

Aus dem Institut für Pathologie und Funktionsbereich Cythopathologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Funktionsbereich Cytopathologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Biesterfeld

Verbesserung der Treffsicherheit der zytologischen
Lungenkarzinomdiagnostik mittels adjuvanter Fluoreszenz-in-
situ-Hybridisierung und DNA-Bildzytometrie

Dissertation

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

vorgelegt von

Ingmar Born

2016

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

gez.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

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

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Schramm M, Wrobel C, Born I, u. a. Equivocal cytology in lung cancer diagnosis: improvement of diagnostic accuracy using adjuvant multicolor FISH, DNA-image cytometry, and quantitative promoter hypermethylation analysis. *Cancer Cytopathol.* 2011;119(3):177–192

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das Lungenkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie.....	1
1.1.3 Pathogenese	3
1.1.4 Histologische Klassifizierung.....	4
1.1.4.1 Das Adenokarzinom.....	5
1.1.4.2 Das Plattenepithelkarzinom	5
1.1.4.3 Das großzellige Karzinom.....	6
1.1.4.4 Das kleinzellige Karzinom.....	6
1.1.5 Symptome.....	7
1.1.6 Diagnostik und Staging	8
1.1.7 Therapie und Prognose	9
1.2 Zytologie des Lungenkarzinoms	10
1.3 Aneuploidie	13
1.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	15
1.4.1. Die LAVysion™-Sonde	16
1.5 DNA-Bildzytometrie	17
1.6 Ziel der Doktorarbeit	18
2. Materialien und Methoden.....	19
2.1 Patientenkohorte und Studiendesign.....	19
2.2 Verarbeitung der Proben.....	20
2.2.1 Bronchialaspirate.....	20
2.2.2 Bronchialbürstungen und Feinnadelaspirationsbiopsien	20
2.3 Zytologie	20
2.3.1 Materialien und Geräte	20
2.3.2 Lösungen und Ansätze	21
2.3.3 Färbung nach Papanicolaou.....	21

2.3.4	Auswertung und Klassifikation	22
2.3.5	Malignitätskriterien	22
2.4	<i>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</i>	23
2.4.1	Materialien und Geräte	23
2.4.2	Lösungen und Ansätze	24
2.4.3	Hybridisierung.....	25
2.4.4	Die Ermittlung des <i>Cutoff</i> -Wertes	26
2.4.5	Auswertung	28
2.5	<i>DNA-Bildzytometrie</i>	29
2.5.1	Materialien und Geräte	29
2.5.2	Lösungen und Ansätze	29
2.5.3	Färbung nach Feulgen	29
2.5.4	Auswertung	30
2.5.5	Malignitätskriterien	32
2.6	<i>Follow-Up und Referenzstandard</i>	34
2.7	<i>Statistische Methoden</i>	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	<i>Das Patientenkollektiv</i>	35
3.2	<i>Ergebnisse der Zytologie</i>	38
3.3	<i>Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</i>	43
3.3.1	Die Ergebnisse der Pilotstudie.....	43
3.3.2	Die Ergebnisse der FISH in der Studienpopulation.....	43
	Ergebnis der FISH	45
3.4	<i>Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie</i>	48
3.4	<i>Vergleich von Zytologie, FISH und DNA-Bildzytometrie</i>	53
3.5.1	Vergleich der Durchführbarkeit.....	53
3.5.2	Vergleich der diagnostischen Maßzahlen.....	54
4.	Diskussion	58
5.	Zusammenfassung	68

6. Abkürzungsverzeichnis	69
7. Abbildungsverzeichnis	71
8. Tabellenverzeichnis	73
9. Literaturverzeichnis	75
10. Danksagung	82
11. Eidesstattliche Versicherung	83

1. Einleitung

1.1 Das Lungenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Lungenkarzinom ist weltweit die maligne Tumorerkrankung mit den meisten Neuerkrankungen pro Jahr und damit das am häufigsten diagnostizierte Karzinom. Im Jahr 2012 wurden weltweit circa 1.800.000 neue Fälle diagnostiziert¹. In den europäischen Staaten wurden 2012 circa 410.000 Erkrankungen diagnostiziert². In den entwickelten Ländern ist das Lungenkarzinom bei Männern hinter dem Prostatakarzinom die maligne Tumorerkrankung mit den zweithäufigsten Neuerkrankungen, bei Frauen liegt das Lungenkarzinom hinter dem Mammakarzinom und dem kolorektalen Karzinom an dritter Stelle der häufigsten Neuerkrankungen¹. In Deutschland liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter bei circa 70 Jahren³. Im Jahr 2012 war die weltweite Inzidenz bei Männern deutlich höher als bei Frauen (1.242.000 Neuerkrankungen bzw. 538.000 Neuerkrankungen)², allerdings zeigt sich in den letzten Jahren in den meisten europäischen Ländern ein Trend zu fallender Inzidenz bei Männern. Mit Ausnahme einiger weniger Länder steigt hingegen die Inzidenz bei Frauen an bzw. stagniert⁴. Es deutet sich außerdem eine Verlagerung der Inzidenz zu den Entwicklungsländern hin ab⁵. Diese Veränderungen werden vor allem auf Veränderungen im Tabakkonsum zurückgeführt^{6,7}.

Geschätzte 1.590.000 Patienten starben 2012 weltweit an den Folgen eines Lungenkarzinoms². Für Deutschland liegen Daten aus dem Jahr 2010 vor, es starben 13.627 Frauen und 29.381 Männer in diesem Jahr an einem Lungenkarzinom³. Das Lungenkarzinom ist die häufigste Todesursache unter den malignen Tumorerkrankungen, etwa 19,4 % der Todesfälle bei Tumorerkrankungen entfallen auf das Lungenkarzinom².

1.1.2 Ätiologie

In den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde zum ersten Mal der wissenschaftliche Zusammenhang zwischen Rauchen und der Entstehung von Lungenkarzinomen erbracht⁸⁻¹¹. Seitdem wurde diese Beobachtung in einer großen Anzahl Studien für nahezu jede Bevölkerungsgruppe bestätigt und Tabakrauchen als Hauptrisikofaktor für das Lungenkarzinom identifiziert¹²⁻¹⁴ und für die Entstehung von bis zu 90% aller Lungenkarzinome verantwortlich gemacht⁷. Alleine das Inhalieren des Tabakrauchs erhöht das Risiko im Vergleich zu Nichtrauchern um das 20fache⁷. Tabakrauchen erhöht nicht nur die Inzidenz des Lungenkarzinoms, sondern auch dessen Mortalität^{15,16}. Verantwortlich dafür sind mindestens 55 im Rauch enthaltene Karzinogene, z.B. aromatische Amine und Aldehyde, von denen alle potentiell humankarzinogen sind. Am besten belegt ist dieser

Zusammenhang bei verschiedenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und Nitrosaminen¹⁷.

Hecht und Mitarbeiter entwickelten ein Schema, welches die einzelnen Stufen zwischen Nikotinkonsum und Entstehung eines Lungenkarzinoms aufzeigt¹⁷.

Durch die Inhalation von Karzinogenen kann es hiernach letztlich zu Mutationen von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen und damit zum Lungenkarzinom kommen. Die natürliche mukoziliäre *Clearance* (Excretion) sowie DNA-Reparaturmechanismen wirken hierbei protektiv.

Nicht nur das aktive Rauchen, sondern auch das sogenannte Passivrauchen, d.h. das passive Einatmen der Partikel aus dem Zigarettenrauch, ist mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Lungenkarzinoms behaftet. In einer Metaanalyse kommen Hackshaw et al. zur Schlussfolgerung, dass Frauen, die noch nie geraucht haben und mit einem rauchenden Ehemann zusammenleben, mit einem 24 % höherem Risiko an einem Lungenkarzinom erkranken als nicht rauchende Frauen ohne rauchenden Ehemann. Das Risiko erhöht sich auch mit ansteigender Dauer und Stärke der Exposition des Rauchs auf den Nichtraucher¹⁸. Dies deckt sich mit einer älteren japanischen Studie, die ein höheres Risiko für nichtrauchende Ehefrauen von Rauchern aufzeigt. Nach dieser Studie beträgt das relative Risiko für Frauen von rauchenden Ehemännern mit einem Zigarettenkonsum von 1-14 Zigaretten/Tag 1,42. Auch hier zeigte sich ein Einfluss der Exposition auf das Risiko, an einem Lungenkarzinom zu erkranken. Für Ehefrauen, deren Ehemänner einen Zigarettenkonsum von mehr als 19 Zigaretten/Tag aufwiesen, betrug das relative Risiko 1,96¹⁹.

Neben dem Tabakrauch sind noch eine Reihe weiterer Risikofaktoren mit dem Auftreten des Lungenkarzinoms assoziiert, u.a. Radon^{20,21}, Asbest²², Formaldehyd, Nickel und Chrom²³. Es wird geschätzt, dass von diesen Karzinogenen alleine das Radon für bis zu 10% aller Lungenkarzinome verantwortlich ist²⁴.

Neben Karzinogenen sind ebenfalls einige nicht-maligne Lungenerkrankungen mit einer erhöhten Inzidenz des Lungenkarzinoms vergesellschaftet. Hier sind vor allem die COPD^{13,25,26}, aber auch die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF)²⁷⁻²⁹ und Tuberkulose³⁰ zu nennen. Als mögliche Mechanismen werden hier die chronische Entzündung mit inflammatorischen Veränderungen des Bronchialepithels sowie eine unzureichende Reinigung des Respirationstraktes von karzinogenen Stoffen (reduzierte mukoziliäre *Clearance*) diskutiert.

Obwohl etwa 90% aller Lungenkarzinome auf das Rauchen zurückzuführen sind, entwickeln nicht alle Raucher ein Lungenkarzinom⁷. So beträgt das Risiko für einen männlichen Raucher in Deutschland, bis zum 75. Lebensjahr an einem Lungenkarzinom zu erkranken

14,3%. Für einen männlichen Nichtraucher in Deutschland beträgt das Risiko zum Vergleich 0,6%³¹.

Diese Beobachtung hat zur Überlegung geführt, dass genetische Faktoren einen Einfluss auf die Tumorentstehung haben könnten. Es findet sich auch tatsächlich eine familiäre Häufung von Lungenkarzinomen, die unabhängig vom Tabakkonsum ist. So ist das Risiko für Menschen mit einem an Lungenkarzinom erkrankten erstgradigen Verwandten um 1,51 erhöht, ebenfalls ein Lungenkarzinom zu entwickeln³².

1.1.3 Pathogenese

Nach heutigem Stand der Forschung verläuft die Tumorentstehung in mehreren nacheinanderfolgenden Schritten³³. Das Lungenkarzinom entsteht vermutlich aus pluripotenten Stammzellen epithelialen Ursprungs^{34,35}. Für das Plattenepithelkarzinom ist darüber hinaus eine Sequenz morphologischer Veränderungen gut untersucht³⁶. Über mehrere Zwischenstadien, u.a. Metaplasie und Dysplasie entwickelt sich vorerst ein Carcinoma in situ, später das invasive Karzinom (s. Abb. 1.1). Als mögliche Ursachen werden die verstärkte Zellproliferation sowie vermehrte Ausschüttung bestimmter Zyto- und Chemokine als Reaktion auf Kontakt mit den oben genannten Karzinogenen diskutiert³⁷. In dem der Abb. 1.1 zu entnehmendem Verlauf kommt es zu zunehmender genetischer Instabilität³⁸. Diese Instabilität kann zwei Ebenen zugeordnet werden³⁹, nämlich in erster Linie chromosomaler Instabilität, d.h. den Verlust oder Vermehrung größerer chromosomaler Abschnitte; in zweiter Linie Instabilität auf Nukleotidebene, welche charakterisiert ist durch eine Veränderung der DNA-Sequenz, z.B. durch Insertion, Deletion oder Punktmutationen. Als Folge dieser genetischen Instabilität kommt es zur Aktivierung von Onkogenen bzw. zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgen⁴⁰. Des Weiteren wird als Folge chronischer Entzündungen eine vorzeitige Alterung der bronchioalveolären Stammzellen diskutiert. Bei jeder Zellteilung kommt es zu einer Verkürzung der Telomeren der Chromosomen. Diese werden hierbei „klebriger“. Es kommt zu End-zu-End Verbindungen von Chromosomen, die bei einer folgenden Mitose dann brechen können. Resultat ist eine chromosomale Aneuploidie, welche, wie unten ausgeführt, zur malignen Transformation führen kann⁴¹. Häufig amplifizierte bzw. aktivierte Onkogene sind bei den NSCLC v.a. Gene aus den EGFR-, HER-, MYC und RAS-Familien. Bei den SCLC sind seltener Mutationen an RAS- und EGFR-Genen festzustellen, dafür kommt es häufiger zu Mutationen im C-KIT- und C-MYC-Gen^{40,42-44}.

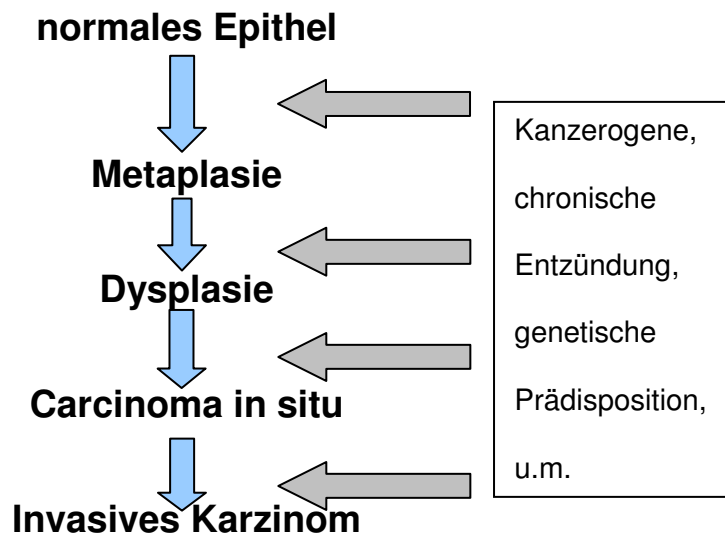


Abb. 1.1: Modell der Kanzerogenese des Plattenepithelkarzinoms

Die am häufigsten betroffenen Tumorsuppressorgene sind bei den NSCLC v.a. p53, RB1 und p161/NK4A; beim SCLC sind p53 und RB1 in noch stärkerem Maße betroffen. Sowohl bei NSCLC als auch bei SCLC ist sehr häufig ein früher chromosomaler Verlust von 3p zu beobachten, was eine Inaktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene zur Folge haben kann, u.a. Inaktivierung der Gene von FUS1, RASSF1A und FHIT^{40,42,43,45}.

Die oben genannten Mechanismen führen letztendlich zur unkontrollierten Proliferation und Immortalisierung der Tumorzellen, autokriner Stimulation, Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Tumorangio-genese, Apoptose-Resistenz sowie außerdem zum Verlust von Zell-Zellkontakten und damit zu Invasion und Metastasierung⁴⁶.

1.1.4 Histologische Klassifizierung

Nach der neuen 2015 vorgestellten Klassifikation der WHO werden die Lungentumore wie folgt eingeteilt⁴⁷:

1. epitheliale Tumore
 - a. Adenokarzinome
 - b. Plattenepithelkarzinome
 - c. neuroendokrine Tumoren
 - i. u.a. kleinzellige Karzinome
 - d. großzellige Karzinome
 - e. adenosquamöse Karzinome
 - f. pleomorphe Karzinome
 - g. Spindelzellkarzinome
 - h. Riesenzellkarzinome
 - i. Karzinosarkome

- j. pulmonale Blastome
- k. andere und unklassifizierte Karzinome
- l. speicheldrüsentypische Tumore
- m. Papillome
- n. Adenome
- 2. mesenchymale Tumoren
 - a. u.a. pulmonale Hamartome, Chondrome
- 3. lymphohistiozytische Tumoren
 - a. u.a. MALT-Lymphome, diffuse großzellige B-Zell-Lymphome
- 4. Tumoren von ektopem Ursprung
 - a. u.a. Teratome, intrapulmonale Thymome
- 5. Metastasen

1.1.4.1 Das Adenokarzinom

Das Adenokarzinom hat mittlerweile das Plattenepithelkarzinom als häufigsten malignen Lungentumor abgelöst, vermutlich aufgrund vermehrten Konsums von Filterzigaretten und damit einhergehender tieferer Inhalation des Rauchs^{47,48}. Es entsteht am häufigsten in der Lungenperipherie und infiltriert bei Diagnosestellung oft bereits Pleura und Thoraxwand. Seltener kann es auch zentral oder multifokal bzw. bipulmonal auftreten. Histopathologisch zeigen sie oft eine Mischung aus azinären, papillären und soliden Anteilen mit Schleimproduktion (Abb. 1.2 A+B).

Obwohl Adenokarzinome bei Rauchern weitaus häufiger sind, treten sie doch häufiger als alle anderen Karzinome auch bei Nichtrauchern auf⁴⁹. Um eine einheitlichere Terminologie des Adenokarzinoms der Lungen zu gewährleisten und um den Fortschritten seit der letzten WHO Klassifikation aus dem Jahr 2004 auf den Gebieten der Molekularpathologie, Radiologie, Onkologie und Chirurgie Rechnung zu tragen, wurde im Rahmen einer internationalen Konsensuskonferenz eine neue Klassifikation des Adenokarzinoms etabliert, welche im Wesentlichen zwischen präinvasiven, minimalinvasiven und invasiven Adenokarzinomen und diversen Subtypen unterscheidet^{50,51}.

1.1.4.2 Das Plattenepithelkarzinom

Plattenepithelkarzinome treten am häufigsten in Hilusnähe im Lungenzentrum auf. Dementsprechend wachsen sie oft infiltrierend in Haupt- und Lappenbronchien, was u.a. Atelektasen und Retentionspneumonien zur Folge haben kann. Ihr wesentliches histopathologisches Merkmal stellt die Keratinproduktion dar, was sich z.B. in Ausbildung von Hornperlen und in der Ausprägung eines speziellen Zytoskeletts zeigt (Abb. 1.2 C). Ein zytologisch diagnostisch zu nutzendes Kriterium sind die interzellulären Brücken, welche den

Desmosomen entsprechen. Allerdings variiert die Ausprägung dieser Merkmale stark mit dem Differenzierungsgrad des Tumors⁴⁹.

1.1.4.3 Das großzellige Karzinom

Großzellige Lungentumore entstehen bevorzugt peripher. Sie sind definiert als histologisch gering differenzierte Karzinome ohne Merkmale von Adeno-, Plattenepithel- oder kleinzelligen Karzinomen (s. Abb. 1.2 D)⁴⁹.

1.1.4.4 Das kleinzellige Karzinom

Das kleinzellige Karzinom ist in der neuesten WHO-Klassifikation unter den neuroendokrinen Tumoren eingeordnet. Es ist charakterisiert durch schnelles Wachstum, ausgeprägte Nekrosezonen und frühe Metastasierung. Diese Eigenschaften haben dazu geführt, dass diese, meist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostizierten Tumore, in der klinischen Praxis meist nicht nach dem TNM-System klassifiziert werden, sondern vereinfacht nach *limited* versus *extensive disease* (s. Kap. 1.1.7). Histologisch fallen die kleinen, rundlichen Tumorzellen mit schmalem Zytoplasmasaum und granuliertem, salz- und pfefferkornartigem Chromatinmuster meist ohne sichtbare Nucleoli auf.

Klinisch kommt es häufig im Zusammenhang mit kleinzelligen Karzinomen zu paraneoplastischen Syndromen⁴⁹.

In der klinischen Praxis werden die kleinzelligen Karzinome häufig den nicht-kleinzelligen Karzinomen gegenübergestellt, allerdings soll nach neuerem Konsens auch an biotischem oder zytologischem Untersuchungsmaterial möglichst eine Zuordnung zu den histogenetischen Hauptgruppen erfolgen⁵¹.

Die Häufigkeitsverteilung sieht wie folgt aus⁵²:

• kleinzellige Karzinome:	13,9%
• nicht-kleinzellige Karzinome	85,1%
○ Plattenepithelkarzinome	19,8%
○ Adenokarzinome	37,5%
○ großzellige Karzinome	3,3%
○ andere nicht-kleinzellige Karzinome	24,5%
• Sarkome	0,2%
• andere spezifische Tumorentitäten	0,1%
• nicht-charakterisierbare Tumore	0,8%

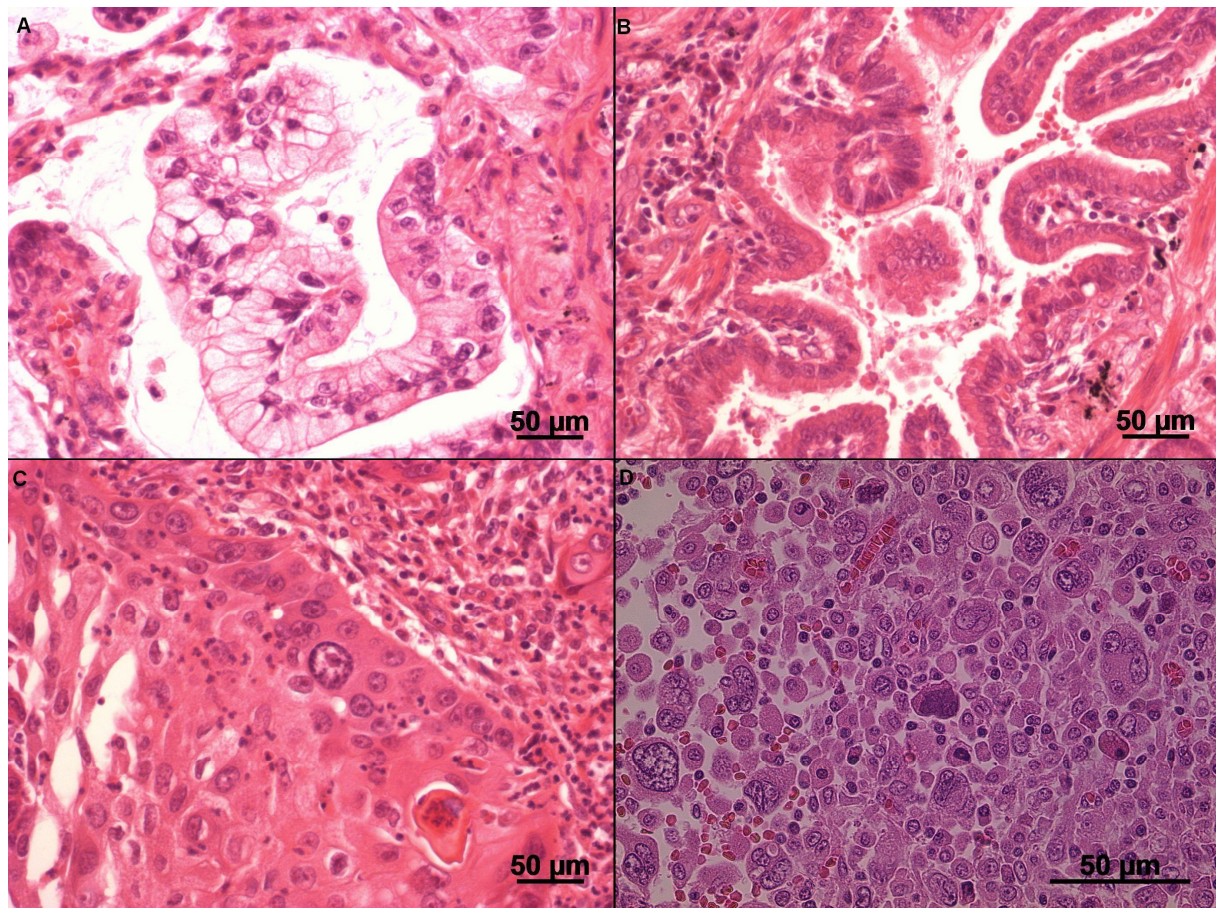


Abb. 1.2: A: gut differenziertes Adenokarzinom, HE-Färbung, 20x Objektiv; B: mäßig differenziertes Adenokarzinom, HE-Färbung, 20x Objektiv; C: mäßig differenziertes Plattenepithelkarzinom, HE-Färbung, 20x Objektiv; D: großzellig-anaplastisches Karzinom, HE-Färbung, 20x Objektiv

1.1.5 Symptome

Das Lungenkarzinom wird sehr häufig erst spät als solches erkannt. Dies liegt unter anderem daran, dass die Symptome häufig unspezifisch sind und erst relativ spät auftreten. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zeigen etwa 90% der Patienten eine Symptomatik⁵³. Die Mehrzahl dieser Patienten zeigt eher unspezifische Symptome, u. a. Gewichtsverlust, B-Symptomatik oder Müdigkeit. Gehäuft treten auch Symptome auf, die auf eine Metastasierung des Lungenkarzinoms hinweisen. Dazu zählen Kopf- und Knochenschmerzen, Übelkeit, Schwindel und Lymphadenopathie⁵⁴.

Am häufigsten treten Metastasen des Lungenkarzinoms in Leber, Knochen, Nebenniere, Gehirn und intrapulmonal auf. Seltener sind Niere, Schilddrüse, Pankreas, Milz und Herz betroffen⁵⁵.

Vergleichsweise selten präsentieren sich Patienten ausschließlich mit Symptomen, die durch den Primärtumor hervorgerufen werden. Husten ist das häufigste Symptom beim Lungenkarzinom, des Weiteren können Dyspnoe und Hämoptoe auftreten⁵⁴.

Bei weiterer intrathorakaler Ausbreitung kann es u.a. zur Infiltration des Plexus brachialis, Horner-Syndrom und Beteiligung der Pleura und des Perikards kommen.

Das Lungenkarzinom ist außerdem eine der häufigsten Ursachen für eine obere Einflusstauung⁵⁴.

Bei ungefähr 10% der Patienten tritt ein paraneoplastisches Syndrom auf. Die Bandbreite der möglichen Symptome ist enorm und steht nicht im Zusammenhang mit der Lage oder des Stadiums des Tumors. Mögliche Symptome sind SIADH, Cushing-Syndrom, Gynäkomastie oder ein Karzinoid-Syndrom⁵⁴. Am häufigsten, jedoch nicht ausschließlich tritt ein paraneoplastisches Syndrom beim kleinzelligen Lungenkarzinom auf⁴⁹. Etwa 10% der Patienten weisen überhaupt keine Symptome auf⁵³.

1.1.6 Diagnostik und Staging

Nach den Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin sollte initial bei Verdacht auf ein Lungenkarzinom neben einer Anamnese, die auch Raucherstatus sowie Kontakt mit Gefahrenstoffen (v.a. Asbest) berücksichtigt und einer körperlichen Untersuchung die Abnahme eines Basislabors stattfinden⁵⁶.

Als bildgebendes Verfahren ist primär eine Röntgenübersicht des Thorax indiziert, die bei positivem Befund oder dringendem Verdacht durch eine kontrastmittelgestützte CT des Thorax komplettiert werden soll⁵⁶.

Ist eine tumorsuspekte Läsion sichtbar, schließt sich obligat eine histologische oder zytologische Sicherung der Tumordiagnose an.

Trotz der diagnostischen Maßnahmen sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in 56% der Fälle schon Fernmetastasen aufgetreten. Nur bei 15% bzw. 22% befindet sich das Karzinom noch in einem lokalisierten oder regionalen Stadium⁵².

Lin und Mitarbeiter haben berechnet, dass die Prognose der NSCLC bedeutend verbessert werden könnte, wenn die Karzinome in einem früheren, noch operablem Stadium diagnostiziert würden. So könnten demnach, wenn der Tumor bei einer Größe von 5 mm detektiert werden könnte, bei 61% der Patienten die Tumorerkrankung geheilt werden, wobei die Ergebnisse auf rein mathematischen Modellen beruhen⁵⁷. Aus diesem Grund wurden große Studien durchgeführt, die den Wert des *Screening* ermitteln sollten. Hierbei wurden v.a. die Sputumzytologie, die Röntgenübersichtsaufnahme des Thorax sowie die *low-dose*-CT untersucht. Allerdings konnte in keiner dieser älteren Studien eine signifikante Senkung der Mortalität nachgewiesen werden^{58–60}. In einer neueren Studie konnte jedoch eine geringe Senkung der Mortalität durch *Screening* mittels *low-dose*-CT nachgewiesen werden, allerdings war ebenfalls eine hohe Anzahl falsch-positiver Ergebnisse zu verzeichnen⁶¹. Zurzeit existieren aus diesen Gründen noch keine Empfehlungen für den Einsatz eines *Screenings*⁵⁶. Es wird jedoch erforderlich sein, Lungenkarzinome in frühen Stadien zu diagnostizieren, wenn die Mortalität des Lungenkarzinoms signifikant gesenkt werden soll.

Das *Staging* des Lungenkarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation⁶².

