

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. I. Esposito
Funktionsbereich Cytopathologie

Erprobung eines automatisierten DNA-zytometrischen Messsystems an luftgetrockneten Ergusspräparaten

Dissertation

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

vorgelegt von

Anna Feider

2018

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Stefan Biesterfeld

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans Reinke

Für Lena und Frederick

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein automatisiertes Messsystem für DNA-Bildzytometrie an luftgetrockneten Ergusspräparaten zu erproben und einen direkten Vergleich mit der herkömmlichen, manuellen DNA-Bildzytometrie zu ziehen. Die manuelle DNA-Bildzytometrie wird schon länger als adjuvante Methode zur konventionellen Zytologie eingesetzt. Deren Treffsicherheit für Ergusspräparate ist mit im Mittel 58 % anzugeben. Da die manuelle DNA-Bildzytometrie relativ zeitaufwändig ist und zudem verhältnismäßig wenige, subjektiv ausgewählte Zellen je Präparat gemessen werden, sollte nun ein automatisiertes Messsystem erprobt werden. Zur Überprüfung der Übereinstimmung sollte nicht nur die Treffsicherheit der beiden Verfahren verglichen, sondern auch einzelne Variablen der beiden Messungen im direkten Vergleich analysiert werden.

Dazu wurden insgesamt 121 luftgetrocknete Ergusspräparate aus dem Jahr 2012 der Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf untersucht. Nach entsprechender Vorbereitung der Präparate und anschließender Feulgen-Färbung wurden alle Präparate beiden Messungen zugeführt. Für die manuelle Messung wurden je Präparat ca. 300 Analyse- und 30 Referenzzellen ausgewählt und anschließend ein DNA-Histogramm erstellt. Der Prototyp des automatischen Messsystems stand an der RWTH Aachen und stammt von demselben Hersteller wie das an der Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf zurzeit in Gebrauch befindliche Gerät. Sowohl der Vortrieb des Präparats als auch die Unterscheidung der Zelltypen laufen hier automatisch ab. Zum Schluss erfolgt eine manuelle Kontrolle durch den Untersucher.

Für die Vergleichbarkeit der einzelnen Messvariablen zeigten sich einige Abweichungen, welche vor allem auf die unterschiedlichen Zellzahlen zurückzuführen sind, die bei beiden Messungen analysiert werden. Insgesamt lag die Übereinstimmung der Diagnosen für beide Verfahren aber bei 95,9 %. Es ergab sich für die manuelle Messung eine Sensitivität von 68,5 % bei einer Spezifität von 100 %. Die automatisierte Messung führte durch die höhere Anzahl der gemessenen Zellkerne zu einer höheren Sensitivität (75,9 %) bei einer Spezifität von 98,5 %. Die ermittelten Werte für Sensitivität und Spezifität passen gut zu den in der Literatur beschriebenen Werten bei ähnlich großer Stichprobe (durchschnittliche Sensitivität 76,3 %, durchschnittliche Spezifität 98,5 %).

Insgesamt ließ sich feststellen, dass die diagnostische Treffsicherheit durch das automatisierte Verfahren im Vergleich zur herkömmlichen Methode verbessert werden konnte und zudem der Zeitaufwand für eine Messung deutlich verringert wird. Außerdem ist es bei der automatisierten Messung durch das automatische Erkennen von abnormalen Zellen möglich, tumorzellhaltige Präparate ggf. auch unter der Nachweisgrenze für DNA-zytometrische Stammlinien zu identifizieren.

Somit stellt die automatisierte DNA-Bildzytometrie eine gute Ergänzung bzw. Alternative zur konventionellen DNA-Bildzytometrie dar und eröffnet darüber hinaus neue diagnostische Möglichkeiten durch die automatische Zellerkennung.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AgNOR	Begriff für mit einer Silberreaktion (chemisch: Ag) dargestellte Proteine, die mit den NORs (siehe unten) assoziiert sind
°C	Grad Celsius
CCD	<i>charged coupled device</i>
CUP	<i>Cancer of unknown primary</i>
CV	Variationskoeffizient
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dl	Deziliter
dV	dringender Verdacht
EE	<i>exceeding event</i>
ER	<i>exceeding rate</i>
ESCAP	<i>European Society for Analytical Cellular Pathology</i>
g	Gramm
G ₀	Ruhephase im Zellzyklus
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin (Färbung)
ICC	Interklassenkorrelationskoeffizient
IOD	Integrierte optische Dichte
l	Liter
MGG	May-Grünwald-Giemsa
min	Minute
ml	Milliliter
M / MW	Mittelwert
n.A:	numerische Apertur
NOR	<i>nucleus organizing regions</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Pap	Papanicolaou
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule

SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
STL	Stammlinie
TRIS	tris hydroxymethyl aminomethan
W.D.	<i>working distance</i>
zw	zweifelhaft

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Ergüsse seröser Körperhöhlen	1
1.2.1 Ätiologie und Pathogenese	1
1.2.2 Klinik und Diagnose	5
1.3 Treffsicherheit der Ergusszytologie	6
1.4 Adjuvante Untersuchungsmethoden	7
1.5 Historie der DNA-Bildzytometrie	9
1.6 Grundlagen der DNA-Bildzytometrie	12
1.7 Ziele der Arbeit	14
2 Material und Methoden	17
2.1 Patientenkollektiv und Präparate	17
2.2 Zytologische Untersuchungen in der Routinediagnostik	18
2.2.1 Präparateherstellung	18
2.2.2 MGG Färbung	19
2.2.3 Färbung nach Papanicolaou (Pap)	19
2.2.4 Konventionelle zytologische Diagnostik	21
2.2.5 Immunzytochemie	22
2.3 DNA-Bildzytometrie	24
2.3.1 Feulgen-Färbung	24
2.3.2 Vorbereitung der Präparate	26
2.3.3 Manuelle DNA-Bildzytometrie	27
2.3.4 Automatisierte Messung	29
2.3.5 Auswertung der DNA Zytometrie	30
2.4 Statistische Datenauswertung	32

2.4.1	Korrelationskoeffizient nach Pearson und Interklassen-	
	korrelationskoeffizient.....	32
2.4.2	t-Test.....	33
2.4.3	Cohens Kappa-Koeffizient	33
2.4.4	Sensitivität und Spezifität.....	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Deskriptive Betrachtung und Vergleich der Parameter für beide	
	Messmethoden.....	35
3.1.1	Anzahl gemessener Analyse- und Referenzzellen.....	35
3.1.2	9c Exceeding Events	36
3.1.3	Anzahl der aneuploiden Stammlinien.....	42
3.2	Betrachtung einzelner Parameter bei nur einer Messmethode.....	45
3.2.1	Zusammenhang zwischen CV abnormalities und Diagnose der	
	automatischen Messung.....	46
3.2.2	2c Referenz-IOD der manuellen Messung	47
3.3	Übereinstimmung der Diagnosen	49
3.3.1	Vergleich der zytologischen Diagnosen in Aachen und	
	Düsseldorf	49
3.3.2	Vergleich der DNA-zytometrischen Diagnosen der manuellen	
	und der automatischen Messung	51
3.3.3	Vergleiche zwischen zytologischen und DNA-zytometrischen	
	Diagnosen	51
4	Diskussion	55
4.1	Relevanz und Treffsicherheit der Ergusszytologie	55
4.2	Kritische Beurteilung der eigenen Ergebnisse.....	58
4.2.1	Kritische Beurteilung des Vergleichs einzelner Parameter	59
4.2.2	Beurteilung der Treffsicherheiten und Darstellung diskrepanter	
	Messergebnisse	62

4.3 Kritischer Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der wissenschaftlichen Literatur	66
4.3.1 DNA-zytometrische Studien an Ergüssen seröser Höhlen.....	66
4.3.2 Treffsicherheiten anderer adjuvanter Methoden	68
5 Schlussfolgerungen	71
6 Literaturverzeichnis	73
7 Abbildungsverzeichnis	80
8 Tabellenverzeichnis	81

1 Einleitung

1.1 Einführung

Gemäß den Angaben des Robert-Koch-Instituts erkrankten im Jahr 2012 477.950 Menschen in Deutschland an Krebs. 220.923 Menschen starben in demselben Jahr in Folge einer Krebserkrankung. Bei Männern waren die meisten Krebs-Todesfälle durch ein Bronchialkarzinom bedingt (24,8 %), bei Frauen war ein Mammakarzinom mit einem Anteil von 17,5 % für die meisten Krebssterbefälle verantwortlich (Robert-Koch-Institut, 2015).

