

Aus dem Institut für Pathologie und Funktionsbereich Cytopathologie  
der Heinrich-Heine-Universität  
Funktionsbereich Cytopathologie  
Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Treffsicherheit der adjuvanten Fluoreszenz-in-situ-  
Hybridisierung von Bürstenabstrichen der Gallenwege für die  
Diagnose von cholangiozellulären Karzinomen und duktalem  
Pankreaskarzinomen

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Annika Thieme  
2015

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

gez:

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent: Prof. Dr. med. Alfred Böcking

Korreferent: Prof. Dr. med. R. Kubitz

Georg und meinen Eltern gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Posterpräsentation auf der 96. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V. in Berlin im Jahr 2012. FR-P-111.

M. Schramm, A. Thieme, N. Pomjanski, H. Neuhaus, A. Böcking, S. Biesterfeld

Adjuvante Fluoreszenz In-situ-Hybridisierung nach unklarer Zytologie der ableitenden Gallen- und Pankreasgänge

# I Zusammenfassung

**der Dissertation zur Treffsicherheit der adjuvanten Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von Bürstenabstrichen der Gallenwege für die Diagnose von cholangiozellulären Karzinomen und duktalem Pankreaskarzinomen**

**Einleitung:** Gallengangs- und exokrine Pankreaskarzinome zeigen wenige Symptome und werden daher erst spät diagnostiziert. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie hoch die Treffsicherheit der lichtmikroskopischen Zytologie und der chromosomalen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am selben Material sind und ob die FISH einen Zugewinn an Treffsicherheit im Vergleich zur konventionellen Zytologie ermöglicht.

**Material und Methoden:** Das Präparatekollektiv setzte sich aus 235 Abstrichen zusammen, von denen bei 219 ein Follow up möglich war. 131 Präparate wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung untersucht.

**Ergebnisse:** Die lichtmikroskopische Zytologie und die FISH erreichen eine Sensitivität von 89,33 % vs 76 % und eine Spezifität von 83,93 % vs 100 %. Wird die FISH als adjuvante Methode nach unklarer Zytologie eingesetzt, liegt die Sensitivität bei 82,86 % und die Spezifität bei 100 %.

**Schlussfolgerung:** Die FISH eignet sich als Bestätigungstest bei unklarer Zytologie der ableitenden Gallen- und Pankreasgänge und führt hier abschließend zu einer definitiven Diagnose oder dem Ausschluss eines malignen Tumors. Als adjuvante Methode bei zytologisch negativen und positiven Diagnosen erbringt sie keinen Benefit.

Annika Thieme

## II Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	Bedeutung
ACS	American Cancer Society
APC	Adenomatöse Polyposis coli
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AUC	Area under the Curve
BRCA-Gen	Breast Cancer-Gen
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A = p16
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHC	Ductus hepatocholedochus
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
EUS	Endoskopischer Ultraschall
FDG-PET	<sup>18</sup> F-Fluordesoxy-Glucose-Positronenemissionstomographie
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FNB/FNAB	Feinnadelaspirationsbiopsie
GB	Gallenblase
GG	Gallengang
G-Stadien	Grading-Stadien
Her-2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
ICD-O	Internationale Klassifikation der Krankheiten für die Onkologie
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
LK	Lymphknoten
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NPV	Negativer prädiktiver Wert
PAP	Papanicolaou
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDT	Photodynamische Therapie
PPV	Positiver prädiktiver Wert
PTCD	perkutane transhepatische Choledochusdrainage
SMAD4	Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4
SNOMED	Systematisierte Nomenklatur der Medizin
TNM	Tumor, Lymphknoten, Metastasen
TP53	Tumor Protein 53
UICC	Union International contre le Cancer
WHO	World Health Center Organisation

### III Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	4
1.1	Tumoren der Gallengänge .....	4
1.1.1	Epidemiologie .....	4
1.1.2	Prognose .....	4
1.1.3	Ätiologie .....	4
1.1.4	Pathologie und Stadieneinteilung .....	6
1.1.4.1	Pathologie .....	6
1.1.4.2	Molekularpathogenese / Zytogenetik .....	6
1.1.4.3	Einteilung der hilären Cholangiokarzinome nach Bismuth: .....	7
1.1.5	Diagnostik .....	7
1.1.5.1	Klinische Symptomatik .....	7
1.1.5.2	Weiterführende Diagnostik – Labor und bildgebende Verfahren .....	8
1.1.6	Therapie .....	9
1.1.6.1	Chirurgische Therapie .....	9
1.1.6.2	Palliativmedizin .....	9
1.2	Duktales Adenokarzinom des Pankreas .....	10
1.2.1	Epidemiologie .....	10
1.2.2	Prognose .....	11
1.2.3	Ätiologie .....	11
1.2.4	Pathologie und Stadieneinteilung .....	12
1.2.4.1	Pathologie .....	12
1.2.4.2	Molekularpathogenese/ Zytogenetik .....	13
1.2.5	Diagnostik .....	14
1.2.5.1	Klinische Symptomatik .....	14
1.2.5.2	Weiterführende Diagnostik – Labor und bildgebende Verfahren .....	14
1.2.6	Therapie .....	15
1.2.6.1	Therapie mit kurativer Intention .....	15
1.2.6.2	Palliativmedizin .....	16
1.3	Klinische Zytodiagnostik .....	16
1.3.1	ERCP .....	17
1.3.2	Exfoliativzytologie des Gallen- und Pankreasgangssystems .....	18
1.3.3	Aneuploidie .....	18
1.3.4	Phylogenetische/ chromosomale Krebstheorie .....	19
1.3.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	20

1.4	Zielsetzung der Dissertation .....	21
2	Material und Methoden .....	22
2.1	Material .....	22
2.1.1	Das Patientenkollektiv .....	22
2.1.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	24
2.2	Methoden .....	27
2.2.1	Gewinnung der Gallenwegsabstriche mittels ERCP .....	27
2.2.2	Standardisierte, lichtmikroskopische Diagnostik der Exfoliativzytologie .....	27
2.2.3	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	28
2.2.4	Vorbereitung der zytologischen Proben für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	28
2.2.5	Hybridisierung .....	29
2.2.6	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der hybridisierten Präparate .....	30
2.2.6.1	DAPI-Fluoreszenzfilter .....	30
2.2.6.2	Fluoreszenzfilter spectrum green, spectrum red, spectrum aqua, spectrum gold .....	30
2.2.6.3	Auswertung .....	31
2.2.7	Follow up .....	32
2.2.8	Referenzstandard .....	33
2.2.9	Dignitätsdiagnostik .....	34
3	Ergebnisse .....	36
3.1	Deskriptive Darstellung der Daten .....	36
3.1.1	Patientenkollektiv .....	36
3.1.2	Diagnosen des Follow ups .....	38
3.1.3	Anwendung der FISH .....	40
3.1.4	Mikroskopische Analyse .....	41
3.1.4.1	DAPI .....	41
3.1.4.2	Fluoreszenzfilter .....	42
3.1.5	Verteilung chromosomaler Aberrationen .....	44
3.2	Analyse der Ergebnisse .....	45
3.2.1	Treffsicherheit der zytopathologischen Routinediagnostik .....	45
3.2.1.1	Zytologisches Kollektiv I (n = 219) .....	45
	Einteilung in zytologische Diagnosegruppen .....	46
3.2.1.2	Zytologisches Kollektiv II (n = 131) .....	48
3.2.2	Aufschlüsselung der diskrepanten zytopathologischen Diagnosen des Kollektivs II (n = 131) .....	51
3.2.3	FISH-Auswertung .....	54

3.2.4	Treffsicherheit der FISH in den vier zytologischen Diagnosegruppen.....	58
3.2.5	Aufschlüsselung der diskrepanten FISH-Diagnosen.....	59
3.2.6	FISH als adjuvante Methode bei negativer und unklarer Zytologie .....	62
3.2.7	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	63
3.3	Ist FISH eine geeignete diagnostische Methode in der Abstrich-Diagnostik von Gallengangs- und Pankreaskarzinomen im Rahmen einer ERCP?.....	63
4	Diskussion.....	64
4.1	Patienten und Präparate .....	64
4.2	Aneuploidie als Kriterium für Malignität .....	64
4.3	Lässt sich die diagnostische Treffsicherheit der Gallengangszytologie durch die Hinzunahme der FISH am selben Material verbessern? .....	65
4.3.1	Adjuvante FISH bei positiver und negativer Zytologie .....	65
4.3.2	Adjuvante FISH bei dringend verdächtiger Zytologie.....	66
4.3.3	Adjuvante FISH bei zweifelhafter Zytologie .....	66
4.3.4	Fazit.....	67
4.4	Vergleich mit anderen Studien .....	67
4.4.1	Routinezytologie .....	67
4.4.2	FISH .....	70
4.4.3	Varianten .....	72
4.5	Limitationen der Studie .....	74
4.6	Schlussfolgerung.....	75
5	Literatur.....	76
6	Abbildungsverzeichnis.....	87
7	Tabellenverzeichnis .....	88
8	Danksagung.....	90
9	Anhang .....	91

# **1 Einleitung**

## **1.1 Tumoren der Gallengänge**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) gehört mit einer Inzidenz von 1,8/100.000 (USA 2004-2008) (Howlader 2011) bis 5.2-5.87/100.000 (Japan) (Khan u. a. 2002) zu den eher seltenen Tumorentitäten. 13 % der jährlich weltweit 7,6 Millionen malignombedingten Todesfälle sind jedoch auf hepatobiliäre maligne Erkrankungen zurückzuführen (Ayala & Blackstock 2008), wovon das cholangiozelluläre Karzinom nach dem hepatozellulären Karzinom den zweitgrößten Anteil ausmacht. 10-20 % der Todesfälle weltweit bei primären hepatobiliären Neoplasien sind auf das CCC zurückzuführen (Gatto u. a. 2010). Das mittlere Erkrankungsalter liegt in der siebten Lebensdekade. Männer sind etwa 1,5-fach häufiger betroffen als Frauen (2,3 vs 1,5/100.000) (Howlader 2011). Andere Daten zeigen keinerlei Bevorzugung eines Geschlechts (Kuntz & Kuntz 2008, S.815).

In den letzten zwei Jahrzehnten ist die Inzidenz des intrahepatischen CCC in den USA um 165 % gestiegen und gewinnt damit an Relevanz (Shaib & El-Serag 2004). Dahingegen blieb die Inzidenzrate extrahepatischer CCC konstant (Gatto u. a. 2010).

### **1.1.2 Prognose**

Das mediane Überleben bei einem CCC beträgt nach Daten von Guglielmi und Mitarbeitern (2010) 24 Monate. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei intrahepatischem CCC ist 26 %, bei extrahepatischem 13 % (Guglielmi u. a. 2010).

Die altersadjustierte Mortalitätsrate des extrahepatischen CCC sank in den USA von 0,6:100.000 im Jahre 1979 auf 0,3:100.000 in 1998 (Aljiffry u. a. 2009).

Das Überleben ist abhängig von der Tumordifferenzierung. Die 2-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit G1-Adenokarzinom beträgt 24 %, für G2-Adenokarzinome 16 %, für G3-Adenokarzinome 3,7 % und für Patienten mit G4-Tumoren 0 % (Henson u. a. 1992).

### **1.1.3 Ätiologie**

Es ist bisher keine eindeutige Ätiologie des cholangiozellulären Karzinoms bekannt. Es finden sich jedoch diverse Risikofaktoren:

Das CCC tritt gehäuft bei Patienten mit chronischen Cholangitiden auf. In Westeuropa und den USA stellt die mit Colitis ulcerosa vergesellschaftete primär sklerosierende Cholangitis den häufigsten prädisponierenden Faktor für die Entwicklung eines CCC dar (Schulick 2008). In der Literatur werden Entartungsraten von bis zu 40 % (Khan u. a.

2008) und ein 400–1000-fach erhöhtes relatives Risiko (Sendler & Tumorzentrum (Muenchen) 2006) beschrieben.

Patienten mit Choledocholithiasis zeigen ein im Vergleich zur Normalbevölkerung verdoppeltes Risiko (Odds Ratio 2,07) für die Entwicklung eines cholangiozellulären Karzinoms (Ahrens u. a. 2007). Bis zu 10 % der Patienten mit Hepatolithiasis entwickeln ein CCC (Khan u. a. 2008).

Infektionen mit Leberegeln wie beispielsweise *Clonorchis sinensis* spielen in Asien bei bis zu 60 % der hepatobiliären Neoplasien eine Rolle (Böcker u. a. 2004).

Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Infektion weisen ein 2,55-faches Langzeitrisiko für die Entwicklung eines intrahepatischen CCC auf. Das Risiko für die Entwicklung eines extrahepatischen CCC scheint nicht erhöht (El-Serag u. a. 2009).

Auch kongenitale Anomalien der Gallengänge gehen mit einem erhöhten Entartungsrisiko einher:

Choledochuszysten sind kongenitale, segmentale Dilatationen der Gallenwege. Sie finden sich in Westeuropa mit einer Inzidenz von 1:100000 Geburten eher selten. In Asien dagegen zeigt sich eine deutlich höhere Inzidenz von 1:1000 Geburten, 2/3 aller erkrankten Asiaten sind Japaner (Singham u. a. 2009).

Das Caroli-Syndrom ist mit einer Inzidenz von 1:1000000 eine seltene erbliche Malformation der größeren intrahepatischen Gallengänge mit 100-fach erhöhtem Entartungsrisiko (Sendler & Tumorzentrum (Muenchen) 2006). Es manifestiert sich in 80 % der Fälle vor dem 30. Lebensjahr (Yonem & Bayraktar 2007).

Im Gegensatz dazu sind bei der biliären Atresie sowohl extra- als auch intrahepatische Gallengänge betroffen. Diese Anomalie ist die häufigste Ursache für Lebertransplantationen im Kindesalter (Mieli-Vergani & Vergani 2009).

Dem Alagille-Syndrom liegt ursächlich eine autosomal-dominant vererbte Mutation des JAG1-Gens zugrunde, welches für die Zellzyklusregulation von Bedeutung ist. Symptome sind neben kardiovaskulären und skelettalen Anomalien eine chronische Rarefizierung der Gallenwege (Oda u. a. 1997). Mit einer Prävalenz von 1:70000 Geburten ist auch das Alagille-Syndrom eher selten (Tsai u. a. 2010).

Das bis zu den 1950er Jahren unter dem Namen Thorotrast eingesetzte karzinogene Röntgenkontrastmittel Thoriumdioxid besitzt eine hohe Affinität zum retikulohistiozytären System und hat eine ausgeprägte radioaktive Belastung von Leber und Gallenwegen zur Folge (Zhu u. a. 2004). Die mittlere Latenzzeit bis zur Entwicklung eines Cholangiokarzinoms beträgt 35 Jahre (Kuntz & Kuntz 2008).

Als weitere Risikofaktoren gelten chemische Agenzien wie Dioxin, Nitrosamin und Aflatoxin sowie Medikamente, insbesondere Isoniazid, anabolische Steroide,  $\alpha$ -Methyl-dopa und Kontrazeptiva (Kuntz & Kuntz 2008).

## **1.1.4 Pathologie und Stadieneinteilung**

### **1.1.4.1 Pathologie**

Cholangiozelluläre Karzinome werden nach ihrer Lokalisation in Tumoren der Gallenblase, sowie intra- und extrahepatische Neoplasien der Gallenwege eingeteilt. Letztere werden weiterhin in drei Abschnitte untergliedert. Die Tumoren des oberen Drittels machen etwa 49 % aller extrahepatischen CCC aus. Sie erstrecken sich vom Leberhilus bis zur Mündung des Ductus cysticus und werden auch als Klatskin-Tumoren bezeichnet. Im mittleren Drittel (Ductus hepaticus communis) finden sich etwa 29 %; im unteren, periampullär gelegenen Drittel werden die übrigen extrahepatischen cholangiozellulären Karzinome diagnostiziert (Kuntz & Kuntz 2008). Das Papillenkarcinom stellt eine eigene Tumorentität dar und wird daher nicht zu den cholangiozellulären Karzinomen gezählt.

Mit einer Häufigkeit von mehr als 90 % stellt das Adenokarcinom die größte Entität der cholangiozellulären Karzinome dar. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um hoch- bis mittelgradig differenzierte Karzinome, die früh perineural infiltrieren (Aljiffry u. a. 2009) und sich per continuitatem in die Nachbarorgane ausbreiten (Sendler & Tumorzentrum (Muenchen) 2006, S.77–100).

Weitere Differenzierungen sind das kleinzellige Karzinom, das Plattenepithelkarzinom, Karzinoide und Mischtumoren. Diese Malignome machen jeweils unter 5 % aller cholangiozellulären Karzinome aus. Bei Immunsupprimierten und AIDS-Patienten zeigen sich zudem Kaposi-Sarkome und Lymphome (Stahl u. a. 2006).

Die Einteilung der distalen extrahepatischen Gallengangstumoren erfolgt nach der TNM-Klassifikation nach ICD-O C24.0 (Wittekind & Meyer 2010).

### **1.1.4.2 Molekularpathogenese / Zytogenetik**

Molekularpathogenetisch finden sich Hinweise, dass sowohl die Aktivierung von Onkogenen wie dem K-ras-Gen, welches eine erhöhte Zellproliferationsrate provoziert (Rodriguez-Viciano u. a. 2005) und auf Chromosom 12p Genlocus 12.1 zu finden ist (Wang u. a. 2001), (DeHaan u. a. 2007), als auch die Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen wie p53, welches eine wichtige Kontrollfunktion am G1/S- und G2/M-Übergang des Zellzyklus inne hat (Briggs u. a. 2009), eine Rolle bei der Tumorentstehung spielen (Ahrendt u. a. 2000). Die Rate von KRAS-Mutationen nimmt dabei von proximalen zu distalen Gallengangskarzinomen zu (Bosman u. a. 2010, S.273). Das extrazelluläre Matrixprotein Laminin- $\gamma$ -2 spielt eine wichtige Rolle bei der Zellmigration und beim invasiven Tumorwachstum. Es wird insbesondere beim intrahepatischen Gallenwegskarzinom verstärkt exprimiert (Aishima u. a. 2004).

Neben den exemplarisch beschriebenen Gendefekten zeigen sich signifikante Assoziationen zwischen chromosomaler Instabilität und Aneuploidie mit Verlusten und Zugewinnen ganzer Chromosomen (-abschnitte) und einer niedrigen Überlebensrate (Lindberg u. a. 2006). Aneuploidie konnte als unabhängiger prognostischer Marker identifiziert werden (Iachino u. a. 1998), (Briggs u. a. 2009).

### 1.1.4.3 Einteilung der hilären Cholangiokarzinome nach Bismuth:

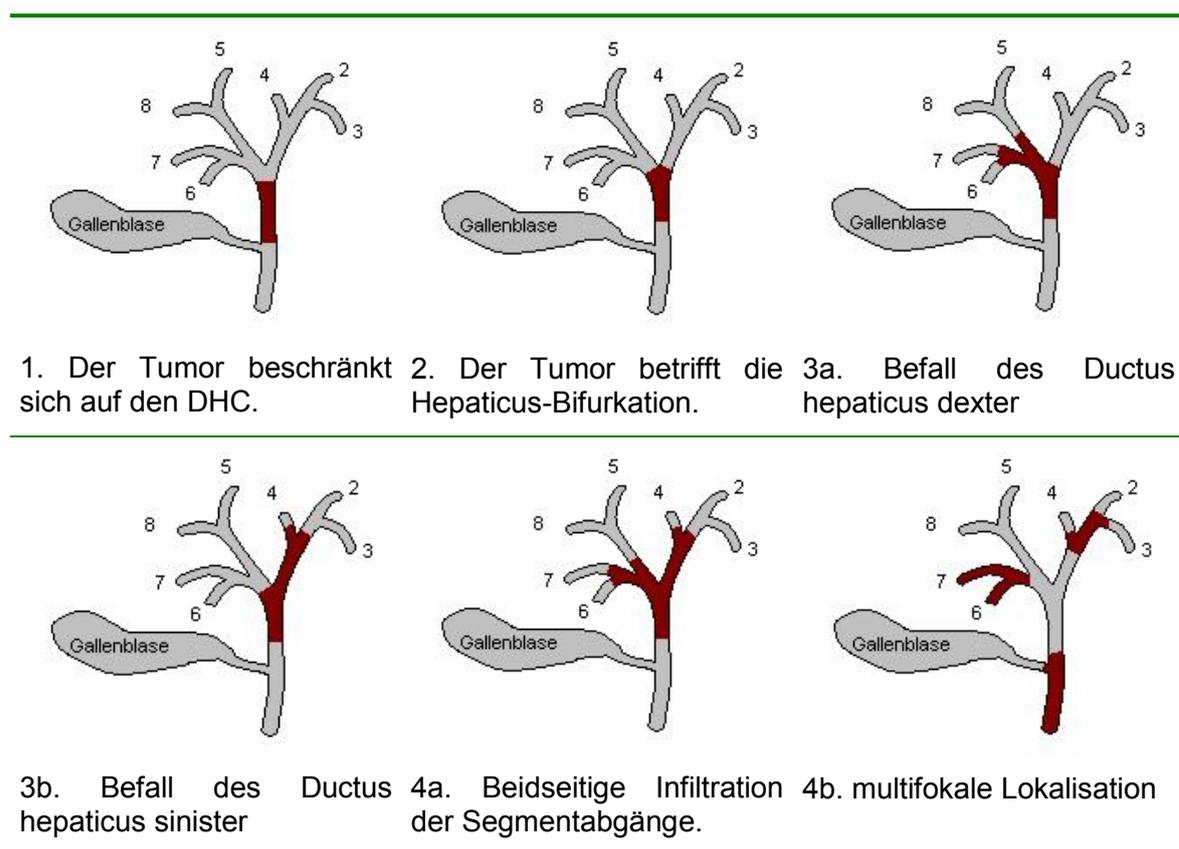


Tabelle 1: Bismuth-Stadien (Aljiffry u. a. 2009)

## 1.1.5 Diagnostik

### 1.1.5.1 Klinische Symptomatik

Das Leitsymptom des distalen cholangiozellulären Karzinoms ist in 90 % der Fälle ein schmerzloser Verschlussikterus mit bierbraunem Urin und acholischen Stühlen. Bei der körperlichen Untersuchung kann durch den Rückstau der Galle in die Gallenblase in seltenen Fällen ein Courvoisier-Zeichen vorliegen (Bahra u. a. 2006). Die Patienten berichten zudem über Pruritus (30–50 %), rechtsseitigen Oberbauchschmerz (30 %), Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust (35 %) (DeOliveira u. a. 2007). Bei einem Rückstau in das Pankreas kann ein CCC auch durch eine Pankreatitis in Erscheinung treten (Rexroth 2005). Da das Wachstum cholangiozellulärer Karzinome meist langsam

progredient ist, gibt es wenige Akut- und Frühsymptome. Daher zeigt sich der Tumor meist erst in späten Stadien (Bahra u. a. 2006).

#### **1.1.5.2 Weiterführende Diagnostik – Labor und bildgebende Verfahren**

Im Laborbefund finden sich Zeichen der Inflammation, der Cholestase (erhöhte alkalische Phosphatase, Leucin-Amino-Peptidase und  $\gamma$ -GT, erhöhtes Bilirubin) und erhöhte Tumormarker (CA19-9, CA 50, CEA) (Kuntz & Kuntz 2008).

An erster Stelle der apparativen Diagnostik steht die abdominelle Sonographie. Größere intrahepatische CCC und Lebermetastasen lassen sich als Raumforderungen darstellen. Kleinere hiläre und distale Tumoren sind schwer zu beurteilen. In diesen Fällen kann ein indirekter Nachweis über proximal der Stenosen gelegene Gallengangsdilatationen gelingen. Die Farbkodierte-Duplex-Sonographie kann helfen, Gefäßinvasionen und Thrombosen insbesondere der V. portae zu erkennen. Die Sensitivität und Spezifität sind stark abhängig von der Größe und Lokalisation des Tumors und von der Erfahrung des Untersuchers (Kolligs u. a. 2008).

Bei weiter bestehendem Verdacht auf ein CCC wird eine endoskopische Diagnostik durchgeführt. Die Endosonographie (EUS) eignet sich für die Darstellung distaler Tumoren, weniger für hilusnahe Stenosen, da der Ultraschallkopf im Lumen des Duodenums platziert wird. Für eine noch detailreichere Auflösung wurde der intraduktale Ultraschall entwickelt (Wehrmann u. a. 2003), der es durch Einführung 2 mm durchmessender Mini-Ultraschallsonden (Frequenz 12-30 MHz) in die Gallenwege ermöglicht, auch kleinste Läsionen in den Gallenwegen oder aber eine Infiltration der Nachbarorgane darzustellen.

Eine zentrale Rolle in der Diagnostik kommt der endoskopisch-retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP) zu, da sie zusätzlich zur diagnostischen Darstellung der Gallenwege und des Pankreasgangs die Möglichkeit bietet, histologische und zytologische Proben zu gewinnen und bei Bedarf sofort zu intervenieren.

Falls der Zugang zu einem MRT-Gerät besteht, wird heutzutage eine Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) in Kombination mit einer MRT empfohlen. Der Vorteil gegenüber der ERCP liegt in der Nichtinvasivität und somit einem geringeren Nebenwirkungsspektrum des Verfahrens (siehe Kapitel 1.3.1). Die Sensitivität der MRCP wird in der Literatur mit 70-100 % angegeben (Bahra u. a. 2006), (Hekimoglu u. a. 2008). Nachteilig ist jedoch, dass eine Materialgewinnung aus den Gallenwegen und jegliche therapeutische Maßnahmen unmöglich sind. Wenn eine MRCP nicht möglich ist, sollte eine kontrastmittelverstärkte Computertomographie (CT) angedacht werden. Bei einer CT-Angiographie kann eine mögliche Tumorinvasion in die umliegenden Gefäße wie A. hepatica und V. portae und damit die Operabilität beurteilt werden (Bahra u. a. 2006).

Zum Nachweis von Fernmetastasen eignet sich die Positronen-Emissionstomographie (PET), bei der sich aufgrund des erhöhten Glucosemetabolismus der CCC ein radioaktiv markiertes Glucoseanalogon in Tochter Tumoren anreichert und dort nachgewiesen werden kann (Kolligs u. a. 2008).

## **1.1.6 Therapie**

### **1.1.6.1 Chirurgische Therapie**

Die chirurgische Therapie cholangiozellulärer Karzinome stellt die einzige potentiell kurative Behandlungsmethode dar.

Im mittleren oder distalen Drittel gelegene Tumoren des DHC können in Form einer erstmals 1898 von Alessandro Codivilla (Schnelldorfer & Sarr 2009) und später von Allen O. Whipple beschriebenen Duodenopankreatektomie operiert werden. Heutzutage wird zumeist die partielle Duodenopankreatektomie nach Traverso-Longmire eingesetzt, bei der neben Pankreaskopf und Duodenum der distale DHC und regionäre Lymphknoten reseziert werden (Henne-Bruns u. a. 2007).

Bei den hilären Klatskin-Tumoren werden die infiltrierten extrahepatischen Gallenwege reseziert und eine Cholezystektomie sowie eine ausgedehnte Lymphadenektomie des Ligamentum hepatoduodenale durchgeführt. Liegt ein Bismuth-Stadium III vor, muss eine links- oder rechtsseitige Leberteilresektion vorgenommen werden. Die Rekonstruktion erfolgt über eine Roux-Y-Anastomose. Der Klatskin-Tumor Grad IV ist inoperabel (Henne-Bruns u. a. 2007).

Aufgrund der notwendigen Immunsuppression nach Lebertransplantationen ist die Rezidivrate der intrahepatischen Cholangiokarzinome sehr hoch. Daher wird im klinischen Alltag meist von einer Transplantation abgesehen (Kuntz & Kuntz 2008).

### **1.1.6.2 Palliativmedizin**

Für die Operabilität der Cholangiokarzinome müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein: Leber- und Fernmetastasen müssen ausgeschlossen sein. Außerdem dürfen die V.portae und benachbarte Organe nicht infiltriert sein (Zervos u. a. 2005). Andernfalls werden palliative Maßnahmen ergriffen:

Bei einem Aufstau der Galle entwickeln die Patienten einen therapieresistenten Juckreiz, weshalb ein vorherrschendes Ziel palliativer Therapie die Drainage der Galle darstellen sollte. Dadurch wird weiterhin das Risiko für die Entwicklung von Cholangitiden verhindert. Bei einer endoskopischen retrograden Cholangiopankreatikographie können Pigtailkatheter oder Metall- beziehungsweise Kunststoff-Stents (Levy u. a. 2004) in den Gallenwegen platziert werden, die dann die Ableitung der Galle ins Duodenum

ermöglichen. Alternativ zur Endoskopie kann der Gallenabfluss über eine perkutane Drainage (Laméris u. a. 1990) zum Beispiel mittels Yamakawa-Prothese gewährleistet werden (Petzold u. a. 2001).

Bisher gibt es keine einheitlichen Richtlinien für eine palliative Chemotherapie. Die meisten Patienten werden individuell oder im Rahmen von Studien behandelt.

Fluorouracil, Gemcitabin, Cisplatin, Irinotecan, Epirubicin, Capecitabin, Mitomycin C und andere Chemotherapeutika werden als Mono- oder Polytherapie eingesetzt (Cereda u. a. 2010).

Die palliative Chemotherapie verbessert einerseits die Lebensqualität, andererseits erhöht sich auch signifikant die mediane Überlebensspanne. Bei Glimelius et al. (1996) steigt das mediane Überleben von 2,5 auf 6 Monate (Glimelius u. a. 1996).

Da die Tumoren im Gegensatz zum übrigen Lebergewebe ausschließlich arteriell mit Blut versorgt werden, ist es möglich transarteriell kathetergesteuert eine Chemoembolisation (TACE) oder selektive interne Radiotherapie (SIRT) durchzuführen. Erste Studien belegen eine signifikante Verlängerung der Lebenszeit (Hong & Geschwind 2010).

Ob eine adjuvante Chemotherapie die Überlebenschancen verbessern kann, lässt sich durch die momentane, widersprüchliche Studienlage nicht bewerten.

Eine postoperative externe Radiotherapie erhöht bei Gwak et al. (2010) das mediane Überleben der Patienten (Gwak u. a. 2009). Doch auch hier finden sich wie bei der Chemotherapie bisher keine Phase-III-Studien, die der Radio- und der Radiochemotherapie eine eindeutige Prognoseverbesserung zusprechen könnten.

