

Aus dem Institut für Zytopathologie der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. A. Böcking

**Diagnostische Relevanz des Ki67-
Proliferationsfraktionsindex und der DNA-Zytometrie in
Ergüssen seröser Körperhöhlen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Alexandra Schönherr

2003

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

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

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Elisabeth Borsch-Galetke

für meine Eltern

Inhalt

1. Einleitung	3
1.1 Das maligne Mesotheliom.....	3
1.2 Immunzytochemie.....	8
1.2.1 ABC-Methode.....	8
1.2.2 APAAP-Methode.....	10
1.2.3 Ki67/Proliferationsfraktion.....	10
1.3 DNA-Bildzytometrie.....	11
1.3.1 DNA-Färbung.....	12
1.3.2 DNA-Messung.....	12
2. Fragestellung	13
3. Material und Methoden	15
3.1 Ausgangsmaterial.....	15
3.1.1 Ausgangsmaterial für die Ki67-Färbung.....	16
3.1.2 Ausgangsmaterial für die DNA-Färbung.....	17
3.1.3 Ausgangsmaterial für die Ki67-DNA-Doppelfärbung.....	17
3.2 Einzelfärbung.....	18
3.2.1 Proliferationsfraktion.....	18
3.2.1.1 Ki67-Färbung (ABC).....	18
3.2.1.2 Auswertung der Ki67-Färbung.....	22
3.2.2 DNA-Gehalt.....	23
3.2.2.1 DNA-Färbung (Pararosanilin).....	23
3.2.2.2 Auswertung der DNA-Färbung.....	24
3.3 Doppelfärbung.....	27
3.3.1 Ki67-Färbung (APAAP).....	28
3.3.2 DNA-Färbung (Thionin).....	30
3.3.3 Auswertung der Doppelfärbung.....	34

4. Ergebnisse	35
4.1 Einzelfärbung.....	35
4.1.1 Proliferationsfraktion.....	35
4.1.1.1 bei reaktiven Ergüssen.....	36
4.1.1.2 bei malignen Mesotheliomen.....	38
4.1.2 DNA-Gehalt bei malignen Mesotheliomen.....	40
4.1.3 Überlebenszeit bei malignem Mesothliom.....	43
4.2 Doppelfärbung.....	45
5. Diskussion	47
5.1 Einzelfärbung.....	47
5.1.1 Proliferationsraten der Mesothelzellen bei tumorzellfreien Ergüssen.....	47
5.1.2 Proliferationsrate der Zellen des malignen Mesothelioms, DNA-Zytometrie und Prognose.....	49
5.1.2.1 Proliferationsrate.....	49
5.1.2.2 DNA-Zytometrie.....	50
5.1.2.3 Prognose.....	50
5.2 Doppelfärbung.....	52
6. Zusammenfassung	56
7. Anhang	58
7.1 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	58
7.2 Follow up Erfassungsbögen, TNM-Staging.....	59
8. Literatur	64

1. Einleitung

1.1 Das maligne Mesotheliom

Das maligne Mesotheliom ist der Primärtumor seröser Häute. An diesem asbestassoziierten Krebsleiden erkranken ca. 600 Menschen jährlich in Deutschland (1999) [42]. Der Tumor ist immer noch schwer zu diagnostizieren und die Prognose für die Patienten ist schlecht.

Das maligne Mesotheliom geht von den Mesothelzellen der Pleura, des Perikard, des Peritoneum oder der Tunica vaginalis testis aus und wächst kontinuierlich, zum Teil auch multilokulär unter Metastasierung in die regionären Lymphknoten.

Im Unterschied zum malignen Mesotheliom versteht man unter einer Pleura-, Peritoneal- oder Perikardkarzinose die Metastasierung eines malignen epithelialen Tumors in die serösen Häute.

Ätiologie: Überwiegend (in ca. 90% der Fälle) wird das maligne Mesotheliom durch die Inhalation von Asbeststäuben verursacht. Es entsteht mit einer Latenzzeit von ca. 35 Jahren [1], die ersten Fälle sind zum Teil jedoch schon nach 20 Jahren, in einigen Fällen aber auch erst nach 50 Jahren und später [46] festzustellen. Betroffen sind hauptsächlich Männer im sechsten Lebensjahrzehnt, die in Staubberufen tätig waren [50].

Das asbestinduzierte maligne Mesotheliom ist als Berufskrankheit anerkannt (BK-Nr. 4105).

Trotz zunehmender Elimination des Asbestes als Baustoff seit den 70er Jahren ist in Deutschland wegen der langen Latenzzeit [50] mit einem weiteren Anstieg der Erkrankungsfälle zu rechnen. Nach den Untersuchungen von RAITHEL et al. lag die Inzidenz 1999 bei ca. 600 Erkrankungen pro Jahr und wird in den nächsten Jahren stark zunehmen; man vermutet bis zum Jahr 2010 einen Anstieg bis auf 1000 Mesotheliom-Neuerkrankungen pro Jahr [42].

Histologie: Mesotheliome bieten typischerweise ein weites Spektrum an Differenzierungsformen, die von rein epithelialen bis zu sarkomatösen Formen reichen. In biphasischen Tumoren kommen sowohl epitheloide als auch sarkomatoide Strukturen vor. Besonders die epitheliale Form des Mesothelioms ist häufig schwierig von dem histologischen Bild eines metastasierenden Adenokarzinoms zu differenzieren. [50]

Klinik: Die klinischen Symptome des malignen Mesothelioms sind Thoraxschmerzen (60%), die beim Auftreten eines Pleuraergusses (80%) im Gegensatz zur Pleuritis nicht nachlassen [50], gleichzeitig auftretende Dyspnoe, Husten mit und ohne Auswurf und im späten Stadium dann Gewichtsabnahme und Fieber [41].

Die Pleuraergüsse sind häufig einseitig und ausgedehnt [42]; sie treten bei 91% der unbehandelten Patienten auf [54]. Häufig befindet sich der Patient beim Auftreten dieser Symptome bereits in einem späten Stadium der Erkrankung.

Diagnose: Daher ist die häufigste Manifestation des malignen Mesothelioms in bildgebenden Verfahren wie Röntgenaufnahmen und Sonographie des Thorax der Pleuraerguss. Die durch Punktion gewonnene Flüssigkeit ist serös oder sanguinolent bis hämorrhagisch. [50]



aus TIM © Georg Thieme Verlag

Abb. 1: Pleuraerguss bei Pleuramesotheliom

Die klinisch gestellte Verdachtsdiagnose „malignes Mesotheliom“ kann zytologisch aus Ergussmaterial, sowie histologisch an Biopsien bewiesen werden. Doch schon die Erkennung der Zellen des malignen Mesothelioms, also die Unterscheidung zwischen reaktiven Mesothelien und Tumorzellen, wirft Probleme auf [19]. Des Weiteren ist die Differentialdiagnose zwischen malignem Mesotheliom und einer Karzinose der serösen Häute zum Teil schwierig.

Durch Kombination adjuvanter Methoden wie DNA-Bildzytometrie, Immunzytochemie und AgNOR-Analyse können die Tumorzellen jedoch in 90,6% korrekt histogenetisch klassifiziert werden [5]:

So kommt DNA-Aneuploidie nur in Tumorzellen (95,4 Prozent bei Karzinosen, 57,1 Prozent bei Mesotheliomen) [35], nicht aber in reaktiven Ergüssen vor. Somit ist es möglich, auch Tumorzellen zu erkennen, deren Malignität zytomorphologisch nicht zu sichern ist (Sensitivität 82,9%; Spezifität 94,7%) [5]. Da bei 64,3% der malignen Mesotheliome die größte DNA-Stammlinie im Bereich von 1,8c bis 2,2c liegt (bei Karzinosen: 9,2%), kann die DNA-Zytometrie auch zur Differentialdiagnostik von Mesotheliomen und Karzinosen eingesetzt werden [5, 35].

Ein immunzytochemischer Marker, den sowohl reaktive als auch neoplastische Mesothelzellen aufweisen, ist das Antigen Calretinin. Epithel-spezifische Antigene, wie BerEP4, sind bei diesen Zelltypen nicht nachzuweisen, BerEP4 ist aber bei Karzinosen regelmäßig zu finden [34].

Wendet man den kombinierten Nachweis der oben genannten Marker bei zytologisch zweifelhaften Ergüssen an, so erreicht man eine Sensitivität von 77,8 Prozent bei einer Spezifität von 100 Prozent zur Diagnosestellung [5, 35].

Eine weitere Möglichkeit zur sicheren Identifikation von Tumorzellen ist die AgNOR-Analyse: Ein normaler Zellkern weist im Mittel 4,5 Nukleolus organisierende Regionen (NOR) auf. Werte darüber fanden sich bei 98,5% der malignen Mesotheliome [40]; so ist diese Methode besonders geeignet, um reaktive Mesothelzellhyperplasien von neoplastischen Mesothelzellen abzugrenzen. [5]

Eine sichere Unterscheidung zwischen Mesotheliom- und Karzinomzellen in Ergüssen lässt sich also treffen, wenn die Zytomorphologie mit den Ergebnissen der immunzytochemischen Marker BerEp4 und Calretinin sowie der DNA-Zytometrie übereinstimmt [40]. Daraus ergibt sich eine Sensitivität von 61%, eine Spezifität von 99% und eine Gesamttrefferquote von 84,6% [5].

Zwischen Karzinosen und Mesotheliomen lässt sich mit diesen Methoden in allen Fällen korrekt unterscheiden.

Nach BÖCKING et al. befinden sich 47% der mit Hilfe der beschriebenen adjuvanter Methoden zytologisch diagnostizierten malignen Mesotheliome (n=40) im Stadium T1 [5]. Im Gegensatz dazu gelingt der konventionellen Zytologie die Diagnose eines malignen Mesothelioms überhaupt nur in 45% der Fälle [40].

Diese Diagnostik kann mit einem minimal-invasiven Eingriff durchgeführt werden, da die Punktion des Ergusses genügt, um eine ausreichende Menge Zellen für die oben genannten Methoden zu gewinnen.

Die histologische Diagnostik erfolgt nach, Gewinnung von Präparaten, durch Biopsie oder Operation, beziehungsweise post mortem durch Obduktionspräparate.

Die Dokumentation sowie Diagnosesicherung des malignen Mesothelioms erfolgt in Deutschland durch das Zentrale Mesotheliomregister der Gewerblichen Berufsgenossenschaften am Institut für Pathologie (Direktor: Prof. K. M. Müller) der Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannsheil, Universitätsklinik in Bochum [38].

Prognose: Die Prognose für Patienten mit malignem Mesotheliom ist äußerst schlecht und durch therapeutische Maßnahmen kaum zu bessern. Im Stadium I nach BUTCHARD beträgt die mittlere Überlebenszeit 13 Monate [9]; sie sinkt im Stadium II auf 9,4, im Stadium III auf einen Monat.

In Einzelfällen sind jedoch Überlebenszeiten von bis zu 10 Jahren bekannt, die sich bisher nicht durch pathologische oder klinische Variablen erklären lassen [47, 50, 53].

Therapie: Die therapeutischen Möglichkeiten sind äußerst begrenzt. Selbst im frühen Stadium verlängern auch radikale chirurgische Eingriffe die Überlebenszeit der Patienten nicht signifikant; so werden Maßnahmen wie eine Pleurektomie nur noch palliativ zur Verminderung der Ergussproduktion eingesetzt.

Mit dem gleichen Ziel werden auch Pleurodesen mit sklerosierenden Substanzen durchgeführt.

Da das maligne Mesotheliom auch auf eine Radiatio weitgehend nicht anspricht, wird diese vor allem im Rahmen der Schmerztherapie bei extrathorakalen Metastasen eingesetzt.

Die durchschnittlichen Ansprechraten auf Zytostatika wie z.B. Doxorubicin liegen nur bei etwa 10%. Durch lokale Applikation von Cisplatin kann jedoch, ebenso wie bei einer Pleurodese, die Ergussproduktion gehemmt werden [50].

Neoadjuvante Methoden, wie z.B. die intrapleurale Therapie mit Zytokinen oder γ -Interferon bzw. eine Gen-Therapie, könnten im frühen Stadium Ia Erfolge zeigen, während in späteren Stadien die Prognose trotz aller Therapieversuche infaust ist [40].

Aus diesem Grund ist eine frühzeitige, möglichst nichtinvasive Diagnostik sehr wichtig, um bessere Therapieerfolge und Überlebenszeiten zu erreichen.

Die Erstdiagnose im prognostisch günstigeren Stadium Ia findet jedoch bisher nur bei 12% aller Patienten statt [9]; mit Hilfe adjuvanter zytologischer Methoden ließe sich das maligne Mesotheliom jedoch zukünftig bei 47% der Patienten im Stadium T1, N0, M0 diagnostizieren [40].

1.2 Immunzytochemie

Immunzytochemische Färbemethoden dienen der Markierung eines Antigens in Zytoplasma, Zellmembran oder –kern, wie z.B. des Ki67-Antigens. Das Prinzip dieser Methode wurde erstmals 1965 von BEUTNER et al. [3] für den Nachweis und die Quantifizierung humaner Autoantikörper in der Fluoreszenzmikroskopie angewandt und später durch MASON und SAMMONS [31] in einem immunenzymatischen Verfahren wiederentdeckt [26].

Es stehen verschiedene Methoden, wie zum Beispiel die Immunperoxidase-Technik [26], die Avidin-Biotin-Methoden [26, 32, 48], die APAAP-Methode [16], sowie das Immunfluoreszenzverfahren [51] zur Verfügung.

Bei den hier beschriebenen Experimenten wurde die Avidin-Biotin-Methode sowie die APAAP-Methode verwendet.

a) Die Avidin-Biotin-Methoden

Das einfachste Verfahren, welches die starke Affinität zwischen Biotin und Avidin ausnutzt, ist das Zweischnittverfahren nach CLARC und TODD [14], mit dem ein biotinylierter Primärantikörper durch Avidin nachgewiesen wird.

Hierbei muss jedoch der Primärantikörper bereits in konjugierter Form vorliegen, was das Verfahren einschränkt und verteuert [26].

Daher hat es sich als sinnvoller erwiesen, ein Dreischnittverfahren anzuwenden. Zwei Methoden arbeiten nach diesem Prinzip: Die LAB-(Labeled-Avidin-Biotin-)Methode [52] und die im Folgenden verwendete ABC-(Avidin-Biotin-Complex-)Methode [27].

b) Die APAAP-Methode

Ein anderes Prinzip, ein Antigen zu markieren, ist die APAAP-Methode. Dabei wird durch einen Brückenantikörper der Primärantikörper mit einem Enzymkomplex (APAAP) verbunden. Der Enzymkomplex enthält die alkalische Phosphatase, die für die Umwandlung des Substrats und damit für die Anfärbung des Antigens zuständig ist.

1.2.1 Die ABC-Methode

Die ABC-Methode ist das empfindlichste Verfahren in der Immunzytologie [27]. Dabei wird zunächst, wie in den anderen Verfahren auch, das Antigen (z.B. Ki67) mit einem spezifischen Antikörper, dem Primärantikörper (z.B. MIB-1), markiert.

Im zweiten Schritt wird ein biotinylierter Sekundärantikörper (LINK) zugegeben, der an den Primärantikörper bindet. Im dritten Schritt wird ein Komplex aus biotinylierter Peroxidase und Avidin verwendet (die Avidin-Biotin-Bindung ist praktisch irreversibel [23]). Das Avidin-Biotin-Verhältnis ist dabei so gewählt, dass an jedem Avidin drei Peroxidase-Enzyme über Biotin gebunden sind und die vierte Biotinbindungsstelle frei bleibt, über die dann die Kopplung an den biotinylierten Sekundärantikörper erfolgen kann [26]. Eine unspezifische Färbung kommt praktisch nicht zustande: Einerseits durch die hohe Affinität des Avidins zum Biotin, andererseits durch fehlende endogene Avidinbindungsstellen in den meisten Geweben [22, 26].

Peroxidasen, wie im ABC-Komplex verwendet, katalysieren die Oxidation eines Substrates durch Wasserstoffperoxyd [26]. Ein solches Substrat ist z.B. das AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol), das nach Oxidation durch die Peroxidase eine Rotfärbung ergibt. AEC ist wasserunlöslich aber nicht alkoholstabil.

Um eine Umwandlung des Substrates durch endogene, in den Zellen enthaltene Peroxidasen zu verhindern, werden die Präparate vor dem immunologischen Verfahren in einer Mischung aus Methanol und H_2O_2 inkubiert [49]. Dabei wird bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten eine 0,3% H_2O_2 -Methanol-Lösung verwendet [26].

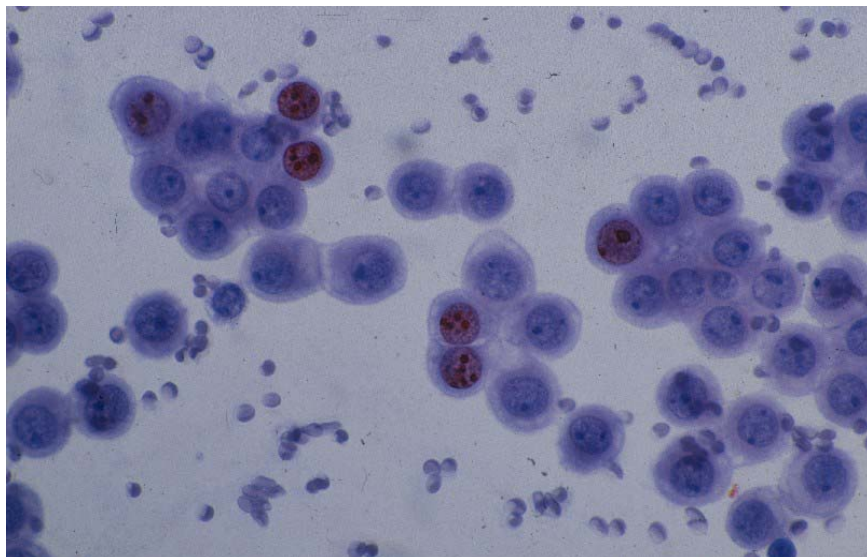


Abb.2: ABC-Methode: Anfärbung des Ki67-Antigens bei Mesothelzellen

1.2.2 APAAP-Methode

Die APAAP-Methode bietet, wie die ABC-Methode, eine Möglichkeit, bestimmte Zellantigene nachzuweisen. Dabei wird zunächst ebenfalls der Primärantikörper (z.B. MIB-1) zugegeben, der an das Antigen (z.B. Ki67) bindet.

Im zweiten Schritt wird dann der Brückenantikörper LINK im Überschuss zugegeben, der hier allerdings nicht biotinyliert ist. So bindet der Brückenantikörper, der wie alle Antikörper zwei Antigenbindungsstellen besitzt, mit jeweils einer Bindungsstelle an das Antigen; die andere bleibt auf Grund der großen Menge des Brückenantikörpers frei.

