

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

Direktor: Prof. Dr. med. A. Böcking

**Treffsicherheit eines immunzytochemischen Markerpanels
zur Identifizierung von Primärtumoren unbekannter
Lokalisation (CUP-Syndrom) an Tumorzellen aus
Körperhöhlenergüssen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Peyrüze Doganay

2005

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. dent. Ulrich Stüttgen

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einleitung</u>	4
1.1	Ergüsse seröser Körperhöhlen	4
1.1.1	Klinische Relevanz der zytologischen Erguss-Diagnostik	4
1.1.2	Ätiologie, kausale Pathogenese und Häufigkeiten	5
1.1.3	Klinisches Vorgehen	7
1.1.4	Aufbereitungsmethoden/Färbungen	8
1.2	Treffericherheit der konventionellen zytologischen Diagnostik	10
1.3	Adjuvante Methoden der Ergusszytologie	11
1.3.1	Immunzytochemie	12
1.3.1.1	Immunzytochemische Färbemethoden	13
1.4	Ziele und Herleitung der Fragestellung	17
1.4.1	Das Studienkonzept	17
1.4.2	Ziele der hier vorliegenden Studie	17
1.4.3	Die Fragestellung	18
2.	<u>Material und Methoden</u>	19
2.1	Material	19
2.1.1	Patientenpopulation und Ausgangsmaterial	19
2.1.2	Einschlusskriterien für die Studie	19
2.1.3	Materialgewinnung und Versand	20
2.2	Methoden zytologischer Untersuchungen	21
2.2.1	Herstellung der Ausstrichpräparate für die Ergusszytologie	21
2.2.2	Durchführung der zytologischen Untersuchungen	24
2.2.2.1	Diagnostische Kriterien für Malignität	24
2.2.2.2	Diagnostische Kategorien/zytologische Klassifikationen	24
2.3	Immunzytochemische Untersuchungen	26
2.3.1	Herstellung der Präparate für die immunzytochemischen Untersuchungen	26

2.3.2	Auswertung der immunzytochemisch gefärbten Präparate	31
2.4	Klinisches/histologisches Follow-up	34
2.4.1	Erfassungsroutine/Validierung zytologischer Diagnosen	34
2.5	Statistische Untersuchungen	36
3.	<u>Ergebnisse</u>	<u>38</u>
3.1	Deskriptive Statistik	38
3.1.1	Geschlechtsverteilung	38
3.1.2	Altersvergleich zwischen Körperhöhlenergüssen männlicher und weiblicher Patienten	39
3.1.3	Ausgangsmaterial	40
3.1.4	Klinisches/histologisches Follow-up des Studienkollektives	41
3.2	Immunzytochemische Untersuchungen	43
3.2.1	Auswertung der immunzytochemischen Untersuchungsergebnisse der Lerngruppe (n= 79)	43
3.2.1.1	Algorithmus zur diagnostischen Interpretation der immunzytochemischen Färbeargebnisse	45
3.2.2	Histogenetische Klassifikationsgenauigkeit der Testgruppe (n= 101)	48
3.2.3	Rohdaten der immuzytochemischen Untersuchungsergebnisse der Gesamtkohorte (n= 180)	49
3.2.3.1	Markerspezifische Betrachtung	51
3.2.3.2	Organspezifische Betrachtung	54
3.2.4	Organabhängige Darstellung der am häufigsten vorkommenden Farbe-Scores	58
3.3	Maßzahlen diagnostischer Treffsicherheit	59
3.3.1	In Abhängigkeit des benutzten Markers TTF1	59
3.3.2	In Abhängigkeit des benutzten Markers CDX2	60
3.3.3	Überlebenszeit der Patienten (n= 53) mit tumorzellhaltigen serösen Körperhöhlenergüssen	62
3.4	Selten metastasierende Karzinome	64

4.	<u>Diskussion</u>	65
5.	<u>Zusammenfassung</u>	76
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	77
7.	<u>Anhang</u>	86
7.1	Übersicht der Tabellen und Abbildungen	86
7.2	Follow-up-Erfassungsbogen	89
7.3	Danksagung	90
7.4	Teilpublikationen dieser Arbeit	91
7.5	Lebenslauf	92

1 Einleitung

1.1 Ergüsse seröser Körperhöhlen

1.1.1 Klinische Relevanz der zytologischen Erguss-Diagnostik

Ergüsse seröser Körperhöhlen sind pathologische Flüssigkeitsansammlungen, die in der Pleurahöhle, im Bauchraum oder in dem Herzbeutel auftreten können. Pleuraergüsse treten dabei am häufigsten auf, gefolgt von solchen des Peritoneums und des Perikards.

Eine primäre Erguss-Diagnostik kann durch die körperliche Untersuchung, die Sonographie, konventionelle Röntgen-Aufnahmen oder in seltenen Fällen die Computertomographie geleistet werden. Eine Bestimmung der Dignität des Ergusses ist mit diesen Methoden jedoch nicht durchführbar, denn als klinisches Symptom kann ein Erguss auf eine Vielzahl von benignen und malignen Grunderkrankungen hinweisen. Mehr als 50 unterschiedliche Erkrankungen sind bekannt, die mit der Bildung von Ergüssen seröser Körperhöhlen einhergehen können. Verschiedene pathogenetische Mechanismen sowie unterschiedliche Ätiologien sind verantwortlich für die Bildung eines Ergusses (Bedrossian, 1994).

In den meisten Fällen erfolgen eine therapeutische Drainage und/oder eine diagnostische Punktion. Dies ist für den Patienten wenig belastend und für den Diagnostiker ein wenig aufwendiges Verfahren, das selten Komplikationen zeigt (Pneumothorax, Blutung, Infektion u.a.). Es gibt verschiedene diagnostische Möglichkeiten, wie z. B. die der Laborchemie oder der Zytopathologie, die erste Hinweise auf die Ursache eines Ergusses liefern können.

Ca. 45 % der Ergüsse seröser Körperhöhlen enthalten bösartige Zellen. Davon wiederum liefert die Zytologie in ca. 45 % den ersten Hinweis auf einen Primärtumor (Bedrossian, 1994).

Somit wird der Erguss seröser Höhlen zu einer wichtigen Informationsquelle für den Kliniker und zu einer methodischen Herausforderung für den Zytopathologen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer standardisierten zytologischen Diagnostik von

Ergüssen seröser Körperhöhlen im Hinblick auf die frühe Entdeckung maligner Tumoren. Bei Patienten mit einer bekannten malignen Erkrankung trägt die ergusszytologische Diagnose weiterhin zum Staging eines Tumors bei und beeinflusst damit die Therapie. Das Ergebnis der zytologischen Untersuchung des Ergusses entscheidet oft über das weitere diagnostische und therapeutische Schicksal des Patienten. Damit kommt der zytologischen Abklärung eines Ergusses eine große klinische Bedeutung zu. Seit mehr als einem Jahrhundert findet man in der Literatur die Diskussion über die Möglichkeit und Wertigkeit der zytologischen Diagnostik an Flüssigkeiten aus serösen Körperhöhlen. Das Ziel der zytologischen Diagnostik ist die Erkennung und Typisierung maligner Tumoren.

1.1.2 Ätiologie, kausale Pathogenese und Häufigkeiten

Nach einer groben klinischen, kausalpathogenetischen Einteilung kann zwischen Transsudaten, Exsudaten und neoplastisch bedingten Ergüssen seröser Körperhöhlen unterschieden werden. Die Häufigkeiten bezogen auf Pleura, Perikard und Peritoneum sind in Abbildung 1 wiedergegeben (Van Haam, 1977)

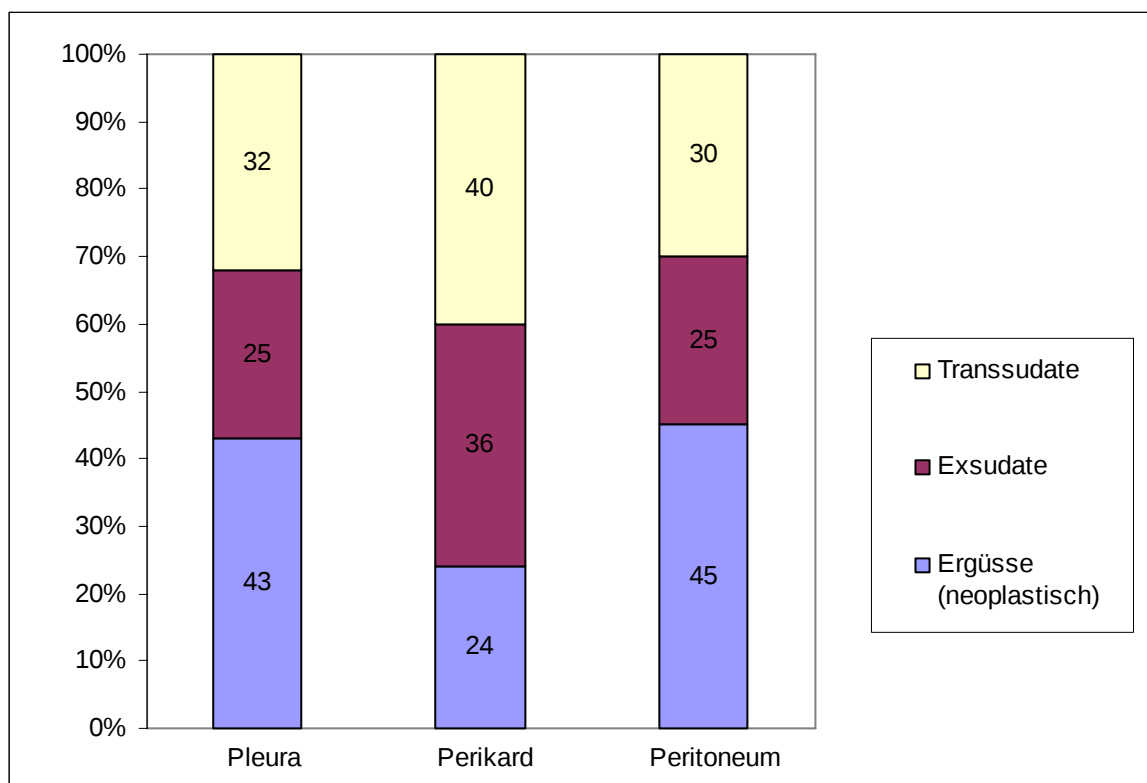


Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung von Transsudaten, Exsudaten sowie neoplastischen Ergüssen bezogen auf Pleura, Perikard und Peritoneum (Van Haam, 1977)

Transsudate treten bei lokaler oder allgemeiner Stauung z.B. im Rahmen von Herzinsuffizienz (Links-, Rechts-), portaler Hypertension, Niereninsuffizienz oder Lungenembolie auf. Durch Anstieg des hydrostatischen (Herzinsuffizienz) oder Abnahme des onkotischen Druckes (Proteinverlust) in den Kapillaren tritt Flüssigkeit in den Pleuraspalt über. Bei Abnahme des intrapleurale Druckes infolge Atelektase ist dieses Phänomen ebenfalls festzustellen. Transsudate sind meist zellarm (vorwiegend Lymphozyten) und haben einen geringen Eiweißgehalt ($<30\text{g/l}$) sowie ein niedriges spezifisches Gewicht ($<1,015\text{ g/l}$). Sie bilden einen Anteil von 30-40% bei Ergüssen seröser Körperhöhlen.

Exsudate entstehen durch vermehrte Kapillarpermeabilität für Eiweiß und Zellen (Leukozyten, Lymphozyten) im Rahmen entzündlicher Prozesse. Der Eiweißgehalt ist durch Austritt von Akut-Phase-Proteinen (z.B. CRP) und Antikörpern erhöht ($> 30\text{ g/l}$). Der Erguss ist zellreich und hat ein höheres spezifisches Gewicht ($> 1,015\text{ g/l}$) als Transsudate. Ein gestörter Lymphabfluss bei tumorösen Erkrankungen kann ebenfalls einen zell- und eiweißreichen Erguss verursachen.

In 25-36% aller Ergüsse seröser Körperhöhlen ist eine Entzündung, die Ursache. Erkrankungen wie die Pleuritis (bakteriell, viral, fungal oder parasitär) stellen den größten Anteil an den Exsudaten entzündlichen Ursprungs dar. Im Rahmen anderer Grunderkrankungen (Rheumatismus, Sarkoidose, Kollagenosen oder Asbestose) kann es jedoch ebenfalls zur Ausbildung entzündlich bedingter Ergüsse kommen (Hausheer et Yabro, 1985).

Neoplastische Exsudate stellen mit einem Anteil von mehr als 40% der Ergüsse von Pleura und Peritoneum eine große Teilgruppe dar. Ihr Anteil bei Perikardergüssen liegt mit 24% niedriger (Van Haam, 1977).

Auslösende Ursache sind vorwiegend metastatische Karzinome (Mamma-, Kolon- und Lungen-Tumoren); ferner sind maligne Lymphome, Leukämien und das seltenere maligne Mesotheliom zu nennen. Da maligne Tumoren heute neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen zählen, ist ihre frühe Diagnose im Hinblick auf Therapie und Prognose eines Patienten wichtig. Die standardisierte zytologische Diagnostik von neoplastischen Ergüssen seröser Körperhöhlen vermag dies zu leisten.

1.1.3 Klinisches Vorgehen

Aufgrund der vielen ätiologischen Möglichkeiten, die sich dem Kliniker offenbaren, stellt sich die Problematik der genauen Abklärung der Ergussursache, da diese von großer Relevanz für die weitere Therapie des Patienten ist (Classen et al., 1994).

Für die weitere diagnostische Abklärung bietet sich als minimalinvasiver Eingriff die Ergusspunktion an.

Es kann jede seröse Höhle des Körpers vom Diagnostiker erreicht werden. Ergüsse können zu therapeutischen oder diagnostischen Zwecken punktiert werden. Während einer chirurgischen Intervention ist es möglich, Flüssigkeit aus den serösen Höhlen durch Aspiration, Bürstung oder lokale Waschung verdächtiger Bezirke bzw. der ganzen Höhle, falls die Ergussmenge zu gering ist, zu gewinnen. Dieses wird häufig bei so genannten "second look-Operationen" durchgeführt (Ziselman et al., 1984). Darüber hinaus können bei endoskopischen Untersuchungen Ergussflüssigkeiten gewonnen werden: bei der Thorakoskopie, der Laparoskopie und der Perikardioskopie. Weiterhin können durch Drainagen der Thoraxhöhle oder des Peritoneums oder von Dialysaten Ergüsse gewonnen werden.

Die diagnostische Sicherheit der Ergusszytologie ist abhängig von der Zellzahl im Erguss. Die Zellen eines Ergusses befinden sich vorwiegend am "tiefsten Punkt" einer Körperhöhle, da sie dorthin sedimentieren. Dort sollte für zytodiagnostische Zwecke nach Möglichkeit punktiert werden. Die Punktionsstelle könnte somit bei einem stehenden Patienten eine andere sein als bei einem bettlägerigen oder in Operation befindlichen.

Je nach diagnostischer Fragestellung wird der Kliniker bestimmte Laboruntersuchungen bei Ergüssen seröser Körperhöhlen wählen. Möglich sind biochemische Untersuchungen, wie z.B. das Gesamt-Eiweiß, Glukose, Amylase oder das Gesamt-Fett. Weitere mögliche Untersuchungen sind morphologisch-zytologische, wie Zellzählungen, Bestimmung des Anteils der entzündlichen zellulären Komponente und die Suche nach Tumorzellen mit Spezialfärbungen und Immunzytochemie. Ferner kommen quantitativ-analytische Methoden wie die DNA-Zytometrie in Frage. Daneben bieten sich mikrobiologische Untersuchungen an, z. B. durch Zellkulturen oder Gramfärbungen sowie immunologische, z.B. der Rheumafaktoren, des Komplements oder antinukleärer Antikörper. Schließlich kommen Methoden wie die Zellkultur oder die Zytogenetik in Frage.

Die geeigneten Untersuchungen wird der Kliniker nach der für ihn im Vordergrund stehenden Differentialdiagnose einsetzen.

Der Erguss sollte möglichst zügig nach Entnahme den verschiedenen Laboratorien zugesandt werden. Für zytologische Untersuchungen ist ein Volumen von 50-100 ml geeignet, sofern vorhanden. Je größer das Volumen, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, diagnoseweisende Zellen zu finden. Zellen in Ergüssen sind zwei bis drei Tage bei Raumtemperatur haltbar ohne lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen zu erleiden. Falls eine Zustellung des Ergusses in diesem Zeitraum nicht möglich ist, sollte dieser vor Ort zentrifugiert werden (340 g/5 min). Anschließend sollten Ausstrichpräparate vom Sediment (Kapitel 2.2.1) hergestellt und dem Labor zugesandt werden. Es sollte jedoch immer in erster Linie eine möglichst schnelle Einsendung des nativen Ergusses angestrebt werden, da mit dem frischen Material noch Zusatzuntersuchungen, wie Immunzytochemie, DNA-Bild- und -Flowzytometrie oder ggf. eine Zellkultur zur Verbesserung der diagnostischen Sicherheit eingesetzt werden können.

Von großer Wichtigkeit für den Zytopathologen sind klinische Informationen zur Patientenanamnese, den wesentlichen klinischen Befunden und der diagnostischen Fragestellung. Anderenfalls ist eine korrekte diagnostische Interpretation der mikroskopischen Morphologie oft nicht möglich. Wichtige Hinweise sind z.B. einem Erguss möglicherweise zugrunde liegende Erkrankungen, wie z. B. eine Herzinsuffizienz, eine portale Stauung, ein bekannter Primärtumor oder eine Pankreatitis. Weiterhin ist die Mitteilung eingesetzter therapeutischer Maßnahmen, wie z.B. eine durchgeführte Bestrahlung oder Chemotherapie von großer Wichtigkeit, da diese Zellveränderungen verursachen können, welche zu Verwechslungen mit Krebszellen führen können.

1.1.4 Aufbereitungsmethoden/Färbungen

Es gibt verschiedene Aufarbeitungsmethoden, um Zellen in Ergüssen zu konzentrieren. Die am häufigsten verwendeten sind a) die Zentrifugation, gefolgt von einer Ausstrichpräparation des Sediments, b) die Zytozentrifugation des Ergusses direkt auf Objektträgern mittels Zytozentrifugen bei geringen Ergussvolumina oder klaren Transsudaten, bei denen eine geringe Zellzahl zu erwarten ist und c) die

Zellblocktechnik, bei der das gesamte Zellpellet nach Zentrifugation fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend wie Gewebe geschnitten wird.

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

Die zwei in der diagnostischen Ergusszytologie am häufigsten angewandten Färbemethoden sind die nach Papanicolaou (Pap.-) und die May-Grünwald-Giemsa-Färbung (MGG). Der Papanicolaou-Färbung muss ein alkoholisches Fixativ (Delaunay), der May-Grünwald-Giemsa-Färbung eine Lufttrocknung vorausgehen. Nach Pap.- und nach MGG gefärbte Zellen unterscheiden sich wie folgt: Die Papanicolaou-Färbung zeigt Zellen, deren Kernchromatindetails sowie Zytoplasmastrukturen (z.B. strähnig-wabig bei Plattenepithelien) exzellent zur Darstellung kommen. Dagegen zeigt die MGG-Färbung Zellen, die aufgrund der Lufttrocknung größer als nach Alkoholfixation bleiben, was eine bessere Beurteilung vor allem der Zellen bei Leukämien und Lymphomen zulässt.

Luftgetrocknete MGG-gefärbte Präparate eignen sich nach der Routine-Diagnostik insbesondere für die DNA-Zytometrie (nach Entdeckung und Umfärbung nach Feulgen) und für eine AgNOR-Analyse (nach Entdeckung und Silberfärbung).

Nach Delaunay fixierte und nach Papanicolaou gefärbte Präparate eignen sich nach der Routine-Diagnostik vor allem für eine immunzytochemische Untersuchung (Entdeckung und anschließende Färbung nach der Avidin-Biotin-Complex-Methode).

1.2 Treffsicherheit der konventionellen zytologischen Diagnostik

Die Sensitivität der konventionellen zytologischen Diagnostik für die Detektion von malignen Zellen in Ergüssen beträgt nur etwa 58% (Durchschnitt aus einer Literaturübersicht über mehr als 6.000 Fälle aus sechs Studien, Spriggs und Boddington, 1989).

Dieses bedeutet, dass 42% der Tumoren, die in die serösen Häute streuen, zytologisch in den Ergüssen nicht detektiert werden (falsch negative Diagnosen).

Die Spezifität beträgt ca. 97%, so dass im Mittel 3% der zytologischen Diagnosen in Ergüssen falsch positiv sind.

Der positive Prädiktionswert wird im Mittel mit 99,3 %, der negative Prädiktionswert mit 80 % angegeben.

1998 führten Motherby und ihre Mitarbeiter am Institut für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eine Studie an 300 Ergüssen zur Ermittlung der Masszahlen diagnostischer Treffsicherheit der Cytodiagnostik durch.

Sie konnten eine Sensitivität von 50% und eine Spezifität von 97% nachweisen. Für den positiven und negativen Prädiktionswert erzielten sie 96% und 87%. Ferner gaben sie die histogenetische Klassifikationsgenauigkeit mit 88% und die Gesamt-treffsicherheit mit 89% an (Motherby et al., 1998).

Eine Verbesserung der diagnostischen Treffsicherheit, insbesondere der Detektionsrate maligner Zellen (Sensitivität) ist daher dringend notwendig. Dabei darf allerdings eine Erhöhung der Sensitivität keinesfalls zu Lasten der Spezifität gehen. D. h. das Auftreten falsch positiver zytologischer Diagnosen muss unbedingt vermieden werden (Koss, 1992).

1.3 Adjuvante Methoden der Ergusszytologie

Die technischen Entwicklungen der letzten Jahrzehnte ermöglichen heute neben der Zytologie den Einsatz einer Reihe von adjuvanten Methoden, die in der Abklärung zytologisch unklarer Ergüsse eingesetzt werden können.

In der Diagnostik von Ergüssen seröser Körperhöhlen verwendete adjuvante Verfahren wie die *Immunzytochemie*, *DNA-Zytometrie*, *Elektronenmikroskopie*, *Zytogenetik*, *Spezialfärbungen* oder *AgNOR-Analyse* können die Treffsicherheit der Zytodiagnostik signifikant verbessern, ohne Einfluss auf die Spezifität zu nehmen.

Die Zytologie kann die Differenzierung zwischen Transsudaten, Exsudaten sowie neoplastisch verursachten Ergüssen ermöglichen. In der Diagnostik neoplastischer Ergüsse ist darüber hinaus eine detaillierte Untersuchung zur histogenetischen Klassifikation bzw. zur Bestimmung der Primärlokalisation eines Tumors und des Differenzierungsgrades (Malignitäts-Grading) durchführbar. Dies erlaubt eine an das jeweilige Tumorstadium angepasste Therapie bzw. die Erfolgskontrolle einer bereits begonnenen Behandlung.

Während histologische Untersuchungen die Entnahme einer Gewebeprobe in Form einer Biopsie, einer Probeexzision in einem tumorverdächtigen Bezirk oder die Entnahme eines ganzen Tumors voraussetzen, kann die Zytologie auf weniger belastende Probenahmeverfahren wie die Punktion von Körperflüssigkeiten (z.B. Aszites, Pleuraerguss, Perikarderguss), die Feinnadelaspirationsbiopsie (z.B. Lymphknoten, Schilddrüse), die Gewinnung von Körperflüssigkeiten (z.B. Urin) oder Schleimhautabstrichen (z.B. Zervix) zurückgreifen.

Eine verbindliche Beurteilung ist allerdings nur dann möglich, wenn das entnommene Material repräsentativ und anschließend nach einem für die Zytologie optimierten, standardisierten Protokoll aufbereitet worden ist (vgl. Kapitel 2.2.1 Abbildung 3).

