

Aus dem Institut für Cytopathologie
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Böcking

Messpräzision und diagnostische Treffsicherheit der
Multimodalen Zellanalyse
an Körperhöhlen-Ergüssen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität
Düsseldorf
vorgelegt von

Christiane Henning

2010

Als Inauguraldissertation

gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr.med. Joachim Wolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Alfred Böcking

Korreferent: Prof. Dr.med. Norbert Gattermann

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	1
1 Ergüsse seröser Körperhöhlen.....	2
1.1 Klinik	2
1.2 Pathogenese der Ergussbildung	3
1.3 Ätiologie	7
1.4 Klinisches Vorgehen.....	8
1.5 Therapie von symptomatischen Ergüssen.....	10
2 Das maligne Mesotheliom	10
3 Zytologische Diagnostik.....	15
3.1 Treffsicherheiten.....	18
3.2 DNA-Bildzytometrie	21
3.3 Qualitätssicherung in der DNA-Zytometrie	24
3.4 Nukleolus Organisierende Regionen	24
4 Vor- und Nachteile der bisherigen Untersuchungstechniken	28
5 Ziel dieser Arbeit	30
II Material und Methoden	32
1 Materialauswahl.....	32
2 Arbeitsschritte und Färbungen	33
2.1 Zytologische Begutachtung in MGG	37
2.2 Interpretation der DNA-Messdaten	39
2.3 Auswertung der AgNOR-gefärbten Präparate.....	40
3 Methode: MMZA.....	41
3.1 Technische Umsetzung.	41
3.2 Komponenten.....	42
3.2.1 Hardware	43
3.2.2 Software	44
3.3 Bildverarbeitung	52
3.3.1 Vorverarbeitung	52
3.3.2 Repositionierung und Koregistrierung	54
3.3.3 Segmentierung	56
3.3.4 Klassifikation	59
3.3.5 Auswertung der DNA-Zytometrie	60
3.3.6 Nukleolus-organisierende Regionen	65
III Ergebnisse	70
1 Ablauf der Aufnahmesequenzen.....	70
1.1 Qualität von Probengut und Färbungen	71
1.2 Zellrelokation und Koregistrierung.....	73
1.3 Segmentierung	76
1.4 Klassifikation.....	78

2	Benutzeroberfläche, Benutzerführung, Visualisierung und Navigation	78
3	Treffsicherheit der konventionellen morphologischen Zytologie	80
4	DNA-Ergebnisse	81
4.1	Qualitätssicherung	81
5	Konventionelle DNA-Zytometrie	83
5.1	Treffsicherheit der DNA-Analyse	83
5.2	Histogrammtypisierung und -auswertung	91
5.3	Vergleich von Modalwerten und Variationskoeffizienten	98
6	AgNOR-Auswertung	100
6.1	Manuelle AgNOR-Analyse	100
6.2	Automatische AgNOR-Analyse	105
6.3	AgNOR-Flächenberechnung	106
7	Weitere Ergebnisse	111
7.1	DNA-Gehalt vs. AgNOR-Zahl	111
7.2	DNA-Gehalt vs. AgNOR-Fläche	112
IV Diskussion		113
1	Aktueller Stand	113
2	Der Diagnoseprozess	114
3	Mögliche technische Fehlerquellen	116
3.1	Zytologische Fehldiagnosen	117
3.2	Marker DNA-Aneuploidie	118
3.3	AgNOR-Analyse	120
3.4	Färbung	121
4	Funktionsfähigkeit des MMZA-Systems	123
4.1	Messpräzision des MMZA-Systems	124
4.1.1	DNA-Zytometrie	125
4.2	Bewertung der DNA-Ergebnisse	127
4.3	Bewertung der AgNOR-Ergebnisse	129
4.3.1	AgNOR-Zählung	130
4.3.2	AgNOR-Fläche	133
5	Multimodalität	134
V Zusammenfassung		137
Literaturverzeichnis		I-XIII
Danksagung		XIV

I Einleitung

In den Industrieländern ist Krebs die zweithäufigste Todesursache. Die Häufigkeit des Pleuramesothelioms wird dabei mit 0,16% aller malignen Tumoren und ca. 0,38% aller tumorbedingten Todesursachen angegeben. Die Inzidenz liegt bei ca. 10-15/100000/Jahr. Aufgrund der langen Latenzzeit von 20 bis 50 Jahren zwischen Asbestexposition und Erkrankung sowie erheblicher Altlasten in Form asbesthaltiger Baustoffe wird die Pleuramesotheliommortalität in den nächsten Jahren vermutlich weiter steigen (Sohrab und Konietzko, 2002).

Bei diesem „Signaltumor bei Asbestexposition“ handelt es sich um die häufigste beruflich bedingte Krebserkrankung. Im letzten Jahrzehnt nahm die Anzahl der Erkrankungen um 50% zu, mit einem weiteren Anstieg kann bis zum Jahr 2020 gerechnet werden. Die Diagnose des malignen Pleuramesothelioms gilt allerdings derzeit als schwierig, so dass Fehldiagnosen häufig sind. Der schleichende Beginn mit später Diagnose im Stadium der Inoperabilität sowie die relative Resistenz gegenüber Zytostatika und Strahlen machen das Mesotheliom zu einem sehr schwer zu behandelnden Tumor. Mit einer mittleren Überlebenszeit zwischen 4 und 12 Monaten ist die Prognose besonders ungünstig (Steele, 2002).

Diese Fakten unterstreichen die Notwendigkeit, eine leistungsstarke und rentable Mesotheliomfrühdagnostik zu entwickeln, die die bisherigen Möglichkeiten übertrifft.

Da das Auftreten eines Ergusses der serösen Körperhöhlen ein Symptom einer Vielzahl von unterschiedlichen Erkrankungen sein kann, kommt einer erschöpfenden diagnostischen Interpretation die entscheidende Bedeutung zu. Häufig sind Ergüsse das Erstsymptom einer bis dahin noch nicht bekannten Erkrankung. Da die Ätiologie oftmals nicht eindeutig ist, muss eine Abklärung erfolgen, denn daraus ergeben sich entscheidende therapeutische Konsequenzen. Die Deutung der gewonnenen Befunde und die korrekte Diagnosefindung sind aber nach wie vor schwierig.

Ein Pleuraerguss findet sich bei etwa 10% der internistisch betreuten Patienten (Pfitzer, 1993). Dabei erkrankt die Pleura nur selten primär, sondern wird häufig im Rahmen anderer Grunderkrankungen wegen ihrer unmittelbaren Nachbarschaft zu allen Organsystemen sekundär in das pathologische Geschehen miteinbezogen. Beim

malignen Mesotheliom handelt es sich um eine primäre Erkrankung der serösen Höhlen (Motherby, 1998 a).

Der Nachweis von malignen Zellen in Ergüssen infolge eines Mesothelioms oder einer Pleuritis carcinomatosa erfolgt zytologisch. Dabei sind normale, nicht aktivierte Mesothelzellen relativ eindeutig zuzuordnen, wohingegen die Unterscheidung zwischen reaktiven, respektive proliferierenden Mesothelzellen und mesothelialen Tumorzellen dem Zytopathologen oftmals schwer fällt. Nicht-invasive, aber aussagekräftige Methoden zur Untersuchung der Zellen, welche zudem die bisher erreichte diagnostische Effizienz zu steigern vermögen, könnten zukünftig bei der Diagnosestellung hilfreich sein. Die Ergusszytologie erbringt häufig als erste Untersuchungstechnik den Nachweis eines malignen Geschehens. Daher ist eine Verbesserung ihrer diagnostischen Treffsicherheit dringend erforderlich. Eine Verringerung der Spezifität darf aber nicht damit einhergehen (Koss, 1992), da eine falsch-positive Diagnose weitreichende psychische, diagnostische und therapeutische Folgen hätte.

1 Ergüsse seröser Körperhöhlen

1.1 Klinik

Eine krankhafte Vermehrung der Flüssigkeitsmenge in der Pleura-, Peritoneal- oder Perikardhöhle wird als Erguss bezeichnet. Ergüsse können Leitsymptom einer Erkrankung sein (z.B. Pleuramesotheliom), sie lassen aber allein aufgrund der Symptomatik keinen Rückschluss auf die ursächliche Grunderkrankung zu. Atemabhängige Schmerzen, Reizhusten und Dyspnoe kommen bei Pleura- und Perikardergüssen vor, wobei 25% der Patienten keine Symptome aufweisen. Eine Zunahme des Bauchumfanges mit abdominellem Spannungsgefühl, Knöchelödeme, Dyspnoe und Sodbrennen treten am häufigsten bei Aszites auf (Weber, 1997, Konietzko, 1997). Aber auch oligo- oder asymptomatische Verläufe kommen vor. Die diagnostische Wertigkeit der subjektiven Beschwerden wird durch den Entstehungsmechanismus ausschlaggebend beeinflusst, aber auch maßgeblich durch die Ergusslokalisation und die Ergussgröße (Geisler und Magnussen, 1990, Achenbach, 1997).

Die wenig typische und diagnostisch nur hinweisgebende Symptomatik sowie die diagnostische Unsicherheit der klinischen Befunde (Inspektion, Perkussion, Auskultation) müssen daher immer im Zusammenhang mit der Patientengeschichte gesehen werden. Bildgebende Verfahren sollten sich der körperlichen Untersuchung anschließen, um eventuell Rückschlüsse auf eine bestehende Grunderkrankung zuzulassen. CT oder MRT und Laboranalysen (Tumormarker u. a.) vermögen aber nicht eine exakte Beurteilung der Dignität oder der histogenetischen Klassifikation eines neoplastischen Geschehens abzugeben. Allein der Histologie und der Zytologie bleiben der verlässliche Nachweis bösartiger Neubildungen und deren Malignitätsgrading (Bestimmung des Differenzierungsgrades der Tumorzellen) vorbehalten.

Mehr als 50 verschiedene Krankheiten können zu einem Erguss führen. Meist erfolgt daraufhin eine diagnostische Punktion oder eine therapeutische Drainage. In ca. 45% der Fälle sind bösartige Zellen enthalten, und in 45% dieser tumorzellpositiven Ergüsse liefert eine zytologische Untersuchung den ersten Hinweis auf einen Primärtumor (Bedrossian, 1994). Die wichtigste Aufgabe der Zytologie ist dabei die Differenzierung zwischen Malignität und Benignität der Zellen in Ergussflüssigkeiten. Zudem können, im Falle eines tumorbedingten Ergusses, Aussagen zum Tumortyp und zur Organzugehörigkeit (ursächlicher Primärtumor) getroffen werden. Ist der die Flüssigkeitsansammlung verursachende Tumor bekannt, ist ein Grading und Staging möglich. Des Weiteren werden therapeutische Optionen und evtl. das weiterführende diagnostische Vorgehen durch die Zytodiagnostik beeinflusst, denn die Therapie kann an das entsprechende Tumorstadium angepasst werden und die Effizienz einer therapeutischen Maßnahme kann überprüft werden. Daher hat die treffsichere zytologische Abklärung von Ergüssen eine große klinische Bedeutung.

1.2 Pathogenese der Ergussbildung

Vielfältige Mechanismen tragen zur Entstehung eines Ergusses bei (Classen, 1994): Abweichungen des hydrostatischen oder onkotischen Drucks, der Kapillarpermeabilität oder Interzellular-Kohärenz, eine renal bedingte Natrium-Wasser-Retention oder eine Verlegung der Lymphabflussbahnen (z.B. durch maligne Zellen) bedingen die vermehrte Flüssigkeitsansammlung. Erkrankungen, die die

Dynamik/das Gleichgewicht von Flüssigkeitssekretion und –absorption stören, gehen mit einer Ergussbildung einher. Die Pleura kann dabei auch mit Entzündungen, Verklebungen und Gewebszunahme reagieren. Die primären und sekundären pathologischen Veränderungen der Pleura gehen hierbei in der Regel mit einer Veränderung der Zusammensetzung der sezernierten Flüssigkeit einher. Klinisch und kausalpathogenetisch wird unterschieden zwischen Transsudaten, Exsudaten und neoplastisch bedingten Ergüssen seröser Körperhöhlen.

1. Eine Erhöhung des hydrostatischen Druckes in den Kapillaren, z.B. bei kardialer Dekompensation oder
2. die Erniedrigung des onkotischen Druckes aufgrund von Hypoproteinämie, z.B. bei nephrotischem Syndrom oder Leberinsuffizienz sowie
3. eine Abnahme des intrapleuralen Druckes (bei Totalatektase eines Lungenflügels, Lungenembolie)

führen aufgrund einer lokalen oder systemischen Stauung zu einem eiweißarmen Transsudat. Diese meist zellarme, vorwiegend lymphozytäre Flüssigkeit weist laborchemisch einen niedrigen Eiweißgehalt (<30g/l) und ein geringes spezifisches Gewicht (<1,015g/l) auf.

Ruft ein entzündlicher Prozess eine pathologische Flüssigkeitsansammlung hervor (32-36% der Fälle), entsteht ein Exsudat (Van Haam, 1977). Im Falle einer Entzündung ist das Exsudat bedingt durch eine Permeabilitätsstörung der splanchnischen Gefäße, die zur Exsudation führt. Durch

4. eine erhöhte Kapillarpermeabilität für Flüssigkeiten, Zellen und Eiweiß (Pleuritis bei Pneumonie, Infektionen mit Bakterien, Viren, Pilzen, Tuberkulose, Urämie, Strahlen, rheumatische Erkrankungen)

kommt es zu einem eiweiß- und zellreichen (Leukozyten, Lymphozyten) Exsudat. Der vermehrte Eiweißgehalt (>30g/l) ist durch den Austritt von Akut-Phase-Proteinen und Antikörpern bedingt. Das spezifische Gewicht liegt bei mehr als 1,015g/l.

Trans- oder Exsudate entstehen durch

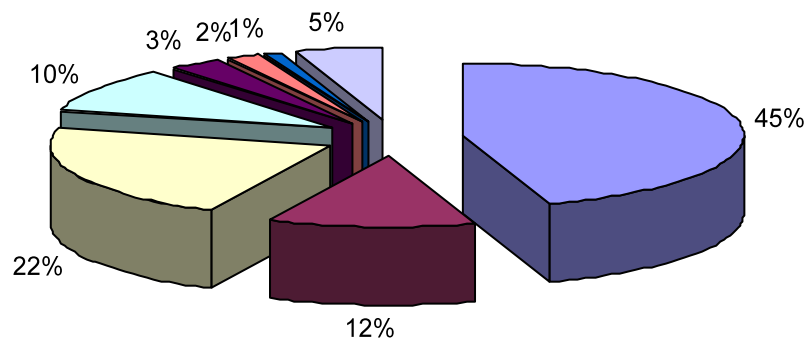
5. eine verminderte Lymphdrainage wegen Tumorzellen oder aber durch
6. Aszitesübertritt über diaphragmale Lymphbahnen oder Zwerchfelldefekte.

Die Entstehung eines Aszites bei Lebererkrankungen ist ein noch nicht vollständig aufgeklärtes, multifaktorielles Geschehen, welches in Zusammenhang mit einem Ungleichgewicht von Starlingkräften steht. Dabei spielen neben lokalen auch

systemische Mechanismen wie die renale Natrium-Retention und die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems eine Rolle (Classen, 1994).

Die Behinderung des Lymphabflusses durch Tumorzellen ruft bei Peritonealkarzinosen ein Exsudat hervor. Insgesamt liegt der Anteil neoplastisch bedingter Exsudate bei mehr als 40%. Als Sekundärtumor ist besonders die Pleuritis carcinomatosa zu erwähnen. Diese wird häufig durch primäre Lungentumoren (besonders Adeno- und kleinzellige Karzinome), gefolgt vom Mammakarzinom und malignen Primärtumoren von Ovar, Uterus, Prostata, Magen-Darm-Trakt, Pankreas, Niere und Leber verursacht. Die Metastasierung erfolgt auf lymphogenem oder hämatogenem Wege, oder aber per continuitatem. Die eher seltenen Primärtumoren der Pleura können sowohl maligne als auch benigne sein. Auch sie rufen Exsudate hervor.

Häufigkeit der Pleuraergüsse (nach Hausheer und Yarbro, 1985)



■	Maligne Tumoren: Metastasierende Karzinome (am häufigsten: Männer: Bronchialkarzinome, Frauen: Mammakarzinome), metastasierende Sarkome, maligne Mesotheliome, maligne Lymphome
■	Herzinsuffizienz: Rechtsherzinsuffizienz, Linksherzinsuffizienz
□	Infektiös (Pneumonie, Pleuritis): Tuberkulose (10%), Bakteriell (9%), Viral (1%), Empyem (1%), Fungal (<1%), Parasitär (<1%)
□	Unbestimmt
■	Lungeninfarkt/-embolie
■	Leberzirrhose
■	Kollagenosen
□	Andere: Niereninsuffizienz, Rheumatismus, Trauma, Asbestose, Pankreatitis

Abb. I.1: Ätiologie der Pleuraergüsse

Die Unterscheidung zwischen Trans- und Exsudaten ist insofern für die Klärung der Ätiologie wichtig. Dazu dient die Bestimmung von Gesamteiweiß, spezifischem Gewicht, Zellgehalt und Laktatdehydrogenase. Bei Nachweis eines Transsudates kann unter Umständen auf eine weiterführende Diagnostik verzichtet werden, sofern das klinische Gesamtbild für eine extrapleurale benigne Grunderkrankung spricht (z.B. Herzinsuffizienz, Nierenerkrankungen, Lebererkrankungen) und keinerlei Tumorverdacht besteht. Exsudate hingegen sprechen eher für eine pleurale Ursache und bedürfen weiterer differentialdiagnostischer Maßnahmen (Light, 1997). Laborchemisch ergeben sich somit Anhaltspunkte für die Dignität des Ergusses, der Nachweis von Malignität ist allerdings nicht möglich. Bei der Untersuchung maligner Ergussflüssigkeiten ist zudem eine histogenetische Klassifikation (Aufdecken der Primärlokalisierung eines Tumors) und eine Bestimmung des Differenzierungsgrades der Zellen (Malignitätsgrading) möglich. Dadurch kann der behandelnde Arzt die Therapie gezielt an das entsprechende Stadium und den entsprechenden Tumortyp anpassen.

<p>Biochemie</p> <p>Spezifisches Gewicht Gesamt-Eiweiß (Trans- oder Exsudat) LDH pH Glukose Amylase Gesamt-Fette Cholesterol Ammoniak Hyaluronsäure CEA, ACE, C3-C4, etc.</p> <p>Zytologie</p> <p>Zytologische Untersuchung (Papanicolau, Diff-Quick) Zellzählung und Differentialbild (Giemsa) Spezialfärbungen Immunzytochemie Elektronenmikroskopie</p>	<p>Quantitative Analyse</p> <p>Flowzytometrie (Oberflächenmarker, DNA-Ploidie) Morphometrie Bild-Analyse AgNOR-Zählung</p> <p>Mikrobiologie</p> <p>Kulturen Gram-Färbung</p> <p>Immunologie</p> <p>Rheuma-Faktoren Komplement Antinukleäre-Antikörper</p> <p>Andere</p> <p>Zytogenetik</p>
---	--

Tab. I.1: Laboruntersuchungen von Ergüssen seröser Körperhöhlen
Quelle: Bedrossian (1994)

1.3 Ätiologie

Etwa 10% der internistischen Patienten entwickeln im Krankheitsverlauf einen Pleuraerguss. Hinweise auf die Ätiologie können Anamnese, klinische Symptomatik, bildgebende Verfahren sowie Zytologie und klinisch-chemische Analysen der Ergussprobe geben. Primär pleuropulmonale Erkrankungen, aber auch extra- und intrathorakale sowie systemische Erkrankungen, die sekundär einen Erguss erzeugen, sind Ursache einer pathologischen Flüssigkeitsansammlung.

Eine kardiale Stauung ist mit 30-40% die häufigste Ursache, gefolgt von pneumonischen (30%) und neoplastischen (15%) Primärerkrankungen. Lungenembolien und Infarkte (11%), Leberzirrhose, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Tuberkulose und die Asbest-assoziierte Pleuritis rufen Pleuraergüsse hervor. 30% der Ergüsse entstehen im Rahmen von Entzündungen. In pneumologischen Kliniken sind derzeit sogar 40% der Ergüsse malignombedingt. Sekundär metastatische Tumoren der Pleura sind etwa 20-mal häufiger als primäre Pleuratumoren (Müller, 1997). Ein Pleuraerguss tritt in 80% der Fälle bei Vorliegen eines primären Pleuratumors auf und ist somit dessen wichtigstes Leitsymptom. Sogar bei 90% der metastatischen sekundären Pleuratumoren entwickelt sich ein Erguss, wobei dieser in 40% zugleich auch die Erstmanifestation des malignen Geschehens ist (Whitaker und Shilkin, 1984 und Loddenkemper, 1994). Bei etwa 30-80% der Patienten mit unklarem Erguss kann schon durch die alleinige Anwendung der *Zytologie* dessen maligne Ätiologie festgestellt werden. Bei weiteren 15-20% ergeben sich hochgradige Verdachtsmomente für Bösartigkeit (Gatzemeier und Magnussen, 1988, Light, 1997). Die Ausbildung eines Ergusses im Rahmen eines malignen Geschehens hat unterschiedliche Entstehungsmechanismen. Maligne Ergüsse sind Folge einer direkten Tumorinvasion in die Pleura, wohingegen indirekt induzierte Ergüsse (Begleitergüsse) einen zytologisch benignen Charakter aufweisen, weil sie ohne zwingenden direkten Tumorkontakt entstehen.

Am häufigsten werden *Pleuraergüsse* zytologisch untersucht. In 45% dieser Fälle werden Tumorzellen gefunden. Bei Männern stammen diese meist von Filiae eines Bronchialkarzinoms, bei Frauen von Brustkrebsmetastasen (Hausheer und Yarbro, 1984).

*Aszites*untersuchungen werden etwas seltener veranlasst. Hierbei sind Leberzirrhose und Herzinsuffizienz die häufigsten ätiologischen Mechanismen, geben

aber aufgrund ihrer klinischen Eindeutigkeit seltener Anlass zur zytologischen Abklärung. Die tumorbedingten Fälle (10%) entfallen auf Gastrointestinalmetastasierung bei Männern und Ovarialfilialisierung bei Frauen (Bedrossian, 1994). Daneben kommen Endometrium- und Mammakarzinome vor, sowie gastrointestinale und hepatozelluläre Karzinome (Hentrich und Hartenstein, 1997).

Perikardergüsse machen weniger als 1% aller untersuchten Ergüsse aus. Knapp die Hälfte ist durch eine Neoplasie hervorgerufen. Hierbei sind 80% der ursächlichen Tumoren Bronchialkarzinome, Mammakarzinome, maligne Lymphome oder Leukämien (Wilkes et al., 1995). Des Weiteren führen Herzinfarkte, Peri- und Myokarditis Ergüsse des Herzbeutels herbei.

1.4 Klinisches Vorgehen

Der Verdacht auf das Vorliegen eines Ergusses ergibt sich aus Anamnese und klinischer Symptomatik. Anschließend versucht der Arzt, diesen durch eine körperliche Untersuchung zu untermauern. Der genaue Nachweis einer pathologischen Flüssigkeitsansammlung gelingt dann mit Hilfe von Röntgenaufnahmen, Sonographie, Computer- und Kernspintomographie.

Therapeutische (z.B. wegen Behinderung der Atemmechanik) und diagnostische Punktionen werden bei Vorhandensein eines Ergusses vorgenommen. Bei operativen Eingriffen besteht die Möglichkeit, mittels Aspiration, Bürstung oder einer Lavage Ergussflüssigkeit zu gewinnen. Falls die erzielte Menge zu gering ist, kann bei sogenannten „second look“-Operationen nach Tumorresektionen mit der Lavagetechnik noch ein ausreichend großes Volumen erzielt werden (Ziselman et al., 1984). Auch per Endoskopie oder aus Drainagen und Dialysaten können Ergussflüssigkeiten gewonnen werden. Der Nachweis eines Ergusses gelingt mittels Sonographie bei Pleuraergüssen schon ab einem Volumen von 10ml (Reuß, 1992), bei Aszites ab 10-15ml (Schlümerich, 1992). Konventionelle Röntgenaufnahmen oder in seltenen Fällen die Computertomographie dienen ebenfalls dem primären Nachweis und der Quantifizierung einer pathologischen Flüssigkeitsansammlung.

Die diagnostische Treffsicherheit der Ergusszytologie ist abhängig von der Menge des Untersuchungsmaterials bzw. der Zellkonzentration (Motherby, 1999). Daher ist es erforderlich, neben der Aspiration eines hinreichend großen Volumens (mindestens 50-100 ml) die Punktion am tiefsten Punkt der Körperhöhle vorzunehmen, da die Zellen dorthin sedimentieren.

Der Versand des Ergusses sollte möglichst zügig erfolgen, da die Zellen nur einen Zeitraum von zwei bis drei Tagen bei Raumtemperatur ohne morphologische Schäden überdauern. Kann diese Frist nicht eingehalten werden, kann der Erguss vor Ort zentrifugiert werden (340g/5min). Die vom Sediment angefertigten Ausstriche können anschließend dem Labor zugesandt werden. Hinweisend kann schon das makroskopische Aussehen der Flüssigkeit sein: klar, purulent, chylös oder hämorrhagisch. Bei eventuell im Erguss befindlichen Präzipitaten oder Gewebspartikeln werden gefärbte Schnitte angefertigt.

In Abhängigkeit von der diagnostischen Fragestellung stehen dem Arzt weitere Untersuchungsmöglichkeiten bei Ergüssen zur Verfügung: Im Labor werden biochemische, mikrobiologische, immunologische sowie zytologisch-morphologische Parameter bestimmt. Das Anlegen einer Zellkultur oder die Anwendung der Zytogenetik kann ebenfalls hilfreich sein. Daneben ist mittels Spezialfärbungen und Immunzytochemie eine gezielte Suche nach Tumorzellen durchführbar. Die DNA-Bild-Zytometrie als quantitativ-analytisches Verfahren kommt ebenso zur Anwendung wie die AgNOR-Analyse.

Weitere notwendige Informationen wie Anamnese, klinische Befunde und (Verdachts-) Diagnosen sowie die diagnostische Fragestellung sollten durch den Kliniker mitgeteilt werden, da sie für den Zytopathologen eine korrekte Interpretation seiner mikroskopischen Befunde unter Umständen erst ermöglichen. Die Auskunft seitens des Klinikers über Grunderkrankungen des Patienten (z.B. Entzündungen, portale Stauung, Herzinsuffizienz, Primärtumor) gibt dem Zytopathologen wertvolle Hinweise auf die mögliche Genese des Ergusses. Auch durchgeführte therapeutische Maßnahmen wie Strahlen- oder Chemotherapie sollten unbedingt erwähnt werden, da diese Zellveränderungen bedingen, welche in der zytomorphologischen Diagnostik zu Verwechslungen mit Krebszellen führen können.

1.5 Therapie von symptomatischen Ergüssen

Vor allem die Verbesserung der Lebensqualität des Patienten steht im Vordergrund der klinischen Therapie, da die Ausbildung eines malignen Ergusses meist auf eine lediglich palliative Behandlungsmöglichkeit im Rahmen einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung hinweist. Besteht kein kuratives Therapieziel, erfolgt auch keine Behandlung wenn der Erguss asymptomatisch ist. Eine einfache Punktion der Ergussflüssigkeit ist mit einer Rezidivquote von bis zu 97% innerhalb eines Monats verbunden (Anderson et al., 1974). Zudem steigen bei wiederholten Punktionen die Infektionsgefahr und die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines gekammerten Ergusses. Im Gegensatz dazu gelingt bei symptomatischen, rezidivierenden tumorbedingten Pleuraergüssen mit einer Pleurodesebehandlung mittels Mitoxantron, Bleomycin und Tetrazyklin (Groth et al., 1991; Walker-Renard et al., Ruckdeschel et al., 1991; Bjermer et al., 1995) die langfristige fibröse Verklebung beider Pleurablätter miteinander.

Die intraperitoneale Instillation von Zytostatika wie Cisplatin oder Mitoxantron wird kontrovers diskutiert (Parsons et al., 1996). Ist eine hepatische Filialisierung Ursache des Aszites, ist eine diuretische Therapie mit Spironolacton oder Furosemid zweckmäßig (Pockros et al., 1992). Nur bei Patienten mit therapierefraktärem Aszites und deutlich eingeschränkter Lebenserwartung ist die operative Anlage eines peritoneovenösen Shunts trotz der damit verbundenen hohen Komplikationsrate (Shuntverschlüsse, Infektionen, Gerinnungsstörungen) indiziert (Gough and Balderson, 1993).

2 Das maligne Mesotheliom

Als Mesotheliome bezeichnet man die primären Tumoren der serösen Häute: Pleura, Peritoneum und Perikard, seltener auch der Hodenhüllen. Als Ursache eines Ergusses sind sie derzeit in Deutschland von besonderer klinischer und epidemiologischer Bedeutung (Woitowitz, 1987; Müller und Kusmann, 1996). Inzidenz und Mortalität des malignen Pleuramesothelioms sind seit Jahren ansteigend. Derzeit sterben in Deutschland pro Jahr etwa 800 Menschen am malignen

Mesotheliom. Die Betroffenen sind in der Mehrheit Personen, die beruflich Asbeststaub ausgesetzt waren. Zu dieser Entwicklung trug hauptsächlich die Expansion der asbestverarbeitenden Industrie, vor allem Ende der siebziger Jahre, bei (McDonald et al., 1989). In dieser Zeit war Asbest in der Bundesrepublik in über 3000 Produkten enthalten. 1989 wurde er in die Gefahrenstoffklasse I eingeordnet. Wenngleich die berufliche Asbestexposition bereits seit 1975 stark abgenommen hat, wird der Zenit neu aufgetretener maligner Pleuramesotheliome in Deutschland für 2017 erwartet (S. Sohrab und N. Konietzko, 2002).

Schon 1938 wurde der Zusammenhang zwischen der Entstehung eines Mesothelioms und der Asbestexposition am Arbeitsplatz von Teutschländer erkannt (Zit. in Wedler, 1943). 1977 wurde schließlich das durch Asbest verursachte maligne Mesotheliom in die Liste der Berufskrankheiten aufgenommen. Studien zur Dosis-Wirkungsbeziehung belegen ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko schon bei geringen Faserkonzentrationen von 0,1 bis $370 \times 10^6/\text{g}$ (Tuomi et al., 1990). Ergebnisse einer bundesdeutschen Studie sprechen für ein erhöhtes Mesotheliomrisiko bereits bei einer durchschnittlichen Umweltexposition. Als mögliche Ursachen für die Entwicklung eines Mesothelioms wurden auch Talkum (Rödelsperger et al., 1990) und künstliche Mineralfasern (Woitowitz et al., 1993) diskutiert. Da zwischen der anamnestisch angegebenen Asbestfaserbelastung und dem Auftreten der ersten Symptome eines malignen Mesothelioms im Mittel 35 Jahre liegen (Battifora und McCaughey, 1994), ist mit einem Anstieg der jährlichen Mesotheliominzidenz (derzeit ca.600) zu rechnen (Raithel, 1996). Das erwartete Maximum der als Berufskrankheit (BK-Nr. 4105) anerkannten Neuerkrankungen wird auf ca. 1.000 Fälle im Jahre 2010 geschätzt. 1999 wurden in Deutschland 600 neue Fälle als Berufskrankheit anerkannt. Es werden bis zu 20 Mesotheliomerkrankungen auf 100 Todesfälle bei Asbestexponierten beschrieben (Woitowitz, 1987). Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. Diese Tatsache und die unterschiedlich lange Latenzzeit (20 bis 50 Jahre) zwischen Staubexposition und Tumorentstehung haben sowohl zeitliche als auch differentialdiagnostische Schwierigkeiten zur Folge (Brockmann et al., 1990).

Erst im fortgeschrittenen Stadium führt das Mesotheliom zu klinischen Symptomen. Im Krankheitsverlauf treten Thoraxschmerzen, Luftnot bei körperlicher Belastung, trockener Reizhusten, rezidivierende Fieberschübe und B-Symptomatik zu spät auf, um den Patienten rechtzeitig zu einem Arztbesuch zu bewegen. Häufig

kommt es später zusätzlich zu Komplikationen wie Schluckbeschwerden, Hornersyndrom, Perikardtamponade oder obere Einflusstauung (Chrétien und Letournex, 1983).

Oft ist als Leitsymptom ein großer Pleuraerguss radiologisch sichtbar (Raithel et al., 1996). Bei 91% der unbehandelten Mesotheliompatienten finden sich laut Yilmaz et al. (1998) Pleuraergüsse. Der Befund eines Ergusses führt dann meist zu weiterführender invasiver Diagnostik in Form von Computertomographie, MRT, Feinnadelaspirationsbiopsie und Thorako- bzw. Laparoskopie mit Biopsie. Die bildgebenden Verfahren sind aber erst dann erfolgreich in der Beurteilung des Tumors, wenn dieser bereits ein raumforderndes Stadium erreicht hat. Dabei ist diese Art der Untersuchung aufgrund der Gerätetechnik kostspielig und aufgrund der zeitaufwendigen Aufnahmetechnik oftmals unangenehm für den Patienten. Außerdem wird der Patient bei der Untersuchung mit Röntgenstrahlung belastet.

Die Diagnosesicherung der diffusen Pleuramesotheliome gelingt bedauerlicherweise in über 90% aller Fälle erst im fortgeschrittenen Stadium ($> T1$) (Raithel et al., 1996). Eine kurative Therapie ist dann wegen des ausgedehnt infiltrierenden, diffusen Wachstums äußerst selten erfolgreich. Therapie und Prognose der Mesotheliomkranken sind daher meist infaust. Die mittlere Überlebensrate liegt bei 4-18 Monaten (S. Sohrab und N. Konietzko, 2002). In einer Studie von Ribak und Selikoff (1992) an 457 asbestexponierten Mesotheliomkranken zeigte sich eine signifikante Differenz in der Überlebenszeit pleuraler (11,4 Monate) und peritonealer (7,4 Monate) Mesotheliome. Nur in früheren Stadien kann eine Heilung oder zumindest langjährige Remission gelingen, und zwar durch radikale Pleuropneumonektomie unter Mitnahme aller infiltrierten Teile von Diaphragma, Perikard und Interkostalmuskulatur in Kombination mit adjuvanter Radio-Chemotherapie (Sugarbaker et al., 1995). Auch die Kombination von operativer Tumorentfernung und lokaler Interferoninstillation ist in diesem Stadium noch aussichtsreich (Boutin und Rey, 1993). Als Palliativtherapie wird eine Pleurektomie vorgenommen oder aber eine analgesierende Bestrahlung. Mit dem Ziel einer Teilremission kann versuchsweise eine Chemotherapie durchgeführt werden (Schiebe et al., 1994). Auch über die Tumorresektion kombiniert mit intraoperativer hyperthermer Peritonealperfusion mit Cisplatin wird berichtet (Ma et al., 1997). Die Pleurodesebehandlung bei malignen Pleuraergüssen stellt die wichtigste lokale Maßnahme zur Prophylaxe eines Rezidivergusses und bei Unmöglichkeit einer

systemischen Therapie dar (Light, 1990). Trotz intensiver Diagnostik- und Therapiebemühungen ist der Krankheitsverlauf rasch letal: Die Überlebenszeit für die Patienten liegt im Median bei 10 Monaten (Hillerdal, 1983). Eine spezifische Frühtherapie existiert derzeit noch nicht.

Folglich ist die Frühdiagnostik derzeit der wirkungsvollste Ansatz zur Verbesserung der Therapieoptionen des malignen Mesothelioms. Neben dem Screening Asbestexponierter ist also vor allem die zytologische Früh- und Differentialdiagnostik des erstmanifesten Ergusses entscheidend und prognoseverbessernd (Renshaw et al., 1997), da dadurch die Heilungsaussichten für die Betroffenen durch den früheren Einsatz adäquater Therapien ansteigen. Überdies ist erst nach der Diagnosestellung eines asbestverursachten Mesothelioms durch ein berufsgenossenschaftliches Gutachten die finanzielle Absicherung der Betroffenen durch eine Minderung der Erwerbsfähigkeit von 100% gesichert (Raithel et al., 1996).

Bisher spielte die zytologische Untersuchung von Ergüssen seröser Körperhöhlen nur eine untergeordnete Rolle bei der Verifizierung eines Mesotheliomverdacht. Eine histologische Abklärung war notwendig, um im berufsgenossenschaftlichen Gutachten den bereits manifesten Tumor belegen zu können. Obwohl seröse Ergüsse in bis zu 90% der Fälle lange der radiologischen, klinischen oder histologischen Nachweisbarkeit vorausgehen (Mohrmann, 1996), waren sie bisher ein verkanntes Untersuchungsgut. Renshaw et al. (1997) beobachtete an der Gesamtheit ihrer Mesotheliomerkrankten jeweils wenigstens einen Erguss. Allerdings lag die von ihnen beschriebene Sensitivität der zytologischen Befundung bei nur 32%, weshalb sie eine darauffolgende histologisch-biopsische Abklärung befürworteten. Folglich wurde die gezielte Biopsie als bedeutsamstes diagnostisches Mittel angesehen (Averbach und Sugarbaker, 1996).

Mittlerweile ist es aber möglich, mittels ergusszytologischer adjuvanter Verfahren, ein malignes Mesotheliom zu diagnostizieren und es von sekundären, metastatischen Tumoren differentialdiagnostisch abzugrenzen. In dieser Arbeit wurde durch die Kombination der nicht invasiven Methoden eine Verbesserung der diagnostischen Treffsicherheit angestrebt.

Die erzielbaren Heilungserfolge sind abhängig vom Zeitpunkt und der Sicherheit der Detektion, von der präzisen Klassifikation des Tumortyps und von der validen Einstufung seines Malignitätsgrades. Die (Früh-) Diagnostik ist der klinische Ansatz, der leichter und effektiver als die Therapie verbessert werden kann. Vielmehr bildet

die Frühdiagnostik unspezifischer oder asymptomatischer Ergüsse von Pleura und Peritoneum die Voraussetzung für den Erfolg kurativer Therapieansätze mittels radikaler chirurgischer und radiologisch-chemotherapeutischer Schritte.

In der Pathologie bzw. Histologie werden größere Mengen an Untersuchungsmaterial auf eine invasive und für den Patienten schmerzhaft Art und Weise gewonnen und anschließend untersucht. Mit der Zytopathologie dagegen ist eine Form von „sanfter Krebsdiagnostik“ möglich, die nicht nur eine frühzeitige Befunderstellung erlaubt und zudem preiswert ist, sondern ferner durch ihre unblutige Durchführbarkeit eine für den Patienten angenehme und für die Kostenträger günstige ambulante Diagnostik ermöglicht. Die Compliance und Akzeptanz seitens der Patienten steigt aufgrund der fast schmerzfreien und nahezu komplikationslosen Entnahme des Untersuchungsmaterials.

Die Entnahme nur geringer Mengen an Untersuchungsmaterial sollte eine ethische Forderung der Medizin sein. Bisher stellte sich in der Zytopathologie aber das Problem der eingeschränkten diagnostischen Möglichkeiten an derart wenig Zellmaterial der Verfolgung dieses Ziels entgegen. Die Rate an (aufgrund zu geringer Zellzahl) unzureichenden Proben führte zur Ablehnung von Präparaten. Gleichzeitig zeigte sich eine niedrige Treffsicherheit bei Präparaten mit einer nur minimalen Zellzahl .

Mit dieser Arbeit wird hierfür ein Lösungsansatz geboten: Durch die kombinierte Anwendung bereits erprobter und wissenschaftlich anerkannter adjuvanter zytologischer Methoden ist es nun möglich, eine höhere diagnostische Treffsicherheit zu erreichen. Es können mehr Proben ausgewertet werden, da selbst eine geringe Anzahl an Zellen diagnostisch ausreichend ist. Überdies kann an wenigen Zellen mehr Information gewonnen werden.

Um einen hohen Qualitätsstandard sicherzustellen und aufrechtzuerhalten, muss zudem die Reproduzierbarkeit der Diagnostik gegeben sein, da sonst im Rahmen der Validierung des zytologischen Befundes weitere, unter Umständen mit Komplikationen verbundene diagnostische und therapeutische Maßnahmen durch den Kliniker eingeleitet werden müssten. Unnötige und kostspielige Kontrollbiopsien und Operationen fänden statt, die dem Patienten die Entscheidung für eine primäre zytologische Abklärung seiner Erkrankung sehr fragwürdig erscheinen ließen.

3 Zytologische Diagnostik

Grundsätzlich finden sich in der Ergussflüssigkeit folgende Zelltypen: Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen, Mesothelzellen und im Falle eines malignen Geschehens auch Tumorzellen. Eine morphologische Konkordanz zwischen der ursächlichen Erkrankung der serösen Höhlen und den zellulären Bestandteilen der Ergussflüssigkeiten gibt es aber nicht. Die bedeutsamste Aufgabe der diagnostischen Zytologie von Ergüssen ist infolgedessen der Tumorzellnachweis. Neben den üblicherweise durchgeführten Routinefärbungen stehen bei speziellen Fragestellungen auch immunzytologische Färbungen zur Verfügung.

Bei der zytologischen Befundung von Ergüssen seröser Körperhöhlen existieren 11 unterschiedliche Gruppen morphologisch-diagnostischer Kriterien mit etwa 80 verschiedenen Aspekten, die unterschieden werden. Folgende Merkmale werden differenziert: Zellkerne, Nukleolen, Chromatin, Kern-Kern-Beziehungen, Zytoplasma (-vakuolisierung), Pigmentierung, Zellform, Kern-Plasma-Relation, Zell-Zell-Verbindungen und Zellarrangement.

Zellkern	Zytoplasma	Arrangement
Zellkerne: <ul style="list-style-type: none"> • Vergrößerung • Anisonukleose • Mikrokerne • Polymorphie • Kernmembran-Unregelmäßigkeit • Kernmembran-Verdickung 	Zytoplasma: <ul style="list-style-type: none"> • Strukturlos • Vakuolisiert • Granuliert • Strähnig-wabig • Fibrillär • Scheckig • Dicht • Transparent 	Zellform: <ul style="list-style-type: none"> • Rund • Oval • Kubisch • Zylindrisch • Dreieckig • Polygonal • Zipflig • Geschwänzt • Polymorph • Rechteckig begrenzt • Glatt begrenzt • Polyzyklisch begrenzt
Nukleolen: <ul style="list-style-type: none"> • Vergrößerung • Größenvariabilität • Vermehrung • Polymorphie • Kernmembranständigkeit 	Zytoplasma-Vakuolisierung: <ul style="list-style-type: none"> • Kleine Vakuolen • Große Vakuolen • Größenvariable Vakuolen • Seifenschaumartige Vakuolen • Apikale Vakuolen 	Zell-Zell-Verbindungen: <ul style="list-style-type: none"> • Interzellularspalten • Interzellularbrücken • Zellgrenzen • Interzelluläre Fenster • Interzelluläre Lumina • Intrazelluläre Lumina

Zellkern	Zytoplasma	Arrangement
Chromatin: <ul style="list-style-type: none"> • Feinkörnig • Grobkörnig • Hyperchromasie • Anisochromasie • Irreguläre Verteilung 	Pigmentierung: <ul style="list-style-type: none"> • Galle • Lipofuszin • Hämosiderin • Melanin • Anthrakotisch 	Zell-Zell-Lagerung: <ul style="list-style-type: none"> • Einzel • Gruppen • Verbände • Synzytien • Einschichtig • Mehrschichtig • Hexagonal • Zwiebschalenartig • Azini • Drüsen • Papillen • Trabekel • Kugeln
Kern-Kern-Beziehungen: <ul style="list-style-type: none"> • Nuclear moulding • Nuclear crowding • Dachziegelartige Überlagerung • Fischzugartige Lagerung • Kreuzende Kernachsen • Rosettenartig • Perlschnurartig • Palisadenartig 	Kern-Plasma-Relation: <ul style="list-style-type: none"> • Vergrößert • Verkleinert • Variabel 	

Tab. 1.2: Diagnostische Kriterien der Ergusszytologie. Aus: Motherby (1998c)

Anhand dieser Kriterien wird die zytologische Diagnose, abhängig von der Wahrscheinlichkeit, nach der maligne Zellen vorliegen, in eine Kategorie der „Düsseldorfer Nomenklatur“ eingeordnet (Böcking, 1998). Sind keine malignen Zellen feststellbar, so lautet die Diagnose „negativ“, ist das Vorhandensein nicht auszuschließen, „zweifelhaft“, ist es wahrscheinlich, „dringend verdächtig“, und falls Tumorzellen sicher nachweisbar sind, „positiv“.

Unzureichend	Negativ	Zweifelhaft	Dringender Verdacht	Positiv
Für eine zytologische Diagnostik nicht hinreichend erhaltene oder repräsentative Zellen	Bösartige Zellen sind nicht nachweisbar (p = 0%)	Bösartige Zellen sind nicht auszuschliessen (p ca. 30%)	Bösartige Zellen sind wahrscheinlich (p ca. 70%)	Sicher mit bösartigen Zellen (p = 100%)

„Düsseldorfer Nomenklatur“, Böcking und Freudenberg (1998a)

Zytologisch spezifische Diagnosen sind solche, die sich allein aufgrund morphologischer Kriterien stellen lassen, ohne dass klinische Informationen mit in die Befunde eingehen. Dabei wird nach benigner und maligner Dignität unterschieden.

Benigne Dignität (entspricht nicht tumorösen, spezifischen Grundkrankheiten, wie zytologisch angegeben)	Maligne Dignität (entspricht der Metastasierung durch spezifische Primärtumoren oder malignen Mesotheliomen, wie zytologisch angegeben)
<ul style="list-style-type: none"> ○ Unauffälliger Erguss ○ Stauungserguss ○ Hämorrhagischer Erguss ○ Chronisch-entzündlicher Erguss ○ Akut-entzündlicher Erguss ○ Eitriger Erguss ○ Tuberkulöser Erguss ○ Chylöser Erguss 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Karzinom o.n.A. ○ Adenokarzinom o.n.A. schleimbildendes/siegelringzelliges ○ Plattenepithelkarzinom ○ Kleinzelliges Karzinom ○ Undifferenziertes Karzinom ○ Malignes Mesotheliom ○ Malignes Lymphom Hodgkin-Lymphom Non-Hodgkin-Lymphom o.n.A. hochmalignes/niedrig malignes ○ Sarkom ○ Malignes Melanom

Tabelle I.3: Zytologisch spezifische Diagnosen in Ergüssen seröser Körperhöhlen. Aus: Motherby (1998c)

Des Weiteren gibt es zytologisch bedingt spezifische Diagnosen, bei denen ebenfalls eine gutartige und eine bösartige Dignität differenziert werden.

Benigne Dignität Vereinbar mit nicht tumorösen, spezifischen Grundkrankheiten		Maligne Dignität Vereinbar mit Metastasierung durch spezifische Primärtumoren	
<ul style="list-style-type: none"> • Herzinsuffizienz • Portale Hypertension • Herzinfarkt • Pneumonie • Pleuritis • Pankreatitis • Peritonitis • Perikarditis • Myokarditis • Mykose • Parasitenbefall 	<ul style="list-style-type: none"> • Rheumatismus • Niereninsuffizienz • Dialysat • Asbestose • Trauma • Pneumothorax • Fremdkörperreaktion • Meigs-Syndrom • Mesenterialinfarkt • Strahlenreaktion • Zytostatikareaktion 	Karzinosen <ul style="list-style-type: none"> • Speicheldrüsenkarzinome • Schilddrüsenkarzinome • Bronchialkarzinome • Ösophaguskarzinome • Mammakarzinome • Gallengangskarzinome • Pankreaskarzinome • Dickdarmkarzinome • Nierenzellkarzinome • Urothelkarzinome • Hodenkarzinome 	Leukämien und Lymphome <ul style="list-style-type: none"> • Lymphatische Leukämien • Myeloische Leukämien • Hodgkin-Lymphome • Non-Hodgkin-Lymphome • hochmaligne • niedrigmaligne

Benigne Dignität Vereinbar mit nicht tumorösen, spezifischen Grundkrankheiten		Maligne Dignität Vereinbar mit Metastasierung durch spezifische Primärtumoren	
<ul style="list-style-type: none"> • Kollagen-Krankheiten • Lungeninfarkt • Sarkoidose 		<ul style="list-style-type: none"> • Ovarialkarzinome • Endometriumkarzinome • Cervix-uteri-Karzinome • Pseudomyxoma peritonei 	Sarkomatosen <ul style="list-style-type: none"> • Leiomyosarkome • Rhabdomyosarkome • Fibrosarkome • Liposarkome • Osteosarkome • Chondrosarkome

Tabelle I.4: Zytologisch bedingt spezifische Diagnosen. Aus: Motherby (1998c).

3.1 Treffsicherheiten

Die Differenzierung zwischen entzündlich alterierten und hyperplastischen oder neoplastischen Mesothelzellen oder abgesiedelten Zellen eines Adenokarzinoms ist oftmals wegen ihrer zytomorphologischen Gleichartigkeit nahezu aussichtslos (Salerno et al., 1990). Die morphologischen Erscheinungsbilder reaktiv veränderter Zellen und metastatischer Adenokarzinomzellen weisen unter Umständen große Ähnlichkeiten auf (Boon et al., 1984; van de Molengraft et al., 1981). Aktivierte Mesothelzellen weisen z. T. eine erhebliche Zell- und Kernpolymorphie auf, die eine Abgrenzung zum Mesotheliom erschweren (Müller, 1997). Sherman und Mark (1990) gelang bei der Untersuchung von 89 Pleuraergüssen aufgrund von Mesotheliomen in nur 53% der Fälle ein Nachweis maligner Zellen und in nur 37% die spezifische Diagnosesicherung des Mesothelioms. Weitere Schwierigkeiten ergeben sich insbesondere bei der sicheren Differentialdiagnostik zwischen Karzinosen (metastatische Adenokarzinome) und malignen epithelialen Mesotheliomen.

Wegen der daraus erwachsenden gutachterlichen, aber auch therapeutischen Konsequenzen ist gerade in diesen Fällen eine sichere Unterscheidung erforderlich. Zudem erschweren Zelldegeneration und Zellarmut eine treffsichere zytologische Diagnosefindung, so dass häufig eine eindeutige Dignitätsbeurteilung allein aufgrund zytologischer Kriterien nicht möglich ist. Die schwierige Abgrenzung zwischen Makrophagen, Mesothelzellen und Tumorzellen sowie stark hämorrhagische, entzündliche Begleitreaktionen stellen weitere Erschwernisse dar. Zellatypien durch

Bestrahlungen, vorangegangene Chemotherapien, mehrfache Punktionen oder einen Pneumothorax, können einen malignen Erguss vortäuschen (Grundmann, 1984). Ist die Zahl entarteter Zellen inmitten einer benigne proliferierten Mesothelzellpopulation sehr klein, ist eine definitive Tumordiagnosestellung nicht gerechtfertigt. Eine zweifelsfreie Dignitätseinschätzung anhand von zytologischen Bewertungskriterien gelingt oft nicht aufgrund von Mangel an Qualität (schlechter Erhaltungszustand) oder Menge des eingesandten Untersuchungsmaterials. Daher lautet die zytologische Diagnose aus technischen Gründen dann „zweifelhaft“ oder „dringend verdächtig auf das Vorliegen von Tumorzellen (Böcking, 1998 b). In der Routinediagnostik liegt der Anteil an diagnostisch zweifelhaften Fällen bei etwa 6% (Böcking, 1998 b). Die Beurteilung lautet „Dringender Verdacht auf das Vorliegen von Tumorzellen“ bei durchschnittlich bei 2,9- 5,8% der peritonealen Proben und bei 1,8-7,7% der pleuralen Flüssigkeiten, mit einem Durchschnitt von 5,6% für alle Fälle (Motherby, 1998 c).

Die Sensitivität der konventionellen zytologischen Diagnostik für die Erkennung von Tumorzellen in Ergüssen der serösen Höhlen beträgt nur etwa 58% (Durchschnitt aus einer Literaturübersicht über mehr als 6.000 Fälle aus sechs Studien, Spriggs und Boddington, 1989). Folglich ergibt sich eine Rate unentdeckter Tumoren (falsch negative Diagnosen) von 42%. Prakash und Reimann (1985) berichten über eine Sensitivität der zytologischen Diagnostik von 48%. Die Spezifität beträgt ca. 97%, was mit einer mittleren Rate falsch positiver Befunde von 3% einhergeht. Positiver und negativer Prädiktionswert werden mit 99,3% bzw. 80% beziffert. Eine Optimierung der diagnostischen Treffsicherheit, speziell der Nachweisrate (Sensitivität), ohne Verlust von Spezifität (Koss, 1992), ist daher unerlässlich. Die zum Teil erhebliche Schwankungsbreite der Treffsicherheit, betreffend die Dignitätsbeurteilung von 40-87%, wird von zwei Faktoren besonders beeinflusst: dem Tumortyp und der Erfahrung des Zytologen (Light, 1997).

