

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

**Verbesserung der Treffsicherheit
der Ergusszytologie
mittels AgNOR-Analyse
als adjuvante Untersuchungsmethode**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Zahnmedizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Brinja-Lara Rohn
2004

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

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

Referent: Prof. Dr. Böcking

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. Borsch-Galetke

Meinem Mann Gerhard
und
meinen Kindern Paul und Neele

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Klinik.....	3
1.2	Ätiologie.....	3
1.3	Kausale Pathogenese	7
1.4	Nukleolus Organisierende Regionen.....	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Material: Patientengut	11
2.2	Methoden: Routinefärbungen der Ergusszytologie.....	12
2.3	Präparations- und Färbetechnik.....	13
2.4	Auswertung der Silbernitrat-gefärbten Präparate.....	14
3	Ergebnisse.....	15
3.1	Treffsicherheit der konventionellen Ergusszytologie	15
3.2	Treffsicherheit der Ergusszytologie unter Anwendung der AgNOR-Analyse als adjuvante Methode	20
4	Diskussion.....	28
4.1	Konventionelle ergusszytologische Routinediagnostik	28
4.2	Ergusszytologie in der Routinediagnostik unter Anwendung adjuvanter Methoden.....	30
4.3	Nukleolus Organisierende Regionen (AgNORs)	30
5	Zusammenfassung	34
6	Literaturverzeichnis	35

1 Einleitung

1.1 Klinik

Unter einem Erguss seröser Körperhöhlen versteht man eine krankhafte Vermehrung der Flüssigkeitsmenge in der Pleura-, Peritoneal- oder Perikardhöhle. Es sind mehr als 50 verschiedene Erkrankungen bekannt, welche mit Ergüssen seröser Körperhöhlen einhergehen. Bis zu 45 % aller Ergüsse enthalten Tumorzellen, und in 45 % aller „malignen“ Ergüsse liefert die Zytodiagnostik den ersten Hinweis auf einen Primärtumor (Bedrossian, 1994). Bei Patienten mit bekannter maligner Erkrankung trägt die Ergusszytologie zum Tumor-Staging bei und beeinflusst dadurch die Therapie. Der treffsicheren zytologischen Abklärung eines Ergusses kommt daher eine große klinische Bedeutung zu.

1.2 Ätiologie

Es kommen verschiedene Ursachen für die Entstehung von Ergüssen in Frage. Man unterscheidet nach tumorösen, entzündlich, hydrostatisch und systemisch bedingten Ursachen. Pleuraergüsse werden unter den Ergüssen der serösen Häute am häufigsten zur diagnostischen Abklärung in zytologische Laboratorien eingesandt. Hausheer und Yarbrow (1985) zeigten, dass die Häufigkeit des Auftretens mit 45 % bei den Neoplasien, mit 22 % bei infektiösen Ursachen und mit 12 % bei Herzinsuffizienzen liegt (Tabelle 1). Pleuraergüsse weisen am häufigsten maligne Zellen durch die Metastasierung eines Lungenkarzinoms bei Männern und des Mammakarzinoms bei Frauen auf.

Aszites kommen nicht so häufig in zytologischen Untersuchungen vor, weil das klinische Bild einer Leberzirrhose oder eines Herzinfarkts, welche die häufigsten Ursachen für einen Aszites sind, meist zu einer eindeutigen Diagnose führt und keiner zytologischen Abklärung mehr bedarf (Tabelle 2). Zu einer zytologischen Untersuchung kommt es bei durch maligne Ergüsse hervorgerufenem Aszites (Bedrossian). Bei Männern stammen die malignen Zellen meist aus Metastasen des Gastrointestinaltrakts und bei Frauen aus Ovariarkarzinomen.

Ergüsse, die durch perikardiale Erkrankungen verursacht werden, liegen bei 1 % der in einem zytologischen Routinelabor eingesandten serösen Ergüsse. Davon haben ungefähr die Hälfte einen malignen Ursprung (Tabelle 3). Weitere Ursachen sind Herzinfarkte, Perikarditiden oder Myokarditiden (Bedrossian, 1994).

Pleuraergüsse	Häufigkeiten
Maligne Tumore Metastasierende Karzinome Männer: Lungenkarzinome Frauen: Mammakarzinome Metastasierende Sarkome Maligne Mesotheliome Maligne Lymphome	45 %
Herzinsuffizienz Rechtsherzinsuffizienz Linksherzinsuffizienz	12 %
Infektiös (Pneumonie, Pleuritis) Tuberkulose 10 % Bakteriell 9 % Viral 1 % Fungal < 1 % Empyem 1 % Parasitär < 1 %	22 %
Unbestimmt	10 %
Lungeninfarkt oder -embolie	3 %
Leberzirrhose	2 %
Kollagenosen	1 %
Andere Niereninsuffizienzen Rheumatoide Erkrankungen Traumata Asbestosen Pankreatitiden	5 %

Tabelle 1: Ätiologie der Pleuraergüsse (in absteigender Häufigkeit) (Hausheer und Yarbro, 1985)

Aszites
Leberzirrhose
Rechtsherzinsuffizienz
Maligne Tumore <ul style="list-style-type: none"> Metastasierende Karzinome <ul style="list-style-type: none"> Männer: Dickdarm- und Magenkarzinome Frauen: Ovarialkarzinome Metastasierende Sarkome Maligne Mesotheliome Maligne Lymphome
Gutartige Tumoren des Ovars
Pankreatitis
Peritonitis
Niereninsuffizienz mit nephrotischem Syndrom

Tabelle 2: Ätiologie des Aszites (in absteigender Häufigkeit) (Bedrossian, 1994)

Perikardergüsse
Maligne Tumore Metastasierende Karzinome Männer: Lungenkarzinome Frauen: Mammakarzinome Metastasierende Sarkome Maligne Mesotheliome Maligne Lymphome
Herzinfarkt
Perkarditis Bakteriell Viral Tuberkulös Fungal
Myokarditis

Tabelle 3: Ätiologie der Perikardergüsse (in absteigender Häufigkeit) (Bedrossian, 1994)

1.3 Kausale Pathogenese

Die häufigsten Mechanismen der Entstehung von Körperhöhlenergüssen sind die Änderung des hydrostatischen und des onkotischen Drucks, der Kapillarpermeabilität sowie der interzellulären Kohärenz, die Behinderung des Lymphabflusses sowie eine Natrium-Wasser-Retention. Im Thorax führt auch eine Abnahme des intrapleurales Drucks sowie eine Dissoziation von Pleura visceralis und parietalis beim Pneumothorax zu serösen Ergüssen. Außerdem kann es beim Meigs-Syndrom zu einem Übertritt von Aszites in die Pleurahöhle durch Lymphgefäße kommen (Classen, 1994).

Die Flüssigkeit des Pleuraergusses kann je nach Ursache eiweißarm (Transsudat < 30 g Eiweiß/l) oder eiweißreich (Exsudat > 30 g Eiweiß/l) sein. Steigt der intrakapilläre Druck an (z.B. bei einer Herzinsuffizienz) oder nimmt der onkotische Druck in den Kapillaren ab (z.B. durch Hypoproteinämie bei nephrotischem Syndrom oder Leberinsuffizienz), bei gleichzeitiger Abnahme des intrapleurales Drucks (z.B. bei totaler Atelektase eines Lungenlappens), so entsteht bei Pleuraergüssen ein Transsudat. Zu einem Exsudat führt eine vermehrte Kapillarpermeabilität für Flüssigkeit und Eiweiß (z.B. bei parapneumonischer Pleuritis). Sowohl Transsudate als auch Exsudate können bei Pleuraergüssen durch Verlegung der mediastinalen Lymphbahnen (z.B. durch Behinderung der Lymphdrainage durch Tumorzellen) oder durch Übertritt von Flüssigkeiten aus der Peritonealhöhle entstehen.

Die Pathogenese des Aszites bei Lebererkrankungen ist ein multifaktorielles Geschehen, welches bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Classen, 1994). Ursächlich muss ein Ungleichgewicht bei den Starling-Kräften durch eine Erhöhung des hydrostatischen Druckgradienten bei portaler Hypertension und durch eine Erniedrigung des onkotischen Gradienten durch einen reduzierten Proteingehalt des Bluts (Hypalbuminämie) und eine verstärkte Kapillarpermeabilität sein. Von weiterer Bedeutung ist eine vermehrte Lymphproduktion, die die Transportkapazität der hepatischen Lymphgefäße übersteigt. Weiterhin gibt es neben diesen lokalen Faktoren zwei systemische Faktoren für die Pathogenese. Eine gesteigerte renale Retention von Natriumionen und die mit ihr aufgrund der osmotischen Verhältnisse zwangsläufig verbundene Retention des Wassers. So tritt ein Circulus vitiosus in Gang: Der erhöhte transhepatische Flusswiderstand verursacht über Vermittlung des Sympathikus eine vermehrte Natriumrückresorption im Bereich der proximalen Tubuli und damit auch eine Flüssigkeitsretention. Das so ausgedehnte effektive Plasmavolumen wird dann aufgrund der gestörten Balance der Starling-Kräfte in die freie Bauchhöhle abgepresst. Ist einmal Flüssigkeit im Abdomen, führt dies wiederum zu einem verminderten effektiven Plasmavolumen, welches zur Stimulation des Renin-Angiotensin-

Aldosteron Systems und schließlich zur vermehrten Natriumrückresorption führt. Die Pathogenese des Aszites bei Entzündungen wird durch eine Permeabilitätsstörung der splanchnischen Kapillaren mit Ausbildung eines proteinreichen Exsudates beschrieben. Bei malignen Aszites im Rahmen einer Peritonealkarzinose besteht der entscheidende Pathomechanismus in der Verlegung des Lymphabflusses durch Tumorzellen.

Ergüsse werden zu therapeutischen und/oder diagnostischen Zwecken punktiert. Diese wenig invasive Maßnahme ist ambulant durchführbar. Darüber hinaus können während chirurgischer Eingriffe aus serösen Höhlen spontan entstandene Flüssigkeiten oder durch Lavagen gewonnene aspiriert werden, vor allem bei Second-Look-Operationen nach Tumorresektionen (Ziselmann et al., 1984). Auch aus Drainagen gewonnene Flüssigkeiten können zytologisch untersucht werden. Die Punktion sollte am tiefsten Punkt der Höhle (abhängig von der Lage des Patienten) erfolgen, da die diagnostisch relevanten Zellen dorthin sedimentieren. Weil die zytologische Treffsicherheit von der Menge des zu untersuchenden Materials abhängt (Motherby et al., 1999), ist es ratsam, möglichst größere Volumina oder mehrere Proben einzusenden, mindestens jedoch 50-100 ml soweit vorhanden. Der Versand in ein zytodiagnostisch spezialisiertes Institut sollte nativ in sterilen, bruchsicheren und dicht schließenden Gefäßen erfolgen. Die diagnostisch relevanten Zellen überstehen in der eiweißreichen Ergussflüssigkeit eine zwei- bis dreitägige Reise ohne morphologisch oder immunologisch Schaden zu nehmen. Im Labor werden vom Sediment Ausstriche hergestellt. Befinden sich Gewebspartikel oder Präzipitate im Erguss, so werden hiervon gefärbte Schnitte angefertigt.

Wichtig für eine treffsichere zytologische Diagnostik ist die Mitteilung wesentlicher klinischer Befunde und der diagnostischen Fragestellung durch den Kliniker. So sollten zugrundeliegende Erkrankungen (z.B. Herzinsuffizienz, portale Stauungen, Entzündungen, Primärtumor) und vor allem therapeutische Maßnahmen, wie Chemo- oder Strahlentherapie unbedingt mitgeteilt werden. Dann können neben zytologischen und zytometrischen Untersuchungen, je nach Fragestellung, weitere biochemische, mikrobiologische und immunologische Untersuchungen in Frage kommen.