Wie bereits erwähnt ist die Sensitivität der Zytologie in der Diagnostik von Ergüssen seröser Körperhöhlen mit 58% unbefriedigend; eine Verbesserung durch Hinzuziehen adjuvanter Methoden ist demnach anzustreben.

1.3.1 Immunzytochemie

Immunzytochemische Untersuchungen an zytologischen Präparaten von Ergüssen seröser Körperhöhlen werden seit etwa zwanzig Jahren durchgeführt.

Die Immunzytochemie beruht auf dem immunologischen Nachweis bestimmter Zytoplasma-, Zellmembran- oder Zellkernepitope, die einen Hinweis auf die histogenetische Herkunft der Zelle geben können (Zellnachweis durch Sichtbarmachung des Immunkomplexes mit Hilfe von an spezifischen Antikörpern gebundenen speziellen Farbstoffen).

Immunzytochemische Untersuchungen können in der Diagnostik von soliden Tumoren eingesetzt werden. So kann z.B. an durch eine Feinnadelaspirationsbiopsie eines vergrößerten Lymphknotens gewonnenen Zellen mittels immunzytochemischer Techniken auf die histogenetische Herkunft eines, bisher unbekannten Primärtumors rückgeschlossen und die weitere Diagnostik gezielt ausgerichtet werden.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit der Immunzytochemie besteht in der Identifizierung von ortsfremden epithelialen Zellen in Ergüssen seröser Höhlen, um auf diese Weise das Vorliegen eines metastasierten Karzinoms nachzuweisen. In der Differentialdiagnose der metastatischen Karzinome kommen bestimmte Antikörper bei Untersuchungen von Ergüssen zur Anwendung, die durch solche des Ovars, der Brust oder des Bronchialtrakts verursacht werden.

Der diagnostische Wert der Immunzytochemie für die Identifizierung von malignen Zellen in Ergüssen ist in der Literatur gelegentlich betont worden (Mason et al., 1987, Silverman et al., 1987, Bedrossian, 1994, Shield et al., 1994, Guzman et al., 1995, Bedrossian, 1998a). Es gibt eine Reihe von Arbeiten über die Anwendung spezifischer Antikörper für die immunzytochemische Identifizierung von Primärtumoren verschiedener metastatischer Karzinome in Ergüssen, z. B. des Ovar (Guzman et al., 1988b, Cuijpers et al., 1993), der Brust (Guzman et al., 1988a) oder beider (Athanasidou et al., 1994) oder von Bronchialkarzinomen (Guzman et al., 1990).

Mit Hilfe der Immunzytochemie kann in der Zytologie eine Verbesserung der histogenetischen Klassifikationsgenauigkeit erreicht werden (Motherby et al., 1999, Matter-Walstra und Kraft, 1996).

1.3.1.1 Immunzytochemie Färbemethoden

Immunzytochemische Färbemethoden dienen der Markierung eines Antigens in Zytoplasma, Zellmembran oder -kern. Das Prinzip dieser Methode wurde erstmals 1965 von BEUTNER et al. für den Nachweis und die Quantifizierung humaner Autoantikörper in der Fluoreszenzmikroskopie angewandt und später durch MASON und SAMMONS in einem immunenzymatischen Verfahren wiederentdeckt (Mason et Sammons, 1979).

Es stehen verschiedene Methoden, wie zum Beispiel die Immunperoxidase-Technik (Haska, 1997), die Avidin-Biotin-Methode (Haska, 1997, Matsumara et al., 1989, Shepherd et Richman, 1988) die APAAP-Methode (Cordell et al., 1984), sowie das Immunfluoreszenzverfahren (Verheijlen et al., 1989) zur Verfügung.

Die Avidin-Biotin-Methoden

Das einfachste Verfahren, welches die starke Affinität zwischen Biotin und Avidin ausnutzt, ist das Zweischrittverfahren nach CLARC und TODD (Clark and Todd, 1982), 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 (Haska, 1997).

Daher hat es sich als sinnvoller erwiesen, ein Dreischrittverfahren anzuwenden. Zwei Methoden arbeiten nach diesem Prinzip: Die LAB-(Labeled-Avidin-Biotin-)Methode (Warnke et Levy, 1980) und die im Rahmen unserer Studie verwendete ABC-(Avidin-Biotin-Complex-)Methode (Hsu et al., 1981).

Die ABC-Methode

Die ABC-Methode ist das empfindlichste Verfahren in der Immunzytologie (Hsu et al., 1981). Dabei wird zunächst, wie in den anderen Verfahren auch, das Antigen mit einem spezifischen Antikörper, dem Primärantikörper, markiert.

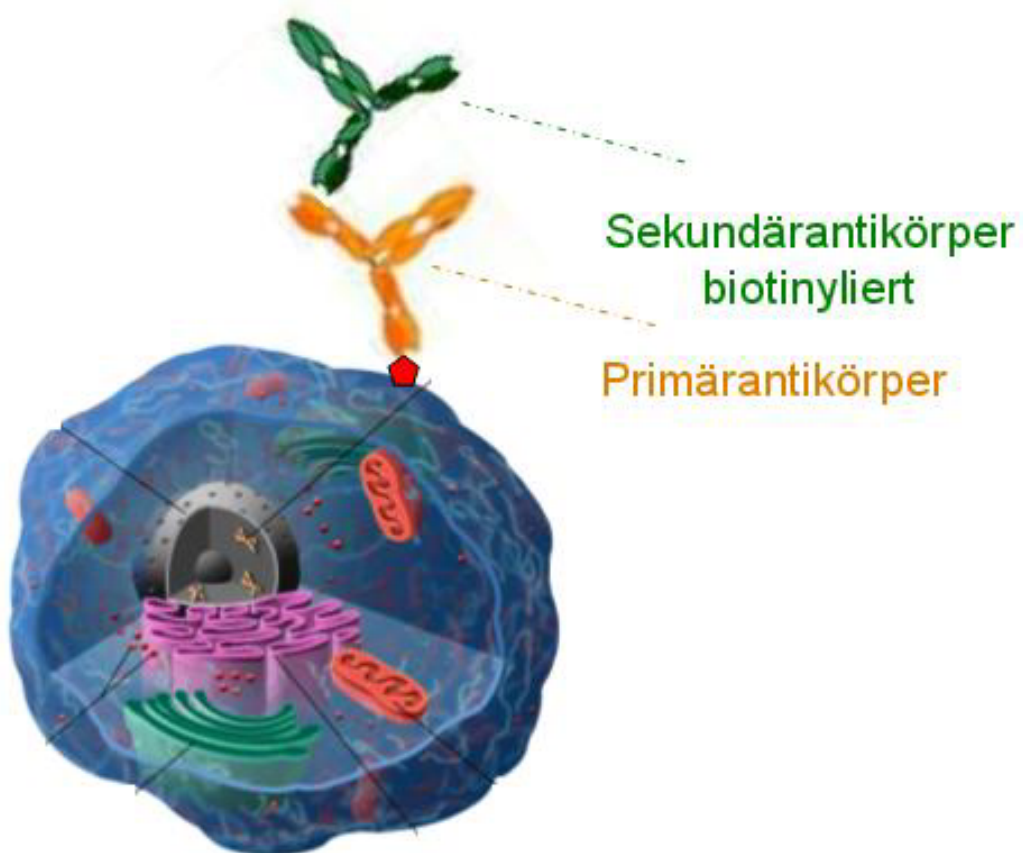
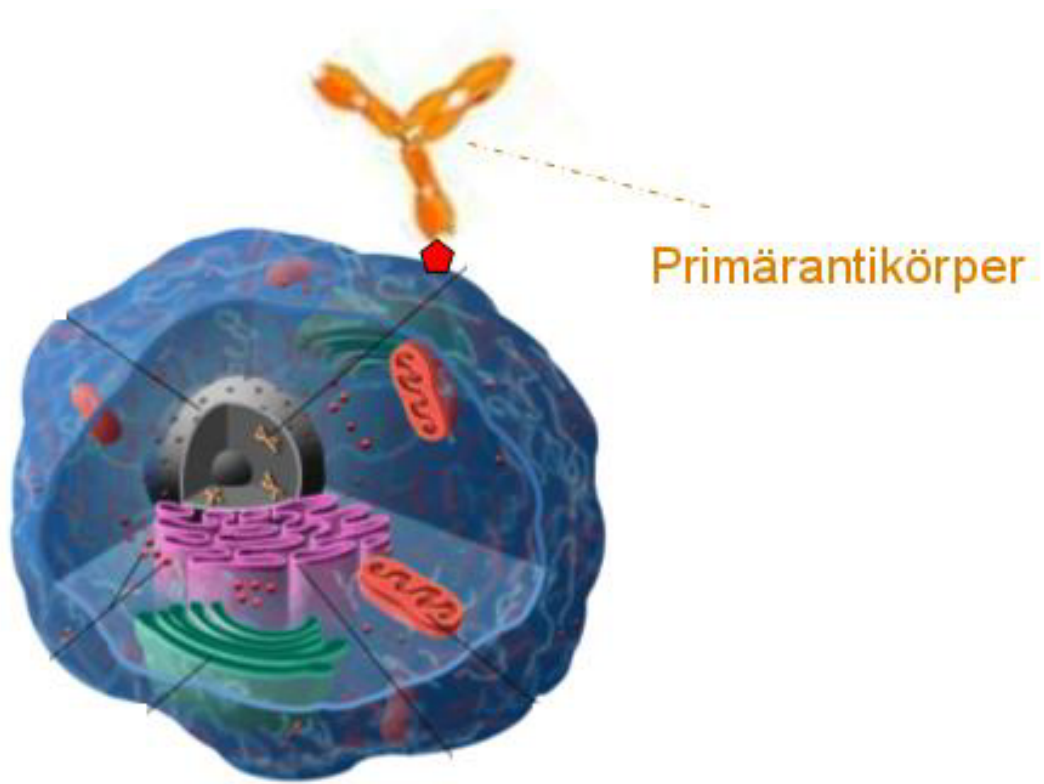
Im zweiten Schritt wird ein biotinylierter Sekundärantikörper (LINK) zugegeben, der an den Primärantikörper bindet. Im dritten Schritt wird ein Komplex aus biotinylierter Peroxidase und Avidin verwendet (die Avidin-Biotin-Bindung ist praktisch irreversibel Green, 1963). Das Avidin-Biotin-Verhältnis ist 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 (Haska, 1997). 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 (Giorno et Kohler, 1983, Haska, 1997).

Peroxidasen, wie im ABC-Komplex verwendet, katalysieren die Oxidation eines Substrates durch Wasserstoffperoxyd (Haska, 1997). 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 (Streefkerk, 1972).

Dabei wird bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten eine 0,3% H_2O_2 -Methanol-Lösung verwendet (Haska, 1997).



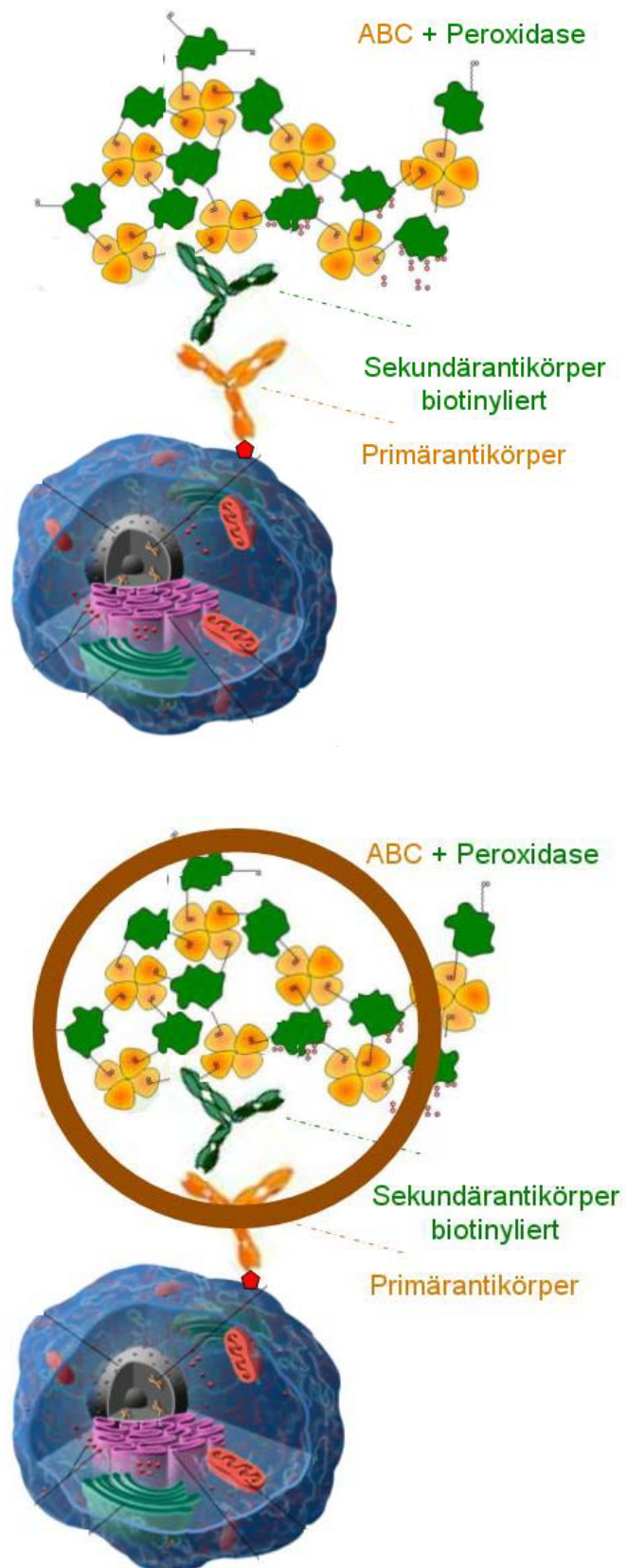


Abbildung 2: Immunzytochemische Färbung nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode

1.4 Ziele und Herleitung der Fragestellung

1.4.1 Das Studienkonzept :

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Kohortenstudie an Patienten mit serösen Körperhöhlenergüssen bei bekanntem (Subkohorte 1: n=79) und unbekanntem Primärtumor (Subkohorte 2: n=101) zum Zweck der Primärtumor-Identifizierung an Tumorzellen mittels der Immunzytochemie.

1.4.2 Ziele der hier vorliegenden Studie:

1. Bestimmung der Prävalenz und Quantifizierung einer Immunreaktion gegenüber sechs verschiedenen monoklonalen Antikörpern (CK5/6, CK7, CK20, TTF1, CDX2, CA125) als Grundlage für die Identifizierung der Primärtumoren von Karzinometastasen klinisch unbekannter Herkunft.
2. Verbesserung der Tumor-Klassifikations-Genauigkeit der immunzytochemischen Diagnostik, durch ein Antikörperpanel, bestehend aus CK5/6, CK7, CK20, TTF1, CDX2 und CA125.
3. Etablierung eines diagnostischen Algorithmus aus den immunzytochemischen Untersuchungsergebnissen der Subkohorte 1 (n=79).
4. Aufzeigen der Gültigkeit (diagnostischer Wert/Treffer sicherheit) des von uns aufgestellten diagnostischen Algorithmus durch Überprüfung im prospektivem Studienarm (Subkohorte 2: n=101).
5. Bestimmung der Maßzahlen diagnostischer Treffer sicherheit (Sensitivität, Spezifität, positiver-/negativer Prädiktionswert, Gesamttreffer sicherheit und Klassifikations-Genauigkeit).
6. Methodische Adaptation der Immunzytochemie an die zytologische Diagnostik von Ergüssen seröser Körperhöhlen und Etablierung der Immunozytochemie als adjuvante Methode in der zytologischen Routine-Diagnostik.

1.4.3 Die Fragestellung :

Eignet sich die Immunzytochemie unter Verwendung des Markerpanels CK5/6, CK7, CK20, TTF1, CDX2 und CA125 als Methode zur Identifizierung des Primärtumors von Karzinometastasen klinisch unbekannter Herkunft an metastatischen Tumorzellen in Körperhöhlenergüssen in der zytologischen Routine-Diagnostik?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenpopulation und Ausgangsmaterial

Für die vorliegende Studie wurden die zytologischen Diagnosen der Ergüsse aus serösen Höhlen (Pleura, Peritoneum und Perikard) von insgesamt 207 Patienten, sowie die entsprechenden Akten des Instituts für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ausgewertet. In allen 207 Fällen wurde zytologisch eine tumorzellpositive Diagnose gestellt. Von den ursprünglich 207 Patientendaten, die für den Studieneinschluss evaluiert wurden, haben 27 Patientendaten die Einschlusskriterien nicht erfüllt und konnten daher nicht an der Studie teilnehmen. Die absolute Zahl der in die Studie eingehenden Patienten betrug somit 180.

Die 180 Ergüsse seröser Körperhöhlen setzten sich wie folgt zusammen:

118 Pleuraergüsse

53 Peritonealergüsse

9 Perikardergüsse

2.1.2 Einschlusskriterien für die Studie:

- I. Ergüsse seröser Körperhöhlen, welche im entsprechenden Zeitintervall, d.h. zwischen November 2001 und November 2003 konsekutiv gesammelt wurden und den Routine-Einsendungen des Instituts für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität entstammten.
- II. Ergüsse seröser Körperhöhlen, mit morphologischem Zelnachweis eines metastasierenden nicht-kleinzelligen Karzinoms (multiple Tumorzellen), die zytologisch bereits als "sicher positiv" diagnostiziert wurden (Böcking, 1998a).
- III. Ergüsse seröser Körperhöhlen, welche ausreichend natives Material (ausreichend Tumorzellen) enthielten für eine immunzytochemische Untersuchung (Herstellung von acht Objektträgern), so dass eine spezifische Immunzytochemie nachgewiesen werden konnte.

IV. Ein klinisches Follow-up konnte eingeholt werden, so dass eine Datenauswertung möglich war.

Die Punktionen erfolgten bei der Patientenpopulation in einem Zeitraum von November 2001 bis November 2003 durch insgesamt 51 verschiedene Einsender und stammten aus dem Universitätsklinikum Düsseldorf sowie Krankenhäusern der näheren Umgebung. Bei allen Patienten wurde die Diagnose entweder durch ein histologisches- und/oder klinisches Follow-up (eingeholt nach 12-16 Monaten) gesichert und bestätigt.

2.1.3 Materialgewinnung und Versand

Die Ergüsse werden zu therapeutischen und/oder diagnostischen Zwecken punktiert. Diese wenig invasive Maßnahme ist ambulant durchführbar. Die Materialgewinnung für die Zytodiagnostik der serösen Ergüsse erfolgt durch Punktion unter Ultraschallkontrolle. Die Punktion sollte am tiefsten Punkt der Höhle (abhängig von der Lage des Patienten) erfolgen, da die diagnostisch relevanten Zellen dorthin sedimentieren. Durch Erzeugung von Unterdruck werden Zellen in die Nadel aspiriert, dabei ist jede Stelle des Körpers mit einer Zielgenauigkeit von ca. 3 mm erreichbar. Das Durchstechen von Gefäßen mit den nur 0,7 mm dicken Nadeln führt zu keinen Blutungskomplikationen. Eine Provokation von Fernmetastasen ist nicht zu befürchten. Weil die zytologische Treffsicherheit von der Menge des untersuchten Materials abhängt (Böcking et al., 2000), ist es ratsam, möglichst große Volumina oder mehrere Proben einzusenden. Die Punktatmenge variiert zwischen 50-100 ml. Das Material wird nativ in sterilen, bruch sicheren und dicht schließenden Gefäßen versandt. Die diagnostisch relevanten Zellen überstehen in der eiweißreichen Ergussflüssigkeit eine zwei- bis dreitägige Reise ohne morphologisch oder immunologisch Schaden zu nehmen. Die Versendung des Ergusses erfolgt gemeinsam mit einem Begleitzettel, auf dem der Kliniker die wesentlichen klinischen Befunde und die diagnostische Fragestellung mitteilt. Dies ist von großer Bedeutung für die Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik.

2.2 Methoden zytologischer Untersuchungen

2.2.1 Herstellung der Ausstrichpräparate für die Ergusszytologie

Nach der Punktion der Ergüsse in den jeweiligen Kliniken wurde das Material samt Begleitzettel an das Institut für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gesandt. Dort wurde es gekühlt (4°C) aufbewahrt, unter diesen Umständen ist es zwei bis drei Tage haltbar, sofern möglich, erfolgte jedoch die Präparation noch am selbigen Tag.

Es stehen verschiedene Aufbereitungsmethoden, um Zellen zu konzentrieren, zur Verfügung. Die von uns verwendete Methode ist Zentrifugation gefolgt von einer Ausstrichpräparation des Sedimentes.

Die für die diagnostischen Zwecke benötigte Ergussflüssigkeit wird in eine Einmalspritze aspiriert und in ein Zentrifugenspitzenröhrchen entleert. Das Nativ-Material wurde zunächst zentrifugiert (5 Minuten, 340 g) und dann dekantiert, so dass nur die Zellen zurückblieben, sowie 2 bis 3 ml Flüssigkeit im Überstand. Diese Suspension wurde aufgeschüttelt, dann erfolgte die Entnahme einiger Milliliter mittels einer Pasteur-Pipette.

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 auseinander gezogen.

Auf diese Weise erhielt man jeweils zwei mit Zellen beschichtete Präparate. Insgesamt wurden auf diese Weise acht Objektträger pro Probe hergestellt. Die Präparate wurden von diesem Punkt an unterschiedlich behandelt, je nachdem für welche Färbung sie im Weiteren verwendet werden sollten.

Nach dem Auseinanderziehen der Objektträger wurden drei Objektträger luftgetrocknet und nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt, einer davon diente der DNA-Bildzytometrie. Die anderen fünf Objektträger wurden für die Immunzytochemie direkt in eine Modifikation des Delaunay-Fixativ (500ml Äthanol plus 500ml Aceton, Riedel-de-Haen, Seelze, Nr.24201) plus 10 Tropfen 1- molarer Trichloressigsäure (Merck, Darmstadt, Nr.1.00807.0100) fixiert und für die Färbung nach Papanicolaou vorbereitet. Dies musste schnell geschehen, um ein Antrocknen der Zellen auf dem Objektträger zu verhindern. Alle acht Objektträger wurden dann der zytologischen

Diagnostik zugeführt (vgl. hierzu Kapitel 2.2.2). Nach Entfernen der Deckgläser in Xylol konnte die immunzytochemische (nach der Avidin-Biotin-Complex-Methode) bzw. Feulgen-Färbung durchgeführt werden (vgl. hierzu Abbildung 3).