Zur Steigerung der Effektivität der zytopathologischen Diagnostik gibt es diverse Zusatzuntersuchungen. Neben der (statischen und Flow-) DNA-Zytometrie und der AgNOR-Analyse, auf die später noch näher eingegangen wird, stehen dem Zytopathologen noch Methoden wie die Immunzytochemie, das Magnetic Activated Cell Sorting (MACS), die Atomic Force Microscopie (AFM), die klassische Zytogenetik, die Interphase-Zytogenetik (FISH) und die Elektronenmikroskopie zur Verfügung.

Autoren	Erguss	Fälle gesamt	gesamt mit Malignom	Zytologie positiv	Zytologie unklar	Zytologie negativ	gesamt ohne Malignom	Zytologie positiv	Zytologie unklar	Zytologie negativ	Sensitivität in %
Ceelen (1964)	peritoneal	159	72	59	5	8	87	1	2	84	81
Lopez Cardozo (1966)	pleural	1248	546	339	29	178	702	2	62	638	62
Lopez Cardozo (1966)	peritoneal	344	199	144	16	39	145	0	4	141	72
Johnson (1966)	pleur.&perit.	766	345	131	69	145	421	0	15	406	37
Spriggs&Boddington (1968)	pleural	1746	640	349	31	260	1106	3	0	1103	54
Spriggs&Boddington (1968)	peritoneal	452	321	207	3	101	131	0	0	131	64
Mouriquand et. al. (1977)	pleural	1039	296	200	30	66	743	4	7	732	67
Martensson et. al. (1985)	pleural	247	139	60	16	63	108	0	3	105	43
Spriggs&Boddington (1989)	Metaanalyse	6001	2558	1489	209	860	3443	10	93	3340	58
Salerno et. al. (1989)	peritoneal	127	32	7	X	25	95	0	X	95	22
Bueno et. al. (1990)	pleural	401	189	99	X	90	212	0	X	212	52
Giazza et. al. (1990)	pleural	200	105	63	X	42	95	1	X	94	60
Nance et. al. (1991a)	pleural	385	109	77	9	23	276	0	2	274	71
Pinto (1996)	pleur.&perit.	111	56	43	X	0	55	0	X	55	76
Kuaban et. al. (1995)	pleural	336	54	36	X	18	282	X	X	X	67
Oliva et. al. (1995)	pleural	104	87	48	X	39	17	0	X	17	55
Motherby et. al. (1998c)	pleural	291	88	44	13	31	203	2	4	197	50
Motherby et. al. (1998c)	peritoneal	293	93	58	9	26	200	0	4	196	62

Tab. I.5: Diagnostische Treffsicherheit der Ergusszytologie: Angaben aus der Weltliteratur seit 1964 bis 1998

3.2 DNA-Bildzytometrie

Sowohl maligne als auch benigne Neoplasien weisen von den übrigen Körperzellen abweichende numerische und/oder strukturelle Chromosomenaberrationen auf. Diese treten nicht in normalen oder reaktiv veränderten Zellen auf (Sandberg, 1990). Primäre Aberrationen erscheinen früh und sind gelegentlich spezifisch für den auslösenden Tumor. Im Zuge der Tumorprogression kommen gelegentlich noch sekundäre und tertiäre Aberrationen hinzu, welche oft eine Verschlechterung der Prognose bedeuten (Heim und Mitelman, 1995). Daher erlaubt die Chromosomenanalyse nicht nur die Detektion und Identifizierung von Tumorzellen (eventuell schon vor der klinischen Manifestation: Hansteen et al., 1993), sondern auch eine Analyse der malignen Potenz des Tumors (Füzesi et al., 1993). Im Moment ist die Anwendung der konventionellen Zytogenetik aber für den routinemäßigen Einsatz in der Diagnostik noch zu kostspielig und aufwendig. Als logische Alternative ist der Nettoeffekt der chromosomalen Aberrationen in Form des DNA-Gehalts der Zellkerne messbar. Dieser kann somit als mikroskopisch erfassbarer diagnostischer Marker dienen.

DNA-Aneuploidie ist das quantitative zytometrische Äquivalent chromosomaler Aneuploidie (Böcking et al., 1994). Als DNA-Aneuploidie bezeichnet man eine DNA-Verteilung in einer Zellpopulation, die statistisch signifikant von der einer gesunden Population (ruhende, proliferierende oder polyploide Zellen) abweicht (Böcking et al., 1997). Nur in Tumorzellen ist der DNA-Gehalt um mehr als ein Zehntel der Chromosomenmasse verringert oder vermehrt. Gleichsam entspricht ein Nachweis von DNA-Aneuploidie dem Nachweis von Tumorzellen. Da der Gesamtmessfehler der DNA-Zytometrie $\pm 10\%$ beträgt, kann erst eine größere Abweichung des DNA-Gehalts der untersuchten Zellen den neoplastischen Ursprung der Zellen beweisen. Nur ein gewebsspezifisches Maß an DNA-Aneuploidie gilt als Malignitätskriterium, da in einigen Geweben, wie z.B. der Schilddrüse, aneuploide DNA-Verteilungen auch in gutartigen Tumoren gefunden wurden. Liegt keine Aneuploidie vor, so ist es dennoch nicht ausgeschlossen, dass Malignität vorliegt; denn je nach Typ weisen 5-20% der Tumoren derart geringe chromosomale Aberrationen auf, dass diese DNA-zytometrisch nicht belegbar sind.

Prinzip der statischen DNA-Zytometrie: Die DNA der Zellkerne wird stöchiometrisch mit speziellen Farbstoffen angefärbt. Dann wird das absorbierte Licht

pro Zellkern photometrisch gemessen. Es erfolgt eine Kalibrierung mit Zellen bekannten DNA-Gehaltes. Schließlich wird die Häufigkeitsverteilung der DNA-Gehalte der Zellkerne in Form von Histogrammen graphisch dargestellt.

Im Gegensatz dazu werden bei der Durchflusszytometrie (Flowzytometrie) die angefärbten Zellen unter Hochdruck durch eine Kapillare gepresst und die Emission des Fluoreszenzlichtes mittels Photodioden ermittelt.

In unserem Fall haben wir das Verfahren der so genannten Bildzytometrie angewendet. Mit Hilfe eines TV-Bildanalyse-Systems wurden dabei die Werte der integrierten optischen Dichten (IODs) der auf Objektträgern fixierten Zellen gemessen.

Die diagnostische Zweckmäßigkeit der DNA-Zytometrie bei der Identifizierung von neoplastischen Zellen und Mesotheliomzellen in Ergussproben wurde bereits mit einigen Studien dokumentiert (u.a. Spriggs et al., 1989; Kapusta et al., 1991; Salet-van der Pol, 1994; Dejmek et al., 1992; Isobe et al., 1995). In der Literatur wurde die geringste Sensitivität für die Flow- und statistische DNA-Zytometrie mit 48% angegeben (Salet-van der Pol, 1994). Andere Studien erreichten mittels statischer DNA-Zytometrie indessen Werte von 89-100% bei der Verwendung von DNA-aneuploiden Stammlinien als Malignitätsmarker.

Vor allem bei Proben, deren zytologische Diagnose allenfalls als „zweifelhaft“ oder „dringend verdächtig“ eingestuft werden kann, ist die Anwendung dieses Systems vorteilhaft und Erfolg versprechend. Die Rate diagnostisch unklarer Ergüsse, die zytologisch untersucht werden, liegt laut einer Studie von Spriggs und Boddington (1989) bei etwa 6%. „Dringend verdächtig auf das Vorliegen von Tumorzellen“ sind zwischen 2,9% und 5,8% der Peritonealergüsse und zwischen 1,8% und 7,7% der Pleuraergüsse, laut Motherby et al. (1998). In diesen zytologisch zweifelhaften Fällen liegt die Prävalenz von DNA-Aneuploidie zwischen 12,5% und 60% (Croonen et al., 1988; Matter-Walstra und Kraft, 1996; Fischler et al., 1994; Joseph et al., 1995).

DNA-Aneuploidie wurde von Freni et al. (1971) in 49% der durch Tumoren verursachten Ergüsse festgestellt. Höhere Werte für die Prävalenz von DNA-Aneuploidie wurden zwar von Schneller et al. (1987) mit 73% , von Banks et al. (1994) mit 77% und von Kapusta et al. (1991) mit 100% erreicht; jedoch sank dadurch ihre Spezifität (bei Kapusta et al. 15% falsch positive Ergebnisse). Dennoch lag die Prävalenz von DNA-Aneuploidie stets höher als die von denselben Autoren erzielten Ergebnisse bei der Flow-Zytometrie. Bei der Anwendung der DNA-Bildzytometrie

fanden Dejmek et al. (1992) und Hafiz et al. (1988) aneuploide DNA-Ergebnisse bei 59% bzw. 89% der tumorzellhaltigen serösen Ergüsse. Eine Untersuchung von zytologisch unklaren Ergüssen mit dem Ziel der diagnostischen Abklärung wurde nur von wenigen Wissenschaftlern vorgenommen. Ihre Resultate mit Einsatz der Bildzytometrie lagen bei 12,5 bis 60% (Freni et al., 1971, Fischler et al., 1994, Matter-Walstra et al., 1996). Dabei gab es keinen Fall mit benignem follow-up, der ein aneuploides DNA-Histogramm aufwies. Die starke Schwankung dieser Ergebnisse war unter anderem begründet in nicht standardisierten Färbetechniken oder Messgeräten. Dennoch kann DNA-Aneuploidie als hinreichend sensitiver und hoch spezifischer Marker für die Erkennung von Tumorzellen in zytologisch unklaren Ergüssen beurteilt werden.

Mehrere Faktoren beeinflussen die Identifikationsrate von DNA-Aneuploidie in Tumorzellen:

- das Ausmaß, in dem sich der DNA-Gehalt der untersuchten Zellkerne vom normalen $2c$ -Gehalt unterscheidet
- die Messpräzision der Bildzytometrie (Sanchez et al., 1990, Kindermann et al., 1994, Haroske et al., 1995 und 1996, Thunissen et al., 1997)
- die Algorithmen, mit denen die diagnostische Interpretation der Messdaten und die Identifikation von DNA-Aneuploidie im DNA-Histogramm vorgenommen werden
- die Anzahl der Zellen, die gemessen wird

Durch den heutigen, deutlich verbesserten Stand der Messtechnik und die Anwendung von, im „Europäischen Consensus Report“ (Böcking et al., 1995, Giroud et al., 1998 und Haroske et al., 2001) festgelegten, standardisierten Messprotokollen, wurde eine vereinheitlichte und diagnostisch sicherere DNA-Zytometrie möglich.

3.3 Qualitätssicherung in der DNA-Zytometrie

Im Rahmen der Gewährleistung von Qualität, Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des Systems wurden die Messungen gemäß den Empfehlungen der ESACP durchgeführt (Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry, Haroske et al., 2001, 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry, Part 1, Haroske et al., 1997 und Part 2, Giroud et al., 1997, Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry, Böcking et al., 1995). Um eine Uniformität und Reliabilität der diagnostischen Ergebnisse sicherzustellen, müssen neben der Materialaufarbeitung, den Färbebedingungen, der Auswahl der Analysezellen, dem Skalierungsprozess und der Interpretation der Messergebnisse auch die densitometrischen Messungen qualitätskontrolliert und standardisiert ablaufen. Im Zuge dieser Bestrebung wurden DNA-Messungen an Objektträgern mit Rattenhepatozyten vorgenommen. Die Messungen an diesen biologischen Testpräparaten geben Information über die Materialaufarbeitung und die Qualität der Messungen. Sie gestatten insofern die Qualitätskontrolle des gesamten Ablaufs von der Feulgen-Färbung bis zur IOD-Messung.

3.4 Nukleolos Organisierende Regionen

Die AgNOR-Analyse dient auch zur Unterscheidung zwischen reaktiven und neoplastischen Zellen in Ergüssen seröser Körperhöhlen. Eine besondere Indikation ist die Identifizierung von Tumorzellen in diagnostisch zweifelhaften Fällen.

Als „Nukleolos Organisierende Regionen“ (NORs) werden Chromosomenabschnitte bezeichnet, auf denen die ribosomalen Gene (rDNA) liegen. Es handelt sich dabei um die kurzarmigen Abschnitte der akrozentrischen Chromosomen 13 – 15, 21 und 22. Sie regulieren unter Kontrolle der RNA-Polymerase (Transkriptase), sowie einer Reihe spezifischer NOR-assoziiierter Proteine die Synthese ribosomaler RNA (Busch et al., 1982). Das Transkriptionsprodukt der NORs – die RNA- dient als Baustein für die Herstellung von Ribosomen. NORs sind folglich zentrale Schaltstellen in der Regulation der Proteinbiosynthese (Fakan und Hernandez-Verdun, 1986). Entscheidende Funktionen der non-Histon-Proteine

(Nukleoplasmine) sind die Zusammenführung der rDNA bzw. die Chromatinorganisation im Nukleolus (Reimer et al., 1987 und Sato, 1988) und die Regulation der RNA-Synthese (Jordan, 1987).

Durch eine *Färbung mit Silbernitrat* können mit der rDNA verbundene non-Histon-Proteine markiert werden. Diese sind dann als braun-schwarze Punkte in den Zellkernen dargestellt und werden als AgNOR (argyrophilic staining of NORs) bezeichnet. Sie sind überwiegend als Substrukturen in den Nukleolen sichtbar. Die AgNORs liegen im Zellkern in zwei Formationen vor: in kleineren oder größeren Gruppen als sog. Cluster (entsprechend Nukleolen) oder als einzelne, verstreute Punkte außerhalb der Nukleolen, als sog. Satelliten. Da die AgNOR-Reaktion an Proteine gebunden ist, welche nur mit entspiralisierten, aktiv transkribierenden NOR-Genen verbunden sind, kann so die Proliferationstendenz einer Zelle auf molekularer Ebene demonstriert werden (Ferraro und Prantera, 1988). Der Aktivitätszustand der rDNA (NORs) wird dabei durch die Argyrophilie der Proteine widerspiegelt (Rüschhoff, 1990). Lewin deckte bereits 1987 auf molekulargenetischer Ebene die zentrale Funktion der NORs in der gesamten zellulären Proteinbiosynthese auf. Derenzi et al. (1989, 1990 a und b) zeigten auf, dass Interphasekerne einen erhöhten Gehalt an AgNORs zeigten. AgNOR-Zahl und -Fläche auf Chromosomen korrelieren dabei aber nur locker mit den im Interphasekern gefundenen Werten. Anzahl und Größe sind von der Zellzyklusphase und -dauer, der Ausreifung der Zelle sowie vom Ploidiestatus der Zelle abhängig (Rüschhoff, 1990,1992; Carillo et al., 1994; Trevisan et al., 1993; Sujathan et al., 1996).

Die Anzahl der AgNORs im Interphasekern ist abhängig von drei Mechanismen:

- Chromosomale Aneuploidie (Schwarzacher et al., 1988)
- rDNA-Amplifizierung (Roberts et al., 1987)
- Änderung der NOR-Anordnung im Raum (Zatsepina et al., 1988 und Derenzini et al., 1989)

Die *Anzahl* der gefärbten AgNORs korreliert mit der Zellzyklusphase (Bigras et al., 1996; Zoeller, 1994). Je nach Phase weist eine normale Zelle dabei ein (S-Phase), drei (G1) oder bis zu sieben (G2) AgNORs auf. Unmittelbar vor und nach der Mitose ist die größte Anzahl sichtbar (Zoeller, 1994). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Silberreaktion verknüpft ist mit zahlreichen biologischen Einflüssen wie dem Zellzyklus, dem Reife- und Proliferationsgrad sowie der Dignität einer Zelle. Die

AgNOR-Zählung dient der Unterscheidung von gut- und bösartigen Zellbildern und damit der Dignitätsbeurteilung (Crocker, 1990).

Die *Anwendbarkeit* der AgNOR-Analyse wurde bereits an Ergussmaterial demonstriert. Derenzini et al. (1989) beschrieben an 105 Ergüssen eine gute Trennschärfe zwischen normalen und reaktiv entzündlich veränderten Mesothelzellen einerseits sowie zwischen Zellen von metastatischen Karzinomen und Mesotheliomzellen andererseits. In der Arbeit von Ayres et al. (1988) wurde eine signifikant höhere AgNOR-Zahl bei malignen Zellen gemessen. Außerdem unterschieden sich normale und reaktiv veränderte Pleurazellen signifikant voneinander. Vor allem undifferenzierte neoplastische Zellen wiesen eine außergewöhnlich hohe mittlere NOR-Zahl auf. Auch Colecchia et al. (1992) konnten gutartige von bösartigen Ergussproben anhand der AgNOR-Zahl separieren. Martin et al. (1992) untersuchten die mittlere AgNOR-Zahl und NOR-Fläche von 37 Pleuraergüssen. Sie konnten eine Korrelation zwischen höherem Malignitätsgrad und Zunahme der AgNOR-Zahl und –Gesamtfläche feststellen, wohingegen die Größe der individuellen NORs umgekehrt proportional sank. Huang et al. (1994) untersuchten 71 Ergussproben. Sie fanden durchschnittlich 12,57 (+/- 3,64) AgNORs pro Zelle bei maligner Genese und 3,96 (+/-1,39) bei benigner Genese des Ergusses. Die Untersuchungen von Bethwaite et al. (1995) ergaben für reaktive Proben einen Wert von 3,68 (95%CI: 3,17-4,19) und für maligne Proben 5,10 (95%CI: 4,35-5,84) bei der mittleren AgNOR-Zahl. Sowohl Lin et al. (1994) als auch Antonangelo et al. (1994) konnten beim Vergleich von malignen und benignen Ergussproben mit Hilfe der AgNOR-Zahl-Analyse zwischen malignen und benignen Proben differenzieren. Pomjanski et al. (2001) machten einen Schwellwert von 4,5 (Summe aus Clustern und Satelliten) aus, mit Hilfe dessen sie eine Detektionsrate für Tumorzellen von 97,5% erzielten. Motherby et al. (1999) ermittelten sogar eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 97,1% für die AgNOR-Analyse zum Zweck der Identifizierung maligner Zellen.

Dagegen fand die Arbeitsgruppe um Carillo et al. (1994) bei der Korrelation von AgNOR-Zahlen mit den Ergebnissen der konventionellen Zytologie und der Flow-Zytometrie keine statistisch signifikante Differenz der AgNOR-Anzahl in malignen und benignen Ergüssen. Auch eine statistische Beziehung zwischen der AgNOR-Zahl und der DNA-Ploidie war nicht feststellbar. Huang et al. (1994) fanden indessen in Pleuraergüssen höhere Werte in malignen als in benignen Zellen und höhere in

aneuploiden als in diploiden Tumorzellen. Bei malignen Ergüssen stellten sie zudem eine Korrelation zwischen der mittels DNA-Flowzytometrie ermittelten S-Phase-Fraktion und der durchschnittlichen AgNOR-Zahl pro Nukleus fest.

Es hat sich gezeigt, dass nicht nur die Anzahl der AgNORs, sondern auch deren *Größe, Farbintensität und Verteilung* in den Zellkernen ein Maß für die Proliferationstendenz der untersuchten Zellpopulation sind. Diese Parameter spiegeln den Aktivitätsgrad der Zelle wider. Arbeiten, die sich mit dem AgNOR-Verhalten bei Zellreifung und -differenzierung beschäftigten (Reeves et al., 1984, Smetana und Likowsky, 1984), zeigten, dass die Anzahl der Silberniederschläge im Bereich der Nukleolen mit zunehmender Zellreifung zwar sinkt, die Partikelfläche selbst aber zunimmt. Derenzini et al. (1989) untersuchten Pleuraergusszellen mit Hilfe der AgNOR-Analyse und einer automatischen Bildanalysetechnik.

Ziel der Arbeit war es, quantitative Unterschiede in der Gesamtfläche der AgNORs in Hinblick auf die Dignität aufzudecken. Ergebnis war, dass die mittlere AgNOR-Fläche bei Mesotheliomen und Adenokarzinomen signifikant höher war als bei reaktiv veränderten Mesothelzellen. Zudem stellte sich heraus, dass neoplastische Zellen eine höhere Anzahl von AgNORs pro Zellkern (<11 nicht neoplastisch, >54 neoplastisch) und eine größere Variabilität, die Größe und Verteilung betreffend, aufwiesen. Laut Rüschoff (1992) ist in zytologischen Ausstrichen die Bestimmung der Gesamt-AgNOR-Fläche im Zellkern der einfachen Auszählung der einzelnen AgNOR-Partikel überlegen. Für die Schilddrüse wurde in neusten Untersuchungen diese Beobachtung bestätigt (Rüschoff et al., 1993, Shechtman et al., 1998). Die Übertragbarkeit dieser Beobachtung soll in der vorliegenden Arbeit auch für Ergussmaterial überprüft und bewertet werden.

4 Vor- und Nachteile der bisherigen Untersuchungstechniken

Die grundsätzlichen *Vorteile* der einzelnen etablierten adjuvanten Methoden sind offensichtlich:

In den Ergussflüssigkeiten, die in 90% der Fälle im Frühstadium eines malignen Mesothelioms auftreten, finden sich meist vom Tumor abgeschilferte Zellen. Diese stehen für die zytologische Untersuchung zur Verfügung. Die Entnahme des Untersuchungsmaterials ist kaum mit Unannehmlichkeiten oder mit Schmerzen verbunden. Per Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) ist eine bis auf 5mm zielgenaue Punktion möglich, bei der weder mit Blutungen noch mit Infektionen gerechnet werden muss. Ein akzidentelles Setzen von Metastasen wurde ebenfalls nicht beobachtet (Ravetto et al., 2000).

Die etablierten Untersuchungstechniken weisen zum Teil hohe Spezifitäten (sicherer Krebsausschluss) oder hohe Sensitivitäten (hohe Tumordetektionsquote) auf, genügen jedoch niemals beiden Forderungen.

Die konventionelle Zytodiagnostik erkennt allerdings nur 32% der malignen Mesotheliome, wohingegen die Anwendung moderner adjuvanter Methoden wie der DNA-Zytometrie und der AgNOR-Analyse eine Steigerung der Treffsicherheit auf 95% erlauben (Pomjanski et al., 2001). Bis zu 100% der metastatischen Karzinomzellen können so in den Ergüssen detektiert werden (Pomjanski et al., 2001). Vielversprechende Daten liegen auch für die Brauchbarkeit als Mittel der Erstdiagnostik vor: in 45% der malignen Ergüsse liefert die Zytodiagnostik den ersten Hinweis auf das Vorliegen eines bösartigen Tumors. In 73% können Mesotheliome vor allen anderen Methoden und in 47% schon im Stadium T1 diagnostiziert werden (Böcking et al., 2000). Mit Hilfe der DNA-Zytometrie können Krebszellen um mehrere Monate bis Jahre früher als mit der subjektiven mikroskopischen Untersuchung alleine erkannt werden (Motherby et al., 1998, Böcking et al., 2000, Pomjanski et al., 2001 und Grote et al., 2003).

Der breite Einsatz dieser Verfahren wird jedoch durch eine Reihe von *Nachteilen* und Unvollkommenheiten stark eingeschränkt:

- Konventionelle morphologische Begutachtung:

Das Vormustern der Präparate ist vor allem Aufgabe von Zytologisch-Technischen Assistentinnen (CTA). Durch Schließung fast aller CTA-Schulen ist es in diesem Aufgabenbereich zu einer enormen Fachkräfteverknappung gekommen. Eine umfassende konventionelle lichtmikroskopische Analyse der Präparate erfordert zum einen das Expertenwissen eines erfahrenen Zytopathologen. Zum anderen stellt die Dauer der Untersuchung einen nicht unerheblichen Kostenfaktor dar. Überdies ist die Treffsicherheit der auf diese Art gewonnenen Diagnosen nicht immer ausreichend. Zudem sind die qualitativen Aussagen einer visuellen Auswertung subjektiv und inter- und intra-individuellen Schwankungen unterworfen.

- Statische DNA-Zytometrie:

Ohne apparative Unterstützung ist auch der Einsatz der DNA-Zytometrie zu zeit- (ca. 30 Minuten pro Präparat), personal- (speziell geschulte CTAs und Zytopathologen) und materialaufwendig (Färbung, benötigte Soft- und Hardware). Geschultes Personal, das die teuren und speziellen Geräte bedienen kann, ist in der heutigen Zeit der Kostensenkung kaum finanzierbar. Ein Einsatz in der Routinediagnostik ist somit bisher nicht rentabel.

- AgNOR-Analyse:

Bisher ist der Aufwand für die Anwendung der AgNOR-Analyse zu groß. Der hohe Zeitaufwand für die Durchführung dieser Technik (ca. 60 Minuten pro Präparat) und die Subjektivität, mit der diese vorgenommen wird, begrenzen deren Anwendung. Die Tatsache, dass einige Wissenschaftler auch die Fläche der AgNORs anstelle der Anzahl für diagnostisch aussagekräftiger erachten, führte darüber hinaus zu einer gewissen Verunsicherung unter den (potentiellen) Anwendern.

Keine dieser Begutachtungsmethoden erfüllt für sich genommen die notwendigen Anforderungen an Sensitivität bzw. Spezifität für eine präzise Diagnostik. Für die betroffenen Patienten hat dies zur Folge, dass erst sehr spät eine Diagnose gestellt werden kann durch weitere, oft überflüssige, invasive und kostenintensive Untersuchungsmethoden. Inadäquate oder unterbliebene Therapieversuche verschlechtern ebenfalls die Prognose des Patienten. Eine Steigerung der diagnostischen Treffsicherheit der Ergusszytologie ist daher dringend erforderlich. Die Genauigkeit der zytopathologischen Ergebnisse ist dabei von dem untersuchten Ergussvolumen, der Präparation und Färbung, der Erfahrung des Untersuchers sowie der Anwendung adjuvanter Methoden abhängig.

5 Ziel dieser Arbeit

Mit der hier vorliegenden Arbeit wurde nun ein Versuch unternommen, die Treffsicherheit zur Detektion von Tumorzellen in serösen Ergüssen durch die computerunterstützte multimodale Kombination der Anwendung verschiedener adjuvanter zytodiagnostischer Methoden zu verbessern.

Diese Zusammenführung komplementärer zytologischer Analysen ist ein Beitrag dazu, die Unzulänglichkeiten der einzelnen Methoden nicht nur auszugleichen, sondern auch zu einer bisher nicht erreichten Treffsicherheit zu führen.

Werden die adjuvanten Verfahren an denselben Zellen angewendet, ist es möglich, eine Diagnose an einer geringeren Zellzahl als der bisher erforderlichen zu stellen. Da mehr Information am selben Material gewonnen werden kann, kann die ohnehin schon geringe Menge an Untersuchungsmaterial noch weiter reduziert werden. Bei einer für den Zytopathologen zweifelhaften Morphologie des untersuchten Präparates ist es möglich, durch die Kombination der Analysemethoden zu einer diagnostisch verwertbaren Entscheidung zu kommen.

Intention dieser Arbeit ist

- die Beschreibung des Systems der Multimodalen Zellanalyse (MMZA) und der Beweis der Funktionsfähigkeit des Prinzips dieser Methode
- die grobe Evaluation einer für die Krebsfrühdagnostik und für die präventive Tumordiagnostik hinreichenden Treffsicherheit am Beispiel des Ergusses im Vergleich mit den derzeitigen Standards
- die Untersuchung der Messqualität und deren Vergleich mit den derzeitigen Standards in Form einer Gegenüberstellung mit einem bekannten, etablierten System (AutoCyte QUICK-DNA Workstation) in Düsseldorf und mit den Performancestandards der ESACP
- die Demonstration der Messgenauigkeit der MMZA bei der DNA-Messung und der AgNOR-Analyse
- die Demonstration der Machbarkeit einer automatischen AgNOR-Auswertung mittels einer neu entwickelten Software
- die Überprüfung der Gebrauchstauglichkeit der MMZA in der klinischen Routine

In dem neuen hier vorgestellten diagnostischen Ansatz der Multimodalen Zellanalyse (MMZA) werden nun hochspezifische mit hochsensitiven Analyseverfahren in einer Art Diagnosekaskade kombiniert. Diese Kaskade beginnt mit der hochsensitiven MGG-Färbung der Proben. Diese Färbung dient der morphologischen Analyse und Klassifikation der untersuchten Zellen. Durch die Auswahl auffälliger, eine atypische Morphologie aufweisender Regionen werden verdächtige Zellen selektiert und angereichert. Nach der Entfärbung und einer neuerlichen Färbung nach Feulgen (hochspezifisch) findet die DNA-Analyse statt. Kann immer noch keine zuverlässige Diagnose gestellt werden, folgt noch die Umfärbung mit einer Silbernitrat-Färbung. Hiermit können dann die Nukleolusorganisierenden Regionen (AgNORs) in den Zellkernen sichtbar gemacht und messtechnisch erfasst werden.

Durch diese methodische Adaptation der einzelnen etablierten Methoden in Form von aufeinanderfolgenden analytischen Schritten ist eine stufenweise und gezielte Reduktion des diagnostisch unsicheren, zweifelhaften Sektors erreichbar. Lediglich die problematischen, diagnostisch fraglichen Proben werden dem nächsten, aufwendigeren Untersuchungsabschnitt zugeführt, um weitere differenzierende Merkmale feststellen zu können. Eine erneute Einbestellung des betreffenden Patienten ist nicht nötig, da die Untersuchung am selben Präparat vorgenommen werden kann. Die schrittweise Verringerung der Anzahl zu untersuchender Proben und die Wiederverwertbarkeit der Präparate für die eventuell folgenden Analysen stellen einen großen Vorteil hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit und der Akzeptanz seitens der Patienten dar.

Die untersuchten Zellen werden in den aufeinanderfolgenden Schritten immer wieder relokalisiert und koregistriert (punktgenau zur Deckung gebracht). Auf diese Weise können komplementäre Merkmale an den einzelnen, als diagnostisch relevant erachteten Zellen korreliert werden. Durch die sukzessive Anwendung der Untersuchungsverfahren und die dadurch erzielte Multimodalität der Auswertbarkeit der gewonnenen Informationen potenzieren sich die Beiträge zur Verbesserung der Treffsicherheit.

II Material und Methoden

1 Materialauswahl

Aus dem *Archiv* des Institutes für Zytopathologie der Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf wurden 35 Ausstrich-Präparate anhand ihrer bekannten Diagnosen ausgewählt. Untersucht wurden 27 *Sediment-Ausstriche von Pleuraergüssen und 8 Aszitesproben* von 35 Patienten. Die Pleuraergüsse stammten von 9 Frauen (33%) im Alter von 50 bis 79 Jahren (Durchschnitt 64,2 Jahre) und 18 Männern (66%) im Alter von 47 bis 82 Jahren (Durchschnitt 67,7 Jahre). Die Aszites-Proben stammten von einer Frau im Alter von 77 Jahren und 7 Männern im Alter von 52 bis 74 Jahren (Durchschnitt 64,6 Jahre). Die zytologischen Erstdiagnosen der Pleuraergüsse und der Aszites-Flüssigkeiten wurden in den Jahren 1998 bis 2003 am Institut für Zytopathologie in Düsseldorf gestellt. Die Patienten stammten aus der Universitätsklinik in Düsseldorf und aus Krankenhäusern der Umgebung.

Die zytologische Diagnose der untersuchten Präparate wurde dabei validiert durch das histologische follow-up. Konnte keine histologische Begutachtung in den eingesehenen Patientenakten gefunden werden, galt das klinische follow-up als ausreichender Hinweis für die Existenz oder das Fehlen eines malignen Primär- oder Sekundärtumors der serösen Häute. Dabei wurden die Ergebnisse von etablierten Untersuchungsmethoden, wie z.B. Röntgen, Computertomographie oder Laparoskopie, retrospektiv als aussagekräftig gewertet.

Die Tumorzell-negativen Fälle (n=11) wurden in die Studie einbezogen, um zu zeigen, dass die Methode die gesunden Proben als solche identifiziert und keine falsch-positiven Diagnosen liefert.

Die Tumorzell-positiven Fälle (n=13) wurden bearbeitet, um zu demonstrieren, dass das System keine falsch negativen Ergebnisse erzielt.

Die zweifelhaften Proben (n=11) schließlich sollten die Fähigkeit der MMZA, die Treffsicherheit der Diagnostik zu verbessern, unter Beweis stellen.

Die Gruppe der Tumorzell-positiven Ergüsse setzte sich zusammen aus 11 Proben mit Zellen von Primärtumoren des Mesothels (*Mesotheliome*) und aus 13 Proben mit metastatischen Zellen von Sekundärtumoren (*Karzinosen*) der Pleura oder des Peritoneums. Die Diagnose eines malignen Mesothelioms wurde an 7 Pleuraergüssen

und 4 Aszites-Flüssigkeiten gestellt. Die Patienten, deren Ergussflüssigkeiten (9 Pleuraergüsse und 4 Aszites) Zellen von Karzinosen enthielten, wiesen laut Krankenakten folgende *Primärtumoren* auf: 2 Magenkarzinome, 2 Ovarial-Karzinome, 7 Bronchial-Karzinome, 2 Pankreas-Karzinome. 11 Präparate wurden als Tumorzell-negativ eingestuft. Darunter waren 11 Pleuraergüsse und kein Aszites. Die folgenden Grundkrankheiten waren Ursache Tumorzell-negativer Ergüsse: chronische Pleuritis/Silikose (2), Staphylokokken-Sepsis (1), Herzinsuffizienz (2), kardiale Stauung (2), Pleuropneumonie (2) und unspezifische Ergussbildungen (2).

Tumorzell-positive Ergüsse wurden als *richtig positiv* eingestuft, wenn die zytologische Diagnose durch Krankenaktendaten (Klinik oder Histologie) bestätigt werden konnte. Die Diagnose galt als *richtig negativ*, wenn keine Widersprüche zwischen den Archivdaten und der negativen zytologischen Diagnose vorhanden waren. Gab es dagegen Diskrepanzen zwischen den Patientendaten und der zytologischen Beurteilung, wurden die Fälle als *falsch positiv* bzw. *falsch negativ* gewertet.

2 Arbeitsschritte und Färbungen

Die einzelnen Schritte der Multimodalen Zellanalyse erfolgten an gefärbten *Ausstrichpräparaten* von pleuralen oder peritonealen Erguss-Sedimenten. Um Ergussflüssigkeiten mikroskopisch untersuchen zu können, muss die im Vergleich zu dem gewonnenen großen Flüssigkeitsvolumen geringe Menge der darin enthaltenen Zellen erst einmal konzentriert werden. Dazu wurden aus den Ergusspunktaten Sedimente hergestellt, indem die vom Kliniker eingesandte Flüssigkeit mit 340g für 5min. zentrifugiert und der Überstand dekantiert wurde. Mit einer Pipette wurde ein Tropfen dieses Sedimentes (mit etwas Flüssigkeit aufgeschwemmt) auf einen Glasobjektträger aufgebracht. Mit einem zweiten Objektträger wurden durch Gegeneinanderstreichen der beiden Objektträger zwei Präparate hergestellt. Anschließend wurden die Proben luftgetrocknet. Diese Lufttrocknung bietet wegen der im Vergleich zur Alkoholfixation ausbleibenden Zellschrumpfung den Vorteil der besseren Beurteilbarkeit der Zellen.

Die erste Färbung, der die Proben unterzogen wurden, ist die *May-Grünwald-Giemsa-Färbung* (MGG = Färbung nach Pappenheim): Einwirken in May-Grünwald-Lösung für 5min., zwei Mal Waschen in gepuffertem Aqua dest., danach Färbung in Giemsa-Lösung für 15 min., zweimaliges Waschen in gepuffertem Aqua dest..

Abschließend werden die Präparate mit Entelan® eingedeckelt. Durch die MGG-Färbung kommen besonders gut die *Zellkerne* und die *Zytoplasmastrukturen* zur Darstellung. Außerdem ist bei derart gefärbten Präparaten eine Differenzierung von Mesothelzellen, Makrophagen und Epithelzellen leichter möglich, wenngleich eine eindeutige Unterscheidung nicht immer erzielbar ist. Zur *morphologischen Begutachtung* der Zellen ist die MGG-Färbung wegen der oben genannten Vorteile sehr geeignet. Sie dient der Identifizierung verdächtiger Zellen auf dem Objektträger.

Zuerst wurden die Präparate (erneut) nach allgemein akzeptierten diagnostischen Kriterien (Bedrossian, 1994, Koss, 1992, Bibbo, 1991) von Herrn Prof. Dr. med. Böcking, einem erfahrenen Zytopathologen, beurteilt. Bezirke auf dem Objektträger, die diagnostisch relevante, *verdächtige Zellgruppen* enthielten, wurden mit einem Filzschreiber auf dem Deckglas umfahren. Am Lehrstuhl für Bildverarbeitung (LfB) in Aachen (Direktor Prof. Meyer-Ebrecht, Mitarbeiter Torsten Klein und Alexander Schega) wurden Zellszenen aus den so markierten *Bezirken* mit einem 63er Objektiv (numerische Apertur 1,30) nach möglichst optimaler Einstellung der Bildqualität von Mikroskop und CCD-Kamera fotografiert. Die Auswahl der Zellen erfolgte innerhalb der markierten Bezirke nach dem Zufallsprinzip. Je nachdem um welche diagnostische Kategorie es sich bei dem untersuchten Präparat handelte, wurden Aufnahmen von Tumorzellen, von verdächtigen Zellen oder von gesunden Zellen gemacht. Die Aufnahmen wurden dabei automatisch an eine Datenbank weitergeleitet, aus der sie jederzeit wieder abgerufen werden konnte. Nun wurden *Fotokopien der Objektträger* zur Dokumentation gemacht, um die Filzschreiber-Markierungen nach der Umfärbung wieder auf das neue Deckglas auftragen zu können. Des Weiteren wurden die entstandenen Bilddaten auf eine *CD* gebrannt und an Dr. med. Nguyen Huy, einen vietnamesischen Gynäkologen und Stipendiaten (Düsseldorf Entrepreneurs-Foundation) des Instituts für Zytopathologie in Düsseldorf, weitergeleitet. So war es möglich, in Düsseldorf zu einem späteren Zeitpunkt eine DNA-Messung an denselben Zellregionen vorzunehmen, die schon am LfB untersucht worden waren.

Dann wurden die Präparate an das Institut für Zytopathologie in *Düsseldorf* zurückgeschickt, um sie für die spezifische Darstellung der nukleären DNA nach *Feulgen* (Feulgen und Rossenbeck, 1924) zu färben. Diese Färbung ermöglicht die quantitative Analyse des zellulären DNA-Gehalts jedes einzelnen Zellkerns. Vor der Umfärbung wurden die Proben in Xylol (mindestens 72 Stunden) entdeckelt und 60 min. in einem Methanolbad zwecks Entfärbung gewaschen. Dann wurde die Feulgen-Färbung (Chatelain et al., 1989) mit dem Temperatur-kontrollierten Färbeautomaten

Varistain 23-4 der Fa. Shandon durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine einstündige saure Hydrolyse (HCl) bei 27,5°C mit nachfolgender einstündiger Färbung in Schiff'schem Reagenz gemäß den Empfehlungen der ESACP (Haroske et al., 2001). Mit dieser Färbung lassen sich besonders die Zellkerne und deren Chromatinstruktur gut darstellen. Die darin enthaltene DNA wird dabei spezifisch und stöchiometrisch angefärbt. Zweck der *DNA-Messung* mittels dieser Färbung war die Identifizierung und Quantifizierung von DNA-Aneuploidie, um so die Bösartigkeit und das maligne Potential (grading) der Zellen beurteilen zu können.

Die umgefärbten Präparate wurden entsprechend den *Fotokopien* erneut mit Filzschreiber markiert und zurück nach *Aachen* gebracht. Unter dem Mikroskop wurden mittels einer computergesteuerten *Repositionierung* des Mikroskoptisches anhand der abgespeicherten Koordinaten diejenigen Positionen aufgefunden und angefahren, von denen bereits in der MGG-Färbung Aufnahmen gemacht worden waren. Demzufolge konnten Aufnahmen derselben Zellgruppierungen wie in der MGG-Färbung nun in der Feulgen-Färbung gemacht werden. Die DNA-Messung konnte somit an den *identischen Zellen* der ersten Färbung durchgeführt werden. Nach einer computergestützten automatischen Vorsegmentierung wurden die gefundenen Kernkonturen klassifiziert. Diese *Klassifikation* erlaubte es, die Zellen als Analyse- oder Referenzzellen einzuordnen. Dabei gehörten, je nach Diagnosekategorie, zu den Analysezellen Mesothel-, Mesotheliom- oder Karzinosezellen. Die Referenzzellpopulation setzte sich aus Lymphozyten oder Granulozyten zusammen.

Nun wurde die *integrale optische Dichte* (IOD) der Kerne von 300 Analyse- und von 30 Referenzzellen berechnet. Die *Referenzzellen* dienten der internen Kalibrierung der densitometrischen Messungen. Diese Zellen sind für eine Eichung geeignet, da ihr DNA-Gehalt unabhängig von einer ablaufenden malignen Grunderkrankung diploid (DNA-Gehalt des doppelten Chromosomensatzes) ist. Deren mittlere integrierte optische Dichte wurde somit als 2c-Gehalt festgelegt. Der *Variationskoeffizient* des DNA-Gehalts der Referenzzellfraktion darf dabei, gemäß den Forderungen der ESACP (Haroske et al., 2001), die 5%-Marke nicht überschreiten.

Die gespeicherten Bilder der Zellszenen in der Feulgen-Färbung wurden anschließend auf eine *CD* gebrannt und zusammen mit den Proben an Dr. med. Nguyen Huy in *Düsseldorf* geschickt. Er hatte die Aufgabe, nach Möglichkeit *dieselben Zellen* auf dem jeweiligen Objektträger mit dem dort angewendeten System *AutoCyte QUICK-DNA-Workstation* wiederzufinden und an diesen eine DNA-Messung durchzuführen.

Nach der Messung wurden die Präparate entdeckelt und entfärbt, um anschließend die *Silberfärbung (AgNOR)* durchführen zu können. Mit dieser Silberfärbung lassen sich aktive Nukleolar Organizer Regions (NORs) anfärben. Ihre Anzahl, Fläche und Verteilung ermöglichen Schlussfolgerungen, betreffend die Intensität der Proteinsynthese und somit die Zellproliferation.

Die Färbung erfolgte bis auf wenige Modifikationen nach der Methode von Ploton et al. (1986), Crocker et al. (1989) und Rüschoff et al. (1992).

Die Proben werden dabei in einer absteigenden Alkoholreihe gewaschen. Anschließend werden sie mit Aqua bidest gespült und mit einer Silbernitrat-Gelatine-Ameisensäure-Lösung in einer dunklen, feuchten Kammer für 35-37 min. inkubiert. Danach werden die Proben erneut mit Aqua bidest gespült, für 10 min in 10%iges Natriumthiosulfat getaucht, erneut gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe gewaschen. Schließlich werden die Präparate in Xylol eingestellt und eingedeckelt.

Dann wurden die Proben nach Aachen zurückgeschickt. Am LfB wurden erneut Aufnahmen der nun AgNOR-gefärbten Zellen gemacht, von denen bereits Bilder in der Feulgen- und MGG-Färbung existierten. Anschließend wurden 100 der 300 Analysezellen ausgewählt, erneut relokalisiert und gemäß den Auswertungsempfehlungen von Crocker et al. (1989) mit einem 100er-Öl-Objektiv (numerische Apertur 1,30) fokussiert. Für jeden dieser 100 Zellkerne wurde die Anzahl der *Cluster* und *Satelliten* subjektiv bestimmt und in eine interaktiv aufrufbare Tabelle manuell eingetragen. Am Ende der Auszählung wurde vom Computer die mittlere Anzahl sowohl der Cluster als auch der Satelliten pro Präparat errechnet. Gegen Ende der Auswertungszeit war es möglich, die AgNOR-Zahl und -Fläche durch eine in Aachen neu entwickelte Software automatisch berechnen zu lassen (Aschenborn, 2004; Schega, 2004).

2.1 Zytologische Begutachtung in MGG

In der visuellen Färbung wurden bei der Selektion diagnostisch relevanter Zellen, je nachdem um welche diagnostische Kategorie es sich handelte, vornehmlich diejenigen Zellszenen fotografiert, die nach den allgemeinen Regeln der zytologischen Krebsdiagnostik malignitätsverdächtig waren oder aber gesund aussahen.

Als *allgemeine zytomorphologische Malignitätskriterien* gelten vergrößerte, entrundete oder lobulierte Kerne mit undulierter Membran, eine vergrößerte Kern-Plasma-Relation, hyperchromatisches und grobkörniges Chromatin, vergrößerte und entrundete Nukleolen und das Vorhandensein von Mikrokernen oder atypischen Mitosen. Für eine sichere Malignitätsdiagnose sollten drei der oben genannten Kriterien vorhanden sein. Des Weiteren sollte, außer beim Mesotheliom, eine zweite, morphologisch differente Zellpopulation ohne Übergänge vorliegen.

Eine zytologische Typisierung ist unter Anwendung verschiedener zytologischer Kategorien möglich:

- Für das Vorliegen eines malignen *Mesothelioms* sprechen vor allem eine erhöhte Zellzahl, maulbeerförmige Zellverbände mit polyzyklischen Zellgrenzen, eine erhöhte Nukleolengröße und das Vorhandensein nur vereinzelter Entzündungszellen (Bedrossian, 1994). Desweiteren sind halbmondförmige, interzelluläre Fenster, atypische Doubletten, Mehrkernigkeit und uniforme, kleine zytoplasmatische Vakuolen charakteristisch.
 - Karzinosen weisen folgende Merkmale auf:
 - Liegt ein *Adenokarzinom* vor, sind weniger maulbeerförmige Verbände sichtbar, das Zytoplasma ist im Gegensatz zum Mesotheliom gleichmäßig gefärbt, und die Vakuolen sind größenvariabel. Eine azinäre Lage der Zellen und eine zelluläre Polarität sprechen ebenfalls dafür.
 - *Plattenepithelkarzinome* weisen interzelluläre Lücken und Brücken, ein dunkles Zytoplasma ohne Vakuolen sowie eine periphere Palisadenstellung der Kerne auf.
 - *Kleinzellige Karzinome* stellen sich als kleine Zellen mit spärlichem Zytoplasma und kleinen, eventuell eingedellten Kernen dar.
 - Bei *Sarkomen* befinden sich die spindelzelligen, undifferenzierten Zellen nur in loser Anordnung.
 - Die einzeln gelegenen, runden Zellen eines malignen *Lymphoms* haben eine variable Größe und ein meist spärlich ausgeprägtes Zytoplasma.

- *Reaktiv veränderte Mesothelzellen* dagegen zeigen eine Lagerung als Einzelzellen, Doubletten oder Quartetts oder liegen einschichtig in Rosetten, Reihen oder Pseudoazini vor. Interzelluläre Fenster, zelluläres Moulding und eine zwiebelschalenartige Anordnung kommen ebenfalls vor. Pseudosiegelringzellen, typische Mitosen und Mehrkernigkeit belegen ebenfalls den benignen Charakter der Zellpopulation. Bei einem Stauungserguss zeigen sich nur wenige degenerative kleine Lymphozyten und unauffällige Mesothelzellen. In einem hämorrhagischen Ergusspräparat sieht man wenige, z. T. regressive Erythrozyten und Makrophagen. Akut entzündliche Ergüsse zeichnen sich durch eine vermehrte Anzahl von Granulozyten und Lymphozyten sowie einige aktivierte Mesothelzellen und Makrophagen aus. Bei chronisch entzündlichen Proben liegen dagegen vorwiegend aktivierte Lymphozyten und Makrophagen, aber nur wenige Granulozyten und aktivierte Mesothelzellen vor. Bei einem lymphozytenreichen Zellbild mit nur wenigen Granulozyten und aktivierten Mesothelzellen sollte eine Tuberkulose differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden. Ein eitriger Erguss ist erkennbar an den zahlreichen nekrotischen Granulozyten und aktivierten Mesothelzellen.

Gemäß der Düsseldorfer Nomenklatur werden Proben als „unzureichend“ bezeichnet, die nekrotische, autolytische, heterolytische oder osmotisch geschädigte Zellen aufweisen. Aus technischen Gründen „zweifelhaft“ oder „dringend verdächtig“ werden Präparate eingestuft, wenn nur sehr wenige Zellen zur Verfügung stehen, diese schlecht erhalten oder aber dysplastisch sind.

Entsprechend der morphologischen Begutachtung wurden die zytologischen Diagnosen in folgende Kategorien eingeteilt:

- „negativ“ bei Proben, in denen keine malignen Zellen nachweisbar waren. Es liegen ausnahmslos normale und/oder proliferierte und/oder reaktiv (entzündlich oder degenerativ) veränderte Zellen (Mesothelzellen oder Entzündungszellen) vor.

- „zweifelhaft“ in Fällen, bei denen maligne entartete Zellen nicht sicher auszuschließen sind. Hier sind nur wenige atypische Zellen (abnorm aktivierte oder proliferierte Mesothelien oder wenige stark degenerierte Tumorzellen) zu erkennen. Die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer malignen Neoplasie liegt bei ungefähr 30%.

- „dringend verdächtig“ bei Präparaten, bei denen die diagnostischen Kriterien für eine sichere Annahme von Malignität nicht ausreichend ausgeprägt sind. Oder aber die Anzahl der Tumorzellen ist zu gering, um eine sichere Diagnose stellen

zu können. Die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Tumors liegt hier bei ungefähr 70%.

- „positiv“, wenn das Präparat eindeutig maligne entartete Zellen enthielt. Es wurde dabei zwischen einem Mesotheliom oder aber einem metastasierten Tumor unterschieden. Waren Zellen einer solchen Karzinose im Erguss vorhanden, wurde soweit möglich der Tumortyp spezifiziert.

2.2 Interpretation der DNA-Messdaten

Die *Messdaten* wurden gemäß den Empfehlungen und Anforderungen des „Consensus Report of the European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP)“ (Böcking et al., 1995, Giroud et al., 1998 und Haroske et al., 1998, 2001) interpretiert. DNA-Aneuploidie wurde angenommen, wenn

- der Modalwert der Stammlinie (STL) $<0,925 >1,075$ oder $<1,80 >2,20$ oder $<3,60 >4,40$ betrug (Böcking et al., 1995, Giroud et al., 1998 und Haroske et al., 1998, 2001) („atypische Stammlinie“). -Eine Stammlinie wurde als solche gewertet, wenn es sich dabei um einen Häufigkeitsgipfel in einem Histogramm handelte, vorausgesetzt, es lagen auch Messwerte im Verdoppelungsbereich dessen Modalwertes vor.-
- Zellen mit einem DNA-Gehalt $> 9c$ (9c exceeding events („9cEE“)) vorhanden waren (Chatelain et al., 1989), oder

Die Ergebnisse der DNA-zytometrischen Messungen wurden in Form eines *Histogramms* dargestellt, wobei die errechneten DNA-Werte bzw. die IOD der einzelnen Zellkerne gegen die Anzahl der gemessenen Zellkerne aufgetragen wird. Um Fehldeutungen der Ergebnisse von DNA-Messungen zu vermeiden, muss Folgendes beachtet werden: Um das resultierende DNA-Histogramm bezüglich des qualitativen Nachweises von DNA-Aneuploidie im Rahmen einer Dignitätsbewertung interpretieren zu können, müssen jegliche den DNA-Gehalt der Zelle beeinflussende Faktoren miteinbezogen werden. Dabei werden *physiologische* von *unphysiologischen Einflüssen* unterschieden. Zu den letztgenannten gehören morphologisch nachweisbare Virusinfektionen (HPV, CMV, HSV, HIV), Radio- und Chemotherapie sowie VitaminB₁₂-Mangel (Böcking, 1995, Sandberg, 1990). Zu den erstgenannten gehören regelhafte Vervielfachungen des Chromosomensatzes, genannt „euploide Polyploidisierung“. Eine solche Polyploidie ist in einigen

Gewebe, darunter auch im Mesothel, physiologisch (Böcking et al., 1994; Biesterfeld et al., 1994). Diese Vervielfachungen stellen sich als ganzzahlige Potenzen des 2c-Wertes ($2^n c$) dar. Somit sind Mesothelzellen mit einem Wert von bis zu $8c$ aufzufinden, ohne dass damit Malignität verbunden ist. Daher kann erst die Diagnose einer Neoplasie bzw. Aneuploidie gestellt werden, wenn Zellen mit einem DNA-Gehalt von mehr als $9c$ ($9c$ exceeding events) in einem Präparat vorhanden sind.