## **1.2 Duktales Adenokarzinom des Pankreas**

### **1.2.1 Epidemiologie**

Das exokrine Adenokarzinom der Pankreasgangzellen stellt mit über 90 % die größte Entität der Pankreaskarzinome dar. Im Jahr 2000 wurden in Deutschland 7711 Neuerkrankungen bei Frauen und 5766 bei Männern verzeichnet. Das bedeutet einen Anteil von 4 % bzw. 3,8 % an allen Krebsneuerkrankungen (Seufferlein & Adler 2009). Die jährliche Weltstandard-Inzidenz beträgt 5,2 je 100.000 für Frauen und 7,8 je 100.000 für Männer. Die Inzidenz liegt etwa in gleicher Höhe wie die Mortalitätsrate (Layfield & Jarboe 2010). Das Pankreaskarzinom steht an 10. Stelle der Tumorneuerkrankungen in Deutschland. Bedingt durch die hohe Letalität findet es sich jedoch hier auf Platz 5 der Krebstodesursachenstatistik (Seufferlein & Adler 2009). Das mittlere Erkrankungsalter bei Männern beträgt 68 Jahre, bei Frauen 75 Jahre (Seufferlein & Adler 2009). 80 % der

Erkrankungen manifestieren sich bei Patienten zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr (Bosman u. a. 2010, S.281).

### 1.2.2 Prognose

Die 5-Jahres-Überlebensrate beim exokrinen Pankreaskarzinom ist abhängig vom Stadium der Erkrankung. Nach Daten der American Cancer Society (ACS) 2014 liegt das 5-Jahres-Überleben nach der Erstdiagnose bei weniger als 5 % (American Cancer Society 2014). Als ursächlich wird gesehen, dass die Erkrankung bei der Erstdiagnose meist lokal fortgeschrittenen ist und schon Metastasen vorliegen, die die Überlebenszeit determinieren (Philip u. a. 2009). Remissionen werden nur in Einzelfällen beobachtet. Unbehandelt liegt das mediane Überleben beim metastasierten Pankreaskarzinom bei 3-

Stage IA	14 %
Stage IB	12 %
Stage IIA	7 %
Stage IIB	5 %
Stage III	4 %
Stage IV	1 %

5 Monaten. Ein Median von 6-10 Monaten zeigt sich bei Patienten mit nicht metastasiertem, lokal fortgeschrittenem Tumor bzw. 11-15 Monate bei Patienten nach radikaler chirurgischer Resektion (Ghaneh u. a. 2008). Längere Überlebenszeiten können bei R0-Resektionen und metastasenfremigen Lymphknoten-Exzidaten erwartet werden (Bosman u. a. 2010, S.291).

Tabelle 2: Stadienabhängige 5-Jahres-Überlebensraten der ACS

### 1.2.3 Ätiologie

Die Ätiologie des exokrinen Pankreaskarzinoms ist nicht geklärt. Es lassen sich jedoch zahlreiche Risikofaktoren eruieren. Adipositas und mangelnde körperliche Aktivität können das Lebenszeitrisiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln steigern (Michaud u. a. 2001). Aktueller Zigarettenkonsum, Beendigung des Rauchens vor weniger als 5 Jahren und Passivrauchen (Vrieling u. a. 2010) erhöhen das relative Risiko für Pankreasneoplasien um 1,5-2,5 (Sendler & Tumorzentrum (Muenchen) 2006).

Abhängig von der Dauer, der Häufigkeit und der Menge von Alkoholkonsum steigt bei Gupta und Mitarbeitern (Gupta u. a. 2010) bei Männern das relative Risiko um das 1,5 – 6-fache.

Chronische Pankreatitiden erhöhen das Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms (Whitcomb 2004). Dabei scheint die ätiologische Unterteilung in alkohol- oder medikamententoxische, infektiöse, autoimmune und traumatische Genesen von eher untergeordneter Bedeutung für die Tumorprogression zu sein (Whitcomb & Greer 2009).

In tropischen Regionen findet sich insbesondere bei Kindern die tropische kalzifizierende Pankreatitis, deren relatives Risiko in der Literatur mit bis zu 100 beschrieben wird (Chari u. a. 1994).

Zu den hereditären Syndromen, die mit Pankreaskarzinomen assoziiert werden, zählen neben der hereditären Pankreatitis (Relatives Pankreaskarzinomrisiko: 20) auch angeborene Defekte, die neben dem Pankreas zahlreiche andere Organe betreffen können. Das Peutz-Jeghers-Syndrom, welches bei einer Mutation des STK11/LKB1-Gens auftritt, zeigt ein im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung 132-fach höheres Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms (Whitcomb & Greer 2009). Beim hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinom, bei dem verschiedene DNA-Mismatch-Repair-Gene mutiert sind, erhöht sich ebenfalls das Pankreaskarzinomrisiko (Lynch u. a. 2004). Weiterhin steigt das Entartungsrisiko bei der zystischen Fibrose (Mutation des CFTR-Gens) (Whitcomb 2004), dem Syndrom der dysplastischen Nävi, beim hereditären Mamma-/Ovariakarzinom-Syndrom (Mutationen der Tumorsuppressorgene BRCA1 oder BRCA2) und bei der familiären adenomatösen Polyposis (APC8-Mutation) (Whitcomb & Greer 2009).

## **1.2.4 Pathologie und Stadieneinteilung**

### **1.2.4.1 Pathologie**

98 % der Pankreastumoren entstehen aus dem exokrinen Anteil des Pankreas. In 70 % der Fälle entwickelt sich das exokrine Adenokarzinom des Pankreas im Pankreaskopf- oder Papillenbereich. Dabei kommt es zur tumorösen Stenose des Ductus choledochus, zur frühzeitigen Infiltration der Duodenalwand und zur Ummauerung der A. und V. mesentericae superiores (Böcker u. a. 2004). Weitere 25 % der exokrinen Pankreaskarzinome finden sich im Korpus- und etwa 5 % im Kaudagebiet (Kelly & Benjamin 1995).

Als prognostisch ungünstig werden eine perineurale Infiltration, sowie Lymphgefäß- und Veneneinbrüche gewertet (Sendler & Tumorzentrum (Muenchen) 2006).

Das duktales Adenokarzinom stellt mit etwa 80 % die weitaus größte Tumorentität dar. Meist handelt es sich um hoch- bis moderat-differenzierte Tumoren, die die tubulären und duktales Strukturen der mittelgroßen und kleinen Pankreasgänge imitieren (Böcker u. a. 2004). Es finden sich dabei im Kontrast zu gesundem Pankreasgewebe oft inkomplette oder rupturierte glanduläre Strukturen (Bosman u. a. 2010, S.283).

Die Einteilung exokriner Pankreastumoren erfolgt nach der TNM-Klassifikation nach ICD-O C25 (Wittekind & Meyer 2010).

Der Fokus dieser Dissertation liegt auf dem duktalem Adenokarzinom, sodass auf die selteneren malignen Neoplasien des Pankreas im Verlauf nicht weiter eingegangen wird.

#### **1.2.4.2 Molekularpathogenese/ Zytogenetik**

Molekularpathogenetisch weist das Pankreaskarzinom sowohl Zunahmen als auch Verluste genetischen Materials sowie chromosomale Instabilität auf (Bosman u. a. 2010, S.289). Deletionen beziehungsweise chromosomale Verluste finden sich vor allem auf den Chromosomen 18q (90 %), 17p (90 %), 9p (85 %) und 1p (60 %) (Harada u. a. 2002), (Bosman u. a. 2010, S.289), (Ghaneh u. a. 2008), (Almoguera u. a. 1988). Zugewinne genetischen Materials zeigen insbesondere die Chromosomenabschnitte 8q, 3q, 20q und 7p (Harada u. a. 2002).

Neben den quantitativen, chromosomalen Veränderungen sind meistens Tumorsuppressorgene (CDKN2A, TP53, SMAD4) und Onkogene (KRAS, Her-2/neu) betroffen. Tumorsuppressorgene werden durch homozygote Deletion, z.B. Verlust eines Allels gekoppelt mit angeborenen Mutationen des zweiten Allels oder Methylierung der Promotorregion ausgeschaltet. Onkogene hingegen werden durch Punktmutationen oder Genüberexpression aktiviert. In selteneren Fällen (4%) kann Mikrosatelliteninstabilität in Pankreaskarzinomen gefunden werden (Bosman u. a. 2010, S.290), (Korc u. a. 1992), (Tsiambas 2006).

Schon bei pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN I-III) als Malignomvorstufen finden sich molekulargenetische Alterationen, die teils typisch für das jeweilige Stadium sind, teils auch in invasiven duktalem Adenokarzinomen zu identifizieren sind. Häufige Übereinstimmungen finden sich bei Mutationen des Onkogens KRAS oder Her-2/neu. Allerdings geht nur ein kleiner Teil der pankreatischen intraepithelialen Neoplasien in invasive Karzinome über. Zudem können KRAS-Mutationen zwar in etwa 90 % der Malignome nachgewiesen werden, finden sich jedoch auch bei morphologisch nicht suspekten Gangepithelien (Sendler 2006, S.80), (Maitra u. a. 2005). CDKN2A-Mutationen treten besonders oft in mittelgradigen intraepithelialen Veränderungen (PanIN-II) auf, TP53-, BRCA2- und SMAD4-Mutationen präsentieren sich im hochgradigen intraepithelialen Neoplasien (PanIN-III) (Bosman u. a. 2010, S.290), (Sendler 2006, S.80). Sicher ist, dass in der Tumorgenese die Anzahl genetischer Veränderungen trotz großer Variationsbreite sukzessive zunimmt (Ried u. a. 1999).

## **1.2.5 Diagnostik**

### **1.2.5.1 Klinische Symptomatik**

Das exokrine Pankreaskarzinom zeigt keine spezifischen Frühsymptome und wird deshalb oft erst in fortgeschrittenen Stadien entdeckt. Bei 90 % der Patienten treten im Verlauf Schmerzen auf. Ursächlich werden hier die Peritonealkarzinose oder die Perineuralinvasion gesehen (Diehl & Kochsiek 2004, S.1384–1390). Letztere führt zusätzlich zu den charakteristischen Rückenschmerzen (Buchler u. a. 2003). Das Gros der Patienten (90 %) klagt früh über ungewollte Gewichtsabnahme.

Der schmerzlose Ikterus ist das erste wegweisende Symptom auf ein fortgeschrittenes Pankreaskopfkarzinom. 60 – 70 % entwickeln diesen posthepatischen Ikterus durch die sekundäre Stenosierung des Ductus hepatocholedochus. Tumoren im Pankreaskopf gehen früh mit einem Ikterus einher. Sind Pankreaskorpus oder –schwanz betroffen, fällt ein Ikterus meist erst bei einer Metastasierung in die Leber auf.

Als Komplikationen können im Verlauf ein Verschlussikterus, Magenausgangsstenosen, eine Steatorrhoe und Thrombophlebitiden entstehen (Buchler u. a. 2003). Eine Phlebothrombose der unteren Körperhälfte findet sich bei 16-56 % der Patienten (Diehl & Kochsiek 2004, S.1386). Übelkeit und Erbrechen deuten auf duodenale oder hepatische Beteiligung hin.

Es findet sich in 80 % der Fälle eine milde Glucose-Intoleranz. Seltener besteht ein positives Courvoisier-Zeichen. In 10 % der Fälle zeigt sich eine akute Pankreatitis als Erstsymptom eines Pankreaskarzinoms (Sendler & Tumorzentrum (Muenchen) 2006).

### **1.2.5.2 Weiterführende Diagnostik – Labor und bildgebende Verfahren**

Für die Labordiagnostik werden Leber- (ALT, AST, Bilirubin, Gesamteiweiß, INR, PTT) und Cholestaseparameter ( $\gamma$ -GT, AP), sowie Tumormarker (CA 19-9, CEA und eventuell Du-Pan 2, CA 125) für die Verlaufsbeurteilung bestimmt.

Zu Beginn der weiterführenden Diagnostik wird ein Abdomen-Sonogramm zur Beurteilung des lokalen Wachstums, der Lebermetastasen und der Cholestase angeordnet. Thrombosierungen der V. lienalis und der V. portae können zudem über eine farbkodierte Duplexsonographie ausgeschlossen werden (Diehl & Kochsiek 2004, S.1387).

Obligatorisch ist bei weiterem Verdacht eine hochauflösende thorakoabdominelle Mehrzeilen-Computertomographie zum Staging des größtenteils hypodensen Tumors. Das CT sollte immer vor einer endoskopischen Intervention durchgeführt werden, um Artefaktbildungen durch eingelegte Stents zu vermeiden. Um die lokale Tumorausdehnung beurteilen zu können, kann ergänzend ein endoskopischer Ultraschall angeschlossen werden. Duktale Adenokarzinome des Pankreas erscheinen

meist (80 % der Fälle) als echoarme, inhomogene Strukturen, teils mit zystischen und echoreichen Anteilen (Bosman u. a. 2010, S.282).

Die Indikation für eine ERCP wird bei schmerzlosem Ikterus und negativem CT gestellt. Nach Kontrastmittelgabe können sich Stenosierungen und abrupte Abbrüche der Pankreasgänge zeigen, die den Tumorverdacht erhärten (Diehl & Kochsiek 2004, S.1387).

Bei kleinen Tumoren unter 2 cm Durchmesser liegen die Sensitivität und Spezifität der bisher angesprochenen apparativen Untersuchungen jeweils unter 50 %, sodass hier die für kleine Tumoren hochsensitive und –spezifische Endosonographie Anwendung findet (Diehl & Kochsiek 2004, S.1388).

Fernmetastasen der Lunge werden mittels Röntgen-Thorax diagnostiziert. Eine MRT für das Tumorstaging ist fakultativ (Seufferlein & Adler 2009).

Histologische Biopsien oder Feinnadelaspirationsbiopsien (FNB) des Pankreas treten immer häufiger im pathologischen Untersuchungsgut auf, insbesondere zur präoperativen definitiven Diagnosestellung. Laut den S3-Leitlinien „Exokrines Pankreaskarzinom“ 2009 sollen sie bei potentiell resektablen Läsionen nicht zur präoperativen Diagnostik eingesetzt werden, da eine primäre Resektion empfohlen wird (Empfehlungsgrad: B, „Evidenzstärke“ 2, Konsens) (Seufferlein & Adler 2009). Hingegen ist auch in der palliativen Situation eine bioptische Diagnosesicherung obligat. Dies dient auch zur Differenzierung von Pankreasmetastasen bei Primärtumoren anderer Lokalisation (Seufferlein & Adler 2009). Die FNB kann transkutan oder endosonographisch gesteuert durchgeführt werden.

## **1.2.6 Therapie**

### **1.2.6.1 Therapie mit kurativer Intention**

Wegen fehlender Frühwarnzeichen sind bei Diagnosestellung nur 10 % der Pankreasmalignome potentiell kurativ behandelbar. Bei Fernmetastasen (Seufferlein & Adler 2009), Peritonealkarzinose oder eine Tumorinfiltration der Viszeralarterien (Riess u. a. 2009) kann nicht kurativ reseziert werden.

Bei einem resektablen Pankreaskopfkarzinom wird eine pyloruserhaltende Pankreatikoduodenektomie mit Lymphadenektomie vorgenommen, die die klassische Operation nach Kausch-Whipple ablöst (Riess u. a. 2009), jedoch im Langzeitoutcome gleichwertig ist (Seufferlein & Adler 2009). Bei Korpus- und Kaudakarzinomen wird eine Pankreaslinksresektion mit Splenektomie durchgeführt (Buchler u. a. 2003).

Trotz histologisch gesicherter R0-Resektionen und verbesserter diagnostischer Sensitivität durch immunhistochemische Untersuchungen und PCR-basierte Assays

(Niedergethmann u. a. 2002) rezidiert das Pankreaskarzinom oft, sodass die 5-Jahres-Überlebensrate nach kurativer OP nur etwa 20 % beträgt (Zerbi u. a. 1995).

Die bisherige Studienlage zur adjuvanten Chemotherapie ist noch lückenhaft, wird jedoch in den S3-Leitlinien für das exokrine Pankreaskarzinom im UICC-Stadium I-III empfohlen (Seufferlein & Adler 2009). Aktuell ist nur von Gemcitabin (als Mono- oder Kombinationspräparat) bekannt, dass es das Langzeitüberleben signifikant steigert eventuell mit involvierter Radiotherapie (Riess u. a. 2009, S.49).

Der Wert neoadjuvanter Chemoradiotherapie ist noch unklar (Riess u. a. 2009).

#### **1.2.6.2 Palliativmedizin**

Zur Ikterustherapie kann eine Stenteinlage, eine perkutane transhepatische Choledochusdrainage (PTCD) (Diehl & Kochsiek 2004, S.1390) oder eine biliodigestive Anastomose erfolgen (Buchler u. a. 2003, S.150). Die vielversprechendsten Ergebnisse unter Chemotherapeutika-Einsatz fanden sich bei 5-Fluorouracil (Glimelius u. a. 1996), Mitomycin C (Haycox u. a. 1998) und Gemcitabin (Burris u. a. 1997). Letzteres wird als First-Line-Therapie eingesetzt (Seufferlein & Adler 2009). Die Indikation für eine Radiotherapie beschränkt sich auf symptomatische Metastasen (Seufferlein & Adler 2009). Neue Forschungsansätze versprechen interessante Einsatzmöglichkeiten für die Zukunft. So werden derzeit antiangiogenetische Strategien, Antikörper-Therapien gegen Wachstumsfaktorrezeptoren (z.B. Erlotinib: EGF-Rezeptorinhibitor (Tang u. a. 2006)), Antisense-RNA-Therapie und Immunotherapie erprobt (Riess u. a. 2009).

### **1.3 Klinische Zytodiagnostik**

Pankreas- und Gallengangskarzinome werden meist in späten Stadien detektiert, in denen die Heilungschancen gering sind. Daher werden weitere minimal-invasive diagnostische Mittel gesucht, mit denen sich die Früherkennungsrate der Malignome verbessern lässt. Zytologische Untersuchungen von Gallen- und Pankreasgang-abstrichen nach Sondierung der Gallenwege im Rahmen einer ERCP gehören in vielen Zentren zur Routinediagnostik bei Stenosen im entsprechenden Gebiet und erlauben eine frühe Diagnose (Osnes u. a. 1975), (Kurzawinski u. a. 1993). Um die zytologischen Diagnosen insbesondere in unklaren Fällen zu sichern, können adjuvante Methoden verwendet werden (Kipp u. a. 2004), (Moreno Luna u. a. 2006), die den DNA-Gehalt und die Ploidie der Zellen messen und so eine Aussage über die Dignität des Präparats erlauben. Zu diesen Methoden zählt neben der DNA-Zytometrie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, die unter 1.3.5 näher dargestellt wird.

### 1.3.1 ERCP

Die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie ist eine invasive Methode, die sowohl die diagnostische Darstellung der ableitenden Gallenwege, der Gallenblase und des Pankreasgangs als auch die Gewinnung diagnostischer Proben und schließlich therapeutische Interventionen erlaubt.

Das oral einzuführende Endoskop verfügt über eine Seitblickoptik (Duodenoskop), mit deren Hilfe die Papilla Vateri im Duodenum aufgesucht und sondiert werden kann.

Über ein Cholangioskop kann der Untersucher sich einen direkten Einblick von den Gegebenheiten vor Ort machen. Als zweite Möglichkeit kann retrograd ein Kontrastmittel in den Ductus hepatocholedochus injiziert werden, welches von dort in das Gallengangsystem weiter fließt. Unter röntgenologischer Durchleuchtung können dann Veränderungen wie Gallensteine, Stenosen und Aufweitungen beurteilt werden (siehe Abbildung unten).

Wenn eine weitere Untersuchung der umgebenden Strukturen gewünscht ist, kann ein intraduktaler Ultraschall (siehe Kapitel 1.1.5.2) weiterhelfen.

Der Stellenwert der ERCP in der alleinigen bildgebenden Diagnostik nimmt seit der Entwicklung der MRCP deutlich ab. Ihr Einsatz wird heutzutage hauptsächlich durch ihre interventionellen diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten gerechtfertigt.

Über die Arbeitskanäle des Endoskops lassen sich Zangen, zur Gewinnung von histologischen Biopsien oder Bürsten für Exfoliativzytologien der Gallen- und Pankreasgänge, vorschieben. Durch Einsetzen von Stents (siehe Kapitel 1.1.6.2), chirurgischer Inzision der Stenosen (Papillotomie) oder Entfernen von Gallensteinen kann die endoluminale Gallenpassage wieder hergestellt werden.

Nebenwirkungen sind die Aerobilie und Perforationen der Magen- und Darmwände. In



selteneren Fällen kann es zu Post-ERCP-Pankreatitiden, Cholangitiden und Cholezystitiden kommen. Insbesondere die akute Pankreatitis geht mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher.

Abbildung 1: Darstellung des Pankreas- und Gallengangsystems im Röntgenbild (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. med. T. Frieling, Helios Klinikum Krefeld)

### **1.3.2 Exfoliativzytologie des Gallen- und Pankreasgangssystems**

Die lichtmikroskopische Zytologie ist ein anerkanntes Verfahren zur Diagnostik von Gallen- und Pankreasgangepithelien (Bardales u. a. 1998).

In der Exfoliativzytologie werden Zellen untersucht, die entweder spontan abgeschilfert sind oder von einer Körperflüssigkeit (zum Beispiel Sputum, Aszites, Galle) abgesaugt und dann zentrifugiert oder mit einem feinen Instrument abgetragen werden. Für Gallen- und Pankreasgangabstriche bei ERCP wird ein speziell geformtes Bürstchen eingesetzt. Die auf Glasobjektträger aufgetragenen Zellen werden fixiert, gefärbt und nach der „standardisierten Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie“ (Böcking 1998) ausgewertet (siehe 2.2.2).

Die Diagnose Cholangio- oder Pankreaskarzinom lässt sich oft nur durch eine invasive Histologie oder durch eine Zytologie stellen (Athanassiadou & Grapsa 2008), (Novis u. a. 2010), (Pugliese u. a. 1995). Insbesondere extrahepatische Cholangiokarzinome und duktale Pankreaskopfkarzinome können zytopathologisch gesichert werden. Intrahepatische Stenosen können mit der ERCP dagegen nicht erreicht werden und auch Pankreaskarzinome des Korpus oder Schwanzes müssen durch andere Diagnostik gesichert werden (z.B. Feinnadelaspirationsbiopsie).

Die Spezifität der Zytologie beträgt 80-100 % (Farrell u. a. 2001), (Athanassiadou & Grapsa 2008), die Sensitivität variiert stark. In der Literatur finden sich Werte zwischen 15 % (Barr Fritcher u. a. 2007) und 85 % (Sawada u. a. 1989), in neueren Studien bis 68 % (Govil u. a. 2002). In Erprobung befinden sich nun einige adjuvante Methoden, die die Sensitivität und Spezifität der Zytologie erhöhen sollen. Dazu zählen die Durchfluss-DNA-Zytometrie und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Athanassiadou & Grapsa 2008), die durch Messung quantitativer, chromosomaler Veränderungen (Aneuploidie) die Dignitätsdiagnostik erleichtern sollen.

### **1.3.3 Aneuploidie**

Eine gesunde, kernhaltige Zelle enthält jedes Chromosom in doppelter Ausführung (2 Gonosomen und 44 Autosomen). Man spricht von einem diploiden Chromosomensatz (2c, c = content). Eine Sonderstellung nehmen die Keimzellen ein, die während der Meiose einen haploiden Chromosomensatz (1c) präsentieren.

Während der Synthesephase des Zellzyklus verdoppelt sich durch die DNA-Replikation der Chromosomengehalt einer Zelle. In der G<sub>2</sub>-Phase vor der mitotischen Teilung und in den zwei frühen Phasen der Mitose (Pro- und Metaphase) findet sich somit eine physiologische, chromosomale Tetraploidie (4c) (Böcking 1990). Physiologisch aktivierte Zellen können auch ohne weitere Zellteilung ihren Chromosomensatz abermals

verdoppeln. Eine Polyploidisierung mit  $2^n$  ( $n \geq 2$ , ganze Zahlen) Chromosomensätzen kann deshalb als euploider Mechanismus gewertet werden (Biesterfeld u. a. 1994), (Otto & Whitton 2000).

Chromosomale Aneuploidie bezeichnet numerische oder strukturelle Aberrationen. Alle Krebskaryotypen weisen solche chromosomalen Veränderungen auf. Diese stehen am Beginn der Karzinogenese und führen zu Imbalancen und Defekten in der Zelle (Upender u. a. 2004), (Torres u. a. 2008). Diese Dysregulation der Gene bedingt eine Veränderung der Proteinstöchiometrie und kann zu Apoptoseresistenz der Zellen und neoplastischer Transformation führen (Torres u. a. 2008). Insbesondere Regelkreise und Mechanismen, die nur durch eine gemeinschaftliche Zusammenarbeit von Proteinen funktionieren, werden gestört. Sehr anfällig ist der Spindelapparat, der eine zentrale Rolle in der Aufteilung der Chromosomen während der Mitose übernimmt (Duesberg 2007). Bei Störungen kommt es zu Ungleichverteilungen und bei einem Überleben der ungleichen Tochterzellen zu weiterer DNA-Aneuploidisierung. Mit der Zeit können die erbgutveränderten Zellen dadurch neue Fähigkeiten wie Chemotherapeutika-Resistenzen, Zellteilungsstopp, Immortalisierung und Wanderungsfähigkeit als Ursache für Metastasen erwerben (Samsel & Böcking 2006, S.50), (Williams u. a. 2008), (Briggs u. a. 2009), (Lengauer u. a. 1998).

Chromosomale Aneuploidie wird als diagnostisches Mittel zur Krebsfrüherkennung genutzt und kann eine frühere Diagnose als die rein morphologische Histologie und Zytologie ermöglichen (Böcking u. a. 1985), (Maraki u. a. 2004), (Remmerbach u. a. 2003), (Tsiambas u. a. 2006).

### **1.3.4 Phylogenetische/ chromosomale Krebstheorie**

Neben der ursächlich auf Genmutationen basierenden Krebstheorie entwickelte sich eine zweite Theorie, welche die Aneuploidisierung als Ursprung für Neoplasien (Nishimura 2008) oder zumindest als frühes Schlüsselereignis in der Tumorgenese sieht (Duesberg 2007). Unspezifische Aneuploidisierungen können spontan oder durch Karzinogene wie z.B. virale Infekte, ionisierende Strahlen, mechanische Kräfte oder chemische Substanzen entstehen (Samsel & Böcking 2006, S.13). Eine Kettenreaktion von Aneuploidisierungen mit Zunahme des Aneuploidisierungsgrades führt schließlich zur neoplastischen Zelltransformation und damit zum malignen Tumor (Duesberg 2007). Dabei gilt, dass die Malignität und Variabilität der Zellen zunehmen, je weiter der Aneuploidisierungsprozess fortschreitet (Samsel & Böcking 2006, S.49), (Williams u. a. 2008).

Auslöser für die Entwicklung einer alternativen Krebsentstehungstheorie waren einige Fakten, die sich nicht mit den gängigen Annahmen erklären ließen, welche behaupten, dass Genmutationen allein die Entstehung von Neoplasien bedingen. Einige Karzinogene wie beispielsweise Asbest, aromatische Kohlenwasserstoffe oder Blei erzeugen keinerlei Genmutationen, können aber sehr wohl zu Neoplasien führen.

Kinder, die mit numerischen Aberrationen zur Welt kommen, wie etwa Kinder mit Trisomie 21, weisen ein erheblich vergrößertes Risiko auf an einer Leukämie zu erkranken (Duesberg 2007). Andere Trisomien sind primär nicht lebensfähig oder führen nach wenigen Monaten postpartal zum Tod (Trisomie 13 und 18). Neuere Studien zeigen jedoch erste Hinweise, dass bestimmte aneuploide Zustände stabiler sind als andere, da ein Mindestmaß an Stabilität notwendig zu sein scheint, um zu überleben (Li u. a. 2009).

Ob Verursacher oder Folge von Neoplasien, Aneuploidie als Malignommarker ist mittlerweile eine anerkannte und feste Größe in der Tumordiagnostik (Böcking & Motherby 1999), (Motherby, Marcy, u. a. 1998), (Motherby, Nadjari, u. a. 1998):

So kann mit der Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durch quantitative Messung einzelner Chromosomen in einer Zelle der veränderte DNA-Gehalt neoplastischer Zellen sichtbar gemacht werden und die Diagnose einer Neoplasie erlauben.

### **1.3.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Die in-situ-Hybridisierung wurde in den späten 1960er Jahren von den Biologen Mary Lou Pardue und Joe Gall als neue Methode vorgestellt, welche über radioaktive DNA-Markierung die Visualisierung von Nucleinsäuresequenzen ermöglichte (Gall & Pardue 1969). Die gesuchte Sequenz auf der Patienten-DNA wird komplementär von einer geeigneten Einzelstrang-DNA-Sonde gebunden. Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) werden dazu fluoreszenz-markierte Einzelstrang-DNA-Sonden eingesetzt (Langer u. a. 1981), (Pinkel u. a. 1986).

Als Vorteil der FISH lässt sich herausstellen, dass sie im Vergleich zu der ursprünglichen Methode auf radioaktive Strahlung verzichtet. Außerdem können während eines Hybridisierungsvorganges mehrere Zielsequenzen (durch die Verwendung unterschiedlich fluoreszierender Sonden) getrennt betrachtet werden. Zuletzt ermöglicht die FISH einen direkten Nucleotidsequenznachweis ohne zusätzliche Antikörper- oder Avidin-Färbung. Diese Zusatzfärbungen sind erforderlich, wenn DNA-Sonden mit gebundenen Haptenen verwendet werden, wie zum Beispiel bei der in den 1980er Jahren von Manuelidis et al. entwickelten Biotin-markierten in-situ-Hybridisierung (Levsky & Singer 2003).

Die doppelsträngige Zielzell-DNA wird durch eine Temperaturerhöhung und eine Behandlung mit sauren oder alkalischen Lösungen denaturiert. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen komplementärer DNA-Stränge getrennt. Eine stabil renaturierte, heterogene Doppelstrang-DNA aus Zell- und Sonden-DNA bildet sich erst bei Herabsetzung der Temperatur. Unspezifisch gebundener Sondenüberschuss wird über verschiedene Waschvorgänge entfernt.

Im Fluoreszenzmikroskop können dann fluoreszenzmarkierte chromosomale Strukturen durch Einsetzen von verschiedenen Filtern, die spezifisch für eine emittierte Wellenlänge sind, im Einzelnen betrachtet werden.

Die chromosomale FISH kann als diagnostisches Mittel für Neoplasien eingesetzt werden, da die Tumorgenese mit charakteristischen Veränderungen auf chromosomaler Ebene vergesellschaftet ist. Diese Teilamplifikationen, Deletionen und numerischen Aberrationen können mittels FISH sicht- und messbar gemacht werden.

Zusätzlich zur Aussage über den Chromosomengehalt des Zellkerns kann die Morphologie des Zellkerns in der DAPI-Färbung beurteilt werden.

#### **1.4 Zielsetzung der Dissertation**

Gallengangs- und exokrine Pankreaskarzinome sind heutzutage noch immer mit einer sehr schlechten Prognose verbunden. Je früher ein Karzinom entdeckt wird, desto größer ist die Chance einer dauerhaften Remission. Daher sollte das Hauptaugenmerk der Diagnostik auf Früherkennungsmethoden gelegt werden, die möglichst minimal-invasiv valide Ergebnisse liefern. Neben histologischen Biopsien, die während ERCPs gewonnen werden können, wurden daher exfoliativzytologische Bürstenabstriche entwickelt, die einen geringeren Eingriff in die körperliche Integrität fordern.