Nun wird der APAAP-Komplex (alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase) hinzugefügt. Da der APAAP-Komplex aus dem gleichen Tier (Maus) stammt, wie der Primärantikörper, wird er von der freien Antigenbindungsstelle des Brückenantikörpers gebunden.

Zuletzt wird ein Chromogen (*Chromogen-Red, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg*) zugegeben, das, durch die alkalische Phosphatase katalysiert, eine Rotfärbung der APAAP-Komplexe und somit eine Markierung des Antigens ergibt [17].

Für die APAAP-Methode stehen verschiedene Chromogene zur Verfügung; das hier verwendete Chromogen-Red ist im Gegensatz zum AEC der ABC-Methode alkoholstabil.

1.2.3 Ki67/Proliferationsfraktion

Ki67 ist ein Kernantigen, das durch die oben genannten Methoden (ABC-1.2.1, APAAP-1.2.2) über einen spezifischen Primärantikörper nachgewiesen werden kann.

Als ein proliferationsassoziiertes Antigen ist es in Zellen zu finden, die sich in einer Phase der Zellteilung befinden. Es wird im Zellkern und im Nucleolus exprimiert.

Seine Anwesenheit ist fest an bestimmte Zellzyklusphasen gebunden. Das Protein wird während aller aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert, das heißt Ki67 ist während der G1-, S- und G2-Phase sowie während der Mitose vorhanden, aber immer abwesend in der Ruhephase (G0) [21, 44]. Dieses Auftreten des Ki67-Proteins findet man bei normalen Zellen ebenso wie bei Tumorzellen [20].

Das Ki67 Antigen kann über den Antikörper MIB-1 (*Dianova*) nachgewiesen werden. Dieser monoklonale Antikörper bindet das Protein im Zellkern [28].

Über die ABC- (1.2.1) oder die APAAP-Methode (1.2.2) kann dann der Antikörper und somit auch das Ki67-Antigen sichtbar gemacht werden.

Die Proliferationsfraktion ist ein Maß für die Vermehrungsrate von Zellen. Sie ist äquivalent zur Anzahl der Mitosen und somit gleichzusetzen mit dem Prozentsatz der sich zum Zeitpunkt der Messung teilenden Zellen.

Ki67 stellt einen guten Marker da, um die Proliferationsfraktion von Zellpopulationen zu bestimmen [44]. Die Proliferationsfraktion wiederum korreliert häufig mit der Prognose von Tumorpatienten; eine hohe Proliferationsrate bedeutet in der Regel eine schlechtere Prognose für den Patienten. Dies wurde am Mammakarzinom [18], aber auch mehrfach am malignen Mesotheliom nachgewiesen [2, 10, 15, 30].

1.3 DNA-Bildzytometrie

Tumore, auch gutartige, zeigen meist, von den übrigen Körperzellen abweichende, numerische und/oder strukturelle Chromosomenaberrationen, welche nicht in normalen oder reaktiv veränderten Zellen vorkommen [43]. Anstelle der Messung der Chromosomenzahl kann jedoch auch die Menge der DNA bestimmt werden, ausgehend davon, dass ein normaler diploider Chromosomensatz eine bestimmte Menge DNA enthält (2c).

DNA-Aneuploidie ist das quantitative zytometrische Äquivalent chromosomaler Aneuploidie [7]. Der Nachweis der DNA-Aneuploidie gilt, mit wenigen Ausnahmen, in den meisten Geweben als Marker für Malignität [7].

DNA-Aneuploidie liegt vor, wenn

1. der DNA-Index der Stammlinie $< 1,8c > 2,2c$, $< 3,6c > 4,4c$ beträgt („atypische Stammlinie“) [5, 36],
2. Zellen $> 9c$ (9c exceeding events) vorhanden sind [5, 12]. Dies gilt nur für Gewebe in denen keine höhere euploide Polyploidisierung als Tetraploidie vorkommt.

Bei 64,3% der malignen Mesotheliome liegt die größte Stammlinie im Bereich von 1,8c bis 2,2c [5], bei 57,1% der Messungen zeigt sich in malignen Mesotheliomen der Pleura und des Peritoneums DNA-Aneuploidie [34].

DNA-Histogramme von Mesothelzellen zeigen in reaktiven Ergüssen keine Kriterien der DNA-Aneuploidie [36].

1.3.1 DNA-Färbung

Um mittels DNA-Zytometrie die Menge der DNA in den einzelnen Zellkernen identifizieren und quantifizieren zu können, ist eine Färbung notwendig, die spezifisch an die DNA in den Zellkernen bindet und deren Farbintensität dann mit der Menge der vorhandenen DNA übereinstimmt.

Dazu wird die Feulgen-Färbung verwendet. Nach CHATELAIN et al. [13] besteht diese Färbung grundsätzlich aus folgenden zwei Schritten:

Im ersten Schritt wird die DNA hydrolysiert; dabei werden die Purinbasen von der doppelsträngigen DNA abgetrennt. Dadurch resultieren DNA-Stränge, die anstelle der Purinbasen Aldehydgruppen aufweisen.

Wichtig bei der Durchführung der Hydrolyse ist es, eine konstante Temperatur von 27°C einzuhalten, da ansonsten große Abweichungen in der Farbintensität (integrated optical density, IOD) festgestellt werden [13].

Im zweiten Schritt bindet Schiff-Reagenz (z.B. Pararosanilin [rot] oder Thionin-Sulfit-Farbstoff [blau]) stöchiometrisch an die freigelegten Aldehydgruppen.

Dadurch werden diese freien Bindungsstellen angefärbt, und die Intensität des Farbstoffs im einzelnen Zellkern (IOD) kann photometrisch bestimmt werden [13].

Pararosanilin zeigt ein Absorptionsmaximum bei 560 nm, Thionin bei 590 nm [8].

Die Feulgen-Färbung kann mit einem modifizierten Färbeautomaten (*Shandon, Runcorn, U.K.*) durchgeführt werden, der mit einer 27°C Heizkuvette kombiniert ist [13].

1.3.2 DNA-Messung

Die Messung der optischen Dichte der Zellkerne (IOD) erfolgt nach BÖCKING [6] mit Hilfe einer TV-Schwarz-weiß- bzw. Farbkamera und einem PC-basierten Bildanalysesystem im sichtbaren Spektralbereich. Dazu wird ein Mikroskop mit einer entsprechenden Kamera und Interferenzfiltern (Pararosanilin 560 nm, Thionin 590 nm) ausgestattet und dann das Kamerabild auf den Monitor des Computers projiziert. Nun werden auf dem Bildschirm interaktiv zunächst 30 Referenzzellen (Lymphozyten) und dann 300 Tumorzellen pro Objektträger markiert, deren DNA über Bestimmung des IOD-Wertes automatisch gemessen wird.

Die Messung und Auswertung erfolgt mit der Software *Quick Auto Cyte (Autocyte, Burlington, USA)*.

2. Fragestellung

Ein Ziel der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen ist es, Erkenntnisse über die Ki67-Proliferationsfraktion (→ 1.2.3) von Mesothelzellen in tumorzellfreien Ergüssen und von malignen Mesotheliomzellen (→ 1.1) zu gewinnen.

Dazu werden 20 Ergüsse mit Tumorzellen des malignen Mesothelioms und 20 reaktive tumorzellfreie Ergüsse untersucht.

Zusätzlich wird eine DNA-Bildzytometrie (→ 1.3) an Zellen aus den Ergüssen, die durch ein malignes Mesotheliom entstanden, durchgeführt.

Zunächst soll gezeigt werden, wie sich die Proliferationsfraktion innerhalb der Gruppe der reaktiven Ergüsse verhält, insbesondere bezüglich eines möglichen Zusammenhangs mit Tumoren an anderen Körperstellen desselben Patienten.

Auch in der Gruppe der malignen Mesotheliome wird die Proliferationsfraktionsverteilung dargestellt.

Es soll untersucht werden, ob es möglich ist, anhand des Parameters „Proliferationsfraktion“, der über die Anfärbung des Ki67-Antigens (→ 1.2.3) ermittelt wird, eine Differentialdiagnose zwischen Ergüssen, die durch ein malignes Mesotheliom verursacht wurden, und reaktiven, tumorzellfreien Ergüssen (→ 1.1) zu stellen.

Der Zusammenhang der Proliferationsfraktion der Mesotheliomzellen mit dem DNA-Gehalt dieser Tumorzellen, sowie mit der Prognose und Lebenserwartung der Patienten, die an dem malignen Mesotheliom erkrankt sind, soll dargestellt werden.

Da bei einigen Ergüssen bei malignem Mesotheliom zum Teil nur sehr wenige Zellen für die Diagnostik zu gewinnen sind, ist es nicht immer möglich, zwei Präparate, eins für die DNA-Bildzytometrie, sowie eins für die Immunfärbung herzustellen.

So ist ein weiteres Ziel dieser Untersuchungen die Etablierung einer Methode, bei der beide Färbungen an einem Präparat, also an denselben Zellen vorgenommen werden können (Doppelfärbung).

Dies erfolgt jedoch nicht an Mesotheliompräparaten, sondern an Ergüssen von Pleura-, Peritoneal- oder Perikardkarzinosen (50 Präparate).

Folgende Fragen werden also im Verlauf beantwortet:

- Wie stellt sich die Ki67-Proliferationsfraktion der Mesothelzellen bei tumorzellfreien Ergüssen dar, auch bezüglich der Grunderkrankung der Patienten?
- Wie verhält sich die Proliferationsfraktion der Tumorzellen des malignen Mesothelioms, besonders im Vergleich zur Gruppe der tumorzellfreien Mesothelzellen? Ist eine Differentialdiagnose auf dieser Grundlage möglich?
- Wie stellt sich die DNA-Verteilung in der Gruppe der malignen Mesotheliome dar? Gibt es eine Korrelation mit der Ki67-Proliferationsfraktion?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Proliferationsfraktion und der Überlebenszeit der Patienten mit malignem Mesotheliom (z.B. bei Langüberlebenden)?
- Ist es möglich, sowohl Proliferationsfraktion (Ki67) als auch DNA-Gehalt bei geringer Zellzahl an denselben Zellen, also an einem Präparat (Doppelfärbung), zu bestimmen?

3. Material und Methoden

3.1 Ausgangsmaterial

Ausgangsmaterial für die folgenden Experimente war Punktionsmaterial von Pleura- oder Perikardergüssen beziehungsweise Aszites.

Gegenstand der Einzelfärbung waren 20 Ergüsse als Folge eines malignen Mesothelioms und 20 reaktive Ergüsse als Folge von entzündlichen Prozessen und Stauungen.

Die Ergüsse setzten sich wie folgt zusammen:

1. Maligne Mesotheliome

- 15 Pleuraergüsse
- 1 Perikarderguss
- 4 Asziten

darunter waren 2 Frauen und 18 Männer im Alter zwischen 56 und 80 Jahren.

2. Reaktive Ergüsse

- 15 Pleuraergüsse
- 1 Perikarderguss
- 4 Asziten

darunter waren 10 Frauen und 10 Männer im Alter zwischen 28 und 85 Jahren.

Gegenstand der Doppelfärbung waren 50 Ergüsse, die durch Pleura-, Perikard- und Peritonealkarzinosen entstanden waren.

Es handelte sich um Material, das zwischen 1997 und 2000 am Institut für Zytopathologie der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf routinemässig untersucht wurde. Alle Patienten stammten aus der Universitätsklinik Düsseldorf sowie aus umliegenden Krankenhäusern.

Nach der Punktion der Ergüsse in den jeweiligen Kliniken wurde das Material an das Institut für Zytopathologie gesandt. Dort wurde es gekühlt (4°C) aufbewahrt; unter diesen Umständen ist es zwei bis drei Tage haltbar.

Das Material wurde zunächst zentrifugiert (5 Minuten, 300 g) und dann dekantiert, so dass nur die Zellen zurückblieben, sowie 2 bis 3 ml zellulose Flüssigkeit im Überstand. Diese Suspension wurde aufgeschüttelt, dann erfolgte die Entnahme einiger Milliliter mittels einer Glaspipette.

Ein Tropfen wurde nun auf einen Objektträger aufgetropft und mit einem zweiten Objektträger bedeckt, so dass durch die Kapillarkräfte eine gleichmäßige Verteilung der Suspension zwischen den Objektträgern erfolgte. Dann wurden beide Objektträger auseinandergezogen.

Auf diese Weise erhielt man jeweils zwei mit Zellen beschichtete Präparate.

Die Präparate wurden von diesem Punkt an unterschiedlich behandelt, je nachdem für welche Färbung sie im Weiteren verwendet werden sollten.

Sie wurden zum Beispiel für die Immunfärbung fixiert und gefärbt (→ 3.1.1) und für die DNA-Messung zunächst luftgetrocknet und dann gefärbt (→ 3.1.2).

3.1.1 Ausgangsmaterial für die Ki67-Färbung

Nach dem Auseinanderziehen der Objektträger, wurden diese in Fixationslösung gestellt. Dies musste schnell geschehen, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf den Objektträgern zu gewährleisten. Nach dem Eintauchen in das Fixativ war die Zellschicht auf den Objektträgern in der Regel als weißer Film zu erkennen. Als Fixationslösung wurde Delaunay-Lösung benutzt; zur Fixation von 14 Objektträgern waren ca. 200 ml Fixativ erforderlich.

1 Liter Delaunay-Lösung wurde wie folgt hergestellt:

500 ml Ethanol wurden mit 500 ml Aceton auf dem Magnetrührer gemischt; dazu wurden 10 Tropfen 1M Trichloressigsäure gegeben.

Die Lösung war gekühlt ca. 10 Tage haltbar.

Es wurden zwei Küvetten mit Delaunay-Lösung gefüllt, die erste zum Eintauchen, die zweite zur endgültigen Fixation. Die Fixationsdauer betrug mindestens 30 Minuten.

Danach wurden die Objektträger folgendermaßen nach Papanicolaou gefärbt:

96% Ethanol	2 min.	
80%, 70%, 50% Ethanol	je 1 min.	
Aqua dest.	1 min.	
Harris`Hämatoxylin 1a	2 min.	100 ml. Hämatox., 300ml Aqua dest.
H ₂ O	3 min.	nach jedem Lauf wechseln
NH ₂ OH	1 min.	400 ml Ethanol (70%), 3 ml NH ₃
50%, 70%, 80%, 96% Ethanol	tauchen	
Orange II 2b	2 min.	250 ml Orange, 250 ml Ethanol

96% Ethanol	2x1 min.	
Polychrom 3b	2 min.	unverdünnt verwenden
96% Ethanol	2x1 min.	
100% Ethanol	2 min.	
Ethanol/Xylol	2 min.	250 ml Ethanol (100%), 250 ml Xylol
Xylol	3x1 min.	

Tab. 1: Papanicolaou-Färbung

Im Anschluss an die Färbung wurden die Objektträger über Xylol mit Entellan eingedeckt.

Diese Objektträger waren das Ausgangsmaterial für die vorliegenden Experimente. In dieser Form können sie gelagert werden, ohne dass eine Veränderung der Zellstruktur eintritt.

3.1.2 Ausgangsmaterial für die DNA-Färbung

Die Objektträger, die wie unter 3.1 beschrieben hergestellt worden waren, wurden zunächst luftgetrocknet und dann nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) gefärbt.

Dafür wurden die Präparate für 5 Minuten in May-Grünwald-Lösung eingesetzt, dann zweimal in gepuffertem Aqua destillata gespült und anschliessend 15 Minuten in Giemsa-Lösung gefärbt. Nach erneutem zweimaligen Spülen (Aqua dest.) wurden die Präparate luftgetrocknet.

Für die Routinediagnostik wurden die Präparate über Xylol mit Entellan eingedeckt und konnten im Anschluss für die DNA-Färbung weiterverwendet werden.

3.1.3 Ausgangsmaterial für die Ki67-DNA-Doppelfärbung

Ausgangsmaterial für die Doppelfärbung waren Präparate, die nach Delaunay-Papanicolaou fixiert, gefärbt und über Xylol mit Entellan eingedeckt (→ 3.1.1) waren.

3.2 Einzelfärbung

Für die Einzelfärbung wurden die Ki67-Färbung (→ 1.2.1, ABC-Methode) bzw. die DNA-Färbung (→ 1.3.1, Pararosanilin) an jeweils einem eigenen Objektträger einzeln durchgeführt. Ausgangsmaterial für die Einzelfärbung wurde wie unter 3.1.1/2 beschrieben hergestellt.

Für die Ki67-Färbung wurde ein Delaunay/Papanicolaou gefärbter Objektträger (→ 3.1.1) und für die DNA-Messung ein luftgetrockneter und May-Grünwald-Giemsa gefärbter Objektträger (→ 3.1.2) verwendet.

Im Anschluss an die Färbung wurden Proliferationsfraktion (→ 1.2.3) und DNA-Gehalt (→ 1.3.1) bestimmt.

3.2.1 Proliferationsfraktionsbestimmung

Die Proliferationsfraktion der untersuchten Ergüsse, die durch das maligne Mesotheliom, bzw. durch reaktive Prozesse entstanden waren, wurde über den Antikörper Ki67 (→ 1.2.3) bestimmt. Dabei wurde die ABC-Methode (→ 1.2.1) zur Immunfärbung der proliferierenden Zellen angewendet.

Danach erfolgte die Auswertung durch mikroskopische Auszählung und prozentuale Bestimmung der proliferierenden Tumor- bzw. Mesothelzellen.

3.2.1.1 Ki67-Färbung (ABC-Methode)

Um das Material Ki67 färben und auswerten zu können, mussten die Präparate im ersten Schritt zunächst entdeckelt und das Eindeckmedium entfernt werden. Dies geschah durch Lagerung in einer mit Xylol gefüllten Küvette. Die benötigte Zeit bis zur Entdeckelung variierte je nach Dauer der vorherigen Aufbewahrung. Präparate, die bis zu 4 Jahre aufbewahrt wurden, waren jedoch nach maximal zwei Wochen in Xylol vollständig entdeckelt.

Im zweiten Schritt wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe folgendermassen entfärbt:

Xylol	2x10 min.
Ethanol 100%	2x10 min.
Ethanol 96%	2X10 min.

Tab. 2: Entfärbung in Alkohol

Um das verbleibende Ethanol aus den Präparaten zu entfernen, wurden die Objektträger in PBS-Puffer (500 ml Aqua dest.; 8 g NaCl; 1.463 g Na₂HPO₄; 0.245 g KH₂PO₄) 2 x 10 Minuten gewaschen. Nun wurden die Zellen in Citratpuffer (1,8 ml 0,1M Citronensäure; 8,2 ml 0,1 M Natriumcitrat ad 100 ml Aqua dest.; pH 6,0) bei 80°C für 10 Minuten permeabilisiert. Dazu wurde eine geschlossene Heizkuvette in einem Wasserbad verwendet. Dieser Schritt war unbedingt notwendig, um den Antikörper zu demaskieren. Der Antikörper MIB-1 könnte ansonsten das Antigen in den Zellen nicht binden, zum einen, weil Mesothelzellen im Vergleich zu z.B. Lymphozyten viel Zytoplasma besitzen, zum anderen, weil nach Fixation die Antigenbindungsstellen durch quervernetzte Proteine maskiert sein können.

