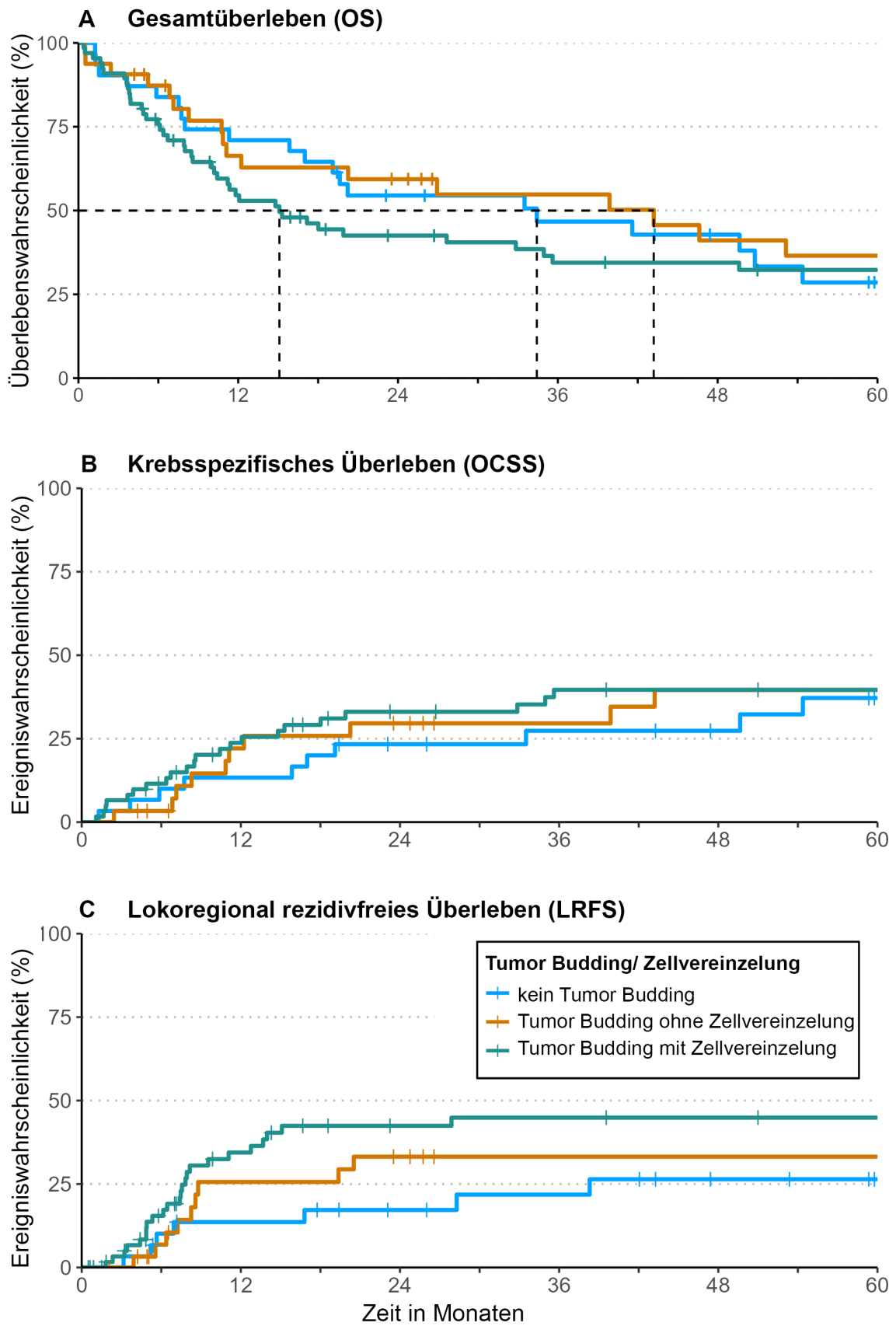


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve - Einfluss Tumor Budding und Tumorzellvereinzlung auf das Gesamtüberleben (OS), das krebspezifische Überleben (OCSS) und das lokoregionale rezidivfreie Überleben (LRFS).

### 3.7. Proportionales Hazard-Regressionsmodell

Für die assoziierten Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, CCI-Score, Tumor Budding und Tumorzellvereinzelung) wurden bereinigte Hazard Ratios (HR) und entsprechende 95%-Konfidenzintervalle (CI) mit Hilfe des proportionalen Hazard-Regressionsmodells nach Cox geschätzt. Die Hazard Ratios wurden für das Gesamtüberleben (OS), das krebsspezifische Überleben (OCSS) und das lokoregionale rezidivfreie Überleben (LRFS) einzeln bestimmt und in Tabelle 7 dargestellt.

Bezogen auf das Patientenalter bei Erstdiagnose konnte kein signifikanter Unterschied mit steigendem Alter für das Risiko innerhalb des Beobachtungszeitraums zu versterben beobachtet werden. ( $HR_{OS} = 1,1$   $p = 0,4$ ).

Frauen zeigten mit einer Hazard Ratio von 0,55 ein signifikant geringeres Risiko für das nicht krebsspezifische Versterben ( $p = 0,023$ ). In Bezug auf das krebsspezifische Versterben und das Risiko für lokoregionale Rezidive konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. ( $HR_{OCSS} = 0,71$   $p = 0,3$  und  $HR_{LRFS} = 0,84$   $p = 0,6$ ).

Patienten mit einer höheren Komorbidität ( $CCI \geq 1$ ) wiesen tendenziell ein erhöhtes Risiko auf innerhalb von fünf Jahren nach der primären Therapie zu versterben. ( $HR_{OS} = 1,52$   $p = 0,09$ ). Ein signifikanter Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden.

Vergleicht man die Patientengruppen bezogen auf das Tumor Budding, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe ohne Tumor Budding und mit Tumor Budding und ohne Tumorzellvereinzelung bezogen auf alle betrachteten Überlebens-Outcomes ( $HR_{OS} = 1,11$   $p = 0,8$ ;  $HR_{OCSS} = 1,10$   $p = 0,9$  und  $HR_{LRFS} = 1,39$   $p = 0,5$ ).

Für Patienten mit Tumor Budding und zusätzlicher Tumorzellvereinzelung konnte für das Gesamtüberleben und das krebspezifische Überleben ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Analyse gezeigt werden. ( $HR_{OS} = 1,4$   $p = 0,2$  und  $HR_{OCSS} = 1,23$   $p = 0,6$ ) Das Risiko für ein lokoregionales Rezidiv zeigte sich für Patienten dieser Gruppe im Vergleich zu Patienten ohne dieses histopathologische Merkmal signifikant um das 2,32-fache erhöht ( $p = 0,045$ ).

Betrachtet man das Tumor Budding kontinuierlich zeigt sich mit einer Hazard-Ratio von 1,05 eine signifikant erhöhte generelle Sterbewahrscheinlichkeit (OS) pro gemessenem Bud ( $p = 0.009$ ). Auch das krebspezifische Versterben ist mit einer Risikozunahme um das 1,07-fache pro gemessenem Bud signifikant erhöht ( $p = 0,021$ ). Vergleichbares zeigt sich für das Risiko eines lokoregionalen Rezidivs mit einer Hazard-Ration von 1,08 ( $p = 0,003$ ).

Tabelle 7: Hazard Ratios verschiedener prognostischer Faktoren für das Gesamtüberleben (OS), das krankheitsfreie Überleben (OCSS) und lokoregionale rezidivfreie Überleben (LRFS).