Histogramme von Tumorzell-negativen bzw. reaktiven Ergüssen weisen eine Stammlinie bei etwa $2,0c$ auf, wohingegen Mesotheliom-bedingte Proben oftmals weitere Stammlinien bei $4,0c$ und $8,0c$ sowie vereinzelte Zellkerne mit einem DNA-Gehalt $>9c$ zeigen. Bei einem Erguss aufgrund einer Karzinose sind meist atypische Stammlinien zu finden (Werte zwischen den ganzzahligen Vielfachen von 2) sowie ebenfalls vereinzelte Kerne mit einem DNA-Gehalt $>9c$.

2.3 Auswertung der AgNOR-gefärbten Präparate

Wenn auswertbar, wurden pro Präparat 100 Zellkerne untersucht. Dabei wurden in diesen die AgNORs gezählt. Die haufenförmig zusammen gelagerten Silbernitratniederschläge wurden als ein Cluster gewertet. Die außerhalb von Nukleolen gelegenen Satelliten wurden jeweils einzeln gezählt. Der Computer errechnete abschließend den Durchschnitt der Summe aus Clustern und Satelliten pro Präparat.

Mit dem am LfB entwickelten Algorithmus zur automatischen Detektion von AgNORs konnte anschließend außer der Kernfläche und der Zahl auch die relativen und absoluten AgNOR-Flächen bestimmt werden.

3 Methode : Die Multimodale Zellanalyse (MMZA)

3.1 Technische Umsetzung

Aus Gründen der Standardisierung der Methode stimmt das folgende Kapitel mit den Dissertationen von Frau Nadja Nietzke und Frau Astrid Metzger überein.

In enger Kooperation mit dem Institut für Cytopathologie ist am Lehrstuhl für Bildverarbeitung der RWTH Aachen ein Laborsystem einer Mikroskopie-Workstation entstanden, das in den durchgeführten ersten Studien die messtechnischen und diagnostischen Möglichkeiten der neuen Diagnosemethode belegen sollte. Das hieraus gewonnene Datenmaterial liefert eine solide Basis für kommende Weiterentwicklungen der Einzelkomponenten des Systems.

Vor allem die Bedienbarkeit wurde auf die Probe gestellt, und Verbesserungsvorschläge der Autorin dieser Arbeit flossen direkt in den Entwicklungsprozess ein.

Das Fundament dieses neu entwickelten Systems bilden robuste digitale Bildverarbeitungsalgorithmen, die den Pathologen die Arbeit erleichtern und diese neue diagnostische Methode in der Routine möglich machen sollen.

Die technischen Merkmale sind im Folgenden zusammengestellt:

- Robuste Bildverarbeitungsalgorithmen tragen der Variationsbreite des Zellmaterials Rechnung.
- Sichere Speicherung von großen Datenmengen (sowohl Bilder als auch Ergebnisse).
- Integration von Bildaufnahme, Steuerung des Mikroskops und Interaktion mit dem Benutzer in eine graphische Benutzeroberfläche.
- Extraktion von Messwerten aus den einzelnen Modalitäten.
- Korrelation der Daten verschiedener Auswertungen und Bilder einzelner Modalitäten.



Abb. II.1: Ansicht des Labormusters mit Mikroskop, CCD-Kamera und Computer

Im Folgenden werden die Komponenten im Einzelnen beschrieben, wobei eine Unterteilung in Hard- und Software vorgenommen wird.

3.2 Komponenten

Das System für die Multimodale Zellanalyse besteht aus vielen Komponenten, deren einwandfreie Zusammenarbeit eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg darstellt.

In Abb. II.2 sind die Komponenten schematisch dargestellt.

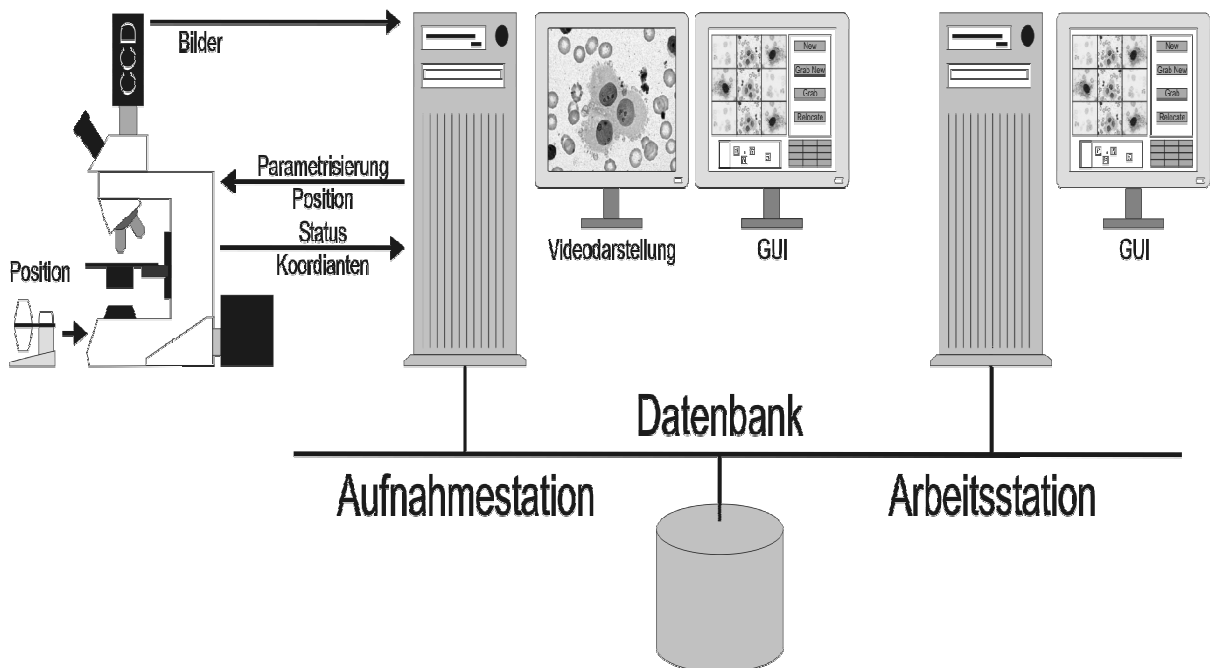


Abb. II.2: Komponenten des Systems

3.2.1 Hardware

Mikroskop / Kamera / Digitalisierer

Die Analyse der zytologischen Präparate erfolgt in einem Durchlichtmikroskop.

Zur Verfügung stand das DM-LA-Mikroskop von Leica mit den Objektiven 5x/0.15, 10x/0.30, 20x/0.70, 40x/0.75, 63x/1.32 und 100x/1.35, wobei für die Aufnahmen das 63x-Objektiv verwendet wurde. Wesentliche Komponenten wie XYZ-Positionierung, Objektivwechsel, Aperturblenden und Lichtintensität sind durch einen Computer zu steuern. Gleichzeitig können alle diese Einstellungen auch manuell durch den Benutzer über ein externes Steuergerät (Satellit) vorgenommen werden. Während des Betriebs hält der Computer dann alle Änderungen der Parametrisierung des Mikroskops nach. Die Kommunikation erfolgt über eine serielle Schnittstelle (RS232) per Programmbibliothek (SDK) von Leica.

Die benötigten Farbinformationen liefert eine Kamera mit 3-Chip-Technologie. Für die Entwicklung dieses Systems wurde die 3-Chip-CCD-Kamera CV M-90 von JAI eingesetzt, die mit dem PAL Standard (Bildgröße ca. 800 mal 600 Pixel) arbeitet. Für die Messungen der integrierten optischen Dichten (IODs) mit Pararosanilin-gefärbter Zellkerne zum Zweck der DNA-Zytometrie wurde kein Interferenz-Filter benutzt, da dieser nach internen Vergleichstests keine höhere Messgenauigkeit einbringt.

Um die analogen Videosignale in ein digitales Bild umzusetzen, wird ein Framegrabber benötigt, hier das Matrox Meteor-II-Board, der u.a. die Möglichkeit einer Live-Darstellung des Videosignales anbietet und per Matrox Imaging Library (MIL), einer C-Bibliothek, gesteuert wird, die kompatibel zu allen gängigen Matrox-Grabberkarten ist.

Computer

Die Computer für die Aufnahmestation und auch die Arbeitsstationen sind normale PCs in einem Netzwerk. Der Rechner der Aufnahmestation verfügt zusätzlich über einen zweiten Monitor für die Darstellung des Videobildes der CCD-Kamera und eine Grabberkarte zum Digitalisieren der Mikroskopaufnahmen (s. Abb. 2.1). Seine Eckdaten sind: AMD-Prozessor Athlon XP 1600+, Festplatte 80 GB, Grafikkarten (zwei für zwei Monitore): Asus AGP V7700 pro, Matrox Millennium II PCI, CD-Brenner, Microsoft Windows 2000, Microsoft Visual Studio

6.0 Professional. Als Betriebssystem wurde Microsoft Windows 2000 gewählt, da sowohl die Software für die Matrox-Karten (MIL) als auch das SDK von Leica nur für diese Umgebung zur Verfügung stehen.

Vom Datenbank- und Fileserver wurden keine hohen Rechenleistungen gefordert, aber er sollte genügend Festplattenspeicher für die großen Datenmengen zur Verfügung stellen (>> 100 GB -Festplatte).

3.2.2 Software

Hierzu gehören die grundlegenden Komponenten wie Datenbankanbindung und Ansteuerung des Mikroskops, des Digitalisierers bis hin zur graphischen Benutzeroberfläche, die die Befehle des Anwenders annimmt und die Ergebnisse präsentiert. Entwickelt wurde die Software mit dem Microsoft Visual C++ Compiler 6.0.

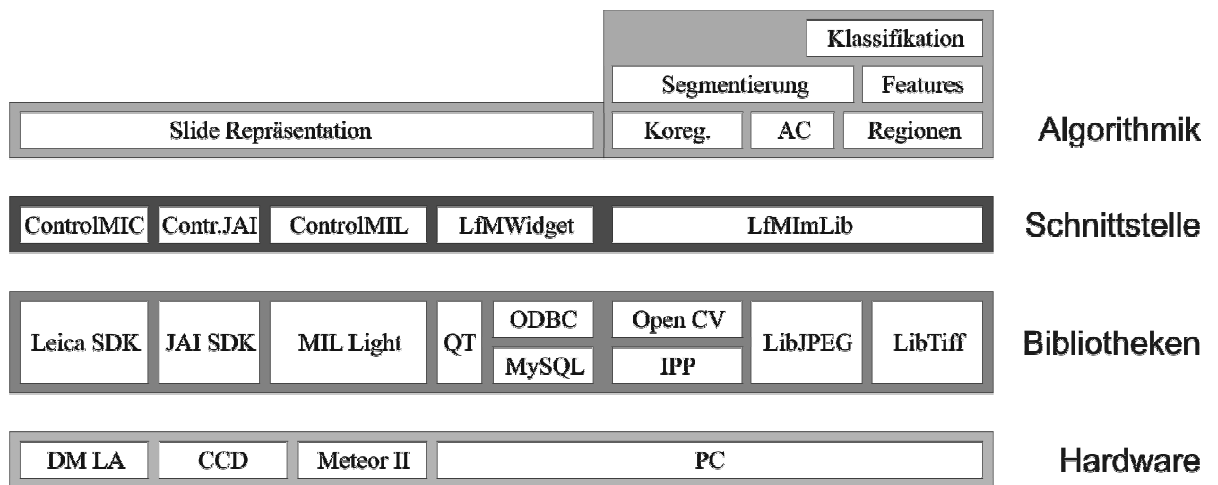


Abb. II.3: Ebenen der Softwarekomponenten und der Hardware

Abb. II.3 zeigt die drei verschiedenen Ebenen der verwandten Softwarekomponenten, die auf die beschriebene Hardware aufsetzte:

Bibliotheken:

Zur Ansteuerung der Hardwarekomponenten werden Entwicklungspakete (Leica SDK, JAI SDK, MIL Light) der Hersteller benötigt. Auch für die Anbindung an die Datenbank (MySQL, ODBC) und die Darstellung der Benutzerinterfacelemente (Qt) wird auf Softwarebibliotheken zurückgegriffen.

Ebenso stammen elementare Grafikroutinen aus diversen Bibliotheken (IPP, OpenCV, LibTiff, LibJPEG).

Schnittstellen:

Zur eigentlichen Anwendung wurden Schnittstellen implementiert, die die benötigten Funktionalitäten der Bibliotheken auf das System anpassen (ControlMIC, Control-MIL, ControlJAI). Spezielle Darstellungselemente werden auch in einem Interface abgelegt (LfMWidget). Die Basis aller höheren Bildverarbeitungsroutinen bildet eine weitere Bibliothek (LfMImLib).

Algorithmik:

An oberster Stufe steht die Repräsentation des Objektträgers (Slide Representation) mit allen Informationen über Positionen und Eigenschaften der Zellen.

Dieses virtuelle Abbild ermöglicht einen einfachen Zugriff auf alle Daten der Probe. Ebenso befinden sich in dieser Ebene komplizierten Bildverarbeitungsalgorithmen für die Repositionierung und Segmentierung der Bilddaten.

Anwendung:

Zusammengefasst werden all die beschriebenen Funktionalitäten in einer Anwendung (im Diagramm nicht dargestellt), die mit einer grafischen Benutzerschnittstelle die Bedienung ermöglicht.

Im folgenden Abschnitt wird vor allem auf die Komponenten eingegangen, die den Rahmen des Systems bilden und die Anwendung der „Multimodalen Zellanalyse“ im klinischen Alltag ermöglichen. Die zentralen Algorithmen der Bildverarbeitung sind im Abschnitt 3.3.1 detaillierter erläutert.

Datenbank

Für die Erstellung von Diagnosen mittels der Multimodalen Zellanalyse fallen große Mengen an Daten an. Dies sind neben den digitalisierten Aufnahmen der Mikroskopbilder auch Positionsdaten sowie Mikroskop- und Kamera-Parameter. Diese Datenmengen werden mittels einer MySQL-Datenbank verwaltet. Die

Datenbank befindet sich auf dem zentralen Server, der gleichzeitig auch als Fileserver fungiert, da die digitalen Mikroskopbilder nicht in der Datenbank abgelegt werden. Die Computer kommunizieren über die ODBC-Schnittstelle (Open Database Connectivity) mit der SQL-Datenbank. Somit kann von allen Arbeitsstationen, die über ein lokales Netzwerk miteinander verknüpft sind, auf die Daten zugegriffen und mit ihnen gearbeitet werden.

Die Ordnungskriterien der Datenbank passen sich an die Anforderungen der Multimodalen Zellanalyse an. Jede Probe erhält beim Eingang in das zytologische Labor eine eindeutige Kennzeichnung, die sich wie folgt zusammensetzt: Zuerst ein großes C, anschließend eine fortlaufende Nummerierung und als letztes eine zweistellige Jahreszahl, z.B.: C5660-98 (zytologische Probe Nr. 5660 in Jahre 1998). Diese sogenannte C-Nummer ist das oberste Ordnungskriterium.

Die nächste Ebene sind die verschiedenen angefahrenen Positionen auf dem Objektträger, die untersucht werden. Sie werden als durchlaufende Nummerierung gespeichert und bilden das zweite Ordnungskriterium.

Für jede dieser Positionen sind Aufnahmen in verschiedenen Färbungen möglich. Die Färbungen werden als MGG (May-Grünwald-Giemsa), PAP (Papanicolaou), FEU (Feulgen), AGN (Siberfärbung) etc. abgekürzt und stellen das dritte Ordnungskriterium dar.

Darüber hinaus ist das benutzte Objektiv das unterste Kriterium.

Es sind Aufnahmen an beliebig vielen angefahrenen Positionen (POS) in beliebigen Färbungen (STA) mit unterschiedlichen Objektiven (OBJ).

Für jede Probe wird also ein Datenkubus mit den Koordinaten POS, STA und OBJ gefüllt. Mit verschiedenen „Schnittebenen“ durch diesen Kubus können dann verschiedene tabellarische Ansichten der Daten erzeugt werden.

Die aus der Segmentierung der Zellkerne hervorgegangenen Zellkernkonturen und die Klassifikation der Zellen werden ebenfalls in der Datenbank als sogenannte Zellobjekte gespeichert. Sie sind einer Position auf einer Probe zugeordnet, so dass für jedes dieser Objekte auch die Ursprungsbilder in den verschiedenen Färbungen dargestellt werden können. Die Koordinaten der Segmente beziehen sich nur auf eine Färbung, so dass bei der Überlagerung der Konturen auf andere Färbungen die Bilder vorher noch transformiert werden müssen.

Zur Dokumentation ist es möglich, noch Zusatzinformationen wie Herkunftsmaterial der Probe, ggf. histologische Diagnose und beliebige weitere Kommentare zu speichern. Des Weiteren kann jede einzelne Position mit einem Kommentar versehen werden.

In Abb. II.4 ist ein Teil des Informationsflusses für die Visualisierung der Ergebnisse dargestellt. Die Kommunikation zwischen der Datenbank und der Arbeitsstation erfolgt über eine ODBC-Schnittstelle. Nachdem feststeht, auf welche der Färbungen die Ergebnisse projiziert werden sollen, wird das passende Bild mit den erforderlichen Parametern transformiert, damit die Koordinaten der Konturen korrekt sind. In das Bild können nun wahlweise die Zellkernkonturen, die Messergebnisse für die einzelnen Zellen, ein kalibrierter Maßstab und, wenn vorhanden, weitere Beschreibungen zu der Probe eingeblendet werden.

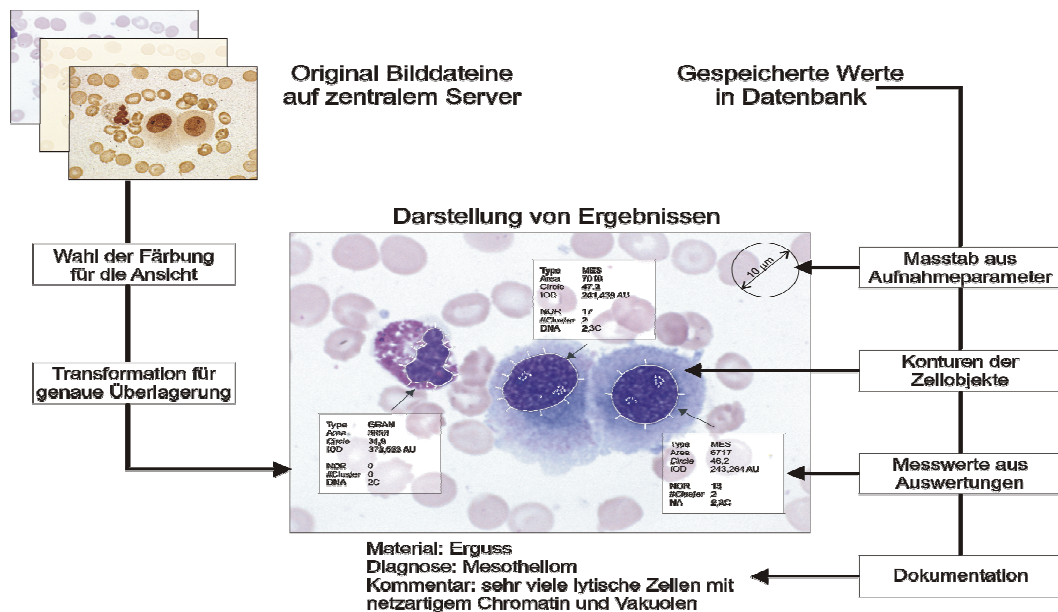


Abb. II.4: Informationsfluss zur Darstellung der Ergebnisse

Benutzeroberfläche / Benutzerführung

Für die Umsetzung der Oberfläche wurde das Entwicklungspaket Qt der Firma Trolltech gewählt. Die Aufgaben der Benutzeroberfläche lassen sich in mehrere Untergruppen einteilen, die sich auch in der Anordnung der Elemente auf dem Bildschirm widerspiegeln (s. Abb. II.5).

Abhängig vom Zustand des Systems sind verschiedene Aktionen und Abläufe möglich oder sinnvoll. Der Benutzer wird durch die Anpassung der Oberfläche geführt, um einen reibungslosen Ablauf zu gewährleisten.

Neue Aufnahmen können z.B. erst gemacht werden, wenn die C-Nummer der Probe unter dem Mikroskop in die Oberfläche eingegeben wurde. Die einzelnen Aktionen können über Schaltflächen (Buttons) ausgeführt werden, wobei diese Steuerelemente in einer logischen Reihenfolge untereinander angeordnet sind.

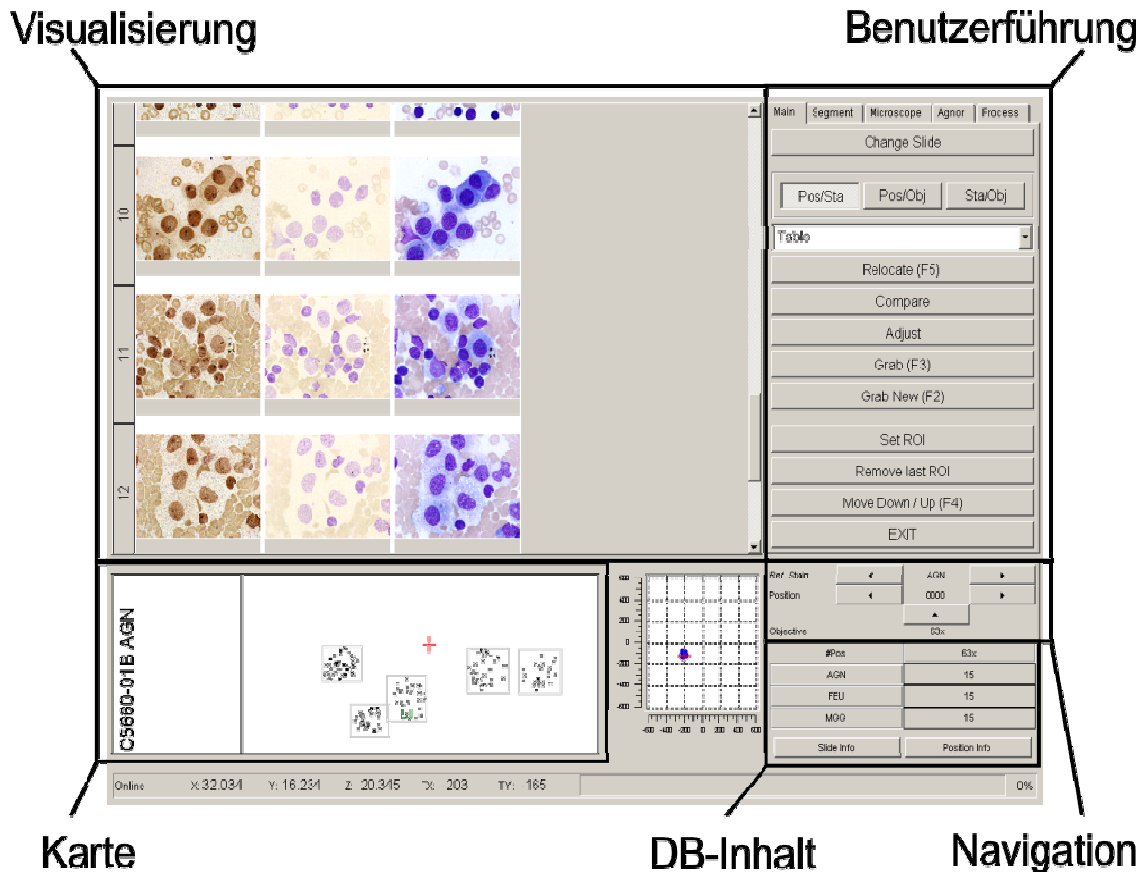


Abb. II.5: Einteilung der Benutzeroberfläche

Einstellungen des Mikroskops oder der CCD-Kamera sind in verborgenen Dialogen untergebracht und stören somit nicht den normalen Ablauf der Anwendung. Durch diese geringe Schachtelungstiefe der Befehle ist eine übersichtliche und schnelle Steuerung des Systems möglich.

Visualisierung

Je nach Anwendung sind verschiedene Darstellungen der Daten nötig. Um einen Überblick der in der Datenbank vorhandenen aufgenommenen Zellbilder zu erhalten, ist eine tabellarische Ansicht mit verkleinerten Bildern vorgesehen (Bildergalerie).

Ausgewertete Daten und der Vergleich von identischen Zellen in verschiedenen Färbungen erfordert das Übereinanderlegen von Einzelaufnahmen mit Einblendung der zusätzlichen Eigenschaften der Zellen.

Diese Darstellungen erfolgen alle im linken oberen Teil der Benutzeroberfläche.

Gleichzeitig werden die Positionen der Aufnahmen auf einer „Karte“ der Objektträgers mit seiner C-Nummer links unten dargestellt, wobei die aktuelle Position der gewählten Aufnahme markiert ist und die Position des Mikroskoptisches auch eingeblendet wird.

Die Anzahlen der vorhandenen Aufnahmen in den verschiedenen Färbungen sind unterhalb der Navigationselemente dargestellt.

Navigation

Für die Repositionierung des Mikroskops oder die Durchsicht des vorhandenen Bildmaterials muss der Benutzer jederzeit die Möglichkeit haben, Referenzfärbungen oder Positionen auf dem Objektträger auszuwählen. Im unteren rechten Teil der Oberfläche können diese Einstellungen vorgenommen werden. Die Wahl von Referenzfärbung und Position erfolgt über diese Elemente, während der Wechsel des Objektivs nur über das Mikroskop möglich ist.

Ablauf einer Aufnahmesequenz

In diesem Abschnitt wird der Ablauf einer multimodalen Auswertung exemplarisch an der Färbesequenz MGG-Feulgen-Silber dargestellt (s. Abb.II.6).

Die Sequenz beginnt mit dem Einlegen eines Objektträgers in der visuellen Färbung (in diesem Falle MGG). Zuerst werden Mikroskop und CCD-Kamera auf optimale Bildqualität eingestellt. Dabei wird der Weiß-Abgleich bei eingelegtem leeren Objektträger durch das Programm automatisch durchgeführt. Anschließend werden diese Parameter (Beleuchtung und Aperturblende des Mikroskops, Verstärkung der R-, G- und B-Kanäle der Kamera etc.) in der Datenbank gespeichert.

Der Benutzer sucht sich nun Positionen auf der Probe aus, die durch eine multimodale Analyse untersucht werden sollen, und nimmt Bilder dieser Positionen auf. Parallel zu den digitalen Bildern werden auch die XYZ-Koordinaten des Mikroskops in die Datenbank übernommen. Hierbei ist es jederzeit möglich, durch die automatische Repositionierung schon erfasste Positionen abermals anzufahren.

Dies ermöglicht eine nachträgliche Begutachtung der ausgewählten Zellen nicht nur anhand der gespeicherten Bilder, sondern auch an den Originalproben durch das Mikroskop.

Für weitere Verarbeitungsschritte werden vergleichbare Grauwertbilder der Farbaufnahmen benötigt. Unter anderem arbeitet der Repositionierungsalgorithmus mit diesen Grauwertbildern, die durch eine adaptive Grauwerttransformation (s. Abschnitt 3.3.1) erzeugt werden. Die aus dieser Transformation hervorgehenden Koeffizienten werden ebenfalls in der Datenbank gespeichert.

Es folgt nun der Umfärbeprozess zur Feulgen-Färbung.

Nach dem Einlegen werden die Einstellungs-Parameter abermals gespeichert. Zum Auffinden der zuvor erfassten Zellen fährt das System den Tisch des Mikroskops an die gleiche Stelle wie in der ersten Färbung. Da durch mechanische Ungenauigkeiten beim Einlegen der Probe in der Verankerung auf dem Tisch und eventuelle Verschiebung der Zellen durch den Umfärbeprozess die gesuchte Position nicht exakt repositioniert werden kann, muss der Benutzer eine grobe manuelle Korrektur der Position vornehmen. Die Feinjustierung der Position erfolgt durch ein in Abschnitt 3.3.2 beschriebenes Verfahren. Anschließend errechnet das System aus der Differenz von Soll- und Ist-Position (Soll: Position aus erster Färbung, Ist: Position des Tisches nach Feinjustage) einen Translationsvektor, mit dessen Hilfe globale Verschiebungen der Probe eliminiert werden und die nachfolgenden Positionen genauer aufgefunden werden. Nun werden die digitalen Bilder der Zellen gespeichert.

Mit den daraus adaptiv erzeugten Grauwertbildern ist es nun möglich, eine pixelgenaue Koregistrierung der ersten beiden Bildsequenzen durchzuführen. Hierbei wird ein zur Repositionierung ähnlicher Algorithmus angewandt, der jedoch über eine höhere Genauigkeit verfügt und um einen Rotationsfreiheitsgrad erweitert ist. Die errechneten Parameter dieser Transformation werden ebenfalls in der Datenbank abgelegt. Von diesem Moment an ist es möglich, die Ansicht der Zellen in den zwei ersten Färbungen darzustellen, um z.B. zu den morphologischen Informationen aus der visuellen Färbung noch die Struktur des Chromatins in der Feulgen-Färbung hinzuzuziehen.

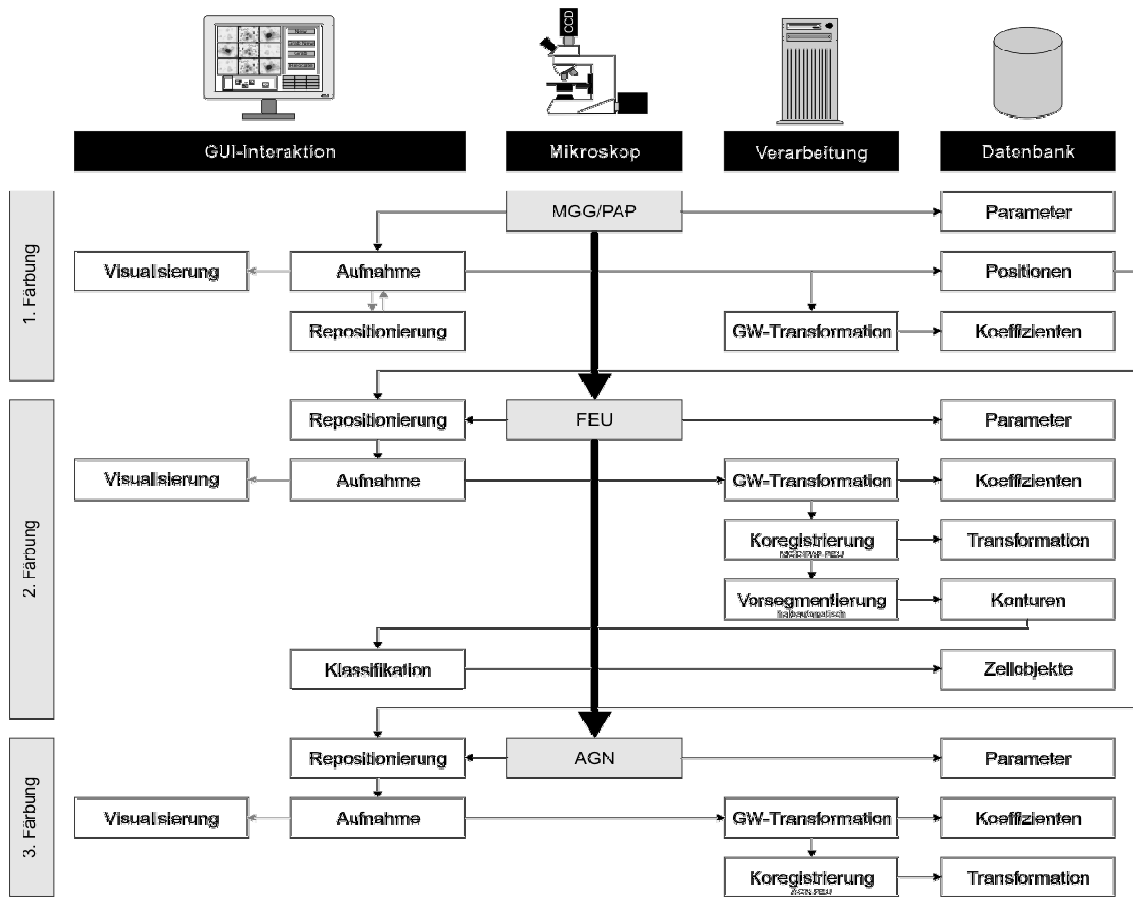


Abb. II.6: Ablauf einer Aufnahmesequenz mit angedeutetem Informationsfluss. (Die Extraktion von Messwerten in der Feulgen- und Silber-Färbung ist nicht dargestellt)

Da sich die Feulgen-Färbung durch ihren hohen Farbkontrast hervorragend für die Segmentierung des Zellkerns eignet, wird an dieser Stelle bereits eine Vorsegmentierung durchgeführt. Die gefundenen Kernkonturen werden dargestellt und der Benutzer kann diese noch verfeinern oder verwerfen sowie die Zellen nach Typ und Aufgabe in der DNA-Zytometrie klassifizieren (s. Kapitel 3.3.4 – 3.3.5). In der Datenbank werden die Zellobjekte mit ihrer Kontur und Zugehörigkeit für die weitere Verarbeitung abgelegt.

Durch die erwähnte Client-Server-Architektur ist es ohne weiteres möglich, nach der Aufnahme der zweiten Färbung alle weitergehenden Verarbeitungsschritte (Segmentierung, Klassifikation, etc.) an einer anderen Arbeitsstation durchzuführen. Die Aufnahmestation mit dem Mikroskop ist während dieser Zeit für andere Aufnahmesequenzen frei. Nach dem zweiten Umfärbeprozess zur Silber-Färbung werden abermals die gleichen Positionen angefahren und die Aufnahmen der Zellen genauso wie die Parameter von Mikroskop und Kamera gespeichert. Auch hier kann nach erfolgter Grauwerttransformation eine exakte Koregistrierung mit den Feulgen-Bildern erfolgen.

Auf die hier ausgesparte Extraktion der Messdaten aus der Feulgen- und der Silber-Färbung wird im Abschnitt 3.3.5 eingegangen.

3.3 Bildverarbeitung

Digitale Bildverarbeitungsverfahren ermöglichen die Durchführung der MMZA-Messungen und die automatisierte Quantifikation von Messergebnissen. In diesem Abschnitt werden die Algorithmen für die einzelnen Verarbeitungsschritte dargelegt.

3.3.1 Vorverarbeitung

Das Ziel der Vorverarbeitung ist es, eine geeignete Transformation vom RGB-Farbraum (Rot, Grün, Blau-Farbraum) in ein Grauwertbild zu finden. Die Parameter der Transformation werden aus einer Aufnahme sequenz einer Probe mittels einer Cluster-Analyse des RGB-Histogrammes errechnet, die radiale Gaussverteilungen für Vordergrund und Hintergrund (bzw zusätzlich für Plasma) zugrunde legt (s. Abb. II.7).

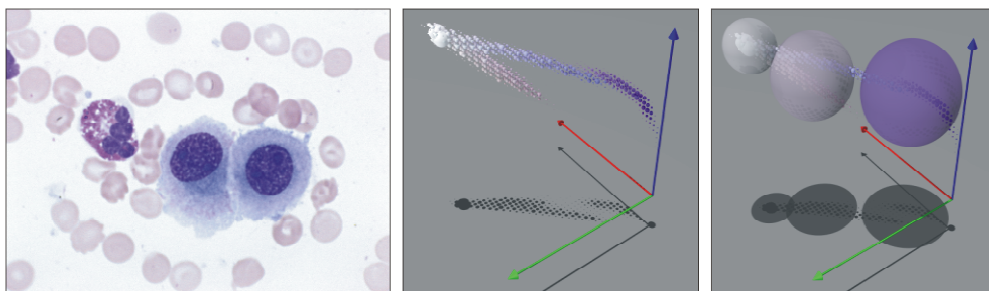


Abb. II.7: Ein originales MGG-Bild mit dem dazugehörigen RGB-Histogramm. Die Auftrittswahrscheinlichkeit drückt sich im Durchmesser der Kugel aus. Ganz rechts ist das Ergebnis des Clusterings dargestellt. Jede Verteilung entspricht einer großen Kugel. Die Farbe entspricht dem Zentrum und der Radius der Varianz dieser Verteilungen.

Aus diesen Verteilungen wird durch Anwendung der Fisher-Diskriminante (Blake und Isard 1998) eine kontrastoptimierende Linearkombination der Farbkanäle ermittelt und damit das Grauwertbild erzeugt.

Der vorgestellte Algorithmus liefert aber noch weitere wichtige Informationen. Jede Farbwertkombination (R, G, B) kann einer der gefundenen Verteilungen zugeordnet werden, wobei nur zwischen Vordergrund-, Hintergrund-

und Restclustern als Ganzes unterschieden wird. Jedem Farbbild können also drei Maskenbilder (s. Abb. II.8) zugeordnet werden, die schon eine grobe Partitionierung in Zellkern und Hintergrund ermöglichen.

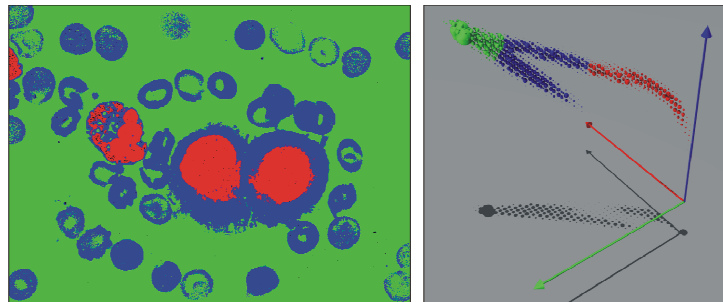


Abb. II.8: Zuordnung der Pixel durch ihre RGB-Werte zu Vordergrund- (rot) Hintergrund- (grün) und Restcluster (blau). Dargestellt als Farbbild und im RGB-Histogramm.

Diese Masken spielen auch bei der pixelgenauen Koregistrierung eine wichtige Rolle.

Die Parameter der Transformation werden in die Datenbank gespeichert und mit ihnen die verschiedenen Färbungen soweit angeglichen, dass sie für die exakte Koregistrierung verglichen werden können (s. Abb. II.9 und II.10).

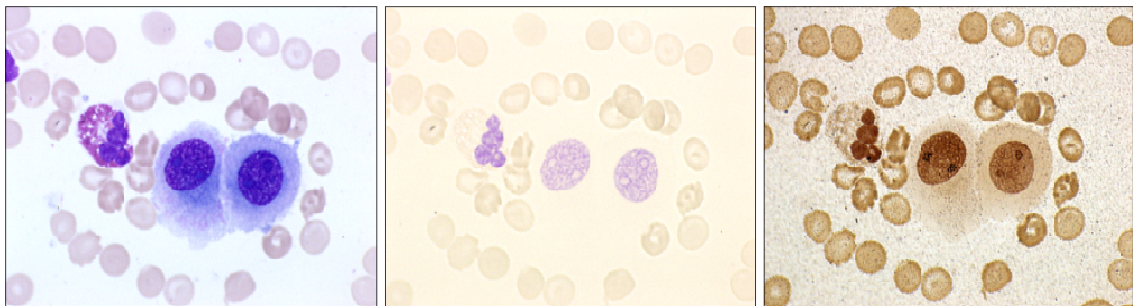


Abb. II.9: Originalaufnahmen (MGG, Feulgen und Silber von links nach rechts) vor der Transformation

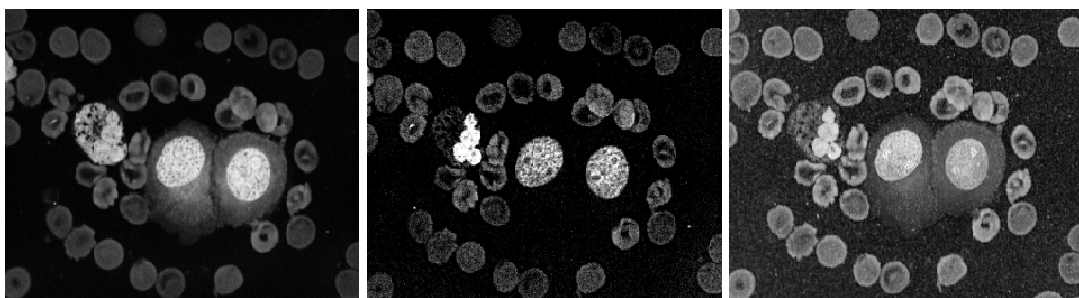


Abb. II.10: Ergebnis der Transformation für Bilder in MGG-, Feulgen- und Silber-Färbung derselben Region.

3.3.2 Repositionierung und Koregistrierung

Identische Zellen in anderen Färbungen wieder aufzufinden, ist eine der Hauptaufgaben während der Erfassung von multimodalen Zellaufnahmen.

Um eine multimodale Analyse praktisch einsetzen zu können, ist eine Automatisierung unverzichtbar. Hierbei nimmt die digitale Bildverarbeitung eine Schlüsselrolle ein. Denn an dieser Stelle übernimmt ein Optimierungsalgorithmus, der die Verschiebung in X- und Y-Richtung korrigiert, die Steuerung des Mikroskops. Der Ablauf ist schematisch in Abb. II.11 dargestellt.

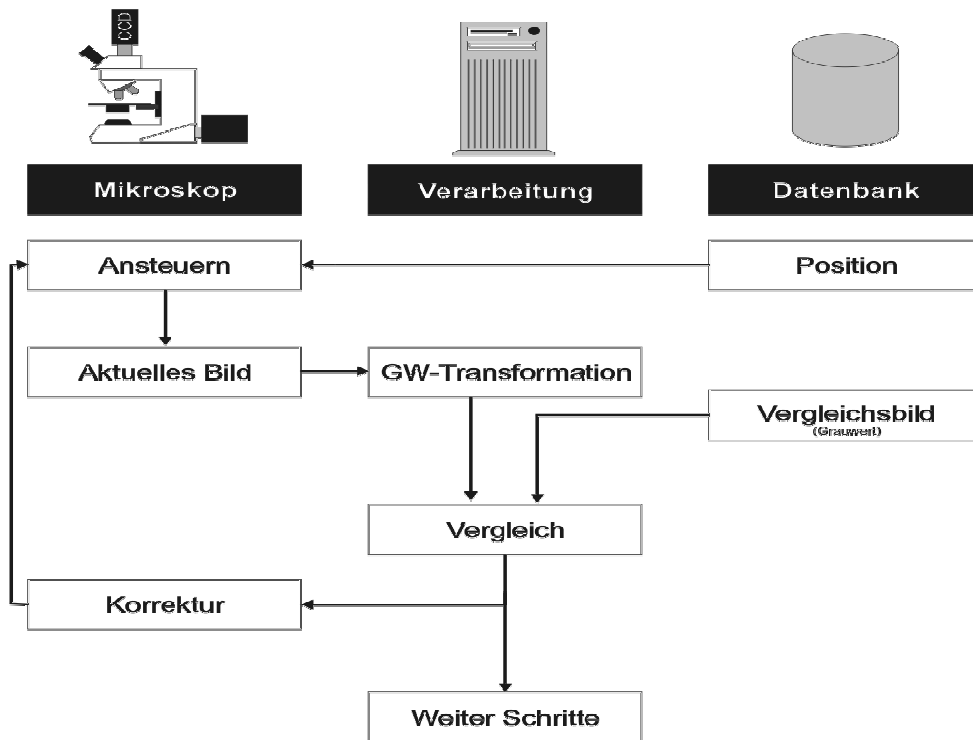


Abb. II.11: Ablaufschema der Repositionierung

Erhält das System den Auftrag, eine schon in einer früheren Färbung aufgenommene Position anzufahren, werden die in der Datenbank gespeicherten Koordinaten an das Mikroskop weitergegeben und der Tisch des Mikroskops bewegt sich dort hin. Aufgrund von Ungenauigkeiten, die durch die Mechanik des Tisches oder das Einlegen des Objektträgers in die Halterung entstehen, kann die exakte Position nicht mit der benötigten Genauigkeit angesteuert werden.

Im Datenbestand befindet sich die Aufnahme der gesuchten Zellen aus der vorangegangenen Färbung. Mithilfe dieser Information wird die Position des Mikroskopisches noch weiter verfeinert. Hierzu werden das aktuelle Bild der CCD-Kamera und das Bild aus der vorhergehenden Färbung verglichen. Die zwei Farbbilder werden mit dem aus Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Verfahren in

Grauwertbilder transformiert und mit einem Optimierungsverfahren übereinander gelegt.

Diese Korrektur wird an die Steuerung des Mikroskops weitergegeben und somit die Positionierung verbessert. Auch bei der Korrekturbewegung des Tisches spielt die mechanische Ungenauigkeit eine Rolle. Aus diesem Grund wird das Verfahren mehrfach angewandt. Wird die nötige Verschiebung kleiner als eine einzustellende Schwelle, dann wird die Korrektur der Positionierung beendet.

Durch mehrere Durchläufe dieser Regelschleife kann erreicht werden, dass die Korrektur in der Größenordnung der Ausdehnung eines Pixels liegt. Bei der hier benutzten Kombination aus CCD-Kamera und 63x-Objektiv liegt die Pixelgröße bei ca. $0,1\mu\text{m}$.

Durch diese „optische“ Rückkopplung ist es somit möglich, mit einem mechanisch relativ ungenauen Mikroskopisch sub- μm -Genauigkeit in der Positionierung zu erreichen.

Zwar sind die Positionsfehler beim Anfahren der Probe zum Wiederauffinden der zuvor gespeicherten Positionen durch eine Korrektur in X- bzw. Y-Richtung korrigiert worden, jedoch erschwert eine weitere Eigenschaft des mechanischen Aufbaus des Mikroskops die endgültige Lagekorrektur: Die Fixierung der CCD-Kamera auf dem mittleren Tubus des Mikroskops ist drehbar und besitzt keinen Anschlag für die Nullposition. D.h. die Rotation der Kamera kann zwischen den einzelnen Aufnahmesequenzen leicht variieren, auch wenn sie bei jeder Neumontage durch eine Testprobe in ihrer Position kalibriert wird. Die Rotationsabweichungen können bis zu einem 1° betragen. Aus diesem Grund muss der Optimierungsalgorithmus für die endgültige Überlagerung der Bilder um den Rotationsfreiheitsgrad erweitert werden.

Der Schritt, die Aufnahmen der Zellen in den verschiedenen Färbungen pixelgenau zu überlagern, wird als Koregistrierung bezeichnet. Er ist nötig, um bei der folgenden Weiterverarbeitung mittels bildverarbeitender Methoden auf die Informationen aus allen Färbungen gleichzeitig zugreifen und Auswertungsergebnisse von einer Färbung auf eine andere projizieren zu können. Aus diesem Grund wird bei der Koregistrierung ein etwas größerer Rechenaufwand in Kauf genommen, um exakte Ergebnisse zu erzielen.

3.3.3 Segmentierung

In dieser Arbeit wurden zwei konkurrierende Wege eingeschlagen, um zu einer Segmentierung der Zellkerne zu gelangen: Eine vollautomatische Segmentierung mittels eines Regionenwachstumsverfahrens auf Pixelbasis und eine interaktive Segmentierung auf Basis eines Wasserscheidenalgorithmus. Beide Ansätze arbeiten mit den aus der adaptiven Grauwerttransformation hervorgegangenen Informationen und setzen auf den Grauwertbildern auf.

Regionenwachstum:

Die Parametrisierung dieses Algorithmus erfolgt durch zwei Werte. Wenn der Grauwert eines Pixels über einem Schwellwert liegt, wird dieses Pixel als ein Startpunkt des Algorithmus betrachtet.

Anschließend werden alle Nachbapixel dieses Startpixels geprüft und dem Selektionsbild hinzugefügt, wenn die Abweichung ihres Grauwerts zu dem des Startpixels innerhalb eines gewissen Toleranzbereiches liegt. Dieser Vorgang wird rekursiv wiederholt, bis keine neuen Pixel hinzukommen. Die Höhe des Schwellwerts und der Prozentsatz an Grauwertvariation legen dabei die gesamte Parametrisierung des Algorithmus fest. Mittels morphologischer Operationen (Löcher füllen, Randobjekte und zu kleine Objekte entfernen, Konturen glätten) wird das (binäre) Ergebnisbild anschließend „gesäubert“. Beschreibungen dieser Konturen werden in der Datenbank abgelegt und stehen anschließend zur Verfügung.

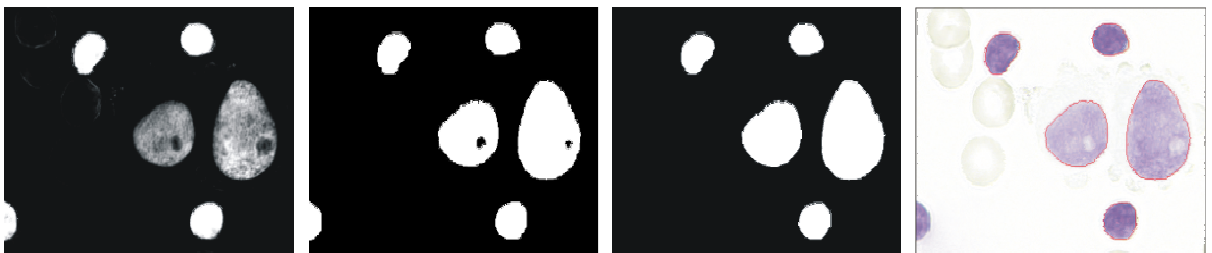


Abb. II.12: Die einzelnen Schritte des Regionenwachstums: (von links nach rechts) Ausgangsbild, gefundene Regionen, nach morphologischer Glättung und Füllung der Löcher, endgültige Kontur im original Farbbild

Wasserscheidenalgorithmus:

Bei der anschließenden Klassifikation der Zellen wird vom Benutzer auch die Qualität der Segmentierung überprüft. Ist sie nicht korrekt oder zu ungenau, wird als interaktives Segmentierungsverfahren der Wasserscheidenalgorithmus gestartet.

Im Einzelnen werden folgende Verarbeitungsschritte durchgeführt: Das Ergebnis eines Gradientenoperators (z.B. der Sobel-Operator) interpretiert der Wasserscheidenalgorithmus als „Gebirgslandschaft“, in der ein Wasserspiegel ansteigt und so „Seen“ wachsen. Dadurch werden Wasserscheiden identifiziert (s. Abb. II.13), die das Bild in – zunächst sehr viele – Regionen unterteilen. Dem kann schon durch einfache Glättungsoperatoren und eine Mindestgröße der Bassins begegnet werden (vgl. Abb. II.14 mit II.15). Zusätzlich werden alle aus der Clusteranalyse hervorgegangenen Vordergrundbereiche als einzelne Regionen gesetzt (s. Abb. II.16).

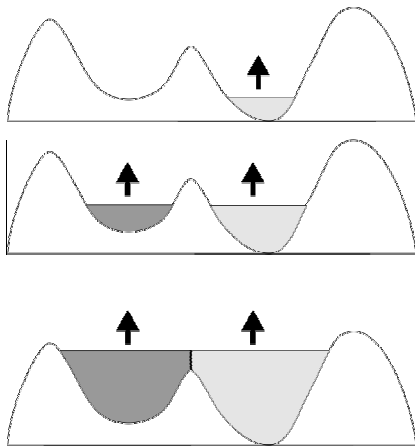
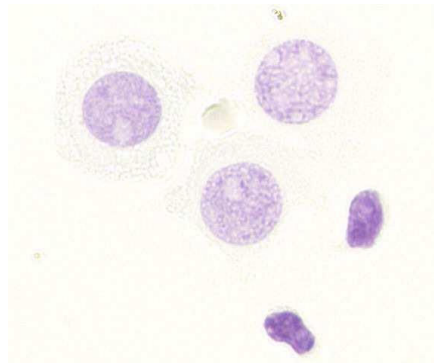


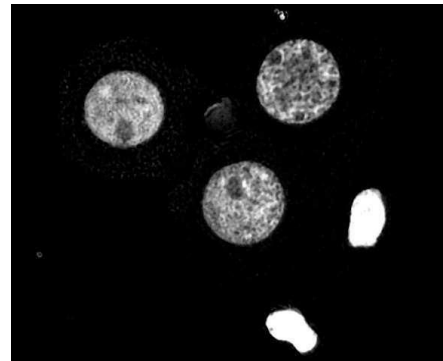
Abb. II.13: Der Wasserscheidenalgorithmus:(Von links nach rechts) Entstehung des ersten „Sees“ in einem Minimum, Entstehung des zweiten „Sees“ in einem höher gelegenen Minimum, Errichten eines „Damms“ zur Trennung der beiden „Seen“. Die „Seen“ außerhalb des Gebirges sind nicht dargestellt.