Das zentrale Ziel dieser Dissertation ist es zu klären, ob sich die Treffsicherheit der lichtmikroskopischen Gallengangs- und Pankreasgangszytologie durch die Hinzunahme der chromosomalen FISH (UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden)) am selben Material verbessern lässt. Beurteilt werden soll außerdem, welche Anteile zytologisch unsicher diagnostizierter Präparate (Wertungskategorie zweifelhaft oder dringend verdächtig, siehe 2.2.2) nach adjuvanter FISH-Diagnostik sicher als tumorzellpositiv oder negativ eingestuft werden können. Dazu muss zunächst die Güte der lichtmikroskopischen Auswertung der Gallengangs- und Pankreasgangsabstriche allein bewertet werden. Weiterhin wird die zusätzliche Anwendbarkeit der FISH-Methodik auf die vorab zytologisch gefärbten Präparate untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Das Patientenkollektiv

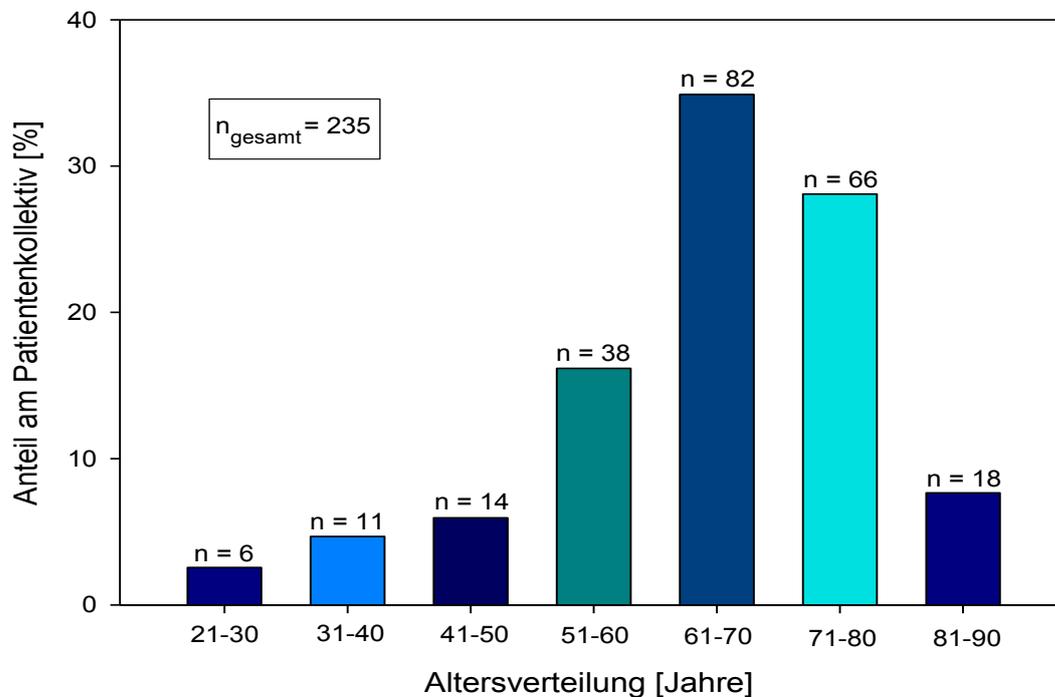
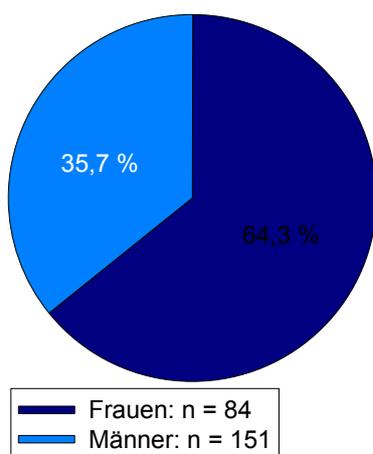


Abbildung 2: Altersverteilung des Patientenkollektivs

Das untersuchte Präparatekollektiv besteht aus 235 PAP-gefärbten, Bürstenabstrichen von Gallen- und Pankreasgangepithelien.



Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung im Mittel 64,7 ( $\pm 13,4$ ) Jahre alt. Das Alter der Patienten reichte von 21 bis 88 Jahren.

84 der 235 Abstriche wurden bei weiblichen Patienten und 151 bei männlichen Patienten entnommen. Das entspricht einer Verteilung von  $m : w = 1,8 : 1$ .

Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Untersuchung 23, die älteste Patientin 88 Jahre alt. Bei den Männern variierte das Alter zwischen dem 21. und dem 87. Lebensjahr.

Abbildung 3: Geschlechterverteilung der Patienten

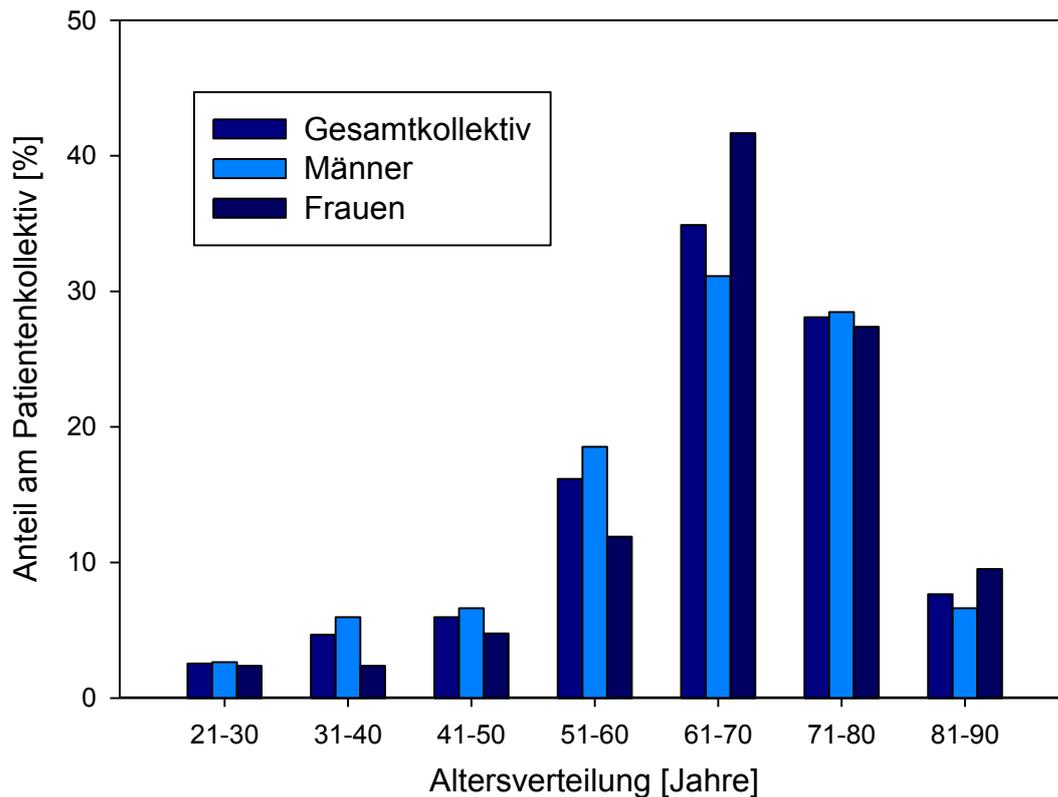


Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung nach Geschlecht und Alter

Einschlusskriterien: Alle Patienten des Evangelischen Krankenhaus (EVK) Düsseldorf, von denen im Zeitraum zwischen dem 01.01.2005 und dem 31.12.2007 zur diagnostischen Abklärung einer Strikturen des Gallen-/Pankreasgangsystems im Rahmen einer ERCP zytologische Bürstenabstriche entnommen wurden, wurden in der vorliegenden Studie eingeschlossen. Die zytologischen Abstriche wurden am zytopathologischen Institut des Universitätsklinikums Düsseldorf von erfahrenen Zytopathologen lichtmikroskopisch ausgewertet.

Retrospektiv ermöglichte Herr Univ.-Prof. Dr. med. A. Böcking den Zugang zu den in der Zytopathologie archivierten Proben.

Tumorzellhaltige und -verdächtige Areale auf den Objektträgern aller Präparate aus dem oben genannten Zeitraum von routinezytologisch zweifelhaften, dringend verdächtigen und positiven Präparate wurden ausgewählt und mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung einer erneuten diagnostischen Begutachtung unterzogen. Auf den Objektträgern von routinezytologisch negativen Präparaten wurden analog unauffällige dukta Epithelien markiert.

Eine Akteneinsicht im Archiv des EVK ermöglichte ein detailliertes Follow-up, welches zur Beurteilung der zytologischen Diagnosen notwendig war.

## 2.1.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

### Verwendete Reagenzien:

- Xylol, Merck
- 100 % Ethanol
- 95 % Ethanol
- 80 % Ethanol
- 0,5 % HCl / 70 % Ethanol:
  - 8 ml 25 % HCl in
  - 392 ml 70 % Ethanol (vergällt) lösen
- Aqua dest.
- 20x SSC-Lösung (Abbott):
  - NaCl: 3 M (175,32 g/l)
  - Trinatriumcitrat ( $C_6H_5Na_3O_7$ ): 0,3M (88,23 g/l)
- 20x SSC Stammlösung:
  - 132 g 20x SSC in 400 ml Aqua dest.
  - mit HCl auf pH 5,3 einstellen
  - mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen
- 2x SSC Gebrauchslösung (jeden Tag frisch ansetzen):
  - 100 ml der so gewonnenen Stammlösung mit 850 ml Aqua dest. auffüllen
  - mit NaOH auf pH 7 adjustieren
  - mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
  - 0,4 SSC Gebrauchslösung (jeden Tag frisch ansetzen):
    - 20x SSC Stammlösung mit
    - 950 ml Aqua dest. und 1 ml NP-40, Abbott auffüllen
    - mit NaOH auf pH 7-7,5 einstellen
- Pepsin, Sigma:
  - Pepsinstammlösung:
    - 0,2 mg / ml Pepsin in 0,02 M HCl
    - Aufbewahrung als 100  $\mu$ l Aliquots bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$
  - Pepsingebrauchslösung:
    - 4,9 ml Aqua dest. +
    - 100  $\mu$ l 1 M HCl
    - 10  $\mu$ l Pepsinstammlösung
- PBS-Stammlösung:
  - 1,46 g  $Na_2HPO_4 \times H_2O$ , Merck

- 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck
- 0,2 g KCl, Merck
- 8,0 g NaCl, Merck
- auf 900 ml mit Aqua dest. auffüllen
- mit 1 N HCl auf pH 7,3 adjustieren
- auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
- PBS-Gebrauchslösung:
  - 50 ml Stammlösung
  - 950 ml Aqua dest.
  - Auf pH 7,3 einstellen
- 1 % Formalin / PBS:
  - 1 g Paraformaldehyd, Merck in
  - 100 ml PBS-Puffer lösen
  
- *Hybridisierungssonden:*  
 Vysis® UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden)
 

<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CEP® 3 SpectrumRed™</li> <li>○ CEP® 7 SpectrumGreen™</li> <li>○ CEP® 17 SpectrumAqua™</li> </ul>	}	zentromerspezifische Chromosomensonden
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ LSI® 9p21 SpectrumGold™</li> </ul>		Lokusspezifische Sonde
  
- *Hybridisierungsmix, Vysis:*  
 7  $\mu\text{l}$  Sondenmix für eine Deckglasgröße von 18x18  $\text{mm}^2$ :
  - 4,9  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer (bestehend aus SSC, Dextransulfat und Formamid)
  - 1,4  $\mu\text{l}$  Aqua dest.
  - 0,7  $\mu\text{l}$  UroVysion-Sonde
  
- Vectashield with DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol), Biozol

**Weitere Materialien:**

- Auflichtfluoreszenzmikroskop mit Digitalkamera
  - MRm Zeiss Imager.M1, Carl Zeiss, Jena
  - 100 Watt Quecksilberdampflampe, Osram

- Fluoreszenzfiltereinsätze: DAPI-Einzelbandpass, Einzelbandpass-Yellow, Einzelbandpass-Aqua und Einzelbandpass-Green und Einzelbandpass Red
- AxioCam MRm, Carl Zeiss, Jena
- Immersionsöl „Immersol“ 518 F Fluoreszenzfrei, Carl Zeiss
- Vortexer, Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik
- Tischzentrifuge, Qualitron INC
- Präzisionsheizplatte, Präzitherm, LHG
- Wasserbad ( $73 \pm 1$  °C), Memmert
- Befeuchtete Hybridisierungskammer ( $37 \pm 1$  °C)
- Fixogum, Rubber Cement, Q-Biogene
- Deckgläschen, VWR:  $\varnothing$  rund 10 mm, 15 x 15 mm<sup>2</sup>, 18 x 18 mm<sup>2</sup>
- Objektträger Super Frost Plus, Menzel, weiß, 25 x 75 x 1, VWR
- Eppendorf-Tuben, Eppendorf
- Eppendorf-Pipetten Research/ Reference, Eppendorf
- Geeichte Thermometer
- Diamantglasschreiber

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewinnung der Gallenwegsabstriche mittels ERCP**

Bei einer endoskopischen retrograden Cholangiopankreatikographie werden über einen Bürstenabstrich der Gallenwege oder des Pankreasganges Epithelzellen gewonnen. Der Endoskopiker oder eine anwesende Hilfsperson streicht während der ERCP das Bürstchen auf 2-6 Objektträgern aus. Die Proben werden für die zytologische Routinediagnostik mit einem alkoholischen Spray oder nach Saccomanno (Saccomanno u. a. 1963) (50 % Äthanol, 2 % Carbowax 1540 und 0,006 % Rifampicin) fixiert und zur zytologischen Diagnostik geschickt. Für die lichtmikroskopische Auswertung in der Zytopathologie werden die Ausstriche nach Papanicolaou gefärbt.

### **2.2.2 Standardisierte, lichtmikroskopische Diagnostik der Exfoliativzytologie**

Zu Beginn wird das eingegangene Untersuchungsmaterial makroskopisch und mikroskopisch beschrieben. Dann wird eine Diagnose nach der ICD-O-M oder SNOMED vorgenommen.

Die Präparate werden nach einem Konsens der Arbeitsgemeinschaft für Zytopathologie der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und der Deutschen Gesellschaft für Zytologie (Böcking 1998) in folgende Diagnosestufen eingeteilt. Hierbei finden verschiedene Abstufungen der Malignitätswahrscheinlichkeit statt:

- ⇒ bösartige Zellen nicht nachweisbar (= negativ)
- ⇒ bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen (= zweifelhaft)
- ⇒ bösartige Zellen wahrscheinlich (= dringender Verdacht)
- ⇒ bösartige Zellen nachweisbar (= positiv)
- ⇒ unzureichendes Untersuchungsmaterial

Negative Präparate enthalten keine Hinweise auf maligne Zellen. Es können jedoch regressiv veränderte duktale Epithelien, Entzündungszellen, Schleim, Detritus und Blut nachgewiesen werden.

In zweifelhaften Präparaten kann ein Vorliegen maligner Zellen nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, z.B. bei schlechter Fixierung der Präparate und dadurch bedingter Fehlfärbung.

Eine Einstufung als dringend verdächtig wird in der Regel vorgenommen, wenn bösartige Zellen angenommen werden, diese aber in zu geringer Zahl vorliegen oder nicht genügend zytologische Malignitätskriterien erfüllt sind.

In positiven Abstrichen finden sich eindeutig maligne Zellen, es wird zusätzlich eine histogenetische Klassifikation angestrebt.

Das Untersuchungsmaterial ist unzureichend, wenn kaum oder keine Zellen zu finden sind oder die Beurteilbarkeit durch ausgeprägte Zellyse unmöglich wird.

Diese Einteilung ermöglicht den Vergleich der Maßzahlen der Treffsicherheiten von routinezytologischer und fluoreszenzmikroskopischer Diagnostik.

### **2.2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Zur Detektion von Nucleotidsequenzen auf den Chromosomen der Gallenwegsepithelzellen kam das Vysis® UroVysion Kit zur Anwendung. Es enthält drei zentromerspezifische Sonden für Chromosom 3, 7 und 17, die numerische Aberrationen anzeigen können. Die vierte Sonde bindet an den Locus 9p21 für den Nachweis struktureller Aberrationen (insbesondere Deletionen).

Ein diploider Chromosomensatz liegt vor, wenn jeweils zwei Signale einer fluoreszenzmarkierten Nucleotidsequenz pro Zellkern gezählt werden.

Um Interferenzen der vier Sonden mit unspezifischen Genloci auszuschließen, wurden Locus-Spezifitätsstudien von der Firma Vysis vorgenommen. Kreuzhybridisierungen konnten dabei ausgeschlossen werden (*Vysis® UroVysion Test für den Nachweis des Blasenkarzinom-Rezidivs*).

Um die emittierten Signale eindeutig einem Zellkern zuordnen zu können, muss eine zusätzliche Übersichtsfärbung der Zellkerne vorgenommen werden. Dazu wird das Fluorochrom 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet.

### **2.2.4 Vorbereitung der zytologischen Proben für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Für die FISH interessante Regionen, das heißt Regionen mit Analysezellen werden auf den Objektträgern ausgewählt und mithilfe eines Diamantglasschreibers markiert, sodass nur kleinere Abschnitte der Präparate hybridisiert und ausgewertet werden müssen. Diese Regionen messen 15 x 15 mm, 18 x 18 mm oder in Ausnahmefällen 10 mm Ø.

Die alkoholfixierten Objektträger werden für die mikroskopische Routinediagnostik nach Papanicolaou gefärbt und eingedeckelt. Vor dem Hybridisierungsvorgang müssen die Präparate entfärbt werden. Dazu werden die Präparate zuerst über 1-3 Tage mittels Xylol entdeckelt, mit Alkoholwaschlösung (je 2x 5 Minuten in 100 %, 95 % und 80 % Ethanol) von Xylol und Rückständen des Eindeckelmediums Eukitt befreit und schließlich

vermittels 0,5 % HCL / 70 % Ethanol (15 Minuten) entfärbt. Die absteigende Alkoholreihe bringt außerdem die Zellen in ein sukzessiv zunehmendes wässriges Milieu.

Zur folgenden DNA-Denaturierung werden die Objektträger in Gruppen à 4 Präparate bei 73 °C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) für 5 Minuten in 2 SSC gegeben und dann nach Hinzupipettieren der Pepsingebrauchslösung für 15 Minuten in einer auf 37 °C vorgewärmten feuchten Kammer gelagert. Ein exaktes Einhalten der Temperatur oder der Reaktionszeit ist hier von größter Bedeutung, um eine übermäßige Andauung der Zellkerne oder auch eine zu geringe Denaturierung zu vermeiden. Es werden in jedem Fall 4 Objektträger, bei passender Präparatezahl auch Leer-Objektträger, in einer Küvette platziert, um zwischen den Chargen keine Schwankungen des Mikromilieus oder der Temperatur zu haben.

Die Proben werden dann in PBS neutralisiert, formalinfixiert und ein weiteres Mal in PBS abgepuffert. Mit aufsteigender Ethanolkonzentration (je 2 Minuten 70 %, 85 %, 100 %) werden die Präparate wieder in ein organisches Lösungsmittel überführt, das heißt, es wird überschüssiges Wasser entzogen.

### **2.2.5 Hybridisierung**

Der Hybridisierungsmix, bestehend aus 70 % Vol. Puffer, 20 % Vol. Aqua dest. und 10 % Vol. DNA-Sonde, wird 10 Minuten vor seiner Verwendung angesetzt, durchmischt und zentrifugiert. Da die UroVysion-DNA-Sonde lichtempfindlich ist, muss ab diesem Schritt im Dämmerlicht gearbeitet werden.

Für die Deckglasgröße mit einem runden Durchmesser von 10 mm wurden 2  $\mu\text{l}$ , für 15 x 15 mm<sup>2</sup> 5  $\mu\text{l}$  und für 18 x 18 mm<sup>2</sup> 7  $\mu\text{l}$  Hybridisierungsmix verwendet. Um die Präparate vor der Austrocknung zu schützen, werden die Deckgläschen mit Fixogum versiegelt.

Um eine optimale Hybridisierung der DNA-Sonden an die komplementären DNA-Abschnitte zu gewährleisten, werden die Präparate zuerst 10 Minuten lang bei 73 °C auf einer Heizplatte denaturiert. Danach werden die Objektträger 14-16 Stunden über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37 °C aufbewahrt.

Am zweiten Tag wird nach Ablösung des Deckgläschens der Sondenüberschuss mittels 0,4 x SSC + 0,1 % NP40 erst bei Raumtemperatur, dann bei 73 °C und zuletzt erneut bei Raumtemperatur über zwei Minuten ausgewaschen.

Zur Beurteilung der Morphologie der Zellkerne und um die Signale beim Mikroskopieren eindeutig einzelnen Zellen zuordnen zu können, werden die Zellkerne mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff DAPI gegengefärbt.

Abschließend werden luftblasenfrei Deckgläschen (24 x 32 mm<sup>2</sup>) aufgelegt, die Präparate erneut mit Fixogum versiegelt und die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln bis zum Mikroskopieren aufbewahrt.

### **2.2.6 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der hybridisierten Präparate**

Zur Beurteilung der Hybridisierungsergebnisse wurde ein Auflichtfluoreszenzmikroskop verwendet. Als Anregungslichtquelle zur Fluoreszenz diente eine 100 W Quecksilberdampfampe. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung je eines Ölimmersionsobjektivs mit 63-facher beziehungsweise 100-facher Vergrößerung. Das Immersionsöl wies dabei kaum Autofluoreszenz auf. Damit wurde eine Interferenz mit den gewünschten Signalen vermieden.

#### **2.2.6.1 DAPI-Fluoreszenzfilter**

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) bindet bevorzugt an AT-reiche Regionen der kleinen Furchen der DNA (Krishan & Dandekar 2005). In euploiden Zellkernen zeigt sich bei Anregung im DAPI-Filter eine homogene blaue Fluoreszenz (Emissionsmaximum: 461 nm).

Veränderungen in der Chromatinstruktur führen zu einer unregelmäßigen Darstellung des Zellkerns. Es zeigen sich sowohl Areale verminderter Fluoreszenz als auch vermehrt schollige Areale, die eine erhöhte Fluoreszenz zeigen.

Das hybridisierte Areal auf dem Objektträger wird meanderförmig durchgesehen, wobei auffällige Zellen durch Einsatz der Fluoreszenzfilter näher begutachtet werden.

Zur Auswahl dieser potentiell malignen Zellen fanden folgende Kriterien Anwendung:

- auffallend große und unregelmäßig geformte Zellkerne
- inhomogene DAPI-Färbung
- Zellen mit durchgehend abgrenzbarem Zellkern
- einzeln liegende Zellen

Zellen, die im DAPI-Filter in sogenannten Clustern liegen, zeigen oft Überlappungen ihrer Signale und konnten daher nicht gezählt werden.

#### **2.2.6.2 Fluoreszenzfilter spectrum green, spectrum red, spectrum aqua, spectrum gold**

Zur getrennten Beurteilung der DNA-Sonden-Signale werden Einzelbandpass-Filtersätze eingesetzt, die die Unterscheidung von CEP 3 (Rot-Fluoreszenz), CEP 7 (Grün), CEP 17 (Wasserblau), LSI 9p21 (Gold) und Zellkern-DNA nach DAPI-Gegenfärbung (Blau) gewährleisten.

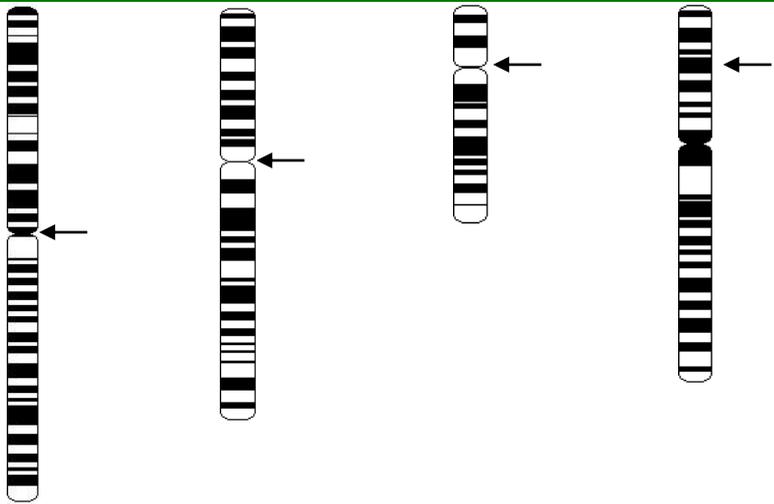
<b>Probenname</b>	Vysis CEP 3	Vysis CEP 7	Vysis CEP 17	Vysis LSI p16
<b>Lokalisierung der Sonden</b>	3p11.1-q11.1	7p11.1-q11.1	17p11.1-q11.1	9p21
<b>Fluorophore</b>	SpectrumRed	SpectrumGreen	SpectrumAqua	SpectrumGold
<b>Chromosomen-Ideogramme</b>				

Tabelle 3: Genloci (Beipackzettel: UroVysion Bladder Cancer Kit (Abbott Laboratories))

Das UroVysion Kit wurde aus folgenden Gründen für diese Studie ausgewählt. Es wurde nach Sichtung der internationalen Datenlage deutlich, dass das ursprünglich für die Diagnostik des Harnblasenkarzinoms in Urinen entwickelte UroVysion Kit sich ebenfalls ausgezeichnet für die adjuvante Diagnostik maligner Tumoren von Gallen- und Pankreasgangsabstrichen eignet, wie erstmals von den Mayo Kliniken, Minnesota, gezeigt wurde (Kipp u. a. 2004). Die Chromosomen 3, 7, 9 und 17 zeigen in der Tumorgenese der Cholangio- und Pankreaskarzinome früh eine Aneuploidisierung (Tsiambas u. a. 2006); diese können somit mit dem UroVysion Kit erfasst werden.

Im Institut für Zytopathologie der Uniklinik Düsseldorf wird das UroVysion Kit regelmäßig für die Diagnostik von Urothelkarzinomen eingesetzt. Somit war im Vorfeld bereits der Hybridisierungsprozess erprobt.

### 2.2.6.3 Auswertung

Die Zellen werden in die Kategorien chromosomal euploid, polyploid und aneuploid unterteilt.

Ein euploides Genom bezeichnet hierbei einen unauffälligen, doppelten Chromosomensatz (2 x 23 Chromosomen). Als polyploid werden Zellen gezählt, die  $2^n$  ( $n \geq 2$ ) Signal-Amplifikationen gleichzeitig in allen vier untersuchten Chromosomenloci zeigen. Polyploidie kommt in vielen nicht-neoplastischen Geweben vor und darf nicht als Malignitätskriterium gewertet werden (Biesterfeld u. a. 1994). Die Abweichung der

Signalzahl bei ausschließlich einer der vier Sonden wird toleriert (Schramm u. a. 2011). Aneuploidie bezeichnet einen Chromosomensatz  $\neq 2^n$ , weil ganzzahlige Vielfache von einzelnen Chromosomensätzen mit Ausnahme von  $2^n$  nicht in nicht-neoplastischen Geweben vorkommen.

Chromosomal euploide und polyploide Zellen werden hierbei als nicht atypisch, chromosomal aneuploide Zellen als atypisch gewertet (Schramm u. a. 2011).

Ein Präparat wird bei Erfüllung folgender Kriterien als positiv (= maligne) diagnostiziert:

1. Analyse von 25 morphologisch atypischen Zellen:
  - $\geq 5$  von 25 Zellen zeigen eine Signalzunahme bei 2 oder mehr Chromosomen (3, 7, 9p21, 17).
2. Werden diese Voraussetzungen nicht erfüllt, wird die Analyse fortgeführt, bis:
  - $\geq 5$  von 60 Zellen eine Signalzunahme an 2 oder mehr Chromosomen (3, 7, 9p21, 17) in derselben Zelle aufweisen.
3. Bei Nichterreichen von mindestens 5 chromosomal atypischen Zellen nach Durchmusterung des gesamten hybridisierten Areals wurde ein Präparat als negativ gewertet.

	Chromosom 3	Chromosom 7	Chromosom 17	9p21
Euploide Zellen	2	2	2	2
	2	3	2	2
	2	2	2	1
Polyploide Zellen	4	4	4	4
	3	4	4	4
	8	8	8	8
Aneuploide Zellen	8	9	11	3
	3	4	5	2

Tabelle 4: Beispiele für die Auswertung der Sondensignale

Ein Beispiel des Auswertungsbogens ist im Anhang niedergelegt.

### 2.2.7 Follow up

Um die diagnostische Treffsichersicherheit der Zytologie und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung beurteilen zu können, musste der Krankheitsverlauf der Patienten ermittelt werden. Dazu wurde ein Follow up-Bogen entworfen (siehe Anhang), der es ermöglichte die Daten nach einem festgelegten Referenzstandard zu klassifizieren.

### 2.2.8 Referenzstandard

Die im obigen Follow up-Bogen ermittelten Daten wurden einem vorab definierten positiven oder negativen Referenzstandard zugeordnet. Waren die ermittelten Patientendaten nicht eindeutig zuzuordnen, galt dies als Ausschlusskriterium für die Studie.

#### Positiver Referenzstandard:

1. Histologische Diagnose eines malignen Tumors anhand eines Operationspräparates aus dem gleichen anatomischen Bereich (Gallen- oder Pankreasgang sowie umliegendes Gewebe). Die Zeitdifferenz zwischen der Gewinnung der Zytologie und der Histologie beträgt  $\leq 6$  Monate.

*oder*

2. Diagnose eines malignen Tumors anhand einer Stanzbiopsie oder Feinnadelaspirationsbiopsie aus der gleichen anatomischen Region wie das zytologische Ausstrichpräparat. Die Zeitdifferenz beträgt  $\leq 6$  Monate.

*oder*

3. Zytologische Diagnose eines malignen Tumors (positiv), hohe klinische Evidenz für Malignität (positives CT, MRT, Sonogramm, ERCP), sowie ein konsekutives, entsprechendes therapeutisches Handeln des Klinikers (z.B. Einleitung einer Chemotherapie oder Einleitung palliativer Maßnahmen).

*oder*

4. Nach positiver Zytologie wird die Raumforderung als positiv diagnostiziert und eine entsprechende Therapie eingeleitet (z.B. Beginn einer Chemotherapie).

#### Negativer Referenzstandard:

1. Histologische (operativ oder Biopsie) oder zytologische Diagnose „negativ“ plus Übereinstimmung mit dem klinischen Gesamtbild.
2. Negativer klinischer Verlauf  $\Rightarrow$  es findet sich kein Nachweis eines malignen Tumors der Region über einen Zeitraum von  $\geq 1$  Jahr.

