

**Aus dem Institut für Pathologie
Funktionsbereich Cytopathologie
Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld**

**Diagnostische Treffsicherheit der Feinnadelaspirationsbiopsie
(FNAB) mit adjuvanter DNA-Zytometrie bei
malignomverdächtigen pankreatischen Raumforderungen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Milan Alexander Bölefahr

2011

Als Inauguraldissertation
gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf,
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Alfred Böcking

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	<i>Anatomie des Pankreas</i>	4
1.2	<i>Pankreastumore</i>	4
1.2.1	<i>Benigne Tumore</i>	4
1.2.2	<i>Maligne Tumore</i>	5
1.3	<i>Epidemiologie</i>	8
1.4	<i>Ätiologie</i>	8
1.5	<i>Diagnostik bei pankreatischen Raumforderungen mit Verdacht auf Pankreaskarzinom</i>	9
1.6	<i>Technik und Durchführung der Feinnadelaspirationsbiopsie</i>	11
1.6.1	<i>Indikation</i>	11
1.6.2	<i>Komplikationen</i>	12
1.6.3	<i>Endosonographisch vs. Sonographisch- gesteuerte Punktion</i>	12
1.7	<i>Ziel der Untersuchung</i>	13
2	Material und Methoden	14
2.1	<i>Patientenkollektiv</i>	14
2.2	<i>Färbung der Präparate</i>	17
2.2.1	<i>MGG-Färbung</i>	17
2.2.2	<i>Färbung nach Papanicolaou</i>	18
2.3	<i>Morphologische Grundlagen der zytologischen Interpretation</i>	19
2.4	<i>Anwendung der DNA-Bildzytometrie</i>	24
2.4.1	<i>Färbung nach Feulgen</i>	24
2.4.2	<i>Versuchsaufbau und Vorbereitung der Präparate</i>	26
2.4.3	<i>Die Messung</i>	27
2.4.4	<i>Auswertung und Kriterien der DNA-Aneuploidie</i>	29
2.5	<i>Klinisches Follow-Up</i>	34
2.5.1	<i>Kennziffern der statistischen Auswertung</i>	36
3	Ergebnisse	38
3.1	<i>Allgemein</i>	38
3.1.1	<i>Evidenzlevel der Follow-Up-Erhebungen</i>	39
3.2	<i>„negative“ Fälle</i>	41

3.2.1	Zytologische Ergebnisse	41
3.2.2	Zytometrische Ergebnisse	43
3.3	„zweifelhafte“ Fälle	45
3.3.1	Zytologische Ergebnisse	45
3.3.2	Zytometrische Ergebnisse	46
3.4	„dringend verdächtige“ Fälle	47
3.4.1	Zytologische Ergebnisse	47
3.4.2	Zytometrische Ergebnisse	51
3.5	„positive“ Fälle	54
3.5.1	Zytologische Ergebnisse	54
3.5.2	Zytometrische Ergebnisse	57
3.6	Komplikationen	60
3.7	Wiederholung der Punktion	61
3.8	Treffericherheit der zytologischen und DNA-bildzytometrischen Diagnostik	62
3.8.1	Zytologische Diagnostik	62
3.8.2	DNA-Bildzytometrie	63
3.8.3	Zytologische Diagnostik ergänzt um die DNA-Zytometrie	64
4	Diskussion	69
5	Zusammenfassung	80
6	Literaturverzeichnis	82
7	Danksagung	89
8	Lebenslauf.....	90

1 Einleitung

1.1 Anatomie des Pankreas

Das Pankreas liegt in Höhe des 1.-3. Lendenwirbels sekundär retroperitoneal im Oberbauch und ist an der Vorderseite von Peritoneum überzogen. Es ist ca. 10-15 cm lang, 3-4 cm breit sowie 2-3 cm dick und wiegt zwischen 50 und 120 Gramm. Es hat direkte Lagebeziehungen zum Duodenum, den extrahepatischen Gallenwegen, zum Milzhilus sowie zur Arteria und Vena mesenterica superior. Anatomisch lässt sich das Pankreas in drei Anteile unterteilen: 1. Pankreas-Kopf, 2. Pankreas-Körper und 3. Pankreas-Schwanz. Die arterielle Blutversorgung erfolgt hauptsächlich über die Arteria pankreatoduodenalis und die Arteria splenica, der venöse Abfluss wird größtenteils über die Vena portae geleistet. Es besteht aus einem exokrinen und einen endokrinen Anteil, wobei der exokrine Teil ungefähr 98 % des Organs ausmacht. Das Pankreas wird vom Ductus pankreaticus durchzogen. Er wird im klinischen Sprachgebrauch auch Ductus Wirsungianus genannt und stellt den Hauptausführungsgang dar. Zusammen mit dem Ductus Choledochus mündet er in der Papilla duodeni major (Papilla Vateri) im Duodenum. Das Parenchym besteht aus azinären Lobuli mit interlobulären Gängen. Die Azinuszellen produzieren täglich 1-2 Liter bicarbonathaltigen Pankreassaft, der u.a. die für die Verdauung sehr wichtigen Enzyme Amylase, Lipase, Trypsin und Chymotrypsin enthält (Böcker, 2004; Moll, 2006).

1.2 Tumoren im Pankreas

1.2.1 Benigne Tumore

Benigne Tumore des Pankreas sind sehr selten und machen nur ca. 1 % der Pankreastumore aus. Dabei gehen die meisten vom endokrinen Anteil des Pankreas aus. Je nach zellulärem Ursprung der Neoplasie handelt es sich bei den neuroendokrinen benignen Neoplasien entweder um Insulinome, Gastrinome, Glucagonome oder um ein Vipom. Ca. 75 % aller endokrinen Tumore sind Insulinome, die zu 90 % benigne Eigenschaften besitzen. In 10 % der Fälle treten die Insulinome nicht singular sondern multipel auf und haben eine Assoziation zum MEN-1-Syndrom (Büchler et al., 2004). Mit Ausnahme des Insulinoms verhalten sich die neuroendokrinen Pankreastumore häufig maligne. Die histologischen Kriterien für Malignität sind in diesen Fällen sehr unzuverlässig.

Benigne Tumore des exokrinen Pankreas sind das seröse und muzinöse Zystadenom. Die exokrinen benignen Tumoren verursachen nur uncharakteristische klinische Symptome wie Oberbauchschmerzen und Rückenschmerzen. Zudem kann es auch durch eine tumorbedingte Stenose des Gallengangs zu einem Ikterus kommen. Daher sollten alle benignen Tumore des Pankreas operativ entfernt werden. (Büchler et al., 2004).

1.2.2 Maligne Tumore

Mehr als 95 % der Pankreaskarzinome sind Adenokarzinome, die vom ductalen Epithel ausgehen. Es wird davon ausgegangen, dass sich die maligne Entartung über prämaligne Vorstufen im Pankreasgangsystem entwickelt (AWMF, S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“, 2006). Die Tumor-Differenzierung unterteilt man histologisch in drei Grade: hochdifferenzierte (Grad 1), mäßig differenzierte (Grad 2) und wenig differenzierte (Grad 3) Karzinome. Tabelle 1 zeigt die pTNM-Klassifikation des ductalen Pankreaskarzinoms:

Tabelle 1: Einteilung nach pTNM-Klassifikation (Böcker, 2004)

pT	Primärtumor
pT0	kein Primärtumor nachweisbar
pTis	Carcinoma in situ
pT1	größter Durchmesser des Primärtumors \leq 2cm, Tumor innerhalb des Pankreas
pT2	größter Durchmesser des Primärtumors \geq 2cm, Tumor innerhalb des Pankreas
pT3	Primärtumor wächst ein in peripankreatisches Gewebe
pT4	Primärtumor wächst ein in angrenzende große Gefäße (Aa. und Vv. coeliacae und mesentericae sup.)
pTX	Primärtumor kann nicht untersucht werden
pNX	die regionären Lymphknoten können nicht untersucht werden
pN0	keine nachweisbaren regionären Lymphknoten
pN1	regionäre Lymphknotenmetastasen
pMX	Fernmetastasen können nicht untersucht werden
pM0	keine Fernmetastasen nachweisbar
pM1	Fernmetastasen nachweisbar

Seltene Formen des Pankreaskarzinoms sind das intraductale papillär-muzinöse Karzinom (IPMN), das Zystadenokarzinom sowie das extrem seltene Azinuszellkarzinom. Zudem gibt es noch das maligne Pankreatoblastom, das jedoch nur im Kindesalter auftritt (Böcker, 2004). Das Pankreaskarzinom tritt in 70-80 % der Fälle im Pankreas-Kopf auf und hat bei Diagnosestellung in 80 % der Fälle schon metastasiert, was die aggressive Potenz dieses Tumors unterstreicht (Büchler et al., 2004). Das Pankreaskarzinom verursacht in der Regel keine charakteristischen Frühsymptome. Typische Spätsymptome sind der durch die tumorbedingte Verlegung des Ductus choledochus bzw. der Papilla Vateri hervorgerufene schmerzlose Ikterus, Gewichtsverlust, durch die Infiltration der Nervenscheiden hervorgerufene Rückenschmerzen sowie ein neu aufgetretener Diabetes mellitus. Folgende Tabelle 2 zeigt die Symptommhäufigkeit von 368 Patienten mit histologisch gesichertem Pankreaskarzinom (Sulkowski et al., 1988)

Tabelle 2: (Sulkowski et al., 1988)

Symptome	Häufigkeit in %
Gewichtsverlust	67
Schmerzen	64
Ikterus	59
Acholischer Stuhl	45
Appetitverlust	37
Erbrechen	27
Diarrhöen	21
Pruritus	19

Reisman et al. (1996) belegen, dass bei Patienten über 60 Jahren das Pankreas- oder Gallengangskarzinom mit 20 % die häufigste Ursache für einen neu aufgetretenen Ikterus darstellt. Zudem führt die Obstruktion des Ductus Pancreaticus häufig zu einer chronischen sekundären obstruktiven Pankreatitis (Böcker, 2004). Das Pankreaskarzinom kann jedoch auch durch eine obstruktionsbedingte Cholangitis, bei Gefäßinfiltrationen durch eine Thrombose oder durch eine portale Hypertension symptomatisch werden (Hopt, 2000).

Die Metastasierung verläuft zunächst über die regionären Lymphknoten, bei hämatogener Ausbreitung lassen sich zu 80 % hepatische Metastasen diagnostizieren

und in 50 % der Fälle ist die Lunge von Metastasen befallen. Zudem findet man häufig eine Peritonealkarzinose sowie seltener Metastasen in Nieren, Nebennieren, Pleura und im Skelettsystem (Büchler et al., 2004).

Die kurative Therapie des Pankreaskarzinoms ist nur durch chirurgische R0-Resektion des Tumors möglich. Dabei muss das Ziel, unabhängig von der Lokalisation des Karzinoms, die komplette Resektion im Gesunden sein (Wagner et al., 2004; (AWMF, S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“, 2006). Dabei sollten weder das Alter der Patienten noch die Infiltration der Vena portae ein Kriterium für eine mögliche Inoperabilität sein. Durch eine En-bloc-Resektion ist zudem auch bei fortgeschrittenem Tumorstadium die Prognose identisch zu der nach Standardresektion (Sasson et al., 2002; Nakao et al., 2006). Im Falle von nachweisbaren Fernmetastasen sollte die Pankreasresektion jedoch unterlassen werden, da der Nachweis eines Überlebensvorteils durch eine Resektion eines metastasierten Pankreaskarzinoms nicht erbracht wurde (Mann et al., 2006; Shrikhande et al., 2007). Je nach Lage des Tumors stehen die (pyloruserhaltene) Duodenopankreatektomie (OP nach Whipple), die Pankreaslinksresektion und die subtotale Pankreaslinksresektion zur Auswahl. Eine erweiterte Lymphadenektomie zusätzlich zur Pankreas(teil)resektion konnte bisher keinen Benefit aufweisen (Farnell et al., 2005). Nach der Operation gilt die adjuvante Chemotherapie als die Behandlung der Wahl. Bei metastasiertem Krankheitsbild ist eine kurative Behandlung zurzeit nicht möglich, und es verbleibt lediglich die palliative Chemotherapie für die sinnvolle Behandlung dieser Patienten. Dabei steht die Schmerzkontrolle und die Erhaltung der Lebensqualität im Zentrum der Bemühungen, und weniger die Rückbildung des Tumors. Dabei hat sich der Einsatz von Gemcitabin als Therapiestandard bewährt (Burriss et al., 1997; Yip et al., 2006).

Bei IPMN wird die operative Resektion empfohlen, wenn vor der Operation die Dignität der zu resezierenden Läsion nicht eindeutig zu klären ist. Es gilt die Regel, dass alle potentiell malignen zystischen Tumorerkrankungen in gleicher Weise operativ behandelt werden sollen, wie das ductale Pankreaskarzinom (AWMF, S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“, 2006).

In ungefähr 2 % der Fälle handelt es sich bei der malignen Pankreasläsion um eine Metastase eines anderen Primärtumors. Bei der Metastasierung ins Pankreas stehen die Nierenzellkarzinome an erster Stelle, gefolgt von Colon- und Bronchial-Karzinomen

(Kirsch, 2005). Die Unterscheidung von Metastasen zu primären Pankreaskarzinomen ist extrem wichtig, da die exakte Diagnose die gesamte Ausrichtung der Behandlung bestimmt. Zudem liegt die prognostizierte Überlebensrate von Patienten mit ins Pankreas metastasierten Karzinomen anderen Ursprungs in der Regel weit über der Prognose von primären Pankreaskarzinomen (Rickes et al., 2001).

Die Prognose des Pankreaskarzinoms ist nach wie vor extrem schlecht. Die Erkrankung hat mit einer allgemeinen 5-Jahres-Überlebensrate von 4 % einen der schlechtesten Werte aller Krebserkrankungen. Dies liegt vor allem an der durch die fehlende Symptomatik bedingte späte Diagnosestellung sowie an dem sehr aggressiven Metastasierungsverhalten (AWMF, S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“, 2006). Selbst bei einer radikalen R0-Resektion liegt die mittlere statistische Überlebenszeit bei lediglich 9-18 Monaten, bei unbehandeltem Pankreaskarzinom beträgt sie nur 1-2 Monate (Büchler et al., 2004).

1.3 Epidemiologie

In Deutschland erkranken jährlich ungefähr 12.800 Menschen am Pankreaskarzinom, in den USA sind es 25.000 Menschen pro Jahr. Die Inzidenzrate in Deutschland liegt, je nach Literatur, bei 7-10 Fällen pro 100.000 Einwohnern (Büchler et al., 2004; Kirsch, 2005). Die Inzidenzrate ist seit 1990 ungefähr stabil geblieben (Böcker, 2004). Das Geschlechterverhältnis ist ausgeglichen, und die meisten Neuerkrankungen treten im höheren Alter auf. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei Männern bei 68 und bei Frauen bei 75 Jahren. Die Inzidenzraten zeigen erst einen deutlichen Anstieg ab dem 50. Lebensjahr (Reisman et al., 1996). Da die Prognose äußerst schlecht ist, entspricht die Inzidenzrate fast der Mortalitätsrate. Das Pankreaskarzinom stellt mit 6 % die fünfthäufigste malignombedingte Todesursache in Deutschland dar (AWMF, S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“, 2006).

1.4 Ätiologie

Die Frage nach der Ätiologie des Pankreaskarzinoms bleibt weiterhin ungeklärt. Zwar gibt es Hinweise, dass Ernährungsgewohnheiten, Rauchen und die berufsbedingte Belastung die Entstehung des Pankreaskarzinoms fördern. Die Studienlage ist jedoch besonders bei den Ernährungsgewohnheiten nicht eindeutig, so dass die AWMF in ihren Leitlinien zum Thema „Exokrines Pankreaskarzinom“ keine eindeutige

Ernährungsempfehlung geben kann. Anders ist es jedoch bei den Lebensgewohnheiten, wozu durchaus Empfehlungen ausgesprochen werden.

Heute wird selbst der früher als gesichert geltende Zusammenhang zwischen Fett- bzw. cholesterinärmer Ernährung und einer Senkung des Pankreaskarzinom-Risikos angezweifelt, da es unterschiedliche Studienergebnisse dazu gibt, die sich zum Teil widersprechen (Stolzenberg-Solomon et al., 2002; Michaud et al., 2005; Michaud et al., 2003; Zhang et al., 2005). Als gesichert gilt jedoch, dass der vermehrte Verzehr von geräucherten/gegrillten Lebensmitteln sowie Zigaretten- und exzessiver Alkoholenuss die Inzidenz steigert (Talamini et al., 1999; Anderson et al., 2005). Besonders das Rauchen ist sehr stark mit einer Verdopplung des Erkrankungsrisikos assoziiert und durch viele Studien eindeutig belegt (Yun et al., 2005; Larsson et al., 2005; Hassan et al., 2007). Des Weiteren gibt es Studien, die den Zusammenhang zwischen Adipositas und dem Auftreten von Pankreaskarzinomen beweisen (Patel et al., 2005; Rapp et al., 2005). Zudem gibt es Hinweise, dass Herbizide, Fungizide, Pestizide sowie chlorierte Kohlenwasserstoffe, Chromverbindungen und elektromagnetische Felder das Karzinomrisiko erhöhen (Ojajärvi et al., 2001; Ji et al., 2001; Yassi et al., 2003; AWMF, S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“, 2006).

1.5 Diagnostik bei pankreatischen Raumforderungen mit Verdacht auf Pankreaskarzinom

Die Abgrenzung von (entzündlichen) Pseudotumoren zu echten pankreatischen Neoplasien ist im klinischen Alltag sowohl für den Patienten als auch für die Ärzte von größter Bedeutung. In der Leitlinie der „Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der „Deutschen Krebsgesellschaft“ wird bei Vorliegen eines Tumorverdachts empfohlen, zunächst eine Oberbauchsonographie durchzuführen (Kirsch, 2005; AWMF, S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“, 2006). Büchler et al. (2004) beschreiben, dass die Sonographie alleine schon in bis zu 80 % der Fälle auch zu einer Metastasendiagnose führt, wenn ein Pankreaskarzinom vorliegt. Insgesamt soll die Sensitivität für den korrekten Nachweis eines Pankreaskarzinoms mittels transabdominellen Ultraschalls 80-90 % betragen (Karlson et al., 1999). Falls die gezielte Oberbauchsonographie zu keinem eindeutigen Ergebnis führt, kann sowohl die Endosonographie, eine MRT mit additiver ERCP (MRCP), oder eine Multidetector-CT zur Klärung des Tumorverdachts eingesetzt werden. Dabei

stellen die Computertomographie und die Endosonographie die Standardverfahren für die präoperative Tumordiagnostik dar (AWMF, S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“, 2006). Obwohl die ERCP in bis zu 90 % der Fälle die Diagnose eines Pankreaskarzinoms ermöglicht (Büchler et al., 2004), ist die Indikation zu einer rein diagnostischen ERCP nicht mehr gegeben, da sie in bis zu 5 % der Fälle zu einer Pankreatitis führen kann (Loperfido et al., 1998; Welzel et al., 2003). Jedoch erlaubt die ERCP bei einer Tumorkompression die Einlage eines Stents, was insbesondere bei palliativer Ausrichtung von großer therapeutischer Bedeutung ist.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer Bürstenbiopsie aus dem Pankreasgang. Obwohl einige Autoren die Sensitivität dieser Methode mit 66-81,8 % angeben (Vandervoort et al., 1999; Uchida et al., 2007), bleibt sie umstritten und wird nicht als Routinediagnostik empfohlen (AWMF, S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“, 2006). Eine weitere Möglichkeit der Diagnostik bietet die Positronenemissionstomographie (PET), die für den Nachweis eines Pankreaskarzinoms Sensitivitätswerte zwischen 85-100 % aufweist (Welzel et al., 2003). Jedoch bestehen durch die extrem hohen Kosten und eine noch fehlende Validierung diverse Vorbehalte gegen diese Methode.

Die Endosonographie wird von manchen Autoren als das diagnostische Mittel mit der höchsten Sensitivität für die Diagnose einer Pankreasneoplasie beschrieben. Insbesondere bei der Diagnostik von sehr kleinen Tumoren (< 2-3 cm) weist die Endosonographie eine Sensitivität von mehr als 90 % auf und gilt als das Diagnostische Mittel der Wahl (Welzel et al., 2003; Nowack, 2004; Kahl und Malfertheiner, 2004). Allerdings muss an dieser Stelle betont werden, dass eine definitive Tumordiagnose erst durch histologische oder zytologische Untersuchung von operativ entnommenem Gewebe oder präoperativ bioptisch gewonnenen Gewebe oder Zellen gestellt wird, und nicht durch radiologische Methoden allein.

Die Tumormarker CEA und CA 19-9 haben sich weder in der Präventiv- noch in der Primärdiagnostik bewährt. Zum einen sind die Marker im Frühstadium des Pankreaskarzinoms nicht erhöht, zum anderen lässt sich auch bei nicht-malignen Pankreaserkrankungen, z.B. einer Pankreatitis, ein Anstieg der Tumormarker, insbesondere von CA 19-9, feststellen. Die Tumormarker sind jedoch für das Therapiemonitoring und die laborchemischen Rezidivkontrolle geeignet. Hinzu kommt, dass sich die Überlebenszeit der Patienten durch die postoperative CA 19-9-

Bestimmung gut abschätzen lässt (Steinberg, 1990; Welzel et al., 2003; Kim et al., 2004).

1.6 Technik und Durchführung der Feinnadelaspirationsbiopsie

1.6.1 Indikation

Das Ziel der Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) des Pankreas ist es, durch eine minimal-invasive und kostengünstige Zellentnahme mit adjuvanter zytologischer Untersuchung die komplikationsreiche und teure Laparotomie bei bestimmten Patienten zu verhindern. Somit können unnötige Operationen bei benignem Befund oder Nachweis von Metastasen mit anderem Primarius verhindert und eine palliative Chemotherapie schneller eingeleitet werden. Dieser Sachverhalt ist nicht nur für den Patienten von größter Bedeutung, sondern ist auch aus ökonomischen Gründen sehr wichtig für die Planung des weiteren Behandlungsablaufes. Kramer et al. (2004) berechneten die Kosten für eine EUS-FNAB auf 798 US \$, wohingegen die Kosten für eine explorative Laparoskopie mit 8177 US \$ erheblich höher liegen (Mortensen et al., 2000). Und auch Harewood et al. (2001) kommen zu dem Schluss, dass eine FNAB bei Patienten mit Pankreaskarzinom die Behandlungskosten reduziert.

Laut der „Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Deutschen Krebsgesellschaft (DKG)“ wird empfohlen, bei einer resektabel erscheinenden unklaren Raumforderung diese zu resektieren, ohne vorher eine bioptische Diagnosesicherung durchzuführen. Das heißt, es sollen auch Raumforderungen unklarer Dignität operativ entfernt werden. Diese Empfehlung wird mit dem Risiko einer möglichen Tumorzellverschleppung begründet, die durch eine Feinnadelpunktion hervorgerufen werden könnte. Es wird angeraten, nur dann eine Feinnadelpunktion durchzuführen, wenn differentialdiagnostisch eine Metastase eines anderen Primärtumors nicht ausgeschlossen werden kann oder eine operative Resektion nicht möglich ist, sondern eine palliative Therapie indiziert ist. Insbesondere vor Beginn der palliativen Behandlung ist die bioptische Diagnosesicherung durch eine Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) zwingend notwendig (Büchler et al., 2004; AWMF, S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“, 2006).

Das Lehrbuch „Harrison-Innere Medizin“ empfiehlt, dass jedes Pankreaskarzinom histologisch abgeklärt sein muss, um eine Verwechslung mit anderen

Neoplasien oder Lymphomen sicher auszuschließen. Weiterhin wird empfohlen, bei nicht resezierbaren Tumoren und bei Kontraindikationen gegen eine explorative Laparotomie eine CT- bzw. sonographisch-gesteuerte FNAB des Pankreas vorzunehmen (Kasper und Harrison, 2005).

Welzel et al. (2003) beschreiben, dass die FNAB zwar im Einzelfall für die Differenzierung von entzündlichen und neoplastischen Läsionen herangezogen werden kann, jedoch ist der routinemäßige Einsatz bei kurativem Therapieansatz aufgrund der möglichen Komplikationen wie einer Pankreatitis, Blutung, Infektion und Tumorzellverschleppung nicht indiziert. Liegt jedoch eine zystische Struktur vor, so sollte diese EUS-gesteuert punktiert werden, da man nur durch die zytologische Diagnostik und durch die Bestimmung des CEA- und CA-19-9-Wertes eine diagnostische Aussage über die Dignität der Struktur machen könne (AWMF, S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“, 2006).

1.6.2 Komplikationen

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die Komplikationsrate sowohl bei endosonographischer als auch bei sonographischer FNAB zwischen 0-2 % lag und damit sehr gering war (Chang et al., 1997; Wiersema et al., 1997; Raut et al., 2003; Bhatia et al., 2008).

1.6.3 Endosonographisch vs. sonographisch-gesteuerte Punktion

Betrachtet man verschiedene Studien zur Ermittlung der Sensitivität von Feinnadelaspirationsbiopsien bei pankreatischen Raumforderungen, so ist festzustellen, dass die Werte zum Teil erheblich divergieren.