Als Untersuchungen werden kontrastmittelgestützte CT des Thorax und Abdomen eingesetzt. Zur Erkennung von abdominellen Organmetastasen v.a. in der Leber ist auch die Sonographie des Abdomens von Bedeutung. In Sonderfällen kommen auch Untersuchungen wie die MRT oder PET-CT zum Einsatz⁵⁶.

Die Einordnung des Lungenkarzinoms erfolgt nach Stadien nach IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*) und UICC (*Union for International Cancer Control*)⁶².

Diese Klassifikation gilt grundsätzlich sowohl für das kleinzellige als auch das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom. Dennoch wird im klinischen Alltag häufig die vereinfachte Klassifikation der VALG (*Veterans Administration Lung Cancer Study Group*) für das kleinzellige Lungenkarzinom gewählt, die nur zwischen *limited* und *extensive disease* unterscheidet⁵⁶:

- *Limited disease*: auf den initialen Hemithorax begrenzter Tumor mit oder ohne ipsi- oder kontralaterale mediastinale oder ipsilaterale supraklavikuläre Lymphknotenmetastasen und mit oder ohne ipsilateralen Pleuraerguß unabhängig vom zytologischen Ergebnis
- *Extensive disease*: jede Ausbreitung über limited disease hinaus

Das *Staging* des Tumors hat sowohl Konsequenzen für die Therapieplanung als auch für die Prognose.

1.1.7 Therapie und Prognose

Die Therapie des Lungenkarzinoms ist abhängig vom histologischen Typ, dem Stadium und von Patientenfaktoren wie z.B. ECOG- (*Eastern Cooperative Oncology Group*)-*Performance*-Status und bestehenden Komorbiditäten, in geringerem Maße auch vom Patientenalter.

Hier soll nur eine kurze und vereinfachte Darstellung der leitliniengerechten Therapie erfolgen⁵⁶.

Die Therapie der Wahl des nicht-kleinzelligen Karzinoms im Stadium I-IIIa ist die operative Resektion samt systematischer Lymphadenektomie^{56,63}. Anschließend kann abhängig vom Stadium und Patientenfaktoren eine adjuvante Chemotherapie erfolgen. Eine neoadjuvante Chemotherapie wird in diesem Stadium nicht empfohlen⁵⁶. Eine kombinierte Radiochemotherapie sollte erfolgen, wenn keine Operabilität gegeben ist oder der Tumor nicht vollständig reseziert werden konnte.

Auch im Stadium IIIa/IIIb sollte eine definitive Therapie versucht werden, welche je nach Patientenfaktoren eine Operation, Radio- und/oder Chemotherapie umfasst.

Im Stadium IV kann in der Regel nur noch eine palliative Therapie stattfinden, mit dem Ziel, die Lebensqualität des Patienten zu erhalten und seine Überlebenszeit zu verlängern. Hierzu zählt v.a. die Chemotherapie.

Besonders interessant sind seit wenigen Jahren verfügbare Thyrosinkinaseinhibitoren des EGF-Rezeptors, welche adjuvant, aber auch in der Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Lungenkarzinoms eingesetzt werden können. Die wesentlich geringere Toxizität im Vergleich zu einer konventionellen Chemotherapie ermöglicht eine bessere Lebensqualität für die Patienten. Ein potentiell Therapieansprechen wird vorab am bioptisch entnommenen Untersuchungsmaterial mittels molekularpathologischem Nachweis aktivierender Mutationen des EGF-Rezeptors bestimmt⁶⁴.

Im Gegensatz zum nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom steht beim kleinzelligen Lungenkarzinom nicht die operative Resektion im Vordergrund. Im Stadium der *limited disease* ist die Therapie der Wahl die kombinierte Chemotherapie mit Cisplatin und Etoposid mit gleichzeitiger Strahlentherapie. Beim Vorliegen einer *extensive disease* ist in der Regel keine kurative Therapie mehr möglich. Als palliative Maßnahme sollten die Patienten ebenfalls eine kombinierte Chemotherapie erhalten. Das weitere Therapieregime orientiert sich an den Symptomen des Patienten und dem Ansprechen auf die Chemotherapie⁵⁶.

Trotz der oben genannten Therapiemaßnahmen ist die Prognose des Lungenkarzinoms weiterhin schlecht. Dies liegt v.a. an der späten Diagnose des Tumors, so dass die Erkrankung oft schon weit fortgeschritten ist. Mit Ausbreitung des Tumors sinkt auch die 5-Jahresüberlebensrate deutlich ab. Beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom im lokalisierten Stadium liegt sie noch bei 54,5%, im regionalen Stadium sinkt sie schon auf 25,7% und bei Vorliegen von Fernmetastasen sogar auf 3,7%. Unabhängig vom Stadium liegt die durchschnittliche 5-Jahresüberlebensrate des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms bei 17,4%⁵².

Noch schlechter ist die Prognose des kleinzelligen Lungenkarzinoms. Hier liegt die durchschnittliche 5-Jahresüberlebensrate bei 6,1%. Beim Vorliegen von Fernmetastasen, was bei der Mehrzahl der Patienten der Fall ist, sinkt sie noch weiter auf 2,7%⁵².

Beim kleinzelligen Lungenkarzinom gibt es noch weitere Prognosefaktoren neben dem Tumorstadium. Zu den wichtigsten zählen der ECOG-*Performance*-Status, das Geschlecht und die Konzentration der LDH im Plasma⁶⁵.

1.2 Zytologie des Lungenkarzinoms

Zytologische Methoden sind leitliniengemäß fester Bestandteil zur Diagnose von Lungenkarzinomen^{56,66}. Das entsprechende Material kann während einer Bronchoskopie

(Bürstung, TBNA, BAL), aus Sputum oder durch transthorakale Feinnadelaspirationsbiopsie gewonnen werden, wird nach Papanicolaou gefärbt und mikroskopisch untersucht. Wenn ein Tumor im Stadium M1a mit malignem Pleuraerguss vorliegt, kann auch mittels Pleurapunktion relevantes Material zur zytologischen Untersuchung gewonnen werden.

Die diagnostische Wertigkeit der Zytologie ist dabei sowohl von Art des gewonnenen Materials als auch von der Lokalisation des Tumors abhängig. Die Sputumzytologie erreicht eine Spezifität von 99% sowie eine Sensitivität von 66%. Bürstungen zeigen eine Sensitivität von 59%, bei BAL liegt diese bei 48%⁶⁶. Alle diese Angaben gelten nur für zentral sitzende Tumore, für peripher liegende Tumore liegt die Trefferquote signifikant darunter⁶⁷.

Die Hauptaufgabe der Zytologie besteht natürlich in der Differenzierung zwischen malignem und benignem Geschehen. Für die Therapie ist jedoch auch die Unterscheidung zwischen kleinzelligem und nicht-kleinzelligem Karzinom bedeutsam⁵⁶. Hier erreicht die Zytologie eine Trefferquote von ca. 98%⁶⁶. Gelegentlich kommt es also zu falschen Ergebnissen, v.a. wird häufiger ein NSCLC für ein SCLC gehalten. Deshalb wird empfohlen, bei zytologischer Diagnose eines SCLC, aber klinischem Verdacht auf ein NSCLC weitere Untersuchungen anschließen zu lassen⁶⁷. Die histogenetisch korrekte Tumordiagnose, insbesondere die Spezifizierung der Diagnose eines nicht-kleinzelligen Karzinoms als Plattenepithel- oder Adenokarzinom, wird als Grundlage einer individualisierten Tumorthherapie auch von der Zytologie zunehmend gefordert⁵¹.

Die unterschiedlichen (Tumor-) Zelltypen in bronchopulmonalen Untersuchungsmaterialien weisen oft spezifische morphologische Charakteristika auf, die sie zytologisch differenzierbar machen⁶⁸ (Abb. 1.3):

- Normale bronchiale Epithelien haben eine zylinderförmige Struktur mit basal liegendem Zellkern, welcher ein fein granuliertes Chromatin mit 1-2 kleinen Nukleolen aufweist. Am apikalen Zellpol finden sich Zilien mit einer Endplatte.
- Reaktives Epithel besitzt dagegen vergrößerte Nuclei und Nucleolen mit einer gering zugunsten des Kerns verschobenen Kern-Plasma-Relation. Synzytiale Zellverbände mit mehreren, ähnlich geformten Nuclei können vorkommen.
- Plattenepithelkarzinome sind charakterisiert durch einen hohen Grad an Zell- und Zellkernpolymorphismen mit großen Unterschieden in der Kern-Plasma-Relation. Die Zellen liegen vereinzelt oder lagern sich in fischzugartigen Verbänden an. In den Kernen zeigt sich verdichtetes, hyperchromatisches Chromatin, die Nukleolen sind vergrößert, können aber auch fehlen. Typisch für Plattenepithelkarzinome ist die durch ein blätterteigartig geschichtetes Plasma und Keratinperlen erkennbare Keratinsynthese, welche jedoch bei zunehmender Entdifferenzierung fehlen kann.

- Adenokarzinome besitzen ein granuliertes oder schaumiges Zytoplasma. Im Präparat finden sich einzelne Zellen, Gewebefragmente und Zellverbände, die papillär, tubulär oder polyzyklisch begrenzt sind. Die Zellkerne sind rundlich oder vesikulär, weisen gelegentlich einen großen zentralen Nukleolus auf und liegen exzentrisch im Plasma.
- Großzellige Karzinome besitzen eine erhöhte Kern-Plasma-Relation, ein hyperchromatisches Chromatin und häufig multiple vergrößerte Nukleoli. Die Zellen sind vergrößert und liegen vereinzelt oder in synzytialen Verbänden vor.
- Kleinzellige Karzinome haben kleine Zellen von 1½-2facher Lymphozytengröße, die in teils dichten Zellverbänden mit hochgradiger Kernüberlagerung (*nuclear crowding*) liegen. Sie besitzen einen zentral liegenden Zellkern mit gekörntem, pfeffer- und salzkornartigem, hyperchromatischem Chromatin und extrem zu Gunsten des Kerns verschobener Kern-Plasma-Relation. Aufgrund der dichten Anlagerung kommt es zum gegenseitigen Eindellen der Zellkerne (*nuclear molding*). Durch die oft hohe Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors findet sich vermehrt nekrotisches Gewebe im Präparat.

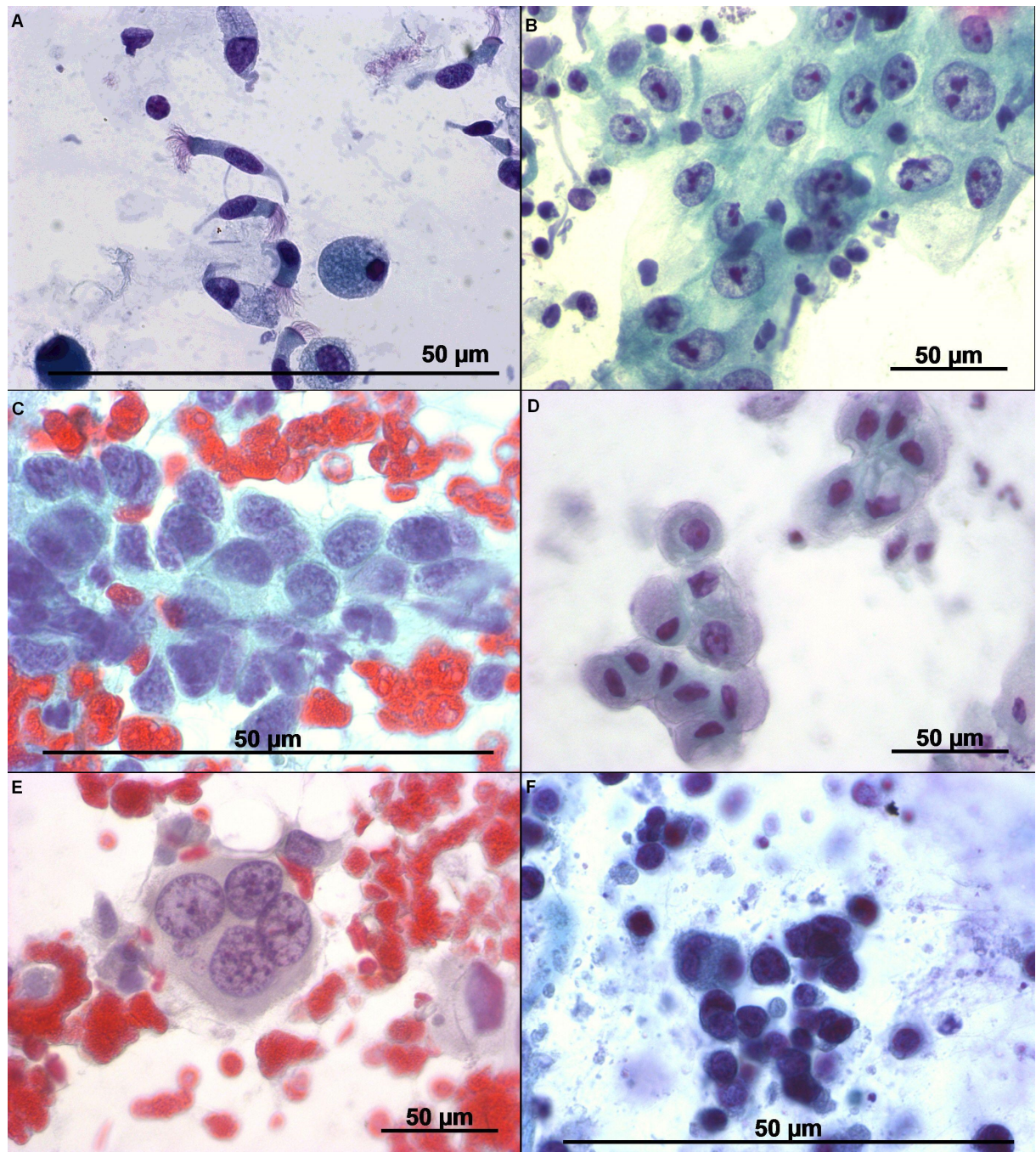


Abb. 1.3: A: normales respiratorisches Epithel, 63x Objektiv; B: reaktiv-verändertes respiratorisches Epithel, 40x Objektiv; C: gering differenziertes Plattenepithelkarzinom, 63x Objektiv; D: Adenokarzinom, 40xObjektiv; E: großzelliges Karzinom, 40x Objektiv; F: kleinzelliges Karzinom, 63x Objektiv

1.3 Aneuploidie

Unter Aneuploidie versteht man die „Abweichung vom euploiden Chromosomensatz, bei der einzelne Chromosomen nicht in normaler Anzahl vorhanden sind“⁶⁹.

Während der Mitose werden normalerweise die duplizierten Chromosomen gleich auf die Tochterzellen verteilt, so dass die Anzahl der Chromosomen in jeder Generation konstant bleibt. Kommt es zu Fehlern während dieser Verteilung, resultiert dies in einer

Ungleichverteilung der Chromosomen oder einzelner Chromosomenteile und damit in Aneuploidie.

Schon zu Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckte Boveri an Seeigeln, dass ein veränderter Chromosomensatz zu einer erhöhten Sterblichkeit seiner Versuchszellen führte. Später leitete er daraus die Theorie ab, dass Tumorzellen einen veränderten Chromosomensatz aufweisen⁷⁰.

Mehrere Studien konnten zeigen, dass viele Tumorzellen in verschiedenen Geweben aneuploid sind, z.B. in Kolonkarzinomen⁷¹ und Adenokarzinomen der Brust⁷². Dies konnte auch für Lungenkarzinome festgestellt werden⁷³. Mit zunehmenden zytologisch erkennbaren Atypien steigt auch der Grad der Aneuploidie in Lungenkarzinomen^{74–76}.

Aneuploidie ist ein obligates Ereignis in der Entstehung maligner Tumorentitäten und immortalisiert Zellen^{77–81}.

In Hefezellen konnte gezeigt werden, dass durch Aneuploidie die genetische Stabilität der Zellen herabgesetzt wird, was zu weiteren genomischen Veränderungen und schließlich zur malignen Transformation führen könnte⁸². Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass in aneuploiden Zellen die Genexpression häufig erhöht oder verändert ist, außerdem kommt es zu erhöhtem Zellvolumen und verändertem Stoffwechsel^{78,79}.

Obwohl Aneuploidie in allen malignen Tumorzellen vorkommt, ist seine Rolle in der Tumorentstehung noch nicht völlig klar. Duesberg vertritt die Hypothese, dass Aneuploidie, und nicht spezifische Genmutationen, den entscheidenden Schritt zur malignen Transformation darstellt⁷⁷. Dies ist jedoch nicht unumstritten⁸³. Andere Autoren vertreten die Ansicht, dass erst einzelne Mutationen spezifischer Gene zu Missverteilung der Chromosomen und damit zu Aneuploidie führen^{84–86}.

Unabhängig davon, welche Theorie letztendlich zutrifft, ist Aneuploidie unumstritten Teil der Tumorentstehung und damit als diagnostisches Kriterium zu nutzen^{87–89}.

Der Begriff der Aneuploidie kann auch weiter aufgefasst werden. So ist der in dieser Studie verwendete Begriff der DNA-Aneuploidie nicht als Amplifikation oder Deletion von Chromosomen oder deren Abschnitten definiert. Vielmehr meint DNA-Aneuploidie einen modalen DNA-Gehalt einer Population von Zellen, deren DNA-Verteilung sich signifikant von der einer gesunden (ruhenden, proliferierenden oder polyploiden) Zellpopulation unterscheidet⁹⁰.

Von der Aneuploidie abzugrenzen ist die euploide Polyploidisierung, welche eine Vervielfachung des normalen Chromosomensatzes (2c) auf das Vierfache, das Achtfache usw. darstellt. Euploide Polyploidisierung ist als benigner, physiologischer Zustand bei verschiedenen Geweben beschrieben, z.B. als Adaptationsvorgang auf Belastung bei

Herzmuskelzellen⁹¹ oder bei unterschiedlichen Geweben als Ausdruck von Zellalterung und entzündlichen Vorgängen^{92,93}. Hamada und Mitarbeiter konnten zeigen, dass einzelne reaktiv-entzündlich veränderte Bronchialepithelien einen DNA-Gehalt von 8c, also einen oktaploiden Chromosomensatz, besitzen⁹⁴.

Euploide Polyploidisierung ist als benigne Veränderung also unbedingt von einem pathologischen aneuploiden Chromosomensatz zu unterscheiden und muss dementsprechend in den diagnostischen Algorithmen berücksichtigt werden.

1.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die chromosomale Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist eine Methode zur Darstellung von einzelnen Genen oder ganzen Chromosomen an histologischen oder zytologischen Präparaten. Dabei werden fluoreszierende DNA-Sonden eingesetzt, die unter einem speziellen Fluoreszenzmikroskop untersucht werden können.

Die FISH-Sonden bestehen aus einzelsträngigen DNA-Stücken, die an ihre komplementären DNA-Abschnitte binden. Die Sonden können direkt fluorochrom-markiert sein (direkte Methode) oder erst durch Zugabe eines gegen die Sonde gerichteten, fluorochrom-markierten Antikörpers sichtbar werden (indirekte Methode).

Zur Auswertung werden die Präparate unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Das Präparat wird durch eine Quecksilberdampflampe und einen Anregungsfilter mit Licht einer bestimmten Wellenlänge ausgeleuchtet. Dadurch wird das Fluorochrom in einen energetisch höheren Zustand versetzt. Unter Abgabe von Fluoreszenzlicht wird wieder das Niveau des Grundzustandes erreicht. Dieses Fluoreszenzlicht lässt sich dann mit einem Sperrfilter darstellen. Die Frequenzen der anregenden und emittierten elektromagnetischen Strahlung kann für jedes eingesetzte Fluorochrom verschieden gewählt werden, so dass durch Verwendung der entsprechenden Filter mehrere, mit verschiedenen Fluorochromen markierte DNA-Sonden an einem Präparat eingesetzt werden können.

Ein Vorteil der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung liegt in der Möglichkeit, Zellkerne in der Interphase des Zellzyklus zu untersuchen, d.h. das komplette Genmaterial kann beurteilt werden. Dabei lassen sich Amplifikationen oder Deletionen der betreffenden DNA-Abschnitte erkennen. Einen weiteren Vorteil stellt die Möglichkeit dar, die Hybridisierung an den vorher Papanicolaou-gefärbten Objektträgern der Routinezytologie anzuwenden⁹⁵⁻⁹⁷.

Es werden kommerziell eine Reihe von Sonden angeboten, die zu vielfältigen Zwecken eingesetzt werden. Hier sei beispielhaft der Einsatz von FISH in der Urinzytologie zur Diagnose des Harnblasenkarzinoms angegeben⁹⁸. Weitere Einsatzmöglichkeiten in der Onkologie sind bei der Einschätzung des HER2-Status des Mammakarzinoms⁹⁹, oder bei der

Diagnose der AML anhand des Philadelphia-Chromosoms¹⁰⁰. Außerhalb der Onkologie wird FISH u.a. in der Pränataldiagnostik angewendet¹⁰¹.

Auch in der Lungenzytologie wird die Fluoreszenz in situ Hybridisierung eingesetzt. In dieser Arbeit angewendet wurde die LAVysion™-multicolour-FISH-Sonde der Firma Abbot Laboratories, die speziell für die Lungenzytologie entwickelt wurde⁹⁶. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Anwendung dieser Sonde an bronchoskopisch gewonnenen Proben (BAL, Bürstungen, TBNA) die Sensitivität signifikant steigert^{95–97,102,103}. So konnten Bubendorf und Mitarbeiter zeigen, dass die Anwendung der LAVysion™-Sonde die Sensitivität bei bronchialen Bürstungen von 49% auf 73% steigern kann⁹⁵, Sokolova und Mitarbeiter entdeckten in einer ähnlichen Studie eine Steigerung von 54% auf 82%⁹⁶. Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit einer Studie von Halling und Mitarbeiter, die eine Steigerung der Sensitivität von 51% auf 71% bei bronchialen Bürstungen zeigte¹⁰².

1.4.1. Die LAVysion™-Sonde

Zur Hybridisierung der Präparate in dieser Doktorarbeit wurde die LAVysion™-*multicolour*-Sonde (Abbott Laboratories) eingesetzt. Diese enthält 4 verschiedene Sonden:

Die Sonde LSI D5S721, D5S23 ist ungefähr 450 kb lang und mit dem Fluorochrom SpectrumGreen™ markiert.

Die Sonde LSI EGFR ist ungefähr 300 kb lang und enthält das gesamte EGFR-Gen. Sie ist mit SpectrumRed™ markiert.

Das EGFR-Gen kodiert für das Protein *Epidermal Growth Factor Receptor*, einen transmembranösen Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität. Der EGF-Rezeptor gehört zu den Protoonkogenen.

Amplifikationen des EGFR-Gens sind u.a. für das NSCLC beschrieben⁴⁵.

Die Sonde LSI C-MYC ist ca. 750 kb lang, enthält das gesamte C-MYC-Gen auf 8q24 und ist mit SpectrumGold™ markiert.

Das Protein C-MYC zählt als Transkriptionsfaktor ebenfalls zu den Protoonkogenen. Es ist an der Regulation und Expression von circa 15% aller menschlichen Gene beteiligt.

Eine Amplifikation von C-MYC wird bei vielen Tumorarten beobachtet^{43,104–106}, und ist im Allgemeinen ein Marker für Metastasierung und für eine schlechte Prognose^{107,108}.

Außerdem enthält die LAVysion™-*multicolour*-Sonde noch eine Sonde gegen die Zentromerregion von Chromosom 6 (CEP 6), die mit SpectrumAqua™ markiert ist.

Die Verwendung einer 4-fach Sonde zur Bestimmung chromosomaler Aneuploidie erlaubt eine sensitivere und besser abgesicherte Diagnose im Vergleich zur Aneuploidie-Bestimmung nur eines einzelnen Chromosoms.

1.5 DNA-Bildzytometrie

Die DNA-Bildzytometrie ist eine Methode zur Messung des DNA-Gehalts eines Zellkerns. Das Verfahren wird v.a. bei Verdacht auf einen malignen Tumor eingesetzt. Sie kann unter anderem zur Bestimmung von DNA-Aneuploidie bei Malignitätsgrading und Therapiekontrolle eingesetzt werden¹⁰⁹. Eine DNA-Messung erfolgt stets an ungeschnittenen, ganzen Zellkernen entsprechend international festgelegter Standards^{90,110–112}.

Das Prinzip der DNA-Bildzytometrie beruht auf der Messung der integrierten optischen Dichte (IOD) an nach Feulgen gefärbten Zellkernen¹¹³. Hierbei bindet ein im sichtbaren Licht absorbierender Farbstoff kovalent an die DNA. Zur Messung der IOD wird ein Mikroskop mit Videokamera und entsprechender Bildverarbeitungssoftware benötigt. Die IOD korreliert stöchiometrisch mit dem DNA-Gehalt der Zelle.

Die IOD von Analysezellen wird mit der IOD einer Population von morphologisch unauffälligen Referenzzellen aus dem gleichen Präparat verglichen. Häufig werden dazu z.B. Lymphozyten verwendet. Aus den gemessenen IOD aller Referenzzellen wird der Mittelwert errechnet. Diesen Mittelwert definiert man als den Referenzstandard für die Messung der Analysezellen, indem man den errechneten Mittelwert mit dem DNA-Gehalt eines normalen Zellkerns gleichsetzt (2c). Durch Vergleich der IOD der Analysezellen mit den Referenzzellen lässt sich der DNA-Gehalt einer Population von Analysezellen berechnen.

Hierbei können Veränderungen wie z.B. Polyploidisierung oder Aneuploidie in einem Histogramm dargestellt werden.

In der Lungenzytologie kommt die DNA-Bildzytometrie bei malignitätsverdächtigen Läsionen zum Einsatz und erlaubt die Unterscheidung zwischen benignen und malignen Geweben; außerdem stellen die Ergebnisse der Untersuchung einen unabhängigen Prognosefaktor dar^{75,87,114–118}.

Auch an anderen Organsystemen ist der diagnostische Nutzen der DNA-Zytometrie belegt, z.B. bei Karzinomen und deren Vorstufen der Mundschleimhaut¹¹⁹ und der Cervix uteri^{120,121}.

Ein Vorteil der Methode liegt darin, dass sie wie die FISH an den gleichen Objektträgern durchführbar ist wie die Routinezytologie^{87,114}. Dadurch entfällt die für den Patienten unter Umständen belastende Entnahme weiterer Proben. Zudem ist die gezielte Untersuchung von in der Routinezytologie hinsichtlich ihrer Dignität unklarer Zellen möglich.

Jedoch können auch verschiedene nicht-maligne Zustände den DNA-Gehalt im Sinne einer Polyploidisierung verändern und somit zu falschen Interpretationen führen. Hier sind u.a. virale Infektionen, Vitamin-B12-Mangel, vorangegangene Therapien mit Zytostatika oder ionisierender Bestrahlung zu nennen^{92,110,111}.

1.6 Ziel der Doktorarbeit

Zytologische Methoden werden häufig in der Diagnostik des Lungenkarzinoms angewandt. Die Proben stammen aus endobronchial gewonnenem Untersuchungsmaterial wie Sputum, BAL, bronchialen Bürstungen und TBNA⁶⁶. Die Hauptaufgabe der Zytologie besteht in der Unterscheidung zwischen malignen und benignen Geweben, sowie der möglichst histogenetisch korrekten Zuordnung von Neoplasien^{51,66}.

Diese Unterscheidung jedoch ist nicht immer sicher möglich^{122–124}. Es verbleibt ein Rest zytologisch unklarer Proben, auch wenn die Diagnostik in den Händen erfahrener Zytopathologen liegt^{66,97,125}. Savic und Mitarbeiter geben diesen Anteil mit 2,9% an⁹⁷, in der vorliegenden Studie liegt sie innerhalb eines 9-Monatszeitraums bei 8,6%⁸⁹.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer diagnostischer Verfahren und Algorithmen, um eine sichere definitive Diagnose zu ermöglichen.

In dieser Doktorarbeit werden im Rahmen einer abgewandelten Kohortenstudie die Treffsicherheiten von zytologischer Untersuchung, DNA-Bildzytometrie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ermittelt und mit einem klinisch-histologischen *Follow-up* korreliert (vgl. Kap. 2.6). Insbesondere wurde die adjuvante Anwendung nach vorheriger Zytologie an den gleichen Ausstrichen untersucht.

Die statistischen Parameter der Lungenzytologie werden mit denen der FISH und DNA-Bildzytometrie verglichen.

Das Hauptziel ist es herauszufinden, ob und in welchem Ausmaß die Anwendung von FISH und DNA-Zytometrie unter Verwendung unserer in den Abschnitten 2.4.4 und 2.5.5 erläuterten diagnostischen Algorithmen zu einer Verbesserung der Diagnostik unklarer Lungenzytologien hinsichtlich Malignität führt. Für die FISH wird dabei ein neuer diagnostischer Algorithmus zur Vermeidung falsch positiver Befunde im Falle einer Polyploidisierung vorgestellt.