## 2.2.9 Dignitätsdiagnostik

Zur Beurteilung der Qualität eines diagnostischen Tests wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der eine Vorhersage eintreffen wird.

Dazu werden die Daten des Referenzstandards (krank sowie gesund, oder in diesem Fall die Diagnose oder der Ausschluss eines malignen Tumors) Patienten in Bezug zu der Ermittlungswahrscheinlichkeit im diagnostischen Test gesetzt.

		Testergebnis		
		Positiv	Negativ	
Diagnose nach Referenzstandard	Krank	richtig positiv a	falsch negativ b	Alle Erkrankten a+b
	Gesund	falsch positiv c	richtig negativ d	Alle Gesunden c+d
		Alle Test-Positiven a+c	Alle Test-Negativen b+d	Alle Untersuchten a+b+c+d

Tabelle 5: Vierfeldertafel zur Berechnung der Maßzahlen diagnostischer Treffsicherheit

### Maßzahlen der diagnostischen Treffsicherheit

#### Sensitivität:

Die Sensitivität beschreibt, wie viele der tatsächlich Erkrankten durch den Test als krank erkannt werden. In diesem Fall wird der Anteil der richtig tumorzellpositiven Diagnosen an der Anzahl aller Patienten mit Malignom (Follow up) berechnet.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{richtig - positive Fälle}}{\text{richtig - positive Fälle} + \text{falsch - negative Fälle}} = \frac{a}{a+b}$$

#### Spezifität:

Die Spezifität beschreibt den Anteil der richtig als tumorzellnegativ erkannten Fälle an allen negativen Fällen aus dem Follow up.

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{richtig - negative Fälle}}{\text{richtig - negative Fälle} + \text{falsch - positive Fälle}} = \frac{d}{d+c}$$

#### Positiver prädiktiver Wert:

Der positive Prädiktionswert (positive predictive value = PPV) gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein positives Testergebnis einen tatsächlich positiven Fall anzeigt.

$$\text{PPV} = \frac{\text{richtig - positive Fälle}}{\text{richtig - positive Fälle} + \text{falsch - positive Fälle}} = \frac{a}{a+c}$$

### **Negativer prädiktiver Wert:**

Der negative Prädiktionswert (negative predictive value = NPV) gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein negatives Testergebnis einen tatsächlich negativen Fall anzeigt.

$$\text{NPV} = \frac{\text{richtig - negative Fälle}}{\text{richtig - negative Fälle} + \text{falsch - negative Fälle}} = \frac{d}{d+b}$$

### **Gesamttrefferbarkeit:**

Als Gesamttrefferbarkeit wird der relative Anteil aller richtigen Diagnosen an der Gesamtzahl aller Diagnosen bezeichnet. Zu den „richtigen Diagnosen“ zählen die richtig-positiven und die richtig-negativen Beurteilungen (übereinstimmende Diagnosen im Test und im Follow up).

$$\text{Gesamttrefferbarkeit} = \frac{\text{richtig - positive Fälle} + \text{richtig - negative Fälle}}{\text{Gesamtzahl aller Diagnosen}} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Deskriptive Darstellung der Daten

##### 3.1.1 Patientenkollektiv

Vom 01.01.2005 bis zum 31.12.2007 wurden aus dem Evangelischen Krankenhaus Düsseldorf 235 exfoliativzytologische Gallengangs- und Pankreasgangabstriche in das zytopathologische Institut des Universitätsklinikums Düsseldorf eingesandt.

150 Präparate (63,83%) wurden zytologisch als tumorzell-negativ eingestuft. Die Diagnose „zweifelhaft“ erhielten 29 Fälle (12,24%), „dringend verdächtig“ waren 27 Präparate (11,49%). Die übrigen 29 Präparate (12,24%) konnten als eindeutig tumorzellpositiv gewertet werden.

**Studienausschluss:** Die häufigste Ursache, die zu einem Ausschluss von Patienten aus dem Kollektiv führte, war in 11 Fällen der mangelnde Referenzstandard (siehe Kapitel 2.2.8). In neun dieser Fälle wurde der Verdacht auf ein Cholangio- beziehungsweise Pankreaskarzinom gestellt, aber nur unzureichend durch weitere Diagnostik unterstützt. Gründe für die fehlende weiterführende Diagnostik und Behandlung lagen in einer Verlegung der Patienten in andere Krankenhäuser. Zwei Patienten lehnten eine weitere Diagnostik und eine anstehende Whipple-Operation ab und machten damit ein weiteres Verfolgen ihrer Krankheitsgeschichte unmöglich.

Zu geringe Zellzahlen führten in zwei Fällen dazu, dass fluoreszenzmikroskopisch keine sichere Aussage über die Dignität des Präparats gemacht werden konnte. In zwei weiteren Fällen konnten die notwendigen Akten für das Follow up im Evangelischen Krankenhaus nicht ausfindig gemacht werden, sodass der Verlauf nicht dokumentiert werden konnte und somit kein Referenzstandard ermittelt werden konnte. Das letzte Präparat musste ausgeschlossen werden, da die Objektträger anderweitig verwendet worden waren und somit für die Studie nicht zur Verfügung standen.

<b>Zytologische Dignität</b>	<b>Positiv</b>	<b>Dringend verdächtig</b>	<b>Zweifelhaft</b>	<b>Negativ</b>
Anfängliche Anzahl (n <sub>gesamt</sub> = 235)	29	27	29	150
<u>Ausschluss nach folgenden Kriterien:</u>				
Kein Referenzstandard (n = 11)	-	4	3	4
Geringe Zellzahl (n = 2)	-	-	-	2
Fehlende Objektträger (n = 1)	-	-	1	-
Fehlende Akte im EVK (n = 2)	-	-	1	1
<b>Bereinigte Anzahl (n<sub>gesamt</sub> = 219)</b>	<b>29</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>143</b>

Tabelle 6: Übersicht über die Verteilung der Präparate auf die zytologischen Diagnoseeinheiten vor und nach Berücksichtigung der Ausschlusskriterien

Nach der Bereinigung des Patientenkollektivs standen 219 Präparate weiterhin für die Studie zur Verfügung. Davon fielen 143 Präparate (65,29 %) zytologisch tumorzellnegativ, 24 (10,96 %) zweifelhaft, 23 (10,5 %) dringend verdächtig und 29 (13,24 %) tumorzellpositiv aus.

Die Verteilung der Karzinomentwicklung über die verschiedenen Altersklassen nach dem Follow up zeigt die folgende Abbildung.

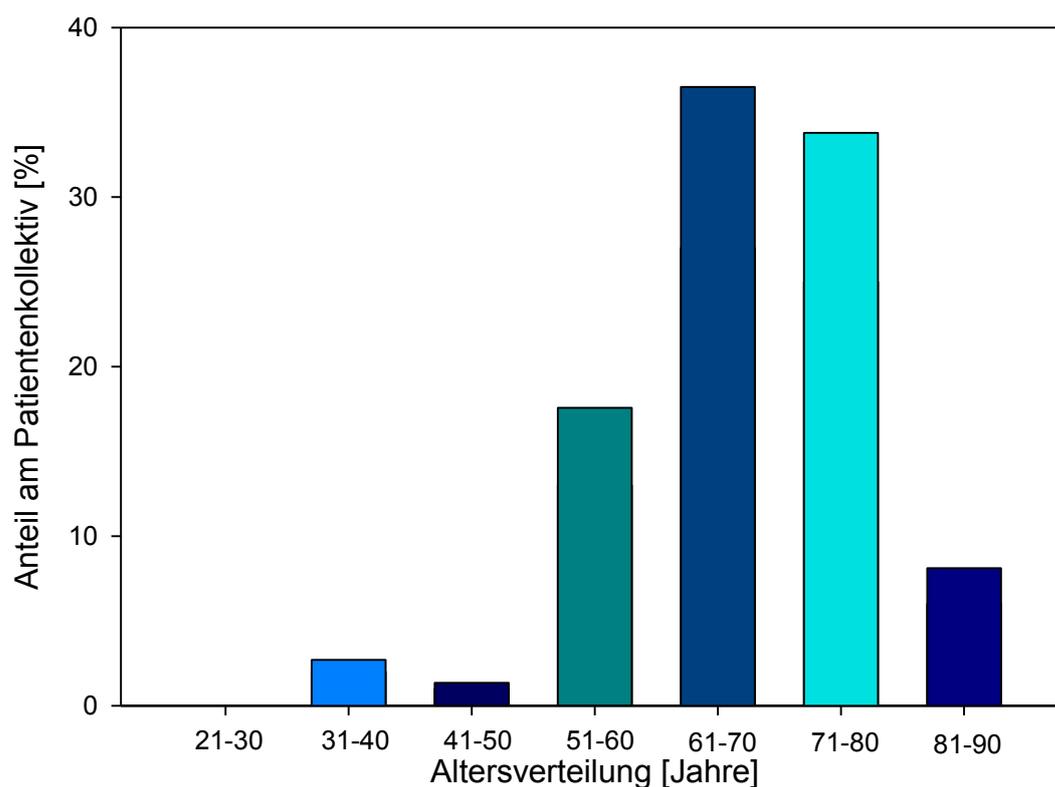


Abbildung 5: Altersverteilung der Karzinome

Prozentual wurden die meisten Karzinome im 6. bis 8. Lebensjahrzehnt apparent. Der höchste Wert mit 36,49 % zeigte sich bei den 61- bis 70-jährigen Patienten. Jüngere Patienten sind kaum bis gar nicht (21- bis 30-Jährige) betroffen. In der Gruppe der 81- bis 90-Jährigen befinden sich nur 18 Patienten, weshalb dieser Bereich prozentual in Bezug auf das Gesamtkollektiv (n = 219 Patienten) wenig ins Gewicht fällt. Allerdings konnte bei 6 dieser Patienten (33,3 %) ein Cholangio- oder Pankreaskarzinom diagnostiziert werden.

### 3.1.2 Diagnosen des Follow ups

#### Zytologisch tumorzellnegative Präparate

143 Präparate wurden als „tumorzellnegativ“ klassifiziert.

<u>Anzahl (Anteil [%])</u>	<u>Ätiologie der Stenosen</u>
<u>Negatives Follow up (n = 121)</u>	
33 (27,3 %)	Benigne Gallengangstenose
30 (24,8 %)	Chron. Pankreatitis
17 (14,0 %)	Primär sklerosierende Cholangitis
8 (6,6 %)	Cholangitis
8 (6,6 %)	V.a. Klatskintumor (Histologie negativ)
6 (5,5 %)	Choledocholithiasis
6 (5,5 %)	Pankreatikusstenose
3 (2,5 %)	Z. n. Cholangiokarzinom
2 (1,7 %)	Autoimmunpankreatitis
2 (1,7 %)	Unklarer Pankreasschwanztumor
1 (0,8 %)	Cholangiektasien
1 (0,8 %)	Zystadenom des Pankreas
1 (0,8 %)	Chronische Cholezystitis
1 (0,8 %)	Papillenadenom
1 (0,8 %)	Biliom des rechten Leberlappens
1 (0,8 %)	Entzündung der Papilla Vateri
<u>Keine Übereinstimmung zwischen Zytologie und Follow up (n = 22)</u>	
14 (11,6 %)	Pankreaskopf-Ca mit Gallengangsbeteiligung
3 (2,5 %)	Klatskintumor (Histologie positiv)
2 (1,7 %)	distales Cholangiokarzinom
2 (1,7 %)	Gallenblasenkarzinom
1 (0,8 %)	Adeno-Ca der Papilla Vateri

Tabelle 7: Follow up der zytologisch tumorzellnegativen Präparate

In 121 der 143 Fälle stimmten die zytologische Diagnose und die Diagnose des Follow ups überein. Nach erneuter Durchsicht der Präparate ergab sich bei 21 Präparaten mit fehlender Übereinstimmung zwischen Zytologie und Follow up weiterhin kein Anzeichen für Malignität, trotz histologischer Diagnose eines Karzinoms mit Gallengangsbeteiligung, sodass von einem *Sampling Error* ausgegangen wurde, bei dem der Untersucher den Abstrich abseits des Ortes des Interesses abnahm. Das Präparat enthielt dadurch keine malignen Zellen. Bei einem Gallengangsabstrich konnten bei der zweiten Durchsicht im Gegensatz zur Erstuntersuchung zytologisch nun bösartige Zellen nachgewiesen werden, sodass die Diagnose in tumorzellpositiv umgeändert wurde (*Screening Error*).

### **Zytologisch zweifelhafte Präparate**

24 Präparate wurden als zweifelhaft eingestuft.

<b>Anzahl (Anteil [%])</b>	<b>Ätiologie der Stenosen</b>
<i>negatives Follow up (n = 8)</i>	
3 (12,5 %)	V.a. Klatskintumor (Histologie negativ)
2 (8,3 %)	Pankreaskopf-Ca ohne Gallengangsbeteiligung
2 (8,3 %)	Chron. Pankreatitis
1 (4,2 %)	Primär sklerosierende Cholangitis
<i>positives Follow up (n = 16)</i>	
8 (33,3 %)	Pankreaskopf-Ca mit Gallengangsbeteiligung
1 (4,2 %)	Klatskintumor IV (Histologie positiv)
1 (4,2 %)	Klatskintumor IIIa (Histologie positiv)
1 (4,2 %)	distales Cholangiokarzinom
1 (4,2 %)	Adenokarzinom der Papilla Vateri
1 (4,2 %)	Adenokarzinom der Gallenblase
1 (4,2 %)	Magenkarzinomrezidiv im DHC
1 (4,2 %)	gering differenziertes Adeno-Ca, Primarius unklar
1 (4,2 %)	Maligne GG-Stenose, nicht näher bezeichnet

Tabelle 8: Follow up der zytologisch zweifelhaften Präparate

8 der 24 zweifelhaften Präparate stellten sich im Follow up als negativ heraus. In 6 Fällen konnte im Follow up kein Malignom gesichert werden. In den verbliebenen 2 Fällen wurde zwar ein Pankreaskopfkarcinom diagnostiziert, eine Mitbeteiligung des Gallengangs, aus dem die Bürstenzytologie stammte, konnte jedoch ausgeschlossen werden. Bei 16 zweifelhaften Präparaten war das Follow up positiv. Führende Diagnose war ein Pankreaskopfkarcinom mit Gallengangsbeteiligung, in 5 weiteren Fällen entsprang das Malignom den cholangiozellulären Epithelien.

### **Zytologisch dringend verdächtige Präparate**

23 Präparate wurden als dringend verdächtig eingestuft.

<b>Anzahl (Anteil [%])</b>	<b>Ätiologie der Stenosen</b>
<i>negatives Follow up (n = 1)</i>	
1 (4,3 %)	V.a. Klatskintumor (Histologie negativ)
<i>positives Follow up (n = 22)</i>	
15 (65,2 %)	Pankreaskopf-Ca mit Gallengangsbeteiligung
5 (21,7 %)	Klatskintumor IV (Histologie positiv)
2 (8,7 %)	distales Cholangiokarzinom

Tabelle 9: Follow up der zytologisch dringend verdächtigen Präparate

Ein zytopathologisch dringend verdächtiges Präparat wurde im Follow up negativ bewertet, die übrigen 22 Fälle zeigten ein positives Follow up mit 7 Cholangiokarzinomen und doppelter Anzahl an Pankreaskopfkarzinomen mit Gallengangs- beziehungsweise Pankreasgangsbeteiligung.

### **Zytologisch positive Präparate**

29 Präparate wurden als „tumorzellpositiv“ klassifiziert.

<b>Anzahl (Anteil [%])</b>	<b>Ätiologie der Stenosen</b>
<i>negatives Follow up</i>	
-	-
<i>positives Follow up:</i>	
13 (44,8 %)	Pankreaskopf-Ca mit Gallengangsbeteiligung
5 (17,2 %)	distales Cholangiokarzinom
5 (17,2 %)	Klatskintumor IV (Histologie positiv)
2 (6,9 %)	Klatskintumor IIIb (Histologie positiv)
2 (6,9 %)	Adenokarzinom der Gallenblase mit GG-Beteiligung
1 (3,4 %)	Magenkarzinomrezidiv im DHC
1 (3,4 %)	gering differenziertes Adeno-Ca, Primarius unklar

Tabelle 10: Follow up der zytologisch tumorzellpositiven Präparate

Alle Präparate wurden zytopathologisch richtig positiv eingestuft. 13 Präparate wiesen Pankreaskopfkarzinome, 14 weitere Cholangiokarzinome auf.

### **3.1.3 Anwendung der FISH**

131 der 219 in die Studie eingeschlossenen Präparate wurden ein bis vier Jahre nach Entnahme hybridisiert und ausgewertet. Da alle zytologisch negativen Präparate aus dem Jahr 2007 auch in der FISH negativ waren und somit durch die FISH kein Zugewinn an Information ermittelt werden konnte, wurde auf die kostspielige Hybridisierung der zytologisch negativen Präparate aus 2005 und 2006 (88 Präparate) verzichtet.

Trotz des unterschiedlich langen Zeitraums von ein bis vier Jahren zeigten sich bei der Beurteilung keine maßgeblichen qualitativen Differenzen. Allein die Ablösung der Deckgläschen von den älteren Präparaten, welche für eine Hybridisierung notwendig war, benötigte einen längeren Zeitraum (bis zu 5 Tage im Xylolbad).

Bei häufigem Auftauen der Sonden verloren diese an Signalstärke, sodass die Sondenmischung vorab aliquotiert wurde, um die notwendigen Auftauvorgänge möglichst gering zu halten.

Die Zeit zwischen Hybridisierung und Auszählung am Fluoreszenzmikroskop betrug zwischen 4 Stunden und 2 Wochen. Je früher die Auswertung innerhalb des angegebenen Zeitraums erfolgte, desto klarer und eindeutiger zeigten sich die Signale. Doch erst ab 2 Wochen Lagerungszeit zeigten sich zunehmend leichte Auswertungsschwierigkeiten durch verblasste Signale.

Besonderes Augenmerk musste während der Anwendung auf den Arbeitsschritt gelegt werden, in dem die proteolytische Aufbereitung der Nuclei erfolgte. Eine Unterschreitung der 15-minütigen Wartezeit hatte eine mangelnde Hybridisierung zur Folge, da die Sonden nur ungenügend in den Zellkern hinein gelangen konnten. Eine zu lange Wartezeit konnte erwirken, dass die Zellkernmembran zu stark angegriffen wurde, die Sondersignale schwach und faserig ausgezogen waren und die DAPI-Färbung uneindeutig war. Bei schwacher DAPI-Färbung ist die sichere Zuordnung eines Signals zu einem Zellkern nicht mehr gewährleistet. Es könnten Artefakte als chromosomale Signale gewertet und falsch positive Diagnosen erzeugt werden.

Insgesamt mussten nur zwei Präparate aufgrund niedriger Zellzahlen aus dem Präparatekollektiv ausgeschlossen werden (s. 3.1.1). 131 Präparate konnten erfolgreich hybridisiert und ausgewertet werden.

Im Gegensatz zur lichtmikroskopischen, zytopathologischen Untersuchung und zur DNA-Zytometrie benötigt die FISH nur eine sehr kleine Anzahl intakter Zellkerne, die einzeln und nicht in Clustern liegen, um eine valide Aussage zur Dignität des Präparates zu garantieren. Sie ermöglicht somit die Auswertung auch schlecht fixierter Präparate mit kleinen Zellmengen, welches eine rein morphologisch begründete Diagnose eines malignen Tumors stark erschwert oder sogar unmöglich macht.

Im Folgenden wird auf den mikroskopischen Vorgang eingegangen.

### **3.1.4 Mikroskopische Analyse**

#### **3.1.4.1 DAPI**

Die Färbung eines Präparates mit der DAPI-Gegenfärbung dient dem Markieren von Zellkernen. Eine klare, strahlend blaue Färbung weist auf eine gelungene Proteolyse der Zelle hin, da angedaute Zellkerne eine Voraussetzung für die DAPI-Gegenfärbung sowie insbesondere für die Sondenmarkierung sind. Bei einer hohen Zellzahl des Präparates oder stark verschleimten Arealen kann die Zellaufschlüsselung suboptimal verlaufen und eine Auswertung erschweren. Bei überschießender Proteolyse oder starker mechanischer Einwirkung wird die Integrität der Zellkerne gestört. Diese zeigen ein zerfließendes DAPI-Muster und können nicht gezählt werden. Die DAPI-Übersicht liefert somit einen ersten Eindruck von der Güte der Färbung.

Anhand der Zellkernmorphologie (siehe Kapitel 2.2.6.1) werden einzeln liegende, verdächtige Zellen ausgewählt und mithilfe der Sondenfilter nach Aberrationen untersucht. In Clustern liegende Zellen werden nicht ausgewertet, da die Zuordnung von Signalen zur jeweiligen Zelle nicht eindeutig ist.

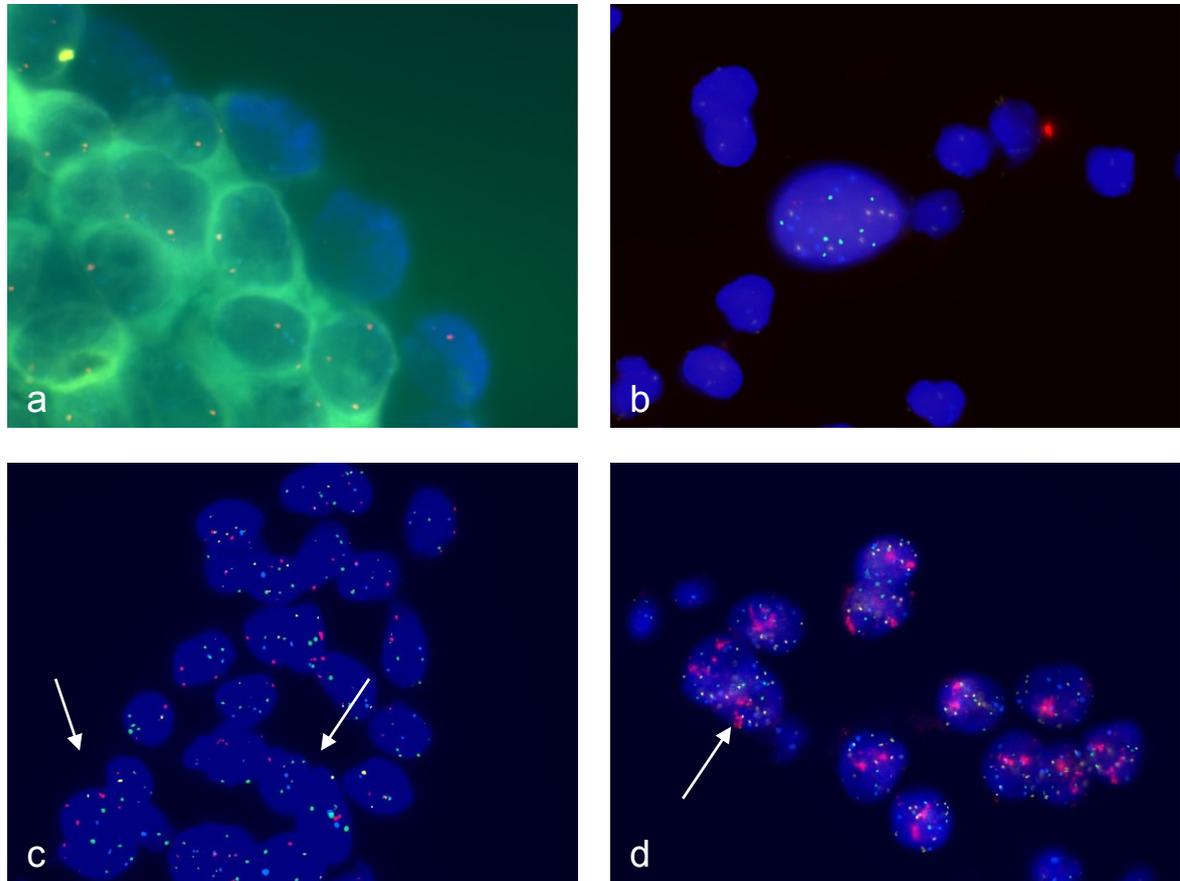


Abbildung 6a: durch Schleim (grün fluoreszierend) überlagerte Zellen zeigen nur schwache Sonden signale

Abbildung 6b: morphologisch verdächtige Zelle

Abbildung 6c+d: Clusterbildung (Pfeile)

### 3.1.4.2 Fluoreszenzfilter

Ideale Signale können bei Chromosomen erzielt werden, die in vollständiger Kondensation vorliegen. Der Grad der Kondensation ist abhängig von den Phasen des Zellzyklus. Die stärkste Kondensation findet sich während der Metaphase der Mitose. Wenn die detektierten Signale in Bereichen euchromatischer DNA vorliegen, zeigen sich die Hybridisierungssignale nicht als Punkte, sondern als ausgezogene Fäden, die nur schwach fluoreszieren und durch ihre Länge nicht in einer Ebene liegen. Die Gefahr besteht dabei, die Signale zu übersehen oder mehr Signale zu detektieren, als vorliegen.

Ein hohes Bakterienvorkommen reduziert ebenfalls die Auswertbarkeit, da die Bakterien-DNA teils ausgeprägte Eigenfluoreszenz entwickelt und somit bei bakterieller Überlagerung der Zellkerne die Detektion der humanen DNA erschwert. Bei diesen Präparaten müssen humane Zellkerne außerhalb der Zonen bakterieller Kontamination gemessen werden.

Kräftige Signale zeigt die rot fluoreszierende Sonde von Chromosom 3. Auch bei Schleimüberlagerung oder zahlreichen Erythrozyten und Bakterien im Hintergrund bleibt die Sonde einwandfrei auswertbar. Die Sondensignale von Chromosom 7 (grün) und 17 (aqua) hingegen werden bei Hintergrundfluoreszenz eher überlagert, sodass Zellkerne außerhalb des ungünstigen überlagerten Bereichs gesucht werden müssen. Dort sind die Signale dann gut auswertbar.

Die Sonde für den Locus 9p21 zeigt die im Vergleich schwächsten Signale. In euploiden Zellen liegen die Signale oft sehr weit auseinander, sodass jede Ebene des Zellkerns mikroskopisch ausführlich begutachtet werden muss, damit kein Signal übersehen wird und die Zelle aufgrund der fälschlich angenommenen Deletion als bösartig detektiert wird. In 5 Fällen musste die Hybridisierung wiederholt werden, da das Gold-Signal der 9p21-Sonde unzureichend war, Homodeletionen vortäuschte und somit falsche Ergebnisse provoziert hätte.

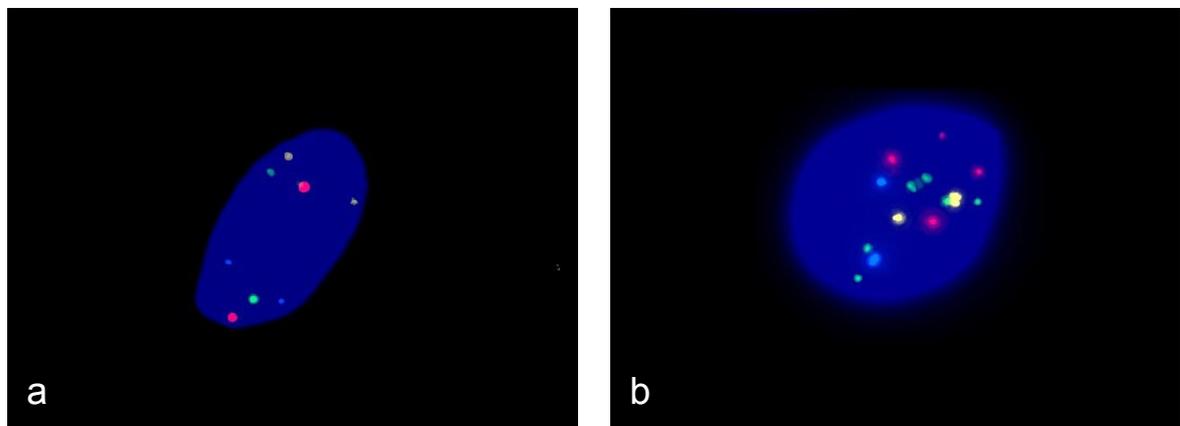


Abbildung 7a: diploide Zelle mit je 2 grünen, gelben, roten und blauen Sonden-Signalen

Abbildung 7b: aneuploide Zelle mit 6 grünen, 2 gelben, 4 roten, 2 blauen Signalen

### 3.1.5 Verteilung chromosomaler Aberrationen

131 Präparate wurden mit dem UroVysion-Sondenmix hybridisiert und untersucht. Insgesamt wurden dabei 6388 Zellen ausgewertet. Im Durchschnitt wurden 49 Zellen pro Präparat ausgezählt.

1251 Zellen wiesen eine Amplifikation des Chromosoms 3 auf. Am zweithäufigsten lag das Chromosom 7 (819 Zellen) vermehrt vor gefolgt von Chromosom 17 (666 Zellen). Eine Homodeletion von 9p21 wurde in 369 Zellen gefunden (5,8 % aller ausgezählten Zellen) und war somit seltener als die Amplifikationen zu finden.

Die durchschnittliche Chromosomenanzahl der vier untersuchten Chromosomen, die eine Zelle aufweist, zeigt die folgende Abbildung. Chromosom 3, 7 und 17 zeigen jeweils gegenüber dem diploiden Chromosomensatz einen erhöhten DNA-Gehalt. Den höchsten Zugewinn mit durchschnittlich 2,35 Signalen pro Zelle zeigt die an das Zentromer des Chromosoms 3 bindende Sonde.

Die Sonde 9p21 misst einen unter dem physiologischen, diploiden Chromosomensatz liegenden Wert von 1,86 Signalen pro Zelle.