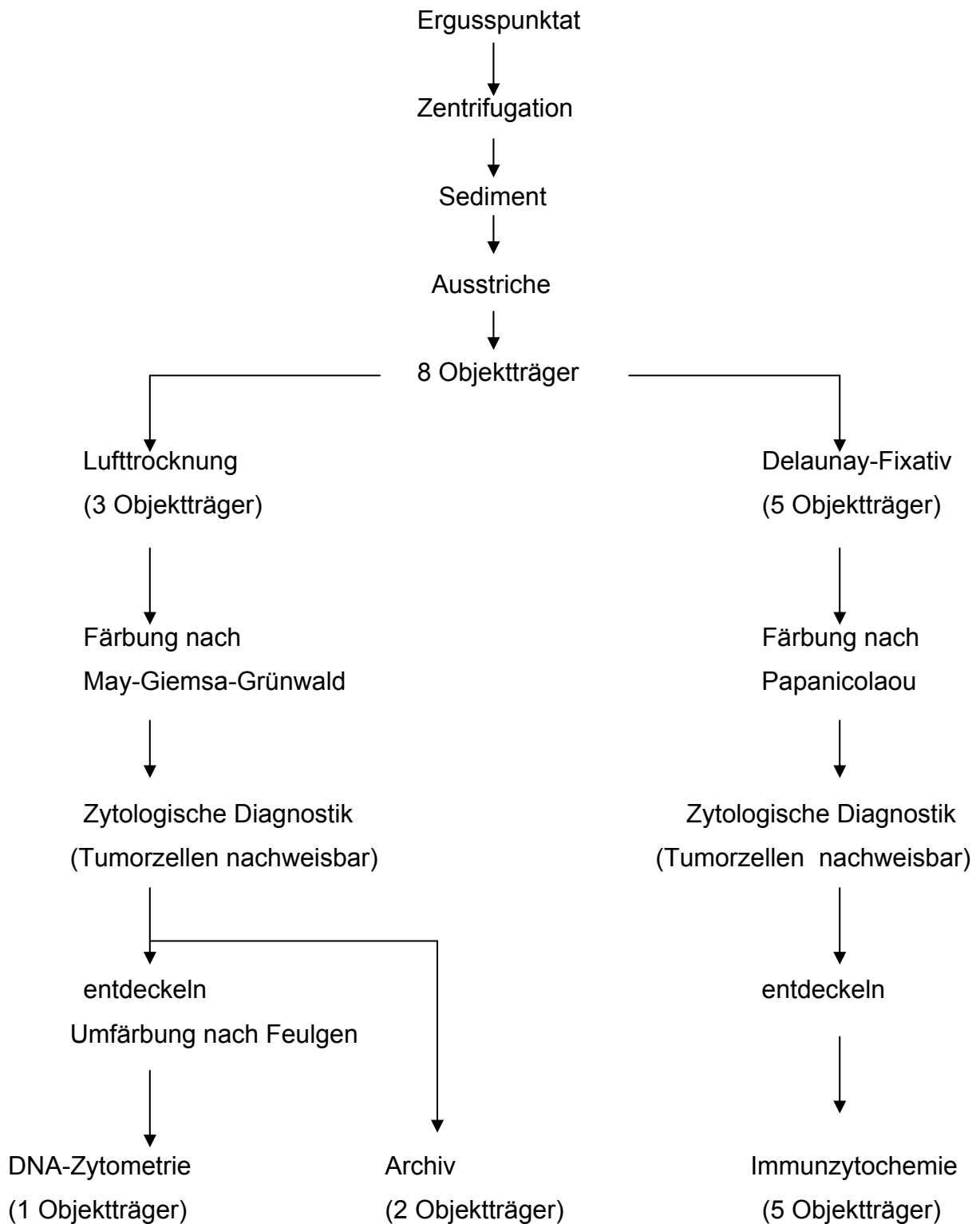


Abbildung 3: Präparationsschema zur Herstellung von Ausstrichpräparaten aus Körperhöhlenergüssen für eine zytologische, immunzytochemische und DNA-Bild-zytometrische Untersuchung

2.2.2 Durchführung der zytologischen Untersuchungen

2.2.2.1 Diagnostische Kriterien für Malignität

Die Ausstriche wurden von einer erfahrenen Zytopathologin, Frau Doktor Pomjanski, begutachtet. Für die Identifikation maligner Zellen waren folgende, in der Fachliteratur bekannte, diagnostische Kriterien relevant (Bedrossian, 1994, Koss 1992, Bibbo, 1991).

1. Nachweis von Zellverbänden, die aus mehr als vier Zellen bestanden
2. exzentrische Lokalisation von Zellkernen
3. vergrößerte Kern/Plasma-Relation
4. ausgeprägte Anisonukleose (unterschiedliche Größe der Zellkerne)
5. Kernpolymorphie (Vielgestaltigkeit der Zellkerne)
6. Überlappungen von Zellkernen
7. Irregularität der Zellkernmembran
8. Hyperchromasie und Anisochromasie (unterschiedliche Anfärbbarkeit)
9. Vergrößerung des Chromatinmusters
10. Vermehrung und Vergrößerung von Nukleonen

2.2.2.2 Diagnostische Kategorien/zytologische Klassifikation (Stufung der Malignitätswahrscheinlichkeit)

Die zytologische Bewertung der serösen Ergüsse erfolgte standardisiert nach der Nomenklatur für die extragenitale Zytologie der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und Zytologie nach Böcking und Freudenberg, 1998b. Die Präparate wurden nach den oben aufgezählten allgemein akzeptierten diagnostischen Kriterien ausgewertet (Bedrossian, 1994, Böcking, 1998b, Koss, 1992). Die zytologischen Diagnosen wurden in folgende fünf Kategorien eingeteilt:

„unzureichend“:	Präparate ohne Zellen oder mit lediglich autolytischem oder nekrotischem Zellmaterial.
„negativ“:	Fälle, bei denen bösartige Zellen nicht nachweisbar sind. Es liegen ausschließlich normale und/oder proliferierte und/oder reaktiv veränderte Zellen (entzündlich oder degenerativ) vor (z.B. Mesothelien oder

	Entzündungszellen). Die Malignitätswahrscheinlichkeit beträgt 0%.
„zweifelhaft“:	Fälle, bei denen bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen sind, d.h. wenige atypische Zellen (z.B. abnorm aktivierte oder proliferierte Mesothelien oder wenige stark degenerativ veränderte Tumorzellen) liegen vor, die eine weitere Abklärung durch adjuvante Methoden (Immunzytochemie/DNA-Zytometrie) bzw. Wiederholung der Ergusspunktion angeraten sein lassen.
„dringend verdächtig“:	Fälle, bei denen das Vorkommen bösartiger Zellen wahrscheinlich ist. Dabei können die diagnostischen Kriterien für eine sichere Annahme der Malignität nicht hinreichend ausgeprägt sein, oder es liegen zu wenige Tumorzellen vor, um eine sichere Diagnose zu stellen. Die Diagnosesicherung durch eine adjuvante Methode ist empfehlenswert.
„positiv“:	wenn die Ergüsse eindeutig maligne Zellen enthielten. Der vermutete Tumortyp wird soweit wie möglich spezifiziert. Die Malignitätswahrscheinlichkeit beträgt 100 %.

2.3 Immunzytochemische Untersuchungen

Immunzytochemische Färbemethoden dienen der Markierung eines Antigens in Zytoplasma, Zellmembran oder -kern. Diese Antigene können sowohl physiologisch vorkommen, als auch durch viele maligne Prozesse induziert sein. So kann ein Tumor wie z.B. das Lungenkarzinom, der das Antigen (TTF1) exprimiert, durch die Anwendung des immunzytochemischen Markers Anti-TTF1 diagnostiziert werden. In dieser Studie wurden für die immunzytochemischen Untersuchungen sechs verschiedene Antikörper in Kombination angewandt, und zwar solche, die einerseits in mehreren Studien anderer Autoren am häufigsten verwendet worden sind (TTF1, CA125, CDX2) und andererseits diejenigen, die ortsfremde epitheliale Zellen in Ergüssen seröser Höhlen detektieren (CK5/6, CK7, CK20). Auf diese Weise kann eine Erkennung von Zellen metastasierender Karzinome in solchen Präparaten ermöglicht werden.

2.3.1 Herstellung der Präparate für die immunzytochemischen Untersuchungen

(Vorbereitung und Färbung der Präparate)

Die Durchführung immunzytochemischer Untersuchungen erfolgte entsprechend der von Dalquen entwickelten Methode (Dalquen et al., 1993). Im Anschluss an die Fixierung nach Delaunay und der Färbung nach Papanicolaou wurden die für die Immunzytochemie interessanten Zellen auf dem Objektträger mittels Filzschreiber markiert. Um die Zellmarkierungen für den weiteren Auswertungsvorgang zu erhalten, wurde vom Objektträger mittels eines konventionellen Kopiergerätes eine Kopie hergestellt. Nach den folgenden Färbegängen konnten die zytologisch auffälligen Areale des Objektträgers durch Vergleich mit dieser Kopie rekonstruiert werden. Die Deckgläser wurden anschließend in Xylol entfernt. Wenn nötig, d.h. für den Fall, dass nur wenige verdächtige Zellen vorhanden waren, wurden die Objektträger durch einen Dako-Pen (Dako, Glostrup, Dänemark, No.: S2002) in zwei Abschnitte eingeteilt, so dass eine Anwendung verschiedener Antikörper auf demselben Objektträger möglich war. Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode wurde für die immunologische Reaktion angewendet (Dalquen et al., 1993). Die Inkubation der horizontal gelagerten Objektträger lief in einer feuchten Kammer ab. Alle weiteren, in

der Tabelle 1 dargestellten präparativen Schritte erfolgten bei aufrechter Position der Objektträger in Küvetten unter Raumtemperaturbedingungen. Zur Entfernung des Eindeckmediums und des Farbstoffes durchliefen die Präparate für jeweils 10 Minuten zwei Xylobäder. Es folgten zwei Äthanolbäder (100%), in denen die Präparate ebenfalls 10 Minuten verblieben. Abgeschlossen wurde dieser Schritt durch jeweils 10-minütiges Baden in zwei Äthanolbädern (96%).

Für den Fall, dass es sich um Kernantikörper handelt, wie bei den Markern TTF1, CDX2, ist ein zusätzlicher Schritt die Hitzebehandlung notwendig, welcher für die zytoplasmatischen Antikörper (CK5/6, CK7, CK20, CA125) wegfällt. Vorbereitende Schritte hierfür sind zum einen das Füllen des Glasfärbekastens mit 200 ml des PBS-Gebrauchspuffers, zum anderen wird der Citratpuffer (gemäß Tabelle 1) frisch angesetzt und in die Coplinküvette eingebracht. Im Anschluss hieran wird die Coplinküvette 30 Minuten lang im Wasserbad auf 80°C erwärmt. Die Objektträgerhalter samt den Objektträgern werden 5 Minuten lang mit dem PBS-Gebrauchspuffer gespült. Anschließend werden die Objektträger für 20 Minuten bei 80°C in die Coplinküvette gestellt. Die Coplinküvette wird nun aus dem Wasserbad heraus genommen, wobei die Objektträger für weitere 20 Minuten in ihr zum Abkühlen stehen gelassen werden. Dann werden die Objektträger wieder in den Objektträgerhalter gestellt. Es schließt sich nochmals ein 5 minütiges Spülen mit dem PBS-Gebrauchspuffer an.

Ab hier laufen die Behandlungsschritte sowohl für die Kernantikörper, als auch für die zytoplasmatischen Antikörper gleich ab. Es folgt die Hemmung der endogenen Peroxidase. Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde durch eine Inkubation mit 1ml H₂O₂ (30% Perhydrol, Merk, Darmstadt, Nr.:1.07209.0250) in 100 ml Methanol (Merck, Darmstadt, Nr.:1.06008, 250) gestoppt.

Nach dreimaligem, kurzem Spülen wurde jeder Objektträger zweimal in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS, Sigma, Deisenhofen, Nr.: D-1408) jeweils 10 Minuten lang gespült, um das verbleibende Äthanol aus den Präparaten zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation in normalem (Pferde-) Serum (für Mäuse-Antikörper) (225 µl: 15ml Aqua dest.) (Vector, Camon Laboratory Service, Wiesbaden, Nr.: S-2000) für 20 Minuten. Bei schräg gehaltenem Objektträger konnte dann die verbleibende Flüssigkeit abtropfen. Anschließend wurden die Objektträger mit dem Primär-Antikörper 12 Stunden bei 25 °C inkubiert (angewandte Antikörper, sowie deren Spezifikationen sind in der Tabelle 2 zusammengefasst). Ein

zweimaliger Spülvorgang der Objektträger in 0,5 M. TRIS (tris(hydroxymethyl)-aminomethan) bei einem pH-Wert von 7,6 in PBS 1:10 für jeweils 5 Minuten folgte. Dann wurden die Objektträger mit dem ABC-Elite-Standard (Vectastain, Camon Laboratory Service, Wiesbaden, Nr.: PK- 6100) für weitere 30 Minuten inkubiert und noch einmal in TRIS 0,5M (Boehringer, Mannheim, Nr.: 812838) in PBS 1:10 fünf Minuten lang gespült. Das Substrat-Chromagen-Reagens AEC (3-Amino-9-Äthylcarbazol) (Sigma, Deisenhofen, Nr.: A5754) wurde für 40 Minuten zugegeben. Es folgte ein zweimaliges Spülen in sterilem Aqua dest. für jeweils fünf Minuten. Die Gegenfärbung wurde durchgeführt mit Mayers Hämatoxylin (blau für 1 Minute), um im Mikroskop eine bessere Identifikation der Zellen zu gewährleisten. Es schloss sich ein Spülvorgang unter fließendem Wasser zur Entfernung überflüssigen Farbstoffes und Eindecken mit Aquatex (wasser-basiertes Fixations-Medium, Merck, Darmstadt, Nr.:1.08562) an.

Tabelle 1: Färbeprotokoll für die Immunzytochemie

Färbeschritt		Zeit bei RT#	Substanz
1	Vorbehandlung	10 Min.	Xylol
2		10 Min.	Xylol
3		10 Min.	Äthanol 100%
4		10 Min.	Äthanol 100%
5		10 Min.	Äthanol 96%
6		10 Min.	Äthanol 96%
7*	Hitzebehandlung	5 Min.	PBS-Puffer
			Citatpuffer (Stammlsg.A :1,8ml, Stammlsg.B: 8,2ml, Aqua-dest.steril.ad 100ml mischen und in Coplinküvette füllen, im Wasserbad auf ca. 80°C erhitzen)
		20 Min 80°C	Objektträger im Wasserbad (Coplinküvette)
		20 Min.	Objektträger in Coplinküvette abkühlen lassen

		5 Min.	PBS-Puffer
8	Stoppen der endogenen	30 Min.	1ml H ₂ O ₂ (30 % Perhydrol) auf 100 ml Methanol reinst
9	Peroxidase		3 mal mit PBS-Puffer spülen
10	Waschen	10 Min.	PBS-Puffer
11		10 Min.	PBS-Puffer
12	Inkubation 1. Tag	20 Min.	Normalserum
13			Flüssigkeit ablaufen lassen
14		12h bei 25°C	Primär-Antikörper
15	Waschen	5 Min.	Tris 0,5M in PBS 1:10
16		5 Min.	Tris 0,5M in PBS 1:10
17	Inkubation 2. Tag	30 Min.	LINK (Sekundär-Antikörper)
18	Waschen	5 Min.	Tris 0,5M in PBS 1:10
19		5 Min.	Tris 0,5M in PBS 1:10
20	Inkubation 2. Tag	30 Min.	ABC-Elite Standard
21	Waschen	5 Min.	Tris 0,5M in PBS 1:10
22		5 Min.	Tris 0,5M in PBS 1:10
23	Substrat-Chromogen-Reagenz	40 Min.	AEC
24	Spülen	5 Min.	Aqua dest. Steril
25		5 Min.	Aqua dest. Steril
26	Gegenfärbung	1 Min.	Mayer Hämatoxylin
27	Waschen	10 Min.	unter fließendem Wasser
28	Eindecken mit Aquatex		

Legende

= bei Raumtemperatur

7*= Zusätzlicher Präparationsschritt: (Hitzbehandlung betrifft lediglich Kernantikörper TTF1 und CDX2)

Tabelle 2: Spezifikationen der Antikörper, die im Rahmen der vorliegenden Studie benutzt worden sind (Art, Verdünnung, Hersteller/Spezifität von Primär-Antikörpern und Lokalisation des Färbeergebnisses).

CK5/6 (Basistyp Zytokeratin, 58 KD)	monoklonal, 1:200, Dako, Glostrup, Dänemark, Nr.7237, Klon D5/16 B4, intrazytoplasmatisch
CK7 (Basistyp Zytokeratin, 54 KD)	monoklonal, 1:1000, Dako, Glostrup, Dänemark, Nr.7018, Klon OV-TL, intrazytoplasmatisch
CK20 (intermediäres Filamentprotein, 46 KD)	monoklonal, 1:200, Dako, Glostrup, Dänemark, Nr.7019, Klon Ks 20.8, intrazytoplasmatisch
CA125 (hoch molekulares Glykoprotein, > 200 KD)	monoklonal, 1:1000, Dako, Glostrup, Dänemark, Nr.M 3519, Klon OC125, intrazytoplasmatisch
TTF1 (Thyroid- Transkriptionsfaktor)	monoklonal, 1:200, Arcis, Hiddenhausen, Deutschland, Nr.DM 285, Klon 8G7G3/1, intranukleär
CDX2 (intestinal- spezifischer- Transkriptionsfaktor; Homeobox- Gen)	monoklonal, 1:5000, BioGenex, The Hague, Niederlande, Nr.MU 392-UC, Klon CDX2-88, intranukleär

2.3.2 Auswertung der immunzytochemisch gefärbten Präparate

Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte durch eine erfahrene Zytopathologin, Frau Doktor Pomjanski, bei Vergrößerungen von 10- bis 100fach. Die Ergebnisse wurden in schwierigen Fällen anschließend zusätzlich mit Herrn Professor Böcking diskutiert.

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 Auswertung des gesamten Gesichtsfeldes. Dabei war das Gesichtsfeld in vier Quadranten eingeteilt. Diese wurden, beginnend mit dem linken oberen Quadranten, im Uhrzeigersinn ausgewertet. Danach wurde der Objektträger mäanderförmig verschoben, so dass das jeweilige angrenzende Gesichtsfeld ausgezählt werden konnte. Dies geschah so lange, bis der gesamte Objektträger ausgewertet war.

Bei der mikroskopischen Auswertung wurde jede Tumorzelle, bei der eine erkennbare Rot-/Braunfärbung vorhanden war, ungeachtet der Intensität der Braunfärbung, als positiv bewertet. Die Farbintensität spielte keine Rolle bei der Beurteilung der Quantität der immunzytochemischen Reaktion. Das Verhältnis der immunreaktiven Tumorzellen, d.h. positiv angefärbter Tumorzellen zur Gesamttumorzellzahl, wurde ausgewertet. Die Auswertung erfolgte während des Mikroskopierens nach Auszählung und Abschätzung des Prozentsatzes der angefärbten Tumorzellpopulation.

Es erfolgte eine semiquantitative prozentuale Bestimmung des Anteils der angefärbten Tumorzellen, wobei den Ergebnissen ein Score von null bis fünf zugeordnet wurde.

Die folgende semiquantitative Skalierung wurde angewendet: Score 0, wenn weniger als 10% der in Frage stehenden Population angefärbt wurde, Score 1, wenn 11-20%, Score 2, wenn 21-40%, Score 3, wenn 41-60%, Score 4, wenn 61-80%, Score 5, wenn 81-100% der in Frage stehenden Population angefärbt wurde (vgl. Abbildung 4: semiquantitative Analyse der immunzytochemischen Reaktion).

Durch die Übersetzung der semiquantitativ ermittelten Prozentangaben der immunreaktiven Tumorzellen in Scores wurden Übersetzungsfehler bzw. ein Vortäuschen von Pseudogenauigkeit vermieden.

Die Anfärbeprevalenz und der Score wurde für jeden Antikörper in der diagnostisch

relevanten Tumorzellpopulation bestimmt. Die Antikörperreaktionen wurden pro Fall evaluiert ohne Kenntnis des Patienten-Follow-ups, um eine Beeinflussung der Entscheidung zu vermeiden.

Um falsch positive Ergebnisse aufgrund artifiziellen oder unspezifischen Anfärbens auszuschließen, wurde bei 10% der angefärbten Zellen ein Schwellenwert angesetzt. Eine Anfärbung der Zellen galt dann als positiv, wenn mehr als 10% der betrachteten Zellpopulation mit dem Antikörper reagiert hatte.

Da in jeder Färbeserie immer auch positiv reagierende Zellen auf den Objektträgern vorlagen, diente deren Anfärbung als Positivkontrolle. Die fehlende Anfärbung der in der Auswertung nicht mit einbezogenen Zellen (z.B. Granulozyten, Makrophagen und Mesothelien) diente als Negativkontrolle. Die Auswertung pro Probe dauerte ungefähr 10-15 Minuten.

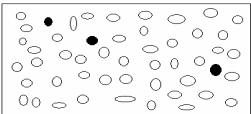
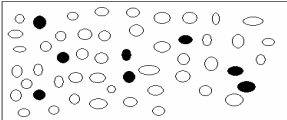
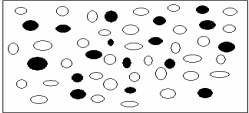
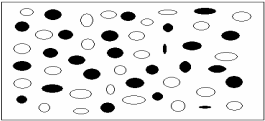
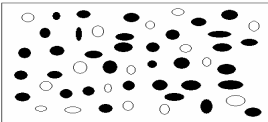
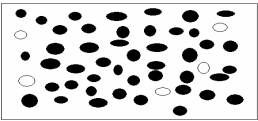
	gefärbte Tumorzellen / Gesamtumorzellzahl %	Score
	0-10	0
	11-20	1
	21-40	2
	41-60	3
	61-80	4
	81-100	5

Abbildung 4: Semiquantitative Analyse der immunzytochemischen Reaktion

2.4 Klinisches/histologisches Follow-up

2.4.1 Erfassungsroutine/Validierung zytologischer Diagnosen

Die eingesandten 180 serösen Körperhöhlenergüsse entstammten dem Routine-Eingang des Instituts für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und sind dort zytologisch durch eine erfahrene Zytopathologin begutachtet worden. Eingangskriterium für unsere Studie war die zytologische Diagnose: "sicher positiv". Alle 180 Ergüsse waren als bösartig befundet und enthielten Zellen eines metastasierenden Karzinoms. Zusätzlich wurden intern am darauf folgenden Tag die Zellausstriche mit Hilfe der Immunzytochemie untersucht. Die Immunzytochemie wurde also ausschließlich an tumorzellpositiven Ergüssen, d.h. an Ergüssen von Patienten mit einem zytologisch sicher diagnostizierten nicht-kleinzelligen Karzinom durchgeführt. Die Mitteilung der zytologischen/immunzytochemischen Diagnosen erfolgte umgehend an die Kliniken.

Im Rahmen der Qualitätssicherung der Immunzytochemie an tumorzellhaltigen serösen Körperhöhlenergüssen wurde ein Erfassungsbogen, der handschriftlich vom Einsender auszufüllen war, erstellt (siehe Anhang/Kapitel 7.2). Dieser wurde, soweit intern mit den Patientenstammdaten im Voraus ausgefüllt und zusammen mit einem Anschreiben den betreffenden Einsendern zugesandt. Den Einsendern wurde anheim gestellt, entweder selbst die Datenkomplettierung des Erfassungsbogens zu übernehmen, oder die Erhebung der Daten durch die Verfasserin dieser Arbeit vor Ort zu ermöglichen.

37 Einsender entschieden sich für die Datenkomplettierung durch die Doktorandin vor Ort. Nach Rückfragen bei den behandelnden Kliniken und Durchsicht der Krankenakten vor Ort wurde innerhalb eines Zeitraumes von 12-16 Monaten die persönliche Krankenanamnese und, soweit vorliegend, auch das histologische Follow-up der Patienten erhoben.

Die Patientenanamnese wurde nur dann als „richtig typisiert“ akzeptiert, wenn sie retrospektiv das Vorliegen eines Primärtumors hinreichend bewies. Dies erfolgte entweder durch das histologische- (n= 102), oder das klinische Follow-up (n= 78). Als „falsch typisiert“ wurden zytologische/immunzytochemische Diagnosen bewertet, wenn dass Follow-up des Primärtumors keine Bestätigung der zytologischen/immunzytochemischen Diagnosen ergab.

In einigen Fällen konnte kein ausreichendes Follow-up erhoben werden, so dass diese nicht mit in die Auswertung einbezogen wurden.

Im Erfassungsbogen enthaltene Fragen bezüglich der TNM-Klassifikation wurden leider nur sporadisch beantwortet – und dies teilweise unvollständig, so dass dieses Item von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden musste.