Letztendlich sollte bei einer Entscheidung für eine FNAB der endosonographische Zugangsweg gewählt werden, da diese Methode sich als sehr spezifisch und sensitiv herausgestellt hat (Chang et al., 1997; Varadarajulu und Wallace, 2004; Agarwal et al., 2004; Agarwal et al., 2008). Insbesondere bei kleinen, soliden Pankreastumoren hat sich die EUS-FNAB als sehr sensitiv erwiesen (Kahl und Malfërtheiner, 2004). Zudem wurde nachgewiesen, dass die Sensitivität der EUS-FNAB eindeutig von der Größe der punktierten Raumforderung sowie maßgeblich von der Erfahrung des Punkteurs abhängt (Barthet et al., 2007). Sogar für die sehr schwierige Diagnostik von Neuroendokrinen Tumoren des Pankreas (NETs) wurden gute

Ergebnisse bei EUS-FNAB beschrieben (Chatzipantelis et al., 2008). Wie jedoch zu Beginn schon beschrieben, unterscheiden sich die Angaben zur Sensitivität in den einzelnen Studien erheblich und liegen für die EUS-FNAB zwischen 66,6 % (Südhoff et al., 2004) und 94,6 % (Mitsuhashi et al., 2006). Die Sensitivität bei sonographisch-gesteuerter Punktion wird einmal mit 76,4 % bei einer Spezifität von 100% und einer Gesamttrefferbarkeit von 77,2 % angegeben (Fatka, 2002), Bhatia et al. (2008) kommen hingegen auf eine Sensitivität von 81 % mit einer Spezifität von 100 %.

1.7 Ziel der Untersuchung

Das Ziel dieser Untersuchung war es herauszufinden, ob sich durch den Einsatz von adjuvanter DNA-Zytometrie die Sensitivität, Spezifität, der positive als auch der negative Vorhersagewert sowie die Gesamttrefferbarkeit der zytologischen Diagnostik auf das Vorliegen von Malignität bei malignomverdächtigen pankreatischen Raumforderungen steigern lässt.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Gegenstand dieser Studie waren 192 zytologische Diagnosen von Feinnadelaspirationsbiopsien pankreatischer Raumforderungen, die in den Jahren 2005 und 2006 im Institut für Cytopathologie in Düsseldorf gestellt wurden. Insgesamt wurden 177 Patienten punktiert, bei 15 dieser Patienten wurde die FNAB zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. Von diesen doppelt punktierten Patienten liegen aus diesem Grund auch jeweils zwei zytologische Diagnosen vor, die jeweils einzeln in die Studie mit aufgenommen wurden. Diesen Sachverhalt stellen Abbildungen 1a und 1b dar.

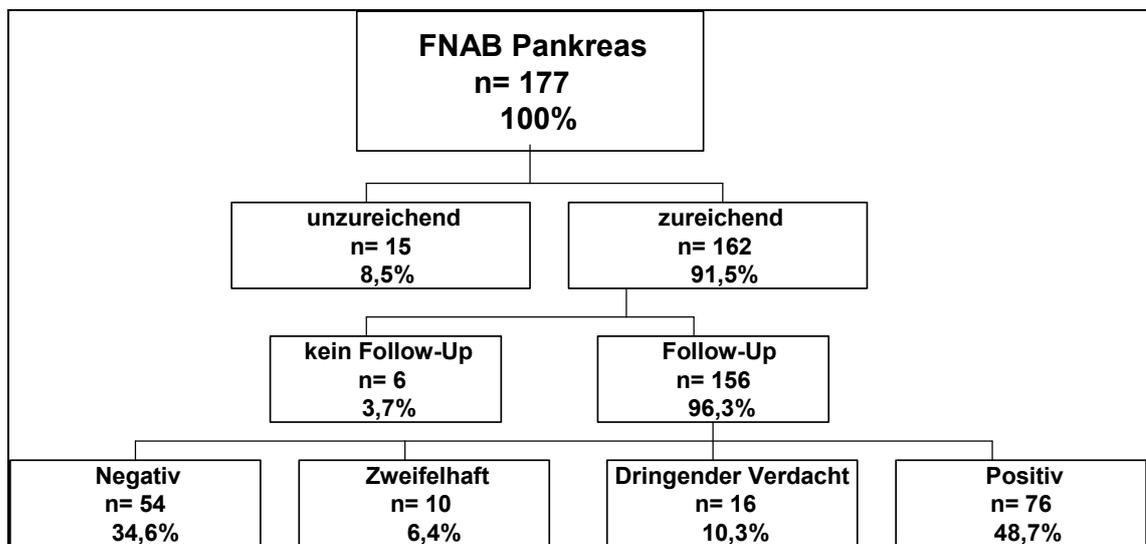


Abb. 1a: Flussdiagramm der zytologischen Diagnosen nach einmaliger Punktion

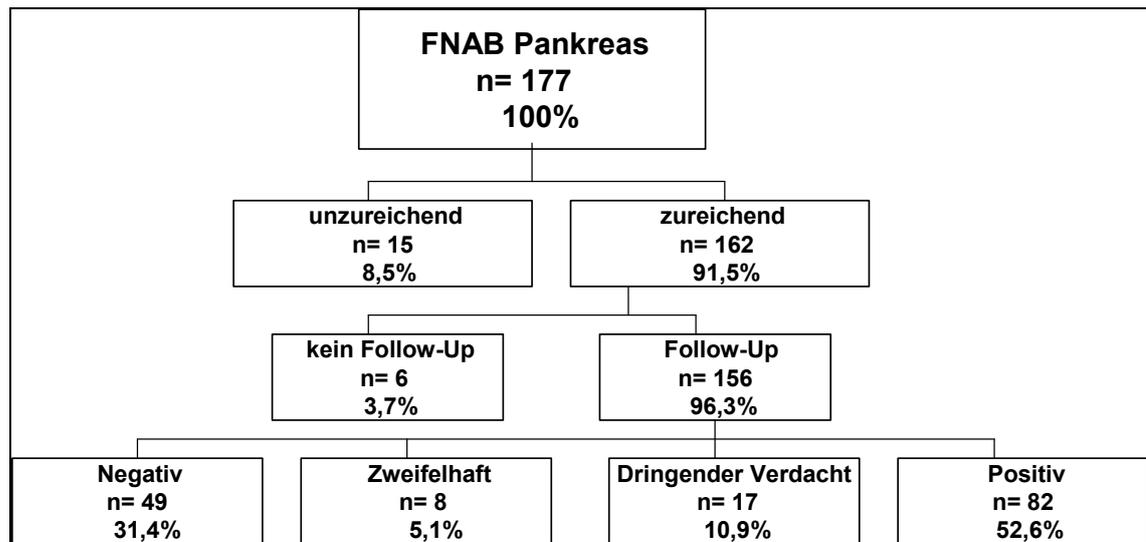


Abb. 1b: Flussdiagramm der zytologischen Diagnosen nach wiederholter Punktion in 15 Fällen

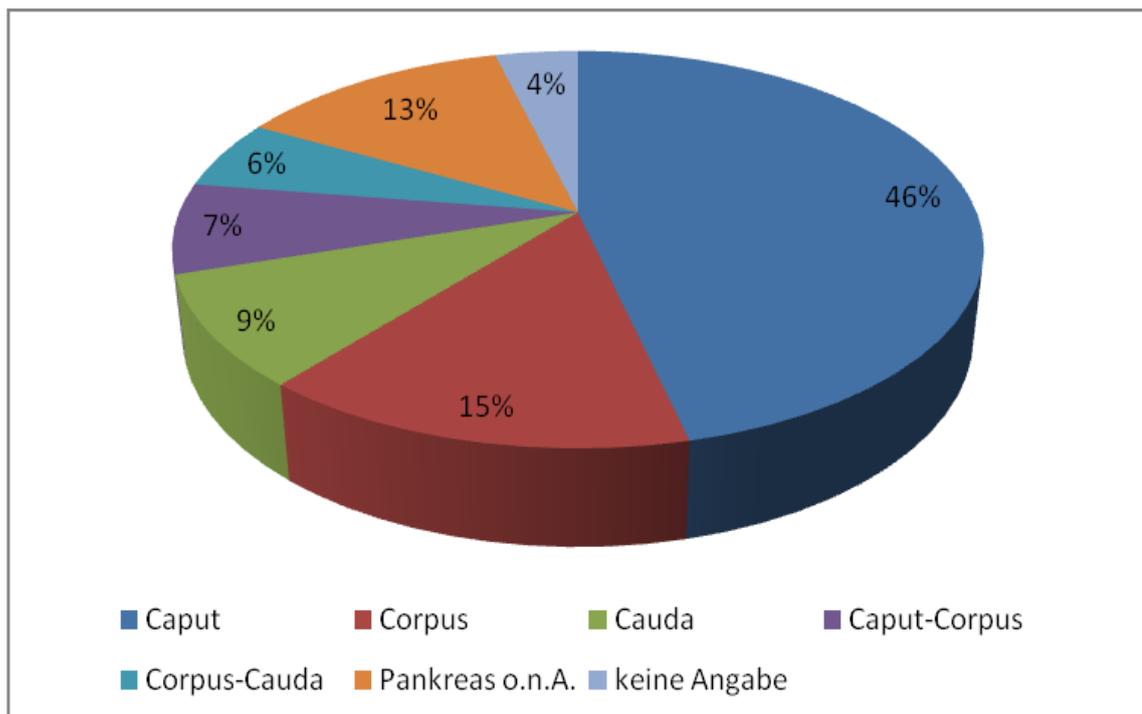
Insgesamt 16 verschiedene Einsender haben in diesem Zeitraum 2897 Objektträger von Feinnadelaspirationsbiopsien zur Begutachtung an das Institut für Cytopathologie in Düsseldorf geschickt. Zwei dieser Einsender wurden von der Studie ausgeschlossen: In einem Fall handelte es sich um ein Zweitgutachten, in dem anderen Fall ist es nicht gelungen, die Follow-Up Daten zur Überprüfung der zytologischen Diagnosen vollständig zu erfassen.

Das Patientenkollektiv setzt sich aus 87 Männern (49,2 %) und 90 Frauen (50,8 %) zusammen, insgesamt also 177 Patienten. Das Alter der Patienten lag bei Diagnosestellung zwischen 25 und 87 Jahren, das Durchschnittsalter betrug zu diesem Zeitpunkt 68,6 Jahre.

Wie aus Tabelle 3 und Abbildung 2 ersichtlich ist, waren ein Großteil der Raumforderungen (46 %) im Bereich des Pankreaskopfes lokalisiert, gefolgt von Corpus (15 %) und Cauda (9 %). In 17 % der Fälle konnte keine genaue Ortsangabe gemacht werden.

Tabelle 3: Lage der Raumforderungen im Pankreas

Ort	Anzahl
Caput	82
Corpus	26
Cauda	16
Caput-Corpus	13
Corpus-Cauda	10
Pankreas ohne nähere Angabe (o.n.A.)	23
keine Angabe	7
TOTAL	177

**Abb. 2:** Lage der Raumforderungen im Pankreas

2.2 Färbung der Präparate

Insgesamt 169 der 192 Einsendungen wurden nach Papanicolaou (Pap), zwei nur nach May-Grünwald-Giemsa (MGG), und 14 Einsendungen sowohl nach Pap als auch nach MGG gefärbt. Eine Einsendung war bei Eingang bereits nach Pap. gefärbt, bei einer anderen war das Färben der Präparate wegen unpassender Fixierung nicht mehr möglich. In fünf Fällen handelte es sich bei dem eingesendeten Material um Flüssigkeiten. Das Sediment wurde nach Zentrifugation ausgestrichen und nach Pap gefärbt. Insgesamt wurden 2357 Objektträger nach Papanicolaou und 68 Objektträger nach MGG gefärbt.

2.2.1 MGG-Färbung

Die May-Grünwald-Giemsa-Färbung (MGG-Färbung), auch „panoptische Färbung nach Pappenheim“ genannt, ist die Standardfärbung für luftgetrocknete, extragenitale, zytologische Präparate. Das Prinzip besteht darin, dass sich saure, basische und neutrale Farbstoffe mit Bestandteilen des Zellkerns (DNA, RNA, Nukleoli) und des Zytoplasmas sowie mit Proteinen verbinden. Die basischen Proteine sind azidophil und werden rot angefärbt, die Zellkernbestandteile sind basophil und stellen sich nach der Färbung bläulich dar. Die Qualität ist stark vom pH-Wert des verwendeten Wassers abhängig, es muss daher sehr genau auf die richtige Zusammensetzung, das Mischungsverhältnis und die Einwirkzeit geachtet werden. Tabelle 4 zeigt den genauen Ablauf der Färbung:

Tabelle 4: Färbung nach MGG

<i>Ablauf</i>	<i>Zeit in Minuten</i>	<i>Substanz</i>
1	5	May-Grünwald-Lösung
2	1	Aqua dest., gepuffert
3	1	Aqua dest., gepuffert
4	15	gebrauchsfertige Giemsa Lösung
5	1	Aqua dest., gepuffert
6	1	Aqua dest., gepuffert
7	-	Präparate trocken lassen
8	-	Eindeckeln

2.2.2 Färbung nach Papanicolaou

Die zytologische Färbung nach Papanicolaou ist die Standardfärbung für alkoholfixierte Präparate in der genitalen und extragenitalen Zytologie. Durch die besondere Hervorhebung des Chromatingehaltes im Zellkern ist sie für die Krebsdiagnostik von entscheidender Bedeutung.

Die Kerne stellen sich nach dieser Färbung dunkelviolett mit roten Nukleolen und blaugrünem bis gelblichen Zytoplasma dar. Es können sowohl Alkohol- als auch sprayfixierte Präparate für die Pap-Färbung verwendet werden. Für den automatisierten Färbeablauf wird im Institut für Cytopathologie in Düsseldorf der Färbeautomat Varistain der Firma Thermo-Electron verwendet. Tabelle 5 zeigt den genauen Ablauf der Färbung:

Tabelle 5: Färbung nach Papanicolaou

<i>Ablauf</i>	<i>Zeit in Minuten</i>	<i>Substanz</i>
1	2	Ethanol 96%
2	1	Ethanol 80%
3	1	Ethanol 70%
4	1	Ethanol 50%
5	1	Aqua dest.
6	2	Gebrauchsfertiges Hämatoxylin
7	3	Leitungswasser
8	3	Leitungswasser
9	1	NaOH
10	1	Ethanol 70%
11	1	Ethanol 70%
12	1	Ethanol 80%
13	1	Ethanol 96%
14	2	gebrauchsfertiges Orange II 2b
15	1	Ethanol 96%
16	1	Ethanol 96%
17	2	Polychrom 3b
18	1	Ethanol 96%
19	1	Ethanol 96%
20	2	Ethanol 99,6%
21	1	Xylol
22	1	Xylol
23	1	Voclear
24	1	Voclear
25		Eindeckeln



Abb. 3: Automatische Färbung nach Papanicolaou

2.3 Morphologische Grundlagen der zytologischen Interpretation

Nach dem Eingang begutachtete ein erfahrener Zytopathologe die Präparate und stellte anschließend eine Diagnose. Viele der befundeten Einsendungen waren nicht sehr zellreich. In den meisten Fällen konnte man Azinuszellen und ductale Epithelzellen erkennen, Inselzellen konnten nur durch bestimmte Färbungen, z.B. Immuncytochemische Färbungen, sichtbar gemacht werden. Die Kontamination durch Zellen anderer Organe, welche bei der Passage der Biopsienadel auftreten kann, stellt ein zusätzliches Problem bei der morphologischen Interpretation dar (Gray, 2003).

Abbildungen 4a + 4b zeigen mikrophotographische Bilder einer FNAB des Pankreas mit zytologischer Diagnose eines mäßig differenzierten Adenokarzinoms mit muzinöser Komponente, vereinbar mit einem duktalem Pankreaskarzinom.

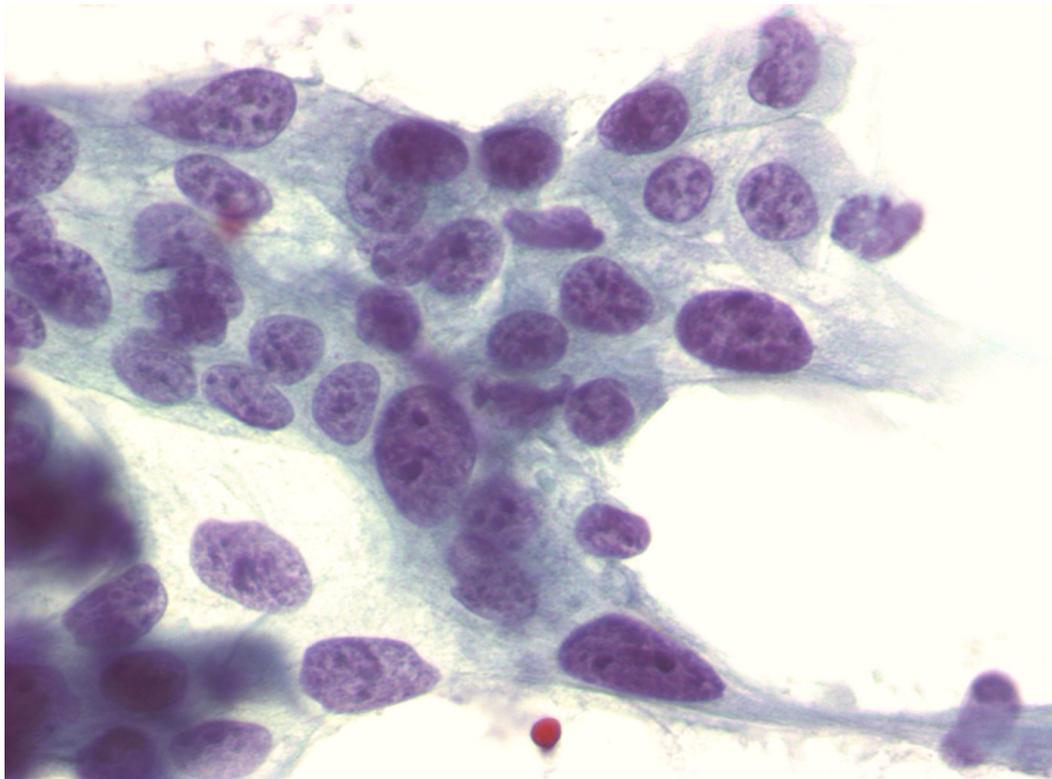
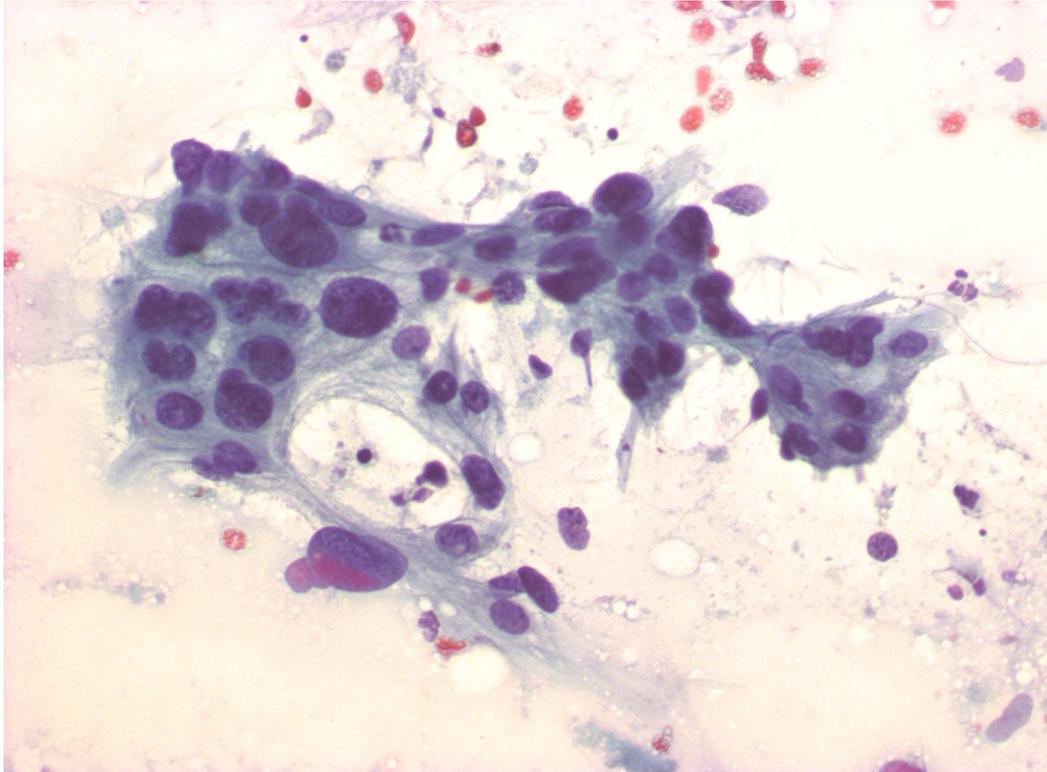


Abb. 4a+b: Feinnadelaspirationsbiopsie des Pankreas: mäßig differenziertes Adenokarzinom mit muzinöser Komponente, vereinbar mit einem duktalem Pankreaskarzinom

Einsendungen mit zytodiagnostisch unzureichendem Zellmaterial wurden als „unzureichend“ klassifiziert und in dieser Studie nicht berücksichtigt. Alle anderen zureichenden Präparate wurden anhand der folgenden Kategorien klassifiziert (Böcking und Freudenberg, 1995):

- 1) „negativ - keine Tumorzellen nachweisbar“
- 2) „zweifelhaft - Tumorzellen nicht sicher auszuschließen“
- 3) „mit dringendem Verdacht - Tumorzellen wahrscheinlich“
- 4) „positiv - Tumorzellen nachweisbar“

Tabelle 6 zeigt die allgemeingültigen Kriterien für die Diagnostik von Tumorzellen, die unter anderem für die Befunderhebung herangezogen wurden (Feichter und Dalquen, 2000). Zusätzlich wurden folgende in der Tabelle 7 aufgeführten zytologischen Kriterien bei der Beurteilung der Präparate berücksichtigt (Gray, 2003).

Tabelle 6: Diagnostische Malignitätskriterien (Feichter und Dalquen, 2000):

Ordnung	Malignitätskriterium
Erste	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns 2. Kernhyperchromasie 3. grobkörniges, verklumptes Heterochromatin 4. typisches "Pfeffer und Salz"-Bild durch irreguläre Heterochromatin-Verteilung 5. Anisonukleose 6. Kernpolymorphie 7. Exzentrische Lage des Zellkerns im Zytoplasma
Zweite	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mehrkernigkeit 2. Nukleolenatypie 3. Kohäsivitätsverlust 4. Hyperchromasie des Zytoplasmas 5. Vermehrte und atypische Mitosen
Dritte	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tumor-Diathese 2. Zell-Kannibalismus

Tabelle 7: Befundkonstellationen in der zytologischen Pankreasdiagnostik
(Gray, 2003)

Nichtneoplastische Veränderungen	Zytologische Befunde
1. Akute Pankreatitis	Akute Entzündungszellen (EZ) dominieren, zelluläre Ablagerungen, degenerierte EZ
2. Chronische Pankreatitis	Chron. Entzündungszellen, keine Nekrose + Einzelzellen, wenig Mitosen, gelegentlich Bindegewebe, Gangregenerate
2. Pseudozyste	Hypozellulär, im Hintergrund gallige, blutige, granuläre Ablagerungen, Calcifikationen, keine Epithelzellen, Schaumzellen (Makrophagen mit stark vakuolisiertem Zytoplasma)
3. Pankreaszyste	Häufig keratine Ablagerungen, evtl. Lymphozyten, Cholesterin-Risse, Cholesterin-Kristalle
Neoplastische Veränderungen (benigne)	
1. Seröses Zystadenom	Hypozellulär, würfelförmige Epithelzellen, runder/ovaler Zellkern (ZK), klares Zytoplasma (ZP) mit gut sichtbaren Zellgrenzen, undeutlicher Nukleolus
2. Muzinöses Zystadenom	Häufig Schleimablagerungen, variable Zellzahl mit säulenförmigen EZ, keine Atypien / Nekrosen/ Mitosen, Einzelzellen

- | | | |
|----|--|---|
| 3. | Intraductales papilläres muzinöses Adenom (IPMN) | Wie bei muzinösem Zystadenom, + häufig extrazell. Schleim + Ansammlungen von muzinösen Epithelzellen. |
|----|--|---|

**Neoplastische
Veränderungen
(maligne)**

- | | | |
|----|--|--|
| 1. | gutdifferenziertes ductales Adenokarzinom | Zellreiche Ausstriche, überlappende ZK, Chromatinverklumpung + -aufhellung, Kernflächen-Variation, irreguläre Kernkontur |
| 2. | mittel/gering differenziertes ductales Adenokarzinom | Dreidimensionale Zellgruppen, Hyperchromasie + grobkörniges Chromatin, Mitosen + Nekrosen, allgemeine Malignitätskriterien |
| 3. | undifferenziertes (anaplastisches) Karzinom | Prominente Tumordiathese, häufig isolierte und unzusammenhängende Zellen, Mehrkernigkeit, atypische Mitosen |
| 4. | Muzinöses Zystadenokarzinom | Wie bei muzinösem Zystadenom + Zellansammlung mit deutlicher Zell-Dyshäsion, Mitosen, Nekrosen, Atypien, prominente Nukleoli |
| 5. | Intraductales papilläres muzinöses Adenokarzinom | wie bei IPMN |
| 5. | Endokrine Tumore | Zellreiche Ausstriche, überwiegend Einzelzellen mit z.T. nackten ZK, (verzweigtes) Stroma mit umgebenden TZ, einzelne große ZK |
-

2.4 Anwendung der DNA-Bildzytometrie

2.4.1 Färbung nach Feulgen

Die Umfärbung der Präparate nach Feulgen stellt die Voraussetzung für eine quantitative DNA-Messung durch die statische DNA-Bildzytometrie dar. Die chemische Reaktion nach Feulgen führt zu einer spezifischen Markierung der DNA im Zellkern (Feulgen und Rosenbeck, 1924). Die Grundlage der Färbung bildet die Verbindungsreaktion von fuchsinschwefliger Säure (Schiff'sches Reagens) mit mindestens zwei freigewordenen Aldehydgruppen zu rotvioletterm Farbstoff. Mit Ribonukleinsäure (RNA) fällt die Reaktion negativ aus, so dass spezifisch immer nur DNA und keine RNA markiert wird. Bevor die nach Papanicolaou- oder MGG-gefärbten Präparate nach Feulgen umgefärbt werden können, müssen sie jedoch zunächst für mindestens 72 Stunden im Xylol-Bad entdeckelt und anschließend für 60 Minuten mit Methanol gewaschen werden.