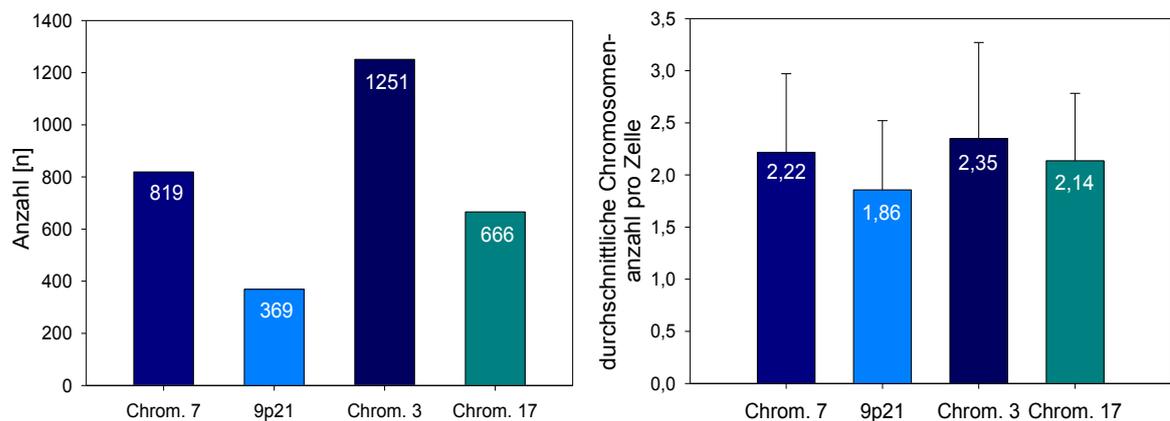


Abbildung 8: Zell-Gesamtanzahl mit jeweils aneuploidem Chromosom

Abbildung 9: durchschnittliche Chromosomenanzahl pro Zelle

## 3.2 Analyse der Ergebnisse

Das Follow-up wurde im März 2010 durchgeführt. Die zu diesem Zeitpunkt ermittelten Diagnosen der Studienpatienten wurden als Referenz für die Studienergebnisse gesetzt. Zwischen der zytologischen Diagnostik des Präparatekollektivs (2005-2007) und dem Follow-up liegen somit 2,25-5,25 Jahre. Die Maßzahlen der Treffsicherheit erlauben somit ausschließlich Aussagen über diesen Nachbeobachtungszeitraum, was aber in Anbetracht der schlechten Prognose der Patienten mit Pankreaskarzinom oder Gallengangkarzinom (5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung für Pankreaskarzinome 5 % (Jemal u. a. 2009) und für CCC 5 – 10 % (Anderson u. a. 2004)) ausreicht.

### 3.2.1 Treffsicherheit der zytopathologischen Routinediagnostik

#### 3.2.1.1 Zytologisches Kollektiv I (n = 219)

Nach Ausschluss nicht brauchbaren Datenmaterials (siehe 3.1.1) verblieben 219 zytopathologisch ausgewertete Präparate, die sich eindeutig dem in 2.2.8 dargelegten positiven oder negativen Referenzstandard zuordnen ließen. Die folgende Abbildung zeigt einen Überblick über die Verteilung der Ergebnisse. Die letzte Zeile der Abbildung repräsentiert die Aufteilung der vier zytologischen Diagnoseeinheiten in Follow up-Positive (Patienten mit Malignom) und Follow up-Negative (Patienten ohne Malignom).

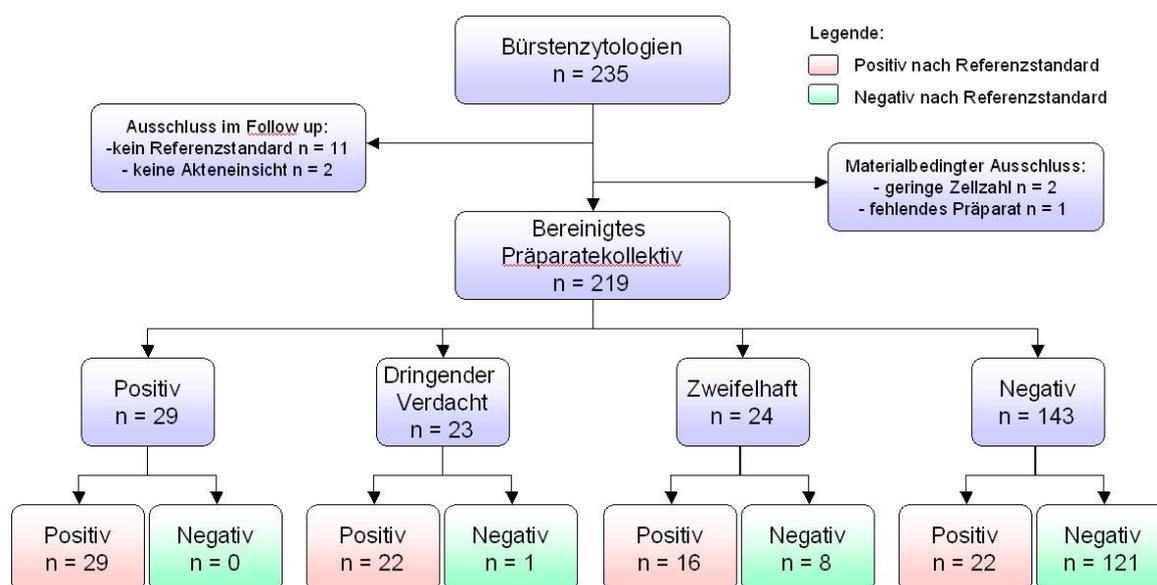


Abbildung 10: Zuordnung der zytologischen Kategorien zum jeweiligen Referenzstandard

## Einteilung in zytologische Diagnosegruppen

Um die Treffsicherheit der zytopathologischen Diagnosen beschreiben zu können, ist es notwendig eine Dichotomisierung der vier Stufen der Malignitätswahrscheinlichkeit (Böcking 1998) vorzunehmen. Diese Aufteilung ist erforderlich, da eine Auftragung in einer Vierfeldertafel zur Errechnung von Sensitivität und Spezifität nur möglich ist, wenn der Test ausschließlich eine binäre Auswahl in „Test-positiv“ oder „Test-negativ“ bereit hält. Bei den zweifelhaften und dringend verdächtigen Präparaten muss somit entschieden werden, ob sie als „Test-positiv“ oder „Test-negativ“ eingestuft werden. Dabei ergeben sich drei verschiedene Möglichkeiten der Splittung, die in der folgenden Tabelle dargestellt werden.

Diagnostische Kategorien nach den Stufen der Malignitätswahrscheinlichkeit	Auswertungsmöglichkeit		
	⊕ = Test-positiv, ⊖ = Test-negativ		
	<u>Variante 1</u>	<u>Variante 2</u>	<u>Variante 3</u>
Negativ	⊖	⊖	⊖
Zweifelhaft	⊕	⊖	⊖
Dringender Verdacht	⊕	⊕	⊖
Positiv	⊕	⊕	⊕

Tabelle 11: Auswertungsvarianten der 4 zytologischen diagnostischen Kategorien

Diese drei Varianten bedingen jeweils unterschiedliche Maßzahlen der diagnostischen Treffsicherheit und werden im Folgenden für das Kollektiv I einzeln dargestellt:

**Variante 1:** Positive, dringend verdächtige und zweifelhafte Präparate gelten als „Test positiv“. Nur negative Präparate gelten als „Test negativ“. Die Vierfeldertafel zeigt einen Überblick über die absoluten Häufigkeiten der Ereignisse.

<b>Zytologie</b>			Sensitivität:	67/89 = 0,7528	
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	121/130 = 0,9308
Krank	67	22	89	PPV:	67/76 = 0,8816
Gesund	9	121	130	NPV:	121/143 = 0,8462
Summe	76	143	219	Gesamttreffsicherheit:	(67+121)/219 = 0,8584

Tabelle 12: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 1

Die Sensitivität beträgt bei der Variante 1, bei der auch unklare Zytologien (Wertungskategorie „zweifelhaft“ und „dringend verdächtig“) als „Test-positiv“ gewertet werden und deshalb viele „richtig-positive“ Ergebnisse erzeugt werden, 75.28 %.

Allerdings wird durch diese Art der Auswertung eine hohe Anzahl „falsch-positiver“ Testergebnisse erzeugt, die sich in der Spezifität von 93,08 % widerspiegeln.

**Variante 2:** Positive und dringend verdächtige Präparate gelten als „Test positiv“. Zweifelhafte und negative Präparate gelten als „Test negativ“.

<b>Zytologie</b>			Sensitivität:	51/52=0,573	
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	129/130=0,9923
Krank	51	38	89	PPV:	51/52=0,9808
Gesund	1	129	130	NPV:	129/167=0,7725
Summe	52	167	219	Gesamttreffer­sicherheit:	(51+129)/219=0,8219

Tabelle 13: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 2

Im Gegensatz zu Variante 1 werden hier die zweifelhaften Präparate als „Test-negativ“ bewertet. Die Sensitivität sinkt im Folgenden auf 57,3 %. Da einige „falsch-positiv“ Werte, die auf die Hinzunahme zytologisch zweifelhafter Präparate in die Kategorie „Test-positiv“ zurückzuführen sind, wegfallen, zeigt diese Variante eine wesentlich höhere Spezifität von 99,23 %.

**Variante 3:** Positive Präparate gelten als „Test positiv“; dringend verdächtige, zweifelhafte und negative Präparate gelten als „Test negativ“.

<b>Zytologie</b>			Sensitivität:	29/89=0,3258	
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	130/130=1,0
Krank	29	60	89	PPV:	29/29=1,0
Gesund	0	130	130	NPV:	130/190=0,6842
Summe	29	190	219	Gesamttreffer­sicherheit:	(29+130)/219=0,726

Tabelle 14: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 3

Wenn nur die sicher „tumorzellpositiven“ Präparate zur „Test-positiven“ Sparte gezählt werden, verringert sich die Sensitivität im Vergleich zu den vorherigen Auswertungsvarianten auf 32,58 %. Die Spezifität beträgt 100 %, da kein zytologisch positiv bewertetes Präparat sich als „falsch-positiv“ herausgestellt hatte.

Eine Übersicht über die drei Varianten bietet die folgende Tabelle:

Ergebnis	Zytologie (Kollektiv I, n = 219)		
	Variante 1	Variante 2	Variante 3
Sensitivität	75,28 %	57,3 %	32,58 %
Spezifität	93,08 %	99,23 %	100 %
PPV	88,16 %	98,08 %	100 %
NPV	84,62 %	77,24 %	68,42 %
Gesamttreffer­sicherheit	85,84 %	82,19 %	72,6 %

Tabelle 15: Übersicht über die Treffsicherheiten der zytopathologischen Routinebefundung (Kollektiv I)

### 3.2.1.2 Zytologisches Kollektiv II (n = 131)

Aus der Gesamtheit der zytologisch negativ diagnostizierten Präparate wurden nur diejenigen aus dem Jahr 2007 (55 Zytologien) mittels FISH ausgewertet. Die Präparate von 2006 und 2005 (insgesamt 88) blieben unberücksichtigt, da nach einer vorab erfolgten Vorauswertung eine adjuvante FISH an zytologisch negativen Präparaten keinen diagnostischen Zugewinn brachte (die FISH- und Zytologieergebnisse stimmten zu 100 % überein). Da es Hauptziel der Studie war, die adjuvante FISH nach unklarer Zytologie zu beurteilen, wurde es für ausreichend erachtet, eine exemplarische Negativkontrollgruppe zu untersuchen.

Das zytologische Kollektiv I eignet sich somit zur Beurteilung der Treffsicherheit der routinezytologischen Diagnostik im Gesamtkollektiv (vgl. Kapitel 2.2.1). Kollektiv II (= Äquivalent zum FISH-Kollektiv) ermöglicht den direkten Vergleich mit den FISH-Ergebnissen und die Bestimmung eines eventuell signifikanten Unterschieds zwischen den beiden Methoden.

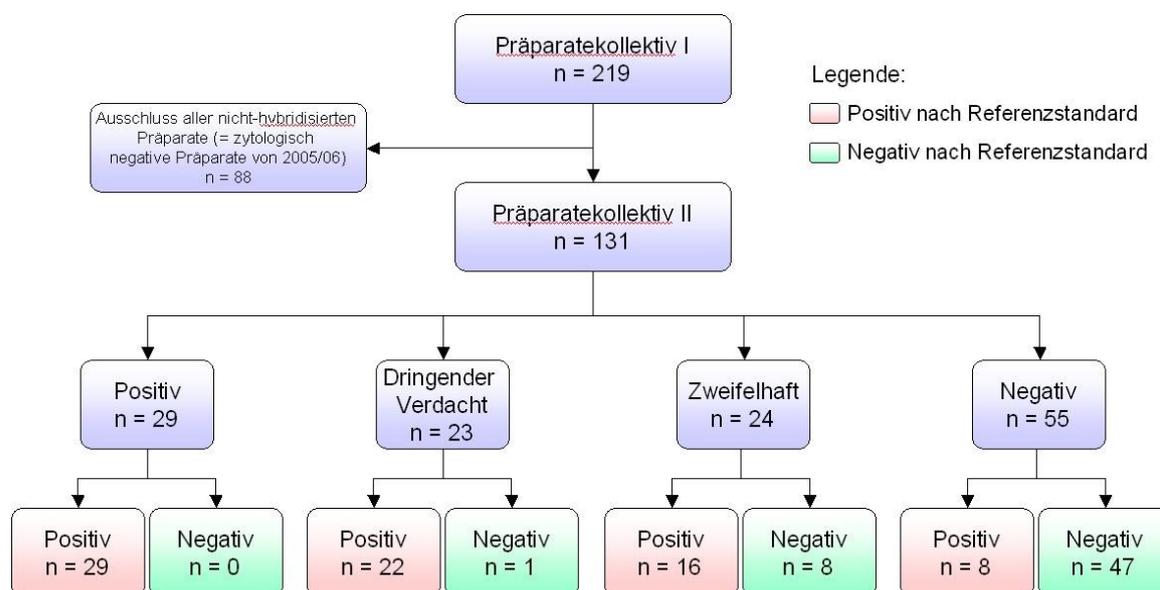


Abbildung 11: Verteilung im Kollektiv II nach Anwendung auf den Referenzstandard

Analog zur Auswertung des Kollektivs I ergeben sich auch für das angepasste Kollektiv II erneut drei Möglichkeiten der Auswertung:

**Variante 1:** Positive, dringend verdächtige und zweifelhafte Präparate gelten als „Test positiv“. Nur negative Präparate gelten als „Test negativ“.

	Zytologie			Sensitivität:	67/75=0,8933
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	47/56=0,8393
Krank	67	8	75	PPV:	67/76=0,8816
Gesund	9	47	56	NPV:	47/55=0,8545
Summe	76	55	131	Gesamttreffericherheit:	(67+47)/131=0,8702

Tabelle 16: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 1

Die Sensitivität ist bei Zurechnung der unklaren Zytologie zu den positiven Präparaten hoch (89,33 %). Nur 88,16 % der als positiv deklarierten Präparate wiesen im Follow up letztlich ein Malignom auf. Die Spezifität liegt bei 83,93 %.

**Variante 2:** Positive und dringend verdächtige Präparate gelten als „Test positiv“. Zweifelhafte und negative Präparate gelten als „Test negativ“.

	Zytologie			Sensitivität:	51/75=0,68
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	55/56=0,9821
Krank	51	24	75	PPV:	51/52=0,9808
Gesund	1	55	56	NPV:	55/79=0,6962
Summe	52	79	131	Gesamttreffericherheit:	(51+55)/131=0,8092

Tabelle 17: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 2

Bei Zuzählung der zweifelhaften Präparate zu den „Test negativen“ sinkt die Sensitivität auf 68,0 %, die Spezifität steigt im Gegenzug auf 98,21 %.

**Variante 3:** Positive Präparate gelten als „Test positiv“; dringend verdächtige, zweifelhafte und negative Präparate gelten als „Test negativ“.

	Zytologie			Sensitivität:	29/75=0,3867
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	56/56=1,0
Krank	29	46	75	PPV:	29/29=1,0
Gesund	0	56	56	NPV:	56/102=0,549
Summe	29	102	131	Gesamttreffericherheit:	(29+56)/131=0,6489

Tabelle 18: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 3

Bei dieser dritten Variante sinkt die Sensitivität auf 38,67 %. Die Spezifität beträgt dagegen 100 %. Hier konnte bei jedem Patienten mit einem zytologisch positiven Präparat im Follow up ein Malignom im Gallen- oder Pankreasgang nachgewiesen werden. Die Gesamtreffsicherheit liegt nur noch bei 64,89 % gegenüber 87,02 % bei der Variante 1.

<b>Zytologie (Kollektiv II, n = 131)</b>			
	Variante 1	Variante 2	Variante 3
Sensitivität	89,33 %	68,0 %	38,67 %
Spezifität	83,93 %	98,21 %	100,00 %
PPV	88,16 %	98,08 %	100,00 %
NPV	85,45 %	69,62 %	54,9 %
Gesamtreffsicherheit	87,02 %	80,92 %	64,89 %
Youden-Index	0,73	0,66	0,39

Tabelle 19: Übersicht über die Treffsicherheiten der zytopathologischen Routinebefundung (Kollektiv II)

Da die lichtmikroskopische Zytologie eine schnelle und verlässliche Methode darstellt, wird sie als Routinediagnostikum verwendet. Sie kann als Screeningmethode zur Früherkennung von dysplastischen und malignen Veränderungen eingesetzt werden. Ein Screeningtest benötigt eine hohe Sensitivität, die eine hohe Detektionsrate ermöglicht.

Die höchste Sensitivität der Routinezytologie zeigt Variante 1 mit 89,33 %.

Der Youden-Index (= Sensitivität + Spezifität - 1) ist der Punkt, der am weitesten von der 45°-Geraden in einer ROC-Kurve entfernt ist. Ein hoher Youden-Index bezeichnet den optimalen Cut-off- Wert der ROC-Kurve.

Der Youden-Index als optimales Maß von Sensitivität und Spezifität fällt mit 0,73 bei Variante I am höchsten aus. Somit wird diese Einteilung der dringend verdächtigen und zweifelhaften Präparate zu den „Test positiven“ (= Variante I) für den weiteren Vergleich mit der FISH verwendet werden.

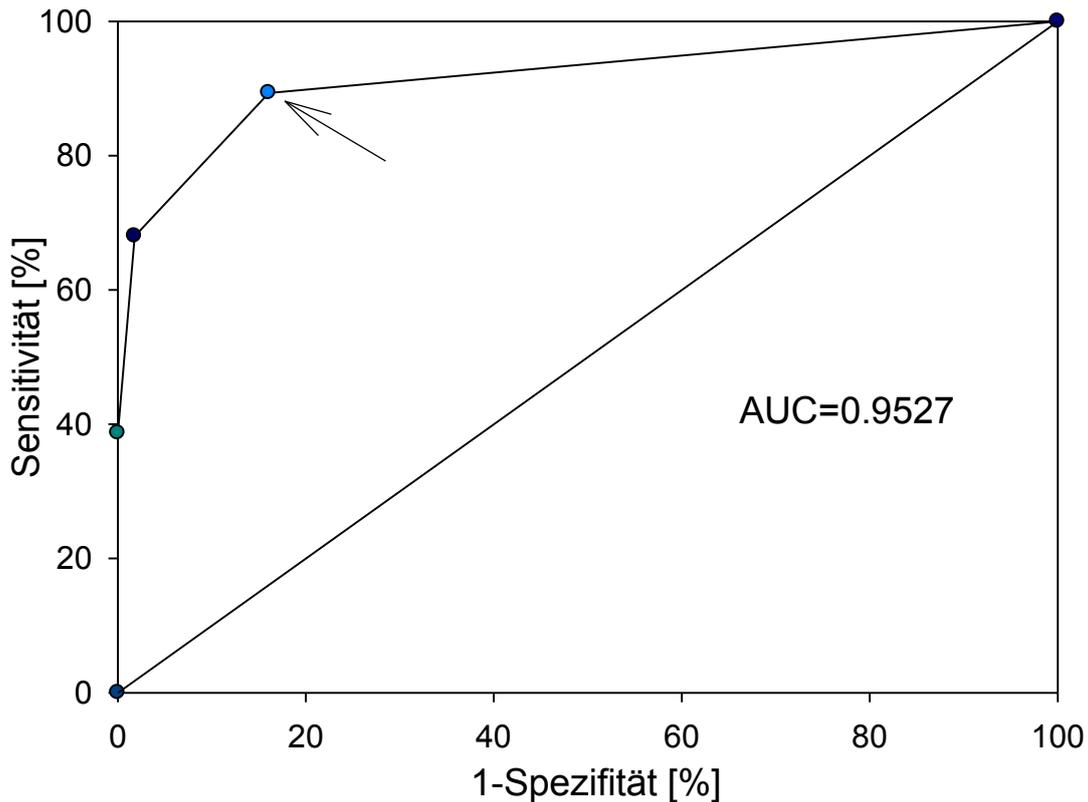


Abbildung 12: ROC-Kurve der Zytologie (Kollektiv II)

### 3.2.2 Aufschlüsselung der diskrepanten zytopathologischen Diagnosen des Kollektivs II (n = 131)

Die zytopathologischen Diagnosen wichen bei Variante 1 als Grundlage (= unklare Zytologie wird als Test positiv gewertet) in 17 Fällen von denen des Follow ups ab.

Die folgenden zwei Tabellen geben eine detaillierte Übersicht über die einzelnen Fälle.

---

#### **Falsch positive Fälle (9 Präparate)**

---

##### **Zweifelhafte Zytologie**

---

- 1 Zytologisch zeigten sich abnorme Zellen mit etwas vergrößerten, entrundeten, unregelmäßigen Zellkernen mit verschobener Kernplasmarelation. Bei dem an primär sklerosierender Cholangitis erkrankten Patient zeigte sich in der ERCP eine DHC-Stenose, die sich histologisch als chronisch rezidivierende Entzündung herausstellte.
  - 2 Zytologisch fanden sich vereinzelte abnorme Zellen mit etwas vergrößerten, entrundeten, unregelmäßigen Zellkernen. Die folgende DNA-Zytometrie war negativ. Bei histologischen Biopsien und einer explorativen Laparotomie konnte kein Hinweis für Malignität gefunden werden.
-

- 
- 3 Zytologisch zeigten sich teils aktivierte, teils regressiv veränderte duktale Epithelien. Die DNA-Zytometrie war negativ. Klinisch fand sich eine akute Pankreatitis ohne Hinweis auf maligne Veränderungen.
  - 4 Zytologisch fanden sich vereinzelte abnorme Zellen mit etwas vergrößerten, entrundeten, unregelmäßigen Zellkernen. Klinisch bestätigte sich eine chronisch rezidivierende Pankreatitis ohne Nachweis maligner Veränderungen.
  - 5 Teils zeigten sich regressiv veränderte duktale Epithelien. Wegen starker Lufttrocknungsartefakte war die diagnostische Sicherheit eingeschränkt. Die DNA-Zytometrie war negativ. In der Histologie fand sich kein Hinweis auf Malignität und auch drei weitere Zytologien waren negativ.
  - 6 Teils zeigten sich regressiv veränderte duktale Epithelien. Wegen starker Lufttrocknungsartefakte war die diagnostische Sicherheit eingeschränkt. Klinisch wies der Patient eine Cholezystitis, jedoch keine neoplastischen Veränderungen auf.
  - 7 Zytologisch fanden sich vereinzelte abnorme Zellen mit etwas vergrößerten, entrundeten, unregelmäßigen Zellkernen. Die DNA-Zytometrie war negativ. Der klinische Verdacht auf einen Klatskin-Tumor konnte histologisch nicht bestätigt werden.
  - 8 Teils zeigten sich regressiv veränderte duktale Epithelien. Wegen starker Lufttrocknungsartefakte war die diagnostische Sicherheit eingeschränkt. Eine Gallengangsbiopsie am gleichen Entnahmeort diagnostizierte eine tumorfreie, fibrotische Veränderung.

---

### **Dringend verdächtige Zytologie**

---

- 1 Der dringende Verdacht auf das Vorliegen von Tumorzellen eines hochdifferenzierten Adenokarzinoms wurde durch eine negative DNA-zytometrische Untersuchung, negative histologische Biopsien, drei weitere negative Zytologien und zuletzt durch einen zweijährigen klinisch negativen Verlauf widerlegt.

---

### **Positive Zytologie**

---

- keine
- 

Tabelle 20: falsch positive Fälle nach Zytologie (Kollektiv II)

Neben den 9 falsch positiven Diagnosen wurde im Kollektiv II in 8 Fällen eine falsch negative Diagnose gestellt:

---

### **Falsch negative Fälle (8 Präparate)**

---

#### **Negative Zytologie**

---

- 1 Zytologisch fanden sich regressiv veränderte duktale Epithelien, jedoch kein Anhalt für Malignität. 5 Monate später wurden histologisch ein Klatskin-Tumor Grad IV und ein Gallenblasen-Karzinom nachgewiesen. Eine erneute, sehr präzise Durchsicht des zytologischen Präparates erbrachte keine Veränderung der zytologischen Diagnose, sodass am ehesten von einem *Sampling Error* ausgegangen wird.
- 2 Zytologisch wurden regressiv veränderte duktale Epithelien bei lufttrocknungsbedingter, eingeschränkter Beurteilbarkeit erkannt. Histologisch bestätigte sich der klinische Verdacht auf einen Klatskin-Tumor Grad IV. Eine erneute mikroskopische Durchsicht erbrachte keine Veränderung der zytologischen Diagnose, sodass am ehesten von einem *Sampling Error* ausgegangen wird.
- 3 Zytologisch war das Zellbild vereinbar mit einer chronisch rezidivierenden Cholangitis. Histologisch zeigte sich ein Adenokarzinom der Papilla Vateri. Eine erneute Durchsicht des zytologischen Präparates erbrachte keine Veränderung der zytologischen Diagnose, sodass am ehesten von einem *Sampling Error* ausgegangen wird.
- 4 Zytologisch war das Zellbild vereinbar mit einer chronisch rezidivierenden Cholangitis  
+5 mit Zeichen eines Gallenstaus. Es handelte sich histologisch um ein Lokalrezidiv eines Gallenblasenkarzinoms (Erstdiagnose 6 Jahre vorher) mit umschriebener Lymphangiosis carcinomatosa und DHC-Stenose.
- 6 Zytologisch war das Zellbild vereinbar mit einer chronisch rezidivierenden Cholangitis. Histologisch zeigte sich ein muzinöses, duktales Pankreaskarzinom.
- 7 Zytologisch fanden sich regressiv veränderte duktale Epithelien mit geringer entzündlicher Komponente und ausgeprägtem Gallenstau. Histologisch zeigte sich ein duktales Adenokarzinom des Pankreas (1,9cm von der Papilla Vateri) entfernt.
- 8 Zytologisch fanden sich entzündlich aktivierte und regressiv veränderte duktale Epithelien mit entzündlicher und hämorrhagischer Komponente. Histologisch fand sich ein Pankreaskopfkarzinom mit chronischer Entzündung der Papilla Vateri.

---

Tabelle 21: falsch negative Fälle nach Zytologie (Kollektiv II)

### 3.2.3 FISH-Auswertung

Da für FISH an Gallengangs- und Pankreasgangsepithelien noch kein einheitlicher Cut-off festgelegt wurde, ab dem ein Präparat als tumorpositiv gewertet wird, werden unterschiedliche Cut-off-Berechnungen durchgeführt. Um die diagnostische Aussagekraft der FISH zu erhöhen, wurde anhand der Maßzahlen der Treffsicherheit die Zahl aneuploider Zellen festgesetzt, die mindestens notwendig ist, um eine positive Diagnose zu konstatieren. Bei Urothelkarzinomen der Harnblase wird mittels der UroVysion Sonden ab  $\geq 4$  aneuploiden Zellen pro Präparat das ganze Präparat als maligne gewertet. Da diese Vorgaben nicht unüberprüft auf das Cholangio- und exokrine Pankreaskarzinom übertragen werden können, werden die Berechnungen für  $\geq 1$ ,  $\geq 2$  usw. bis  $\geq 10$  aneuploide Zellen pro Präparat als Cut-off im Folgenden vorgestellt. Als Referenzstandard (Einteilung in krank und gesund) gelten wiederum die Ergebnisse des Follow ups.