2.5 Statistische Untersuchungen

Zur Darstellung des Studienkollektivs wurden die in der wissenschaftlichen Literatur allgemein üblichen deskriptiven Statistiken berechnet. In der vorliegenden Studie wurden zur Bestimmung der diagnostischen Validität der immunzytochemischen Marker die Daten des Studienkollektivs anhand der statistischen Kennwerte Sensitivität, Spezifität, positiver/negativer Prädiktionswert, Gesamttreffer sicherheit und Klassifikations-Genauigkeit ausgewertet. Die allgemeinen Formeln zur Bestimmung dieser statistischen Kennwerte lauten wie folgt:

Maßzahlen diagnostischer Treffsicherheit

Immunzytochemische Untersuchungen an Karzinometastasen seröser Körperhöhlen mit unbekanntem Primärtumor sind qualitative diagnostische Tests, deren Ergebnisse anhand festgelegter Kriterien lediglich positiv oder negativ angegeben werden.

Die Testeigenschaften werden durch die Maßzahlen Sensitivität und Spezifität beschrieben. Der ideale Test hat eine Sensitivität (Spezifität) von jeweils 1,0 bzw. 100% (Maßzahl mit 100 multipliziert und in Prozent dargestellt).

$$\text{Sensitivität der immunzytochemischen Marker} = \frac{\text{Test positiv}}{\text{tatsächlich positiv}}$$

$$\text{Spezifität der immunzytochemischen Marker} = \frac{\text{Test negativ}}{\text{tatsächlich negativ}}$$

Der Vorhersagewert gibt jeweils die Wahrscheinlichkeit an, mit der die aus dem Farbeergebnis gezogene Schlussfolgerung richtig ist.

$$\text{Positiver Prädiktionswert} = \frac{\text{Anzahl der richtig-positiven}}{\text{Gesamtzahl der positiven Diagnosen}}$$

Positiver Prädiktionswert: Die Wahrscheinlichkeit, mit der durch ein als positiv beurteiltes Färbeergebnis auch auf das Vorhandensein eines malignen Tumors geschlossen werden kann, wird als positiver Prädiktionswert bezeichnet.

$$\text{Negativer Prädiktionswert} = \frac{\text{Anzahl der richtig-negativen}}{\text{Gesamtzahl der negativen Diagnosen}}$$

Negativer Prädiktionswert: Die Wahrscheinlichkeit, mit der durch ein als negativ beurteiltes Färbeergebnis auch das Nichtvorhandensein maligner Zellen gesichert ist, wird als negativer Prädiktionswert bezeichnet.

$$\text{Gesamttreffer-sicherheit} = \frac{\text{Summe der richtig-negativen und richtig-positiven Fälle}}{\text{Gesamtzahl aller untersuchter Ergüsse}}$$

Gesamttreffer-sicherheit: Die Gesamttreffer-sicherheit gibt an, wie hoch der prozentuale Anteil aller richtigen (sowohl der richtig-positiven, als auch der richtig-negativen) immunzytochemischen Diagnosen, bezogen auf alle untersuchten Ergüsse, gelegen ist.

Maßzahl diagnostischer Genauigkeit

Klassifikations-Genauigkeit tumorpositiver Proben: Die Klassifikations-Genauigkeit tumorpositiver Proben wird berechnet, indem man die Zahl der histogenetisch korrekt klassifizierten Tumoren im Verhältnis zu der Gesamtzahl der tumorpositiven Diagnosen setzt. Die Klassifikations-Genauigkeit wurde also definiert als der Prozentsatz der immunzytochemischen Typisierungen, welche im Follow-up als richtig bestätigt wurden.

$$\text{Klassifikations-Genauigkeit tumorpositiver Proben} = \frac{\text{Anzahl korrekt klassifizierter tumorzellpositiver Proben}}{\text{Gesamtzahl der tumorzellpositiven Proben}}$$

3. Ergebnisse

3.1 Deskriptive Statistik

3.1.1 Geschlechtsverteilung

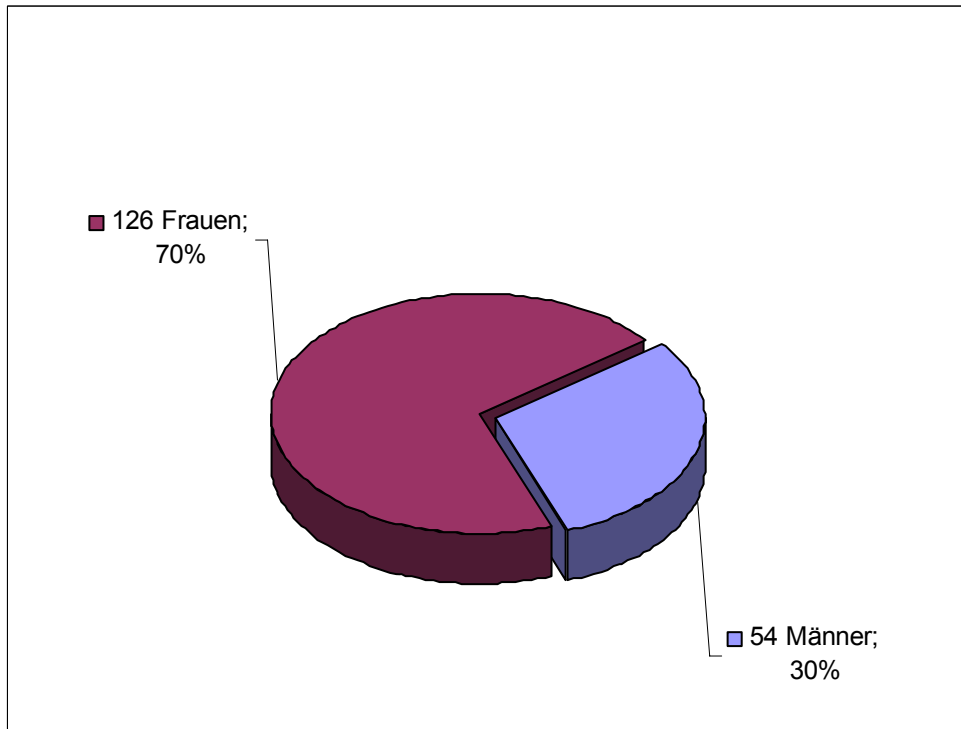


Abbildung 5: Geschlechtsverteilung des Patientenkollektivs der 180 untersuchten serösen Körperhöhlenergüsse

Die Auswertung der konsekutiv gesammelten 180 Fälle von Patienten mit zytologisch gesicherten metastasierenden Karzinom in serösen Körperhöhlenergüssen (Pleura, Peritoneum und Perikard) erfolgte von November 2001 bis November 2003. Sie ergab ein Verhältnis von 126 Frauen zu 54 Männern. Dies entspricht einer Geschlechtsverteilung im Patientengut von 70% Frauen zu 30% Männern.

3.1.2 Altersvergleich zwischen Körperhöhlenergüssen männlicher und weiblicher Patienten

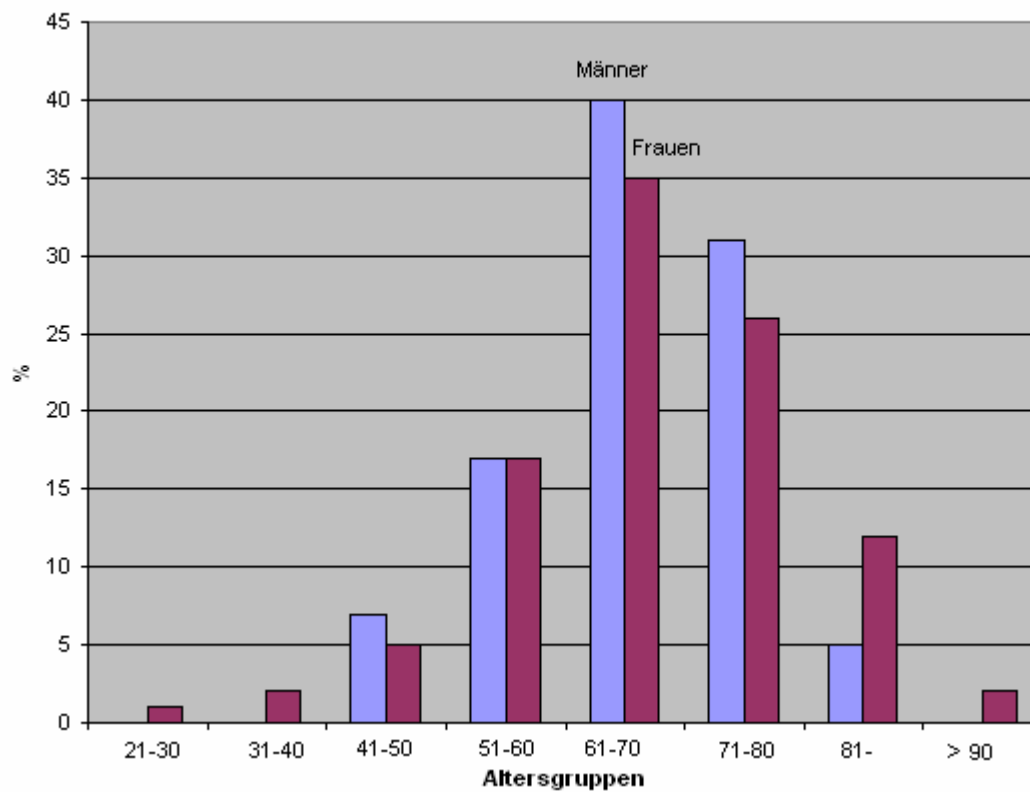


Abbildung 6: Geschlechtsbezogener Altersvergleich

Die Abbildung 6 veranschaulicht einen geschlechtsspezifischen Altersvergleich, wobei der Anzahl der Patienten mit positiven Ergüssen (angegeben in Prozent) Altersgruppen gegenübergestellt werden. Die 180 zytologisch positiv diagnostizierten Körperhöhlenergüsse entstammten Patienten sehr unterschiedlicher Altersgruppen. Die Altersverteilung weist einen Medianwert des Patientenalters bei Frauen von 67,7 Jahren (Streuung von 23 bis 96 Jahre) und bei Männern einen Medianwert von 67 Jahren (Streuung von 42 bis 89 Jahre) auf.

Ein kleiner Prozentsatz der Frauen (1%) erkrankten bereits zwischen dem 21. und 30.- und 2% zwischen dem 31. und 40. Lebensjahr an einem metastasierenden Karzinom. Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen Frauen und Männern im Hinblick auf die Altersverteilung. Männer erkrankten später, d.h. erstmalig im Alter von 41 bis 50 Jahren an einem metastasierenden Karzinom. Die Ursache hierfür ist das Ovarialkarzinom, welches sich bei Frauen in einem früheren Lebensabschnitt manifestiert, als die möglichen Karzinome, die Männer betreffen. Aufgrund der

höheren Lebenserwartung der Frauen, erkrankten diese auch im hohen Alter (ab dem 81. Lebensjahr) häufiger an einem Karzinom als Männer.

Die Häufigkeit für das Erkranken an einem metastasierenden Karzinom in serösen Körperhöhlenergüssen ist für beide Geschlechter zunächst steigend mit zunehmendem Lebensalter. Im Gesamtvergleich sind Patienten vom 51. bis zum 80. Lebensjahr häufiger von einem malignen Erguss betroffen. Diese Altersgruppe erreicht bei den Männern einen Anteil von 88%, bei den Frauen einen Anteil von 78%. Sowohl bei Frauen als auch bei Männern befindet sich das Häufigkeitsmaximum, d.h. der Altersgipfel, zwischen dem 61. und 70. Lebensjahr.

3.1.3 Ausgangsmaterial

Für die vorliegende Studie wurden die zytologischen Diagnosen der tumorzellhaltigen Ergüsse aus serösen Höhlen von insgesamt 180 Patienten, sowie die entsprechenden Akten des Instituts für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf als geeignet anerkannt und ausgewertet. Die 180 Ergüsse seröser Körperhöhlen setzten sich aus 118 Pleura-, 53 Peritoneal- und 9 Perikardergüssen zusammen.

Von den 180 serösen Ergüssen hatten bei ihrer Einsendung 79 auf dem klinischen Begleitzettel bereits als Vermerk den Sitz des Primarius notiert. Die restlichen 101 eingesandten Ergüsse entstammten Patienten mit bis dato unbekannten Tumorleiden mit der Bitte um Abklärung auf Malignität. Für die zuletzt genannten 101 Patientenfälle, bei denen vom Kliniker kein Primärtumor auf dem Begleitzettel angegeben ist, gibt es zwei Alternativen:

1. dem Kliniker ist zu diesem Zeitpunkt kein malignes Tumorleiden bekannt (n=97),
2. ein Primärtumor ist klinisch manifest und bekannt, wird aber vom Kliniker auf dem Begleitzettel nicht mit angegeben (n=4).

Ungeachtet um welchen der zwei Fälle es sich handelt, für den Zytopathologen handelt es sich, aufgrund der Nichtangabe auf dem Begleitzettel, in jedem der 101 Fälle um einen Erguss mit klinisch unbekanntem Primärtumor.

3.1.4 Klinisches/histologisches Follow-up des Studienkollektives

Das detaillierte histologische und/oder klinische Follow-up der Patienten wurde den Resultaten der adjuvanten Methode Immunzytochemie gegenübergestellt. Wenn keine Unterschiede zwischen zytologisch/immunzytochemischer Diagnose und Follow-up bestanden, wurde die Diagnose als richtig gewertet.

In allen 180 tumorzellhaltigen Körperhöhlenergüssen wurde im Follow-up ein Primarius festgestellt.

Die folgende Tabelle soll Aufschluss über die prozentuale Verteilung der häufigsten Erguss – provozierenden Malignome geben. Entsprechend des Patienten-Follow-ups ließ sich das Patientengut (n=180) für die sechs am häufigsten metastasierenden Karzinome einteilen in:

31 Patienten mit einem Mamma-, 58 mit einem Ovarial-, 58 mit einem Lungen-, 8 mit einem Kolon-, 9 mit einem Magen- und 5 mit einem Pankreaskarzinom. Es bleibt also für unsere Kohorte festzuhalten, dass Ovar und Lunge mit 32% gefolgt von der Mamma mit 17%, den höchsten prozentualen Anteil haben unter den am häufigsten metastasierenden Karzinomen.

Tabelle 3: Prävalenz der häufigsten Primärtumoren

	Gesamtzahl	Prozentsatz
Mamma	n=31	17,2%
Ovar	n=58	32,2%
Lunge	n=58	32,2%
Kolon	n= 8	4,4%
Magen	n= 9	5%
Pankreas	n= 5	2,7%

Die Richtigkeit der durch den diagnostischen Algorithmus getroffenen immunzytochemischen Tumorlokalisation wurde durch ein detailliertes klinisches/histologisches Follow-up der Gesamtkohorte kontrolliert.

Hierbei bleibt festzuhalten, dass bei allen 180 Fällen, entweder ein histologisches- bzw. ein histologisch und klinisches- (n=102) oder ein ausschließlich klinisches Follow-up (n=78) vorlag.

Tabelle 4: Absicherung der immunzytochemischen Tumordiagnose durch die Follow-up-Diagnose an n = 180 tumorzellhaltigen serösen Körperhöhlenergüssen.

	Follow-up histologisch oder histologisch und klinisch gesichert (n)	Follow-up klinisch gesichert (n)
n= 180 (zytologisch positive Ergüsse eines metastasierenden Karzinoms)	n= 102 (56,7%)	n= 78 (43,3%)

3.2 Immunzytochemische Untersuchungen

3.2.1 Auswertungen der immunzytochemischen Untersuchungsergebnisse der Lerngruppe (n= 79)

Die Subkohorte 1, bestehend aus den 79 malignen Ergüssen seröser Körperhöhlen mit bekanntem Primarius, diente als Lerngruppe zur Etablierung unseres Markerpanels und eines diagnostischen Algorithmus und wurde daher immunzytochemisch retrospektiv untersucht.

Konkret heißt dies, dass unser Markerpanel bestehend aus CK5/6, CK7, CK20, CA125, TTF1 und CDX2 in einem ersten Schritt immunzytochemisch an den 79 Fällen getestet und ausgewertet wurde. Dieser Schritt erfolgte ohne Kenntnis des Primarius.

Aus der Kenntnis des Primariusortes der 79 Fälle und den Ergebnissen der zuvor gemachten Auswertung des Markerverhaltens (Anfärbeprevalenz und Score) konnte dann im zweiten Schritt ein organspezifisches, d.h. charakteristisches Färbemuster etabliert werden. Das Wissen um eine organspezifische Markerkonstellation wurde dann zur Ausbildung eines Algorithmus verwendet.

Tabelle 5: Prävalenz der Zellanfärbung und deren Quantifizierung für die sechs verschiedenen immunzytochemischen Marker unseres Panels in zytologisch tumorzellpositiven Ergüssen seröser Höhlen (Pleura, Perikard und Peritoneum) bezogen auf die 6 häufigsten Follow-up-Diagnosen der Lerngruppe (n=79)

Dargestellt sind jeweils das arithmetische Mittel von Prävalenz und Score.

Karzinome aus (n=79)	Immunzytochemie						
		CK 5/6	CK 7	CK 20	CA 125	TTF 1	CDX 2
Mamma (n=26)	Anzahl der Fälle mit pos. Immunreaktion [%]	77	100	80	0	0	38
	Score	3	4	2	0	0	1
Ovar (n=20)	Anzahl der Fälle mit pos. Immunreaktion [%]	60	100	70	100	0	40
	Score	2	5	2	4	0	2
Lunge (n=16)	Anzahl der Fälle mit pos. Immunreaktion [%]	50	100	69	0	75	25
	Score	3	4	2	0	2	1
Kolon (n=6)	Anzahl der Fälle mit pos. Immunreaktion [%]	67	50	100	0	17	84
	Score	3	2	4	0	5	3
Magen (n=1)	Anzahl der Fälle mit pos. Immunreaktion [%]	100	100	100	0	0	0
	Score	5	5	5	0	0	0
Pankreas (n=3)	Anzahl der Fälle mit pos. Immunreaktion [%]	67	100	67	0	0	100
	Score	2	5	3	0	0	3

Die Resultate der immunzytochemischen Untersuchungsreihe mit sechs verschiedenen Antikörpern bei Anwendung in 79 zytologisch tumorzellpositiven Ergüssen beinhalten die Auswertung des qualitativen Merkmals Prävalenz angegeben in % (ermittelt aus der Summe der markerpositiven Fälle dividiert durch die Anzahl der Getesteten). Ferner wurde bei vorhandener Markerpositivität, d.h. für

den Fall, dass eine immunzytochemische Reaktion stattgefunden hat, der quantitative Parameter, der Score (Anzahl der positiv gefärbten Tumorzellen dividiert durch die Gesamttumorzellzahl) ermittelt. Hier ist zu betonen, dass es sich um einen Durchschnittsscore handelt, berechnet als arithmetisches Mittel aus der Summe der einzelnen Scores dividiert durch die Anzahl der Fälle mit Score > 0. Zur Berechnung des Durchschnittsscore wurden also lediglich die Präparate berücksichtigt die Marker-positiv waren (Fälle mit Score > 0), so wurde verhindert, dass der wechselnde Anteil ungefärbter Präparate, im Sinne eines Bias den Durchschnittsscore verfälscht.

Bei der Betrachtung der immunzytochemischen Ergebnisse der Marker CK7 und CK20 zeichnet sich eine organspezifische Anfärbetendenz ab. Hier gibt es 3 Alternativen:

1. **Score CK7 > Score CK20:** dies spricht für das Organ Lunge/Ovar oder Mamma als Primärtumorsitz
2. **Score CK7 $\geq$ Score CK20:** dies spricht für das Organ Magen oder Pankreas als Primärtumorsitz
3. **Score CK7 < Score CK20:** dies spricht für das Organ Kolon als Primärtumorsitz.

CA125 wurde als spezifisch für das Ovarialkarzinom eingeordnet.

TTF1 färbt vor allem Lungenkarzinome.

Bei der Betrachtung des Markerverhaltens von **CDX2** fällt auf, dass er besonders in den Tumoren des Kolons und des Pankreas exprimiert.

Die Einzelbetrachtung der Marker zieht den Schluss nach sich, dass die immunzytochemischen Marker allein, d.h. isoliert betrachtet, keine hinreichende Aussagekraft besitzen. Dahingegen erlaubt die Gesamtbetrachtung des Markerexpressionsverhaltens aller sechs Marker unseres Markerpanels und deren Quantifizierung einen Algorithmus für die Identifizierung eines Primarius aufzustellen.

3.2.1.1 Algorithmus zur diagnostischen Interpretation der immunzytochemischen Färbeergebnisse

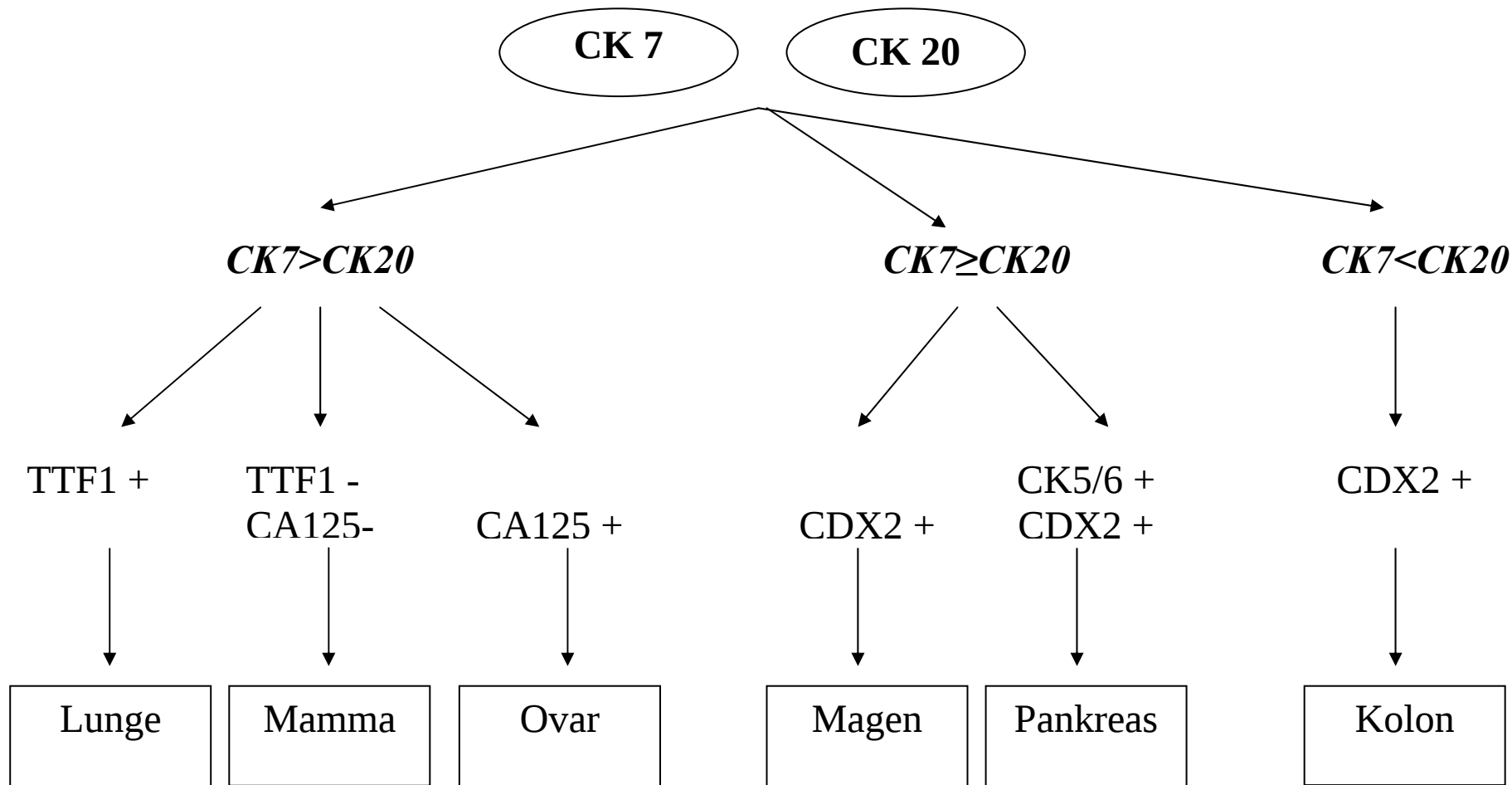


Abbildung 7: Algorithmus zur diagnostischen Interpretation der immunzytochemischen Färbeargebnisse

Legende zur Abbildung 7:

- + = Markerpositivität
- = keine Markerpositivität

CK: Zytokeratin; CA 125: Cancer Antigen 125; TTF-1: Thyroid Transcriptionsfactor-1; CDX2: intestinal-spezifisches Homeobox-Gen

Aus den Forschungsergebnissen mit der Lerngruppe der 79 malignen serösen Körperhöhlenergüsse mit bereits klinisch bekanntem Primarius (siehe Tab. 5) und aus den wissenschaftlichen Veröffentlichungen haben wir die Parameter Anfärbeprevalenz und den Anteil gefärbter Zellen, den Score ermittelt, um einen Algorithmus bilden zu können. Hierbei ermöglicht die kombinierte Betrachtungsweise beider Parameter (Anfärbeprevalenz und Score) eine bessere Trennung der Karzinomentitäten. Wir etablierten den folgenden Algorithmus zur diagnostischen Evaluation der immunzytochemischen Färbeargebnisse (siehe Abbildung 7). Dieser basiert auf der Auswertung der am häufigsten vorkommenden Anfärbemuster der unterschiedlichen Karzinome.