Ergüsse seröser Körperhöhlen sind nicht selten der erste Hinweis auf eine mögliche Tumorerkrankung bzw. mögliche Metastasen. Ca. 46 % aller Patienten mit einem malignen Erguss haben zu diesem Zeitpunkt keinen bekannten Primärtumor. Die Untersuchung eines Ergusses stellt somit nicht nur den Pathologen vor eine diagnostische Herausforderung, sondern stellt allgemein eine wichtige Information für die betroffenen Patienten dar (Bedrossian, 1994).

Da die Sensitivität der konventionellen zytologischen Untersuchung vergleichsweise gering ist (s. Kapitel 1.3), sind methodische und klinische Studien erforderlich, die auf die Optimierung dieser abzielen. Die vorliegende Forschungsarbeit soll einen Beitrag liefern, indem sie die Ergebnisse zweier adjuvanter Verfahren, eines bewährten und eines neu entwickelten, miteinander vergleicht.

1.2 Ergüsse seröser Körperhöhlen

1.2.1 Ätiologie und Pathogenese

Die serösen Höhlen des Pleura-, Peritoneal- und Perikardraumes werden von einem einschichtigen Mesothel, einer einem einschichtigen Plattenepithel ähnlichen Deckzellschicht, ausgekleidet. Unter einem Erguss einer serösen

Körperhöhle versteht man den pathologischen Anstieg der Flüssigkeitsmenge in der Perikard-, Peritoneal- oder Pleurahöhle. Ein Erguss kann verschiedene Ursachen haben, wobei es vor allem gilt, maligne Veränderungen zytologisch zu erkennen und von anderen Ursachen abzugrenzen.

Bei der Ätiologie der Ergüsse kann man ganz allgemein drei Hauptursachen unterscheiden, nämlich Entzündungen, Stauungsphänomene und maligne Tumoren. Die Häufigkeit der Ergussursachen ist dabei von Körperhöhle zu Körperhöhle unterschiedlich. Diverse Fälle bleiben auch unaufgeklärt und werden als idiopathisch bezeichnet; ferner gibt es viele Sonderformen wie durch Urämie bedingte Ergüsse, eosinophile Ergussbildung oder ungeklärte, aber typische Ergüsse, z.B. im Rahmen eines Meigs-Syndroms (Fremed et al., 2015).

Für die Ursache von Pleuraergüssen finden sich in der Literatur verschiedene Häufigkeitsangaben. So liegt laut Light die Ursache für Pleuraergüsse zu 37 % bei Linksherzinsuffizienz, gefolgt von Pneumonie mit 22 % und neoplastischen Veränderungen mit 15 % (Light, 2002). Laut anderen Studien sind insgesamt sogar ca. 45 % aller Pleuraergüsse auf neoplastische Veränderungen zurückzuführen. Hiervon gehen etwa 75 % der malignen Ergüsse auf Bronchialkarzinome, Mammakarzinome, Lymphome, Leukämie oder Adenokarzinome unbekannten Ursprungs zurück (Hausheer & Yarbrow, 1987). In der Literatur wird berichtet, dass ca. ein Drittel aller malignen Pleuraergüsse auf Bronchialkarzinome zurückzuführen sind. Mammakarzinome sind die zweithäufigste Ursache, gefolgt von Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen. Ovarial- und gastrointestinale Tumoren sind weniger häufig. In 5-10 % aller Fälle kann kein Primärtumor identifiziert werden (Antony et al., 2001). *Post-mortem*-Studien zeigen, dass bei 15 % aller malignen Veränderungen auch ein Pleuraerguss vorlag (Rodriguez-Panadero et al., 1989).

Für Ergüsse des Peritoneums sind vielfach Stauungen verantwortlich, darunter als Hauptursache zu 80-85 % chronische Lebererkrankungen, aber auch Rechtsherzinsuffizienz. Bei ca. 10 % der Patienten liegt eine maligne Veränderung zugrunde (McHutchinson, 1997; Runyon, 1994). Fälle infektiöser

Peritonitis sind vergleichsweise selten. In der westlichen Welt sind die häufigsten Ursachen von Peritonealkarzinosen Ovarialkarzinome, ferner Endometriumkarzinome, Mammakarzinome, Pankreaskarzinome, gastrointestinale Karzinome sowie hepatozelluläre Karzinome (Hird et al., 1989; Sangisetty & Miner, 2012).

Auch für die selteneren Perikardergüsse finden sich in der Literatur verschiedene Erkrankungen als Auslöser. Nur die häufigsten sollen hier erwähnt werden. So werden für neoplastische Veränderungen Werte zwischen 13 % (Sagrista-Sauleda et al., 2000) und 31 % angegeben (Abdallah & Atar, 2014). Eine große Gruppe stellen in der Literatur zudem die idiopathischen Perikardergüsse (akut und chronisch) mit einem Anteil zwischen 7 % (Corey et al., 1993) und 48 % dar (Levy et al., 2003). Für Perikardergüsse in Folge von Radiatio finden sich in der Literatur Werte zwischen 10 % (Posner et al., 1981) und 14 % (Corey et al., 1993). Auch Nierenerkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder Tuberkulose können einen Perikarderguss nach sich ziehen (Abdallah & Atar, 2014; Levy et al., 2003).

Nicht jeder Erguss muss punktiert werden. Dies ist nicht notwendig bei kleineren Ergussvolumina und geklärt oder gut begründet vermuteter Ursache. Generell lassen sich nach Bedrossian (1994) Patienten, deren Ergusspunkate zytopathologisch untersucht werden, in vier Hauptgruppen einteilen:

- Patienten, bei denen zuvor maligne Veränderungen diagnostiziert wurden
- Patienten, die einen neu aufgetretenen Erguss haben, bei dem eine Malignitätswahrscheinlichkeit besteht
- Patienten mit Verdacht auf Mesotheliom nach Asbest-Exposition
- Patienten, bei denen mit Routineuntersuchungen keine Diagnose der Ergussursache gestellt werden konnte

Die Zusammenstellung zeigt, dass für primär gutartige Veränderungen, auf die Ergüsse nicht selten zurückgehen, keine genuine Indikation zur diagnostischen Punktion besteht, sondern eigentlich im Wesentlichen die Frage nach einer

Karzinose für eine Punktionsentscheidung ausschlaggebend ist. Anders sieht es allerdings aus, wenn die Punktion nicht diagnostischer, sondern klinisch-entlastender Natur ist, wenn also beispielsweise ein mehrere Liter umfassender Aszites bei bekannter Grunderkrankung abpunktiert wird. Solche Ergüsse werden nicht immer zytologisch untersucht, insbesondere nicht, wenn ihre Ursache bereits zuvor geklärt ist.

Neoplastische Veränderungen sind in Ergüssen häufig anzutreffen, wobei man zwischen primären, vor Ort entstandenen Neoplasien, und sekundären Neoplasien, z.B. Metastasen von anderen Tumoren, unterscheiden muss. Die primären malignen Mesotheliome gehen von den Mesothelien aus. Metastasen stammen häufig von Adenokarzinomen, z.B. Ovarialkarzinomen, Mamma- oder Magenkarzinomen. Auch kleinzellige Bronchialkarzinome metastasieren häufig in die serösen Höhlen (Freudenberg et al., 2002), während Plattenepithelkarzinome vergleichsweise selten in Ergüssen gefunden werden.

Außerdem lassen sich bei Ergüssen seröser Körperhöhlen Transsudate und Exsudate unterscheiden, wobei die Unterscheidung einen gewissen Rückschluss auf die Ergussgenese zulässt.