Als Nebenziel soll möglichst im Rahmen einer Abwägung von Kosten, Aufwand und zu erwartendem Ergebnis eine Indikation gestellt werden, ob im klinischen Alltag bei einer bestimmten Untersuchung eher die DNA-Bildzytometrie oder die FISH anzuwenden ist.

2. Materialien und Methoden

2.1 Patientenkohorte und Studiendesign

In die Studie eingeschlossen wurden 210 Patienten mit Verdacht auf Lungenkarzinom, die in der Abteilung für Pneumologie des Florence-Nightingale-Krankenhauses in Düsseldorf ambulant oder stationär behandelt wurden. Alle Patienten erhielten zur diagnostischen Abklärung eine Bronchoskopie, in deren Verlauf die Probenentnahme zur diagnostischen Zytologie stattfand. Es wurden nur Patienten ohne bekannte maligne Lungenerkrankung und im Falle wiederholter Bronchoskopien jeweils nur das erstübersandte Untersuchungsmaterial des Patienten untersucht. Verlaufskontrollen von Patienten mit bekanntem Lungenkarzinom wurden in der Studie nicht berücksichtigt.

Die erste Probe der Studie wurde am 06.05.2008 entnommen, die letzte Probe am 17.02.2009.

Insgesamt wurden in diesem Untersuchungszeitraum Proben von 847 Patienten der oben genannten Abteilung im Institut für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf untersucht. Die Diagnosen wurden gemäß allgemein akzeptierter Kategorien erstellt (s. Kap 1.2 und 2.3.4). Hiervon wurden 210 Patienten in die Studie aufgenommen wurden, die sich wie folgt zusammensetzen:

Jeweils die **ersten** 70 Patienten mit cytologisch negativer, positiver oder unklarer (zweifelhafter und dringend verdächtiger) Tumor-Diagnose wurden unter Berücksichtigung o.g. Kriterien eingeschlossen und mit FISH und DNA-Zytometrie untersucht. Es wird betont, dass eine weitere Patientenauswahl nicht stattfand. Der Rekrutierungszeitraum wurde nach Erreichen von 70 unklaren zytologischen Erstdiagnosen beendet. Insgesamt erhielten von den 847 Patienten im Untersuchungszeitraum 630 eine zytologisch negative Diagnose, 125 Proben waren zytologisch positiv und 92 Proben ergaben zytologisch ein unklares Ergebnis (50 „dringend verdächtig“, 42 „zweifelhafte“). Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit aber in der weiteren Abklärung unklarer zytologischer Diagnosen liegt, wurde aus Zeit- und Kostengründen darauf verzichtet, alle Patienten im Untersuchungszeitraum mittels FISH und DNA-Bildzytometrie zu untersuchen.

Dabei wurden die adjuvanten Methoden stets an den routinemäßig zytologisch befundeten Objektträgern durchgeführt. Eine zusätzlich Probeentnahme zu Studienzwecken und eine damit verbundene zusätzliche Belastung des Patienten fand nicht statt.

Bei den Proben handelte es sich um Bronchialsekrete, Bronchiallavagen, Bronchialbürstungen und transbronchiale oder transtracheale Feinnadelaspirationsbiopsien von Lymphknoten oder Tumoren. Eine weitere Differenzierung der Feinnadelaspirationsbiopsien ist nicht möglich, da die genaue Art der Probenentnahme auf

den Einsendeformularen nicht immer angegeben wurde. In welchem Ausmaß Blindnadelungen und ultraschallgesteuerte Probenentnahmen stattgefunden haben, ist anhand der eingesandten Formulare nicht ersichtlich. Aus diesem Grund wird im Folgenden vereinfachend nur von Feinnadelaspirationsbiopsien gesprochen.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universitätsklinik Düsseldorf bewilligt (Studiennummer 3059 vom 19.05.2008).

Es soll noch einmal erwähnt werden, dass alle Probenentnahmen im Rahmen der routinemäßigen zytologischen Diagnostik entnommen wurden und nicht zum Zweck dieser Studie. Im Rahmen der Diagnostik asservierte Proben wurden nachträglich nach Vorliegen des Ethikvotums für die Studie untersucht. Alle adjuvanten Methoden dieser Studie (FISH, DNA-Bildzytometrie) wurden erst nach Eingang des Ethikvotums angewendet.

2.2 Verarbeitung der Proben

2.2.1 Bronchialaspirate

Die Proben wurden in 20 ml Saccomanno-Fixativ (50% Ethanol, 2% Polyethylenglykol, 60mg/l Rifampicin) eingeschickt. Ein Vorteil dieser Fixierung besteht darin, dass die DNA so in chemisch unmodifizierter Form erhalten bleibt.

Die Proben wurden 15 min bei 500g zentrifugiert. Anschließend wurden pro Patient 4 Sedimentausstriche angefertigt, getrocknet und nach Papanicolaou für die Routinezytologie gefärbt.

2.2.2 Bronchialbürstungen und Feinnadelaspirationsbiopsien

Bronchialbürstungen wurden vom bronchoskopierenden Arzt oder einer Hilfsperson nach Probeentnahme auf einem Objektträger ausgerollt und sofort danach mit Alkoholspray fixiert. Proben aus Feinnadelaspirationsbiopsien wurden nach Probeentnahme auf einem Objektträger ausgestrichen und ebenfalls mit Alkoholspray fixiert. Die eingesandten Objektträger wurden anschließend für die Routinezytologie nach Papanicolaou gefärbt.

2.3 Zytologie

2.3.1 Materialien und Geräte

In Tabelle 2.1. sind die Materialien und Geräte dargestellt, die für die Papanicolaou-Färbung im Institut für Cytopathologie benutzt wurden.

Materialien und Geräte	Hersteller	Bestell- od. Seriennummer
NH ₃	Merck	1.05432.2500
Harris Hämatoxylin 1a	Merck	1092532500
Orange II 2b	Merck	1068872500
Polychrom 3b	Merck	1092722500
Xylol	Merck	1.08685.2500
Objektträger Super Frost plus, weiß, 90°geschliffen, 25x75x1mm	Menzel Gläser	AG 00008032E
Färbeautomat Varistain 24-4	Shandon	74200002
Voclear	Vogel	QU-400301120

Tabelle 2.1: Materialien und Geräte für die Papanicolaou-Färbung

2.3.2 Lösungen und Ansätze

gebrauchsfertiges Hämatoxylin	150 ml	Harris Hämatoxylin 1a
	450 ml	Aqua dest.
	danach filtrieren	
gebrauchsfertiges Orange II 2b	300 ml	Orange II 2b
	300 ml	96% Ethanol
NH ₂ OH	3 ml	NH ₃
	600 ml	70% Ethanol
	Lösung wurde täglich erneuert	

2.3.3 Färbung nach Papanicolaou

Alle Schritte der Färbung nach Papanicolaou wurden in einem Färbeautomaten Varistain 24-4 der Firma Shandon durchgeführt. Die alkoholfixierten Präparate wurden in Objektträgerhaltern befestigt und durchliefen die folgenden Schritte:

1. Aufwässerung in einer absteigenden Alkoholreihe, 2 min in 96% Ethanol sowie je 1 min in 80%, 70% und 50% Ethanol
2. Waschen in Aqua dest. für 1 min
3. Kernfärbung mit gebrauchsfertigem Hämatoxylin für 2 min
4. Zweimaliges Abwaschen in Leitungswasser für je 3 min („bläuen“)
5. Auswaschen der überschüssigen Farbe aus dem Zytoplasma durch NH₂OH für 1 min
6. Entwässerung durch aufsteigende Alkoholreihe mit je 1 min in 70% Ethanol (2x), 80% und 96% Ethanol
7. Zytoplasmafärbung mit gebrauchsfertigem Orange II 2b und Polychrom 3b für je 2 min, dazwischen 2x1 min in 96% Ethanol
8. Entwässerung durch aufsteigende Alkoholreihe in 96% Ethanol für 2x1 min und

99,5% Ethanol für 2 min

9. Waschen und Vorbereiten für des Eindecken in Xylol für 2x1 min und Voclear für ebenfalls 2x1 min

Die Papanicolaou-Färbung ist eine Färbetechnik, die vor allem in der zytologischen Begutachtung von Körpersekreten, Abstrichen und Proben von Feinnadelaspirationsbiopsien zum Einsatz kommt.

Die Kernstruktur lässt sich mit dieser Färbung besonders gut darstellen.

2.3.4 Auswertung und Klassifikation

Die nach Papanicolaou gefärbten Präparate wurden von einem in der zytologischen Diagnostik erfahrenen Pathologen untersucht und unter Berücksichtigung der unten dargestellten Kategorien befundet¹²⁶. Präparate der Kategorie „unzureichend“ wurden in unsere Studie nicht eingeschlossen.

Nach Konsens der deutschen Gesellschaft für Zytologie werden Präparate der extragenitalen Zytologie -hier adaptiert für oben genannte Untersuchungsmaterialien- in folgende diagnostische Kategorien unterteilt¹²⁶:

- **Unzureichend:** Das Material ist unzureichend, wenn es keine oder zu wenig Zellen der tieferen Atemwege enthält, oder Artefakte die mikroskopische Diagnose unmöglich machen.
- **Negativ:** Das Untersuchungsmaterial enthält keine Tumorzellen.
- **Zweifelhaft:** Das Untersuchungsmaterial enthält Epithelien mit geringen oder mittleren Dysplasien oder abnorme Zellen unklarer Dignität.
- **Dringender Verdacht:** Das Untersuchungsmaterial enthält Epithelien mit schweren Dysplasien oder wenige atypische, malignomverdächtige Zellen, deren Anzahl für eine sicher positive Diagnose nicht ausreicht.
- **Positiv:** Das Untersuchungsmaterial enthält Tumorzellen.

2.3.5 Malignitätskriterien

Zur Unterscheidung zwischen benignen und malignen Prozessen werden allgemeine Atypiekriterien zugrunde gelegt, dazu gehören Kernpolymorphien mit vergrößerten Nukleolen und erhöhter Kern-Plasma-Relation, Anisonukleose, Hyperchromasie der Zellkern sowie eine unregelmäßige Chromatinverteilung, unregelmäßige Kernmembranen und ggf. exzentrische Lage der Zellkerne.

Weiterhin wurden die spezifischen Charakteristika der einzelnen Tumortypen berücksichtigt und zur Diagnose herangezogen (s. Kap. 1.2).

2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

2.4.1 Materialien und Geräte

Tabelle 2.2 zeigt die angewendeten Materialien und Geräte für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.

Materialien und Geräte	Hersteller	Bestell- od. Seriennummer
LAVysion™ multicolor Sonde	Abbott Molecular	5J4201
Vectashield with DAPI	Biozol	H-1200
LSI/WCP Hybridisierungspuffer	Abbott Molecular	6J6701
NP 40	Abbott Molecular	7J0501
20xSSC	Abbott Molecular	2J1032
Fixogum Rubber cement	Q-Biogene	FIXO 0125
Paraformaldehyd	Merck	8.18715.0100
Na ₂ HPO ₄	Merck	106586
KH ₂ PO ₄	Merck	104873
NaCl	Merck	106404
KCl	Merck	104936
Pepsin Crystalline	Sigma	P6887
Xylol	Merck	1.08685.2500
Deckgläser rund Ø 10mm	VWR	631-1340
Deckgläser rund Ø 12mm	VWR	631-0713
Deckgläser 15x15mm	VWR	631-0710
Deckgläser 18x18mm	VWR	631-0669
Vortex Typ VF 2	Janke und Kunkel	703513
Wasserbad Typ WB 7	Memmert	1203.0797
Heizplatte PZ-28-1T	Präzitherm	14741194
Wärmeschrank Typ B6060	Heraeus Instruments	51009651
pH-Meter 765 Calimatic	Knick	765
Mikroskop Axio Imager M1	Carl Zeiss	66635
AxioCam MRm	Carl Zeiss	426509-9901-000
AxioVision Version 4.5.0.0	Carl Zeiss	410130-0200-000
AxioVision QuantiFISH software α46 für AxioVision 4.5	Carl Zeiss	410132-0205-000
Immersionsöl „Immorsol“ 518F fluoreszenzfrei	Carl Zeiss	444 963 0000 000

Tabelle 2.2: benötigte Reagenzien, Materialien und Geräte für die FISH

2.4.2 Lösungen und Ansätze

0,5% HCl/70% Ethanol	8 ml	25% HCl in
	392 ml	70% Ethanol
	Lösung bei Raumtemperatur 2 Monate haltbar	
2x SSC	100 ml	20x SSC Stammlösung in
	850 ml	Aqua dest.
	mit NaOH auf pH 7 einstellen und mit Aqua dest. auf	
	1000 ml	auffüllen
	Lösung bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar	
20x SSC Stammlösung	132 g	20x SSC in
	400 ml	Aqua dest.
	mit HCL auf pH 5,3 einstellen, mit Aqua dest. auf	
	1000 ml	auffüllen
	anschließend mit 0,45 µm Porendurchmesser filtrieren	
	Lösung bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar	
Pepsinlösung	0,1 g	Pepsin in
	1 ml	Aqua dest.
	bei -20°C mehrere Jahre haltbar	
PBS-Gebrauchslösung	50 ml	PBS-Stocklösung auf
	1000 ml	mit Aqua dest. auffüllen
	Lösung bei Raumtemperatur 4 Wochen haltbar	
PBS-Stocklösung	1,4 g	Na ₂ HPO ₄
	0,2 g	KH ₂ PO ₄
	0,2 g	KCl
	8 g	NaCl mit Aqua dest. auf
	1000 ml	auffüllen und mit pH-Meter
	auf pH 7,4 einstellen	
	Lösung bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar	
1% Formalin/PBS-Lösung	1 g	Paraformaldehyd bei 50°C mit
		Magnetrührer in
	100 ml	PBS-Lösung auflösen
	Lösung bei Raumtemperatur 6 Wochen haltbar	
Hybridisierungsmix	7 µl	LSI/WCP-Hybridisierungspuffer
	2 µl	Aqua dest.
	1 µl	LAVysion™ <i>multicolor</i> Sonde
0,4xSSC/0,1% NP40-Lösung	20 ml	20xSSC Stammlösung
	950 ml	Aqua dest.

1ml NP40 (Nonyl-phenoxypolyethoxylethanol)
mit NaOH auf pH 7-7,5 einstellen und mit Aqua dest. auf
1000 ml auffüllen
Lösung bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar

2.4.3 Hybridisierung

Nach zytologischer Diagnosestellung wurden die interessierenden Regionen auf dem Deckglas des Präparates mit einem Filzstift gekennzeichnet („gekreist“). Ein zusätzlich angefertigtes Präparat war nicht notwendig. Anschließend wurde das Präparat photokopiert, um die Markierungen nach Ablösen des Deckglases übertragen zu können.

Die Durchführung der Hybridisierung mit der LAVysionTM-Sonde erfolgte nach dem in der Routinediagnostik verwendeten Protokoll des Instituts für Cytopathologie, Düsseldorf. Damit die Sonden an ihre komplementären DNA-Abschnitte binden können, muss die Ziel-DNA zunächst denaturiert werden. Erst danach schließt sich die Hybridisierungsphase an, in der die Sonden an die DNA binden. In weiteren Waschschritten werden überschüssige Sonden entfernt.

1. Entdeckung der Objektträger in Xylol für 1-3 Tage
2. Aufwässerung der Präparate durch eine absteigende Alkoholreihe:
 Je 2x 10 min in 100% Ethanol,
 2x 5 min in 95% Ethanol und
 2x 5 min in 80% Ethanol
3. Waschen unter fließendem Leitungswasser für 5 min
4. Entfärbung der Präparate mit 0,5%HCl/70% Ethanol für 15 min
5. Waschen unter fließendem Leitungswasser für weitere 5 min
6. Pufferung mit 2xSSC für 5 min im auf 73°C vorgeheizten Wasserbad
7. Andauung der Zellmembranen durch Pepsinlösung bei 37° in feuchter Kammer für 15 min
8. Waschen mit PBS für 5 min
9. Fixierung mit 1% Formalin/PBS-Lösung für 5 min
11. Waschen mit PBS für weitere 5 min
12. Entwässerung durch aufsteigende Alkoholreihe je 2 min in 70% ,85% und 100%
 Ethanollösung
13. Trocknen bei Raumtemperatur
14. Zufügen des Hybridisierungsmix (Tabelle 2.3) und wasserdichtes Abdecken mit Deckglas
 und Fixogum Rubber cementTM.
15. Denaturierung bei 73°C auf einer Heizplatte für 10 min
16. Hybridisierung bei 37°C in einer feuchten Kammer über Nacht

17. Entdeckung des Präparats in 0,4% SSC/0,1% NP40-Lösung für 1-5 min, lichtgeschützt
18. Pufferung und Spülung je 2 min in 0,4% SSC/0,1% NP40-Lösung, einmal bei 73°C im Wasserbad, einmal bei Raumtemperatur, lichtgeschützt
19. Waschen in Aqua dest., danach trocknen bei Raumtemperatur, lichtgeschützt
20. Gegenfärbung mit einem Tropfen DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid)
21. Eindeckelung und lichtgeschützte Lagerung bei 4°C bis zur Auswertung

Deckglasgröße in mm	Hybridisierungsmix in µl
18x18	7
15x15	5
Ø12	3
Ø10	2

Tabelle 2.3: Menge des angewandten Hybridisierungsmix je Deckglasgröße

2.4.4 Die Ermittlung des *Cutoff*-Wertes

In dieser Studie verwendeten wir ausschließlich die LAVysion™ multicolor Sonde der Firma Abbott Laboratories (vgl. auch Kap. 1.4.1.1).

Es wurden 60, mindestens jedoch 25 gut erhaltene, sich nicht überlagernde, morphologisch auffällige (vergrößert, unregelmäßige Kontur, fleckiges Muster in der DAPI-Färbung) Zellkerne nach der *Scanning*-Methode ausgezählt.

Da bei der FISH lediglich wenige in der Interphase befindliche Zellen ausgezählt werden, ist es wahrscheinlich, dass Zellen mitgezählt werden, die sich in der Synthesephase des Zellzyklus befinden. Diese würden in der FISH gegebenenfalls keinen 2ⁿ-fachen Chromosomensatz zeigen und daher als chromosomal aneuploid gewertet werden. Um falsch-positiven Diagnosen vorzubeugen, ist daher die Etablierung eines *Cutoffs* zur Dichotomisierung in FISH-positive und FISH-negative Diagnosen notwendig.

Als *Cutoff* zur Diagnose FISH positiv wurde eine Amplifikation von mindestens 2 der 4 untersuchten Zielregionen bei mindestens 6 Zellkernen bestimmt. Dieses Kriterium wurde als Anhaltswert aus der Literatur entnommen. Tabelle 2.4 zeigt exemplarisch einige Publikationen mit den jeweils gewählten *Cutoffs* und Ergebnissen. In allen angegebenen Publikationen wurde ebenfalls die LAVysion™-Sonde eingesetzt.

Wir entschlossen uns, den von uns gewählten *Cutoff* zunächst in einer Pilotstudie zu überprüfen.

Literaturangabe	Untersuchungsmaterial	Cutoff	Ergebnis
Bubendorf et al 2005 ⁹⁵	Bronchiallavagen, Bronchialbürstungen, transbronchiale Feinnadelaspirationsbiopsien	>5 Zellen mit einer Amplifikation von min 2 Loci, min 25 Zellen ausgezählt	FISH erhöht Sensitivität auf 73% (Spezifität 87%) in Bronchialbürstungen, für Lavagen und FNAB kein Vorteil gegenüber Zytologie entdeckt
Barkan et al 2004 ¹⁰³	Bronchialbürstungen, Tumorabklatschpräparate	>5 Zellen mit einer Amplifikation von min 2 Loci in 25 ausgezählten Zellen	Sensitivität: 40% Spezifität: 73%
Halling et al 2006 ¹⁰²	Bronchiallavagen, Bronchialbürstungen	>4 Zellen mit Amplifikation von min 2 Loci ODER >9 tetrasome Zellen (4-4- 4-4)	Bronchiallavagen: -Sensitivität: 49% -Spezifität: 95% Bronchialbürstungen: -Sensitivität: 71% -Spezifität: 83%
Savic et al 2006 ⁹⁷	Bronchiallavagen, Bronchialbürstungen, Sputum, transbronchiale FNAB	>3 Zellen mit Amplifikationen an min 2 Loci oder >5 Signale eines Locus in min 25 ausgezählten Zellen, die durch computergestützte Relokalisation aufgefunden wurden	Sensitivität: 79% Spezifität: 100%

Tabelle 2.4: ausgewählte Studien zur Sensitivität und Spezifität von FISH bei unterschiedlichem Cutoff unter Verwendung der LAVysion™-Sonde

In der Pilotstudie untersuchten wir die Präparate von 24 Patienten mit bekanntem *Follow-Up* retrospektiv mit der LAVysion™-Sonde. 4 Präparate waren allerdings nicht in der FISH auswertbar und wurden aus der Studie genommen.

Alle Präparate wurden unabhängig voneinander von 2 Untersuchern unter Berücksichtigung des oben genannten Cutoffs beurteilt. Bei Nichtübereinstimmung wurde ein dritter Untersucher hinzugezogen und eine Mehrheitsentscheidung getroffen.

Die Ergebnisse der Pilotstudie sind im Kap. 3.3.1 aufgeführt.

Ein Problem vorangegangener Studien war unserer Ansicht nach die suboptimale Spezifität der LAVysion™-Sonden. Der von uns vermutete Grund liegt in der unzureichenden Berücksichtigung polyploider Zellen, welche z.B. im Falle reparativer Veränderungen bei chronischer Bronchitis beobachtet werden⁹⁴. Eine polyploide Zelle wird durch oben genannte Kriterien nicht von einer aneuploiden Zelle unterschieden. Daher wurde folgendes zusätzliches Kriterium eingeführt:

Ein tetraploider Zellkern ist z.B. wie folgt definiert: 4 Signale pro Zielregion bei mindestens 3 der 4 Sonden (4-4-4-4 oder 4-4-4-3). Analoges gilt für oktaploide Kerne (Abb. 2.1).

Eine Deletion eines Genortes wurde nicht als FISH positiv gewertet.

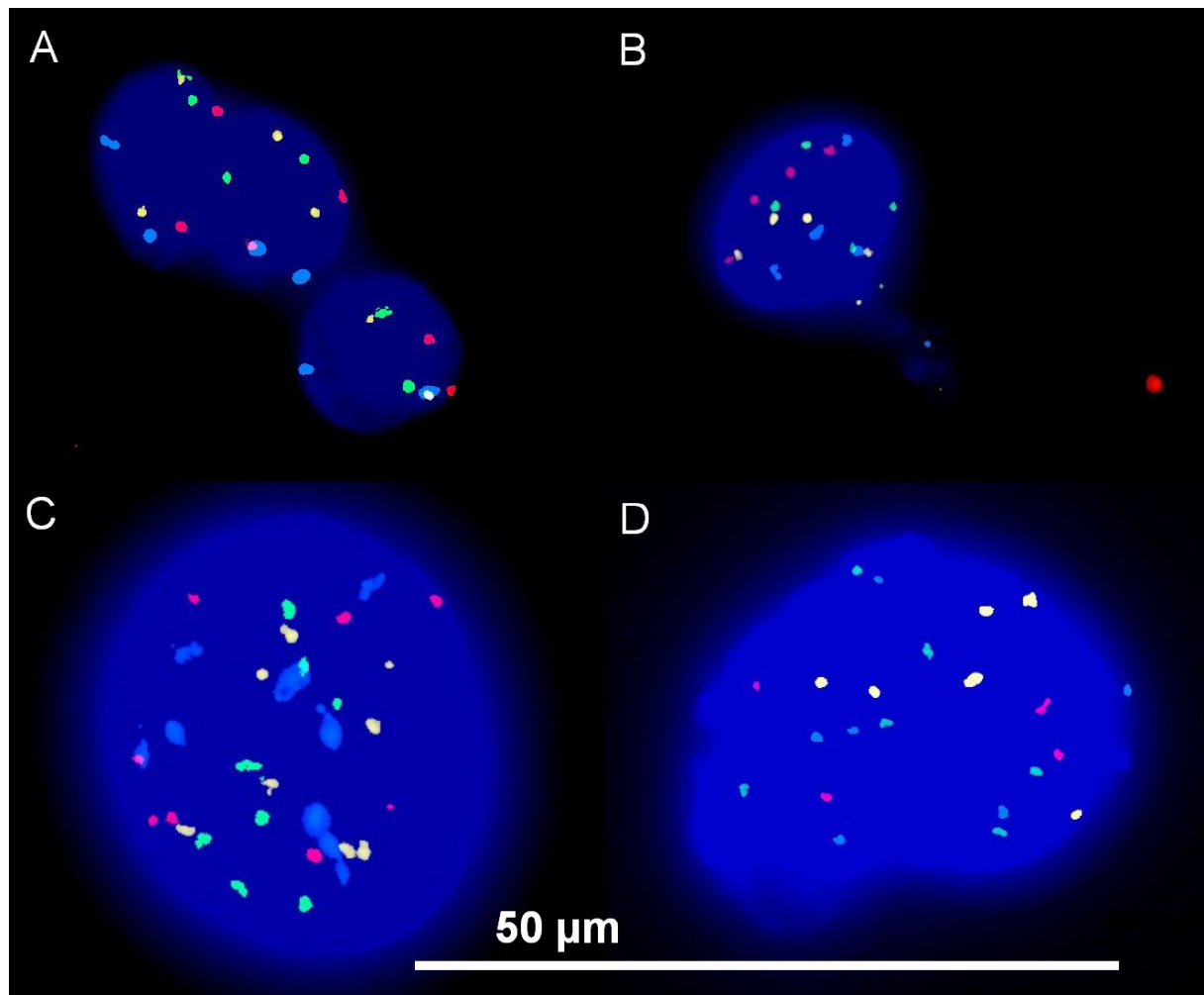


Abb. 2.1: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; A: 3 normale diploide Zellen (2c) mit je 2 Signalen; B: tetraploide Zelle (4c) mit je 4 Signalen; C: oktaploide Zelle (8c) mit je 8 Signalen (vorab publiziert in *Cancer Cytopathology*⁸⁹); D: aneuploide Zelle mit 4 roten, 6 blauen, 6 grünen und 6 gelben Signalen (alle Aufnahmen mit 63x Objektiv)

2.4.5 Auswertung

Die Auswertung der Präparate fand an einem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M1™ der Firma Carl Zeiss statt, das mit je einem Filter für DAPI, SpectrumGreen™, SpectrumRed™, SpectrumGold™ und SpectrumAqua™ ausgestattet war. Die Auszählung der Kerne fand in 63facher Vergrößerung unter Zuhilfenahme von nicht fluoreszierendem Immersionsöl statt. Die Präparate wurden wie in der Pilotstudie bereits praktiziert von jeweils 2 verschiedenen Untersuchern ohne Kenntnis der zytologischen Diagnose durchgeführt. Stimmt die Untersucher in ihrer Beurteilung nicht überein, wurde das Präparat von einem dritten Untersucher mikroskopiert und diagnostisch beurteilt. Anschließend wurde eine Mehrheitsentscheidung gefällt.

Dabei habe ich persönlich insgesamt 100 Präparate aller diagnostischen Kategorien selbständig ausgewertet.

Die Präparate wurden anhand des oben beschriebenen *Cutoffs* als „FISH positiv“ oder „FISH negativ“ gewertet.

2.5 DNA-Bildzytometrie

2.5.1 Materialien und Geräte

Tabelle 2.5 zeigt die benötigten Materialien und Geräte für die DNA-Bildzytometrie.

Materialien und Geräte	Hersteller	Bestell- od. Seriennummer
Xylol	Merck	1.08685.2500
5 N HCl	Merck	1.09911.0001
1 N HCl	Merck	1.09970.0001
10% gepuffertes Formalin	Sigma-Aldrich	HT 50-1-128
K ₂ S ₂ O ₅	Merck	1.09970.0001
Schiff's Reagenz	Merck	1.09033.0500
Färbeautomat Varistain 24-4	Shandon	74200002
Heizküvette für Varistain	Tharmac	Sonderanfertigung

Tab.2.5: Liste der benötigten Materialien und Geräte für die DNA-Bildzytometrie

2.5.2 Lösungen und Ansätze

SO ₂ -Stammlösung	100g	K ₂ S ₂ O ₅ in
	900ml	Aqua dest. auflösen
	Lösung bei Raumtemperatur 6 Monate haltbar	
gebrauchsfertige SO ₂ -Lösung	1350ml	Aqua dest.
	75ml	SO ₂ -Stammlösung
	75ml	1 N HCl
	Lösung wurde vor jeder Färbung erneuert	

2.5.3 Färbung nach Feulgen

Zunächst wurden die Präparate von einem zytologisch erfahrenen Pathologen befundet und morphologisch auffällige Zellgruppen für die DNA-Bildzytometrie mit einem wasserfesten Filzstift auf dem Deckglas markiert. Danach wurden die Präparate fotokopiert, um die Zellgruppen auch nach der Färbung wiederzufinden. Dadurch wurden mit der DNA-Bildzytometrie die gleichen Zellgruppen gemessen, die bereits für die zytologische Diagnose relevant waren. Dann wurden die Präparate für die Färbung freigegeben.