1.4 Nukleolus Organisierende Regionen

Als „Nukleolus Organisierende Regionen“ (NORs) werden Chromosomenabschnitte bezeichnet, auf denen die ribosomalen Gene (rDNA) gelegen sind. NORs (rDNA) sind Schaltstellen der Regulation der Proteinbiosynthese (Rüschhoff J, 1992). Sie können durch Silbernitrat als braunschwarze Punkte in Zellkernen dargestellt werden und werden deshalb als AgNORs bezeichnet. Die AgNOR-Reaktion ist an Proteine gebunden, die mit aktivierten NOR-Genen assoziiert sind und so die Aktivität bzw. Proliferationspotenz einer Zelle auf molekularer Ebene anzeigen. Die biologische Bedeutung von NORs als zentrale Schaltstelle für die gesamte zelluläre Proteinbiosynthese einer Zelle konnte in den letzten Jahren mit Hilfe molekulargenetischer Techniken aufgezeigt werden (Lewin, 1987). Auf die Frage nach dem Mechanismus, der einem erhöhten AgNOR-Gehalt im Interphasekern produzierender Zellen zugrunde liegt geben andere Arbeiten hinweise (Derenzini et al., 1989, 1990a, 1990b). Letztendlich hat sich gezeigt, dass AgNOR-Zahl und -Fläche auf Chromosomen mit dem im Interphasekern ermittelten Werten allenfalls nur locker korrelieren. Drei Mechanismen ließen sich abgrenzen, die zur quantitativen Variabilität der AgNORs im Interphasekern führen:

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

Die Anzahl der sichtbaren AgNORs korrespondiert mit der Zyklusphase (Bigras et al., 1996; Zoeller, 1994). Eine normale Zelle zeigt je nach Zyklusphase ein (S-Phase), drei (G1) oder bis zu sieben (G2) AgNORs. Die höchste Anzahl der AgNORs ist unmittelbar vor und nach der Mitose zu finden (Zoeller, 1994). AgNORs stellen sich überwiegend als Substrukturen in den Nukleolen der Interphasekerne dar. Als wesentliche Kriterien zur Erfassung der Proliferationstendenz einer Zelle bzw. eines Tumors hat sich nicht nur die AgNOR-Zahl, sondern auch deren Größe, Farbtintensität und die Verteilung der Silberniederschläge in Zellen herausgestellt. Am histologischen Schnitt ist daher der Quotient aus AgNOR-Zahl und AgNOR-Fläche ein besonders sensibler diagnostischer Parameter zur Erfassung der Proliferationstendenz eines Gewebes.

An zytologischen Ausstrichen ist die Bestimmung der Gesamt-AgNOR-Fläche im Zellkern der einfachen Auszählung einzelner AgNOR-Partikel angeblich überlegen (Rüschhoff, 1992).

Erste Arbeiten weisen auf die Anwendbarkeit der AgNOR-Technik an Ergüssen seröser Körperhöhlen hin. Derenzini et al. (1989) fanden an 105 Ergüssen eine gute Trennung zwischen normalen und reaktiv entzündlich veränderten Mesothelzellen (10 Fälle) einerseits sowie von metastatischen Karzinomen (85 Fälle) und Mesotheliomzellen (10 Fälle) andererseits. Carrillo et al. (1994) korrelierten an 38 Fällen AgNOR-Ergebnisse mit der konventionellen Zytologie und der DNA-Flow-Zytometrie. Während sich zwar tendenziell höhere AgNOR-Zahlen pro Zellkern in malignen Zellen zeigten, gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den AgNOR-Zahlen in benignen und malignen Ergüssen. Weiterhin fand sich keine statistische Korrelation zwischen AgNOR-Zahlen und DNA-Ploidie-Status. Huang et al. (1994) berichten in Zellen in Pleuraergüssen über höhere AgNOR-Zahlen in malignen als in benignen Zellen und höhere in aneuploiden als in diploiden malignen Zellen. Weiterhin berichten sie in malignen Ergüssen über eine signifikante Korrelation zwischen S-Phase Fraktion bestimmt durch DNA-Flow-Zytometrie und dem Durchschnitt der AgNOR-Zahl pro Nukleus.

Mittels der AgNOR-Reaktion werden unter anderem die Proteinsynthese- und Proliferationsaktivität einer Zelle auf molekularer Ebene angezeigt. Chromosonale Aneuploidie und rDNA-Amplifizierung können ebenfalls zu einer NOR-Vermehrung und Vergrößerung führen. Zur diagnostischen Auswertung wird die Zahl (gegebenenfalls auch die Fläche) von einzelnen Verbänden liegenden AgNORs in 100 Zellkernen gezählt oder mittels TV-Bildanalyse ermittelt. Die AgNOR-Analyse eignet sich sehr gut zur Identifizierung weniger neoplastischer Zellen in Ergussedimenten, hierbei speziell zur Abgrenzung einer reaktiven Mesothelhyperplasie von einem malignen Mesotheliom.

In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, durch die Modifikation der AgNOR-Untersuchungstechnik die Unterscheidung zwischen reaktiven und neoplastischen Zellen aus serösen Ergüssen verschiedener Körperhöhlen in der Routinediagnostik zu ermöglichen, hierbei insbesondere zur zytologischen Diagnose maligner Mesotheliome.

2 Material und Methoden

2.1 Material: Patientengut

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Eignung der AgNOR-Quantifizierung zur Differenzierung reaktiver von neoplastischen Zellproliferationen, insbesondere Mesothelproliferationen.

Gegenstand dieser Arbeit waren 132 Ergüsse (Aszites (25), Pleura- (103) und Perikardergüsse (4)) der serösen Häute mit Tumorzell-positiven (65), Tumorzell-negativen (30) und zytologisch unklarer Diagnosen (37: dringend verdächtig (17), zweifelhaft (20)). Entsprechend der Patienten-Follow-Ups ließen sich die Ergüsse in drei Gruppen einteilen: Patienten mit malignem Mesotheliomen (51), solche mit Karzinosen (41) (Karzinom der Lunge (20), des Magens (5), des Pankreas(1), der Brust (5), des Ovars (6), unbekannter Primärtumor (CUP) (1) sowie eines Melanoms (1)) und solche mit reaktiven Ergüssen (40) (Herzinsuffizienz (8), Pleuritis (3), Leberzirrhose (4), posttherapeutisch: Bestrahlung (1) und Chemotherapie (1), zystischer Adnextumor (2), Karzinom der Lunge (5), unbekannter Primärtumor (CUP) (1), Lymphome/Leukämie (2), Magen-sarkom (2), Peritonitis (5), Pneumonie (3) und Lungenembolien (3)). Die Patientenpopulationen stammen aus der Universitätsklinik Düsseldorf sowie aus Krankenhäusern der Umgebung und wurden im Zeitraum von 1997-2000 am Institut für Cytopathologie der Medizinischen Einrichtung der Heinrich-Heine Universität routinemäßig untersucht.

Bei allen Patienten wurde die Diagnose entweder histologisch, speziell bei allen Mesotheliomen, oder durch klinische Follow-Ups, bei Karzinomen, gesichert und bestätigt. Die Proben enthielten 51 Ergüsse pleuraler und peritonealer Genese von Patienten mit gesicherten Mesotheliomen, 41 Ergüsse pleuraler, peritonealer und perikardialer Genese von Patienten mit gesicherten Karzinomen und 40 Ergüsse pleuraler und peritonealer Genese von Patienten mit reaktiven Mesothelien. Die ursprünglichen zytologischen Diagnosen der Mesotheliome und Karzinome waren entweder zweifelhaft, verdächtig oder positiv mit Tumorzellen.

2.2 Methoden: Routinefärbungen der Ergusszytologie

Es stehen verschiedene Aufarbeitungsmethoden, um Zellen in Ergüssen zu konzentrieren, zur Verfügung. Die am häufigsten verwendeten sind

- die Zentrifugation, gefolgt von einer Ausstrichpräparation des Sediments,
- die Zytozentrifugation des Ergusses direkt auf Objektträgern mittels Zytozentrifugen bei geringen Ergussvolumina oder klaren Transsudaten, bei denen eine geringe Zellzahl zu erwarten ist und
- die Zellblocktechnik, bei der das gesamte Zellpellet nach Zentrifugation fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend wie Gewebe geschnitten wird.

Im Institut für Cytopathologie an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf wird die erstgenannte Methode zur Zentrifugation und Ausstrichpräparation an allen eingesandten Ergüssen durchgeführt. Sollten darüber hinaus noch größere Partikel im Erguss vorhanden sein, wird zusätzlich daran die Zellblocktechnik durchgeführt.

Die zwei in der diagnostischen Ergusszytologie am häufigsten angewandten Färbemethoden sind nach Papanicolaou (Pap.-) und die May-Grünwald-Giemsa-Färbung (MGG). Der Papanicolaou-Färbung muss ein alkoholisches Fixativ, der May-Grünwald-Giemsa-Färbung eine Lufttrocknung vorausgehen. Variationen der MGG-Färbung sind nach Romanowsky, nach Wright, nach Giemsa und die Diff-Quic-Färbung der Firma Merck (Darmstadt).

Der Unterschied, der nach Pap.- und nach MGG gefärbten Zellen liegt darin, dass die Zellen nach der Papanicolaou-Färbung ihre Kernchromatindetails und Zytoplasmastrukturen (z.B. strähnig-wabig bei Plattenepithelien) sehr gut darstellen. Während die Zellen nach MGG-Färbung durch die Lufttrocknung größer als nach Alkoholfixation bleiben.

Luftgetrocknete MGG-gefärbte Präparate eignen sich nach der Routinediagnostik insbesondere für die DNA-Zytometrie (nach Entdeckelung und Umfärbung nach Feulgen) und für eine AgNOR-Analyse (nach Entdeckelung und Silberfärbung). Nach Delauney fixierte und nach Papanicolaou gefärbte Präparate eignen sich nach Routinediagnostik vor allem für eine immunzytochemische Untersuchung (Entdeckelung und anschließende Färbung nach der Avidin-Biotin-Complex-Methode).

Jede der Proben enthielten etwa 10-100 ml des Ergusses. Die Ergussflüssigkeit wurde mit 340 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Es wurden je acht Präparate pro einer Probe durch das Pipettieren je eines Tropfens des Sediments, durch etwas Flüssigkeit aufgeschwemmt, auf vier Objektträger hergestellt. Der erste Objektträger wurde mit je einem zweiten bedeckt. Danach wurden sie gegeneinander ausgestrichen, so dass man je zwei Präparate erhielt. Drei der Objektträger wurden luftgetrocknet und nach May-Grünwald-Giemsa (MGG=Färbung nach Pappenheim) gefärbt. Die übrigen fünf Objektträger wurden sofort in Delauney-Lösung fixiert und nach Papanicolaou (Pap.-) gefärbt.

2.3 Präparations- und Färbetechnik

Für die AgNOR-Färbung wurden die luftgetrockneten und nach MGG gefärbten Proben verwendet. Zum Vergleich wurden auch andere Fixierungen und Färbungen versucht, an denen jedoch die AgNOR-Färbung keine guten Ergebnisse aufwies. Die Silberfärbung wurde entsprechend der One-Step-Methode von Ploton et al. (1986), Crocker et al. (1989) und Rüschoff et al. (1992) mit einigen Modifikationen durchgeführt. Nach zytologischer Evaluierung wurden die Deckgläser mit Xylol entfernt. Die entdeckelten Präparate kamen zunächst in eine absteigende Alkoholreihe. Danach wurden sie für 10 min in 4 % gepuffertem Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden sie für 10-15 min in Leitungswasser gewässert. Es folgte eine Inkubation in einer Silbernitrat-Gelatine-Ameisensäure-Lösung (Merck, Darmstadt) für 25-35 min in einer abgedunkelten feuchten Kammer. Danach wurden sie erneut für 10 min in Leitungswasser gewässert, dann in 10 % Na-Thiosulfat für 10 min inkubiert, um sie dann nochmals für 10 min in Leitungswasser zu wässern. Die Objektträger wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Xylol gestellt. Schließlich wurden sie mit Entelan® eingedeckt und im Dunkeln aufbewahrt.