Variable	OS <sup>1</sup>			OCSS <sup>1</sup>			LRFS <sup>1</sup>		
	HR <sup>1</sup>	95% CI <sup>1</sup>	p-Wert	HR <sup>1</sup>	95% CI <sup>1</sup>	p-Wert	HR <sup>1</sup>	95% CI <sup>1</sup>	p-Wert
<b>Alter</b>	1.01	0.99-1.03	0.4						
<b>Geschlecht</b>									
Männlich	—	—		—	—		—	—	
Weiblich	<b>0.55</b>	<b>0.32-0.92</b>	<b>0.023</b>	0.71	0.36-1.41	0.3	0.84	0.44-1.60	0.6
<b>CCI-Score<sup>1</sup></b>									
0	—	—							
1 ≤	1.52	0.94-2.47	0.090						
<b>Tumor Budding</b>									
Kein Budding	—	—		—	—		—	—	
Budding ohne Tumorzellvereinzelung	1.11	0.58-2.13	0.8	1.10	0.47-2.54	0.9	1.39	0.53-3.61	0.5
Budding mit Tumorzellvereinzelung	1.40	0.81-2.44	0.2	1.23	0.60-2.51	0.6	<b>2.32</b>	<b>1.02-5.28</b>	<b>0.045</b>
Anzahl der Knospen (Buds)	<b>1.05</b>	<b>1.01-1.09</b>	<b>0.009</b>	<b>1.07</b>	<b>1.01-1.13</b>	<b>0.021</b>	<b>1.08</b>	<b>1.03-1.14</b>	<b>0.003</b>

<sup>1</sup> OS = Gesamtüberleben, OCSS = krebspezifisches Überleben, LRFS = lokoregionales rezidivfreies Überleben  
HR = Hazard Ratio, CI = Konfidenzintervall, CCI = Charlson-Komorbiditäts-Index

## 4. Diskussion

Die Berücksichtigung von histopathologischen Risikofaktoren in der Bewertung von Tumorerkrankungen ist von zunehmender Bedeutung. In Kombination mit der klassischen Stadieneinteilung, welche auf der Tumorgröße und -ausdehnung basiert, ermöglicht es die Prognose und das biologische Verhalten besser einzuschätzen. Im Sinne einer risikoadaptierten und personalisierten Therapie können histopathologische Risikofaktoren zur Festlegung des Ausmaßes einer Therapie herangezogen werden. [19, 21, 22, 24, 25, 34]

Etabliert haben sich für das Mundhöhlenkarzinom in der aktuellen Leitlinie und TNM-Klassifikation bereits die Infiltration von Nerven oder Blutgefäßen sowie die Infiltrationstiefe und das extranodale Wachstum. In Abhängigkeit von diesen Merkmalen wird entweder ein höheres Tumorstadium vergeben oder es wird eine adjuvante Nachbehandlung empfohlen. [13, 23]

Im Fokus der Forschung steht seit mehreren Jahren die Invasionsfront des Tumors. Bereits in den neunziger Jahren wiesen Bryne et al. geringer differenzierte Zellen an der Invasionsfront im Vergleich zu zentralen Anteilen des Tumors nach. [81]

Das Wachstums- und Infiltrationsmuster von Tumorzellen an der Invasionsfront wird unter anderem durch die zuletzt durch Brandwein-Gensler et al. modifizierte Einteilung der POI beschrieben. Die Ausbildung isolierter kleiner Tumornester oder Sattelitzellen (POI 4 und 5) konnte als signifikanter Risikofaktor identifiziert werden. [34]

Eine alternative Betrachtungsweise der Ausbildung kleiner Zellnester ist das Tumor Budding. Dieses wurde erstmals 1949 durch Imai et al. für das kolorektale Karzinom beschrieben. [44] Seither konnte es bereits in vielen Publikationen als unabhängiger Risikofaktor für verschiedene Tumorentitäten, wie Karzinome der Brust, der Lungen, des Harntrakts oder des Darmes, nachgewiesen werden. [45-50, 82]

Fest etablieren konnte sich das Tumor Budding als histopathologischer Risikofaktor beim kolorektalen Karzinom. Hier wird es von der aktuellen Leitlinie beim Festlegen der Therapie berücksichtigt. [77]

Auch bezogen auf das Mundhöhlenkarzinom konnten bereits mehrere Studien einen negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben sowie auf das tumorspezifische und rezidivfreie Überleben nachweisen. [36, 37, 43, 50-53, 55-58] Zudem konnte eine Assoziation mit der Tumorgröße, der Infiltrationstiefe, dem Differenzierungsgrad und vor allem Lymphknotenmetastasen gezeigt werden. [36, 37, 43, 50-58] Eine Empfehlung das Tumor Budding bei der Therapieplanung zu berücksichtigen gibt es für das Mundhöhlenkarzinom aktuell nicht. [13]

Ziel dieser Studie war es die klinischen Endpunkte (OS, OCSS, LRFS) in Abhängigkeit von Tumor Budding als histopathologischer Risikofaktor bei Patienten mit einer bereits lokal fortgeschrittenen Tumorerkrankung zu analysieren. Zudem sollte der Einfluss von Tumorzellvereinzelung als kleinste Form eines Tumor Buds untersucht werden.

Die Stärke der Studie liegt in der prospektiven Erhebung der klinischen Endpunkte sowie der tumor- und therapiebezogenen Daten durch die interne Tumordatenbank der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck.

Die Besonderheit der vorliegenden Studie liegt in der Betrachtung von Patienten mit einem bereits lokal fortgeschrittenen Tumorstadium (pT3/4 und pN0-3). Bisher veröffentlichte Studien, die den Einfluss von Tumor Budding auf das Überleben von Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom untersucht haben, befassten sich entweder mit Karzinomen in einem frühen Stadium (pT1/2 und pN0) [35-38, 78] oder schlossen alle Tumorgrößen mit ein (pT1-4). [43, 51, 54, 55, 57] Eine isolierte Betrachtung von Tumoren in einem lokal fortgeschrittenen Stadium ist bisher nicht erfolgt.

Im Vergleich zu Untersuchungen, die alle Tumorstadien miteingeschlossen haben, lag durch die alleinige Betrachtung der lokal fortgeschrittenen Tumore eine höhere Homogenität innerhalb der Kohorte vor. Die Patienten waren bezogen auf die mit der Tumorgröße und -ausdehnung assoziierte Prognose besser vergleichbar.

Insgesamt konnten 129 Patienten in die vorliegende Untersuchung eingeschlossen werden. Im Vergleich zu anderen Studien, die ebenfalls den Einfluss von Tumor

Budding untersucht haben, liegt die Kohorte dieser Studie bezogen auf die Größe im mittleren Bereich ( $n = 56 - 311$ ). [35, 57] Elseragy et. al konnten die höchste Anzahl an Patienten in ihre Studie einschließen ( $n = 311$ ). Betrachtet wurden jedoch nur Tumore im Frühstadium mit einer maximalen Tumorgöße von pT2 und ohne Lymphknotenmetastasen. [35] Mit insgesamt 118 pT3 und pT4 Tumoren konnten Ho et al. die meisten Tumore in einem fortgeschrittenen Stadium bei einer Kohortengröße von 200 Patienten einschließen. [54]

In der in dieser Arbeit betrachteten Kohorte lag das mediane Alter bei 62 Jahren und mit 67% war die Mehrheit männlich. Bezogen auf diese demographischen Kenndaten zeigte sich in anderen Publikationen eine ähnliche Verteilung mit einem medianen Alter von 58-65 Jahren und einer deutlichen Mehrheit männlicher Patienten. [36, 51, 54, 57]

In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Patientenalter und dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden ( $HR_{OS} = 1,01$   $p = 0,4$ ). In einer retrospektiven Analyse von einer größeren Kohorte ( $n = 467$ ) konnten Wang et al. das Patientenalter bei Erstdiagnose als signifikanten Risikofaktor für das Gesamtüberleben nachweisen und gaben das Risiko mit einer Hazard Ratio von 1,03 pro Lebensjahr an ( $p = 0,002$ ). [83] Auch Elseragy et al. konnten für Patienten über 60 Jahre ein signifikant erhöhtes Risiko für das nicht krebsbezogene versterben aufzeigen ( $HR_{OS} = 1,87$   $p = 0,007$ ). [35]

In der vorliegenden Studie zeigten Frauen ein signifikant geringeres Risiko innerhalb des Beobachtungszeitraumes zu versterben ( $HR_{OS} = 0,55$   $p = 0,023$ ). Bezogen auf das krebspezifische Versterben oder das Risiko ein lokoregionales Rezidiv zu bekommen konnte kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden. Oh et al. untersuchten den Einfluss des Geschlechts auf das Überleben bei Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom und konnten unter Berücksichtigung von 3379 Patienten ein signifikant besseres krebspezifische Überleben für Frauen nachweisen. [84]