Transsudate entstehen, wenn es zu einem Ungleichgewicht zwischen dem hydrostatischen und dem onkotischen Druck kommt (Light, 2002). Dies kann z.B. infolge einer Leberzirrhose oder Niereninsuffizienz der Fall sein. In der Literatur finden sich verschiedene Angaben über die Definition eines Transsudates. Nach van Haam definieren sich Transsudate über ein geringes spezifisches Gewicht von unter 1,015 g/l und einen geringen Eiweißgehalt von unter 2 g/dl (Van Haam, 1977), andere Autoren setzen den Schwellenwert bei 3 g/dl (Koss & Melamed, 2006). Nach Light ist ein Transsudat über das Verhältnis des Proteingehaltes in der Ergussflüssigkeit zum Proteingehalt im Serum definiert, bei einem Transsudat liegt dieser Quotient bei $< 0,5$ (Light, 2002).

Exsudate sind entsprechend zell- und eiweißreicher, mit einem spezifischen Gewicht über 1,015 g/l und einem Proteinanteil von über 2g/dl (Van Haam, 1977), bzw. einem Quotienten zwischen Ergussflüssigkeit und Serumprotein

von $> 0,5$ (Light, 2002). Exsudate entstehen durch entzündliche Veränderungen der serösen Höhlen aufgrund einer erhöhten Kapillarpermeabilität und des damit verbundenen Übertritts von Proteinen und anderen zellulären Bestandteilen aus dem Blutkreislauf.

Neoplastische Ergüsse können sowohl Transsudate als auch Exsudate sein, je nachdem ob die Resorption der serösen Flüssigkeit mechanisch durch den Tumor verändert ist oder die Kapillaren der serösen Membranen durch die maligne Veränderung beschädigt werden (Bibbo & Wilbur, 2008). In der Regel erfüllen sie aber das Kriterium des Exsudates.

1.2.2 Klinik und Diagnose

Patienten, die unter einem Pleuraerguss leiden, geben bei Diagnosestellung oft Husten, thorakale Schmerzen und Dyspnoe an. Kleinere Pleuraergüsse sind oft symptomlos (Porcel & Light, 2013). Ergussmengen ab 175 ml können durch eine konventionelle Röntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen nachgewiesen, kleinere Ergussmengen unter 100 ml sonographisch erfasst werden (Hentrich & Hartenstein, 1997). Bei der körperlichen Untersuchung sind meist ein dumpfer Klopfschall und ein abgeschwächter Fremitus charakteristisch (Wong et al., 2009).

Patienten mit Aszites leiden bei größerer Ergussmenge häufig unter Ileusbeschwerden, Übelkeit und Erbrechen. Dies wird durch die volumenbedingte Verdrängung des Intestinals hervorgerufen. Dyspnoe und chronische Schmerzsyndrome, hervorgerufen über einen persistierenden hohen Druck in der Bauchhöhle, sowie venöse Thrombosen sind ebenfalls häufig anzutreffen (Ströhlein et al., 2011). Bei der klinischen Untersuchung fallen eine Flankendämpfung sowie die wandernde Dämpfungsgrenze bei Seitenlagerung des Patienten auf (McHutchinson, 1997).

Bei Patienten mit Ergussbildung im Perikard treten vor allem Dyspnoe, Thoraxschmerzen, Husten und allgemeine Schwäche auf. Als klinische Befunde können verschiedenen Studien zufolge zudem oft Tachykardie, ein

Jugularvenenstau sowie ein *Pulsus paradoxus* festgestellt werden (Nowrouzian et al., 1988).

1.3 Treffsicherheit der Ergusszytologie

Betrachtet man die Sensitivität und Spezifität (s. Kapitel 2.4.4) der Ergusszytologie, so geht aus einer Literaturübersicht mit sechs Studien und insgesamt 6001 Patienten hervor, dass die Sensitivität der konventionellen zytologischen Untersuchung im Mittel mit 58 % vergleichsweise gering ist, während die Spezifität bei hohen 97 % liegt (Spriggs & Boddington, 1989).

Die Treffsicherheit der zytologischen Untersuchung wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, auf die in Kapitel 4.1 noch näher eingegangen werden soll. Zudem variieren Sensitivität und Spezifität je nach Art des Ergusses:

So wird für Perikardergüsse für die diagnostische Treffsicherheit der Zytologie in Studien eine Sensitivität und Spezifität von 87 % bzw. 100 % angegeben (Meyers & Bouska, 1989). Eine andere Studie, die jedoch nur eine geringe Fallzahl aufweist, beschreibt sogar eine Sensitivität von 100 % bei einer Spezifität von 93.3 % (Malamou-Mitsi et al., 1996). Eine aktuelle Studie aus dem Schwerpunkt Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf gibt bei großer Fallzahl (n = 424) eine Sensitivität von 85,5 % bei einer Spezifität von 97 % an (Dannenberg, 2014).

Bei Pleuraergüssen zeigen Studien diagnostische Treffsicherheiten mit einer Sensitivität / Spezifität von 50 % / 97 % (Motherby, Nadjari, et al., 1999) bis hin zu einer Sensitivität von 71 % bei einer Spezifität von 99 % (Nance et al., 1991).

Für Ascites finden sich in der Literatur ebenfalls verschiedene Angaben. So gibt es Studien, die nur eine geringe Sensitivität (22 %) bei einer Spezifität von 100 % beschreiben (Salerno et al., 1990), während eine Studie aus den 60er Jahren sogar von einer Sensitivität von 81 % bei einer Spezifität von 97 % berichtet (Ceelen, 1964). Auch für die Treffsicherheit der Pleuraergusszytologie liegt eine aktuelle Studie vom Schwerpunkt Cytopathologie der Universitäts-

linik Düsseldorf vor. Im Jahr 2015 wurde von Fink für ein Patientenkollektiv von $n = 1437$ eine Sensitivität von 49,16 % bei einer Spezifität von 100 % beschrieben (Fink, 2015).

1.4 Adjuvante Untersuchungsmethoden

Um die Treffsicherheit zu verbessern und die Quote unklarer Fälle zu senken, werden heutzutage verschiedene adjuvante Untersuchungsmethoden angewandt (Mohanty & Dey, 2003; Motherby, Marcy, et al., 1998). Ziel ist es, mit Hilfe der adjuvanten Methoden die Sensitivität bei gleichbleibend hoher oder sogar noch verbesserter Spezifität zu erhöhen. Im Folgenden sollen kurz die geläufigsten Methoden beschrieben werden. Die Verbesserung der Treffsicherheiten mit Hilfe dieser adjuvanten Verfahren wird im Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie in Kapitel 4 diskutiert.

Als erste adjuvante Methode soll die Immunzytochemie beschrieben werden. Diese dient zum einen dem Nachweis von Tumorzellen, vor allem bei zweifelhaften oder dringend verdächtigen Präparaten, zum anderen kann bei bereits als positiv diagnostizierten Fällen durch sie der Primärtumor bestimmt werden. Für die immunzytochemische Untersuchung können Alkohol-fixierte (gefärbt oder ungefärbt) sowie ungefärbte luftgetrocknete Präparate verwendet werden.

Hierbei können Karzinomzellen durch den Nachweis spezifischer Antigene im Zytoplasma, der Zellmembran oder des Zellkernes identifiziert werden. Je nach Indikation kommen spezielle Antikörper zum Einsatz. Für den Nachweis einer Karzinose dient bspw. Ber-EP4. Durch Koppelung mit spezifischen Stoffen können diese anschließend durch spezielle immunologische Färbungen nachgewiesen werden (Motherby, Kube, et al., 1999). Ber-EP4 dient vor allem der Unterscheidung zwischen Adenokarzinomen und malignen Mesotheliomen (Sheibani et al., 1991). Soll bei unbekanntem Ursprung der Neoplasie, sog. „*Cancer of unknown primary*“ (CUP), der Primärtumor bestimmt werden, werden andere Antikörper eingesetzt. Ca. 3 - 5 % aller Neoplasien sind auf ein CUP-Syndrom zurückzuführen (Pavlidis & Fizazi, 2009). Als Antikörper können hier bspw. CK 20 bzw. cdx-2 für die Zuordnung zu einem Kolonkarzinom

(Pomjanski et al., 2005) oder CK 7 und GATA-3 zu einem Mammakarzinom dienen.