Alle Verarbeitungsschritte wurden im Färbeautomaten Varistain 24-4 der Firma Shandon durchgeführt¹¹³.

1. Entdeckung der Präparate in Xylol für 15 min

2. Aufwässerung durch absteigende Alkoholreihe je 5 min in 99,5% und 96% Ethanol
3. Fixierung und Stabilisierung der DNA durch 10% Formalin für 50 min
4. Zweimaliges Spülen in Aqua dest. für 10 min
5. Saure Hydrolyse in 5 N HCl für 60 min bei 27°C
6. Dreimaliges Spülen in Aqua dest. für je 2 min
7. Färbung mit Schiff's Reagenz für 60 min
8. Dreimaliges Spülen in gebrauchsfertiger SO₂-Lösung für je 5 min und zwei Mal in Aqua dest. für je 1 min
9. Entwässern durch aufsteigende Alkoholreihe mit 70%, 96% und 99,5% Ethanol für je 10 min
10. Fixierung in Xylol für 15 min

Die Feulgen-Färbung ist eine spezifische stöchiometrische Färbung der DNA. Dadurch wird die quantitative Messung der DNA in der DNA-Bildzytometrie möglich.

In einem ersten Schritt wird die DNA mit Formalin fixiert, um sie im nächsten Schritt gegenüber der Salzsäure zu stabilisieren. Durch saure Hydrolyse werden Purin-Basen aus der DNA entfernt, dadurch entstehen freie Aldehydgruppen.

Im nächsten Schritt entsteht durch Reaktion mit dem Schiff'schen Reagenz eine Schiff'sche Base, welche eine Eigenfärbung der DNA bewirkt. Die Zellkerne erhalten so eine violette Färbung, das Cytoplasma bleibt aufgrund fehlender DNA ungefärbt (Abb 2.2).

2.5.4 Auswertung

Die Auswertung der Präparate fand an einem Axioplan 2™ Mikroskop der Firma Zeiss mit einer Schwarz-Weiß-Kamera (VariCam CCIR™) und der AutoCyte QUIC-DNA-Workstation Software™ statt. Einige Präparate wurden auch an einem zweiten Gerät untersucht, einem Motic BA400 microscope™ (Motic, Xiamen, China). Dieses ist mit einer MotiCamPro 285A Kamera™ (Motic, Xiamen, China) mit einer Auflösung von 1360x1024 Pixeln und der MotiCyte DNA image cytometry software™ (Motic, Xiamen, China) ausgestattet. Jedes Präparat wurde von einem Untersucher beurteilt. Alle Messungen wurden in 40facher Vergrößerung durchgeführt.

Von mir persönlich wurden 83 Präparate aller diagnostischen Kategorien selbständig beurteilt.

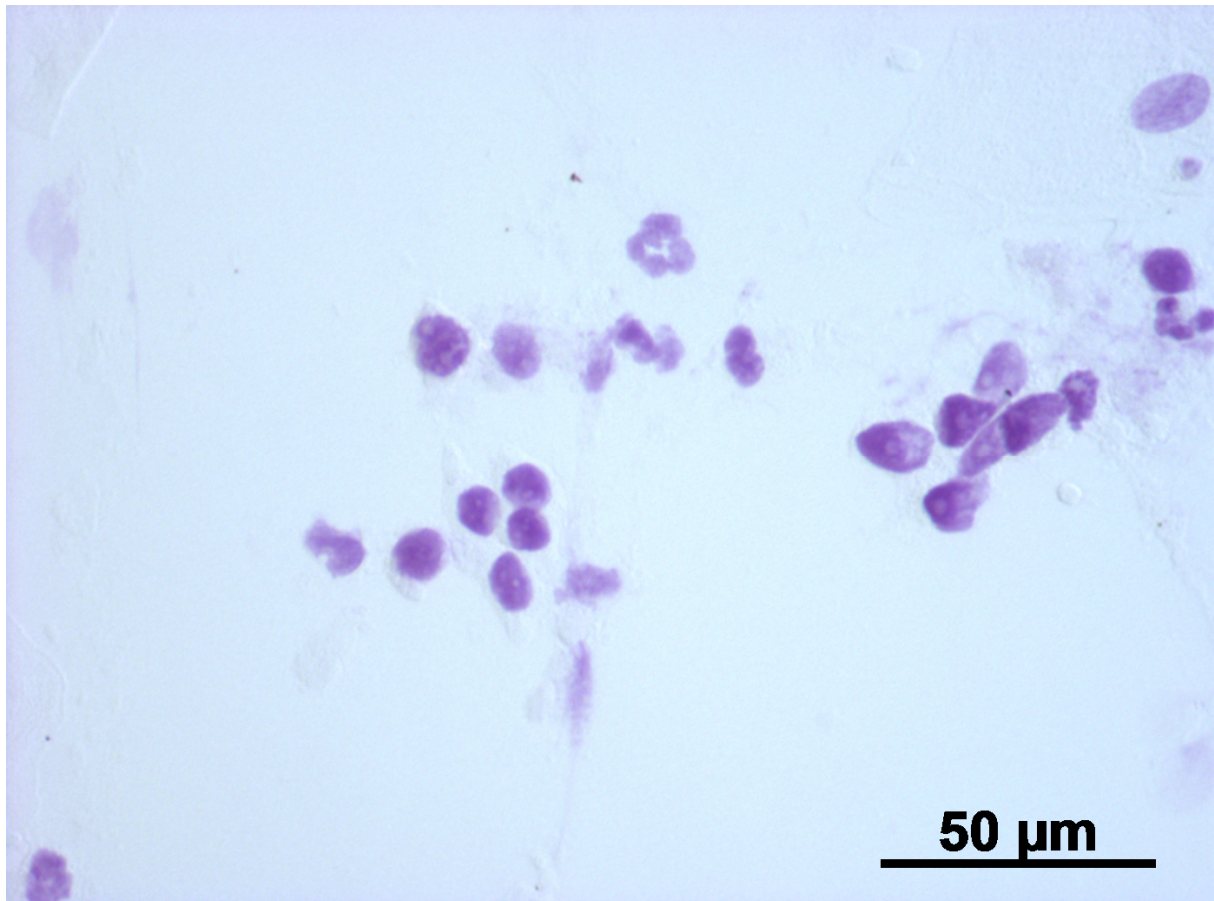


Abb. 2.2: nach Feulgen gefärbtes Präparat einer bronchioalveolären Lavage (40x Objektiv)

Es wurden mindestens 30 morphologisch normale Bronchialepithelzellen, Lymphozyten oder Granulozyten als interne Referenzzellen gemessen. Der Variationskoeffizient der IOD (CV) der Referenzzellen lag bei jeder Messung unter 5%. Der Korrelationskoeffizient zwischen IOD und Fläche der Zellkerne lag bei jeder Messung zwischen -0,4 und +0,4.

Die mittlere IOD der Referenzzellen wurde als 2c definiert.

Es wurden in der Regel 300, mindestens aber 60 morphologisch auffällige Analysezellen in einem Histogramm ausgewertet, in dem der DNA-Gehalt jeder einzelnen Zelle aufgetragen wurde. Der größte Häufigkeitsgipfel wird hierbei als Stammlinie bezeichnet, wenn sich in der Verdopplungsregion des DNA-Gehaltes ebenfalls wenige Zellen befinden. Im Falle normaler Bronchialepithelien läge demnach die Stammlinie bei einem DNA-Gehalt von 2c (entspricht einem diploiden Chromosomensatz). Einige morphologisch unauffällige prämitotische Zellen befänden sich nach der Synthesephase des Zellzyklus (G2/M-Phase) und hätten einen DNA-Gehalt von 4c, was einem tetraploiden Chromosomensatz entspräche. Es wurden vor allem Zellkerne in Regionen untersucht, die aufgrund von zytologischen Auffälligkeiten in der Papanicolaou-Färbung markiert wurden.

2.5.5 Malignitätskriterien

Die Auswahl der zu messenden Analysezellen wurde anhand der in Kap. 1.2 und 2.3.5 genannten Kriterien getroffen.

Als Kriterium für die Diagnose „DNA-bildzytometrisch positiv“ wurde der Nachweis einer Aneuploidie festgelegt.

Als Nachweis für eine Aneuploidie definierten wir für die vorliegende Studie zwei verschiedene Merkmale, welche allgemein als DNA-zytometrische Malignitätskriterien im Institut für Cytopathologie im Rahmen der Routinediagnostik Anwendung finden:

1. DNA-Stammlinienverschiebung auf $<1,80c$ oder $>2,20c$ bzw. $<3,60c$ oder $>4,40c$ (Abb. 2.3 B)
2. Aneuploidie einer einzelnen Zelle $>9c$ (*9c exceeding event*)⁹⁰ (Abb. 2.3 C)

Sobald der Nachweis eines dieser Merkmale gelang, wurde die Diagnose „DNA-bildzytometrisch positiv“ gestellt.

Bei einer DNA-Stammlinie zwischen $1,80c$ und $2,20c$ bzw. $3,60c$ und $4,40c$ ohne Auftreten von *9c exceeding events* wurde die Diagnose „DNA-bildzytometrisch negativ“ gestellt (Abb. 2.3 A).

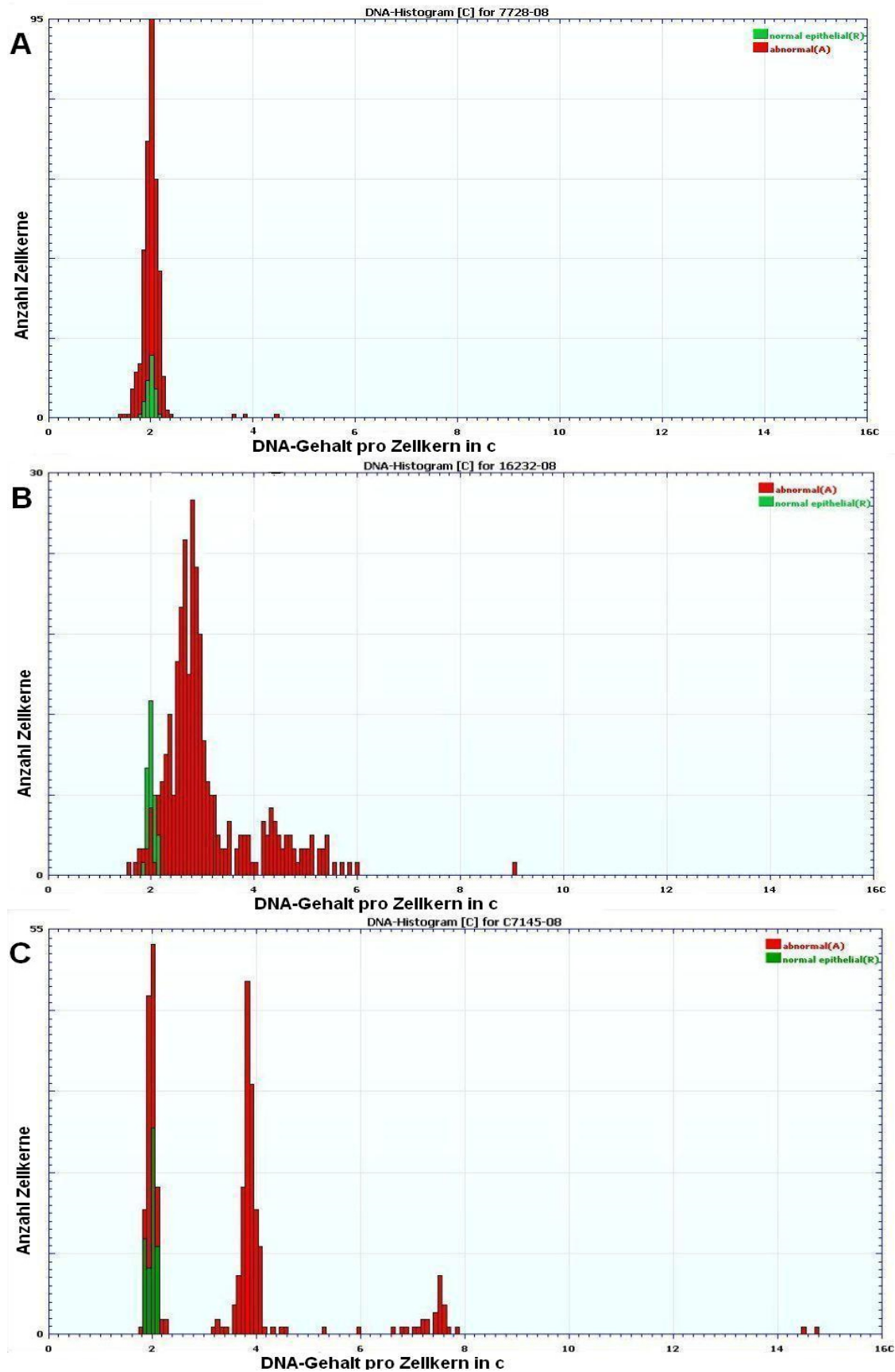


Abb. 2.3: Histogramme der DNA-Bildzytometrie (vorab publiziert in Cancer Cytopathology⁸⁵) grüne Balken stehen für die gemessenen Referenzzellen, rote Balken für die Analysezellen; A: normale euploide Stammlinie (2c); B: aneuploide DNA-Stammlinienverschiebung (2,73c); C: Polyploidisierung der Stammlinie, jedoch mit zwei Zellen >9c, daher DNA-bildzytometrisch positiv, im Follow-up ergab sich hier ein falsch positiver Befund

2.6 *Follow-Up* und Referenzstandard

Das *Follow-Up* fand frühestens 11 Monate nach Eingang der ersten Probe statt. Die Krankenakten der in der Studie teilnehmenden Patienten wurden im Archiv des Florence-Nightingale-Krankenhauses, Düsseldorf, eingesehen (dabei selbständige Auswertung von 105 Krankenakten) und ein vorab wie folgt definierter Referenzstandard ermittelt:

Der positive Referenzstandard (Patient hat einen malignen Lungentumor) wurde auf zwei mögliche Weisen definiert:

1. tumorpositive histologische Diagnose anhand einer bronchoskopisch gewonnenen Biopsie oder an reseziertem Material aus der gleichen anatomischen Region wie die zytologische Probe
2. zytologische Diagnose „positiv“ mit passender Klinik bzw. Einleitung einer Tumorthherapie

Der negative Referenzstandard (Patient hat keinen malignen Lungentumor) wurde wie folgt definiert:

Histologische oder zytologische Diagnose „negativ“ und Übereinstimmung mit dem klinischen Gesamtbild oder negatives Follow-Up während des oben genannten Zeitraums

2.7 Statistische Methoden

Sämtliche Berechnungen wurden mit dem Programm Minitab[™] Ver. 15.1.30.0 (Minitab Inc., PA, USA) durchgeführt.

Der exakte Test nach Fischer wurde eingesetzt zur Analyse der Kontingenztafeln auf statistische Signifikanz.

Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ festgesetzt.

Sensitivität, Spezifität, PPV und NPV inklusive 95% Konfidenzintervall wurden getrennt für Zytologie, FISH und DNA-Bildzytometrie berechnet. Für die statistische Auswertung wurden zytologisch unklare Proben als positiv bewertet.

Sensitivität „gibt die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Test unter den tatsächlich Kranken an¹²⁷.“ Spezifität „gibt die Wahrscheinlichkeit für einen negativen Test unter den tatsächlich Gesunden an¹²⁷.“ Der positive prädiktive Wert „gibt die Wahrscheinlichkeit an, krank zu sein, falls ein positives Testergebnis vorliegt¹²⁷.“ Der negative prädiktive Wert „gibt die Wahrscheinlichkeit an, gesund zu sein, falls ein negatives Testergebnis vorliegt¹²⁷.“

Die Ergebnisse von FISH und DNA-Bildzytometrie wurden mittels Fleiss-Kappa-Test auf Übereinstimmung überprüft.

3. Ergebnisse

3.1 Das Patientenkollektiv

Insgesamt wurden bronchoskopisch entnommene Proben von 210 Patienten untersucht und in die Studie einbezogen. An mehreren Patienten wurde mehr als eine Probenart (z.B. Lavage und Bürstenbiopsie) entnommen. In diesen Fällen wurde jeweils die das weitere klinische Handeln bestimmende Probe mit der höchsten Malignitätswahrscheinlichkeit in die Studie einbezogen.

Jeweils 70 einbezogene Patientenproben waren zytologisch sicher negativ und sicher positiv, weitere 70 Proben waren zytologisch zweifelhaft oder dringend malignitätsverdächtig und wurden als diagnostisch unklar eingestuft.

Insgesamt 198 der 210 Patienten (94,3%) erfüllten die Anforderungen des vorab definierten positiven oder negativen Referenzstandards und wurden zur Auswertung herangezogen. Von den 198 Proben entfielen 66 auf die Gruppe sicher negativ, 68 auf die Gruppe sicher positiv und 64 auf die diagnostisch unklare Diagnosegruppe. Die Abb. 3.1 zeigt den Weg der Patienten durch die Studie.

Die erhebbaren Daten von 12 Patienten erfüllten den Referenzstandard nicht: Bei 5 Patienten konnten die Akten nicht gefunden werden, 2 Patienten verstarben, während die Diagnose ermittelt wurde, 2 Patienten mit hochgradigem Karzinomverdacht lehnten weitere diagnostische Maßnahmen ab, bei 2 Patienten zeigte sich bei Akteneinsicht eine vorherige Lungenkarzinomdiagnose (Studienausschluss), und ein Patient wurde aufgrund einer zytologisch dringend tumorverdächtigen Diagnose behandelt. Eine definitive histologische oder zytologische Tumordiagnose lag nicht vor.

In 124 Fällen wurde bei den Patienten ein primäres Lungenkarzinom diagnostiziert, 63 Patienten zeigten im *Follow-Up* benigne Lungenerkrankungen, weitere 23 Patienten hatten maligne primäre nichtkarzinomatöse Lungenneoplasien, Lungenmetastasen anderer Primärtumoren oder erfüllten nicht die Anforderungen des Referenzstandards (Tabelle 3.1).

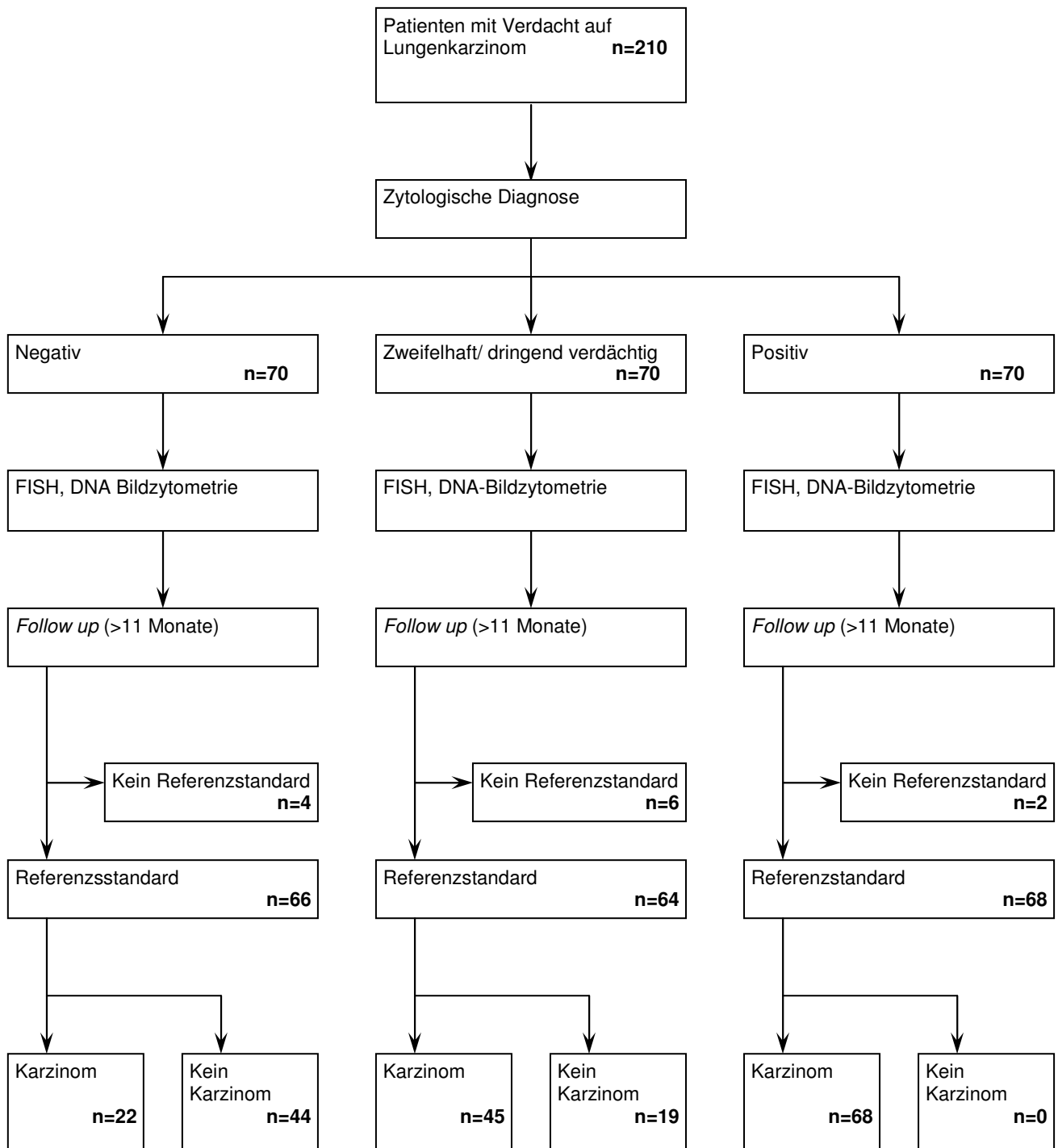


Abb. 3.1: modifiziertes STARD-Diagramm zur Veranschaulichung des Weges der Patienten durch die Studie

	Benigne Lungenerkrankungen* n=63	Primäres Lungenkarzinom n=124	Andere † n=23
Alter	65 (26-88)	66 (34-88)	66 (26-83)
Geschlecht weiblich männlich	30 (48%) 33 (52%)	48 (39%) 76 (61%)	7 (30%) 16 (70%)
Raucheranamnese Raucher pack-years nie geraucht keine Daten	34 (54%) 40 (6-150) 10 (16%) 19 (30%)	100 (81%) 40 (10-150) 10 (8%) 14 (11%)	8 (35%) 40 (30-60) 5 (22%) 10 (43%)
Tumortyp ¶ SCLC NSCLC Adenokarzinom Plattenepithelkarzinom Mischdifferenzierung mit Kleinzeller andere**		31 (25%) 17 (14%) 52 (42%) 20 (16%) 3 (2%) 1 (1%)	0 (0%) 2 (8,5%) 5 (22%) 0 (0%) 0 (0%) 16 (69,5%)
Lokalisation zentral peripher andere		84 (68%) 38 (30,5%) 2 (1,5%)	
Tumorstadium ‡ 0 IA IB IIB IIIA IIIB IV nicht ermittelt § limited disease extensive disease		1 (1%) 4 (4%) 14 (13,5%) 5 (5%) 13 (12,5%) 27 (26%) 37 (36%) 2 (2%) 7 (35%) 13 (65%)	

* benigne Lungenerkrankungen: akute oder chronische Bronchitis (35), Pneumonie (9), interstitielle Lungenerkrankungen (7), Narben (3), Lungenembolie (3), Pleuritis (1), Hämoptysen (1), Atelektasen (1), gastroösophagealer Reflux (1), Hamartom (1), mediastinales Neurinom (1)

†enthält u.a.: Patienten mit pulmonalen Metastasen von Karzinomen der Mamma (1), Vulva (1), Cervix uteri (1), Magen (1) und Kolon/Rektum (3) sowie verschiedene andere Entitäten

‡ nur primäre Lungenkarzinome berücksichtigt

§ in einem Fall verstarb der Patient, bevor ein Tumorstaging durchgeführt werden konnte, ein zweiter Patient verließ das Krankenhaus vor Beendigung des Stagings

|| diffus metastasierendes SCLC (1), zervikale und mediastinale Lymphknotenmetastasen eines pulmonalen Adenokarzinoms ohne entdeckten Primarius (1)

¶ in 9 Fällen basiert die Tumorklassifikation allein auf der zytologischen Diagnose

** Primäres Lungensarkom (1), metastasiertes Melanom (1), atypisches Karzinoid (1), non Hodgkin Lymphom (2), kein Referenzstandard (12).

Tabelle 3.1: die klinischen Daten der 210 Patienten der Studie (vorab publiziert⁸⁹)

3.2 Ergebnisse der Zytologie

Von 198 zytologischen Proben (94,3%) konnte ein Referenzstandard im Rahmen des *Follow-up* ermittelt werden und diese wurden zur Auswertung herangezogen.

135 Proben erfüllten einen positiven Referenzstandard, 63 Proben erfüllten einen negativen Referenzstandard.

175 Proben konnten sowohl zytologisch als auch mit FISH und DNA-Bildzytometrie ausgewertet werden und werden im Folgenden als Kohorte „Methodenvergleich“ der Gesamtkohorte gegenübergestellt.

Für die statistische Auswertung wurden zytologisch unklare Proben als positiv gewertet (Tabelle 3.2-3.4, Fehlbefunde in Tabelle 3.3 und 3.4 farbig unterlegt).

Eine weitere Differenzierung der verschiedenen Probearten bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität wurde nicht unternommen, da es das Ziel dieser Doktorarbeit ist, die diagnostische Treffsicherheit der Lungenzytologie mit den adjuvanten Methoden FISH und DNA-Bildzytometrie zu vergleichen, unabhängig von der Art der Probe.

In der Gesamtkohorte erreichte die alleinige zytologische Untersuchung eine Sensitivität von 83,7% und eine Spezifität von 69,8%, in der Kohorte „Methodenvergleich“ lagen diese Werte bei 82,1% bzw. 78,8% (s. Tabelle 3.2).

	Sensitivität mit 95%-KI	Spezifität mit 95%-KI	Positiver prädiktiver Wert	Negativer prädiktiver Wert	n	
Gesamtkohorte	83,7% [0,775; 0,899]	69,8% [0,585; 0,811]	85,6% [0,796; 0,916]	66,7% [0,556; 0,778]	198	p<0,0001
Methodenvergleich	82,1% [0,753; 0,889]	78,8% [0,677; 0,899]	90,2% [0,847; 0,957]	65,1% [0,534; 0,768]	175	p<0,0001

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Zytologie

Zytologische Diagnose	Referenzstandard	
	positiv	negativ
positiv	113	19
negativ	22	44

Tabelle 3.3: Vergleich der qualitativen zytologischen Diagnose mit dem Referenzstandard

Zytologische Diagnose	Referenzstandard	
	positiv	negativ
Negativ	22	44
Positiv	68	0
dringend verdächtig	34	5
Zweifelhaft	11	14

Tabelle 3.4: Vergleich der zytologischen Diagnose mit dem Referenzstandard

Von 132 Patienten mit zytologisch unklarer oder positiver Diagnose hatten 113 einen malignen Lungentumor, bei 19 Patienten konnte im *Follow-Up* keine Tumorerkrankung nachgewiesen werden (s. Tabelle 3.3). Von den 68 Patienten mit zytologisch positivem Ergebnis hatten alle einen malignen Lungentumor. Aus der Gruppe der unklaren Zytologien wiesen 45 der 64 Patienten einen malignen Lungentumor im *Follow-Up* auf.

Bei 19 Patienten mit qualitativ positiver Diagnose konnte kein maligner Lungentumor nachgewiesen werden, diese entsprechen also falsch-positiven Befunden. 14 dieser Proben gehörten zur Kategorie „zweifelhaft“. 13 dieser Proben konnten mit FISH untersucht werden, was 12 mal ein negatives Ergebnis und einmal ein positives Ergebnis ergab.

Mit DNA-Zytometrie konnten von diesen 14 Proben 11 untersucht werden, was in allen Fällen keinen Nachweis eines malignen Lungentumors ergab.

5 Patienten mit qualitativ falsch positiver zytologischer Diagnose gehörten zur Kategorie „dringend verdächtig auf maligne Tumorzellen“. FISH konnte nur an einem Präparat angewendet werden, das Ergebnis war negativ.