Die Aufgabe des Benutzers besteht nunmehr aus dem Hinzufügen oder Löschen der einzelnen Regionen, um das Gebiet innerhalb eines Zellkerns zu selektieren. Auch hier zeigt sich, dass eine geschickte Kombination aus durch den Computer vorausgerechneten Werten, hier die Regionen, und Benutzerinteraktionen

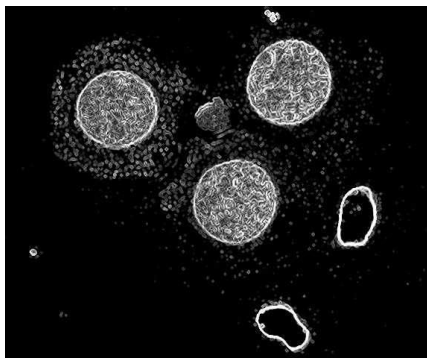
den Arbeitsablauf schneller und sicherer macht. Der gleiche Konturfindungsalgorithmus wie beim Regionenwachstum wandelt die Objekte aus dieser Selektion dann in eine Konturbeschreibung um, die ebenfalls in der Datenbank abgelegt wird.



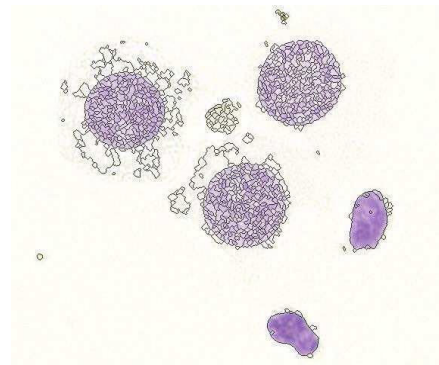
(a) Original



(b) Grauwert



(c) Gradient



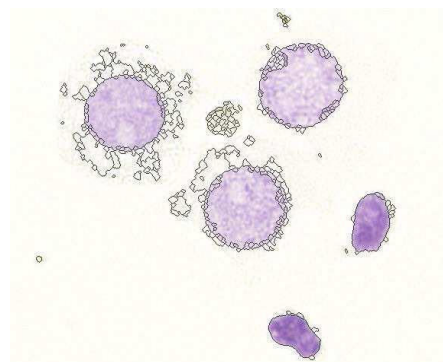
(d) Ergebnis

Abb. II.14: Anwendung des Wasserscheidenalgorithmus

Nach pixelgenauer Koregistrierung können nun die Segmentierungen der Zellkerne auch auf die anderen Färbungen projiziert werden. Bereits in diesem Stadium bietet sich eine völlig neue Sicht auf die Zellen, da sie nun wahlweise in einer der vorliegenden Färbungen betrachtet werden können, je nachdem, welche Eigenschaften der Zelle interessieren.

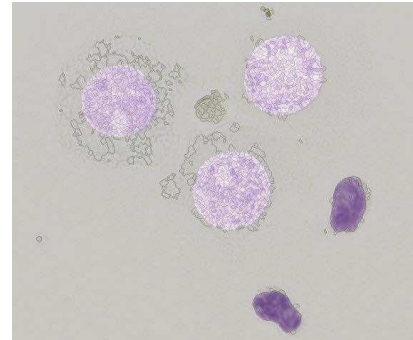
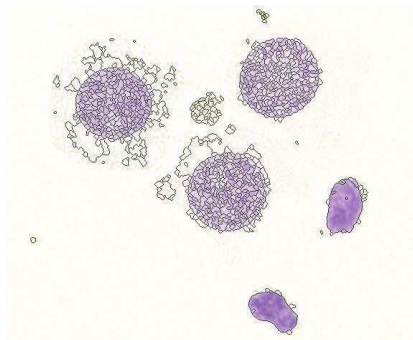


(a) Vordergrundpixel



(b) Ergebnis

Abb. II.15: Reduzierung der Anzahl der Regionen durch Einbeziehung von Zusatzinformationen



(a) Wasserscheide

(b) Selektierte Regionen (hell)

Abb. II.16: Auswahl von Regionen

3.3.4 Klassifikation

Die zunächst noch manuelle Klassifikation verschiedener Zelltypen für die nachfolgenden Auswertungen wird mittels einer einfach zu bedienenden Benutzeroberfläche durchgeführt. Das System zeigt dem Benutzer die Aufnahmen mit den aus der Segmentierung gewonnenen Kernkonturen (s. Abb. II.17). Jeder Kontur kann ein Zelltyp aus einer vorgegebenen Liste zugeordnet werden, wonach sie mit einem grünen Kreis markiert werden. Zusätzlich kann die Zelle als Mess- oder Referenzzelle für die DNA-Auswertung gewählt werden. Hierbei ist es möglich, die Zellen jederzeit auch in den anderen Färbungen zu betrachten.

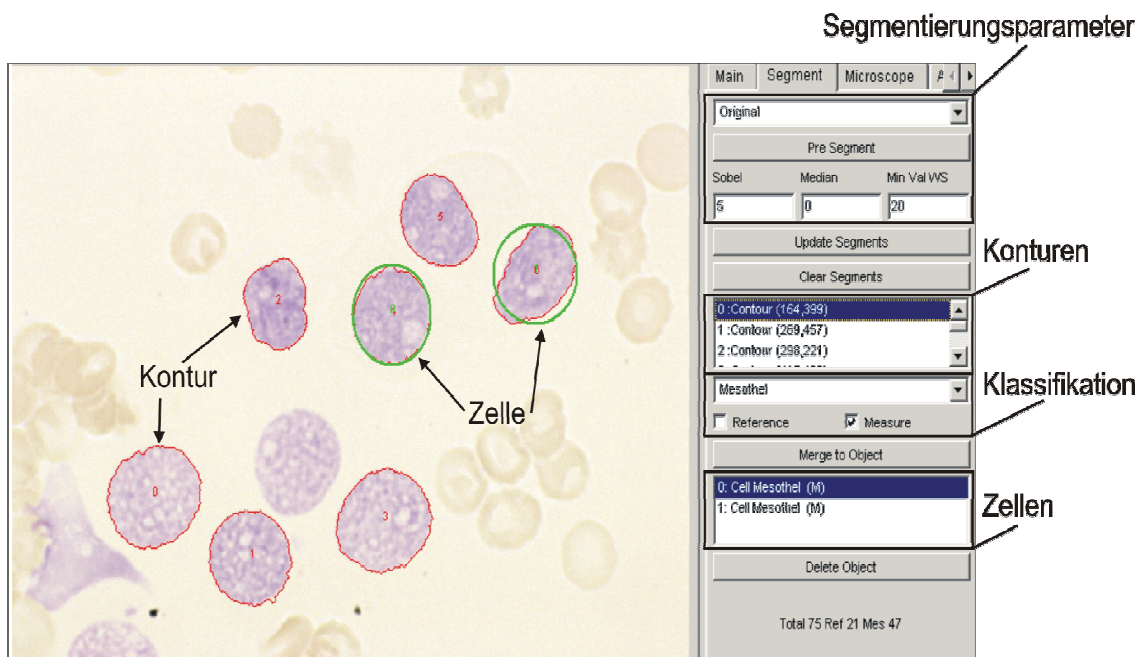


Abb. II.17: Benutzeroberfläche für die manuelle Klassifikation der Zellen

3.3.5 Auswertung der DNA-Zytometrie

Nachdem nun die Zellen als einzelne klassifizierte Objekte mit ihren Konturen vorliegen, müssen noch die für die Diagnose relevanten Daten extrahiert werden. Eine der aussagekräftigsten adjunktiven Methoden der diagnostischen Zytopathologie ist die DNA-Analyse.

Die primäre Messgröße ist hierbei die integrale optische Dichte (IOD) einer Zelle. Durch die Messung von Referenzzellen wird mit Hilfe ihres mittleren IOD-Wertes der DNA-Gehalt ruhender normaler Zellen von $2c$ festgelegt ($c = \text{content}$). Aus der Messung von 30 Referenzzellen in jedem Präparat ergibt sich der euploide $2c$ -Wert als interner Referenzwert (Mittelwert der integrierten optischen Dichte IOD). Zur Qualitätssicherung muss der Variationskoeffizient (CV) einer Referenzzellpopulation kleiner 5% sein (Böcking et al. 1995b, Haroske et al. 1998).

Zunächst werden hier die technischen Aspekte, die die DNA-Messung ermöglichen, dargestellt:

Berechnung der optischen Dichte

Die optische Dichte OD eines durchleuchteten Objektes ist wie folgt definiert:

$$OD = -\log_{10}(T) \quad (2.1)$$

mit dem Transmissionskoeffizienten $T = I_1 / I_0$, wobei I_0 die Lichtintensität vor dem Objekt und I_1 die Intensität hinter dem Objekt ist (s. Abb. II.18(a)).

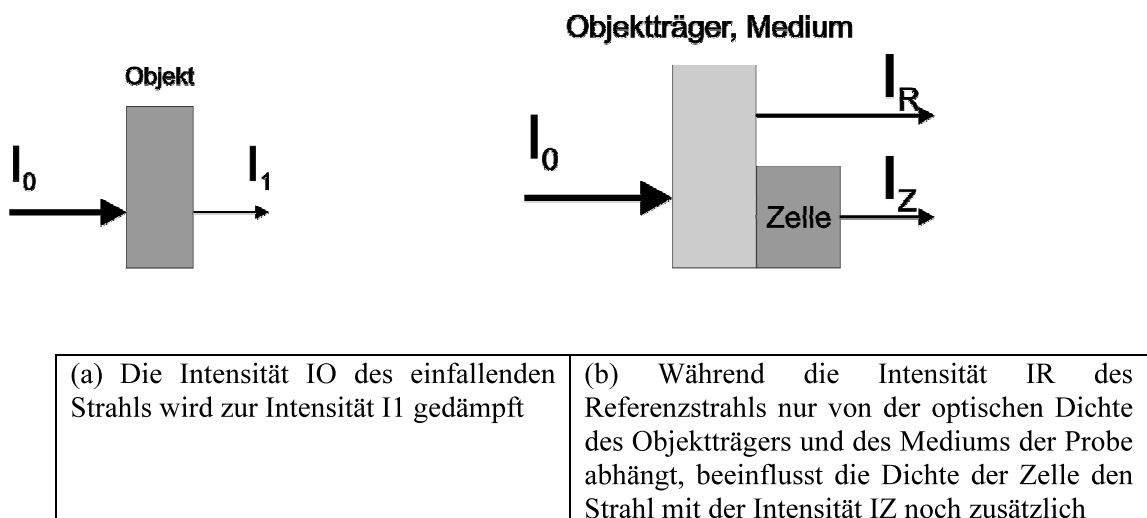


Abb. II.18: Zur Definition der optischen Dichte

Die Messung der OD von Zellen unter dem Mikroskop ist etwas komplizierter, da weder die Eingangintensität I_0 noch die OD des Objektträgers und des die Zelle umgebenden Mediums bekannt sind. Durch eine Referenzmessung der OD in der nahen Umgebung der zu vermessenden Zelle können diese Einflüsse kompensiert werden.

Es ergibt sich nach Abb. 2.18(b):

$$\begin{aligned} T_{\text{ges}} &= IZ / I_0 ; \quad TR = IR / I_0 ; \quad TZ = IZ / IR \\ \Rightarrow TZ &= T_{\text{ges}} / TR = (IZ / I_0) / (IR / I_0) = IZ / IR \end{aligned}$$

Hieraus kann dann die IOD der Zelle

$$IOD = \sum_i -\log_{10}(I_i / IR) \quad (2.2)$$

mit den Intensitäten der Pixel innerhalb der Zelle I_i und dem Mittelwert der Referenzintensität IR außerhalb der Zelle bestimmt werden.

Gemäß dem Absorptionsmaximum des Feulgen-Farbstoffes werden die IOD-Werte aus einer Linearkombination des Grün- und des Rotkanales im Verhältnis 7:3 berechnet. Die Intensitäten ergeben sich aus den Grauwerten der betrachteten Pixel. Weitere Einflüsse müssen jedoch noch beachtet werden, um die Messung der IOD korrekt durchzuführen.

Streulicht

Gleichung 2.2 geht von parallelen Lichtstrahlen aus. In der Realität werden aber Lichtstrahlen abseits der zu vermessenden Zelle in der Probe gestreut, so dass die Intensität hinter der Zelle höher ist, als sie aufgrund der Dichte sein dürfte (s. Abb. 2.20(a)). Um dies zu korrigieren, muss der prozentuale Anteil des Streulichtes bei der Messung ermittelt werden (Kindermann und Hildgers 1994).

Hierzu werden am besten Objekte vermessen, die vollständig opaque sind, also einen Transmissionkoeffizienten von 0 haben. Es bieten sich kleine Partikel Aktivkohle an, die auf die gleiche Art verarbeitet und fixiert sind wie die Zellen. Aus den Messungen ergibt sich dann eine von Null abweichende Transmission. Da in diesem Fall die korrekte Transmission Null wäre, ist dieser „falsche“ Transmissionswert gleichzeitig die Korrektur der gemessenen Transmission, und die optische Dichte ergibt sich dann zu:

$$OD = -\log_{10}((I_{\text{gemessen}} - I_{\text{streu}}) / (I_{\text{Referenz}} - I_{\text{streu}})) \quad (2.3)$$

Beugung

Die betrachteten Objekte sind so klein, dass in dieser Größenordnung bereits Beugungseffekte eine Rolle spielen. An der Kante des Zellkerns wird das zum größten parallel verlaufende Licht in Richtung des Kerns gebeugt (s. Abb. II.19(b)).

Somit erscheint der Rand der Zelle heller als er sich eigentlich abbilden sollte. Um diesen Effekt zu kompensieren, werden in der Randregion nicht die Werte der einzelnen Pixel für die Berechnung der IOD herangezogen, sondern sie werden auf den mittleren Wert aus dem Inneren der Zelle gesetzt.

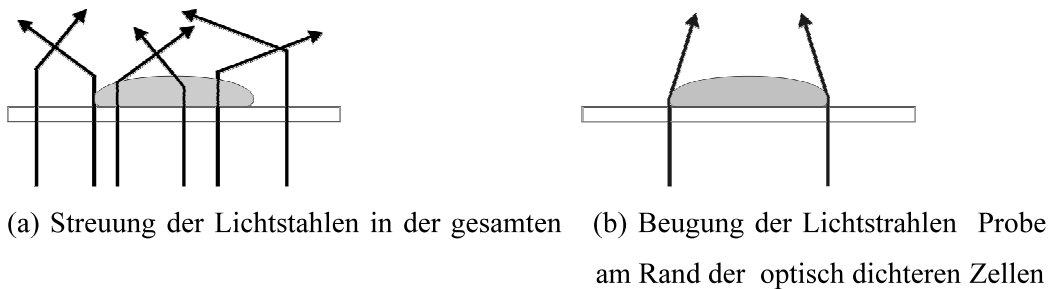


Abb. II.19: Störeffekte bei der Berechnung der optischen Dichte der Zellen

Der Zellkern wird für die Bestimmung des IOD in drei Regionen eingeteilt (s. Abb. II.20): Ein äußerer Rahmen für die Bestimmung der Referenzintensität IR, der innere Rand für die Korrektur der Beugung und schließlich der innere Rest des Zellkerns für die Berechnung der IOD.

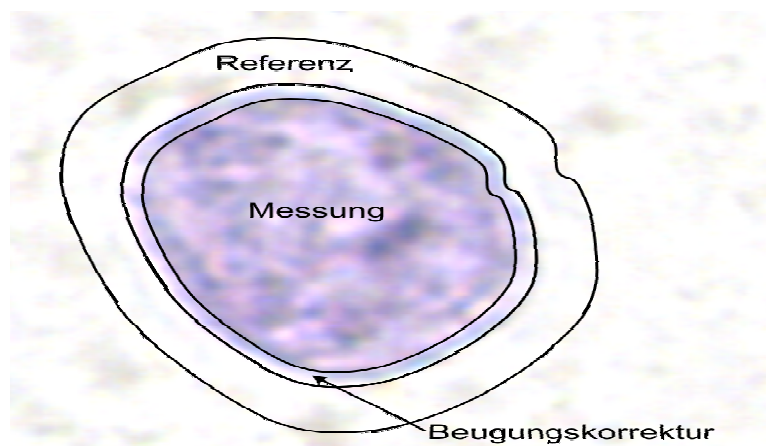


Abb. II.20: Einteilung der Zellen in verschiedene Regionen für die Bestimmung der IOD

Für die Beurteilung der Messung ist auch die Fläche A der Zellkerne von Bedeutung. Die Fläche der Zellen in Abhängigkeit der IOD aufgetragen, gibt Aufschluss über eine erfolgreiche Korrektur der Beugung. Je kleiner die Objekte sind, desto größer ist der Einfluss der Beugung auf das Ergebnis der IOD. Bei nicht korrigierten Aufnahmen verschiebt sich die IOD von Zellen mit kleiner Ausdehnung

zu kleineren Werten hin, was an einer Kürzung des unteren Astes zu erkennen ist. Wird die Beugung durch das beschriebene Verfahren korrigiert, verschwindet dieser Effekt.

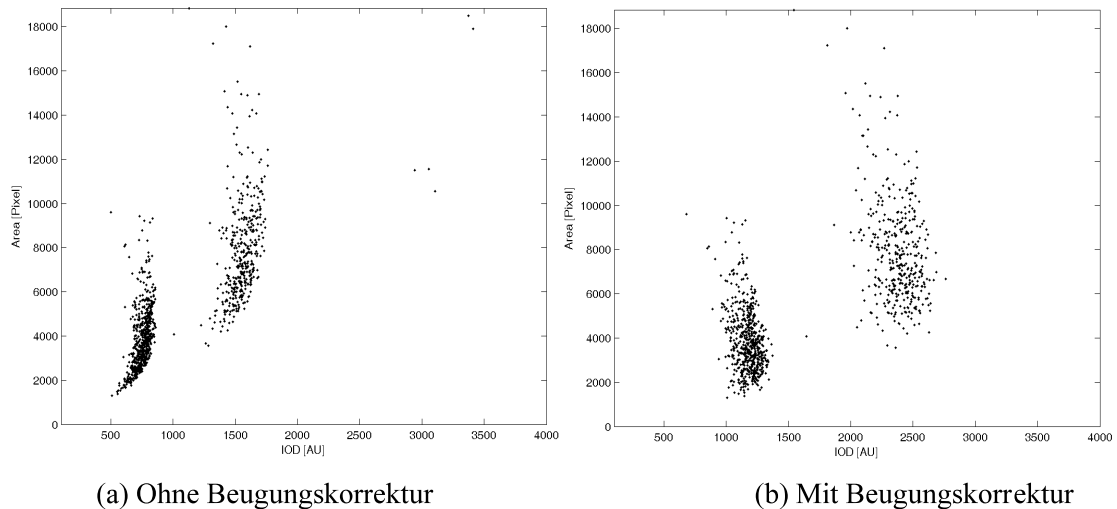


Abb. II.21: Beugungskorrektur einer IOD-Messung

DNA-Messung

Nachdem all diese störenden Effekte eliminiert bzw. kompensiert wurden, kann nun der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen angegeben wird und somit die DNA-Verteilung in der untersuchten Zellpopulation errechnet werden. Diese wird in einem DNA-Histogramm dargestellt. Dieses offenbart die Häufigkeitsverteilung der integrierten optischen Dichte der spezifisch mit DNA-Farbstoffen (Feulgen-Färbung) gefärbten Zellkerne in der Einheit c (1 c entspricht der DNA-Menge eines einfachen Chromosomensatzes). Pro Präparat wurden, wenn möglich, 300 Analysezellen und 30 Referenzzellen gemessen. Nekrotische, autolytische oder übereinander liegende Zellen wurden nicht gemessen.

Bei der Auswertung der Histogramme wird der Bereich der zu beurteilenden DNA-Stammlinie durch den Untersucher festgelegt. Die Berechnung des Modalwertes, der den häufigsten Wert (Gipfel) eines DNA-Histogramms darstellt, erfolgt bei der Berechnung des DNA-Histogramms. Diese geschieht in einem separaten Rechenprozess nach Erstellen der Bildergalerie in der Feulgen-Färbung mit der darauf folgenden Segmentierung und Klassifikation der Zellen durch den Benutzer. Letzteres dient gleichzeitig der Qualitätskontrolle, da die Messzellen und Referenzzellen anhand der Bilder erst jetzt endgültig klassifiziert und in die Messung aufgenommen oder verworfen werden. Dabei können zu jeder Zelle die

jeweils entsprechenden Bilder in der Papanicolaou- oder May-Grünwald-Giemsa-Färbung betrachtet werden. Es werden die zu messenden Zellkerne hierbei direkt überprüft, sowie Artefakte aus der Messung ausgeschlossen (Müller et al. 1994). Anschließend werden die DNA-Histogramme und weiteren DNA-zytometrischen Daten ausgedruckt.

Die Benutzerschnittstelle des Systems erstellt für die Beurteilung der Ergebnisse durch den Pathologen eine übersichtliche Darstellung (s. Abb. II.22).

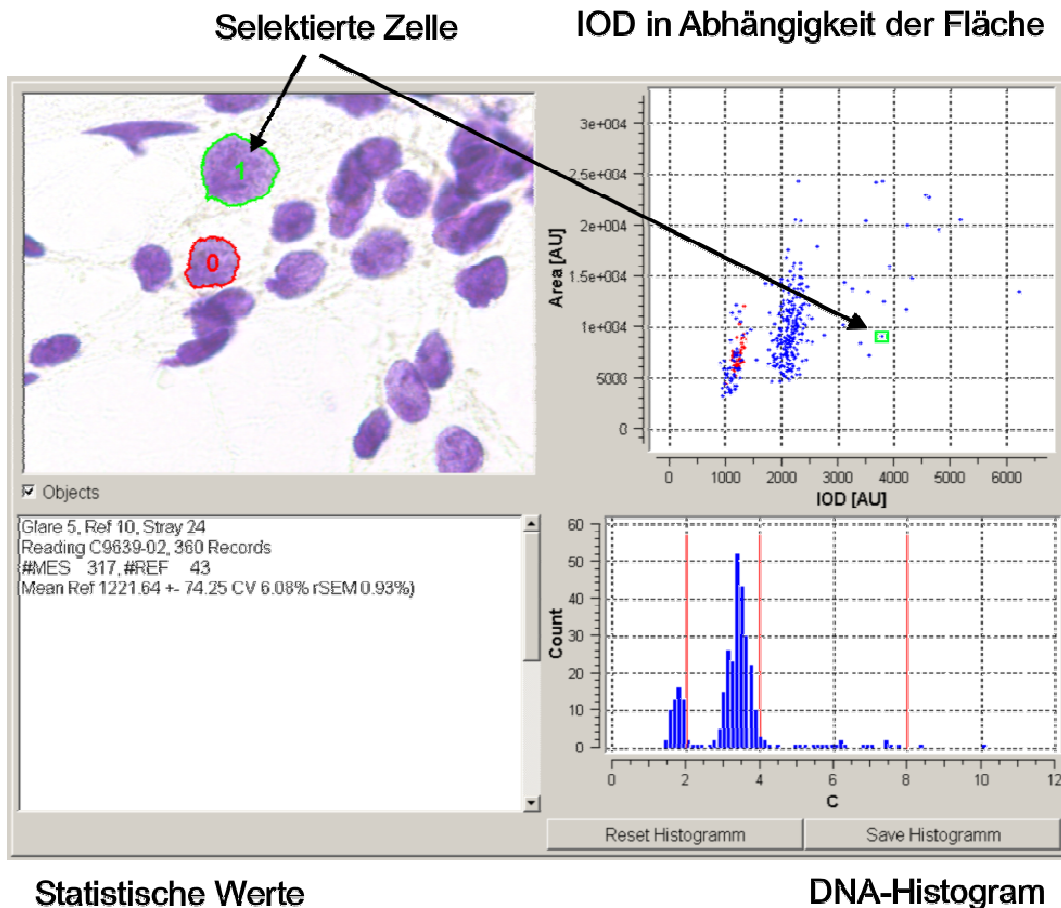


Abb. II.22: Benutzeroberfläche für die DNA-Analyse

Rechts unten ist die Darstellung des DNA-Histogramms zu sehen. Zur Orientierung sind rote Markierungen an den Stellen 2c, 4c und 8c angebracht. Um ggf. Fehler in der Beugungskorrektur zu erkennen, sind nochmals in einem weiteren Diagramm die Flächenmaße aller Zellen über ihrem IOD eingezeichnet. Die Messzellen sind blau und die Referenzzellen rot. Der Benutzer kann in dieser Darstellung einzelne Zellen selektieren, die dann links daneben auf dem Originalbild eingezeichnet werden.

Selbstverständlich können dann auch die Bilder dieser Zellen in allen bereits aufgenommenen Färbungen betrachtet werden.

3.3.6 Nukleolus-organisierende Regionen

AgNOR-Zählung

Da es sich bei der Silberfärbung um eine Ausfallreaktion und nicht um eine Reaktion mit definierten Bindungspartnern handelt, unterliegt diese Färbung starken Schwankungen, abhängig von der Probe und den Eigenschaften des Färbekochens.

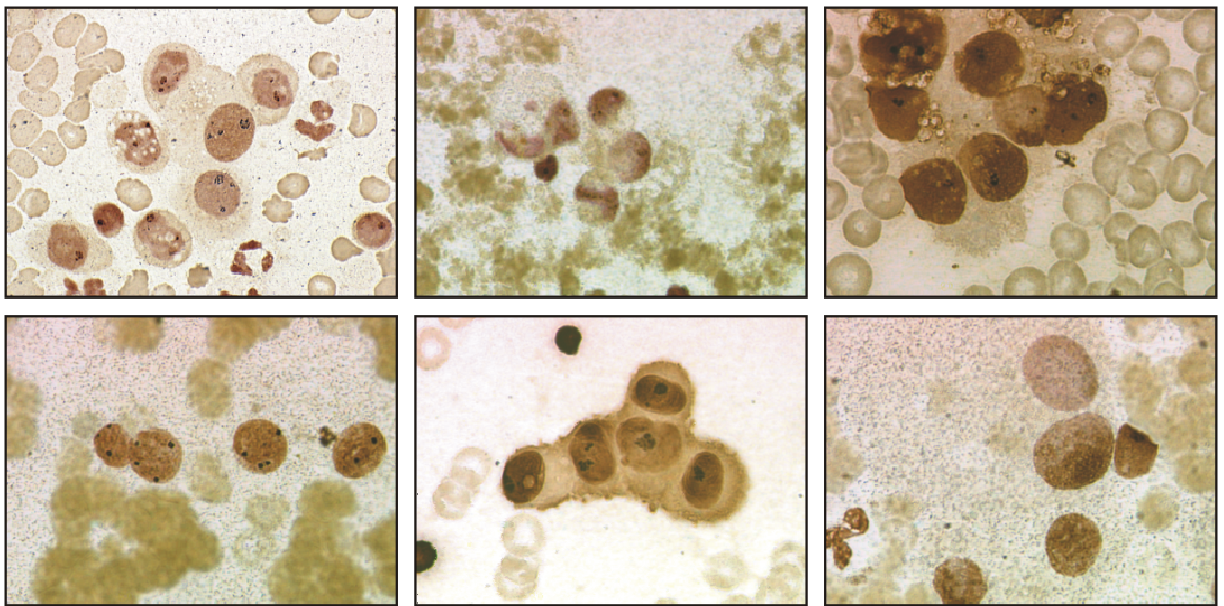


Abb. II.23: Aufnahmen in der Silbernitrat-Färbung in unterschiedlicher Qualität.

Wegen der stark variierenden Färberegebnisse und des geringen Kontrastes zwischen Zellkern und NOR, erweist sich in manchen Fällen die Messung der Cluster (zusammengelagerte AgNORs) und Satelliten (einzeln liegende AgNORs) sowohl in der manuellen als auch in der automatischen Zählung als schwierig (Abb II.23). Durch eine geschickte Gestaltung der Benutzeroberfläche ist es möglich, dem Anwender genügend Hilfestellung zu geben, um die Auswertung eines Silber-Präparats in einer für die Routineanwendung akzeptablen Zeitspanne durchzuführen.

Zusätzlich zur Bedienung des Mikroskops muss derzeit noch die Anzahl der Cluster und Satelliten manuell in das System eingegeben werden.

Da das Prinzip der Multimodalen Zellanalyse auf der Auswertung identischer Zellen in verschiedenen Färbungen beruht, wurden in der Silber-Färbung auch nur Zellen ausgewertet, die bereits in vorherigen Färbungen betrachtet worden sind.

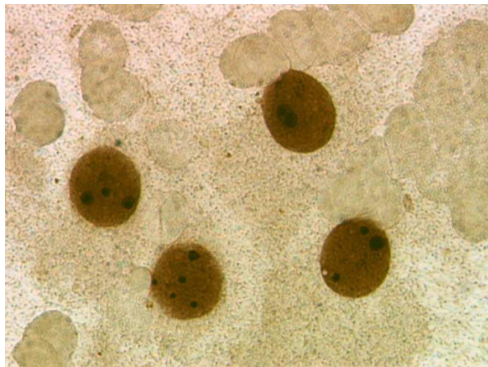
Insbesondere werden Zellen untersucht, bei denen nach einer erfolgreichen Segmentierung und Klassifikation ein Ergebnis der DNA-Analyse vorliegt.

Das System erfasst für diese Zellen die Anzahl der Cluster und Satelliten und berechnet daraus die mittleren Anzahlen pro Zellkern.

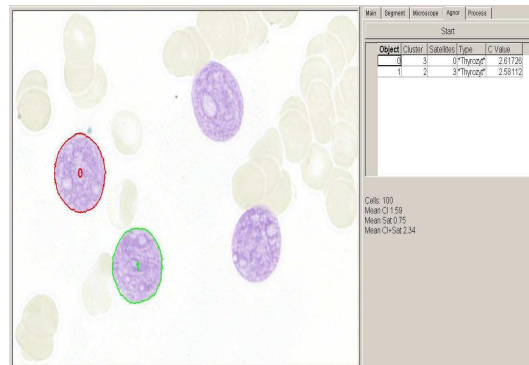
Dem Benutzer wird bereits bei der Aufnahme der Bilder in der Silber-Färbung die Möglichkeit gegeben, die Messwerte in die Datenbank einzutragen. Auf dem Bildschirm mit der Benutzeroberfläche wird das aktuelle Bild in der Feulgen-Färbung mit den Konturen der auszuwertenden Zellkerne dargestellt.

Die Werte für die Anzahl der Cluster und Satelliten werden dann in eine Tabelle eingetragen, in der auch Daten der vorhergehenden Färbungen dargestellt sind (Abb.II.24(b)).

Sowohl der Zelltyp als auch der errechnete DNA-Gehalt werden angezeigt.



(a) Videobild des Mikroskops auf dem linken Bildschirm



(b) GUI der Anwendung auf dem rechten Bildschirm

Abb. II.24: Benutzerschnittstelle für die Eingabe der Meßwerte aus der Silber-Färbung.

Das Ergebnis dieser Auswertung besteht dann nicht nur wie bei der ursprünglichen Auswertungsmethode aus den Mittelwerten von Clustern und Satelliten pro Zellkern, sondern jeder Zelle wird ein diagnostisch relevanter Wert zugeordnet. Hierdurch sind Korrelationen z.B. zwischen dem DNA-Gehalt und der Anzahl von NORs in Bezug auf individuelle Kerne möglich.

Nicht nur die Verbindung der einzelnen Ergebnisse der adjunktiven Methoden ergänzen sich durch die Anwendung der „Multimodalen Zellanalyse“. Auch die Ansichten der Zellen in den verschiedenen Färbungen tragen entscheidend dazu bei, Fehler bei der Auswertung zu unterbinden.

Die automatische AgNOR-Zählung basiert auf demselben Algorithmus, der auch zur AgNOR-Flächenberechnung eingesetzt wird.

AgNOR-Flächenbestimmung

Die Berechnung der AgNOR-Fläche erfolgte nach einem Algorithmus, der ebenfalls am LfB entwickelt wurde (Aschenborn 2004).

Folgende grundlegende Eigenschaften wurden für alle AgNORs in den Aufnahmen vorausgesetzt:

1. AgNOR-Regionen sind dunkler als ihre unmittelbare Umgebung.
2. AgNOR-Regionen sind durch einen Gradienten umrandet.
3. Einzelne AgNORs besitzen eine homogene Färbung.
4. Einzelne AgNORs haben eine maximale Größe.
5. Einzelne AgNORs besitzen eine kreis- bzw. kugelförmige Struktur.
6. Satelliten und Cluster sind vollständig im Zellkern enthalten.
7. Alle Objekte sind geschlossene Objekte.

Die AgNOR-Analyse beginnt mit einer Grauwerttransformation. Als Farbraummodell wurde der HSV-Farbraum gewählt, der die Farben über den Farbton (Hue [H]), Sättigung (Saturation [S]), und Helligkeit (Value [V]) definiert. Der Helligkeitskanal bietet den besten Ansatz für das nachfolgende Gradientenbild, das mit Hilfe eines optimierten Sobel-Operators, einem Gradientenoperator, erzeugt wird. Ein Wasserscheidenalgorithmus reduziert die Gradienten zu ein-Pixel-breiten Kanten. Für jeden Kantenpixel wird eine Profillinie in Richtung des lokalen Gradienten nach Objektkanten abgesucht. Jedes Pixel zwischen den Grenzen wird als Objektpixel bewertet. Das Ergebnis ist eine Pixelbewertungsmatrix, in der die Objektpixel durch die höheren Werte identifiziert werden können. Da die Transformation auf einem Gradientenbild basiert, bleiben die Ergebnisse von färbungsbedingten Hintergrundschwankungen unbeeinflusst. Ausgehend von Pixeln mit sehr hohen Werten in der Pixelbewertungsmatrix werden nun mittels eines Wachstumsprozesses die optimalen Segmente gefunden. Der Wachstumsprozess wird fortgesetzt, bis die bestmögliche Kombination von homogener Fläche und Umrandung erreicht ist. Eine endgültige Klassifikation, die auf dem Mittelwert der Pixelbewertung beruht, trennt die ungültigen Segmente aus dem Hintergrund von den eigentlichen AgNORs. Abb. II.25 zeigt das Ergebnis der automatischen AgNOR-Erkennung.

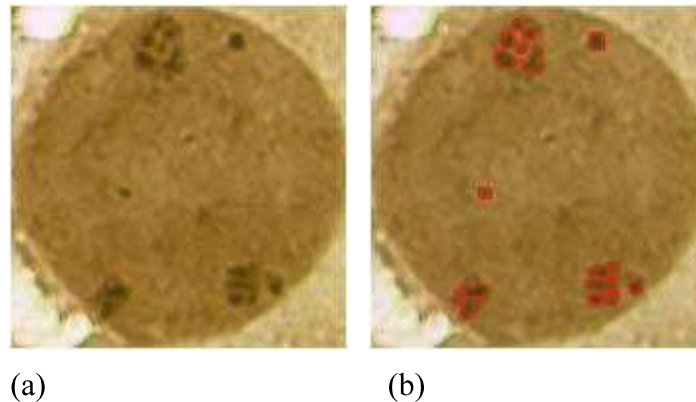


Abb. II.25: Silbernitrat-gefärbter Zellkern (a) mit detektierten AgNORs (b)

Anschließend werden die AgNOR-Regionen in Satelliten oder Cluster klassifiziert. Da Cluster ausschließlich in Nukleolen liegen, bietet sich zur Clusteridentifizierung ein Nukleolenabgleich an. Dieser Schritt setzt eine funktionierende Nukleolen-Detektion voraus. Sie wird in der Diplomarbeit von Alexander Schega (2004) beschrieben und hier kurz dargestellt. Wie bei der AgNOR-Erkennung, werden auch für die Nukleolen-Detektion gewisse morphologische Eigenschaften der Nukleolen, diesmal in der Feulgenfärbung, als Ausgangspunkt verwendet.

So ist ein Nukleolus:

1. ein annähernd rundes Objekt, das aus mindestens einem Viertelkreis besteht,
2. heller als der Restkern ist,
3. eine homogene Fläche besitzt und
4. zu mindestens 50% von einem dunklen Rand umschlossen ist.

Zu Beginn wird eine geeignete Grauwerttransformation durchgeführt, die relevante Bildinformationen hervorhebt und Störeinflüsse relativ dazu abmildert. Mittels einer angepassten Hough-Transformation zur Detektion von Kreisstrukturen werden anschließend die in Frage kommenden Objekte lokalisiert und die Startpunkte für eine genauere Segmentierung mit Hilfe aktiver Konturen ermittelt. Es lassen sich so statistische Merkmale dieser Objekte extrahieren, anhand welcher entschieden werden kann, ob es sich um einen Nukleolus handelt.

In den Fällen, in denen die Nukleolen nicht detektierbar sind, zählt die räumliche Nähe einzelner AgNORs zueinander als Unterscheidungsmerkmal. Liegen zwei oder mehrere AgNORs genügend dicht beisammen, kann von einem Cluster ausgegangen werden (Prinzip der Formationserkennung).

Der letzte Schritt des AgNOR-Algorithmus besteht aus der quantitativen Berechnung der AgNOR-Fläche.

Der Mehrwert der „Multimodalen Zellanalyse“ gegenüber der klassischen Auswertung einzelner Färbungen zeigt das enorme diagnostische Potenzial der neuen Methode. Durch diese Umsetzung in ein funktionierendes System sind viele Vorteile demonstriert worden. Mithilfe dieses Labormusters ist es möglich, ohne großen Aufwand zytopathologische Probe multimodal auszuwerten.

III Ergebnisse

1 Ablauf der Aufnahmesequenzen

Der Zeitaufwand für den im Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Ablauf der Aufnahmesequenz der Zellbilder betrug pro Färbung pro Präparat, bei durchschnittlich ungefähr 160 Aufnahmen, ca. 2,5 Stunden. Die vergleichsweise beträchtliche Dauer war bedingt durch einen hohen Rechenaufwand des Computers für die Relokalisation und Koregistrierung der Bildpositionsdaten sowie die notwendige Zeit für das Speichern der Aufnahmen in einer Bilddatenbank, die etwa 4 Sekunden dauerte. Außerdem war die automatische Repositionierung identischer Zellbilder aus vorangegangenen Färbungen zunächst derart ungenau, dass eine manuelle Korrektur und ein visuell geführter Feinabgleich regelhaft erforderlich waren (s. Abschnitt II. 3.3.2).

Bei der Aufnahme der MGG-gefärbten Zellszenen in den vorher von einem erfahrenen Zytopathologen bei der Durchsicht am Mikroskop ausgewählten und Filzschreiber-markierten Regionen stellt sich die Möglichkeit, diese Markierungen auch auf dem Computermonitor darzustellen, als hilfreich dar. Gleichzeitig werden die Positionen der Aufnahmen auf einer „Landkarte“ des Objektträgers mit seiner C-Nummer links unten auf dem Bildschirm dargestellt, wobei die aktuelle Position der gewählten Aufnahme markiert ist und die Position des Mikroskoptisches ebenso eingeblendet wird. So war es möglich, auch als unerfahrener Auswerter innerhalb dieser Grenzmarkierungen zielgenau möglichst viele von den im Vorhinein vom Zytopathologen als diagnostisch relevant eingestuften Zellen zu fotografieren. Außerdem war durch die Monitorarstellung das Verlassen der diagnostisch interessanten Regionen auf dem Objektträger sichtbar und konnte so verhindert werden.

1.1 Qualität von Probengut und Färbungen

Die Qualität der Proben bezüglich des Zustandes der einzelnen Zellen variierte trotz vorgeschalteten Aussortierens völlig unzureichender Proben (s. Abschnitt I.3). Es sollten mindestens 300 *Analysezellen* gemessen werden, um in der DNA-Analyse ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten. Bei elf Proben konnte dieser Forderung aber wegen unzureichendem Zellmaterial nicht nachgekommen werden. Bei diesen Präparaten wurden im Mittel 243 Messzellen (147 bis 293 Zellen) DNA-zytometrisch untersucht.

Ein Zusammenhang zwischen einer bestimmten Färbung oder Präparategruppe und der Schadhaftheit der Zellen konnte nicht beobachtet werden. Nach den in Kapitel II.2.1 beschriebenen Kriterien für unzureichende Proben (Nekrose, Autolyse etc.) wurden folglich entsprechend auffällige Zellen nicht in der Messung berücksichtigt. Aufgrund eines für den ungeübten Untersucher möglicherweise visuell nicht feststellbaren Defektzustandes der untersuchten Zellen ist gleichwohl eine Ungenauigkeit der Ergebnisse sowohl in der DNA-Messung als auch in der AgNOR-Zählung vorstellbar.

Die wie in Kapitel II.2 beschriebenen durchgeführten *Färbungen* nach MGG, Feulgen und AgNOR zeigten zum Teil erhebliche Qualitätsunterschiede im Färbeergebnis der Präparate. Die Zeitangaben für die einzelnen Färbungen wurden eingehalten und waren bei den einzelnen Präparaten identisch. Sie wichen nicht von den Färbeprotokollen ab. Die drei untersuchten Präparategruppen zeigten untereinander keine Unterschiede im Färbe- und Kontrastverhalten.

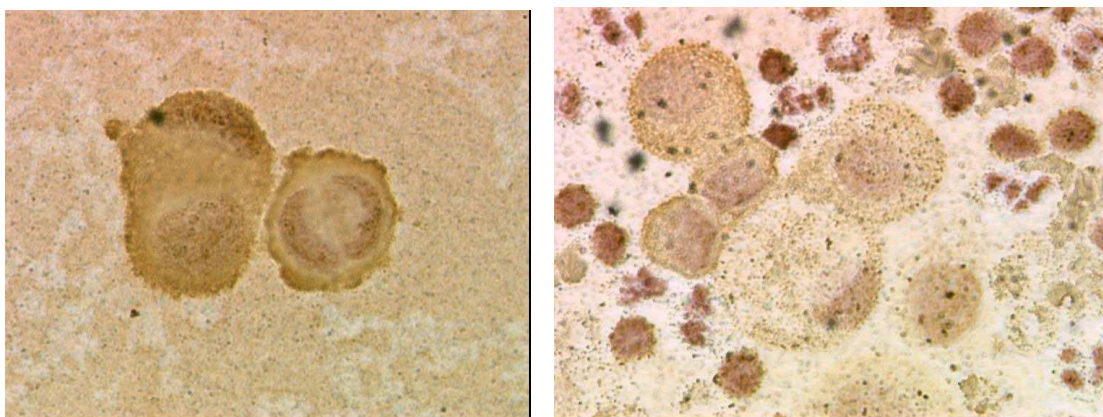
Die *MGG*-Färbung wies die geringsten Intensitätsunterschiede auf. Die morphologische Begutachtung wurde lediglich durch besonders dunkel oder hell gefärbte Präparate etwas erschwert.

Bei der Färbung nach *Feulgen* traten größere Differenzen in der Farbqualität auf. Es stellte sich heraus, dass der bei einigen Präparaten mangelhaft ausgeprägte Farbkontrast zwischen Kern und Zytoplasma eine Fehlerquelle für den *Segmentierungsalgorithmus* darstellte. So konnten Kernkonturen nicht als solche exakt identifiziert und markiert werden. Die Kernmasken wurden zu klein gekennzeichnet, es wurden dunklere Areale innerhalb des Zytoplasmas als Kern

fehlidentifiziert oder es wurden dicht zusammen gelagerte Kerngruppen als ein einzelner Kern erkannt. Die Möglichkeit, von der Software erkannte Kernkonturen manuell zu korrigieren (wie in Abschnitt II.3.3.3. beschrieben), stellte sich als sehr hilfreich dar. So konnte durch den Wechsel der Darstellung des Fotos von der Feulgen- in die MGG-Färbung die korrekte visuelle Erkennung der Randkonturen der Zellkerne gewährleistet werden. Diese vorangegangene Färbung erlaubte nämlich durch den größeren Farbkontrast zwischen Zytoplasma und Kern deren visuelle Trennung bzw. Differenzierung.

Die Variabilität der *Farbintensität* zwischen den einzelnen Präparaten speziell in der Feulgenfärbung verfälschte keineswegs die Ergebnisse der IOD-abhängigen *DNA-Messung*. Grund dafür ist, dass die Auswertung auf der Berechnung des Verhältnisses der optischen Dichte der Messzellen zu den Referenzzellen beruht, die den gleichen Färbebedingungen ausgesetzt waren. Da die Färbeintensität auf dem entsprechenden, identischen Objektträger ebenfalls minimalen Schwankungen unterworfen ist, wurden Analyse- und Referenzzellen gleichermaßen in den umrandeten ROIs (regions of interest) ausgewählt und fotografiert.

Die Intensität der Färbung variierte besonders stark bei der *AgNOR*-Färbung. Obwohl für alle Objektträger stets dieselbe Färbezeit nach einem standardisierten Färbeprotokoll veranschlagt wurde, gab es Fälle, in denen keine argyrophilen Regionen innerhalb des Zellkernes zu erkennen waren (Abb. III.1 a))



a)

b)

Abb. III.1: AgNOR-Färbung - Variabilität

Andererseits gab es auch Präparate, die derart überfärbt waren, dass keine Unterscheidung zwischen AgNORs und silbergefärbtem Schmutz bzw. Präzipitaten möglich war (Abb. III.1 b)). Daher konnten 14 Fälle (2 Reaktive, 6 Karzinosen und

6 Mesotheliome) nicht ausgewertet werden. Bei 4 Proben (C1489-99, C11270-00, C13477-99, C11033-98) konnte nur eine geringere als die veranschlagte Anzahl von 100 Zellen ausgewertet werden (34 bis 98, Mittelwert 69 Zellen). Zudem war es bei der manuellen Zählung der Cluster und Satelliten gelegentlich für den Untersucher schwierig zu entscheiden, wann eine silbergefärbte Struktur, die sich innerhalb der Kerngrenzen befand, oberhalb oder noch innerhalb der Zellebene lag.

Die *Homogenität* der Färbung innerhalb der gesamten Fläche des einzelnen Objektträgers war in allen drei Färbungen gegeben. Eine augenfällig ungleichmäßige Anfärbung von Zellen, die in verschiedenen Regionen des Objektträgers lagen, konnte nicht festgestellt werden.

Mit steigender *Lagerungszeit* war ein geringes Verblässen ausgehend vom Objektträgerrand zu beobachten. Daher wurden ausschließlich Aufnahmen von Zellen gemacht, die nicht unmittelbar am Rand des Präparates lagen. Es stellte sich heraus, dass das Ausbleichen besonders relevant war für die AgNOR-Auswertung, da hierbei eine eventuelle Verfälschung der AgNOR-Zahlen nicht durch eine Softwareanwendung zu korrigieren war.

1.2 Zellrelokation und Koregistrierung

Um das Wiederauffinden der Zellszenen, von denen bereits Aufnahmen in einer anderen Färbung existierten, zu ermöglichen, fand eine computerunterstützte Relokalisation statt.

Nach dem Einlegen des umgefärbten Objektträgers fuhr der Mikroskopist an die gleiche Koordinatenposition, bei der in der vorhergehenden Färbung die erste Aufnahme gemacht worden war. Wegen mechanischer Ungenauigkeiten beim Einlegen der Probe und einer teilweise aufgetretenen Verschiebung der Zellen auf dem Objektträger beim Umfärbeprozess konnten diese Positionen aber nur ungenau angefahren werden.

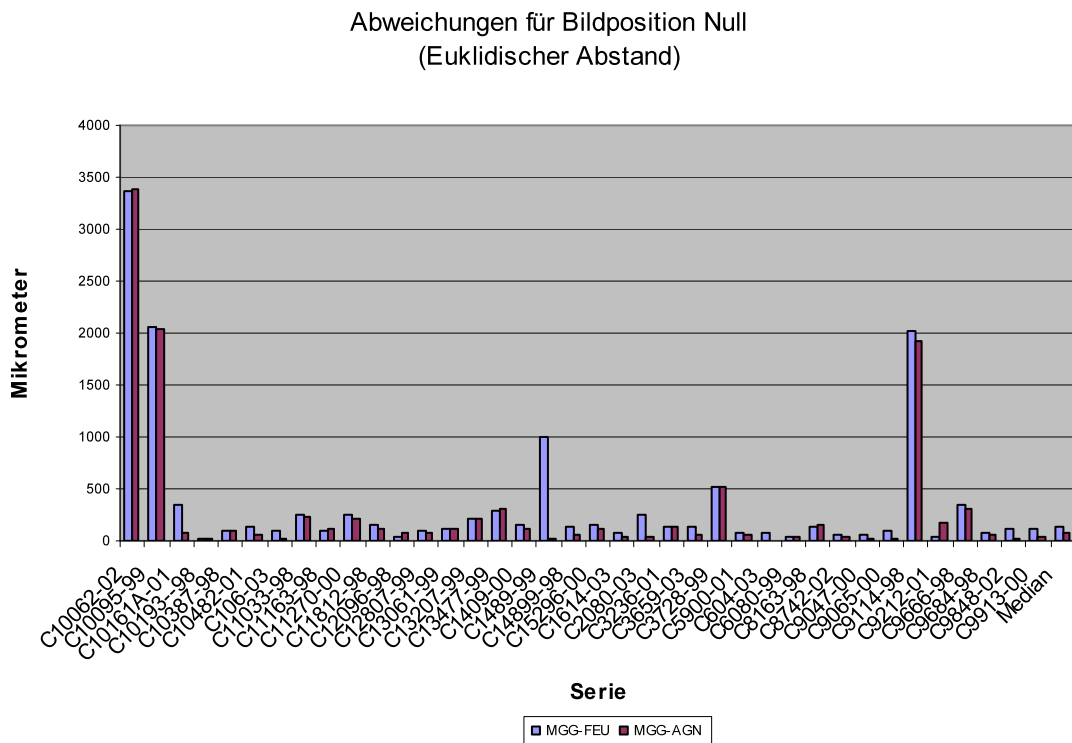


Abb III.2: Abweichung der ersten Bildposition

Die gesuchten Zellen waren nicht auf dem vom Computer gefundenen Bild der CCD-Kamera zu sehen. Durch einen Blick durch das Okular war es aber meist möglich, über einen visuellen Vergleich der Abweichungen des gespeicherten Bildes aus der vorherigen Färbung von dem aktuellen Mikroskopbild, die gesuchten Zellszenen zu entdecken. In einzelnen Fällen war es allerdings erforderlich, manuell den Mikroskoptisch in Kreisen um die zuerst angefahrne Position zu steuern, um die gesuchten Zellen mit dem Okular auffinden zu können.

Der Euklidische Abstand der ersten Position der MGG-Färbung von der ersten Position der darauf folgenden Feulgen-Färbung betrug im Median 131,84 μm (28,16 μm – 3373,42 μm). Dieser Abstand betrug zwischen der ersten Position der ersten Färbung (MGG) und der ersten Position der dritten Färbung (AgNOR) im Median 81,07 μm (4,71 μm – 3375,35 μm). Das auf dem Monitor sichtbare Bildformat betrug 74,2x55,2 μm , die Bilddiagonale 92,5 μm . Hieraus ist ersichtlich, dass im Durchschnitt die Zellszene der ersten Bildposition der jeweils folgenden Färbung nicht so exakt wieder angefahren werden konnten, dass sie auf dem Monitorbild sichtbar waren. Im Median lagen die gesuchten Zellen bei der Aufnahme der Feulgenbilder etwa 1,4 Bildschirmdiagonalen entfernt von der Position der Zellen in

der vorangehenden MGG-Färbung. Um die umgefärbten Zellen zu finden, war es daher erforderlich, diese auf dem Monitorbild durch ein manuelles Verschieben des Mikroskopisches aufzufinden oder mit Blick durch das Okular zu suchen.

Bei der Aufnahme der AgNOR-Bilder gelang die Repositionierung etwas besser. In der Regel waren die Zellen des ersten Fotos hierbei direkt auf dem Monitor sichtbar, sodass nur noch die computerunterstützte Feinjustierung vorgenommen werden musste, um eine annähernd pixelgenaue Überlagerung der Bildpositionen zu erlauben.

Die grobe, von Hand eingestellte Lagekorrektur wurde mit dem Ziel durchgeführt, das Bild der CCD-Kamera und das gespeicherte Bild annähernd gleich auszurichten. Die Feinjustierung der Position (Schaltfläche „*Refine*“) erfolgte anschließend über ein in Abschnitt II.3.3.2 beschriebenes Verfahren. Hierbei wurden die zwei Bilder übereinander gelegt und deren Koordinaten miteinander verglichen. Die errechneten Verschiebungsvektoren in x- und y-Richtung wurden an die Mikroskopsteuerung weitergeleitet und dadurch die Position des Mikroskopisches verbessert.