Die Temperatur des Wasserbades wurde mittels eines Teflonthermometers kontrolliert. Ausserdem wurde darauf geachtet, dass die Objektträger im Citratpuffer nicht zu eng zusammen standen, um eine gleichmässige Temperaturverteilung in der Kuvette zu gewährleisten. Dann wurde die Heizkuvette aus dem Wasserbad herausgenommen und ohne Deckel bei Raumtemperatur für 20 Minuten stehen gelassen um abzukühlen.

Im Anschluss mussten die endogenen, zelleigenen Peroxidasen gestoppt werden, um eine unspezifische Umwandlung des später zugefügten Farbstoffs zu verhindern. Dies geschah durch Inkubation in 100 ml Methanol, das mit einem Milliliter Wasserstoffperoxid (H₂O₂, 30%) angesäuert war (30 Minuten). Mittels PBS-Spülung wurde das H₂O₂-Methanol-Gemisch aus den Präparaten entfernt.

Es folgte die Inkubation der Präparate mit Normalserum (20 Minuten). Dazu wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer (die Feuchtigkeit wurde in einer geschlossenen Kammer durch mit PBS-Lösung getränkten Tüchern aufrechterhalten) waagrecht liegend mit dem Normalserum überschichtet. Normalserum blockiert freie Proteine im Hintergrund der zu färbenden Zellen und verhindert so eine unspezifische Anfärbung dieser Proteine.

Mit den so vorbereiteten Präparaten erfolgte dann der erste Schritt der eigentlichen Immunfärbung im Sinne der ABC-Methode (→ 1.2.1). Dazu wurde der Primärantikörper MIB-1 (*Dianova*) aufgetragen, der im Verhältnis 1:100 mit Medium (*DAKO-Kit, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg*) verdünnt war. Für ein Präparat wurden also 10 µl Antikörper und 1 ml Medium verwendet.

Diese Präparate wurden über Nacht für 12 Stunden bei Raumtemperatur in der verdunkelten feuchten Kammer belassen. Am Morgen folgte dann eine zweimalige Spülung in Tris/PBS (bestehend aus 50% PBS-Puffer und 50% Tris-Puffer: 750 ml Aqua dest., 60,57 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan); dabei blieben die an Ki67 gebundenen Antikörper erhalten, die überschüssigen freien Antikörper wurden entfernt.

Laut ABC-Methode wurde nun die Überschichtung mit dem Sekundärantikörper (LINK), der an MIB1 bindet (30 Minuten, Raumtemperatur, feuchte, dunkle Kammer) vorgenommen.

Nach dem Spülen der Präparate wurde das ABC-Reagenz (*ABC-Elite Standard*), bestehend aus einem Komplex biotinylierter Peroxidase und Avidin, aufgetragen. Wie in 1.1.2 beschrieben, bindet dieser Komplex an den biotinylierten Sekundärantikörper und vermittelt über die Peroxidase die Anfärbung des Antigens.

Nach Entfernung überschüssiger Anteile des ABC-Komplexes mittels einer Tris/PBS-Spülung, erfolgte die Inkubation der Präparate in einer Küvette mit AEC-Lösung für 40 Minuten. Diese Lösung ist instabil und nur eine Stunde haltbar und musste deshalb direkt vor Gebrauch frisch angesetzt werden.

Dazu wurden 28 mg AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) in 7,2 ml N-N-Dimethylformamid unter ständigem Rühren gelöst und mit 100 ml Acetatpuffer (0,1 M, pH: 5,2) versetzt. Dann wurden 106 µl H₂O₂ zugegeben. Diese Lösung wurde auf dem Magnetrührer homogenisiert und dann filtriert.

AEC wurde auf dem Präparat durch die Peroxidase des gebundenen Enzym-Komplexes oxidiert; dadurch entstand an der jeweiligen Stelle ein roter Farbstoff.

Mittels Spülungen in Aqua dest. wurde die nicht verbrauchte AEC-Lösung nach 40 Minuten Inkubation aus den Präparaten entfernt und der Färbeprozess beendet.

Alle proliferierenden Kerne waren zu diesem Zeitpunkt über die Darstellung des Antigens Ki67 rot angefärbt worden. Um unter dem Mikroskop eine bessere Identifikation der Zellen zu gewährleisten, wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau) für eine Minute durchgeführt. Dann wurde überschüssiger Farbstoff aus den Präparaten gewaschen (fließendes Leitungswasser, 10 Minuten).

Im Anschluss wurden die Präparate mit Aquatex, einem wässrigen Eindeckmedium, eingedeckt.

Färbeprotokoll für die ABC-Färbung:

PBS	2 x	10 min.	
Citratpuffer		10 min.	80°C
Citratpuffer		20 min.	ohne Deckel abkühlen lassen
PBS	2 x	10 min.	
Methanol/ H ₂ O ₂		30 min.	
PBS	3 x	Spülen	
PBS	2 x	10 min.	
Normalserum		20 min.	feuchte Kammer, dunkel
		ablaufen lassen	
Primärantikörper		12 h	feuchte Kammer, dunkel
Tris/PBS	2 x	5 min.	
LINK		30 min.	feuchte Kammer, dunkel
Tris/PBS	2 x	5 min.	
ABC-Lösung		30 min.	feuchte Kammer, dunkel
Tris/PBS	2 x	5 min.	
AEC-Lösung		40 min.	
Aqua dest.	2 x	5 min.	
Hämatoxylin		1 min.	
H ₂ O, fließend		10 min.	

Tab. 3: ABC-Färbung

3.2.1.2. Auswertung der Ki67-Färbung

Die prozentuale Ki67-Proliferationsfraktion wurde aus dem Verhältnis der Marker-positiven Tumorzellen (malignes Mesotheliom) bzw. der –positiven Mesothelien (reaktive Ergüsse) zu der Gesamtzahl der gezählten Mesotheliomzellen/ Mesothelien ermittelt.

Dazu wurde ein Mikroskop mit einem 40er Objektiv und einem 10er Okular verwendet.

Pro Objektträger wurden 300 Zellen ausgezählt. Dabei wurden nur Mesothelzellen bzw. Mesotheliomzellen beachtet.

Die Objektträger wurden regelmässig mit der beschrifteten Seite nach links unter das Mikroskop gelegt. Die Auswertung begann jeweils in der linken oberen Ecke des Objektträgers bei Sicht durch das Okular mit der Auszählung des gesamten Gesichtsfeldes. Dabei war das Gesichtsfeld durch ein Zählokular in vier Quadranten eingeteilt. Diese wurden, beginnend mit dem linken oberen Quadranten, im Uhrzeigersinn ausgezählt. Danach wurde der Objektträger mäanderförmig verschoben, so dass das jeweils angrenzende Gesichtsfeld ausgezählt werden konnte. Dies geschah solange, bis entweder 300 Zellen gezählt worden waren oder bis der gesamte Objektträger ausgewertet war.

Durch die zum Teil sehr geringe Zellzahl wurde so in Einzelfällen die Proliferationsfraktion aus weniger als 300 Zellen berechnet.

Für die Auswertung wurde jede Mesothel-/Mesotheliomzelle einer von zwei Gruppen zugeordnet: entweder der Gruppe „Proliferation“ oder der Gruppe „Ruhephase“.

Wie unter 1.2.3 erläutert, galten dabei folgende Kriterien: Jede Zelle, bei der eine erkennbare Rotfärbung im Kern oder in Kernteilen vorhanden war, wurde als eine proliferierende Zelle gewertet; jede Zelle ohne Rotfärbung im Kern als eine Zelle in Ruhephase. Nekrotische Zellen wurden nicht gezählt.

Die Proliferationsfraktion ergibt sich aus der Anzahl der proliferierenden Zellen dividiert durch die Gesamtzahl der gezählten Zellen.

3.2.2 DNA-Gehalt

Der DNA-Gehalt wurde ausschließlich an Tumorzell-positiven Ergüssen, das heisst an Ergüssen von Patienten mit einem diagnostisch gesicherten malignem Mesotheliom, bestimmt. Nach der Anfärbung der DNA in den Zellkernen mit Pararosanilin (→ 1.3.1) wurde der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen gemessen (→ 1.3.2) und als Histogramm für jeden der ausgewerteten Objektträger dargestellt.

3.2.2.1 DNA-Färbung (Pararosanilin)

Für die DNA-Färbung wurden als Ausgangsmaterial luftgetrocknete und nach Pappenheim gefärbte Objektträger benötigt (→ 3.1.2). Diese wurden für die anschließende diagnostische Beurteilung über Xylol mit Entellan eingedeckt.

Die Färbung der Präparate erfolgte automatisch in einem modifizierten Färbeautomaten (*Shandon, Runcorn, U.K.*) (→ 1.3.1).

Dazu wurden die Präparate in die Halterung des Färbeautomaten gestellt und dann automatisch, entsprechend des programmierten Färbeablaufs, von Küvette zu Küvette bewegt.

Dabei wurde zunächst das Eindeckmedium Entellan durch Xylol entfernt. Nach absteigender Alkoholreihe wurden die Präparate in gepuffertem Formalin fixiert.

Die Hydrolyse der DNA (→ 1.3.1) erfolgte in einer Heizküvette in 5N HCl bei 27°C.

Bei diesem Schritt war zu beachten, dass die Heizküvette schon während der Zeit, in der das Eindeckmedium entfernt bzw. die Fixation durchgeführt wird, erwärmt wurde, damit die enthaltene Säure die für die Hydrolyse erforderliche Temperatur von exakt 27°C erreicht hatte. Diese Temperatur wurde nach ca. 80 Minuten erreicht und blieb dann konstant [13].

Nach Spülung der Präparate in Aqua dest., um die restliche Salzsäure zu entfernen, wurden die durch die Hydrolyse freigelegten Aldehydgruppen der DNA mit einer Schiff-Reagenz, in diesem Fall mit Pararosanilin (rot), angefärbt (→ 1.3.1). Mit Sulfidwasser wurde im Anschluss der nicht an Aldehydgruppen gebundene Farbstoff entfernt und so der Färbevorgang beendet. Danach wurden die Präparate nach aufsteigender Alkoholreihe über Xylol mit Entellan eingedeckt und konnten so ausgewertet werden (→ 1.3.2).

Färbevorschrift für die Feulgen-Färbung mit dem Shandon-Färbeautomaten

(Runcorn, U.K.):

Xylol	15 min.
Ethanol 100%	5 min.
Ethanol 96%	5 min.
10% gepuffertes Formalin	50 min.
Aqua dest.	10 min.
Aqua dest.	5 min.
5 N Hcl, 27°C	60 min.
Aqua dest.	3 x 2 min.
Schiff's Reagenz	60 min.
Sulfitwasser	3 x 5 min.
Aqua dest.	2 x 1 min.
Ethanol 70%	3 min.
Ethanol 96%	3 min.
Ethanol 100%	3 min.
Xylol	10 min.

Tab. 4: Feulgen-Färbung (Pararosanilin) im Färbeautomaten

3.2.2.2 Auswertung der DNA-Färbung

Die nach Pararosanilin-Feulgen gefärbten Objektträger wurden mit einem computergestützten optischen Verfahren ausgewertet (→ 1.3.2):

Die Messeinheit für diese Auswertung bestand aus einem Mikroskop, auf das eine Schwarz-Weiss-Kamera montiert war. Die Kamera wurde an einen PC, der mit der Software *Quick Autocyte* (*Autocyte, Burlington, USA*) ausgestattet war, angeschlossen. Diese Software ist speziell für DNA-zytometrische Messungen entwickelt worden.

Zunächst wurde das Mikroskop für die Messung vorbereitet. Dazu wurde ein Interferenzfilter (560nm +/- 10nm) eingelegt, entsprechend des Absorptionsmaximums der hier mit Pararosanilin angefärbten DNA.

Dann wurde das auszuwertende Präparat unter dem Mikroskop plaziert.

Im ersten Schritt wurden Mikroskop und Software auf dieses bestimmte Präparat kalibriert. Dazu wurde zunächst ein zellhaltiger Bereich des Präparates fokussiert. Dieser Ausschnitt war gleichzeitig auf dem Monitor des Computers zu sehen.

Dann wurde durch eine in den Lichtweg des Mikroskops eingeschobene Blende für das System „Schwarz“ definiert.

Im nächsten Schritt wurde das Mikroskop „geköhler“ und im Anschluss ein Weissabgleich durchgeführt. Dazu wurde ein leeres weißes Feld angeboten und die Lichtintensität dem optimalen Bereich der Kamera angepasst.

Ein zu messender Ausschnitt des Präparates konnte nun aufgesucht und auf dem Bildschirm betrachtet werden.

Die Kalibrierung des Systems musste vor jeder Messung eines Präparates erneut stattfinden. An diesem Punkt konnte die eigentliche Messung beginnen.

Um den DNA-Gehalt eines Zellkerns zu bestimmen, wurde der IOD-Wert (integrated optical density), das heißt die Farbintensität des entsprechenden Kerns gemessen, der dem DNA-Gehalt entspricht (→ 1.3.1).

Um den IOD-Wert eines Zellkerns zu bestimmen, wurde der entsprechende Kern auf dem Monitor mit einer Maus angeklickt, die integrierte optische Dichte wurde dabei automatisch bestimmt und gespeichert.

Zunächst wurden 30 Referenzzellen (unauffällige mittelgroße Lymphozyten) gemessen, um an diesem bestimmten Präparat einen Durchschnittswert für die Farbintensität, die durch den diploiden Chromosomensatzes einer normalen Zelle entsteht, zu erhalten.

Nun wurden in dem entsprechenden Präparat jeweils 300 Tumorzellen (Mesotheliomzellen) hinsichtlich ihres IOD-Wertes vermessen. Die Mesotheliomzellen wurden vom Auswertenden mikroskopisch identifiziert und mit der Maus angeklickt; dadurch wurde wiederum automatisch der IOD-Wert entsprechend dem DNA-Gehalt bestimmt.

Nach Beendigung des Messvorgangs lieferte die Software eine histogrammische Darstellung der Verteilung des DNA-Gehalts der gemessenen Tumorzellen im Verhältnis zu den Referenzzellen. Dabei wurde der durchschnittliche IOD-Wert der Referenzzellen als 2c (d.h. normaler doppelter Chromosomensatz) festgelegt.

Doppelte integrierte optische Dichte z.B. einer Tumorzelle in Relation zu einer Referenzzelle wurde also bei 4c eingeordnet.

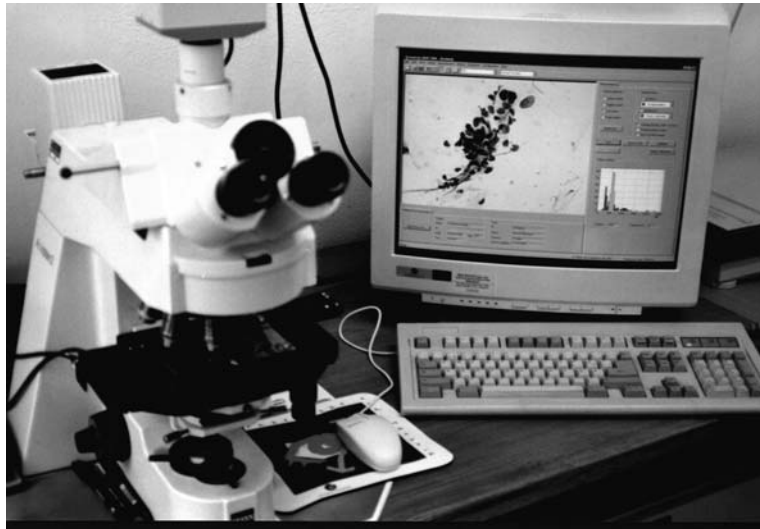


Abb. 3: Messmikroskop mit Monitor und Tastatur des Bildanalyseprogramms Quick Autocyte für die DNA-Bildzytometrie

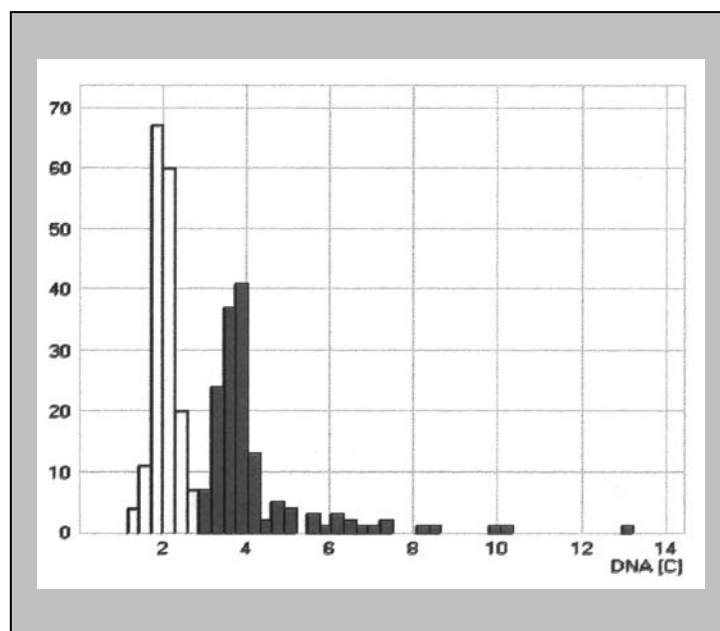


Abb. 4: DNA-Histogramm eines malignen Mesothelioms: Stammlinien bei 2c und 4c sowie 6 Zellen >9c

3.3 Doppelfärbung

Weil in einigen Ergusspräparaten nur wenige Zellen vorhanden sind, sollte mit Hilfe einer experimentellen Doppelfärbung versucht werden, sowohl die Immunfärbung als auch die DNA-Messung an einem Objektträger, also an denselben Zellen durchzuführen. Damit sollte die Möglichkeit, eine vollständige Diagnostik auch an zellarmen Präparaten durchzuführen, geschaffen werden.

Da Ergüsse durch maligne Mesotheliome im Vergleich zu Ergüssen durch Karzinosen seröser Häute in der Routinediagnostik deutlich seltener sind, wurden für die Doppelfärbung, zum Etablieren dieser Methode, die folgenden Experimente an Karzinosen durchgeführt (→ 3.1).

Es wurden Delaunay/Papanicolaou fixierte und gefärbte Präparate (→ 3.1.3) verwendet.

Pro Patient wurden jeweils drei Präparate gefärbt. Ein Objektträger verblieb nur immungefärbt zur Kontrolle, der zweite sollte für die zusätzliche Färbung der DNA mit Thionin verwendet werden, der dritte wurde ausschliesslich Thionin-Feulgen gefärbt. Die Doppelfärbung wurde in zwei Schritten durchgeführt: Zunächst erfolgte die Immunfärbung mit der APAAP-Methode (→ 1.2.2), dann die Thionin-Feulgen-Färbung der DNA (→ 1.3.1).