DNA-Zytometrie konnte am selben Präparat wie FISH sowie an einer weiteren Probe angewendet werden, ebenfalls zweimal mit negativem Ergebnis. 3 Präparate waren auch mit der DNA-Zytometrie nicht auszuwerten.

Von 66 Patienten mit initial negativer Zytologie hatten 44 im *Follow-up* keinen malignen Lungentumor, diese entsprechen also den richtig-negativen Befunden.

22 Patienten mit negativer zytologischer Diagnose hatten hingegen einen malignen Lungentumor.

An allen diesen 22 Präparaten konnten sowohl FISH als auch DNA-Bildzytometrie angewandt werden. Von diesen 22 Patientenproben enthielten 3 Proben in der FISH (davon auch 2 in der DNA-Bildzytometrie) nachweisbare aneuploide Zellen. Eine erneute Durchsicht der verbliebenen nach Papanicolaou gefärbten Präparate zeigte in allen Fällen wenn auch zum Teil nur ganz vereinzelt zytologisch atypische Zellen. Also ist bei 3 Präparaten von einem *screening error*, in den anderen 19 Präparaten von einem *sampling error* auszugehen.

Im Rahmen der Routinediagnostik wurden die zytologisch negativen Präparate je nach Vorhandensein und Menge bestimmter entzündlicher Zellen im Präparat einer diagnostischen Untergruppe zugeordnet (s. Abb. 3.2 und 3.3). Hierbei dominieren die Diagnosen mit entzündlichen Veränderungen des Bronchialsekrets.

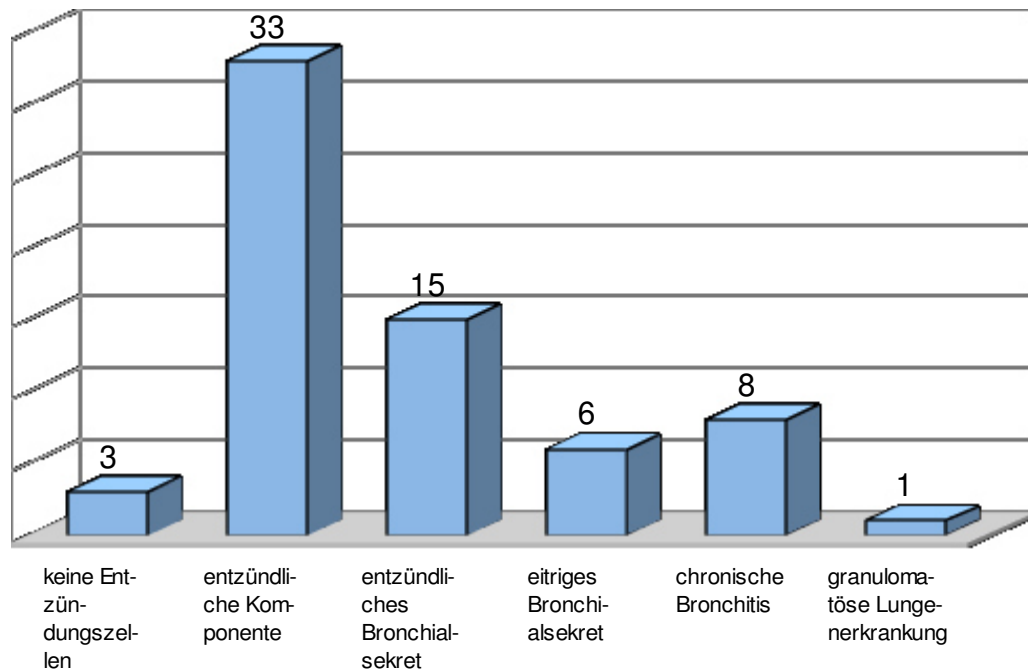


Abb. 3.2: Die Verteilung der zytologisch negativen Präparate in einzelne diagnostische Untergruppen

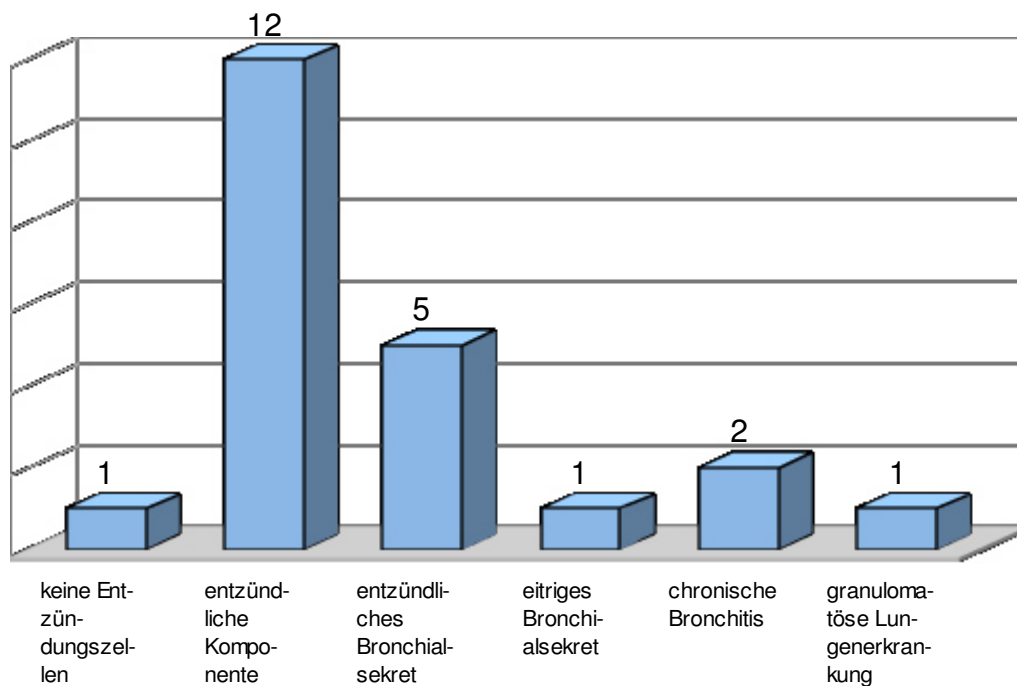


Abb. 3.3: Die Verteilung der zytologisch falsch-negativen Präparate in einzelne diagnostische Untergruppen

Für die Kategorie zytologisch „zweifelhaft“ gab es zwei diagnostische Untergruppen, in die sich die Präparate je nach Vorhandensein und Ausprägung von dysplastischen Bronchialepithelien einordnen lassen (s. Tabelle 3.5).

	Dysplasie Grad I	Dysplasie Grad II
alle zytologisch zweifelhaften Präparate	9	16
zytologisch zweifelhafte Präparate mit negativem Referenzstandard	8	6

Tabelle 3.5: Die zytologisch zweifelhaften Präparate und ihre Zuordnung in diagnostische Untergruppen

Die Proben der Kategorie zytologisch „dringend verdächtig“ lassen sich ebenfalls zwei diagnostischen Untergruppen zuordnen: Proben mit hochgradig dysplastischen Bronchialepithelien sowie Proben mit wenigen atypischen Zellen ohne eindeutigen Nachweis von Malignität (s. Tabelle 3.6).

	Dysplasie Grad III	wenige atypische Zellen
alle zytologisch dringend verdächtigen Präparate	4	35
zytologisch dringend verdächtige Präparate mit negativem Referenzstandard	1	4

Tabelle 3.6: Die zytologisch dringend verdächtigen Präparate und ihre Zuordnung in diagnostische Untergruppen

Bei den Proben aus der Kategorie „zytologisch positiv“ wurde zudem versucht, eine Aussage zur Tumorentität zu treffen (Abb. 3.4). Häufig wurde die zytologische Diagnose in der Histologie bestätigt (Tabelle 3.7). Eine Ausnahme davon bilden die zytologisch diagnostisierten Plattenepithelkarzinome. Hier kam es zu 11 Abweichungen zwischen zytologischer und histologischer Diagnose. In 10 dieser Fälle liegt nur eine Biopsie zum Vergleich vor, in der häufig ein Adenokarzinom diagnostiziert wurde. Nur in einem Fall wurde histologisch anhand des Operationspräparates ein gering differenziertes adenosquamöses Karzinom diagnostiziert, zytologisch war also nur der plattenepitheliale Anteil erkennbar. Dieses grundsätzliche Problem der Repräsentativität einer histologischen oder zytologischen Biopsie für den Gesamttumor ist gerade in der Lungenpathologie aufgrund der Häufigkeit von mischdifferenzierten Tumoren relevant, kann jedoch häufig nur am vollständigen Resektat erfasst werden¹²⁸.

Grundsätzlich unterliegt die histologische Aufarbeitung einer Biopsie also ebenso dem *sampling error* wie die Zytologie.

Demgegenüber steht eine Anzahl von 4 Proben in dieser Gruppe mit negativer Histologie, welche jedoch in der Zytologie und im *Follow-Up* einen malignen Tumor aufwiesen. Eine bessere Übereinstimmung erzielte die Zytologie, wenn man die zytologischen Diagnosen nur auf die Unterscheidung zwischen kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen reduziert (Tabelle 3.8). Alle 42 zytologisch diagnostizierten nicht-kleinzelligen Karzinome wurden in der histologischen Aufbereitung bestätigt. Bei den kleinzelligen Karzinomen gab es unter der Annahme einer für den Gesamttumor repräsentativen Probenentnahme zwei Fehlbefunde. Bei beiden Patienten wurde histologisch anhand einer Biopsie ein Adenokarzinom diagnostiziert.

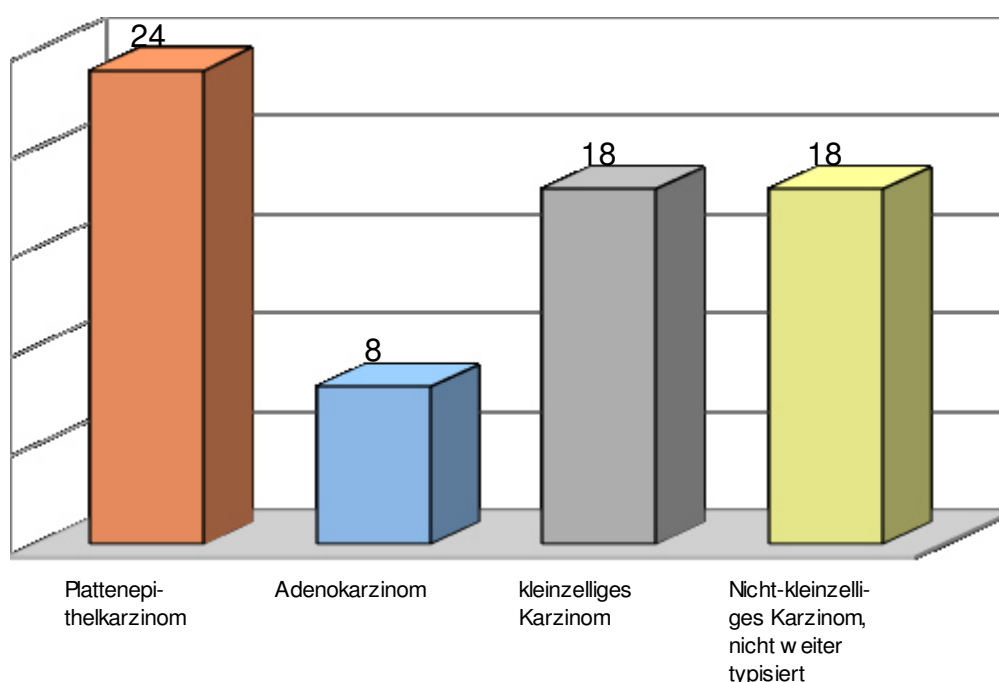


Abb. 3.4: Die zytologischen Tumordiagnosen der zytologisch positiven Präparate

Zytologische Diagnose	Übereinstimmung mit histologischer Diagnose					
	ja		nein		keine Histologie	Histologie negativ
	Biopsie	OP-Resektat	Biopsie	OP-Resektat		
Plattenepithelkarzinom	5	3	10	1	1	4
Adenokarzinom	5	1	0	0	2	0
Kleinzelliges Karzinom	14	0	2	0	1	1
NSCLC, nicht weiter typisiert	16	1	0	0	1	0

Tabelle 3.7: Die zytologischen Diagnosen der positiven Präparate und ihr Vergleich mit der korrespondierenden Tumorhistologie

Zytologische Diagnose	Übereinstimmung mit histologischer Diagnose			
	ja	nein	keine Histologie	Histologie negativ
NSCLC	42	0	4	4
SCLC	14	2	1	1

Tabelle 3.8: Die zytologischen Diagnosen der positiven Präparate hinsichtlich der Unterscheidung in SCLC und NSCLC und Vergleich mit der korrespondierenden Tumorphistologie

3.3 Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

3.3.1 Die Ergebnisse der Pilotstudie

In einem ersten Schritt noch vor Beginn der vorliegenden Studie entschlossen wir uns, den von uns gewählten *Cutoff*-Wert in einer Pilotstudie zu validieren (s. Kap. 2.4.4).

Es wurden Präparate von 24 Patienten mit bekanntem Follow-Up retrospektiv mit der LAVysion™-Sonde untersucht. Vier Präparate waren nicht auswertbar mit der FISH-Sonde und wurden nicht in die Pilotstudie eingeschlossen.

In der Auswertung ergab sich für unseren *Cutoff*-Wert für die LAVysion™-Sonde eine Sensitivität von 84,6% und eine Spezifität von 100%, so dass wir den gewählten Cutoff auch in der vorliegenden Studie übernahmen (s. Tabelle 3.9 und 3.10).

	positiv	dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ
Zytologie	4	3	6	7
FISH	11	-	-	9
Follow-Up	13	-	-	7

Tabelle 3.9: Auswertung der Zytologie und der FISH im Vergleich mit dem *Follow-Up* (Pilotstudie)

	FISH
Sensitivität	84,6%
Spezifität	100%

Tabelle 3.10: Sensitivität und Spezifität von FISH (Pilotstudie)

3.3.2 Die Ergebnisse der FISH in der Studienpopulation

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung konnte an 189 von 198 Proben (95,5%) beurteilt werden. Davon entfielen 68 Proben auf die zytologische Kategorie „positiv“, 65 auf zytologisch „negativ“ und 56 Proben auf die Gruppe zytologisch „unklar“.

9 Proben wiesen Artefakte in einer oder mehr Sonden auf und konnten nicht ausgewertet werden. 8 von diesen Proben entfielen auf die Gruppe „unklare Zytologie“, eine Probe war

zytologisch negativ. 5 dieser Präparate waren auch mit der DNA-Zytometrie nicht auswertbar.

In unserer Studie wies die Fluoreszenz in situ Hybridisierung eine signifikante erhöhte Spezifität im Vergleich zur Zytologie auf, allerdings bei leicht erniedrigter Sensitivität (Tabelle 3.11).

Für die uns besonders interessierende Kohorte der zytologisch unklaren Präparate berechneten wir gesondert die statistischen Maßzahlen (Tabelle 3.11).

Insgesamt konnten 56 von 64 zytologisch unklaren Präparaten mit Referenzstandard (87,5%) mit FISH beurteilt werden. Davon entfielen 22 auf die Diagnose „zweifelhaft“ und 34 auf die Diagnose „dringender Tumorverdacht“. 46 FISH-Diagnosen nach unklarer Zytologie entsprachen der *Follow-Up* Diagnose (78,1%), 10 waren falsch, weitere 8 Präparate nicht auswertbar (zusammen 28,2%).

Vergleicht man die Ergebnisse der diagnostisch unklaren Präparate mit denen der Gesamtkohorte, so ist die Spezifität etwas geringer, während die Sensitivität minimal ansteigt. Die Ergebnisse der Untergruppen „zweifelhaft“ und „dringender Verdacht“ weichen von dieser Feststellung ab, erreichen aber keine statistische Signifikanz.

	Sensitivität mit 95%-KI	Spezifität mit 95%-KI	PPW	NPW	n	
Gesamtkohorte	78% [0,709; 0,851]	98,2 % [0,948; 1]	99% [0,971; 1]	65,9% [0,558; 0,76]	189	p<0,0001
Methodenvergleich	78,9% [0,717; 0,861]	98,1% [0,944; 1]	99% [0,971; 1]	66,2% [0,558; 0,766]	175	p<0,0001
Zytologisch unklare Befunde gesamt	78,6% [0,662; 0,91]	92,9% [0,794; 1]	97,1% [0,914; 1]	59,1% [0,386; 0,796]	56	p<0,0001
„zweifelhaft“	44,4% [0,119; 0,769]	92,3% [0,778; 1]	80% [0,449; 1]	70,6% [0,49; 0,922]	22	p=0,116
„dringender Tumorverdacht“	87,9% [0,768; 0,99]	100% [1]	100% [1]	20% [0; 0,551]	43	p=0,147

Tabelle 3.11: statistische Maßzahlen der FISH

Mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden 30 Fehlbefunde in der Gesamtkohorte erstellt. 29 Befunde sind falsch negativ, nur ein Befund war falsch-positiv (s. Tabelle 3.12-3.16, Fehlbefunde farbig unterlegt).

Ergebnis der FISH (Gesamtkohorte)	Referenzstandard	
	positiv	negativ
positiv	103	1
negativ	29	56

Tabelle 3.12: Das qualitative FISH-Ergebnis der Gesamtkohorte im Vergleich zum Referenzstandard

Ergebnis der FISH (zytologisch positive Präparate)	Referenzstandard	
	positiv	negativ
positiv	67	0
negativ	1	0

Tabelle 3.13: Das qualitative FISH-Ergebnis der zytologisch positiven Präparate im Vergleich zum Referenzstandard

Ergebnis der FISH (zytologisch negative Präparate)	Referenzstandard	
	positiv	negativ
positiv	3	0
negativ	19	43

Tabelle 3.14: Das qualitative FISH-Ergebnis der zytologisch negativen Präparate im Vergleich zum Referenzstandard

Ergebnis der FISH (zytologisch zweifelhafte Präparate)	Referenzstandard	
	positiv	negativ
positiv	4	1
negativ	5	12

Tabelle 3.15: Das qualitative FISH-Ergebnis der zytologisch zweifelhaften Präparate im Vergleich zum Referenzstandard

Ergebnis der FISH (zytologisch dringend verdächtige Präparate)	Referenzstandard	
	positiv	negativ
positiv	29	0
negativ	4	1

Tabelle 3.16: Das qualitative FISH-Ergebnis der zytologisch dringend verdächtigen Präparate im Vergleich zum Referenzstandard

Von den 104 mit FISH positiv diagnostizierten Patienten wiesen 103 einen malignen Lungentumor auf (s. Tabelle 3.12). Abb. 3.5 zeigt die Verteilung der richtig-positiven FISH-Präparate auf die Tumorentitäten.

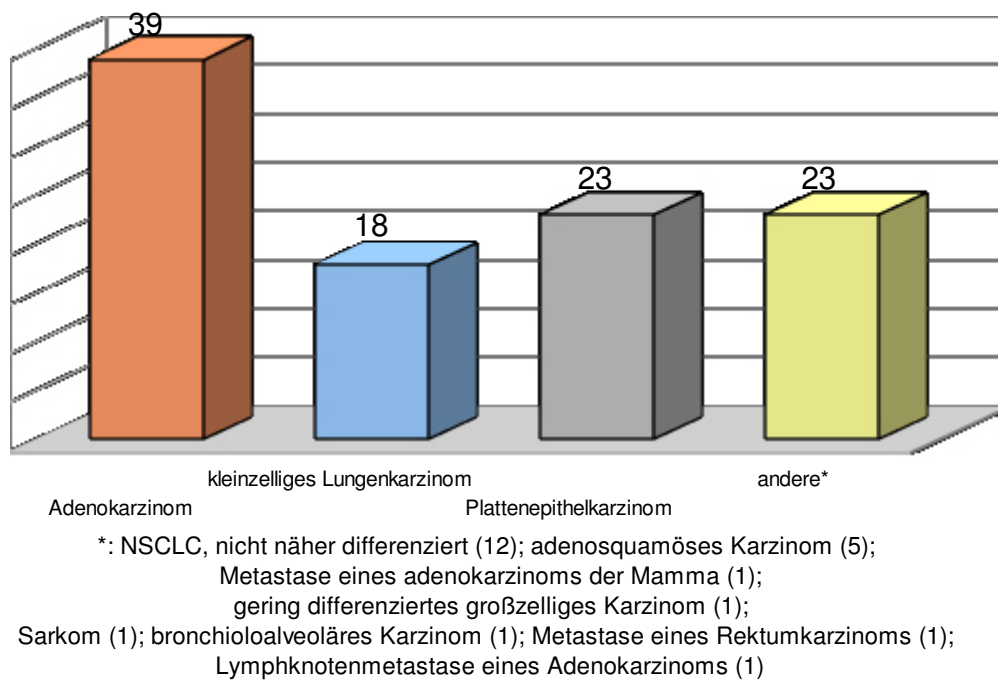


Abb. 3.5: richtig positive FISH-Präparate und korrespondierende Tumorphistologie

Ein Präparat wurde mit der FISH-Sonde falsch positiv gewertet. Klinisch lag eine malignomverdächtige Raumforderung im rechten Unterlappen vor. Dieser Verdacht konnte aber weder histologisch noch zytologisch bestätigt werden. Im *Follow-up* ergab sich eine chronische Bronchitis. Bei einem zweiten Durchsehen des Präparates nach Erhebung des Follow-up zeigte sich ein polyploides Muster mit zum Teil sehr enger Signallagerung und dadurch erschwelter Auswertbarkeit. Zytologisch gehörte das Präparat zur Kategorie „zweifelhaft“.

85 Patienten wurden in unserer Studie als FISH-negativ bewertet. Davon zeigten 56 Patienten im *Follow-Up* keine Zeichen eines malignen Lungentumors (s. Tabelle 3.12). Abb. 3.6 zeigt die zugehörigen klinischen Diagnosen zu den mit FISH richtig-negativ bewerteten Präparaten.

29 Proben mit positivem Referenzstandard wurden als fälschlicherweise als FISH-negativ diagnostiziert (s. Tabelle 3.12). Abb. 3.7 zeigt die korrespondierende Tumorphistologie der falsch-negativen Präparate.

Von diesen Proben gehörten 19 in die zytologische Kategorie „negativ“. Alle diese Präparate waren interessanterweise auch in der DNA-Zytometrie als falsch negativ bewertet worden. 9 waren unklarer Zytologie (5 zweifelhaft, 4 dringender Verdacht); 5 dieser Proben waren auch in der DNA-Zytometrie falsch-negativ, 3 nicht auswertbar und ein Präparat wurde in der DNA-Bildzytometrie als richtig-positiv diagnostiziert.

Ein falsch-negatives Präparat war zytologisch positiv. Dabei handelte es sich um das Präparat einer Bronchiallavage aus dem linken Oberlappen mit Zellen eines kleinzelligen Lungenkarzinoms. Sowohl zytologisch als auch in der DAPI-Färbung war dies morphologisch klar zu erkennen, die LAVysion-Sonde ergab jedoch keine schwellenwertübersteigende chromosomale Aneuploidie.

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erkannte drei zytologisch falsch-negative Präparate als positiv (s. Tabelle 3.14). Dabei handelte es sich um zwei gering differenzierte primäre Adenokarzinome sowie ein gering differenziertes nicht verhornendes Plattenepithel-Karzinom. Nach der erneuten Durchsicht der verbliebenen nach Papanicolaou gefärbten Präparate zeigten sich in zwei dieser Fälle wenige atypische Zellen. In dem anderen Fall wurden Tumorzellen aufgrund starker Lufttrocknungsartefakte als benigne fehlgedeutet.

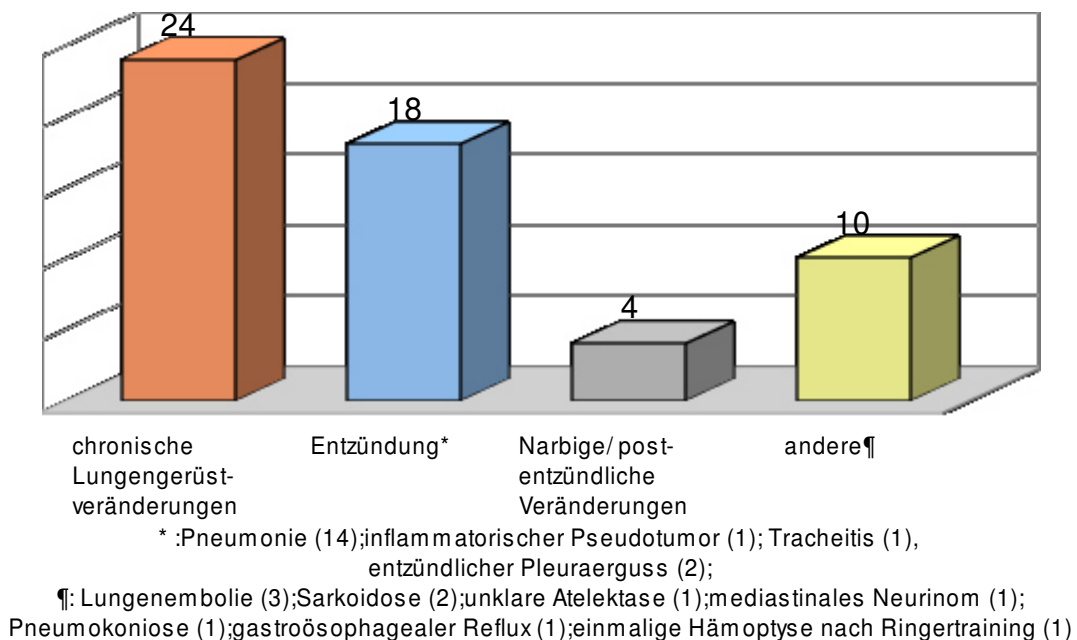
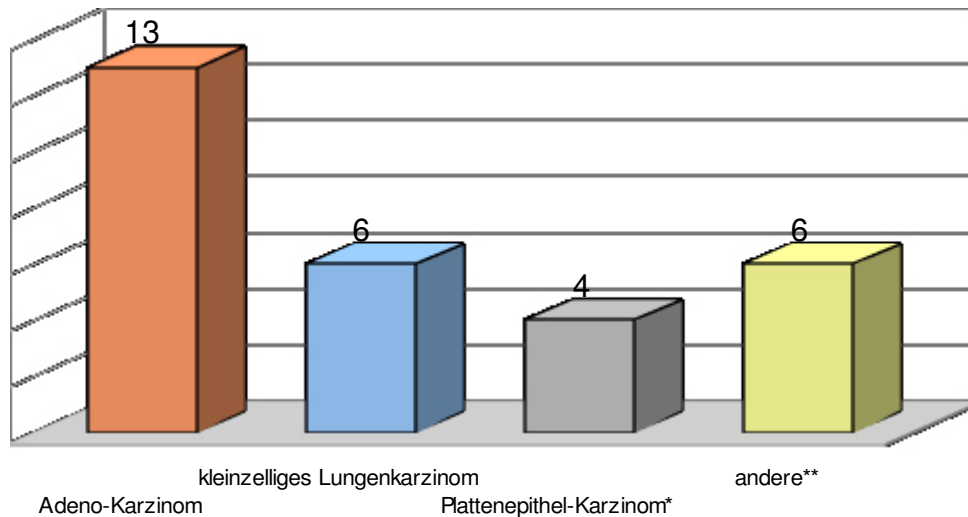


Abb. 3.6: richtig negative FISH-Präparate und korrespondierende klinische Diagnosen



*: darunter ein Carcinoma-in-situ

** : NSCLC, nicht näher bezeichnet (1); zentrales Karzinoid (1); zentrales T-Zell-Lymphom (1); metastasiertes Adeno-Karzinom des Kolon (1); metastasiertes endometriales Cervix-Karzinom (1); adenosquamöses Karzinom (1)

Abb. 3.7: falsch negative FISH-Präparate und korrespondierende Tumorhistologie

3.4 Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie

Es konnten 179 von 198 Proben mit der DNA-Zytometrie befundet werden (90,4%). Davon gehörten 64 Präparate zur Gruppe „negativ“, 67 zur Gruppe „positiv“ und 48 zur Gruppe der diagnostisch unklaren Präparate.

Zu wenige Analyse- oder Referenzzellen, Inhomogenität der Feulgen-Färbung und starke degenerative Veränderungen bzw. zerfallene Zellen machten die Befundung der übrigen 19 Präparate unmöglich.

Die DNA-Bildzytometrie war in 99 Fällen (55,3%) positiv. In 28 Fällen wurde die Diagnose aufgrund einer Stammlinienaneuploidie gestellt, in 13 Fällen allein aufgrund von Einzelzellaneuploidie (9c exceeding events) und in 58 Fällen lagen beide Diagnosekriterien vor (Abb. 3.8).