2.4 Auswertung der Silbernitrat-gefärbten Präparate

Die AgNOR-gefärbten Präparate wurde unter einem Lichtmikroskop mit 1000-facher Vergrößerung in einem Ölimmersionsverfahren betrachtet. Es wurden 100 Zellkerne pro Präparat ausgewertet. Zur Standardisierung des Zählvorgangs richteten wir uns nach Crocker's Methode. Zunächst wurden alle AgNORs im Zellkern gezählt. Die Punkte lagen einerseits in Haufen (sogenannte Clusters) als auch einzeln (sogenannte Satelliten) außerhalb der Nukleoli vor. Es wurden auch verschiedene Kombinationsmöglichkeiten der Zählung erprobt, so dass sich insgesamt sechs Zählvarianten ergaben:

- Anzahl der Cluster,
- durchschnittliche Anzahl der AgNORs in den Clustern,
- Gesamtzahl der AgNORs aller Cluster,
- Anzahl der Satelliten,
- Anzahl der Satelliten und der Cluster (als je einen Punkt berechnet),
- Anzahl der Satelliten und der Cluster (vorkommende AgNORs individuell gezählt).

Der Zählvorgang für eine Betrachtung von Clustern und Satelliten getrennt dauert ungefähr 20-30 min.

3 Ergebnisse

3.1 Treffsicherheit der konventionellen Ergusszytologie

Die Befundung geschieht standardisiert nach einer von der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und Zytologie erarbeiteten Nomenklatur für extragenitale Zytologie (Böcking und Freudenberg, 1998) (Tabelle 4).

Pleuraergüsse

Von den 103 ausgewerteten Pleuraergüssen (Tabelle 5, Abbildung 1) konnten alle (100 %) als technisch adäquate Proben berücksichtigt werden. In 23 Fällen wurde zytologisch eine nicht maligne Diagnose (keine Tumorzellen = negativ) gestellt. Dies entspricht 22,3 %. Fünfzehn Proben wurden als zweifelhaft (14,6 %) und sechzehn als dringend verdächtig (15,5 %) diagnostiziert. In 49 der Proben wurden maligne Zellen detektiert. Dies entspricht einer tumorzellpositiven Diagnose in 47,6 %.

Aszites

Von den 25 ausgewerteten Aszites (Tabelle 5, Abbildung 1) konnten alle (100 %) als technisch adäquate Proben berücksichtigt werden. In sechs Fällen wurde zytologisch eine nicht maligne Diagnose (keine Tumorzellen = negativ) gestellt, was 24,0 % entspricht. Fünf Proben wurden als zweifelhaft (20,0 %) und zwei als dringend verdächtig (8,0 %) diagnostiziert. In 11 der Proben wurden maligne Zellen detektiert. Dies entspricht einer tumorzellpositiven Diagnose von 44,0 %.

Perikardergüsse

Von den 4 ausgewerteten Perikardergüssen (Tabelle 5, Abbildung 1) konnten alle (100 %) als technisch adäquate Proben berücksichtigt werden. In allen 4 Proben wurden maligne Zellen detektiert, was einer 100 %-igen tumorzellpositiven Diagnose entspricht.

<p>1. Angaben des eingesandten Untersuchungsmaterials</p> <p>ggf. auch der klinischen Fragestellung bzw. der klinischen Verdachtsdiagnose laut Begleitschein (beispielsweise: „Pleuraerguss bei Verdacht auf metastasierendes Mammakarzinom“.)</p>
<p>2. Beschreibung des erhaltenen Untersuchungsmaterials</p> <p>Typ, Makroskopie und Menge (beispielsweise: „50 ml einer gelblich-trüben Flüssigkeit“.)</p>
<p>3. Beschreibung der Zellbilder</p> <p>ggf. mit Hinweisen auf Erhaltungszustand und Repräsentativität (beispielsweise: „wenige aktivierte Mesothelien, massenhaft neutrophile Granulozyten“.)</p>
<p>4. Stufung der Malignitätswahrscheinlichkeit</p> <p>negative: bösartige Zellen nicht nachweisbar</p> <p>zweifelhaft: bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen</p> <p>dringender Verdacht: bösartige Zellen wahrscheinlich</p> <p>positiv: bösartige Zellen nachweisbar</p> <p>unzureichendes mit Begründung (beispielsweise: „autolytisch“)</p> <p>Untersuchungsmaterial:</p>
<p>5. Diagnose im Klartext</p> <p>Bevorzugte Termini der ICD-0 samt Kodierung (beispielsweise: „das Zellbild entspricht einem Pleuramesotheliom [ICD-0 9050/3]“.).</p> <p>ggf. Angaben von Ausschlussdiagnosen (beispielsweise: „kein Anhalt für das Vorliegen einer Pleuritis“.), Kommentare, Empfehlungen, Stellungnahme zu klinischen Fragen.</p>

Tabelle 4: Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie nach Böcking und Freudenberg (1998)

Diagnosen		Anzahl
Pleura	(100 %)	103
Negativ	23 (22,3 %)	
Zweifelhaft	15 (14,6 %)	
Dringender Verdacht	16 (15,5 %)	
Positiv	49 (47,6 %)	
Aszites	(100 %)	25
Negativ	6 (24,0 %)	
Zweifelhaft	5 (20,0 %)	
Dringender Verdacht	2 (8,0 %)	
Positiv	12 (48,0 %)	
Perikard	(100 %)	4
Negativ		
Zweifelhaft		
Dringender Verdacht		
Positiv	4 (100 %)	
Gesamtzahl der Proben		132

Tabelle 5: Verteilung der zytologischen Diagnosen der untersuchten Ergüsse

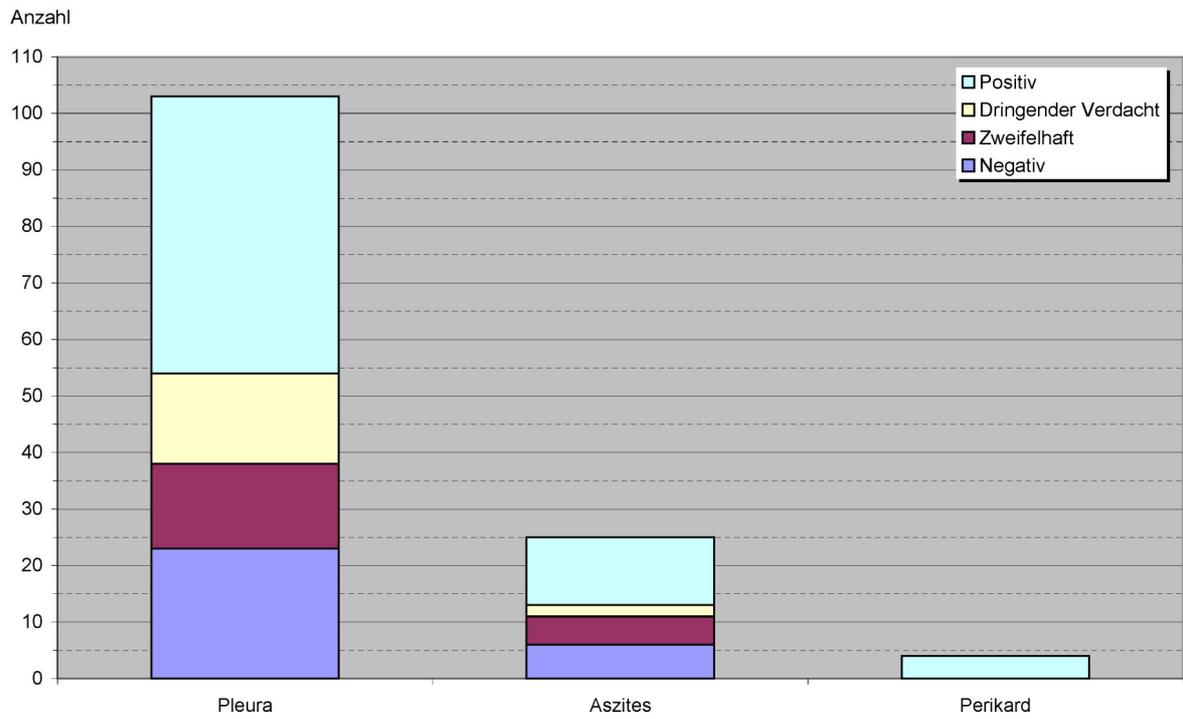


Abbildung 1: Verteilung der zytologischen Diagnosen der untersuchten Ergüsse

Tabelle 6 und Abbildung 2 zeigen die Altersverteilung des Patientenkollektivs, der hier untersuchten Ergüsse. Die Altersverteilung liegt zwischen 0 und 90 Jahren mit einem breiten Maximum zwischen 50 und 80 Jahren.

Alter in Jahren	Mesotheliome	Karzinosen	Reaktive Mesothelien
bis 10			1
11-20			
21-30			
31-40			2
41-50		2	5
51-60	13	12	11
61-70	25	11	12
71-80	10	12	6
81-90	2	4	3
91-100			

Tabelle 6: Altersverteilung des Patientenkollektivs der untersuchten Ergüsse

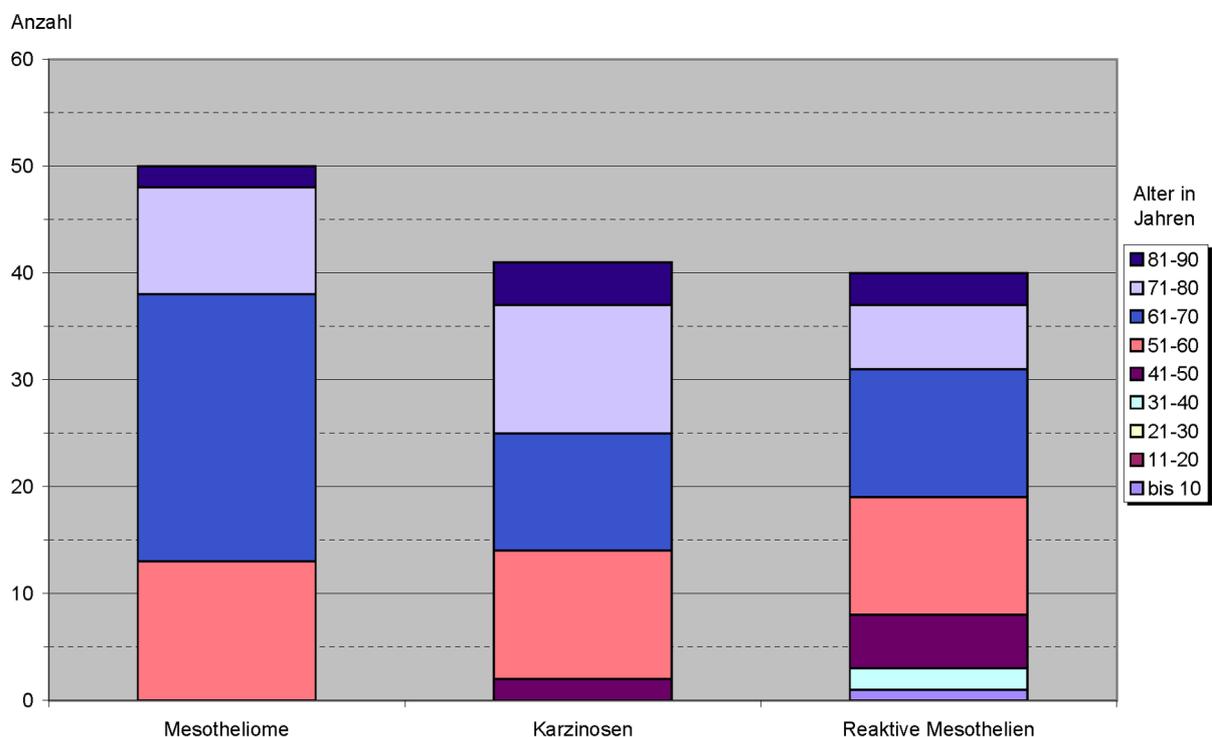


Abbildung 2: Altersverteilung des Patientenkollektivs der untersuchten Ergüsse

3.2 Treffsicherheit der Ergusszytologie unter Anwendung der AgNOR-Analyse als adjuvante Methode

Auswertung: Zählung der Cluster (als eine Einheit) und der Satelliten im Zellkern

Bei den Ergüssen maligner Mesotheliome (n=51) zeigten sich im Mittel 6,5 AgNORs/Zellkern (3,53-12,09), bei denen mit Karzinosen (n=41) im Mittel 8,99 (4,83-26,35). Keiner (0 %) der benignen Ergüsse (n=40) zeigte in seinen reaktiven Mesothelzellen eine Anzahl von AgNORs im Zellkern > 4,40 (Mittelwert 3,27 AgNORs/Zellkern (2,16-4,37)). Somit zeigten alle neoplastischen Ergüsse (100 %) eine Anzahl von AgNORs im Zellkern > 4,4. Es konnte an all diesen Ergüssen (n=92) eine Malignitätsdiagnose gestellt werden.