Im Gegensatz zur Einzelfärbung war es bei der Doppelfärbung notwendig, die APAAP-Methode zu benutzen, da die Präparate für die anschliessende DNA-Messung mit der Farbkamera aufgrund des günstigeren Brechungsindex mit Entellan eingedeckt sein mussten. Dies war jedoch bei der (genaueren) ABC-Methode nicht möglich, da zum Eindecken mit Entellan zunächst eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt werden musste, bei der der nicht-alkoholstabile Farbstoff AEC (ABC-Methode) im Gegensatz zum alkoholstabilen Chromogen-Red der APAAP-Methode ausgewaschen worden wäre.

Zur Quantifizierung der DNA im zweiten Schritt, war es deshalb auch nicht mehr möglich, Pararosanilin (rot) als Schiff-Reagenz zur Anfärbung der DNA zu verwenden, da es eine ähnliche Farbe und damit auch ein ähnliches Absorptionsmaximum wie das Chromogen der APAAP-Methode hat.

Um an den gleichen Zellen eine zweiparametrische Messung (Ki67 und DNA) durchführen zu können, musste also der zweite Farbstoff eine andere Farbe und ein anderes Absorptionsmaximum besitzen. Deshalb wurde als Schiff-Reagenz zur DNA-Färbung bei der Doppelfärbung hier der blaue Farbstoff Thionin verwendet.

3.3.1 Ki67-Färbung (APAAP-Methode)

Die Vorbereitungsschritte für die eigentliche Immunfärbung wie Entdeckelung durch Xylol, Entfärbung durch Ethanol und Permeabilisierung durch Citratpuffer liefen bei der APAAP-Methode ähnlich ab wie bei der ABC-Methode (→ 3.2.1.1).

Im Unterschied zur ABC-Methode durfte allerdings bei der APAAP-Methode kein PBS-Puffer als Waschlösung verwendet werden [17], da die Phosphatverbindungen dieses Puffers mit denen des Substrats um die alkalische Phosphatase des APAAP-Komplexes konkurriert hätten. Somit wäre der an das Antigen gekoppelte APAAP-Komplex verbraucht worden und es wäre keine, oder nur eine sehr geringe Anfärbung des Antigens zustande gekommen.

Statt dessen wurde bei der APAAP-Methode TBS-Puffer (12,2 g Tris (-hydroxymethyl)-aminomethan; 17,6 g NaCl; 74 ml 1N HCl; ad 2 l Aqua dest.; pH 7,6) verwendet.

Folgende Schritte wurden (ähnlich wie bei der ABC-Methode) durchgeführt:

Färbeprotokoll für die APAAP-Färbung (Teil 1)

Xylol	2 x	10 min.	
Ethanol 100%	2 x	10 min.	
Ethanol 96%	2 x	10 min.	
TBS	2 x	10 min.	
Citratpuffer		10 min.	80°C
		20 min.	ohne Deckel abkühlen lassen
TBS	2 x	5 min.	

Tab. 5: APAAP-Färbung (Teil 1)

Nun erfolgte die eigentliche Immunfärbung im Sinne der APAAP-Methode.

Sie unterscheidet sich nur in wenigen Schritten von der ABC-Methode. Es zeigte sich aber in Vorversuchen, dass bei der weniger empfindlichen APAAP-Methode, im Gegensatz zur ABC-Methode, das Stoppen der endogenen Enzyme, in diesem Fall der alkalischen Phosphatasen, nicht erforderlich war.

Es stellte sich heraus, dass keine Veränderung der Qualität der Immunfärbung und keine unspezifische Hintergrundfärbung bei der APAAP-Methode auftraten, auch wenn dieser Schritt (Stoppen der endogenen alkalischen Phosphatasen mit Levamisol) ausgelassen wurde.

Eine Inkubation mit Normalserum war in diesem Fall auch nicht notwendig, da keine unspezifische Hintergrundfärbung von Proteinen durch die APAAP-Methode nachzuweisen war.

Für die Bindung des Ki67-Antigens wurde derselbe Primärantikörper (Verdünnung mit Medium 1:100) verwendet wie bei der ABC-Methode, nämlich MIB-1 (*Dianova*). Die Inkubation mit dem Antikörper und alle weiteren Schritte dieser Färbung, inklusive der Zugabe des Chromogens, erfolgten wie üblich an waagrecht liegenden Präparaten in einer dunklen, feuchten Kammer.

Im Gegensatz zur ABC-Methode wurden die Präparate aus labortechnischen Gründen nur für 30 Minuten mit dem Primärantikörper inkubiert; dies hatte jedoch nachgewiesenermaßen keinen Einfluss auf die Qualität der Immunfärbung.

Der Sekundärantikörper (LINK), der APAAP-Immunkomplex und das Chromogen (Chromogen-Red) stammten aus dem Universal DAKO APAAP-Kit, Maus (*DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg*).

Färbeprotokoll für die APAAP-Färbung (Teil 2)

Primärantikörper	30 min.
TBS	2 x 5 min.
LINK	30 min.
TBS	2 x 5 min.
APAAP-Komplex	30 min.
TBS	2 x 5 min.
Chromogen-Red	20 min.
Aqua dest.	2 x 5 min.

Hämatoxylin	10 min.
Ethanol 50%	30 sec.
Ethanol 70%	30 sec.
Ethanol 96%	30 sec.
Ethanol 100%	30 sec.
Ethanol/Xylol	2 min.
Xylol	2 x 2 min.

Tab. 6: APAAP-Färbung (Teil 2)

Nach Zugabe des APAAP-Komplexes (alkalische Phosphatase-Anti-alkalische-Phosphatase) wurde dieser über den Sekundärantikörper (LINK) an den Primärantikörper MIB-1 gebunden (→ 1.2.2).

Das zugegebene Substrat (Chromogen-Red) wurde dann durch die alkalische Phosphatase des APAAP-Komplexes umgewandelt, so dass bei der Anfärbung des Ki67-Antigens in den Zellkernen proliferierender Zellen ein leuchtendroter Farbstoff entstand.

Die Gegenfärbung der Zellen erfolgte mit Hämatoxylin (blau), dann wurden die Präparate nach aufsteigender Alkoholreihe über Xylol mit Entellan eingedeckt.

Im Anschluss konnten die Präparate unter dem Mikroskop betrachtet und die Qualität der Immunfärbung beurteilt werden.

Jeweils ein Objektträger wurde zur Kontrolle aufbewahrt, an einem zweiten Präparat konnte nun zusätzlich die Anfärbung der DNA durchgeführt werden.

3.3.2 DNA-Färbung (Thionin)

Die Thionin-Feulgen-Färbung wurde an jeweils zwei Präparaten durchgeführt: Einmal am Ki67 gefärbten Präparat (APAAP-Methode, → 3.3.1), zum anderen zur Kontrolle an einem Delaunay/Papanicolaou gefärbten Präparat.

Zunächst wurden die Präparate in Xylol entdeckelt.

Bei den frisch eingedeckten immungefärbten Präparaten löste sich das Deckgläschen in der Regel schon nach einigen Stunden, bei den Dellaunay/Papanicolaou vorbehandelten Präparaten dauerte die Entdeckungelung in der

xylolgefüllten Küvette bis zu zwei Wochen, je nachdem, wie lange das jeweilige Präparat gelagert worden war (→ 3.2.1.1).

In Vorversuchen war festgestellt worden, dass es zu beachten war, dass das immungefärbte Präparat nicht länger als 24 Stunden in Xylol aufbewahrt wurde, da bei längerer Inkubationszeit der alkoholstabile Farbstoff zu verblassen begann, so dass dann nicht mehr sicher davon ausgegangen werden konnte, dass die Zahl der proliferierenden Zellen mit der Zahl der angefärbten Zellen übereinstimmte.

Es wurde jedoch sichergestellt, dass nach dem Entdecken von weniger als 24 Stunden in Xylol, beziehungsweise nach den Alkoholreihen, die zum Eindecken und für die Thionin-Feulgen-Färbung notwendig waren, kein Verlust der Ki67-Färbung auftrat. Dazu wurde in Bezug zu einem Kontrollpräparat an verschiedenen Stellen der Färbeprozesse ein Präparat aus der Färbereihe entfernt und mit dem Kontrollpräparat verglichen.

Die Thionin-Feulgen-Färbung wurde nicht im Färbeautomaten, sondern per Hand durchgeführt. Dabei wurden beide Präparate auf dieselbe Weise behandelt.

Zunächst wurde das Eindeckmedium durch Xylol entfernt. Dann erfolgte die Entfärbung der Präparate durch Ethanol, dabei wurde der Papanicolaou-Farbstoff einerseits und das Hämatoxylin andererseits entfernt, das Chromogen-Red im Immun-Präparat blieb hingegen erhalten.

Nach Fixierung der Zellen (Formalin 10%) erfolgte die Hydrolyse der DNA wie bei der Parasosanilin-Färbung für 60 Minuten bei 27°C (→ 3.2.2.1). Dann folgte die Anfärbung der durch die Hydrolyse freigelegten Aldehydgruppen (→ 1.3.1) durch das Schiff-Reagenz, in diesem Fall durch den Thionin-Sulfit-Farbstoff. Beendet wurde die Färbung, indem überschüssiges Thionin mittels Sulfitwasser entfernt wurde.

Im Anschluss konnten die Präparate nach aufsteigender Alkoholreihe über Xylol mit Entellan eingedeckt werden.

Färbeprotokoll für die Thionin-Feulgen-Färbung:

Xylol	15 min.
Xylol/Ethanol 100%	Spülen
Ethanol 100%	10 min.
Ethanol 96%	5 min.
10% gepuffertes Formalin	50 min.
Aqua dest.	10 min.
Aqua dest.	10 min.
5 N HCl, 27°C	60 min.
Aqua dest.	1 min.
Thionin SO ₂	60 min.
Sulfitwasser	2 x 5 min.
Aqua dest.	2 min.
Ethanol 50%	30 sec.
Ethanol 70%	30 sec.
Ethanol 96%	30 sec.
Ethanol 100%	30 sec.
Ethanol 100%/Xylol	2 min.
Xylol	2 x 2 min.

Tab. 7: Thionin-Feulgen-Färbung

An den mit Entellan eingedeckten Präparaten konnte dann mikroskopisch ein Vergleich der Färbungen des doppelt gefärbten Präparates mit den beiden einfach gefärbten Kontrollpräparaten erfolgen.

Bei dem oben beschriebenen Färbeablauf ergaben sich jedoch Probleme bezüglich der Qualität der Thionin-Feulgen-Färbung an den zuvor mit der APAAP-Methode gefärbten Präparaten. Während die Ki67-Färbung in derselben Qualität und Farbintensität möglich war, wie in der Einzelfärbung, war die DNA-Färbung im Vergleich zu Kontrollpräparaten zu schwach. Aus diesem Grund wurden diverse Änderungen im Färbeablauf vorgenommen, um die Qualität der Doppelfärbung zu verbessern.

1. Veränderungen der Thionin-Feulgen-Färbung:

- Verlängerung der Fixationsdauer in Formalin: *2h (4h, 6h, 12h)* an üblicher Stelle der Thionin-Färbung
- Veränderung der Hydrolysedauer in 5N HCL bei 27°C:
 - a) *keine Hydrolyse*
 - b) *Hydrolyse 30min. (40 min., 50 min., 60min., 70 min., 80 min., 90 min.)*
- Verlängerung der Inkubationszeit mit dem Schiff-Reagenz (Thionin SO₂): *60 min. (70 min., 80 min., 90 min., 120 min.)*
- Verkürzung der Auswaschzeit in Sulfitwasser: *2 x 4 min. (3 min., 2 min., 1 min.), 1 x 4 min. (3 min., 2 min., 1min.)*

2. Veränderungen der Ki67-Färbung:

- Veränderung der Inkubationszeit in Citratpuffer (80°C): *2 min. (4 min., 6 min., 8 min., 10 min., 12 min.)*
- Veränderung der Temperatur des Citratpuffers (10 min., 20 min. abkühlen lassen): *20°C (30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C)*

3. Übergreifende Veränderungen des Färbeablaufs beider Färbungen

- Fixation in Formalin *am Beginn der Doppelfärbung*: Xylol > Ethanol > TBS (Beginn der Ki67-Färbung) > Aqua dest. > Formalin 1h (6h, 12h) > Aqua dest., > Fortführung der Ki67-Färbung mit TBS
- Direkte Folge beider Färbungen: *Ki67-Färbung bis zum Schritt Chromogen –Red > Aqua dest., dann Weiterführung der Thionin-Feulgen-Färbung mit der Fixation in Formalin.*
- Umkehr der Färbereihenfolge: *erst Thionin-Feulgen-Färbung, dann Ki67-Färbung nach zuvor beschriebenem Schema*

4.3.3 Auswertung der Doppelfärbung

Bei der Auswertung der Doppelfärbung sollte mit Hilfe eines PC-basierten Farbkamera-Bildanalyse-Systems simultan sowohl der DNA-Gehalt der Zellen als auch die Proliferationsfraktion am gleichen Präparat bestimmt werden.

Die Messeinheit, die zur Auswertung der Doppelfärbung verwendet wurde, bestand aus einem Mikroskop und einer Farbkamera, die an einen PC, der mit der Software Quick Autocyte Immuno (*Quick Autocyte, Burlington, USA*) ausgestattet war, angeschlossen wurde.

Zunächst wurde das System entsprechend der Messung der DNA bei der Einzelfärbung kalibriert (→ 3.2.2.2). Dazu wurde das Mikroskop „geköhler“, ein Schwarz- beziehungsweise Weiss-Abgleich durchgeführt und die Lichtintensität angepasst.

Dann wurde ein Ausschnitt des Präparates, der sowohl die Farbe Blau (jeder beliebige Zellkern mit DNA) als auch die Farbe Rot (jede proliferierende Zelle) enthielt, ausgewählt und von der Farbkamera auf den Bildschirm des PC übertragen. Danach wurden durch die Software automatisch die Schwellen für die Farbe Rot bzw. Blau bestimmt und die entsprechenden Zellkerne mit einer roten bzw. einer blauen Linie umrandet. Die Schwellen zur Erkennung dieser beiden Farben konnten dann noch individuell angepasst werden.

Zur eigentlichen Messung wurde ein Gesichtsfeld eingestellt, das dann automatisch vermessen werden sollte. Dabei sollten die Zellkerne erkannt und der Gruppe „Rot“ bzw. „Blau“ zugeordnet werden. Dies wurde wiederum durch Umrandung der Kerne in der entsprechenden Farbe dargestellt. Ausserdem wurde gleichzeitig der DNA-Gehalt der blauen Zellkerne anhand der Farbintensität des Thionins bestimmt.

Bei Falscherkennung der Farbe eines Zellkerns besteht die Möglichkeit die Farbe umzudefinieren, etwa kann ein durch die Software falsch zugeordneter Kern konnte z.B. von „rot“ nach „blau“ umbenannt werden.

Ausserdem können nicht gewünschte Zellen, wie zum Beispiel Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen aus der Berechnung entfernt werden, so dass die Ergebnisse ausschliesslich aus der Auswertung der Tumorzellen entstanden.

Nach Vermessung eines Präparates erstellt das Programm zum Einen ein Histogramm über die DNA-Verteilung der Zellkerne, zum Anderen berechnet es die Proliferationsfraktion der Tumorzellen.

4. Ergebnisse

4.1 Einzelfärbung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Einzelfärbungen dargestellt. Zunächst wird die Auswertung der Ki67-Antigen-Färbung an Zellen aus reaktiven Ergüssen und von malignen Mesotheliomen aufgezeigt.

Zu Beginn erfolgt die Analyse der Daten der reaktiven Ergüsse in Bezug auf die Grunderkrankung der Patienten. Dann folgt die Darstellung der Daten der Proliferationsraten bei malignen Mesotheliomen und im Anschluss der Vergleich beider Gruppen (Differentialdiagnose). Danach werden die Ergebnisse der DNA-Färbung bei malignen Mesotheliomen dargestellt, auch im Vergleich zur Proliferationsfraktion.

Des Weiteren wird an der Gruppe der Ergüsse von malignen Mesotheliomen eine Auswertung der oben genannten Daten unter zusätzlicher Berücksichtigung von AgNOR-Analyse, Tumorstadium und Überlebenszeit nach zytologischer Diagnosestellung erfolgen.

4.1.1 Proliferationsfraktion

Die Proliferationsfraktion der Zellen wurde, wie zuvor beschrieben (4.2.1), über Anfärbung des Ki67-Antigens mit der ABC-Methode (Abb. 4) und über quantitative Auszählung der proliferierenden Zellen in Ergusspräparaten von 20 Präparaten von Patienten mit einem reaktiven nicht neoplastischen Erguss (Gruppe A) und 20 Patienten mit malignem Mesotheliom (Gruppe B) erstellt. Nachfolgend werden die Daten beider Gruppen einzeln und im Vergleich dargestellt.

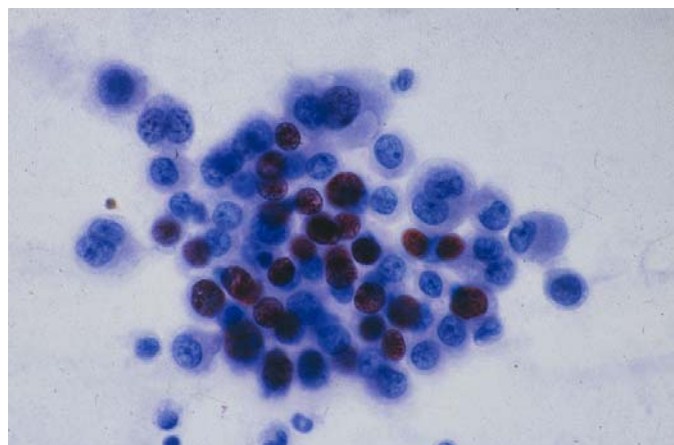


Abb. 5: Ki67/Hämatoxylin gefärbtes Präparat: malignes Mesotheliom

4.1.1.1 Proliferationsfraktion – reaktive Ergüsse

20 Präparate von reaktiven Ergüssen von Pleura, Perikard und Peritoneum, die nicht-neoplastische Mesothelzellen enthielten, standen für die Auswertung zur Verfügung.

In Ergänzung zur Analyse bezüglich der Ki67-Proliferationsfraktion dieser Zellen wurde anhand einer Follow-up-Analyse nachvollzogen, an welcher Grunderkrankung der jeweilige Patient litt und ob ein Tumorleiden in der Anamnese bekannt war.