#### Cut-off-Berechnungen für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

**Variante 1:** Das Präparat wird als maligne eingestuft, wenn  $\geq 1$  Zelle aneuploid ist.

$\geq 1$	FISH			Sensitivität:	68/75=0,9076
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	39/56=0,6964
Krank	68	7	75	PPV:	68/85=0,8
Gesund	17	39	56	NPV:	39/46=0,8478
Summe	85	46	131	Gesamttreffsicherheit:	(68+39)/131=0,8168
				Youden-Index	0,61

Tabelle 22: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 1

**Variante 2:** Das Präparat wird als maligne eingestuft, wenn  $\geq 2$  Zellen aneuploid sind.

$\geq 2$	FISH			Sensitivität:	64/71=0,8533
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	49/56=0,875
Krank	64	11	75	PPV:	64/71=0,9014
Gesund	7	49	56	NPV:	49/60=0,8167
Summe	71	60	131	Gesamttreffsicherheit:	(64+49)/131=0,8626
				Youden-Index	0,73

Tabelle 23: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 2

**Variante 3:** Das Präparat wird als maligne eingestuft, wenn  $\geq 3$  Zellen aneuploid sind.

$\geq 3$	FISH			Sensitivität:	58/75=0,7733
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	55/56=0,9821
Krank	58	17	75	PPV:	58/59=0,9831
Gesund	1	55	56	NPV:	55/72=0,7639
Summe	59	72	131	Gesamttreffer-sicherheit:	(58+55)/131=0,8626
				Youden-Index	0,75

Tabelle 24: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 3

**Variante 4:** Das Präparat wird als maligne eingestuft, wenn  $\geq 4$  Zellen aneuploid sind.

$\geq 4$	FISH			Sensitivität:	58/75=0,7733
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	55/56=0,9821
Krank	58	17	75	PPV:	58/59=0,9831
Gesund	1	55	56	NPV:	55/72=0,7639
Summe	59	72	131	Gesamttreffer-sicherheit:	(58+55)/131=0,8626
				Youden-Index	0,75

Tabelle 25: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 4

**Variante 5:** Das Präparat wird als maligne eingestuft, wenn  $\geq 5$  Zellen aneuploid sind.

$\geq 5$	FISH			Sensitivität:	57/75=0,76
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	56/56=1,0
Krank	57	18	75	PPV:	57/57=1,0
Gesund	0	56	56	NPV:	56/74=0,7568
Summe	57	74	131	Gesamttreffer-sicherheit:	(57+56)/131=0,8626
				Youden-Index	0,76

Tabelle 26: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 5

**Variante 6:** Das Präparat wird als maligne eingestuft, wenn  $\geq 6$  Zellen aneuploid sind.

$\geq 6$	FISH			Sensitivität:	55/75=0,7333
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	56/56=1,0
Krank	55	20	75	PPV:	55/55=1,0
Gesund	0	56	56	NPV:	56/77=0,7368
Summe	55	76	131	Gesamttreffer-sicherheit:	(55+56)/131=0,8473
				Youden-Index	0,74

Tabelle 27: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 6

**Variante 7:** Das Präparat wird als maligne eingestuft, wenn  $\geq 7$  Zellen aneuploid sind.

$\geq 7$	FISH			Sensitivität:	53/75=0,7067
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	56/56=1,0
Krank	53	22	75	PPV:	53/53=1,0
Gesund	0	56	56	NPV:	56/78=0,7179
Summe	53	78	131	Gesamttreffer-sicherheit:	(53+56)/131=0,8321
				Youden-Index	0,71

Tabelle 28: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 7

**Variante 8:** Das Präparat wird als maligne eingestuft, wenn  $\geq 8$  Zellen aneuploid sind.

$\geq 8$	FISH			Sensitivität:	45/75=0,6
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	56/56=1,0
Krank	45	30	75	PPV:	45/45=1,0
Gesund	0	56	56	NPV:	56/86=0,6512
Summe	45	86	131	Gesamttreffer-sicherheit:	(45+56)/131=0,771
				Youden-Index	0,6

Tabelle 29: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 8

**Variante 9:** Das Präparat wird als maligne eingestuft, wenn  $\geq 9$  Zellen aneuploid sind.

$\geq 9$	FISH			Sensitivität:	43/75=0,5733
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	56/56=1,0
Krank	43	32	75	PPV:	43/43=1,0
Gesund	0	56	56	NPV:	56/88=0,6364
Summe	43	88	131	Gesamttreffer-sicherheit:	(43+56)/131=0,7557
				Youden-Index	0,57

Tabelle 30: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 9

**Variante 10:** Das Präparat wird als maligne eingestuft, wenn  $\geq 10$  Zellen aneuploid sind.

$\geq 10$	FISH			Sensitivität:	41/75=0,5467
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	56/56=1,0
Krank	41	34	75	PPV:	41/41=1,0
Gesund	0	56	56	NPV:	56/90=0,6222
Summe	41	90	131	Gesamttreffer-sicherheit:	(41+56)/131=0,7405
				Youden-Index	0,55

Tabelle 31: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 10

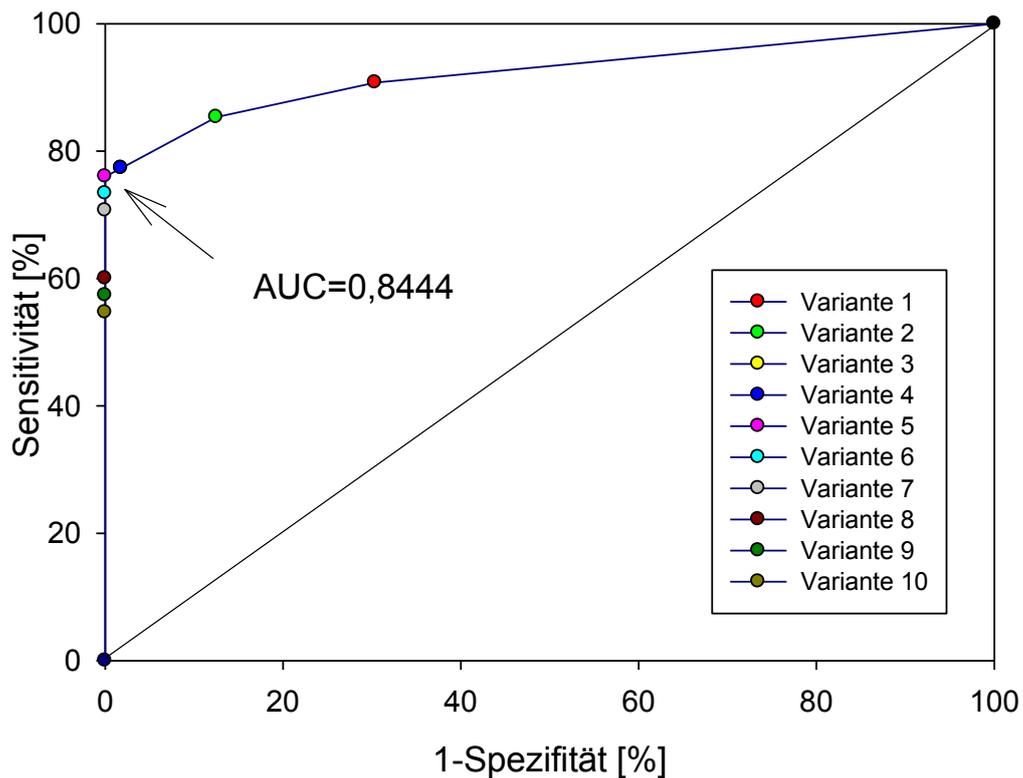


Abbildung 13: ROC-Kurven der FISH

Als Voraussetzung dafür, dass die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als Bestätigungstest bei unklarer Zytologie etabliert werden kann, muss diese eine sehr hohe Spezifität aufweisen.

An der ROC-Kurve lässt sich erkennen, dass die Spezifität bei Verringerung der für eine positive Diagnose notwendigen Zellen zunächst konstant hoch bleibt, bei weiterer Reduktion der Zellzahl jedoch scharf abfällt (siehe Pfeil). Die Sensitivität ist im Bereich eines hohen Cut-offs gering, sodass sich diese Varianten nicht eignen.

Die Spezifität sinkt bei den ersten Varianten früh ab, sodass diese für einen Bestätigungstest nicht in Frage kommen. Als idealer Cut-off-Wert mit einer Spezifität von 100 % und einer Sensitivität von 76 % sowie dem höchsten Youden-Index von 0,76 wird daher im Folgenden Variante 5 ( $\geq 5$  aneuploide Zellen) verwendet.

### 3.2.4 Treffsicherheit der FISH in den vier zytologischen Diagnosegruppen

#### Negative Zytologie

FISH erkannte keinen nach zytologischer Bewertung falsch negativ diagnostizierten Befund (n = 8) als richtig positiv. FISH erkannte kein Präparat als falsch positiv.

#### Zweifelhafte Zytologie

Von insgesamt 24 mittels FISH auswertbaren zuvor zytologisch zweifelhaften Präparaten waren nach Erhebung des Follow ups 10 richtig positiv, keines falsch positiv, 10 richtig negativ sowie 5 falsch negativ.

	FISH				
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	10/10=1,0
Krank	10	6	16	PPV:	8/8=1,0
Gesund	0	8	8	NPV:	8/14=0,5713
Summe	10	14	24	Gesamttreffsicherheit:	(8+10)/24=0,75

Tabelle 32: Treffsicherheit der FISH bei zweifelhafter Zytologie

#### Dringend verdächtige Zytologie

FISH erkannte 19 von 23 dringend verdächtigen Präparaten als richtig positiv. 3 Präparate waren in der FISH falsch negativ, 1 richtig negativ.

	FISH				
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	1/1=1,0
Krank	19	3	22	PPV:	19/19=1,0
Gesund	0	1	1	NPV:	1/4=0,25
Summe	19	4	23	Gesamttreffsicherheit:	(20+1)/25=0,84

Tabelle 33: Treffsicherheit der FISH bei dringend verdächtiger Zytologie

#### Positive Zytologie

FISH erkannte 28 von 29 zytologisch positiven Präparaten nach Erhebung des Follow up als richtig positiv. Ein Präparat wurde nach FISH als falsch negativ eingestuft.

### 3.2.5 Aufschlüsselung der diskrepanten FISH-Diagnosen

Da die FISH in insgesamt 18 Fällen falsch negative Ergebnisse lieferte, wurden diese Präparate erneut durch einen zweiten unabhängigen Untersucher (Dr. Martin Schramm, Zytopathologie, Universitätsklinik Düsseldorf) mikroskopiert und ausgewertet. Trotz dieser erneuten Durchsicht fanden sich in keinem einzigen Präparat aneuploide Zellen, sodass davon auszugehen ist, dass es sich nicht um einen *Screening Error* sondern um einen *Sampling Error* handelt.

Falsch positiv war kein Präparat diagnostiziert worden.

Im Folgenden werden die diskrepanten Fälle aufgeführt.

---

#### **Falsch negative Fälle (18 Präparate)**

---

- 1 FISH fand 2 aneuploide Zellen (von 60).  
Zytologisch fand sich kein Anhalt für Malignität. Fünf Monate nach der Zytologie wurde histologisch ein Klatskin-Tumor Grad IV und ein Gallenblasen-Karzinom nachgewiesen. Trotz erneuter Durchsicht konnten keinen auffälligen Zellen gefunden werden, sodass hier zwar wahrscheinlich zwei Zellen des Gallenblasenkarzinoms im Abstrich erfasst waren, aber der für eine positive Diagnose notwendig Cut-off von mindestens 5 aneuploiden Zellen nicht überschritten wurde. Das *Sampling* war also hier unzureichend.
- 2 FISH fand nur euploide Zellen.  
Zytologisch wurden regressiv veränderte duktale Epithelien bei eingeschränkter Beurteilbarkeit durch ausgeprägte Lufttrocknungsartefakte erkannt (zweifelhafte Zytologie). In der Histologie bestätigte sich der klinische Verdacht auf einen Klatskin-Tumor Grad IV. Trotz erneuter Durchsicht konnten weder fluoreszenz- noch lichtmikroskopisch auffällige Zellen gefunden werden, sodass am ehesten von einem *Sampling Error* ausgegangen wird.
- 3 FISH fand nur euploide Zellen.  
Zytologisch war das Zellbild vereinbar mit einer chronisch rezidivierenden Cholangitis mit wenigen abnormen Zellen (zweifelhafte Zytologie). Histologisch zeigte sich ein Adenokarzinom der Papilla Vateri. Trotz erneuter Durchsicht konnten weder fluoreszenz- noch lichtmikroskopisch auffällige Zellen gefunden werden, sodass am ehesten von einem *Sampling Error* ausgegangen wird.
- 4 Im Präparat fanden sich 2 aneuploide Zellen.  
Zytologisch wurden abnorme Zellen mit etwas vergrößerten, entrundeten, unregelmäßigen Zellkernen erkannt (zweifelhafte Zytologie). Die DNA-Zytometrie war negativ. Die Histologie erbrachte die Diagnose mäßig differenziertes Pankreaskopfkarzinom. Die aneuploiden Zellen gehören wahrscheinlich zum Pankreaskarzinom, unterschreiten jedoch den Cut-off.

- 
- 5 Im Präparat fand sich 1 aneuploide Zelle.  
Zytologisch wurden abnorme Regeneratepithelien mit vergrößerten, entrundeten, unregelmäßigen Zellkernen erkannt (zweifelhafte Zytologie). Die DNA-Zytometrie war negativ. Die Histologie diagnostizierte ein Magenkarzinomrezidiv im DHC. Hier wurde zwar wahrscheinlich eine Zelle des Magenkarzinoms im Abstrich erfasst, aber der für eine positive Diagnose notwendige Cut-off von mindestens 5 aneuploiden Zellen wurde nicht überschritten. Es kommt also in Betracht, dass der Grad der chromosomalen Aneuploidie des hier vorliegenden Tumors den Schwellenwert der Methode unterschreitet oder auch dass chromosomale Veränderungen an anderen als den hier untersuchten Chromosomen vorliegen.
- 6 Im Präparat fand sich 1 aneuploide Zelle.  
Zytologisch wurden abnorme Regeneratepithelien mit vergrößerten, entrundeten, unregelmäßigen Zellkernen, vergrößerte Chromatinstruktur und großen Nucleolen erkannt (zweifelhafte Zytologie). Die Histologie zeigte ein Adenokarzinom der Papilla Vateri.
- 7 Im Präparat fanden sich 2 aneuploide Zellen.  
Zytologisch wurden abnorme Regeneratepithelien mit vergrößerten, entrundeten, unregelmäßigen Zellkernen erkannt (zweifelhafte Zytologie). Die Histologie zeigte ein fortgeschrittenes Pankreaskopfkarcinom.
- 8 FISH fand nur euploide Zellen.  
Zytologisch wurden abnorme Regeneratepithelien mit vergrößerten, entrundeten, unregelmäßigen Zellkernen erkannt (zweifelhafte Zytologie). Die Histologie zeigte einen Klatskin-Tumor Grad I.
- 9 Im FISH-Präparat waren 4 von 60 ausgezählten Zellen aneuploid. Damit war das Präparat negativ einzustufen.  
Zytologisch wurden atypische Zellen mit entrundeten, unregelmäßigen Zellkernen mit prominenten Nucleolen und eine zu Gunsten der Nuclei verschobene Kernplasmarelation erkannt (dringend verdächtige Zytologie). Klinisch zeigte sich ein inoperabler Pankreaskopftumor.
- 10 Im Präparat fanden sich 2 aneuploide Zellen.  
Zytologisch wurden atypische Zellen mit entrundeten, unregelmäßigen Zellkernen mit prominenten Nucleolen und eine zu Gunsten der Nuclei verschobene Kernplasmarelation erkannt (dringend verdächtige Zytologie). Histologisch zeigte sich ein mäßig differenziertes muzinöses duktales Adenokarzinom.
- 11 Im Präparat fanden sich 2 aneuploide Zellen.  
Zytologisch wurden atypische Zellen mit entrundeten, unregelmäßigen Zellkernen und eine zu Gunsten der Nuclei verschobene Kernplasmarelation erkannt (dringend verdächtige Zytologie). Die Histologie zeigte einen Klatskin-Tumor Grad IV.
- 12 Im Präparat fanden sich 4 aneuploide Zellen.  
Bei starken Lufttrocknungsartefakten wurden zytologisch atypische Zellen mit
-

- 
- entrundeten, unregelmäßigen Zellkernen und eine zu Gunsten der Nuclei verschobene Kernplasmarelation erkannt (dringend verdächtige Zytologie). Die Histologie zeigte ein gering differenziertes adenosquamöses GB-Karzinom mit GG-Beteiligung.
- 13 Im Präparat fanden sich keine aneuploiden Zellen. Die Beurteilbarkeit war durch Schleim- und Erythrozytenüberlagerungen stark eingeschränkt, sodass nur wenige Zellen ausgewertet werden konnten.  
Die 7 ½ Monate später durchgeführte Zytologie war vereinbar mit einem intraduktalen papillären Pankreastumor unklarer Dignität (= positiv). Klinisch zeigte sich eine Pankreasraumforderung bei Pankreatitis. Eine immunzytochemische FNB des Pankreaskopfes war positiv.
- 14 Zytologisch war das Zellbild vereinbar mit einer chronisch rezidivierenden  
+15 Cholangitis. FISH fand in diesen beiden Abstrichen am selben Patienten (die Entnahmezeitpunkte lagen einen Monat auseinander) jeweils nur euploide Zellen. Es handelte sich histologisch um ein Lokalrezidiv eines Gallenblasenkarzinoms (Erstdiagnose 6 Jahre vorher) mit umschriebener Lymphangiosis carcinomatosa und DHC-Stenose.
- 16 Im Präparat fanden sich 2 aneuploide Zellen. Zytologisch war das Zellbild vereinbar mit einer chronisch rezidivierenden Cholangitis. Histologisch zeigte sich ein muzinöses, duktales Pankreaskarzinom. Der Cut-off von 5 Zellen wurde hier nicht erreicht.
- 17 Im Präparat fand sich 1 aneuploide Zelle. Zytologisch fanden sich regressiv veränderte duktale Epithelien mit geringer entzündlicher Komponente und ausgeprägtem Gallenstau. Histologisch zeigte sich ein duktales Adenokarzinom des Pankreas (1,9cm von der Papilla Vateri) entfernt.
- 18 Im Präparat fand sich 1 aneuploide Zelle. Zytologisch finden sich entzündlich aktivierte und regressiv veränderte duktale Epithelien mit entzündlicher und hämorrhagischer Komponente. Histologisch findet sich ein Pankreaskopfkarzinom mit chronischer Entzündung der Papilla Vateri.
- 

Tabelle 34: falsch negative Fälle nach FISH

Die häufigste Ursache eines falsch negativen Befundes war das *Sampling Error* wie oben beschrieben, bei dem die Bürstenzytologie an einem Ort erfolgte, an dem keine malignen Zellen vorhanden waren. Am zweithäufigsten waren Fixationsfehler Ursache für eine eingeschränkte und konsekutiv falsch-negative Diagnostik.

### 3.2.6 FISH als adjuvante Methode bei negativer und unklarer Zytologie

Im Folgenden wird eine Auswertung vorgestellt, welche die FISH als Reflextest nach Zytologie nutzt und so eine vorab auf höchstmögliche Sensitivität eingestellte Routinezytologie (obige Variante 1, bereits zytologisch zweifelhafte Präparate werden als Test-positiv gewertet) mit einer auf gute Spezifität eingestellten FISH ( $\geq 5$  aneuploide Zellen werden für eine positive Diagnose benötigt) kombiniert. Die zytologische Diagnose eines malignen Tumors (positiv) hat in der internationalen Literatur eine sehr hohe Spezifität. Daher wird hier keine adjuvante FISH benötigt. Selbst ein nicht aneuploides FISH-Resultat nach negativer Zytologie verändert die morphologische Tumordiagnose nicht. Hingegen kann oft nach unklarer Zytologie durch den Nachweis von Aneuploidie mittels FISH eine eindeutige Diagnose (Tumor-positiv oder -negativ) gestellt werden. Nach negativer Zytologie bringt eine adjuvante FISH keinen Vorteil, da keine der zytologisch falsch negativen Präparate aneuploid waren.

In der folgenden Tabelle werden daher die positiven und negativen Zytologien im Vergleich zum Follow up und die zweifelhaften sowie dringend verdächtigen Ergebnisse mit adjuvanter FISH ebenfalls im Vergleich zum Follow up aufgeführt. Die FISH bestimmt dabei die Einteilung des Präparats in „Test-positiv“ oder „Test-negativ“.

**Variante 5:** Das Präparat wird als maligne eingestuft, wenn  $\geq 5$  Zellen aneuploid sind.

	<b>Zytologie (+FISH <math>\geq 5</math> Zellen)</b>			Sensitivität:	58/75=0,7733
	Positiv	Negativ	Summe	Spezifität:	56/56=1,0
Krank	58	17	75	PPV:	58/58=1,0
Gesund	0	56	56	NPV:	56/73=0,7671
Summe	58	73	131	Gesamttrefferlichkeit:	(58+56)/131=0,8702

Tabelle 35: Zytologie plus FISH als adjuvante Methode bei nicht positiver Zytologie

### 3.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Einen Überblick über die Zytologie und die FISH als Einzeldiagnostikum und den gestaffelten Einsatz von 1. Zytologie und 2. FISH nach unklarer Zytologie gibt die folgende Tabelle.

<b>Ergebnis</b> (n = 131)	<b>Zytologie</b> (Kollektiv II, Variante I)	<b>FISH</b> (≥ 5 aneuploide Zellen)	<b>Zytologie + FISH</b> <b>bei unklarer Zytologie</b>
Positiv	n = 67	n = 57	n = 58
Negativ	n = 47	n = 56	n = 56
Falsch positiv	n = 9	n = 0	n = 0
Falsch negativ	n = 8	n = 18	n = 17
Sensitivität	89,33 %	76,0 %	77,33 %
Spezifität	83,93 %	100,00 %	100,00 %
PPV	88,16 %	100,00 %	100,00 %
NPV	85,45 %	75,68 %	76,71 %
Gesamttreffsicherheit	87,02 %	86,26 %	87,02 %

Tabelle 36: Methodenvergleich

### **3.3 Ist FISH eine geeignete diagnostische Methode in der Abstrich-Diagnostik von Gallengangs- und Pankreaskarzinomen im Rahmen einer ERCP?**

Im Kollektiv II konnte zytologisch eine Sensitivität von 89,33 % und eine Spezifität von 83,93 % ermittelt werden. In der FISH wurde eine Sensitivität von 76 % bei einer Spezifität von 100 % errechnet. Die Sensitivität der Zytologie ist größer als bei der FISH, die Spezifität hingegen ist bei der Zytologie nicht akzeptabel. Wegen der geringeren Sensitivität eignet sich die FISH somit nicht als Primärdiagnostikum. Zunächst sollte somit die routinemäßige Zytologie Anwendung finden. Die FISH kann bei unklarer (zweifelhafter oder dringend verdächtiger) Diagnostik als adjuvanter Test zur Diagnosesicherung eingesetzt werden.

## **4 Diskussion**

Ziel der Dissertation war es zu bewerten, ob die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eine geeignete diagnostische Methode zur Erkennung von Cholangio- und duktalem Adenokarzinomen des Pankreas darstellt.

Weiterhin sollte beurteilt werden, ob die FISH als adjuvante Methode nach der zytopathologischen Routinediagnostik einen Zugewinn an Information liefern und somit die diagnostische Aussagekraft der Zytologie verbessern kann.

### **4.1 Patienten und Präparate**

Die Präparate stammten ausnahmslos aus einer Klinik (Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf), dessen gastroenterologische Abteilung eine hohe Fallzahl an ERCPs aufwies. Das EVK stellte unter den im Institut für Zytopathologie eingegangenen Bürstenzytologien der Gallen- bzw. Pankreasgänge das größte Präparatekollektiv (235 Einsendungen im Zeitraum 2005-2007). Dadurch ist die Stichprobe sehr homogen mit einer hohen Fallzahl. Aufgrund der kleinen Untersucherzahl unterlagen die Präparate keinen großen Qualitätsschwankungen. Durch die Erfahrung der endoskopierenden Ärzte mit der Methode waren Materialentnahmefehler sowie Fixationsfehler auf ein Minimum beschränkt. Das Vermeiden von Fixationsfehlern, wie z.B. Lufttrocknungsartefakten (Gupta u. a. 2013), und Fehlern bei der Materialentnahme sowie die Erfahrung des Endoskopikers sind aber für den Erfolg der Methode unabdingbar, da andernfalls die Sensitivität reduziert ist (Stoos-Veić u. a. 2010), (Elek u. a. 2005). Die einheitliche Fixation der Präparate bildete die Grundlage für eine erfolgreiche zytopathologische Diagnostik. Durch eine hohe Erfahrung der Zytopathologen steigt ebenfalls die Treffsicherheit der Diagnostik (Selvaggi 2004).

### **4.2 Aneuploidie als Kriterium für Malignität**

Cholangio- und Pankreaskarzinome zeichnen sich durch Veränderungen des DNA-Gehaltes aus (Lindberg u. a. 2006), (Abou-Rebyeh u. a. 2002), (Iachino u. a. 1998), (Brunt & Kraemer 1996). So kann Aneuploidie in der Tumordiagnostik als feste Messgröße für die Einstufung als bösartig verwendet werden (vgl. 1.3.3 und 1.3.4) (Böcking & Motherby 1999), (Motherby, Marcy, u. a. 1998), (Motherby, Nadjari, u. a. 1998).

Je weiter die Transformation der Zellen in Richtung Malignität fortschreitet, desto höher ist der Grad der Aneuploidie (Samsel & Böcking 2006, S.49), (Williams u. a. 2008).

In der Diagnostik pankreatobiliärer Tumoren haben sich Tests im diagnostischen Alltag bewährt, die zur Neoplasieerkennung eine quantitative Bestimmung des DNA-Gehaltes vornehmen. Zu diesen adjuvanten Methoden zählt die DNA-Zytometrie, die den gesamten DNA-Gehalt eines Nucleus bestimmt (Biesterfeld & Deacu 2009).

Die oben genannte Methode beurteilt die sogenannte **DNA-Aneuploidie**, welche ein Abweichen des DNA-Gehaltes einer Zelle vom diploiden Chromosomensatz beschreibt. In der vorliegenden Arbeit wurde **chromosomale Aneuploidie** (oder Aneusomie) von einzelnen Chromosomen als Kriterium für eine maligne Transformation von Zellen herangezogen und mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung untersucht. Die gleichzeitige Verwendung von vier DNA-Sonden im Reaktionsansatz, wie es bei dem hier verwendeten UroVysion Sondenmix der Fall ist, ermöglicht die simultane Untersuchung der Aneusomie von vier Chromosomen, was die Spezifität des Tests erhöht. Die verwendeten DNA-Sonden für die Chromosomen 3, 7, 9p21 und 17 bilden gut bereits beschriebene zytogenetische Veränderungen bei Pankreas- und cholangiozellulären Karzinomen ab (Harada u. a. 2002), (Bosman u. a. 2010, S.289), (DeHaan u. a. 2007), (Salek u. a. 2007).

### **4.3 Lässt sich die diagnostische Treffsicherheit der Gallengangszytologie durch die Hinzunahme der FISH am selben Material verbessern?**

#### **4.3.1 Adjuvante FISH bei positiver und negativer Zytologie**

Durch den hohen Zeit- und Personalaufwand, der benötigt wird, um ein FISH-gefärbtes Präparat herzustellen, sowie aufgrund hoher Kosten wird die Zukunft der FISH als Diagnostikum in der Anwendung als adjuvante Methode nach lichtmikroskopischer Diagnostik und nicht als primäre Methode gesehen. Zu prüfen galt es somit, ob die FISH einen Zugewinn an Information liefern kann.

Bei den richtig negativen Zytologien erbrachte FISH zwar kein falsch-positives Ergebnis, doch die falsch negativen Befunde der Zytologie konnten in keinem Fall zu einem richtig positiven Befund revidiert werden. Die im Vergleich zum positiven Follow-up diskrepanten Präparate wurden zytologisch und fluoreszenzmikroskopisch einer erneuten Durchsicht unterzogen, doch konnte keine der beiden Methoden eine Befundänderung erwirken. Es muss am ehesten davon ausgegangen werden, dass die Bürstenzytologien nicht aus dem verdächtigen Bereich der Gallen- oder Pankreasgänge stammten und es sich damit um Entnahmen am falschen Ort (*Sampling Errors*) handelte.

In dieser Studie konnte für negative Zytologien somit kein Benefit einer adjuvanten FISH gefunden werden.

Die positiven Zytologien waren auch im Follow up ausnahmslos positiv. Der positive prädiktive Wert nur für positive Diagnosen beträgt folglich 100 %. Eine adjuvante Methode kann bei besagter Quote keine zusätzliche Information liefern, sondern allenfalls höhere Kosten verursachen, sodass sich die FISH hier ebenfalls nicht eignet.

Eine alleinige FISH-Diagnostik hätte in einem der 29 zytologisch positiven Fälle zu einem falsch negativen Ergebnis geführt. Die Zytologie führt hier zu einem besseren Ergebnis. Dies ist der Hauptgrund (neben dem schon erwähnten Kosten- und Zeitfaktor) bei positiver Zytologie auf eine adjuvante FISH zu verzichten.

#### **4.3.2 Adjuvante FISH bei dringend verdächtiger Zytologie**

22 der insgesamt 23 zytologisch als dringend verdächtig eingestuftem Präparate waren im Follow up positiv. Nach zytologisch dringendem Verdacht lag in einem Fall nach Follow up kein maligner Tumor vor. Der betroffene Patient war zwei Jahre lang tumorfrei geblieben. In der FISH wurde das Präparat richtig negativ eingestuft. Drei FISH-Präparate waren nach Auswertung durch zwei Untersucher falsch negativ geblieben. In zwei Präparaten fanden sich 2 aneuploide Zellen und in einem weiteren 4.

Diese Präparate zeigten zwar aneuploide Zellen, jedoch wurde der in dieser Arbeit ermittelte, zur Diagnose eines malignen Tumors führende Cut-off nicht überschritten. Insbesondere in solchen Fällen, wo man sich am Rande der Nachweisgrenze bewegt, wäre ein besseres klinisches *Sampling* wünschenswert. Wegen der geringen Zellzahl und Lufttrocknungsartefakten war die Auswertbarkeit eingeschränkt.

Eine weitere Erklärung wäre, dass der Grad der Aneuploidie der Tumoren in den diskrepanten Fällen zu gering ist, bzw. dass nicht die hier untersuchten Chromosomen 3, 7, 17 und 9p21 betroffen sind. Dies ist allerdings weniger wahrscheinlich, da duktale Pankreaskarzinome und cholangiozelluläre Karzinome eine ausgeprägte chromosomale Instabilität besitzen und zu den Tumoren mit dem höchsten Grad an Aneuploidie zählen (Harada u. a. 2002), (Bosman u. a. 2010, S.289), (DeHaan u. a. 2007).

In 19 von 23 dringend verdächtigen Fällen führte die FISH jedoch zu einer sicheren diagnostischen Aussage.

#### **4.3.3 Adjuvante FISH bei zweifelhafter Zytologie**

24 zweifelhafte Zytologien wurden mit der FISH untersucht. In 18 Fällen führte die FISH zu einer sicheren, richtigen Diagnose (10 x richtig positiv, 8 x richtig negativ). In 6 Fällen

wurde ein falsch negatives Ergebnis ermittelt. Bei 3 dieser diskrepanten Fälle war die im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführte DNA-Zytometrie am gleichen Material negativ, bei einem Fall dringend verdächtig bei geringer Zellzahl. Bei den beiden letzten Präparaten war wegen geringer Zellzahl keine DNA-Zytometrie möglich. Alle 6 hybridisierten Präparate waren auch nach erneuter Durchsicht durch einen zweiten Untersucher negativ. Da bei 4 der 6 Präparate DNA-Zytometrie und FISH negativ waren, wird ebenfalls von einem *Sampling Error* ausgegangen.

#### **4.3.4 Fazit**

Nach Gegenüberstellung der Ergebnisse kann somit geschlossen werden, dass die Zytologie eine ausreichend gute diagnostische Methode ist, wenn sie eine sichere Diagnose („tumorzellpositiv“ oder „tumorzellnegativ“) ermöglicht.

Die Dichotomisierung der vier Diagnoseeinheiten (s. Kapitel 3.2.1.1) ist eine für die Errechnung der Maßzahlen der Treffsicherheit notwendige, jedoch künstliche Einteilung. Die dringend verdächtigen und zweifelhaften Präparate wurden hier als tumorzellpositiv eingeteilt. Dies entspricht jedoch nicht der Realität im klinischen Alltag. Diese beiden Diagnosekategorien ermöglichen keine sichere Aussage. Die FISH kann hierbei helfen eine sichere Diagnose mit hoher Spezifität herbei zu führen.

## **4.4 Vergleich mit anderen Studien**

### **4.4.1 Routinezytologie**

Die bürstenzytologische, lichtmikroskopische Diagnostik erlangte in dieser Arbeit je nach Auswertungsvariante für das Kollektiv I (n = 219) im Vergleich zu anderen Studien hohe Treffsicherheiten. Bei der gewählten Variante 1 (zweifelhafte und dringend verdächtige Zytologien werden statistisch als positiv bewertet) betrug die Sensitivität 75,28 %, die Spezifität 93,08 %.

In anderen Studien finden sich alle drei Varianten (vgl. Kapitel 3.2.1.1) der Auswertungsmöglichkeit. Hier ergaben sich Sensitivitäten zwischen 15 – 68 % und Spezifitäten zwischen 80 - 100 % (Schoefl u. a. 1997), (Farrell u. a. 2001), (Stewart u. a. 2001), (Govil u. a. 2002), (Baron u. a. 2004), (Barr Fritcher u. a. 2007), (Gupta u. a. 2013).