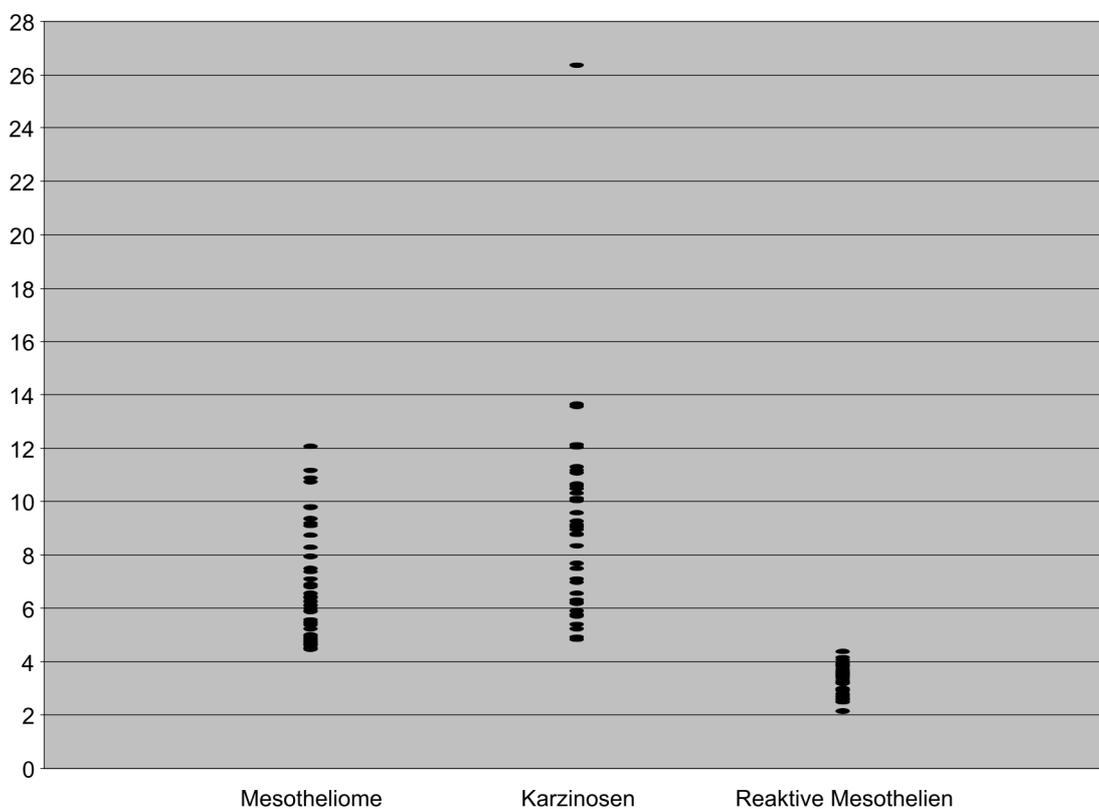


Abbildung 3: AgNOR-Analyse (Zählung der Cluster (als eine Einheit) und der Satelliten) von 132 Ergüssen maligner Mesotheliome, Karzinosen und reaktiver Veränderungen (n=Mittelwert Anzahl der AgNORs/Zellkern)

Auswertung: Zählung der Satelliten im Zellkern

Zählt man nur die als Satelliten bezeichneten, außerhalb der Cluster liegenden AgNORs im Zellkern, zeigen sich folgende Werte: Keiner (0 %) der benignen Ergüsse (n=40) zeigte in seinen reaktiven Mesothelzellen eine Anzahl von AgNORs im Zellkern $> 2,50$ (Mittelwert 1,63 AgNORs/Zellkern (1,06-2,4)). Bei den Ergüssen maligner Mesotheliome (n=51) zeigten sich im Mittel 4,89 AgNORs/Zellkern (2,51-10,57), bei denen von Karzinosen (n=41) im Mittel 7,58 (2,55-25,76). Somit zeigten alle neoplastischen Ergüsse (100 %) eine Anzahl von AgNORs im Zellkern $> 2,50$. Es konnten an allen dieser Ergüsse (n=92) eine Malignitätsdiagnose gestellt werden.

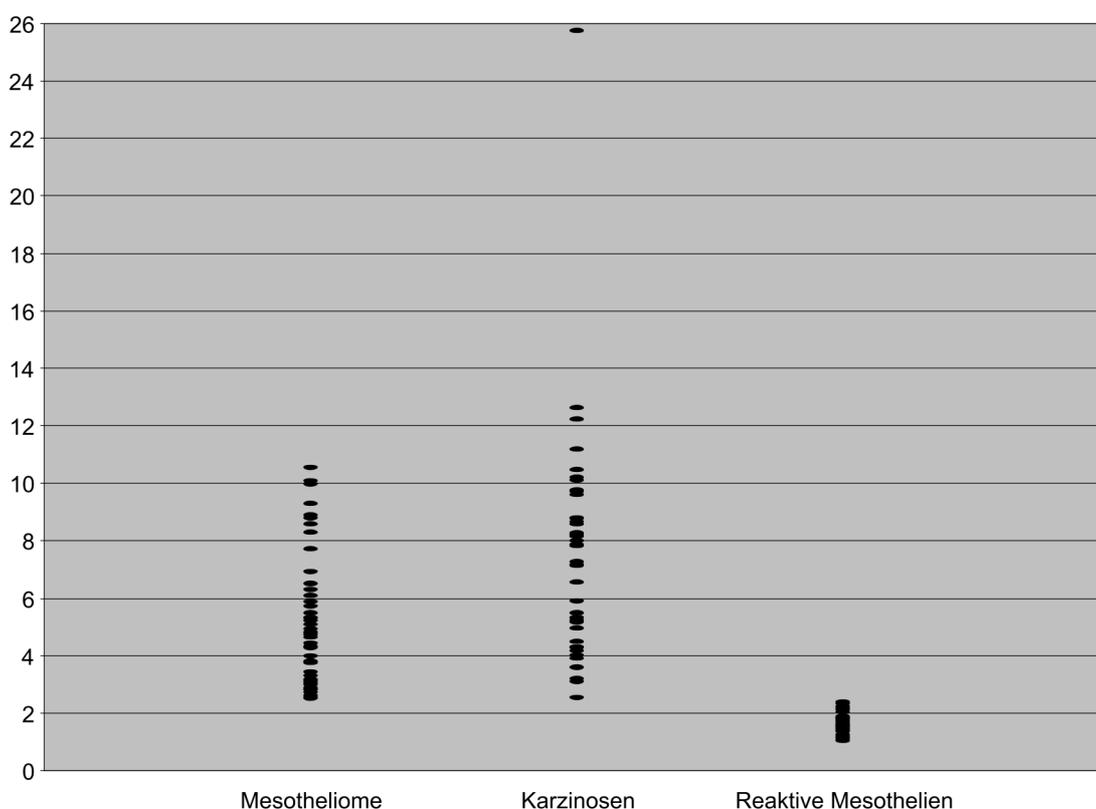


Abbildung 4: AgNOR-Analyse (Zählung der Satelliten) von 132 Ergüssen maligner Mesotheliome, Karzinosen und reaktiver Veränderungen (n=Anzahl der AgNORs/Zellkern)

Andere Auswertungsvarianten:

Die anderen Auswertungsvarianten: Anzahl der Cluster, durchschnittliche Anzahl von AgNORs in den Clustern, Gesamtzahl von AgNORs aller Cluster und Anzahl der Satelliten und der Cluster (vorkommende AgNORs individuell gezählt) ergeben keine gute Trennschärfe zwischen reaktiven und neoplastischen Zellen in Ergüssen. Da sich diese Ergebnisse schon früh abzeichnen konnten wir im weiteren Verlauf der Zählungen auf diese Varianten verzichten.

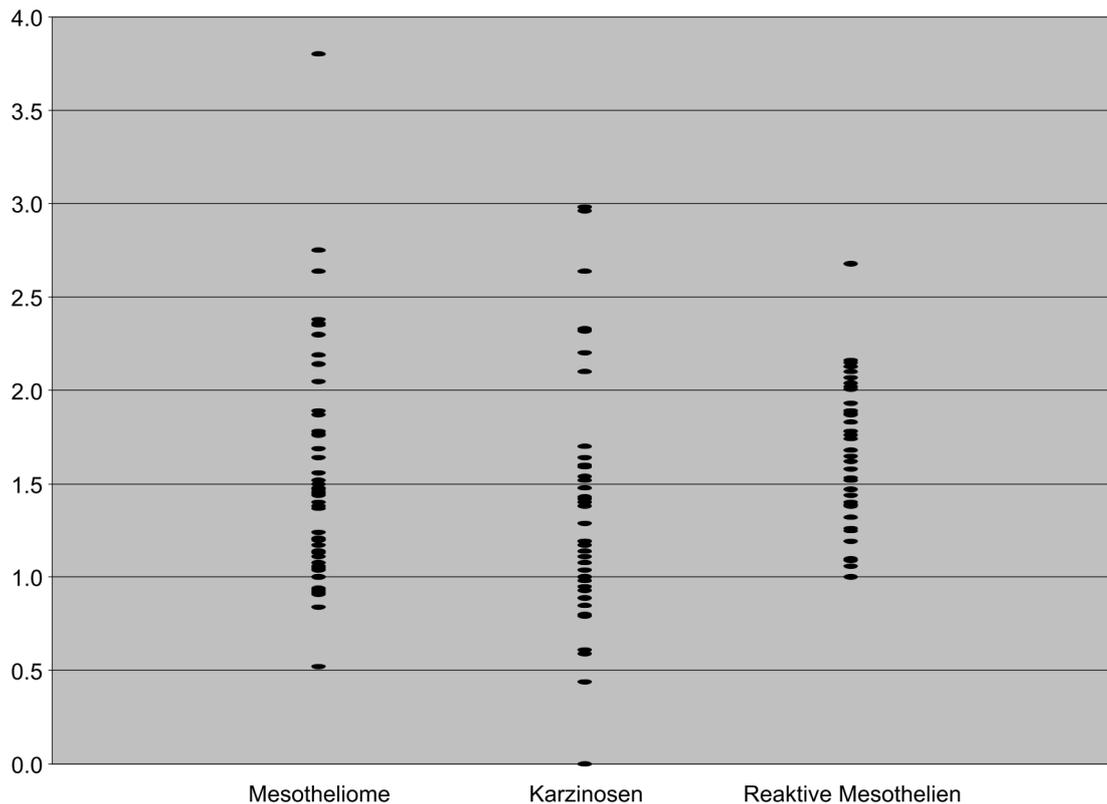


Abbildung 5: AgNOR-Analyse (Zählung der Anzahl der Cluster) von 132 Ergüssen maligner Mesotheliome, Karzinosen und reaktiver Veränderungen (n=Anzahl der AgNORs/Zellkern)