Dies führte zu folgenden Ergebnissen:

Nr.	Ki67-I (%)	Follow-up	Tumor
1	3,5	Multiple Lebernekrosen unklarer Ätiologie	Nein
2	12,25	Non-Hodgkin-Lymphom	Ja
3	17,51	Cholangio-CA, C2-tox. Leberzirrhose	Ja
4	24	Cervix-CA	Ja
5	7,75	Adenofibrom des Ovars	Nein
6	6,98	Magensarkom, pseudomembranöse Kolitis	Ja
7	14,75	Kleinzelliges Bronchial-CA	Ja
8	6,5	Chron. Rezidivierende Pleuritis, Diab. mell.	Nein
9	9,5	Pankreatitis	Nein
10	25,5	Bronchial-CA	Ja
11	15,5	Lymphom	Ja
12	5,75	Herzinsuffizienz, Leberzirrhose, verstorben	Nein
13	1,8	TVT, Lungenembolie	Nein
14	7	Niereninsuffizienz, Dialyse	Nein
15	22	Rhabdomyosarkom, Rezidiv	Ja
16	16,5	Leberzirrhose bei Hepatitis C, verstorben	Nein
17	5,25	Fettstoffwechselstörung	Nein
18	9	Kleinzelliges, diffuses NHL	Ja
19	2,5	Linksherzinsuffizienz	Nein
20	2,75	Kollagenose	Nein

Tab. 8: Ki67-Index (reaktive Ergüsse) und Grunderkrankung

Gemäß Tabelle 8 ergeben sich Ki67-Proliferationsraten von Mesothelzellen in Ergüssen dieses Patientenkollektivs, in denen keine Tumorzellen nachweisbar waren, von 1,8% bis 25,5%, im Durchschnitt liegt die Proliferationsrate bei 10,8%.

Neun der oben aufgeführten Patienten hatten ein Tumorleiden:

Drei Non Hodgkin Lymphome, ein Cholangiokarziom, ein Zervixkarzinom, ein Magensarkom, ein kleinzelliges Bronchialkarzinom, ein nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom und ein Rhabdomyosarkom.

Bei elf der Patienten war keine maligne Erkrankung festzustellen.

Unterteilt man nun die Patienten in zwei Gruppen anhand der jeweiligen Grunderkrankung so findet man folgende Verteilung:

- Gruppe A: Ergüsse von 11 Patienten mit tumorzellfreien Präparaten *ohne* Tumorleiden in der Anamnese – Proliferationsindex (%): 1,8-16,3
- Gruppe B: Ergüsse von 9 Patienten mit reaktiven tumorzellfreien Präparaten *mit* einem Tumorleiden in der Anamnese – Proliferationsindex (%): 7,0-25,5

Diese Ergebnisse sind in folgender Darstellung zusammengefasst:

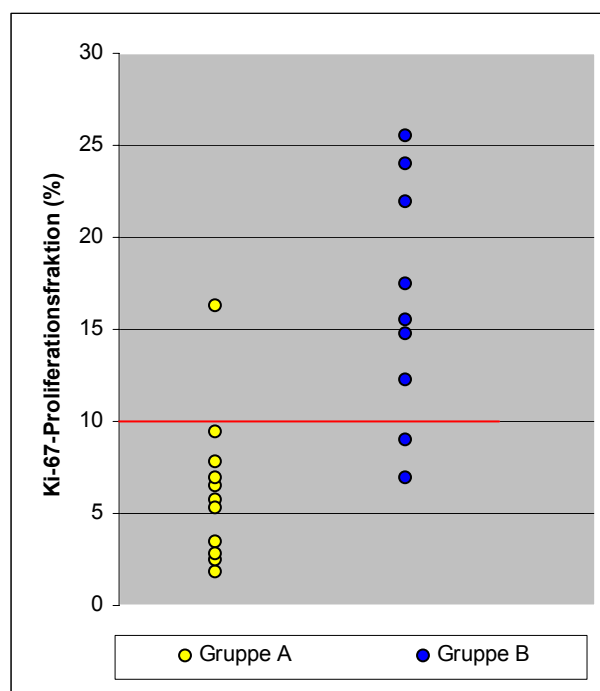


Abb. 6: Ki67-Proliferationsfraktion (%) von Mesothelzellen reaktiver Ergüsse bei Patienten ohne (Gruppe A) und mit (Gruppe B) Tumorleiden

Wie aus dieser Graphik ersichtlich, weisen Mesothelzellen von Patienten ohne Tumorleiden in der Anamnese (Gruppe A) Proliferationsraten von 1,8 bis 16,3% auf, Mesothelzellen von Patienten mit einem Tumorleiden in der Anamnese (Gruppe B) bei tumorzellfreiem Erguss eine Proliferationsrate von 7,0 bis 25,5%.

Der Proliferationsindex von morphologisch normalen Mesothelzellen von Patienten mit einer neoplastischen Erkrankung in der Anamnese ist also signifikant höher ($p=0,001$) als der Proliferationsindex von Mesothelzellen bei Patienten ohne neoplastische Grunderkrankung.

Nimmt man eine Ki67-Proliferationsrate von 10% als kritische Schwelle zur Erkennung von bösartigen Tumoren, so ergibt sich bei quantitativer Auswertung der Proliferationsfraktion eine Sensitivität von 77,8% und eine Spezifität von 90,9% (nach Analyse der Daten mit dem U-Test nach Mann und Whitney) um eine Krebserkrankung an anderer Stelle des Körpers zu erkennen.

4.1.1.2 Proliferationsfraktion – maligne Mesotheliome

Ebenfalls 20 Ergusspräparate, die Zellen des malignen Mesothelioms enthielten, wurden hinsichtlich ihrer Proliferationsraten untersucht.

Bei allen Patienten, deren Ergussmaterial verwendet wurde, ist ein malignes Mesotheliom histologisch gesichert worden. Die Begutachtung erfolgte durch Prof. K. M. Müller (Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannsheil, Universitätsklinik Bochum) und durch andere Pathologische Institute jeweils anhand von Obduktionspräparaten, Biopsien oder Operationspräparaten.

Nr.	Ki67-I (%)	Histologisch gesichert durch
1	49	(Prof. Müller, Universitätsklinikum Bochum)
2	22,41	(OP-Präparat)
3	36,5	(Prof. Müller, Universitätsklinikum Bochum)
4	16,5	(Gewebs-Stanze)
5	22,75	(Prof. Müller, Universitätsklinikum Bochum, PE)
6	22,37	(Prof. Müller, Universitätsklinikum Bochum, PE)
7	34,92	(OP-Präparat)
8	35,5	(Prof. Müller, Universitätsklinikum Bochum)
9	8	(Prof. Müller, Universitätsklinikum Bochum)

10	3,77	(OP-Präparat)
11	6	(Prof. Müller, Universitätsklinikum Bochum)
12	13,25	(Probeexzision)
13	13,88	(Probeexzision)
14	3,5	(OP-Präparat)
15	22,8	(Prof. Müller, Universitätsklinikum Bochum, Obduktion)
16	69,95	(Probeexzision)
17	22,13	(Prof. Müller, Universitätsklinikum Bochum)
18	12,9	(Gewebs-Stanze)
19	16,77	(OP-Präparat)
20	15,44	(Probeexzision)

Tab. 9: Ki67-Index (maligne Mesotheliome) und Follow up

Setzt man die Gruppe der malignen Mesotheliome in Vergleich zur Gruppe der reaktiven Ergüsse, so ergibt sich folgende graphische Darstellung:

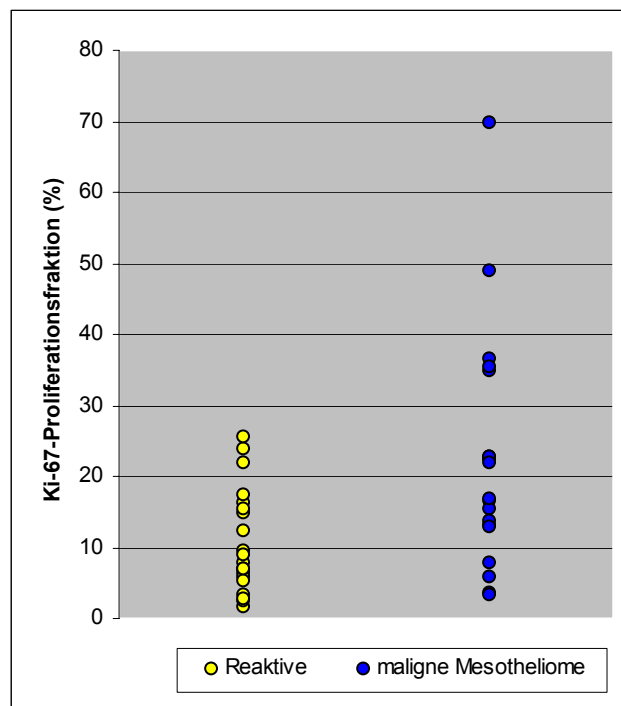


Abb. 7: Proliferationsfraktion (%) von Mesothelzellen reaktiver Ergüsse im Vergleich zu Tumorzellen des malignen Mesothelioms

In der Gruppe der reaktiven Ergüsse fanden sich Proliferationsraten von 1,8% bis 25,5%, in der Gruppe der malignen Mesotheliome Werte von 3,5% bis 69,95%.

Diese beiden Gruppen überlappen besonders im unteren Bereich; es zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied der Proliferationsraten von reaktiven Ergüssen und malignen Mesotheliomen ($p= 0,05$).

Man findet in der Gruppe der reaktiven Ergüsse keine Proliferationsraten größer als 26%, wohingegen in der Gruppe der malignen Mesotheliome Proliferationsraten, die über dieser Schwelle liegen, in 25% der Fälle erreicht werden.

Es ergibt sich also aus diesen Daten eine Spezifität von 100% bei einer Sensitivität von 25% zur Erkennung von malignen Mesotheliomen gegenüber nicht-neoplastischen Ergüssen, setzt man eine Ki67-Proliferationsfraktion von 26% als Grenze.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Proliferationsfraktionen innerhalb der Gruppe der reaktiven Ergüsse bezüglich einer bösartigen Grunderkrankung hochsignifikant unterschiedlich sind.

Anhand dieses Index ist jedoch in der Mehrzahl der Fälle keine Differentialdiagnose zwischen malignen Mesotheliomzellen und normalen Mesothelien zu stellen: Nur 25% der malignen Mesotheliome können auf diese Weise bestätigt werden, dann allerdings mit einer Spezifität von 100%.

4.1.2 DNA-Gehalt bei malignen Mesotheliomen

Wie unter 3.2.2 beschrieben, wurden 20 weitere Präparate der Patienten mit malignem Mesotheliom nach Feulgen gefärbt und bezüglich der DNA-Verteilung ausgewertet.

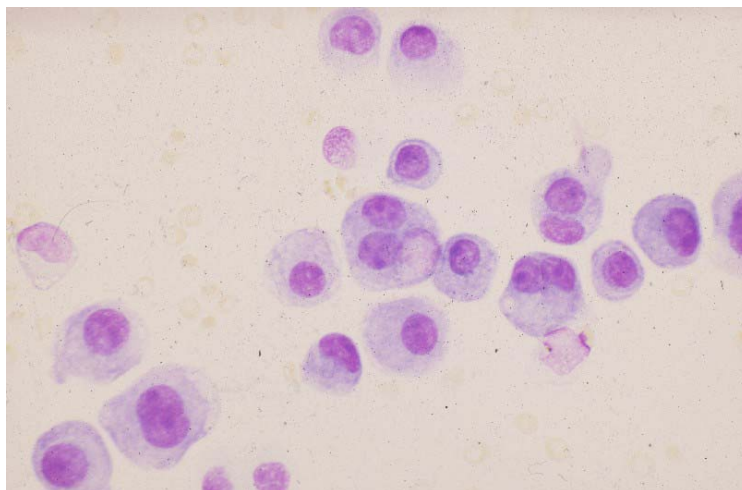


Abb. 8: Pararosanilin-Feulgen gefärbtes Präparat

Nimmt man zur Grundlage, dass Aneuploidie anzunehmen ist beim Nachweis von Zellen mit

1. einer Stammlinie mit einem DNA-Gehalt von $> 1,8c > 2,2c > 3,6c > 4,4c$ und/oder
2. Zellen $> 9c$ (9c exceeding events)

so ergibt sich folgende Verteilung:

Nr.	DANN-Stammlinien bei	Auswertung
1	2c; 4c; $>9c$	Poliploidisierung, Aneuploidie, 9cee
2	2c; 4c; 8c	Euploide Polyploidisierung
3	2,37c; 4,74c; $>9c$	Aneuploide Polyploidisierung, 9cee
4	2,52c; 5c	Aneuploide Polyploidisierung
5	2c; 4c; 8c	Polyploidisierung
6	2c; 4c; 8c	Polyploidisierung
7	1,81c; 3,6c	Aneuploide Polyploidisierung
8	1,83c; 3,66c	Aneuploide Polyploidisierung
9	2,08c	Euploidie
10	2c; 4c	Poliploidisierung
11	2c; 4c	Poliploidisierung
12	2,8c; 5,6c	Aneuploide Polyploidisierung
13	2c; 4c	Polyploidie
14	1,6c; 3,2c	Aneuploide Polyploidisierung
15	2c, 4c, 8c, $>9c$	Aneuploide Polyploidisierung, 9cee
16	1,7c; 3,5c	Aneuploide Polyploidisierung
17	2c, 4c, $>9c$	Aneuploide Polyploidisierung, 9cee
18	3,57; $>9c$	Aneuploidie, 9cee
19	2,03c; 4c	Euploide Polyploidisierung
20	2c;	Euploidie

Tab. 10: DNA-Verteilung bei Tumorzellen des malignen Mesothelioms

Wie zuvor gezeigt, findet man:

- 9 euploid/polyploide Chromosomensätze (45% der Fälle)
- 11 aneuploide Chromosomensätze (55% der Fälle).

Setzt man nun die Ergebnisse der DNA-Zytometrie (euploid/polyploid) in Korrelation mit der Ki67-Proliferationsfraktion, so ergibt sich folgende Darstellung:

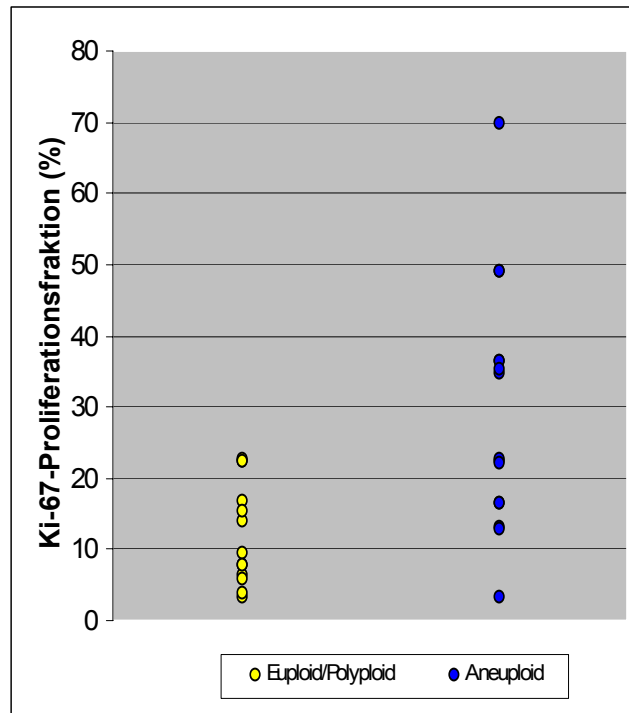


Abb. 9: Proliferationsfraktion (%) in Bezug auf die DNA-Verteilung beim malignen Mesotheliom

In der Gruppe der Mesotheliome mit euploiden/polyploiden Chromosomensätzen fanden sich Proliferationsraten von 3,77% bis 22,75%, in der Gruppe mit den aneuploiden Chromosomensätzen Werte von 3,5% bis 69,95%. Es zeigt sich, dass zwar in beiden Gruppen niedrige Proliferationsraten festzustellen sind, Werte über 22,8% jedoch nur in der Gruppe der Mesotheliome mit aneuploiden Chromosomensätzen (bei 36% der Aneuploiden) zu finden sind.

Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ist allerdings nicht nachzuweisen.

4.1.3 Überlebenszeit beim malignen Mesotheliom

Die Überlebenszeit der Patienten mit malignem Mesotheliom wurde wie folgt ermittelt:

Da der Zeitpunkt der Entstehung der Erkrankung nicht bestimmt werden konnte, wird der Zeitraum von der zytologischen Diagnose bis zum Versterben des Patienten als Überlebenszeitraum definiert. Das Tumorstadium war nur in wenigen Fällen vollständig bestimmt worden. Bei vier Patienten konnte der Todeszeitpunkt nicht ermittelt werden, da sich die jeweiligen Patienten nicht mehr beim behandelnden Hausarzt oder in einem bekannten Krankenhaus vorgestellt hatten. So entstand die folgende Zusammenstellung:

Nr.	Ki67-I (%)	Zytologische Diagnose	Tumorstadium	Verstorben am	Überlebenszeit (Monate)
1	49	25.03.97		04/97	1
2	22,41	28.04.97		05/97	1
3	36,5	14.05.97		07/97	2
4	16,5	06.06.97	IV	02/98	8
5	22,75	22.09.97	IV	n.b.	n.b.
6	22,37	11.09.98	I	04/02	43
7	34,92	12.10.98		n.b.	n.b.
8	35,5	23.11.98		08/99	9
9	8	25.01.99		n.b.	n.b.
10	3,77	19.02.99		09/01	32
11	6	11.03.99		n.b.	n.b.
12	13,25	13.04.99	IV	05/99	1
13	13,88	27.05.99	III	04/00	11
14	3,5	01.06.99		10/01	28
15	22,8	02.02.00		06/00	4
16	69,95	08.02.00		03/00	1
17	22,13	18.02.00		06/00	4
18	12,9	24.02.00		07/00	5
19	16,77	28.04.00	III	05/01	13
20	15,44	28.04.00	III	04/01	12

Tab. 11: Ki67-Index (maligne Mesotheliome) und Überlebenszeit [n.b. = nicht bekannt]

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, lag die Überlebenszeit der Patienten im Schnitt bei 10,9 Monaten. Drei Patienten zeigten deutlich längere Überlebenszeiten als der Durchschnitt: sie überlebten 28, 32 und 43 Monate.