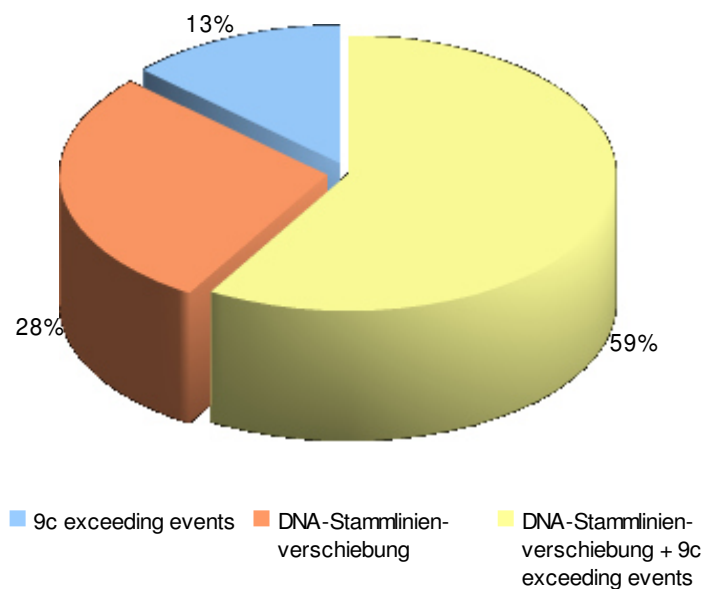


Abb. 3.8: Verteilung der Malignitätskriterien der 99 positiv getesteten Fälle der DNA-ICM

Auch für die DNA-Zytometrie wurden die Maßzahlen der diagnostischen Treffsicherheit für die Gesamtkohorte, die Kohorte Methodenvergleich sowie nach unklarer Zytologie errechnet (Tabelle 3.17).

Auch hier zeigt sich wie bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ein Anstieg der Spezifität im Vergleich zur alleinigen zytologischen Untersuchung.

Auffällig ist die Spezifität von 100% in der Gruppe der zytologisch unklaren Präparate. Dabei bleibt die Sensitivität mit Ausnahme der zweifelhaften Präparate ebenfalls auf einem sehr hohen Niveau. Im Gegensatz zur Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erreichen die Maßzahlen der DNA-Zytometrie auch bei getrennter Auswertung nach zweifelhafter und dringend verdächtiger Zytologie statistische Signifikanz. 42 DNA-bildzytometrische Diagnosen nach unklarer Zytologie entsprachen der *Follow-Up* Diagnose (65,6%), 6 waren falsch, weitere 16 Präparate nicht auswertbar (zusammen 34,4%).

In der Gesamtkohorte traten insgesamt 98 richtig-positive, 1 falsch positiver, 54 richtig negative und 26 falsch negative Bewertungen auf (s. Tabelle 3.18-3.22, Fehlbefunde farbige unterlegt).

	Sensitivität mit 95%-KI	Spezifität mit 95%-KI	PPW	NPW	n	
Gesamtkohorte	79% [0,718; 0,862]	98,2% [0,947; 1]	99% [0,971; 1]	67,5% [0,572; 0,778]	179	p<0,0001
Methodenvergleich	80% [0,73; 0,87]	98,1% [0,944; 1]	99% [0,971; 1]	67,1% [0,565; 0,777]	175	p<0,0001
Zytologisch unklare Befunde	82,9% [0,704; 0,54]	100% [1]	100% [1]	68,4% [0,475; 0,893]	48	p<0,0001
„zweifelhaft“	42,9% [0,062; 0,796]	100% [1]	100% [1]	73,3% [0,509; 0,957]	18	p=0,043
„dringend tumorverdächtig“	92,9% [0,834; 1]	100% [1]	100% [1]	50% [0,01; 0,99]	30	p=0,014

Tabelle 3.17: statistische Maßzahlen der DNA-ICM

Ergebnis der DNA-ICM (Gesamtkohorte)	Referenzstandard	
	positiv	negativ
positiv	98	1
negativ	26	54

Tabelle 3.18: Das Ergebnis der DNA-ICM der Gesamtkohorte im Vergleich zum Referenzstandard

Ergebnis der DNA-ICM (zytologisch positive Präparate)	Referenzstandard	
	positiv	negativ
positiv	67	0
negativ	0	0

Tabelle 3.19: Das Ergebnis der DNA-ICM der zytologisch positiven Präparate im Vergleich zum Referenzstandard

Ergebnis der DNA-ICM (zytologisch negative Präparate)	Referenzstandard	
	positiv	negativ
positiv	2	1
negativ	20	41

Tabelle 3.20: Das Ergebnis der DNA-ICM der zytologisch negativen Präparate im Vergleich zum Referenzstandard

Ergebnis der DNA-ICM (zytologisch zweifelhafte Präparate)	Referenzstandard	
	positiv	negativ
positiv	3	0
negativ	4	11

Tabelle 3.21: Das Ergebnis der DNA-ICM der zytologisch zweifelhaften Präparate im Vergleich zum Referenzstandard

Ergebnis der DNA-ICM (zytologisch dringend verdächtige Präparate)	Referenzstandard	
	positiv	negativ
Positiv	26	0
Negativ	2	2

Tabelle 3.22: Das Ergebnis der DNA-ICM der zytologisch dringend verdächtigen Präparate im Vergleich zum Referenzstandard

Von 99 mit DNA-Bildzytometrie erstellten positiven Diagnosen wiesen 98 Patienten im Follow-Up einen malignen Lungentumor auf (s. Tabelle 3.18). Abb. 3.9 zeigt die Verteilung der richtig-positiven Diagnosen auf die einzelnen Tumorentitäten.

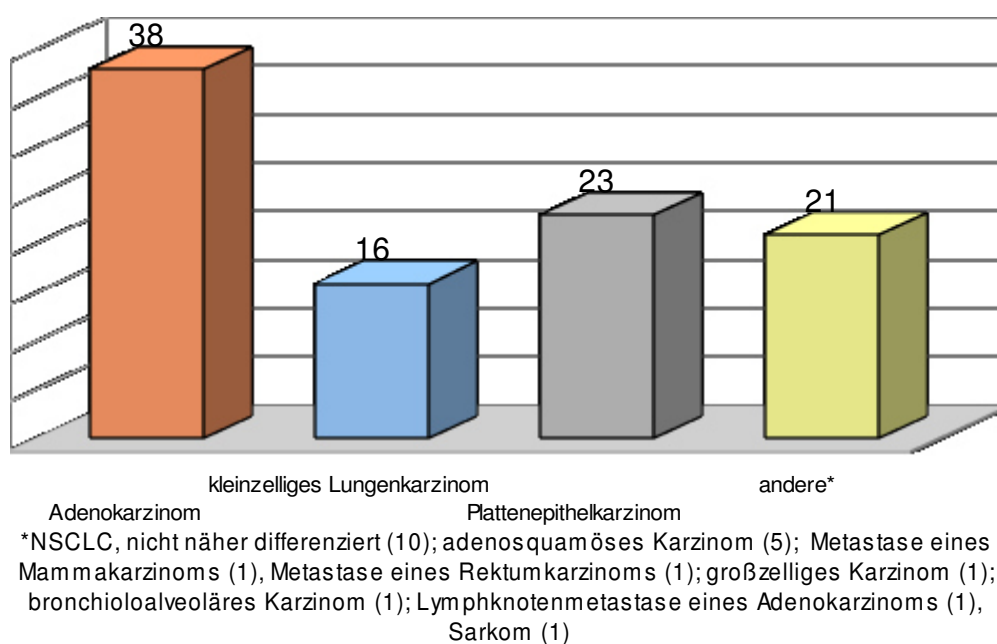


Abb. 3.9: richtig-positive Präparate der DNA-ICM und korrespondierende Tumorphistologie

Es war auch ein falsch-positiver Befund zu verzeichnen. Es handelte sich dabei um einen 58jährigen Mann (ca. 30 *pack-years*). In diesem Präparat waren nach Feulgen-Färbung zwei stark vergrößerte, aber morphologisch unauffällige Zellen mit Kinozilien zu erkennen, die allerdings einen DNA-Gehalt $>9c$ hatten. Aufgrund der unauffälligen Morphologie wurde das Präparat der zytologischen Kategorie „negativ“ zugeordnet. Durch den hohen DNA-Gehalt war jedoch definitionsgemäß das Kriterium für eine positive Diagnose durch *9c exceeding events* (Einzelzellaneuploidie) gegeben. Im *Follow-up* zeigte sich kein maligner Tumor, klinisch wurde ein narbiger Bronchusverschluss diagnostiziert. Es wurde auf eine histologische Sicherung verzichtet und eine CT-Kontrolle empfohlen.

54 Präparate konnten mittels DNA-Bildzytometrie als richtig-negativ diagnostiziert werden.

Abb. 3.10 zeigt die Verteilung der 54 Fälle auf die verschiedenen nicht-malignen Lungenerkrankungen.

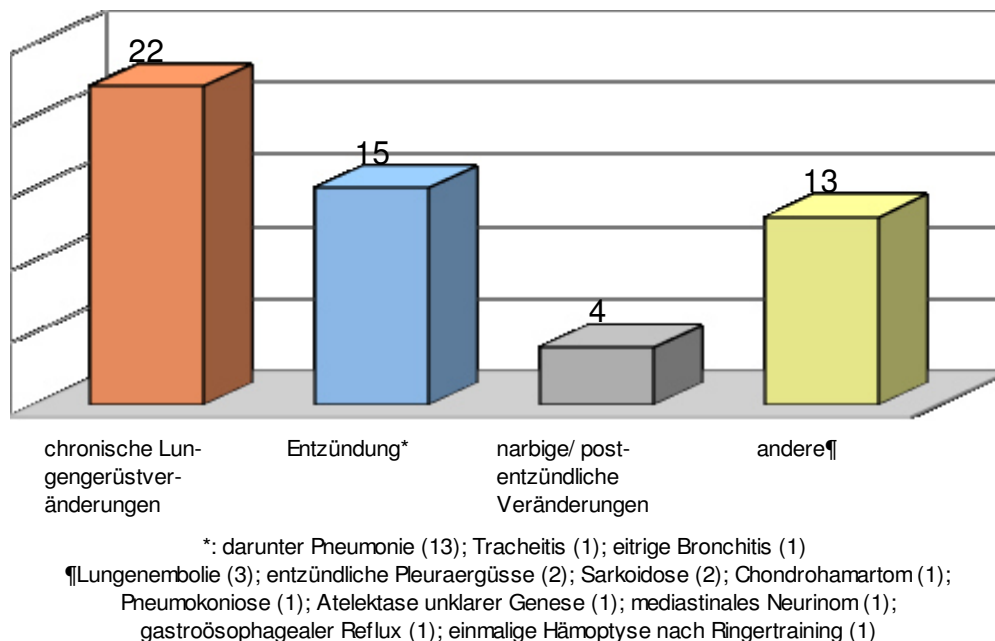


Abb. 3.10: richtig-negative Befunde der DNA-ICM und korrespondierende klinische Diagnose

In der Auswertung der Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie wurden 26 Präparate falsch-negativ befundet (Abb. 3.11). Von diesen Präparaten waren 20 auch zytologisch negativ, 4 waren der Kategorie „zweifelhaft“ und 2 der Kategorie „dringender Tumorverdacht“ zugeordnet.

24 der 26 falsch-negativen Befunde der DNA-Bildzytometrie waren auch in der FISH falsch-negativ. Ein weiteres Präparat war mit FISH nicht auswertbar. Ein Präparat konnte mit FISH als positiv gewertet werden. Dabei handelte es sich um ein Adenokarzinom der Lunge, die Zytologie des Präparats war ebenfalls als „negativ“ gewertet worden.

Die DNA-Bildzytometrie erkannte zwei Präparate als positiv, die in der Zytologie als falsch-negativ befundet wurden. Im *Follow-Up* zeigten diese Präparate ein gering differenziertes nicht verhornendes Plattenepithel-Karzinom und ein gering differenziertes primäres Adenokarzinom. Diese Präparate wurden im Übrigen auch von der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als positiv erkannt.

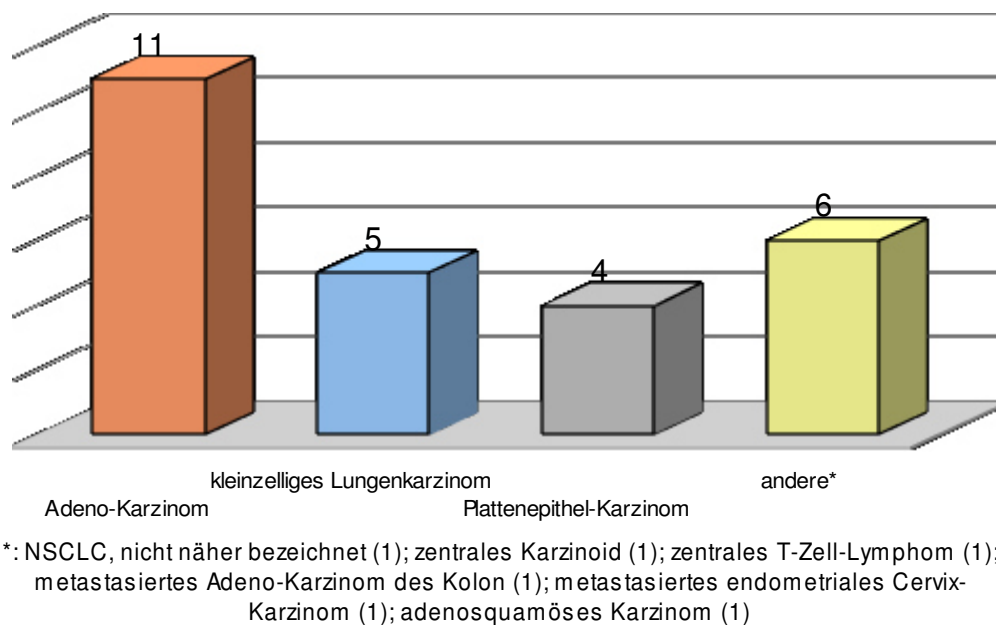


Abb. 3.11: falsch negative Präparate der DNA-ICM und korrespondierende Tumorphistologie

3.4 Vergleich von Zytologie, FISH und DNA-Bildzytometrie

3.5.1 Vergleich der Durchführbarkeit

210 Präparate wurden zytologisch begutachtet. 198 erfüllten einen positiven oder negativen Referenzstandard und wurden für die FISH und DNA-Bildzytometrie vorbereitet.

Insgesamt waren 189 von 198 (95,5%) Präparaten mittels Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung auswertbar. 179 von 198 (90,4%) der Präparate konnten mit DNA-Bildzytometrie befundet werden (Tabelle 3.23a und b).

	Gesamtkohorte		Zytologisch positive Präparate		Zytologisch negative Präparate	
	n	%	n	%	n	%
FISH	189/198	95,5	68/68	100	65/66	98,5
DNA-Bildzytometrie	179/198	90,4	67/68	98,5	64/66	97

Tabelle 3.23a: Vergleich der Anzahl der auswertbaren Präparate für FISH und DNA-ICM bei Gesamtkohorte sowie sicher positiven und negativen Befunden

	Diagnostisch unklare Präparate		Diagnose „zweifelhaft“		Diagnose „dringender Verdacht“	
	n	%	n	%	n	%
FISH	56/64	87,5	22/25	88	34/39	87,2
DNA- Bildzytometrie	48/64	75	18/25	72	30/39	76,9

Tabelle 3.23b: Vergleich der Anzahl der auswertbaren Präparate für FISH und DNA-ICM bei diagnostisch unklaren und davon gesondert angegebenen zweifelhaften und dringend verdächtigen Befunden

In jeder Kohorte ist der Prozentsatz der auswertbaren Präparate der DNA-Bildzytometrie geringer als für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Besonders stark tritt dies bei den diagnostisch unklaren Befunden hervor.

Von den 19 nicht auszuwertenden Präparaten der DNA-Bildzytometrie wiesen nur vier Probleme mit der Feulgen-Färbung auf (z.B. Inhomogenität der Färbung). Bei den restlichen 15 Präparaten konnten nicht genügend geeignete Referenz- oder Analysezellen gefunden werden, um die in Kap. 2.5.4 erläuterten Kriterien zu erfüllen.

Bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung ergibt sich ein anderes Bild. Alle neun nicht auszuwertenden Präparate wiesen Artefakte auf (am häufigsten in Spectrum RedTM), die ein Auszählen der Signale unmöglich machten. Es gab allerdings keine Probleme genügend diagnostisch relevante Zellkerne zu finden, wobei einschränkend gesagt werden muss, dass ein Präparat mit einer zu geringen Zahl von morphologisch auffälligen Analysezellen eher als falsch negativ denn als nicht auswertbar gewertet würde.

3.5.2 Vergleich der diagnostischen Maßzahlen

175 Proben konnten sowohl zytologisch, mittels FISH als auch DNA-bildzytometrisch ausgewertet werden. Die von diesen Patienten abgeleiteten statistischen Maßzahlen in den einzelnen Kohorten sind zum Vergleich in Abb. 3.12 A-E dargestellt.

Für die statistische Auswertung wurden alle unklaren zytologischen Präparate als positiv gewertet.

Wie zu erkennen ist, steigert die Anwendung der adjuvanten Methoden deutlich die Spezifität im Vergleich zur Zytologie. Die Sensitivität ist in unserer Studie dagegen etwas niedriger. Diese Unterschiede sind im Wesentlichen durch die Einordnung von zytologisch unklaren Diagnosen als test-positiv begründet. Dabei unterscheiden sich Fluoreszenz in situ Hybridisierung und DNA-Bildzytometrie in den diagnostischen Parametern nur geringfügig. Dies wird auch durch den Fleiss-Kappa-Test bestätigt, der mit $\kappa=0,93$ in der Kohorte

„Methodenvergleich, bzw. 0,9 in der Kategorie „unklar“ die enge Korrelation der Ergebnisse belegt.

Die DNA-Bildzytometrie erreicht im Vergleich zur FISH eine etwas bessere Sensitivität und Spezifität bei den zytologisch unklaren Präparaten. Wie in Kap. 3.5.1 dargestellt, ist sie jedoch in weniger Fällen anwendbar als die Fluoreszenz in situ Hybridisierung, was meist am Mangel an Analyse- oder Referenzzellen lag.

Es gab in unserer Untersuchung auch falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse (s. Tabelle 3.24, Fehlbefunde sind farbig unterlegt).

	Richtig-positive Befunde	Falsch-positive Befunde	Richtig- negative Befunde	Falsch-negative Befunde
Zytologie	113	19	44	22
FISH	103	1	56	29
DNA- Bildzytometrie	98	1	54	26

Tab.3.24: Verteilung der richtig-positiven, falsch-positiven, richtig-negativen und falsch-negativen Befunde auf die verschiedenen Methoden

Die hohe Anzahl falsch-positiver Befunde der Zytologie hat auch hier ihre Ursache in der Bewertung der unklaren zytologischen Präparate als „positiv“ im Rahmen der statistischen Auswertung. 5 Befunde zählen zur zytologischen Kategorie „dringend verdächtig“, 14 zur Gruppe „zweifelhaft“. Von den sicher zytologisch tumorpositiven Präparaten wiesen alle einen positiven Referenzstandard auf.

Somit gibt es echte falsch-positive Ergebnisse nur in der FISH und in der DNA-Bildzytometrie. Es handelt sich um zwei verschiedene Fälle.

Der falsch-positive Befund der DNA-Bildzytometrie zählte zur zytologischen Kategorie „negativ“ und wies mehrere vergrößerte, morphologisch unauffällige Zellen auf (s. Kap. 3.4). In der FISH war das Präparat ebenfalls unauffällig.

Der falsch-positive Befund in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gehörte zytologisch zur Kategorie „zweifelhaft“, DNA-bildzytometrisch ergab sich ein negativer Befund (s. Kap. 3.3).

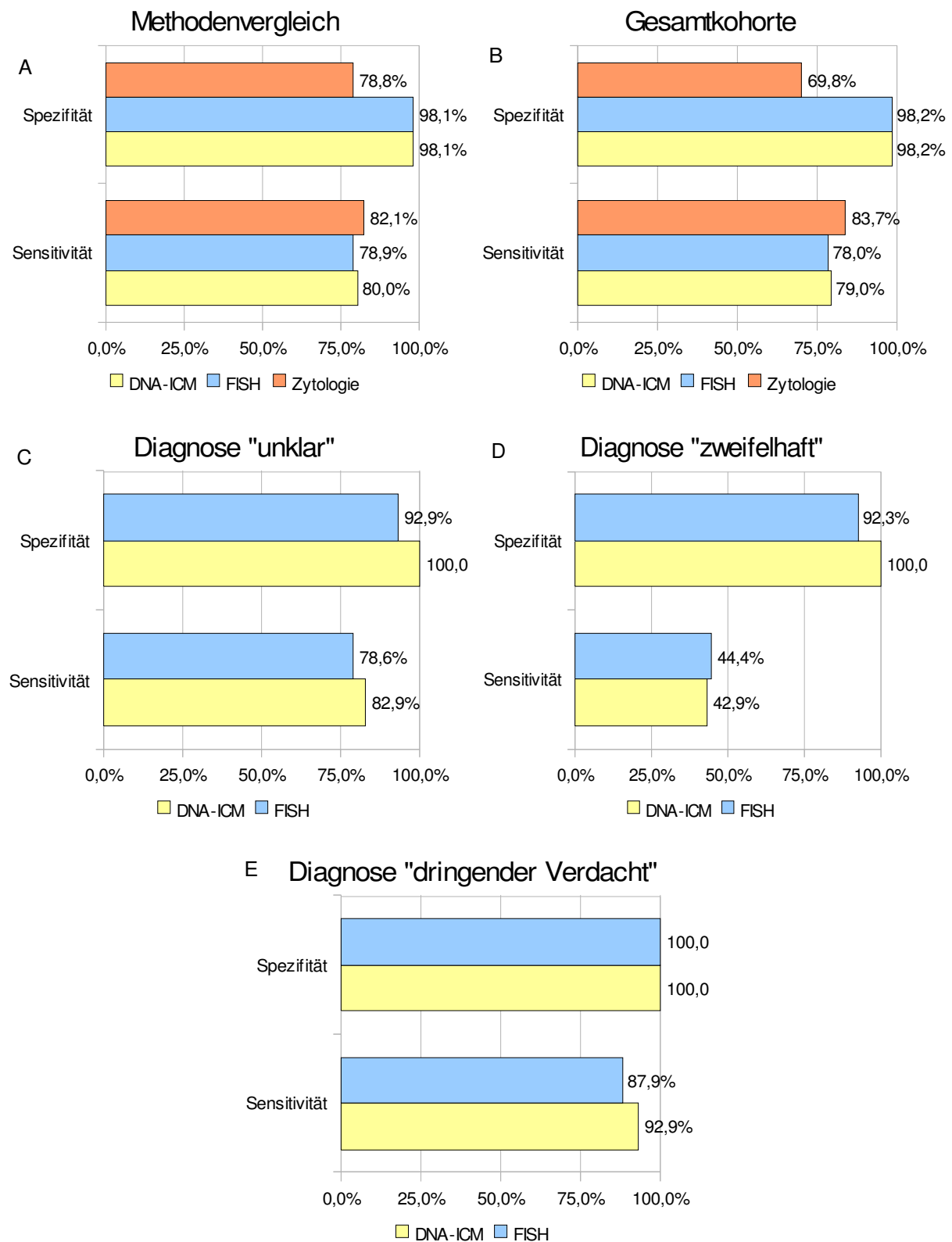


Abb. 3.12: Vergleich der adjuvanten Methoden in den 175 Proben des Methodenvergleich (A), der Gesamtkohorte (B), diagnostisch unklaren (C), zweifelhaften (D) und dringend verdächtigen Präparaten (E)

Betrachtet man die falsch-negativen Befunde der DNA-Bildzytometrie, so ergibt sich folgende Verteilung auf die zytologischen Gruppen:

20 Präparate gehören zur Kategorie „negativ“, 4 zur Gruppe „zweifelhaft“ und 2 zur Gruppe „dringend verdächtig“. 24 der falsch-negativen Präparate wurden auch mit FISH als falsch-negativ bewertet, 1 Präparat war mit FISH nicht auswertbar, und 1 Präparat wurde mit FISH als richtig-positiv bewertet.

Die falsch-negativen Befunde der FISH verteilen sich wie folgt:

19 Präparate der Kategorie „negativ“, 5 der Gruppe „zweifelhaft“, 4 der Gruppe „dringend verdächtig“ und 1 Präparat war zytologisch positiv (s. Kap. 3.3). Mit der DNA-Bildzytometrie wurden von den 29 Präparaten 2 als richtig-positiv bewertet, 3 Präparate waren nicht auszuwerten, die übrigen 24 Proben wurden auch DNA-bildzytometrisch als falsch-negativ bewertet.

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass es unter den Fehlbefunden der adjuvanten Methoden deutliche Überschneidungen gibt. Nur in einzelnen Fällen konnte eine Methode einen Fehlbefund der jeweils anderen berichtigen. Die überwiegende Anzahl der falsch-negativen Befunde wurden sowohl mit FISH als auch mit DNA-Bildzytometrie als falsch bewertet.

4. Diskussion

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden vorab in Cancer Cytopathology publiziert⁸⁹. Die folgenden Ausführungen sind daher an die publizierte Arbeit angelehnt.

Suboptimale Sensitivität und unklare Diagnosen in der pulmonalen Zytologie sind ein häufiges Problem. Die Diagnose verzögert sich, adäquate Therapie wird aufgeschoben, der Patient muss weiteren, unter Umständen invasiven Prozeduren ausgesetzt werden. Der Anteil an falsch negativen Diagnosen in der konventionellen Zytologie ist zudem sehr hoch, da häufig keine Tumorzellen in den Ausstrichen zu finden sind. Dies wurde in einer großen Metaanalyse von Schreiber und McCrory dargestellt⁶⁶. Die Sensitivität von Bronchiallavagen, bronchialen Bürstenabstrichen und Feinnadelbiopsien betrug hierbei im Literaturmittel 48%, 59% und 56%. Insbesondere bei peripheren Lungentumoren ist die Sensitivität verbesserungsbedürftig, hier ergab sich ein gemittelter Wert von 43% für Bronchiallavagen, 52% für Bürstenabstriche und 67% für transbronchiale Feinnadelbiopsien. Allerdings wird in dieser Studie keine genaue Angabe zur Art der Feinnadelbiopsie getätigt. In einer Studie von Herth ergeben sich für die endoskopisch gesteuerte Feinnadelaspirationsbiopsie deutlich bessere Ergebnisse mit einer Sensitivität von 94% und einer Spezifität von 100% bei Punktion mediastinaler und hilärer Lymphknoten¹²⁹.

Unklare zytologische Diagnosen werden, soweit hierüber überhaupt Aussagen erfolgen, aufgrund der statistisch notwendigen Dichotomisierung entsprechend der Stärke des Tumorverdachts meist entweder zu tumornegativen oder -positiven Befunden hinzugeschlagen. In der vorliegenden Studie betrug die Sensitivität der Zytologie 82%, was einen im Literaturvergleich guten Wert darstellt. Allerdings muss einschränkend gesagt werden, dass unklare zytologische Diagnosen hier entsprechend der Studienintention eines Suchtests als Test-positiv gewertet wurden, aber für den Kliniker nicht den gleichen Stellenwert haben wie eine klare Tumordiagnose. Dies zeigt sich auch im dann deutlich reduzierten Wert für die Spezifität von 69,8%. Diese Werte für Sensitivität und Spezifität sind daher mit der Literatur nur eingeschränkt vergleichbar. Darüber hinaus ist die hier untersuchte Population bezüglich eines Lungenkarzinoms angereichert, da von 843 in der Zytologie eingegangenen Proben jeweils die ersten 70 mit zytologisch negativen, unklaren und positiven Diagnosen einbezogen wurden. Dies entspricht allen unklaren Diagnosen, den weitaus meisten positiven Diagnosen, aber nur einem Bruchteil der zytologisch negativen Diagnosen von 843 Patienten. Wir halten dieses Vorgehen aber hinsichtlich der Zielsetzung der vorliegenden Studie gerechtfertigt, deren Schwerpunkt auf der Validierung von FISH und DNA-Bildzytometrie nach unklarer konventioneller Zytologie liegt. Der Anteil von Patienten, bei denen nach klinisch auszuschließendem Lungenkarzinomverdacht tatsächlich ein Lungenkarzinom diagnostiziert wird, ist etwa ein Drittel (persönliche Mitteilung Dr. Kappes,

ehemals Chefarzt der Klinik für Pneumologie, Florence Nightingale Krankenhaus Düsseldorf).

Ein Problem, welches gelegentlich zu unklaren zytologischen Befunden führt, stellt die manchmal schwierige Unterscheidung zwischen malignen Tumorzellen und Gewebe mit (post-) entzündlichen, unspezifischen Veränderungen dar^{122,125}.