Das Vorhandensein von Komorbiditäten ist ebenfalls ein wichtiger Faktor und wird bisher nur in wenigen Studien berücksichtigt. Der Charlson Komorbiditätsindex ermöglichte es eine Aussage über den allgemeinen Gesundheitszustand zu treffen

und den Einfluss auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom zu untersuchen. Es zeigte sich zwar die Tendenz, dass Patienten mit mindestens einer relevanten Begleiterkrankung ein schlechteres Überleben haben, allerdings scheiterte diese Studie daran ein signifikantes Niveau zu erreichen. ( $HR_{OS} = 1,52$ ,  $p = 0,09$ ) Mit dem Einfluss des CCI auf das Gesamtüberleben von Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom beschäftigte sich auch die Arbeit von Ghanizada et al.. Unter Betrachtung von 1173 Patienten konnte eine signifikant reduziertes Gesamtüberleben für Patienten mit einem CCI von 1 gezeigt werden ( $HR_{OS} = 1,48$ ,  $p < 0,01$ ). Mit steigendem CCI wiesen die Patienten in der Überlebenszeitanalyse ein zunehmendes Risiko auf. [85]

Die Auswertung des Tumor Buddings und der Tumorzellvereinzelung erfolgte nach einscannen der histologischen Schnitte auf einem Whole Slide Image. Bei dem Großteil vergleichbarer Studien erfolgte die Bestimmung konventionell am Lichtmikroskop. [36, 43, 55] In der Literatur werden beide Verfahren mit einer hohen diagnostischen Übereinstimmung bewertet. [86]

Da die histologischen Schnitte größtenteils aus der Routinediagnostik stammten, erfolgte die Auswertung in HE-Färbung. Auch in den meisten anderen Studien wurde das Tumor Budding in HE-Färbung bestimmt. Nur vereinzelt erfolgte die Detektion nach einer immunhistochemischen (IHC) Färbung des Zytokeratins. [37, 38] Einige Studien konnten für die IHC-Färbung einen Vorteil in der Reproduzierbarkeit und eine geringere Variabilität zwischen unterschiedlichen Untersuchern aufweisen. Zudem zeigten diese Färbung eine zuverlässigere Detektion durch unerfahrene Untersucher. [38, 58, 87] Aufgrund einer guten prognostischen Aussagekraft, geringeren Kosten und einer besseren Verfügbarkeit wird dennoch die HE-Färbung durch die ITBCC bevorzugt. In schwer beurteilbaren Situationen kann eine immunhistochemische Färbung in der Beurteilung helfen. [41]

Der in dieser Studie angewandten Methode entsprechend wurde ein Tumor Bud durch die meisten Autoren als ein kleines Zellnest von bis zu vier Zellen definiert. [38, 43, 51, 55, 57, 88] Lediglich in der Arbeit von Ho et al. wurden auch Zellverbunde von fünf Zellen als Tumor-Bud gewertet. [54] Einzelne isolierte Tumorzellen zählten in diesen Arbeiten mit in die Definition eines Tumor Buds und entsprachen der empfohlenen Definition der ITBCC. [41] Um den Einfluss der

Zellvereinzelung zu untersuchen wurde in dieser Studie eine zusätzliche Gruppe mit Tumor Buds bestehend aus nur einer Tumorzelle gebildet.

In der Auswertung des Tumor Buddings gab es ebenfalls unterschiedliche Ansätze. Einige Publikationen untersuchten alleinig das Vorhandensein von Tumor Buds als dichotomes Merkmal. Gewertet wurde das Tumor Budding entweder, wie in der vorliegenden Studie, ab dem ersten Tumor Bud [54, 57] oder erst ab einem definierten Grenzwert von drei [57] bzw. fünf [43, 55]. Angelehnt an die Empfehlung der ITCC für das kolorektale Karzinom, wurde in anderen Untersuchungen die Aktivität des Tumor Buddings anhand einer dreistufigen Graduierung analysiert. [41] Die Einteilung erfolgt hierbei in eine geringe (0 - 4 Buds), mittlere (5 – 9 Buds) und hohe Aktivität ( $\geq 10$  Buds). [38, 51, 88]

In der vorliegenden Studie waren Patienten, bei denen Tumor Budding nachgewiesen werden konnte, im Median 4 Jahre jünger als Patienten ohne Tumor Budding. Diese Tendenz wurde auch in der Arbeit von Hong et al. beschrieben, erreichte jedoch keine Signifikanz. [57] Unter Betrachtung einer deutlich größeren Kohorte konnten Ho et al. eine signifikante Korrelation zwischen einem jüngeren Patientenalter und Tumor Budding zeigen. Im Durchschnitt waren Patienten mit Tumor Budding in dieser Untersuchung 4,5 Jahre jünger. [54]

In der deskriptiven Statistik dieser Studie ergab sich der Hinweis, dass der Konsum von Nikotin und Alkohol ebenfalls einen Einfluss auf das Tumorbudding und die Tumorzellvereinzelung hat. Der prozentuale Anteil an ehemaligen oder aktiven Rauchern und an Patienten, die exzessiv Alkohol tranken, war in der Gruppe mit Tumor Budding mit und ohne Zellvereinzelung erhöht. Bezogen auf das Lungenkarzinom konnte der Zusammenhang zwischen Nikotin und Tumorbudding durch Thakur et al. bereits signifikant gezeigt werden. [89] Studien, die diesen Zusammenhang beim Mundhöhlenkarzinom oder in Bezug auf den Alkoholkonsum untersucht haben, liegen nicht vor.

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie waren geringgradig differenzierte Tumore (G3) in der Gruppe mit vorhandenem Tumor Budding in mehreren Studien stärker vertreten. [54, 56, 88] In der Arbeit von Wang et al. konnte eine signifikante

Korrelation zwischen dem Grading und dem Vorhandensein von Tumor Budding gezeigt werden. [43]

Betrachtet man die Tumorgöße, beschrieben durch den pT-Status, zeigt sich in dieser Untersuchung die Tendenz, dass Tumore mit einem pT4-Status häufiger Tumor Budding aufweisen. Wang et al. konnten unter Berücksichtigung jeder Tumorgöße (pT1 - pT4) eine starke Korrelation zwischen der Tumorgöße und Tumor Budding aufzeigen. [43] Auch in der Arbeit von Ho et al. unterschieden sich die pT-Kategorien signifikant im prozentualen Anteil an Tumoren mit positivem Tumor Budding. (pT1 = 25,9%; pT2 = 28,9%; pT3 = 75,7%; pT4 = 70,6%). [54]

Tumor Budding wurde bereits in vielen Publikation als unabhängiger Risikofaktor für Lymphknotenmetastasen nachgewiesen. Dieser Zusammenhang zeigt sich sowohl bei der Betrachtung von Karzinomen mit einer geringen Größenausdehnung (pT1/2) [38] als auch unter Berücksichtigung aller Tumorgößen. [43, 51, 54, 57, 88] Bei der isolierten Betrachtung von Tumoren in fortgeschrittenem Stadium zeigte sich auch in der vorliegenden Kohorte die Tendenz, dass vermehrt Lymphknotenmetastasen in den Gruppen mit vorhandenem Tumor Budding mit und ohne Zellvereinzelung vorlagen.

In der Überlebenszeitanalyse ergab sich für das OS bei Patienten mit Tumor Budding und ohne Tumorzellvereinzelung im Vergleich zu Patienten ohne Tumorbudding kein Hinweis auf eine erhöhte Ereignisrate. Bezogen auf das OCSS und LRFS stellte sich in der Kaplan-Meier-Kurve eine geringere krebsspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit und höhere Rezidivrate dar. Eine signifikante Zunahme des Risikos basierend auf diesem histopathologischen Merkmal konnte in der durchgeführten multivarianten Analyse für keinen der genannten klinischen Endpunkte bestätigt werden.

Unter Betrachtung von Tumoren im Frühstadium (pT1/2 und pN0) konnten bereits mehrere Arbeiten den Einfluss des Tumor Buddings als Risikofaktor nachweisen. [35-38, 78] Für diese Tumorstadien zeigten Almangush et al. 2014 eine 2,04-fache Risikozunahme für das krebsspezifische Versterben ( $p = 0,01$ ). [36] In einer ebenfalls von Almangush et al. publizierten Metaanalyse von 2018 konnte ein signifikant reduziertes Gesamtüberleben nicht nur für Karzinome im Frühstadium

sondern auch unter Betrachtung jeder Tumorgröße (pT1-pT4) nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich das rezidivfreie Überleben in dieser Arbeit ebenfalls signifikant reduziert. [50] Vergleichende Studien, welche ausschließlich Karzinome in lokal fortgeschrittenem Tumorstadium (pT3/4 und pN+) berücksichtigen, liegen nicht vor.