Die Überlebenszeit ist in folgender Graphik in Abhängigkeit von der Ki67-Proliferationsfraktion dargestellt:

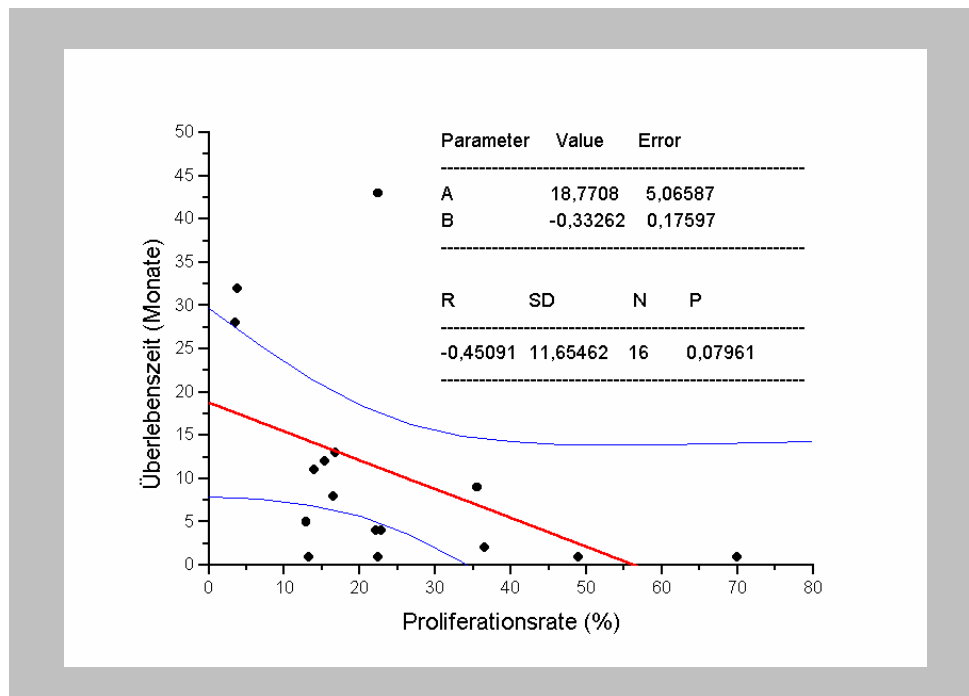


Abb. 10: Proliferationsfraktion (%) in Bezug auf die Überlebenszeit mit Regressionsgeraden (rot) und Konfidenzintervall (blau, 95%) berechnet mit MicroCal Origin®
 A: Achsenabschnitt, B: Steigung der Regressionsgeraden
 R: Korrelationskoeffizient, SD: Standardabweichung
 N: Anzahl der Patienten, P: Wahrscheinlichkeit für R=0

Wie anhand der Regressionsgeraden zu erkennen ist, nimmt die Überlebenszeit mit Abnahme der Proliferationsfraktion zu. Aus den oben genannten Werten ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $-0,45$, eine Signifikanz wurde knapp verfehlt ($p=0.079$).

Bei zwei dieser Patienten ist dies in besonderem Maße erkennbar:

- Überlebenszeit 28 Monate bei einer Proliferationsrate von 3,5%
- Überlebenszeit 32 Monate bei einer Proliferationsrate von 3,77%.

Der dritte langüberlebende Patient (43 Monate) befand sich in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung (Stadium I) und liegt mit der Proliferationsrate von 22,37% im Bereich des Durchschnitts (22,4%).

4.2 Doppelfärbung

Die Doppelfärbung erfolgte an den Ergusspräparaten von 50 Patienten mit Pleura-, Perikard- oder Peritonealkarzinose (3.3).

Die Färbung der Präparate mit der APAAP-Methode gelang, wie unter 4.3.1 beschrieben, problemlos. Die Kerne der proliferierenden Zellen waren deutlich mit dem Farbstoff Chromogen-Red angefärbt; es trat keine unspezifische Hintergrundfärbung auf.

Es zeigte sich jedoch, dass der Farbstoff Chromogen-Red, der das Ki67-Antigen markierte, entgegen vorheriger Annahmen nicht unbegrenzt in Xylol stabil ist, sondern bei längerem Kontakt ausgewaschen wurde. So war bei Lagerung der gefärbten Präparate in Xylol für einen Zeitraum von länger als 24h ein zunehmender Verlust der Ki67-Färbung festzustellen.

Die an die Ki67-Färbung anschließende Thionin-Feulgen-Färbung der DNA war im Vergleich zu Kontrollpräparaten, die nur Thionin-gefärbt waren, signifikant schwächer ausgeprägt. Dies führte zu deutlichen Fehlern bei der DNA-zytometrischen Messung. Auch diverse Änderungen im Färbeablauf (3.3), führten nicht zu einer stärkeren Farbintensität. Mit einer Reihe unterschiedlicher Versuchsanordnungen wurde versucht, dieses Problem zu beheben; wobei jeweils einzelne Schritte in beiden Färbungen angepasst und auf ihre Wirkung hinsichtlich beider Färbeergebnisse untersucht wurden.

So war die Thionin-Färbung weder durch längere Fixation in Formalin an ursprünglicher Stelle im Färbeablauf bzw. vor der Ki67-Färbung, noch durch Veränderung der Hydrolysezeiten oder der Färbezeiten mit dem Thionin-Farbstoff positiv zu beeinflussen.

Die besten Ergebnisse fanden sich beim üblichen Färbeablauf. Die optimale Hydrolysezeit betrug 60 min. Die Verlängerung der Färbezeit bzw. die Verkürzung der Auswaschzeit in Sulfitwasser führte vermehrt zu unspezifischen Hintergrundfärbungen, ohne die Anfärbung der DNA wesentlich zu verbessern, so dass auch hier die im Protokoll beschriebenen Zeiten (3.3) die bestmögliche Alternative darstellten.

Wurde hingegen die Temperatur des Citratpuffers zur Inkubation der Präparate während der Ki67-Färbung verändert, ließen sich bessere Ergebnisse bezüglich der Thionin-Feulgen-Färbung erzielen: Bei Inkubation bei Raumtemperatur gelang dieselbe Qualität der DNA-Färbung wie bei den Kontrollpräparaten; das Ki67-Antigen ließ sich dann jedoch nicht mehr anfärben.

Niedrigere Temperaturen des Citratpuffers oder Verkürzung der Inkubationszeit ergaben zwar bessere Ergebnisse bezüglich der DNA-Färbung, bedingten aber eine schlechtere, bzw. überhaupt keine Anfärbbarkeit des Ki67-Antigens.

Wurden beide Färbungen ohne Zwischenschritte hintereinander durchgeführt, blieben diese Ergebnisse unbeeinflusst.

Eine Umkehr der Färbereihenfolge (zuerst Thionin-Feulgen, dann Ki67) ergab zwar zunächst Präparate mit qualitativ gut angefärbter DNA, im Verlauf der dann folgenden Ki67-Färbung war diese Farbtintensität jedoch nicht zu erhalten.

Eine Doppelfärbung mit qualitativ entsprechend guten Präparaten, wie in den Kontrollen, war hier also nicht möglich.

So ergaben sich bei der computergestützten Auswertung insofern Probleme, als daß das Programm bei der schwächeren Thionin-Färbung der doppelt gefärbten Präparate den DNA-Gehalt der Zellen nicht korrekt bestimmen konnte. Im Gegensatz zu nur Thionin gefärbten Kontrollpräparaten wurden stets zu geringe Werte angegeben.

5. Diskussion

5.1 Einzelfärbung

Wie unter 3.2 bereits beschrieben, wurde im Rahmen der Einzelfärbung an 20 Präparaten reaktiver Ergüsse und an 20 Präparaten von Patienten mit malignem Mesotheliom eine Ki67-Färbung durchgeführt. Bei den Patienten mit malignem Mesotheliom wurde an einem zusätzlichen Präparat eine DNA-Färbung vorgenommen.

Zur Markierung des Ki67-Antigens in den Zellen wurde die ABC-Methode verwendet, da sie die derzeit empfindlichste Methode der Immunfärbung ist [27].

Die unter 3.2.1.1 beschriebene Anfärbung proliferierender Zellkerne ließ sich mit dieser Methode problemlos durchführen. Da das Ki67 Antigen in der G1, S, G2 und M-Phase exprimiert wird [21, 44], wurden so alle proliferierenden Zellen erkannt, egal ob es sich um normale Zellen oder um Tumorzellen handelte [20].

Die rot markierten proliferierenden Zellen wurden ausgezählt und als Verhältnis zur Gesamtzahl der Mesothel-/Mesotheliomzellen die Ki67-Proliferationsfraktion (%) bestimmt.

Mit der Thionin-Feulgen-Färbung (→ 3.2.2) konnte die DNA in den Zellkernen der Tumorzellen beim malignen Mesotheliom spezifisch angefärbt und so die Zellen auf ihren DNA-Gehalt hin überprüft werden.

5.1.1. Proliferationsraten der Mesothelzellen bei tumorzellfreien Ergüssen

Die Ergebnisse der Einzelfärbung ergeben Proliferationsraten von 1,8 bis 25,5% bei Zellen in reaktiven Ergüssen.

Analysiert man die ermittelten Daten im Hinblick auf die Grunderkrankung der Patienten, so zeigt sich erstaunlicherweise ein hochsignifikanter Unterschied zwischen zwei Patientenkollektiven.

So findet sich bei tumorzellfreien Ergüssen von Patienten mit einem malignen Tumor, wie z.B. einem Cholangiokarziom, einem Zervixkarzinom, einem Magensarkom, oder Non Hodgkin Lymphom (Gruppe B) signifikant höhere ($p=0,001$) Proliferationsraten der Mesothelzellen im Erguss als bei Patienten ohne Tumorleiden (Gruppe A).

Hier zeigt sich also deutlich, dass normale Mesothelzellen in Anwesenheit eines Tumors im Körper des Patienten signifikant mehr proliferieren, als Mesothelzellen von Patienten ohne Tumorleiden.

Wie bereits beschrieben im Abschnitt 4.1.1.1 beschrieben, ergaben sich für die untersuchte Patientengruppe folgende Proliferationsraten:

- Nicht-neoplastische Mesothelzellen von Patienten mit tumorzellfreien Ergüssen *ohne* Tumorleiden in der Anamnese zeigen Proliferationsraten von 1,8-16,3%
- Nicht-neoplastische Mesothelzellen von Patienten mit tumorzellfreien Ergüssen *mit* einem Tumorleiden in der Anamnese weisen Proliferationsraten von 7,0-25,5% auf.

Nimmt man als kritische Schwelle zur Erkennung bösartiger Tumore eine Mesothelzell-Proliferationsrate von $>10\%$ an, so erkennt man 77,8% der Tumorpatienten bei einer Spezifität von 90,9%.

In der Gruppe der Patienten ohne Tumorleiden fand sich nur eine Patientin mit einem Wert über der 10%-Grenze, also mit einem Proliferationsindex, der eigentlich einen bösartigen Tumor im Körper des Patienten anzeigen sollte. Bei dieser Patientin liegt die Mesothelzell-Proliferationsrate bei 16,5%.

Im Follow up war festzustellen, dass diese inzwischen bereits verstorbene Patientin an fortgeschrittener Leberzirrhose bei Hepatitis C litt.

Bei Hepatitis C mit Leberzirrhose treten jedoch innerhalb von 10 Jahren bei mindestens 20% der Patienten hepatozelluläre Karzinome auf [45, 55].

Es ist also nicht auszuschließen, dass auch diese Patientin bereits an einem okkulten hepatozellulären Karzinom litt, das sich bereits durch eine deutlich erhöhte Proliferationsrate der Mesothelien bemerkbar gemacht haben könnte.

Die vermehrte Proliferation von nicht-neoplastischen Zellen im Bereich maligner Tumore ist in der Literatur schon beschrieben worden. So zeigen normale Zellen in Anwesenheit von malignen Tumoren ein vermehrtes Wachstum, wie zum Beispiel Epithelzellen in der Nähe maligner Melanome: Hier fiel eine epitheliale Hyperplasie in der Nähe dieser Tumore auf. Die hyperplastischen Epithelzellen waren gut differenziert und zeigten keine Anzeichen für Malignität, bildeten jedoch irreguläre epitheliale Zellstränge [37].

Auch wurden von NICOULATOU-GALITIS et al. im Jahre 2001 paraneoplastische Phänomene festgestellt, wie z.B. eine deutliche Gingivahyperplasie bei Non-

Hodgkin-Lymphom, wobei die Histologie der Gingiva eine entzündliche Hyperplasie ohne maligne Zellen ergab [39].

Bei wenig differenzierten Tumoren vor allem des Ovars und des Uterus zeigten sich diffuse Hyperplasien im Bereich der Uvea beider Augen [11].

KOYAMA et al. stellten im Jahr 1997 bei Patienten mit Magenkarzinom neben hyperplastischer Epidermis in Form einer Akanthosis nigricans eine Hyperplasie des Ösophagusepithels fest. Bei den Zellen des Magenkarzinoms wurden Rezeptoren für TGF-alpha (transforming growth factor alpha) und EGF (epidermal growth factor) nachgewiesen, die Serumspiegel dieser Botenstoffe waren stark erhöht. Auch wurden EGF-Rezeptoren an den hyperplastischen Epidermiszellen nachgewiesen. Da nach chirurgischer Behandlung des Magenkarzinoms sowohl die Serumspiegel von TGF-alpha und EGF sanken, als auch die hyperplastischen Läsionen an Epidermis und Ösophagus zurückgingen, ist zu vermuten, dass diese vom Tumor ausgeschüttete Botenstoffe zu den paraneoplastischen Phänomenen geführt haben. [29].

In der hier durchgeführten Studie fand sich ein ebensolches Phänomen. Gesunde Mesothelzellen von Patienten mit einem malignen Tumor proliferieren signifikant mehr als Mesothelzellen von Patienten ohne Tumor.

Als Ausblick ist zu sagen, dass auf dieser Grundlage Proliferationsraten gesunder Zellen als Suchtest für noch nicht erkannte Tumorleiden an anderer Stelle des Körpers eingesetzt werden könnten.

5.1.2 Proliferationsrate der Zellen des malignen Mesothelioms, DNA-Zytometrie und Prognose

5.1.2.1 Proliferationsrate

Bei den 20 Patienten mit histologisch gesicherten malignen Mesotheliomen zeigten sich Proliferationsraten der Mesotheliomzellen von 3,5 - 69,95%.

Zunächst wurden die Tumorzell-Proliferationsraten bei malignem Mesotheliom mit den zuvor ermittelten Daten der reaktiven Ergüsse (Proliferationsraten von 1,8-25,5%) verglichen. Im Ergebnisteil (→ 4.1.1.2) ist das Verhältnis beider Gruppen graphisch dargestellt.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p=0,05$): Lediglich bei Zellen des malignen Mesothelioms fanden sich Proliferationsraten über 26%, nie aber bei tumorzellfreien Ergüssen.

Allerdings lassen sich auf diesem Wege nur 25% der malignen Mesotheliome abgrenzen, da alle anderen tumorzellhaltigen Ergüsse Proliferationsraten im Bereich der tumorzellfreien Ergüsse aufweisen.

Dieser Marker ist also zur Differentialdiagnose zwischen benignen und malignen mesothelialen Prozessen auf Grund seiner geringen Sensitivität nicht geeignet. Zum Nachweis eines malignen Prozesses können hohe Proliferationsraten ($>26\%$) allerdings mit einer Spezifität von 100% herangezogen werden.

5.1.2.2 DNA-Zytometrie

Die Zellen des malignen Mesothelioms wurden bezüglich ihres DNA-Gehalts untersucht. Dabei fand sich bei 45% der Fälle Euploidie, bei 55% der Fälle Aneuploidie. Dies korreliert mit Ergebnissen von Untersuchungen von MOTHERBY et al., dort weisen 57,1% der malignen Mesotheliome DNA-Aneuploidie auf [43].

Nach Einteilung in zwei Patientengruppen (Aneuploid/Non-Aneuploid), wurden die in Abschnitt 5.1.1.2 aufgeführten Proliferationsraten verglichen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen, jedoch proliferierten auch hier nur Ergüsse mit aneuploiden Zellen zu über 23%, dies ist bei 36% der Aneuploiden der Fall.

5.1.2.3 Prognose

Die Prognose für Patienten, die am malignen Mesotheliom erkrankt sind, ist sehr schlecht. So überleben diese Patienten im Durchschnitt nur 13 Monate ab Stadium I und 1 Monat ab Stadium III [41]. Dies zeigte sich auch in den hier durchgeführten Untersuchungen: Die untersuchten Patienten überlebten im Schnitt 10,9 Monate.

Dem entgegen stehen Berichte über Patienten, die mit dieser Erkrankung durchaus viel länger überlebt haben, als allgemein vermutet [42, 47]. So berichteten SERIO et al. über Überlebenszeiten von 17 und 39 Monaten [46].

In der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen Proliferationsrate und Überlebenszeit von Patienten mit malignem Mesotheliom beschrieben [2, 10, 15, 30]. So fanden etwa BEER et al. einen hochsignifikanten Unterschied ($p=0,001$) bezüglich des Überlebens von Patienten mit hohem oder niedrigem Ki67-Proliferationsfraktionsindex [2].

Dieser Zusammenhang wurde auch hier untersucht. Die Überlebenszeit sei wie folgt definiert: Die gesicherte Überlebenszeit mit malignem Mesotheliom entspricht dem Zeitraum von zytologischer Diagnosestellung bis zum Tod des Patienten. Der sich daraus ergebende Zusammenhang zwischen dem Überlebenszeitraum (in Monaten) und der Ki67-Proliferationsfraktion ist in Abbildung 9 graphisch dargestellt.

Wie anhand der Regressionsgeraden aus dieser Abbildung zu erkennen ist, nimmt die Überlebenszeit mit fallender Proliferationsrate zu. Der Korrelationskoeffizient für diesen Zusammenhang beträgt $-0,45$, eine Signifikanz wurde knapp verfehlt ($p=0.079$).

In der Tat überlebten auch drei der hier untersuchten Patienten deutlich länger als erwartet, bzw. länger als der Durchschnitt des in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektivs, nämlich 28, 32 und 43 Monate. Dabei zeigte sich, dass zwei dieser Patienten eine sehr niedrige Proliferationsfraktion aufwiesen, die bei 3,5 und 3,8% lag. Im Schnitt proliferieren Zellen des malignen Mesothelioms mit 22,4% (\rightarrow 4.1.1.2).

Daher ist in diesen beiden Fällen anzunehmen, dass die lange Überlebenszeit auf die sehr niedrige Proliferationsrate zurückzuführen ist.

Beim dritten Patienten, der überdurchschnittlich lange überlebte, ist trotz der mittleren Proliferationsrate tatsächlich eine bessere Prognose zu erwarten gewesen, als beim Durchschnitt, weil er sich in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung befand (Stadium I). Da seine Überlebenszeit jedoch immer noch erheblich länger war, als die im Stadium I prognostizierten 13 Monate [9], müssen hier zusätzliche Faktoren zu dieser langen Überlebenszeit geführt haben.

Z.B. wurden einige Patienten chirurgisch, einige mit Radiatio und andere mit nur palliativer (z.B. durch Pleurodese) behandelt.

Ein generelles Problem der hier durchgeführten Studie war, dass sich die Patienten in verschiedenen Ausgangssituationen befanden. So ließen sich die Patienten bei

zytologischer Diagnostik in unterschiedliche Stadien einordnen, bei einigen Patienten war das Tumorstadium nicht nachzuvollziehen, bzw. kein Staging erfolgt.