Der erste Schritt in der Interpretation der immunzytochemischen Marker ist der Vergleich der Immunreaktivität von CK7 und CK20. Dieser erfolgt durch semiquantitative Einschätzung der Anzahl immunreaktiver unter allen Tumorzellen und anschließende Bewertung als Score (siehe Material und Methodenteil 2.3.2, Abbildung 4).

Für die Konstellation **Score CK7 > Score CK20, mit CK5/6 und TTF1 Markerpositivität**, wurde ein Karzinom der Lunge favorisiert.

Die Kombination **Score CK7 > Score CK20 mit Positivität von CA125** wurde einem Ovarialkarzinom zugeordnet.

Score CK7 > Score CK20 und Positivität für CK5/6 und gleichzeitiger Negativität für TTF1 und CA125 spricht demnach für ein Mammakarzinom.

Die immunzytochemische Markerkonstellation **Score CK7 ≥ Score CK20 mit CK5/6 und CDX2 Positivität**, wurde eingestuft als Magen- oder Pankreaskarzinom.

Für den Fall der Markerkombination **Score CK7 < Score CK20 und positiver immunologischer Reaktion von CDX2** wurde ein Kolonkarzinom favorisiert.

3.2.2 Histogenetische Klassifikationsgenauigkeit der Testgruppe (n=101)

Anschließend unterzogen wir die Subkohorte 2 (n=101) der immunzytochemischen Untersuchung. Bei allen 101 Fällen handelte es sich um Karzinommetastasen seröser Körperhöhlen mit unbekannter Herkunft, so dass hier die Immunzytochemie prospektiv zur Festlegung des Primarius stattfand. Anhand unseres zuvor aufgestellten Algorithmus, basierend auf der Anfärbeprevalenz und dem Score konnten wir die immunzytochemischen Färbeargebnisse, insbesondere die immunzytochemischen Markerkonstellationen diagnostisch interpretieren und auswerten zum Zwecke einer Identifizierung des Primarius.

Tabelle 6: Übereinstimmung zwischen immunzytochemischer Tumorlokalisation und Follow-up-Diagnose bei n=101 tumorzellhaltigen serösen Körperhöhlenergüssen mit zum Diagnosezeitpunkt klinisch unbekanntem Primärtumor

Organ	richtige Klassifikation	%
Mamma	5/5	100%
Ovar	36/38	94,8%
Lunge	37/42	87,9%
Kolon	2/2	100%
Magen	4/8	50%
Pankreas	1/2	50%
Prostata	1/1	100%
Mesotheliom	1/1	100%
Peritoneum	0/2	0%
Gesamt	86/101	85,1%

Ein detailliertes klinisches/histologisches Follow-up aller n=101 Fälle wurde als Referenzstandard verwendet. Die Tabelle 6 veranschaulicht, dass die Genauigkeit der Primärtumor-Identifizierung an den untersuchten tumorzellpositiven Proben mit unbekanntem Primarius in dieser Studie 85,1% betrug.

Dies bedeutet, dass basierend auf dem von uns benutzten Markerpanel und aufgestelltem Algorithmus, 86 von den 101 tumorzellhaltigen serösen Körperhöhlenergüssen mit klinisch unbekanntem Primärtumor korrekt lokalisiert wurden.

In allen Fällen eines Mammakarzinoms wurde dies immunzytochemisch korrekt identifiziert. Dies entspricht einer Primärtumor-Identifikation für das Karzinomorgan Mamma von 100%. Weiterhin wurden 94,8% (36 von 38) Ovarial- und 87,9% (37 von 42) Lungenkarzinomen richtig lokalisiert.

Auch Karzinome mit geringer Fallzahl wurden richtig identifiziert: zwei von zwei Kolon-, vier von acht Magen-, ein Pankreas- und ein von einem Prostatakarzinom.

3.2.2 Rohdaten der immunzytochemischen Untersuchungsergebnisse der Gesamtkohorte (n=180)

Tabelle 7: Rohdaten der immunzytochemischen Färbeergebnisse bezogen auf die sechs häufigsten Follow-up-Diagnosen der Gesamtkohorte (n=180)

Organ	Marker	Anzahl gefärbt / Gesamtanzahl n [%]		immunolog. Reaktion [Score]					
				0	1	2	3	4	5
Mamma (n=31)									
	CK 5/6	24/31	77	7	4	9	3	3	5
	CK 7	30/31	97	1	1	4	3	2	20
	CK 20	24/31	77	7	10	9	3	1	1
	CA 125	2/31	6	29	2	-	-	-	-
	TTF 1	0/31	0	31	-	-	-	-	-
	CDX 2	11/31	35	21	9	1	-	-	-

Organ	Marker	Anzahl gefärbt / Gesamtanzahl n [%]		immunolog. Reaktion [Score]					
				0	1	2	3	4	5
Ovar (n=58)									
	CK 5/6	42/58	72	16	7	23	7	3	2
	CK 7	58/58	100	-	-	3	3	6	46
	CK 20	40/58	69	18	11	17	7	5	-
	CA 125	58/58	100	-	2	4	6	16	30
	TTF 1	1/58	2	57	-	-	-	-	1
	CDX 2	21/58	36	37	13	5	1	-	2

Organ	Marker	Anzahl gefärbt / Gesamtanzahl n [%]		immunolog. Reaktion [Score]					
				0	1	2	3	4	5
Lunge (n=58)									
	CK 5/6	46/58	79	12	3	17	12	6	8
	CK 7	57/58	98	1	1	4	3	5	44
	CK 20	44/58	76	14	5	25	10	2	2
	CA 125	13/58	22	45	2	7	1	-	3
	TTF 1	37/58	64	21	-	-	7	6	24
	CDX 2	11/58	19	47	7	4	-	-	-

Organ	Marker	Anzahl gefärbt / Gesamtanzahl n [%]		immunolog. Reaktion [Score]					
				0	1	2	3	4	5
Kolon (n=8)									
	CK 5/6	4/8	50	4	1	1	1	1	-
	CK 7	5/8	63	3	1	2	-	-	2
	CK 20	8/8	100	-	1	-	2	1	4
	CA 125	1/8	13	7	-	1	-	-	-
	TTF 1	1/8	13	7	-	-	-	1	-
	CDX 2	7/8	88	1	2	-	-	-	5

Organ	Marker	Anzahl gefärbt / Gesamtanzahl n [%]		immunolog. Reaktion [Score]					
				0	1	2	3	4	5
Magen (n=9)									
	CK 5/6	7/9	78	2	1	1	2	-	3
	CK 7	9/9	100	-	1	-	-	-	8
	CK 20	9/9	100	-	1	3	2	1	2
	CA 125	3/9	33	6	-	-	1	-	2
	TTF 1	0/9	0	9	-	-	-	-	-
	CDX 2	3/9	33	5	1	3	-	-	-

Organ	Marker	Anzahl gefärbt / Gesamtanzahl n [%]		immunolog. Reaktion [Score]					
				0	1	2	3	4	5
Pankreas (n=5)									
	CK 5/6	5/5	100	-	1	2	1	-	1
	CK 7	5/5	100	-	-	1	-	-	4
	CK 20	4/5	80	1	-	1	1	-	2
	CA 125	0/5	0	5	-	-	-	-	-
	TTF 1	0/5	0	5	-	-	-	-	-
	CDX 2	4/5	80	1	3	-	-	-	1

3.2.3.1 Markerspezifische Betrachtung

Tabelle 7 gibt die Rohdaten unserer immunzytochemischen Untersuchung, bezogen auf die sechs häufigsten Follow-up-Diagnosen der Gesamtkohorte wieder. Hierin enthalten sind sowohl die 79 retrospektiv untersuchten Fälle, als auch die prospektiv untersuchten 101 tumorzellhaltigen serösen Körperhöhlenergüsse mit klinisch unbekanntem Primärtumor. Die diagnostische Auswertung der immunzytochemischen Färbeargebnisse beruht auf der Analyse der Parameter Markerexpression und Score, welche im Detail wiedergegeben sind.

Die Betrachtung des Markers **CK5/6** alleine zeigt keinen eindeutigen organspezifischen Zusammenhang. In allen sechs Organumoren kommt es zu einer immunologischen Reaktion mit CK5/6, die Anfärbeprevalenz variiert hierbei zwischen 50 und 100%, wobei der Anteil gefärbter Zellen in allen Organen relativ gleichmäßig von Score 1 bis 5 verteilt ist.

CK7 besitzt in den Organumoren von Mamma, Ovar, Lunge, Magen und Pankreas eine Zellanfärbung in 97 bis 100 % der Fälle, wobei die Anzahl der gefärbten Zellen hauptsächlich im Bereich von Score 4 bis 5 angegeben werden kann.

Dahingegen zeigt das Kolonkarzinom eine Anfärbeprevalenz für CK7 in lediglich 62% der Fälle, welches im Gegensatz zu den oben genannten Organen, überwiegend mit Score 0 bis 2 reagiert.

CK20 färbt in 69 bis 100% aller Karzinome. CK 20 hält sich in den Organumoren von Mamma, Ovar und Lunge, hauptsächlich im Bereich von Score 0 bis 3 auf.

Auch hier ist die Ausnahme das Kolonkarzinom. Dessen Zellen werden zu 100% gefärbt durch CK20, wobei 88% dieser mit Score 3 und mehr reagieren.

In Magen- und Pankreaskarzinomen ergibt die Quantifizierung der CK20 Markerpositivität keine zusätzliche Information.

Betrachtet man den Marker **CA125** so fällt auf, dass er in allen Tumoren mit Ausnahme der des Pankreas eine zumindest geringe Anfärbeprevalenz besitzt, in denen der Mamma 6%, des Kolons 13% gefolgt von der Lunge 22% und des Magens 33%. Hiervon zeigen lediglich 22% von Tumoren des Magens und 5% der Lunge eine Zellanfärbung von Score 4 bis 5.

Im Gegensatz dazu reagieren jedoch Zellen von Ovarialkarzinomen in 100% der Fälle mit einer Anfärbung auf CA125; von diesen reagieren 79% mit einem Score 4 bis 5.

TTF1 zeigt keine Anfärbung in Zellen von Karzinomen der Mamma, des Magens und Pankreas. Je ein Ovarial- und ein Kolonkarzinom zeigen eine Anfärbung mit Score > 4.

Mit einer 64% Anfärbeprevalenz für den Marker TTF1 im Bereich Score 3 bis 5, hebt sich die Lunge eindeutig von den zuvor genannten Werten ab.

CDX2 reagiert in 88% der Kolon- und in 80% der Pankreaskarzinome mit einer Anfärbung. Dabei besitzt das Kolonkarzinom in 63% der Fälle eine Anfärbung mit dem Score 5, wohingegen das nur in 20% der Pankreaskarzinome gilt.

In den Karzinomen der Mamma, der Lunge und des Magens gibt es eine wesentlich geringere Anfärbeprevalenz von lediglich 19-36%, wobei diese sich nur im Bereich Score 0 bis 2 abspielen. Das zuvor Gesagte gilt auch zum Großteil für das Ovarialkarzinom, wobei die Anfärbeprevalenz hier 36% beträgt; von diesen reagieren 95% auf den CDX2 Marker mit Score 0 bis 2.

Aufgrund der Einzelbetrachtung der immunzytochemischen Markerfärbergebnisse der sechs Marker unseres Panels ist ersichtlich, dass die Marker allein, d.h. isoliert betrachtet, keine hinreichende Aussagekraft besitzen.

Dies gilt auch für die Marker TTF1 und CDX2. Man kann TTF1 als spezifischen Marker für das Lungekarzinom, CDX2 als spezifischen Marker für das Kolon-/Pankreaskarzinom benennen, dennoch zeigen unsere immunzytochemischen Untersuchungen, dass sie zwar mit einer geringeren Anfärbeprevalenz und einem geringem Score, trotzdem auch andere Organe anfärben.

Aus diesem Grunde ermöglicht nur die Gesamtbetrachtung der organspezifischen Anfärbeprevalenzen für alle sechs Marker unseres Panels und die Quantifizierung der immunologischen Reaktionen, aus einem charakteristischen Markerverhalten, bzw. organtypischen Färbemuster entsprechend des von uns aufgestellten Algorithmus den Primarius zu identifizieren.

Tabelle 8: Prävalenz der Zellanfärbung und deren Quantifizierung für sechs verschiedene immunzytochemische Marker unseres Panels in zytologisch tumorzellpositiven Ergüssen seröser Höhlen (der Pleura, des Perikards und des Peritoneums) bezogen auf die sechs häufigsten Follow-up-Diagnosen der Gesamtkohorte (n=180)

Dargestellt sind jeweils das arithmetische Mittel von Prävalenz und Score.

Karzinome aus (n=180)	Immunzytochemie						
		CK 5/6	CK 7	CK 20	CA 125	TTF 1	CDX 2
Mamma (n=31)	Anzahl der Fälle mit pos. Immunreaktion [%]	77	97	77	6	0	35
	Score	3	4	2	1	0	1
Ovar (n=58)	Anzahl der Fälle mit pos. Immunreaktion [%]	72	100	69	100	2	36
	Score	2	5	2	4	5	2
Lunge (n=58)	Anzahl der Fälle mit pos. Immunreaktion [%]	79	98	76	22	64	19
	Score	3	5	2	3	5	1
Kolon (n=8)	Anzahl der Fälle mit pos. Immunreaktion [%]	50	63	100	13	13	88
	Score	3	3	4	2	4	4
Magen (n=9)	Anzahl der Fälle mit pos. Immunreaktion [%]	78	100	100	33	0	33
	Score	3	5	3	4	0	2
Pankreas (n=5)	Anzahl der Fälle mit pos. Immunreaktion [%]	100	100	80	0	0	80
	Score	3	4	4	0	0	2

3.2.3.2 Organspezifische Betrachtung

Tabelle 8 gibt die diagnostische Auswertung der immunzytochemischen Färbeergebnisse, d.h. das organtypische Färbemuster, gebildet aus den arithmetischen Mitteln der Parameter Anfärbeprävalenz und Score (nur Fälle mit Score > 0 verwendet), bezogen auf die sechs häufigsten Follow-up-Diagnosen der Gesamtkohorte wieder.

Für das Mammakarzinom bleibt festzuhalten, dass alle drei Zytokeratine eine hohe Prävalenz für eine immunologische Farbreaktion zeigen (CK5/6: 77%, CK7: 97 % und CK20: 77%). Dabei zeigt sich klar, dass sowohl die qualitative als auch die quantitative Tendenz zur Anfärbung, für den Marker CK7, mit einer Anfärbeprävalenz von 97% und einem durchschnittlichen Score 4 am größten ist. Bei einem mittleren Score für CK7 von 4 und einem Score für CK20 von 2, ist das organspezifische Verhältnis, Score CK7 > Score CK20 klar ersichtlich.

Das organspezifische Färbemuster für das metastasierende Mammakarzinom lautet daher: Markerpositivität für CK5/6 und Score CK7 > Score CK20.

Das Färbemuster für das Ovar verhält sich, was die Zytokeratine anbetrifft, ähnlich wie das für das Organ Mamma, jedoch tritt das Verhältnis Score CK7 > Score CK20 noch deutlicher zutage. Es existiert eine durchschnittliche Relation von CK7 Score 5 zu CK20 Score 2. Das Ovar ist das einzige Organ, in dem der Marker CA125 zu 100% anfärbt mit einem mittlerem Score von 4.

CA125 wird zwar auch in anderen Organen angefärbt (Mamma, Lunge, Kolon und Magen) zeigt dort aber wesentlich geringere Anfärbeprävalenzen (6 bis 33%) und auch geringere Scores (Score 1 bis 3; Ausnahme Magen Score 4).

Das typische Färbebild für das metastasierende Ovarialkarzinom ist anzugeben mit: CK5/6 Positivität, Score CK 7 > Score CK 20 und CA125 Markerexpression.

Was das Markerexpressionsverhalten der Zytokeratine CK5/6, CK7 und CK20 in metastasierenden Lungenkarzinomen anbetrifft, zeigt sich keine Abgrenzung gegenüber den zuvor genannten Tumoren der Mamma und des Ovars. Die Markerpositivität für TTF1 mit 64% und einem durchschnittlichem Score 5 ist jedoch typisch für Lungenkarzinome.

Eine mittlere Zellanfärbung von Score 5 für TTF1 gibt es ansonsten nur in 2% der

Ovarialkarzinome, ferner reagieren 13% der Kolonkarzinome mit einem mittleren Score 4.

Das typische Markerexpressionsverhalten des Lungenkarzinoms lautet demnach: CK5/6 Positivität, Score CK7 > Score CK20 und TTF1 Markerpositivität.

Der Fall Score CK7 < Score CK20 und CDX2 Markerpositivität kommt charakteristischerweise nur im metastasierenden Kolonkarzinom vor.

CDX2 färbt auch in 80% metastasierende Zellen der Pankreaskarzinome, hier jedoch liegt der Anteil mit durchschnittlich Score 2 geringer als im Kolonkarzinom, mit einem durchschnittlichen Score 4. Außerdem ist das Verhältnis von CK7 zu CK20 entscheidend, welches im Pankreaskarzinom Score CK7 $\geq$ Score CK20 lautet im Gegensatz zu dem im Kolonkarzinom vorherrschenden Scoreverhältnis: Score CK7 < Score CK20.

Auch in den Metastasen der Mamma-, Ovar-, Lungen- und Magenkarzinome ist eine Anfärbung von CDX2 vorhanden, sie spielt jedoch aufgrund ihrer qualitativ und speziell quantitativ geringen Ausprägung keine Rolle (Anfärbeprevalenz: 19 bis 36% mit einem geringem Score 1-2).

Das charakteristische Markerexpressionsmuster für das metastasierende Magenkarzinom beruht hauptsächlich auf einer CK5/6 Markerpositivität und einem Verhältnis Score CK7 $\geq$ Score CK20.

Erwähnenswert ist, dass sowohl CK7, als auch CK20 eine Anfärbeprevalenz von 100% im Magen besitzen.

Eine gute Differenzierung des Magen- vom Pankreaskarzinom ist nicht möglich, da das typische Markeranfärbemuster des Pankreas dem des Magenkarzinoms entspricht. Es kann also, für den Fall der oben beschriebenen Markerkonstellation nicht angegeben werden, welche der zwei Differentialdiagnosen zum Tragen kommt. In diesem Zusammenhang ist die Betrachtung des CDX2 Markers hilfreich, dieser färbt in 80% der Pankreas- und nur in 33% der Magenkarzinome.

Das Aufzeigen der deutlich höheren CDX2 Prävalenz, berechtigt zu dem Rückschluss, **für den Fall CK5/6 Positivität mit einem Verhältnis Score CK7 $\geq$ Score CK20 und CDX2 Positivität ein Pankreaskarzinom zu vermuten.**

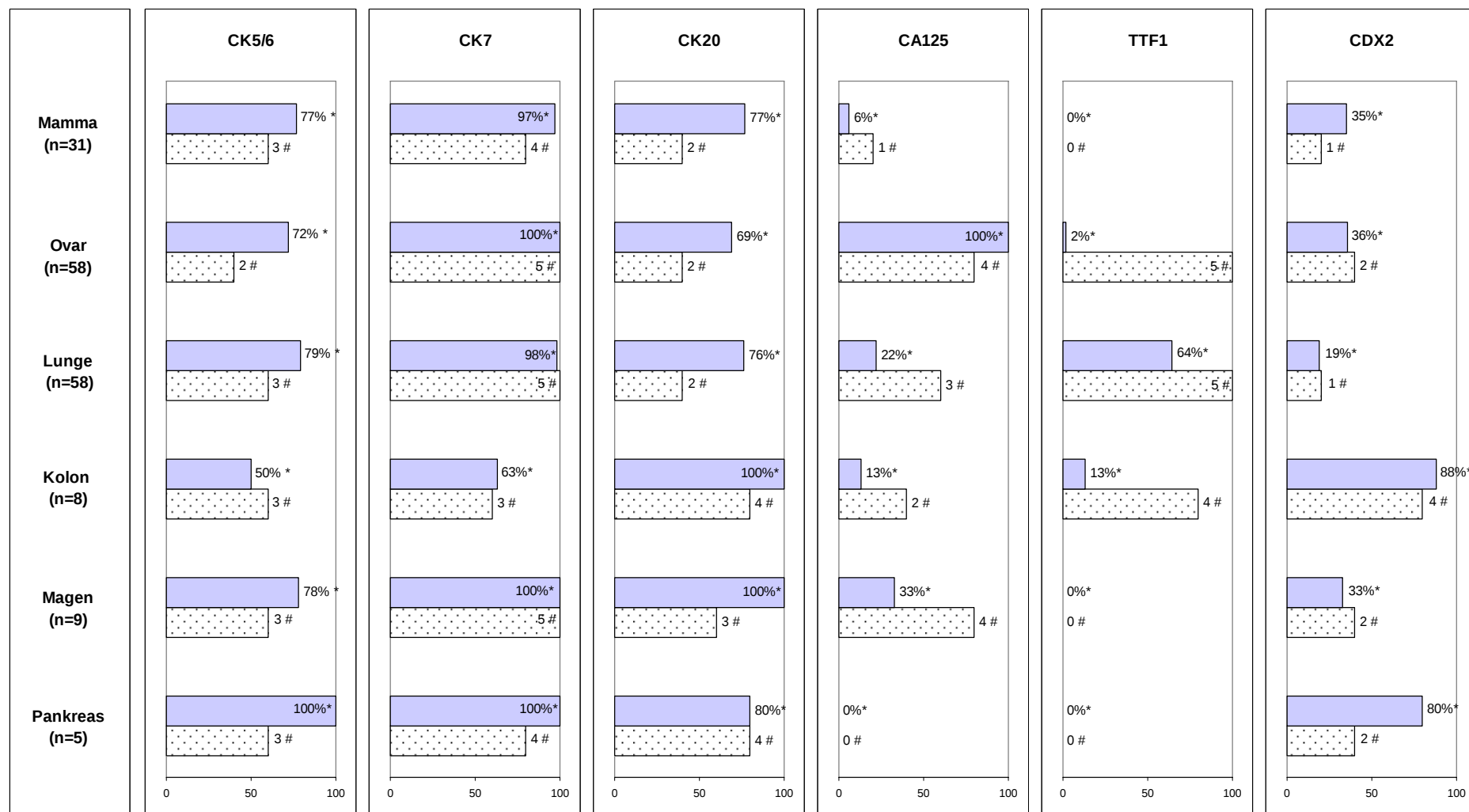


Abbildung 8: organotypisches Markerexpressionsprofil

Legende:

- * = Prävalenz (Markerpositivität = Anteil der Fälle mit positiver Immunreaktion)
- # = Score (Anteil gefärbter Zellen= arithmetisches Mittel der Scores bei Fällen mit positiver Immunreaktion (nur Fälle mit Score > 0 verwendet))

Die Abbildung 8 beinhaltet die Auswertung des qualitativen Merkmals Prävalenz angegeben in % (ermittelt aus der Summe der Marker-positiven Fälle dividiert durch die Anzahl der Getesteten). Ferner wurde bei vorhandener Markerpositivität, der quantitative Parameter, der Durchschnittsscore ermittelt. Zur Berechnung des Durchschnittsscore wurden lediglich die Präparate berücksichtigt die Marker-positiv waren (Fälle mit Score > 0), so wurde verhindert, dass der wechselnde Anteil ungefärbter Präparate, im Sinne eines Bias den Durchschnittsscore verfälscht. Die Abbildung 8 ist eine graphische Darstellung der Tabellen 7 und 8.