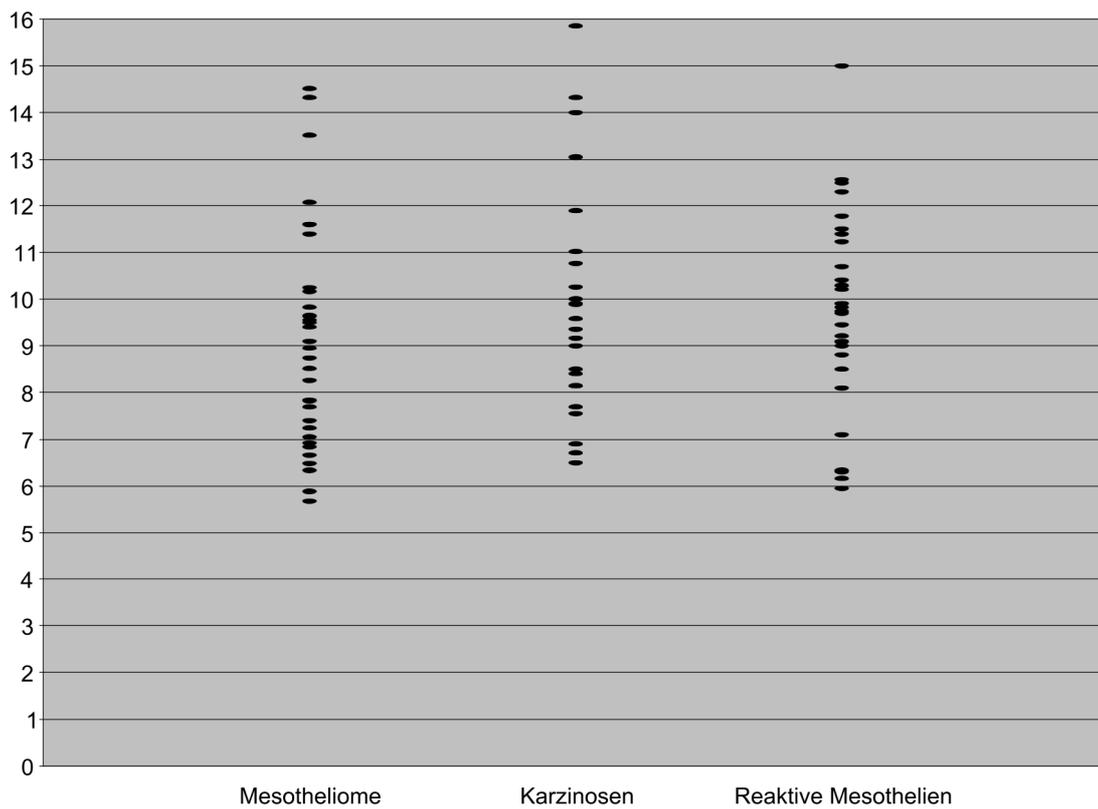


Abbildung 6: AgNOR-Analyse (Zählung der durchschnittlichen Anzahl der AgNORs in den Clustern) von 90 Ergüssen maligner Mesotheliome, Karzinosen und reaktiver Veränderungen (n=Anzahl der AgNORs/Zellkern)

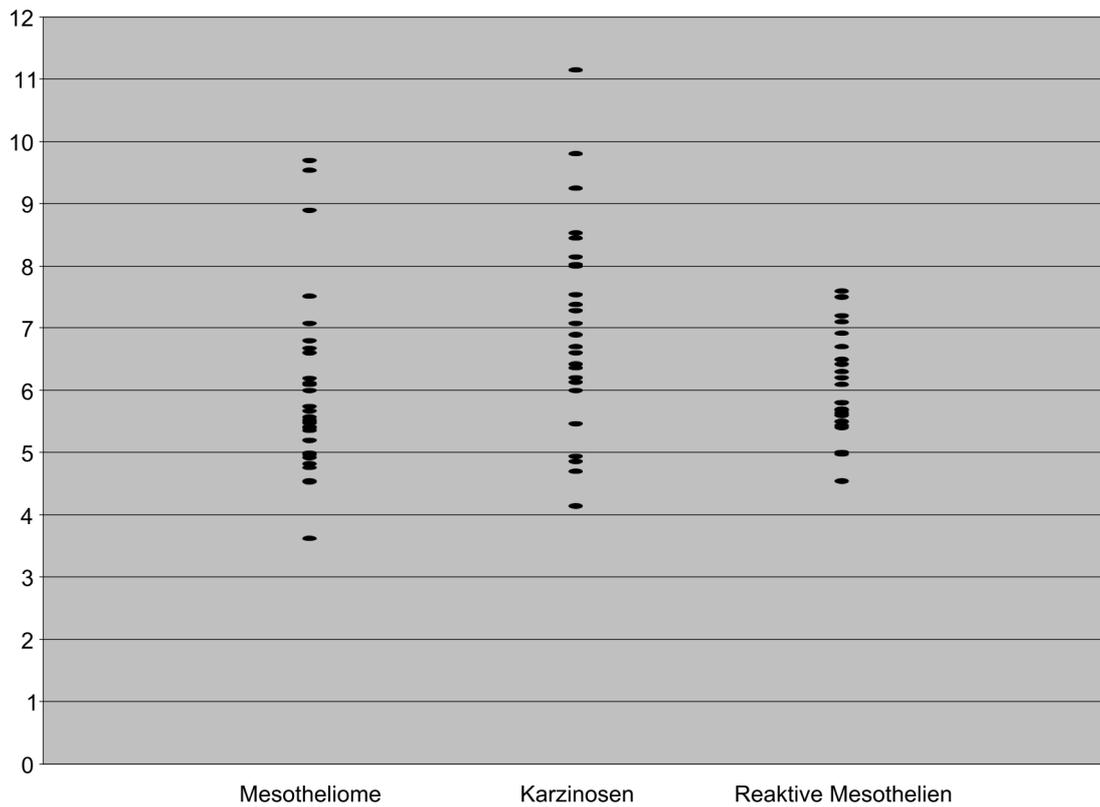


Abbildung 7: AgNOR-Analyse (Zählung der Gesamtzahl der AgNORs aller Cluster) von 90 Ergüssen maligner Mesotheliome, Karzinosen und reaktiver Veränderungen (n=Anzahl der AgNORs/Zellkern)

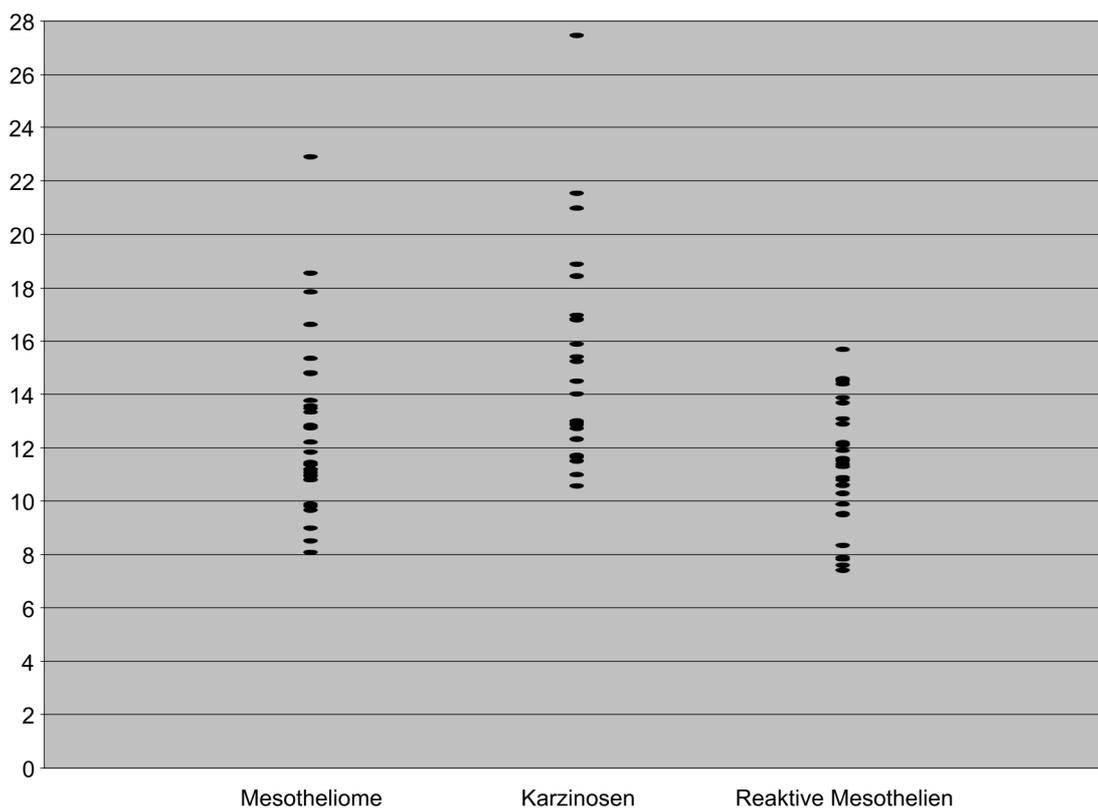


Abbildung 8: AgNOR-Analyse (Zählung der Cluster (vorkommende AgNORs individuell gezählt) und der Satelliten) von 90 Ergüssen maligner Mesotheliome, Karzinosen und reaktiver Veränderungen (n=Anzahl der AgNORs/Zellkern)

Von den Ergüssen, die sich im Follow-Up als Mesotheliom-bedingt herausstellten (n=51), waren rein zytodiagnostisch siebenundzwanzig Tumorzell-positiv, fünfzehn dringend verdächtig und neun einer zweifelhaften Dignität. Die unklaren Ergüsse konnten nun durch die adjuvante Methode der AgNOR-Analyse als Tumorzell-positive Ergüsse gesichert werden. Die AgNOR-Analyse eignet sich daher ausgezeichnet zur Identifikation weniger neoplastischer Zellen in Ergusssedimenten, insbesondere zur Abgrenzung einer reaktiven Mesothelhyperplasie von einem malignen Mesotheliom.

Die Sensitivität der AgNOR-Methode für die Erkennung von Tumorzellen im Erguss entspricht 100 %. Die Spezifität, als auch positiver sowie negativer Vorhersagewert entsprechen 100 %.

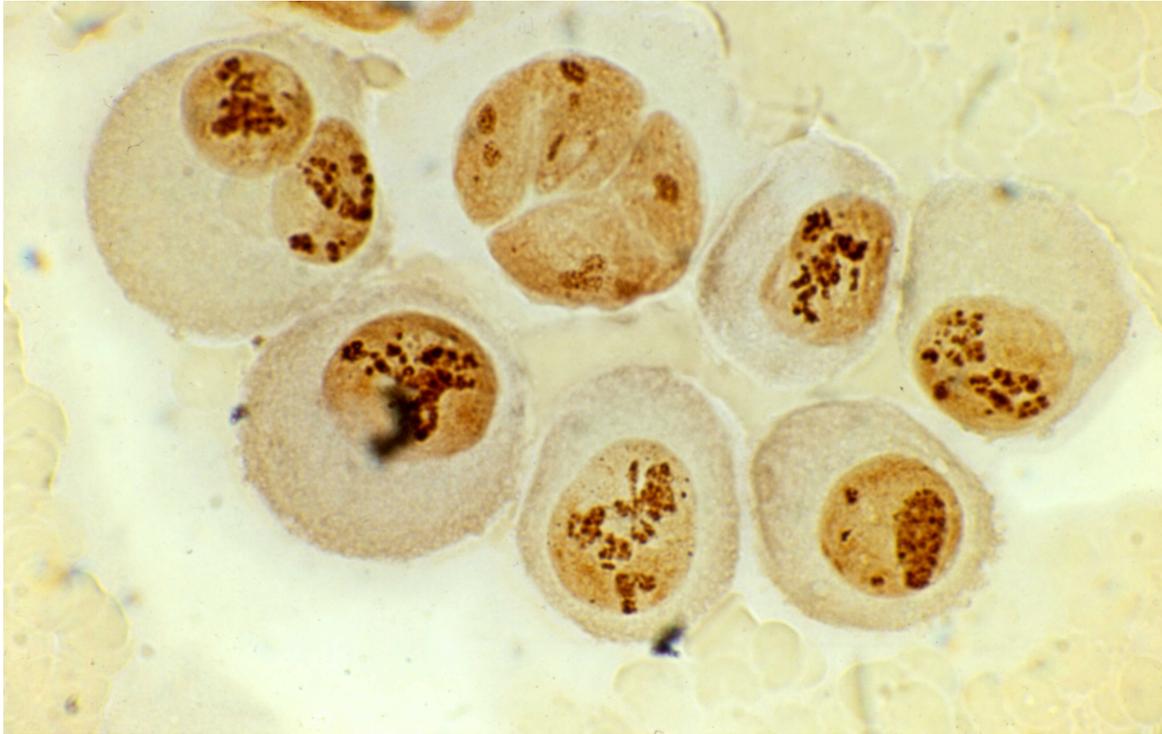


Abbildung 9: Erguss mit Zellen einer Karzinose nach AgNOR-Färbung (Objektiv 100-fach). Die AgNORs liegen vorwiegend als Satelliten, selten als kleine Cluster im Zellkern vor.