Zunächst werden bei den so behandelten Präparaten mit Hilfe einer sauren Hydrolyse mit Salzsäure freie Aldehydgruppen an den Desoxyriboseanteilen der zuvor mit Formalin stabilisierten DNA erzeugt (Kasten, 1971). Dies hat zwei wichtige Konsequenzen: Erstens werden durch die saure Hydrolyse die nach Papanicolaou gefärbten Präparate entfärbt und zweitens bilden die freien Aldehydgruppen den Angriffspunkt für die Reaktion mit dem Schiff'schen Reagens (Merck, Nr. 1.09033). Bei diesem Schritt müssen die Säurekonzentration, die Hydrolysezeit sowie die Reaktionstemperatur so abgestimmt sein, das möglichst viele freie Aldehydgruppen entstehen und dabei nicht direkt zerstört werden (Krug, 1980). Für die meisten Zellen liegt das Hydrolyseoptimum mit 5 N HCl bei 25° C Reaktionstemperatur und einer Reaktionszeit von 60 Minuten (Böcking et al., 1995a). Bei ungefärbten Präparaten beginnt die Feulgen-Färbung erst mit der Formalinfixation. Auf das Färben mit dem Schiff'schen Reagens folgt das Spülen in SO²-Wasser und Aqua destillata sowie eine Dehydrierung in aufsteigender Ethanol-Konzentration. Abschließend verbleiben die Präparate bis zum Eindeckeln mit Entellan (Merck, Nr. 7961, n 20/D 1,9-1,50) lichtgeschützt im Xylol-Bad. Auch nach dem Eindeckeln sollten nach Feulgen gefärbte Präparate immer unter Lichtausschluss aufbewahrt werden, um ein Ausbleichen der Färbung zu verhindern.

Unsere Präparate wurden alle vollautomatisch mit dem modifizierten Färbeautomaten Varistain 23-4 der Firma SHANDON (Runcorn, U.K.) gefärbt. Das Färbeschema ist in nachfolgender Tabelle 8 ersichtlich (Böcking, 1995b). Nach der erfolgreichen Umfärbung der Präparate nach Feulgen ist eine Rückfärbung nach Papanicolaou ohne Qualitätsverlust möglich.

Tabelle 8: Schematischer Ablauf der Feulgen-Färbung (Böcking 1995b)

Ablauf	Zeit in	
	Minuten	Substanz
1	15	Xylol
2	5	Ethanol 100%
3	5	Ethanol 96%
		10 % Formalin, gepuffert
4	50	Na ₂ HPO ₄ +NaHPO ₂
5	10	Aqua dest.
6	5	Aqua dest.
7	60	5 N HCl, 25°C
8	2	Aqua dest.
9	2	Aqua dest.
10	2	Aqua dest.
11	60	Schiff'sches Reagenz
12	5	SO ₂
13	5	SO ₂
14	5	SO ₂
15	1	Aqua dest.
16	1	Aqua dest.
17	3	Ethanol 70%
18	3	Ethanol 96%
19	3	Ethanol 100%
20	10	Xylol
21	-	Eindeckeln mit Entellan

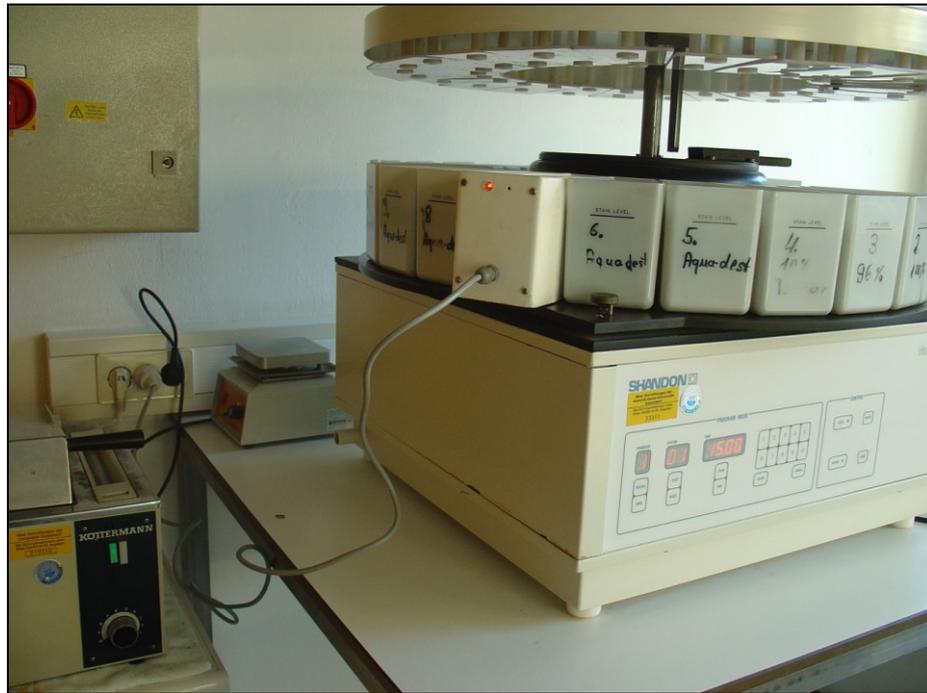


Abb. 5: Automatische Umfärbung der Präparate nach Feulgen

2.4.2 Versuchsaufbau und Vorbereitung der Präparate

Vor der für die DNA-Bildzytometrie notwendigen Umfärbung nach Feulgen wurden alle in Betracht kommenden Objektträger des Patientenkollektivs im Lichtmikroskop betrachtet und die Objektträger mit dem größten Gehalt an verdächtigen Zellen für die DNA-Zytometrie ausgewählt. Solche Einsendungen, bei denen entweder die zytologische Diagnose wegen einer zu geringen Anzahl an diagnostisch relevanten Zellen eingeschränkt war oder Präparate, die von einer Punktion einer Zyste und/oder Pseudozyste stammten und somit keine oder nur eine zu geringe Anzahl und relevanten Zellen enthielten, wurden von der zytometrischen Messung ausgeschlossen und nicht umgefärbt.

Vor der Feulgen-Färbung markierte man zellreiche Areale mit einem Filzstift. Dabei wurde darauf geachtet, wenn möglich nur solche Areale auszuwählen, in denen es keine Überlappungen der Zellkerne untereinander und/oder durch Erythrozyten oder Zelldetritus gab. Anschließend wurden die so markierten Objektträger fotokopiert. Durch die so entstandenen Vorlagen konnte sichergestellt werden, dass auch nach der für die Feulgen-Färbung notwendige Entdeckelung die für die DNA-Zytometrie interessanten Präparatareale erneut markiert und somit schnell wieder gefunden werden konnten.

2.4.3 Die Messung

Die photometrische Messung der integrierten optischen Dichten (IOD) der nach Feulgen gefärbten Zellkerne erfolgte durch ein TV-Bildanalyzesystem (AutoCyte Inc. Quic-DNA, Zeiss, Jena, Deutschland und TriPath, Burlington, USA). Dies besteht aus einem Zeiss-Axioskop mit 40er Objektiv, n.A. 0,75, einem 570 nm-Interferenzfilter +/- 10 nm Halbwertsbreite, einer Schwarzweißkamera mit 572 Linien (VarioCam, Modell CCIR, PCO Computer Optics, Kehlheim) mit Kameraadapter mit einem Vergrößerungsfaktor von 1,6, einem Pentium-PC, Monitor, einer Tastatur mit Maus und einem Farb-Tintenstrahldrucker. Die Monitor-Bilder wurden mit einem Frame-Grabber-Board (Firma Leutron, Zürich, Schweiz) analysiert.

Die Messungen und das TV-Bildanalyzesystem entsprachen den Standards und Anforderungen der European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP), die Richtlinien und Maßnahmen der Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle in den „Consensus Reports of the ESACP Task Force on Standardization of Diagnostic DNA Image Cytometrie“ aufgestellt und veröffentlicht hat (Böcking et al., 1995a; Giroud et al., 1998; Haroske et al., 2001).

Vor jeder Messung wurde eine Köhler'sche Beleuchtung zur Reduzierung des Streulichtes eingestellt. Die Zellkernbilder wurden automatisch mit Hilfe eines Wasserscheidenalgorithmus segmentiert, und der mittlere Grauwert der Umgebung des Zellkerns mit in die Berechnung der integrierten optischen Dichte (IOD) einbezogen.



Abb. 6: Zeiss Axioplan 2 Mikroskop mit Schwarzweisskamera und der AutoCyte Quic-DNA-Workstation Software.

Die Messung der IOD der markierten Zellkerne erfolgte bei grünem Licht bei einem Absorptionsmaximum von 570 nm. In diesem Bereich liegt der Absorptionsgipfel der mit Fuchsinäure gefärbten und somit markierten DNA der Zellkerne. Der Messvorgang der einzelnen Zellkerne umfasste sowohl die Festlegung der Zellgrenzen, die Messung der jeweiligen IOD also auch die Verrechnung der IOD des Hintergrundes mit der IOD des Kerns. Die Auswahl der zu messenden Kerne erfolgte interaktiv durch den Untersucher. Mittels einer an die Kernform und Kerngröße angepassten Messmaske wurde das Markieren einzelner Zellkerne erheblich vereinfacht. Es wurde bei jedem Messvorgang darauf geachtet, dass keine sich überlappenden Zellkerne für die IOD-Messung mit einbezogen wurden, ebenso wenig solche Zellkerne, bei denen ein zu dunkler Hintergrund das Messergebnis zu stark verfälscht hätte. Durch einen von Hand gezogenen Trennstrich konnten jedoch auch zwei sehr dicht beieinander liegende Zellkerne separat voneinander gemessen werden. Auch nekrotische oder autolytische Zellkerne wurden von der Messung ausgeschlossen. Um eine interne Eichung bei jedem neuen Messvorgang sicherzustellen, wurden im Laufe jeder Messung mindestens 30 Referenzzellen gemessen. Dies waren in den meisten Fällen Lymphozyten, nur in Einzelfällen wurden Granulozyten oder normale Epithelzellen als Referenzzellen herangezogen. Die mittlere integrierte optische Dichte (IOD) dieser Referenzzellen wurde vom Untersucher als „ $2c$ “-Wert festgelegt ($1c$ entspricht dem DNA-Gehalt eines einfachen Chromosomensatzes). Dies war jedoch nur zulässig, wenn der Variationskoeffizient (CV-Wert) der Referenzpopulation weniger als 5 % betrug (Böcking et al., 1995a; Haroske et al., 1998).

Wenn möglich, wählte der Untersucher 300 verdächtige und/oder atypische Zellen als Analysezellen aus. Alle gemessenen Zellen wurden zwecks Qualitätssicherung und Ausschluss von Artefakten in einer Bild-Galerie gespeichert, sie sind somit jederzeit bei fraglichen Resultaten einsehbar. Abbildung 7 zeigt eine solche Bild-Galerie während einer Messung.

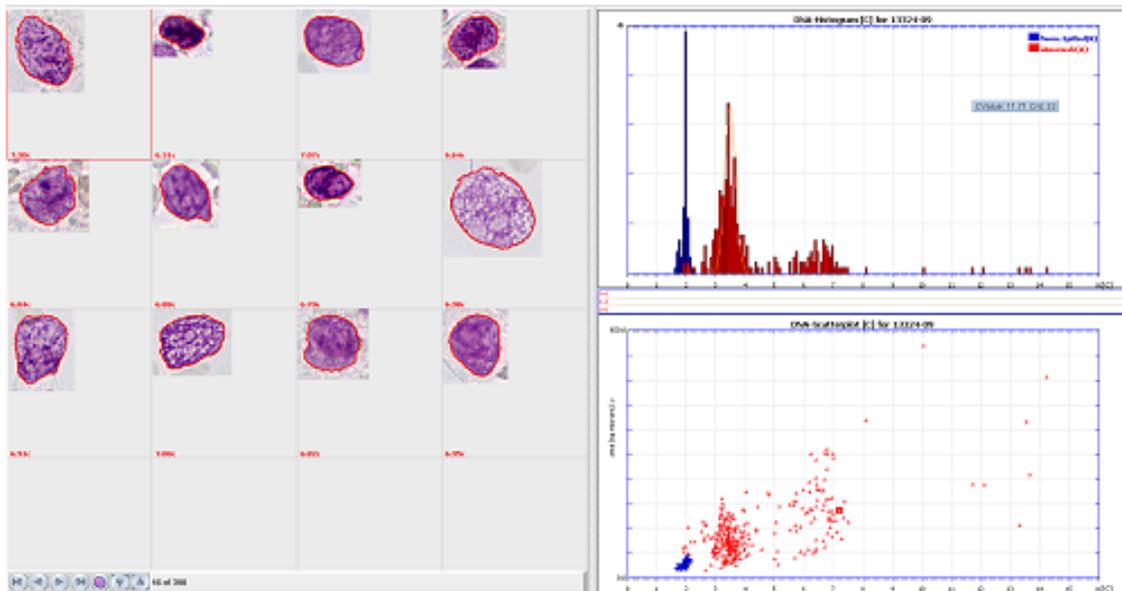


Abb. 7: Bild-Galerie am Ende einer DNA-zytometrischen Messung

Es mussten mindestens 70 verdächtige Zellen gemessen werden, damit eine abschließende Interpretation der Messergebnisse zulässig war. Sowohl die Messwerte der Referenzzellen als auch die der Analysezellen wurden anschließend nach ihrem DNA-Gehalt und der Häufigkeitsverteilung in ein DNA-Histogramm eingetragen. Daraus folgte ein DNA-Histogramm, das auf der Abszisse den DNA-Wert (in der Dimension c) zeigt, und mit der Ordinate die Anzahl der Zellen mit gleichem DNA-Gehalt beschreibt. Abbildungen 8a+b zeigen Beispiele solcher Histogramme. Zum Abschluss markierte der Untersucher noch die Stammlinie im Histogramm und druckte dieses zusammen mit anderen Parametern der Messung aus.

2.4.4 Auswertung und Kriterien der DNA-Aneuploidie

Die DNA-Bildzytometrie misst den Nettoeffekt von numerischen und/oder strukturellen Chromosomenaberrationen, die in malignen und auch vielen benignen Tumoren fast immer nachweisbar sind. Diese Chromosomenaberrationen, ausgelöst durch genetische Instabilität, werden als das Schlüsselereignis in der frühen Tumorgenese betrachtet (Böcking, 1995b; Haroske et al. 2001). Es gilt also, dass DNA-Aneuploidie als Marker für die erfolgte Transformation von Zellen in Neoplasien betrachtet wird. Wichtig ist jedoch, dass ein Fehlen von DNA-zytometrisch messbarer Aneuploidie eine Neoplasie nicht ausschließt (Böcking, 1995b), da eventuell geringe

strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen, z.B. in einer sehr frühen Phase der malignen Transformation, (noch) nicht erfasst werden.

Das für die Interpretation wichtige DNA-Histogramm zeigt dabei die Häufigkeitsverteilung des DNA-Gehaltes der gemessenen Zellen. Bei der Messung einer nicht maligne-entarteten Referenzpopulation zeigt sich im Histogramm ein Häufigkeitsgipfel bei $2c$ ($c = \text{content}$). Dies entspricht einem diploiden DNA-Gehalt im Zellkern. Befinden sich die gemessenen Zellen gerade in der G2/M-Phase des Zellzyklus, können im Histogramm auch Häufigkeitsspitzen um $4c$ ($\pm 10\%$) auftauchen. Verschiedene andere Einflussfaktoren können jedoch auch ohne neoplastische Veränderungen dazu führen, dass die Häufigkeitsgipfel im Histogramm verschoben sind. Zu diesen Faktoren gehören Virusinfektionen mit Humanen Papilloma-, Cytomegalie- oder Herpes-Viren, ebenso Zytostatika, Vitamin B12-Mangel sowie Strahlentherapie (Böcking, 1995b; Duesberg et al., 2004). Aber auch in physiologischen Geweben wurde eine Abweichung der normalen Häufigkeitsverteilungen festgestellt, dies wird als euploide Polyploidisierung beschrieben. In folgenden Geweben wurde dies festgestellt: Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln, Onkozyten, Hepatozyten, Herzmuskelzellen, Samenblasenepithelien, Mesothelien, Megakaryozyten, Urothelien, Thyreozyten und in zervikalen Zylinderepithelien (Biesterfeld et al. 1994; Böcking, 1995b). Um eine Fehlinterpretation der Messergebnisse zu verhindern, müssen diese Ausnahmen und Faktoren bei der Interpretation der Diagramme beachtet werden.

Die diagnostische Befundung erfolgte in den Kategorien euploid (DNA-diploid, -polyploid) und aneuploid. Als DNA-aneuploid werden dabei die DNA-Verteilungen bezeichnet, die signifikant von ruhenden, proliferierenden und polyploiden Zellpopulationen abweichen.

Eine euploide **DNA-Polyploidie** wurde angenommen, wenn Stammlinien, d.h. die dominierenden Häufigkeitsgipfel im Histogramm, innerhalb der Bereiche von 2c (diploid) und 4c (tetraploid) und ggf. 8c (oktaploid) vorlagen, zuzüglich +/- 10% dieser Grenzwerte. Ganz allgemein wird als DNA-Stammlinie (DNA-STL) ein lokaler Häufigkeitsgipfel bezeichnet, dem DNA-Werte im Bereich seiner Verdopplung zugeordnet werden können.

Das Vorliegen einer **DNA-Aneuploidie** wurde angenommen, wenn **1.** die Modalwerte der Stammlinien um mehr als +/- 10% von 2c, 4c oder 8c abgewichen sind (Böcking, 1995b; Haroske et al. 1998) und/oder **2.** Zellen mit einem DNA-Gehalt von mehr als 9c (9c Exceeding Events, 9cEE) nachweisbar waren (Chatelain et al. 1989; Böcking, 1995b).

Abbildungen 8a + 8b zeigen Beispiele für diploide und aneuploide DNA-Histogramme von FNAB des Pankreas.

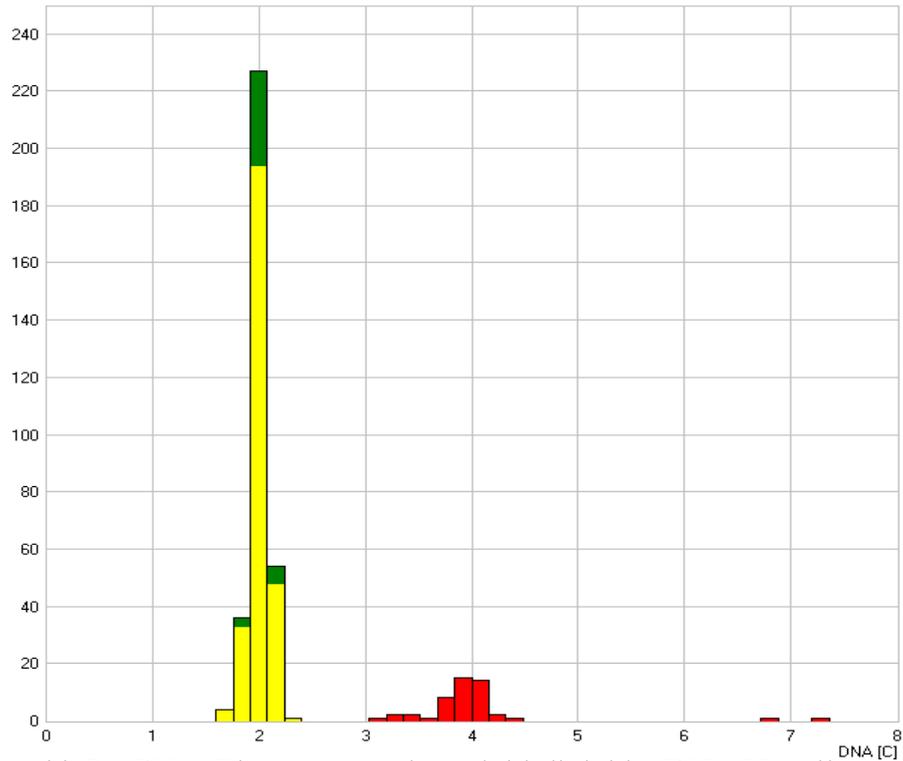


Abb.8a: DNA-Histogramm mit euploid-diploider DNA-Verteilung
(eine DNA-Stammlinie um 2c und einige Werte bei 4c, 9cEE = 0)

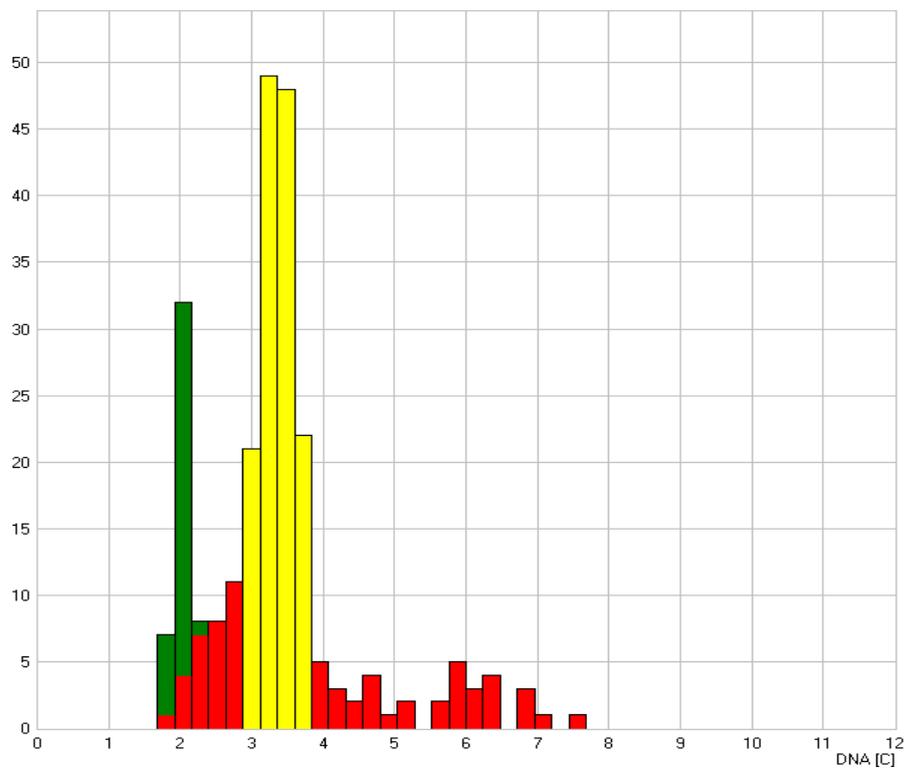


Abb.8b: DNA-Histogramm mit DNA-Stammlinien-Aneuploidie
(eine DNA-Stammlinie um 3,3c, 9cEE = 0)

Vor der Software-unterstützten Interpretation markierte der Untersucher die Stammlinie durch das Anklicken ihres Minimums und Maximums am Computerbildschirm. Die Berechnung des Modalwertes der einzelnen Stammlinien erfolgte anschließend automatisch.

Nur wenn ausschließlich morphologisch-eindeutige Tumorzellen gemessen werden, darf auch ein DNA-Malignitätsgrad bestimmt werden. Da dies bei den Messungen von FNAB aus dem Pankreas nicht sicher gewährleistet werden konnte, erfolgte kein Malignitätsgrading. Tabelle 9 zeigt die Kriterien zur diagnostischen Beurteilung von DNA-Histogrammen.

Tabelle 9: Kriterien zur diagnostischen Beurteilung von DNA-Histogrammen

	Stammlinie (STL)	DNA-Gehalt > 9c (9cEE)
DNA-Diploid	> 1,80c < 2,20c	-
DNA-Polyploid	1) > 1,80c < 2,20c 2) > 3,60c < 4,40c	-
DNA-Aneuploid	1) < 1,80c > 2,20c 2) < 3,60c > 4,40c	mind. 1 Zellkern mit DNA-Gehalt > 9c

2.5 Klinisches Follow-Up

Für die Beurteilung der Richtigkeit der zytologischen und/oder zytometrischen Diagnosen wurde neben den histologischen Ergebnissen auch das klinische Follow-Up herangezogen. Wenn histologische Ergebnisse fehlten, wurden nur die Resultate des klinischen Follow-Up berücksichtigt. Die untersuchten Einsendungen wurden danach klassifiziert, ob sie Tumorzellen enthielten oder nicht. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Patientengeschichte wurden nur dann als zureichend bewertet, wenn sich daraus genügend Beweise für oder gegen das Vorhandensein eines Pankreastumors ergaben. Im Follow-Up wurde die Krankheitsgeschichte der Patienten auf Hinweise untersucht, die für oder gegen eine Tumordiagnose im Pankreas sprachen. Folgende Parameter wurden bei der Follow-Up-Erfassung berücksichtigt und ausgewertet: 1. Histologie, 2. Sonographie/Endosographie-Befunde, 3. CT-, MRT-, Röntgen- /Szintigraphiebefunde, 4. der weitere Krankheitsverlauf, 5. das Sterbedatum des Patienten. Zusätzlich wurde notiert, ob eine Chemo- bzw. Strahlentherapie durchgeführt wurde. Außerdem wurden bei der Durchsicht der Patientenakten die Größe und der Ort der punktierten Raumforderung sowie mögliche Komplikationen notiert.