Durch die wie beschrieben induzierte Korrekturbewegung des Tisches gelang bei mehrfachem Durchlaufen dieses Prozesses eine Genauigkeit der (Re-) Positionierung in der Größenordnung eines Pixels. Allerdings gelang die Optimierung der Tischposition mittels der Bildüberlagerung weniger gut bei Aufnahmen, in denen sehr viele Zellen abgebildet waren, die Zellen unscharf fotografiert worden waren oder bei denen aus präparatorischen Gründen die Kerne vom umgebenden Zytoplasma nur schwer abzugrenzen waren. Hier musste die Korrektur der Tischposition manuell anhand der sichtbaren Bilddifferenzen bis zu einer subjektiv zufriedenstellenden Genauigkeit vorgenommen werden.

Das System errechnete nach jeder Repositionierung aus der Differenz von Soll- und Ist-Position (Soll: Position aus erster Färbung, Ist: Position des Tisches nach Feinjustage) einen **Translationsvektor**. Dieser, für jede Aufnahme einzeln errechnete, Vektor war als X-Y-Punktwolkendiagramm auf der Benutzeroberfläche sichtbar. Mit Hilfe des gespeicherten Vektors des ersten in der neuen Färbung aufgenommenen Bildes konnten die nachfolgenden Positionen sehr viel treffsicherer angefahren werden. Mit der steigenden Anzahl der durchgeführten Relokalisationen wurde die Differenz zwischen Soll- und Ist-Position fortlaufend geringer.

Die nach der ersten Aufnahme in der neuen Färbung folgenden, vom Computer zu relokalisierenden Positionen wurden nun so exakt angefahren, dass die gesuchten Zellszenen nun auf dem Bild der CCD-Kamera sichtbar waren und nicht mehr mit einem Blick durch das Okular und manuellem Umkreisen der fehlerhaften Position aufgesucht werden mussten.

Auch die **Koregistrierung**, d.h. die pixelgenaue Überlagerung der Bilder in der Referenz- und der aktuellen Färbung, wurde im Verlauf der Messungen robuster und genauer. Bis auf wenige Ausnahmen funktionierte der Algorithmus fehlerlos. Allerdings war eine Abhängigkeit zwischen der Farbintensität der Zellaufnahmen und der Korrektheit der Koregistrierung festzustellen. Fehler traten dann auf, wenn die Kernkonturen wegen mangelnder Farbkontraste kaum erkennbar waren. Grundsätzlich gelang die pixelgenaue Überlagerung der Bilder, wurde aber wegen des erhöhten Zeitaufwandes (etwa 5sec pro Bild) kaum angewendet.

1.3 Segmentierung

Eine mehrstündige *vollautomatische Vorsegmentierung* wurde wegen des hohen Farbkontrastes an den Zellkernen der Aufnahmen in der Feulgenfärbung vorgenommen. Die anfangs allein auf einem interaktiven *Wasserscheidenalgorithmus* basierenden Berechnungen resultierten in der Darstellung, bei der die Zellkerne in sehr viele Regionen unterteilt waren. Anfangs wurden in einem 1,5stündigen Prozess vom Computer für jedes Bild Wasserscheiden berechnet, welche die identifizierten Zellkerne in viele Regionen unterteilten. Dabei war die Größenbestimmung und *Einteilung der Regionen* noch sehr grob, so dass zum Teil Randbezirke einzelner Kerne gar nicht als Region erfasst wurden oder die Wasserscheide ein die Kernmembran überschreitendes Areal miteinbezog. Zudem wurden bei der Selektion der für die spätere DNA-Messung relevanten Regionen (durch Anklicken) auch Areale markiert, die über die Kernbegrenzung hinausgingen.

Auch die nachfolgende, auf dem Algorithmus des **Regionenwachstums** basierende Kerndetektion arbeitete anfangs noch sehr ungenau (zu groß oder zu klein gezogene Umrisslinien), so dass sehr viele Konturen interaktiv am Monitor verworfen oder verfeinert werden mussten.

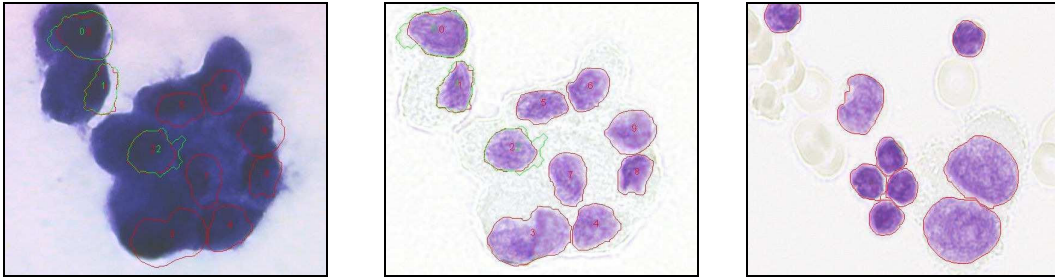


Abb.III.3: Feulgen-Färbung – Variationen der Anfärbbarkeit der Zellen

Zum Teil wurden auch Strukturen im Zytoplasma oder dicht gelagerte Kerngruppierungen zusammen als eine Kontur erkannt. Die Korrektheit der Masken musste daher bei allen Präparaten überprüft werden. Besonders bei Proben, in denen die Kern-Zytoplasma-Demarkation unscharf war, zeigte die Kerndetektion mangelhafte Umrisslinien an. Durch die insuffizienten Konturen wurde die DNA-Messung der betroffenen Proben ungenau, da die integrierte optische Dichte zu einer nur unzureichend genau detektierten Kernfläche in Beziehung gesetzt werden musste.

Es war möglich, Messmasken mittels des **Wasserscheidenalgorithmus** (s. Abschnitt II .3.3.3) subjektiv nachzubessern. Dabei konnten vom Computer vorberechnete Regionen interaktiv selektiert und zu der bereits detektierten Kernkontur hinzugefügt oder aus ihr herausgelöscht werden. Um eine bessere und detailliertere visuelle Erkennbarkeit der Kernkonturen zu erreichen, war es möglich, sich die Konturen auch in der morphologischen MGG-Färbung anzeigen zu lassen. Dies erleichterte die exakte manuelle Modifikation der Umrisse.

Zu Anfang dauerte die Segmentierung aufgrund der aufwendigen Nachbesserung der ungenauen Konturvorschläge aus der automatischen Vorsegmentierung ungefähr zwei Stunden pro Präparat. Die Segmentierung der Kernkonturen besserte sich aber im Laufe der Messungen aufgrund einer nachgebesserten leistungsfähigeren Bildverarbeitungssoftware, so dass immer weniger Kernumrisse manuell angepasst werden mussten und immer mehr dicht zusammengelagerte Kerne automatisch voneinander getrennt werden konnten. Ungenau detektierte Kernumrandungen konnten weiterhin mithilfe des Wasserscheidenalgorithmus manuell korrigiert werden. Die Verbesserungen in der automatischen Zellkerndetektion bewirkten eine Reduktion des Zeitaufwands für

diesen Arbeitsschritt auf etwa 45 Minuten pro Präparat. Zudem konnte durch den Fortschritt in der *Erkennungsgenauigkeit* eine Ursache für eine ungenaue IOD- bzw. DNA-Messung minimiert werden. Der aktuelle Entwicklungsstand des Segmentierungs-Algorithmus weist eine so große Präzision auf, dass manuelle Nachbesserungen nur in den seltensten Fällen erforderlich sind.

1.4 Klassifikation

Die manuelle Klassifikation der vermessenen Kerne in verschiedene Zelltypen wurde subjektiv über eine Benutzeroberfläche vorgenommen. Aus einer vorgegebenen Liste konnte ein Zelltyp (Mesothelzelle, Lymphozyt, Granulozyt, Makrophage) ausgewählt und durch einen Doppelklick mit der Maus der entsprechenden Kern-Kontur zugeordnet werden.

Für die DNA-Messung wurden die Zellen zusätzlich in Mess- (Mesothel- bzw. Mesotheliom- bzw. Karzinomzelle) oder Referenzzellen (Lymphozyt oder Granulozyt) eingeteilt. Hierbei war es ebenfalls möglich, jederzeit dieselben Zellen auch in den Aufnahmen der anderen Färbungen zu betrachten und somit in den visuellen Zuordnungsprozess einzubeziehen.

2 Benutzeroberfläche, Benutzerführung, Visualisierung

und Navigation

Die *Benutzeroberfläche und Benutzerführung* waren wie in Kapitel II.3.2.2 beschrieben gestaltet. Für den Anwender stellten sie sich als hilfreich und benutzerfreundlich dar. Durch eine *übersichtliche Anordnung* der verschiedenen Schaltflächen war das Erlernen der Bedienung einfach und schnell möglich.

Die Darstellung der Bilddaten aus den verschiedenen Färbungen in einer tabellarischen *Bildergalerie* erleichterte die schnelle Durchsicht der Präparate und

ermöglichte die Identifikation von Färbeartefakten. Die einzelnen Bilder konnten angeklickt und dann vergrößert dargestellt werden, so dass *Details der Zellstrukturen* besser erkennbar waren. Zudem konnte anschließend diese vergrößerte Aufnahme nacheinander in den verschiedenen Färbungen angesehen werden. Diese Option erleichterte beispielsweise das visuelle Erkennen der Kerngrenzen und die manuelle Korrektur der automatisch detektierten Segmente (Vergleich zwischen Feulgen- und MGG-Aufnahme). Zudem wurde die Unterscheidung zwischen einem Cluster (im Nukleolus gelegen) und einer Ansammlung von eigentlich verbindungslosen Satelliten (außerhalb der Nukleolen gelegen) erleichtert (Vergleich AgNOR- mit Feulgenaufnahme). So konnten die für die verschiedenen Färbungen *spezifischen Darstellungen* der Morphologie einzelner Zellstrukturen optimal zur Ergänzung gebracht werden.

Die *Visualisierung* der Ergebnisse aus den einzelnen Arbeitsschritten konnte noch nicht komprimiert wie in Abbildung III.4 dargestellt werden. Zum Zeitpunkt der Messungen erfolgte die Veranschaulichung der gesammelten Zellinformationen wie in Abb. III.4.

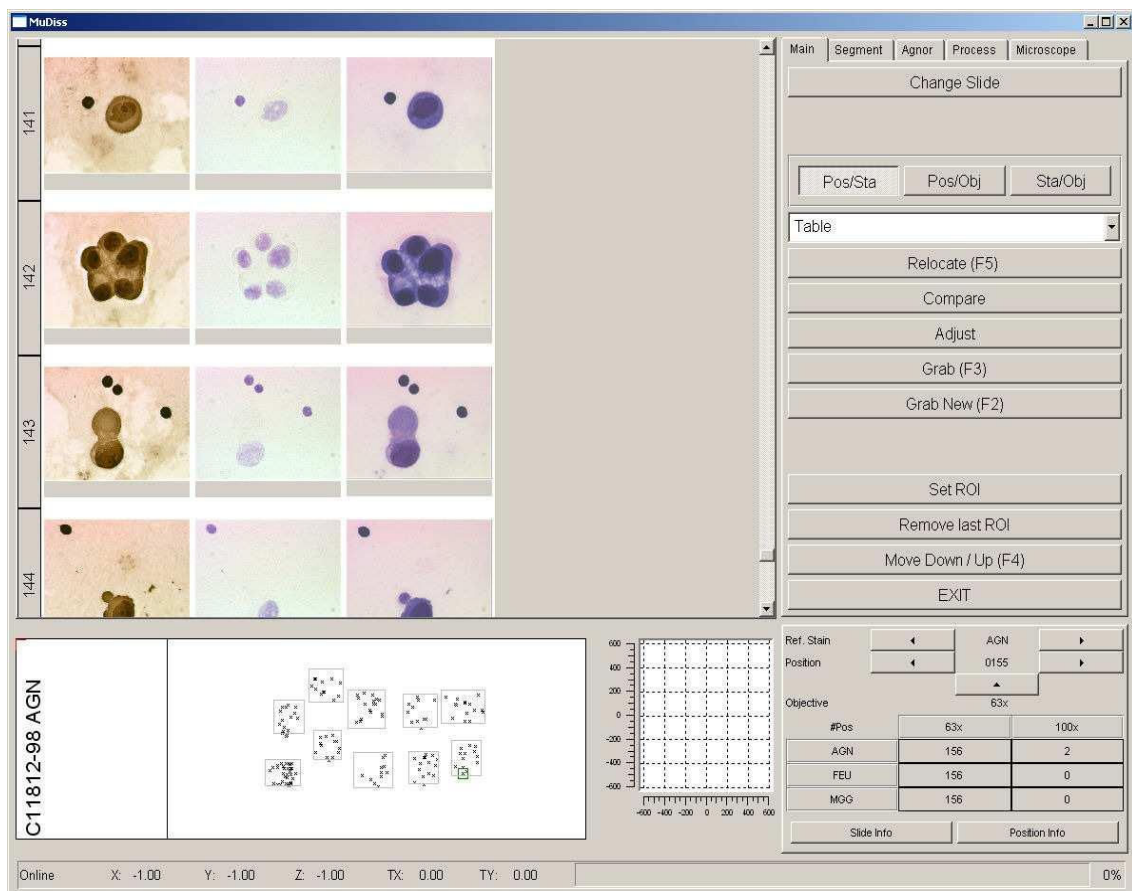


Abb. III.4: Visualisierung der Ergebnisse (Screenshot): alle Färbungen und Zellpositionen

Die *Navigation* zwischen den verschiedenen Ansichten und Färbungen gelang reibungslos. Erforderliche Informationen konnten problemlos aufgefunden werden. Das Wechseln zwischen den Registerkarten, die jeweils einen der Arbeitsschritte und dessen Ergebnisse übersichtlich darstellten, gestattete einen schnellen Überblick.

3 Treffsicherheit der konventionellen morphologischen Zytologie

Es wurden 27 Pleuraergüsse und 8 Aszites-Flüssigkeiten untersucht.

Von den 27 ausgewerteten *Pleuraergüssen* lag die Rate *Tumorzell-negativ* eingestufte Fälle bei 37 % (10). Kein Fall wurde aufgrund der morphologischen Durchsicht als zweifelhaft bezüglich des Vorliegens von Tumorzellen bewertet. Ein Pleuraerguß (3,7%) wurde als dringend verdächtig für das Vorhandensein von neoplastischen Zellen eingeordnet. Somit lag die Rate zweifelhafter oder verdächtiger Ergussproben bei insgesamt 3,7% (1). 16 Proben (59,3%) wurden anhand morphologischer Kriterien als *Tumorzell-positiv* diagnostiziert.

Bei den 8 untersuchten *Aszites-Proben* wurde kein Fall als *Tumorzell-negativ* bewertet. Eine Probe wurde als zweifelhaft für das Vorhandensein von neoplastischen Zellen beurteilt (12,5%). Drei Proben (37,5%) wurden als dringend verdächtig für das Vorliegen von Tumorzellen eingestuft. Insgesamt konnten also fünf der 35 Proben (14,3%) anhand von morphologischen Kriterien nicht eindeutig bezüglich der Dignität beurteilt werden. Vier Proben (50%) wurden als Tumorzell-positiv eingestuft.

Die bei den einsendenden Kliniken eingesehenen Krankengeschichten zeigten, dass in 97,1% aller Fälle (unzweifelhafte, dringend verdächtige und zweifelhafte) die klinische oder histopathologische Diagnose mit der konventionellen Ergusszytologie übereinstimmte; damit lag die *Richtig-positiv-Rate* bei 97,1%. Die morphologisch gestellte Diagnose der Tumorzellfreiheit entsprach zu 90,9% (10 von 11 Fällen)

derjenigen, die aufgrund klinischer oder histopathologischer Daten gestellt wurde (*Richtig-negativ-Rate* 90,9%). Bei einem Fall, in dem es zytologisch einen geringfügigen Anhalt für das Vorliegen von Tumorzellen gab (zweifelhaft, nur wenige atypische Zellen detektiert), stellte sich im Follow-up doch ein Tumor dar (*Falsch-negativ-Rate* = 2,86%).

In keiner der Proben wurden im Erguss scheinbar atypische Zellen detektiert, deren Malignität allerdings aufgrund des Follow-ups verworfen werden konnte (*Falsch-positiv-Rate* = 0%). Die Sensitivität der ergusszytologischen Diagnostik beträgt somit 97,14% , wenn zweifelhafte oder negative zytologische Diagnosen bei der Berechnung mit in die Gesamtzahl der Tumorzell-positiven Diagnosen miteinbezogen werden wie bei Spriggs und Boddington (1989). Werden diese Fälle, gemäß der oben genannten Autoren, ebenfalls mit in die Gesamtzahl der Tumorzell-freien Proben einbezogen, ergibt sich für die Spezifität ein Wert von 100 %.

4 DNA-Ergebnisse

4.1 Qualitätssicherung

Im Zuge der Qualitätssicherung und Validierung des Systems wurden DNA-Messungen an *Rattenhepatozyten* vorgenommen, die die in Anlehnung an die Standards der ESACP gestellten Anforderungen an die Messpräzision in beinahe allen Fällen erfüllten (Giroud et al, 1998). Die AutoCyte Quic-DNA-Messungen erbrachten generell schlechtere Ergebnisse. Die von der ESACP festgelegten Grenzwerte konnten sowohl für den CV der Quotienten der Mittelwerte der Peaks zwischen Referenz- und Analysezellen aller Messungen (<2%) als auch für den CV der Quotienten der Mittelwerte der Peaks zwischen tetraploiden und diploiden Analysezellen aller Messungen (<1%) nicht eingehalten werden.

Messsystem Rattenleber Messung	MMZA									AutoCyte QUIC-DNA		
	A			B			C			A	B	C
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Modalwert 2c	2,03	2,01	2,03	2,03	1,98	2,00	2,02	2,00	2,00	1,95	1,88	1,86
Modalwert 4c	4,02	4,00	4,06	4,04	3,96	4,04	4,03	3,98	3,99	4,15	4,05	3,90
4c / 2c	1,98	1,99	2,00	1,99	2,00	2,02	2,00	1,99	2,00	2,13	2,15	2,10
CV (%) des 2c-peak	2,6	2,02	1,75	3,28	2,93	1,54	2,54	2,68	1,80	2,78	2,97	3,06
CV (%) des 4c-peak	1,64	1,64	1,61	2,74	2,70	1,31	1,92	1,92	1,46	4,04	3,37	2,50
CV (%) der Referenzzellen	1,87	1,63	1,94	2,84	1,85	1,35	2,21	1,48	1,90	3,75	3,25	2,75
CC des 2c-peak	0,05	0,02	0,42	0,05	0,25	0,47	0,21	0,08	0,23	-0,17	0,66	-0,01
CC des 4c-peak	0,10	0,06	0,31	0,19	0,10	0,16	0,10	0,13	0,15			
CC der Referenzzellen	0,05	0,01	0,22	0,03	0,05	0,05	0,00	0,04	0,02	0,29	0,62	0,37

1-A. Metzger, 2-C. Henning, 3-N. Nietzsche

Tabelle III.1 : Ergebnisse der DNA-Messungen der drei Rattenleber-Präparate mit je drei Messungen

Mittelwert aller Rattenhepatozyten-Messungen	Sollwertvorgaben der E S A C P	MMZA - Ergebnisse	AutoCyte Quic-DNA- Ergebnisse
Modalwert 2c (c)	2,00	2,01	1,89
Modalwert 4c (c)	4,00	4,01	4,03
4c / 2c	2,00	1,99	2,13
CV des 2c-Peaks (%)	< 5	2,35	2,94
CV des 4c-Peaks (%)	< 5	1,88	3,30
CV der Referenzzellen (%)	< 5	1,89	3,25
CC des 2c-Peaks	< 0,4	0,21	0,28
CC des 4c-Peaks	< 0,4	0,14	-
CC der Referenzzellen	< 0,4	0,05	0,42
CV aller 2c-Peaks (%)	< 2	0,88	2,49
CV aller 4c-Peaks (%)	< 2	0,82	3,12
CV von 4c / 2c (%)	< 1	0,55	1,18

Tabelle III.2 : Vergleich der DNA-Messungen an drei Rattenleber-Präparaten mit je drei Messungen

5 Konventionelle DNA-Zytometrie

5.1 Treffsicherheit der DNA-Zytometrie

Von den 40 initial ausgewählten Ergussproben konnten 5 nicht DNA-zytometrisch ausgewertet werden. Somit wurden DNA-Messungen lediglich an 35 Proben vorgenommen. Durch eine während des Umfärbeprozesses von MGG nach Feulgen aufgetretene mangelnde Anfärbbarkeit oder Autolyse der Zellen konnte der DNA-Gehalt der Zellkerne nicht bestimmt werden. Auch Präparate, die eine unzureichende Anzahl (<140) verwertbarer Zellkerne aufwiesen, wurden von der DNA-Analyse ausgeschlossen. Somit konnten schließlich 35 Präparate den folgenden Messungen zugeführt werden.

A) Reaktive Ergüsse

Die DNA-Zytometrie der 11 im Follow up als benignen Ursprungs beurteilten Präparate wiesen allesamt DNA-Euploidie als Marker für prospektive Benignität in Mesothelzellen auf. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen aller im Folgenden zitierten Arbeiten.

B) Metastatische Karzinome

69,2% (9) der 13 metastatischen Karzinome erfüllten bei den Messungen am LfB ein oder beide Kriterien für DNA-Aneuploidie. Am IfC lag die Rate aneuploider Karzinoseproben bei 76,9% (10). Das häufigste Kriterium für DNA-Aneuploidie war bei beiden Untersuchern eine atypische DNA-Stammlinie. In Aachen wurden 8 Fälle und in Düsseldorf 6 Fälle mit diesem Merkmal detektiert. Alle dieser Aachener Fälle wiesen gleichzeitig Tumorzellen mit einem DNA-Gehalt von $> 9c$ auf. Auch die in Düsseldorf durchgeführten Messungen zeigten neben dem Merkmal einer atypischen Stammlinie auch das Vorhandensein von neoplastischen Zellen. Während am LfB jedoch nur eine Probe allein aufgrund der Detektion von Tumorzellen als aneuploid erkannt wurde, konnten am IfC vier Proben anhand dieses Kennzeichens als aneuploid erfasst werden.

<u>MMZA-Ergebnisse:</u>		<u>AutoCyteQUIC-DNA-Ergebnisse:</u>	
Aneuploidiekriterien	Fallzahl (n= 13)	Aneuploidiekriterien	Fallzahl (n=13)
<i>Aneuploide STL oder 9cEE</i>	9 (69,2%)	<i>Aneuploide STL oder 9cEE</i>	10 (76,2%)
<i>Aneuploide STL</i>	8 (61,5%)	<i>Aneuploide STL</i>	6 (46,2%)
<i>9cEE</i>	1 (7,7%)	<i>9cEE</i>	4 (30,8%)
<i>Aneuploide STL und 9cEE</i>	8 (61,5%)	<i>Aneuploide STL und 9cEE</i>	6 (46,2%)

Tab. III.3a): DNA-Aneuploidiekriterien bei Karzinosen

<u>MMZA-Ergebnisse:</u>		<u>AutoCyteQUIC-DNA-Ergebnisse:</u>	
Aneuploidiekriterien	Fallzahl (n= 13)	Aneuploidiekriterien	Fallzahl (n= 13)
<i>Aneuploide Stammlinie</i>	8 (61,5%)	<i>Aneuploide Stammlinie</i>	6 (46,2%)
Eine	5 (38,5%)	Eine	0
Zwei	2 (15,4%)	Zwei	4 (30,8%)
Multiple	1 (7,7%)	Multiple	2 (15,4%)
<i>9c Exceeding Events</i>	9 (69,2%)	<i>9c Exceeding Events</i>	10 (76,9%)
1-3	3 (23,1%)	1-3	0
4-10	4 (30,8%)	4-10	5 (38,5%)
>10	2 (15,4%)	>10	5 (38,5%)

Tab. III.3b): DNA-Aneuploidiekriterien bei Karzinosen – Zahl der DNA-Stammlinien

C) Mesotheliome

In 11 Fällen wurde initial aufgrund zytomorphologischer Kriterien die Diagnose eines Mesothelioms gestellt. Darunter waren vier Proben initial lediglich als dringend verdächtig eingeschätzt worden. Mittels Erhebung eines klinischen oder histologischen Follow ups konnten davon alle Diagnosen bestätigt werden. Damit liegt die *Klassifikationsgenauigkeit* der Ergusszytologie für die Diagnose eines Mesothelioms in unserer Arbeit bei 100%, wenn auch die dringend verdächtigen Fälle miteinbezogen werden. In keinem der Proben fand sich im Follow up kein Hinweis auf eine Neoplasie.

Am LfB erfüllten 4 Präparate (36,4%) mindestens eins der beiden Kriterien für DNA-Aneuploidie. Am IfC waren dagegen bei 5 Proben (45,5%) ein oder zwei Merkmale für *Aneuploidie* ausgebildet.

<u>MMZA-Ergebnisse:</u>		<u>AutoCyteQUIC-DNA-Ergebnisse:</u>	
Aneuploidiekriterien	Fallzahl (n= 11)	Aneuploidiekriterien	Fallzahl (n= 11)
<i>Aneuploide STL oder 9cEE</i>	4 (36,4%)	<i>Aneuploide STL oder 9cEE</i>	5 (45,5%)
<i>Aneuploide (atypische) STL</i>	3 (27,3%)	<i>Aneuploide (atypische) STL</i>	1 (9,1%)
<i>9cEE</i>	1 (9,1%)	<i>9cEE</i>	4 (36,4%)
<i>Aneuploide STL und 9cEE</i>	1 (9,1%)	<i>Aneuploide STL und 9cEE</i>	1 (9,1%)

Tab. III.4a): DNA-Aneuploidiekriterien bei Mesotheliomen

<u>MMZA-Ergebnisse:</u>		<u>AutoCyteQUIC-DNA-Ergebnisse:</u>	
Aneuploidiekriterien	Fallzahl (n= 11)	Aneuploidiekriterien	Fallzahl (n= 11)
<i>Aneuploide Stammlinie</i>	3 (27,3%)	<i>Aneuploide Stammlinie</i>	2 (18,2%)
Eine	3 (27,3%)	Eine	1 (9,1%)
Zwei	0	Zwei	1 (9,1%)
Multiple	0	Multiple	0
<i>9c Exceeding Events</i>	2 (18,2%)	<i>9c Exceeding Events</i>	5 (38,5%)
1-3	2 (18,2%)	1-3	5 (38,5%)
4-10	0	4-10	0
>10	0	>10	0

Tab.III.4b): DNA-Aneuploidiekriterien Mesotheliome- Zahl der Stammlinien

	MMZA	MMZA	AutoCyte	AutoCyte
Kriterien für DNA-Aneuploidie	Maligne Mesotheliome	Karzinosen	Maligne Mesotheliome	Karzinosen
Aneuploide Stammlinie	27,27%	64,54%	9,09%	46,15%
Aneuploide Stammlinie + 9cEE	36,36%	69,23%	45,45%	76,92%

Tab. III.5: Identifikation von Neoplasie anhand von Kriterien für DNA-Aneuploidie bei malignen Mesotheliomen und Karzinosen

Das unterschiedliche Auftreten verschiedener *Aspekte der DNA-Aneuploidie* ist in Tabelle III.5 dargestellt. Sie zeigt, wie die Anwendung eines oder beider Kriterien die Prävalenz von DNA-Aneuploidie beeinflusst. Es ist ersichtlich, dass das Auftreten einer abnormen Stammlinie das häufigste Anzeichen für Aneuploidie ist. Das zweithäufigste Merkmal stellen die 9c Exceeding Events dar. Dem folgend ist das Auftreten von zwei Stammlinien. DNA-Histogramme mit multiplen Stammlinien waren in unseren Untersuchungen rar (1Fall, 4,2% am LfB, 2 Fälle , 8,3% am IfC

bezogen auf alle Tumorzell-positiven Präparate). Zusätzlich zeigt die Tabelle, dass die *Detektionsrate* von DNA-Aneuploidie durch die kombinierte Anwendung beider Kriterien deutlich zunimmt: Bei den Karzinose-Proben konnte DNA-Aneuploidie in 61,5% am LfB mittels einer abnormen Stammlinie detektiert werden, in 46,2% am IfC. Bei Einbeziehen des Kriteriums 9cEE konnte die Rate non-euploider und damit malignitätsverdächtiger Fälle auf 69,2% am LfB und 76,9% am IfC gesteigert werden. Bei den durch ein Mesotheliom verursachten Ergüssen gelang eine Erhöhung der DNA-Aneuploidie-Erkennung von 27,3% auf 36,4% am LfB. Am IfC konnte die Rate von 9,1% sogar auf 45,5% gesteigert werden, da hier die DNA-Ploidie-Diagnose in 36,4% auf das Vorliegen von Tumorzellen mit abnorm hohem DNA-Gehalt (9cEE) gestützt war.

Beim Vergleich der Verteilung der DNA-Aneuploidiekriterien in Mesotheliompräparaten mit der in Karzinosepräparaten, zeigen sich im Wesentlichen keine größeren Unterschiede was die Ploidiebeurteilung betrifft. Tendenziell liegt die Rate der Aneuploidie bei Mesotheliomen unter der bei Karzinosen. Die DNA-Stammlinieninterpretation erweist sich in beiden Diagnosegruppen als häufigstes DNA-Aneuploidiemerkmal. Bei den Mesotheliompräparaten ist allerdings in den Düsseldorfer Messungen das Auffinden von 9cEE das entscheidende Merkmal in der Detektion von Aneuploidie im Gegensatz zu den Messungen in Aachen, die hier atypische Stammlinien als häufigstes Merkmal aufweisen. Am LfB wurden in beiden Diagnosegruppen mehr abnorme peaks gemessen als am IfC. Die Hinzunahme der 9cEE bewirkt dennoch ein Ansteigen der Aneuploidierate wie oben beschrieben.

Ein Vergleich der Messwerte und diagnostischen Interpretationen der DNA-Zytometrie sind in Tabelle III.6, III.7 und III.8 aufgeführt. Die in den Tabellen gelb markierten Zellen zeigen die Abweichungen der Ergebnisse der beiden Messsysteme.

Zytologische und histologische Diagnose: reaktiver Erguss	Nr.	Eingangsnnummer	Material	DNA-Interpretation		DNA-Histogrammtyp		Modalwerte (c)		Differenz der Modalwerte	CV (%)		CV-Differenz (%)
				MMZA	Autocyte	MMZA	AutoCyte	MMZA	AutoCyte	$MW_M - MW_A$	MMZA	AutoCyte	$CV_M - CV_A$
								(MW_M)	(MW_A)		(CV_M)	(CV_A)	
	1	10062-02	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	2,01	1,85	0,16	2,73	1,40	1,33
	2	10387-98	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	2,14 X	2,18 4,29	-0,04 X	3,54	2,69	0,85
	3	11033-98	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	1,95	2,16	-0,21	4,46	4,13	0,33
	4	2080-03	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	2,18	2,05	0,13	1,43	2,71	-1,28
	5	5867-99	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	2,06	2,16	-0,10	3,85	2,69	1,16
	6	8163-98	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	1,91	2,19	-0,28	4,43	2,31	2,12
	7	9114-98	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	2,09	2,11	-0,02	2,57	1,63	0,94
	8	9666-98	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	1,85	2,08	-0,23	4,54	2,26	2,28
	9	11163-98	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	2,01	1,85	0,16	2,73	1,40	1,33
	10	1614-03	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	2,00	2,05	-0,05	3,02	2,18	0,84
	11	9684-98	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	2,13	2,14	-0,01	2,56	2,51	0,05

Tab. III.6: Vergleich der Messwerte und diagnostischen Interpretationen der DNA-Zytometrie an 11 verschiedenen, Tumorzell-freien Pleuraerguß-Sedimenten m AutoCyte QUIC-DNA-System und am MMZA-System

Zytologische und histologische Diagnose: Karzinose	Nr.	Eingangsnnummer	Material	DNA-Interpretation		DNA-Histogrammtyp		Modalwerte (c)		Differenz der Modalwerte	CV (%)		CV-Differenz (%)
				MMZA	AutoCyte	MMZA	AutoCyte	MMZA	AutoCyte	MW _M - MW _A	MMZA	AutoCyte	CV _M - CV _A
								(MW _M)	(MW _A)		(CV _M)	(CV _A)	
	1	106-03	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	2,01	1,98	0,03	2,02	2,10	-0,08
	2	604-03	Aszites	aneuploid: STL + >9c	aneuploid: >9c	x-ploid/hyperdiploid	peridiploid	2,23 X	2,14 4,25	0,09 X	2,63	2,54	0,09
	3	7655-99	Pleura	aneuploid: STL + >9c	aneuploid: STL + >9c	multiploid	multiploid	2,01 3,30 6,50 X	1,99 X 5,94 11,91	0,02 X 0,56 X	2,36	2,32	0,04
	4	8337-02	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	2,01 4,06	2,17 4,21	-0,16 -0,15	2,30	2,63	-0,33
	5	8742-02	Pleura	aneuploid: STL + >9c	aneuploid: STL + >9c	x-ploid/5,77ploid	x-ploid/5,26ploid	5,77 11,48	5,26 10,23	0,51 1,25	6,34	2,74	2,60
	6	10193-98	Aszites	euploid	aneuploid: >9c	peridiploid	peritetraploid	2,03 X	2,03 4,04	0,00 X	2,78	2,83	-0,05
	7	11812-98	Pleura	aneuploid: STL + >9c	aneuploid: STL + >9c	x-ploid / hypotriploid	x-ploid / hypertriploid	2,84 X	3,10 5,94	-0,26 X	5,81	2,02	3,79
	8	12807-99	Aszites	aneuploid: STL + >9c	aneuploid: STL + >9c	x-ploid / 2,77-ploid	x-ploid/5,58ploid	2,77 X	3,08 5,58	-0,31 X	4,52	2,25	2,27
	9	13061-99	Pleura	aneuploid: STL + >9c	aneuploid: STL + >9c	x-ploid/1,66ploid	multiploid	1,66 3,20 X X	X 3,45 6,76 12,92	X -0,25 X X	4,71	2,92	1,79
	10	13207-99	Pleura	aneuploid: >9c	aneuploid: >9c	peridiploid	peritetraploid	2,13 X X	1,99 4,24 8,13	0,14 X X	2,46	1,53	0,93
	11	13477-99	Pleura	aneuploid: STL + >9c	aneuploid: >9c	x-ploid / hypertetraploid	peritetraploid	2,11 4,49 X	X 4,21 7,62	X -0,28 X	3,30	1,58	1,72
	12	14899-98	Pleura	aneuploid: STL + >9c	aneuploid: STL + >9c	x-ploid / 2,85-ploid	x-ploid/2,98-ploid	2,85 X	2,98 5,79	-0,13 X	4,48	2,39	2,09
	13	1040-03	Aszites	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	2,14	2,06	0,08	2,27	2,37	-0,10

ab. III.7: Vergleich der Messwerte und diagnostischen Interpretationen der DNA-Zytometrie an 13 verschiedenen, Tumorzell-haltigen (metastatische Zellen) Pleuraermenten und Aszites-Flüssigkeiten am AutoCyte QUIC-DNA-System und am MMZA-System

Zytologische und histologische Diagnose: Mesotheliom	Nr.	Eingangsnnummer	Material	DNA-Interpretation		DNA-Histogrammtyp		Modalwerte (c)		Differenz der Modalwerte	CV (%)		CV-Differenz (%)
				MMZA	AutoCyte	MMZA	AutoCyte	MMZA	AutoCyte		MMZA	AutoCyte	
								(MW _M)	(MW _A)	MW _M - MW _A	(CV _M)	(CV _A)	CV _M - CV _A
	1	1409-00	Pleura	aneuploid: >9c	aneuploid: >9c	peridiploid	peritetraploid	2,07 X	2,02 4,23	0,05 X	2,80	2,82	-0,02
	2	1489-99	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	1,87	2,01	-0,14	3,98	2,62	1,36
	3	3236-01	Aszites	aneuploid: STL	aneuploid: STL + >9c	x-ploid / hyperdiploid	x-ploid / hyperdiploid	2,28	2,34	-0,06	3,80	2,51	1,29
	4	6080-99	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	1,98 X	1,84 3,62	0,14 X	3,76	2,82	0,94
	5	9047-00	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peritetraploid	1,98 3,78	2,06 3,85	-0,08 -0,07	2,61	1,44	1,17
	6	9065-00	Pleura	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	1,96	2,03	-0,07	3,45	1,93	1,52
	7	9913-00	Pleura	euploid	aneuploid: >9c	peridiploid	peridiploid	2,11 X	2,10 4,01	0,01 X	2,42	1,58	0,84
	8	10095-99	Pleura	euploid	aneuploid: >9c	peridiploid	peridiploid	2,09	2,11	-0,02	2,87	2,97	-0,10
	9	10161A-01	Aszites	aneuploid: STL + >9c	aneuploid: >9c	x-ploid / hypertriploid	peritetraploid	2,09 3,46	X 3,61	X -0,15	4,02	1,77	2,25
	10	11270-00	Aszites	aneuploid: STL	aneuploid: STL	x-ploid/1,66- ploid	x-ploid/3,09- ploid	1,66 X	1,59 3,09	0,06 X	2,85	2,19	0,66
	11	10482-01	Aszites	euploid	euploid	peridiploid	peridiploid	2,08	2,17	-0,09	4,28	1,64	2,64
Mittelwert aller Fälle ± Standardabweichung										-0,02±0,19	3,39+/-1,09	2,30+/-0,58	1,06+/-1,06
Mittelwert aller Tumorzell-positiven + zweifelhaften Fälle(Mesotheliome) ± Standardabweichung										-0,01±0,21	3,45 ±1,15	2,27±0,49	1,14±1,10
Mittelwert aller Tumorzell-negativen, euploiden Fälle ± Standardabweichung										-0,04±0,15	3,26±0,99	2,36±0,77	0,90±0,98

ab III.8: Vergleich der Messwerte und diagnostischen Interpretationen der DNA-Zytometrie an 11 verschiedenen, Tumorzell-haltigen (Zellen maligner Mesothelie raerguß-Sedimenten und Aszites-Flüssigkeiten am AutoCyte QUIC-DNA-System und am MMZA-System

5.2 Histogrammtypisierung und –auswertung

Die DNA-Histogramme des MMZA- und des AutoCyteQuic-DNA-Systems werden exemplarisch für den Fall eines Mesothelioms, einer Karzinose und eines reaktiven Ergusses gegenübergestellt. Das AutoCyteQuic-DNA-Histogramm enthält im Gegensatz zu dem der MMZA zusätzlich zu den Analysezellen noch die Referenzzellen (Lymphozyten), die als blaue Balken dargestellt sind. Im AutoCyteQuic-DNA-Histogramm sind die Analysezellen gelb markiert, die die Stammlinie bilden.

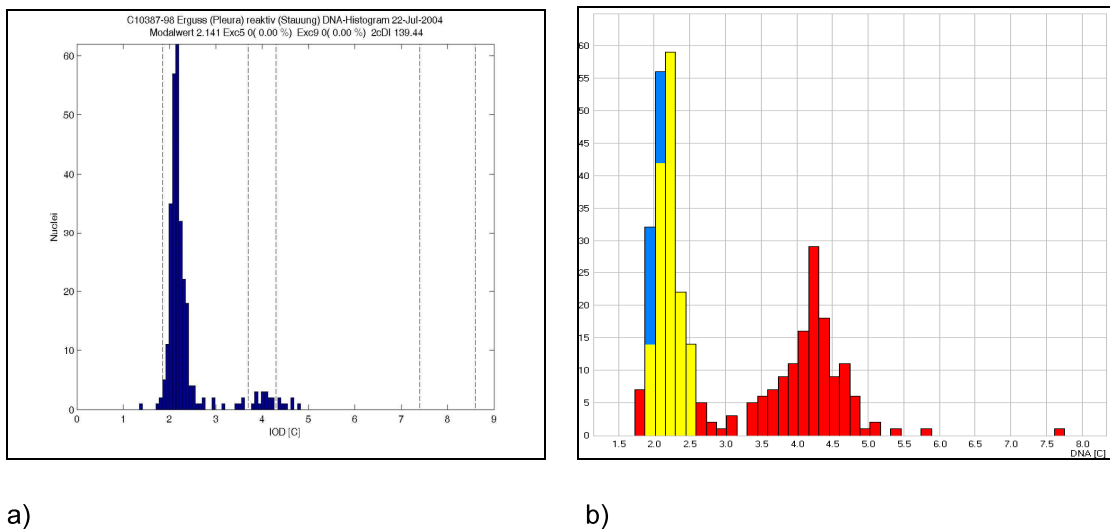


Abb. III.5: Reaktiver Erguss: DNA-Histogramm MMZA (a) und AutoCyte (b)

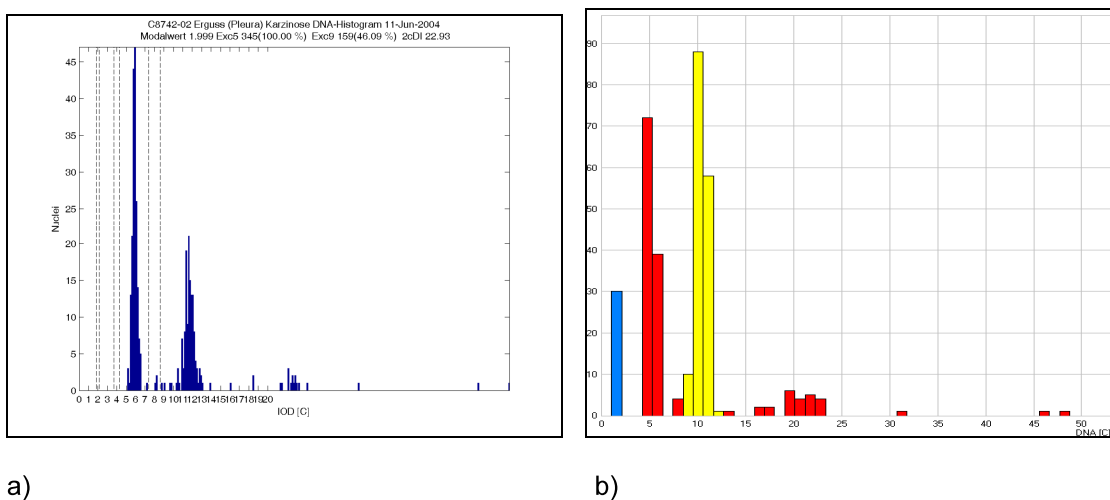


Abbildung III.6: Karzinose: DNA-Histogramm MMZA (a) und AutoCyte (b)

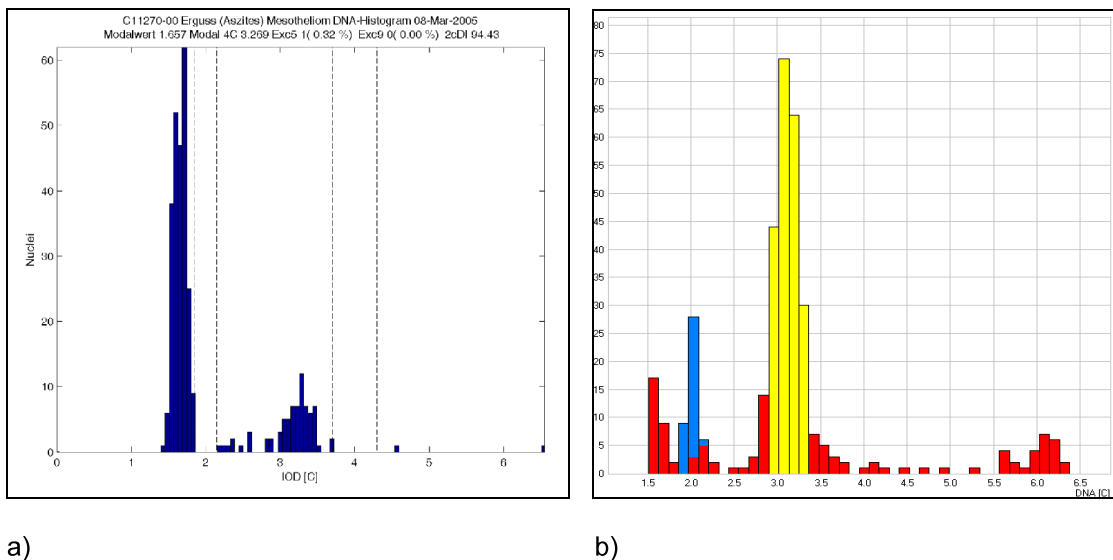


Abbildung III.7: Mesotheliom: DNA-Histogramm MMZA (a) und AutoCyte (b)

Die Histogramme wurden auf das Vorliegen von mindestens einem Kriterium für DNA-Aneuploidie untersucht. Als Merkmale galten:

- Aneuploide Stammlinien (Böcking et al., 1993)
- Vorhandensein von 9c exceeding events (9cEE)

Nachstehend erfolgt für die einzelnen Diagnosegruppen ein Vergleich zwischen den Ergebnissen des MMZA-Systems sowie des AutoCyteQUIC-DNA-Systems bezüglich

- a) der Anzahl der gemessenen DNA-Stammlinien
- b) dem Histogrammtyp und
- c) der DNA-Interpretation bzw. Ploidie.

A) Reaktive Ergüsse

In der Gruppe der *reaktiven Ergüsse* wiesen die untersuchten Proben bis auf eine Ausnahme durchweg nur eine DNA-Stammlinie im Bereich zwischen 1,80 und 2,20c auf. Dementsprechend wurden alle als *peridiploides DNA-Histogramm* beschrieben. Dabei gab es keine Abweichungen zwischen der Aachener und der Düsseldorfer Beurteilung. Bei Präparat C10387-98 wurde lediglich am IfC eine zusätzliche pentaploide Stammlinie gemessen, die am LfB nicht erscheint.

Die Histogramme der zytologisch *Tumorzell-freien* Fälle (benigne, entzündlich oder reaktiv-aktiviert) zeigten keines der oben angegebenen Kriterien für DNA-Aneuploidie. Daher konnten diese Fälle ausnahmslos als *DNA-euploid* interpretiert werden. Folglich liegt die Prävalenz des Markers DNA-Euploidie bei benignen, reaktiv veränderten Ergussproben gemäß den in der Literatur beschriebenen Werten bei 100%.

10 DNA-Histogramme (90,9 %) wiesen nur eine *Stammlinie* auf, wobei diese am LfB zwischen 1,85c und 2,18c lag (Mittelwert 2,03, Median 2,01c) und am IfC zwischen 1,85c und 2,19c (Mittelwert 2,07, Median 2,11c). Bei Probe C10387-98 (siehe Abb. III.8) wurde in Düsseldorf eine weitere DNA-Stammlinie bestimmt, wohingegen in Aachen keine zweite vorkam. In 4 Proben (36,4%) am LfB und 7 Proben (63,6%) am IfC lagen Zellen mit einem DNA-Gehalt $>5c$ im Rahmen einer euploiden Polyploidisierung vor (Biesterfeld et al., 1994). In insgesamt 11 Fällen wurden Zellen mit $>5c$ erfasst (4 am LfB (1-7, MW 3,5), 7 am IfC(1-6, MW 2,86)), wobei in keinem einzigen Fall ein DNA-Gehalt von $>9c$ gemessen wurde. Zellen mit einem DNA-Gehalt $>9c$ wurden in keiner reaktiven Probe gefunden. Somit wurden alle reaktiven Ergussproben in der DNA-Zytometrie richtig negativ befundet.

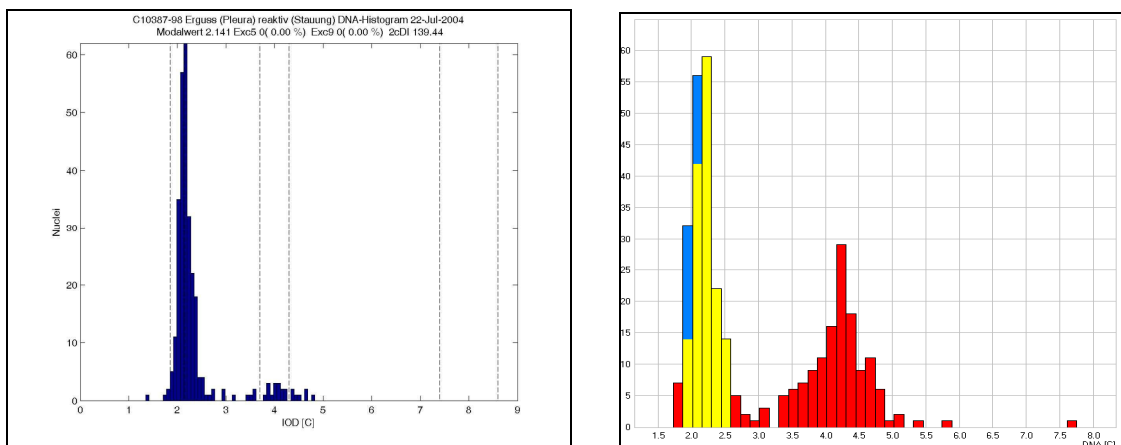


Abb. III.8: Präparat C10387-98 (reaktiver Erguss) MMZA (a) und AutoCyte (b)

B) Metastatische Karzinome

Beim Vergleich der *Anzahl der Stammlinien* gab es bei den *Karzinose-Präparaten* Abweichungen in acht Fällen. Dabei wurde in zwei Fällen in Düsseldorf eine zweite Stammlinie detektiert, die in den Aachener Histogrammen nicht hervortritt, da die

entsprechende Zellpopulation nicht oder nur in geringem Maße in die Messung miteinbezogen wurde. Mittels MMZA wurde in fünf Fällen eine einzelne atypische Stammlinie gemessen, die in den AutoCyte-Histogrammen nicht erfasst wird. Einmal zeigt die Düsseldorfer Beurteilung einen multiploiden Histogrammtyp, während in der Aachener Messung nur zwei atypische Stammlinienpopulationen aufgezeichnet wurden und so ein multiploides Muster erzeugen.

Es gab nur einen Fall mit differenter *DNA-Dignitäts-Diagnose* (C10193-98). Die Histogramm-Analyse erbrachte jedoch in sechs der 13 Fälle Abweichungen bezüglich des *Histogramm-Typs*. Dabei fehlten entweder bei den MMZA-Histogrammen Stammlinien mit höheren c-Werten (4 Fälle) (siehe Abb. III.9), oder bei der AutoCyte-Quic-DNA-Untersuchung wurden für eine repräsentative Stammlinienpopulation zu wenige diploide Zellen berücksichtigt (1Fall). Außerdem beeinflussten Abweichungen in der Stammlinienlage (inner- oder außerhalb der Euploidie-Grenzwerte um 2c und 4c) die Beurteilung der Ploidie und definitionsgemäß demzufolge auch die Beschreibung des Histogrammtyps (2Fälle). Die sechs übereinstimmenden Fälle zeigten ein peridiploides (2), multiploides (1) oder x-ploides (2) Muster.

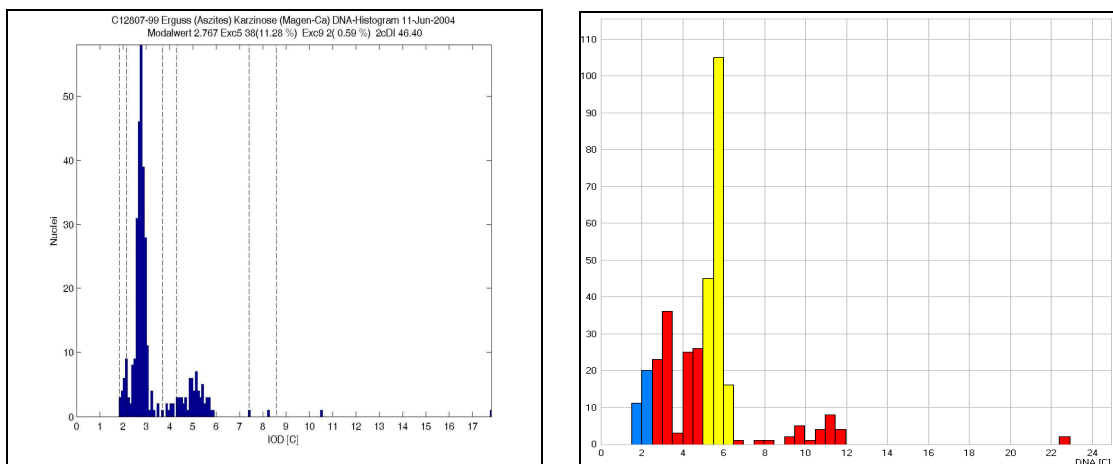


Abb. III.9: Präparat C12807-99 (Karzinose) MMZA (a) und AutoCyte (b)

Bei den Karzinosen lag die Prävalenz von DNA-Aneuploidie bei 69,2% am LfB und 76,9% am IfC. Dabei war das Kriterium 9cEE das häufigste Merkmal (9 Fälle am LfB, 10 am IfC), gefolgt von einer abnormen Stammlinie (8 Fälle am LfB, 6 am IfC). In einem Fall wurde am LfB lediglich ein Kriterium für DNA-Aneuploidie erfüllt (9cEE), in vier Fällen am IfC. Es gab 9 Präparate in Aachen und 6 Präparate in Düsseldorf, die beide Kriterien erfüllten.