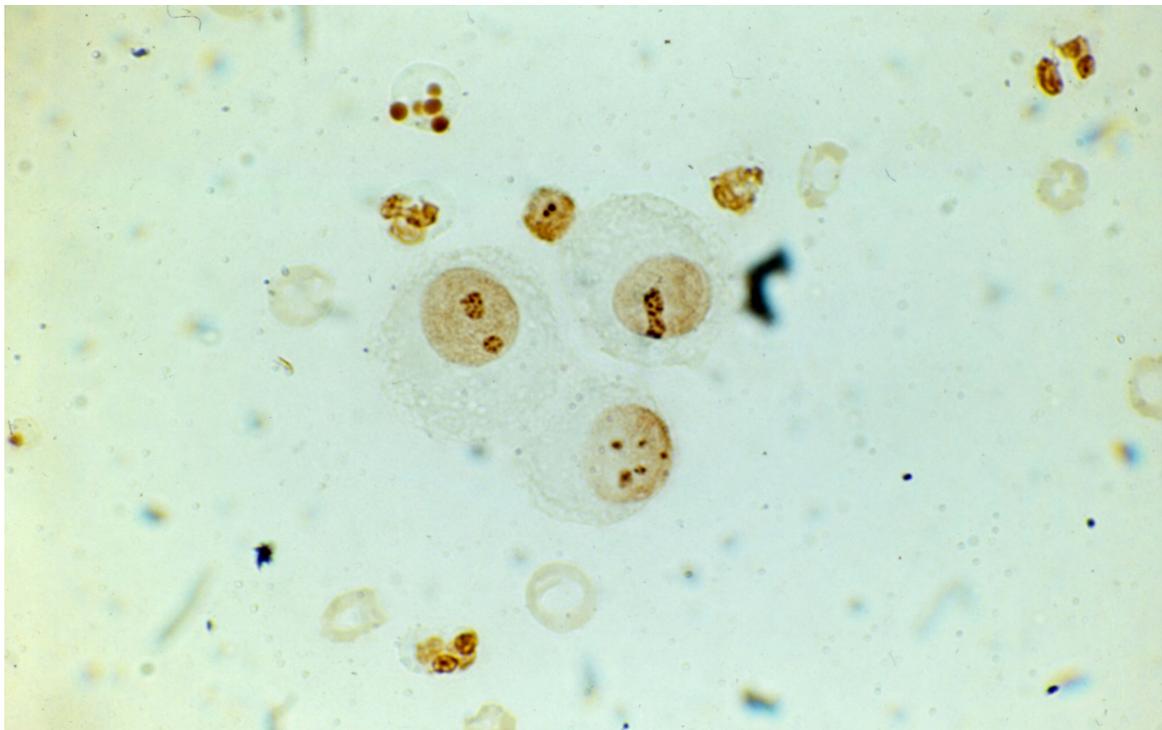


Abbildung 10: Entzündlicher Erguss mit reaktiven Mesothelzellen nach AgNOR-Färbung (Objektiv 100-fach). Die AgNORs liegen als Cluster und Satelliten im Zellkern vor.

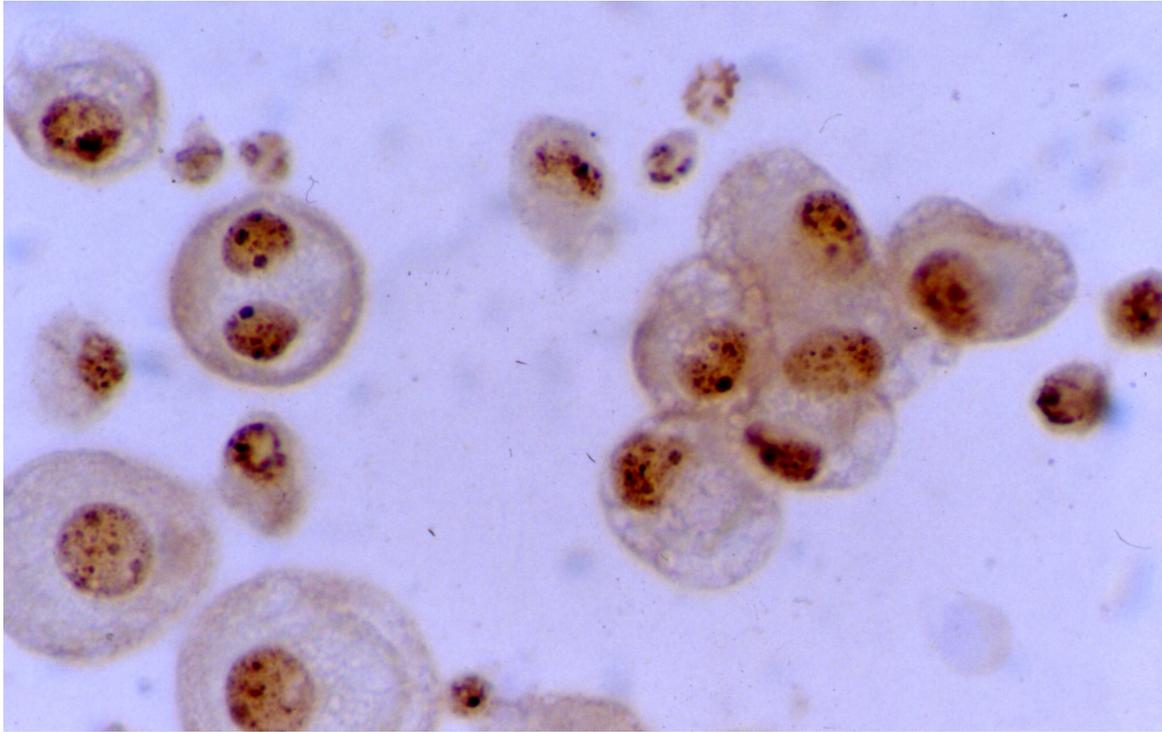


Abbildung 11: Erguss mit einem Verband von Zellen eines malignen Mesothelioms nach AgNOR-Färbung (Objektiv 100-fach). Die AgNORs liegen als Cluster und Satelliten im Zellkern vor.

4 Diskussion

4.1 Konventionelle ergusszytologische Routinediagnostik

Bereits Spriggs und Boddington (1989) belegten, dass sich in der Literatur kaum methodisch angemessene Studien über die Treffsicherheit der ergusszytologischen Diagnostik finden. Über einen Zeitraum von 25 Jahren fanden sich lediglich sechs Untersuchungen, die aufgrund ihrer Fallzahl ($n=159-2198$, Mittelwert 1000) sowie ausreichender Daten zur Bestimmung der Sensitivität, der Spezifität, der positiven und negativen Vorhersagewerte sowie der Zahl der diagnostisch unklaren Fälle verfügen. In den letzten 10 Jahren findet sich nur eine Studie (Nance et al., 1991a), welche diese Voraussetzungen erfüllt. Der Grund für die geringe Anzahl methodisch befriedigender Studien ist, dass Autoren es seit einiger Zeit vorziehen, über Untersuchungen mit geringer Fallzahl, aber mit adjunktiven Methoden zu berichten, mit dem Ziel die diagnostische Treffsicherheit zu erhöhen. Eine methodisch einheitliche Berichterstattung ist aber unerlässlich, um Ergebnisse verschiedener Studien miteinander vergleichbar zu machen.

Ein relevanter Aspekt der Evaluierung der diagnostischen Treffsicherheit der Ergusszytologie ist der „Goldene Standard“. Er sollte im Idealfall das detaillierte histologische und/oder klinische Follow-Up der Patienten sein. Leider wird dieses in der Literatur unterschiedlich gehandhabt. Spriggs und Boddington (1989) bemerkten, dass oft die „endgültige Diagnose“ abhängig ist von der zytologischen, deren Treffsicherheit gerade überprüft wird. Wenn die histologische Verifizierung unter Umständen verlangt wird, würden die meisten Patienten ohne Tumoren von der Evaluierung ausgeschlossen. Viele Autoren berichten nicht darüber, nach welchem Standard sie die Richtlinien ihrer zytologischen Diagnosen bewertet haben. In unserer Studie wurde die Korrektheit zytopathologischer Diagnosen anhand der eingesehenen Krankenakten überprüft. Dabei wurden die jeweils letzten klinischen Informationen herangezogen, es sei denn, eine histologische Bestätigung wurde früher erhalten.

Nach den Definitionen von Spriggs und Boddington (1989) sollten methodisch adäquate Studien, welche über die diagnostische Treffsicherheit der Ergusszytologie berichten, folgende Maßzahlen enthalten.:

Sensitivität

Der Prozentsatz der gemäß Goldstandard tumorzellhaltigen Ergüsse, welcher korrekt als solcher erkannt worden ist ($n = \text{richtig positiv} / n = \text{alle Tumorfälle}$).

Spezifität

Der Prozentsatz der gemäß Goldstandard tumorzellfreien Ergüsse, welcher korrekt als solcher erkannt worden ist ($n = \text{richtig negativ} / n = \text{alle Fälle ohne Tumor}$)

Positiver Prädiktionswert

Der Prozentsatz, in dem eine Diagnose des Nachweises von Tumorzellen gemäß Goldstandard korrekt ist ($n = \text{richtig positiv} / n = \text{alle positiven Diagnosen}$).

Negativer Prädiktionswert

Der Prozentsatz, in dem eine Diagnose des Fehlens von Tumorzellen gemäß Goldstandard korrekt ist ($n = \text{richtig negativ} / n = \text{alle negativen Diagnosen}$).

Wir stimmen mit diesen Autoren überein, dass die meisten Unterschiede in den berichteten Treffsicherheiten zwischen den verschiedenen Studien Unterschiede in der Berichterstattung reflektieren. Alle Autoren haben falsch-positive Diagnosen als ernst zunehmende Fehler betrachtet. Sie sind jedoch unterschiedlich mit der Kategorie der zytologisch zweifelhaften oder verdächtigen Fälle umgegangen. Einige Autoren benutzen diese Kategorie für Proben, bei denen sie fast sicher sind, dass darin maligne Zellen vorliegen. Bedrossian (1994) unterscheidet zwischen „zytologisch unklaren – wahrscheinlich gutartigen“ und „zytologisch unklaren – wahrscheinlich bösartigen“ Proben. Wir benutzen die Begriffe „bösartige Zellen sind nicht auszuschließen“ (=zweifelhaft) und „bösartige Zellen sind wahrscheinlich“ (=dringender Verdacht) für solche Diagnosen (Böcking und Freudenberg, 1998a). Mit diesen beiden Kategorien werden unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten des Vorliegens von Tumorzellen beschrieben.

4.2 Ergusszytologie in der Routinediagnostik unter Anwendung adjuvanter Methoden

1994 wurde am Institut für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität die Treffsicherheit der ergusszytologischen Diagnostik zum ersten Mal ausgewertet. Danach wurden aufgrund der hohen Sensitivitäten und Spezifitäten der immunzytochemischen Anfärbung maligner epithelialer Zellen in Ergüssen (Ber-EP4-Positivität) sowie der DNA-Bildzytometrie (DNA-Aneuploidie), wie in mehreren Studien gezeigt werden konnte, diese beiden Methoden an unklaren Ergüssen in den letzten Jahren in der Routinediagnostik zunehmend integriert. Dies geschah einerseits zur Abklärung der Dignität zytologisch unklarer Ergüsse zum anderen zur Differentialdiagnose (Mesotheliom/Karzinose) an Tumorzell-positiven Ergüssen. Im Jahr 1997 wurde eine erneute Statistik aufgestellt, um eine verbesserte Treffsicherheit der Ergusszytologie durch den Einsatz adjuvanter Methoden zu belegen (Motherby, 1999).