Auch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) kann bei der Diagnose eingesetzt werden. Diese Technik erlaubt es, an den Zielzellen gebundene, Fluoreszenz-Farbstoff-markierte spezifische DNA-Sequenzen visuell darzustellen und kann somit zur Quantifizierung von numerischen und strukturellen Chromosomenveränderungen dienen (Bubendorf et al., 2008). Dieses Verfahren ist besonders hilfreich bei der Unterscheidung zwischen reaktiven Mesothelzellen und den Zellen des malignen Mesothelioms (Savic et al., 2010). Bei malignen Mesotheliomen ist im Gegensatz zu reaktiven Mesothelien häufig eine Chromosomenaberration sowie im Besonderen eine 9p21-Deletion festzustellen (Vlajnic et al., 2014).

Als weitere adjuvante Methode ist die spezifische Anfärbung von Proteinen, die mit den Nukleus organisierenden Regionen (NORs) assoziiert sind, mit Hilfe von Silbernitrat, die sog. AgNOR-Reaktion, zu nennen. Bei den NORs handelt es sich um DNA-Schlingen, welche ribosomale RNA kopieren. Zahl und Größe der NORs spiegeln somit die Aktivität der Zelle bzw. die Proliferationsrate wider (Crocker & Nar, 1987). Beim Menschen sind diese NORs auf dem kurzen Arm der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 zu finden. Theoretisch sind somit bei einer diploiden Zelle 20 NORs vorhanden. Die Zahl der tatsächlich auffindbaren NORs hängt allerdings von Faktoren wie der Transkriptionsrate der Zelle und dem Zeitpunkt des Zellzyklus ab. Bei der mikroskopischen Betrachtung sind bei reaktiven, benignen Zellen meist allerdings nur 1 - 2 NORs pro Abschnitt erkennbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die einzelnen NORs relativ nah beieinander liegen, sodass diese nicht als einzelne Punkte wahrgenommen werden können. Bei malignen Veränderungen sind diese breiter gestreut, was teilweise auch dazu beiträgt, dass mehr NORs gezählt werden (Underwood & Giri, 1988). Mit Hilfe der Färbung durch kolloidale Silbernitrat-Lösung werden diese Regionen als schwarze Punkte lichtmikroskopisch sichtbar. Durch ihre Anzahl und Größe lässt sich auf die Transkriptionsrate schließen. Studien an Ergüssen zeigen, dass die Anzahl der NORs bei malignen Zellen unabhängig vom Typ erhöht

war, im Schnitt $4,72 \pm 0,76$ je Nukleolus. Im Vergleich betrug die Anzahl der NORs bei reaktiven, gutartigen Ergüssen $1,92 \pm 0,23$. Bei weiterer Differenzierung fand man die höchsten NOR-Werte in Lymphomen ($5,44 \pm 0,34$), gefolgt von Adenokarzinomen ($4,57 \pm 0,75$) (Sujathan et al., 1996). Andere Studien zeigen mittlere AgNOR-Anzahlen von $1,53 \pm 0,15$ bei reaktiven Ergüssen und $4,03 \pm 0,38$ bei malignen Veränderungen. Zudem waren die NORs bei den reaktiven Ergüssen gleichmäßig in Größe und Form, während die NORs der malignen Ergüsse Unregelmäßigkeiten in Form, Größe und Kontur aufwiesen (Gill et al., 2011).

Eine weitere adjuvante Methode stellt die DNA-Bildzytometrie zum Nachweis numerischer Aneuploidie dar. Diese soll in der vorliegenden Studie angewandt werden. Das besondere Augenmerk liegt auf der automatisierten, computer-gesteuerten Messung. Nach quantitativer DNA-Färbung nach Feulgen kann durch die Messung der integrierten optischen Dichte (IOD) nach interner Eichung auf die DNA-Verteilung in der analysierten Zellpopulation geschlossen werden. Die Grundlagen der DNA-Zytometrie werden in den folgenden beiden Kapiteln noch eingehend besprochen.

1.5 Historie der DNA-Bildzytometrie

Das Prinzip der DNA-Bildzytometrie beruht auf photometrischen Grundlagen. Die Abhängigkeit zwischen der Konzentration einer Färbung und der optischen Dichte dieser Färbung ist auf die Arbeit von Lambert und Beer im Jahre 1854 zurückzuführen. Bereits in den späten 1890er Jahren entwickelten Köhler und von Rohr ein Mikroskop, mit dem Köhler eine hohe Absorption bei 280 nm entdeckte, die er jedoch in der Anwesenheit organischer Substanzen begründet sah. Caspersson führte diese Eigenschaft später auf DNA bzw. die damals bekannten Nukleinsäuren zurück. 1933 entwickelte er ein System für photographische Photometrie, welches später durch photoelektrische spektrometrische Systeme und anschließend durch Fotomultiplier ersetzt wurde. 1948 bauten Pollister und Ris den ersten Prototypen eines einfachen Mikrometers (Meijer et al., 1997). In den folgenden Jahren wurde die Technik stetig weiterentwickelt, sodass auch größere Zellzahlen gemessen werden

konnten. Bereits 1961 gelang es Tolles et al., je 200 Zellen in vaginalen und cervicalen Abstrichen zu messen (Tolles et al., 1961).

Mit der Entwicklung der Computer wurde die DNA-Bildzytometrie stetig weiterentwickelt. Vor allem der Zeitfaktor spielte in der zytometrischen Diagnostik eine Rolle. Das Messen und die Interpretation der Daten mit konventionellen Photometern nahm so viel Zeit in Anspruch, dass die DNA-Bildzytometrie hauptsächlich in wissenschaftlichen Untersuchungen, nicht jedoch in der täglichen Diagnostik, angewandt wurde. TV-basierte Bildanalysesysteme wie das Leitz TAS plus System beinhalteten nun nicht nur eine hochauflösende Schwarz-/Weiß-Kamera, sondern auch ein automatisches Mikroskop sowie die dazu passende Software und erlaubten dem Anwender die Messung in Echtzeit (Auffermann et al., 1984) und eine visuelle Kontrolle über jede gemessene Zelle. Weiterentwicklungen wie das computerbasierte DNA-Bildzytometer CM1, das von der Firma Hund (Wetzlar) in Kooperation mit der RWTH Aachen entwickelt wurde, führten zu schnelleren Messungen und machten Messungen für diagnostische Zwecke in weniger als 60 Minuten möglich; außerdem war eine Relokalisation der Zellen und somit ein gezieltes Nachmessen definierter Zellen verfügbar (Müller et al., 1994).

In der vorliegenden Studie erfolgte die manuelle Messung durch ein TV-Bildanalysesystem Moti-Cyte DNA (Manual System V1.0, Motic, Xianmen / Wetzlar), für dessen Entwicklung seit ca. 2000 eine Zusammenarbeit zwischen dem Hersteller sowie dem Institut für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität und dem Lehrstuhl für Bildverarbeitung an der RWTH Aachen bestand. Dieses jetzt farbbasierte System stellt im Grunde eine Weiterentwicklung des CM1 dar und ermöglicht über moderne Softwaretools Messzeiten von weniger als 30 Minuten. Außerdem wurden über detaillierte Bildgalerien, in denen die Bilder bereits gemessener Zellen abgelegt werden, Nachbetrachtungen einzelner Zellmessungen erleichtert.