Die in dieser Studie untersuchten Diagnosen wurden dann als „richtig positiv“ und „richtig negativ“ bewertet, wenn die zytologische Diagnose mit den histologischen Befunden und/oder den Ergebnissen aus dem Patienten-Follow-Up übereinstimmte. War dies nicht der Fall und es lagen eindeutige Diskrepanzen vor, wurden sie als „falsch negativ“ oder „falsch positiv“ bewertet. Für die Auswertung wurden die „zweifelhaften“ zytologischen Diagnosen zu den Test-negativen, die „dringend verdächtigen“ Diagnosen zu den Test-positiven zugeordnet.

Die Eignung der Follow-Up-Befunde, eine valide Basis für das tatsächliche Vorliegen oder Fehlen eines malignen Tumors darzustellen (positiver bzw. negativer Referenzstandard), wurde in verschiedene Evidenzlevel (EL) eingeteilt, Evidenzlevel 1 stellt die niedrigste, Evidenzlevel 6 die höchste Bewertungsstufe bei den positiven Fällen dar. Dementsprechend wurde auch bei den negativen Fällen so verfahren, jedoch stellt hier Evidenzlevel 4 die höchste Stufe dar. Tabelle 10 zeigt die einzelnen Einstufungskriterien und die Anzahl (n) der auf die verschiedenen Evidenzlevel verteilten Befunde.

Tabelle 10: Definition der Einteilungskriterien in „richtig/falsch positiv“ und „richtig/falsch negativ“

*EL = Evidenzlevel; EL1 = niedrigstes Evidenzlevel, EL6 = höchstes Evidenzlevel; in Klammern angegeben: Anzahl n der für das Evidenzlevel zutreffenden Befunde, Insgesamt (zytologische Diagnose + eindeutiges Follow-Up) n= 151; unklares Follow-Up n= 5

		MALIGNES TUMORLEIDEN	
		Positiv	negativ
D I A G N O S E	P o s i t i v	<u>richtig positiv</u>	<u>falsch positiv</u>
		<p>EL1*aus Arztbrief geht die gleiche (im Hinblick auf die Malignität des Prozesses) positive Diagnose hervor wie aus dem zytologischen Befund, keine weitere Diagnoseabsicherung (n= 0)</p> <p>EL2*wie EL1, jedoch mit bestätigtem Follow-Up (durch Behandlung des Tumorgeschehens (n= 0))</p> <p>EL3*ein erneuter zytologischer Befund stützt den zytologischen Befund (n= 1)</p> <p>EL4* Röntgen/Sono/Endosono stützt die zytologische Diagnose (n= 8)</p> <p>EL5* MRT und/oder CT stützen die zytologische Diagnose (n= 39)</p> <p>EL6*Histologie (Stanzbiopsie oder nach operativer Resektion des Herdes) stützen die zytologische Diagnose (n= 49)</p>	<p>EL1*aus Arztbrief geht eine abweichende (im Hinblick auf die Malignität des Prozesses) negative Diagnose hervor als aus dem zytologischen Befund, (es widerlegt jedoch keine Diagnose den zytologischen Befund) (n= 0)</p> <p>EL2* aus Arztbrief geht eine abweichende (im Hinblick auf die Malignität des Prozesses) negative Diagnose hervor als aus dem zytologischen Befund; die Ätiologie der punktierten Raumforderung wurde geklärt (n= 0)</p> <p>EL3*ein weiterer zytologischer Befund steht im Widerspruch zur ersten zytologischen Diagnose (n= 0)</p> <p>EL4* Röntgen/Sono/Endosono widerspricht dem zytologischen Befund (n= 0)</p> <p>EL5* MRT und/oder CT widersprechen dem zytologischen Befund (n= 0)</p> <p>EL6*Histologie (Stanzbiopsie oder nach operativer Resektion des Herdes) widerspricht dem zytologischen Befund (n= 1)</p>
	n e g a t i v	<u>falsch negativ</u>	<u>richtig negativ</u>
		<p>EL1*Prozess wurde im Arztbrief abschließend als positiv beschrieben, jedoch widerlegen keine weiteren Befunde den zytologischen Befund (n= 0)</p> <p>EL2* Prozess wurde im Arztbrief abschließend als positiv beschrieben, weiterer zytologischer Befund oder Bildgebung (außer MT/CT) widerlegt die zytologische Diagnose (n= 1)</p> <p>EL3* Prozess wurde im Arztbrief abschließend als positiv beschrieben, CT- und/oder MRT-Befund widerlegt den zytologischen Befund (n= 6)</p> <p>EL4* Prozess wurde im Arztbrief abschließend als positiv beschrieben, histologische Diagnose widerlegt den zytologischen Befund (n= 6)</p>	<p>EL1*Prozess wurde im Arztbrief abschließend als ungeklärt aber nicht maligne diagnostiziert, Kliniker übernahm die zytologische Diagnose ohne weitere Befundabklärung (n= 2)</p> <p>EL2* Prozess wurde im Arztbrief abschließend als ungeklärt beschrieben, jedoch bestätigen weitere zytologische und/oder histologische Befunde die zytologische Diagnose (n= 2)</p> <p>EL3* Prozess wurde im Arztbrief abschließend als benigne beschrieben, die Ätiologie des Prozesses wurde geklärt (n= 10)</p> <p>EL4* wie EL2, jedoch bestätigen weitere Befunde von Zytologie/ Histologie/Sonographie/Endosonographie/Röntgen/MRT/CT den zytologischen Befund, oder Bestätigung der zytologischen Diagnose durch negatives, mehrjähriges Follow-Up (n= 26)</p>

2.5.1 Kennziffern der statistischen Auswertung

Die Sensitivität sowie die Spezifität wurden anhand der üblichen statistischen Vierfeldertafel berechnet (Hilgers und Bauer, 2007). Zudem wurde die Treffsicherheit sowie der positive als auch der negative Vorhersagewert bestimmt.

Die Sensitivität beschreibt die Empfindlichkeit eines Testverfahrens, da sie die (bedingte) Wahrscheinlichkeit für die richtige Diagnose bei der Erkennung von tatsächlich Kranken angibt.

Sensitivität:

Test positiv und tatsächlich positiv

Gesamtzahl der Erkrankten

Die Spezifität hingegen beschreibt die (bedingte) Wahrscheinlichkeit für ein richtiges Testergebnis bei der Erkennung von gesunden Patienten.

Spezifität:

Test negativ und tatsächlich negativ

Gesamtzahl der Gesunden

Der positive Vorhersagewert gibt die (bedingte) Wahrscheinlichkeit an, bei Vorliegen eines positiven Ergebnisses auch tatsächlich krank zu sein, wohingegen der negative Vorhersagewert die (bedingte) Wahrscheinlichkeit darstellt, bei einem negativen Testergebnis tatsächlich gesund zu sein.

Positiver Vorhersagewert:

Test positiv und tatsächlich positiv

Test positiv

Negativer Vorhersagewert:

Test negativ und tatsächlich negativ

Test negativ

Die Gesamtreffsicherheit beschreibt das Verhältnis von „richtig positiv“ und „richtig negativ“ erkannten Fällen zur Gesamtzahl aller untersuchten Fälle.

Gesamtreffsicherheit (Accuracy):

$$\frac{\text{Anzahl der richtig Negativen} + \text{Anzahl der richtig Positiven}}{\text{Anzahl der richtig Negativen} + \text{richtig Positiven} + \text{Anzahl falsch Negativen} + \text{falsch Positiven}}$$

3 Ergebnisse

3.1 Allgemein

Wie Abbildung 9 deutlich macht, konnte ich im Rahmen dieser Arbeit von den 177 punktierten Patienten 156 gültige und zureichende Follow-Up-Erfassungen erheben. Dabei wurde bei den Patienten, die ein zweites Mal zeitversetzt punktiert wurden, separat nur die erste oder zweite, nicht jedoch beide Diagnosen gleichzeitig mit in die Berechnung der Ergebnisse einbezogen.

In sechs Fällen gelang es nicht, eine ausreichende Nachbeobachtung der einzelnen Krankheitsverläufe zu gewährleisten, da die Akten nicht einsehbar waren. Es blieben in dieser Untersuchung auch alle 15 Biopsien, die als „unzureichend“ klassifiziert wurden, unberücksichtigt.

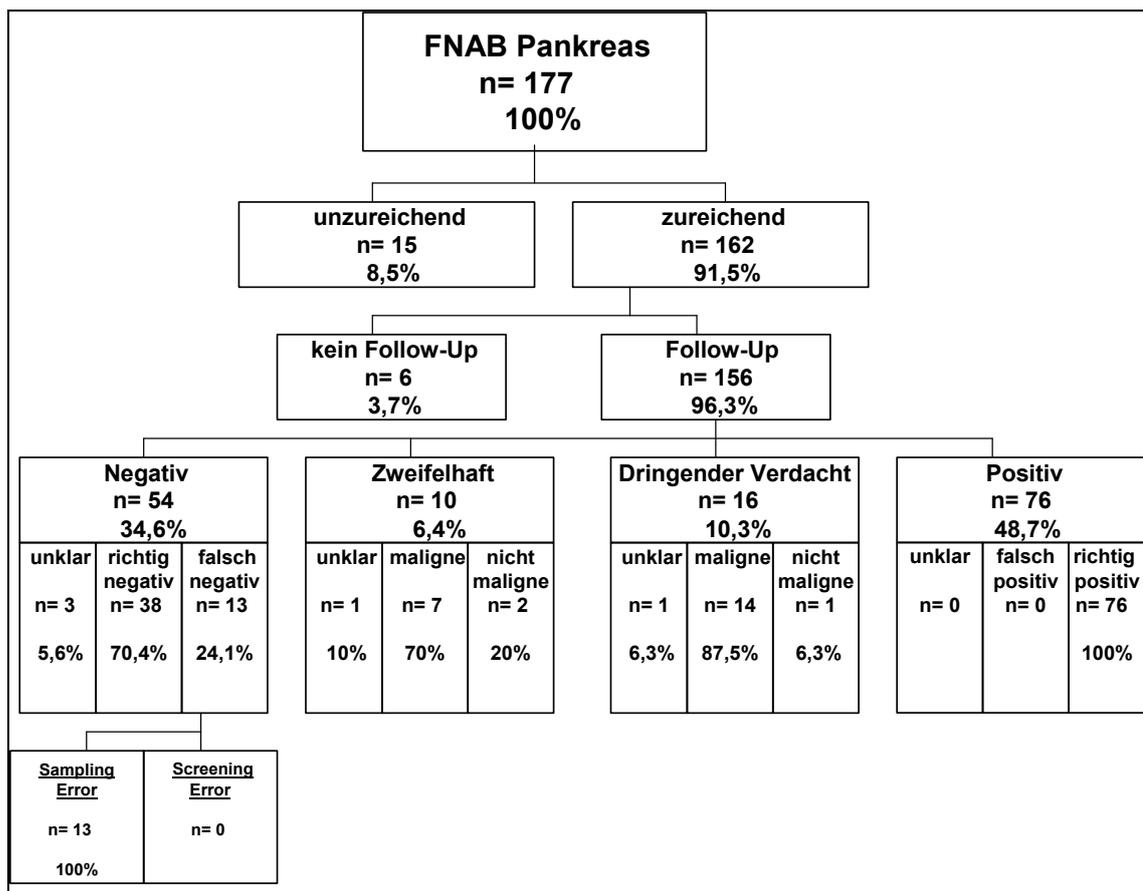


Abb. 9: Follow-Up nach einmaliger Punktion

Als erstes untersuchten wir die Treffsicherheit für alle zytologischen Diagnosen nach einmaliger Punktion. Anschließend berechneten wir die Steigerung der Treffsicherheit bei einer Wiederholung der Punktion.

3.1.1 Evidenzlevel der Follow-Up-Erhebungen

Wie deutlich in Tabelle 11 und Abbildungen 10a und 10b zu erkennen ist, ließen sich der Großteil der Follow-Up-Erhebungen in die zwei jeweils höchsten Kategorien einordnen, bei den negativen Fällen fielen nur 5 von 53 Erhebungen auf die beiden niedrigsten Evidenzlevel aus. Bei den positiven Befunden stellt ein Fall mit Evidenzlevel 3 die niedrigste Kategorie der in dieser Studie verwendeten Follow-Up-Erhebungen dar.

Tabelle 11: Aufteilung der Follow-Up-Erhebungen nach Evidenzlevel. Insgesamt (zytologische Diagnose + eindeutiges Follow-Up) n= 151, unklares Follow-Up n= 5

Evidenzlevel	Anzahl n	
	positive Diagnosen	negative Diagnosen
1	0	2
2	0	3
3	1	16
4	8	32
5	39	-
6	50	-
Gesamt	98	53

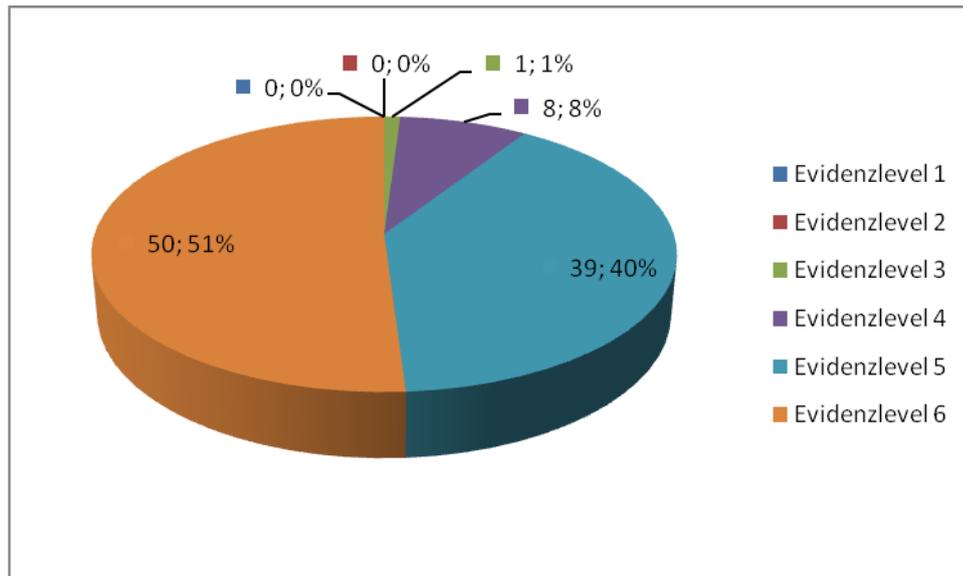


Abb. 10a: Graphische Darstellung der Aufteilung nach Evidenzlevel der positiven Diagnosen

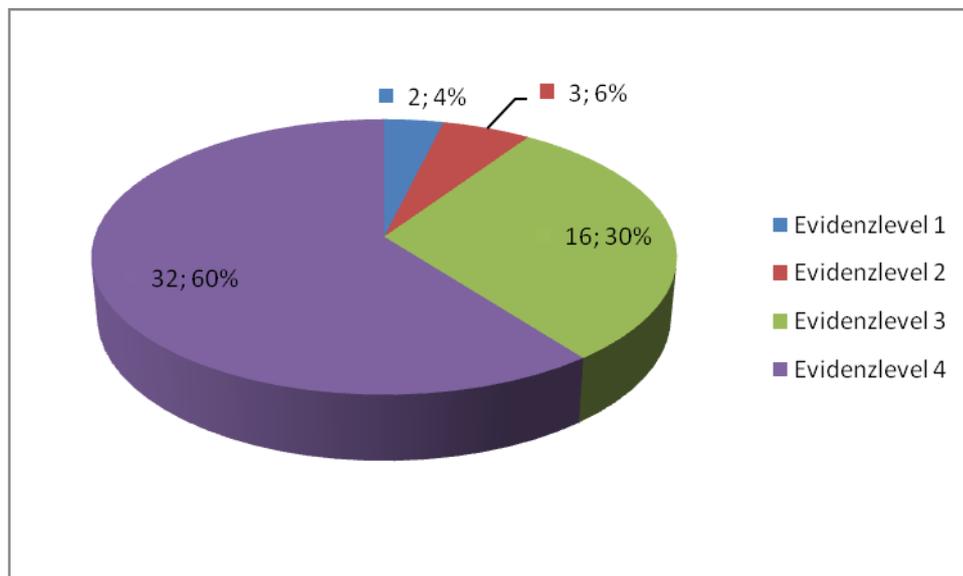


Abb. 10b: Graphische Darstellung der Aufteilung nach Evidenzlevel der negativen Diagnosen

3.2 „Negative“ Fälle

3.2.1 Zytologische Ergebnisse

Die Analyse der Daten ergab, dass von den in den Jahren 2005 und 2006 zur zytopathologischen Begutachtung eingeschickten Präparaten 54 als „negativ“ klassifiziert worden sind. Dies entspricht einem relativen Anteil von 34,6 % aller zureichenden und mit einem Follow-Up versehenen Biopsien. Von den 54 gestellten Diagnosen „Tumorzell-negativ“ konnten drei (5,6 %) durch ein unklares Follow-Up weder bestätigt noch falsifiziert werden und fallen deshalb aus der Studie heraus. Von den restlichen 51 untersuchten Einsendungen konnten 38 als „richtig negativ“ und 13 als „falsch-negativ“ klassifiziert werden. Dies entspricht einem relativen Ergebnis von 74,5 % „richtig negativen“ und 25,5 % „falsch negativen“ Diagnosen, abzüglich der Diagnosen mit unklarem Follow-Up. Von den 13 „falsch-negativen“ Befunden wurden fünf (38,5 %) vom Zytopathologen mit dem Vermerk versehen: „Diagnostische Sicherheit eingeschränkt wegen zu geringer Anzahl diagnostisch relevanter Zellen“. Alle der 13 „falsch-negativen“ Ergebnisse wurden ein zweites Mal von einem erfahrenen Zytopathologen begutachtet und weiterhin als „negativ - ohne Tumorzellen“ bewertet.

Wenn man jedoch den jeweils zweiten Befund der doppelt biopsierten Patienten heranzieht, ergibt sich, wie Abbildung 11 deutlich macht, dass von den 54 gültigen Diagnosen nur noch 49 als „negativ“ bewertet wurden. Dies entspricht einem relativen Anteil von 31,4 %.

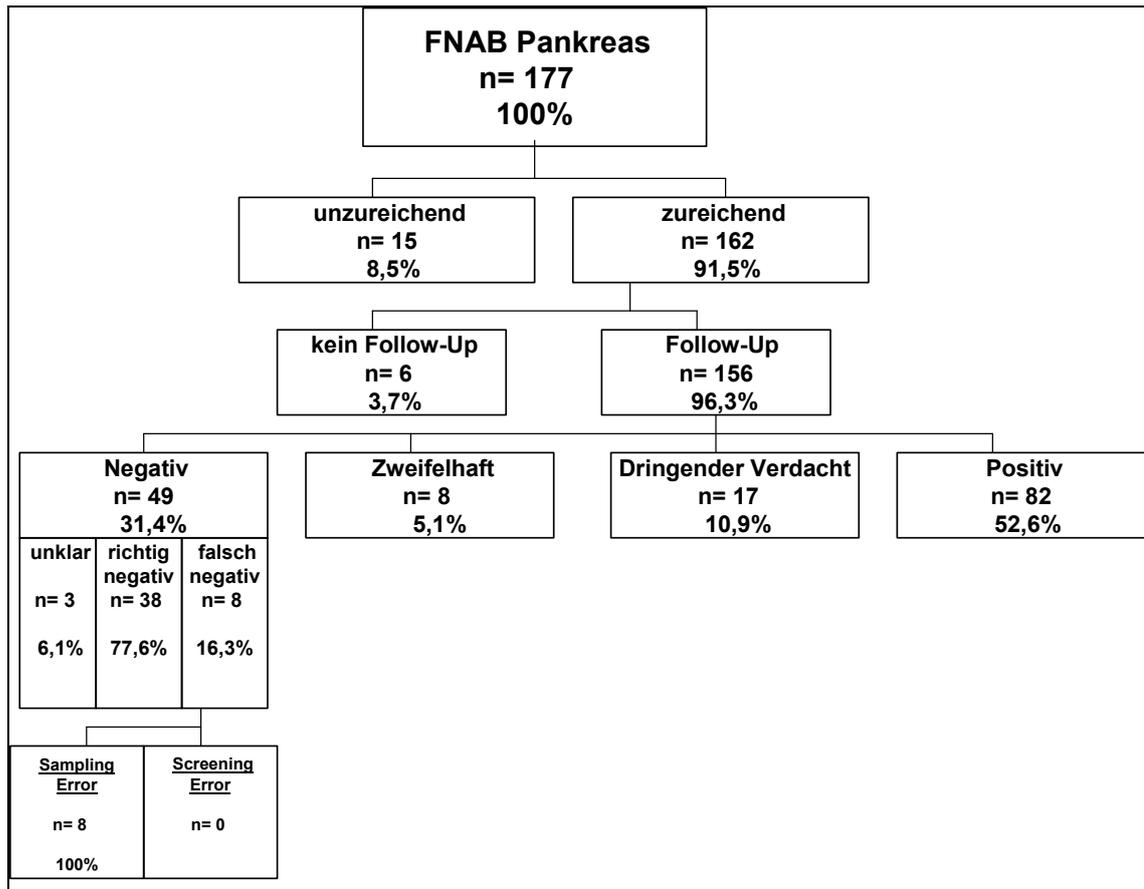


Abb. 11: Follow-Up nach wiederholter Punktion in 15 Fällen

Von diesen 49 negativen Diagnosen waren wiederum drei, also 6,1 %, aufgrund eines unklaren Ergebnisses der Follow-Up-Erfassung nicht zu bewerten. Die restlichen 46 Befunde teilten sich in 38 als „richtig negativ“ und 8 als „falsch negativ“ eingeordnete Diagnosen auf. Dies entspricht unter Nichtberücksichtigung der unklaren Fälle einem prozentualen Ergebnis von 82,6 % „richtig negativen“ und 17,4 % „falsch negativen“ Klassifizierungen. Zu den 8 „falsch negativen“ Befunden bleibt zu erwähnen, dass in der Abschlussdiagnose in 4 Fällen der Zusatz: „Diagnostische Sicherheit eingeschränkt wegen zu geringer Anzahl diagnostisch relevanter Zellen“ zu finden war. Wie schon oben erwähnt, wurden alle genannten 8 „falsch negativen“ Befunde ein zweites Mal von einem erfahrenen Zytopathologen begutachtet und weiterhin als „negativ - ohne Tumorzellen“ bewertet.

Tabelle 12 zeigt, dass sich die Zahl der als „negativ“ klassifizierten Punktate auch nach erneuter Begutachtung durch einen erfahrenen Zytopathologen nicht verändert hat. Fünf negative Befunde, die nicht mit dem Follow-Up zu vereinbaren waren, sind alle durch die spätere Zweitbiopsie korrigiert worden.

Viermal wurde der zytologische Befund der zweiten zu einem späteren Zeitpunkt wiederholten Biopsie mit „positiv“ und einmal „mit dringendem Verdacht“ bewertet, so dass es sich in allen ursprünglich 13 „falsch-negativen“ Fällen um einen Sampling-Error handelt, und sie somit einer Fehlpunktion zuzuschreiben sind.

Tabelle 12: Überprüfung der falsch-negativen Diagnosen

Punktionszytologie der „negativen“ Fälle	Anzahl nach 1. Durchsicht	Anzahl nach 2. Durchsicht	Anzahl nach 2. Punktion
richtig negativ	38	38	38
falsch negativ	13	13	8

3.2.2 Zytometrische Ergebnisse

Nach der zytomorphologischen Diagnostik wurde eine DNA-zytometrische Messung der Präparate durchgeführt. Dies gelang jedoch nur, wenn das Präparat sowohl genügend messbare Zellen nach den in Absatz 2.2 genannten Kriterien als auch ausreichend viele Referenzzellen enthielt. Zusätzlich wurden auch die Präparate von der Messung ausgeschlossen, die entweder im Rahmen der immunzytochemischen Diagnostik umgefärbt worden waren, den Zusatz „Diagnostische Sicherheit eingeschränkt“ trugen als auch solche, bei denen einen Zyste diagnostiziert worden war.

Wie Abbildung 12 zeigt, wurden von den 49 als „negativ“ beurteilten Präparaten 11 (22,4 %) DNA-zytometrisch gemessen. Die restlichen 38 Fälle (77,6 %) konnten bei der DNA-Zytometrie aus den oben genannten Gründen nicht berücksichtigt werden.

negativ n= 49 31,4%		
DNA-Zytometrie		
nicht messbar n= 38 77,6%	Aneuploid: n= 0 0%	Not Aneuploid n= 11 22,4%
maligne n= 5 13,2%	maligne n= 0	maligne n= 3 27,3%
nicht maligne: n= 31 81,6%	nicht maligne: n= 0	nicht maligne: n= 7 63,6%
unklar n= 2 5,3%	unklar n= 0	unklar n= 1 9,1%
Follow-Up		

Abb. 12: Ergebnisse der DNA-Zytometrie bei negativer zytologischer Diagnose

In allen 11 adjuvant durchgeführten Messungen ergab die DNA-Zytometrie eine not-aneuploide bzw. euploide DNA-Verteilung und somit ein mit der negativen zytologischen Diagnose konformes Ergebnis. Es wurden mindestens 30 und höchstens 48 Referenzzellen (Durchschnittswert: 33,2) und zwischen 80 und 370 Analysezellen (Durchschnittswert: 213) ausgewählt.