Untersucht wurde neben Tumor Buddings auch der Einfluss von einer Tumorzellvereinzelung als kleinste Form eines Tumor Buds. Dieser histopathologische Faktor konnte bereits bei anderen Tumorentitäten als signifikanter Risikofaktor für die Prognose gezeigt werden. [82, 90] In den meisten Studien, welche Mundhöhenkarzinome untersuchten, zählten einzelne Tumorzellen mit in die Definition eines Tumor Buds und wurden nicht separat betrachtet. Boxberg et al. untersuchten in ihrer Arbeit den Einfluss der Zellanzahl innerhalb eines Tumor Buds bei Larynx- und Hypopharynx Karzinomen. Vergleichend mit der vorliegenden Studie bildeten sie eine Gruppe mit Zellvereinzelung und eine Gruppe mit Tumor Buds von 2–4 Zellen. Zusätzlich untersuchten sie Zellverbände von 5–15 Zellen und >15 Zellen. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Größe des kleinsten Tumor Buds und dem Gesamtüberleben, dem krebspezifischem sowie dem rezidivfreien Überleben. Hierbei wurde die schlechteste Prognose bei Patienten mit Zellvereinzelung beobachtet. [39] Bezogen auf das Mundhöhlenkarzinom konnte in der Studie von Tan et. al die Tumorzellvereinzelung ebenfalls als signifikanter Risikofaktor für das Gesamtüberleben nachgewiesen werden. [88]

In der Vorliegenden Studie zeigte sich in der Überlebenszeitanalyse für Patienten mit einem Tumor Budding und einer Tumorzellvereinzelung im Vergleich zu Patienten ohne Tumor Budding oder fehlender Tumorzellvereinzelung die höchsten Ereignisraten für das OCSS und LRFS sowie tendenziell für das OS. Auch in der multivariaten Analyse stellte das Tumorbudding mit Zellvereinzelung mit einer Hazard Ratio von 2,32 einen signifikanten Risikofaktor für das LRFS dar ( $p = 0,045$ ). Für die anderen klinischen Endpunkte (OS und OCSS) konnte keine signifikante Risikoerhöhung beobachtet werden.

Der pT-Status und der pN-Status nach der TNM-Klassifikation sind etablierte prognostischer Risikofaktoren. [13, 23] Wang et al. wiesen in ihrer Arbeit ein

signifikant geringeres OS und OCSS sowie signifikant höheres Rezidiv-/Metastasierungsrisiko mit steigendem pT- und pN-Status nach. Bezogen auf die Tumorgröße stieg das Risiko bei pT4-Tumoren im Vergleich zu pT1-Tumoren um das 3,46-fache für das OS ( $p < 0,001$ ), das 4,23-fache ( $p < 0,001$ ) für das OCSS, und das 2,79-fache ( $p = 0,002$ ) für das Rezidiv-/Metastasierungsrisiko an. [83]

Dementsprechend besteht innerhalb der in dieser Studie betrachteten Kohorte bereits allein aufgrund der Tumorgröße (pT3 und pT4) und des N-Status (pN0–pN3) eine stark verringerte generelle und krebspezifische Überlebenswahrscheinlichkeit sowie eine höhere Rezidivneigung.

Die durch die Tumorgröße und -ausdehnung bereits eingeschränkte Prognose könnte eine Erklärung für die gering ausgeprägte Effektstärke der betrachteten Risikofaktoren und teilweise fehlende Signifikanz innerhalb der hier betrachteten Kohorte darstellen. Bei anderen Arbeiten, die einen signifikanten Einfluss auf das OS, OCSS und LRFS nachweisen konnten, wurden pT1/2 Karzinome isoliert betrachtet oder miteingeschlossen. Es ist davon auszugehen, dass der Effekt eines Risikofaktors, sich bei einem im Durchschnitt höherem Gesamtüberleben und geringeren Rezidivneigung besser nachweisen lässt.

Basierend auf der Erkenntnis, dass die Mortalität und Rezidivrate bei einem lokal fortgeschrittenen Tumorstadium durch eine adjuvante Radio-(chemo-)therapie reduziert werden kann, erfolgte leitliniengerecht bei einem Großteil dieser Kohorte eine adjuvante Nachbehandlung. [13, 62, 67] Attramadal et al. lieferten in ihrer Arbeit Hinweise auf ein höheres Überleben bei Patienten mit Tumor budding mit einer zusätzlich zur chirurgischen Therapie erfolgten adjuvanten Radiotherapie. [78] Die in der vorliegenden Kohorte erfolgte umfangreiche Therapie könnte einen weiteren Grund darstellen, welcher die fehlende Effektstärke des Tumor Buddings und der Tumorzellvereinzelung im Vergleich zu Karzinomen im Frühstadium, die keine adjuvante Nachbehandlung erfahren, erklärt.

Weitere Studien mit einer größeren Kohorte sind nötig, um den Einfluss des Tumor Buddings auf die Prognose bei bereits fortgeschrittenen Karzinomen signifikant nachzuweisen, da in diesem Patientenkollektiv von einer geringeren Effektstärke auszugehen ist.

In der vorliegenden Studie erfolgte neben der Beschreibung des Tumor Buddings als dichotomes Merkmal auch die kontinuierliche Messung der Budding Aktivität ohne Grenzwert oder Graduierung. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der gemessenen Tumor Buds an der Invasionsfront und den klinischen Endpunkten. Mit steigender Anzahl der gemessenen Tumor Buds stieg das Risiko innerhalb des Beobachtungszeitraumes zu versterben mit einer Hazard Ratio von 1,05 pro Tumor Bud an ( $p = 0,009$ ). Andere Studien, welche die Budding Aktivität nicht kontinuierlich, sondern graduiert betrachteten, konnten ebenfalls ein niedrigeres Gesamtüberleben bei einer hohen Budding Aktivität nachweisen. [51, 88] Die Studie von Tan et al. übernahm die Einteilung der Budding-Aktivität der ITBCC und richtete eine vierte Gruppe für Patienten ohne Tumor Budding ein. Deckend mit den Ergebnissen dieser Studie stieg die Hazard Ratio bezogen auf das Gesamtüberleben mit steigender Budding-Aktivität an. [88]

Das Risiko am Mundhöhlenkarzinom zu Versterben war mit einer Hazard Ration von 1,07 pro gemessenem Tumor Bud in der vorliegenden Untersuchung signifikant erhöht ( $p = 0,021$ ). Mit steigender Budding Aktivität zeigte sich ebenfalls mit einer Hazard Ratio von 1,08 pro Tumor Bud eine größere Neigung zur Ausbildung von lokoregionalen Tumorrezidiven. Bezogen auf pT1 und pT2 Tumore konnten Shimizu et al. den Zusammenhang zwischen einer hohen Budding Aktivität und einem reduzierten rezidivfreien Überleben ebenfalls signifikant nachweisen. Die Einteilung der Budding Aktivität erfolgte in dieser Studie in Anlehnung an die ITBCC und nicht kontinuierlich. [38]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich ein negativer Effekt von Tumor Budding und Zellvereinzelung auch bei Mundhöhlenkarzinomen in einem bereits lokal fortgeschrittenen Stadium zeigen lässt. Vor allem die Tumor Budding Aktivität ist mit einer signifikanten Risikozunahme für ein reduziertes OS, OCSS und LRFS assoziiert. Die Tumorzellvereinzelung konnte sich in dieser Analyse ebenfalls als signifikanter Risikofaktor für ein verringertes LRFS zeigen. Diese Ergebnisse werden durch andere Arbeiten, welche das Tumor Budding und Zellvereinzelung in Bezug auf alle Tumorstadien untersucht haben, gestützt. [38, 39, 50, 51, 88]

Ein limitierender Faktor in der vorliegenden Studie besteht darin, dass die Kohortengröße durch die Betrachtung von ausschließlich lokal fortgeschrittenen

Tumoren und durch die Archivierung histologischer Präparate bis 1996 begrenzt war. Die Nachbeobachtungszeit betrug bei einigen Fällen nur wenige Monate.

Zudem war die Prognose der Patienten bezogen auf das Überleben und die Ausbildung von Rezidiven aufgrund des Tumorstadiums bereits eingeschränkt. Ein zusätzliches Risiko signifikant nachzuweisen ist in dieser Konstellation nur bei einer ausgeprägten Effektstärke oder großen Kohorte möglich.