4.3 Nukleolus Organisierende Regionen (AgNORs)

Als wesentliche Kriterien zur Erfassung der proliferativen Aktivität einer Zelle bzw. eines Tumors hat sich nicht nur die AgNOR-Zahl, sondern auch deren Größe, Farbintensität und die Verteilung der Silberniederschläge in Zellkernen herausgestellt. Untersuchungen an zytologischen Ausstrichen zeigten, dass die Bestimmung der Gesamt-AgNOR-Fläche im Zellkern der Auszählung einzelner AgNOR-Partikel angeblich überlegen ist (Rüschhoff, 1992). In anderen Studien werden z.B. alle AgNOR-Punkte innerhalb und außerhalb (Satelliten) des Nukleolus zusammengezählt (Carrillo et al., 1994) oder einzeln gezählt und zueinander und zur Gesamtzahl der AgNORs in Beziehung gesetzt (Shechtman et al., 1998). Wiederum ein anderer Autor (Okamura et al. 1998) berechnet die Prozentsätze der Kerne mit 1, 2, 3, 4 oder > 4 AgNORs. Bigras et al., 1996, zeigte, dass AgNORs ausschließlich in Ki67-positiven Zellen prognostisch relevant sein sollen. Die Empfehlung, AgNORs nur in proliferierenden Zellen zu zählen, kann nur für ein Malignitätsgrading sinnvoll sein, da bei Fragen der Dignität wahrscheinlich meist Populationen mit zu geringer Proliferation vorliegen, so dass man zu wenige Zellen zum Auswerten vorfände.

Koker et al. (1991) berichten, dass nach der Silber-Färbung die NORs als tief braune oder schwarze Punkte in unterschiedlicher Anzahl und Größe innerhalb der Nuklei erscheinen, welche eine gelbliche bis gelblich-braune Farbe mit scharfen Konturen aufweisen. Dieses Erscheinungsbild entspricht genau unseren Beobachtungen. Wolonski et al. (1998) entdeckten, dass generell maligne Mesotheliome eine höhere Anzahl von AgNORs pro Zelle aufweisen, die Ergebnisse der AgNOR-Auszählungen zeigen jedoch eine große Überlappung zwischen einzelnen Werten

bei den benignen und malignen Zellpopulationen. Carrillo et al. (1994) berichten über Überlappungen zwischen einzelnen Ergebnissen in jeder zytologischen Kategorie. Wir konnten im Gegensatz zu Carrillo et al. eine eindeutige Trennung zwischen benignen und malignen Zellen in Ergüssen erzielen. Trevisan et al. (1993) behauptet, dass die AgNOR-Methode keine 100 %-ige Sicherheit geben kann, die Ergebnisse seien jedoch leicht zu reproduzieren und kostengünstig. Derenzini et al. (1989) untersuchten mittels der Bildanalyse die AgNORs und fand heraus, dass die Verteilungsmuster der Interphasenkerne eine eindeutige Unterscheidung zwischen neoplastischen und reaktiven Zellen aus menschlichen Ergüssen ergaben. Andere Arbeiten berichten über erhebliche Überlappungen in der AgNOR-Anzahl bei benignen und malignen Ergüssen (Aides et al., 1988 und Colechia et al., 1991).

An histologischen Schnitten ist die diagnostische Auswertung von AgNOR-Häufigkeiten oder -Fläche erheblich erschwert, da es zu schnittbedingte Substanzdefekten der Kerne von im Einzelfall unbekannter Größe kommen kann. Dadurch entsprechen die pro Zellkernabschnitt gezählten AgNORs nicht der wahren Zahl pro Zellkern. Damit man Unterschiede zwischen den Zellen finden kann, müssen eine große Anzahl von Zellkernen ausgezählt werden. Bei der diagnostischen Auswertung an zytologischem Material kommt es nicht zum Auftreten einer solchen Problematik, da alle sichtbaren Zellkerne vollständig erhalten bleiben. Die in der Zytologie pro Zellkern ermittelten AgNOR-Zahlen entsprechen den tatsächlichen, und bieten daher verlässlichere Werte als jene der Histologie. Daraus resultierend muss eine geringere Zellzahl ausgewertet werden, um diagnostisch relevante Unterschiede zwischen verschiedenen Populationen zu finden.

Wir konnten eine 100 %-ige eindeutige Trennung zwischen reaktiven und neoplastischen mesothelialen Zellen erzielen, indem wir alle AgNORs im Zellkern quantitativ erfassten und dabei die AgNOR-Cluster jeweils nur als einen Punkt und dazu die Satelliten zählten. Zuvor wurden verschiedene andere Auswertungsmöglichkeiten durchgespielt. Es wurde die gesamte AgNOR-Zahl pro Zellkern ermittelt und dabei das Cluster soweit als möglich in einzelne AgNORs aufgliedert und mit Satelliten zusammengezählt. Weiterhin wurden nur die Satelliten isoliert gezählt. Darüber hinaus wurden die Cluster näher untersucht: Anzahl der Cluster, Anzahl einzelner AgNORs der Cluster im Zellkern zusammengezählt, Anzahl der AgNORs pro Cluster. Während die verschiedenen Auswertungen der Cluster keine gute Trennung zwischen benignen und neoplastischen Zellen ermöglichten, zeigte die Zählung der Satelliten ebenfalls eine gute Trennung. Da es jedoch biologisch nicht sinnvoll erscheint, die Cluster bei der Auswertung zu vernachlässigen, ist diese Auswertungsmethode nicht zu empfehlen.

In unseren Untersuchungen konnten wir in allen Ergüssen von malignen Mesotheliomen und von Karzinosen mehr als $> 4,4$ AgNORs pro Zellkern finden. In keinem der Ergüsse ohne Tumorzellen ließen sich dagegen solche Werte nachweisen. Damit wurde ein Schwellenwert gefunden mit einer Sensitivität der AgNOR-Analyse zur Detektion von Malignität von 100 % und einer Spezifität zur Erkennung von Benignität von ebenfalls 100 %. Positiver und negativer Vorhersagewert betragen gleichfalls jeweils 100 %. Es ist also mit der AgNOR-Untersuchung eine eindeutige Trennung zwischen reaktiven und neoplastischen Zellen in Ergüssen möglich.

Die Tatsache, dass mittels der AgNOR-Analyse maligne Mesotheliomzellen nicht nur in sicher Tumorzell-positiven Ergüssen ($n=27$) maligner Mesotheliome ($n=51$), sondern auch in allen zytologisch zweifelhaften ($n=9$) und dringend tumorverdächtigen Ergüssen ($n=15$) sicher zu identifizieren waren, belegt, dass die Methode in der Lage ist, die Treffsicherheit der Ergusszytologie zur Diagnostik maligner Mesotheliome wesentlich zu steigern. Wir konnten demnach in 24 von 51 Fällen mittels der AgNOR-Analyse eine sichere Tumordiagnose stellen, obwohl zytologisch nur ein Verdacht ausgesprochen werden konnte. Daraus lässt sich eine Erhöhung der Sensitivität der zytologischen Mesotheliomdiagnostik an Ergüssen um 47 % ableiten.

Mittels der AgNOR-Analyse ist man jedoch nicht in der Lage zwischen malignen Zellen unterschiedlicher Herkunft zu differenzieren. Auch wenn die Zahl der AgNORs pro Zellkern für Karzinosen im Mittel etwas höher liegen als für Mesotheliome, ist eine eindeutige Differenzierung im Einzelfall nicht möglich.

Bei weiteren Untersuchungen konnten wir feststellen, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen den Tumorstadien der mittels AgNOR-Analyse untersuchten und diagnostizierten Mesotheliome und deren Mittelwerten gibt.

Es gibt bereits Arbeiten, in denen die AgNOR-Ergebnisse mit dem DNA-Ploidiestatus der Zellkerne, gemessen mittels der DNA-Flow-Zytometrie, korreliert wurden (Huang et al., 1994; Carrillo et al., 1994). Huang et al. (1994) folgerte, dass DNA-aneuploide Malignome (Mesotheliome und Karzinosen) höhere AgNOR-Werte aufwiesen als diploide. Auch wenn die DNA-Zytometrie dabei keinen zusätzlichen Beitrag zur Dignitätsklärung liefert, gibt das Erfassen von zwei unabhängigen Markern eine größere diagnostische Sicherheit. Besondere Bedeutung kommt den AgNORs bei der Unterscheidung reaktiver von neoplastischen Mesothelzellen zu. Hier versagt die DNA-Zytometrie oft, da in Zellen aus malignen Mesotheliomen (DNA-Stammlinien- oder Einzelzellaneuploidie nur in 58,5 % nachweisbar sind (Motherby et al., 1998)). Die Immunzytochemie kann diese Differenzierung bisher nicht leisten, da sie nur dignitätsunabhängige Differenzierungsmerkmale der Zellen nachweist (Motherby, 1999). Die AgNOR-Analyse ist demnach

als einzige Methode in der Lage, auch wenige Mesotheliomzellen durch eine erhöhte mittlere Zahl von AgNORs pro Zellkern zu identifizieren. Es ist also beim geringsten zytologischen Verdacht auf das Vorliegen von Mesotheliomzellen im Erguss immer eine AgNOR-Analyse durchzuführen, um so ein Mesotheliom möglichst frühzeitig zu erfassen. Die Überlebenschancen von Patienten mit diesem bösartigen Tumor sind, wie bei anderen Krebsen auch, erheblich vom Stadium abhängig in welchem die Erkrankung erstmals diagnostiziert und behandelt wurde.

Diese Ergebnisse eröffnen nun neue Möglichkeiten für eine treffsichere Mesotheliom-Früherkennung, wie z.B. bei Risikopopulationen wie Asbestexponierten.

5 Zusammenfassung

Die Sensitivität der konventionellen ergusszytologischen Diagnostik ist mit ca. 58 % im Literaturdurchschnitt unbefriedigend. Die Spezifität beträgt ca. 97 %. 5 % der zytologischen Diagnosen sind im Mittel zweifelhaft oder nur dringend verdächtig auf Tumorzellen. Die Fähigkeit der Zytodiagnostik, zwischen primären und sekundären Tumoren der serösen Häute zu unterscheiden, ist bisher gering (Spriggs und Boddington, 1989).

Die klinischen Konsequenzen der bisher unbefriedigenden Treffsicherheit für die betroffenen Patienten können eine verzögerte Diagnose mit oft unnötigen, invasiven und teuren weiteren Untersuchungsverfahren sein, sowie inadäquate oder unterbliebene Therapien, ggf. auch verpasste Anerkennungen von Berufskrankheiten (insbesondere bei Mesotheliomen). Eine sensitive Frühdiagnose des malignen Mesothelioms an Ergussflüssigkeiten ist bisher nicht möglich.

Eine Verbesserung der diagnostischen Treffsicherheit der Ergusszytologie ist daher dringend notwendig. In dieser Arbeit ist die adjuvante Methode der AgNOR-Analyse auf ihre Eignung zum Nachweis maligner Zellen in Ergüssen und zur Differentialdiagnose verschiedener Primärtumoren untersucht worden.

Es wurden 132 Ergüsse, darunter 51 bei Mesotheliomen, 41 bei Karzinosen und 40 bei benignen Ergüssen, mit der AgNOR-Analyse untersucht. Diese vermochte zwischen reaktiven und neoplastischen Mesothelzellen mit einer Sensitivität, Spezifität, positivem und negativem Vorhersagewert von jeweils 100 % zu unterscheiden. Man ist jedoch nicht in der Lage zwischen malignen Zellen unterschiedlicher Herkunft zu differenzieren, auch wenn die Zahl der AgNORs pro Zellkern für Karzinosen im Mittel etwas höher liegt als für Mesotheliome.