In drei Fällen (27,3 %) zeigte sich ein Pankreaskarzinom im Follow-Up. Diese drei Präparate wurden jedoch schon morphologisch als „falsch negativ“ klassifiziert und daraufhin ein zweites Mal zytologisch begutachtet. Wie in Absatz 3.2.1. beschrieben, konnten auch bei der wiederholten Durchsicht keine Tumorzellen in den Präparaten festgestellt werden, so dass auch das Ergebnis der DNA-Zytometrie auf eine Fehlpunktion bzw. „Sampling Error“ hindeutet. In 7 Fällen (63,6 %) stimmte der Follow-Up-Befund einer Pankreatitis mit der euploiden DNA-Verteilung überein. In einem Fall (9,1 %) konnte die Frage der Dignität des klinisch erhobenen Befundes nicht hinreichend geklärt werden und blieb somit unklar.

3.3 „Zweifelhafte“ Fälle

3.3.1 Zytologische Ergebnisse

Für die zehn Fälle in der diagnostischen Kategorie „zweifelhaft“ wurden zehn Patienten punktiert, bei zwei Patienten wurde die Punktion zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt und die zytologische Diagnose geändert. Die Auswertung der Follow-Up-Daten der zehn während des ersten Punktionsversuches als „zweifelhaft“ klassifizierten Punktate (6,4%) ergab, dass in sieben Fällen (70 %) ein malignes Geschehen festgestellt werden konnte, jedoch in einem Fall (10 %) die Frage nach der Dignität der Neoplasie nicht beantwortet werden konnte. In zwei Fällen (20 %) lag kein Anhalt auf Malignität vor. Bei fünf der sieben (71,2 %) als „zweifelhaft“ eingeordneten Diagnosen mit positiver Tumordiagnose im Follow-Up wurde der Zusatz: „Diagnostische Sicherheit eingeschränkt wegen zu geringer Anzahl diagnostisch relevanter Zellen“ in dem Befund mit angegeben.

Bei den beiden doppelt punktierten Patienten wurde die jeweils zweite zu einem späteren Zeitpunkt erhobene Diagnose in einem Fall auf „dringend verdächtig“ und in dem anderen Fall auf „positiv“ bezüglich des Vorhandenseins von malignen Tumorzellen hochgestuft. Im ersten Fall wurde die Tumordiagnose durch das klinische Follow-Up bestätigt und im zweiten Fall ergab die Nachbeobachtung der Krankengeschichte den klinischen Befund eines inoperablen Pankreas-Kopf-Karzinoms. Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, sank dadurch die Anzahl der als „zweifelhaft“ beschriebenen Fälle von zehn auf acht (5,1 %).

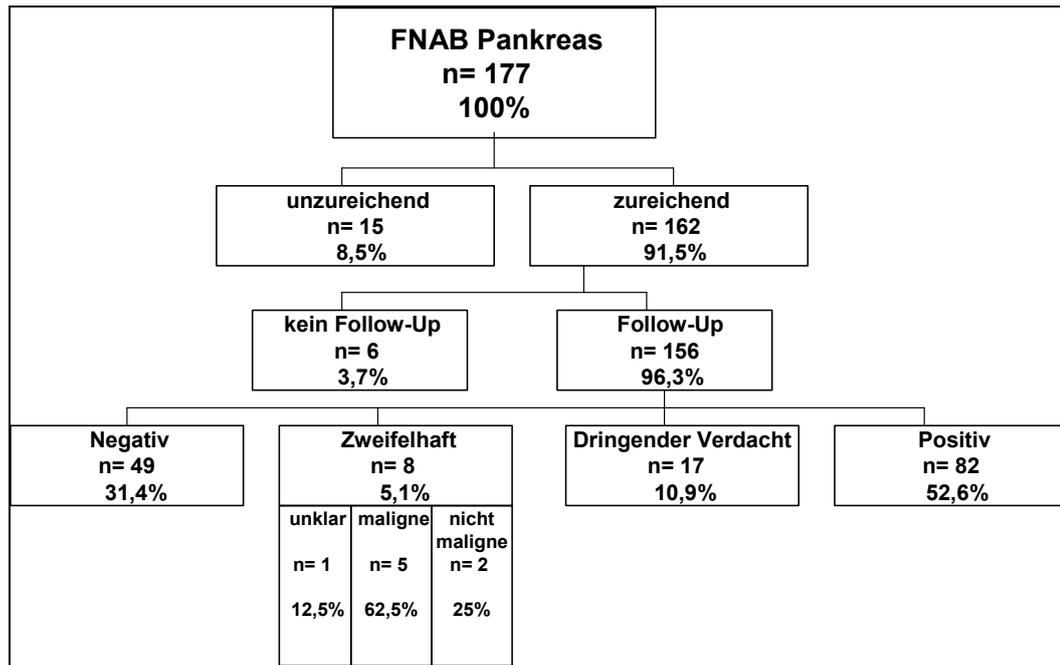


Abb. 13: Follow-Up der „zweifelhaften“ zytologischen Tumordiagnosen nach wiederholter Punktion in 15 Fällen

3.3.2 Zytometrische Ergebnisse

Wie Abbildung 14 zeigt, konnten vier der acht (50 %) „zweifelhaften“ Fälle aufgrund einer zu geringen Anzahl an diagnostisch relevanten Zellen aus dem Pankreas nicht DNA-zytometrisch gemessen werden. Die Messung der restlichen vier Präparate ergab in einem Fall ein aneuploides (12,5 %) und dreimal (37,5 %) ein not-aneuploides Resultat. Es wurden zweimal 30 und jeweils einmal 31 und 32 Referenzzellen (Durchschnittswert: 30,75) und zwischen 303 und 363 Analysezellen (Durchschnittswert: 337) ausgewählt.

Der aneuploide Befund ging mit der klinischen Diagnose eines fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms einher und bestätigte auch somit die zytologisch erhobene Diagnose eines malignen Tumors. Eine der drei not-aneuploiden Messungen konnte durch den histologischen Befund „kein Anhalt für Malignität“ verifiziert werden. Im zweiten Fall wurde die Raumforderung im Follow-Up als „benignes Cystadenom“ beschrieben, was die Richtigkeit der zytologischen Diagnose anzeigt, da die Läsion im zytologischen Gutachten auch als „benignes muzinöses Cystadenom im Pankreas“ beschrieben wurde. Im dritten Fall ergab das Follow-Up den dringenden CT- und endosonographisch gestützten Verdacht eines malignen Pankreas-Kopf-Tumors mit tumorbedingter Stenose des Ductus Hepatocholedochus (DHC) und wurde somit in die Kategorie „falsch-negativ“ eingeordnet.

Zweifelhaft n= 8 5,1%		
DNA-Zytometrie		
nicht messbar n= 4 50%	Aneuploid: n= 1 12,5%	Not Aneuploid n= 3 37,5%
maligne n= 3 75%	maligne n= 1 100%	maligne n= 1 33,3%
nicht maligne: n= 0	nicht maligne: n= 0	nicht maligne: n= 2 66,6%
unklar n=1 25%	unklar n= 0	unklar n= 0
Follow-Up		

Abb. 14: Ergebnisse der DNA-Zytometrie bei Präparaten mit der zytologischen Diagnose „zweifelhaft“

3.4 „Dringend verdächtige“ Fälle

3.4.1 Zytologische Ergebnisse

Die Anzahl der „dringend verdächtigen“ Diagnosen bzgl. des Vorhandenseins einer Neoplasie veränderte sich durch die Wiederholung der Punktion nur sehr geringfügig. Die Anzahl erhöhte sich von 16 nach einmaliger auf 17 nach der erneuten FNAB bei einem Patienten.

Die Überprüfung der ursprünglich 16 als „dringend verdächtig“ klassifizierten Diagnosen, was einem relativen Anteil von 10,3 % entspricht, ergab, dass sich bei 14 Patienten der maligne Tumorverdacht bestätigte, ein Fall unklar blieb und nur bei einem Patienten keine maligne Neoplasie nachgewiesen werden konnte. Da wir bei der Berechnung der statistischen Werte wie Sensitivität, Spezifität und der Gesamttreffsicherheit alle „dringend Verdächtigen“ Fälle mit zu den positiven Befunden zählten, ergibt sich daraus, dass in 14 Fällen eine „richtig-positive“ (93,3 %)

und in einem Fall eine „falsch-positive“ Aussage (6,7 %) seitens der Zytopathologen getroffen wurde.

Wie die folgende Tabelle 13 im Einzelnen verdeutlicht, wurde 13-mal ein primäres Pankreaskarzinom diagnostiziert, in sieben Fällen konnte dies auch histologisch gesichert werden. Bei einem dieser Patienten konnte die durch eine PE gewonnene Histologie kein malignes Geschehen im Pankreas feststellen, da jedoch alle klinischen und radiologischen Anzeichen sowie die begonnene Chemotherapie für die Richtigkeit der im Follow-Up erhobenen Diagnose sprachen, wurde dieser Fall als „richtig positiv“ bewertet. Darüber hinaus wurde jeweils einmal ein Neuroendokriner Tumor unklarer Dignität, ein B-Zell-Lymphom, sowie eine benigne ductale Pankreas-Zyste, in diesem Fall auch histologisch gesichert, im Follow-Up beschrieben. Die benigne Zyste wurde fälschlicherweise als Tumor gedeutet, sodass wir diesen Fall als „falsch positiv“ einordneten.

Tabelle 13: Häufigkeitsverteilung der Abschlussdiagnose bei „dringend verdächtigen“ Fällen

Diagnose mit der Diagnose „dringender Verdacht“	Anzahl n =
Primäres Pankreaskarzinom	13
Neuroendokriner Tumor unklarer Dignität	1
B-Zell-Lymphom	1
benigne ductale Pankreas-Zyste	1
Gesamt	16

Bei drei Patienten blieb auch bei der Wiederholung der FNAB der „dringende Verdacht“ auf das Vorliegen von Tumorzellen bestehen. Bei einem Patienten wurde nach der zweiten Biopsie die Diagnose von „dringend verdächtig“ auf „positiv“ heraufgesetzt. Hinzu kamen noch zwei weitere nach der zweiten Punktion als „dringend Verdächtig“ kategorisierte zytologische Befunde, die nach der ersten Punktion als „negativ“ und „zweifelhaft“ diagnostiziert worden waren.

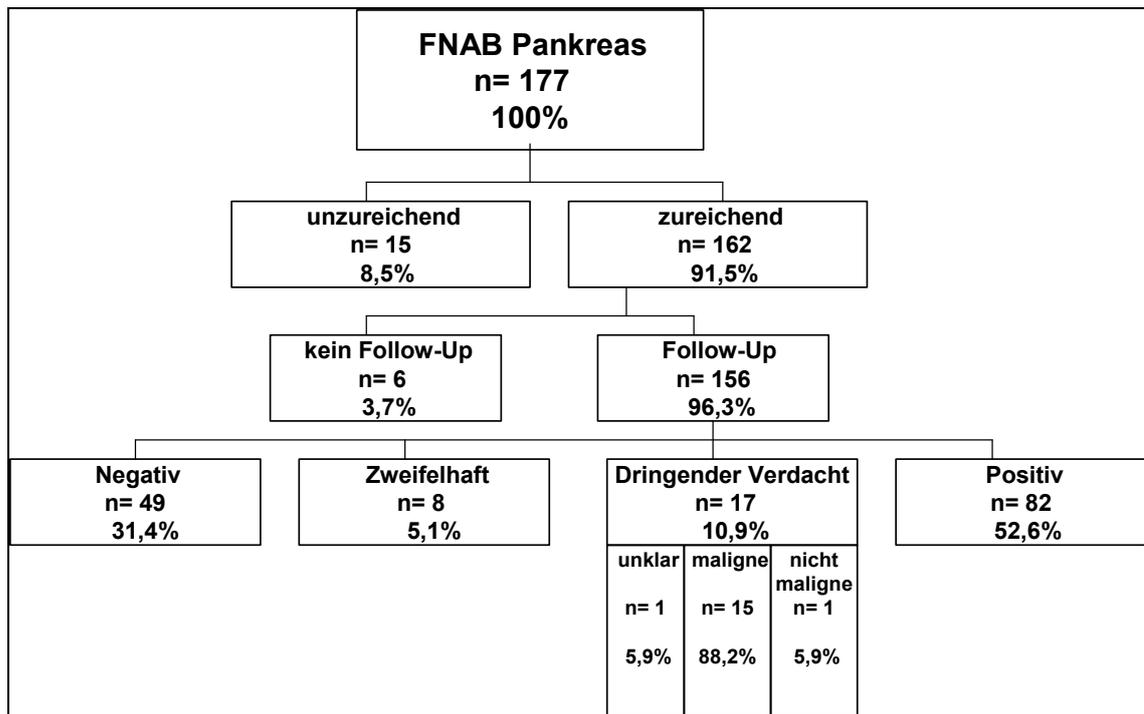


Abb. 15: Follow-Up der „dringend verdächtigen“ zytologischen Tumordiagnosen nach in 15 Fällen wiederholter Punktion

Wie Abbildung 15 demonstriert, wurden alles in allem unter Einbeziehung der wiederholten FNAB 17 (10,9 %) der 156 Fälle als „dringend verdächtig“ bewertet. Davon wurden 15 Fälle (93,8 %) als „richtig positiv“ und wiederum ein Fall (6,2 %) als „falsch positiv“ bewertet. In einem Fall konnte die Dignität der Läsion nicht hinreichend geklärt werden, dieser Fall wurde als unklar kategorisiert.

Die „falsch positive“ Diagnose wurde zum zweiten Mal für den gleichen Patienten gestellt. Die zytologische Diagnose lautete zunächst erneut: „Dringender Verdacht auf Vorliegen eines Azinus-Zell-Karzinoms“. Dies konnte jedoch im Follow-Up nicht bestätigt werden, da die unklare Raumforderung im Pankreas als histologisch gesicherte benigne ductale Pankreaszyste in der Abschlussdiagnose beschrieben wurde. In diesem besonderen Fall führte der zuständige Zytopathologe eine direkte DNA-zytometrische Messung der Präparate dieses Patienten durch. Diese ergab keinen Nachweis von Aneuploidie, und die Verdachtsdiagnose wurde auf „zweifelhaft - Kein sicherer Nachweis von Tumorzellen, Zellbild entspricht abnormen Azinusepithelzellen“ zurückgestuft. Das aneuploide Ergebnis der schon nach der ersten FNAB

durchgeführten DNA-Zytometrie wurde in der Nachbetrachtung für ungültig erklärt, da technische Fehler während des Messvorgangs das Resultat verfälschten.

Wie in der nachstehenden Tabelle 14 zusammengefasst, blieb die Anzahl der in dieser zytologischen Kategorie diagnostizierten Primären Pankreaskarzinome insgesamt gleich. Zusätzlich wurde jedoch auch ein Malignom mit unklarem Primarius entdeckt, dass folgerichtig in die Kategorie „richtig positiv“ mit eingeordnet wurde.

Tabelle 14: Häufigkeitsverteilung der Abschlussdiagnose bei „dringend verdächtigen“ Fällen

Diagnose mit der Diagnose „dringender Verdacht“	Anzahl n =
Primäres Pankreaskarzinom	13
Neuroendokriner Tumor unklarer Dignität	1
B-Zell-Lymphom	1
benigne ductale Pankreas-Zyste	1
Malignom mit unklarem Primarius	1
Gesamt	17

3.4.2 Zytometrische Ergebnisse

Von den 17 in der diagnostischen Kategorie „dringender Verdacht“ beschriebenen Fällen konnten sechs (35,3 %) aus den in Abschnitt 2.2 genannten Ausschlusskriterien nicht zytometrisch gemessen werden. Die restlichen 11 Diagnosen (64,7 %) konnten um die adjuvante DNA-Zytometrie ergänzt werden. Abbildung 16 stellt diesen Sachverhalt anschaulich dar.

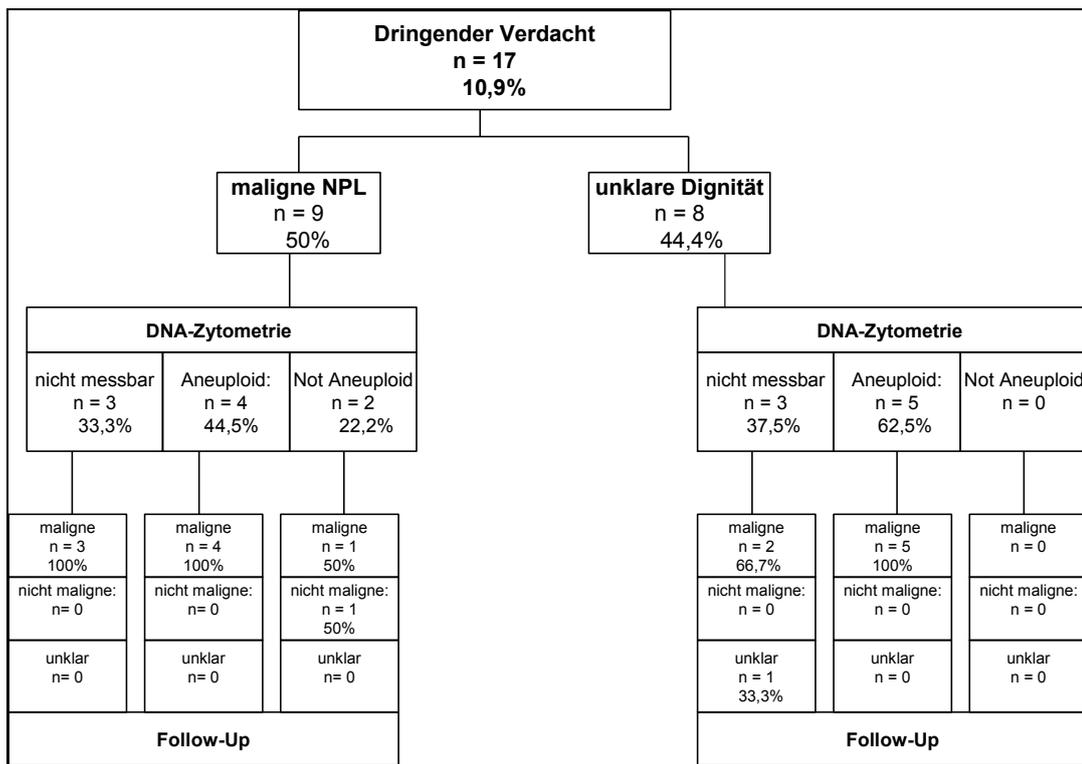


Abb.16: Follow-Up der DNA-Zytometrie bei Präparaten mit der zytologischen Diagnose „dringender Verdacht“

Insgesamt wurden dabei wenigstens 30 und maximal 54 Referenzzellen (Durchschnittswert: 34,82) und zwischen 135 und 430 Analysezellen (Durchschnittswert: 294,6) selektiert.

Bei vier der neun Patienten (44,5 %), bei denen zytologisch eine maligne Neoplasie beschrieben worden war, zeigte sich Aneuploidie in der DNA-Zytometrie. In zwei weiteren Fällen (22,2 %) konnte jedoch trotz „dringendem Verdacht auf Vorliegen von malignen Zellen“ keine Aneuploidie festgestellt werden, obwohl sich ein Verdacht durch das Follow-up bestätigte. Im anderen Fall wurde hingegen, wie schon oben beschrieben, das „not aneuploide“ Ergebnis der DNA-Zytometrie verifiziert, da sich die punktierte Läsion histologisch gesichert als „benigne ductale Pankreaszyste“ darstellte. Insofern verbesserte die DNA-Zytometrie das „falsch-positive“ zytologische Ergebnis, indem sie die Raumforderung „richtig-negativ“ diagnostizierte. Die Präparate von drei Patienten (33,3 %) mit sowohl zytologischer als auch klinisch bestätigter Diagnose eines Malignoms konnten nicht gemessen werden, da nicht ausreichend Analysezellen den in Abschnitt 2.4.3 beschriebenen Auswahlkriterien genügten. Von den acht als „dringend verdächtig“ beschriebenen Punktaten mit unklarer Dignität stellten sich fünf (62,5 %) als aneuploid dar, in drei Fällen (37,5 %) konnte keine zytometrische Messung vorgenommen werden. Insgesamt stellten sich alle neun in der Kategorie „dringender Verdacht“ durch die DNA-Zytometrie erhobenen aneuploiden Befunde als „richtig positiv“ dar. Demgegenüber steht der oben beschriebene eine Fall einer „falsch negativen“ zytometrischen Diagnose.

Nachstehende Tabelle 15 und Abbildung 17 stellen erneut dar, wie häufig die einzelnen Kriterien für die Feststellung der Aneuploidie herangezogenen wurden. Viermal wurde die Aneuploidie durch die Stammlinieninterpretation bestimmt. In einer Messung gab die Anzahl der Zellen mit einem DNA-Gehalt $>9c$ den Ausschlag für die Diagnose: Aneuploidie. Weitere viermal waren beide Kriterien der Aneuploidie im Histogramm zu finden. Der höchste $9cEE$ -Wert einer aneuploiden Messung betrug 21,49c.

Tabelle 15: Kriterien der Aneuploidie in den „dringend verdächtigen“ Fällen

DNA-zytometrische Kriterien, anhand derer Aneuploidie festgestellt wurde	Anzahl n =
Stammlinie (STL) alleine	4
9cEE alleine	1
beide Kriterien (STL + 9cEE) kombiniert	4
Gesamt	9

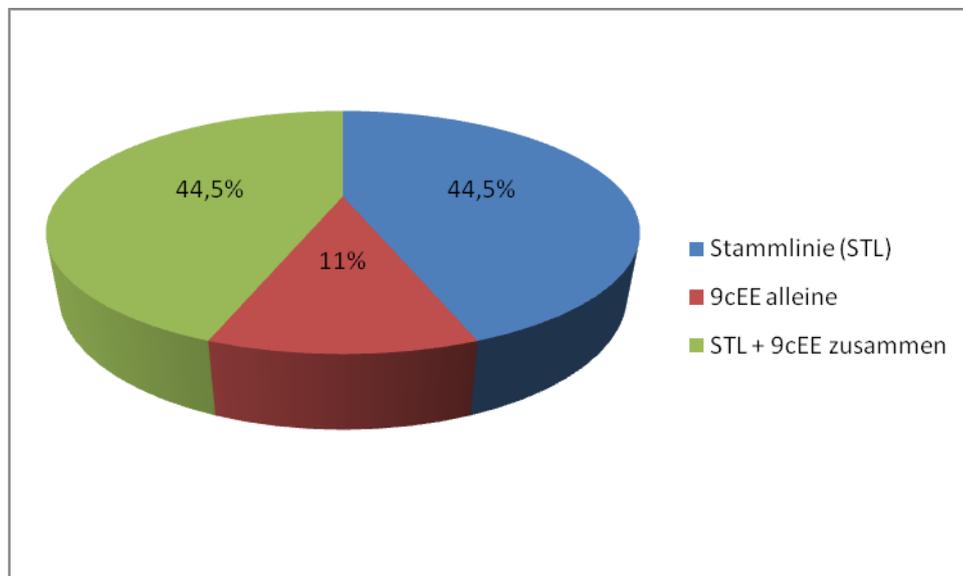


Abb. 17: Häufigkeitsverteilung der für die Diagnose „Aneuploid“ herangezogenen Kriterien der dringend verdächtigen Fälle

3.5 „Positive Fälle“

3.5.1 Zytologische Ergebnisse

Wieder beginnend in der Annahme, dass jeder der 156 Patienten nur ein einziges Mal biopsiert wurde, ergab die Analyse der Daten, dass 76-mal eine „positive“ Diagnose gestellt wurde. Dies entspricht einem relativen Anteil von 48,7 % aller Biopsien. In allen 76 „positiven“ Fällen konnte der Tumorbefund durch die Follow-Up-Erhebung bestätigt werden. Da es keine unklaren oder „falsch positiven“ Ereignisse bei der Auswertung der Daten gab, konnten somit 100 % der zytologisch als „positiv“ bewerteten Fälle als „richtig positiv“ eingestuft werden.

Die Erhebung kam zu dem Ergebnis, dass es sich bei den punktierten Raumforderungen in 70 Fällen um Primäre Pankreaskarzinome und in jeweils 6 Fällen um eine Metastase von einem anderen malignen Tumor handelte (Tabelle 16). Im Einzelnen wurden jeweils eine Metastase eines Colon- und eines Ovarial-Karzinoms sowie zwei Bronchial-Karzinom-Metastasen im Pankreas diagnostiziert. In einem Fall wurde eine Pankreas-Beteiligung des bekannten multiplen Myeloms richtig diagnostiziert. Zusätzlich wurde auch die Pankreas-Metastasierung eines malignen Melanoms durch die durchgeführte FNAB entdeckt.

Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung der Abschlussdiagnose bei „positiven“ Fällen

Diagnose der „Tumorzell-positiven“ Fälle	Anzahl n =
Primäres Pankreaskarzinom	70
Metastase eines Ovarial-Ca	1
Metastase eines Bronchial-Ca	2
Metastase eines malignen Melanoms	1
Metastase eines Colon-Ca	1
Pankreasbeteiligung eines Multiplen Myeloms	1
Gesamt	76

Insgesamt konnte die Diagnose in 40 Fällen histologisch gesichert werden. Bei zwei Patienten war der histologische Befund unauffällig, jedoch sprachen die klinischen Angaben sowie das weitere Vorgehen der behandelnden Ärzte für die Richtigkeit der zytologischen Diagnose, so dass beide Fälle als „richtig positiv“ klassifiziert wurden.