C) Mesotheliome

Beim Vergleich der durch *Mesotheliome* verursachten Ergüsse stimmten in fünf Fällen (45,5%) die Histogramme am LfB und IfC im Hinblick auf die Anzahl mit je einer *Stammlinie* überein. In einem Fall (C9047-00) konnten in beiden Messungen zwei Stammlinien abgegrenzt werden. Bei Probe C10161A-01 wurden in Aachen zwei, in Düsseldorf lediglich eine Stammlinie detektiert. In vier Fällen konnte dagegen nur am IfC eine zweite Stammlinie nachgewiesen werden.

Bezüglich des *DNA-Histogrammtyps* zeigten sich Abweichungen in vier Fällen. In einem Fall wurde nur am IfC eine zweite größere Stammlinie detektiert: C1409-00 wurde am LfB als peridiplod begutachtet, am IfC dagegen als peritetraploid (siehe Abb. III.10). Bezüglich der *Stamlinienploidie* gab es eine Ungleichheit: C10161A-01 wurde mittels MMZA als x-ploid bzw hypertriploid diagnostiziert, während sich mittels AutoCyte QUIC-DNA ein peritetraploides DNA-Muster ermitteln ließ (siehe Abb. III.10). Zu den bei beiden Untersuchungen gefundenen Tumorzellen (9cEE) wurde am LfB bei Präparat C10161A-01 zusätzlich eine atypische Stammlinie bei 3,46c detektiert wurde, welche am IfC gerade noch innerhalb der Grenzwerte für Euploidie lag (3,61c). Da der in Düsseldorf ermittelte CV bei dieser Probe besser war als der in Aachen errechnete, ist davon auszugehen, dass die die Stammlinie erzeugende Zellpopulation tatsächlich einen noch euploiden DNA-Gehalt aufweist. Bei zwei Proben (C9047-00, C11270-00) ergibt sich die differente Histogrammtypisierung aus der Tatsache, dass am LfB die Stammlinie mit dem niedrigeren c-Wert die größere der beiden detektierten ist.

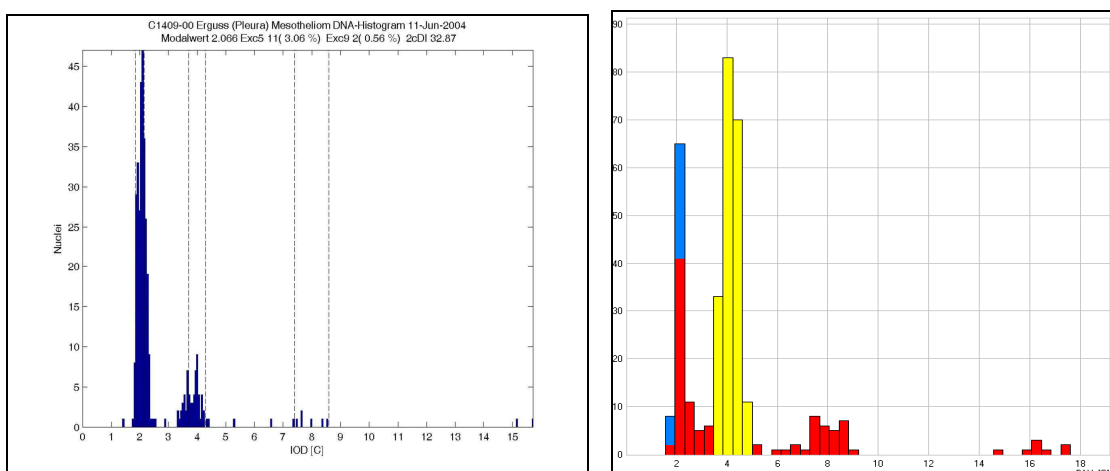


Abb. III.10 : Präparat C1409-00 (Mesotheliom) MMZA (a) und AutoCyte (b)

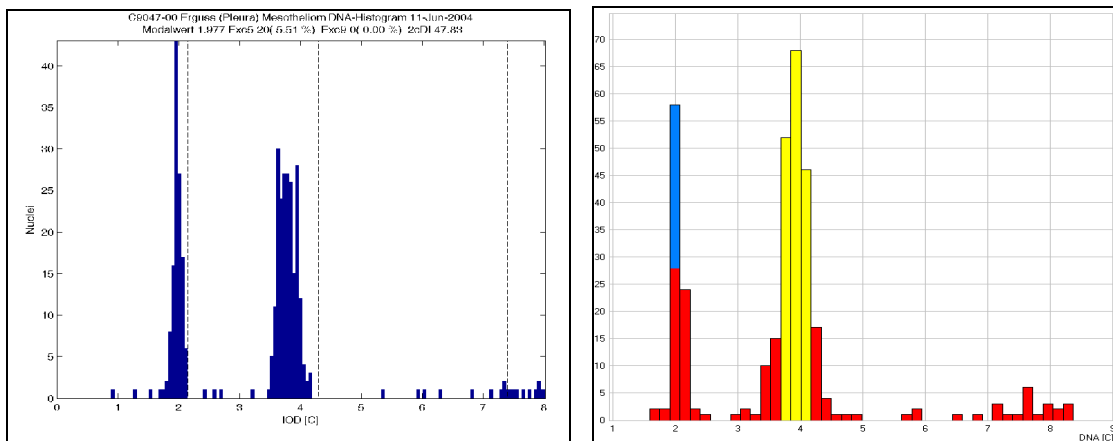


Abbildung III.11: Präparat C9047-00 (Mesotheliom) MMZA (a) und AutoCyte (b)

Mit 36,4% am LfB und 54,5% am IfC war die Rate DNA-aneuploider Histogramme bei den durch ein Mesotheliom hervorgerufenen Ergussproben etwas niedriger als bei den durch metastatische Absiedlungen verursachten Proben. Die am LfB erstellten Histogramme zeigten in drei Fällen eine abnorme Stammlinie und in zwei Fällen 9cEE. Beide Aneuploidiemerkmale wurden in einem Präparat gefunden.

Im Vergleich dazu wurden am IfC häufiger 9cEE (5 Fälle) identifiziert und weniger abnorme Stammlinien (2 Proben). Beide Kennzeichen zugleich sind in einem Fall nachweisbar.

In zwei der vier Fälle, die zytomorphologisch nur als dringend verdächtig für das Vorliegen von Tumorzellen beurteilt werden konnten, wurde aufgrund des jeweils am LfB und IfC aneuploid interpretierten DNA-Histogramms der dringende Malignitätsverdacht bestätigt. Die visuell differentialdiagnostisch in Betracht gezogenen reaktiv veränderten Mesothelzellen konnten DNA-zytometrisch als Tumorzellen identifiziert werden, und es gelang somit eine Reduktion der initial zweifelhaften Fälle um 50%. Alle vier Proben wurden im Follow up als Mesotheliome bestätigt.

Beim *Vergleich der DNA-Stammlinienlagen* lässt sich feststellen, dass die größte Stammlinie bei 91% (LfB) bzw. 54,5% (IfC) der Mesotheliome zwischen 1,80c und 2,20c lag, wohingegen nur 46,2% (LfB) bzw. 30,8% (IfC) der Karzinosen ihre größte Stammlinie in diesem Bereich aufwiesen. Tendenziell befand sich die *größte DNA-Stammlinie* bei diesen metastatisch bedingten Ergüssen bei höheren Werten als bei Mesotheliom-bedingten Proben: Im Mittel lag die Stammlinie der Mesotheliome am

LfB bei 2,02c (SD 0,16) und am IfC bei 2,67c (SD 0,86). Für die Karzinosen ergaben sich folgende Mittelwerte: am LfB 2,60c (SD 1,06), am IfC 3,63c (SD 1,38).

Beim Vergleich der *analogen Stammlinienlagen* ergeben sich folgende Resultate: a) Mesotheliome: am LfB 2,14c (SD 0,46), am IfC 2,17c (SD 0,51); b) Karzinosen: am LfB 2,81c (SD 1,14), am IfC 2,80c (SD 1,03); c) Reaktive: am LfB 2,03c (SD 0,10), am IfC 2,07c (SD 0,12).

Am Lehrstuhl für Bildverarbeitung (nachfolgend LfB abgekürzt) wurden demnach wiederholt mehr Stammlinien identifiziert als am LfB. Am IfC dagegen wiesen die Messungen bei höheren C-Werten gelegene Stammlinien auf. Zudem gab es Fälle, bei denen der 2c-peak in den Messungen vom IfC gar nicht (2 Fälle) oder wesentlich kleiner als der am LfB ausgebildet war.

In der Gegenüberstellung der Aachener mit den Düsseldorfer Ergebnissen bei der DNA-Analyse zeigten sich 3 Fälle (8,6%) mit abweichenden Resultaten bezüglich der *Ploidie*. Darunter waren eine Karzinose und zwei Mesotheliome. Diese Präparate wurden in Düsseldorf als DNA-aneuploid befundet, wohingegen in Aachen keine Kriterien für DNA-Aneuploidie erfüllt waren. In allen Fällen gab am IfC die Detektion von Tumorzellen (9cEE) den Ausschlag für die Diagnosefindung. Zwar wurden die Messzellen am LfB und IfC in den gleichen, im Vorfeld durch einen erfahrenen Zytopathologen markierten Arealen auf dem Objektträger rekrutiert; dennoch gelang es lediglich dem erfahrenen Untersucher (Dr. med. Nguyen) in Düsseldorf diese Tumorzellen aufzuspüren. Durch die Differenzen im diagnostizierten DNA-Ploidiestatus wurde jedoch keine falsch positive Diagnose gestellt.

5.3 Vergleich von Modalwerten und Variationskoeffizienten

Modalwerte

Die Modalwerte der größten DNA-Stammlinie zeigen bei den Tumorzellfreien Präparaten (Reaktiven) keine Differenzen zwischen den Aachener und Düsseldorfer Untersuchungen. Die jeweils größte und bis auf Präparat C 10387-98 einzige DNA-Stammlinie liegt ausnahmslos im peridiploiden Wertebereich.

Die Modalwerte der größten Stammlinie jedes Karzinose-Präparates weichen in 5 Fällen der MMZA-Auswertung von der AutoCyte-Auswertung ab. Dabei liegt in zwei Fällen die größte Stammlinie in Aachen im peridiploiden Bereich, wohingegen diese sich in Düsseldorf im Bereich zwischen 3,60c und 4,40c bewegt. In zwei Fällen liegt die im DNA-Gehalt kleinere, aber höhere Stammlinie nur in Aachen vor. Einmal wurde lediglich in Düsseldorf die größte Stammlinie bei einem höheren c-Wert detektiert.

Bei den Mesotheliom-Ausstrichen gibt es Differenzen bezüglich der Lage der größten Stammlinie in vier Fällen. Sowohl bei C11270-00 als auch bei C1409-00 gibt es nur eine Stammlinie bei der MMZA-Messung, jedoch zwei Stammlinien bei der AutoCyte-Messung. Bei C10161A-01 wurde nur am LfB eine repräsentative peridiploide Stammlinie erfasst. Bei C9047-00 weisen die Histogramme in beiden Untersuchungen je zwei Stammlinien auf, jedoch liegt die größere Stammlinie am LfB bei dem kleineren c-Wert, am IfC bei dem größeren.

Unter Berücksichtigung aller Fälle errechnet sich, dass die DNA-Stammlinienlage im Mittel am IfC um 0,02c höher (SD 0,19) gemessen wurde als am LfB. Bei den Tumorzell-positiven Proben ist die Peaklage in Düsseldorf im Mittel nur um 0,01c höher (SD 0,21) als in Aachen. In den Tumorzell-freien Proben lag die mit AutoCyte ermittelte peridiploide Stammlinie um 0,04c über der mit dem MMZA-System gemessenen. Mit 2,03c (Median 2,01, SD 0,10) ist die Aachener Peaklage näher an dem „Idealwert“ von 2,00c als die Düsseldorfer Lage mit 2,07c (Median 2,11, SD 0,12).

Der Vergleich der Lage der Stammlinien beider Systeme (MMZA und AutoCyte) ist in Abbildung III.12 als Korrelationsdiagramm der entsprechenden Modalwerte dargestellt. Die Korrelation beider Messungen ist demnach hoch ($r = 0,98$).

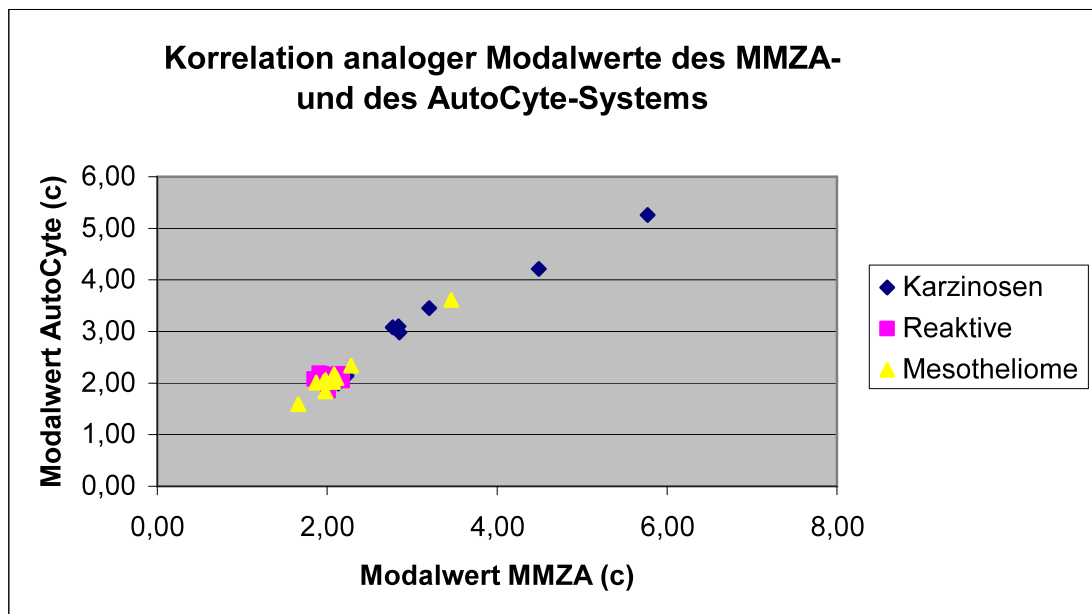


Abb. III.12: Korrelation analoger Stammlinien: gelbe Dreiecke entsprechen Mesotheliomproben, blaue Quadrate Karzinose-Präparaten und rosa Quadrate Tumorzellfreien Präparaten. Die Koordinaten ergeben sich aus den jeweils analogen Modalwerten der DNA-Stammlinien beider Messsysteme (MMZA- und AutoCyte-System)

Variationskoeffizient (CV) der Referenzzellen

Sämtliche CV-Werte der AutoCyte QUIC-DNA-Messung befinden sich unterhalb des von der ESACP (Giroud et al., 1998) geforderten Grenzwertes für den CV von 5%. Bei der Messung mit dem MMZA-System dagegen lagen zwei Karzinose-Proben (5,7%) (C8742-02 mit 6,3%, C11812-98 mit 5,8%) knapp über dem verlangten Grenzwert.

Im Vergleich der Variationskoeffizienten liegen die CV-Werte des MMZA-Systems im Mittel um 1,06% (SD 1,06) höher als die des AutoCyte QUIC-DNA-Systems. Dabei ergibt sich für die Messungen am LfB ein Wert von 3,39+/-1,09% und für die am IfC ein Wert von 2,30+/-0,58%.

Bei den Neoplasie-bedingten Proben zeigte sich eine größere Abweichung im CV-Wert als bei den Ergüssen benignen Ursprungs (CV-Differenz Mesotheliome und Karzinosen 1,14±1,10%, CV-Differenz Tumorzellfreie 0,90±0,98%). Der CV der DNA-Stammlinien in neoplastischen Ergüssen lag in Aachen höher als der in nicht-neoplastischen (3,45 ±1,15% in malignen gegenüber 3,26±0,99% in benignen Proben). In Düsseldorf dagegen war es umgekehrt (2,27±0,49% in malignen gegenüber 2,36±0,77% in benignen Proben).

6 AgNOR-Auswertung

Zum einen fand eine manuelle Auswertung durch visuelle Begutachtung und Zählung mit dem 100x Objektiv statt. Die Auswertung der Silbernitrat gefärbten Proben erfolgte gemäß der Beschreibung in Kapitel II.2.3. Zum anderen erfolgte eine automatische AgNOR-Zählung anhand des in Kapitel II.3.3.6 dargestellten Algorithmus.

6.1 Manuelle AgNOR-Analyse

Aufgrund der oben beschriebenen starken Variation der Färbeintensität konnten nur 21 (60%) der 35 Präparate ausgewertet werden. Von den 11 Tumorzell-freien Proben konnten 9 (81,8%) ausgewertet werden. Bei den Karzinosen lag die Rate auswertbarer Präparate bei 53,9% (7 von 13 Proben) und bei dem Mesotheliomen bei 45,5% (5 von 11 Fällen). Auch war es bei einzelnen Proben nicht möglich, die geforderten 100 Zellen (3 Fälle) auszuwerten, da ein Teil der Präparate eine inhomogene Färbung oder, durch Überalterung der Proben, eine ungleichmäßige Entfärbung bzw. ein Verblässen der AgNORs aufwies. Cluster (homogene schwarzbraune Flecken oder eng gruppierte schwarzbraune Punkte) und Satelliten (örtlich voneinander getrennte schwarzbraune Punkte) wurden daher bei möglichst vielen ebenmäßig gefärbten Zellkernen jeweils separat gezählt und anschließend addiert. Bei Unsicherheit, ob es sich bei zwei oder mehr dicht aneinandergelagerten Punkten um einzelne Satelliten handelt oder aber um ein einzelnes Cluster, konnte durch einen Wechsel in die Feulgen-Ansicht des entsprechenden Bildes geklärt werden. Denn in dieser Ansicht waren die die AgNORs enthaltenden Nukleolen sichtbar.

Tumorzell-freie Ergüsse zeigten generell eine geringere Anzahl an AgNOR-Satelliten (0,70-3,00; MW 1,62; SD 0,75) sowie im Mittel eine geringere Anzahl an Clustern (1,49-2,98; MW 1,99 ; SD 0,48). Die Addition aus Satelliten und Clustern zeigte bei 9 von 10 ausgewerteten Proben (Präp-Nr. C 9684-98 Summe 5,45) eine Summe kleiner als 5,10.

Bei den fünf ausgezählten *Mesotheliomen* färbten sich zwischen 1,22 und 3,90 Cluster (MW 1,99; SD 0,73) sowie zwischen 3,35 und 7,33 Satelliten (MW 4,80; SD 1,60). Die Summe aus beiden ergab Werte zwischen 5,42 und 8,63 (MW 6,79; SD 1,16).

Unter den sieben ausgezählten *Karzinose*-Präparaten schwankte die Zahl der Cluster zwischen 1,87 und 4,15 (MW 2,83; SD 0,97), die der Satelliten zwischen 4,01 und 6,24 (MW 5,16; SD 1,03). Die Summe der beiden ergab Werte zwischen 6,22 und 9,24 (MW 7,99; SD 1,15).

Bei *neoplastischen Zellen* wurden mehr AgNOR-Satelliten und -Cluster angefärbt als bei den Zellen benignen Ursprungs: Karzinosen + Mesotheliome: 2,48 +/- 0,94 Cluster, 5,01 +/- 1,24 Satelliten und 7,49 +/- 1,26 Cluster+Satelliten, Reaktive: 1,99 +/- 0,48 Cluster, 1,62 +/- 0,75 Satelliten und 3,62 +/- 0,95 Cluster+Satelliten.

Es gab größere *Überlappungen* der Wertebereiche für AgNOR-Satelliten und – Cluster von Mesotheliomen und Karzinosen. Zwar zeigten sich bei den Karzinosen durchschnittlich höhere Mittelwerte für die Summe aus Satelliten und Clustern; dennoch ist kein Trennwert ermittelbar, mit Hilfe dessen eine diagnostische Unterscheidung zwischen Mesotheliomen und Karzinosen möglich ist.

Anhand der *Summe* aus Clustern und Satelliten konnten aber Ergussproben benigner Ätiologie nahezu fehlerlos von Proben maligner Genese unterschieden werden, da sich bei einem *Schwellenwert* von 5,10 für die Summe aus Clustern und Satelliten mit einer Ausnahme (C9684-98, reaktiv, C+S=5,45) keine Überschneidungen in diesem Wertebereich feststellen lassen. Infolgedessen konnten 9 von 10 reaktiven Ergüssen bei diesem angesetzten Cut-off-Wert von 5,10 allein durch die AgNOR-Analyse als nicht-maligne eingestuft werden. Somit konnte das zytomorphologisch differentialdiagnostisch mögliche Vorliegen von Tumorzellen eines Mesothelioms nahezu ausgeschlossen werden. Präparat Nr.9684-98 konnte bereits mittels zytomorphologischer Kriterien und durch die Ergebnisse der DNA-Analyse in Aachen und Düsseldorf als reaktiv diagnostiziert werden. Somit ist durch Zusammenschau aller Teilergebnisse der MMZA die korrekte Diagnosestellung auch in diesem Fall gelungen.

Von den vier eingangs in der zytomorphologischen Begutachtung als *dringend verdächtig* für das Vorliegen von Tumorzellen begutachteten Präparaten konnten zwei der AgNOR-Analyse zugeführt werden. In diesen Fällen wurde der Cut-off-Wert für

Benignität von 5,10 überschritten, so dass beide Proben (C10161A-01 und C11270-00) eindeutig als maligne eingestuft werden konnten. Präparat C1040-03, welches anfangs als zytomorphologisch zweifelhaft eingestuft worden war, konnte aufgrund mangelnder Färbequalität keiner AgNOR-Auswertung zugeführt werden. Somit konnte in den auswertbaren zytomorphologisch bezüglich der Dignität nicht eindeutig beurteilbaren Ausstrichen stets die Dignität mittels AgNOR-Analyse korrekt ermittelt werden.

Die allesamt DNA-euploid bewerteten *Tumorzell-freien Proben* konnten durch die AgNOR-Auszählung in Bezug auf ihre Benignität bestätigt werden.

Von den vier in der DNA-Analyse als euploid beurteilten *Karzinosen* konnten in nur einem Präparat die argyrophilen Regionen gezählt werden. Auch hier konnte durch den überschrittenen Schwellenwert von 5,1 prospektive Malignität festgestellt bzw. bestätigt werden.

Von den sieben DNA-euploid bewerteten *Mesotheliomen* konnten nur zwei Proben der AgNOR-Analyse unterzogen werden. Durch Anwendung des Schwellenwertes konnten beide Fälle als malignen Ursprungs eingestuft und somit das Follow up bestätigt werden.

Histologische bzw. klinische Diagnose	Nr.	Eingangsnr.	Anzahl ausgewerteter Zellen		Cluster	Satelliten	Satell.+Cluster	Satell.+Cluster	Satell.+Cluster	Differenz
			manuell	automatisch	(Mittelwert)	(Mittelwert)	(Mittelwert)	(Mittelwert)	(Mittelwert)	automatisch *
					manuell	manuell	manuell	automatisch *	automatisch**	- manuell
reaktive Ergüsse	1	10062-02	keine Daten	7,00	X	X	X	X	2,70	X
	2	10387-98	128,00	242,00	1,87	1,35	3,23	4,20	3,70	0,97
	3	11033-98	98,00	keine Daten	1,49	3,00	4,49	X	X	X
	4	11163-98	115,00	156,00	1,67	0,76	2,43	6,10	5,90	3,67
	5	1614-03	110,00	156,00	2,15	0,70	2,85	3,90	3,80	0,10
	6	2080-03	100,00	116,00	1,57	1,61	3,18	3,30	3,20	0,12
	7	5867-99	keine Daten	keine Daten	X	X	X	X	X	X
	8	8163-98	115,00	161,00	1,67	1,29	2,96	5,60	5,40	2,64
	9	9114-98	171,00	254,00	2,29	1,84	4,13	5,50	5,60	1,37
	10	9666-98	128,00	240,00	2,26	1,60	3,86	5,80	5,50	1,94
	11	9684-98	100,00	188,00	2,98	2,47	5,45	7,00	6,80	1,55
Karzinosen	12	10193-98	102,00	keine Daten	4,15	4,01	8,16	X	X	X
	13	1040-03	keine Daten	keine Daten	X	X	X	X	X	X
	14	106-03	keine Daten	keine Daten	X	X	X	X	X	X
	15	11812-98	138,00	245,00	2,72	4,02	6,75	5,70	4,70	-1,05
	16	12807-99	102,00	153,00	2,03	6,18	8,21	3,90	3,80	-4,31
	17	13061-99	keine Daten	2,00	X	X	X	X	2,50	X
	18	13207-99	keine Daten	keine Daten	X	X	X	X	X	X
	19	13477-99	34,00	102,00	3,97	5,24	9,21	16,50	11,90	7,29
	20	14899-98	104,00	134,00	1,90	6,23	8,13	8,70	8,70	0,57
	21	604-03	106,00	107,00	1,87	4,35	6,22	2,90	2,70	-3,32
	22	7655-99	103,00	131,00	3,17	6,11	9,27	9,70	10,10	0,43
	23	8337-02	keine Daten	keine Daten	X	X	X	X	X	X
	24	8742-02	keine Daten	keine Daten	X	X	X	X	X	X

Histologische bzw. klinische Diagnose	Nr.	Eingangsnr.	Anzahl ausgewerteter Zellen		Cluster	Satelliten	Satell.+Cluster	Satell.+Cluster	Satell.+Cluster	Differenz
			manuell	automatisch	(Mittelwert)	(Mittelwert)	(Mittelwert)	(Mittelwert)	(Mittelwert)	automatisch *
					manuell	manuell	manuell	automatisch *	automatisch**	- manuell
Mesotheliome	25	10095-99	100,00	184,00	2,07	3,35	5,42	4,60	4,30	-0,82
	26	10161A-01	110,00	191,00	2,90	3,67	6,57	5,40	4,70	-1,17
	27	10482-01	keine Daten	9,00	X	X	X	X	8,40	X
	28	11270-00	72,00	293,00	1,22	5,29	6,51	5,30	3,70	-1,21
	29	1409-00	112,00	188,00	1,30	7,33	8,63	7,40	6,50	-1,23
	30	1489-99	71,00	78,00	2,46	4,36	6,83	7,20	7,10	0,37
	31	3236-01	keine Daten	247,00	X	X	X	5,40	5,20	X
	32	6080-99	keine Daten	keine Daten	X	X	X	X	X	X
	33	9047-00	keine Daten	13,00	X	X	X	8,00	9,00	X
	34	9065-00	keine Daten	keine Daten	X	X	X	X	X	X

Tab. III.9: AgNOR-Zählung – Vergleich manuell und automatisch (* automatische AgNOR-Zählung in den manuell schon ausgewerteten Zellen; ** automatische AgNOR-Zählung in allen auswertbaren Zellen) jeweils für Tumorzell-freie, Karzinose- und Mesotheliom-Präparate. Gelb markiert ist das Ergebnis, das oberhalb des Cut-off-Wertes 5,1 für die Differenzierung von Tumorzell-freien und Tumorzellen enthaltenden Proben liegt.

6.2 Automatische AgNOR-Analyse

Bei der automatischen AgNOR-Analyse erfolgte die Zählung einerseits in manuell bereits ausgewerteten Zellen, andererseits in allen für den Algorithmus auswertbaren Zellen.

In allen Diagnosegruppen lag der Mittelwert der automatischen Zählung an den *manuell* bereits ausgewerteten Zellen etwas höher als an allen *auswertbaren* Zellen (nachfolgend werden abgekürzt: Reaktive = R = Tumorzell-freie, Karzinose = K und Mesotheliome = M) (R: 5,18 +/- 1,25 und 4,73 +/- 1,41; K: 7,90 +/- 4,97 und 6,34 +/- 3,82; M: 6,19 +/- 1,31 und 6,11 +/- 1,95). Dies lässt darauf schließen, dass bei der manuellen AgNOR-Zählung überwiegend diejenigen Kerne mit höheren NOR-Zahlen ausgewertet wurden.

Beim Vergleich der beiden Messreihen in allen Diagnosegruppen liegen die automatisch erfassten AgNORs mit 6,92 (SD 2,92) höher als die manuell erfassten Regionen mit 5,83 (SD 2,26). Der Mittelwert der Differenzbeträge liegt bei 0,42 (SD 2,53). Dieses Resultat ist zurückzuführen auf die fehlende Klassifizierung der NORs in Cluster und Satelliten bei der automatischen Auszählung.

In den *benignen Proben* wurden an den zuvor manuell ausgewerteten Zellkernen automatisch 5,18 (SD 1,25) AgNORs gezählt und damit 1,55 (SD 1,22) mehr als manuell gezählt worden waren. An allen auswertbaren Kernen wurden 4,73 (SD 1,41) AgNORs erfasst.

Bei den *Karzinosen* wurden automatisch 0,06 (SD 4,11) AgNORs (7,90 +/- 4,97) weniger erfasst als manuell. In den verwertbaren Kernen wurden 6,34 (SD 3,82) argyrophile Areale erfasst.

Bei den *Mesotheliomen* detektierte der Algorithmus 0,81 (SD 0,68) AgNORs (6,19 +/- 1,31) weniger als visuell ermittelt worden waren. In allen brauchbaren Kernen wurden 6,11 (SD 1,95) AgNORs erkannt.

Betrachtet man die *Tumorzell-positiven* Fälle zusammen, so ergibt sich für die manuelle Auswertung ein um 0,40 (SD 2,96) höherer Betrag als für die automatische Berechnung (6,98 +/- 3,46). Wird der Detektionsalgorithmus auf alle verwertbaren Zellkerne angewendet, ergibt sich ein Betrag von 6,22 (SD 2,86).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass auch in der automatischen Analyse der AgNOR-Zahl die Karzinosen die höchsten Werte vor den Mesotheliomen und den reaktiv veränderten Ergüssen aufweisen. Aufgrund der großen Standardabweichungen innerhalb der

einzelnen Diagnosegruppen kommt es aber zu großen Überlappungen in den Wertebereichen der drei Gruppen. Demzufolge ist trotz der tendenziell höheren AgNOR-Zahlen der neoplastischen Präparate keine diagnostische Trennung der malignen von den benignen Proben möglich.

6.3 AgNOR-Flächenberechnung

In Tabelle III.10 sind die Ergebnisse der automatischen AgNOR- und Zellkern-Flächenberechnung dargestellt. Die Resultate beziehen sich auf diejenigen Zellen, die bereits der DNA-Analyse unterzogen worden waren und für den Algorithmus auswertbar waren.

Kapitel III Ergebnisse

	Präparate-Nr.	Anzahl Zellen	Minimale relative AgNOR-Fläche (%)	Maximale relative AgNOR-Fläche (%)	Mittelwert relative AgNOR-Fläche (%)	SD relative AgNOR-Fläche (%)	Minimale absolute AgNOR-Fläche (µm ²)	Maximale absolute AgNOR-Fläche (µm ²)	Mittelwert absolute AgNOR-Fläche (µm ²)	SD absolute AgNOR-Fläche (µm ²)	Minimale Nukleus-Fläche (µm ²)	Maximale Nukleus-Fläche (µm ²)	Mittelwert Nukleus-Fläche (µm ²)	
reaktive Ergüsse	10062-02	7,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,4	14,0	5,1	25,5	40,9	88,2	67,2	
	10387-98	242,0	0,0	0,5	0,2	0,0	0,3	35,3	10,1	39,7	23,1	184,4	59,1	
	11033-98	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	
	11163-98	156,0	0,0	0,7	0,2	0,0	0,6	38,2	15,8	66,6	31,6	120,6	72,6	
	1614-03	156,0	0,0	0,4	0,1	0,0	2,0	30,4	9,1	24,4	37,6	162,9	70,4	
	2080-03	116,0	0,0	0,6	0,2	0,0	0,4	25,0	8,1	27,8	29,4	82,7	46,4	
	5867-99	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten
	8163-98	161,0	0,1	0,8	0,3	0,0	3,8	35,6	14,6	41,6	29,2	111,7	56,0	
	9114-98	254,0	0,0	0,5	0,1	0,0	0,9	32,5	9,9	25,3	24,8	144,8	78,8	
	9666-98	240,0	0,0	0,4	0,2	0,0	2,2	31,9	10,5	25,0	31,9	148,0	70,5	
9684-98	188,0	0,0	0,6	0,1	0,0	0,8	49,7	12,5	55,7	49,0	297,4	106,6		
Karzinosen	10193-98	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	
	1040-03	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	
	106-03	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	
	11812-98	245,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,3	33,7	8,5	53,2	50,1	243,4	101,4	
	12807-99	153,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,9	19,7	6,0	7,1	33,4	367,2	92,6	
	13061-99	2,0	0,0	0,1	0,0	0,0	2,6	9,1	5,8	20,9	172,1	199,5	185,8	
	13207-99	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	
	13477-99	102,0	0,0	0,4	0,1	0,0	1,5	51,9	19,3	116,9	50,2	901,8	155,0	
	14899-98	134,0	0,0	0,4	0,1	0,0	0,8	47,0	18,8	91,4	54,9	283,8	132,1	
	604-03	107,0	0,0	0,4	0,1	0,0	0,3	27,0	5,5	23,7	35,1	287,9	63,2	
	7655-99	131,0	0,0	0,2	0,1	0,0	3,6	28,8	11,9	27,2	68,4	478,3	167,5	
	8337-02	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	
8742-02	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten		

	Präparate-	Anzahl	Minimale	Maximale	Mittelwert	SD	Minimale	Maximale	Mittelwert	SD	Minimale	Maximale	Mittelwert	SD Nukleus-	
	Nr.	Zellen	relative	relative	relative	relative	absolute	absolute	absolute	absolute	Nukleus-	Nukleus-	Nukleus-	Fläche (µm ²)	
			AgNOR-	AgNOR-	AgNOR-	AgNOR-	AgNOR-	AgNOR-	AgNOR-	AgNOR-	Fläche	Fläche (µm ²)	Fläche (µm ²)		
			Fläche (%)	Fläche (%)	Fläche (%)	Fläche (%)	Fläche (µm ²)	Fläche (µm ²)	Fläche (µm ²)	Fläche (µm ²)	(µm ²)	(µm ²)	(µm ²)		
Mesotheliom	10095-99	184,0	0,0	0,6	0,2	0,0	0,9	40,1	8,8	40,4	22,4	218,8	56,9	631,4	
	10161A-01	191,0	0,0	0,5	0,2	0,0	0,8	34,2	12,7	40,2	26,5	209,2	78,4	1057,3	
	10482-01	9,0	0,1	0,5	0,3	0,0	5,2	47,2	26,2	184,3	52,6	108,6	75,6	510,0	
	11270-00	293,0	0,0	0,4	0,1	0,0	0,6	23,6	9,0	15,1	36,8	153,3	70,2	516,1	
	1409-00	188,0	0,0	0,5	0,2	0,0	0,8	53,6	13,7	80,7	32,2	387,4	94,7	3135,5	
	1489-99	78,0	0,0	0,4	0,1	0,0	0,3	27,3	8,4	38,1	45,6	303,2	110,7	2310,4	
	3236-01	247,0	0,0	0,7	0,2	0,0	3,0	43,4	15,6	48,9	28,4	106,9	65,4	192,5	
	6080-99	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten
	9047-00	13,0	0,0	0,3	0,2	0,0	1,7	35,7	15,9	73,4	68,5	182,5	105,4	1205,3	
	9065-00	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten
9913-00	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	keine Daten	

Tab. III.10: Ergebnisse der automatischen AgNOR- und Zellkern-Flächenberechnung. Aufgeführt sind die Anzahl der vermessenen Zellen, die minimale und maximale relative AgNOR-Fläche, der Mittelwert der relativen AgNOR-Fläche, die Standardabweichung der relativen AgNOR-Fläche, die minimale und maximale absolute AgNOR-Fläche, der Mittelwert der absoluten AgNOR-Fläche, die Standardabweichung der absoluten AgNOR-Fläche, die minimale und maximale Nukleus-Fläche sowie der Mittelwert und die Standardabweichung der Nukleusfläche. Die Daten sind geordnet nach den jeweiligen Diagnosegruppen (Tumorzell-freie, Karzinose- und Mesotheliom-Proben)

Im Durchschnitt sind die Mittelwerte der *absoluten AgNOR-Fläche* bei den Mesotheliom-Präparaten ($13,8 \pm 5,9 \mu\text{m}^2$) am größten, gefolgt von den Karzinosen ($10,8 \pm 6,0 \mu\text{m}^2$) und den reaktiven Ergüssen ($10,6 \pm 3,3 \mu\text{m}^2$). Jedoch kann aufgrund der Überlappung der Wertebereiche kein Schwellenwert für den Mittelwert der absoluten AgNOR-Fläche gefunden werden, der eine Trennung zwischen benignen oder malignen Fällen erlaubt.

Die Mittelwerte der *relativen AgNOR-Flächen* schwanken zwischen 0,1% und 0,2%. Hier lässt sich aber mit 0,2% (SD 0,1%) kein Unterschied zwischen reaktiven Ergüssen und Mesotheliomen feststellen. Die Karzinosen weisen eine mittlere relative AgNOR-Fläche von nur 0,1% (SD 0%) auf.

Diese Feststellung deckt sich mit der Tatsache, dass die Zellkernflächen in den Karzinose-Proben ($128,2 \pm 44,4 \mu\text{m}^2$) erheblich größer sind, als die der zwei anderen Diagnosegruppen (M: $82,2 \pm 19,4 \mu\text{m}^2$; R: $69,7 \pm 17,0 \mu\text{m}^2$). Mit einem Schwellenwert von $85 \mu\text{m}^2$ liessen sich acht der neun reaktiven Ergüsse (88,89%) von sechs der sieben Karzinoseproben (85,71%) unterscheiden und richtig klassifizieren. Diese Differenzierung gelingt aber meist schon aufgrund zytomorphologischer Merkmale. Die weitaus diffizilere und dringendere Unterscheidung von reaktiv veränderten Mesothelien und Mesotheliomzellen gelingt dagegen anhand eines Schwellenwertes für die Zellkernfläche nicht.

Die Mesotheliompräparate weisen *Kernflächen* von $56,9-110,7 \mu\text{m}^2$ (MW $82,2 \mu\text{m}^2$, SD $19,4 \mu\text{m}^2$) und Reaktive von $56,0-106,6 \mu\text{m}^2$ (MW $69,7$, SD $17,0 \mu\text{m}^2$) auf. Die Karzinoseproben dagegen haben Kerne mit einer Ausdehnung von $63,2-185,8 \mu\text{m}^2$ (MW $128,2 \mu\text{m}^2$, SD $44,4 \mu\text{m}^2$). Die bestehenden Überlappungen in den Wertebereichen verbieten somit die Abgrenzung von benignen und malignen Proben.

Die vier morphologisch als dringend verdächtig eingestuften Fälle, die laut Follow up als Mesotheliome bestätigt wurden, konnten daher auch nicht aufgrund ihrer Zellkernfläche oder ihrer absoluten AgNOR-Fläche von reaktiven Fällen unterschieden werden.

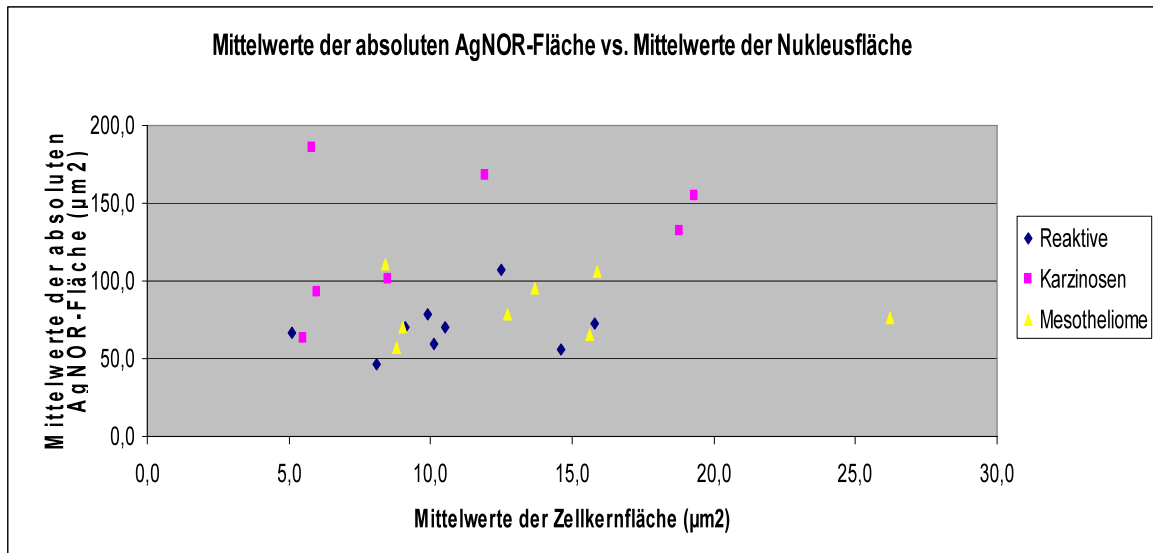


Abb. III.13: Mittelwerte der AgNOR-Fläche vs. Mittelwerte der Nukleusfläche.

Gelbe Dreiecke entsprechen Mesotheliomproben, rosa Quadrate Karzinose-Präparaten und blaue Quadrate Tumorzellfreien Präparaten.

7 Weitere Ergebnisse

7.1 DNA-Gehalt (C-Wert) versus AgNOR-Zahl

Wird die manuell ermittelte AgNOR-Zahl (Summe aus Clustern und Satelliten) pro Zelle mit deren DNA-Gehalt (IOD in c) in Beziehung gesetzt, wird deutlich, dass die Gesamtzahl der NORs nicht proportional zum DNA-Gehalt steigt. Es konnten auch keine weiteren Gesetzmäßigkeiten festgestellt werden. In unserer Untersuchung konnte daher kein Zusammenhang zwischen der AgNOR-Zahl einer Zelle und deren c-Wert festgestellt werden. Diese Beurteilung ist exemplarisch für den Fall C 11812-98 gezeigt.

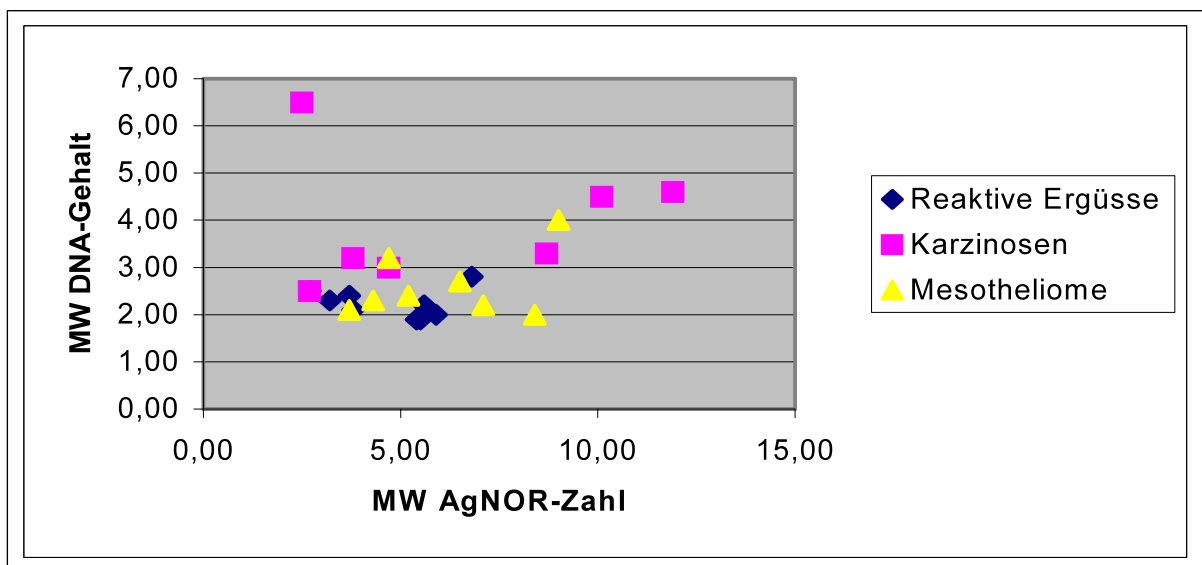


Abbildung III.14 DNA-Gehalt vs. AgNOR-Zahl

Gelbe Dreiecke entsprechen Mesotheliomproben, rosa Quadrate Karzinose-Präparaten und blaue Quadrate Tumorzellfreien Präparaten.

7.2 DNA-Gehalt versus absoluter AgNOR-Fläche

Wird für jedes Präparat die absolute AgNOR-Fläche jeder Zelle gegen deren c-Wert (DNA-Gehalt) aufgetragen, weisen die Diagramme mit steigendem DNA-Gehalt auch eine größere absolute AgNOR-Fläche auf. Diese Beobachtung wird exemplarisch (Fall C11812-98) mit Abbildung III.15 verdeutlicht.

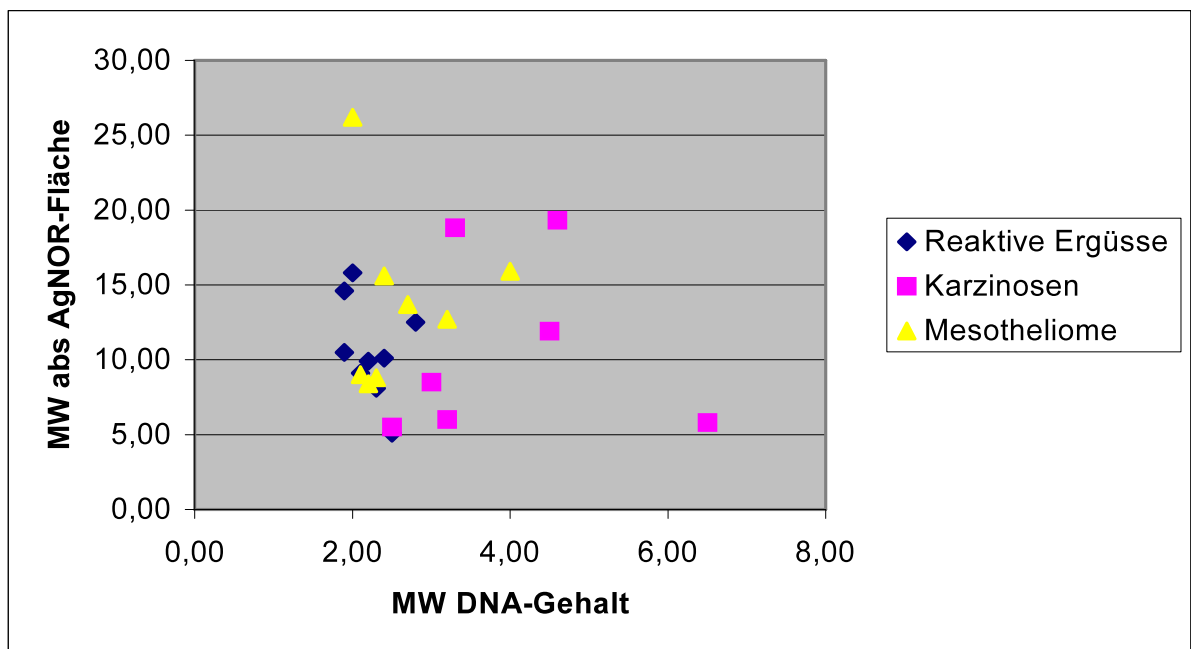


Abbildung III.15: absolute AgNOR-Fläche vs. DNA-Gehalt

Gelbe Dreiecke entsprechen Mesotheliomproben, rosa Quadrate Karzinose-Präparaten und blaue Quadrate Tumorzellfreien Präparaten.

IV Diskussion

Bei einer Vielzahl benigner wie maligner Grunderkrankungen kommt es zu einer pathologischen Flüssigkeitsansammlung in einer oder mehreren der serösen Körperhöhlen (Pleura, Peritoneum, Perikard). Da ein Erguss Symptom von diversen lokalen wie systemischen Erkrankungen sein kann, geben weder der Ort der Ansammlung noch die Menge einen Aufschluss über die Genese des Ergusses. Eine exakte Diagnosestellung bezüglich der Dignität des ursächlichen Krankheitsgeschehens ist folglich von entscheidender Bedeutung. Da die Entwicklung eines malignen Ergusses oftmals vor der Diagnosestellung des Primärtumors liegt, liefert die ergusszytologische Tumordiagnose vielfach die Erstbeschreibung eines Malignoms.

Dennoch sind die diagnostische Interpretation und eine eindeutige Dignitätsbeurteilung trotz zahlreicher diagnostischer Möglichkeiten mit diversen Schwierigkeiten behaftet. Auch mit Hilfe der zytopathologischen Untersuchung ist eine zweifelsfreie Unterscheidung zwischen benignen und malignen Ergüssen bisher nicht möglich.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die diagnostische Treffsicherheit für die Erkennung von Tumorzellen in Körperhöhlen-Ergüssen unter Einsatz der „Multimodalen Zellanalyse“ zu verbessern. Dabei kam neben der DNA-Bildzytometrie auch eine automatische AgNOR-Analyse an identischen Zellen zum Einsatz.

1 Aktueller Stand

Problematisch ist die Einschätzung der Treffsicherheit bisheriger ergusszytologischer Untersuchungen, denn erst die unzweifelhafte Kenntnis der einen Erguss hervorrufenden Erkrankung (ggf. post mortem) ermöglicht die Überprüfung der zytologischen Diagnose. Allerdings wird eine ergusszytologische Untersuchung vor allem dann angefordert, wenn die auslösende Krankheit nicht bekannt ist. Die durch den Kliniker gestellte Diagnose beruht dann folglich auf dem zytopathologischen Befund.

Immer noch gilt die histologische Begutachtung, sofern diese im weiteren Krankheitsverlauf beauftragt wird, als konkretester Beleg. Würden jedoch nur histologisch gesicherte Fälle zur Überprüfung zytodiagnostischer Treffsicherheit

herangezogen, würden in dieser hoch selektionierten Gruppe fast ausschliesslich maligne Ergüsse nachuntersucht und deren Diagnosen überprüft. Als „Goldener Standard“ gelten daher sowohl eine detaillierte histologische Begutachtung als auch unter Umständen ein klinisches Follow-up.

Viele Autoren geben leider nicht den in ihren Untersuchungen zur Überprüfung ihrer Ergebnisse verwendeten Standard an, wodurch die großen Schwankungen in der Angabe der zytologischen Treffsicherheit neben der uneinheitlichen Verwendung der zytdiagnostischen Terminologie und der unterschiedlichen Interpretationen von DNA-Histogrammen wenigstens teilweise erklärlich sind.

Eine Verbesserung der bisher erzielten zytdiagnostischen Sicherheit und speziell der Sensitivität ist dringend erforderlich. Eine damit verbundene Verringerung der Spezifität darf aber wegen der weitreichenden Folgen einer falsch positiven Diagnose nicht in Kauf genommen werden (Koss, 1992).

Eine Verbesserung der diagnostischen Treffsicherheit durch den Einsatz adjuvanter Untersuchungsmethoden konnte bereits von Motherby et al. (Motherby et al., 1999) nachgewiesen werden. Nun soll untersucht werden, ob durch die serielle Anwendung von verschiedenen erprobten adjuvanten Methoden an identischen Zellen aus Körperhöhlen-Ergüssen (Morphologie, DNA-Zytometrie und AgNOR-Analyse) die diagnostische Treffsicherheit weiter gesteigert werden kann.

2 Der Diagnoseprozess

Durch eine Punktion der von der pathologischen Flüssigkeitsansammlung betroffenen Körperhöhlen kann nicht nur auf eine selten mit Komplikationen (Blutung, Infektion etc.) behaftete Weise Untersuchungsmaterial gewonnen werden, sondern auch mechanische Folgeerscheinungen des Ergusses selbst (z.B. eingeschränkte Atemexkursionen) können beseitigt oder zumindest gelindert werden.

Durch eine laborchemische Untersuchung der Ergussproben kann zwischen Transsudaten und Exsudaten unterschieden werden. Diese Unterscheidung erlaubt eine grobe Einordnung bezüglich der Pathogenese des Ergusses. Ein Rückschluss auf die exakte Ätiologie und Dignität ist hierdurch aber nicht möglich. Eine definitive Beurteilung ist wegen der deshalb erforderlichen weiteren diagnostischen Schritte und therapeutischen Konsequenzen unerlässlich.