Die automatisierte DNA-Bildzytometrie wurde in Kooperation mit der RWTH Aachen entwickelt. Verwendet wurde hierfür ein Motic-Mikroskop BA610 mit verschiedenen Objektiven, darunter auch einem 40er Messobjektiv (numerische

Apertur 0.65), zudem eine hochauflösende Farbbildkamera (Motic 285A (1360x1024)), die Software MotiCyte Screener 2.3 sowie der zugehörige Klassifikator (s. unten). Diese Entwicklung wurde erst im Jahr 2013 abgeschlossen und befindet sich auf der Schwelle zwischen wissenschaftlichen Anwendungen und Nutzung für diagnostische Routinezwecke. Im Unterschied zur manuellen Messung, bei der der Untersucher durch einen Mausklick jede zu untersuchende Zelle auswählt und ihren Charakter (Eichzelle, Analysezelle) vorgibt, sollen bei der automatisierten Messung alle Zellen ohne Unterstützung eines Untersuchers gemessen und klassifiziert werden. Erst nach Ablauf des eigentlichen Messvorganges muss dann eine Messkontrolle vorgenommen werden, die an der Bildgalerie erfolgt. In dieser sind alle gemessenen Objekte abgelegt, und der Untersucher kann entscheiden, welche der Objekte nicht den Ansprüchen an eine exakte Detektion, Fokussierung etc. entsprechen und gelöscht werden müssen bzw. welche der Objekte nicht der richtigen Zellart zugeordnet worden sind und manuell umklassifiziert werden müssen.

Die hier gegebene Darstellung der Entwicklung DNA-zytometrischer Messsysteme kann nicht auf die parallel notwendigen experimentellen Ansätze eingehen, mit denen sich Erkenntnisse über physikalische und biologische Aspekte gewinnen ließen.

Allein über die optimale Beleuchtungseinstellung, die Filterwahl zur Gewinnung monochromatischer Lichtverhältnisse im Absorptionsmaximum der Feulgen-Reaktion, Effekte von Streulicht (Schwarzschild-Villiger-Effekt; *Glare*), Diffraktion des Lichtes und ungleichmäßige Ausleuchtung des Gesichtsfeldes (*Shading*) wurden viele Arbeiten veröffentlicht und die gewonnenen Erkenntnisse in geeignete Softwarelösungen eingesetzt (Chieco et al., 1994; Goldstein, 1975; Jonker et al., 1997; Kindermann & Hilgers, 1994). Ferner wurden die Fokussierungssysteme immer weiter optimiert. Heute werden in DNA-zytometrischen Messsystemen Autofokussierungen verwendet, die hochsensibel reagieren und optimale Masken für die Detektion der Kernmembran ermöglichen. Auf dem Gebiet biologischer Untersuchungen sei nur an die Entwicklung des Prinzips der Böhm'schen Hydrolysekurven zur Standardisierung der Feulgen-Färbung (Böhm, 1968) oder an Studien zur Poly-

ploidisierung von Geweben, auch nach Strahlentherapie oder Chemotherapie, erinnert (Biesterfeld, 1994). Die in solchen Untersuchungen gesammelten Daten gingen in die Anleitungen zur praktischen Anwendung der DNA-Bildzytometrie und in die heute in der Software verankerten Auswertelgorithmen ein.

1.6 Grundlagen der DNA-Bildzytometrie

Betrachtet man den euploiden menschlichen Zellkern, so enthält dieser mit Ausnahme der Keimzellen je 2×23 strukturell intakte Chromosomen (2×22 Autosome sowie xx bzw. xy). Dies entspricht einem doppelten Chromosomensatz, den eine normale, diploide Zelle in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus besitzt, und wird als $2c$ bezeichnet. Bevor es zur Zellteilung kommt, liegt in der G_2/M -Phase des Zellzyklus ein vierfacher Chromosomensatz, entsprechend $4c$, vor. Zuvor hat die Zelle dann einen Zellzyklus durchlaufen und verfügte in der Synthesephase für einen gewissen Zeitraum über alle DNA-Gehalte, die zwischen $2c$ und $4c$ liegen (Böcking, 1990).

Abweichungen von diesen euploiden Verhältnissen werden als Aneuploidie bezeichnet. Diese kann rein strukturell sein, z.B. wenn in einer Zelle eine Translokation vorliegt, oder numerisch, z.B. wenn einer Zelle Chromosomen fehlen oder die Anzahl der Chromosomen erhöht ist. Sind solche Zellen überlebensfähig, so geben sie bei klonaler Expansion ihre veränderten Eigenschaften an ihre Tochterzellen weiter, und es entsteht eine Zellpopulation, die entsprechende Veränderungen im DNA-Profil aufweist (Böcking, 1995).

Die DNA-Bildzytometrie, deren wissenschaftliche Anfänge durch Caspersson schon in den 30er Jahren lagen, ist ein heute diagnostisch anwendbares, lichtmikroskopisches, TV-bildanalytisches Verfahren, das dem Nachweis bzw. Ausschluss von numerischer Aneuploidie von Zellpopulationen bzw. von Einzelzellen dient. Dabei wird nach stöchiometrischer Umsetzung der DNA in einen Farbstoff („Feulgen-Färbung“) mikrodensitometrisch die integrierte optische Dichte von Zellen einer Analysezellpopulation bestimmt und mit

derjenigen von euploiden Referenzzellen verglichen. Finden sich zwischen beiden Populationen signifikante Unterschiede im mittleren DNA-Gehalt der Zellpopulation der G₀/G₁-Phase („Stammlinie“), so wird heute nach den Kriterien des Konsensus der ESACP („European Society for Analytical and Cellular Pathology“) (Haroske et al. 1998) für die Analysezellpopulation numerische DNA-Aneuploidie angenommen („Stammlinienaneuploidie“). Meistens finden sich Zunahmen an chromosomalem Material, sodass sich DNA-Stammlinien statt bei 2c beispielsweise bei 3c nachweisen lassen; einige Tumorentitäten, z.B. das chromophobe Nierenzellkarzinom, sind aber für chromosomale Verluste bekannt (Kovacs, 1999) und bilden dann hypodiploide Stammlinien aus.

Außerdem ist es unter bestimmten Voraussetzungen auch möglich, Einzelzellen DNA-bildzytometrisch als aneuploid zu klassifizieren („Einzelzellaneuploidie“). Verfügen Einzelzellen über einen DNA-Gehalt von signifikant oberhalb von 4c, des DNA-Gehaltes bei Eintritt in die G₂/M-Phase, kann Aneuploidie vorliegen, sofern andere Gründe wie euploide Polyploidisierung oder ein Zustand nach Strahlen- oder Chemotherapie ausgeschlossen werden können (Böcking, 1990). Das häufigste angewandte Kriterium zur Detektion von Einzelzellaneuploidie ist der Nachweis von Zellen mit einem DNA-Gehalt > 5c, sodass einem Messfehler von bis zu 1c Rechnung getragen wird (5cEE, „5c Exceeding Event“).

Da numerische DNA-Aneuploidie bei reaktiven oder regenerativen Prozessen nicht beschrieben ist, ist ihr Nachweis als Beleg für maligne Transformation der untersuchten Zellpopulation zu interpretieren.

Strukturelle Aneuploidie lässt sich hingegen DNA-bildzytometrisch nicht nachweisen; geeignete Verfahren hierfür sind molekularpathologische und zytogenetische Methoden der Humangenetik. In der diagnostischen Pathologie kommt insbesondere auch die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) zum Einsatz (Fiegl, Massoner, et al., 2004).

1.7 Ziele der Arbeit

Es wurde bereits oben erwähnt, dass es sich bei dem automatisierten Messsystem zur DNA-Bildzytometrie um eine neue Entwicklung handelt. Entsprechend gilt es, in methodischen Untersuchungen ihre Aussagekraft im Vergleich zur herkömmlichen manuellen DNA-Bildzytometrie zu bestimmen und auf diese Weise messtechnische Stärken und Schwächen auszuloten. Darüber hinaus soll ihr Stellenwert auch in der Beantwortung klinischer Fragestellungen evaluiert werden.