Die Anforderungen an die Zytologie gehen jedoch weiter. Zunehmend wird auch eine korrekte histogenetische Tumorzusammenfassung gefordert⁵¹. Hier konnten wir in unserer Studie von 58 histologisch gesicherten Tumoren in 45 die zytologisch korrekte Tumorentität diagnostizieren (77,6%). Allerdings muss dazu erwähnt werden, dass die histologische Sicherung in den allermeisten Fällen an einer Biopsie und nicht einem OP-Resektat vorgenommen wurde. Biopsien bilden wie zytologische Proben nicht den gesamten Tumor ab und können damit ebenfalls einem *sampling error* unterliegen¹²⁸. Bei weiteren 10 Patienten wurde keine histologische Sicherung der Tumordiagnose durchgeführt, bzw. die Histologie konnte keine malignen Tumorzellen nachweisen.

Wird die Diagnose nur auf die Unterscheidung zwischen einem kleinzelligen und einem nicht-kleinzelligen Karzinom reduziert, steigt die Typisierungsgenauigkeit in unserer Studie auf 96,6%. Der Durchschnittswert wird in der Literatur mit 98% angegeben⁶⁶. Allerdings wurden in unserer Studie in den zwei Fehlbefunden ein SCLC als Adenokarzinom fehldiagnostiziert, in der Literatur ist der gegenseitige Fall als der weitaus häufigere angegeben. Allerdings wurde in den 2 Fällen die histologische Sicherung durch eine Biopsie erbracht. Da häufig heterogene kleinzellige Lungenkarzinome mit histologischen Anteilen anderer Lungenkarzinome vorkommen¹²⁸, ist letztlich nicht zu klären, welches Verfahren die zutreffende Diagnose erbracht hat. Klinisch wurde in einem Fall der histologischen Diagnose gefolgt, in dem anderen Fall wurde von einem gemischtzelligen Karzinom ausgegangen. Dennoch erzielte die Zytologie unter den o.g. Einschränkungen im Vergleich zum Literaturmittel zuverlässige Ergebnisse.

Schlechte Qualität der Proben oder Färbung kann die Differenzierung auch für erfahrene Untersucher schwierig bis unmöglich machen^{122,130}, was schlussendlich zu unklaren Diagnosen führt.

Aus diesem Grund wurden adjuvante Verfahren in die Zytopathologie eingeführt, um die für alle beteiligten unglücklichen unklaren Diagnosen, die weitere für den Patienten belastende diagnostische Maßnahmen nach sich ziehen, auf ein Minimum zu reduzieren.

Als Konsequenz der oben aufgeführten Überlegungen haben wir in der vorliegenden Arbeit alle zytologisch unklaren Befunde als test-positiv gewertet um eine maximale Sensitivität, bei dann reduzierter Spezifität, zu erzielen. Die Zytologie hat in diesem Fall den Stellenwert

eines Suchtests. Die unklaren Befunde werden dann mittels adjuvanter Methoden weiter abgeklärt, was wieder zu einer Steigerung der Spezifität, bei aber dann weiterhin guter Sensitivität führt. Dieses Vorgehen entspricht der klinischen Routine im Institut für Cytopathologie und führt zu einer starken Reduktion der letztendlich dem Kliniker mitgeteilten unklaren Diagnosen.

Als Kontrollgruppen wurden in dieser Doktorarbeit die Methoden Fluoreszenz in situ Hybridisierung und DNA-Bildzytometrie zusätzlich zu 70 zytologisch unklaren Proben an jeweils 70 zytologisch negativen und positiven Proben auf ihre diagnostische Wertigkeit untersucht und miteinander verglichen. Die Ergebnisse wurden mit dem klinischen *Follow-Up* entsprechend eines vor Studienbeginn definierten Referenzstandards validiert (s. Kap. 2.6).

Beide Methoden haben dabei den Vorteil, dass sie an denselben Objektträgern, an denen auch die konventionelle Zytologie durchgeführt wird, anwendbar sind. Dadurch sind zum einen keine weiteren diagnostischen Prozeduren am Patienten notwendig, zum anderen können zytologisch auffällige Bereiche markiert und nach Hybridisierung bzw. Feulgen-Färbung gezielt mit den obigen adjuvanten Methoden untersucht werden (s. Abb. 4.1).

Darüberhinaus wird ein neuer, von bisherigen Studien abweichender diagnostischer Algorithmus für die pulmonale Zytologie mit der LAVysion™-Sonde vorgestellt. Dabei wird zum ersten Mal das physiologische Phänomen der euploiden Polyploidisierung berücksichtigt. Euploide Polyploidisierung ist definiert als wiederholte Verdopplung des Chromosomensatzes unter gutartigen Bedingungen. Durch die DNA-Bildzytometrie konnte dieses Phänomen in mehreren Geweben nachgewiesen werden, z.B. als Adaptation an Belastung bei Herzmuskelzellen⁹¹, oder bei verschiedenen anderen Geweben im Laufe der Zellalterung oder als Reaktion auf Entzündung^{92,93}. Für Bronchialepithel konnte gezeigt werden, dass einzelne entzündlich veränderte Epithelzellen einen DNA-Gehalt von 8c, entsprechend einem oktaploiden Chromosomensatz aufweisen, was dem 4fachen eines normalen Chromosomensatzes entspricht⁹⁴.

Dieses Phänomen gilt es besonders bei der Interpretation von FISH-Ergebnissen zu beachten, da polyploide Kerne von aneuploiden sorgfältig differenziert werden sollten, um keine falsch positiven Diagnosen zu erstellen.

Aus diesem Grund stellen wir in dieser Arbeit einen neuen Algorithmus für FISH vor, der euploide Polyploidisierung als benigne wertet, d.h. sowohl Kerne mit einem tetraploiden als auch oktaploiden (2^n -fachen) Chromosomensatz.

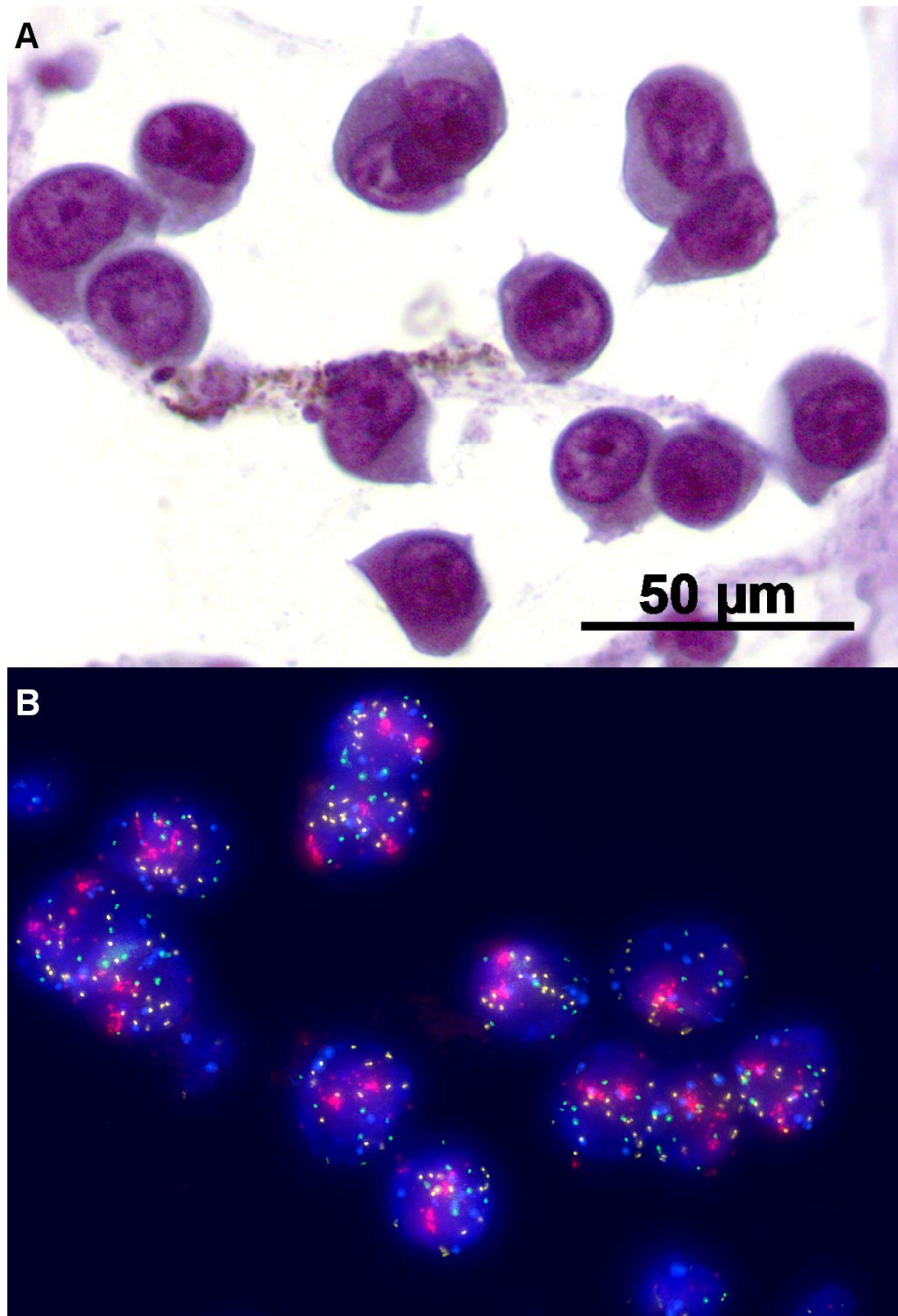


Abb. 4.1: Vergleich des gleichen Abschnitts eines Präparats der Kategorie „dringender Verdacht“ in Zytologie (Papanicolaou-Färbung, 40x Objektiv) (vorab publiziert in Cancer Cytopathology⁸⁹) [A] und FISH [B] (40x Objektiv); eine Zelle im rechten oberen Quadranten ist durch die Hybridisierung verloren gegangen

Die LAVysion™-Sonde wurde speziell für die Diagnostik des Lungenkarzinoms entwickelt⁹⁶. Auch in unserer Studie identifizierte die Sonde zuverlässig Lungenkarzinome, von 68 zytologisch positiven Proben erkannte FISH 67 als positiv. Der einzige in dieser Gruppe falsch negativ gewertete Fall war das schon in Kap. 3.3.2 angesprochene SCLC, das auch in der DAPI-Färbung aufgrund der Zelllagerung als solches erkennbar war, jedoch keine mit den 4 eingesetzten DNA-Sonden detektierbare, schwellenwertüberschreitende chromosomale Aneuploidie zeigte.

In der uns besonders interessierenden Gruppe der zytologisch unklaren Präparate erreichte die FISH eine Sensitivität von 79% bei einer Spezifität von 93%. Dies stimmt gut überein mit einer Studie von Savic und Mitarbeitern, die in 45 zytologisch unklaren Fällen nach Hybridisierung mit der LAVysion™-Sonde eine Sensitivität von 79% und Spezifität von 100% erzielten⁹⁷. In einer weiteren Studie beschrieben Bubendorf und Mitarbeiter, dass sich die Sensitivität durch FISH von 49% bei alleiniger Zytologie auf 71% steigern lässt; diese Ergebnisse konnten jedoch nur für bronchiale Bürstungen erzielt werden, für BAL oder Feinnadelaspirationen konnte kein diagnostischer Nutzen durch FISH-Applikation gezeigt werden⁹⁵. Halling und Mitarbeiter führte Zytologie und FISH an bronchoskopisch gewonnenen Lavagen und Bürstungen durch und erzielte eine Sensitivität von 71% bei Bürstungen und von 49% bei BAL¹⁰². Eine andere Studie von Voss und Mitarbeiter ergab, dass durch Anwendung von FISH an 294 zytologisch nicht-positiven Proben zusätzliche 32% (41% bei zentral und 20% bei peripher liegenden Tumoren) an Lungenkarzinomen diagnostiziert werden konnten¹³¹. Diese Studie berücksichtigte als einzige eine Tetrasomie als benigne Veränderung, jedoch keine Polyploidisierung jenseits eines tetraploiden Chromosomensatzes.

Wir denken, dass Polyploidisierung auch jenseits eines tetraploiden Chromosomensatzes als benigne gewertet werden sollte, und dieser Ansatz wurde unserer Auffassung nach in den bisherigen Studien nur ungenügend berücksichtigt.

In unserer Studie fanden wir in 8 von 56 zytologisch unklaren oder negativen Präparaten mit negativem Referenzstandard oktaploide Zellen. In 24 Proben dieser Gruppe fanden wir außerdem auffällig vermehrt tetraploide Zellen im Sinne einer euploiden Polyploidisierung. Diese Präparate wären eventuell als positiv gewertet worden, wenn nicht unser Algorithmus angewendet worden wäre. Falsch-positive Ergebnisse können also leicht geschehen, wenn oktaploide oder tetraploide Zellen als chromosomal aneuploid gewertet werden, mehr noch da häufig Schwierigkeiten bei der Signalzählung auftreten können, z.B. durch nah aneinander positionierte Signale, elongierte Signale oder degenerative Veränderungen. Einen solchen falsch-positiven Fall gab es auch in unserer Studie. Es handelte sich um ein zytologisch zweifelhaftes Präparat eines Patienten mit chronischer Bronchitis. Nachdem im *Follow-up* kein malignes Geschehen erkennbar war, wurde das FISH-Präparat erneut

untersucht. Es zeigte sich dabei eine sehr nahe Positionierung der Signale, welche die Zählung beeinflusste. Mit der Kenntnis der endgültigen Diagnose hätten die verdächtigen Zellen auch als polyploid gewertet werden können. In der DNA-Bildzytometrie war das Präparat nicht auswertbar aufgrund ungenügender Analysezellen.

Drei von 65 zytologisch negativen Proben enthielten eine überschwellige Zahl in der FISH detektierbarer achromosomal-aneuploider Zellen. Das *Follow-up* bestätigte die Diagnose maligner Lungentumore (2 Adenokarzinome, 1 Plattenepithelkarzinom). 2 dieser 3 Proben waren auch in der DNA-Bildzytometrie aneuploid.

In der schon vorher angesprochenen Studie von Voss lag diese Quote um einiges höher, es wurden in 37 von 230 zytologisch negativen Präparaten mittels FISH Tumorzellen gefunden¹³¹. Dies könnte die Anwendung von FISH bei jeder zytologisch negativen Probe nahe legen. Aufgrund unserer Ergebnisse erscheint dies aber als zu unwirtschaftlich, wobei beachtet werden muss, dass die Kohorte der zytologisch negativen Proben in unserer Studie relativ klein ist. Wenn alle 843 im Untersuchungszeitraum eingesandten Proben mit FISH untersucht worden wären, wäre der Anteil der FISH-positiven Fälle bei negativer Zytologie vermutlich höher. Es bedarf weiterer Studien mit größeren Kohorten zur Klärung der Frage, ob die Anwendung von FISH an zytologisch negativen Proben einen diagnostischen Nutzen im Vergleich zum Mehraufwand ergibt.

Insgesamt konnten 71,8% der zytologisch unklaren Befunde richtig mittels FISH entsprechend der Follow-Up Diagnose befundet werden und so der Anteil der für alle Beteiligten belastenden unklaren zytologischen Befunde deutlich reduziert werden. 28,2% der unklaren zytologischen Präparate konnten mit FISH nicht weiter untersucht werden oder ergaben ein gemäß der *Follow-Up* Diagnose falsches FISH-Resultat.

Verschiedene Studien haben mittels DNA-Bildzytometrie gezeigt, dass die Menge der DNA mit dem Grad der Atypie ansteigt, von leichten dysplastischen Veränderungen bis hin zum invasiven Lungenkarzinom^{75,115}. In der Praxis angewendet wurde diese Erkenntnis, um mittels Messung des DNA-Gehalts zwischen präkanzerösen atypischen und unspezifischen reaktiven Veränderungen bei unklaren dysplastischen bronchopulmonalen Zellveränderungen zu unterscheiden^{87,114}.

In unserer Studie lag die Sensitivität in der Gruppe der unklaren Zytologie bei 82,9%. Dies bestätigt die Ergebnisse von Auffermann und Mitarbeitern, der in einer Studie 17 von 19 Lungenkarzinomen nach vorab erfolgter zytologisch unklarer Diagnose richtig erkannte⁸⁷. Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit 65,6% der zytologisch unklaren Befunde richtig mittels DNA-Bildzytometrie befundet werden.

Mit der DNA-Bildzytometrie wiesen wir bei 3 Patienten mit negativer Zytologie DNA-Aneuploidie nach. 2 dieser Patienten, die auch mit FISH als positiv erkannt wurden, hatten

letztendlich einen malignen Lungentumor (1 Adenokarzinom, 1 Plattenepithelkarzinom). Eine Probe des dritten Patienten wurde DNA-Bildzytometrisch als DNA-aneuploid diagnostiziert. Im *Follow-Up* konnte unsere Tumordiagnose jedoch nicht bestätigt werden, klinisch wurde ein narbiger Bronchusverschluss ohne sichere Tumorzeichen diagnostiziert, eine histologische Sicherung der Diagnose erfolgte wohl mangels klinisch hinreichendem Malignitätsverdachts nicht. In der DNA-Bildzytometrie zeigte sich ein euploid polyploides Muster mit zwei großen, aber normal konfigurierten Zellen mit Kinozilienbesatz und einem DNA-Gehalt über 9c (s. Abb. 2.3). Aufgrund ihrer zytologisch unauffälligen Morphologie werteten wir diese Zellen als oktaploide Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. Dennoch wurde entsprechend der Definition von DNA-Aneuploidie im Rahmen der Studie dieser Befund als falsch-positiv gewertet. Da dieses Präparat allerdings auch zytologisch negativ diagnostiziert wurde, wäre es in der Routinediagnostik im Institut für Cytopathologie, wo eine adjuvante DNA-Bildzytometrie lediglich nach zytologisch unklaren oder nach ausgewählten positiven Diagnosen eingesetzt wird, gar nicht erst mit der DNA-Bildzytometrie untersucht worden.

Demgegenüber stehen 13 weitere Proben, die in der DNA-Bildzytometrie lediglich aufgrund von wenigen Zellen mit einem DNA-Gehalt $>9c$ als DNA-aneuploid gewertet wurden. Alle von diesen Präparaten wiesen auch einen positiven Referenzstandard auf. Aus dieser Gruppe gehörten immerhin 5 der Kategorie „dringend verdächtig“ an.

Wenn man also wie in der klinischen Routine auch praktiziert, DNA-Bildzytometrie nur an unklaren Zytologien anwendet, könnte man nach unserer Auffassung an unserer Wertung der 9c exceeding events als Kriterium für DNA-Aneuploidie festhalten, da der einzige falsch positive Fall aus der Subgruppe „zytologisch negativ“ kam. Demgegenüber stehen 5 Patienten der Gruppe „dringend verdächtig“, die durch die Anwendung dieses Malignitätskriteriums einen direkten Nutzen hatten.

Auch wenn dieser einzelne falsch positive Fall keine statistische Signifikanz erreicht, ist er jedoch ein Beispiel für eine mögliche Fehlerquelle in der Interpretation von Polyploidisierung in der DNA-Bildzytometrie der Lungenzytologie.

Wir kommen daher für die Routineanwendung zu dem Schluss, dass im Falle einer Polyploidisierung bis 8c (also Stammlinien bei 2c, 4c und 8c) und Vorliegen von 9c exceeding events dieses nicht als Kriterium für DNA-Aneuploidie gewertet werden sollte, da es sich wie im o.g. Fall um oktaploide Zellen in der Synthesephase handeln könnte. Fehlen allerdings sowohl morphologische als auch DNA-zytometrische Hinweise auf eine mögliche Polyploidisierung, sollten 9c exceeding events als Zeichen einer DNA-Aneuploidie gewertet werden (Einzelzellaneuploidie).

Ein Beleg dafür, dass Aneuploidie entdeckt durch DNA-Bildzytometrie ein geeigneter Indikator für Malignität ist, ist die Tatsache, dass alle 67 mit der DNA-Bildzytometrie auswertbaren zytologisch positiven Präparate auch DNA-aneuploid waren. Alle Patienten hatten letztendlich auch einen malignen Lungentumor (positiver Referenzstandard).

In dieser Arbeit wurden zwei adjuvante Methoden hinsichtlich ihrer diagnostischen Aussagekraft in der Diagnostik des Lungenkarzinoms untersucht. Ein direkter Vergleich von FISH und DNA-Bildzytometrie war an 175 von 198 Proben möglich. Dabei erzielten beide Methoden sehr ähnliche Werte in der Erkennung von Aneuploidie und damit von Malignität ($\kappa=0.93$).

Auch für die Subgruppe der Kategorie „unklare Zytologie“ liegt die diagnostische Aussagekraft und Treffsicherheit von FISH und DNA-Bildzytometrie nahe aneinander ($\kappa=0.9$). Beide Methoden können das diagnostische Problem bei unklarer Zytologie deutlich abmildern (Spezifität 92,9% / 100%, Sensitivität 78,6% / 82,9% bei FISH bzw. DNA-Bildzytometrie). Der positive prädiktive Wert in dieser Subgruppe liegt bei 97,1% für FISH und 100% für die DNA-Bildzytometrie, der negative prädiktive Wert bei 59,1% bzw. 68,4%. Daraus ergibt sich, dass bei einem positiven Befund die Tumordiagnose mit einer an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit gestellt werden darf, bei negativem Befund sollten jedoch bei fortgesetztem klinischem Tumorverdacht weitere Untersuchungen folgen.

Die Wahl der Methode sollte sich nach unseren Ergebnissen nicht nach erwarteter Tumordiagnose, sondern eher nach praktischen Gesichtspunkten der Durchführbarkeit richten. Wie oben gezeigt, korrelieren die Ergebnisse von FISH und DNA-Bildzytometrie deutlich miteinander. Von 64 zytologisch unklaren Proben wiesen 45 im Follow-up einen malignen Tumor auf. Von diesen 45 Proben konnten 34 sowohl mit FISH als auch mit DNA-Bildzytometrie untersucht werden. Dabei erbrachten beide Methoden in 33 Fällen die gleiche Diagnose, lediglich in einem Fall unterschieden sich die Bewertungen. Dabei handelte es sich um ein zytologisch „dringend verdächtiges“ Präparat eines Patienten, der im Follow-up ein histologisch gesichertes Adenokarzinom der Lunge aufwies. Die FISH war in diesem Fall negativ, DNA-bildzytometrisch ließ sich eine DNA-Aneuploidie nachweisen.

Die übrigen 11 Präparate waren entweder mit einer oder beiden Methoden nicht auszuwerten.

Es scheint daher von primärer Wichtigkeit zu sein, aufgrund der Beschaffenheit des Präparats die passende adjuvante Methode auszuwählen.

Die DNA-Bildzytometrie ist eine im Institut für Cytopathologie seit Jahren in der Diagnostik nahezu sämtlicher zytologischer Untersuchungsmaterialien angewendete Routinemethode,

mit großer Erfahrung der diagnostizierenden Pathologen. Die Auswertung benötigt etwa 30 Minuten, die Feulgen-Färbung ist automatisiert¹¹³ und kostengünstig. Gemäß Gebührenordnung für Ärzte können 42,14 Euro abgerechnet werden (Angabe für stationäre, gesetzlich versicherte Patienten). Es sind allerdings eine Mindestzahl (empfohlen sind 300) von atypischen Zellen sowie ausreichend (etwa 30) Referenzzellen zur Auswertung notwendig. In der pulmonalen Zytologie wird diese Anzahl gelegentlich nicht erreicht, so dass nach unklarer Zytologie in solchen Fällen lediglich eine Wiederholung der zytologischen Untersuchung empfohlen werden konnte. Diese Lücke schließt nun die FISH, die zur Diagnose einer chromosomalen Aneuploidie lediglich 6 atypische Zellen benötigt. Die FISH ist zeitaufwendiger als die DNA-Bildzytometrie (ca. 45 Minuten für die Auswertung) und teurer (gemäß Gebührenordnung für Ärzte können 84,28 Euro für die Anwendung der LAVysion™-Sonde bei stationären, gesetzlich versicherten Patienten abgerechnet werden).

Wir empfehlen die Anwendung von DNA-Bildzytometrie, wenn nach zytologischer Routine das Vorhandensein genügender, d.h. mindestens 70 Analysezellen, erkennbar ist. Wenn nur wenige Zellen zur Befundung vorliegen, verwenden wir die FISH mit der LAVysion™-Sonde.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Anwendung von FISH und DNA-Bildzytometrie bei zytologisch unklaren Proben die diagnostische Treffsicherheit verbessern kann.

Eine Anwendung auf zytologisch positive Proben erscheint nicht sinnvoll, da die Zytologie hier alleine eine ausreichende Aussagekraft aufweist.

Ebenso erscheint die routinemäßige Anwendung der o.g. adjuvanten Methoden bei zytologisch negativen Proben als fragwürdig. Bei den 22 falsch zytologisch negativen Proben in unserer Studie konnten nur 3 mittels FISH und 2 davon auch mittels DNA-Bildzytometrie als positiv bewertet werden. Eine daraufhin erfolgte zweite Durchsicht der nach Papanicolaou gefärbten Objektträger konnte in allen 3 Fällen atypische, z.T. dringend tumorverdächtige Zellen nachweisen. In allen 3 Fällen handelt es sich somit um einen *screening error*. In den übrigen 19 Fällen ist demnach von einem *sampling error* auszugehen, d.h. es befanden sich vermutlich keine Tumorzellen auf den Objektträgern. Eine Anwendung der adjuvanten Methoden auf ein solches Präparat macht verständlicherweise keinen Sinn.

Dennoch ist die Kohorte der zytologisch negativen Proben in unserer Studie aus praktischen Gründen relativ klein. Weitere Studien mit größeren Kohortenzahlen sind notwendig, um eine definitive Antwort auf die Frage zu liefern, ob die Anwendung von DNA-Bildzytometrie und FISH bei zytologisch negativen Präparaten einen diagnostischen Nutzen bringt.

Sowohl DNA-Bildzytometrie als auch FISH haben für sich genommen bessere Treffsicherheiten als die alleinige zytologische Diagnostik. Die Routinezytologie aber durch die alleinige Anwendung einer dieser Methoden zu ersetzen ist aufwendig und aus Zeit- und Kostengründen nicht zu vertreten. Ein wesentlicher Zugewinn ergibt sich weiterhin als Ergebnis dieser Studie auch nur bei Präparaten, die zytologisch als unklar diagnostiziert werden würden.

Wir empfehlen daher, in der Routinediagnostik pulmonale Untersuchungsmaterialien zunächst konventionell-zytologisch zu untersuchen und bei dem kleinsten Zweifel an der Benignität des Untersuchungsmaterials eine adjuvante FISH oder DNA-Bildzytometrie nach oben beschriebenem Algorithmus anzuschließen.

5. Zusammenfassung

Unklare Diagnosen sind ein häufiges Problem in der Lungenzytologie. Sie können zur Verzögerung der endgültigen Diagnose und zu weiteren, u.U. invasiven Maßnahmen am Patienten führen.

Um die diagnostische Treffsicherheit zu erhöhen, wurden die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und die DNA-Bildzytometrie als adjuvante Methoden eingeführt.

In der vorliegenden Studie wurden bronchioalveoläre Lavagen, Bürstenbiopsien und transbronchiale Feinnadelbiopsien an 210 Patienten gewonnen. 70 Proben wurden jeweils zytologisch positiv, negativ und unklar diagnostiziert.

DNA-Bildzytometrie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden an allen 210 Proben angewandt. DNA-ICM wurde nach automatisierter Feulgen-Färbung, FISH nach Hybridisierung mit der LAVysion™-Sonde an den gleichen Objektträgern wie die zytologische Untersuchung durchgeführt. Ein neuer diagnostischer Algorithmus für die LAVysion™-Sonde, der unseres Wissens zum ersten Mal das Phänomen der euploiden Polyploidisierung berücksichtigt, wird vorgestellt.

198 Patienten erfüllten einen vorab definierten positiven oder negativen Referenzstandard und wurden in die Auswertung eingeschlossen.

In der gesamten Kohorte erzielten Zytologie, DNA-ICM und FISH eine Sensitivität von 83,7%, 79% und 78% sowie eine Spezifität von 69,8%, 98,2% und 98,2%.

In der Kohorte der zytologisch unklaren Proben identifizierte FISH und DNA-ICM in 79% bzw. 83% den malignen Lungentumor.

Jeweils 3 Patienten mit malignem Lungentumor und negativer Zytologie wurden mit DNA-ICM und FISH als positiv erkannt.