Die treffsichere Differenzierung zwischen benignen und malignen Ergüssen sowie die histogenetische Einordnung sind mit Hilfe der zytopathologischen Untersuchung samt ihrer adjuvanten Methoden möglich. Allerdings ist die Unterscheidung zwischen proliferierenden Mesothelzellen und mesothelialen Tumorzellen anhand der Morphologie auch für den erfahrenen Zytopathologen oft problematisch und in manchen Fällen selbst am Ende der Diagnoseabfolge mit Zweifeln behaftet. Die Treffsicherheit der ergusszytologischen Diagnostik wird durch unter Umständen Probeabnahmefehler, Verarbeitungsfehler und mangelnde Erfahrung des begutachtenden Zytopathologen geschmälert.

Bei alleinigem Einsatz der Zytomorphologie wird nicht zuletzt deshalb in der herrschenden Literaturmeinung ein Wert von unbefriedigenden 58% für die Sensitivität angegeben (Böcking et al., 2000, Spriggs und Boddington, 1989). Die Verbesserung der diagnostischen Treffsicherheit im Rahmen der ergusszytologischen Analyse von Körperhöhlenflüssigkeiten durch eine Kombination etablierter adjuvanter Untersuchungsmethoden erscheint daher sinnvoll und hilfreich. Dabei kommt der DNA-Zytometrie sowie der AgNOR-Analyse eine große Bedeutung zu. Beide Techniken wurden bereits in vielen Studien auf ihre Aussagekraft hin überprüft und sind international als diagnostische Methoden anerkannt (Pomjanski et al., 2001).

Eine zweifelsfreie Diagnostik hat zudem weitreichende Auswirkungen auf eine adäquate frühzeitige Therapie und vor allem auf die Heilungsaussichten des Patienten.

Ziel dieser Arbeit war, das am LfB entwickelte Multimodale Zellanalyse-System anhand von 35 Ergussproben und drei Rattenleber-Präparaten erstmalig auf seine Funktionsfähigkeit und Messpräzision zu testen, und die dadurch neu gewonnenen diagnostischen Erkenntnisse zu bewerten.

Mit dem MMZA-System wurden 11 Tumorzell-freie, 13 Karzinose- und 11 Mesotheliom-Präparate zu diesem Zweck jeweils in der MGG-, der Feulgen- und der Silbernitrat-Färbung am LfB untersucht. Die DNA-Analyse der Proben fand zudem auch in Düsseldorf am IfC mit dem etablierten AutoCyte-QUIC-DNA-System statt, um Übereinstimmungen und Abweichungen bezüglich der Messgenauigkeit und der DNA-Ploidie-Diagnosen zwischen den Systemen feststellen zu können. Gegenstand der Untersuchungen waren am LfB die Zellmorphologie, der DNA-Gehalt (IOD), die AgNOR-Zahl und die AgNOR-Fläche. Die Daten dieser Parameter wurden dabei an identischen Zellen erhoben.

Die Detektion von Tumorzellen in serösen Ergüssen sollte durch eine computerunterstützte multimodale Analyse unterschiedlicher zytodiagnostischer Methoden erleichtert und treffsicherer gemacht werden. Zudem sollte untersucht werden, ob der Anteil an zytologisch unklaren Diagnosen reduziert werden kann, da vermutlich einem Teil dieser nicht eindeutig zu beurteilenden Fälle maligne Erkrankungen zugrunde liegen. Der Nutzen einer Kombination der oben beschriebenen Untersuchungsmethoden sollte ebenfalls überprüft werden.

Dieses Bestreben war zum Teil erfolgreich. Die Funktionsweise und die Leistungen des Systems der Multimodalen Zellanalyse konnten demonstriert werden. Exemplarisch konnte eine für die Krebsfrühdagnostik hinreichende diagnostische Treffsicherheit nachgewiesen werden. Durch eine Gegenüberstellung mit dem bekannten, etablierten System AutoCyte QUIC-DNA Workstation konnte die Messqualität des neu entwickelten Systems MMZA mit den derzeitigen Standards verglichen und evaluiert werden.

Die Messgenauigkeit der MMZA bei der DNA- und AgNOR-Analyse konnte gezeigt werden.

Die Frage nach der Gebrauchstauglichkeit des neuen Systems in der klinischen Routinediagnostik konnte beurteilt werden.

3 Mögliche technische Fehlerquellen

Durch Fixation, Dehydrierung und Einbettung kommt es zu *Zell- und Gewebeschrumpfungen*. Durch die Flächenveränderung der Zellkerne kann es aber nicht zu Verfälschungen der von dieser Größe abhängigen gemessenen Integrierten Optischen Dichte (IOD) und damit DNA-Bestimmung kommen. Lymphozyten desselben Objektträgers wurden dementsprechend als Referenzzellpopulation gemessen, da diese denselben Präparationsbedingungen ausgesetzt waren. Somit konnten Fehlbestimmungen der IOD vermieden werden.

Nur durch einen standardisierten *Färbevorgang* können gute Kontrastunterschiede für eine optimale IOD-Bestimmung gewährleistet werden.

Durch Langzeitlagerung, Bleichwirkung des Einschlussmittels sowie lange Belichtungsdauer bei der Messung kommt es zum Abblässen des Farbstoffes. Dieses *Ausbleichen* kann einen Verlust der Messgenauigkeit bewirken.

Die Variation der Grauwerte innerhalb eines Bildausschnittes bei tatsächlicher Konstanz der Grauwerte während der zytophotometrischen Messung wird als *Shading* bezeichnet.

3.1 Zytologische Fehldiagnosen

Bei der zytodiagnostischen Beurteilung von Körperhöhlen-Ergüssen kommt eine diagnostische Ungewissheit meist durch entzündlich aktivierte Mesothelien, durch Zelldegeneration oder durch eine unzureichende Anzahl atypischer oder abnormer Zellen in der Probe zustande (Böcking, 1998a, 1998b). Eine falsch positive zytomorphologische Diagnose ist oftmals durch vorangegangene Zytostatika-Therapie oder Strahlentherapie bedingt. Unspezifische Effekte auf den nukleären DNA-Gehalt haben: Zytostatikatherapie, Strahlentherapie, Vitamin B12-Mangel, virale Infektionen, Apoptose, Autolyse und Nekrose. Diese Einflussfaktoren sind bei der diagnostischen Interpretation in Betracht zu ziehen (Böcking et al., 1995). Solche Fehlinterpretationen seitens des Zytopathologen könnten auch durch genauere Angaben des Kliniklers auf dem Anforderungsschein vermieden werden.

Zytologisch falsch negative Diagnosen beruhen zum einen auf Begutachtungsfehlern (*screening errors*), zum anderen auf Probenfehlern (*sampling errors*). Ein Screening error im Rahmen einer Fehlinterpretation gefundener Zellabnormitäten ließe sich durch eine zweite Durchsicht oder aber durch zusätzlichen Einsatz einer adjuvanten Methode wie DNA-Zytometrie oder/und AgNOR-Analyse bereinigen. Somit ist eine Steigerung der Detektion von malignen Zellen und damit der Sensitivität möglich.

Ein sampling error, bei dem auch in einer zweiten Durchsicht keine neoplastischen Zellen auffindbar sind, ist möglicherweise bedingt durch eine malignombedingte, aber keine Tumorzellen enthaltenden Ergussprobe. Ein zu geringes Volumen oder eine zu hohe Punktion im Bereich über den abgesunkenen Tumorzellen könnten hier ursächlich sein.

3.2 Marker DNA-Aneuploidie

In der Literatur wird für die konventionelle Ergusszytologie eine Sensitivität für die Diagnose eines *maligenen Mesothelioms* von 64% (Loddenkämper, 1983) sowie 53% (Sherman und Mark, 1990) angegeben. Damit lag die gemessene DNA-Aneuploidierate bei den malignen Mesotheliomen mit 4 von 11 Fällen (36,36%) am LfB bzw. 6 von 11 Fällen (54,54%) in einem mit den vorangegangenen Arbeiten vergleichbaren Bereich. Dejmek et al. (1992) fanden eine DNA-Aneuploidierate von 59%, Isobe et al. (1995) von 58% und Hafiz et al. (1988) von 89%.

Die DNA-Zytometrie der *metastatischen Absiedlungen (Karzinosen)* ergab eine DNA-Aneuploidierate von 69,2% am LfB und 76,9% am IfC. Damit lag der Anteil aneuploider DNA-Histogramme bei Karzinosen in dem in der Literatur beschriebenen Bereich von Banks et al. (1994) mit 77% und von Kapusta et al. (1991) mit 100%.

Sämtliche untersuchten Ergüsse benignen Ursprungs (*Reaktive*) wiesen in Übereinstimmung mit der Literatur DNA-Euploidie auf.

In einer Studie von Motherby et al. (1998a) gab es Hinweise, dass anhand der Lage der größten Stammlinie im Histogramm eine Unterscheidung zwischen den durch ein Mesotheliom oder den durch eine Tumormetastase bedingten Ergüssen möglich sei. Dabei wies keine der Karzinometastasen die größte Stammlinie im Bereich zwischen 1,80c und 2,20c auf, wohl aber 72% der Mesotheliome. In dieser Arbeit zeigten 38,5% (LfB) bzw. 23,1%(IfC) der Karzinosen und 63,6% (LfB) bzw. 54,5% (IfC) der Mesotheliome ihre größte Stammlinie innerhalb dieser Grenzwerte. Es zeigt sich zwar eine Tendenz, dass mehr Mesotheliome als Karzinosen ihre größte Stammlinie im peridiploiden Bereich aufweisen. Eine klare Korrelation zwischen Stammlinienlage und Genese der Ergussbildung ist aber aus unseren Ergebnissen nicht ersichtlich.

In der Literatur wird die Rate *zytologisch zweifelhafter Ergüsse* durchschnittlich mit 5,6% angegeben (Spriggs und Boddington, 1989; Motherby, 1998c). Für den einsendenden Kliniker ist jedoch eine eindeutige Diagnosestellung seitens des Zytopathologen zur Planung weiterer diagnostischer und therapeutischer Schritte unentbehrlich. Daher sollten besonders die in der zytomorphologischen Begutachtung unklar gebliebenen Fälle weiteren adjuvanten Methoden zugeführt werden. Die Anzahl der dann noch verbleibenden unklaren Diagnosen würde – wie unsere Arbeit belegt – dadurch minimiert. Überdies könnte bei zytologisch erstdiagnostizierten Malignomen frühzeitiger eine adäquate Therapie veranlasst werden.

Lediglich eine geringe Anzahl von Autoren widmete sich in ihren Arbeiten der Untersuchung zytologisch unklarer Fälle. Diese Studien zeigten Prävalenzen der DNA-Aneuploidie in Fällen mit malignen Follow up zwischen 37,5% und 50% (Croonen et al., 1988; Joseph et al, 1995).

In der Gruppe der in unserer Arbeit untersuchten fünf zytologisch zweifelhaften Ergüsse (ein zweifelhafter und vier dringend verdächtige Fälle) konnten zwei Fälle als DNA-aneuploid diagnostiziert werden. Gemäß unserer Recherche handelte es sich dabei um Mesotheliome. Von den drei übrigen Proben wiesen die zwei Mesotheliompräparate und der Karzinoseausstrich ein euploides DNA-Verteilungsmuster auf. Damit lag die von uns ermittelte Prävalenz von Aneuploidie in der Gruppe der zweifelhaften Ergüsse mit 40% in dem mit 12,5% bis 60% vorbeschriebenen Bereich (Matter-Walstra und Kraft, 1996; Fischler et al., 1994). Wir nehmen an, dass DNA-Aneuploidie in zytologisch zweifelhaften Fällen ein spezifischer und sensitiver Marker für Neoplasie ist.

Es ist davon auszugehen, dass bei zytologisch zweifelhafter Dignitätsdiagnosestellung die morphologischen sowie DNA-zytometrischen Veränderungen der Zellen so geringfügig ausgeprägt sind, dass sie mit diesen diagnostischen Methoden noch nicht eindeutig erfassbar sind.

Abweichungen der *DNA-Aneuploidieraten* sind möglicherweise Ausdruck der unterschiedlichen Anzahl und Art der angewendeten Algorithmen zur Interpretation der DNA-Histogramme. Zudem ist die Zahl der in diesen Arbeiten untersuchten Proben sehr klein (18 bis 46). Auch die Zahl der Analysezellen liegt meist unter 200, was wiederum die Nachweisrate von DNA-Aneuploidie beeinflusst. Viele der vorausgegangenen Arbeiten haben den Krankheitsverlauf der Patienten nicht miteinbezogen, sondern die DNA-zytometrischen Ergebnisse lediglich mit denen der konventionellen Zytologie verglichen.

In einigen Studien wurde neben der *DNA-Bildzytometrie* die DNA-Flowzytometrie angewandt. Zwar wird der Einsatz dieser Methode zur Detektion aneuploider Stammlinien anstelle der DNA-Zytometrie in der Literatur befürwortet, dennoch sollte Erwähnung finden, dass sogenannte „rare events“ (Zellen $>9c$), aber auch ganze Stammlinien relevanter, jedoch zahlenmäßig kleiner Zellfraktionen durch die Flowzytometrie nicht erfasst werden, weil sie durch die überwiegende Mehrheit gemessener messtechnisch nicht-bedeutungsvoller Zellen überdeckt werden.

Auch die *Vergleichbarkeit* der ermittelten DNA-Prävalenzen in den einzelnen Studien stellt sich schwierig dar, denn die Detektion von DNA-Aneuploidie beruht auf

unterschiedlichen, zum Teil inadäquaten Algorithmen. In manchen Studien wird DNA-Aneuploidie postuliert, wenn mehr als 10% der Messzellen einen DNA-Gehalt von $>5c$ aufweisen (Matter-Walstra und Kraft, 1996). Da aber Mesothelzellen bereits unter physiologischen Bedingungen eine euploide Polyploidisierung durchlaufen und daher schon gesunde Zellen in der S-Phase des Zellzyklus einen DNA-Gehalt $>5c$ (zwischen $4c$ und $8c$) aufweisen können, scheint dies ein wenig geeigneter Marker zu sein (Böcking A, 1998; Motherby et al., 1998a; Motherby et al., 1998b).

Bei Auftreten eines falsch positiven Falles, muss bedacht werden, ob nicht möglicherweise ein einen Erguss verursachendes CUP (Carcinoma of unknown primary) vorliegt, bei dem der Tumor bisher noch nicht lokalisiert werden konnte.

Im Falle einer falsch negativen Zytodiagnostik, bei der im Patienten-follow-up ein klinischer oder histologischer Hinweis auf ein den Erguss bewirkendes Malignom vorliegt, ist der Erguss unter Umständen nicht ursächlich auf den Tumor zurückzuführen. Hierbei ist dann von einem sogenannten Begleiterguss auszugehen (Vgl. Kap I.1.3).

3.3 AgNOR-Analyse

Unsere Untersuchungen unterstützen die in der Literatur überwiegend positive Haltung gegenüber der diagnostischen Relevanz der AgNOR-Methode. Beim Vergleich von benignen mit malignen Ergussproben zeigen sich signifikante Unterschiede bezüglich der AgNOR-Zahl und der AgNOR-Fläche. Martin et al. beschrieben schon 1992 die mit steigender Malignität zunehmende AgNOR-Zahl bei gleichzeitig schrumpfender Fläche der einzelnen AgNOR-Punkte. Mit Hilfe der manuellen AgNOR-Zählung konnten 95,2% (20 von 21 Fällen) der Präparate in Übereinstimmung mit der Aktenanalyse als benigne bzw. maligne identifiziert werden. Der Schwellenwert zur Unterscheidung zwischen Tumorzell-freien und Tumorzell-enthaltenden Proben lag dabei bei 5,10 für die Summe aus Clustern und Satelliten. Es ist daher davon auszugehen, dass auch bei zytologisch zweifelhaften Fällen eine treffsichere Befundung möglich ist und somit der Anteil der zytologisch nicht sicher einstuftbaren Proben reduziert werden kann.

Bei der automatischen, rechnergestützten Messung von Zahl und Größe der AgNORs konnten keine geeigneten Schwellenwerte zur Differenzierung zwischen Tumorzell-freien und Tumorzell-enthaltenden Präparaten ermittelt werden.

Die einfache Durchführbarkeit der AgNOR-Analyse ist im Gegensatz zur konventionellen subjektiven Zytopathologie nicht abhängig von der diagnostischen Erfahrung und den oftmals persönlichen Einflüssen des Untersuchers. Zudem erlaubt die nun hinzugewonnene Möglichkeit der Speicherung der ermittelten Daten eine Reproduzierbarkeit und Überprüfbarkeit der Ergebnisse der AgNOR-Analyse.

Bei Anwendung der AgNOR-Technik zur Diagnostik zytologischer Ergussflüssigkeiten ist bereits nach einer kurzen Einarbeitungszeit die Dignität des Präparates auch für einen in der konventionellen morphologischen Zytopathologie unerfahrenen Untersucher rasch erfassbar. Derenzini et al (1989) bestätigten mit ihrer Analyse von reaktiv-entzündlichen und malignen Ergüssen diese Annahme. Besonders bei zytomorphologisch unklaren Präparaten kann die AgNOR-Analyse den diagnostischen Entscheidungsprozess erleichtern. Durch eine Automatisierung dieses Prozesses kann außerdem Personal sowie auch Zeit für die diagnostische Aufarbeitung der Präparate gespart werden. Zudem ist auch in diesem Arbeitsschritt durch eine Archivierung des gewonnenen Bildmaterials eine Reproduzierbarkeit bzw. manuelle Überprüfbarkeit durch den Zytopathologen gewährleistet.

Unsere Ergebnisse untermauern die Bedeutung der AgNOR-Technik in der diagnostischen Zytologie von Ergussflüssigkeiten und legen darüber hinaus durch die Automatisierung eine Anwendung in der Routine nahe. Hierfür ist allerdings eine Optimierung des Algorithmus mit einer Klassifizierung in Satelliten und Cluster erforderlich.

Die unbefriedigende Qualität der hier verwendeten Software zur Detektion und Analyse der AgNORs hat zwischenzeitlich am Lehrstuhl für Bildverarbeitung der RWTH zu einem neuen Entwicklungsansatz auf der Grundlage von sogenannten „high dynamic range“ images geführt.

3.4 Färbungen

Die *MGG-Färbung* zeigte bei allen Präparaten durchweg gute Ergebnisse bezüglich der Färbeintensität. Lediglich bei besonders dunkel oder hell gefärbten Proben war die morphologische Beurteilung etwas erschwert.

Bei der *Färbung nach Feulgen* führte der bei einigen Präparaten mangelhaft ausgeprägte Farbkontrast zwischen Kern und Zytoplasma eine Fehlerquelle bei dem Segmentierungsalgorithmus herbei. So konnten Kernkonturen nicht exakt identifiziert

und markiert werden. Eine präzise Bestimmung der IOD als Maß für den DNA-Gehalt der einzelnen Zelle gelingt aber nur unter der Voraussetzung einer passgenauen Segmentierung. Die Möglichkeit, von der Software erkannte Kernkonturen manuell zu korrigieren, stellte sich dabei als sehr hilfreich dar. So konnte durch den Wechsel der Darstellung des Fotos von der Feulgen- in die MGG-Färbung die korrekte visuelle Erkennung der Randkonturen der Zellkerne gewährleistet werden.

Die Variabilität der Farbtintensität zwischen den einzelnen Präparaten verfälschte nicht die Ergebnisse der IOD-abhängigen DNA-Messung. Grund dafür war, dass die Auswertung auf der Berechnung des Verhältnisses der optischen Dichte der Messzellen zu den Referenzzellen beruhte, die den gleichen Färbebedingungen ausgesetzt waren.

Obwohl für alle Objektträger bei der *AgNOR-Färbung* stets dieselbe Färbezeit nach einem standardisierten Färbeprotokoll veranschlagt wurde, variierte die Färbeintensität von völliger Überfärbung bis zu fehlender Erkennbarkeit jeglicher argyrophiler Regionen. Daher konnten 14 Fälle (40%) nicht ausgewertet werden.

Daneben war es bei der manuellen Zählung der Cluster und Satelliten gelegentlich schwierig für den Untersucher, zu entscheiden, wann eine silbergefärbte Struktur, die sich innerhalb der Kerngrenzen befand, oberhalb oder noch innerhalb der Zellebene lag. Dies stellt daher eine Fehlerquelle für zu große manuell wie auch automatisch bestimmte AgNOR-Zahl dar, denn so wurden möglicherweise zusätzlich Strukturen mitgezählt, die sich ober- oder unterhalb der Zellebene befanden.

Ein leichtes Verblässen, besonders am Rand des Objektträgers, sollte durch kurze Lagerungszeiten der Proben verhindert werden, da hierdurch ein falsch niedriges AgNOR-Ergebnis vermieden werden kann.

Eine Verbesserung der Färbetechnik, die zu einheitlicheren Färbeergebnissen führt, ist sowohl für eine genauere AgNOR-Analyse als auch eine Verkürzung der Untersuchungszeit durch ein manuelles oder aber auch durch ein automatisiertes Auswertungsverfahren erstrebenswert.

Falsch hohe AgNOR-Zahlen könnten durch mitgewertete angefärbte Strukturen außerhalb der Zellkernebene pro Zellkern verursacht worden sein. Durch ein manuelles Durchfokussieren gelang weitgehend eine Vermeidung dieser Fehlerquelle. Mittlerweile existiert jedoch eine Software, die ein automatisches Durchfokussieren erlaubt. Dem Untersucher bleibt damit dieser Arbeitsprozess erspart. Allerdings ist der automatische Arbeitsschritt zurzeit noch sehr zeitaufwendig.

4 Funktionsfähigkeit des MMZA-Systems

Die Aufmachung der Benutzeroberfläche, Benutzerführung, Visualisierung und Navigation stellten sich als sinnvoll und übersichtlich dar. Die Option, einmal fotografierte Zellszenen in allen drei Färbungen als Bildergalerie oder Großbild anzusehen, erleichterte besonders die Segmentierung und AgNOR-Analyse. So konnten die vorgeschlagenen Kernkonturen in MGG überprüft und –wo dies nötig war– akkurat manuell nachgebessert werden. AgNOR-Cluster konnten in der Feulgen-Ansicht durch ihre Anordnung in Nukleolen treffsicher von zusammengelagerten Satelliten unterschieden werden.

Ein Nachteil des Systems bestand in dem vergleichsweise hohen Zeitaufwand, der für das Abrufen relativ großer Datenmengen aus der Datenbank oder das Abspeichern darin, notwendig war. Für eine Anwendbarkeit im klinischen Alltag sollte dieser Zeitfaktor weiter reduziert werden.

Die **Relokalisation** von Zellszenen gelang zwar in den meisten Fällen. Dennoch war sehr oft die manuelle Nachbesserung beim Anfahren der ersten Bildposition erforderlich. In 8,6 % (3) der Fälle konnte die erste Bildposition durch den Algorithmus gar nicht wiedergefunden werden, so dass die Relokalisation allein durch den Untersucher vorgenommen werden musste. Dies war mühsam und zeitaufwendig. Zudem wurden gelegentlich die relokalierten Bildpositionen nur so ungenau angefahren, dass eine zeitintensive manuelle Korrektur der Position vorgenommen werden musste. Eine Optimierung des Algorithmus bezüglich der Quote der relokalierten Bildpositionen und der Genauigkeit des Anfahrens dieser Position wäre wünschenswert. Zurzeit wird am LfB ein Algorithmus zur völlig automatisierten Zellrelokalisierung entwickelt (s. Kapitel V).

Für die **Segmentierung** von Zellkernen wurden in einem mehrstündigen Prozess die Kernkonturen durch eine Software errechnet, bevor der Untersucher Konturen auswählen und bearbeiten konnte. Die Segmentierung gelang am Anfang nur unzureichend genau. Durch die Möglichkeit, mittels Wasserscheidenalgorithmus die von der Software erkannten an die tatsächlichen Kernkonturen anzupassen, erhöhte sich die Präzision. Dennoch erforderte diese Nachbesserung zu viel Zeit, um einen Einsatz in der Routinediagnostik zu erlauben. Im Zuge der Anwendungserprobung wurde der Algorithmus soweit verbessert, dass nun eine gute Präzision der Segmentierung gewährleistet ist. Eine Anwendung im Klinikalltag wird aber dennoch nur durch einen schnelleren Segmentierungsprozess möglich sein.

4.1 Messpräzision des MMZA-Systems

Die Überprüfung der Messpräzision des MMZA-Systems erfolgte durch die DNA-zytometrische Evaluation von drei Rattenleber-Präparaten. Als Richtmaß für diese Qualitätskontrolle galten die standardisierten Vorgaben der ESACP (Haroske et al., 2001). Die Messergebnisse lagen in den angestrebten Zielbereichen, so dass eine ausreichende Messpräzision des MMZA-Systems bestätigt werden kann. Somit lassen sich mit dem neu entwickelten Messsystem akkurate DNA-zytometrische Untersuchungsergebnisse und damit treffsichere Diagnosen erzielen. Zudem konnten mit diesem System bei allen untersuchten Messparametern bessere Ergebnisse erzeugt werden als mit dem AutoCyte QUIC-DNA System. Der bei gesunden Rattenhepatozyten zu erwartende DNA-Gehalt von 2c wurde in den MMZA-Messungen (2,01c) exakter wiedergegeben als in den Untersuchungen mit dem AutoCyte QUIC-DNA System (1,89c). Der Quotient 4c zu 2c ist ebenfalls mit 1,99 bei der MMZA besser getroffen als mit 2,13 bei AutoCyte QUIC-DNA. Auch der mittlere Variationskoeffizient (CV) der Referenzzellen liegt mit der MMZA nur bei 1,89%, wohingegen er bei AutoCyte QUIC-DNA 3,25% beträgt. Bei der Berechnung der Korrelation (CC) der Flächen zu der jeweiligen IOD der Referenzzellen (Lymphozyten) errechnet sich – bei dem angestrebten Idealwert von $r = 0$ – für das MMZA-System ein Wert von $r = 0,05$ und ein Wert von $r = 0,42$ für das AutoCyte QUIC-DNA System.

Obwohl laut Kindermann und Hilgers (1994) die besten Resultate an frischem Zellmaterial gewonnen werden können, konnten nach einer Lagerzeit von etwa 2 Monaten diese Messergebnisse am LfB erzielt werden. Das am LfB neu entwickelte MMZA-System ist dem älteren AutoCyte QUIC-DNA System, entsprechend den oben angeführten Parametern bezüglich der Messpräzision der DNA-Analyse an den Rattenhepatozyten, somit überlegen.

4.1.1 DNA-Zytometrie

Zur Überprüfung dieser Beurteilungen bezüglich der Messgenauigkeit erfolgten am LfB nunmehr auch Messungen an Ergussproben. Somit war ein Vergleich der Messpräzision beider Systeme auch an anderem Untersuchungsgut möglich.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der MMZA im Vergleich mit AutoCyte QUIC-DNA wiederholt:

- Mittels MMZA wurden durchschnittlich mehr *DNA-Stammlinien* detektiert als mit dem AutoCyte-System.
- Bei mehreren detektierten Stammlinien in einer Probe lagen die mit dem AutoCyte-System ermittelten Stammlinien tendenziell bei höheren *c-Werten* als diejenigen vom MMZA-System entdeckten.
- Die *Modalwerte* der Analysezellen lagen im Mittel bei der MMZA-Messung um 0,02c (Mittelwert der Modalwertdifferenzen) höher als bei der AutoCyte-Messung. In den Tumorzell-positiven Proben (Karzinosen und Mesotheliome) lagen vergleichbare Peaks am LfB nur um 0,01c höher als am IfC. Die mit AutoCyte ermittelten diploiden DNA-Stammlinien bei den reaktiven Ergüssen lagen dagegen um 0,04c über denen mit dem MMZA-System ermittelten.
- Die analogen Stammlinien der beiden Messungen am LfB und IfC zeigten eine hohe *Korrelation* ($r = 0,98$).
- Die Abweichungen der Modalwerte der Tumorzell-freien Fälle vom *2,00c-Wert* lagen am LfB bei 0,10 (MW 2,03) und am IfC bei 0,12 (MW 2,07).
- Die *CV-Werte* des MMZA-Systems lagen im Mittel um 1,06% (SD 1,06) höher als die des AutoCyte QUIC-DNA-Systems. Dabei ergab sich für die Messungen am LfB ein Wert von 3,39+/-1,09% und für die am IfC ein Wert von 2,30+/-0,58%.

Die hohe Korrelation der Modalwerte vergleichbarer DNA-Stammlinien beider Systeme gibt Hinweise auf eine große *Reliabilität und Validität* der MMZA. Obwohl die Variationskoeffizienten (CV) des MMZA-Systems noch über denen des AutoCyte-Systems liegen, befinden sie sich im Mittel unter dem von der ESACP geforderten Wert von 5% und belegen damit eine ausreichende *Messpräzision*. Die Tatsache, dass die am LfB gemessenen Modalwerte der diploiden Stammlinien der Tumorzell-freien Präparate durchschnittlich näher am optimalen 2,00c-Wert liegen und auch weniger um diesen

Wert streuen, bestätigen die Annahme, dass das MMZA-System zumindest genauso exakt misst, wie das Düsseldorfer Messsystem.

Ursächlich für die *Abweichungen* der analogen Stammlinienlagen (Modalwerte) bei vergleichbarer Messpräzision beider Systeme ist wahrscheinlich die in den Instituten unterschiedlich durchgeführte *Auswahl der Messzellen*. Zwar wurden die Messzellen am LfB und IfC in den gleichen, im Vorfeld durch einen erfahrenen Zytopathologen (Prof. Böcking) markierten Arealen auf dem Objektträger rekrutiert; dennoch konnten nicht immer die identischen Zellen aufgefunden und untersucht werden. Zudem wurden die Messzellen am LfB nach dem Zufallsprinzip der DNA-Analyse unterzogen, wohingegen am IfC gezielt auffällige, potenzielle Tumorzellen miteinbezogen wurden. Durch diese Selektion gelang es dem erfahrenen Untersucher (Dr. med. Nguyen) in Düsseldorf häufiger, 9cEEs aufzuspüren.

Zudem wurde die Größe und Anzahl der detektierten Stammlinien beeinflusst. Am LfB wurden zwar wiederholt mehr Stammlinien gefunden als am IfC. Dadurch, dass die entsprechende Stammlinie aber aus einer kleineren Zellpopulation bestand, ist deren Modalwert zwangsläufig ungenauer. Die Vergleichbarkeit beider Messsysteme wurde durch die ungleiche Rekrutierung von Messzellen zwar erschwert, aber in keinem Fall wurden Fehldiagnosen aufgrund mangelnder Messpräzision erzeugt.

Der Grund für die im Vergleich zum AutoCyte-System höheren Modal- und CV-Werte des MMZA-Systems ist die bessere Glare-/Beugungskorrektur des in am IfC verwendeten Systems. Auch die unterschiedlichen Abweichungen in den Modal- und CV-Werten zwischen Tumorzell-positiven und –negativen Proben bleiben weiterhin ungeklärt.

Insgesamt belegen die guten Messergebnisse der Rattenleber- und der Tumorzell-freien Präparate, dass das MMZA-System dem AutoCyte QUIC-DNA-System im Hinblick auf die erzielte Messpräzision überlegen ist. Um die Ursachen für die tendenziell höheren CV-Werte zu klären und eine bessere Vergleichbarkeit beider Systeme herzustellen, sollten die Messbedingungen noch weiter angeglichen werden. In Zukunft sollten die Vergleichsmessungen von nur einem Untersucher durchgeführt werden. Dabei könnte die Analyse ausschließlich identischer Zellen mit beiden Systemen helfen, systemische Fehler aufzudecken und zu beseitigen.

Aufgrund der Ergebnisse einer Studie von Motherby (1998a) wurde vermutet, in tumorzellpositiven Präparaten mittels Analyse des Modalwertes der größten Stammlinie Karzinosen von malignen Mesotheliomen unterscheiden zu können. Wie auch Remmerbach (1998) konnten wir diese Beobachtung nicht bestätigen. Die, verglichen

mit den Messungen am IfC, vornehmlich in den Untersuchungen am LfB gemessenen diploiden peaks lassen vermuten, dass das Einbeziehen randomisiert (gemäß ESACP) ausgewählter gesunder Messzellen diese Stammlinienlage bei beiden Diagnosegruppen herbeigeführt hat. Eine Differentialdiagnostik zwischen Mesotheliom- und Adenokarzinomzellen aufgrund des DNA-Histogramms ist demnach in unserer Studie nicht möglich. Zudem ist eine geringe Anzahl an Tumorzellen im DNA-Histogramm nicht „Stammlinien-wirksam“, so dass eine fachkundige gezielte Suche nach Tumorzellen notwendig wäre, um eine für eine Stammlinie ausreichend große und repräsentative Population abnormer Zellen zu erfassen. Diese Suche kann aber bisher noch nicht von einer rechnergestützten und automatisierten Zelluntersuchung geleistet werden.

4.2 Bewertung der DNA-Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung begründen die kombinierte Anwendung zweier verschiedener Algorithmen zur Identifikation von DNA-Aneuploidie:

- die Position jeder DNA-Stammlinie,
- das Auftreten von Zellen mit einem DNA-Gehalt $>9c$.

Auch für die Gruppe zytodiagnostisch zweifelhafter Ergüsse wird die sorgfältige Beachtung der Empfehlungen der Europäischen Gesellschaft für Analytische Zelluläre Pathologie (ESACP) im Zuge einer standardisierten diagnostischen DNA-Bildzytometrie empfohlen, um falsch-positive und falsch-negative Diagnosestellungen zu vermeiden (Haroske et al., 1998, Böcking et al., 1995). Der *kombinierte Einsatz* beider o.a. Kriterien bewirkt eine Zunahme der Sicherheit diagnostischer Entscheidungen. Die Anwendung verschiedener Marker für DNA-Aneuploidie führte zu einer Steigerung der Aneuploidierate von 61,5% (LfB) bzw. 46,2% (IfC) bei alleiniger Stammlinieninterpretation der Karzinose-Histogramme auf 69,2% (LfB) bzw. 76,9% (IfC) bei zusätzlicher Berücksichtigung von 9cEE. Bei den Mesotheliom-Präparaten gelang eine Erhöhung der DNA-Aneuploidie-Erkennung von 27,3% auf 36,4% am LfB und von 9,1% sogar auf 45,5% am IfC. Das Vorkommen von Zellkernen mit einem DNA-Gehalt größer $5c$ bei euploid polyploidisierendem Gewebe werteten wir im Gegensatz zu anderen Autoren (Fischler et al., 1994; Parry und Hemstreet, 1989) nicht als Kriterium für DNA-Aneuploidie.

Die *Anzahl der Messzellen* beeinflusst ebenfalls die Rate der Detektion von Tumorzellen. Durch eine Synopse der verschiedenen Untersuchungsergebnisse ist eine zuverlässige Diagnostik auch an einer geringeren Zahl von Messzellen möglich. Beispielhaft ist diese These anhand von Messungen an weitaus weniger als 300 Zellen (Präparat C1489-99 mit 151 Zellen, C13061-99 mit 147 Zellen und C9913-00 mit 179 Zellen) bestätigt worden. Die beiden ersten Präparate zeigten eine genaue Übereinstimmung bezüglich der DNA-Aneuploidie-Kriterien und folglich auch der DNA-Ploidie-Diagnose. Präparat C9913-00 wurde nur am IfC als aneuploid gewertet, da hier zwei Zellen mit einem DNA-Gehalt $>9c$ gefunden wurden.

Insgesamt wurde in drei Fällen (eine Karzinose und zwei Mesotheliome) bei der Interpretation des DNA-Histogramms eine Diskrepanz in der DNA-Ploidie-Diagnose festgestellt. Bei diesen drei diskrepanten Präparaten war das DNA-Aneuploidie-Kriterium „ $9cEE$ “ entscheidend für diese Differenz. Dabei wurden im IfC zwischen einer und vier Tumorzellen ($9cEE$) entdeckt, die am LfB nicht gefunden wurden.

Beim Vergleich der *Anzahl der detektierten DNA-Stammlinien* fällt auf, dass mittels MMZA weniger Stammlinien bei höheren c -Werten gemessen wurden als mittels AutoCyte. Bei der AutoCyte-Auswertung fehlt mehrfach eine am LfB bestimmte diploide Stammlinie. Diese Differenzen sind zurückzuführen auf das oben beschriebene unterschiedliche Vorgehen bei der Auswahl der Messzellen. In keinem Fall wurde jedoch eine Probe benignen Ursprungs als DNA-aneuploid interpretiert.

In der Gruppe der Karzinosen lag die Rate DNA-aneuploider Fälle am LfB bei 69,2% und am IfC bei 76,9%. Unter den Mesotheliom-Proben wurden am LfB 36,4% und am IfC 45,5% der Fälle als DNA-aneuploid beurteilt. Damit lag die Prävalenz von DNA-Aneuploidie in metastasierten Karzinomen und Mesotheliomen unter der zuvor berichteten (Motherby et al., 1999a; Pomjanski et al., 2001). Alle DNA-Histogramme in nicht-malignen, reaktiven Proben erfüllten keines der Kriterien für DNA-Aneuploidie. Damit liegt die Prävalenz von Euploidie in benignen Ergussproben bei 100%. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen früherer Arbeiten (Motherby et al., 1999a+b; Pomjanski et al., 2001).

Zwei der vier zytomorphologisch initial als dringend verdächtig für das Vorliegen von Tumorzellen begutachtete Fälle konnten aufgrund der mit beiden Systemen festgestellten DNA-Aneuploidie als sicher Tumorzell-positiv (malignes Mesotheliom) eingestuft werden. Die DNA-zytometrische Abgrenzung gegenüber den visuell differentialdiagnostisch in Betracht gezogenen reaktiv veränderten, hyperplastischen Mesothelzellen erlaubte somit eine Reduktion der initial zweifelhaften

Fälle um 50%. Die DNA-Zytometrie vermochte so, die Spezifität in der Erkennung hyperplastischer Mesothelzellen und die Sensitivität in der Identifizierung von Mesotheliomzellen zu steigern.

Es zeigt sich zwar eine Tendenz, dass mehr Mesotheliome als Karzinosen ihre größte Stammlinie im peridiploiden Bereich aufweisen. Zellen metastatischer Absiedlungen können dennoch DNA-zytometrisch nicht von Zellen eines Mesothelioms unterschieden werden.

4.3 Bewertung der AgNOR-Ergebnisse

Zur Erfassung der proliferativen Aktivität einer (Tumor-) Zelle eignet sich nicht nur die AgNOR-Zahl, sondern auch die Parameter der AgNOR-Größe, -Farbintensität und die Verteilung der Silberniederschläge innerhalb der Zellkerne.

Laut Rüschoff (1992) ist die Bestimmung der Gesamt-AgNOR-Fläche im Zellkern der Auszählung einzelner AgNORs scheinbar überlegen. In anderen Studien werden andere Auswertmethoden angewendet: Carillo et al. (1994) erfassen die Summe aus AgNOR-Punkten innerhalb (Cluster) und außerhalb (Satelliten) der Nukleolen. Shechtman et al. (1998) zählen Satelliten und Cluster separat voneinander und setzen diese zueinander und zur Gesamtzahl der AgNORs in Beziehung. Ein weiterer Autor (Okamura et al., 1998) errechnet die Prozentsätze der Kerne mit 1, 2, 3,4 oder >4 AgNORs.

Die Untersuchungen von Wolonski et al. (1998) erbrachten zwar eine höhere Anzahl von AgNORs pro Zelle in malignen Mesotheliomen, aber es gab dennoch eine große Überschneidung einzelner Werte bei benignen und malignen Zellpopulationen. Carillo et al. (1994) beschreiben Überlappungen zwischen einzelnen Ergebnissen in jeder zytologischen Diagnosegruppe. Diese Schlüsse zogen auch Aides et al. (1988) und Colecchia et al. (1991). Dagegen zeigte die AgNOR-Bildanalyse von Derenzini et al. (1989a), dass das Verteilungsmuster der Interphasekerne eine eindeutige Unterscheidung zwischen reaktiven und neoplastischen Zellen aus menschlichen Ergüssen erlaubt.

4.3.1 AgNOR-Zählung

Bei der *manuellen AgNOR-Zählung* stellte sich die Möglichkeit, multimodal in die Ansicht einer anderen Färbung (Feulgen) umzuschalten, als sehr hilfreich heraus. So konnte vermieden werden, außerhalb der Nukleolen angefärbte Strukturen/Artefakte mitzuzählen und so ein falsch hohes Ergebnis zu verursachen. Zudem konnte leichter zwischen in Gruppen gelegenen Satelliten und in Nukleolen gelegenen Clustern differenziert werden. Durch einfaches Durchfokussieren wurden argyrophile Regionen, die sich ober- und unterhalb der Kernregion befanden, bei der Zählung ausgeklammert. Dennoch ist es nicht auszuschließen, dass im Einzelnen Satelliten mitgezählt wurden, die sich zwar innerhalb der zweidimensionalen, horizontalen Abmessung der Kernregion befanden, jedoch ober- oder unterhalb der vertikalen Ausdehnung lagen. Somit ist eine minimal zu hoch ermittelte AgNOR-Gesamtzahl vorstellbar.

Da mittels DNA-Zytometrie Aneuploidie (Stammlinien- oder Einzelzellaneuploidie) in Mesotheliomzellen nur in 58,8% (Motherby et al., 1998) nachgewiesen werden kann, ist die AgNOR-Analyse speziell bei der Differenzierung zwischen neoplastischen und reaktiven Mesothelzellen bedeutsam.

Unsere Messungen ergaben, dass in allen durch Mesotheliome oder metastatische Absiedlungen bedingten Ergussproben visuell im Mittel mehr als 5,10 AgNORs (Cluster und Satelliten aufsummiert) pro Zellkern erkennbar waren. Die Ergüsse ohne Tumorbefund zeigten nur in einem einzigen Fall einen solch hohen Wert (5,45). So konnte ein Schwellenwert von 5,10 festgelegt werden, mit dem die Detektion von Malignität beinahe fehlerlos gelang. Folglich konnten mit diesem Schwellenwert acht der neun Tumorzell-freien Proben als benigne eingestuft werden. Auch die zwei auswertbaren zytomorphologisch dringend verdächtigen Präparate konnten so in die korrekte diagnostische Kategorie eingeordnet werden.

Tendenziell lag die AgNOR-Summe pro Zellkern bei den Karzinosen (7,99+/-1,15) in einem höheren Wertebereich als die der Mesotheliome (6,79+/-1,16). Eine genauere differentialdiagnostische Einordnung der malignen Zellen in metastatische und Mesotheliom-Zellen ist aber aufgrund mangelnder Trennschärfe nicht möglich.

Arbeiten, in denen AgNOR-Ergebnisse mit dem DNA-Flow-zytometrisch erfassten Ploidiestatus in Beziehung gesetzt wurden, fanden in DNA-aneuploiden Malignomen (Mesotheliomen und Karzinosen) höhere AgNOR-Werte als in diploiden (Huang et al., 1994; Carillo et al., 1994). Diese Beobachtung konnte in unserer Arbeit nicht bestätigt werden. Die parallele Erfassung zweier unabhängiger

Malignitätsparameter liefert dabei eine höhere diagnostische Sicherheit. Es gab größere Überlappungen der Wertebereiche von Mesotheliomen und Karzinosen, so dass trotz durchschnittlich höherer Mittelwerte für die Summe aus Satelliten und Clustern bei den Karzinosen kein Trennwert ermittelbar war, mit Hilfe dessen eine diagnostische Unterscheidung zwischen Mesotheliomen und Karzinosen möglich gewesen wäre.

Somit ist die Ermittlung der AgNOR-Gesamtzahl ein geeigneter Parameter zur Steigerung der Treffsicherheit in der Detektion von neoplastischen Zellen bzw. der Differenzierung hyperplastischer Zellen von Mesotheliomzellen. Zu diesem Ergebnis kommen auch andere Autoren (Pomjanski et al., 2001; Derenzini et al., 1989; Bethwaite et al., 1995).

Bei der *automatischen AgNOR-Zählung* lagen in allen Diagnosegruppen die automatisch erfassten AgNORs mit 6,92 (SD 2,92) höher als die manuell erfassten Regionen mit 5,83 (SD 2,26). Diese Abweichung findet ihre Begründung in der unterschiedlichen Zählweise: Die Software traf keine Unterscheidung zwischen Clustern und Satelliten. Jede detektierte argyrophile Struktur wurde als gesonderte Einheit gewertet. Im Gegensatz dazu wurden in der manuellen Auswertung jedes AgNOR-Cluster und jeder AgNOR-Satellit als je eine Einheit gezählt.

Da bisher die automatische Detektion anhand von zweidimensionalen Aufnahmen durchgeführt wurde, konnten keine argyrophilen Strukturen erfasst werden, die sich ober- oder unterhalb der fotografierten Ausdehnung des Zellkernes befanden. Somit entgehen einzelne Strukturen der automatischen AgNOR-Zählung. Dagegen konnten mittels Durchfokussierens in der manuellen Auszählung auch argyrophile Strukturen ober- und unterhalb der fotografierten Zellebene erfasst werden.

In allen Diagnosegruppen lag der Mittelwert der automatischen Zählung an den manuell bereits ausgewerteten Zellen etwas höher als an allen auswertbaren Zellen (R: 5,18 +/- 1,25 und 4,73 +/- 1,41; K: 7,90 +/- 4,97 und 6,34 +/- 3,82; M: 6,19 +/- 1,31 und 6,11 +/- 1,95). Trotz der tendenziell höheren AgNOR-Zahlen in neoplastischen Präparaten ist aber keine diagnostische Trennung der malignen von den benignen Proben möglich. In der automatischen Zählung lässt die starke Überschneidung der Ergebnisse der verschiedenen Diagnosegruppen keine Unterscheidung zwischen diesen zu.

Aufgrund der unterschiedlichen Zählweise (in der automatischen Detektion keine Klassifizierung der NORs in Cluster und Satelliten im Gegensatz zur manuellen Auswertung) kann ein statistisch relevanter Vergleich beider Ergebnisse (manuell und

automatisch) nicht vorgenommen werden. Da eine automatische AgNOR-Zählung aufgrund der Zeit- und Personalsparnis grundsätzlich erstrebenswert ist, sollte die Weiterentwicklung der Software eine Differenzierung zwischen Satelliten und Clustern zum Ziel haben. Mit einem verbesserten Nukleolendetektions- und Formationserkennungsalgorithmus in Kombination mit einer Erfassung der Dreidimensionalität der Zellkerne sollte auch eine Minimierung detektierter Artefakte bzw. deren Identifikation als solche gelingen. Unter diesen Voraussetzungen kann dann eine Überprüfung des Zählalgorithmus erfolgen.

Unsere Untersuchungen stützen die in der Literatur überwiegend positive Einstellung gegenüber der diagnostischen Relevanz der AgNOR-Analyse von Körperhöhlen-Ergüssen. Schon 1992 beschrieb die Arbeitsgruppe um Martin (Martin et al., 1992) eine Vergesellschaftung von zunehmender AgNOR-Zahl und –Fläche mit steigender Malignität. Weitere Untersuchungen bestätigen die Annahme, dass mittels der AgNOR-Analyse die Identifikation weniger neoplastischer Zellen in Ergussedimenten gelingt, vor allem zur Abgrenzung hyperplastischer Mesothelien von malignen Mesotheliomen (Pomjanski, 2001).

In Übereinstimmung mit der Literatur zeigte sich in unseren Untersuchungen eine erhöhte AgNOR-Zahl in hochproliferativen malignen Zellen, unabhängig von der Histogenese (Mesotheliom oder Absiedlung eines anderen Tumors). Es gibt aber keine Absolutzahlen, von denen man völlig fehlerfrei auf die Dignität der untersuchten Zellen schließen kann. Besonders auch an mit der konventionellen Zytologie als zweifelhaft befundenen Präparaten lässt sich der Anteil weiterhin unklarer Diagnosen weiter einschränken. Die AgNOR-Analyse kann selbst durch in der Zytologie unerfahrene Untersucher oder durch eine geeignete Software vorgenommen werden und so zu reproduzierbaren Ergebnissen führen.

4.3.2 AgNOR-Fläche

Die automatische AgNOR-Flächenberechnung erfolgte an allen auswertbaren, bereits mittels DNA-Analyse untersuchten Zellkernen. Dabei wurden die Flächen aller detektierten argyrophilen Strukturen in Zellkernen - ohne Unterscheidung zwischen Cluster und Satellit - addiert.

Der größte durchschnittliche Mittelwert der absoluten AgNOR-Fläche wurde für die Mesotheliom-Fälle ermittelt ($13,8 \pm 5,9 \mu\text{m}^2$), gefolgt von den Karzinosen ($10,8 \pm 6,0 \mu\text{m}^2$) und den reaktiven Ergüssen ($10,6 \pm 3,3 \mu\text{m}^2$). Wegen großer Überlappungen der Wertebereiche konnte kein Schwellenwert ermittelt werden, mit dem eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Diagnosegruppen oder zwischen benignen und malignen Präparaten möglich ist. Die Korrektheit der automatisch detektierten AgNOR-Flächen konnte allerdings nicht überprüft werden.

Die Mittelwerte der relativen AgNOR-Flächen schwanken in allen Fällen zwischen 0,1% (Karzinosen) und 0,2% (Reaktive und Mesotheliome) und lassen daher auch keine Dignitätsbestimmung zu.

Zwar haben die Kerne der Karzinosepräparate im Durchschnitt eine weitaus größere Ausdehnung als die anderen Diagnosegruppen. Aufgrund der großen Streuung um diesen Mittelwert gelingt aber keine Differenzierung zwischen maligne und benigne. Mit einem Schwellenwert von $85 \mu\text{m}^2$ ließen sich dennoch acht der neun reaktiven Ergüsse (88,9%) von sechs der sieben Karzinoseproben (85,7%) unterscheiden und richtig klassifizieren. Da diese Unterscheidung aber schon aufgrund morphologischer Merkmale gelingt, bringt dieser Schwellenwert keinen weiteren diagnostischen Vorteil.

Laut Rüschoff (1992) ist in zytologischen Ausstrichen die Bestimmung der Gesamt-AgNOR-Fläche im Zellkern der einfachen Auszählung der einzelnen AgNOR-Partikel überlegen. Unsere Daten stützen diese Einschätzung nicht. Eine annähernd fehlerlose Differenzierung zwischen malignen und benignen Proben gelang nur mit einem Schwellenwert von 5,10 in der manuellen Zählung der NORs. In der automatischen Zählung konnte kein klassifizierender Cut off-Wert gefunden werden.

Die bisherigen visuellen Beurteilungen liefern kaum quantifizierbare Ergebnisse und können nur subjektive Einschätzungen wiedergeben. Die mittels des neu entwickelten Algorithmus lieferbaren Daten über Fläche, Position und Größe der AgNORs könnten einen Beitrag zu einer genaueren und frühzeitigeren Krebsdiagnostik leisten (Aschenborn, 2004).

5 Multimodalität

Durch einen frühzeitigen Einsatz adjuvanter Methoden lassen sich die Folgekosten bei zu später Diagnose einer malignen Erkrankung deutlich senken. Zur Abklärung der Dignität eines Ergusses erscheint besonders bei zytodiagnostisch unklaren Fällen das Hinzuziehen von adjuvanten Methoden wie der DNA-Zytometrie sowie der AgNOR-Analyse sinnvoll, da möglicherweise ein zytomorphologisch noch nicht wahrnehmbares Frühstadium einer Neoplasie vorliegt. Mittels DNA-Zytometrie ist zudem ein Malignitätsgrading möglich, welches durch eine Verlaufbeobachtung die Festlegung eines optimalen Therapiebeginns erlaubt.

Das neu entwickelte System der Multimodalen Zellanalyse weist eine gute Funktionalität und Messpräzision auf. Eine Fortentwicklung einzelner Algorithmen im Hinblick auf eine noch größere Präzision und eine geringere Dauer einzelnen Arbeitsprozesse ist allerdings erforderlich. Unsere Daten zeigen, dass mit verbesserter Messpräzision der DNA-Analyse und kombinierter Anwendung verschiedener adjuvanter Messmethoden entsprechend der vorgestellten MMZA eine Steigerung der diagnostischen Treffsicherheit mit Erhöhung der Detektionsrate maligner Proben sowie eine Reduktion unklarer zytologischer Diagnosen möglich sind. Durch eine zunehmende Automatisierung des Untersuchungsganges könnte eine Ausweitung der Messungen im Sinne eines Screenings erfolgen.