Einen Überblick über die Studienlage gibt die folgende Tabelle:

Studie	Fallzahl	Sensitivität	Spezifität	Auswertungsvariante
(Schoefl u. a. 1997)	59	46,7 %	100 %	unklar
(Farrell u. a. 2001)	24	57 %	80 %	Variante 1
(Stewart u. a. 2001)	408	59,8 %	98,1 %	Variante 1
(Govil u. a. 2002)	278	68 %	100 %	Ausschluss unklarer Zytol.
(Baron u. a. 2004)	110	17,9 %	97,7 %	(s. Text)
(Barr Fritcher u. a. 2007)	284	15 %	100 %	Variante 1
		38 %	98 %	Variante 2
		48 %	91 %	Variante 3
(Gupta u. a. 2013)	22	42,9 %	100 %	unklar
Minimalwert	22	15 %	80 %	
Maximalwert	408	68 %	100 %	
Vorliegende Studie	219	75,28 %	93,08 %	Variante 1

Tabelle 37: Übersicht über die internationale Literatur zu Bürstenzytologien an Gallengangs- und Pankreasgangsabstrichen

Schoefl u. a. (1997) verglichen in einer prospektiven, nicht randomisierten Studie per ERCP gewonnene Bürstenzytologien mit bioptischen Proben. Es konnten insgesamt 59 Patienten nach Bürstenzytologie und erfolgreichem Follow up eingeschlossen werden. Die Sensitivität lag bei 46,7 %, die Spezifität bei 100%. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei gleichzeitiger histologischer und zytologischer Diagnostik die Trefferquote verbessern ließ. Es findet sich keine Aussage darüber, nach welchen Kriterien die zytologische Diagnose „tumorzell-positiv“ und „tumorzell-negativ“ gestellt wurde.

Bei Farrell u. a. (2001) wurden in einer prospektiven, nicht randomisierten Studie alleinige Bürstenzytologien einer Kombination von einer Dilatation der Gallengänge mit folgender FNAB und Bürstenzytologie gegenübergestellt. 24 Patienten wurden mittels alleiniger Bürstenzytologie untersucht. Die Sensitivität lag bei 57 %, die Spezifität bei 80%. Hier wurden dringend verdächtige Präparate sowie Präparate die „atypisch verdächtig“ für Malignität als „tumorzell-positiv“ gewertet. Dadurch, dass nicht sicher zu diagnostizierende Präparate als „tumorzell-positiv“ eingeteilt wurden, ergab sich eine verminderte Spezifität. Bei dieser Variante ist es möglich einer relevanten Anzahl an gesunden Patienten eine falsch-positive Diagnose zu geben.

Bei Govil u. a. (2002) wurden retrospektiv 278 Patienten mit unklaren pankreatobiliären Läsionen mit einer Bürstenzytologie untersucht. Es erfolgte die Einteilung in 3 zytologische Kategorien (maligne, atypisch/verdächtig und benigne). In der statistischen Auswertung wurden die atypisch/verdächtigen Präparate herausgerechnet und nicht weiter berücksichtigt. Ein histologisches Follow up war für insgesamt 54 zytologisch benigne und maligne Präparate durchgeführt worden. Dort zeigten sich eine Sensitivität

von 68 % und eine Spezifität von 100 %. Diese Studie erlaubt nur eine eingeschränkte Aussage, da 31 atypische/verdächtige Präparate (36,5 %), bei denen ein histologisch gesichertes Follow up erfolgt war, aus der Statistik herausgenommen wurden.

Stewart u.a. brachten 2001 eine Studie heraus, die an 2 Krankenhäusern in Glasgow, Schottland als Review durchgeführt wurde. Es wurden insgesamt 408 Patienten mittels Bürstenzytologie untersucht. Auch hier gab es (wie bei Govil u. a. 2002) 3 zytologische Diagnosekategorien. Die atypischen/verdächtigen Präparate wurden als maligne eingestuft. Es gab insgesamt 3 falsch-positive Diagnosen. In 2 dieser Präparate fanden sich ausschließlich atypische Zellen, im dritten Präparat wurde nach erneuter Durchsicht ein initialer *Screening Error* gefunden und die „tumorzell-positive“ Diagnose revidiert. Insgesamt ergaben sich eine Sensitivität von 59,8 % und eine Spezifität von 98,1 %.

Bei Baron u. a. (2004) wurden prospektiv, nicht randomisiert 110 Patienten einer ERCP zugeführt. Zytologisch gab es die Diagnosen negativ, positiv und *equivocal* (mehrdeutig). Durch 2 verblindete Zytopathologen wurden die Präparate erneut durchgesehen und letztlich als eindeutig „tumorzell-positiv“ oder „-negativ“ deklariert (Sensitivität 17,9 %, Spezifität 97,7 %). Der falsch-positive Fall (7,1 Monate Follow up bei PSC) wurde von beiden verblindeten Untersuchern als maligne eingestuft.

In einer retrospektiven Studie an 284 Patienten von Barr Fritcher u.a. (2007) wurden ebenfalls 4 zytologische Diagnoseeinheiten für Bürstenabstrichpräparate gewählt (negativ, atypisch, verdächtig und positiv). Wie in der vorliegenden Studie wurden auch hier drei statistische Auswertungsvarianten gewählt. Im ersten Fall führten nur positive zytologische Ergebnisse zu einer positiven Diagnose mit einer Sensitivität von 15 % und einer Spezifität von 100 %. Bei der zweiten Variante wurden auch zytologisch verdächtige Präparate als positive Diagnose gewertet (Sensitivität 38 %, Spezifität 98 %), bei der dritten Variante zusätzlich die zytologisch atypischen Präparate (Sensitivität 48 %, Spezifität 91 %).

Bei der prospektiven, nicht randomisierten Studie von Gupta u. a. aus dem Jahr 2013 wurden 22 Patienten mit einem Verschlussikterus mit Bürstenzytologie der Gallengänge untersucht. Zudem wurde bei 34 Patienten Gallenflüssigkeit gewonnen und untersucht. Es wurden 4 Diagnosekategorien gewählt und für die statistische Berechnung in die 2 Hauptkategorien „tumorzell-positiv“ (maligne) und „tumorzell-negativ“ (benigne, reaktiv und atypisch) eingeteilt. Die Spezifität lag hier bei 100 %, die Sensitivität bei 42,9 %. Es findet sich jedoch keine klare Abgrenzung zwischen Bürstenzytologien und Gallenaspiraten.

In der vorliegenden Arbeit wurde Variante 1 der Auswertung und damit eine besonders sensitive Einstellung gewählt. Die Zytologie fungiert hier als Suchtest. Diese Variante

geht zu Lasten der Spezifität, da auch unklare zytologische Befunde (Diagnose: zweifelhaft oder dringend verdächtig) aus statistischen Gründen als positiv gewertet werden. Im Vergleich mit den genannten Studien zeigt sich eine auffallend hohe Sensitivität und Spezifität. Mögliche Gründe sind hohe Erfahrungen der Endoskopiker sowie der Zytopathologen, sowie optimale Fixationen.

Eine unklare Zytologie sollte jedoch grundsätzlich den Anlass zu einer weiteren Diagnostik geben. In diesem Fall wird zur Bestätigung und definitiven diagnostischen Abklärung dann eine adjuvante FISH angeschlossen. Die FISH als Suchtest würde einen hohen Zeit- und Kostenaufwand bedeuten und ist somit nicht praktikabel. Zudem konnte FISH in einem Fall eine zytologisch richtig-positive Diagnose nicht bestätigen.

Im Fall einer positiven Zytologie bzw. positiven Diagnose nach adjuvanter FISH kann auch bei Patienten, bei denen aufgrund eines fortgeschrittenen Tumorstadiums keine weitere, zum Teil invasive Diagnostik mehr forciert werden soll, eine adäquate, diagnosegerichtete Therapie erfolgen.

#### 4.4.2 FISH

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über internationale Studien, die sich mit der FISH an Gallengangs- und Pankreasgangsabstrichen im Vergleich zur zytopathologischen Lichtmikroskopie beschäftigt haben:

Studie	Zytologie	FISH	Fallzahl	Sensitivität der FISH	Spezifität der FISH
(Kipp u. a. 2004)	+	+	131	35 %	91 %
(Moreno Luna u. a. 2006)	+	+	233	59 %	92 %
(Barr Fritcher u. a. 2007)	+	+	284	44 %	98 %
(Levy u. a. 2008)	+	+	86	62 %	79 %
(Charatcharoenwitthaya u. a. 2008)	+	+	230	86 %	83 %
(Fritcher u. a. 2009)	+	+	498	43 %	99,6 %
(Bangarulingam u. a. 2010)	+	+	235	46 %	88 %
(Kipp u. a. 2010)	+	+	130	50 %	100 %
(Boldorini u. a. 2011)	+	+	64	77 %	81 %
(Smoczynski u. a. 2012)	+	+	64	66 %	87 %
(Gonda u. a. 2012)	+	+	76	84 %	97 %
Minimalwert			64	35 %	79 %
Maximalwert			498	86 %	100 %
Mittelwert			185	59,27 %	90,51 %
Vorliegende Studie	+	+	131	76 %	100 %

Tabelle 38: Übersicht über die internationale Literatur zu FISH (UroVysion) an Gallengangs- und Pankreasgangsabstrichen

Alle erwähnten Studien verwendeten das UroVysion Kit, welches zur Diagnostik von Urothelkarzinomen im Urin entwickelt wurde (HALLING u. a. 2000).

Die durchschnittliche Spezifität der FISH lag in den Studien bei 90,51 %. Unsere Studie liegt im Vergleich um 9,49 Prozentpunkte höher. Alle aufgeführten Studien vergleichen die Zytologie mit der FISH am gleichen Material. In unserer Studie wurden zytologisch verdächtige Bereiche ausgewählt, markiert und dann fluoreszenz-in-situ-hybridisiert. In den internationalen Studien wird oft nicht klar geäußert, ob Zytologie und FISH am selben Material durchgeführt wurde oder ob aliquotiert wurde. Ein Vergleich mit dieser Studie ist jedoch möglich, da in den Studien sichergestellt war, dass die Proben vom gleichen Entnahmeort stammten.

Die Studie von Kipp und Mitarbeitern (Kipp u. a. 2010) konnte eine maximale Spezifität von 100 % erbringen bei jedoch niedriger Sensitivität von nur 50 %.

Bei der Studie von Charatcharoenwitthaya und Mitarbeitern (Charatcharoenwitthaya u. a. 2008) zeigte sich die im Vergleich höchste Sensitivität von 86 % bei einer Spezifität von 83 %. Diese vorliegende Arbeit maß im Vergleich dazu eine Sensitivität von 76 % bei weit höherer Spezifität (100 %).

In der ältesten Studie der Mayo Kliniken (Rochester, Minnesota, USA) von 2004 wurde ein Präparat als positiv gewertet, wenn  $\geq 5$  Zellen bei mindestens 2 Chromosomen Amplifikationen ( $n > 2$ ) aufwiesen. 9p21-Homodeletionen, die bei der Urinzytologie gemessen werden, wurden diagnostisch nicht mit einbezogen. Damit erreichte die Studie eine Sensitivität von 34 % und eine Spezifität von 98 % (Kipp u. a. 2004).

In späteren Vergleichsstudien wurde zur Steigerung der unbefriedigenden Sensitivität neben den in dieser Studie verwendeten Malignitätskriterien (siehe Kapitel 2.2.6.3) ein weiteres Auswertungsmerkmal herangezogen (Moreno Luna u. a. 2006), (Levy u. a. 2008), (Charatcharoenwitthaya u. a. 2008), (Fritcher u. a. 2009), (Boldorini u. a. 2011). So galten Zellen ebenfalls als aneuploid, wenn Chromosom 3 oder 7 drei oder mehr Chromosomenkopien aufwiesen, die übrigen drei Sonden jedoch unauffällig waren ( $\leq 2$  Chromosomenkopien). Ein Präparat konnte als aneuploid bewertet werden, wenn mehr als 9 Zellen eine Trisomie aufwiesen oder  $\geq 5$  Zellen nach den Kriterien dieser Studie aneuploid waren. Homodeletionen von 9p21, die bei der Urinzytologie per UroVysion Kit gemessen werden, wurden als Auswertungskriterium für Malignität ausgeschlossen. Falsch positive Befunde entstanden hauptsächlich bei trisomen Präparaten (Moreno Luna u. a. 2006), (Levy u. a. 2008), (Charatcharoenwitthaya u. a. 2008), (Fritcher u. a. 2009), (Boldorini u. a. 2011). Auch in unserer Studie ergab sich nach Errechnung des optimalen Youden-Index wie in den oben beschriebenen Studien ein Cut-off von  $\geq 5$  aneuploiden Zellen zur Bemessung eines Präparats als „tumorzell-positiv“, allerdings bezogen wir die Trisomie des Chromosoms 3 und 7 nicht als Malignitätskriterium ein.

#### 4.4.3 Varianten

In neueren Studien der Mayo Kliniken aus den Jahren 2007 und 2010 wurden die Malignitätskriterien variiert, indem eine Trisomie des Chromosoms 3 nicht mehr hinzugezählt wurde (Barr Fritcher u. a. 2007; Kipp u. a. 2010). Nicht nur Trisomie 3, sondern auch der Einschluss von Trisomie 7 zu den positiven Resultaten erhöhte stark die falsch positive Rate, da nur 54 bzw. 50 % der Trisomie 7-Patienten ein positives Follow up zeigten. Nach Zählung der Trisomie 7-Präparate als Test-negativ wies FISH eine 98 bzw. 100%ige Spezifität auf (Barr Fritcher u. a. 2007), (Kipp u. a. 2010). Auch bei Smoczynski u. a. (2012) waren 3 falsch-positive Präparate zu finden, die eine Trisomie 7 aufwiesen. Im Ausblick der Studie wird darauf hingewiesen, in Zukunft Trisomien nicht als alleiniges Malignitätskriterium zu werten.

Eine weitere Variante wurde in den Mayo Kliniken im Jahr 2010 veröffentlicht. Zusätzlich zu den im vorherigen Abschnitt genannte Malignitätskriterien wurden Präparate ebenfalls als maligne bewertet, wenn mehr als 9 Zellen tetrasom waren. Hier wurde jedoch nur bei 3 % der tetrasom getesteten Patienten im Follow up eine Neoplasie gefunden. Patienten mit Trisomie 3 oder 7 oder Tetrasomie zeigten ein ähnliches Outcome wie Patienten mit negativem FISH-Test. Es konnte bei weniger als 20 % der trisom getesteten Patienten nach einem Jahr Follow up ein CCC gefunden werden (Bangarulingam u. a. 2010).

Da alleinige Trisomien (Chromosom 3 oder 7) in bis zu 50 % falsch positive Testergebnisse liefern, wird in den Studien empfohlen, Patienten mit Trisomie 7 engmaschig auf die Entwicklung maligner Stenosen zu screenen (Levy u. a. 2008).

Trisomien wurden in einigen Studien sowohl in maligne entartetem als auch in nicht-neoplastischem Gewebe gefunden (Bardi u. a. 1992), (Elfvig u. a. 1990), (Broberg u. a. 2001), (Hes u. a. 2008). Bei Broberg u.a. (2001) wird die These geäußert, dass die Entstehung von Trisomien eher als Alterungsprozess gesehen werden sollte und nicht von der Dignität des Gewebes abhängig ist. Aufgrund der publizierten ungünstigen Ergebnisse für Trisomien einzelner Chromosomen als Malignitätskriterium, wurde dies in der vorliegenden Studie nicht gesondert untersucht.

Wohl aber wurde ein bereits in der weiteren Abklärung unklarer Befunde in der Lungenzytologie zur Anwendung gebrachter Auswertungsalgorithmus verfolgt, welcher euploide Polyploidisierung berücksichtigt (Schramm et al. 2011). Euploide Polyploidisierung bezeichnet dabei ganzzahlige Vielfache eines Chromosomensatzes,  $2^n$ .

Euploide Polyploidisierung wurde in mannigfaltigen Geweben untersucht. Im Rahmen der Zelldifferenzierung (z.B. bei Hepatozyten (Biesterfeld u. a. 1994)), bei Entzündungen oder als obligater Zustand bei Megakaryozyten (Zimmet & Ravid 2000) kann ein euploid-polyploider Chromosomensatz gefunden werden (Brodsky & Uryvaeva 1977). Bevor eine

physiologische Zellteilung erfolgen kann, kommt es in der G2-Phase des Zellzyklus zu einer Verdopplung des DNA-Gehalts und somit zu einer vorübergehenden Tetrasomie (Löffler & Petrides 2002, S.210).

Euploid-polyploide Zellen als aneuploid zu werten, würde demnach zu einer hohen Rate an falsch positiven Ergebnissen und somit zu einer Verminderung der Sensitivität führen. Mit diesem Hintergrund und angelehnt an aktuelle, ähnlich geartete Studien (Schramm u. a. 2011) wurde Polyploidie im vorgenannten Sinne als physiologische Variante betrachtet und nicht als Aneuploidie gewertet. Die Spezifität der FISH war in der vorliegenden Studie mit 100 % ideal. Dies bestätigte die Annahme polyploide Zellen als euploid zu werten, sodass dieser Auswertungsalgorithmus mittlerweile Anwendung in der zytopathologischen Routinediagnostik findet. Aus den genannten Gründen halten wir die Einführung von Tetrasomie als Malignitätskriterium, wie sie von Bangarulingam et al. 2010 eingeführt wurde, für problematisch. Die Spezifität der FISH in jener Studie erreichte trotz Einführung eines Cutoffs von >9 tetrasomen Zellen als Malignitätskriterium lediglich 88%.

Gonda u.a. untersuchten in ihrer 2012 veröffentlichten Studie den Einfluss von Deletionen von 9p21 als Malignitätskriterium in Kombination mit Polysomien der Chromosomen 3, 7 und 17. Die Sensitivität war mit 84 % hoch gegenüber 47 % bei alleiniger Wertung einer Polysomie. Die Spezifität war in beiden Fällen gleich hoch bei 97 %. Trisomien wurden hier nicht als Malignitätskriterien gewertet, Auch in der vorliegenden Studie wurden 9p21-Deletionen untersucht. Sie spielten jedoch keine Rolle bei der Auswertung eines Präparates. 9p21-Deletionen als Malignitätskriterium zu werten, hätte in keinem Fall die Dignitätseinschätzung verändert. Sie lagen hauptsächlich bei Zellen vor, die einen numerischen Zugewinn bei mindestens zwei der anderen untersuchten Chromosomen zeigten und demnach ohnehin als maligne gewertet wurden. In den internationalen Studien weist der deutliche Zugewinn an Sensitivität ohne eine Zunahme falsch-positiver Ergebnisse allerdings darauf hin, dass 9p21-Deletionen als Malignitätskriterium zu werten sind (Salek u. a. 2007), (DeHaan u. a. 2007).

Alle genannten Studien haben das UroVysion Kit verwendet, da es, wie bereits beschrieben, bekannte Chromosomenaberrationen bei Gallengangs- und Pankreaskarzinomen abbildet. Es fanden sich keine Studien, die andere Sondenkombinationen einsetzten. Es bleibt abzuwarten, ob in zukünftigen Studien die Maßzahlen der Treffsicherheit der FISH durch andere Sondenmixe noch optimiert werden können.

#### **4.5 Limitationen der Studie**

Nur in 119 von 219 Fällen war es im Follow up möglich die Diagnose durch ein Operationspräparat oder eine Biopsie zu sichern. Dieses Problem lag auch bei vielen der im vorigen Abschnitt genannten Studien vor, so dass die alleinige histopathologische Diagnose an der Biopsie oder am OP-Präparat für diesen Typ von Studien nicht den Gold- oder Referenzstandard darstellen konnte. In diesen Fällen der vorliegenden Arbeit war die klinische Entscheidung getroffen worden, eine weitere Diagnostik bei vorliegender DHC-Stenose nicht zu forcieren. Der *Certainty-Factor* (= C-Faktor: internationale Klassifikation für die Zuverlässigkeit einer Befundsicherung (Sellers 1984)) lag dann bei 3 von maximal 5 (histopathologisches Autopsieergebnis) und begrenzte so die diagnostische Sicherheit.

Bei diesen Patienten waren jedoch Zytologien gewonnen worden. Wenn nun eine zytologische Diagnose ein eigenständiges Kriterium des Referenzstandards darstellen würde, wäre der Referenzstandard zur Ermittlung der Güte der Routinezytologie nicht mehr unabhängig. Um diese Problematik zu entschärfen, wurde die zytologische Diagnose nur in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf sowie von der therapeutischen Reaktion (z.B. Einleitung einer Chemotherapie oder Einleitung palliativer Maßnahmen) zur Beurteilung des Referenzstandards herangezogen.

Zu einer Optimierung des Studiendesigns würden somit ein möglichst hoher C-Faktor sowie eine komplette Unabhängigkeit des Referenzstandards beitragen.

Eine histologische Biopsiegewinnung oder gar eine Operation in jedem Fall ist allein schon aus ethischen Gründen bei den oft in fortgeschrittenen Tumorstadien befindlichen Patienten nicht möglich. Eine Obduktion dieser Patienten (C-Faktor 5) zu Studienzwecken wäre wünschenswert, ist aber aufgrund sinkender Frequenzen und einer sinkenden Akzeptanz der Obduktion unrealistisch.

Eine weitere Problematik zeigte sich in der Beurteilung des *Samplings*. Der Ort der Bürstenzytologie wurde oft ungenau mit „Gallengangsabstrich“ angegeben. Es wurden keine Angaben zum exakten Abnahmeort gemacht. Es bleibt somit unklar, wieviele Abstriche nicht im tumorverdächtigen Bereich abgenommen wurden. Dies könnte eine Erklärung für die relevante Anzahl falsch-negativer Befunde sein, die auch nach erneuter Durchsicht durch erfahrene Zytopathologen nicht revidiert werden konnten.

Die Auswertung der hybridisierten Präparate wurde durch einen Untersucher vorgenommen. Im Vorfeld wurde die FISH-Methodik als gut reproduzierbare Methode mit geringer Interobserver-Variabilität dargestellt. Daten finden sich hier zu pulmonaler Zytologie, bei der die Präparate durch mehrere Untersucher ausgewertet wurden (Schramm u. a. 2011). Einschätzungen zur Interobserver-Variabilität können in dieser Studie demnach nicht gegeben werden.

#### **4.6 Schlussfolgerung**

Ziel dieser Studie war es die Treffsicherheit der Routinezytologie der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Gallengangsabstrichen gegenüberzustellen.

Es wurde gezeigt, dass sich kein Zugewinn an Information bei adjuvanten Einsatz der FISH bei negativen und positiven Zytologien erbringen ließ.

Die lichtmikroskopische Zytologie und die FISH erreichten eine Sensitivität von 89,33 % vs 76 % und eine Spezifität von 83,93 % vs 100 %. Wurde die FISH als adjuvante Methode nach unklarer Zytologie eingesetzt, lag die Sensitivität bei 82,86 % und die Spezifität bei 100 %. Falsch negative Befunde waren überwiegend durch ein *Sampling Error* bedingt. Bei den sicher positiven Zytologien war die Spezifität 100 %, sodass ein Einsatz der FISH hier nicht sinnvoll ist.

Mit hoher Gesamttreffsicherheit für zweifelhafte und dringend verdächtige Präparate erhöht die FISH die Anzahl sicherer Diagnosen, was zu einer für den klinisch tätigen Arzt und den Patienten sicheren Planungsgrundlage für das weitere therapeutische Vorgehen führt. Insbesondere dieser Aspekt wird in den vorangehend beschriebenen statistischen Auswertungen nicht berücksichtigt, ist aber jenseits der Maßzahlen der diagnostischen Treffsicherheit ein wichtiges Studienergebnis. Die für eine statistische Auswertung notwendige Dichotomisierung bildet das im klinischen Alltag große Problem der diagnostisch unklaren Zytologie nicht ab, sondern suggeriert sogar diagnostische Sicherheit durch klare Einteilung in positive und negative Befunde. Eine alleinige Betrachtung der statistischen Maßzahlen genügt daher nicht.

Zweifelhafte Diagnosen entstehen oft bei nicht optimal gewonnenen und fixierten Präparaten. Hier kann die FISH sinnvoll adjuvant eingesetzt werden, jedoch muss in einigen Fällen ein erneuter Abstrich empfohlen werden. Insbesondere bei dringend verdächtiger Zytologie bietet sich die FISH jedoch als Bestätigungstest an.

#### **Studienhighlights:**

- A. FISH eignet sich am besten als adjuvante Methode bei unklarer Routinezytologie.
- B. Der Cut-off für die Einordnung als „Test-positiv“ und damit als maligne sollte bei  $\geq 5$  Zellen liegen.
- C. Euploide Polyploidisierung (z.B. Tetrasomie) kommt bei benignen Läsionen vor und ist kein Malignitätskriterium.

## 5 Literatur

- Abou-Rebyeh, H. u. a., 2002. DNA analysis of cholangiocarcinoma cells: prognostic and clinical importance. *Cancer Detection and Prevention*, 26(4), S.313–319.
- Ahrendt, S.A. u. a., 2000. p53 overexpression and K-ras gene mutations in primary sclerosing cholangitis-associated biliary tract cancer. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 7(4), S.426–431.
- Ahrens, W. u. a., 2007. Risk factors for extrahepatic biliary tract carcinoma in men: medical conditions and lifestyle: results from a European multicentre case-control study. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 19(8), S.623–630.
- Aishima, S. u. a., 2004. Aberrant expression of laminin gamma 2 chain and its prognostic significance in intrahepatic cholangiocarcinoma according to growth morphology. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 17(8), S.938–945.
- Aljiffry, M., Walsh, M.J. & Molinari, M., 2009. Advances in diagnosis, treatment and palliation of cholangiocarcinoma: 1990-2009. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 15(34), S.4240–4262.
- Almoguera, C. u. a., 1988. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53(4), S.549–554.
- American Cancer Society, 2014. Pancreatic cancer survival by stage. Available at: <http://www.cancer.org/cancer/pancreaticcancer/detailedguide/pancreatic-cancer-survival-rates> [Zugegriffen Juli 15, 2014].
- Anderson, C.D. u. a., 2004. Diagnosis and Treatment of Cholangiocarcinoma. *The Oncologist*, 9(1), S.43 –57.
- Athanassiadou, P. & Grapsa, D., 2008. Value of endoscopic retrograde cholangiopancreatography-guided brushings in preoperative assessment of pancreaticobiliary strictures: what's new? *Acta Cytologica*, 52(1), S.24–34.
- Ayala, D. & Blackstock, A.W., 2008. Effective treatment strategies for cholangiocarcinoma: the challenge remains. *Gastrointestinal Cancer Research: GCR*, 2(5), S.251–252.
- Bahra, M., Langrehr, J. & Neuhaus, P., 2006. Extrahepatische distale Gallenwegskarzinome. *Der Chirurg*, 77(4), S.335–340.
- Bangarulingam, S.Y. u. a., 2010. Long-term outcomes of positive fluorescence in situ hybridization tests in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(1), S.174–180.

- Bardales, R.H. u. a., 1998. Diagnostic value of brush cytology in the diagnosis of duodenal, biliary, and ampullary neoplasms. *American Journal of Clinical Pathology*, 109(5), S.540–548.
- Bardi, G. u. a., 1992. Trisomy 7 in nonneoplastic focal steatosis of the liver. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 63(1), S.22–24.
- Baron, T.H. u. a., 2004. A prospective comparison of digital image analysis and routine cytology for the identification of malignancy in biliary tract strictures. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 2(3), S.214–219.
- Barr Fritcher, E.G. u. a., 2007. Correlating routine cytology, quantitative nuclear morphometry by digital image analysis, and genetic alterations by fluorescence in situ hybridization to assess the sensitivity of cytology for detecting pancreatobiliary tract malignancy. *American Journal of Clinical Pathology*, 128(2), S.272–279.
- Biesterfeld u. a., 1994. Polyploidy in non-neoplastic tissues. *Journal of Clinical Pathology*, 47(1), S.38–42.
- Biesterfeld, S. & Deacu, L., 2009. DNA image cytometry in the differential diagnosis of benign and malignant lesions of the bile duct, the pancreatic duct and the papilla of Vater. *Anticancer Research*, 29(5), S.1579–1584.
- Böcker, W., Denk, H. & Heitz, P.U., 2004. *Pathologie 3. A.*, Urban & Fischer Bei Elsevier.
- Böcking u. a., 1985. Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA cytophotometry. *Cancer*, 56(7), S.1600–1604.
- Böcking, 1990. DNA cytometry and automation in clinical diagnostics. *Verhandlungen Der Deutschen Gesellschaft Für Pathologie*, 74, S.176–185.
- Böcking, 1998. Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Der Pathologe*, 19(3), S.235–236.
- Böcking & Motherby, 1999. Abklärung zervikaler Dysplasien mittels DNA-Bild-Zytometrie. *Der Pathologe*, 20(1), S.25–33.
- Boldorini, R. u. a., 2011. Fluorescence in situ hybridisation in the cytological diagnosis of pancreatobiliary tumours. *Pathology*.
- Bosman, F.T., Carneiro, F. & Hruban, R.H., 2010. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 2010 0004 Aufl.*, World Health Orgn.
- Briggs, C.D. u. a., 2009. Prognostic molecular markers in cholangiocarcinoma: a systematic review. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 45(1), S.33–47.
- Broberg, K. u. a., 2001. Trisomy 7 accumulates with age in solid tumors and non-neoplastic synovia. *Genes Chromosomes and Cancer*, 30(3), S.310–315.
- Brodsky, W.Y. & Uryvaeva, I.V., 1977. Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. *International review of cytology*, 50, S.275–332.

- Brunt, E.M. & Kraemer, B.B., 1996. DNA image analysis study of lesions of the gallbladder and biliary system. *Liver Transplantation and Surgery: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 2(4), S.284–289.
- Buchler, M.W., Uhl, W. & Malfertheiner, P., 2003. *Pankreaserkrankungen*, S Karger Pub.
- Burris, H.A. u. a., 1997. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 15(6), S.2403–2413.
- Cereda, S. u. a., 2010. The cisplatin, epirubicin, 5-fluorouracil, gemcitabine (PEFG) regimen in advanced biliary tract adenocarcinoma. *Cancer*.
- Charatchoenwitthaya, P. u. a., 2008. Utility of serum tumor markers, imaging, and biliary cytology for detecting cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*, 48(4), S.1106–1117.
- Chari, S. u. a., 1994. Risk of pancreatic carcinoma in tropical calcifying Pancreatitis: An Epidemiology Study. *Pancreas*, 9(1), S.62–6.
- DeHaan, R.D. u. a., 2007. An assessment of chromosomal alterations detected by fluorescence in situ hybridization and p16 expression in sporadic and primary sclerosing cholangitis-associated cholangiocarcinomas. *Human Pathology*, 38(3), S.491–499.
- DeOliveira, M.L. u. a., 2007. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Annals of Surgery*, 245(5), S.755–762.
- Diehl, M.C.V. & Kochsiek, K., 2004. *Innere Medizin 5.*, völlig überarb. A., Urban & Fischer Bei Elsevier.
- Duesberg, P., 2007. Chromosomal chaos and cancer. *Scientific American*, 296(5), S.52–59.
- Elek, G. u. a., 2005. Early diagnosis of pancreatobiliary duct malignancies by brush cytology and biopsy. *Pathology oncology research: POR*, 11(3), S.145–155.
- Elfving, P. u. a., 1990. Trisomy 7, trisomy 10, and loss of the Y chromosome in short-term cultures of normal kidney tissue. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 53(2-3), S.123–125.
- El-Serag, H.B. u. a., 2009. Risk of hepatobiliary and pancreatic cancers after hepatitis C virus infection: A population-based study of U.S. veterans. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(1), S.116–123.
- Farrell, R.J. u. a., 2001. The combination of stricture dilation, endoscopic needle aspiration, and biliary brushings significantly improves diagnostic yield from malignant bile duct strictures. *Gastrointestinal Endoscopy*, 54(5), S.587–594.