Eine weitere Limitation lag in der erfolgten Therapie. Die Indikation zu einer adjuvanten Nachbehandlung bestand in der gesamten Kohorte und ist in den meisten Fällen in Form einer Radiotherapie oder Radiochemotherapie erfolgt. Betrachtet wurde die Kohorte in der vorliegenden Studie in der Gesamtheit und nicht nach Therapiemodalität getrennt. Durch die isolierte Betrachtung in zukünftigen Studien könnte man den Einfluss des Tumor Buddings besser bewerten. Gleichzeitig wäre es möglich eine Aussage zu treffen, ob eine adjuvante Nachbehandlung einen zusätzlichen Nutzen hat. Aktuell gibt es hierzu noch keine Studien mit eindeutigen Ergebnissen. Vor allem die Frage, ob fortgeschrittene Karzinome zusätzlich zu der bereits nach Leitlinie empfohlenen Radiotherapie von einer aggressiveren Therapie im Sinne einer Chemotherapie profitieren, ist interessant.

Neben dem Tumorstadium der betrachteten Kohorte unterschied sich auch die Auswertungsmodalität des Tumorbuddings von anderen Arbeiten. Die Definition eines Tumorbuds war zwar mit den meisten anderen Arbeiten vergleichbar, jedoch wurde in dieser Studie das Tumor Budding bereits ab dem ersten Tumor Bud als vorhanden gewertet. In den meisten anderen Arbeiten wurde ein Grenzwert festgelegt oder ein mehrstufiges System verwendet. Aktuell gibt es keinen Konsens über das Einstufungssystem des Tumor Buddings bei Kopf- und Halstumoren. Um eine bessere Vergleichbarkeit in zukünftigen Studien zu gewähren, erscheint eine einheitliche Methode, wie es für das kolorektale Karzinom durch die ITBCC erarbeitet wurde, sinnvoll.

## 5. Zusammenfassung

Karzinome der Mundhöhle machen etwa 2% aller Krebserkrankungen aus. Die Stadieneinteilung berücksichtigt die Tumorgroße, Lymphknoten- und Fernmetastasen. Das Tumorstadium korreliert mit der Prognose und ist Grundlage für die leitliniengerechte Therapie. Zunehmend werden histopathologische Risikofaktoren berücksichtigt. Das Tumor Budding beschreibt die Ausbildung kleiner Tumornester, welche sich vom Haupttumor gelöst haben. Tumor Buds, welche nur aus einer isolierten Zelle bestehen, werden als Zellvereinzelung beschrieben.

Ziel dieser Studie war es den Einfluss des Tumor Buddings und der Tumorzellvereinzelung auf das Gesamtüberleben, das krebsspezifische sowie das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Mundhöhlenkarzinom (pT3/4 und pN0-3) zu untersuchen.

Insgesamt konnten 129 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Alle Patienten wurden zwischen 1992 und Ende 2019 diagnostiziert und unterzogen sich einer leitliniengerechten Therapie in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Die Erhebung der klinischen Endpunkte, der epidemiologischen und tumorspezifischen Daten erfolgte in einer prospektiv geführten Tumordatenbank der Klinik. Die Auswertung des Tumor Buddings und der Zellvereinzelung erfolgte retrospektiv an archivierten und zunächst digitalisierten histologischen Präparaten.

Patienten mit Tumor Budding mit und ohne Zellvereinzelung zeigten in der Überlebenszeitanalyse eine erhöhte krebsspezifische Sterbe- und Rezidivrate. In einer multivariaten Analyse erhöhte das Tumor Budding mit Zellvereinzelung das Risiko für ein lokoregionales Rezidiv signifikant um das 2,32-fache. Zudem zeigte sich eine signifikante Risikozunahme pro gemessenem Tumor Bud für alle untersuchten klinischen Endpunkte.

In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse und der aktuellen Studienlage zeigt sich das Tumor Budding und die Tumorzellvereinzelung auch für das Mundhöhlenkarzinom als vielversprechender prognostischer Risikofaktor, welcher in der Primärdiagnostik sowie in der Therapieplanung Berücksichtigung finden sollte.

### III. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: TNM-KLASSIFIKATION DER MALIGNEN TUMORE, 8. AUFLAGE, LIPPEN UND MUND, TEIL 1 [23] .....	10
ABBILDUNG 2: TNM-KLASSIFIKATION DER MALIGNEN TUMORE, 8. AUFLAGE, LIPPEN UND MUND, TEIL 2 [23] .....	11
ABBILDUNG 3: GRAFISCHE DARSTELLUNG EINES PLATTENEPITHELKARZINOMS MIT AUSBILDUNG VON TUMOR BUDS UND TUMORZELLVEREINZELUNG .....	17
ABBILDUNG 4: FLUSSDIAGRAMM DER PATIENTENSELEKTION: AUSSCHLUSSKRITERIEN UND ANZAHL DER EINGESCHLOSSENEN PATIENTEN NACH GRUPPEN. ....	25
ABBILDUNG 5: MIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINES PLATTENEPITHELKARZINOMS MIT VORHANDENEM TUMOR BUDDING IN HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG.....	30
ABBILDUNG 6: PROZENTUALE VERTEILUNG DER GEMESSENEN ANZAHL VON BUDS BEZOGEN AUF DIE GESAMTHEIT VON PATIENTEN MIT NACHGEWIESENEM BUDDING .....	36
ABBILDUNG 7: KAPLAN-MEIER-KURVE - EINFLUSS TUMOR BUDDING UND TUMORZELLVEREINZELUNG AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN (OS), DAS KREBSSPEZIFISCHE ÜBERLEBEN (OCSS) UND DAS LOKOREGIONALE REZIDIVFREIE ÜBERLEBEN (LRFS).....	41

### IV. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: DESKRIPTIVE DARSTELLUNG DES ALTERS, GESCHLECHTS UND CCI STRATIFIZIERT NACH TUMOR BUDDING UND TUMORZELLVEREINZELUNG. ....	33
TABELLE 2: DESKRIPTIVE DARSTELLUNG DES NIKOTIN- UND ALKOHOLKONSUMS STRATIFIZIERT NACH TUMOR BUDDING UND TUMORZELLVEREINZELUNG. ....	34
TABELLE 3: DESKRIPTIVE DARSTELLUNG DER TUMORSPEZIFISCHEN UND HISTOPATHOLOGISCHE DATEN STRATIFIZIERT NACH TUMOR BUDDING UND TUMORZELLVEREINZELUNG.....	35
TABELLE 4: DESKRIPTIVE DARSTELLUNG DER ERFOLGTEN THERAPIE STRATIFIZIERT NACH TUMOR BUDDING UND TUMORZELLVEREINZELUNG. ....	37
TABELLE 5: DESKRIPTIVE DARSTELLUNG DER EREIGNISRATEN STRATIFIZIERT NACH TUMOR BUDDING UND TUMORZELLVEREINZELUNG. ....	38
TABELLE 6: EREIGNISRATEN NACH 2 UND 5 JAHREN STRATIFIZIERT NACH TUMOR BUDDING UND TUMORZELLVEREINZELUNG. ....	40
TABELLE 7: HAZARD RATIOS VERSCHIEDENER PROGNOSTISCHER FAKTOREN FÜR DAS GESAMTÜBERLEBEN (OS), DAS KRANKHEITSFREIE ÜBERLEBEN (OCSS) UND LOKOREGIONALE REZIDIVFREIE ÜBERLEBEN (LRFS).....	43