Die entscheidende Verbesserung durch einen frühzeitigen Einsatz der adjuvanten Methoden liegt in der rechtzeitigen/schnelleren und nahezu fehlerlosen Diagnostik der zugrundeliegenden Erkrankung. Dadurch kann zum einen der Kliniker dem ethischen Anspruch nach einer korrekten und schnellen Diagnostik gerecht werden, zum anderen können auch die Folgekosten durch eine verspätete Diagnosestellung gesenkt werden. Gerade bei Ergussproben, deren Dignität nicht eindeutig durch alleinige visuelle Begutachtung geklärt werden kann, erscheint das Hinzuziehen mehrerer Untersuchungsmethoden sinnvoll zu sein. Durch die Chance, ansonsten noch nicht erfassbare, aber kurativ behandelbare Frühstadien einer malignen Erkrankung zu entdecken, ist auch ein breiterer Einsatz der MMZA gerechtfertigt. Da mittels DNA-Zytometrie ein Malignitätsgrading durchführbar ist, kann die Therapie dem jeweiligen Stadium optimal angepasst werden, so dass auch dadurch die Heilungschancen steigen.

Allerdings lässt sich die diagnostische Treffsicherheit nicht allein durch eine Verbesserung zytopathologischer Untersuchungsmethoden steigern, denn in etwa einem

Drittel der Fälle wird durch einen Beobachtungsfehler (screening error) eine falsch-negative Diagnose gestellt (Motherby et al., 1999).

Die DNA-Zytometrie ist zwar ein zeitaufwendiges Verfahren und erfordert eine zytologische Expertise, ermöglicht jedoch eine retrospektive Anwendung, unabhängig von vorangegangenen Fixationsarten, Färbungen und Alter der eventuell schon archivierten Probe.

Unseren Ergebnissen zufolge gelingt mit dem *MMZA-System* eine stufenweise Diagnosefindung, bei der der verbleibende Unsicherheitsbereich zwischen Benignität und Malignität allmählich schrumpft. So können falsch negative und falsch positive Diagnosen auf ein tolerables Maß minimiert werden. Ein signifikanter Anstieg der diagnostischen *Treffsicherheit*, speziell in zytologisch unklaren Fällen, ist dadurch möglich. Den Patienten wird Verunsicherung und Leid bei der Diagnosefindung erspart. Unnötige Operationen können eingespart werden. Durch eine *frühzeitige und exakte Krebsdiagnostik* ist eine daraufhin durchgeführte Therapie aussichtsreicher und kosteneffizienter.

Die am *LfB* neu entwickelten *Bildverarbeitungsalgorithmen* für die Bearbeitung und Analyse des Bildmaterials sind wertvolle Grundlagen für eine Weiterentwicklung hin zu einem routinetauglichen Prototyp (Würflinger et al., 2003a und b; Meyer-Ebrecht et al., 2003).

Die geplante *vollautomatische Relokalisation* der Zellen in den verschiedenen Färbungen stellt den nächsten Schritt auf diesem Weg dar. Nach einer Vorsegmentierung der aktuellen Zellszene vergleicht der Rechner das aktuelle Bild mit Bildern aus der Datenbank, bis identische Zellkern-Gruppierungen erkannt werden. Voraussetzung dafür ist ein funktionsfähiger *Autofokus*. Gelingt das „Matching“ nicht, erfolgt die Suche nach den entsprechenden Zellen in der näheren Umgebung. Ropers (2004) zeigte, dass demgemäß ein exaktes *Relokalisieren* und *Koregistrieren* möglich ist.

Die bisher manuell durchgeführte *Klassifikation* in Mess- und Referenzzellen soll zukünftig ebenfalls *automatisch* ablaufen. Die von uns gesammelten Daten werden zukünftig für die Entwicklung eines Klassifikationsalgorithmus verwendet.

Die Mitarbeiter des Lehrstuhls für Bildverarbeitung sind ebenfalls bemüht, die *automatisierte AgNOR-Zählung und –Flächenbestimmung* durch die Anwendung eines verbesserten *Nukleolendetektionsalgorithmus* zu präzisieren.

Mittels automatischen Durchfokussierens und Fotografierens in mehreren Ebenen soll eine *dreidimensionale Darstellung* der Zellkerne ermöglicht werden.

Auch eine *Erweiterung* des MMZA-Systems um einzelne Krebszellmarker, wie etwa *immunzytochemische Tracer*, ist denkbar.

Durch die angestrebte schrittweise *Automation* einzelner Arbeitsschritte wird eine schnellere und kostengünstigere Untersuchung durchführbar. Bei weiterer Verbesserung der Gebrauchstauglichkeit würde sich das MMZA-System für den Einsatz in der klinischen Routine eignen. Der Einsatz des MMZA-Systems könnte so ein zuverlässiges und bezahlbares Krebscreening, vor allem bei Risikogruppen wie (beruflich) Asbestexponierten, ermöglichen.

V Zusammenfassung

Es sind mehr als 50 verschiedene Erkrankungen bekannt, die mit einer *Ergussbildung* in serösen Körperhöhlen einhergehen. Bis zu 45% aller Ergüsse enthalten *Tumorzellen*. In einem Drittel der Fälle gibt die zytopathologische Untersuchung den ersten Hinweis auf eine Tumorerkrankung (Bedrossian, 1994). Die *diagnostische Abklärung* der Dignität des Ergusses mittels zytomorphologischer Kriterien ist jedoch oftmals sehr schwierig. Die Sensitivität der zytologischen Diagnostik von serösen Ergüssen ist mit 58% im Literaturdurchschnitt daher unbefriedigend (Spriggs und Boddington, 1989).

Das am Lehrstuhl für Bildverarbeitung der RWTH Aachen entwickelte *Labormuster des MMZA-Systems* besteht aus einem computergesteuerten Messmikroskop, einer CCD-Kamera und einem mit der neu entwickelten Bildverarbeitungssoftware ausgestatteten Rechner.

Untersucht wurden 11 reaktive Ergüsse, 13 Karzinosen und 11 Mesotheliome. Zunächst wurden *Fotos* von diagnostisch relevanten Mesothelzellen in der MGG-Färbung gemacht. Nach der Umfärbung nach Feulgen erfolgte die *DNA-Analyse* der relokalierten und Software-unterstützt segmentierten Zellen. Zuletzt fanden die *manuelle Auszählung der AgNORs* sowie eine *automatische AgNOR-Zählung und – Flächenbestimmung* mittels eines neu entwickelten Softwarealgorithmus statt.

Im Zuge des Vergleichs der Messpräzision des AutoCyte QUIC-DNA- und des MMZA-Systems wurden DNA-zytometrische Messungen an drei *Rattenleberpräparaten* durchgeführt. Dabei erzielte das MMZA-System ausschließlich Ergebnisse in dem von der *ESACP* geforderten Bereich, wohingegen die mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System erreichten Resultate diesen teilweise überschritten.

Die *DNA-Analyse* ergab beim Vergleich beider Systeme bezüglich der *DNA-Ploidie* Differenzen in drei Fällen (1 Karzinose, 2 Mesotheliome). Bei den *reaktiven Ergüssen* wurden alle Ausstriche von beiden Untersuchern als DNA-euploid gewertet. Bei den *Karzinosen* wurde am LfB DNA-Aneuploidie in 9 Fällen festgestellt, am IfC in 10 Fällen. Bei der Untersuchung der *Mesotheliompräparate* waren laut Messung am LfB 36,36% der Proben aneuploid, am IfC 54,55%. 40% (2 von 5 Proben) der zytomorphologisch initial nicht eindeutig beurteilbaren Fälle konnten durch die Feststellung von DNA-Aneuploidie als eindeutig maligne eingestuft werden.

Beim Vergleich der *DNA-Stammlinienzahl* und *-größe* zeigten sich Abweichungen in 9,09% der reaktiven Ergüsse, in 69,23% der Karzinosen und in 45,45% der Mesotheliome. Die Modalwerte beider Untersuchungen wiesen insgesamt eine Korrelation von $r= 0,98$ auf. Die Streuung der Modalwerte um 2,00c bei den diploiden reaktiven Ergussproben war bei den MMZA-Messungen mit 2,03c +/-0,10c geringer als bei den AutoCyte-Messungen mit 2,07c +/-0,12c. Die *Variationskoeffizienten* (CV) der Referenzzellen lagen am LfB im Mittel um 1,06% höher als am IfC.

Bei der *manuellen AgNOR-Zählung* konnte nur ein Schwellenwert von 5,10 (Cluster + Satelliten) für die Unterscheidung zwischen reaktiven und tumorbedingten Proben festgestellt werden. Mit Hilfe der *automatischen AgNOR-Zählung* ist keine diagnostische Trennung der malignen von den benignen Proben möglich gewesen. Bei der softwaregestützten Berechnung der *absoluten und relativen AgNOR-Fläche* konnte wegen großer Streuwerte kein Schwellenwert für die Differenzierung zwischen den verschiedenen Diagnosegruppen festgelegt werden.

Das am LfB neu entwickelte *MMZA-System* ist zwar funktionsfähig, jedoch für den diagnostischen Routineeinsatz noch nicht einsatzbereit. Werden die beschriebenen Unzulänglichkeiten behoben und der gesamte Arbeitsablauf beschleunigt, so kann das MMZA-System einen erheblichen Beitrag zu einer verbesserten Krebsdiagnostik leisten.

Literaturverzeichnis

- Achenbach W: Rationale Praxis-Onkologie. Balingen: Demeter-Verlag im Spitta-Verlag, 1997.
- Aides JG, Crocker JG, Skilbeck NQ: Differentiation of malignant from normal and reactive mesothelial cells by the argyrophil technique for nucleolar organizer region associated proteins. *Thorax* 1988; 43: 366-370.
- Anderson CB, Philpott GW, Ferguson TB: The treatment of malignant pleural effusions. *Cancer* 1974; 33: 916-922.
- Antonangelo L, Saldiva PH, Amaro E, Capelozzi VL: Utility of computerized morphometry combined with AgNOR staining in distinguishing benign from malignant pleural effusions. *Anal Quant Cytol Histol* 1994; 16(4): 247-252.
- Aschenborn P: Automatische Analyse der AgNORs in Ag-gefärbten Mikroskoppräparaten von Zellabstrichen für die Krebsdiagnostik. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Meßtechnik und Bildverarbeitung der RWTH-Aachen 2004.
- Auer GU, Bäckdahl M, Forsslund GM, Askensten UG. Ploidy levels in nonneoplastic thyroid cells. *Analyt Quant Cytol Histol* 1985; 7: 97-105.
- Auffermann W, Repges R, Böcking A: Rapid Diagnostic DNA Cytometry with an Automatic Microscope and a TV Image-Analysis System. *Analytical And Quantitative Cytology* 1984; Vol. 6 No. 3: 179-188.
- Auffermann, W, Böcking, A: Early Detection of Precancerous Lesions in Dysplasias of the Lung by Rapid DNA Image Cytometry. *AQCH* 1985; Vol. 7 No. 3: 218-226.
- Averbach AM, Sugarbaker PH: Peritoneal mesothelioma: treatment approach based on natural history. *Cancer Treat Res* 1996; 81: 193-211.
- Ayres JB, Crocker JB, Skilbeck NQ: Differentiation of malignant from normal and reactive mesothelial cells by the argyrophil technique for nucleolar organizer region associated proteins. *Thorax* 1988; 43(5): 366-370.
- Banks ER, Jennings CD, Jacobs S, Davey DD: Comparative Assessment of DNA Analysis in Effusions by Image Analysis and Flow Cytometry. *Diagn Cytopathol* 1994; 10: 62-67.
- Battifora H, McCaughey WTE: Tumors of the serosal membranes. *Atlas of Tumor Pathology*. Washington, D.C., USA: Armed Forces Institute of Pathology, 1995.
- Bedrossian CWM: Diagnostic problems in serous effusions. *Diagn Cytopathol* 1998; 19(2): 131-137.
- Bedrossian CWM: Malignant effusions. A multimodal approach to cytologic diagnosis. Hrsg.: Igaku-Shoin Medical Publishers: New York, Tokio, 1994.

- Bethwaite PB, Delahunt B, Holloway LJ, Thornton A: Comparison of silver-staining nucleolar organizer region (AgNOR) counts and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in reactive mesothelial hyperplasia and malignant mesothelioma. *Pathology* 1995; 27(1): 1-4.
- Bibbo M: *Comprehensive Cytopathology*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1991; 541-614.
- Biesterfeld S, Gerres K, Fischer-Wein G, Böcking A: Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J Clin Pathol* 1994; 47: 38-42.
- Bigras G, Marcelpoil R, Brambilla E, Brugal G: Interest of targeting AgNORs measurement in cycling cells: in vivo cell kinetic evaluation of non-small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol* 1996; 11: 183-198.
- Bjermer L, Gruber A, Sue-Chu M, Sandström T, Eksborg S, Hendriksson R: Effects of intrapleural mitoxantrone and mepacrine on malignant pleural effusion – a randomized study. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 2203-2208.
- Blake A, Isard M. *Active contours*. Springer; 1998.
- Böcking A, Meyer-Ebrecht D, Stockhausen J: Verfahren zur Zellanalyse und Zellanalyseeinrichtung. DE 101 28 552.3. Patentanmeldung.
- Böcking A, Chatelain MD, Homge M: Representativity and Reproducibility of DNA Malignancy Grading in Different Carcinomas. *Analyt Quant Cytol Histol* 1989 11(2):81-86.
- Böcking A, Freudenberg N: Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Pathologe* 1998a; 19: 235-236.
- Böcking A, Giroud F, Reith A: Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology task force on standardization of diagnostic DNA-image cytometry. *Anal Cell Pathol* 1995b; 8: 67-74.
- Böcking A, Rüschoff J: European Consensus on Standardized AgNOR Analysis in Cytopathology. *Anal Cell Pathol* 1999; 19: 51-52.
- Böcking A, Stockhausen J, Meyer-Ebrecht D: Multimodal and molecular measurements of markers and morphology (5M): Towards a single cell cancer diagnosis. *Cellular Oncology* 2004; 26: 73-79.
- Böcking A, Adler C-P, Common H: Algorithm for a DNA-Cytophotometric Diagnosis and Grading of Malignancy. *Anal Quant Cytol* 1984; 6(1):1-8.
- Böcking A, Nguyen Vu Quoc Huy: Diagnostic and Prognostic Use of DNA Image Cytometry in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Invasive Carcinoma. *Cancer Cytopathology* 2004; 102(1): 41-54.
- Böcking A. DNA measurement when and why? In: Wied GL, Keebler CM, Rosenthal DL, Schenk U (eds): *Compendium on quality assurance, proficiency testing and workload*

- limitations in clinical cytology. *Tutorials of Cytology*, Chicago, Illinois, USA 1995a; 170-188.
- Böcking A: Cytopathologie. In: Thomas C, Hrsg.: *Lehrbuch der Histopathologie*. 12. Auflage, FK Schattauer Verlag, Stuttgart – New York. 1998; pp 411-436.
- Böcking A: Progress in diagnostic pathology by quantification. *Anal Cell Pathol* 1994; 6:1-2.
- Böcking A: Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA-Zytometrie. *Dt Ärztebl* 1998c; 12: 1-5.
- Böcking A, Striepecke E, Auer H, Füzesi L: Static DNA Cytometry: Biological Background, Technique and Diagnostic Interpretation. In: *Compendium on the Computerized Cytology and Histology Laboratory*. Edited by GL Wied, PH Bartes, DL Rosenthal, U Schenck. *Chicago Tutorials of Cytology*. 1994: 107-128.
- Böcking A: Die Bedeutung der statischen DNA-Zytometrie bei Dysplasien des Plattenepithels. *Fortschritt und Forschung in der Medizin* 1997/98; 21: 41-49.
- Böcking A: Identifizierung progredienter Dysplasien des Plattenepithels mittels DNA-Bildzytometrie. *MTA Dialog* 2002; 6: 490-494.
- Böcking A, Motherby H, Pomjanski N: Treffsicherheit der Ergusszytologie samt adjuvanten Untersuchungsmethoden. *Dt Ärztebl* 2000; 97: 2626-2630.
- Boon ME, Veldhuizen RW, Ruinaard C, Snieders MW, Kwee WS: Qualitative distinctive differences between the vacuoles of mesothelioma cells from metastatic carcinoma exfoliated in pleural fluid. *Acta Cytol* 1984; 28: 443-449.
- Boutin C and Rey F: Thoracoscopy in pleural malignant mesothelioma: a prospective study of 188 consecutive patients. *Cancer* 1993; 72(2): 389-393.
- Brockmann M, Fischer M, Birsan E, Müller K-M: Das Pleuramesotheliom (Versicherungsmedizinische Aspekte) *Kompaß* 1990; 11: 562-564.
- Busch H, Lischwe MA, Michalik J, Chan PK, Busch RK: Nucleolar proteins of special interest: silver-staining proteins B23 and C23 and antigens of human tumor nucleoli. In: Jordan EG, Cullis CA, eds. *The nucleolus*. Cambridge University Press, 1982: 43-72N.
- Carillo R, Sneige W, El-Naggar A: Interphase nucleolar organizer regions in evaluation of serosal cavity effusions. *Acta Cytol* 1994; 38(3): 367-372.
- Chatelain R, Willms A, Biesterfeld ST, Auffermann W, Böcking A: Automated Feulgen staining with a temperature controlled staining machine. *Analyt Quant Cytol Histol* 1989; 11: 211-217.
- Chretien J, Letourneux M: Pleural mesotheliomas. In: Chretien J, Hirsch A (eds) : *Diseases of the pleura*. Masson Publishing USA, New York 1983.
- Classen M, Diehl V, Kochsiek K: *Innere Medizin* 3. Auflage, Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore 1994.

- Colecchia M, Agnelli T, Caronni E, Leopardi O: Usefulness of morphometry and AgNOR counts to differentiate reactive and malignant mesothelial cells in pleural fluids. *Pathology* 1991; 83: 89-97.
- Colecchia M, Leopardi O: Evaluation of AgNOR count in distinguishing benign from malignant mesothelial cells in pleural fluids. *Pathol Res Pract* 1992; 188(4-5): 541-544.
- Crocker J, Boldy DA, Egan MJ: How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 1989; 158: 185-118.
- Crocker J, Nar P: Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 1987; 151:111-118.
- Croonen AM, Van der Valk P, Herman CJ, Lindeman J: Cytology, immunopathology and flow cytometry in the diagnosis of pleural and peritoneal effusions. *Lab* 1988; 58: 725-732.
- Dejmek A, Strömberg C, Wiström B, Hjerpe A: Prognostic importance of the DNA ploidy pattern in malignant mesothelioma of the pleura. *Analyt Quant Cytol Histol* 1992; 14: 217-221.
- Derenzini M, Betts CM, Ceccarelli C, Eusebi V: Ultrastructural organization of nucleoli in benign naevi and malignant melanomas. *Virch Arch B* 1986; 52: 343-352.
- Derenzini M, Nardi F, Farabegoli F, Ottenetti A, Roncaroli F, Bussolati G: Distribution of silver-stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from non-neoplastic reactive cells in human effusions. *Acta Cytol* 1989a; 33: 491-498.
- Derenzini M, Pession A, Farabegoli F, Tere D, Badiali M, Dehan P: Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. *Am J Pathol* 1989b; 134: 925-932.
- Derenzini M, Romagnoli T, Mingazzini P, Marinozzi V: Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. *Virchows Arch B* 1988; 54: 334-340.
- Fakan S, Hernandez Verdun D: The nucleolus and the nucleolar organizer regions. *Biol Cell* 1986; 56: 189-205.
- Feichter G, Dalquen P, Remmele W: *Pathologie; Bd. 8: Zytopathologie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2000.
- Feulgen R, Rossenbeck H: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1924; 135: 203-248
- Fischler DF, Wongbunnate S, Johnston DA, Katz RL: DNA content by image analysis. An accurate discriminator of malignancy in pericardial effusions. *Analyt Quant Histol* 1994;16(3):167-173.

- Freni SC, James J, Prop FJA: Tumor diagnosis in pleural and ascitic effusions based on DNA Cytophotometry. *Acta Cytol* 1971; 15(2): 154-162.
- Füzesi I: Zytogenetik und DNA-Zytometrie der Tumorprogression bei Nierenzellkarzinomen. *Med Habil Schrift RWTH Aachen* 1993.
- Gatzemeier U, Magnussen H: Diagnostik und Differentialdiagnostik von Pleuraergüssen. In: Hossfeld DK (Hrsg) *Maligne Ergüsse Pleura – Peritoneum – Pericard*. München: Karger Verlag 1988 31-42.
- Geisler L. und Magnussen H.: Krankheiten der Atemwege und der Lunge. In: Schettler G. und Greten H. (Hrsg) *Innere Medizin, Band II*. 8. Aufl. Stuttgart; New York: Thieme Verlag, 1990 1-69.
- Giroud F, Haroske A, Reith A, Böcking A: 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance. *Anal Cell Pathol* 1998; 17: 201-208.
- Gough IR, Balderson GA: Malignant ascites. A comparison of peritoneovenous shunting and nonoperative management. *Cancer* 1993; 71: 2377-2383.
- Grote HJ, Schmiemann V, Sarbia M, Böcking A: DNA extraction from bronchial aspirates for molecular cytology: Which method to take? *Anal Cell Pathol* 2003; 25: 83-88.
- Groth G, Gatzemeier U, Häußingen K, Heckmayr J, Magnussen H, Neuhaus, v. Pavel J: Intrapleural palliative treatment of malignant pleural effusions with mitoxantrone versus placebo (pleural tube alone). *Ann Oncol* 1991; 2: 213-215.
- Grothe HJ et al: Identification of progressive cervical epithelial cell abnormalities using DNA image cytometry. *J Cancer Cytopathol*, eingereicht
- Grundmann, E, 1984, Tumoren, 46-82, in: *Einführung in die Allgemeine Pathologie*, 4. Auflage Fischer, Stuttgart New York.
- Hafiz MA, Becker RL, Mikel UV, Bah GF: Cytophotometric determination of DNA in mesotheliomas and reactive mesothelial cells. *Analyt Quant Cytol Histol* 1988; 10(2): 120-126.
- Hafiz MA, Becker RL, Mikel UV, Bah GF: Cytophotometric determination of DNA in mesotheliomas and reactive mesothelial cells. *Analyt Quant Cytol Histol* 1996; 18:68.
- Hansteen IL, Hilt B, Lien JT, Skaug V, Haugen A: Karyotypic changes in the preclinical and subsequent stages of malignant mesothelioma: a case report. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 70: 94-98.
- Haroske G, Baak JP, Danielsen H, Giroud F, Gschwendtner A, Oberholzer M, Reith A, Spieler P, Böcking A: Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Analytical Cellular Pathology* 2001; 23: 89-95.
- Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A: 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry (Part I and II). *Anal Cell Pathol* 1998; 17: 189-208.

- Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A: European Society for Analytical Cellular Pathology consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurements and interpretation. *Anal Cell Pathol* 1998; 17: 189-200.
- Haroske G, Meyer W, Oberholzer M: Competence on Demand in DNA Image Cytometry *Pathology Research and Practice* 2000; 196: 285-291.
- Haroske G, Meyer W, Theissig F, Kunze KD: DNA stemline and single-cell aneuploidy in static DNA cytometry: statistical approaches. *Analyt Quant Cytol Histol* 1996; 18:68.
- Haroske G, Meyer W, Theissig F, Kunze KD: Increase of precision and accuracy of DNA Cytometry by correcting diffraction and glare errors. *Anal Cell Pathol* 1992; 9: 1-12.
- Hausheer F, Yabro J: Diagnosis and treatment of malignant pleural effusions. *Semin Oncol* 1985; 12(1): 54-75.
- Hedley DW, Philips J, Rugg CA, Taylor IW: Measurement of DNA content as an adjunct to diagnostic cytology in malignant effusions. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984; 20(6): 749-752.
- Heim S, Mitelman F: *Cancer Cytogenetics*. New York, Liss, 1987, pp 239-240.
- Hentrich M, Hartenstein R: Behandlung maligner Körperhöhlenergüsse. *Internist* 1997; 38; 794-804.
- Hillerdal G: Malignant mesothelioma 1982: Review of 4710 published cases. *Br J Dis Chest* 1983; 77: 321-343.
- Huang MS, Tsai MS, Hwang JJ, Wang TH: Comparison of nucleolar organizer regions and DNA flow cytometry in the evaluation of pleural effusions. *Thorax* 1994; 49(11): 1152-1156.
- Isobe H, Sridhar KS, Doria R, Cohen F, Raub WA, Saldana M, Krishan A: Prognostic significance of DNA aneuploidy in diffuse malignant mesothelioma. *Cytometry* 1995; 19: 86-91.
- Jan-Mohamed RM, Armstrong SJ, Crocker J: Rapid Communication - The Relationship between Number of Interphase NORs and NOR-Bearing Chromosomes in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Journal Of Pathology* 1989; 158: 3-7.
- Jordan G: At the heart of the nucleolus. *Nature* 1987; 329: 489-490.
- Joseph MG, Banerjee D, Harris P, Gibson S, McFadden RG: Multiparameter flow cytometric DNA analysis of effusions: a prospective study of 36 cases compared with routine cytology and immunohistochemistry. *Modern Pathol* 1995; 8(6): 686-693.
- Kapusta L, Zbieranoski I, Demianiuk C, Murray D: The role of DNA flow and image cytometry in the evaluation of body cavity fluids. *Analyt Quant Cytol Histol* 1991; 13: 187-192.

- Kindermann D, Hilgers CH: Glare-correction in DNA cytometry. *Analytical Cellular Pathology* 1994; 6: 156-180.
- Konietzko N.: Asbestassozierte Erkrankungen der Pleura. In: Rühle K.-H. (Hrsg) *Pleuraerkrankungen*. Stuttgart: W. Kohlhammer GmbH, 1997 140-151.
- Koss LG: *Diagnostic Cytology and its histopathologic bases*. 4th ed., Philadelphia: JB Lippincott Company, 1992.
- Light RW: Diagnostic principles in pleura disease. *Eur Respir J* 1997; 10: 219-225.
- Light RW: *Pleura Diseases*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990.
- Lin MS, Chong IW, Hwang JJ, Tsai MS: Nucleolar organizer regions in smears of pleural effusion. *Kao-Hsiung-I-Hsueh-Ko Hsueh-Tsa-Chih*. 1994; 10819: 16-21.
- Loddenkemper R: Pleuraerkrankungen. In: Ferlinz, R (Hrsg) *Pneumologie in Praxis und Klinik*. Stuttgart; New York: Thieme Verlag, 1994 712-752.
- Ma GY, Barlett DL, Reed E, Figg WD, Lush RM, Lee KB, Libutti SK, Alexander HR: Continuous hyperthermic peritoneal perfusion with cisplatin for the treatment of peritoneal mesothelioma. *Cancer J Sci Am* 1997; 3: 174-179.
- Martin H, Hufnagl P, Beil M, Wenzelides K, Gottschalk J, Rahn W: Nucleolar organizer region-associated proteins in cancer cells. Quantitative investigations on gliomas, meningiomas, urinary bladder carcinomas and pleural lesions. *Anal Quant Cytol Histol*, 1992; 14 (4):312-319.
- Matter-Walstra KW, Kraft R: Atypical cells in effusions: Diagnostic value of cell image analysis combined with immunochemistry. *Diagn Cytopathol* 1996; 15: 263-269.
- McDonald JC, Sebastien P, McDonald A, Case B: Epidemiological observations on mesothelioma in their implications for non-occupational exposure. *IARC Sci Publ* 1989; 90: 420-427.
- Meyer-Ebrecht D, Böcking A: Multimodal Cell Analysis: Digital Image Processing Enhances Cytologic Cancer Diagnosis. *IEEE BME Mag* (2003) eingereicht.
- Mohrmann W: Arbeitsmedizinisches Kolloquium Bad Reichenhall 1996. Mesotheliom – Aktuelle Aspekte 1996, 39: 11.
- Motherby H, Friedrichs N, Kube M, Nadjari B, Knops K, Donner A, Baschiera B, Dalquen P, Böcking A: Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in diagnostic effusion cytology. Part II. Diagnostic accuracy in equivocal smears. *Analytical Cellular Pathology* 1999; 19: 59-66.
- Motherby H, Kube M, Friedrichs N: Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in diagnostic effusion cytology. Part I . Prevalence of markers in tumor cell positive and negative smears. *Anal Cell Pathol* 1999; 19: 7-20.

- Motherby H, Marcy T, Hecker M, Ross B, Nadjari B, Auer H, Müller KM, Häussinger D, Strauer B-E, Böcking A: Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology. I: DNA aneuploidy for identification and differentiation of primary and secondary tumors of the serous membranes. *Anal Quant Cytol Histol* 1998; 20 (3): 153-161.
- Motherby H, Nadjari B, Remmerbach T, Marcy T, Pomjanskaja N, Müller W, Knops K, Häussinger D, Strauer B-E, Böcking A: Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology. II: DNA aneuploidy for identification of neoplastic in equivocal effusions. *Anal Quant Cytol Histol* 1998; 20(3): 162-168.
- Motherby H, Nadjari B, Friegel P, Kohaus H, Ramp U, Böcking A: Diagnostic accuracy of effusion cytology, *Diagn Cytopathol* 1999; 20 (6): 350-357.
- Motherby H, Pomjanski N, Kube M: Diagnostic DNA-flow- vs. -image-cytometry in effusion cytology. *Anal Cell Pathol* 2002;00: 1-11.
- Müller KM, Kusmann M: Asbestassoziierte Erkrankungen. *Dt. Ärzteblatt* 1996; 93 (9): 435-439.
- Müller W und Rühle KH: Laborchemische Untersuchungen. In: Rühle KH (Hrsg) *Pleuraerkrankungen*. Stuttgart; Berlin; Köln: W. Kohlhammer GmbH, 1997; 57-65.
- Müller, K M.: Pleura, 715-731, in Remmele W (Hrsg):*Pathologie*, 2.Auflage Springer, Berlin Heidelberg New York 1997.
- Okamura H, Shibuta H, Sakamura N, Kamei T, Satoh M, Kiyohiro M, Murakami I: Usefulness of AgNOR Count in Differentiating Malignant Cells from Reaktive Mesothelial Cells in Serous Effusions. *Acta Cytol* 1998; 42: 548.
- Orfao A, Gonzalez M, Ciudad J, Lopez-Berges MC, Lopez A, Vidriales B, Macedo A, San Miguel FJ: Cell cycle and DNA aneuploidy: Biological bases and terminology. In: Sampedro A, Orfao A (Hrsg): *DNA cytometric analysis*. Servicio de Publicaciones; Universidad de Oviedo 1993: 13-24.
- Parry WL, Hemstreet GP: Cancer detection by quantitative fluorescence image analysis. *J Urol* 1989; 139: 270-274.
- Parsons SL, Watson SA, Steele LJC: Malignant ascites. *Br J Surg* 1996; 83: 6-14.
- Pfitzer P.: Zytologie der Ergüsse. In: Schenk U. (Hrsg) *Klinische Zytologie*. München: Märkl-Druck, 1993 204-205.
- Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himberg G, Pigeon F, Adnett JJ: Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem Journal* 1986; 18: 5-14.
- Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himer G, Pigeon F, Adnet JJ: Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986; 18: 5-14.

- Pockros PJ, Esrason KT, Nguyen C, Duque J, Woods S: Mobilisation of malignant ascites with diuretics is dependent on ascitic fluid characteristics. *Gastroenterology* 1992; 193: 1302-1306.
- Pokieser L: Zytodiagnostik des malignen Pleuraergusses. In: Freudenberg N und Goertchen R (Hrsg) *Verh Dtsch Zyt 19*. Stuttgart; New York: G. Fischer Verlag, 45.
- Pomjanski N, Motherby H, Buckstegge B, Knops K, Rohn L, Böcking A: Early diagnosis of mesothelioma in serous effusions using AgNOR-analysis. *Analyt Quant Cytol Histol* 2001; 23(2): 151-160.
- Prakash UBS, Reimann HM: Comparison of needle biopsy with cytologic analysis for the evaluation of pleural effusion: analysis of 414 cases. *Mayo Clin Proc* 1985; 60: 158-164.
- Pyrhönen S, Tiainen M, Rautonen J, Tammilhto L, Laasonen A, Mattson K, Knuutila S: Comparison of DNA and karyotype ploidy in malignant mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 60: 8-13.
- Raithel HI, Kraus T, Hering KG, Lehnert G: Asbestbedingte Berufskrankheiten. *Dt. Ärzteblatt* 1996, 93(11): 546-553.
- Ravetto C, Colombo L, Dottorini M: Usefulness of fine-needle aspiration in the diagnosis of thyroid carcinoma: a retrospective study in 37,895 patients. *Cancer cytopathology* 2000; 90 (6): 357-363.
- Reeves BR; Casey G, Honeycombe JR, Smith S: Correlation of differentiation state and silver staining of nucleolar organizers in the promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 13: 159-166.
- Reimer G, Raska I, Tan EM, Scheer U: Human autoantibodies: probes for nucleolus structure and function. *Virchows Archiv B* 1987; 54: 131-143.
- Remmerbach (Statische DNA-Zytometrie als adjuvante Methode der konventionellen Zytodiagnostik von Ergüssen seröser Körperhöhlen. Dissertation 1998).
- Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, Böcking A: Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cytol Histol* 2001; 22: 211-221.
- Remmerbach, Thorsten W., Weidenbach, Horst, Müller, Conrad: Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal Cell Pathol* 2003; 25: 139-146.
- Renshaw AA, Dean BR, Antman KH, Sugarbaker DJ, Cibas ES: The role of cytologic evaluation of pleural fluid in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Chest* 1997; 111(1): 106-109.
- Reuß J, Schneider H: Sonographische Differentialdiagnostik. Rettenmaier G, Seitz K (Hrsg) Weinheim, Basel, Cambridge, New York, NY: Ed. Medizin, VCH, Bd II, 1992.

- Ribak J, Selikoff IJ: Survival of asbestos insulation workers with mesothelioma. *Br J Ind Med* 1992; 49: 732-735.
- Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage-aktualisierter Nachdruck. Stuttgart, New York: Thieme; 1999.
- Roberts C, Brasch J, Tattersall MH: Ribosomal RNA gene amplification: a selective advantage in tissue culture. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 29: 119-127.
- Rödelsperger K, Voitowitz H-J, Patzich R, Brückel B, Gosch V: Asbestfasern und Ferruginous Bodies in der menschlichen Lunge. *Staubreinhaltung der Luft* 1990; 50: 99-105.
- Ropers S-O: Automatische mikroskopische Relokalisation von Zellkern-Ensembles mit Hilfe eines multimodalen Szenenvergleichs. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Meßtechnik und Bildverarbeitung der RWTH-Aachen 2004.
- Ruckdeschel JC, Moores D, Lee JY, Einhorn LH, Mandelbaum I, Koeller J, Weiss GR, Losada M, Keller JH: Intrapleural therapie for malignant pleural effusions. A randomized comparison of bleomycin and tetracycline. *Chest* 1991; 100: 1528-1535.
- Rüschoff J, Barth P: Theorie und Praxis der Silberfärbung Nukleolus Organisierender Regionen (AgNOR). *Pathologie* 1992; 13: 13-19.
- Rüschoff J: Nukleolus Organisierende Regionen (NORs) in der Pathomorphologischen Tumordiagnostik. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer; 1992.
- Rüschoff J, Prasser C, Cortez T, Hohne HM, Hohenberger W, Hofstadter F: Diagnostic value of AgNOR staining in follicular cell neoplasms of the thyroid: comparison of evaluation methods and nucleolar features. *Am J Surg Pathol* 1993; 17 (12): 1281-8.
- Salerno F, Restelli B, Incerti P, Annoni G, Capozza L, Badalamenti S, Lampertico P, Mojana E, Moser P, Tommasini M: Utility of ascitic fluid analysis in patients with malignancy-related ascitis. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25(3): 251-256.
- Salet-van de Pol MRJ, Hanselar AGJM, de Leeuw H, Nieuwenhuis F, Pahlplatz MMM, van t'Hof-Grootenbour AE, Vooijs GP: Application of cytometry and immunocytochemistry in effusions. *Acta Cytol* 1994; 38: 653.
- Sánchez, L, Regh M, Biesterfeld S, Chatelain R, Böcking A: Performance of a TV Image Analysis System as a Microdensitometer. *Analyt Quant Cytol Histol* 1990; 12(4): 279-284.
- Sandberg AA: The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia. Second edition. New York Elsevier Science Publishing 1990.
- Sato S: Cytological evidence on the ability of the nucleolus organizing regions to assemble pre-existing nucleolar material. *Experientia* 1988; 44: 264-266.
- Schega A: Extraktion von Strukturmerkmalen im Zellkern für die zytopathologische Krebsdiagnostik. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Meßtechnik und Bildverarbeitung der RWTH-Aachen 2003.

- Schiebe M, Hoffmann W, Kortmann RD, Bamaerg M: Klinik und Therapie des malignen Pleuramesothelioms. *Strahlenther Onkol* 1994; 170: 628-635.
- Schlümerich J: Sonographische Differentialdiagnostik. Rettenmaier G, Seitz K (Hrsg) Weinheim, Basel, Cambridge, New York, NY: Ed. Medizin, VCH, Bd II, 1992.
- Schneller J, Eppich E, Greenebaum E, Elequin F, Sherman A, Wersto R, Koss LG: Flow cytometry and Feulgen cytophotometry in evaluation of effusions. *Cancer* 1987; 59: 1307-1313.
- Schwarzacher Robinson T, Kaemer PM, Cram LS: Spontaneous in vitro neoplastic evolution of cultured Chinese hamster cells. Nucleolus organizing region activity. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 35: 119-128.
- Selikoff FJ, Hammond EC, Seidman H: Latency of asbestos disease among insulation workers in the United States and Canada. *Cancer* 1980; 46: 2736-2740.
- Shechtman L, Koren R, Horowitz A, Shechtman I, Halpern M, Gal R: Diagnostic Value of AgNOR Staining in Thyroid Cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 1998; 20(3): 187-191.
- Shermann ME, Mark EJ: Effusion cytology in the diagnosis of malignant epitheloid and biphasic pleural mesothelioma. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114 (8) : 845-851.
- Smetana K, Likovsky Z: Nucleolar silver-stained granules in maturing erythroid and granulocytic cells. *Cell Tissue Res* 1984; 237: 367-370.
- Sohrab S, Konietzko N: Diagnostik und Stadieneinteilung des malignen Pleuramesothelioms. *Pneumologie* 2002: 382-387.
- Spriggs AJ, Boddington MM: Atlas of Serous Fluid Cytopathology. A Guide to the Cells of Pleural, Pericardial, Peritoneal and Hydrocele Fluids. In: Current Histopathology Series, vol. 14. GA Gresham (ed.) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989.
- Spriggs AJ, Boddington MM: The Cytology of Effusions in the Pleural, Pericardial and Peritoneal Cavities and of the Cerebrospinal Fluid. London: Heinemann-Verlag, 1968)
- Steele JP: Prognostic factors in mesothelioma. *Semin Oncol* 2002; 29: 36-40.
- Steffen U und Korsch A: Klinisch-zytologische Diagnostik von Pleuraergüssen in der Pneumologischen Praxis. In: Freudenberg N, Hilgarth M, Baltisser I und Dinges HP (Hrsg) Freudenberg N. 20 Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm: G. Fischer Verlag, 230-231.
- Stockhausen J: Multimodale Zellanlyse. Grundlagen. Dissertation, Lehrstuhl für Meßtechnik und Bildverarbeitung der RWTH-Aachen 2005.
- Sudbo J, Kildal W, Risberg B, Koppgang HS, Danielsen HE, Reith A: DNA content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakia. *New Engl J Med* 2001; 344: 1270-1278.
- Sugarbaker DJ, Jaklitsch MT, Liptay MJ: Mesothelioma and radical multimodality therapy: who benefits? *Chest* 1995; 107: 345-350.

- Sujathan K, Kannan S, Raveendran Pillai K, Chandralenkha B, Sreedevi Amma N, Krishnan Nair M: Significance of AgNOR count in differentiating malignant cells from reaktive mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol* 1996; 40: 724-728.
- Teutschländer: Zit. In Wedler HW: Über den Lungenkrebs bei Asbestose. *Dtsch Arch Klin Med* 1943; 191.
- Thunissen FBJM, Ellis IO, Jütting U: Quality assurance in DNA image analysis on diploid cells. *Cytometry* 1997; 27: 21-25.
- Trevisan MS, Souza MI, Magna LA: Nucleolar organizer regions of mesothelial and carcinomatous cells in effusions. *Diagn Cytopathol* 1993; 9: 492-497.
- Tuomi T, Huuskonen MS, Tammilehto L, Vanhala E, Virtamo M: Occupational exposure to asbestos as evaluated from work histories and analysis of lung tissues from patients with mesothelioma. *Br J Med* 1991;48: 48-52.
- van de Molengraft FJJM, van't Hof MA, Hermann CJ, Vooijs TG: Quantitative light microscopy of atypical mesothelial cells and malignant cells in ascitic fluid. *Analyt Quant Cytol* 1981; 4: 217-220.
- van Haam E: *Cytology of Transsudates and Exsudates*. S. Karger Verlag Basel 1977.
- Walker-Renard PB, Vaughan LM, Sahn SA: Chemical pleurodesis for malignant pleural effusions. *Ann Intern Med* 1994; 120: 56-64.
- Weber U.: Pleuratumoren. In: Rühle K.-H. (Hrsg) *Pleuraerkrankungen*. Stuttgart: W. Kohlhammer GmbH, 1997 136-139.
- Whitaker D, Shilkin KB: Diagnosis of pleural malignant mesothelioma in life: a practical approach. *J Pathol* 1984 143, 147.
- Wilkes JD, Fidias P, Vaickus L, Perez RP: Malignancy-related pericardial effusion. *Cancer* 1995; 76; 1377-1387.
- Woitowitz H-J, Hillerdal G, Calvaresoz A, Berghäuser KH, Rödelsperger K, Jöckel K-H: Risiko- und Einflußfaktoren des diffusen malignen Mesothelioms (DMM). *Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz* 1993 Forschung-Fb 698
- Woitowitz HJ: Epidemiologie und Prävention des malignen Pleuramesothelioms. *Med Klein* 1987, 82: 578-581.
- Wolonski KD, Whitaker D, Shilkin KB, Henderson DW: The use of epithelial membrane antigen and silver-stained nucleolar organizer regions testing in the differential diagnosis of mesothelioma from benign reactive mesothelioses. *J Cancer* 1998; 82: 583-590.
- Würflinger T et al: Automatic Coregistration, Segmentation and Classification for Multimodal Cytopathology. *The new navigators: from professionals to patients, Proc Med Inform Europe* 2003.

- Würflinger T et al: Robust Automatic Coregistration, Segmentation and Classification of Cell Nuclei in Multimodal Cytopathological Microscope Images. CMI&G 2003 angenommen.
- Yilmaz UM, Urkaner G, Yalniz A, Kumcuoglu Z: Computed tomographic findings of environmental asbestos-related malignant pleural mesothelioma. *Respirology* 1998; 3(1): 33-38.
- Zatsepina O, Hozak P, Babadjanyan D, Chentsov Y: Quantitative ultrastructural study of nucleolus organizing regions at some stages of the cell cycle (G0 period, G2 period, mitosis). *Biol Cell* 1988; 62: 211-218.
- Zinselmann EM, Harkavy SE, Hogan M, West W, Atkinson B: Peritoneal Washing Cytology. Uses and Diagnostic criteria in Gynecologic Neoplasms. *Acta Cytol* 1984; 28: 105-110.
- Zoeller J, Flentje M, Sinn P, Born A: Evaluation of AgNOR and Ki-67 antigen as cell kinetic parameters in oral dysplasias and carcinomas. *Anal Cell Pathol* 1994; 7: 77-88.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A. Böcking, Leiter des Instituts für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke Frau Dr. med. N. Pomjanski und Herrn Dr. med. Vu Quoc Huy Nguyen für ihre Hilfe und geduldige Einarbeitung.

Des Weiteren möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Bildverarbeitung von Herrn Prof. Dr.-Ing. D. Meyer-Ebrecht an der RWTH-Aachen bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Inform. Th. Würflinger und Herrn Dipl. Phys. J. Stockhausen, die mit fachlicher Kompetenz und Geduld die Fortschritte dieses Projekts ermöglicht haben. Frau Dipl. Inform. T. Schneider und Herrn Dipl. Ing. A. Bell danke ich für die Hilfe bei technischen Problemen jeder Art.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Mutter, Herrn R. Stommel sowie Sabine Jokl für die stetige Unterstützung und die gewissenhafte Durchsicht dieser Arbeit bedanken.

Christiane Henning

Assistenzärztin

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

- Geburtsdatum: 11.02.1978
- Familienstand: ledig
- Geburtsort: Aachen

BERUFSERFAHRUNG

seit 04/2009

Assistenzärztin für Neurologie

- Patientenversorgung auf der Normalstation und Stroke Unit
SANA-KLINIKUM REMSCHEID GMBH

9/2008-3/2009

Assistenzärztin für Neurologie

- Patientenversorgung auf der Normalstation
- Stationsarbeit auf der Stroke Unit und der Intensivstation
STÄDTISCHE KLINIKEN KÖLN-MERHEIM

4/2006-8/2008

Assistenzärztin für Neurologie

- Patientenversorgung auf der Stroke Unit, Dopplersonographie
- Stationsarbeit auf der Normalstation, EEG-Auswertungen
- Pieperdienst in der neurologischen Notfallambulanz
KLINIKUM KASSEL

8/2004 – 7/2005

Praktisches Jahr

8/2004 – 11/2004

Erstes Tertial in der Chirurgischen Klinik
LUISENHOSPITAL AACHEN

12/2004 – 3/2005

Zweites Tertial in der Medizinischen Klinik
LUISENHOSPITAL AACHEN

4/2005 – 7/2005

Drittes Tertial in der Klinik und Poliklinik für Neurologie
UNIVERSITÄTSKLINIKUM BONN

STUDIUM

10/1997 – 11/2005

Studium der Humanmedizin

- November 2005: Drittes Staatsexamen, Abschluss des Studiums mit der Gesamtnote: befriedigend

RHEINISCH-WESTFÄLISCHE TECHNISCHE UNIVERSITÄT AACHEN

FAMULATUREN

9/2003

Augenheilkunde

DR. MED TH. A. WESENDAHL, AUGENARZT, AACHEN

3/2003 – 4/2003

Allgemeinmedizin

A. GÖRGELS, PRAKTISCHE ÄRZTIN, AACHEN

Christiane Henning

Assistenzärztin

- 2/2003 – 3/2003 **Innere Medizin**
DR. MED J. LANG, INTERNIST, AACHEN
- 8/2002 **Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe**
ALBERT-SCHWEITZER-KRANKENHAUS NORTHEIM
- 9/2001 – 10/2001 **Abteilung für Unfallchirurgie und Allgemein Chirurgie**
ALBERT-SCHWEITZER-KRANKENHAUS NORTHEIM
- 3/2001 – 4/2001 **Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie**
UNIVERSITÄTSKLINIKUM AACHEN

SCHULBILDUNG

- 8/1988 – 5/1997 **Abschluss: allgemeine Hochschulreife (Abitur)**
KAISER-KARLS-GYMNASIUM, AACHEN

SPEZIELLE QUALIFIKATIONEN

- WS 2003/04 **Chirurgischer Skill-Kurs „Advanced Skill-Course“**
CHIRURGISCHE KLINIK, UNIVERSITÄTSKLINIKUM AACHEN
- WS 2003/04 **Teilnahme am Kursus „Akupunktur in der Schmerztherapie“**
KLINIK FÜR ANÄSTHESIOLOGIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM AACHEN
- SS 2003 **Chirurgischer Skill-Kurs „Basic Skill-Course“**
CHIRURGISCHE KLINIK, UNIVERSITÄTSKLINIKUM AACHEN
- SS 2003 **Teilnahme an der Vorlesung „Schmerztherapie“**
KLINIK FÜR ANÄSTHESIOLOGIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM AACHEN
- SS 2002 **Teilnahme am Intubationskurs**
KLINIK FÜR ANÄSTHESIOLOGIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM AACHEN

AUSLANDSAUFENTHALTE

- 8/1994 – 6/1995 **Aufenthalt und Highschoolbesuch**
DEFIANCE, OHIO, USA

Köln, 21.11.2010

Abstract

Es sind mehr als 50 verschiedene Erkrankungen bekannt, die mit einer *Ergussbildung* in serösen Körperhöhlen einhergehen. Bis zu 45% aller Ergüsse enthalten *Tumorzellen*. In einem Drittel der Fälle gibt die zytopathologische Untersuchung den ersten Hinweis auf eine Tumorerkrankung (Bedrossian, 1994). Die *diagnostische Abklärung* der Dignität des Ergusses mittels zytomorphologischer Kriterien ist jedoch oftmals sehr schwierig. Die Sensitivität der zytologischen Diagnostik von serösen Ergüssen ist mit 58% im Literaturdurchschnitt daher unbefriedigend (Spriggs und Boddington, 1989).

Das am Lehrstuhl für Bildverarbeitung der RWTH Aachen entwickelte *Labormuster des MMZA-Systems* besteht aus einem computergesteuerten Messmikroskop, einer CCD-Kamera und einem mit der neu entwickelten Bildverarbeitungssoftware ausgestatteten Rechner.

Untersucht wurden 11 reaktive Ergüsse, 13 Karzinosen und 11 Mesotheliome. Zunächst wurden *Fotos* von diagnostisch relevanten Mesothelzellen in der MGG-Färbung gemacht. Nach der Umfärbung nach Feulgen erfolgte die *DNA-Analyse* der relokalierten und Software-unterstützt segmentierten Zellen. Zuletzt fanden die *manuelle Auszählung der AgNORs* sowie eine *automatische AgNOR-Zählung und – Flächenbestimmung* mittels eines neu entwickelten Softwarealgorithmus statt.

Im Zuge des Vergleichs der Messpräzision des AutoCyte QUIC-DNA- und des MMZA-Systems wurden DNA-zytometrische Messungen an drei *Rattenleberpräparaten* durchgeführt. Dabei erzielte das MMZA-System ausschließlich Ergebnisse in dem von der *ESACP* geforderten Bereich, wohingegen die mit dem AutoCyte QUIC-DNA-System erreichten Resultate diesen teilweise überschritten.

Die *DNA-Analyse* ergab beim Vergleich beider Systeme bezüglich der DNA-Ploidie Differenzen in drei Fällen (1 Karzinose, 2 Mesotheliome). Bei den *reaktiven Ergüssen* wurden alle Ausstriche von beiden Untersuchern als DNA-euploid gewertet. Bei den *Karzinosen* wurde am LfB DNA-Aneuploidie in 9 Fällen festgestellt, am IfC in 10 Fällen. Bei der Untersuchung der *Mesotheliompräparate* waren laut Messung am LfB 36,36% der Proben aneuploid, am IfC 54,55%. 40% (2 von 5 Proben) der zytomorphologisch initial nicht eindeutig beurteilbaren Fälle konnten durch die Feststellung von DNA-Aneuploidie als eindeutig maligne eingestuft werden. Beim Vergleich der *DNA-Stammlinienzahl und –größe* zeigten sich Abweichungen in 9,09% der reaktiven Ergüsse, in 69,23% der Karzinosen und in 45,45% der Mesotheliome. Die Modalwerte beider Untersuchungen wiesen insgesamt eine Korrelation von $r = 0,98$ auf. Die Streuung der Modalwerte um 2,00c bei den diploiden reaktiven Ergussproben war bei den MMZA-Messungen mit 2,03c $\pm 0,10c$ geringer als bei den AutoCyte-Messungen mit 2,07c $\pm 0,12c$. Die *Variationskoeffizienten (CV)* der Referenzzellen lagen am LfB im Mittel um 1,06% höher als am IfC.

Bei der *manuellen AgNOR-Zählung* konnte nur ein Schwellenwert von 5,10 (Cluster + Satelliten) für die Unterscheidung zwischen reaktiven und tumorbedingten Proben festgestellt werden. Mit Hilfe der *automatischen AgNOR-Zählung* ist keine diagnostische Trennung der malignen von den benignen Proben möglich gewesen.

Bei der softwaregestützten Berechnung der *absoluten und relativen AgNOR-Fläche* konnte wegen großer Streuwerte kein Schwellenwert für die Differenzierung zwischen den verschiedenen Diagnosegruppen festgelegt werden.

Das am LfB neu entwickelte *MMZA-System* ist zwar funktionsfähig, jedoch für den diagnostischen Routineeinsatz noch nicht einsatzbereit. Werden die beschriebenen Unzulänglichkeiten behoben und der gesamte Arbeitsablauf beschleunigt, so kann das MMZA-System einen erheblichen Beitrag zu einer verbesserten Krebsdiagnostik leisten.