Die zentrale Neuentwicklung in der automatisierten DNA-Bildzytometrie sind die sogenannten Klassifikatoren oder *Classifier*. Sie wurden zelltypbezogen für diejenigen Anwendungen entwickelt, bei denen sich für die DNA-Bildzytometrie im Rahmen der Routineanwendungen der Zytopathologie eine häufige Indikation ergibt und bei der gleichzeitig die Präparate nicht als fertige Objektträger eingesandt werden, sondern durch geeignete Präparationsmethoden durch das Labor aus Flüssigkeiten hergestellt werden. Der Vorteil solcher selbst hergestellter Präparate im Unterschied zu fertig vorgelegten Ausstrichen seitens der einsendenden Klinik ist aus labortechnischer Sicht, dass die Zellen als Monolayer präpariert werden können und somit zumindest mehr oder weniger in einer Ebene liegen. Bei der Entwicklung der von Böcking erarbeiteten Klassifikatoren (Friedrich et al., 2012), wurden im Rahmen einer manuellen Messung aufgenommene Kernbilder DNA-zytometrischer Messungen Kern für Kern bestimmten Zellgruppen zugeordnet, die für die Körperhöhlenergüsse die Gruppen Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen, Mesothelzellen und abnorme Zellen sowie die Artefakte umfassten. An diesen Kernbildern wurde dann die Software zur Erkennung und Zuordnung von Zellen optimiert und in Testreihen erprobt, bis sie als einsatzfähig für die hier vorgelegte Messreihe galt. Neben dem Klassifikator für die Ergüsse wurden auch separat Klassifikatoren für Präparationen an Drüsenepithel der Prostata, Urothel und Plattenepithel (Mundhöhle, Gebärmutterhals) entwickelt.

Die Untersuchung von Ergüssen seröser Körperhöhlen gehört zu den Routineanwendungen der Zytopathologie; im Krankengut des Schwerpunktes Cytopathologie liefert sie mit ca. 3.000 Fällen pro Jahr einen gehörigen Anteil an der extragynäkologischen Zytologie, die ca. 11.000 Fälle pro Jahr umfasst, also knapp 30 %.

Die diagnostische DNA-Bildzytometrie stellt eine wichtige Methode dar, als adjuvantes Verfahren die Dignität einer Veränderung abzuklären, die mit der konventionellen Zytologie als „dringend verdächtig“ oder „zweifelhaft“ eingestuft wird. Ziel ist es dabei, reaktive Veränderungen von einem malignen Tumorgeschehen abzugrenzen. Dieses Verfahren kommt in der Zytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf ca. 800-mal im Jahr zum Einsatz, darunter auch an Ergüssen seröser Körperhöhlen.

Die herkömmliche, manuelle DNA-Bildzytometrie wird durch einen befundenden Arzt oder eine speziell ausgebildete MTA durchgeführt. Manuell werden 300 Zellen zur Analyse ausgewählt und mit ca. 30 Referenzzellen intern geeicht, anschließend wird ein DNA-Histogramm erstellt und entsprechend der Richtlinien der European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) ausgewertet. Derzeit werden in der Zytopathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf hierfür Messsysteme der chinesischen Fa. Motic (deutsche Niederlassung: Wetzlar) verwendet. Inzwischen wurde vom selben Hersteller ein neues, automatisiertes Messsystem entwickelt, dessen Prototyp an der RWTH Aachen genutzt wird. Hierbei erfolgt die gesamte Messung jedoch automatisch. Mit Hilfe eines Klassifikators können verschiedene Zelltypen unterschieden und zugeordnet werden. Dem Untersucher obliegt danach die Bearbeitung des Rohmessfiles, um eventuelle Fehlklassifikationen zu korrigieren.

In der hier vorliegenden Studie, die in Zusammenarbeit des Schwerpunktes Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf (Prof. Dr. Biesterfeld) mit dem Lehrstuhl für Bildverarbeitung der RWTH Aachen (Prof. Dr. Aach, Prof. Dr. Meyer-Ebrecht und Arbeitsgruppe) und dem Institut für Pathologie in Düren (Prof. Dr. Böcking, ehemaliger Leiter der Cytopathologie der Universitätsklinik

Düsseldorf) durchgeführt wurde, werden erstmals systematische Messreihen an luftgetrockneten Ergusspräparaten im Vergleich der manuellen mit den automatisierten Messverfahren vorgestellt. Ziel der Arbeit ist es, einen ersten Vergleich zwischen manuellem und automatisiertem Messsystem für die Ergusszytologie zu ziehen. Dabei sollen verschiedene Variablen, die bei beiden Messungen automatisch erhoben werden, miteinander verglichen werden. Zudem sollen einzelne Variablen bei jeweils nur einem Messverfahren geprüft werden. Zusätzlich soll die Treffsicherheit der beiden Verfahren ermittelt und vor dem Hintergrund bestehender Studien diskutiert werden.

2 Material und Methoden

Zur vorliegenden Forschungsarbeit liegt von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Studiennummer 4064 ein positives Ethikvotum vor.

2.1 Patientenkollektiv und Präparate

Für die vorliegende Untersuchung standen 136 Präparate primär luftgetrockneter Sedimentausstriche von Ergüssen seröser Höhlen (87 mal Pleura, 37 mal Peritoneum, 3 mal Perikard) sowie intraoperativ gewonnene Spülungen (9 Präparate) zur Verfügung. Das Patientenkollektiv entstammte den Universitätskliniken Düsseldorf und den benachbarten umliegenden Krankenhäusern, die entsprechendes Ergussmaterial im Jahr 2012 zu diagnostischen Zwecken an den Schwerpunkt Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gesandt hatten.

Für die Studie wurden Präparate mit folgenden zytologischen Diagnosen, eingeteilt nach der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und Zytologie, ausgewählt (Böcking 1998):

- „Bösartige Zellen nachweisbar“ (= positiv, 54 Fälle)
- „Bösartige Zellen wahrscheinlich“ (= dringender Verdacht, 6 Fälle)
- „Bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen“ (= zweifelhaft, 6 Fälle)
- „Bösartige Zellen nicht nachweisbar“ (= negativ, 70 Fälle)

15 Präparate der Stichprobe mussten aufgrund zu geringer Zellzahl oder aufgrund zu wenig vorhandener Referenzzellen von einer DNA-zytometrischen Messung ausgeschlossen werden, sodass alle Untersuchungen mit einer Stichprobengröße von $n = 121$ durchgeführt wurden. Somit standen für die statistische Auswertung folgende Präparate zur Verfügung:

- „Bösartige Zellen nachweisbar“ (= positiv, 48 Fälle)
- „Bösartige Zellen wahrscheinlich oder nicht sicher auszuschließen“
(= dringender Verdacht / zweifelhaft, 11 Fälle)
- „Bösartige Zellen nicht nachweisbar“ (= negativ, 62 Fälle)

2.2 Zytologische Untersuchungen in der Routine-diagnostik

2.2.1 Präparateherstellung

Die nativ eingesandten Ergussflüssigkeiten wurden gemäß den *Standard Operating Procedures* (SOP) zunächst für die diagnostische Routinebeurteilung aufgearbeitet. Dazu wurden je 6 Objektträger pro eingesandter Ergussflüssigkeit hergestellt. Dafür wurde dreimal je ein Tropfen des durch Zentrifugation angereicherten Probenmaterials mit Hilfe eines zweiten Objektträgers gleichmäßig ausgestrichen. Routinemäßig wurden je 3 Präparate alkoholfixiert und nach Papanicolaou (Pap) gefärbt und je 3 Präparate luftgetrocknet und nach May-Grünwald-Giemsa (MGG) gefärbt. An diesen sechs Präparaten erfolgte dann die konventionelle zytologische Beurteilung durch erfahrene Pathologen, in einigen Fällen ergänzt um nachträglich durchgeführte immunzytochemische Untersuchungen.

Für die vorliegende Studie wurden von jedem Patienten aus derselben Probe 2 weitere Objektträger hergestellt, von denen der erste MGG-gefärbt wurde und der zweite ungefärbt blieb.

Die für die Routinediagnostik verwendeten Präparate wurden in der Studie nicht der DNA-Zytometrie zugeführt, die zytologischen Erstdiagnosen aus Düsseldorf entstammen jedoch den Routinepräparaten. Für die Studie wurde eines der zusätzlich angefertigten Präparate zudem noch zytologisch von Prof. Dr. Böcking an der RWTH Aachen untersucht. Als finale Diagnose wurde der Konsens zwischen der zytologischen Diagnosen von Prof. Dr. Biesterfeld und Prof. Dr. Böcking sowie, falls vorhanden, das Ergebnis der ebenfalls in Düsseldorf durchgeführten Immunzytochemie und / oder eines follow-ups gewertet.