## V. Literaturverzeichnis

1. Sung, H., J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. *CA Cancer J Clin*, 2021. **71**(3): p. 209-249.
2. Sarode, G., N. Maniyar, S.C. Sarode, M. Jafer, S. Patil, and K.H. Awan, *Epidemiologic aspects of oral cancer*. *Dis Mon*, 2020. **66**(12): p. 100988.
3. Ren, Z.H., C.Y. Hu, H.R. He, Y.J. Li, and J. Lyu, *Global and regional burdens of oral cancer from 1990 to 2017: Results from the global burden of disease study*. *Cancer Commun (Lond)*, 2020. **40**(2-3): p. 81-92.
4. Robert-Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., *Krebs in Deutschland 2015/2016*. 2019: p. 24-27.
5. Montero, P.H. and S.G. Patel, *Cancer of the oral cavity*. *Surg Oncol Clin N Am*, 2015. **24**(3): p. 491-508.
6. Zaroni, D.K., P.H. Montero, J.C. Migliacci, J.P. Shah, R.J. Wong, I. Ganly, and S.G. Patel, *Survival outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985-2015)*. *Oral Oncol*, 2019. **90**: p. 115-121.
7. Howaldt, H.P., H. Vorast, J.C. Blecher, M. Reicherts, and M. Kainz, *Results of the DOSAK tumor register*. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 2000. **4**: p. 216-225.
8. Abati, S., C. Bramati, S. Bondi, A. Lissoni, and M. Trimarchi, *Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis*. *Int J Environ Res Public Health*, 2020. **17**(24).
9. Mehanna, H., V. Paleri, C.M. West, and C. Nutting, *Head and neck cancer-part 1: epidemiology, presentation, and preservation*. *Clin Otolaryngol*, 2011. **36**(1): p. 65-68.
10. Conway, D.I., M. Purkayastha, and I.G. Chestnutt, *The changing epidemiology of oral cancer: definitions, trends, and risk factors*. *Br Dent J*, 2018. **225**(9): p. 867-873.
11. Dhanuthai, K., S. Rojanawatsirivej, W. Thosaporn, S. Kintarak, A. Subarnbhesaj, M. Darling, E. Kryshtalskyj, C.P. Chiang, H.I. Shin, S.Y. Choi, S.S. Lee, and P. Aminishakib, *Oral cancer: A multicenter study*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2018. **23**(1): p. 23-29.
12. Hübbers, C.U. and B. Akgül, *HPV and cancer of the oral cavity*. *Virulence*, 2015. **6**(3): p. 244-248.

13. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen and Medizinischen Fachgesellschaften, *S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms*. Leitlinienprogramm Onkologie, 2021: p. 16-78.
14. Thompson, L., *World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours*. Ear Nose Throat J, 2006. **85**(2): p. 74.
15. Schwenzer, N.E., M., *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde, Band 2: Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2011. **4**: p. 81-83.
16. Johnson, D.E., B. Burtness, C.R. Leemans, V.W.Y. Lui, J.E. Bauman, and J.R. Grandis, *Head and neck squamous cell carcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2020. **6**(1): p. 92.
17. Xu, B., A.M. Salama, C. Valero, A. Yuan, A. Khimraj, M. Saliba, D.K. Zaroni, I. Ganly, S.G. Patel, N. Katabi, and R. Ghossein, *The prognostic role of histologic grade, worst pattern of invasion, and tumor budding in early oral tongue squamous cell carcinoma: a comparative study*. Virchows Arch, 2021. **479**(3): p. 597-606.
18. Nair, D., M. Mair, H. Singhvi, A. Mishra, S. Nair, J. Agrawal, and P. Chaturvedi, *Perineural invasion: Independent prognostic factor in oral cancer that warrants adjuvant treatment*. Head Neck, 2018. **40**(8): p. 1780-1787.
19. Spoerl, S., M. Gerken, R. Fischer, A. Mamilos, S. Spoerl, S. Wolf, F. Pohl, C. Klingelhöffer, T. Ettl, T.E. Reichert, and G. Spanier, *Lymphatic and vascular invasion in oral squamous cell carcinoma: Implications for recurrence and survival in a population-based cohort study*. Oral Oncol, 2020. **111**: p. 105009.
20. Close, L.G., P.M. Brown, M.F. Vuitch, J. Reisch, and S.D. Schaefer, *Microvascular invasion and survival in cancer of the oral cavity and oropharynx*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1989. **115**(11): p. 1304-1309.
21. Mupparapu, M. and R.M. Shanti, *Evaluation and Staging of Oral Cancer*. Dent Clin North Am, 2018. **62**(1): p. 47-58.
22. Huang, S.H. and B. O'Sullivan, *Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer*. Curr Treat Options Oncol, 2017. **18**(7): p. 40.
23. Wittekind, C., *TNM Klassifikation maligner Tumoren, 8. Auflage*. 2017: Wiley-VCH. p. 25-31.
24. Dirven, R., A. Ebrahimi, N. Moeckelmann, C.E. Palme, R. Gupta, and J. Clark, *Tumor thickness versus depth of invasion - Analysis of the 8th edition American Joint Committee on Cancer Staging for oral cancer*. Oral Oncol, 2017. **74**: p. 30-33.

25. Tan, W.J., C.S. Chia, H.K. Tan, K.C. Soo, and N.G. Iyer, *Prognostic significance of invasion depth in oral tongue squamous cell carcinoma*. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2012. **74**(5): p. 264-270.
26. Almangush, A., A.A. Mäkitie, A. Triantafyllou, R. de Bree, P. Strojan, A. Rinaldo, J.C. Hernandez-Prera, C. Suárez, L.P. Kowalski, A. Ferlito, and I. Leivo, *Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update*. *Oral Oncol*, 2020. **107**: p. 104799.
27. Lee, N.C.J., A. Eskander, H.S. Park, S. Mehra, B.A. Burtness, and Z. Husain, *Pathologic staging changes in oral cavity squamous cell carcinoma: Stage migration and implications for adjuvant treatment*. *Cancer*, 2019. **125**(17): p. 2975-2983.
28. Chow, M. and Q.M. Laura, *Head and Neck Cancer*. *N Engl J Med*, 2020. **382**(1): p. 60-72.
29. Choi, N., Y. Noh, E.K. Lee, M. Chung, C.H. Baek, K.H. Baek, and H.S. Jeong, *Discrepancy between cTNM and pTNM staging of oral cavity cancers and its prognostic significance*. *J Surg Oncol*, 2017. **115**(8): p. 1011-1018.
30. Palasz, P., L. Adamski, M. Gorska-Chrzastek, A. Starzynska, and M. Studniarek, *Contemporary Diagnostic Imaging of Oral Squamous Cell Carcinoma - A Review of Literature*. *Pol J Radiol*, 2017. **82**: p. 193-202.
31. Alberico, R.A., S.H. Husain, and I. Sirotkin, *Imaging in head and neck oncology*. *Surg Oncol Clin N Am*, 2004. **13**(1): p. 13-35.
32. Hohlweg-Majert, B., M.C. Metzger, P.J. Voss, F. Hölzle, K.D. Wolff, and D. Schulze, *Preoperative cervical lymph node size evaluation in patients with malignant head/neck tumors: comparison between ultrasound and computer tomography*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009. **135**(6): p. 753-759.
33. Silva, L., M. Lopes, M.C. Sá, R. de Almeida Freitas, R.D. Coletta, E.J.D. da Silveira, and M.C. da Costa Miguel, *Histopathologic grading and its relationship with outcome in oral tongue squamous cell carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 2021. **50**(2): p. 183-190.
34. Brandwein-Gensler, M., M.S. Teixeira, C.M. Lewis, B. Lee, L. Rolnitzky, J.J. Hille, E. Genden, M.L. Urken, and B.Y. Wang, *Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival*. *Am J Surg Pathol*, 2005. **29**(2): p. 167-178.
35. Elseragy, A., T. Salo, R.D. Coletta, L.P. Kowalski, C. Haglund, P. Nieminen, A.A. Mäkitie, I. Leivo, and A. Almangush, *A Proposal to Revise the Histopathologic Grading System of Early Oral Tongue Cancer Incorporating Tumor Budding*. *Am J Surg Pathol*, 2019. **43**(5): p. 703-709.