In zukünftigen Studien über den Zusammenhang zwischen Proliferationsrate und Überlebenszeit wäre also zu beachten, dass sich die Patienten möglichst im selben Tumorstadium befinden und eine vergleichbare Therapie erhalten haben sollten.

Da weiter anzunehmen ist, dass Patienten mit malignem Mesotheliom im Endstadium der Erkrankung bei hoher oder auch bei niedriger Proliferationsgeschwindigkeit schnell versterben, wäre es dabei sinnvoll, Patienten auszuwählen, die sich in einem frühen Stadium ihrer Erkrankung befinden, nach Möglichkeit in Stadium I.

Zu diesem Zeitpunkt sollte dann die Proliferationsfraktion des jeweiligen Tumors bestimmt und die Überlebenszeit verfolgt werden.

Im Anschluss könnte daraus ein eindeutiger Zusammenhang der Ki67-Proliferationsfraktion mit der Überlebenszeit der jeweiligen Patienten, ohne den Einfluss der zuvor beschriebenen störenden Faktoren, ermittelt werden.

5.2 Doppelfärbung

Die Doppelfärbung dient zum einen der Darstellung und Quantifizierung der DNA in Zellkernen, zum anderen der Analyse der Proliferationsfraktion. Die DNA wurde mittels Thionin-Feulgen-Färbung spezifisch angefärbt, der Proliferationsmarker Ki67 mit dem APAAP-Kit K 5000 (Dako) und dem Farbstoff Chromogen-Red. Dann sollte die DNA-Bildzytometrie und die Berechnung der Proliferationsfraktion mit einem TV-Bildanalysesystem mit der Software Quick Autocyte Immuno erfolgen.

Vorteil der Doppelfärbung ist, dass beide Färbungen an ein und demselben Objektträger erfolgen. So ist es auch bei geringen Zellzahlen möglich, beide Färbungen durchzuführen. Auf diese Weise gelingt es zu ermitteln, welche der Zellen proliferieren und daraus einen Zusammenhang mit dem jeweiligen DNA-Gehalt der entsprechenden Zellen herzustellen.

Bei der Doppelfärbung nach dem beschriebenen Schema (→ 3.3) traten jedoch erhebliche Probleme auf. So war die im zweiten Schritt stattfindende DNA-Färbung mit dem Farbstoff Thionin deutlich zu schwach. Dadurch ergaben sich bei der Auswertung dieser Färbung beachtliche Abweichungen zu den Messungen eines nur Thionin-Feulgen gefärbten Kontrollpräparats. Es musste daher angenommen werden, dass die Ki67-Färbung am Präparat Veränderungen hervorruft, die zur Folge

haben, dass die Thionin-Feulgen-Färbung schwächer ausfällt als in den Kontrollpräparaten.

Daher wurde der Versuch unternommen, diese Zellveränderungen zu verhindern oder aber die Thionin-Feulgen-Färbung derart zu modifizieren, dass eine ausreichende Anfärbung der DNA zustande kommen kann (→ 3.3).

So wurde zunächst versucht, durch eine verlängerte Fixationsdauer in Formalin die Zellen besser zu stabilisieren, bzw. diese Fixation vor der Ki67-Färbung durchzuführen, in der Hoffnung, den Einfluss der Immunfärbung auf Zellen und DNA zu vermindern. Dieses Vorgehen verbesserte jedoch die Feulgen-Färbung nicht wesentlich.

Da anscheinend im ersten Färbeprotokoll eine Veränderung der Zellkerne und/oder der DNA stattfindet, könnte möglicherweise eine zusätzliche saure Hydrolyse (5 N HCl) der DNA überflüssig bzw. schädlich gewesen sein.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die Hydrolysezeiten nun systematisch verkürzt bzw. die Hydrolyse komplett weggelassen. Allerdings wurde noch eine geringere Anfärbung der DNA beobachtet. In Einzelfällen konnten keine Färbungen mehr nachgewiesen werden.

Da sich als kritischer Punkt dieses Verfahrens eine zu schwache Anfärbung der Zellkerne herausgestellt hatte, wurde die Färbedauer mit dem Thionin-Farbstoff verlängert, bzw. die Auswaschzeit in Sulfitwasser verkürzt, um eine stärkere Anfärbung der DNA zu erhalten. Beide Alternativen führten jedoch nicht zu einer vermehrten Anfärbung der Zellkerne, sondern nur zu vermehrten unspezifischen Hintergrundfärbungen.

Da alle Veränderungen im Färbeablauf der Thionin-Feulgen-Färbung keinen Fortschritt ergaben, musste angenommen werden, dass bestimmte Schritte im Rahmen der Immunfärbung die Zellen derart beeinflussten, dass die Thionin-Färbung auch mit allen oben genannten Veränderungen nicht mehr in der ursprünglichen Qualität durchzuführen war. Wie schon zuvor beschrieben, führte eine intensivierete Zellfixation nicht zum Erfolg.

Also wurde nach dem Schritt in der Ki67-Färbung gesucht, der den entscheidenden Faktor bei der Zell- oder DNA-Veränderung darstellte, indem einzelne Schritte der Ki-67-Färbung weggelassen wurden, während das restliche Protokoll wie üblich durchgeführt wurde.

Dabei stellte sich heraus, dass eine Thionin-Färbung in guter Qualität erfolgte, wenn die Zellen im Rahmen der Ki67-Färbung nicht in Citratpuffer erhitzt worden waren.

Da alle anderen Schritte der Immunfärbung unverändert geblieben waren, kann man schließen, dass diese Reagenzien keinen Einfluss auf die Qualität der Thionin-Feulgen-Färbung haben sollten.

Wurde allerdings dieser Schritt nicht durchgeführt, ergab sich daraus das ungelöste Problem, dass keine Anfärbbarkeit der Kerne mit dem Ki67-Antigen mehr möglich war.

Daher wurde im Anschluss versucht, lediglich die Inkubationszeit im Citratpuffer zu verkürzen, bzw. die Temperatur abzusenken, um einen Kompromiss zu finden, bei dem sowohl eine gute Anfärbung der Kerne mit dem Antikörper MIB-1 als auch eine solche der DNA gelingt. Leider stellte sich heraus, dass jegliche Änderung von Inkubationszeit oder Temperatur eine entscheidende Verschlechterung der Qualität der Ki67-Färbung ergab, wenn auch die gewünschte Verbesserung der DNA-Färbung zu beobachten war. Die Erhitzung der Zellen in Citratpuffer ist also im Rahmen der Immunfärbung unbedingt notwendig, um eine Anfärbung der Zellkerne zu erreichen.

Es ist folglich anzunehmen, dass diese Inkubation bei 80°C entweder Zellen oder DNA so stark schädigt, dass keine gute Anfärbung der DNA mehr erfolgen kann. Eine Ursache für dieses Problem könnte sein, dass die Bindungsstellen der DNA für das Schiff-Reagenz verändert werden könnten; eine andere Möglichkeit besteht darin, dass Bruchteile der DNA aus dem Zellkern diffundieren und gewaschen werden könnten, so dass aus diesem Grund eine deutlich schwächere Anfärbung erfolgen würde.

Zuletzt wurde die Umkehrung der Reihenfolge dieser beiden Färbungen in Betracht gezogen. Wie jedoch befürchtet war, wurde der Thionin-Farbstoff, der jetzt im ersten Schritt die DNA angefärbt hatte, während der Inkubation im Citratpuffer fast vollständig ausgewaschen. So bleibt zusammenfassend festzustellen, dass mit den unter 3.3 aufgeführten Färbeprotokollen eine Immun-Feulgen-Doppelfärbung offenbar nicht möglich ist.

Mit den vorliegenden, z.T. nur sehr schwach gefärbten Präparaten wurde ein Auswertungsversuch unternommen. Dieser erfolgte unter Verwendung der Software Quick Autocyte Immuno. Dabei ergaben weitere Schwierigkeiten:

Die Erkennung der Zellkerne und die Abgrenzung der einzelnen Zellkerne zueinander war oft nicht zuverlässig, insbesondere wenn Zellen sehr dicht beieinander lagen.

Eben diese traubenförmigen Zusammenlagerungen sind aber ein typisches Bild maligner Mesotheliome. So bleibt zu sagen, dass in einem doppelt-gefärbten Präparat die mikroskopische Auszählung der halbautomatischen Auszählung der Proliferationsfraktion mit getrennter DNA-Zytometrie deutlich überlegen ist. Dies gilt insbesondere, da noch zu viele Korrekturen, wie Definierung der Fläche des Zellkerns und Abgrenzung des Kerns von Plasma und anderen Zellen per Hand erfolgen mussten, da die Kernerkenung häufig nicht korrekt stattfand. Auch wurde z.T. die Farbe der Zellkerne (rot/blau) des öfteren falsch erkannt, so dass die Farbe jeweils Neubestimmt werden musste.

Zusammenfassend muss man sagen, dass eine Doppelfärbung mit den verwendeten Methoden nach den beschriebenen Protokollen nicht möglich ist, auch sind die Auswertungsmöglichkeiten mittels der verfügbaren Software noch verbesserbar.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sedimentausstriche von Körperhöhlenergüssen verschiedener Patientengruppen untersucht, um Proliferationsraten von normalen Mesothelzellen und malignen Mesotheliomzellen zu bestimmen und um eine DNA-Bildzytometrie an diesen durchzuführen. Damit sollten Zusammenhänge zwischen Zellteilungsraten und Krankheitsverlauf untersucht werden, und ein Beitrag zur Diagnostik des malignen Mesothelioms geleistet werden.

Proliferationsraten wurden über Anfärbung und Auszählung des proliferationsassoziierten Antigens Ki67 bestimmt, die DNA-Zytometrie wurde im Anschluss an eine Feulgen-Färbung durchgeführt. Dabei wurde Ki67 über den Antikörper MIB-1 mit der ABC-Methode (siehe 3.2.1.1), die DNA mit Pararosanilin nach Feulgen angefärbt (siehe 3.2.2.1). Neben diesen Einzelfärbungen wäre eine Immun-Feulgen-Doppelfärbung insofern von Vorteil, als damit auch bei geringen Zellzahlen beide an denselben Zellen durchgeführt werden könnten.

Um derartige Doppelfärbungen zu erreichen, wurden 50 Ergüsse bei Pleura-, Perikard oder Peritonealkarzinosen zunächst einer Immunfärbung (hier mit der APAAP-Methode, siehe 3.3.1) und dann einer Feulgen-Färbung (mit dem Farbstoff Thionin, siehe 3.3.2) unterzogen. Allerdings fiel die im zweiten Schritt durchgeführte Thionin-Feulgen-Färbung durchweg zu schwach aus. Um dieses Problem zu umgehen, wurden verschiedenste Variationen der Färbetechnik sowie eine Umkehrung der Färbereihenfolge durchgeführt, ohne allerdings zum erhofften Erfolg zu führen.

Es zeigte sich, dass der dafür entscheidende Vorgang das Erhitzen der Zellen in Citratpuffer auf 80°C ist. Da dieser Schritt jedoch für die Immunfärbung unbedingt notwendig war, ist eine Immun-Feulgen-Doppelfärbung an demselben Präparat auf dem hier eingeschlagenen Weg offenbar nicht möglich.

Im Rahmen der oben genannten Einzelfärbung wurden Ergusspräparate von 20 Patienten mit reaktiven tumorzellfreien Ergüssen und von 20 Patienten mit histologisch bestätigten malignen Mesotheliomen zunächst hinsichtlich der Ki67-Proliferationsfraktion unter Anwendung der ABC-Methode untersucht.

Dabei ergab sich, dass Mesothelzellen in reaktiven Ergüssen im Durchschnitt zu 10,8%, maligne Mesotheliomzellen zu 22,4% proliferieren.

Die Auswertung erbrachte in der Gruppe der reaktiven Ergüsse einen bisher nicht beschriebenen, hochsignifikanten ($p=0,001$) Zusammenhang zwischen Proliferationsrate von Mesothelzellen in tumorzellfreien Ergüssen und einem Tumorleiden dieser Patienten an anderer Stelle des Körpers. Bei diesen Tumoren handelte es sich um ein Cholangiokarzinom, ein Zervixkarzinom, ein Magensarkom, drei Non-Hodgkin-Lymphome, ein kleinzelliges Bronchialkarzinom, ein nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom sowie um ein Rhabdomyosarkom.

Bei einer Proliferationsrate der Mesothelzellen $>10\%$ wurden in 77,8% der Patienten ein Tumorleiden identifiziert, bei einer Spezifität von 90,9% (siehe Abb. 5).

Stellt man die Gruppen „reaktive Ergüsse“ und „Ergüsse bei malignem Mesotheliom“ vergleichend gegenüber, so findet sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Ki-67-Proliferationsfraktion ($p=0,05$). Bei Proliferationsraten von $>26\%$ ergibt sich eine Sensitivität von 25% bei einer Spezifität von 100% zur Abgrenzung des malignen Mesothelioms von reaktiven Mesothelproliferationen. Offensichtlich ist dieser Marker nur bei solch hohen Proliferationsraten geeignet einen differentialdiagnostischen Hinweis auf ein malignes Mesotheliom zu geben.

An Zellen in Ergüssen von malignen Mesotheliomen wurden des weiteren die DNA-Verteilungen mittels Pararosanilin-Feulgen-Färbung und DNA-Zytometrie untersucht: Dabei fanden sich in 45% der Fälle euploide DNA-Verteilungen, bei 55% zeigte sich DNA-Aneuploidie. In 9 von 20 Fällen war das für das maligne Mesotheliom typische Muster der Polyploidisierung, z.T. mit Einzelzellaneuploidie (9cEE) zu beobachten.

Die durchschnittliche Lebenserwartung der Patienten mit malignem Mesotheliom betrug in dieser Untersuchung 10,9 Monate. Drei der untersuchten Patienten überlebten allerdings deutlich länger als der Durchschnitt, nämlich 28, 32 und 43 Monate. Es stellte sich heraus, dass eine Korrelation zwischen der Ki67-Proliferationsrate und der Überlebenszeit dieser Patienten bestand (Abb.9) (Korrelationskoeffizient $-0,45$).

Die Einzelbetrachtung der lang überlebenden Patienten zeigte in einem Fall eine mittlere Proliferationsrate. Die beiden anderen Fälle wiesen dagegen eine sehr geringe Proliferationsrate auf, nämlich 3,5% und 3,8%, so dass auch hier diese Beobachtung für einen Zusammenhang zwischen Prognose und Proliferationsrate spricht.

7. Anhang

7.1 Abbildungen und Tabellen

- Abb. 1 Pleuraerguss bei Pleuramesotheliom (TIM, Georg Thieme Verlag)
- Abb. 2 ABC-Methode: Anfärbung des Ki67-Antigens bei Mesothelzellen
- Abb. 3 Messmikroskop mit Monitor und Tastatur des Bildanalysesystems Quick Autocyte für die DNA-Bildzytometrie
- Abb. 4 DNA-Histogramm eines malignen Mesothelioms: Stammlinien bei 2c und 4c sowie 6 Zellen >9c
- Abb. 5 Ki67/Hämatoxylin gefärbtes Präparat: malignes Mesotheliom
- Abb. 6 Ki67-Proliferationsfraktion (%) von Mesothelzellen reaktiver Ergüsse bei Patienten ohne und mit Tumorleiden
- Abb. 7 Proliferationsfraktion (%) von Mesothelzellen reaktiver Ergüsse im Vergleich zu Tumorzellen des malignen Mesothelioms
- Abb. 8 Pararosanilin-Feulgen gefärbtes Präparat
- Abb. 9 Proliferationsfraktion (%) in Bezug auf die DNA-Verteilung beim malignen Mesotheliom
- Abb. 10 Proliferationsfraktion (%) in Bezug auf die Überlebenszeit beim malignen Mesotheliom
-
- Tab. 1 Papanicolaou-Färbung
- Tab. 2 Entfärbung in Alkohol
- Tab. 3 ABC-Färbung
- Tab. 4 Feulgen-Färbung (Pararosanilin) im Färbeautomaten
- Tab. 5 APAAP-Färbung (Teil 1)
- Tab. 6 APAAP-Färbung (Teil 2)
- Tab. 7 Thionin-Feulgen-Färbung
- Tab. 8 Ki67-Index (reaktive Ergüsse) und Grunderkrankung
- Tab. 9 Ki67-Index (maligne Mesotheliome) und Follow up
- Tab. 10 DNA-Verteilung bei Tumorzellen des malignen Mesothelioms
- Tab. 11 Ki67-Index (maligne Mesotheliome) und Überlebenszeit

Ki 67-Index von Ergüssen seröser Körperhöhlen

Univ.-Prof. Dr. A. Böcking
 Heinrich-Heine-Universität
 Institut für Cytopathologie
 z. Hd. Frau Schönherr
 Moorenstrasse 5
 40225 Düsseldorf

follow-up Erfassungsbogen

Patientendaten:	Einsender:
Name: Vorname: Geburtsdatum:	

Untersuchtes zytologisches Material	
Eingangsnummer:	Eingangsdatum:
Material:	Zytologische Diagnose:

Histologische/zytologische Abklärung		
des malignen Mesothelioms:	ja <input type="radio"/>	nein <input type="radio"/>
Art der Gewebeentnahme:	FNA-Biopsie <input type="radio"/>	OP-Präparat <input type="radio"/>
	Stanz-Biopsie <input type="radio"/>	Obduktion <input type="radio"/>
Ergebnis: (möglichst histologischer Tumortyp)		

Klinische Abklärung	
Klinischer Anhalt für ein malignes Mesotheliom:	ja <input type="radio"/> nein <input type="radio"/>
Wie wurde das Mesotheliom diagnostiziert?	
Staging (→ beiliegendes Blatt): pT____ pN____ pM____ Stadium:	

Therapie
Welche Therapiemassnahmen wurden durchgeführt?

Weiterer Krankheitsverlauf

Hausarzt / eventuell weiterbehandelnde Einrichtung

Datum:	
Gezeichnet durch:	

**TNM-Staging des diffusen malignen Mesothelioms der Pleura
(UICC 1997)**

Primärtumor	
T1	Ipsilaterale parietale und/oder viszerale Pleura
T2	Infiltration: Ipsilaterale Lunge, endothorakale Faszien, Zwerchfell, Perikard
T3	Infiltration: Ipsilaterale Brustwandmuskulatur, Rippen, mediastinale Organe oder Gewebe
T4	Direkter Befall der kontralateralen Lunge, Peritoneum, intraabdominelle Organe, Halsgewebe

Lymphknoten	
N0	keine regionären Lymphknoten
N1	Metastase in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen Hiluslymphknoten
N2	Metastase in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen oder Hilus-Lymphknoten, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraclaviculären Lymphknoten

Metastasen	
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Stadium	
I	T1/2, N0, M0
II	T1/2, N1, M0
III	T1/2, N2, M0 oder T3, N0/1/2, M0
IV	jedes T, N3, M0 oder T4, jedes N, M0 oder jedes T, jedes N, M1

Ki 67-Index von Ergüssen seröser Körperhöhlen

Univ.-Prof. Dr. A. Böcking
 Heinrich-Heine-Universität
 Institut für Cytopathologie
 z. Hd. Frau Schönherr
 Moorenstrasse 5
 40225 Düsseldorf

follow-up Erfassungsbogen

Patientendaten:	Einsender:
Name:	
Vorname:	
Geburtsdatum:	

Untersuchtes zytologisches Material	
Eingangsnummer:	Eingangsdatum:
Material:	Zytologische Diagnose:

Histologische / zytologische Abklärung		
der Pleura, des Peritoneums/Perikards	ja <input type="radio"/>	nein <input type="radio"/>
Art der Gewebeentnahme:	FNA-Biopsie <input type="radio"/>	OP-Präparat <input type="radio"/>
	Stanz-Biopsie <input type="radio"/>	Obduktion <input type="radio"/>
Ergebnis		

Klinische Abklärung	
Um welche Grunderkrankung handelt es sich?	