2.2.2 MGG Färbung

Die May-Grünwald-Giemsa-Färbung (MGG-Färbung) wird am Institut für Cytopathologie an der Universitätsklinik Düsseldorf standardmäßig für luftgetrocknete Ergusspräparate verwendet.

Durch den Wasserentzug bei der Lufttrocknung werden biologische Abbauvorgänge gestoppt, welche die Morphologie der Zellen beeinflussen könnten und so eine Fixation herbeigeführt. Die Lufttrocknung kann bei Raumtemperatur erfolgen und dauert je nach Präparat ca. 1 - 3 Stunden (Freudenberg et al., 2002). Anschließend kann die MGG-Färbung erfolgen. Die basophilen Bestandteile des Zellkerns und des Zytoplasmas, die eine negative elektrische Ladung aufweisen (DNA, RNA, Nukleoli), färben sich mit den positiv geladenen Farbstoffen der Färbelösung (Methylenblau) in wässriger Lösung blau an. Basische, azidophile Proteine, u.a. auch der Globulin-Anteil des Hämoglobins, werden hingegen durch die sauren Farbstoffe (Eosin) rot angefärbt. Die einzelnen Färbeschritte sind gemäß dem am Schwerpunkt Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf verwendeten und in den SOPs hinterlegten Färbeprotokoll nachfolgend in Tabelle 1 dargestellt. Nach erfolgter Färbung werden die Präparate eingedeckelt.

Tabelle 1: Ablauf der MGG-Färbung am Schwerpunkt Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf (Biesterfeld, 2015)

Färbeschritt	Chemikalie	Dauer in min.
1	96 % Ethanol	5
2	gebrauchsfertige May-Grünwald-Lösung	5
3	gepuffertes Aqua dest.	1
4	gepuffertes Aqua dest.	1
5	gebrauchsfertige Giemsa-Lösung	15
6	gepuffertes Aqua dest.	1
7	gepuffertes Aqua dest.	1

2.2.3 Färbung nach Papanicolaou (Pap)

Die Färbung nach Papanicolaou (Pap) wird am Schwerpunkt Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf standardmäßig für alkoholfixierte Präparate angewendet. Sie wird gemäß des Färbeprotokolls, welches in den *Standard*

Operation Procedures (SOPs) hinterlegt ist, in einem Färbeautomaten (Tissue-Tek®, Prisma®, Sakura Finetek, Germany GmbH) durchgeführt. Das Prozedere beginnt mit einer absteigenden Alkoholreihe, anschließend kann die Färbung mit dem Farbstoff Hämatoxylin erfolgen, welches die negativ geladenen Phosphatgruppen der Zellkern-DNA anfärbt. Nach Herauswaschen des überschüssigen Farbstoffes und einer aufsteigenden Alkoholreihe wird das nun entwässerte Präparat mit hydrophoben Plasmafarbstoffen gefärbt. Der Alkohol wird anschließend durch Xylol ausgewaschen und nachfolgend durch Voclear ersetzt. Das genaue Färbeschema der Papanicolaou-Färbung gemäß dem Färbeprotokoll des Instituts für Cytopathologie ist nachfolgend in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Ablauf der Färbung nach Papanicolaou am Schwerpunkt für Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf (Biesterfeld, 2015)

Färbeschritt	Chemikalie	Dauer in min.
1	96 % Ethanol	2
2	80 % Ethanol	1
3	70 % Ethanol	1
4	50 % Ethanol	1
5	Aqua dest.	1
6	gebrauchsfertiges Hämatoxylin	2
7	Leitungswasser	3
8	Leitungswasser	3
9	NH ₂ OH	1
10	70 % Ethanol	1
11	70 % Ethanol	1
12	80 % Ethanol	1
13	96 % Ethanol	1
14	gebrauchsfertiges Orange II 2b	2
15	96 % Ethanol	1
16	96 % Ethanol	1
17	Polychrom 3b	2
18	96 % Ethanol	1
19	96 % Ethanol	1
20	99,5 % Ethanol	2
21	Xylol	1
22	Xylol	1
23	Voclear	1
24	Voclear	1

2.2.4 Konventionelle zytologische Diagnostik

Alle für die vorliegende Untersuchung verwendeten Ausstrichpräparate wurden nach der May-Grünwald-Giemsa-Färbung von erfahrenen Zytopathologen untersucht und ausgewertet. Dabei wurden die üblichen und allgemein gültigen Diagnosekriterien angewandt (Feichter & Dalquen, 2000; Koss & Melamed, 2006):

- Abweichung der Chromatinstruktur
- Kernhyperchromasie
- Vergrößerung des Zellkerns
- Verschiebung der Kern- / Plasma-Relation
- Kerngrößenvariabilität (Anisokaryose)
- Verdickung der Kernmembran
- Kernpolymorphie
- Nukleolenatypie
- Kohäsivitätsverlust
- Hyperchromasie des Zytoplasmas
- Mitosereichtum

Die Pap-gefärbten Präparate dienten vornehmlich als Grundlage einer eventuellen späteren immunzytochemischen Untersuchung in Fällen, in denen sich anhand der MGG-gefärbten Präparate entweder ein Befund der Kategorien zweifelhaft bzw. dringender Verdacht ergeben hatte (zur Diagnosesicherung) bzw. ein positiver Befund erhoben worden war (zur Tumortypisierung). In der primären Diagnostik fanden sie gemäß der üblichen Vorgehensweise keine Verwendung.

Nach erfolgter Untersuchung wurde der Befund (Tabelle 3) nach der Nomenklatur der Deutschen Gesellschaften für Pathologie (DGP) und Zytologie (DGZ) hinsichtlich der Malignitätswahrscheinlichkeit standardisiert kategorisiert (Böcking, 1998) und darüber hinaus mit einem interpretativen Text versehen.

Tabelle 3: Einteilung der zytologischen Diagnosen nach ihrer Malignitätswahrscheinlichkeit (nach Böcking, 1998)

Kategorie	Malignitätswahrscheinlichkeit
negativ	0 %
zweifelhaft	gering (ca. 30 %)
dringender Verdacht	hoch (ca. 70 %)
positiv	sicher (100 %)

2.2.5 Immunzytochemie

Immunzytochemische Verfahren können an Alkohol-fixierten Präparaten (gefärbt oder ungefärbt) sowie an luftgetrockneten ungefärbten Präparaten angewandt werden. Am Schwerpunkt Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf werden in der Routine üblicherweise Präparate verwendet, welche Alkohol-fixiert sind und nach Papanicolaou (s. Kapitel 2.2.3) vorgefärbt sind.

Die dort verwendete ABC-Methode gilt als die empfindlichste Methode (Hsu et al., 1981) der immunzytochemischen Färbungen. Nach der Entdeckungelung in Xylol werden die Präparate zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entfärbt. Es folgt eine Behandlung mit PBS-Puffer, um das Ethanol zu entfernen. Bei Kernantikörpern ist ein zusätzlicher Zwischenschritt in Form einer 20-minütigen Hitzebehandlung in einer 80 °C heißen Heizkuvette erforderlich, um den Antikörper zu demaskieren. Bei zytoplasmatisch bindenden Antikörpern folgt direkt die Hemmung der endogenen Peroxidase durch eine Inkubation der Präparate in einer Mischung aus H₂O₂ und Methanol. Nach mehreren Spülvorgängen wird das Präparat anschließend in Normalserum inkubiert. Die eigentliche immunzytochemische Färbung der so vorbehandelten Präparate erfolgt im nächsten Schritt. Zuerst erfolgt die Inkubation mit dem Primär-Antikörper. Nach weiteren Spülungen werden die Objektträger mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert und anschließend wieder gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgt die Inkubation mit ABC-Elite-Standard (ein Komplex aus biotinylierter Peroxidase und Avidin) und einer anschließenden Waschung.

Danach folgt die Applikation von 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC). Nach weiterer Spülung erfolgt schließlich die Gegenfärbung mit Mayers Hämotoxylin, um eine bessere Identifizierung der Zellen unter dem Mikroskop zu ermöglichen.