In 36 Fällen stand kein histologischer Befund zur Verfügung, so dass sich die Überprüfung der zytologischen Diagnosen auf das klinische Follow-Up stützte. Berücksichtigte man auch die Befunde der sechs Patienten, die erst nach der zweiten FNAB eine positive Diagnose aufwiesen, erhöhte sich die Anzahl auf 82 „positive“ Diagnosen. Dies wird in Abbildung 18 veranschaulicht.

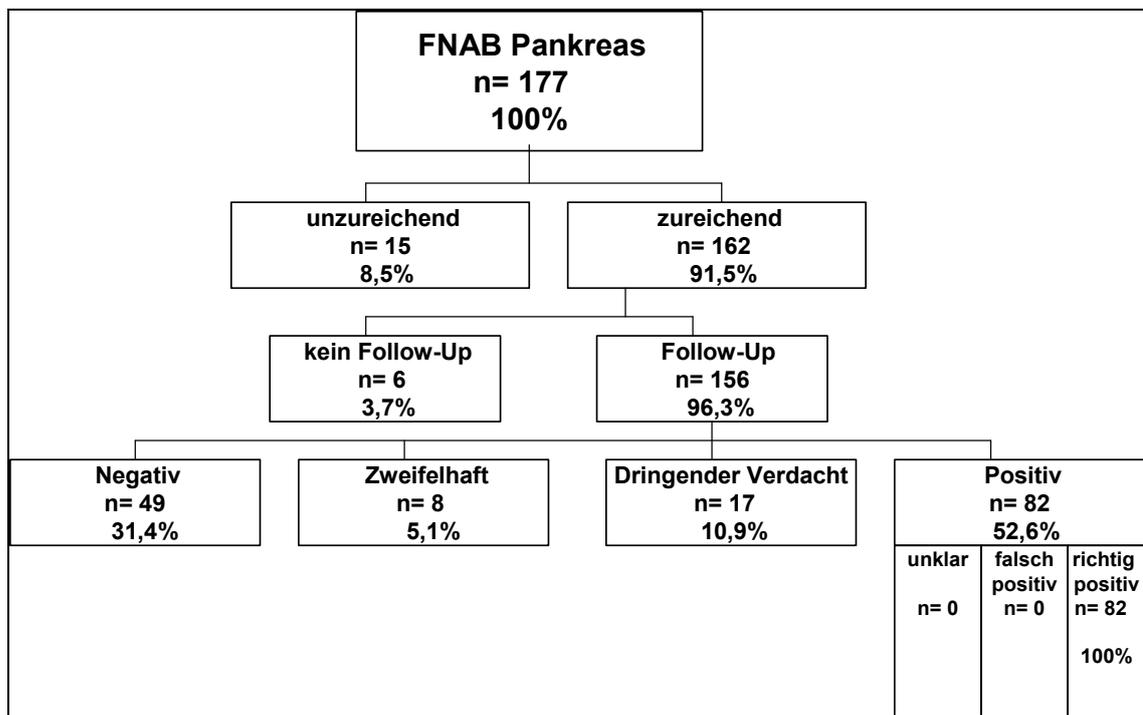


Abb. 18: Follow-Up der „positiven“ zytologischen Tumordiagnosen nach wiederholter Punktion in 15 Fällen

Im Einzelnen wurden vier Patienten, bei denen bei der ersten FNAB keine Tumorzellen nachgewiesen werden konnten und somit als „negativ“ klassifiziert wurden, ein zweites Mal punktiert. In diesen durch die zweite Punktion gesicherten Präparaten wurden in allen vier Fällen maligne Tumorzellen nachgewiesen und eine „positive“ Diagnose gestellt. Da sich im Follow-Up der Malignitätsverdacht eindeutig bestätigte, wurden die vier Befunde als „richtig positiv“ bewertet. Durch die wiederholte Begutachtung der Präparate aus der ersten Punktion dieser vier Patienten wurde bewiesen, dass es sich eindeutig um „Sampling Error“ bei der Punktion handelte und der Fehler nicht in der zytologischen Diagnostik lag.

Zusätzlich reichte in je einem Fall eine „zweifelhafte“ sowie eine „dringende Verdächtige“ zytologische Diagnose nicht für eine Therapieentscheidung aus, so dass eine wiederholte Punktion durchgeführt wurde. In beiden Angelegenheiten resultierte

aus der Wiederholung der Punktion eine „positive“ Diagnose. Es stellten sich alle sechs Fälle bei der Überprüfung der zytologischen Diagnosen als „richtig-positiv“ dar, so dass der relative Wert weiterhin bei 100 % „richtig-positiver“ aller als „positiv“ klassifizierten Diagnosen lag. Fünfmal wurden die Befunde durch das klinische Follow-Up bestätigt, eine Diagnose konnte auch histologisch gesichert werden.

Wie in Tabelle 17 zu sehen ist, erhöhte sich die Anzahl der entdeckten primären Pankreaskarzinome durch die Wiederholung der FNAB von 70 auf 76. Insgesamt wurde bei 78 Patienten zytologisch die Diagnose einer malignen Raumforderung im Pankreas gestellt, bei vier Patienten wurden Tumorzellen mit unklarer Dignität gefunden. In allen 82 Fällen konnte ein maligner Tumor im Pankreas durch das Follow-Up bestätigt werden.

Tabelle 17: Häufigkeitsverteilung der Abschlussdiagnose bei „positiven“ Fällen

Diagnose der „Tumorzell-positiven“ Fälle	Anzahl n =
Primäres Pankreaskarzinom	76
Metastase eines Ovarial-Ca	1
Metastase eines Bronchial-Ca	2
Metastase eines malignen Melanoms	1
Metastase eines Colon-Ca	1
Pankreasbeteiligung eines Multiplen Myeloms	1
Gesamt	82

3.5.2 Zytometrische Ergebnisse

Wie Abbildung 19 verdeutlicht, konnten von 82 „positiven“ Diagnosen insgesamt 64 (78,1 %) DNA-zytometrisch gemessen werden. Es wurden dabei mindestens 30 und höchstens 44 Referenzzellen (Durchschnittswert: 31,4) und zwischen 75 und 379 Analysezellen (Durchschnittswert: 259,4) ausgewählt.

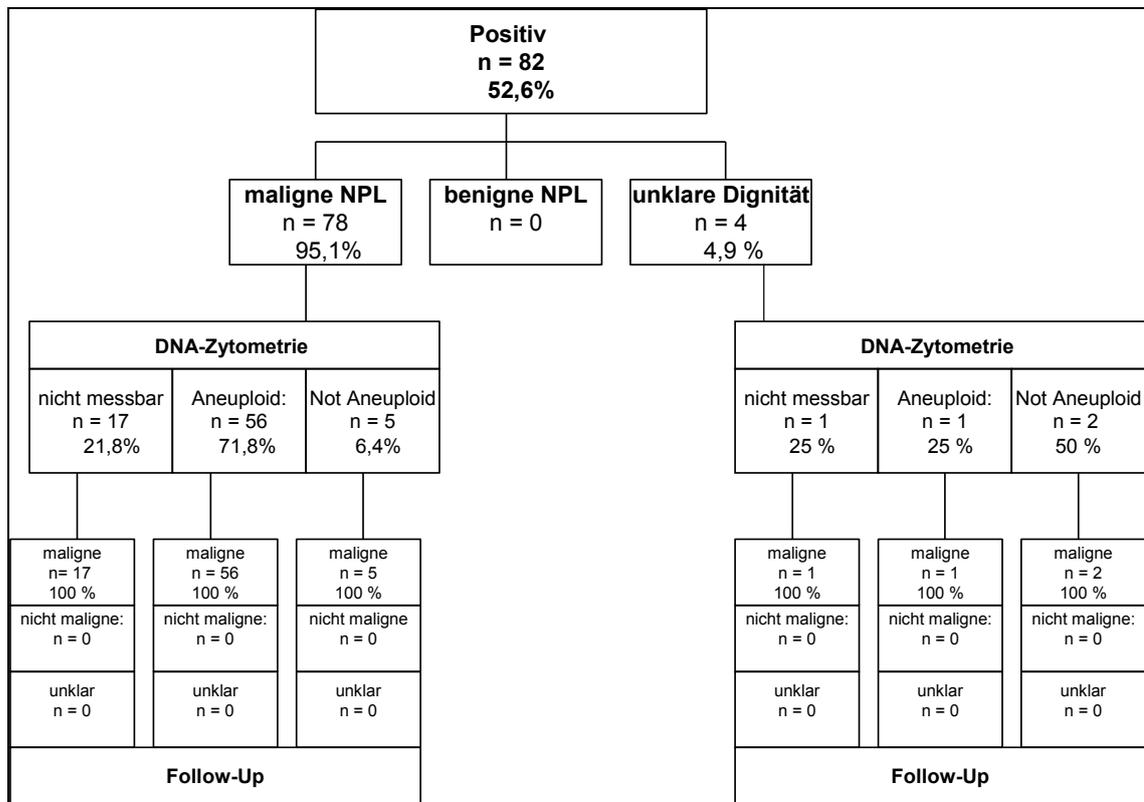


Abb. 19: Follow-Up DNA-zytometrischer Diagnosen an Präparaten mit der zytologischen Diagnose „positiv“

Von den 78 Fällen (95,1 %), die schon zytologisch als eindeutig maligne klassifiziert wurden, zeigten 56 (71,8 %) ein aneuploides Verteilungsmuster im Histogramm. Nur fünf (6,4 %) untersuchte Präparate wiesen ein not-aneuploides bzw. euploides Ergebnis auf. 17 (21,8 %) dieser 78 zytologischen Befunde waren nicht messbar und konnten deshalb nicht der adjuvanten DNA-Zytometrie zugeführt werden. Insgesamt viermal (4,9 %) wurde zytologisch eine positive Tumordiagnose gestellt, ohne jedoch die Frage nach der Dignität eindeutig zu klären. Von diesen vier Fällen mit „unklarer Dignität“ war einer (25 %) nicht messbar, ein weiterer (25 %) zeigte ein aneuploides Ergebnis. Die angefertigten DNA-Zytometrien der beiden anderen Patienten (50 %) wiesen ein euploides DNA-Verteilungsmuster auf.

Alles in allem konnte in 57 der 64 (89,1 %) als „positiv“ diagnostizierten und DNA-zytometrisch gemessenen Fälle Aneuploidie als Zeichen einer malignen Transformation der Zellen nachgewiesen werden. In nur sieben Fällen (10,9 %) gelang dies nicht, da die Messungen dieser Präparate ein not-aneuploides bzw. euploides Ergebnis aufwiesen, obwohl im Follow-Up ein maligner Tumor bestätigt wurde. Es handelte sich bei diesen als „falsch negativ“ klassifizierten Fällen sechsmal um ein primäres Pankreaskarzinom und einmal um ein Endokrines Karzinom im Pankreas. Wie schon im Absatz 3.5.1 beschrieben, zeigte sich bei allen 82 punktierten und in die „positiv“-Gruppe eingeordneten Patienten ein malignes Geschehen im Follow-Up.

Sowohl die nachfolgende Tabelle 18 als auch Abbildung 20 zeigen, wie häufig die einzelnen Kriterien für die Feststellung der Aneuploidie herangezogen wurden. 30-mal waren beide der in Abschnitt 2.4.4. beschriebenen Kriterien der Aneuploidie im Histogramm zu finden, zwölfmal wurde die Aneuploidie durch die Stammlinieninterpretation (STL) bestimmt. Bei 15 Messungen gab die Anzahl der Zellen mit einem DNA-Gehalt $>9c$ den Ausschlag für die Diagnose: Aneuploidie. Der höchste 9cEE-Wert einer aneuploiden Messung betrug 50,12c.

Tabelle 18: Kriterien der Aneuploidie in den „positiven“ Fällen

DNA-zytometrische Kriterien, anhand derer Aneuploidie festgestellt wurde	Anzahl n =
Stammlinie (STL) alleine	12
9cEE alleine	15
beide Kriterien (STL + 9cEE) kombiniert	30
Gesamt	57

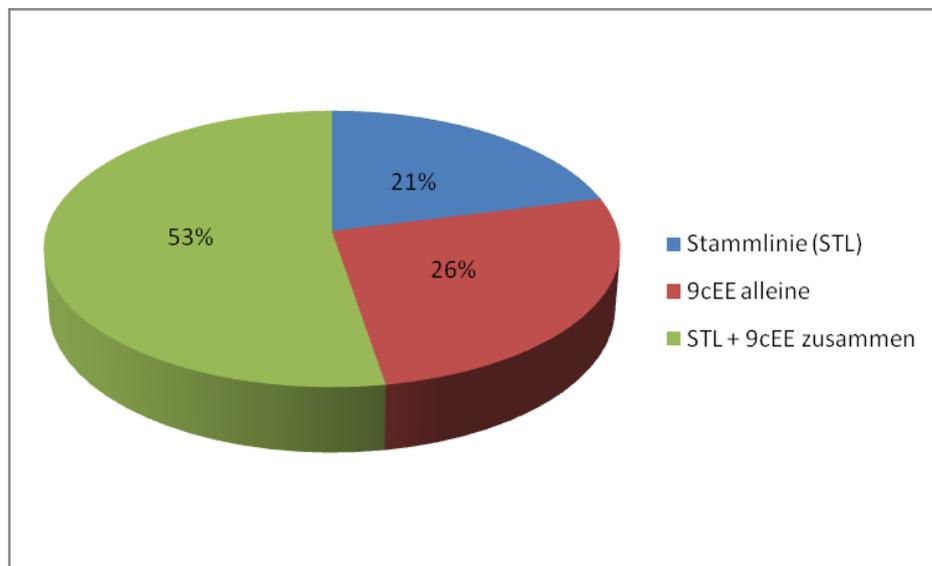


Abb. 20: Häufigkeitsverteilung der für die Diagnose „Aneuploid“ herangezogenen Kriterien der positiven Fälle

3.6 Komplikationen

Insgesamt wurden bei den 192 Punktionen zwei Komplikationen festgestellt, die von den Klinikern in direkten Zusammenhang mit der FNAB gebracht wurden. Dies entspricht einer Komplikationsrate von 1 %. Beide Komplikationen traten nach einer EUS-gezielten FNAB auf. Im ersten Fall klagte der Patient nach dem diagnostischen Eingriff über neu aufgetretene Oberbauchschmerzen. Das klinische Follow-Up ergab eine chronische Pankreatitis mit Pseudozystenbildung bei bekanntem C2-Abusus. Die zytologische Diagnose stellte sich somit in diesem Fall als richtig-negativ heraus.

Die andere beschriebene Komplikation stellte sich hingegen als schwerwiegend dar. Es wurde in der Patientenakte dokumentiert, dass nach endosonographisch-gezielter transgastraler Punktion „Implantationsmetastasen“ im Stichkanal nachzuweisen waren. Die richtig-positive zytologische Diagnose eines gering differenzierten Adenokarzinoms konnte durch die Histologie bestätigt werden, da sich der Patient einer Pankreasresektion unterzog. Das pathologische postoperative Staging lautete: pT3, pN1, pM1 mit nachweisbarer hepatischer und peritonealer Metastasierung. Angesichts des weit fortgeschrittenen Stadiums der Krankheit hatte die Komplikation jedoch weder eine klinische noch eine therapeutische Konsequenz für den Patienten. Wir versuchen derzeit, diese schwerwiegende Komplikation zu verifizieren. Es ist jedoch anzumerken, dass ein Nachweis von Tumorzellen im Stichkanal nicht mit einer Implantationsmetastase gleichzusetzen ist.

3.7 Wiederholung der Punktion

Zusammenfassend kann man feststellen, dass durch eine Wiederholung der Punktion bei „unzureichenden“, „negativen“, „zweifelhaften“ oder auch „dringend verdächtigen“ Befunden bei vorhandenen klinischen Verdachtsmomenten die Anzahl der „falsch negativen“ Diagnosen zurückgeht und gleichzeitig die Anzahl der „richtig positiven“ Befunde steigt. So wurden insgesamt eine „unzureichende“, sieben „negative“, drei „zweifelhafte“ sowie vier „dringend Verdächtige“ FNAB wiederholt.

Wie Abbildung 21 offenbart, wurde bei fünf der sieben Patienten mit zuvor „negativem“ Befund viermal ein „positives“ und einmal ein „dringend verdächtiges“ zytologisches Bild durch die zweite FNAB gefunden. Auch die drei vormals als „zweifelhaft“ kategorisierten Biopsien wiesen nach der erneuten Punktion in zwei Fällen ein „positives“ und in einem Fall ein „dringend verdächtiges“ Ergebnis auf. Eine „unzureichende“ Biopsie erbrachte auch nach der zweiten Punktion ein „unzureichendes“ Ergebnis. Die nochmalige Einsendung von Biopsiematerial der vier zuvor als „dringend verdächtig“ klassifizierten Patienten erbrachte in drei Fällen das gleiche Ergebnis, nur in einem Fall wurde die Diagnose in die Kategorie „positiv“ hochgestuft. Nur zweimal wurde der erste „negative“ Befund auch durch die zweite Punktion erneut bestätigt. Dies war auch mit dem Follow-Up vereinbar, so dass wir in beiden Fällen von einer „richtig negativen“ zytologischen Diagnostik ausgingen. Insgesamt führte die Wiederholung jedes Mal zur einer korrekten Diagnose, welche in allen Fällen durch das Follow-Up als zutreffend bestätigt werden konnte.

Diagnostische Kategorie	Nach 1. FNAB n =	Nach 2. FNAB n =
unzureichend	1	1
negativ	7	2
zweifelhaft	3	0
dringender Verdacht	4	5
positiv	0	7
Gesamt	15	15

Abb. 21: Verteilung der zytologischen Diagnosen nach 1. und 2. Punktion

3.8 Treffsicherheit der zytologischen und DNA-bildzytometrischen Diagnostik

3.8.1 Zytologische Diagnostik

Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, gab es bei der zytologischen Diagnostik eines Malignoms im Pankreas 97 „richtig positive“, 40 „richtig negative“, einen „falsch positiven“ sowie 13 „falsch negative“ Fälle. Insgesamt gab es zudem 5 als „unklar“ definierte Diagnosen, bei denen die Frage nach der Dignität der Läsion durch das klinische Follow-Up nicht hinreichend geklärt werden konnte.

Zytologie Follow-Up	positiv	negativ
maligne	richtig positiv: n= 97	falsch negativ: n= 13
nicht maligne	falsch positiv n= 1	richtig negativ: n= 40

Abb. 22: Vierfeldertafel für die Berechnung der diagnostischen Treffsicherheit für die Feinnadelaspirationsbiopsie von Raumforderungen der Bauchspeicheldrüse. Unklares Follow-Up: n= 5

Aus den in Abbildung 22 zu entnehmenden Werten ergaben sich folglich eine Sensitivität von 88,2 %, eine Spezifität von 97,6 % sowie eine Gesamttreffsicherheit von 90,7 % für die zytologische Diagnostik eines Malignoms im Pankreas. Der positive und negative Vorhersagewert lagen bei 99 % und 75,5 %. Diese Werte beziehen sich auf die Auswertung nach Wiederholung der Punktion in 15 Fällen (siehe 3.7)

Vergleicht man diese Werte mit der Treffsicherheit nach erster Punktion, so lässt sich eine Steigerung der Sensitivität um 6,4 %, des negativen Vorhersagewertes um 8,8 % und der Gesamttreffsicherheit um 4,6 % beobachten.

3.8.2 DNA-Bildzytometrie

Wie Abbildung 23 veranschaulicht, wurden 89 auswertbare und mit einem eindeutigen Follow-Up versehene zytologische Diagnosen durch die DNA-ICM überprüft. Insgesamt wurde 67-mal (75,3 %) die Diagnose „aneuploid“ und 22-mal (24,7 %) die Diagnose „not aneuploid“ gestellt. Alle aneuploiden Fälle zeigten ein malignes Geschehen im Follow-Up, wohingegen sich nur zehn der 23 „not-aneuploiden“ Diagnosen als richtig-negativ herausstellten. Ein bezüglich der Dignität unklarer not aneuploider Fall wurde aufgrund der unklaren Follow-Up-Erhebung nicht berücksichtigt.

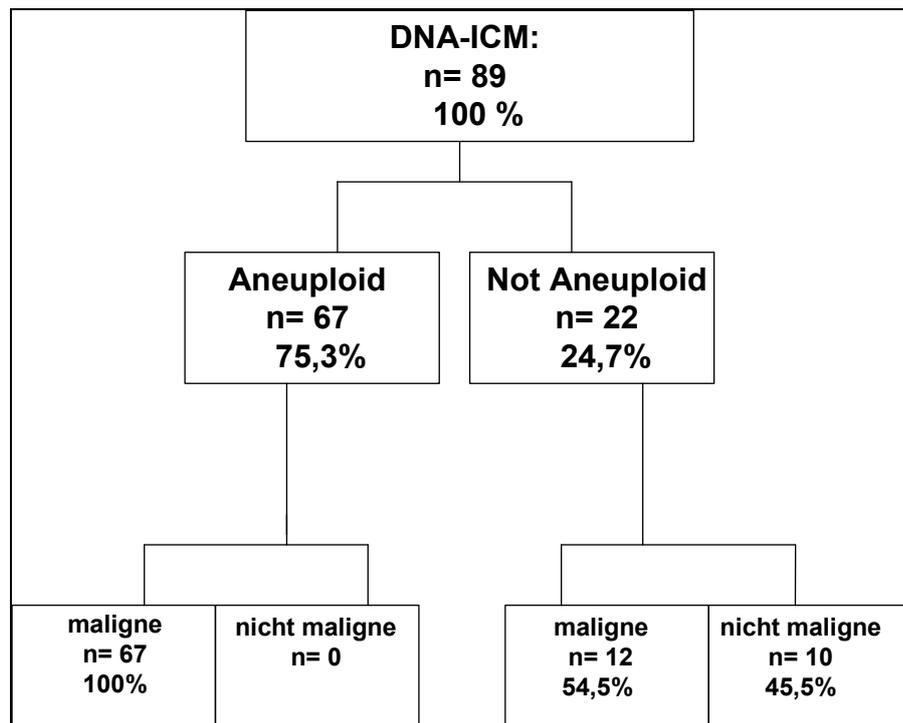


Abb. 23: Flussdiagramm zum Follow-Up DNA-zytometrischer Diagnosen

Bezog man nur die DNA-zytometrisch gemessenen und mit einem eindeutigen Follow-Up versehene Präparate in die Berechnung der Treffsicherheit ein, so lag die Sensitivität der DNA-Bildzytometrie alleine bei 84,8 %. Die Spezifität sowie der positive Vorhersagewert der DNA-Bildzytometrie betragen 100 %, da es keine falsch-

positiven Diagnosen zu verzeichnen gab, d.h., alle aneuploiden Ergebnisse konnten durch einen Malignombefund im Follow-Up bestätigt werden. Insgesamt zeigten 67 von 79 malignen Diagnosen DNA-Aneuploidie in Histogramm, was einer Prävalenz von 84,8 % entsprach. Da jedoch in 12 Fällen ein Malignombefund keine DNA-Aneuploidie zeigte, betrug der negative Vorhersagewert 45,5 %. Die Gesamttreffer sicherheit der DNA-Zytometrie alleine betrug 86,5 %.

Etwas andere Werte ergaben sich, wenn man die beiden in Abschnitt 3.2.2. genannten „Sampling-Error“-Fälle aus der Berechnung der diagnostischen Maßzahlen ausließ. Beide dieser zytologisch „falsch-negativen“ Fälle zeigten nach der DNA-ICM verständlicherweise ein „not-aneuploides“ Ergebnis, da die verdächtige Struktur gar nicht punktiert wurde und sich somit auch keine malignen Zellen auf den zu messenden Objektträgern befanden. Berücksichtigt man dies, so kommt man für die DNA-Zytometrie auf eine Sensitivität von 87 %. Und auch der negative Vorhersagewert sowie die Gesamttreffer sicherheit verbesserten sich demzufolge auf 50 % bzw. 88,5 %. Die Spezifität sowie der positive Vorhersagewert blieben stabil bei 100 %.

3.8.3 Zytologische Diagnostik ergänzt um die DNA-Zytometrie

Aufgrund der oben gezeigten Ergebnisse bedient man sich im Institut für Zytopathologie in Düsseldorf in der routinemäßigen Diagnostik folgendem Handlungsalgorithmus (Abbildung 24), um eine möglichst präzise und klare Diagnose an die Kliniker übermitteln zu können:

Sowohl bei DNA-zytometrisch aneuploiden als auch euploiden Ergebnissen wurden die zytologisch positiven Fälle als positiv in Bezug auf das Vorhandensein von malignen Zellen bewertet. Waren hingegen die Ergebnisse der DNA-Zytometrie bei zytologisch dringend verdächtigen und zweifelhaften Fällen euploid, zählte man sie zu den negativen Ergebnissen, und nur die aneuploiden Messungen zählten als positive Fälle. Die zytologisch negativen Diagnosen zeigten alle ein euploides DNA-Histogramm, so dass sie alle als negativ angesehen wurden. Insgesamt gab es 89 Fälle, in denen sowohl eine zytologische Diagnose als auch der Befund der DNA-Zytometrie sowie ein eindeutiges Follow-Up vorlagen.