36. Almangush, A., I.O. Bello, H. Keski-Säntti, L.K. Mäkinen, J.H. Kauppila, M. Pukkila, J. Hagström, J. Laranne, S. Tommola, O. Nieminen, Y. Soini, V.M. Kosma, P. Koivunen, R. Grénman, I. Leivo, and T. Salo, *Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer*. *Head Neck*, 2014. **36**(6): p. 811-818.
37. Sakata, J., K. Yamana, R. Yoshida, Y. Matsuoka, K. Kawahara, H. Arita, H. Nakashima, M. Nagata, A. Hirose, S. Kawaguchi, S. Gohara, Y. Nagao, A. Hiraki, M. Shinohara, R. Toya, R. Murakami, and H. Nakayama, *Tumor budding as a novel predictor of occult metastasis in cT2N0 tongue squamous cell carcinoma*. *Hum Pathol*, 2018. **76**: p. 1-8.
38. Shimizu, S., A. Miyazaki, T. Sonoda, K. Koike, K. Ogi, J.I. Kobayashi, T. Kaneko, T. Igarashi, M. Ueda, H. Dehari, A. Miyakawa, T. Hasegawa, and H. Hiratsuka, *Tumor budding is an independent prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma: With special reference to the mode of invasion and worst pattern of invasion*. *PLoS One*, 2018. **13**(4): p. 195451.
39. Boxberg, M., P.H. Kuhn, M. Reiser, A. Erb, K. Steiger, A. Pickhard, U. Straßen, I. Koob, A. Kolk, A. Warth, M. Jesinghaus, and W. Weichert, *Tumor Budding and Cell Nest Size Are Highly Prognostic in Laryngeal and Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma: Further Evidence for a Unified Histopathologic Grading System for Squamous Cell Carcinomas of the Upper Aerodigestive Tract*. *Am J Surg Pathol*, 2019. **43**(3): p. 303-313.
40. Boxberg, M., C. Bollwein, K. Jöhrens, P.H. Kuhn, B. Haller, K. Steiger, K.D. Wolff, A. Kolk, M. Jesinghaus, and W. Weichert, *Novel prognostic histopathological grading system in oral squamous cell carcinoma based on tumour budding and cell nest size shows high interobserver and intraobserver concordance*. *J Clin Pathol*, 2019. **72**(4): p. 285-294.
41. Lugli, A., R. Kirsch, Y. Ajioka, F. Bosman, G. Cathomas, H. Dawson, H. El Zimaity, J.F. Fléjou, T.P. Hansen, A. Hartmann, S. Kakar, C. Langner, I. Nagtegaal, G. Puppa, R. Riddell, A. Ristimäki, K. Sheahan, T. Smyrk, K. Sugihara, B. Terris, H. Ueno, M. Vieth, I. Zlobec, and P. Quirke, *Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016*. *Mod Pathol*, 2017. **30**(9): p. 1299-1311.
42. Müller, F., A. Lugli, and H. Dawson, *Tumor Budding beim kolorektalen Karzinom – Informationen zur klinischen Anwendung und Anleitung zur praktischen Bestimmung Tumor budding in colorectal cancer—Information for clinical use and instructions for practical evaluation*. *Der Pathologe*, 2021. **43**: p. 45-50.
43. Wang, C., H. Huang, Z. Huang, A. Wang, X. Chen, L. Huang, X. Zhou, and X. Liu, *Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 2011. **40**(7): p. 545-551.

44. Imai, T., *Histological comparison of cancer of the stomach in autopsy and operation cases*. Jpn J Cancer Res, 1949. **40**: p. 199-201.
45. Gujam, F.J., D.C. McMillan, Z.M. Mohammed, J. Edwards, and J.J. Going, *The relationship between tumour budding, the tumour microenvironment and survival in patients with invasive ductal breast cancer*. Br J Cancer, 2015. **113**(7): p. 1066-1074.
46. Neppl, C., I. Zlobec, R.A. Schmid, and S. Berezowska, *Validation of the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016 recommendation in squamous cell carcinoma of the lung-a single-center analysis of 354 cases*. Mod Pathol, 2020. **33**(5): p. 802-811.
47. Kawachi, H., Y. Eishi, H. Ueno, T. Nemoto, T. Fujimori, A. Iwashita, Y. Ajioka, A. Ochiai, S. Ishiguro, T. Shimoda, H. Mochizuki, Y. Kato, H. Watanabe, M. Koike, and K. Sugihara, *A three-tier classification system based on the depth of submucosal invasion and budding/sprouting can improve the treatment strategy for T1 colorectal cancer: a retrospective multicenter study*. Mod Pathol, 2015. **28**(6): p. 872-879.
48. Mou, S., R. Soetikno, T. Shimoda, R. Rouse, and T. Kaltenbach, *Pathologic predictive factors for lymph node metastasis in submucosal invasive (T1) colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis*. Surg Endosc, 2013. **27**(8): p. 2692-2703.
49. Wada, H., M. Shiozawa, K. Katayama, N. Okamoto, Y. Miyagi, Y. Rino, M. Masuda, and M. Akaike, *Systematic review and meta-analysis of histopathological predictive factors for lymph node metastasis in T1 colorectal cancer*. J Gastroenterol, 2015. **50**(7): p. 727-734.
50. Almangush, A., M. Pirinen, I. Heikkinen, A.A. Mäkitie, T. Salo, and I. Leivo, *Tumour budding in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis*. Br J Cancer, 2018. **118**(4): p. 577-586.
51. Xie, N., P. Yu, H. Liu, X. Liu, J. Hou, X. Chen, H. Huang, and C. Wang, *Validation of the International Tumor Budding Consensus Conference (2016) recommendations in oral tongue squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2019. **48**(6): p. 451-458.
52. Wahab, A., O. Onkamo, M. Pirinen, A. Almangush, and T. Salo, *The budding and depth of invasion model in oral cancer: A systematic review and meta-analysis*. Oral Dis, 2022. **28**(2): p. 275-283.
53. Dolens, E.D.S., M.R. Dourado, A. Almangush, T.A. Salo, C.A. Gurgel Rocha, S.D. da Silva, P.A. Brennan, and R.D. Coletta, *The Impact of Histopathological Features on the Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Comprehensive Review and Meta-Analysis*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 784924.

54. Ho, Y.Y., T.Y. Wu, H.C. Cheng, C.C. Yang, and C.H. Wu, *The significance of tumor budding in oral cancer survival and its relevance to the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer staging system*. Head Neck, 2019. **41**(9): p. 2991-3001.
55. Yu, P., W. Wang, Z. Zhuang, N. Xie, J. Xu, C. Wang, J. Hou, X. Han, and X. Liu, *A novel prognostic model for tongue squamous cell carcinoma based on the characteristics of tumour and its microenvironment: iBD score*. Histopathology, 2019. **74**(5): p. 766-779.
56. Angadi, P.V., P.V. Patil, K. Hallikeri, M.D. Mallapur, S. Hallikerimath, and A.D. Kale, *Tumor budding is an independent prognostic factor for prediction of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma*. Int J Surg Pathol, 2015. **23**(2): p. 102-110.
57. Hong, K.O., K.Y. Oh, W.J. Shin, H.J. Yoon, J.I. Lee, and S.D. Hong, *Tumor budding is associated with poor prognosis of oral squamous cell carcinoma and histologically represents an epithelial-mesenchymal transition process*. Hum Pathol, 2018. **80**: p. 123-129.
58. Kale, A.D. and P.V. Angadi, *Tumor budding is a potential histopathological marker in the prognosis of oral squamous cell carcinoma: Current status and future prospects*. J Oral Maxillofac Pathol, 2019. **23**(3): p. 318-323.
59. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-1428.
60. Huang, S.H., E. Hahn, S.I. Chiosea, Z.Y. Xu, J.S. Li, L. Shen, and B. O'Sullivan, *The role of adjuvant (chemo-)radiotherapy in oral cancers in the contemporary era*. Oral Oncol, 2020. **102**: p. 104563.
61. Huang, S.H. and B. O'Sullivan, *Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2013. **18**(2): p. 233-240.
62. Rodgers, L.W., Jr., S.P. Stringer, W.M. Mendenhall, J.T. Parsons, N.J. Cassisi, and R.R. Million, *Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth*. Head Neck, 1993. **15**(1): p. 16-19.
63. Huang, T.Y., L.P. Hsu, Y.H. Wen, T.T. Huang, Y.F. Chou, C.F. Lee, M.C. Yang, Y.K. Chang, and P.R. Chen, *Predictors of locoregional recurrence in early stage oral cavity cancer with free surgical margins*. Oral Oncol, 2010. **46**(1): p. 49-55.
64. O'Brien, C.J., S.J. Traynor, E. McNeil, J.D. McMahon, and J.M. Chaplin, *The use of clinical criteria alone in the management of the clinically negative neck among patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2000. **126**(3): p. 360-365.