Nach den Ergebnissen unserer Studie kann die Anwendung von DNA-ICM und FISH an unklaren zytologischen Proben also in einer großen Anzahl der Fälle zu einer definitiven Diagnose führen und die diagnostische Genauigkeit erhöhen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AML	akute myeloische Leukämie
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BAL	bronchioalveoläre Lavage
CEP	<i>centromer evaluation probe</i>
CV	Variationskoeffizient der integrierten optischen Dichte
C-KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA-ICM	<i>DNA image cytometry</i> ; DNA-Bildzytometrie
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
FHIT	<i>fragile histidine triad</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FNAB	Feinnadelaspirationsbiopsie
FUS1	<i>Fused-in-sarcoma</i> Gen
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
IASLC	<i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>
IOD	integrierte optische Dichte
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
Kap.	Kapitel
kb	kilobasen
KI	Konfidenzintervall
LSI	<i>locus-specific identifier probes</i>
MYC	<i>myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NP 40	Nonyl-phenoxypropylpolyethoxylethanol
NPW	negativer prädiktiver Wert
NSCLC	<i>non small cell lung cancer</i> ; nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
p53	Protein 53
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PPW	positiver prädiktiver Wert
RAS	<i>rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RASSF1A	<i>RAS-associated domain family 1</i>
RB1	Retinoblastom-Gen 1
SCLC	<i>small cell lung cancer</i> ; kleinzelliges Lungenkarzinom
SIADH	Syndrom der inadäquaten antidiuretischen Hormonsekretion

SI-Einheiten:	g	Gramm
	min	Minute
	ml	Milliliter
	µl	Mikroliter
	µm	Mikrometer
SSC	<i>sodium citrate standard</i>	
STARD	<i>Standards for the reporting of diagnostic accuracy studies</i>	
TBNA	transbronchiale Nadelaspirationsbiopsie	
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>	
VALG	<i>Veteran Administration Lung Cancer Study Group</i>	
WCP	<i>whole chromosome painting probes</i>	

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Modell der Kanzerogenese des Plattenepithelkarzinoms
Abb. 1.2	Histologie eines gut differenzierten Adenokarzinoms, eines mäßig differenzierten Adenokarzinoms, eines Plattenepithelkarzinoms und eines großzelligen Karzinoms der Lunge A-D
Abb. 1.3	Zytologie normalen und entzündlich veränderten respiratorischen Epithels, eines Plattenepithelkarzinoms, eines Adenokarzinoms, eines großzelligen Karzinoms der Lunge und eines SCLC A-F
Abb. 2.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung A-D
Abb. 2.2	nach Feulgen gefärbtes Präparat einer bronchioalveolären Lavage
Abb. 2.3	Histogramme der DNA-Bildzytometrie A-C
Abb. 3.1	modifiziertes STARD-Diagramm zur Veranschaulichung des Weges der Patienten durch die Studie
Abb. 3.2	die Verteilung der zytologisch negativen Präparate in die einzelnen diagnostischen Untergruppen
Abb. 3.3	die Verteilung der zytologisch falsch-negativen Präparate in die einzelnen diagnostischen Untergruppen
Abb. 3.4	die zytologischen Tumordiagnosen der zytologisch positiven Präparate
Abb. 3.5	richtig-positive FISH-Präparate und korrespondierende Tumorphistologie
Abb. 3.6	richtig-negative FISH-Präparate und korrespondierende klinische Diagnosen
Abb. 3.7	falsch-negative FISH-Präparate und korrespondierende Tumorphistologie
Abb. 3.8	Verteilung der Malignitätskriterien der 99 positiv getesteten Fälle der DNA-ICM
Abb. 3.9	richtig-positive Präparate der DNA-ICM und korrespondierende Tumorphistologie
Abb. 3.10	richtig-negative Befunde der DNA-ICM und korrespondierende klinische Diagnose
Abb. 3.11	falsch-negative Präparate der DNA-ICM und korrespondierende Tumorphistologie
Abb. 3.12	Vergleich der adjuvanten Methoden in den 175 Proben des Methodenvergleich (a), der Gesamtkohorte (b), diagnostisch unklaren (c), zweifelhaften (d) und dringend verdächtigen Präparaten (e)

- Abb. 4.1 Vergleich des gleichen Abschnitts eines Präparats der Kategorie „dringender Verdacht“ in Zytologie (Papanicolaou-Färbung, 40-fache Vergrößerung) [A] und FISH (40-fache Vergrößerung) [B]

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Materialien und Geräte für die Papanicolaou-Färbung
Tabelle 2.1	benötigte Reagenzien, Materialien und Geräte für die FISH
Tabelle 2.3	Menge des Hybridisierungsmix je Deckglasgröße für FISH
Tabelle 2.4	ausgewählte Studien zur Sensitivität und Spezifität von FISH bei unterschiedlichem <i>Cutoff</i>
Tabelle 2.5	Liste der benötigten Materialien und Geräte für die DNA-Bildzytometrie
Tabelle 3.1	die klinischen Daten der 210 Patienten der Studie
Tabelle 3.2	Ergebnisse der Zytologie
Tabelle 3.3	Vergleich der qualitativen zytologischen Diagnose mit dem Referenzstandard
Tabelle 3.4	Vergleich der zytologischen Diagnose mit dem Referenzstandard
Tabelle 3.5	die zytologisch zweifelhaften Präparate und ihre Zuordnung in die diagnostischen Untergruppen
Tabelle 3.6	die zytologisch dringend verdächtigen Präparate und ihre Zuordnung in die diagnostischen Untergruppen
Tabelle 3.7	die zytologischen Diagnosen der positiven Präparate und ihr Vergleich mit der korrespondierenden Tumorhistologie
Tabelle 3.8	die zytologischen Diagnosen der positiven Präparate hinsichtlich der Unterscheidung in SCLC und NSCLC und Vergleich mit der korrespondierenden Tumorhistologie
Tabelle 3.9	Auswertung der Zytologie und der FISH im Vergleich mit dem <i>Follow-Up</i> (Pilotstudie)
Tabelle 3.10	Sensitivität und Spezifität von Zytologie und FISH (Pilotstudie)
Tabelle 3.11	statistische Maßzahlen der FISH
Tabelle 3.12	das qualitative FISH-Ergebnis der Gesamtkohorte im Vergleich zum Referenzstandard
Tabelle 3.13	das qualitative FISH-Ergebnis der zytologisch positiven Präparate im Vergleich zum Referenzstandard
Tabelle 3.14	das qualitative FISH-Ergebnis der zytologisch negativen Präparate im Vergleich zum Referenzstandard
Tabelle 3.15	das qualitative FISH-Ergebnis der zytologisch zweifelhaften Präparate im Vergleich zum Referenzstandard
Tabelle 3.16	das qualitative FISH-Ergebnis der zytologisch dringend verdächtigen Präparate im Vergleich zum Referenzstandard
Tabelle 3.17	statistische Maßzahlen der DNA-ICM

Tabelle 3.18	das Ergebnis der DNA-ICM der Gesamtkohorte im Vergleich zum Referenzstandard
Tabelle 3.19	das Ergebnis der DNA-ICM der zytologisch positiven Präparate im Vergleich zum Referenzstandard
Tabelle 3.20	das Ergebnis der DNA-ICM der zytologisch negativen Präparate im Vergleich zum Referenzstandard
Tabelle 3.21	das Ergebnis der DNA-ICM der zytologisch zweifelhaften Präparate im Vergleich zum Referenzstandard
Tabelle 3.22	das Ergebnis der DNA-ICM der zytologisch dringend verdächtigen Präparate im Vergleich zum Referenzstandard
Tabelle 3.23 a+b	Vergleich der Anzahl der auswertbaren Präparate für FISH und DNA-ICM bei Gesamtkohorte, sicher positiven und negativen Befunden (a) und diagnostisch unklaren, zweifelhaften und dringend verdächtigen Befunden (b)
Tabelle 3.24	Verteilung der richtig-positiven, falsch-positiven, richtig-negativen und falsch-negativen Befunde auf die verschiedenen Methoden

9. Literaturverzeichnis

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-386.
3. Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2013.
4. Bray F, Tyczynski JE, Parkin DM. Going up or coming down? The changing phases of the lung cancer epidemic from 1967 to 1999 in the 15 European Union countries. *Eur J Cancer.* 2004;40(1):96-125.
5. Toh C-K. The changing epidemiology of lung cancer. *Methods Mol Biol.* 2009;472:397-411.
6. Jemal A, Thun MJ, Ries LAG, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(23):1672-1694.
7. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest.* 2003;123(1 Suppl):21S-49S.
8. DOLL R, HILL AB. A study of the aetiology of carcinoma of the lung. *Br Med J.* 1952;2(4797):1271-1286.
9. LEVIN ML, GOLDSTEIN H, GERHARDT PR. Cancer and tobacco smoking; a preliminary report. *J Am Med Assoc.* 1950;143(4):336-338.
10. DOLL R, HILL AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J.* 1950;2(4682):739-748.
11. Wynder EL, Graham EA. Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma. *Bull World Health Organ.* 2005;83(2):146-153.
12. Engeland A, Haldorsen T, Andersen A, Tretli S. The impact of smoking habits on lung cancer risk: 28 years' observation of 26,000 Norwegian men and women. *Cancer Causes Control.* 1996;7(3):366-376.
13. Islam SS, Schottenfeld D. Declining FEV1 and chronic productive cough in cigarette smokers: a 25-year prospective study of lung cancer incidence in Tecumseh, Michigan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994;3(4):289-298.
14. Freund KM, Belanger AJ, D'Agostino RB, Kannel WB. The health risks of smoking. The Framingham Study: 34 years of follow-up. *Ann Epidemiol.* 1993;3(4):417-424.
15. Garfinkel L, Stellman SD. Smoking and lung cancer in women: findings in a prospective study. *Cancer Res.* 1988;48(23):6951-6955.
16. Akiba S, Hirayama T. Cigarette smoking and cancer mortality risk in Japanese men and women--results from reanalysis of the six-prefecture cohort study data. *Environ Health Perspect.* 1990;87:19-26.
17. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(14):1194-1210.
18. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ.* 1997;315(7114):980-988.
19. Hirayama T. Cancer mortality in nonsmoking women with smoking husbands based on a large-scale cohort study in Japan. *Prev Med.* 1984;13(6):680-690.
20. Lubin JH, Boice JD Jr, Edling C, et al. Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(11):817-827.
21. Darby S, Hill D, Deo H, et al. Residential radon and lung cancer--detailed results of a collaborative analysis of individual data on 7148 persons with lung cancer and 14,208 persons without lung cancer from 13 epidemiologic studies in Europe. *Scand J Work Environ Health.* 2006;32 Suppl 1:1-83.

22. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; v. 100C. A review of human carcinogens. Part C: Arsenic, metals, fibres and dusts/ IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2009; Lyon, France)
23. Luo J, Hendryx M, Ducatman A. Association between six environmental chemicals and lung cancer incidence in the United States. *J Environ Public Health*. 2011;2011:463701.
24. Committee on Health Risks of Exposure to Radon (BEIR VI), National Research Council. "2 The Mechanistic Basis of Radon-Induced Lung Cancer." *Health Effects of Exposure to Radon: BEIR VI*. Washington, DC: The National Academies Press, 1999:36-68
25. Tockman MS, Anthonisen NR, Wright EC, Donithan MG. Airways obstruction and the risk for lung cancer. *Ann Intern Med*. 1987;106(4):512-518.
26. Mannino DM, Aguayo SM, Petty TL, Redd SC. Low lung function and incident lung cancer in the United States: data From the First National Health and Nutrition Examination Survey follow-up. *Arch Intern Med*. 2003;163(12):1475-1480.
27. Hubbard R, Venn A, Lewis S, Britton J. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):5-8.
28. Le Jeune I, Gribbin J, West J, Smith C, Cullinan P, Hubbard R. The incidence of cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Respir Med*. 2007;101(12):2534-2540.
29. Li J, Yang M, Li P, Su Z, Gao P, Zhang J. Idiopathic pulmonary fibrosis will increase the risk of lung cancer. *Chin Med J*. 2014;127(17):3142-3149.
30. Wu C-Y, Hu H-Y, Pu C-Y, et al. Pulmonary tuberculosis increases the risk of lung cancer: a population-based cohort study. *Cancer*. 2011;117(3):618-624.
31. Crispo A, Brennan P, Jöckel K-H, et al. The cumulative risk of lung cancer among current, ex- and never-smokers in European men. *Br J Cancer*. 2004;91(7):1280-1286.
32. Côté ML, Liu M, Bonassi S, et al. Increased risk of lung cancer in individuals with a family history of the disease: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Eur J Cancer*. 2012;48(13):1957-1968.
33. Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res*. 1984;44(10):4217-4223.
34. Ten Have-Opbroek AA, Benfield JR, van Krieken JH, Dijkman JH. The alveolar type II cell is a pluripotential stem cell in the genesis of human adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Histol Histopathol*. 1997;12(2):319-336.
35. Kim CFB, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*. 2005;121(6):823-835.
36. Saccomanno G, Archer VE, Saunders RP, Auerbach O, Klein MG. Early indices of cancer risk among uranium miners with reference to modifying factors. *Ann N Y Acad Sci*. 1976;271:377-383.
37. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-867.
38. Thiberville L, Payne P, Vielkinds J, et al. Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus. *Cancer Res*. 1995;55(22):5133-5139.
39. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998;396(6712):643-649.
40. Sanchez-Cespedes M. Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. *Lung Cancer*. 2003;40(2):111-121.
41. Stindl R. Defining the steps that lead to cancer: replicative telomere erosion, aneuploidy and an epigenetic maturation arrest of tissue stem cells. *Med Hypotheses*. 2008;71(1):126-140.
42. Sato M, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2007;2(4):327-343.

43. Varella-Garcia M. Chromosomal and genomic changes in lung cancer. *Cell Adh Migr*. 2010;4(1).
44. Kang JU, Koo SH, Kwon KC, et al. High frequency of genetic alterations in non-small cell lung cancer detected by multi-target fluorescence in situ hybridization. *J Korean Med Sci*. 2007;22 Suppl:S47-51.
45. Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Jung SS. Gain of the EGFR gene located on 7p12 is a frequent and early event in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;184(1):31-37.
46. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
47. William D. Travis, Elisabeth Brambilla, Allen P. Burke, Alexander Marx, Andrew G. Nicholson (Eds.): WHO Classification of Tumours of Lung, Pleura, Thymus and Heart (4th edition). IARC: Lyon 2015
48. Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung cancer. *Cancer*. 1995;75(1 Suppl):191-202.
49. Travis W.D., Brambilla E., Muller-Hermelink H.K., Harris C.C. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press: Lyon 2004
50. Petersen I. The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Dtsch Arztebl Int*. 2011;108(31-32):525-531.
51. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011;6(2):244-285.
52. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations)*, National Cancer Institute. Bethesda, MD
53. Buccheri G, Ferrigno D. Lung cancer: clinical presentation and specialist referral time. *Eur Respir J*. 2004;24(6):898-904.
54. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):97S-104S.
55. Barz H, Barz D, Klemm P. [Distribution of lung cancer metastases. I. Combination and frequency of organ metastases]. *Arch Geschwulstforsch*. 1982;52(7):551-560.
56. Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, et al. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. *Pneumologie*. 2010;64(S 02):e1-e164.
57. Lin RS, Plevritis SK. Comparing the benefits of screening for breast cancer and lung cancer using a novel natural history model. *Cancer Causes Control*. 2012;23(1):175-185.
58. Bach PB, Kelley MJ, Tate RC, McCrory DC. Screening for lung cancer: a review of the current literature. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):72S-82S.
59. Bach PB, Niewoehner DE, Black WC. Screening for lung cancer: the guidelines. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):83S-88S.
60. Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, et al. Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet*. 1999;354(9173):99-105.
61. Aberle DR, Adams AM, Berg CD, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011;365(5):395-409.
62. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. Vol 7. Auflage. John Wiley & Sons; 2009.
63. Scott WJ, Howington J, Feigenberg S, Movsas B, Pisters K. Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007;132(3 Suppl):234S-242S.

64. Costanzo R, Piccirillo MC, Sandomenico C, et al. Gefitinib in non small cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:815269.
65. Bremnes RM, Sundstrom S, Aasebø U, Kaasa S, Hatlevoll R, Aamdal S. The value of prognostic factors in small cell lung cancer: results from a randomised multicenter study with minimum 5 year follow-up. *Lung Cancer.* 2003;39(3):303-313.
66. Schreiber G, McCrory DC. Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence. *Chest.* 2003;123(1 Suppl):115S-128S.
67. Rivera MP, Mehta AC. Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest.* 2007;132(3 Suppl):131S-148S. doi:10.1378/chest.07-1357.
68. Bibbo M, Wilbur D. *Comprehensive Cytopathology: Expert Consult.* 3. Aufl. Saunders W B Co; 2008.
69. Pschyrembel W. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (Pschyrembel Klinisches Worterbuch): 263.* Vol 263., neu bearbeitete Auflage. De Gruyter; 2011.
70. Boveri T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci.* 2008;121 Suppl 1:1-84.
71. Ghadimi BM, Sackett DL, Difilippantonio MJ, et al. Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;27(2):183-190.
72. Blegen H, Ghadimi BM, Jauho A, et al. Genetic instability promotes the acquisition of chromosomal imbalances in T1b and T1c breast adenocarcinomas. *Anal Cell Pathol.* 2001;22(3):123-131.
73. Choma D, Daurès JP, Quantin X, Pujol JL. Aneuploidy and prognosis of non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of published data. *Br J Cancer.* 2001;85(1):14-22.
74. Holm LE, Jakobsson P, Killander D, Silfverswärd C, Wersäll J. DNA and its synthesis in individual tumor cells from human upper respiratory tract squamous cell carcinomas. *Laryngoscope.* 1980;90(7 Pt 1):1209-1224.
75. Nasiell M, Kato H, Auer G, Zetterberg A, Roger V, Karlen L. Cytomorphological grading and Feulgen DNA-analysis of metaplastic and neoplastic bronchial cells. *Cancer.* 1978;41(4):1511-1521.
76. Teplitz RL, Pak HY, Benfield JR, et al. Quantitative DNA. Comparative studies of a cellular marker for bronchogenic carcinoma. *JAMA.* 1983;249(8):1046-1049.
77. Duesberg P. Chromosomal chaos and cancer. *Sci Am.* 2007;296(5):52-59.
78. Torres EM, Williams BR, Amon A. Aneuploidy: cells losing their balance. *Genetics.* 2008;179(2):737-746.
79. Williams BR, Prabhu VR, Hunter KE, et al. Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science.* 2008;322(5902):703-709.
80. Fabarius A, Li R, Yerganian G, Hehlmann R, Duesberg P. Specific clones of spontaneously evolving karyotypes generate individuality of cancers. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008;180(2):89-99.
81. Padilla-Nash HM, Hathcock K, McNeil NE, et al. Spontaneous transformation of murine epithelial cells requires the early acquisition of specific chromosomal aneuploidies and genomic imbalances. *Genes, Chromosomes & Cancer.* December 2011.
82. Sheltzer JM, Blank HM, Pfau SJ, et al. Aneuploidy drives genomic instability in yeast. *Science.* 2011;333(6045):1026-1030.
83. Hede K. Which came first? Studies clarify role of aneuploidy in cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(2):87-89.
84. Wang Z, Cummins JM, Shen D, et al. Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Res.* 2004;64(9):2998-3001.
85. Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, et al. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature.* 2004;428(6978):77-81.

86. Ricke RM, Jeganathan KB, van Deursen JM. Bub1 overexpression induces aneuploidy and tumor formation through Aurora B kinase hyperactivation. *J Cell Biol.* 2011;193(6):1049-1064.
87. Auffermann W, Böcking A. Early detection of precancerous lesions in dysplasias of the lung by rapid DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol.* 1985;7(3):218-226.
88. Blöndal T, Bengtsson A. Diagnostic application of nuclear DNA measurements on bronchial secretions. *Anal Quant Cytol.* 1982;4(4):269-274.
89. Schramm M, Wrobel C, Born I, et al. Equivocal cytology in lung cancer diagnosis: improvement of diagnostic accuracy using adjuvant multicolor FISH, DNA-image cytometry, and quantitative promoter hypermethylation analysis. *Cancer Cytopathol.* 2011;119(3):177-192.
90. Haroske G, Baak JP, Danielsen H, et al. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol.* 2001;23(2):89-95.
91. Sandritter W, Adler CP. Polyploidization of heart muscle nuclei as a prerequisite for heart growth and numerical hyperplasia in heart hypertrophy. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab.* 1976;12:115-127.
92. Biesterfeld S, Gerres K, Fischer-Wein G, Böcking A. Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J Clin Pathol.* 1994;47(1):38-42.
93. Zimmet J, Ravid K. Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol.* 2000;28(1):3-16.
94. Hamada S, Namura K, Fujita S, Kushima R, Hattori T. DNA ploidy and proliferative activity of human pulmonary epithelium. *Virchows Arch, B, Cell Pathol.* 1990;58(6):405-410.
95. Bubendorf L, Müller P, Joos L, et al. Multitarget FISH analysis in the diagnosis of lung cancer. *Am J Clin Pathol.* 2005;123(4):516-523.
96. Sokolova IA, Bubendorf L, O'Hare A, et al. A fluorescence in situ hybridization-based assay for improved detection of lung cancer cells in bronchial washing specimens. *Cancer.* 2002;96(5):306-315.
97. Savic S, Glatz K, Schoenegg R, et al. Multitarget fluorescence in situ hybridization elucidates equivocal lung cytology. *Chest.* 2006;129(6):1629-1635.
98. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, et al. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn.* 2000;2(3):116-123.
99. Press MF, Sauter G, Bernstein L, et al. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res.* 2005;11(18):6598-6607.
100. Dewald GW, Schad CR, Christensen ER, et al. The application of fluorescent in situ hybridization to detect Mbcrl/abl fusion in variant Ph chromosomes in CML and ALL. *Cancer Genet Cytogenet.* 1993;71(1):7-14.
101. Stembalska A, Slezak R, Pesz K, Gil J, Sasiadek M. Prenatal diagnosis--principles of diagnostic procedures and genetic counseling. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007;45 Suppl 1:S11-16.
102. Halling KC, Rickman OB, Kipp BR, Harwood AR, Doerr CH, Jett JR. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of lung cancer in bronchoscopic specimens. *Chest.* 2006;130(3):694-701.
103. Barkan GA, Caraway NP, Jiang F, et al. Comparison of molecular abnormalities in bronchial brushings and tumor touch preparations. *Cancer.* 2005;105(1):35-43.
104. Wang J, Kim J, Roh M, et al. Pim1 kinase synergizes with c-MYC to induce advanced prostate carcinoma. *Oncogene.* February 2010.
105. Rapp UR, Korn C, Ceteci F, et al. Myc Is a Metastasis Gene for Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS ONE.* 4(6).
106. Burkhardt L, Grob TJ, Hermann I, et al. Gene amplification in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* December 2009.

107. Varella-Garcia M, Kittelson J, Schulte AP, et al. Multi-target interphase fluorescence in situ hybridization assay increases sensitivity of sputum cytology as a predictor of lung cancer. *Cancer Detect Prev*. 2004;28(4):244-251.
108. Wolfer A, Wittner BS, Irimia D, et al. MYC regulation of a "poor-prognosis" metastatic cancer cell state. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(8):3698-3703.
109. Böcking A: DNA measurements. When and why? In: Compendium on quality assurance, proficiency testing, and workload limitations: In: Wied GL, Keebler CM, Rosenthal DL, Schenck U, Somrak TM, Vooijs GP (eds.) Chicago, Illinois, USA: Tutorials of Cytology 1995; 170-188.
110. Böcking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. European Society for Analytical Cellular Pathology. *Anal Cell Pathol*. 1995;8(1):67-74.
111. Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A. 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. European Society for Analytical Cellular Pathology. *Anal Cell Pathol*. 1998;17(4):189-200.
112. Giroud F, Haroske G, Reith A, Böcking A. 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance. European Society for Analytical Cellular Pathology. *Anal Cell Pathol*. 1998;17(4):201-208.
113. Chatelain R, Willms A, Biesterfeld S, Auffermann W, Böcking A. Automated Feulgen staining with a temperature-controlled staining machine. *Anal Quant Cytol Histol*. 1989;11(3):211-217.
114. Ono J, Auer G. The significance of DNA measurements for the early detection of bronchial cell atypia. *Cytometry*. 1983;3(5):340-344.
115. Pak HY, Teplitz RL, Ashdjian V, Yokota SB, Hammond WG, Benfield JR. Quantitative DNA determination by image analysis. II. Application to human and canine pulmonary cytology. *Anal Quant Cytol*. 1983;5(4):263-268.
116. Carey FA, Gray E, O'Mahony M, Craig SR, Salto-Tellez M, Lamb D. A comparison of flow and image DNA cytometry in prediction of patient prognosis in surgically resected small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol*. 1996;12(3):137-143.
117. Maounis NF, Chorti M, Apostolakis E, et al. Prognostic impact of Deoxyribonucleic acid (DNA) image analysis cytometry and immunohistochemical expression of Ki67 in surgically resected non-small cell lung cancers. *Cancer Detect Prev*. 2006;30(6):507-514.
118. Petersen I, Kotb WFMA, Friedrich K-H, Schlüns K, Böcking A, Dietel M. Core classification of lung cancer: correlating nuclear size and mitoses with ploidy and clinicopathological parameters. *Lung Cancer*. 2009;65(3):312-318.
119. Böcking A, Sproll C, Stöcklein N, et al. Role of brush biopsy and DNA cytometry for prevention, diagnosis, therapy, and followup care of oral cancer. *J Oncol*. 2011;2011:875959.
120. Bibbo M, Dytch HE, Alenghat E, Bartels PH, Wied GL. DNA ploidy profiles as prognostic indicators in CIN lesions. *Am J Clin Pathol*. 1989;92(3):261-265.
121. Grote HJ, Nguyen HVQ, Leick AG, Böcking A. Identification of progressive cervical epithelial cell abnormalities using DNA image cytometry. *Cancer*. 2004;102(6):373-379.
122. Naryshkin S, Young NA. Respiratory cytology: a review of non-neoplastic mimics of malignancy. *Diagn Cytopathol*. 1993;9(1):89-97.
123. Saad RS, Silverman JF. Respiratory cytology: differential diagnosis and pitfalls. *Diagn Cytopathol*. 2010;38(4):297-307.
124. Crapanzano JP, Zakowski MF. Diagnostic dilemmas in pulmonary cytology. *Cancer*. 2001;93(6):364-375.
125. Glatz K, Savic S, Glatz D, et al. An online quiz uncovers limitations of morphology in equivocal lung cytology. *Cancer*. 2006;108(6):480-487.
126. Böcking A. [Standardization of cytopathologic diagnosis]. *Pathologe*. 1998;19(3):236-241.

-
127. Hilgers R-D. *Einführung in Die Medizinische Statistik (Statistik Und Ihre Anwendungen)*. Vol 2., verb. u. überarb. Aufl. Springer; 2006.
128. Roggli VL, Vollmer RT, Greenberg SD, McGavran MH, Spjut HJ, Yesner R. Lung cancer heterogeneity: a blinded and randomized study of 100 consecutive cases. *Hum Pathol*. 1985;16(6):569-579.
129. Herth FJF, Eberhardt R, Vilmann P, Krasnik M, Ernst A. Real-time endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration for sampling mediastinal lymph nodes. *Thorax*. 2006;61(9):795-798. doi:10.1136/thx.2005.047829.
130. Koss LG, Melamed MR. *Koss' Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases*. Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
131. Voss JS, Kipp BR, Halling KC, et al. Fluorescence in situ hybridization testing algorithm improves lung cancer detection in bronchial brushing specimens. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(5):478-485.

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die durch ihr Mitwirken und ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Hr. Prof. Dr. A. Böcking danke ich für die Gelegenheit, unter seiner Leitung im Institut für Cytopathologie arbeiten zu dürfen sowie für die fachliche Unterstützung und die aufmerksame Durchsicht und Korrektur der Doktorarbeit.

Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Hr. Dr. M. Schramm für seine fachliche Beratung, die intensive Betreuung sowie die zahlreichen Ratschläge, welche mir eine große Hilfe waren.

Für ihre Hilfe und für meine Einarbeitung im Bereich der DNA-Bildzytometrie danke ich Fr. Dr. N. Pomjanski.

Hr. Prof. Dr. S. Biesterfeld danke für die freundliche Unterstützung und Beratung.

Auch möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Funktionsbereich Cytopathologie bedanken, die mich sehr freundlich aufgenommen und unterstützt haben. Insbesondere danke ich Fr. M. Kazimirek für ihre fachliche Hilfe bei den Laborarbeiten.

Ich bedanke mich bei Hr. Dr. R. Kappes sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Pneumologischen Klinik des Florence-Nightingale Krankenhaus Düsseldorf für die gute Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Patientinnen und Patienten, deren Proben in dieser Doktorarbeit untersucht wurden.

Ihnen ist es zu verdanken, dass diese Doktorarbeit verfasst werden konnte.

11. Eidesstattliche Versicherung

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

Düsseldorf, 20.07.2015, Ingmar Born

Unterschrift