Zytologie DNA-ICM	Zytologie			
	positiv	dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ
aneuploid	positiv n= 57	positiv n= 9	positiv n= 1	negativ n= 0
nicht aneuploid	positiv n= 7	negativ n= 2	negativ n= 3	negativ n=10

Abb. 24: Algorithmus zur Bewertung der Kombination von zytologischen und DNA-zytometrischen Ergebnissen; Insgesamt (zytologische Diagnose + DNA-Zytometrie + eindeutiges Follow-Up): n= 89; Positiv n= 74; Negativ n= 15,

Kombinierte man die in „positive“ und „negative“ kategorisierten Fälle in Bezug auf das Vorhandensein von malignen Tumorzellen mit den Ergebnissen des Follow-Up, so erhielt man folgende statistischen Maßzahlen für die Gesamttrefferlichkeit auf das Vorliegen von malignen Zellen im Pankreas:

Die Sensitivität betrug 93,6 %, die Spezifität als auch der positive Vorhersagewert lagen bei 100 %, und der negative Vorhersagewert betrug 66,7 %. Dies ergab eine Gesamttrefferlichkeit von 94,4 %.

Bei Hinzunahme der nicht DNA-zytometrisch untersuchten Patienten der Studie ergibt sich folgendes Bild: Wie in Abbildung 25 deutlich zu erkennen ist, gibt es durch die Kombination der zytologischen Diagnose mit der adjuvanten DNA-Zytometrie insgesamt 97 positive, 54 negative und 5 unklare Befunde.

Zytologie DNA-ICM	positiv	dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ
aneuploid	positiv n= 57	positiv n= 9	positiv n= 1	negativ n= 0
nicht aneuploid	positiv n= 7	negativ n= 2	negativ n= 3	negativ n= 10
nicht messbar	positiv n= 18	positiv n= 5	negativ n= 3	negativ n= 36

Abb. 25: Algorithmus zur Bewertung der zytologischen und DNA-zytometrischen Ergebnisse auf das Vorliegen von Malignität. Insgesamt (zytologische Diagnose + DNA-Zytometrie + eindeutiges Follow-Up): n= 151; Positiv n= 97; Negativ n= 54; unklar n= 5

Bei dem Vergleich dieser Kategorisierung mit dem Follow-Up dieser Patienten zeigten sich folgende Ergebnisse, wie in Abbildung 26 gut zu erkennen ist: 97 „richtig positiven“ und 41 „richtig negativen“ Befunden stehen nur 13 „falsch negative“ Diagnosen gegenüber. Durch den Einsatz der DNA-ICM konnte der in Absatz 3.8.1 erwähnte eine „falsch-positive“ Fall korrigiert werden.

Zytologie + DNA-ICM	positiv	negativ
Follow-Up		
maligne	richtig positiv: n= 97	falsch negativ: n= 13
nicht maligne	falsch positiv n= 0	richtig negativ: n= 41

Abb. 26: Berechnung der statistischen Werte auf das Vorliegen von Malignität. Zytologische Diagnose + DNA-ICM kombiniert; eindeutiges Follow-Up n= 151; unklares Follow-Up: n= 5

Vergleicht man die statistischen Maßzahlen der zytologischen Diagnostik auf das Vorliegen von Malignität mit der Kombination von zytologischer Diagnostik und adjuvanter DNA-Zytometrie, so zeigt sich, dass sich durch den Einsatz der DNA-Zytometrie sowohl die Spezifität, der positive Vorhersagewert als auch die Gesamttrefferbarkeit steigern lassen.

Tabelle 19: Vergleich der statistischen Maßzahlen der FNAB von malignomverdächtigen pankreatischen Raumforderungen

	Zytologische Diagnostik auf das Vorliegen von Malignität	Zytologische Diagnostik + DNA-ICM auf das Vorliegen von Malignität
Sensitivität	88,2 %	88,2 %
Spezifität	97,6 %	100 %
Positiver Vorhersagewert	99 %	100 %
Negativer Vorhersagewert	75,5 %	76 %
Gesamttrefferbarkeit	90,7 %	91,4 %

4 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, anhand der in den Jahren 2005 und 2006 eingesendeten Punktate von malignomverdächtigen pankreatischen Raumforderungen zu beweisen, dass mit Hilfe der Feinnadelaspirationsbiopsie und adjuvanter DNA-Zytometrie sichere und präzise zytologische Diagnosen möglich sind. Die von uns berechneten Maßzahlen von 88,2 % (Sensitivität), 97,6 % (Spezifität), 99 % (positiver Vorhersagewert), 75,5 % (negativer Vorhersagewert), 90,7 % (Gesamttreffsicherheit) für die zytologische Diagnostik alleine, sowie von 88,2 % (Sensitivität), 100 % (Spezifität), 100 % (positiver Vorhersagewert), 76 % (negativer Vorhersagewert), 91,4 % (Gesamttreffsicherheit) für die Kombination von zytologischer Diagnostik und adjuvanter DNA-Zytometrie machen deutlich, dass durch den Einsatz der Feinnadelaspirationsbiopsie und DNA-Zytometrie eine ausreichend sichere und valide Diagnosestellung gewährleistet werden kann.

Es besteht in der Literatur eine Kontroverse darüber, ob bei resektablen Pankreastumoren, die lediglich 15 % der Fälle ausmachen, eine präoperative histologische und/oder zytologische Diagnostik sinnvoll erscheint. Es finden sich in der Literatur sowohl Arbeiten, die dieses präoperative Vorgehen mit dem Verweis auf die Gefahr einer Tumorzellverschleppung strikt ablehnen (Kahl und Malfertheiner, 2004; AWMF, S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“, 2006) als auch Arbeiten, die eine präoperative Biopsie dringend empfehlen. Sie argumentieren richtigerweise, dass dadurch die Zahl der unnötigen Operationen und somit auch die überflüssigen Kosten für das Gesundheitssystem deutlich abnehmen (Harewood und Wiersema, 2001; Chen et al., 2004). Dieser Meinung schließen wir uns an.

Bei Patienten mit nichtresektablen Pankreastumoren hingegen ist die Datenlage eindeutig. So empfiehlt das „National Comprehensive Cancer Network“ in ihren Leitlinien, dass eine Bestätigung der Krebsdiagnose vor (palliativem) Therapiebeginn unbedingt vorliegen sollte (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Pancreatic Adenocarcinoma, 2009). Dies kann, wie unsere und viele weitere Studien eindeutig belegen, durch den Einsatz der FNAB sicher gewährleistet werden. Somit können den Patienten in den meisten Fällen gefährliche, invasive und teure Eingriffe wie eine explorative Laparotomie erspart werden.

Die FNAB hilft, unnötige Operationen bei nachgewiesenem benignem Befund oder bei Nachweis von Metastasen zu vermeiden. Zudem konnten Chen et al. (2004) zeigen, dass die Kostendiskrepanz für die Diagnose eines Pankreaskarzinoms bis zu 16306 US\$ betragen kann, je nachdem, für welchen diagnostischen Weg (FNAB oder direkte Operation) man sich entscheidet. Powis and Chang (2000) kommen auf eine ähnliche, wenngleich etwas höhere Kostendifferenz, sie berechneten einen Wert von fast 19500 US\$. Harewood et al. (2001) belegen daneben, dass durch den Einsatz der FNAB die Krankenhauskosten erheblich reduziert werden können, da nur die Patienten einer Operation zugeführt werden, bei denen auch tatsächlich resektable Tumore vorliegen.

Unsere Ergebnisse decken sich größtenteils sehr gut mit den in der Literatur angegebenen Maßzahlen für die Treffsicherheit bei Feinnadelaspirationsbiopsien von pankreatischen Raumforderungen. Hartwig et al. (2009) listen in ihrem Review die Ergebnisse von einzelnen Studien von 1990-2008 auf, wobei sie zwei Gruppen bilden. Auf der einen Seite die Ergebnisse von perkutanen, ultraschall- bzw. CT-gesteuerten FNAB, auf der anderen Seite die der endosonographisch gesteuerten Punktionen. Es zeigt sich, dass die durchschnittliche Sensitivität der von Hartwig et al. untersuchten 22 Studien von US-/CT-gesteuerten Punktionen bei 87 % (45-100 %) liegt, die durchschnittliche Spezifität bei 100 % (91-100%) sowie die durchschnittliche Gesamttreffsicherheit bei 84 % (61-98 %) liegen. Demgegenüber steht eine etwas niedrigere durchschnittliche Sensitivität von 83 % (54-95 %), eine gleiche mittlere Spezifität von 100 % (71-100%) und eine höhere mittlere Gesamttreffsicherheit von 88 % (65-96 %) der 29 untersuchten Studien bei EUS-gezielter Punktion.

Es hat jedoch den Anschein, dass die EUS-gesteuerte Punktion bei sehr kleinen Läsionen (< 3 cm) sowohl eine bessere Treffsicherheit als auch eine bessere Kosten-Nutzen-Relation aufweist (Chen et al., 2004; Volmar et al., 2005).

Ingesamt betrachtet ist es jedoch sehr schwer, eine eindeutige Aussage zu den in der Literatur angegebenen Maßzahlen abzugeben und diese zu bewerten, da die Rahmenbedingungen sehr heterogen sind. Die meisten Studien befassen sich mit der EUS-gesteuerten, andere mit der Ultraschall-gesteuerten und einige wenige mit der CT-gesteuerten Punktion. Daneben variieren die Ergebnisse auch innerhalb dieser einzelnen Subgruppen zum Teil erheblich, auch wenn ein Großteil der Studien eine gleiche oder

ähnlich hohe Sensitivität, Spezifität und Gesamtreffsicherheit aufweisen wie unsere durchgeführte Studie. Dies verdeutlicht nachfolgende Tabelle 20:

Tabelle 20: Übersichtstabelle zu den in der Literatur beschriebenen Maßzahlen

Autor	Anzahl der Fälle	Sensitivität in %	Spezifität in %	PPV in %	NPV in %	Gesamtreffsicherheit in %	Wie punktiert ?
(Krishna et al., 2009)	213	96,6	99,0	99,1	96,2	97,6	EUS
(Yusuf et al., 2009)	540 mit 22G -Nadel	84	100	100	49	k.A.	EUS
(Yusuf et al., 2009)	302 mit 25G -Nadel	92	97	98	89	k.A.	EUS
(Ramírez-Luna et al., 2008)	52	97,3	100	100	90	97,8	EUS
(Bhatia et al., 2008)	267	81	100	k.A.	k.A.	k.A.	US
(Matsubara et al., 2008)	398	86	100	k.A.	k.A.	86	US

(Iglesias -Garcia et al., 2007)	62	76,5	100	100	68	84,3	EUS
(Garre Sánchez et al., 2007)	222	89	98	99	74	91	US
(Zhang et al, 2006)	106	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	94	CT
(Mitsu- hashi et al., 2006)	267	94,6	100	100	82	95,6	EUS
(Volmar et al., 2005)	1050	79,4	99	99,4	67,9	84,5	EUS/ US/ CT
(Krause, 2005)	127	73,8	100	100	79,2	86,9	EUS
(Südhoff et al., 2004)	44	66	100	100	83	86	EUS

(Agarwal et al., 2004)	81	89	100	100	56	90	EUS
(Raut et al., 2003)	233	91	100	k.A.	k.A.	92	EUS
(Harewood et al., 2002)	185	94	71	k.A.	k.A.	92	EUS
(Chang et al., 1997)	44	92	100	k.A.	k.A.	95	EUS
(Al-Kaisi and Siegler, 1989)	205	87	100	100	80	92	k.A.

Es gibt mehrere Gründe, weshalb die oben genannten Ergebnisse zum Teil erheblich divergieren. Einerseits ist die Erfahrung und Routine des punktierenden Arztes maßgeblich entscheidend. Während in unserer Studie 16 der 192 punktierten Fälle als unzureichend klassifiziert wurden, was einem prozentualen Anteil von 8,3 % entspricht, sind in der Literatur Werte von bis zu 25,6 % an unzureichenden Punktionen zu finden. Zudem sind die Lokalisation der Läsion, die Tumorgröße, eine gleichzeitig bestehende chronische Pankreatitis sowie der Tumortyp entscheidende Einflussfaktoren für die Diagnostik mittels FNAB. Es zeigte sich, dass die Materialgewinnung bei Prozessen im Processus Uncinatus sowie von zystischen Neoplasien und sehr kleinen Läsionen problematisch ist.

Des Weiteren geht aus der Literatur hervor, dass insbesondere erfahrene Radiologen die beste Trefferquote bei der FNAB von abdominellen Raumforderungen aufweisen. Zudem ist zu erwarten, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Zytopathologen während der Punktion die Treffsicherheit steigt und dadurch die Anzahl an ungenügenden Punktionen sinkt (O'Connell et al., 2008).

Andererseits spielt jedoch auch die Erfahrung des Zytopathologen eine sehr wichtige Rolle bei der Beurteilung der Punktate. So kommen Binder et al. (1987) zu dem Ergebnis, dass die Sensitivität alleine schon um fast 31 % sinkt, wenn anstatt eines erfahrenen Zytopathologen ein Pathologe mit wenig Erfahrung auf dem Gebiet der Zytopathologie die Befunde von abdominellen FNAB erhebt. Auch Skov et al. (2007) zeigten in Ihrer Studie, dass der Erfahrung des Zytopathologen eine sehr entscheidende Bedeutung zukommt. Sie fordern daher, dass nur Pathologen mit langjähriger Erfahrung Feinnadelaspirationsbiopsien befunden sollten.

Ein Problem liegt jedoch darin, dass die Zytopathologie in Deutschland, abgesehen von Zervix-Abstrichen und der Ergusszytologie, unverständlicherweise nur wenig Beachtung in der klinischen pathologischen Routinediagnostik und der pathologischen Ausbildung findet. Es gibt nur wenige Zentren in Deutschland, die sich intensiv mit der zytopathologischen Diagnostik beschäftigen. Das Institut für Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf unter der Leitung von Professor Böcking ist der einzige Lehrstuhl in Deutschland, der sich ausschließlich mit diesem Aufgabengebiet befasst. Dies unterstreicht, dass alle im Rahmen dieser Studie gestellten zytologischen Diagnosen von Zytopathologen durchgeführt wurden, die eine sehr große

Expertise auf diesem Gebiet aufweisen. Dies spiegelt sich auch in der niedrigen Quote von 8,6 % an „falsch-negativen“ Diagnosen bezüglich Malignität bei pankreatischen Raumforderung wieder. Feinnadelaspirationsbiopsien von pankreatischen Raumforderungen, insbesondere bei EUS-gezielten Feinnadelaspirationsbiopsien, sind durch Kontamination, zum Beispiel mit gastralen Epithelien und/oder lymphatischem Gewebe und Blut, sehr schwer zu beurteilen. In der Literatur liegen die Werte zwischen 4 % und 25 % „falsch-negativer“ Diagnosen bei malignomverdächtigen pankreatischen Raumforderungen (Jenssen et al., 2008).

Im Gegensatz dazu sind in der Literatur nur wenige „falsch-positive“ Fälle beschrieben. In den meisten Studien wird eine Spezifität von 100 % angegeben, nur in einigen Fällen wird davon berichtet, dass „falsch-positive“ Fälle auftraten. Afify et al. (2003) kommen auf zwei „falsch-positive“ Fälle, Sanchez et al. (2007) beschreiben einen von 222 Fällen als „falsch-positiv“. Jenssen et al. (2008) kommen in einer Übersichtsarbeit über EUS-gezielte FNAB auf insgesamt 27 „falsch-positive“ bei 1750 Fällen, was 1,5 % entspricht. Der eine, schon in Abschnitt 3.4.1. beschriebene aufgetretene „falsch-positive“ Fall unserer Studie ist also nicht ungewöhnlich in Bezug auf die Daten in der Literatur. Vielmehr bestätigt es die allgemein anerkannte Tatsache, dass die Differenzierung hoch differenzierter Neoplasien von benignen reaktiven Prozessen, in unserem Fall eine benigne ductale Pankreaszyste, grundsätzlich sehr schwierig ist.

Um die Treffsicherheit im Allgemeinen weiter zu erhöhen und insbesondere bei den nicht eindeutigen Fällen ein weiteres diagnostisches Werkzeug an der Hand zu haben, bietet es sich an, adjuvante Methoden bei der Diagnostik unklarer pankreatischer Raumforderungen hinzuzuziehen. In unserem Fall haben wir uns für die DNA-Zytometrie als adjuvante Methode entschieden. In der Literatur gibt es eine überschaubare Anzahl an Veröffentlichungen, die sich auch mit diesem Thema beschäftigen. Dabei wurde nicht nur die statische DNA-Zytometrie herangezogen, sondern in einigen Fällen auch die DNA-Flowzytometrie. Bei der Interpretation der Ergebnisse der DNA-Flowzytometrie sollte jedoch immer in Betracht gezogen werden, dass diese Methode nicht exakt mit der DNA-ICM verglichen werden kann, da insbesondere sehr kleine aneuploide DNA-Stammlinien und seltene 9cEE häufig nicht registriert werden.

Loertzer et al. (1999) zeigten, dass alle acht von ihnen untersuchten FNAB von Patienten mit nachgewiesener Pankreatitis einen euploiden DNA-Gehalt aufwiesen, ebenso wie sechs von 26 Pankreaskarzinomen (Prävalenz: 23 %). Die restlichen zwanzig FNAB der 26 Patienten mit nachgewiesenem Pankreaskarzinom wiesen ein aneuploides Ergebnis auf (Prävalenz: 77 %). Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass sowohl die Anwendung der DNA-Zytometrie als auch die in derselben Studie durchgeführte Untersuchung des Proliferationsindex dabei helfen können, zwischen chronischer Pankreatitis und einer malignen Neoplasie zu unterscheiden, auch wenn beide Methoden nicht signifikant mit der mittleren Überlebenszeit der Patienten korrelieren.

Weger et al. (1990) untersuchten den DNA-Gehalt von FNAB, die von Pankreaskarzinomen stammten, sowohl mit der DNA-ICM als auch mit der Flow-Zytometrie. Während 76 von 77 mit der statischen DNA-Zytometrie gemessene Präparate ein „non-diploides“ Verteilungsmuster aufwiesen, waren es nur 47 Präparate, die nach Messung mit beiden Methoden ein „non-diploides“ Histogramm zeigten. Insgesamt wiesen 21 der 77 (27,3 %) mit der DNA-ICM gemessenen FNAB eine Stammlinie im triploiden Bereich auf. Die Patienten, deren Biopsien eine nachgewiesene DNA-Stammlinie im triploiden Bereich aufwiesen, zeigten alle eine signifikant kürzere Überlebenszeit. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass alle acht FNAB von Patienten mit chronischer Pankreatitis ein euploides Verteilungsmuster zeigten.

Böttger et al. (1997) kommen aufgrund ihrer Ergebnisse zu der Überzeugung, dass eine Unterscheidung zwischen benignen und malignen endokrinen Pankreastumoren mit Hilfe der DNA-Zytometrie nicht möglich ist. Ihre Schlussfolgerung baut auf den Ergebnissen ihrer Studie auf, in der sie 27 benigne und 15 maligne endokrine Pankreastumoren auf ihren DNA-Gehalt hin untersuchten. Es zeigte sich, dass von den 27 benignen Tumoren 6 ein diploides, 15 ein hypotriploides und 6 ein triploides DNA-Histogramm aufwiesen, und von den 15 malignen Tumoren jeweils einer diploid und hypotriploid, neun triploid und vier hypertriploid waren. Des Weiteren zeigte sich, dass hypertriploide Tumore die signifikant schlechteste Prognose aller untersuchten Tumoren hatten.

Souther et al. (1996) untersuchten den prognostischen Wert der DNA-Zytometrie für zystische muzinöse Pankreastumoren. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass alle 13 von ihnen untersuchten benignen Tumoren diploid waren und die Patienten durch chirurgische Intervention vollständig geheilt werden konnten. Von den 11 untersuchten malignen Zystadenokarzinomen erwiesen sich sechs als diploid und fünf als aneuploid. Während die Patienten mit euploiden Karzinomen nach Resektion in 83% der Fälle geheilt werden konnten, starben alle fünf Patienten mit aneuploiden Zystadenokarzinomen. Daraus resultierte ein signifikanter Überlebensvorteil für diploide Karzinome. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass der Einsatz der DNA-Zytometrie bei muzinösen, zystischen Pankreastumoren für die klinische Prognosestellung sehr hilfreich ist.

Linder et al. (1995) kommen zu dem Ergebnis, dass ein sehr signifikanter Unterschied bezüglich des Langzeitüberlebens besteht, wenn DNA-Aneuploidie in Pankreaskarzinomen nachgewiesen wird. Sie untersuchten auch das Vorhandensein von Anisokaryose als prognostischen Marker. Wenn sowohl Aneuploidie als auch eine Anisokaryoserate von ≥ 0.6 bestand, überlebten nur 5 % dieser Patienten länger als 6 Monate. In einer früheren Untersuchung konnten Linder et al. (1994) ebenfalls nachweisen, dass von 96 untersuchten FNAB von Pankreaskarzinomen, 27 diploid (28 %), 17 tetraploid (18 %) und 52 aneuploid (54 %) waren. Es wurde zudem der signifikante Zusammenhang zwischen DNA-Gehalt und der Resezierbarkeit des Tumors verdeutlicht. So waren nur 17 von 74 (22,9 %) nicht-resektablen Tumoren diploid, wohingegen 10 von 22 (45,5 %) resektablen Tumoren einen diploiden DNA-Gehalt aufwiesen. Zudem hatten die Patienten mit aneuploiden Tumoren die geringste Überlebenszeit im Vergleich mit Patienten mit diploiden und tetraploiden Tumoren.

Einen ähnlich deutlichen und signifikanten Zusammenhang zwischen der Möglichkeit einer chirurgischen Resektion und dem DNA-Gehalt bei Pankreaskarzinomen konnten auch He et al. (2003) belegen. Sie konnten in ihrer Studie zeigen, dass 62,1 % der nichtresektablen Tumoren aneuploid waren, hingegen nur 33,3 % der resektablen Tumoren. Dies verdeutlicht einmal mehr den diagnostischen Nutzen dieser adjuvanten Methode bei der Entscheidungsfindung für oder gegen einen Behandlungspfad, in diesem Falle die Möglichkeit einer kurativen oder palliativen Resektion des Tumors. Und auch Böttger et al. (1992) kommen zu dem Ergebnis, dass

der DNA-Gehalt von Pankreaskarzinomzellen, als Zeichen der chromosomalen Abberation, die Aggressivität der Tumorzellen widerspiegelt und somit entscheidenden Einfluss auf die Prognose hat.

Vergleicht man die in der Literatur gefundenen Angaben zur Prävalenz von Aneuploidie bei Pankreaskarzinomen, so lassen sich unsere Ergebnisse ohne Probleme in diese Reihe einordnen. Es zeigte sich, dass bei 67 von 79 Biopsien von nachgewiesenen Pankreaskarzinomen Aneuploidie festgestellt werden konnte, was einer Prävalenz von 84,8 % entspricht. In einem Fall, wie schon in Abschnitt 3.4. beschrieben, konnte durch den Einsatz der DNA-Zytometrie verhindert werden, dass eine falsch-positive Diagnose gestellt wurde. Somit wurde dem Patienten eine aufwendige und gefährliche Operation erspart. Dies beweist eindeutig, wie wichtig die adjuvante Anwendung der DNA-ICM bei der zytologischen Diagnostik pankreatischer Raumforderungen ist.

Im klinischen Alltag werden in ca. 16 % zytologisch unklare (zweifelhafte und dringend verdächtige) Diagnosen an FNAB von malignomverdächtigen Pankreasläsionen gestellt. Durch eine während der statistischen Auswertung künstliche Einordnung zytologisch zweifelhafter zu den Test-negativen, sowie der zytologisch dringend-verdächtigen zu den Test-positiven Diagnosen wird diese diagnostische Unsicherheit verschleiert. Gerade diese Diagnosen verursachen aber für den Diagnostiker und den Kliniker schwierige Situationen, in denen nicht klar ist, was mit dem Patienten weiter geschehen soll. Der adjuvante Einsatz der DNA-Zytometrie ist ein wichtiges diagnostisches Werkzeug, um eine eindeutig positive oder negative Diagnose bezüglich Malignität bei diesen Fällen zu erbringen. Auf dieser Basis kann der Patient leitliniengerecht behandelt werden.

Gerade dies ist ein wichtiges Ergebnis der Arbeit, welches sich durch Angabe von Maßzahlen der diagnostischen Treffsicherheit nicht eindeutig fassen lässt. Die gleiche Sensitivität von 88,2% von zytologischer Diagnostik allein und von Zytologie kombiniert mit DNA-Zytometrie hat eine völlig andere Wertigkeit, da im ersteren Fall zytologisch unklare Diagnosen willkürlich den Test-positiven oder Test-negativen Diagnosen hinzugerechnet werden müssen, es sich im letzteren Fall aber nur um eindeutig negative und positive Diagnosen handelt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich durch die Kombination von morphologischer Zytodiagnostik und adjuvanter DNA-Zytometrie der positive Vorhersagewert und insbesondere die Spezifität und die Gesamttrefferlichkeit steigern lassen. Es erscheint daher sinnvoll, insbesondere nach zytologisch uneindeutigen Diagnosen, eine adjuvante DNA-Bildzytometrie anzuschließen. Diese liefert nach Messung des DNA-Gehaltes exakt der gleichen bereits zytologisch auffälligen Zellen im Sinne einer multimodalen Analyse ein für den Diagnostiker und Kliniker eindeutiges Ergebnis, welches in eine leitliniengerechte Therapie für den Patienten mündet. Es lässt sich zusammenfassen, dass die Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) mit adjuvanter DNA-Zytometrie von malignomverdächtigen pankreatischen Raumforderungen eine sehr sichere prätherapeutische zytologische Diagnostik ermöglicht, die sehr komplikationsarm und kostengünstig ist und gleichzeitig eine hohe Treffsicherheit gewährleistet.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Untersuchung war es, die Treffsicherheit der Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) bei malignomverdächtigen Raumforderungen des Pankreas zu ermitteln. Zudem galt es herauszufinden, ob sich durch den Einsatz von adjuvanter DNA-Zytometrie die Sensitivität, Spezifität, der positive als auch der negative Vorhersagewert sowie die Gesamttreffsicherheit der zytologischen Diagnostik steigern lässt. Hierzu wurden 192 zytologische Diagnosen von Pankreasfeinnadelpunktionen, die in den Jahren 2005 und 2006 im Institut für Cytopathologie gestellt wurden, retrospektiv untersucht. Insgesamt wurden 177 Patienten punktiert, bei 15 Patienten wurde die FNAB zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. Insgesamt konnten 156 gültige und durch ein Follow-Up bestätigte Diagnosen in der Studie ausgewertet werden.