65. Vonk, J., K.A. Smit, J.L.N. Roodenburg, B. van der Vegt, G.B. Halmos, J.G.M. Vemer-van den Hoek, P.U. Dijkstra, and M.J.H. Witjes, *Effect of adjuvant radiotherapy on the local recurrence of oral squamous cell carcinoma with perineural invasion: A systematic review*. Clin Otolaryngol, 2019. **44**(2): p. 131-137.
66. Chen, W.C., C.H. Lai, C.C. Fang, Y.H. Yang, P.C. Chen, C.P. Lee, and M.F. Chen, *Identification of High-Risk Subgroups of Patients With Oral Cavity Cancer in Need of Postoperative Adjuvant Radiotherapy or Chemo-Radiotherapy*. Medicine (Baltimore), 2016. **95**(22): p. 3770.
67. Mishra, R.C., D.N. Singh, and T.K. Mishra, *Post-operative radiotherapy in carcinoma of buccal mucosa, a prospective randomized trial*. Eur J Surg Oncol, 1996. **22**(5): p. 502-504.
68. Bernier, J., J.S. Cooper, T.F. Pajak, M. van Glabbeke, J. Bourhis, A. Forastiere, E.M. Ozsahin, J.R. Jacobs, J. Jassem, K.K. Ang, and J.L. Lefèbvre, *Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501)*. Head Neck, 2005. **27**(10): p. 843-850.
69. Kiyota, N., M. Tahara, and M. Fujii, *Adjuvant treatment for post-operative head and neck squamous cell carcinoma*. Jpn J Clin Oncol, 2015. **45**(1): p. 2-6.
70. Huang, J., L. Barbera, M. Brouwers, G. Browman, and W.J. Mackillop, *Does delay in starting treatment affect the outcomes of radiotherapy? A systematic review*. J Clin Oncol, 2003. **21**(3): p. 555-563.
71. Tankéré, F., A. Camproux, B. Barry, C. Guedon, J. Depondt, and P. Gehanno, *Prognostic value of lymph node involvement in oral cancers: a study of 137 cases*. Laryngoscope, 2000. **110**(12): p. 2061-2065.
72. Lundahl, R.E., R.L. Foote, J.A. Bonner, V.J. Suman, J.E. Lewis, J.L. Kasperbauer, T.V. McCaffrey, and K.D. Olsen, *Combined neck dissection and postoperative radiation therapy in the management of the high-risk neck: a matched-pair analysis*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998. **40**(3): p. 529-534.
73. Maghami, E., S.A. Koyfman, and J. Weiss, *Personalizing Postoperative Treatment of Head and Neck Cancers*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2018. **38**: p. 515-522.
74. Lavaf, A., E.M. Genden, J.A. Cesaretti, S. Packer, and J. Kao, *Adjuvant radiotherapy improves overall survival for patients with lymph node-positive head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer, 2008. **112**(3): p. 535-543.

75. Cooper, J.S., T.F. Pajak, A.A. Forastiere, J. Jacobs, B.H. Campbell, S.B. Saxman, J.A. Kish, H.E. Kim, A.J. Cmelak, M. Rotman, M. Machtay, J.F. Ensley, K.S. Chao, C.J. Schultz, N. Lee, and K.K. Fu, *Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(19): p. 1937-1944.
76. Bernier, J., C. D'Amico, M. Ozsahin, K. Matuszewska, J.L. Lefèbvre, R.H. Greiner, J. Giralt, P. Maingon, F. Rolland, M. Bolla, F. Cognetti, J. Bourhis, A. Kirkpatrick, and M. van Glabbeke, *Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(19): p. 1945-1952.
77. Schmiegel, W., B. Buchberger, M. Follmann, U. Graeven, V. Heinemann, T. Langer, M. Nothacker, R. Porschen, C. Rödel, T. Rösch, W. Schmitt, S. Wesselmann, and C. Pox, *S3-Leitlinie – Kolorektales Karzinom*. *Z Gastroenterol*, 2017. **55**(12): p. 1344-1498.
78. Attramadal, C.G., S. Kumar, M.E. Boysen, H.P. Dhakal, J.M. Nesland, and M. Bryne, *Tumor Budding, EMT and Cancer Stem Cells in T1-2/N0 Oral Squamous Cell Carcinomas*. *Anticancer Res*, 2015. **35**(11): p. 6111-6120.
79. Quan, H., B. Li, C.M. Couris, K. Fushimi, P. Graham, P. Hider, J.M. Januel, and V. Sundararajan, *Updating and validating the Charlson comorbidity index and score for risk adjustment in hospital discharge abstracts using data from 6 countries*. *Am J Epidemiol*, 2011. **173**(6): p. 676-682.
80. Kalbfleisch, J.D. and R.L. Prentice, *The Statistical Analysis of Failure Time Data*. 2011: Wiley.
81. Bryne, M., H.S. Koppang, R. Lilleng, and A. Kjaerheim, *Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value*. *J Pathol*, 1992. **166**(4): p. 375-381.
82. Li, J., X. Li, and J. Yang, *A Novel Prognostic Stratified System Based on Tumor Budding and the Cell Nest Size in Ureter Urothelial Carcinoma*. *Appl Bionics Biomech*, 2022. **2022**: p. 6988237.
83. Wang, W., J. Adeoye, P. Thomson, and S.W. Choi, *Statistical profiling of oral cancer and the prediction of outcome*. *J Oral Pathol Med*, 2021. **50**(1): p. 39-46.
84. Oh, L.J., R. Asher, M. Veness, R. Smee, D. Goldstein, N. Gopalakrishna Iyer, D. Balasubramanian, T.H. Low, C.E. Palme, R. Gupta, and J. Clark, *Effect of age and gender in non-smokers with oral squamous cell carcinoma: Multi-institutional study*. *Oral Oncol*, 2021. **116**: p. 105210.
85. Ghanizada, M., K.K. Jakobsen, J.S. Jensen, I. Wessel, J. Filtenborg Tvedskov, C. Grønhøj, and C. von Buchwald, *The impact of comorbidities on survival in oral cancer patients: a population-based, case-control study*. *Acta Oncol*, 2021. **60**(2): p. 173-179.

86. Goacher, E., R. Randell, B. Williams, and D. Treanor, *The Diagnostic Concordance of Whole Slide Imaging and Light Microscopy: A Systematic Review*. Arch Pathol Lab Med, 2017. **141**(1): p. 151-161.
87. Kai, K., S. Aishima, S. Aoki, Y. Takase, K. Uchihashi, M. Masuda, A. Nishijima-Matsunobu, M. Yamamoto, K. Ide, A. Nakayama, M. Yamasaki, and S. Toda, *Cytokeratin immunohistochemistry improves interobserver variability between unskilled pathologists in the evaluation of tumor budding in T1 colorectal cancer*. Pathol Int, 2016. **66**(2): p. 75-82.
88. Tan, A. and T. Taskin, *Tumor Budding Should Be in Oral Cavity Cancer Reporting: A Retrospective Cohort Study Based on Tumor Microenvironment*. Cancers (Basel), 2023. **15**(15): p. 3905.
89. Thakur, N., M.J. Ailia, Y. Chong, O.R. Shin, and K. Yim, *Tumor Budding as a Marker for Poor Prognosis and Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 828999.
90. Kadota, K., J. Nitadori, K.M. Woo, C.S. Sima, D.J. Finley, V.W. Rusch, P.S. Adusumilli, and W.D. Travis, *Comprehensive pathological analyses in lung squamous cell carcinoma: single cell invasion, nuclear diameter, and tumor budding are independent prognostic factors for worse outcomes*. J Thorac Oncol, 2014. **9**(8): p. 1126-1139.

## VI. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen beteiligten Personen für die Hilfe und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertationsschrift bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Samer Hakim für die enge Betreuung und die hervorragende Unterstützung auf dem gesamten Weg bis zur Fertigstellung dieser Dissertation.

Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Sieg meinen Dank aussprechen, der es mir ermöglicht hat, meine Dissertation an seiner Klinik zu verfassen.

Für die Unterstützung bei der Auswertung der histopathologischen Präparate und die Bereitstellung des technischen Equipments möchte ich mich bei den Mitarbeitenden des Instituts für Pathologie des UKSH, Campus Lübeck, bedanken. Insbesondere gilt hier mein Dank Herrn Dr. Lars Tharun.

Für die Unterstützung bei der statistischen Interpretation möchte ich mich bei Herrn Dr. Ubai Alsharif aus dem Klinikum Dortmund bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich auf meinem gesamten Werdegang begleitet haben und mir in jeder Hinsicht mit Wort und Tat zur Seite standen. Insbesondere gebührt mein Dank meinen Eltern Dr. Karina und Dr. Kai-Uwe Jensen, die mich seit Anbeginn in jeder Entscheidung bestärkt haben und mir ermöglicht haben meine Ziele zu erreichen.