Die AgNOR-Analyse scheint mit 100 % die höchste Sensitivität zur Detektion neoplastischer Zellen in diagnostisch zweifelhaften Ergüssen zu haben. Aus diesen Ergebnissen resultierend kann man behaupten, dass der Einsatz der AgNOR-Analyse in Ergüssen der serösen Körperhöhlen als adjuvante Methode einen wertvollen, klinisch relevanten Beitrag zur Verbesserung der Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik in der täglichen Routine leisten kann.

Einen weiteren Beitrag zur Erhöhung der Treffsicherheit der Ergusszytologie kann der Kliniker leisten, indem er größere Volumina (50-100ml) als bisher üblich bzw. mehrere Proben, einsetzt.

6 Literaturverzeichnis

- Aides Jg, Crocker JG, Skilbeck NQ: Differentiation of malignant from normal and reactive mesothelial cells by the argyrophil technique for nucleolar organiser region associated proteins. *Thorax* 1988; 43: 366–370
- Bedrossian CWM: Malignant effusion. A multimodal approach to cytologic diagnosis. New York – Tokio: Igaku -Shoin Medical Publishers, 1994.
- Bigras G, Marcelpoil R, Brambilla E, Brugal G: Interest of targeting AgNORs measurement in cycling cells: in vivo cell kinetic evaluation of non-small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol* 1996; 11: 183-198.
- Böcking A, Freudenberg N: Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Pathol* 1998a; 19: 235-236.
- Carrillo R, Sneige W, El-Naggar A: Interphase nucleolar organizer regions in evaluation of serosal cavity effusions. *Acta Cytol* 1994; 38 (3): 367-372.
- Classen M, Diehl V, Kochsiek K: Innere Medizin 3. Auflage; Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore 1994.
- Colechia M, Agnelli T, Caronni E, Leopardi O: Usefulness of morphometry and AgNOR counts to differentiate reactive and malignant mesothelial cells in pleural fluids. *Pathology* 1991; 83: 89–97
- Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ: How should we count AgNORs?: Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 1989; 158: 185-188.
- Derenzini M, Betts CM, Trere D, Membelli V, Millis RR, Eusebi V, Cancerellieri A: Diagnostic value of silver-stained interphasic nucleolar organizer regions in breast tumors. *Ultrastruct Pathol* 1990a; 14: 233-245.
- Derenzini M, Nardi F, Farabegoli F, Ottinetti A, Roncaroli F, Bussolati G: Distribution of silverstained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from nonneoplastic reactive cells in human effusions. *Acta Cytol* 1989; 33 (4): 491-497.

- Derenzini M, Pession A, Trere D: Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab Invest* 1990b; 63: 137-140.
- Hausheer F, Yabro J: Diagnosis and treatment of malignant pleural effusions. *Semin Oncol* 1985; 12 (1): 54-75.
- Huang MS, Tsai MS, Hwang JJ, Wang TH: Comparison of nucleolar organiser regions and DNA flow cytometry in the evaluation of pleural effusion. *Thorax* 1994; 49: 1152-1156.
- Koker G, Hubert M, Wenzelides K: A modified method for the detektion of nucleolar organizer regions (AgNORs). *Acta Histochem* 1991; 90: 155–157
- Lewin B: *Genes*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1987.
- Motherby H, Nadjari B, Friegel P, Kohaus J, Ramp U, Böcking A, Diagnostik accuracy of effusion cytology. *Diagn Cytol* 1998c: accepted for publication.
- Motherby H: Adjuvante Untersuchungsmethoden zur Verbesserung der Treffsicherheit der Ergußzytologie.(1999)
- Nance KV, Shemmer RW, Askin FB: Diagnostic effiacy of pleural biopsy as compared with that of pleural fluid examination. *Modern Pathol* 1991a; 4(3): 320-324.
- Okamura H, Shibuta H, Sakuma N, Kamei T, Satoh M, Kiyohiro M, Murakami I: Usefulness of AgNOR Count in Differentiating Malignant Cells from Reactive Mesothelial Cells in Serous Effusions. *Acta Cytol* 1998, 42: 548.
- Ploton D, Menager M, Jeannersson P, Himber G, Pigeon F, Adnett JJ: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of nucleolar organiter region of the optical level. *Histochemistry* 1986; 18: 5-14.
- Roberts C, Brasch J, Tattersall MH: Ribisomal RNA gene amplification: a selective advantage in tissue culture. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 29: 119-127.
- Rüschoff J, *Nucleolus Organizer Regions (NORs): Diagnostic tumor Pathology: Stuttgart, Gustav Fischer-Verlag, 1992, pp 1-144.*
- Rüschoff J: *Nukleolus Organisierende Regionen (NORs) in der Pathomorphologischen Tumordiagnostik. Gustaf Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York 1992.*

- Schwarzacher-Robinsons T: Kraemer PM, Cram LS: Spontaneous in vitro neoplastic evolution of cultured Chinese hamster cells. Nucleolus organizing region activity. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 35: 119-128.
- Shechtman L, Koren R, Horowitz A, Shechtman I, Halpern M, Gal R: Diagnostic Value of AgNOR Staining in Thyroid Cytology. *Anal Quant cytol Histol* 1998; 20 (3): 187-191.
- Spriggs AL, Boddington MM: Atlas of Serous Fluid Cytopathology. A Guide to the Cells of Pleural, Pericardial, Peritoneal and Hydrocele Fluids. In: *Current Histopathology Series*, vol.14. GA Gresham (Ed.) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989.
- Trevisan MS, Souza MI, Magna LA: Nucleolar organizer regions of mesothelial and carcinomatous cells in effusions. *Diagn Cytopathol* 1993; 9: 492-497
- Wolonski KD, Whitaker D, Shilkin KB, Henderson DW: The use of epithelial membrane antigen and silver-stained nucleolar organizer regions testing in the differential diagnosis of mesothelioma from benign reactive mesothelioses. *J Cancer* 1998; 82: 583-590
- Ziselman EM, Harkavy SE, Hogan M, West W, Atkinson B: Peritoneal Washing Cytology. Uses and Diagnostic Criteria in Gynecologic Neoplasms. *Acta Cytol* 1984; 28: 105-110.
- Zoeller J, Flentje M, Sinn P, Born A: Evaluation of AgNOR and Ki-67 antigen as cell kinetic parameters in oral dysplasias and carcinomas. *Anal Cell Pathol* 1994; 7: 77-88.

Lebenslauf

Person

Name Brinja-Lara Rohn
Geburtsdatum, -ort 15. Januar 1975, Düsseldorf
Familienstand verheiratet
Kinder Tochter (½ Jahr)
Sohn (4½ Jahre)
Adresse Friedenstraße 75
40219 Düsseldorf
Telefon 0211 / 396025

Beruf

Zahnärztin

08/2003 – ... Erziehungsurlaub
05/2003 – 07/2003 Mutterschutz
12/2001 – 04/2003 Zahnarztpraxis Kai Adam, Düsseldorf
Assistenz Zahnärztin

Nebentätigkeiten

09/1999 – 10/2001 Zahnärztlicher Notdienst der WKK
Studentische Hilfskraft
04/1998 – 10/2001 Zahnärztl. Praxisgemeinschaft Dr. Maierhofer und Partner, Düsseldorf
Stuhlassistenz
01/1998 – 03/1998 Zahnarztpraxis Dres. Schrader, Düsseldorf
Stuhlassistenz

Praktika

07/1997 – 08/1997 Praxis für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie
Dr. Dr. med. Marianne Hagen, Düsseldorf
06/1994 – 08/1994 St.-Vinzenz-Krankenhaus, Chirurgie/Innere, Düsseldorf

Veröffentlichungen

04/2001 Pomjanski N, Motherby H, Buckstegge B, Knops K, Rohn BL, Böcking A : Early Diagnosis of Mesothelioma in Serous Effusions Using AgNOR Analysis. *Analyt Quant Cytol Histol* 2001; 23: 1–10

Ausbildung

Universität

10/1995 – 10/2001	Zahnmedizinstudium, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
03/1998	Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Vorphysikum)
10/1998	Zahnärztliche Vorprüfung (Physikum)
10/2001	Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen) Approbation als Zahnärztin

Gymnasium

1985 – 1994	Städtisches Gymnasium Gerresheim, Düsseldorf
1994	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Düsseldorf, 7. Januar 2004

Abstract

Verbesserung der Treffsicherheit der Ergusszytologie mittels AgNOR-Analyse als adjuvante Untersuchungsmethode

Vorgelegt von Brinja-Lara Rohn

Die Sensitivität der konventionellen ergusszytologischen Diagnostik ist mit ca. 58 % im Literaturdurchschnitt unbefriedigend. Die Spezifität beträgt ca. 97 %. 5 % der zytologischen Diagnosen sind im Mittel zweifelhaft oder nur dringend verdächtig auf Tumorzellen. Die Fähigkeit der Zytodiagnostik, zwischen primären und sekundären Tumoren der serösen Häute zu unterscheiden, ist bisher gering (Spriggs und Boddington, 1989). Die klinischen Konsequenzen der bisher unbefriedigenden Treffsicherheit für die betroffenen Patienten können eine verzögerte Diagnose mit oft unnötigen, invasiven und teuren weiteren Untersuchungsverfahren sein, sowie inadäquate oder unterbliebene Therapien, ggf. auch verpasste Anerkennungen von Berufskrankheiten (insbesondere bei Mesotheliomen). Eine sensitive Frühdiagnose des malignen Mesothelioms an Ergussflüssigkeiten ist bisher nicht möglich.

Eine Verbesserung der diagnostischen Treffsicherheit der Ergusszytologie ist daher dringend notwendig.

In dieser Arbeit ist die adjuvante Methode der AgNOR-Analyse auf ihre Eignung zum Nachweis maligner Zellen in Ergüssen und zur Differentialdiagnose verschiedener Primärtumoren untersucht worden.

Es wurden 132 Ergüsse, darunter 51 bei Mesotheliomen, 41 bei Karzinosen und 40 bei benignen Ergüssen, mit der AgNOR-Analyse untersucht. Diese vermochte zwischen reaktiven und neoplastischen Mesothelzellen mit einer Sensitivität, Spezifität, positivem und negativem Vorhersagewert von jeweils 100 % zu unterscheiden. Man ist jedoch nicht in der Lage zwischen malignen Zellen unterschiedlicher Herkunft zu differenzieren, auch wenn die Zahl der AgNORs pro Zellkern für Karzinosen im Mittel etwas höher liegt als für Mesotheliome.

Die AgNOR-Analyse scheint mit 100 % die höchste Sensitivität zur Detektion neoplastischer Zellen in diagnostisch zweifelhaften Ergüssen zu haben. Aus diesen Ergebnissen resultierend kann man behaupten, dass der Einsatz der AgNOR-Analyse in Ergüssen der serösen Körperhöhlen als adjuvante Methode einen wertvollen, klinisch relevanten Beitrag zur Verbesserung der Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik in der täglichen Routine leisten kann.

Einen weiteren Beitrag zur Erhöhung der Treffsicherheit der Ergusszytologie kann der Kliniker leisten, indem er größere Volumina (50–100 ml) als bisher üblich bzw. mehrere Proben, einsetzt.

Mein Dank gilt allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. A. Böcking für die Überlassung dieses interessanten Themas und für den großen Freiraum bei dessen Bearbeitung;

Frau Dr. N. Pomjanski für ihre Betreuung, die vielen Anregungen und Ratschläge;

dem gesamten Team des Instituts für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität, welches mir bei den labortechnischen Arbeiten jederzeit hilfreich zur Seite stand;

Frau Univ.-Prof. Dr. Borsch-Galetke für die Erstellung des Zweitgutachtens;

meinem Bruder Rüdiger für die umfangreiche Unterstützung bei der Datenverarbeitung und Drucklegung und

meinen Eltern, die mir Ausbildung und Studium ermöglicht haben.