3.2.4 Organabhängige Darstellung der am häufigsten anzutreffenden Färbe-Scores

Aus der Tabelle 7 mit den Rohdaten dieser Studie wurden die Modalwerte der Scores, d.h. die am häufigsten vorkommenden Scores der sechs Marker unseres Panels für die sechs am häufigsten metastasierenden Karzinome entnommen und in der Tabelle 9 synoptisch dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Auswertung der am häufigsten vorkommenden Scores, sehr deutlich, das zuvor für die Subkohorte 1 (n= 79) bereits beschriebene organtypische Färbemuster reflektiert. Das charakteristische Expressionsverhalten unseres Markerpanels bestehend aus sechs Antikörpern wird auch durch den Modalwert des Scores belegt und bestätigt die Richtigkeit unseres aufgestellten Algorithmus.

Tabelle 9: Modalwerte der Scores des Markerpanels bezogen auf die sechs häufigsten Follow-up-Diagnosen der Gesamtkohorte.

Karzinome aus n= 180	immunzytochemische Marker					
	CK 5/6	CK 7	CK 20	CA125	TTF 1	CDX2
Mamma (n=31)	2	5	1	0	0	0
Ovar (n=58)	2	5	0	5	0	0
Lunge (n=58)	2	5	2	0	5	0
Kolon (n=8)	0	0	5	0	0	5
Magen (n=9)	5	5	2	0	0	0
Pankreas(n=5)	2	5	5	0	0	1

3.3 Maßzahlen diagnostischer Treffsicherheit

3.3.1 In Abhängigkeit des benutzten Markers TTF1

Tabelle 10: Ermittlung der Maßzahlen Sensitivität, Spezifität und Gesamttreffsicherheit des Markers TTF1

		in Wirklichkeit liegt vor		Vorhersagewert
		LC	kein LC	
Die Diagnose lautet	LC	richtig positiv (Schwellenwert ≥ 3) 37	falsch positiv (Schwellenwert ≥ 3) 3	37/40 =92%
	kein LC	falsch negativ (Schwellenwert < 3) 21	richtig negativ (Schwellenwert < 3) 119	119/140 =85%
		Sensitivität 37/58 =63,8%	Spezifität 119/122 =97,5%	Gesamttreffsicherheit 156/180 =86%

Legende: LC = Lungenkarzinom

Die TTF 1 Anfärbung war in 63,8%, d.h. in 37 von den 58 Lungenkarzinomen vorhanden (7mal Score 3, 6mal Score 4 und 24mal Score 5). Von den 122 Karzinomen nicht-pulmonaler Herkunft wurden 119 Fälle nicht gefärbt (119 von 122), d.h. 97,5% reagierten demnach richtig negativ. Lediglich 3 Fälle nicht-pulmonaler Herkunft wurden positiv gefärbt (1 Karzinom des Ovars mit Score 5, 1 Karzinom des Kolons mit Score 4 und 1 Uteruskarzinom mit Score 3). Die falsch-positiv-Rate für den Marker TTF1 beträgt somit 2,5% (3 von 122). Somit ergibt sich für den TTF1 Marker für das Diagnostizieren eines Lungenkarzinoms eine **Sensitivität** von 63,8% und eine **Spezifität** von 97,5%.

Der **Prädiktionswert (Vorhersagewert)** gibt jeweils die Wahrscheinlichkeit an, mit der die aus dem Färbeergebnis gezogene Schlussfolgerung richtig ist.

Der **positive Prädiktionswert** des Markers TTF1 stellt die 37 richtig-positiven Diagnosen ins Verhältnis zu der Gesamtzahl der positiven Diagnosen (37/40) und beträgt somit 92%.

Der **negative Prädiktionswert** des Markers TTF1 stellt 119 richtig-negativen Diagnosen ins Verhältnis zu der Gesamtzahl der negativen Diagnosen (119/140) und beträgt 85%.

Die **Gesamttreffer sicherheit** der immunzytochemischen Diagnosen des Markers TTF1 ergibt sich aus der Betrachtung der 156 zytologisch korrekt gestellten Diagnosen (37 richtig-positive- + 119 richtig-negative Diagnosen) in Bezug auf 180 genau kategorisierbare Fälle. Sie erreicht einen prozentualen Wert von 86,6%.

3.3.2 In Abhängigkeit des benutzten Markers CDX2

Tabelle 11: Ermittlung der Maßzahlen Sensitivität, Spezifität und Gesamttreffer sicherheit des Markers CDX2 für den Schwellenwert : > 0

		in Wirklichkeit liegt vor		Vorhersagewert
		KK	kein KK	
Die Diagnose lautet	KK	richtig positiv (Schwellenwert > 0) 7	falsch positiv (Schwellenwert > 0) 42	7/49 =14%
	Kein KK	falsch negativ (Schwellenwert 0) 1	richtig negativ (Schwellenwert 0) 130	130/131 =99%
		Sensitivität 7/8 =87,5%	Spezifität 130/172 =75,6 %	Gesamttreffer sicherheit 137/180 =76%

Legende: KK = Kolonkarzinom

Tabelle 12: Ermittlung der Maßzahlen Sensitivität, Spezifität und Gesamttrefferbarkeit des Markers CDX2 für den Schwellenwert > 1

		in Wirklichkeit liegt vor KK		Vorhersagewert
Diagnose	KK	richtig positiv (Schwellenwert > 1) 5	falsch positiv (Schwellenwert > 1) 5	5/10 =50%
	Kein KK	falsch negativ (Schwellenwert ≤ 1) 3	richtig negativ (Schwellenwert ≤ 1) 168	37/39 =95%
		Sensitivität 5/8 =62,5%	Spezifität 168/172 =97,1 %	Gesamttrefferbarkeit 173/180 = 96,1%

Legende: KK = Kolonkarzinom

Die Prävalenz des Markers CDX2 betrug 87,5%, das entspricht einer Anfärbung von 7 der 8 Fälle metastasierender Kolonkarzinome. Fünf der Kolonkarzinome (62,5%) zeigten einen Score 5, während die restlichen zwei positiv gefärbten Fälle (25%), lediglich einen geringen Score von 1 aufwiesen.

Von den restlichen 172 untersuchten Karzinomen anderer Herkunft reagierten 42 Fälle (24,4%) positiv mit CDX2. Die falsch positiv angefärbten 42 nicht-Kolonkarzinome teilten sich auf in: 4 Fälle mit Score 5 Reaktion, 1 Fall mit Score 3 und 37 Fälle mit Score 1. Demgemäß tratt bei den 172 Nichtkolonkarzinomen in 5 Fällen (2,9%) eine falsch positive Reaktion im Bereich Score 3-5 und in 37 Fällen (21,5%) eine falsch positive Reaktion von lediglich Score 1 auf.

In Abhängigkeit von dem festgelegten Schwellenwert für CDX2, entweder (Schwellenwert >0 oder Schwellenwert >1) betrug die **Sensitivität** für das Diagnostizieren eines Kolonkarzinoms von 62,5 bis zu 87,5% und die **Spezifität** von 62,5 bis zu 75,6%. Auch für den **positiven und negativen Prädiktionswert sowie die Gesamttrefferbarkeit von CDX2** gibt es in Abhängigkeit des Schwellenwertes 2 unterschiedliche Werte (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Synoptische Darstellung der Maßzahlen diagnostischer Treffsicherheit für die organspezifischen Marker TTF1 (Lunge) CDX2 (Kolon)

	TTF1 SW$\geq$ 3 für Lungenkarzinome	CDX2 SW>0 für Kolonkarzinome	CDX2 SW>1 für Kolonkarzinome
Sensitivität [%]	63,8	87,5	62,5
Spezifität [%]	97,5	75,6	97,1
Positiver Prädiktionswert [%]	92	14,1	50
Negativer Prädiktionswert [%]	85	99	95
Gesamttreffsicherheit [%]	86,6	76,1	96,1

Legende: SW= Schwellenwert

3.3.3 Überlebenszeit der Patienten (n= 53) mit tumorzellhaltigen serösen Körperhöhlenergüssen

Tabelle 14: Überlebenszeit der Patienten (n= 53) mit tumorzellhaltigen serösen Körperhöhlenergüssen

Überlebens- zeit (Monate)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	n. b.
Patienten n=	23	9	8	3	1	0	1	1	2	1	1	1	1	1

Legende: (n.b. = nicht bekannt)

Die Überlebenszeit der Patienten mit malignen Ergüssen seröser Körperhöhlen wurde wie folgt ermittelt:

Da der Zeitpunkt der Entstehung der Erkrankung nicht bestimmt werden konnte, wird der Zeitraum von der zytologischen/immunzytochemischen Diagnose bis zum Versterben des Patienten als Überlebenszeitraum definiert.

Bei 53 Patienten war der krankheitsspezifische Todeszeitpunkt bekannt. Bei einem Patienten konnte der Todeszeitpunkt nicht ermittelt werden, bei einem weiteren Patienten lag ein Suizid vor.

Die Tabelle 14 verdeutlicht, dass nach 13 Monaten 53 Patienten verstorben waren. Besonders auffällig ist die Tatsache, dass bereits in den ersten vier Monaten nach Diagnosestellung 43, der 53 Patienten mit bekanntem Todeszeitpunkt zu Tode kamen.

Da die Studie zu einem Zeitpunkt ausgewertet wurde, als noch nicht alle Patienten verstorben waren, lässt sich aus dem Follow-up-Ergebniss (53 Verstorbene von 180) keine Überlebensstatistik nach Kaplan-Meier angeben.

3.4 Selten metastasierende Karzinome

Tabelle 15: Immunzytochemische Färbeergebnisse (angegeben in Score) bezogen auf die Follow-up-Diagnosen selten metastasierender Karzinome

Herkunftsorgan des Karzinoms n= 11	Immunzytochemische Marker					
	CK 5/6	CK 7	CK 20	CA 125	TTF 1	CDX2
Oesophagus	0	5	4	0	0	5
Oesophagus	1	4	1	0	0	0
Peritoneum	3	5	2	5	0	0
Peritoneum	0	5	2	5	0	0
Prostata	0	2	0	0	0	0
Prostata	5	0	5	0	0	0
Prostata	0	5	1	0	0	1
Prostata	0	2	1	0	0	0
Niere	2	2	3	0	0	1
Uterus	1	5	3	0	3	0
Bile duct	2	5	3	0	0	0

In unserer Studie gab es lediglich eine kleine Anzahl von Patienten (n= 11), die andere als die zuvor genannten sechs typischerweise in seröse Körperhöhlen metastasierende Karzinome vorwiesen.

Tabelle 15 zeigt die Konstellation der immunzytochemischen Marker in Zellen von elf selten in seröse Körperhöhlenergüsse metastasierenden Karzinomen. Der Anteil der angefärbten Zellen ist als Score angegeben. Aufgrund der kleinen Anzahl der Fälle entfällt die Angabe der Prävalenz für eine Zellanfärbung und des durchschnittlichen Scores. Auch kann aus den immunzytochemischen Färbeergebnissen kein typisches Markerverhalten erkannt und somit auch kein Algorithmus etabliert werden.

4. DISKUSSION

Bei einer Vielzahl benigner wie maligner Grunderkrankungen ist das Auftreten von Ergüssen der serösen Körperhöhlen (Pleura, Peritoneum und Perikard) zu beobachten. Hierbei kann zwischen Transsudaten, Exsudaten sowie neoplastisch bedingten Ergüssen unterschieden werden. Zell- und eiweißarme Transsudate entstehen im Rahmen einer Stauung (z.B. bei Herzinsuffizienz). Exsudate sind eiweiß- und zellreich und durch entzündliche Prozesse induziert (z.B. bei Pleuritis). Im Rahmen einer neoplastischen Erkrankung (z.B. durch metastatische Karzinome der Pleura bei Mamma-Karzinom) können jedoch ebenfalls eiweiß- und zellreiche Ergüsse auftreten.

Durch Punktion können akute Komplikationen (wie z.B. Behinderungen der Atemexkursion bei Pleuraerguss) therapiert werden; ferner steht mit dem Punktat Untersuchungsmaterial zur Verfügung, um die Dignität des Ergusses zu bestimmen. Für den Kliniker ist daher neben der therapeutischen vor allem die diagnostische Funktion des Eingriffes wichtig, denn der Erguss als klinisches Symptom kann Ausdruck einer systemischen Erkrankung sein.

Da die auslösenden Ursachen eine völlig unterschiedliche therapeutische Vorgehensweise fordern, ist eine sichere Unterscheidung durch den Zytopathologen Voraussetzung für eine effektive Therapie.

Die Treffsicherheit der Ergussdiagnostik hängt neben Probennamefehlern, Verarbeitungsfehlern oder der Erfahrung des Diagnostikers auch von der angewandten diagnostischen Methode ab.

Neben der Zytologie kommt hier die adjuvante Methode der Immunzytochemie zur Anwendung. Die Ziele des Einsatzes der adjuvanten Methode Immunzytochemie in der Ergusszytologie sind:

1. eine Zell-/Gewebestypbestimmung und damit auch Primärtumorsitz-Identifizierung
2. eine feingewebliche Typisierung des Tumors und daraus resultierend, eine diesem angepasste Therapie (Operation/Radiatio/Chemotherapie)
3. eine frühzeitige Diagnostik von Metastasen in Körperhöhlenergüssen, zum Zweck des Tumor-Staging auch bei geringer Tumorzellzahl

Die Sensitivität der zytologischen Diagnostik von Ergüssen seröser Höhlen ohne Zusatzmethoden beträgt 58% und ist somit nicht zufrieden stellend (Spriggs et Boddington, 1989).

Das Hinzuziehen der adjuvanten Methode der Immunzytochemie erscheint daher sinnvoll, um die Treffsicherheit zu verbessern. Dies wurde im Rahmen dieser Studie überprüft.

Eine besondere Problematik stellt ferner das Auftreten zytologisch unklarer Diagnosen dar, denn ein Vorliegen maligner Grunderkrankungen innerhalb dieses Kollektivs ist zu vermuten.

Wir setzen die Immunzytochemie in der zytologischen Routine-Diagnostik zur Dignitätsabklärung und Differentialdiagnose neoplastischer Ergüsse ein. In der zytologischen Routine-Diagnostik werden bei *zytologisch Tumorzell-negativen Ergüssen* bisher keine adjuvanten Methoden eingesetzt. Bei *zytologisch Tumorzell-positiven Ergüssen* wird die Immunzytochemie dagegen zur Differentialdiagnose zwischen histogenetisch verschiedenen Tumoren eingesetzt. Bei *zytologisch unklaren Ergüssen* wird die Immunzytochemie zur Abklärung der Dignität und ggf. auch zusätzlich zur histogenetischen Klassifikation der identifizierten Tumoren eingesetzt.

Die Anwendung der Immunzytochemie in der Routine-Diagnostik der Zytologie hat in den letzten zwanzig Jahren eine zunehmende Bedeutung erlangt (Bedrossian, 1998b).

Es existiert in der Literatur eine Vielzahl an Veröffentlichungen über immunzytochemische Untersuchungen an Ergüssen seröser Höhlen.

Im Unterschied zu dem Grossteil der in der Literatur vorherrschenden Studien an histologischem Material (Parafin-Blockpräparate) untersuchte diese Studie den Nutzen der adjuvanten Methode der Immunzytochemie an zytologischen Ausstrichpräparaten von Erguss-Sedimenten. Nur wenige Autoren haben sich mit der Immunzytochemie an zytologischem Material auseinandergesetzt. Ein weiterer Unterschied im Vergleich zu anderen immunzytochemischen Studien, die meist formalinfixiertes Gewebematerial untersuchten, ist das von uns favorisierte alkoholische Fixativ nach Delaunay.

Die von uns verwandte Methodik der Ausstrichpräparation, gefolgt von einer Alkoholfixierung nach Delaunay hat gegenüber der Formalinfixierung von histologischem Material folgende Vorteile:

- Zellmorphologie besser erhalten
- Technik einfach und leicht integrierbar in tägliche Laborabläufe
- Deutliche und zuverlässige Färbeergebnisse
- Subjektive Begutachtung identischer Zellen sowohl in konventioneller Färbung (Papanicolaou) und nach Immunzytochemie möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Studie stellten wir ein Markerpanel, bestehend aus sechs monoklonalen Antikörpern auf und untersuchten es zum Zweck der Primärtumor-Identifizierung verschiedener, in seröse Körperhöhlen metastasierende Karzinome. Hierbei benutzten wir diejenigen Antikörper zur Suche nach Antigenen, die nur bei einer bestimmten Tumorart auftreten. Ferner bewerteten wir die Schwankungen der Expression tumorbezogener Antigene. Mit Hilfe der Antikörper lassen sich Primärtumoren immunzytochemisch nachweisen, indem ihre spezifische Bindung an die zu ihnen passenden Antigene als rot/brauner Farbniederschlag in der Zelle sichtbar gemacht wird.

Die folgenden Antikörper wurden getestet CK5/6, CK7, CK20, TTF1, CDX2 und CA125. Die Gesamtkohorte für die vorliegende Studie bestand aus 180 Ergüssen seröser Körperhöhlen. Die serösen Ergüsse der Subkohorte 1 (n=79) mit klinisch bekanntem Primarius wurden retrospektiv untersucht, um die beste immunzytochemische Markerkonstellation für eine spezifische Primärtumor-Identifikation zu ermitteln. Wir etablierten, basierend auf den häufigsten Markerexpressionskonstellationen (Anfärbeprevalenz und Score) einen Algorithmus zur diagnostischen Evaluation der immunzytochemischen Färbeergebnisse.

In einem nächsten Schritt untersuchten wir die Richtigkeit des zuvor aufgestellten Algorithmus, indem wir die Subkohorte 2 (n=101) mit tumorzellhaltigen Ergüssen seröser Körperhöhlen mit unbekanntem Primarius einer prospektiven Evaluation der diagnostischen Treffsicherheit unterzogen.

In unserer Kohorte unterschieden wir sechs verschieden häufig metastasierende Primärtumoren. Mit Hilfe des diagnostischen Algorithmus konnten wir eine Genauigkeit der Primärtumor-Identifizierung von 85,1% erreichen.

DeYoung et Wick (2000) berichteten ebenfalls über einen immunhistochemischen Algorithmus zur Primärtumor-Identifizierung metastasierender Karzinome. Die Gesamttreffsicherheit der histochemischen Vorhersage des Primärtumorsitzes betrug bei ihnen 67%. In anderen Studien war es möglich, den unbekannten Ursprungsort metastasierender Karzinome in 68-76% vorauszusagen (Lagendijk et al., 1998, Rubin et al., 2001, Krüger et al., 1992).

Moll et al. (1989) bestätigten die biochemische Studie von Blobel et al. (1985), in welcher **CK5** bei Mesotheliomen, nicht aber bei Lungenkarzinomen anzutreffen war. Clover et al. (1997) fanden eine seltene, schwache **CK5/6** Anfärbung bei 14,8% (4/27) der Adenokarzinome. Ordonez (1998) dahingegen berichtete über eine fokale Anfärbung für CK5/6 in 6,5% der nichtpulmonalen Adenokarzinome und diffuse Anfärbung aller Mesotheliome und squamösen Karzinome. Kaufmann et al. (2002) teilten eine CK5/6 Reaktion für 39% der metastasierenden Karzinome der Mamma mit. Die Karzinome der Organe Pankreas und Magen zeigten eine positive CK5/6 Immunreaktion in 8% bzw. 14%.

Wir beobachteten für die genannten Karzinome wesentlich höhere CK5/6 Positivitäten: von 77% für Mamma-, 100% für Pankreas- und 78% für Magenkarzinome.

Jang et al. (2001) untersuchten das kombinierte Immunprofil: **TTF1, CK7, CK20** zum Zweck der Primärtumor-Identifizierung metastasierender Adenokarzinome in serösen Ergüssen.

CK7 > CK20 war der am häufigsten vorkommende Immunphänotyp, beobachtet bei 100%, 88%, 87% und 67% der Adenokarzinome mit Ursprungsort Lunge, Mamma, Ovar und Magen. Ähnliche Ergebnisse wurden von einigen anderen Untersuchern berichtet (Tot, 1999a, Duval et al., 2000, Tot, 1999b, Goldstein et al., 2000).

Das Immunprofil **CK7 < CK20** ist nützlich für die Identifizierung von Adenokarzinomen mit dem Herkunftsorgan Kolon. Chu et al. (2000) stellten eine CK20 Anfärbung in praktisch allen kolorektalen Karzinomen fest. Außerdem registrierten sie eine CK20 Positivität in 62% der Pankreas- und in 50% der Magenkarzinome.

In unserer Studie ermittelten wir ähnliche Ergebnisse: 90% (28/31) der Fälle mit metastasierendem Karzinom mit Ursprungsorgan Mamma und 82,8% (48/58) der metastasierenden Karzinome mit Ursprungsorgan Ovar zeigten eine **CK7 > CK20** Reaktion. Eine ausgedehntere CK7 Anfärbung war im Vergleich zur CK20 Anfärbung in allen 58 (100%) Fällen mit metastasierendem Lungenkarzinom vorhanden.

In allen untersuchten metastasierenden Magen- und Pankreaskarzinomen ermittelten wir eine starke Positivität sowohl für CK7 als auch für CK20.

In unserer Studie zeigten alle 8 Fälle eines metastasierenden Kolonkarzinoms (100%) eine CK20 Positivität. In 6 der 8 Kolonfälle (75%) ermittelten wir, ähnlich wie andere Untersucher auch, eine **CK7 < CK20** Anfärbung.

Zahlreiche Untersucher haben die diagnostische Treffsicherheit des Markers **TTF1** sowohl in primären, als auch in metastasierenden Lungenadenokarzinomen untersucht (Ordonez, 2000, Srodon et Westra, 2002, Jang et al., 2001, Afify et Al-Khafaji, 2002, Bingle 1997, Kaufmann et Dietel , 2000, Reis-Filho et al., 2000, Zamecnik et Kodet, 2002, Hecht et al., 2001). Sie wiesen darauf hin, dass TTF1 ein hoch spezifischer Marker für das Identifizieren des Karzinomorgans Lunge sei. Die ermittelten Sensitivitäten des Markers TTF1 wurden mit 61,5%-89% angegeben. Die berichteten Werte für die Spezifität des Markers TTF1 variierten zwischen 97%-100%.