- Fritcher, E.G.B. u. a., 2009. A multivariable model using advanced cytologic methods for the evaluation of indeterminate pancreatobiliary strictures. *Gastroenterology*, 136(7), S.2180–2186.
- Gall, J.G. & Pardue, M.L., 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 63(2), S.378–383.
- Gatto, M. u. a., 2010. Cholangiocarcinoma: Update and future perspectives. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 42(4), S.253–260.
- Ghaneh, P., Costello, E. & Neoptolemos, J.P., 2008. Biology and management of pancreatic cancer. *Postgraduate Medical Journal*, 84(995), S.478–497.
- Glimelius, B. u. a., 1996. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 7(6), S.593–600.
- Gonda, T.A. u. a., 2012. Polysomy and p16 deletion by fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of indeterminate biliary strictures. *Gastrointestinal Endoscopy*, 75(1), S.74–79.
- Govil, H. u. a., 2002. Brush cytology of the biliary tract: Retrospective study of 278 cases with histopathologic correlation. *Diagnostic Cytopathology*, 26(5), S.273–277.
- Guglielmi, A. u. a., 2010. Does intrahepatic cholangiocarcinoma have better prognosis compared to perihilar cholangiocarcinoma? *Journal of Surgical Oncology*, 101(2), S.111–115.
- Gupta, M. u. a., 2013. Role of biliary tract cytology in the evaluation of extrahepatic cholestatic jaundice. *Journal of Cytology / Indian Academy of Cytologists*, 30(3), S.162–168.
- Gupta, S. u. a., 2010. Risk of pancreatic cancer by alcohol dose, duration, and pattern of consumption, including binge drinking: a population-based study. *Cancer Causes and Control*.
- Gwak, H.K. u. a., 2009. Extrahepatic Bile Duct Cancers: Surgery Alone Versus Surgery plus Postoperative Radiation Therapy. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics\*Physics*, In Press, Corrected Proof.
- HALLING, K.C. u. a., 2000. A COMPARISON OF CYTOLOGY AND FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION FOR THE DETECTION OF UROTHELIAL CARCINOMA. *The Journal of Urology*, 164(5), S.1768–1775.
- Harada, T. u. a., 2002. Interglandular cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization in pancreatic cancer. *Cancer Research*, 62(3), S.835–839.

- Haycox, A. u. a., 1998. Review article: current treatment and optimal patient management in pancreatic cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 12(10), S.949–964.
- Hekimoglu, K. u. a., 2008. MRCP vs. ERCP in the evaluation of biliary pathologies: review of current literature. *Journal of Digestive Diseases*, 9(3), S.162–169.
- Henne-Bruns, D., Dürig, M. & Kremer, B., 2007. *Chirurgie 3.*, vollständig überarbeitete Auflage., Thieme, Stuttgart.
- Henson, D.E., Albores-Saavedra, J. & Corle, D., 1992. Carcinoma of the extrahepatic bile ducts. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer*, 70(6), S.1498–1501.
- Hes, O. u. a., 2008. End-stage kidney disease: gains of chromosomes 7 and 17 and loss of Y chromosome in non-neoplastic tissue. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 453(4), S.313–319.
- Hong, K. & Geschwind, J.-F.H., 2010. Locoregional Intra-arterial Therapies for Unresectable Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Seminars in Oncology*, 37(2), S.110–117.
- Howlader, 2011. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008*, SEER web site: National Cancer Institute.
- Iachino, C., Catsicjannis, N. & Dallera, F., 1998. Prognostic significance of tumor DNA content in carcinoma of the hepatic duct confluence. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 17(4), S.425–430.
- Jailwala, J. u. a., 2000. Triple-tissue sampling at ERCP in malignant biliary obstruction. *Gastrointestinal Endoscopy*, 51(4), S.383–390.
- Jemal, A. u. a., 2009. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 59(4), S.225–249.
- Kelly, D.M. & Benjamin, I.S., 1995. Pancreatic carcinoma. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 6(1), S.19–28.
- Khan, S.A. u. a., 2002. Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *Journal of Hepatology*, 37(6), S.806–813.
- Khan, S.A., Toledano, M.B. & Taylor-Robinson, S.D., 2008. Epidemiology, risk factors, and pathogenesis of cholangiocarcinoma. *HPB: The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 10(2), S.77–82.
- Kipp, B.R. u. a., 2004. A comparison of routine cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of malignant bile duct strictures. *The American Journal of Gastroenterology*, 99(9), S.1675–1681.
- Kipp, B.R. u. a., 2010. Comparison of KRAS Mutation Analysis and FISH for Detecting Pancreatobiliary Tract Cancer in Cytology Specimens Collected During Endoscopic

- Retrograde Cholangiopancreatography. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(6), S.780–786.
- Kolligs, F.T. u. a., 2008. Interdisciplinary diagnosis of and therapy for cholangiocarcinoma. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 46(1), S.58–68.
- Korc u. a., 1992. Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(4), S.1352–1360.
- Krishan, A. & Dandekar, P.D., 2005. DAPI fluorescence in nuclei isolated from tumors. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 53(8), S.1033–1036.
- Kuntz, E. & Kuntz, H.-D., 2008. *Hepatology: Textbook and Atlas* 3rd ed., Springer.
- Kurzwawinski, T.R. u. a., 1993. A prospective study of biliary cytology in 100 patients with bile duct strictures. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 18(6), S.1399–1403.
- Laméris, J.S. u. a., 1990. Ultrasound-guided percutaneous transhepatic cholangiography and drainage in patients with hilar cholangiocarcinoma. *Seminars in Liver Disease*, 10(2), S.121–125.
- Langer, P.R., Waldrop, A.A. & Ward, D.C., 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(11), S.6633–6637.
- Layfield, L.J. & Jarboe, E.A., 2010. Cytopathology of the pancreas: neoplastic and nonneoplastic entities. *Annals of Diagnostic Pathology*, 14(2), S.140–151.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B., 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), S.643–649.
- Levsky, J.M. & Singer, R.H., 2003. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 14), S.2833–2838.
- Levy, M.J. u. a., 2004. Palliation of malignant extrahepatic biliary obstruction with plastic versus expandable metal stents: An evidence-based approach. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 2(4), S.273–285.
- Levy, M.J. u. a., 2008. Prospective evaluation of advanced molecular markers and imaging techniques in patients with indeterminate bile duct strictures. *The American Journal of Gastroenterology*, 103(5), S.1263–1273.
- Li, L. u. a., 2009. Cancer-causing karyotypes: chromosomal equilibria between destabilizing aneuploidy and stabilizing selection for oncogenic function. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 188(1), S.1–25.

- Lindberg, B. u. a., 2006. Diagnostic and prognostic implications of DNA ploidy and S-phase evaluation in the assessment of malignancy in biliary strictures. *Endoscopy*, 38(6), S.561–565.
- Löffler, G. & Petrides, P.E., 2002. *Biochemie und Pathobiochemie* Auflage: 7., völlig neu bearb. Aufl., Berlin u.a.: Springer.
- Lynch u. a., 2004. Familial pancreatic carcinoma in Jews. *Familial Cancer*, 3(3-4), S.233–240.
- Maitra, A. u. a., 2005. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 12(2), S.81–91.
- Maraki, D., Becker, J. & Boecking, A., 2004. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 33(7), S.398–404.
- Michaud u. a., 2001. Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 286(8), S.921–929.
- Mieli-Vergani, G. & Vergani, D., 2009. Biliary atresia. *Seminars in Immunopathology*, 31(3), S.371–381.
- Moreno Luna, L.E. u. a., 2006. Advanced cytologic techniques for the detection of malignant pancreatobiliary strictures. *Gastroenterology*, 131(4), S.1064–1072.
- Motherby, H., Marcy, T., u. a., 1998. Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology: I. DNA aneuploidy for identification and differentiation of primary and secondary tumors of the serous membranes. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology*, 20(3), S.153–161.
- Motherby, H., Nadjari, B., u. a., 1998. Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology: II. DNA aneuploidy for identification of neoplastic cells in equivocal effusions. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology*, 20(3), S.162–168.
- Niedergethmann, M. u. a., 2002. Prognostic implications of routine, immunohistochemical, and molecular staging in resectable pancreatic adenocarcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 26(12), S.1578–1587.
- Nishimura, T., 2008. Total number of genome alterations in sporadic gastrointestinal cancer inferred from pooled analyses in the literature. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 29(6), S.343–350.

- Novis, M. u. a., 2010. [Prospective comparative study of ERCP brush cytology and EUS-FNA for the differential diagnosis of biliary strictures]. *Revista Do Colégio Brasileiro De Cirurgiões*, 37(3), S.190–198.
- Oda, T. u. a., 1997. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nature Genetics*, 16(3), S.235–242.
- Osnes, M., Serck-Hanssen, A. & Myren, J., 1975. Endoscopic retrograde brush cytology (ERBC) of the biliary and pancreatic ducts. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 10(8), S.829–831.
- Otto, S.P. & Whitton, J., 2000. Polyploid Incidence and Evolution. *Annual Review of Genetics*, 34(1), S.401–437.
- Petzold, V., Rösch, T. & Born, P., 2001. [Combined endoscopic and percutaneous transhepatic approach in postsurgical common bile duct occlusion]. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)*, 126(43), S.1197–1200.
- Philip, P.A. u. a., 2009. Consensus Report of the National Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting on Pancreas Cancer Treatment. *J Clin Oncol*, 27(33), S.5660–5669.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J.W., 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9), S.2934–2938.
- Pugliese, V. u. a., 1995. Endoscopic retrograde forceps biopsy and brush cytology of biliary strictures: a prospective study. *Gastrointestinal Endoscopy*, 42(6), S.520–526.
- Remmerbach u. a., 2003. Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases. *Analytical Cellular Pathology: The Journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology*, 25(4), S.159–166.
- Rexroth, G., 2005. *Gastroenterologie* 1. Aufl., Huber, Bern.
- Ried u. a., 1999. Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 25(3), S.195–204.
- Riess, H. u. a., 2009. *Pancreatic Cancer*, Springer Berlin Heidelberg.
- Rodriguez-Viciano, P. u. a., 2005. Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 70, S.461–467.
- Saccomanno u. a., 1963. Concentration of Carcinoma or Atypical Cells in Sputum. *Acta Cytologica*, 7, S.305–310.
- Salek, C. u. a., 2007. Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 13(27), S.3714–3720.

- Samsel, W. & Böcking, A., 2006. *Prognostische und therapeutische Bedeutung der DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom: Wissenschaftlicher Bericht über das Experten-Symposium an der Universität Bremen vom 12. Mai 2005* 1. Aufl., Asgard.
- Sawada, Y., Gonda, H. & Hayashida, Y., 1989. Combined use of brushing cytology and endoscopic retrograde pancreatography for the early detection of pancreatic cancer. *Acta Cytologica*, 33(6), S.870–874.
- Schnelldorfer, T. & Sarr, M.G., 2009. Alessandro Codivilla and the First Pancreatoduodenectomy. *Arch Surg*, 144(12), S.1179–1184.
- Schoefl, R. u. a., 1997. Forceps biopsy and brush cytology during endoscopic retrograde cholangiopancreatography for the diagnosis of biliary stenoses. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(4), S.363–368.
- Schramm, M. u. a., 2011. Equivocal cytology in lung cancer diagnosis: improvement of diagnostic accuracy using adjuvant multicolor FISH, DNA-image cytometry, and quantitative promoter hypermethylation analysis. *Cancer Cytopathology*, 119(3), S.177–192.
- Schulick, R.D., 2008. Primary sclerosing cholangitis: detection of cancer in strictures. *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 12(3), S.420–422.
- Sellers, A.H., 1984. International agreement on classification of malignant tumours. *Canadian Medical Association Journal*, 131(2), S.103–104.
- Selvaggi, S.M., 2004. Biliary brushing cytology. *Cytopathology: official journal of the British Society for Clinical Cytology*, 15(2), S.74–79.
- Sendler hrsg., 2006. *Tumorzentrum München - Manuale* 7. Auflage., Germany, Munich: W. Zuckschwerdt Verlag.
- Sendler & Tumorzentrum (Muenchen), 2006. *Gastrointestinale Tumoren* 7. Aufl., München [i.e. Germering u.a.]: Zuckschwerdt.
- Seufferlein, T. & Adler, G., 2009. Die S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. *Medizinische Klinik*, 104(11), S.869–874.
- Shaib, Y. & El-Serag, H.B., 2004. The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Seminars in Liver Disease*, 24(2), S.115–125.
- Singham, J., Yoshida, E.M. & Scudamore, C.H., 2009. Choledochal cysts: part 1 of 3: classification and pathogenesis. *Canadian Journal of Surgery. Journal Canadien De Chirurgie*, 52(5), S.434–440.
- Smoczynski, M. u. a., 2012. Routine brush cytology and fluorescence in situ hybridization for assessment of pancreatobiliary strictures. *Gastrointestinal Endoscopy*, 75(1), S.65–73.

- Stahl, M. u. a., 2006. Cholangiozelluläres Karzinom. *Kompendium Internistische Onkologie*.
- Stewart, C.J. u. a., 2001. Brush cytology in the assessment of pancreatobiliary strictures: a review of 406 cases. *Journal of Clinical Pathology*, 54(6), S.449–455.
- Stoos-Veić, T. u. a., 2010. Biliary brush cytology for the diagnosis of malignancy: a single center experience. *Collegium antropologicum*, 34(1), S.139–143.
- Tang, P.A., Tsao, M.-S. & Moore, M.J., 2006. A review of erlotinib and its clinical use. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 7(2), S.177–193.
- Torres, E.M., Williams, B.R. & Amon, A., 2008. Aneuploidy: cells losing their balance. *Genetics*, 179(2), S.737–746.
- Tsai, S. u. a., 2010. Management of Large Hepatocellular Carcinoma in Adult Patients with Alagille Syndrome: A Case Report and Review of Literature. *Digestive Diseases and Sciences*.
- Tsiambas u. a., 2006. Chromogenic in situ hybridization analysis of chromosomes 7, 9, and 17 in pancreatic ductal adenocarcinoma based on tissue microarrays. *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 11(2), S.205–211.
- Tsiambas, 2006. HER2/neu expression and gene alterations in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparative immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization study based on tissue microarrays and computerized image analysis. *JOP: Journal of the Pancreas*, 7(3), S.283–294.
- Uppender, M.B. u. a., 2004. Chromosome transfer induced aneuploidy results in complex dysregulation of the cellular transcriptome in immortalized and cancer cells. *Cancer Research*, 64(19), S.6941–6949.
- Vrieling, A. u. a., 2010. Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 126(10), S.2394–2403.
- Wang, C. u. a., 2001. Detailed deletion mapping on chromosome region 9p21 in human periampullary neoplasms. *Chinese Medical Journal*, 114(6), S.588–591.
- Wehrmann, T. u. a., 2003. [Clinical value of intraductal ultrasonography for clarification of confusing ERCP results]. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)*, 128(16), S.863–869.
- Whitcomb, 2004. Inflammation and Cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287(2), S.G315–319.
- Whitcomb & Greer, J., 2009. Germ-line mutations, pancreatic inflammation, and pancreatic cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical*

*Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 7(11 Suppl), S.S29–34.

Williams, B.R. u. a., 2008. Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5902), S.703–709.

Wittekind, C. & Meyer, H.-J., 2010. *TNM: Klassifikation maligner Tumoren 7. Auflage.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Yonem, O. & Bayraktar, Y., 2007. Clinical characteristics of Caroli's disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 13(13), S.1930–1933.

Zerbi, A. u. a., 1995. Comparison between pylorus-preserving and Whipple pancreatoduodenectomy. *The British Journal of Surgery*, 82(7), S.975–979.

Zervos, E.E. u. a., 2005. Stage does not predict survival after resection of hilar cholangiocarcinomas promoting an aggressive operative approach. *American Journal of Surgery*, 190(5), S.810–815.

Zhu, A.X., Lauwers, G.Y. & Tanabe, K.K., 2004. Cholangiocarcinoma in association with Thorotrast exposure. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 11(6), S.430–433.

Zimmet, J. & Ravid, K., 2000. Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Experimental Hematology*, 28(1), S.3–16.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Pankreas- und Gallengangsystems im Röntgenbild .....	17
Abbildung 2: Altersverteilung des Patientenkollektivs .....	22
Abbildung 3: Geschlechterverteilung der Patienten .....	22
Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung nach Geschlecht und Alter .....	23
Abbildung 5: Altersverteilung der Karzinome .....	37
Abbildung 6a: durch Schleim (grün fluoreszierend) überlagerte Zellen zeigen nur schwache Sondensignale.....	42
Abbildung 6b: morphologisch verdächtige Zelle .....	42
Abbildung 6c+d: Clusterbildung (Pfeile).....	42
Abbildung 7a: diploide Zelle mit je 2 grünen, gelben, roten und blauen Sonden-Signalen .....	43
Abbildung 7b: aneuploide Zelle mit 6 grünen, 2 gelben, 4 roten, 2 blauen Signalen .....	43
Abbildung 8: Zell-Gesamtanzahl mit jeweils aneuploidem Chromosom .....	44
Abbildung 9: durchschnittliche Chromosomenanzahl pro Zelle.....	44
Abbildung 10: Zuordnung der zytologischen Kategorien zum jeweiligen Referenzstandard .....	45
Abbildung 11: Verteilung im Kollektiv II nach Anwendung auf den Referenzstandard ....	48
Abbildung 12: ROC-Kurve der Zytologie (Kollektiv II) .....	51
Abbildung 13: ROC-Kurven der FISH.....	57

## **7 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Bismuth-Stadien (Aljiffry u. a. 2009).....	7
Tabelle 2: Stadienabhängige 5-Jahres-Überlebensraten der ACS.....	11
Tabelle 3: Genloci (Beipackzettel: UroVysion Bladder Cancer Kit (Abbott Laboratories)) .....	31
Tabelle 4: Beispiele für die Auswertung der Sondensignale .....	32
Tabelle 5: Vierfeldertafel zur Berechnung der Maßzahlen diagnostischer Treffsicherheit .....	34
Tabelle 6: Übersicht über die Verteilung der Präparate auf die zytologischen Diagnoseeinheiten vor und nach Berücksichtigung der Ausschlusskriterien.....	36
Tabelle 7: Follow up der zytologisch tumorzellnegativen Präparate.....	38
Tabelle 8: Follow up der zytologisch zweifelhaften Präparate.....	39
Tabelle 9: Follow up der zytologisch dringend verdächtigen Präparate .....	39
Tabelle 10: Follow up der zytologisch tumorzellpositiven Präparate .....	40
Tabelle 11: Auswertungsvarianten der 4 zytologischen diagnostischen Kategorien .....	46
Tabelle 12: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 1 ....	46
Tabelle 13: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 2 ....	47
Tabelle 14: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 3 ....	47
Tabelle 15: Übersicht über die Treffsicherheiten der zytopathologischen Routine- befundung (Kollektiv I).....	48
Tabelle 16: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 1 ....	49
Tabelle 17: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 2 ....	49
Tabelle 18: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 3 ....	49
Tabelle 19: Übersicht über die Treffsicherheiten der zytopathologischen Routine- befundung (Kollektiv II).....	50
Tabelle 20: falsch positive Fälle nach Zytologie (Kollektiv II) .....	52
Tabelle 21: falsch negative Fälle nach Zytologie (Kollektiv II).....	53
Tabelle 22: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 1 ....	54
Tabelle 23: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 2 ....	54
Tabelle 24: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 3 ....	55
Tabelle 25: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 4 ....	55
Tabelle 26: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 5 ....	55
Tabelle 27: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 6 ....	55
Tabelle 28: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 7 ....	56
Tabelle 29: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 8 ....	56
Tabelle 30: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 9 ....	56

Tabelle 31: Vierfeldertafel der absoluten diagnostischen Häufigkeiten der Variante 10 ..	56
Tabelle 32: Treffsicherheit der FISH bei zweifelhafter Zytologie .....	58
Tabelle 33: Treffsicherheit der FISH bei dringend verdächtiger Zytologie .....	58
Tabelle 34: falsch negative Fälle nach FISH .....	61
Tabelle 35: Zytologie plus FISH als adjuvante Methode bei nicht positiver Zytologie .....	62
Tabelle 36: Methodenvergleich .....	63
Tabelle 37: Übersicht über die internationale Literatur zu Bürstenzytologien an Gallengangs- und Pankreasgangsabstrichen .....	68
Tabelle 38: Übersicht über die internationale Literatur zu FISH (UroVysion) an Gallengangs- und Pankreasgangsabstrichen .....	70
Tabelle Anhang 1: Auswertungsbogen der FISH.....	91
Tabelle Anhang 2: Follow up-Bogen Seite 1.....	92
Tabelle Anhang 3: Follow up-Bogen Seite 2.....	93

## **8 Danksagung**

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Böcking für die Übergabe des sehr interessanten Themas und die Betreuung bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Biesterfeld als Nachfolger von Herrn Prof. Dr. med. Böcking möchte ich dafür danken, dass er immer ein offenes Ohr hatte und bei Fragen Hilfestellung anbot.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. med. Pomjanski für die Initiierung der Promotionsidee und für die guten Ratschläge während der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Schramm, der sich intensiv in die Thematik mit einarbeitete, mir über viele Hürden hinweg half und mir beim Verfassen der Arbeit eine große Unterstützung zukommen ließ.

Ich danke auch den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Zytopathologischen Instituts, insbesondere Frau Marietta Kazimirek, die mir bei allen praktischen Aufgaben im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. med. Neuhaus, Chefarzt der medizinischen Klinik des Evangelischen Krankenhauses Düsseldorf, möchte ich meinen Dank aussprechen für die Erlaubnis des Zuganges zum Archiv des EVKs.

Zuletzt möchte ich Herrn Scheulen und Herrn Backfisch danken, die trotz Verlagerung des Archivs des EVKs unter hohem logistischem Aufwand die archivierten Akten zur Durchsicht bereit stellten.

## 9 Anhang

**UroVysion**

Case ID: \_\_\_\_\_ Name: \_\_\_\_\_

Birthday: \_\_\_\_\_ Male  Female  Material: \_\_\_\_\_

FISH n°: \_\_\_\_\_ Date (Day 1) of the run: \_\_\_\_\_ Vysis Kit 2J2720 Lot: \_\_\_\_\_

Count signals at least 25 morphologically abnormal cells											
Cells No.	2c	Chro mos. 7 (green)	9p21 (gold)	Chro mos. 3 (red)	Chro mos. 17 (aqua)	Cells No.	2c	Chro mos. 7 (green)	9p21 (gold)	Chro mos. 3 (red)	Chro mos. 17 (aqua)
1						40					
2						41					
3						42					
4						43					
5						44					
6						45					
7						46					
8						47					
9						48					
10						49					
11						50					
12						51					
13						52					
14						53					
15						54					
16						55					
17						56					
18						57					
19						58					
20						59					
21						60					
22						61					
23						62					
24						63					
25						64					
26						65					
27						66					
28						67					
29						68					
30						69					
31						70					
32						71					
33						72					
34						73					
35						74					
36						75					
37						76					
38						77					
39						78					

Results: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

N° Cells: \_\_\_\_\_ 2c: \_\_\_\_\_ Polyploidy %: \_\_\_\_\_ Aneuploidy %: \_\_\_\_\_

FISH →  POSITIV  NEGATIV

Date and signature: \_\_\_\_\_

Tabelle Anhang 1: Auswertungsbogen der FISH

## Qualitätskontrolle der Treffsicherheit von Bürstenabstrichen der Gallenwege

Institut für Cytopathologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Prof. Böcking

Patientendaten	Einsender
Name Vorname Geburtsdatum Geschlecht	

Untersuchtes zytologisches Material	
Eingangsnr.:	Eingangsdatum:
Bürstenabstrich: <u>Ductus choledochus</u> <input type="checkbox"/>	Pankreasgang <input type="checkbox"/>
<u>Ductus hepaticus communis</u> <input type="checkbox"/>	Gallengang (ungenau definiert) <input type="checkbox"/>
<u>Zytologische Diagnose:</u>	
Diagnost. Kategorie: negativ <input type="checkbox"/> zweifelhaft <input type="checkbox"/> unzureichend <input type="checkbox"/> dringender Verdacht <input type="checkbox"/> positiv <input type="checkbox"/>	
Enddiagnose: _____	
Adjuvante Methode: <u>DNA-Zytometrie</u> ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>	
Ergebnis: _____	

Klinisches Staging (s. Beiblatt)	
<u>Extrahepatische Gallenwege</u>	
pT <sub>x</sub> <input type="checkbox"/> pT <sub>0</sub> <input type="checkbox"/> pT <sub>is</sub> <input type="checkbox"/> pT <sub>1</sub> <input type="checkbox"/> pT <sub>2</sub> <input type="checkbox"/> pT <sub>3</sub> <input type="checkbox"/> pT <sub>4</sub> <input type="checkbox"/>	
pN <sub>x</sub> <input type="checkbox"/> pN <sub>0</sub> <input type="checkbox"/> pN <sub>1</sub> <input type="checkbox"/>	
pM <sub>x</sub> <input type="checkbox"/> pM <sub>0</sub> <input type="checkbox"/> pM <sub>1</sub> <input type="checkbox"/>	Lokalisation: _____
<u>Stadiengruppierung</u>	
0 <input type="checkbox"/> IA <input type="checkbox"/> IB <input type="checkbox"/> IIA <input type="checkbox"/> IIB <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>	
<u>Resektionsrand</u>	
R <sub>0</sub> <input type="checkbox"/> R <sub>1</sub> <input type="checkbox"/> R <sub>2</sub> <input type="checkbox"/>	
<u>Certainty-Factor</u>	
1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/>	

Follow up
Klin. Diagnose: _____ OP: _____
<u>Histolog.</u> Diagnose: _____
<u>Zytolog.</u> Diagnose: bestätigt durch: _____
Teilweise bestätigt durch: _____
Falsifiziert durch: _____
Nicht geklärt wegen: _____

Dignitätsdiagnose
Falsch negativ <input type="checkbox"/> falsch positiv <input type="checkbox"/> richtig negativ <input type="checkbox"/> richtig positiv <input type="checkbox"/>
<u>Dignitätsfehler</u> mit klinisch-therapeutischen Konsequenzen: real <input type="checkbox"/> fiktiv <input type="checkbox"/>

Tabelle Anhang 2: Follow up-Bogen Seite 1

<b>Typendifferenzierung</b>			
Richtig <input type="checkbox"/> falsch <input type="checkbox"/> teilweise richtig <input type="checkbox"/> nicht möglich <input type="checkbox"/>			
Klassifikationsfehler mit klinisch-therapeutischen Konsequenzen: real <input type="checkbox"/> fiktiv <input type="checkbox"/>			
Screening error <input type="checkbox"/> sampling error <input type="checkbox"/>			
<b>Weiterer Krankheitsverlauf</b>			
Therapie: _____			
Remission: _____			
Rezidiv: _____			
Komplikationen durch den Bürstenabstrich: _____			
_____			
<b>TNM-Klassifikation</b>			
<b>Extrahepat. Gallengänge</b>			
<u>T – Primärtumor</u>			
T <sub>1</sub> <u>subepitheliales BGW oder fibromuskuläre Schicht betroffen</u>			
T <sub>2</sub> <u>perifibromuskuläres BGW infiltriert</u>			
T <sub>3</sub> <u>Leber, Gallenblase, Pankreas, unilaterale Gefäße infiltriert</u>			
T <sub>4</sub> <u>andere Nachbarorgane, Hauptgefäße, bilaterale Gefäße infiltriert</u>			
<u>N – regionäre Lymphknoten</u>			
N <sub>x</sub> <u>regionäre LK können nicht beurteilt werden</u>			
N <sub>0</sub> <u>keine regionären LK-Metastasen</u>			
N <sub>1</sub> <u>regionäre LK-Metastasen</u>			
<u>M – Fernmetastasen</u>			
M <sub>x</sub> <u>Fernmetastasen können nicht beurteilt werden</u>			
M <sub>0</sub> <u>keine Fernmetastasen</u>			
M <sub>1</sub> <u>Fernmetastasen</u>			
<b>Stadiengruppierung:</b>			
Stadium 0	T <sub>0</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadium IA	T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadium IB	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadium IIA	T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadium IIB	T <sub>1-3</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
Stadium III	T <sub>4</sub>	N <sub>x,0,1</sub>	M <sub>0</sub>
Stadium IV	T <sub>1-4</sub>	N <sub>x,0,1</sub>	M <sub>1</sub>

Tabelle Anhang 3: Follow up-Bogen Seite 2

(American Cancer Society 2014)

## Entnommen aus Online-Publikation

<http://www.cancer.org/cancer/pancreaticcancer/detailedguide/pancreatic-cancer-survival-rates>

### Pancreatic cancer survival by stage

Survival rates are often used by doctors as a standard way of discussing a person's prognosis (outlook). Some people with pancreatic cancer may want to know the survival statistics for people in similar situations, while others may not find the numbers helpful, or may even not want to know them. If you decide you do not want to know them, stop reading here and skip to the [next section](#). The 5-year survival rate refers to the percentage of patients who live *at least 5 years* after their cancer is diagnosed. Of course, many of these people live much longer than 5 years. Also, people with pancreatic cancer can die of other things. The rates below, called *observed survival rates*, don't take that into account.

The numbers below are among the most current available. To get 5-year survival rates, doctors have to look at people who were treated at least 5 years ago. Improvements in treatment since then may result in a better outlook for people now being diagnosed with cancer of the pancreas.

Survival rates are often based on previous outcomes of large numbers of people who had the disease, but they can't predict what will happen with any particular person. Many other factors can affect a person's outlook, such as their age and overall health and how well the cancer responds to treatment. Your doctor can tell you how the numbers below apply to you, as he or she knows your situation best.

### Exocrine pancreatic cancer

The numbers below come from the National Cancer Data Base and are based on people diagnosed with exocrine cancer of the pancreas between 1992 and 1998.

<b>Stage</b>	<b>5-year observed survival rate</b>
Stage IA	14%
Stage IB	12%
Stage IIA	7%
Stage IIB	5%
Stage III	3%
Stage IV	1%

In general, people who can be treated with surgery survive longer, while those not treated with surgery don't fare as well.

### Pancreatic neuroendocrine tumors treated with surgery

For pancreatic neuroendocrine tumors, survival statistics by stage are only available for patients treated with surgery. These numbers come from the National Cancer Data Base and are based on patients diagnosed between 1985 and 2004.

<b>Stage</b>	<b>5-year observed survival rate</b>
Stage I	61%
Stage II	52%
Stage III	41%
Stage IV	16%

In this database, the overall 5-year survival rate for people who were *not* able to have their tumors removed by surgery was 16%.

Last Medical Review: 06/11/2014

Last Revised: 06/11/2014

### Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

15.07.2014, Annika Thieme