Therapie	
Welche Therapiemassnahmen wurden durchgeführt?	

Weiterer Krankheitsverlauf	

Hausarzt / eventuell weiterbehandelnde Einrichtung	

Datum:	
Gezeichnet durch:	

8. Literatur

- [1] Battifora H, McCaughey WTE: Tumors of serosal membranes. Atlas of Tumor Pathology. Washington, D.C., USA: Armed Forces Institute of Pathology, 1995.
- [2] Beer TW, Buchanan R, Matthews AW, Stradling R, Pullinger N, Pethybridge RJ: Prognosis in malignant mesotheliomas related to MIB-1 proliferation index an histological subtype. Hum Pathol 1998; 29(3): 246-51
- [3] Beutner EH, Holborow EJ, Johnson GD: A new fluorescent antibody method: mixed anti-globulin immunofluorescence or labeled antigen indirect immunofluorescence staining. Nature 1965; 208: 353-355.
- [4] Böcking A, Giroud F, Reith A: Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology task force on standardisation of diagnostic DNA-image cytometry. Anal Cell Pathol 1995; 8: 67-74.
- [5] Böcking A, Motherby H, Pomjanski N: Treffsicherheit der Ergußzytologie samt adjuvanten Untersuchungsmethoden. Dt Ärztebl 2000; 97: 2626–2630
- [6] Böcking A: Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA-Bildzytometrie. Dt Ärztlbl 1998; 12: 658-662
- [7] Böcking A: Biologische Grundlagen und Anforderungen an die Methodik der statischen DNA-Zytometrie. Fortschritt und Fortbildung in der Medizin, 1997/98; 21.
- [8] Böcking A: DNA measurements when and why?. Compendium on Quality Assurance, Proficiency Testing and Workload Limitations in Clinical Cytology, 1995; 170-88.
- [9] Boutin C, Rey F, G Gouvernet J: Malignant Mesothelioma: Prognostic Factors in a Series of 125 Patients Studied from 1973 to 1987. Bulletin de L`Academie Nationale de Medecine 1992; 176 (1): 105-14
- [10] Brozzetti S, D'Andrea N, Limiti MR, Pisanelli MC, De Angelis R, Cavallaro A: Clinical behavior of solitary fibrous tumors of the pleura. An immunohistochemical study. Anticancer Res 2000;20(6C):4701-6

- [11] Chahud F, Young RH, Remulla JF, Khadem JJ, Dryja TP: Bilateral diffuse uveal melanocytic proliferation associated with extraocular cancers: review of a process particularly associated with gynecologic cancers. *Am J Surg Pathol* 2001 Feb;25(2):212-8
- [12] Chatélain R, Schunck T, Schindler EM, Schindler EA, Böcking A: Diagnosis of prospective malignancy in koilocytic dysplasia of the cervix with DNA cytometry. *J Reprod Med* 1989; 34: 505-510.
- [13] 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(3): 211-17
- [14] Clark BR, Todd CW: Avidin as a precipitant for biotin labeled antibody in a radioimmunoassay for carcinoembryonic antigen. *Analyt Biochem* 1982; 121: 257-262.
- [15] Comin CE, Anichini C, Boddi V, Novelli L, Dini S: MIB-1 proliferation index correlates with survival in pleural malignant mesotheliomas. *Histopathology* 2000; 36(1): 26.31
- [16] Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984; 32(2): 219-29
- [17] DAKO: Dako-Kits für immunenzymatische Färbemethoden, Allgemeine Testbeschreibung. 1996
- [18] Dalquen P, Baschiera B, Chaffard R, Dieterich H, Feichter GE, Krämer K, Torhorst J: MIB-1 (Ki-67) immunostaining of breast cancer cells in cytologic smears. *Acta Cytologica* 1997; 41(2): 229-37
- [19] Derenzini M, Nardi F, Farabegoli F, Ottinetti A, Roncaroli F, Bussolati G: Distribution of silver-stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic reactive cells in human effusions. *Acta Cytol* 1989, 33:491-98

- [20] Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. *The Journal of Immunology* 1984; 133(4): 1710-15
- [21] Gerdes J, Li L, Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Klad HD: Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki67. *American Journal of Pathology* 1991, 138(5): 867-73
- [22] Giorno R, Kohler PF: Immunohistological localisation of lymphocyte subsets. *Diagn Immunol* 1983; 1: 17-26.
- [23] Green NM: The use of (C14)biotin for kinetic studies and for assays. *Biochem* 1963; 89: 585-599.
- [24] Haroske G, Dimmer V, Meyer W, Kunze KD: DNA histogram interpretation based on statistical approaches. *Anal Cell Pathol* 1997; 15: 157-1732
- [25] Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A: European Society for Analytical Cellular Pathology consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurements and interpretation. *Anal Cell Pathol* 1998.
- [26] Haska J: *Immunzytologie*. Schattauer 1997: 14-16, 22-24
- [27] Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
- [28] Key G, Becker MHG, Baron B, Duchrow M, Schlüter C, Flad HD, Gerdes J: New Ki67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki67 epitope. *Laboratory Investigation* 1993; 68(6): 629-36
- [29] Koyama S, Ikeda K, Sato M, Shibahara K, Yuhara K, Fukutomi H, Fukunaga K, Kanazawa N, Yuzawa K, Fukao K, Iijima T, Kikuchi M, Tomiya T, Fujiwara K: Transforming growth factor-alpha (TGF alpha)-producing gastric carcinoma with acanthosis nigricans: an endocrine effect of TGF alpha in the pathogenesis of cutaneous paraneoplastic syndrome and epithelial hyperplasia

- of the esophagus. *J Gastroenterol* 1997 Feb;32(1):71-7
- [30] Leonardo E, Zanconati F, Bonifacio D, Bonito LD: Immunohistochemical MIB-1 and p27kip1 as prognostic factors in pleural mesothelioma. *Pathol Res Pract* 2001;197(4):253-256
- [31] Mason DY, Sammons RE: The labeled-antigen method of immunoenzymatic staining. *J Histochem Cytochem* 1979; 27: 832-840.
- [32] Matsumara K, Tsuji T, Shinozaki F, Sasaki K, Takahashi M: Immunohistochemical determination of growth fraction in human tumors. *Path Res Pract* 1989; 184: 609-613.
- [33] Motherby H, Friedrichs N, Kube M, Nadjari B, Knops K, Donner A, Baschiera B, Dalquen P, Böcking A: Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in effusion cytology. II. Diagnostic accuracy in equivocal smears. *Analyt Cell Pathol* 1999; 18: 1–8.
- [34] Motherby H, Kube M, Friedrichs N, Nadjari B, Knops K, Donner A, Baschiera B, Dalquen P, Böcking A: Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in diagnostic effusion cytology I. Prevalence of markers in tumor cell positive and negative smears. *Anal Cell Pathol* 1999; 00: 1-14
- [35] Motherby H, Marcy T, Hecker M, Ross B, Nadjari B, Auer H, Müller KM, Häussinger D, Strauer BE, Böcking A: Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology. I. DNA aneuploidy for identification and differentiation of primary and secondary tumors of the serous membranes. *Anal Quant Cytol Histol* 1998; 20: 153–161.
- [36] Motherby H: Adjuvante Untersuchungsmethoden zur Verbesserung der Treffsicherheit der Ergusszytologie. Medizinische Habilitation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1999.
- [37] Mott RT, Rosenberg A, Livingston S, Morgan MB: Melanoma associated with pseudoepitheliomatous hyperplasia: a case series and investigation into the role of epidermal growth factor receptor. *J Cutan Pathol* 2002; 29(8): 490-497
- [38] Müller KM, Kusmann M: Asbestassoziierte Erkrankungen. *Dt. Ärzteblatt* 1996; 93 (9): 435-439.

- [39] Nicolatou-Galitis O, Papadaki T, Moshovi M, Kamma JJ, van Vliet-Constantinidou C, Tsoumakas C, Kattamis A, Tzortzatos-Stathopoulou F: Gingival overgrowth as the initial paraneoplastic manifestation of Hodgkin's lymphoma in a child. A case report. *J Periodontol* 2001 Jan;72(1):107-12
- [40] Pomjanski N, Motherby H, Buckstegge B, Knops K, Rohn B L, Böcking A: Early Diagnosis of Mesothelioma in Serous Effusions Using AgNOR Analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 2001, 23: 1-10
- [41] Pschyrembel 1994: 1209.
- [42] Raithel HL, Kraus T, Hering KG, Lehnert G: Asbestbedingte Berufskrankheiten. *Dt. Ärzteblatt* 1996; 93 (11): 546-553.
- [43] Sandberg AA The chromosomes in human cancer and leukemia. Elsevier, New York, Amsterdam, Oxford 1990.
- [44] Scholzen T, Gerdes J: The Ki67 protein: from the known to the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182(3): 311-22
- [45] Seeff LB: Natural history of hepatitis C. *Am J Med* 1999 Dec 27;107(6B):108-58
- [46] Selikoff FJ, Hammond EC, Seisman H: Latency of asbestos disease among insulation workers in the United States and Canada. *Cancer* 1980; 46: 2736-2740.
- [47] Serio G, Scattone A, Pennella A, Giardina C, Musti M, Valente T, Pollice L: Malignant deciduoid mesothelioma of the pleura: report of two cases with long survival. *Histopathol* 2002; 40(4): 348-352
- [48] Shepherd NA, Richman PI, England J: Ki67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol* 1988; 155: 213-219.
- [49] Streefkerk JG: Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *J Histochem Cytochem* 1972; 20: 829-831.
- [50] Sybrecht GW (Hrsg.): TIM, Pneumologie. Thieme 2001: 1515

- [51] Verheijlen R, Kuijpers HJH, Schlingemann RO et al.: Ki67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. *J Cell Sci* 1989; 92: 123-130
- [52] Warnke R, Levy R: Detection of T and B-cell antigens with hybridoma, monoclonal antibodies: A biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem* 1980; 28: 771-776.
- [53] Wong CF, Fung SL, Yew WW, Fu KH: A case of malignant pleural mesothelioma with unexpectedly long survival without active treatment. *Respiration* 2002; 69 (2):166-8 *Respiration* 2002;69(2): 166-168
- [54] Yilmaz UM, Urkaner G, Yalniz E, Kumcuoglu Z: Computed tomographic findings of environmental asbestos-related malignant pleural mesothelioma. *Respirology* 1998; 3 (1): 33-38.
- [55] Zarski JP, Cohard M: Hepatitis C. *Rev Prat* 1995 Jan 15;45(2):180-4

Ich danke Herrn Professor Böcking für die interessante Aufgabenstellung sowie für die gute Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung und Veröffentlichung der Arbeit.

Für das Korreferat danke ich Frau Professor Borsch-Galetke.

Des weiteren möchte ich Mary Bayer, die mich in ihrem Labor beherbergt hat, für die Hilfe bei technischen Problemen aller Art sowie den übrigen Mitarbeitern des Instituts für die gute Zusammenarbeit danken.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Freund, der mich immer wieder ermuntert hat, die Ergebnisse in Schriftform zu bringen sowie bei meinen Eltern und meiner Schwester, die die Arbeit nach Rechtschreibfehlern durchforstet und Formulierungen kritisch hinterfragt haben.

Lebenslauf

Alexandra Schönherr

geboren am 01. Juni 1977 in Düsseldorf

Eltern: Dr. Thomas Schönherr, Akademischer Oberrat
Rita Schönherr, geb. Koch, Oberstudienrätin

Geschwister: Gabriele Schönherr, geb. am 23.07.1979

Schulbildung

1983-1987	Gemeinschaftsgrundschule Ricarda-Huch-Strasse in Düsseldorf
1987-1996	Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium in Düsseldorf
1996	Abitur

Medizinstudium

10 / 1996 bis 06 / 2003 an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Berufliche Tätigkeit

seit 09 / 2003 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie (Direktor: Prof. Dr. R. Haas)

Publikationen

06 / 2001	Vortrag im Rahmen der AG Zytopathologie zum Thema der Dissertation auf der 85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Münster
12 / 2003	“Diagnostic and prognostic value of Ki67 proliferation fraction in serous effusions”, Analytical Cellular Pathology (im Druck)

Abstract zur Dissertation von Alexandra Schönherr zum Thema Diagnostische Relevanz des Ki67-Proliferationsfraktionsindex und der DNA-Zytometrie in Ergüssen seröser Körperhöhlen

Das maligne Mesotheliom der Pleura ist immer noch schwer früh zu diagnostizieren und die Prognose für betroffene Patienten erweist sich als schlecht. Das erste klinische Symptom ist häufig ein Pleuraerguss (in 90%), so dass dessen zytologische Untersuchung einen minimalinvasiven frühen Schritt der Diagnostik darstellt. Konventionelle zytologische Methoden konnten bisher Mesotheliomzellen nur in 45% der Ergüsse nachweisen. Werden adjuvante Methoden wie DNA-Zytometrie, AgNOR-Analyse und Immunmarker (BerEP4, Calretinin) benutzt, erzielt man eine Sensitivität und Spezifität von 61% und 99% [5].

Obwohl die mittlere Überlebenszeit bei Patienten mit malignem Mesotheliom zwischen einem und dreizehn Monaten liegt, zeigen Einzelfälle längere Überlebenszeiten von bis zu 10 Jahren. Daher scheint es wichtig, nach prognostischen Parametern in Mesotheliomzellen aus Ergüssen zu suchen. Ziele dieser Arbeit waren die Klärung der Fragen, ob 1. mittels der Ki67-Proliferationsrate reaktive und neoplastische Mesothelzellen aus Körperhöhlenergüssen unterschieden werden können, 2. eine Korrelation zwischen der Proliferationsrate und der Überlebenszeit bei Patienten mit malignem Mesotheliom besteht, 3. sich aus der Proliferationsrate reaktiver Mesothelzellen auf das Vorliegen eines bösartigen Tumors in anderen Körperregionen schließen lässt. Ein weiteres Ziel war es, eine Doppelfärbung zu etablieren, mit der an denselben Zellen sowohl eine Immun- als auch eine DNA-Färbung durchgeführt wird.

Ausgangsmaterial waren Pleura- oder Perikardergüssen bzw. Aszites. Es wurden 20 Ergüsse bei malignem Mesotheliom (A), 20 reaktive Ergüsse (B) und 50 Ergüsse metastatischer Karzinosen der serösen Häute (C) untersucht.

Alle Ausstriche von Ergussedimenten wurden zunächst nach Delaunay fixiert und nach Papanicolaou gefärbt.

An Ergüssen der Gruppen A und B wurde jeweils eine Ki67-Färbung (ABC-Methode) zur Proliferationsfraktionsbestimmung vorgenommen und der DNA-Gehalt zytometrisch bestimmt. An den Ergüssen der Gruppe C wurde eine Doppelfärbung durchgeführt: Ki67-Färbung (APAAP-Methode) zur Proliferationsfraktionsbestimmung und Thionin-Feulgen-Färbung zur DNA-Zytometrie. Bei der Doppelfärbung der Ergüsse der Gruppe C fiel die Thionin-Feulgen-Färbung der DNA zu schwach aus. Verschiedenste Variationen im Färbeablauf führten nicht zu einer optimalen Färbequalität. Der dafür entscheidende Vorgang schien das Erhitzen der Zellen in Zitratpuffer auf 80°C zu sein, so dass eine Doppelfärbung auf dem hier eingeschlagenen Weg nicht möglich erscheint.

An den Ergüssen der Gruppen A und B zeigte sich, dass Mesothelzellen in reaktiven Ergüssen im Durchschnitt eine Ki67-Proliferationsrate von 10,8%, maligne Mesotheliomzellen von 22,4% aufwiesen. Stellt man die Gruppen „reaktive Ergüsse“ und „Ergüsse beim malignen Mesotheliom“ vergleichend gegenüber, so findet sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Proliferationsraten ($p=0,05$). Dieser Marker eignet sich jedoch aufgrund der geringen Sensitivität (Ki67-Index $>26\%$: Sens. 25%, Spez. 100%) nicht für die Routinediagnostik.

Untersuchte man Zellen des malignen Mesothelioms, so fanden sich DNA-zytometrisch in 45% der Fälle euploide DNA-Verteilungen, in 55% zeigte sich DNA-Aneuploidie. In 9 von 20 Fällen war das Mesotheliom-typische Muster der Polyploidisierung (2c-4c-(8c)) zu finden, zum Teil mit Einzelzellaneuploidie (9cEE).

Die durchschnittliche Lebenserwartung der Patienten mit malignem Mesotheliom betrug 10,9 Monate, drei Patienten überlebten deutlich länger als der Durchschnitt: 28, 32 und 43 Monate. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen Ki67-Proliferationsrate und Überlebenszeit (Korrelationskoeffizient $-0,45$), wobei Signifikanz knapp verfehlt wurde ($p=0,079$). Zwei der drei lang überlebenden Patienten wiesen zudem sehr niedrige Proliferationsraten von 3,5% und 3,8% auf. Um diesen Zusammenhang weiter zu sichern, sollten in zukünftigen Studien Patienten möglichst im gleichen Tumorstadium mit ähnlicher Therapie hinsichtlich einer Beziehung zwischen Ki67-Proliferationsrate und Überlebenszeit untersucht werden.

In der Gruppe der reaktiven Ergüsse zeigte sich ein hochsignifikanter ($p=0,001$) Zusammenhang zwischen hoher Proliferationsrate von Mesothelzellen in tumorzellfreien Ergüssen und einem malignen Tumor dieser Patienten an anderer Stelle des Körpers. Bei einer Proliferationsrate $>10\%$ wurden 77,8% der Patienten mit einem Tumorleiden identifiziert, bei einer Spezifität von 90,9%. Die erhöhten Proliferationsraten der Mesothelzellen in Anwesenheit eines malignen Tumors können als ein paraneoplastisches Phänomen gewertet werden, das möglicherweise in Zukunft einen Hinweis auf ein CUP-Syndrom (cancer of unknown primary) geben könnte.