Es wurde eine Gesamttreffsicherheit der zytologischen Diagnostik von 90,7 % errechnet. Die weiteren Maßzahlen der Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik lagen bei 88,2 % (Sensitivität), 97,6 % (Spezifität), 99 % (positiver Vorhersagewert) und 75,5 % (negativer Vorhersagewert). Durch die Kombination von zytologischer Diagnostik und adjuvanter DNA-Zytometrie konnte nicht nur die Gesamttreffsicherheit auf 91,4 %, sondern auch die Spezifität auf 100 % sowie der positive als auch der negative Vorhersagewert auf 100 % bzw. 76 % gesteigert werden. Die Sensitivität blieb unverändert bei 88,2 %. Insgesamt wurden zwei Komplikationen registriert, was einer Komplikationsrate von 1 % entspricht.

Besonders hervorzuheben ist, dass alle 67 DNA-zytometrisch gemessenen aneuploiden Fälle ein malignes Geschehen im Follow-Up zeigten. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass DNA-Aneuploidie ein sicheres Anzeichen für Malignität bei pankreatischen Raumforderungen darstellt. Hingegen zeigten 12 durch das Follow-Up bestätigte Pankreaskarzinome ein nicht-aneuploides Ergebnis in der DNA-Zytometrie, sodass die Diagnose „nicht-aneuploid“ Malignität nicht ausschließt. Ein Ausschluss von Malignität darf folglich nur in Kombination mit dem zytomorphologischen Befund und dem klinischen Erscheinungsbild des Patienten attestiert werden.

Insgesamt betrachtet zeigen unsere Ergebnisse, dass sich durch die Kombination von morphologischer Zytodiagnostik und adjuvanter DNA-Zytometrie der positive Vorhersagewert und insbesondere die Spezifität und die Gesamttrefferbarkeit der Diagnostik an Feinnadelaspirationsbiopsien pankreatischer Raumforderungen steigern lassen. Es erscheint daher sinnvoll, beide Methoden zu kombinieren, um ein möglichst präzises Ergebnis an den behandelnden Arzt übermitteln zu können und letztendlich die Sicherheit des Patienten zu gewährleisten. Es lässt sich zusammenfassen, dass die Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) mit adjuvanter DNA-Zytometrie von malignomverdächtigen pankreatischen Raumforderungen eine sichere prätherapeutische zytologische Diagnostik ermöglicht, die sehr komplikationsarm und kostengünstig ist und gleichzeitig eine hohe Trefferbarkeit gewährleistet.

6 Literaturverzeichnis

- AWMF, S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“ der Dt. Ges. f. Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Dt. Krebsgesellschaft (DKG) 2006; <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/032-010.pdf>
- Afify AM, al-Khafaji BM, Kim B, Scheiman J: Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration of the pancreas. Diagnostic utility and accuracy. *Acta Cytologica* 2003; 47: 341-348.
- Agarwal B, Abu-Hamda E, Molke KL, Correa AM, Ho L: Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration and multidetector spiral CT in the diagnosis of pancreatic cancer. *The American Journal of Gastroenterology* 2004; 99: 844-850
- Agarwal B, Krishna NB, Labundy JL, Safdar R, Akduman EI: EUS and/or EUS-guided FNA in patients with CT and/or magnetic resonance imaging findings of enlarged pancreatic head or dilated pancreatic duct with or without a dilated common bile duct. *Gastrointestinal Endoscopy* 2008; 68: 237-242
- Al-Kaisi N, Siegler EE: Fine needle aspiration cytology of the pancreas. *Acta Cytologica* 1989; 33: 145-152.
- Anderson KE, Kadlubar FF, Kulldorff M, Harnack L, Gross M, Lang NP, Barber C, Rothman N, Sinha R: Dietary intake of heterocyclic amines and benzo(a)pyrene: associations with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2005; 14: 2261-2265.
- Barthet M, Gasmi M, Boustiere C, Giovannini M, Grimaud JC, Berdah S: EUS training in a live pig model: does it improve echo endoscope hands-on and trainee competence? *Endoscopy* 2007; 39: 535-539
- Bhatia P, Srinivasan R, Rajwanshi A, Nijhawan R, Khandelwal R, Wig J, Vasishta RK: 5-year review and reappraisal of ultrasound-guided percutaneous transabdominal fine needle aspiration of pancreatic lesions. *Acta Cytologica* 2008; 52: 523-529
- Biesterfeld S, Gerres K, Fischer-Wein G, Böcking A: Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J Clin Pathol* 1994; 47: 38-42
- Binder T, Swobodnik W, Wechsler JG, Löscher G, Eckert E, Schoengen A, Heimpel H, Ditschuneit H: Ultrasound guided fine- and coarse-needle puncture of the abdominal and retroperitoneal space. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1987; 113: 43-48.
- Böcker W, Denk H, Heitz PHU: *Pathologie 3. Auflage Elsevier, Urban & Fischer, München 2004*
- Böcking A, Giroud F, Reith A: Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *European Society for Analytical Cellular Pathology. Analytical Cellular Pathology* 1995a; 8: 67-74
- Böcking A: DNA measurements. 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 1995b; 170-188.*
- Böttger T, Gabbert H, Störkel S, Stöckle S: Image analysis of DNA cytometry in tumors of the upper gastrointestinal tract. *Med Klin (München)* 1992; 87: 293-299.
- Böttger T, Seidl C, Seifert JK, Heintz A, Bretz B, Junginger T: Value of quantitative DNA analysis in endocrine tumors of the pancreas. *Oncology* 1997; 54: 318-323.

- Büchler MW, Uhl W, Malfertheiner P: Pankreaserkrankungen: akute Pankreatitis, chronische Pankreatitis, Tumore des Pankreas, 2. Auflage, Karger, Basel 2004
- Burriss HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC: Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* 1997; 15: 2403-2413
- Chang KJ, Nguyen P, Erickson RA, Durbin TE, Katz KD: The clinical utility of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration in the diagnosis and staging of pancreatic carcinoma. *Gastrointestinal Endoscopy* 1997; 45: 387-393.
- Chatelain R, Willms A, Biesterfeld S, Auffermann W, Böcking A: Automated Feulgen staining with a temperature-controlled staining machine. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 1989; 11: 211-217
- Chatzipantelis P, Salla C, Konstantinou P, Karoumpalis I, Sakellariou S, Doumani I: Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology of pancreatic neuroendocrine tumors: a study of 48 cases. *Cancer* 2008; 114: 255-262
- Chen VK, Arguedas MR, Kilgore ML, Eloubeidi MA: A cost-minimization analysis of alternative strategies in diagnosing pancreatic cancer. *The American Journal of Gastroenterology* 2004; 99: 2223-2234
- Duesberg P, Li R, Rasnick D: Aneuploidy approaching a perfect score in predicting and preventing cancer: highlights from a conference held in Oakland, CA in January. *Cell Cycle* 2004; 3: 823-828.
- Farnell MB, Pearson RK, Sarr MG, DiMagno EP, Burgart LJ, Dahl TR, Foster N, Sargent DJ: A prospective randomized trial comparing standard pancreatoduodenectomy with pancreatoduodenectomy with extended lymphadenectomy in resectable pancreatic head adenocarcinoma. *Surgery* 2005; 138: 618-630
- Fatka BE: Beobachtung der Treffgenauigkeit bei ultraschallgezielten Punktionen von Läsionen in Leber und Pankreas. Medizinische Dissertation, Technische Universität München 2003
- Feichter G, Dalquen P: Zytopathologie 1. Aufl.; Springer, Berlin 2000
- Feulgen R, Rosenbeck 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
- Garre Sánchez MC, Rendón Unceta P, López Cano A, Gómez Rubio M, de Cuenca Morón B, Segura Cabral JM, Crespo Sánchez M: Ultrasound-guided biopsy of the pancreas: a multicenter study. *Revista Española De Enfermedades Digestivas* 2007; 99: 520-524.
- Giroud F, Haroske G, Reith A, Böcking A: 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance. *European Society for Analytical Cellular Pathology. Analytical Cellular Pathology* 1998; 17 : 201-208
- Gray W: *Diagnostic Cytopathology* 2. Aufl.; Churchill Livingstone [u.a.], New York 2003
- Harewood GC, Wiersema MJ: A cost analysis of endoscopic ultrasound in the evaluation of pancreatic head adenocarcinoma. *The American Journal of Gastroenterology* 2001; 96: 2651-2656
- Harewood GC, Wiersema MJ: Endosonography-guided fine needle aspiration biopsy in the evaluation of pancreatic masses. *The American Journal of Gastroenterology* 2002; 97: 1386-1391

- Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A: 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. *European Society for Analytical Cellular Pathology. Analytical Cellular Pathology* 1998; 17: 189-200
- Haroske G, Baak J P, 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
- Hartwig W, Schneider L, Diener MK, Bergmann F, Büchler MW, Werner J: Preoperative tissue diagnosis for tumours of the pancreas. *The British Journal of Surgery* 2009; 96: 5-20
- Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey JN, Pisters PW, Evans DB: Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *The American Journal of Gastroenterology* 2007; 102: 2696-2707
- He YC, Peng W, Qiao JG, Cao J, Chen JW: Relationship between nuclear morphometry, DNA content and resectability of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* 2003; 9: 1863-1865.
- Hilgers RD, Bauer P, Scheiber V: Einführung in Die Medizinische Statistik 2.Aufl.; Springer, Berlin [u.a.] 2007
- Hopt UT: Pankreas-Karzinom: aktueller Stand von Diagnostik und Therapie 1.Aufl.; Weller, Neckargemünd 2000
- Iglesias-Garcia J, Dominguez-Munoz E, Lozano-Leon A, Abdulkaderc I, Larino-Noia J, Antunez J, Forteza J: Impact of endoscopic ultrasound-guided fine needle biopsy for diagnosis of pancreatic masses. *World Journal of Gastroenterology* 2007; 13: 289-293.
- Jenssen C, Möller K, Wagner S, Sarbia M: Endoscopic ultrasound-guided biopsy: diagnostic yield, pitfalls, quality management. *Zeitschrift Für Gastroenterologie* 2008; 46: 897-908
- Ji BT, Silverman DT, Stewart PA, Blair A, Swanson GM, Baris D, Greenberg RS: Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *American Journal of Industrial Medicine* 2001; 39: 92-99
- Kahl S, Malfertheiner P: Role of endoscopic ultrasound in the diagnosis of patients with solid pancreatic masses. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)* 2004; 22: 26-31
- Karlson BM, Ekblom A, Lindgren PG, Källskog V, Rastad J: Abdominal US for diagnosis of pancreatic tumor: prospective cohort analysis. *Radiology* 1999; 213: 107-111
- Kasper DL, Harrison TR: Harrison's Principles of Internal Medicine 16.Aufl.; McGraw-Hill, New York [u.a.] 2005
- Kasten FH: Cytophotometric investigations on the influence of fixation on Feulgen hydrolysis: evidence for a random loss of purines and pyrimidines from DNA during acid hydrolysis. *Acta histochem. Suppl* 1971; 9: 637-647
- Kim JE, Kyu Taek Lee KT, Lee JK, Paik SW, Rhee JC, Choi KW: Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2004; 19: 182-186
- Kirsch T: Stellenwert der konventionellen Ultraschalldiagnostik in der Abklärung fokaler Pankreasläsionen: eine retrospektive Analyse. Medizinische Dissertation Universität Düsseldorf 2005

- Kramer H, van Putten JWG, Post W, van Dullemen HM, Bongaerts A, Pruijm J, Suurmeijer A, Klinkenberg T, Groen H, Groen H: Oesophageal endoscopic ultrasound with fine needle aspiration improves and simplifies the staging of lung cancer. *Thorax* 2004; 59: 596–601
- Krause C: Endosonographisch gesteuerte Punktion zur Differentialdiagnose unklarer Raumforderungen des Pankreas: eine prospektive Studie. Medizinische Dissertation, Universität Hamburg 2005
- Krishna NB, LaBundy JL, Saripalli S, Safdar R, Agarwal B: Diagnostic value of EUS-FNA in patients suspected of having pancreatic cancer with a focal lesion on CT scan/MRI but without obstructive jaundice. *Pancreas* 2009; 38: 625-630
- Krug H: Histo- und Zytometrie: Einführung in die Absorptionsmethoden 1. Auflage; Fischer, Jena 1980
- Larsson SC, Permert J, Håkansson N, Näslund I, Bergkvist L, Wolk A: Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. *British Journal of Cancer* 2005; 93: 1310-1315
- Linder S, Falkmer U, Hagmar T, Blåsjö M, Sundelin P, von Rosen A: Prognostic significance of DNA ploidy in pancreatic carcinoma. *Pancreas* 1994; 9: 764-772.
- Linder S, Lindholm J, Falkmer U, Blåsjö M, Sundelin P, von Rosen A: Combined use of nuclear morphometry and DNA ploidy as prognostic indicators in nonresectable adenocarcinoma of the pancreas. *International Journal of Pancreatology* 1995; 18: 241-248
- Loertzer H, Hinze R, Knolle J, Rath FW, Schmassmann A: Significance of proliferative activity and DNA ploidy in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *International Journal of Pancreatology* 1999; 26: 77-83
- Loperfido S, Angelini G, Benedetti G, Chilovi F, Costan F, De Berardinis F, De Bernardin M, Ederle A, Fina P, Fratton A: Major early complications from diagnostic and therapeutic ERCP: a prospective multicenter study. *Gastrointestinal Endoscopy* 1998; 48: 1-10
- Mann O, Strate T, Schneider C, Yekebas EF, Izbicki JR: Surgery for advanced and metastatic pancreatic cancer-current state and perspectives. *Anticancer Research* 2006; 26: 681-686
- Matsubara J, Okusaka T, Morizane C, Ikeda M, Ueno H: Ultrasound-guided percutaneous pancreatic tumor biopsy in pancreatic cancer: a comparison with metastatic liver tumor biopsy, including sensitivity, specificity, and complications. *Journal of Gastroenterology* 2008; 43: 225-232
- Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS: Dietary meat, dairy products, fat, and cholesterol and pancreatic cancer risk in a prospective study. *American Journal of Epidemiology* 2003; 157: 1115-1125
- Michaud DS, Skinner HG, Wu K, Hu F, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS: Dietary patterns and pancreatic cancer risk in men and women. *Journal of the National Cancer Institute* 2005; 97: 518-524
- Mitsuhashi T, Ghafari S, Chang CY, Gu M: Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration of the pancreas: cytomorphological evaluation with emphasis on adequacy assessment, diagnostic criteria and contamination from the gastrointestinal tract. *Cytopathology* 2006; 17: 34-41
- Moll KJ, Moll M: Anatomie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog 18. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer; München [u.a.] 2006
- Mortensen MB, Ainsworth AP, Langkilde LK, Scheel-Hincke JD, Pless T, Hovendal C: Cost-effectiveness of different diagnostic strategies in patients with

- nonresectable upper gastrointestinal tract malignancies. *Surgical Endoscopy* 2000; 14: 278-281
- Nakao A, Takeda S, Inoue S, Nomoto S, Kanazumi N, Sugimoto H, Fujii T: Indications and techniques of extended resection for pancreatic cancer. *World Journal of Surgery* 2006; 30: 976-82
- NCCN, Clinical Practice Guidelines in Oncology, Pancreatic Adenocarcinoma 2009 des National Comprehensive Cancer Network 2009; http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/pancreatic.pdf
- Nowack C: Diagnostischer und Therapeutischer Wert der endosonographisch gesteuerten Feinnadelpunktion und Pankreaspseudozystendrainage. Medizinische Dissertation, Universität Düsseldorf 2004
- O'Connell AM, Keeling F, Given M, Logan M, Lee MJ: Fine-needle trucut biopsy versus fine-needle aspiration cytology with ultrasound guidance in the abdomen. *Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology* 2008; 52: 231-236
- Ojajärvi A, Partanen T, Ahlbom A, Boffetta P, Hakulinen T, Jourenkova N, Kauppinen T: Risk of pancreatic cancer in workers exposed to chlorinated hydrocarbon solvents and related compounds: a meta-analysis. *American Journal of Epidemiology* 2001; 153: 841-850
- Patel AV, Rodriguez C, Bernstein L, Chao A, Thun MJ, Calle EE: Obesity, recreational physical activity, and risk of pancreatic cancer in a large U.S. Cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2005; 14: 459-466
- Powis ME, Chang KJ: Endoscopic ultrasound in the clinical staging and management of pancreatic cancer: its impact on cost of treatment. *Cancer Control* 2000; 7: 413-420
- Ramírez-Luna MA, Zepeda-Gómez S, Chávez-Tapia NC, Téllez-Avila FI: Diagnostic yield and therapeutic impact of fine-needle aspiration biopsies guided by endoscopic ultrasound in pancreatic lesions. *Revista De Investigación Clínica* 2008; 60: 11-14.
- Rapp K, Schroeder J, Klenk J, Stoehr S, Ulmer H, Concin H, Diem G, Oberaigner W, Weiland SK: Obesity and incidence of cancer: a large cohort study of over 145,000 adults in Austria. *British Journal of Cancer* 2005; 93: 1062-1067
- Raut CP, Grau AM, Staerckel GA, Kaw M, Tamm EP, Wolff RA, Vauthey JN, Lee JE, Pisters PW, Evans DB: Diagnostic accuracy of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration in patients with presumed pancreatic cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2003; 7: 118-128
- Reisman Y, Gips CH, Lavelle SM, Wilson JH: Clinical presentation of (subclinical) jaundice--the Euricterus project in The Netherlands. United Dutch Hospitals and Euricterus Project Management Group. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 1190-1195
- Rickes S, Flath B, Unkrodt K, Ocran K, Neye H, Lochs H, Wermke W: Pancreatic metastases of renal cell carcinomas - evaluation of the contrast behavior at echo-enhanced power-Doppler sonography in comparison to primary pancreatic tumors. *Zeitschrift Für Gastroenterologie* 2001; 39: 571-578
- Sasson AR, Hoffman JP, Ross EA, Kagan SA, Pingpank JF, Eisenberg BL: En bloc resection for locally advanced cancer of the pancreas: is it worthwhile? *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2002; 6: 147-158
- Shrikhande SV, Kleeff J, Reiser C, Weitz J, Hinz U, Esposito I, Schmidt J, Friess H, Büchler MW: Pancreatic resection for M1 pancreatic ductal adenocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology* 2007; 14: 118-127
- Skov BG, Baandrup U, Jakobsen GK, Kiss K, Krasnik M, Rossen K, Vilmann P: Cytopathologic diagnoses of fine-needle aspirations from endoscopic ultrasound

- of the mediastinum: reproducibility of the diagnoses and representativeness of aspirates from lymph nodes. *Cancer* 2007; 111: 234-241
- Southern JF, Warshaw AL, Lewandrowski KB: DNA ploidy analysis of mucinous cystic tumors of the pancreas. Correlation of aneuploidy with malignancy and poor prognosis. *Cancer* 1996; 77: 58-62
- Steinberg W: The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *The American Journal of Gastroenterology* 1990; 85: 350-355
- Stolzenberg-Solomon RZ, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D: Prospective study of diet and pancreatic cancer in male smokers. *American Journal of Epidemiology* 2002; 155: 783-792
- Südhoff T, Hollerbach S, Wilhelms I, Willert J, Reiser M, Topalidis T, Schmiegel W, Graeven U: Clinical utility of EUS-FNA in upper gastrointestinal and mediastinal disease. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2004; 129: 2227-2232
- Sulkowski U, Meyer J, Reers B, Preusser P: Cancer of the exocrine pancreas. Clinical aspects--diagnosis--therapy. *Medizinische Klinik (Munich)* 1988; 83: 700-704.
- Talamini G, Bassi C, Falconi M, Sartori N, Salvia R, Rigo L, Castagnini A: Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Digestive Diseases and Sciences* 1999; 44: 1303-1311
- Uchida N, Kamada H, Tsutsui K, Ono M, Aritomo Y, Masaki T, Kushida Y, Haba R, Nakatsu T, Kuriyama S: Utility of pancreatic duct brushing for diagnosis of pancreatic carcinoma. *Journal of Gastroenterology* 2007; 42: 657-662
- Vandervoort J, Soetikno RM, Montes H, Lichtenstein DR, Van Dam J, Ruymann FW, Cibas ES, Carr-Locke DL: Accuracy and complication rate of brush cytology from bile duct versus pancreatic duct. *Gastrointestinal Endoscopy* 1999; 49: 322-327
- Varadarajulu S, Wallace MB: Applications of endoscopic ultrasonography in pancreatic cancer. *Cancer Control* 2004; 11: 15-22
- Volmar KE, Vollmer RT, Jowell PS, Nelson RC, Xie HB: Pancreatic FNA in 1000 cases: a comparison of imaging modalities. *Gastrointestinal Endoscopy* 2005; 61: 854-861.
- Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW: Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *The British Journal of Surgery* 2004; 91: 586-594
- Weger AR: Nuclear DNA distribution pattern of the parenchymal cells in adenocarcinomas of the pancreas and in chronic pancreatitis. A study of archival specimens using both image and flow cytometry. *Gastroenterology* 1990; 99: 237-242.
- Welzel TM, Vick C, Reiser M, Göke B: Pankreaskarzinom: Präzisierung der Diagnostik zur weiteren Therapieplanung. *Der Chirurg* 2003; 74 171-182
- Wiersema MJ, Vilman P, Giovannini M, Chang KJ, Wiersema LM: Endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy: diagnostic accuracy and complication assessment. *Gastroenterology* 1997; 12: 1087-1095
- Yassi A, Tate RB, Routledge M: Cancer incidence and mortality in workers employed at a transformer manufacturing plant: update to a cohort study. *American Journal of Industrial Medicine* 2003; 44: 58-62
- Yip D, Karapetis C, Strickland A, Steer CB, Goldstein D: Chemotherapy and radiotherapy for inoperable advanced pancreatic cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)* 2006; 3

- Yun, YH, Jung KW, Bae JM, Lee JS, Shin SA, Park SM, Yoo T, Huh BY: Cigarette smoking and cancer incidence risk in adult men: National Health Insurance Corporation Study. *Cancer Detection and Prevention* 2005; 29: 15-24
- Yusuf TE, Ho S, Pavey DA, Michael H, Gress FG: Retrospective analysis of the utility of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration (EUS-FNA) in pancreatic masses, using a 22-gauge or 25-gauge needle system: a multicenter experience. *Endoscopy* 2009; 41: 445-448
- Zhang J, Zhao Z, Berkel HJ: Animal fat consumption and pancreatic cancer incidence: evidence of interaction with cigarette smoking. *Annals of Epidemiology* 2005; 15: 500-508
- Zhang XZ, Huang ZG, Zhang XB: Application of computed tomography guided percutaneous fine-needle aspiration biopsy in examination of pancreas and Vater's ampulla. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 86: 218-222

Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt zunächst Herrn Professor Dr. med. Alfred Böcking für die freundliche Überlassung dieses spannenden Themas und die stetige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich insbesondere auch bei Frau Dr. Natalia Pomjanski und Herrn Dr. Martin Schramm, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und die mir bei meinen unzähligen Fragen immer weiterhelfen konnten.

Für die Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Herrn Doktor Leonid Berynskyy, sowie Herrn und Frau Dres. Onofre bedanken.

Für Ihre tatkräftige Unterstützung gilt mein Dank des Weiteren allen Mitarbeitern des Instituts für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Abschließend danke ich meinen lieben Eltern, Dr. Hanns und Mirjana Bölefahr, und meinem lieben Zwillingenbruder Sebastian, die die Vollendung meiner Dissertation durch Ihre tatkräftige Unterstützung erst ermöglicht haben. Zusätzlich möchte ich mich bei Maike Jansen ganz herzlich für ihre stetige Unterstützung bedanken.

Für alle lieben Menschen, die mir bei der Fertigstellung und Umsetzung dieser Arbeit geholfen haben, gilt: Ohne sie wäre diese Doktorarbeit in der jetzigen Form nicht möglich gewesen. Vielen Dank dafür!

Lebenslauf

Name: Milan Alexander Bölefahr

Geburtsort: Bremen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: evangelisch

Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung: 1990-1994 Grundschule Münsterschule, Bonn
1994-2003 Clara-Schumann-Gymnasium, Bonn

Schulabschluss: 2003 allgemeine Hochschulreife (Abitur)
Abiturnote: 1,4

Studium: 2004-2011 Studium der Humanmedizin an der
Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf

Hochschulabschluss: Juni 2011: 2. Ärztliche Prüfung: Sehr gut (1,5)
Approbation als Arzt
September 2006: 1. Ärztliche Prüfung:
Sehr gut (1,5)