In Einklang mit anderen Autoren fanden wir für den Marker TTF1 eine Sensitivität von 63,8% und eine Spezifität von 97,5%. Wir stimmen mit Afify et al. (2002) überein, dass die TTF1 Markerpositivität nützlich ist zur Unterscheidung zwischen pulmonalen und nichtpulmonalen Primärtumoren. Er kann erfolgreich auf zytologischen Proben angewandt werden.

Barbareschi et al. (2003) evaluierten die immunhistochemische Expression des Markers **CDX2** in einer großen Serie von Lungentumoren und in Metastasen der Lunge. Sie beobachteten eine CDX2 Positivität in 97% (58/60) der kolorektalen Adenokarzinome. Die Verfasser bestätigten, dass CDX2 ein zuverlässiger, spezifischer und sensibler immunhistochemischer Marker für normales und neoplastisches Darmepithel ist.

CDX2 kann in der Routine-Diagnostik sowohl an histologischen, als auch an zytologischem Material leicht angewandt werden. Er ist ein nützlicher Marker beim Identifizieren eines metastasierenden Karzinoms mit unbekanntem Primarius intestinaler Herkunft. CDX2 wurde auch in einer eingeschränkten Gruppe von Adenokarzinomen mit anderen Herkunftsorganen exprimiert, und zwar bei solchen des Magen-, des Gallengang-, des Pankreas- und des muzinösen Ovarialkarzinoms.

Wir beobachteten ähnliche Resultate in unserer Studie. Die Sensitivität und Spezifität des Markers CDX2 im Hinblick auf die Diagnose Kolonkarzinom betrugen 87,5% und 96,1%.

Eine schwach positive Reaktion in einigen Fällen der Magen-, Pankreas- und Ovarialkarzinome könnte hier einen Hinweis auf den Primärtumorsitz liefern.

CA125 wurde ursprünglich eingeführt als ein spezifischer Marker für das Ovarialkarzinom, welcher das Glykoprotein CA125 detektiert (Nolan und Heatley, 2001, Nap, 1998). 1993 prüften Cuijpers und Mitarbeiter die Sensitivität des Markers CA125 für die zytopathologische Diagnostik. Sie berichteten über eine Anfärbung von Ovarialkarzinomzellen in 96% der Fälle.

Viele andere Adenokarzinome können aber leider ebenso eine CA125 Reaktion auslösen, unter anderen z.B. Gallengang-, Pankreas-, Mamma-, Lungen-, Schilddrüsen-, Magen-, Prostata- und Leberkarzinome (Ögmundsdottir et al, 1996, Loy et al., 1992). Die Validität von CA125 als diagnostischer Marker ist beschränkt, denn Epithelproliferationen weiblicher innerer Genitaloberflächen, metastasierende Karzinome mit extragenitaler Herkunft und auch Mesothelproliferationen können ebenfalls CA125 exprimieren. Dennoch schlagen einige Autoren den Gebrauch von CA125 in einem Markerpanel vor, da seine Expression in neoplastischen Ovarialgeweben stärker ist als in anderen Geweben (Skov und Bichel, 1991, Filho et al., 2002).

In der vorliegenden Studie ermittelten wir in allen 58 Fällen (100%) mit Ovarialkarzinom eine deutliche CA125 Positivität. Andere metastasierende Karzinome, wie z.B. die der Lunge, des Magens und des Pankreas zeigten nur eine geringe CA125 Positivität.

Der Gebrauch von CA125 als Tumormarker für das Ovarialkarzinom, scheint daher nur dann hilfreich zu sein, wenn er in einem Panel zum Einsatz kommt.

Die Vergleichbarkeit unserer immunzytochemischen Ergebnisse mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen wurde durch eine intensive Literaturrecherche in 36 anderen publizierten Studien überprüft. Die *Patientenzahl* der einzelnen Studien schwankte darin von 15 bis 481 Fällen; der *zeitliche Rahmen der Veröffentlichungen* erstreckte sich von 1985 bis 2003. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es noch keine allgemeine Akzeptanz eines "Goldstandards" für die Auswertung der diagnostischen Genauigkeit immunzytochemischer Diagnosen. Einige Studien beziehen sich auf histologische, andere nur auf klinische Befunde zur Grunderkrankung. Die meisten Autoren vergleichen immunzytochemische Ergebnisse nur mit zytologischer Routine-Diagnostik.

In unseren immunzytochemischen Untersuchungen kontrollierte ein detailliertes klinisches- bzw. histologisches Follow-up in allen untersuchten Fällen die Richtigkeit der durch den diagnostischen Algorithmus getroffenen Primärtumorlokalisationen.

Unterschiedliche immunzytochemische Methoden (PAP, APAAP, ABC, SABC, SABP, IP, IAF, IF und SABAP) wurden auf *unterschiedliches Material* (Ausstriche, Zellspäne und Blöcke) angewandt.

Die Möglichkeit, verschiedene Antikörper zu einem immunzytochemischen Panel zusammenzufassen wurde in einigen Studien praktiziert, konnte jedoch nicht zu einer allgemeingültigen Kombination für Ergüsse führen, da die Autoren jeweils *unterschiedliche Antikörper-Konstellationen* wählten. Die in den einzelnen Studien ermittelten Prävalenzen der verschiedenen Antikörper unterlagen breiten Streuungen.

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse und eine Gesamtbeurteilung der Treffsicherheiten der Antikörper werden dadurch erschwert.

Während in der vorliegenden Studie die Delaunay Fixierung in Ausstrichen von Ergüssen, gefolgt von einer Färbung gemäß der Avidin-Biotin-Komplex-Methode durchgeführt worden ist, haben andere Autoren *verschiedene Fixations-Typen* auf *unterschiedliche Arten der Zellpräparation* angewandt und außerdem *verschiedene immunzytochemische Färbemethoden* benutzt.

Alle diese Faktoren beeinflussen jedoch die Färberesultate und somit die Vergleichbarkeit der Endergebnisse.

Ein weiteres Problem bezüglich der Vergleichbarkeit der ermittelten immunzytochemischen Prävalenzen zwischen den einzelnen Studien besteht in der

Verwendung adäquater Algorithmen zur Detektion von Tumorzellen. Einige Autoren nutzten die Anfärbeprävalenz von Tumorzellen als einziges Kriterium für die immunzytochemische Primärtumor-Identifizierung. Anderer Untersucher beurteilten zusätzlich die Intensität der immunzytochemischen Färbereaktionen.

Wir halten die Bewertung der immunzytochemischen Färbeintensität für nicht hinreichend aussagekräftig, da sie sowohl von den technischen Färbeprozessen, als auch von der subjektiven Beurteilung des Untersuchers zu stark abhängig ist.

In unserer Studie wurden zwei unterschiedliche immunzytochemische Parameter ausgewertet: zum einen das qualitative Merkmal der Anfärbeprävalenz (absolute Nachweisbarkeit) zum anderen das quantitative Merkmal des Scores (Anteil Marker-positiver Zellen).

Der Score wird aus dem semiquantitativ bestimmten prozentualen Anteil der Marker-positiven Tumorzellen (vgl. Material/Methoden 2.3.2: Abbildung 4: semiquantitative Analyse der immunzytochemischen Reaktion) ermittelt.

Durch die Übersetzung der semiquantitativ ermittelten Prozentangaben der immunreaktiven Tumorzellen in Scores werden Übersetzungsfehler bzw. ein Vortäuschen von Pseudogenauigkeit vermieden.

Ein problematischer Aspekt bezüglich der Beurteilung immunzytochemischer Färbungen ist der *Schwellenwert für ein als positiv gewertetes Färberesultat*. Selbst wenn ein Antikörper hoch spezifisch für die Markierung eines bestimmten Zelltypus ist, bleibt das Risiko der unspezifischen Anfärbung einiger Zellen (z.B. durch zelluläre Degeneration, Nekrose oder Blutserum-Präzipitate) bestehen. Daher empfehlen wir einen Schwellenwert von 10% Anfärbung für eine Zellpopulation, um ein Färb-Ergebnis als positiv anzuerkennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Primärtumor-Identifizierung metastasierender Karzinome in serösen Ergüssen ein bedeutendes Problem in der zytopathologischen Diagnostik darstellt.

In dieser Studie etablierten wir ein Panel, bestehend aus sechs Markern (CK5/6, CK7, CK20, TTF1, CDX2, CA125) und erreichten damit eine korrekte Primärtumor-Identifizierung in 85,1% der Fälle, d.h., dass wir in 86 von 101 „CUP-Fällen“ den Primärtumor korrekt identifizieren konnten. Hierbei erzielten wir für die zwei

häufigsten Primarii des Ovars und der Lunge Treffsicherheiten von 94,8% und 87,9%. Ein detailliertes klinisches- bzw. histologisches Follow-up aller Fälle kontrollierte die Richtigkeit der durch den diagnostischen Algorithmus getroffenen Primärtumorklassifikationen. Die in unserem Markerpanel zusammengestellten sechs monoklonalen Marker haben sich folglich für die Identifikation von Karzinommetastasen mit unbekanntem Primärtumor (CUP) als geeignet erwiesen.

Die Verwendung eines immunzytochemischen Panels aus verschiedenen Antikörpern wird empfohlen, da einzelne Antikörper meist nicht hinreichend spezifisch reagieren. Die Marker TTF1 und CDX2 traten als organspezifische Tumormarker besonders hervor. Die Gesamtbetrachtung der organspezifischen Anfärbeprevalenzen für alle sechs Marker unseres Panels und die Quantifizierung der immunologischen Reaktionen ermöglichen es, aus einem charakteristischen Markerverhalten, bzw. organtypischen Färbemuster entsprechend des von uns aufgestellten Algorithmus den Primarius meist korrekt zu identifizieren.

Aus unseren Ergebnissen resultiert, dass der Einsatz der Immunzytochemie unter Verwendung des von uns zusammengestellten Markerpanels und des aufgestellten Algorithmus zur diagnostischen Interpretation der immunzytochemischen Färbeargebnisse sich als adjuvante Methode zur Identifizierung des Primärtumors klinisch unbekannter Herkunft an Tumorzellen seröser Körperhöhlenergüssen eignet.

Um zu belegen, inwiefern das von uns aufgestellte Markerpanel und die von uns angewandte Methode nützlich sind für die zytologische Routine-Diagnostik an Körperhöhlen-Ergüssen, haben wir nachträglich die Routine-Einsendungen des Institutes für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität für den Zeitraum von März 2004 bis März 2005 ausgewertet. In diesem Zeitraum sind insgesamt 2871 Ergüsse immunzytochemisch untersucht worden. Hiervon waren 384 Ergüsse tumorzellhaltig, wobei 174 klassifiziert wurden als tumorzellhaltig mit zum Diagnosezeitpunkt klinisch unbekanntem Primarius. Bei den restlichen 210 Ergüssen handelte es sich in 201 Fällen um Karzinome mit klinisch bekanntem Primärtumor und bei den verbleibenden 9 Fällen um nicht native Flüssigkeiten. Von den insgesamt 174 klassifizierten Ergüssen mit CUP mussten 32, aufgrund der gering vorhandenen Tumorzellzahl von den weiteren immunzytochemischen

Untersuchungen ausgeschlossen werden. Für die restlichen 142 CUP-Fälle, bei denen eine Immunzytochemie durchgeführt werden konnte, haben wir 85,1%, d.h. für 120 metastasierende Karzinome den Primärtumor korrekt identifiziert.

Unter Berücksichtigung aller 174 tumorzellhaltigen Ergüsse mit klinisch unbekanntem Primarius haben wir somit eine *absolute Treffsicherheit* für das untersuchte Routine-Kollektiv von 69% erreicht.

Die Methode der diagnostischen Immunzytochemie ist ohne Umstellung der Routineabläufe optimal in die Routine-Diagnostik integrierbar. Die Immunzytochemie ist methodisch leicht durchzuführen, verlangt aber a priori eine spezielle Fixierung. Wir favorisieren dazu das Delaunay-Fixativ. Da die Immunzytochemie eine hohe Treffsicherheit aufweist, wird diese Methode für den Gebrauch in einem Routinelabor vorgeschlagen. Diese Entscheidung wird von der existierenden Ausrüstung, den Fähigkeiten des Personals und den zu erwartenden Kosten (Ausgaben durch Geräteanschaffung und Verbrauchsmaterialien) abhängen. Die realen Kosten für die Immunzytochemie (Personal und Verbrauchsmittel) pro Fall belaufen sich auf ca. 70,-- Euro, wobei die Hauptkosten auf das Material entfallen.

In jedem Fall ist jedoch zu bedenken, dass durch den frühzeitigen Einsatz der adjuvanten Methode der Immunzytochemie die Folgekosten bei zu später klinischer Diagnose einer Erkrankung signifikant gesenkt werden könnten.

Besonders in zytodiagnostisch unklaren Fällen erscheint ein Hinzuziehen der Immunzytochemie sinnvoll, um die Dignität eines Ergusses abzuklären, da vielleicht ein zytologisch noch nicht erfassbares Frühstadium einer malignen Erkrankung vorliegt. Auch ein Tumor-Staging ist mittels Immunzytochemie möglich und erlaubt, durch eine Verlaufsbeobachtung, den richtigen Zeitpunkt für einen Therapiebeginn zu bestimmen.

Die Steigerung der Treffsicherheit der Zytodiagnostik von Ergüssen seröser Körperhöhlen hängt jedoch nicht nur von der Zytologie ab, die in 1/3 aller Fälle durch Beobachtungsfehler falsch-negative Diagnosen stellt („screening error“). Vielmehr kommt auch dem Kliniker eine große Verantwortung zu, da Fehler in der Probenahme („sampling error“) wie zu geringes Ergussvolumen, ein falscher Entnahmeort oder falsche anschließende Fixierung in 2/3 der Fälle eine nachfolgende zytologische Evaluierung unmöglich machen können (Motherby et al.,1998).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Steigerung der diagnostischen Sicherheit der Erguss-Zytologie durch die Anwendung der adjuvanten Methode der Immunzytochemie erreichbar war. Dies manifestierte sich in unserer Studie mit einer Genauigkeit der Primärtumor-Identifizierung von 85,1%.

Das untersuchte Panel kann damit in der Routine-Diagnostik zum Zweck der Primärtumor-Identifikation von metastasierenden Karzinomen aus serösen Ergüssen nützlich sein.

Die Anwendung der adjuvanten Methode auf alle Ergüsse, die zytologisch zweifelhafte oder dringend auf Tumorzellen verdächtige Diagnosen liefern, wird angeraten. Auf diese Weise könnte die gesamte diagnostische Treffsicherheit der Erguss-Zytologie in Routine-Labors wahrscheinlich signifikant verbessert werden.

Die in dieser Studie durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen und daraus ermittelten Ergebnisse (für das Kollektiv der mit metastasierenden Zellen eines nicht-kleinzelligen Karzinoms "sicher positiv" diagnostizierten Fälle) sollten an einem größeren Kollektiv von Routine-Fällen überprüft werden, wobei auch eine gezielte Auswahl zytologisch unklarer Fälle miteinbezogen werden sollte.

Treffsicherheit eines immunzytochemischen Markerpanels zur Identifizierung von Primärtumoren unbekannter Lokalisation (CUP-Syndrom) an Tumorzellen aus Körperhöhlenergüssen

Peyrúze Doganay

Karzinommetastasen unbekannter Herkunft in serösen Körperhöhlen stellen ein generelles klinisches Problem dar. Das erste klinische Symptom ist häufig ein Erguss. Mittels Punktion kann der Kliniker eine therapeutische Intervention durchführen und eine diagnostische Abklärung der Dignität des Ergusses durch den Zytopathologen erreichen.

Die Sensitivität der konventionellen ergusszytologischen Diagnostik seröser Körperhöhlen des Menschen ist mit ca. 58% aber nicht zufrieden stellend. Die Spezifität liegt im Literaturmittel bei 97%.

Das Ziel dieser Studie bestand in der Verbesserung der Treffsicherheit der ergusszytologischen Diagnostik durch die adjuvante Anwendung der Immunzytochemie. Wir haben die Eignung sechs verschiedener immunzytochemischer Marker zur Identifizierung maligner Zellen in Ergüssen untersucht zum Zweck der Lokalisation bislang klinisch unbekannter Primärtumoren (CUP).

Analysiert wurde eine Kohorte von 180 Patienten mit tumorzellhaltigen serösen Körperhöhlenergüssen (118 Pleura-, 53 Peritoneal- und 9 Perikardergüsse), welche den Routine-Einsendungen des Institutes für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von November 2001 bis November 2003 entstammten.

Alle Ausstriche von Ergussedimenten wurden zunächst nach Delaunay fixiert und nach Papanicolaou gefärbt. Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurde ein von uns aufgestelltes Markerpanel, bestehend aus sechs monoklonalen Antikörpern (CK5/6, CK7, CK20, CA 125, TTF1 und CDX2) verwendet. Die ABC- (Avidin-Biotin-Komplex-) Methode wurde zur Sichtbarmachung der immunologischen Reaktion benutzt.

Aus den immunzytochemischen Ergebnissen unseres Markerpanels, retrospektiv ermittelt an der Subkohorte 1 (n=79) mit tumorzellhaltigen Ergüssen seröser Körperhöhlen mit bekannten Primarius, etablierten wir basierend auf den häufigsten Markerexpressionskonstellationen (Anfärbeprevalenz und Score) einen Algorithmus zur diagnostischen Evaluation der immunzytochemischen Färbeargebnisse. In einem nächsten Schritt untersuchten wir die Richtigkeit des zuvor aufgestellten Algorithmus, indem wir die Subkohorte 2 (n=101) mit tumorzellhaltigen Ergüssen seröser Körperhöhlen mit unbekanntem Primarius einer prospektiven Evaluation der diagnostischen Treffsicherheit unterzogen. Mit Hilfe des diagnostischen Algorithmus konnten wir eine Genauigkeit der Primärtumor-Identifizierung von 85,1% erreichen, d.h. dass wir in 86 von 101 „CUP-Fällen“ den Primärtumor korrekt identifizieren konnten. Hierbei erzielten wir für die zwei häufigsten Primarii des Ovars und der Lunge Treffsicherheiten von 94,8% und 87,9%. Ein detailliertes klinisches- bzw. histologisches Follow-up aller Fälle kontrollierte die Richtigkeit der durch den diagnostischen Algorithmus getroffenen Primärtumorlokalisationen. Die in unserem Markerpanel zusammengestellten sechs monoklonalen Marker haben sich für die Identifikation von Karzinommetastasen mit unbekanntem Primärtumor (CUP) als geeignet erwiesen. Hierbei traten die Marker TTF1 und CDX2 als organspezifische Tumormarker hervor.

Maßzahlen diagnostischer Treffsicherheit des Markers TTF1 für das Identifizieren von Zellen eines metastasierenden Lungenkarzinoms (ermittelt anhand der Daten der Gesamtkohorte n=180 (Schwellenwert: Score ≥ 3)) sind:

* Sensitivität:	63,8%
* Spezifität:	97,5%
* Positiver Prädiktionswert:	95,7%
* Negativer Prädiktionswert:	85%
* Gesamttreffsicherheit:	86,6%

Maßzahlen diagnostischer Treffsicherheit des Markers CDX2 für das Identifizieren von Zellen eines metastasierenden Kolonkarzinoms (ermittelt anhand der Daten der Gesamtkohorte n=180 (in Abhängigkeit des benutzten Schwellenwert: Score 0/Score 1)) sind:

* Sensitivität:	87,5%	62,5%
* Spezifität:	75,6%	97,1%
* Positiver Prädiktionswert:	14,1%	50%
* Negativer Prädiktionswert:	99%	95%
* Gesamttreffsicherheit:	76,1%	96,1%

Aus unseren Ergebnissen resultiert, dass der Einsatz der Immunzytochemie unter Verwendung des von uns zusammengestellten Markerpanels und des aufgestellten Algorithmus zur diagnostischen Interpretation der immunzytochemischen Färbeargebnisse sich als adjuvante Methode zur Identifizierung des Primärtumors klinisch unbekannter Herkunft an Tumorzellen seröser Körperhöhlenergüssen in der zytologischen Routinediagnostik eignet. In 85,1% der Fälle wurde der Primärtumorsitz korrekt identifiziert.

Die Methode der diagnostischen Immunzytochemie ist ohne Umstellung der Routineabläufe optimal in die Diagnostik integrierbar. Sie stellt somit einen Fortschritt gegenüber der bisher vorherrschenden alleinigen zytologischen Untersuchung dar und erspart unter Umständen eine verzögerte klinische Diagnose mit oft unnötigen, invasiven und teuren weiteren Untersuchungsverfahren sowie inadäquate oder unterbliebene Therapien. Die Immunzytochemie leistet einen wertvollen klinisch relevanten Beitrag zur Erhöhung der Treffsicherheit von zytologischen Diagnosen an Körperhöhlenergüssen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Afify AM, Al-Khafaji BM: Diagnostic utility of thyroid transcription factor-1 expression in adenocarcinomas presenting in serous fluids. *Acta Cytol.* 2002; 46:675-678
- 2 Athanassiadou P, Athanassiades P, Lazaris D, Krykou K, Petrakakou E, Aravantinos D: Immunocytochemical differentiation of reactive mesothelial cells and adenocarcinoma cells in serous effusions with the use of carcinoembryonic antigen and fibronectin. *Acta Cytol.* 1994; 38 (5):718-722
- 3 Barbareschi M, Murer B, Colby TV, Chilosì M, Macri E, Loda M, Doglioni C: CDX-2 homeobox gene expression is a reliable marker of colorectal adenocarcinoma metastases to the lungs. *Am J Surg Pathol.* 2003; 27:141-149
- 4 Bedrossian CWM: Malignant effusions. A multimodal approach to cytologic diagnosis. Igaku-Shoin Medical Publishers, New York-Tokyo, 1994
- 5 Bedrossian CWM: Diagnostic problems in serous effusions. *Diagn Cytopathol.* 1998a; 19(2):131-137
- 6 Bedrossian CWM: Special stains: The old and the new: The impact of immunocytochemistry in effusion cytology. *Diagn. Cytopathol.* 1998b; 18:141-149
- 7 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.
- 8 Bibbo M: Comprehensive Cytopathology. Philadelphia: WB Saunders

- Company, 1991; 541-614
- 9 Bingle CD: Thyroid transcription factor-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29:1471-1473
- 10 Blobel GA, Moll R, Franke WW, Kayser KW, Gould VE.: The intermediate filament cytoskeleton of malignant mesotheliomas and its diagnostic significance. *Am J Pathol.* 1985; 121:235-247
- 11 Böcking A: Cytopathologie. In: Thomas C, Hrsg.: *Lehrbuch der Histopathologie.* 12. Auflage. FK Schattauer Verlag, Stuttgart-New York. 1998a; pp 411-436
- 12 Böcking A, Freudenberg N: Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Der Pathologe.* 1998b; 19:235-236
- 13 Böcking A, Motherby H, Pomjanski N: Treffsicherheit der Ergusszytologie samt adjuvanten Untersuchungsmethoden. *Dt Ärztebl.* 2000; 97:2626-2630
- 14 Chu P, Wu EBS., Weiss LM: Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: A survey of 435 cases. *Mod Pathol.* 2000; 13:962-972
- 15 Clark BR, Todd CW: Avidin as a precipitant for biotin labeled antibody in a radioimmunoassay for carcinoembryonic antigen. *Analyt Biochem.* 1982; 121: 257-262
- 16 Classen M, Diehl V, Kochsiek K: *Innere Medizin* 3. Auflage; Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, 1994
- 17 Clover J, Oates J, Edwards C: Anti-cytokeratin 5/6: A positive marker for mesothelioma. *Histopathology.* 1997; 31:140-143

- 18 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): 219-229
- 19 Cuijpers VMJI, Boerman OC, Salet van de Pol MRJ, Vooijs GP, Poels LG, Ramaekers FCS: Immunocytochemical detection of ovarian carcinoma cells in serous effusions. *Acta Cytol.* 1993; 37(3): 272-279
- 20 Dalquen P, Sauter G, Epper R, Kleber B, Fechter G, Gudat F: Immunocytochemistry in diagnostic cytology. In: Pfitzer P, Grundmann E: *Current status of diagnostic Cytology: Recent Results in Cancer Research.* Berlin: Springer Verlag, 1993; pp 47-80
- 21 DeYoung BR, Wick MR: Immunohistologic evaluation of metastatic carcinomas of unknown origin: An algorithmic approach. *Semin Diagn Pathol.* 2000; 17:184-193
- 22 Duval JV, Savas L, Banner BF: Expression of cytokeratins 7 and 20 in carcinomas of the extrahepatic biliary tract, pancreas, and gallbladder. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 124:1196-1200
- 23 Filho AL, Alves VA, Kanamura CT, Nonogaki S, Bortolan J, Lombardo V, Bisi H: Identification of the primary site of metastatic adenocarcinoma in serous effusions. Value of an immunocytochemical panel added to the clinical arsenal. *Acta Cytol.* 2002; 46:651-658
- 24 Giorno R, Kohler PF: Immunohistological localisation of lymphocyte subsets. *Diagn Immunol.* 1983; 1: 17-26
- 25 Goldstein NS, Long A, Kuan SF, Hart J: Colon signet ring

- adenocarcinoma: immunohistochemical characterization and comparison with gastric and typical colon adenocarcinomas. *Applied Immunohistochem Mol Morphol*. 2000; 8:183-188
- 26 Green NM: The use of (C14)biotin for kinetic studies and for assays. *Biochem*. 1963; 89: 585-599
- 27 Guzman J, Costabel U, Bross KJ, Wiehle U, Grunert F, Schaefer HE: The value of the immunoperoxidase slide assay in the diagnosis of malignant pleural effusions in breast cancer. *Acta Cytol*. 1988a; 32 (2): 188-192
- 28 Guzman J, Higarth M, Bross KJ, Ross A, Wiehle U, Kresin V, Grunert F, von Kleist S: Malignant ascites of serous papillary ovarian adenocarcinoma. An immunocytochemical study of the tumor cells. *Acta Cytol*. 1988b; 32 (4): 519-522
- 29 Guzman J, Bross KJ, Costabel U: Malignant pleural effusions due to small cell-carcinoma of the lung. An immunocytochemical cell-surface analysis of lymphocytes and tumor cells. *Acta Cytol*. 1990; 34 (4): 497-501
- 30 Guzman J: Immunocytochemistry: When and Why ? In: *Compendium on Quality Assurance, Proficiency Testing and Workload limitations in Clinical Cytology*. Edited by GL Wied, CM Keebler, DL Rosenthal, U Schenck, TM Somrak, GP Vooijs. Chicago, *Tutorials of Cytology*, 1995; 197-201
- 31 Haska J: *Immunzytologie*. Schattauer 1997; 14-16, 22-24
- 32 Hausheer F, Yabro J: Diagnosis and treatment of malignant pleural effusions. *Semin Oncol*. 1985; 12 (1): 54-74

- 33 Hecht JL, Pinkus JL, Weinstein LJ, Pinkus GS: The value of thyroid transcription factor-1 in cytologic preparations as a marker for metastatic adenocarcinoma of lung origin. *Am J Clin Pathol.* 2001; 116:483-488
- 34 Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem.* 1981; 29: 577-580
- 35 Jang KY, Kang MJ, Lee DG, Chung MJ: Utility of thyroid transcription factor-1 and cytokeratin 7 and 20 immunostaining in the identification of origin in malignant effusions. *Analyt Quant Cytol Histol.* 2001; 23:400-404
- 36 Kaufmann O, Dietel M: Thyroid transcription factor-1 is the superior immunohistochemical marker for pulmonary adenocarcinomas and large cell carcinomas compared with surfactant proteins A and B. *Histopathology.* 2000; 36:8-16
- 37 Kaufmann O, Fietze E, Dietel M: Immunhistochemische Diagnostik bei Karzinommetastasen mit unbekanntem Primärtumor. *Pathologe.* 2002; 23:183-197
- 38 Koss LG: *Diagnostic Cytology and its histopathologic bases.* 4th ed., Philadelphia: JB Lippincott Company, 1992
- 39 Krüger R, de Leon F, Maihoff J: Der Wert der Immunhistochemie in der histologischen Routinediagnostik von Metastasen unbekannter Primärtumoren. *Pathologe.* 1992; 13:65-72
- 40 Lagendijk JH, Mullink H, Van Diest PJ, Meijer G, Meijer CJLM: Tracing the origin of adenocarcinomas with unknown primary using immunohistochemistry. *Hum Pathol.* 1998; 5:491-498

- 41 Loy TS, Quesenberry JT, Sharp SC: Distribution of CA 125 in adenocarcinomas: An Immunocytochemical study of 481 cases. *Am J Clin Pathol.* 1992; 98:175-179
- 42 Mason DY, Sammons RE: The labeled-antigen method of immunoenzymatic staining. *J Histochem Cytochem.* 1979; 27: 832-840
- 43 Mason MR, Bedrossian C, Fahey CA: Value of immunocytochemistry in the study of malignant effusion. *Diagn Cytopathol.* 1987; 3: 215-221
- 44 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
- 45 Matter-Walstra KW, Kraft R: Atypical cells in effusions: Diagnostic value of cell image analysis combined with immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol.* 1996, 15: 263-269
- 46 Moll R., Dhouailly D, Sun TT: Expression of keratin 5 as a distinctive feature of epithelial and biphasic mesotheliomas. An immunohistochemical study using monoclonal antibody. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1989; 58:129-145
- 47 Motherby H, Nadjari B, Friegel P, Kohaus J, Ramp U, Böcking A: Diagnostic accuracy of effusion cytology. *Diagn Cytopathol.* 1998; 20(6): 350-357
- 48 Motherby H, Kube M, Friedrichs N, Nadjari B, Krops K, Donner A, Baschiera B, Dalquen P, Böcking A: Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in diagnostic effusion cytology: 1. Prevalence of markers in tumor cell positive and negative smears. *Analyt Cell Pathol.* 1999; 19:7-20

- 49 Nap M. Immunohistochemistry of CA 125: Unusual expression in normal tissues, distribution in the human fetus and questions around its application in diagnostic pathology. *Int J Biol Markers*. 1998; 13:210-215
- 50 Nolan LP, Heatley MK: The value of immunocytochemistry in distinguishing between clear cell carcinoma of the kidney and ovary. *Int J Gynecol Pathol*. 2001; 20:155-159
- 51 Ögmundsdottir HM, Gudlaugsdottir S, Bjornsson J, Jonasdottir S: Altered expression of CA 125 in breast carcinomas. *APMIS*. 1996; 104: 47-53
- 52 Ordonez NG: Value of cytokeratin 5/6 immunostaining in distinguishing epithelial mesothelioma of the pleura from lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1998; 22:1215-1221
- 53 Ordonez NG: Value of thyroid transcription factor-1 immunostaining in distinguishing small cell lung carcinomas from other small cell carcinomas. *Adv Anat Pathol*. 2000; 7:123-127
- 54 Reis-Filho JS, Carrilho C, Valenti C, Leitao D, Ribeiro CA, Ribeiro SG, Schmitt FC.: Is TTF 1 a good immunohistochemical marker to distinguish primary from metastatic lung adenocarcinomas? *Pathol Res Pract*. 2000; 196:835-840
- 55 Rubin BP, Skarin AT, Pisick E, Rizk M, Salgia R: Use of cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer. *Eur J Cancer Prev*. 2001; 10:77-82
- 56 Shepherd NA, Richman PI, England J: Ki67 derived proliferative activity

- in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. J Pathol. 1988; 155: 213-219
- 57 Shield PW, Callan JJ, Devine PL: Markers for metastatic adenocarcinoma in serous effusion specimens. Diagn Cytopathol. 1994; 11:237-245
- 58 Silverman JF, Nance K, Phillips B, Norris HAT: The use of immunoperoxidase panels for the cytologic diagnosis of malignancy in serous effusions. Diagn Cytopathol. 1987; 3: 134-140
- 59 Skov RV, Bichel P: OC-125 as a diagnostic aid in the cytological evaluation of ascitis cells in patients with ovarian carcinoma. Virchows Arch (A) Pathol Anat Histopathol. 1991; 419:59-62
- 60 Spriggs A, Boddington MM: Atlas of Serous Fluid Cytopathology. A Guide to the Cells of the Pleural, Pericardial, Peritoneal and Hydrocele Fluids. In Current Histopathology Series, Vol.14, GA Gresham (Ed.), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1989
- 61 Srodon M, Westra WH: Immunohistochemical staining for thyroid transcription factor-1: a helpful aid in discerning primary site of tumor origin in patients with brain metastases. Human Pathol. 2002; 33:642-645
- 62 Streefkerk JG: Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. J Histochem Cytochem. 1972; 20:829-831
- 63 Tot T: Adenocarcinomas metastatic to the liver: the value of cytokeratins 20 and 7 in the search for unknown primary tumours. Cancer. 1999a; 85:171-177

- 64 Tot T: Patterns of distribution of cytokeratins 20 and 7 in special types of invasive breast carcinoma: a study of 123 cases. *Ann Diagn Pathol.* 1999b; 3:350-356
- 65 Van Haam E: *Cytology of Transudates and Exsudates.* S. Karger Verlag Basel, 1977
- 66 Verheijlen R, Kuijpers HJH, Schlingemann RO.: Ki67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. *J Cell Sci.* 1989; 92: 123-130
- 67 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
- 68 Zamecnik J, Kodet R: Value of thyroid transcription factor-1 and surfactant apoprotein A in the differential diagnosis of pulmonary carcinomas: a study of 109 cases. *Virchows Arch.* 2002; 440:353-361
- 69 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

7. Anhang

7.1 Übersicht der Tabellen und Abbildungen

- Tabelle 1:** Färbeprotokoll für die Immunzytochemie
- Tabelle 2:** Spezifikationen der Antikörper, die im Rahmen der vorliegenden Studie benutzt worden sind (Art, Verdünnung, Hersteller/Spezifität von Primär-Antikörpern und Lokalisation des Färbeergebnisses)
- Tabelle 3:** Prävalenz der häufigsten Primärtumoren
- Tabelle 4:** Absicherung der immunzytochemischen Tumordiagnose durch die Follow-up-Diagnose an n= 180 tumorzellhaltigen serösen Körperhöhlenergüssen
- Tabelle 5:** Prävalenz der Zellanfärbung und deren Quantifizierung für die sechs verschiedenen immunzytochemischen Marker unseres Panels in zytologisch tumorzellpositiven Ergüssen seröser Höhlen (der Pleura, des Perikards und des Peritoneums) bezogen auf die sechs häufigsten Follow-up-Diagnosen der Lerngruppe (n= 79)
- Tabelle 6:** Übereinstimmung zwischen immunzytochemischer Tumorlokalisierung und Follow-up-Diagnose bei n= 101 tumorzellhaltigen serösen Körperhöhlenergüssen mit klinisch unbekanntem Primärtumor
- Tabelle 7:** Rohdaten der immunzytochemischen Färbeergebnisse bezogen auf die sechs häufigsten Follow-up-Diagnosen der Gesamtkohorte (n= 180)
- Tabelle 8:** Prävalenz der Zellanfärbung und deren Quantifizierung für die sechs verschiedenen immunzytochemischen Marker unseres Panels in zytologisch tumorzellpositiven Ergüssen seröser Höhlen (der Pleura, des Perikards und des Peritoneums) bezogen auf die sechs häufigsten Follow-up-Diagnosen der Gesamtkohorte (n= 180)
- Tabelle 9:** Modalwerte der Scores des Markerpanels bezogen auf die sechs häufigsten Follow-up-Diagnosen der Gesamtkohorte
- Tabelle 10:** Ermittlung der Maßzahlen Sensitivität, Spezifität und Gesamttreffer-sicherheit des Markers TTF1

- Tabelle 11:** Ermittlung der Maßzahlen Sensitivität, Spezifität und Gesamttreffer-sicherheit des Markers CDX2 für den Schwellenwert > 0
- Tabelle 12:** Ermittlung der Maßzahlen Sensitivität, Spezifität und Gesamttreffer-sicherheit des Markers CDX2 für den Schwellenwert > 1
- Tabelle 13:** Synoptische Darstellung der Maßzahlen diagnostischer Treffsicherheit für die organspezifischen Marker TTF1 (Lunge) CDX2 (Kolon)
- Tabelle 14:** Überlebenszeit der Patienten (n= 53) mit tumorzellhaltigen serösen Körperhöhlenergüssen
- Tabelle 15:** Immunzytochemische Färbeergebnisse (angegeben in Score) bezogen auf die Follow-up-Diagnosen selten metastasierender Karzinome

- Abbildung 1:** Häufigkeitsverteilung von Transsudaten, Exsudaten sowie neoplastischen Ergüssen bezogen auf Pleura, Perikard und Peritoneum (Van Haam, 1977)
- Abbildung 2:** Immunzytochemische Färbung nach der Avidin-Biotin-Komplex Methode
- Abbildung 3:** Präparationsschema zur Herstellung von Ausstrichpräparaten aus Körperhöhlenergüssen für eine zytologische, immunzytochemische und DNA-Bild-zytometrische Untersuchung
- Abbildung 4:** Semiquantitative Analyse der immunzytochemischen Reaktion
- Abbildung 5:** Geschlechtsverteilung des Patientenkollektivs der 180 untersuchten serösen Körperhöhlenergüsse
- Abbildung 6:** Geschlechtsbezogener Altersvergleich
- Abbildung 7:** Algorithmus zur diagnostischen Interpretation der immunzytochemischen Färbeergebnisse
- Abbildung 8:** Organtypisches Markerexpressionsprofil

Institut für Cytopathologie

Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf

 Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. A. Böcking
 Institut für Cytopathologie, Postfach 1010 07, 40001 Düsseldorf

 Telefon 0211 / 81 - 18346
 Telefax 0211 / 81 - 18402

 Homepage
<http://www.med.uni-duesseldorf.de/CytoPathologie/index.html>

Erfassungsbogen zur Treffsicherheit der immunzytochemischen Diagnostik in der Ergusszytologie

Einsender:

Patientendaten:

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

Einsenddatum:

Material:

Aszites ☐Pleuraerguss ☐Herzbeutelerguss ☐
 Spülflüssigkeit
 peritoneal ☐
Douglas ☐
Klinischer Organbefall (Metastasierung) z.Z. der Entnahme der Ergussflüssigkeit:

 Peritonealhöhle: ☐; Pleurahöhle: ☐; Leber: ☐; Lunge: ☐; Hirn: ☐; Knochen: ☐; Nebennieren: ☐
 sonstige _____

Diagnosesicherung klinisch durch :

Biopsie (Histo)

☐

Zytologie

☐

Resektat (Histo)

☐

Obduktion

☐

Primärtumor in _____

Primärtumor unbekannt

☐

Tumortyp: _____

Grading: _____

Staging: T_ N_ M_ Stadium:

Datum: _____ Gezeichnet durch _____

7.3 Danksagung

Für die Überlassung der interessanten Themenstellung, die intensive Betreuung und die Ermöglichung der Arbeit am Institut für Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf möchte ich Herrn Professor Dr. med. A. Böcking herzlich danken. Die Besprechungen mit ihm waren stets konstruktiv und fördernd. Er war mir zu jeder Zeit ein engagierter und geduldiger Doktorvater, dem ich für seine motivierende und professionelle Anleitung, als auch für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und die wertvollen Verbesserungsvorschläge, zutiefst dankbar bin.

Für das Korreferat danke ich Herrn Professor Dr. med. dent. U. Stüttgen.

Ich danke Frau Dr. med. N. Pomjanski für die gute Betreuung, fachliche Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und Zusammenarbeit bei der Durchführung und Veröffentlichung der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. H.J. Grote für Beratungen und Anregungen, für zahlreiche Diskussionen, spontane Hilfestellung bei auftretenden Problemen und für die Unterstützung bei der Literaturrecherche.

Dank schulde ich ferner Herrn P. Nassiri für die stete und kompetente Unterstützung in allen Fragen der EDV.

Des weiteren möchte ich den übrigen Mitarbeitern des Instituts für Cytopathologie für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima danken.

Jeder hat auf seine Weise meine Arbeit unterstützt.

7.4 Teilpublikationen dieser Arbeit

Pomjanski N, Grote HJ, **Doganay P**, Schmiemann V, Buckstegge B, Böcking A: Immunocytochemical identification of carcinomas of unknown primary (CUP) in serous effusions. Diagn. Cytopathol. 2005, (accepted)

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Peyrüze Doganay
Anschrift: 40225 Düsseldorf, Universitätstr.1
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 08.04.1977
Geburtsort: Eschwege, Deutschland
Familienstand: ledig

Vater: Dahho Doganay
Mutter: Sevim Doganay
Geschwister: Teodora, Eleriya und Musa Doganay

Schulbildung:

1983-1987 Grundschole, Bad Camberg
1987-1990 Realschole, Bad Camberg
1991-1996 Mercator-Gymnasium, Duisburg
Abiturnote: 1,7

Studium:

10/1996 - 06/2003 Aufnahme des Studiums der Zahnmedizin an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
06/2003 Staatsexamen-Abschlussnote: gut

Famulaturen:

01/1999-02/2003 Studentische Hilfskraft zentraler zahnärztlicher Notdienst
Düsseldorf
01/1999-02/2003 Studentische Hilfskraft Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
Abteilung Prof. Dr. Becker zahnärztliche Chirurgie

Berufliche Tätigkeit: seit 11/2003 Assistenz Zahnärztin

Promotion:

07/2003 Annahme des Promotionsthemas „Treffericherheit eines
immunzytochemischen Markerpanels zur Identifizierung
von Primärtumoren unbekannter Lokalisation (Cup-
Syndrom) an Tumorzellen aus Körperhöhlenergüssen“ bei
Herrn Professor Dr. med. A. Böcking

Treffericherheit eines immunzytochemischen Markerpanels zur Identifizierung von Primärtumoren unbekannter Lokalisation (CUP-Syndrom) an Tumorzellen aus Körperhöhlenergüssen

Peyrúze Doganay

Karzinommetastasen unbekannter Herkunft in serösen Körperhöhlen stellen ein generelles klinisches Problem dar. Das erste klinische Symptom ist häufig ein Erguss. Mittels Punktion kann der Kliniker eine therapeutische Intervention durchführen und eine diagnostische Abklärung der Dignität des Ergusses durch den Zytopathologen erreichen.

Die Sensitivität der konventionellen ergusszytologischen Diagnostik seröser Körperhöhlen des Menschen ist mit ca. 58% aber nicht zufrieden stellend. Die Spezifität liegt im Literaturmittel bei 97%.

Das Ziel dieser Studie bestand in der Verbesserung der Treffericherheit der ergusszytologischen Diagnostik durch die adjuvante Anwendung der Immunzytochemie. Wir haben die Eignung sechs verschiedener immunzytochemischer Marker zur Identifizierung maligner Zellen in Ergüssen untersucht zum Zweck der Lokalisation bislang klinisch unbekannter Primärtumoren (CUP).

Analysiert wurde eine Kohorte von 180 Patienten mit tumorzellhaltigen serösen Körperhöhlenergüssen (118 Pleura-, 53 Peritoneal- und 9 Perikardergüsse), welche den Routine-Einsendungen des Institutes für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von November 2001 bis November 2003 entstammten.

Alle Ausstriche von Ergussedimenten wurden zunächst nach Delaunay fixiert und nach Papanicolaou gefärbt. Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurde ein von uns aufgestelltes Markerpanel, bestehend aus sechs monoklonalen Antikörpern (CK5/6, CK7, CK20, CA 125, TTF1 und CDX2) verwendet. Die ABC- (Avidin-Biotin-Komplex-) Methode wurde zur Sichtbarmachung der immunologischen Reaktion benutzt.

Aus den immunzytochemischen Ergebnissen unseres Markerpanels, retrospektiv ermittelt an der Subkohorte 1 (n=79) mit tumorzellhaltigen Ergüssen seröser Körperhöhlen mit bekannten Primarius, etablierten wir basierend auf den häufigsten Markerexpressionskonstellationen (Anfärbeprevalenz und Score) einen Algorithmus zur diagnostischen Evaluation der immunzytochemischen Färbeargebnisse. In einem nächsten Schritt untersuchten wir die Richtigkeit des zuvor aufgestellten Algorithmus, indem wir die Subkohorte 2 (n=101) mit tumorzellhaltigen Ergüssen seröser Körperhöhlen mit unbekanntem Primarius einer prospektiven Evaluation der diagnostischen Treffericherheit unterzogen. Mit Hilfe des diagnostischen Algorithmus konnten wir eine Genauigkeit der Primärtumor-Identifizierung von 85,1% erreichen, d.h. dass wir in 86 von 101 „CUP-Fällen“ den Primärtumor korrekt identifizieren konnten. Hierbei erzielten wir für die zwei häufigsten Primarii des Ovars und der Lunge Treffericherheiten von 94,8% und 87,9%. Ein detailliertes klinisches- bzw. histologisches Follow-up aller Fälle kontrollierte die Richtigkeit der durch den diagnostischen Algorithmus getroffenen Primärtumorlokalisationen. Die in unserem Markerpanel zusammengestellten sechs monoklonalen Marker haben sich für die Identifikation von Karzinommetastasen mit unbekanntem Primärtumor (CUP) als geeignet erwiesen. Hierbei traten die Marker TTF1 und CDX2 als organspezifische Tumormarker hervor.

Maßzahlen diagnostischer Treffericherheit des Markers TTF1 für das Identifizieren von Zellen eines metastasierenden Lungenkarzinoms (ermittelt anhand der Daten der Gesamtkohorte n=180 (Schwellenwert: Score ≥ 3)) sind:

* Sensitivität:	63,8%
* Spezifität:	97,5%
* Positiver Prädiktionswert:	95,7%
* Negativer Prädiktionswert:	85%
* Gesamttreffericherheit:	86,6%

Maßzahlen diagnostischer Treffericherheit des Markers CDX2 für das Identifizieren von Zellen eines metastasierenden Kolonkarzinoms (ermittelt anhand der Daten der Gesamtkohorte n=180 (in Abhängigkeit des benutzten Schwellenwert: Score 0/Score 1)) sind:

* Sensitivität:	87,5%	62,5%
* Spezifität:	75,6%	97,1%
* Positiver Prädiktionswert:	14,1%	50%
* Negativer Prädiktionswert:	99%	95%
* Gesamttreffericherheit:	76,1%	96,1%

Aus unseren Ergebnissen resultiert, dass der Einsatz der Immunzytochemie unter Verwendung des von uns zusammengestellten Markerpanels und des aufgestellten Algorithmus zur diagnostischen Interpretation der immunzytochemischen Färbeargebnisse sich als adjuvante Methode zur Identifizierung des Primärtumors klinisch unbekannter Herkunft an Tumorzellen seröser Körperhöhlenergüssen in der zytologischen Routinediagnostik eignet. In 85,1% der Fälle wurde der Primärtumorsitz korrekt identifiziert.

Die Methode der diagnostischen Immunzytochemie ist ohne Umstellung der Routineabläufe optimal in die Diagnostik integrierbar. Sie stellt somit einen Fortschritt gegenüber der bisher vorherrschenden alleinigen zytologischen Untersuchung dar und erspart unter Umständen eine verzögerte klinische Diagnose mit oft unnötigen, invasiven und teuren weiteren Untersuchungsverfahren sowie inadäquate oder unterbliebene Therapien. Die Immunzytochemie leistet einen wertvollen klinisch relevanten Beitrag zur Erhöhung der Treffericherheit von zytologischen Diagnosen an Körperhöhlenergüssen.

A. Böning

28.09.05