Das genaue Färbeprotokoll für die immunzytochemische Färbung ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Ablauf der immunzytochemischen Färbung nach der ABC-Methode am Schwerpunkt Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf (Biesterfeld, 2015)

Färbeschritt	Chemikalie	Zeit in min.
1	Xylol	2 mal 10 min
2	Ethanol 100 %	2 mal 10 min
3	Ethanol 96 %	2 mal 10 min
	PBS-Puffer	5 min
Ggf. Zwischenschritt: Hitzebehandlung bei Kernantikörpern	Citratpuffer	
	Erhitzen der Präparate im Wasserbad	20 min bei 80 °C
	ohne Deckel abkühlen lassen	20 min bei offenem Deckel
	PBS-Puffer	5 min
4	1 ml H ₂ O ₂ auf 100 ml Methanol	30 min
5	PBS-Puffer	3 mal spülen
6	Normalserum	20 min
7	Primär Antikörper	12 h bei 25 °C
8	Tris 0,5 M in PBS 1:10	2 mal 5 min
9	Sekundärantikörper (LINK)	30 min
10	Tris 0,5 M in PBS 1:10	2 mal 5 min
11	ABC-Elite-Standard	30 min
12	Tris 0,5 M in PBS 1:10	2 mal 5 min
13	AEC- Lösung	40 min
14	Aqua dest.	2 mal 5 min
15	Mayer Hämatoxylin	1 min
16	Leitungswasser, fließend	10 min

PBS = phosphate buffered saline, ABC = Avidin-Biotin-Komplex, TRIS = tris hydroxymethyl aminomethan, AEC = 3-Amino-9-ethylcarbazol

2.3 DNA-Bildzytometrie

Im Anschluss wurden in dieser Studie pro Fall sowohl das zusätzliche MGG-gefärbte Präparat als auch das zusätzliche ungefärbte Präparat der Feulgen-Färbung zugeführt, sodass pro Fall zwei verschieden vorbehandelte Präparate für die DNA-Bildzytometrie zur Verfügung standen. Beide Präparate wurden jeweils im selben Färbeprozess gefärbt.

2.3.1 Feulgen-Färbung

Die Feulgen-Färbung (Feulgen & Rossenbeck, 1924) ist durch die spezifische Färbung der Zellkern-DNA eine Voraussetzung für die DNA-Bildzytometrie. Sie wird als Standardfärbung für die DNA-zytometrische Messung verwendet, da sie zu klar interpretierbaren DNA-Histogrammen führt (Biesterfeld et al., 2011). Das Prinzip der Färbung beruht darauf, dass durch milde saure Hydrolyse Basen aus den DNA-Molekülen gespalten werden, wodurch sich die eigentlich farblose bis schwach gelbe fuchsin-schweifige Säure anlagern kann und eine rotviolette Färbereaktion erzeugt. RNA wird hingegen nicht angefärbt, wodurch die Feulgen-Färbung spezifisch für DNA ist.

Das am Schwerpunkt Cytopathologie in Düsseldorf angewandte Färbeprotokoll ist in Tabelle 5 wiedergegeben. Die mit der MGG-Färbung vorgefärbten Präparate werden zunächst im Xylolbad entdeckelt (ca. 72 Stunden) und anschließend im Methanolbad gewaschen. Nun erfolgt eine absteigende Alkoholreihe zur Rehydratation. Die anschließende Fixierung in 10 %-igem Formalin dient dem Schutz der DNA gegenüber der Salzsäure (Kasten, 1971). Für die vorher ungefärbten Präparate startete die Feulgen-Färbung an diesem Schritt mit der Fixierung in Formalin. Es folgt nun die saure Hydrolyse bei genau abgestimmter Temperatur und Konzentration der Salzsäure. Die vorgefärbten Präparate werden bei diesem Schritt gleichzeitig entfärbt.

Tabelle 5: Reihenfolge und zeitlicher Ablauf der Feulgen-Färbung mit dem Varistain 24-3 (Biesterfeld, 2015)

Färbeschritt	Chemikalie	Dauer in min.
1	Xylol	15
2	99,5 % Ethanol	5
3	96 % Ethanol	5
4	10 % gepuffertes Formalin	50
5	Aqua dest.	10
6	Aqua dest.	10
7	5 N HCl	60
8	Aqua dest.	2
9	Aqua dest.	2
10	Aqua dest.	2
11	Schiff'sches Reagenz	60
12	SO ₂ - Wasser	5
13	SO ₂ - Wasser	5
14	SO ₂ - Wasser	5
15	Aqua dest.	1
16	Aqua dest.	1
17	70 % Ethanol	10
18	96 % Ethanol	10
19	99,5 % Ethanol	10
20	Xylol	15

Bei der Feulgenreaktion werden durch die Hydrolyse allerdings nicht nur die Purinbasen am Desoxyribosemolekül abgespalten, wodurch freie Aldehydgruppen erzeugt werden, sondern es kommt auch zu einer Zerstörung und Abspaltung aldehydhaltiger Bestandteile. Daher müssen die Bedingungen Zeit, Temperatur und Konzentration der Säure genau aufeinander abgestimmt sein, um möglichst viele Aldehydgruppen zu erzeugen, bevor deren Zerstörung einsetzt (Krug, 1980). Für die vorliegende Untersuchung wurde die Hydrolyse der DNA durch 5-molare HCl bei einer Temperatur von 27 °C durchgeführt. Dazu wurde eine Heizkuvette verwendet, welche die Salzsäure auf Temperatur hält (Chatelain et al. 1989). Anschließend wird die Färbung mit Schiff'schem Reagenz (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09033.0500) durchgeführt. Nach Spülungen mit SO₂-Wasser und destilliertem Wasser erfolgt eine Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, sodass das Präparat danach bis zur Eindeckelung im Xylol verbleiben kann. Anschließend sollten die Präparate lichtgeschützt aufbewahrt werden, um ein Ausbleichen zu vermeiden. In der täglichen Routine sowie für die vorliegende Studie wird die Färbung, modifiziert nach Chatelain,

vollautomatisch mit einem Färbeautomaten (Varistain 24-3) der Firma Shandon (Runcorn, U.K.) durchgeführt (Chatelain et al., 1989).

In Abb. 1 ist der optische Unterschied zwischen der MGG-Färbung und der Feulgen-Färbung dargestellt.

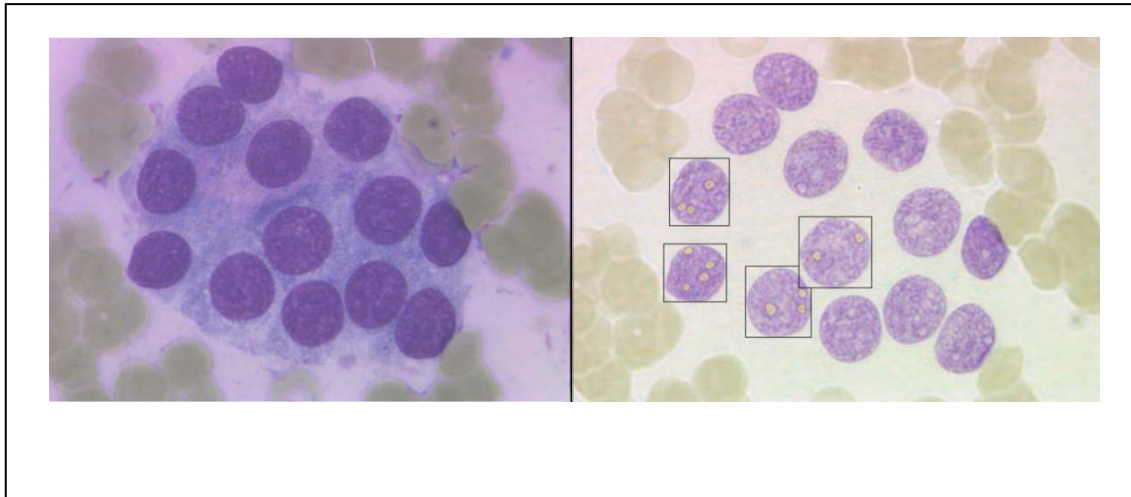


Abb. 1: Die MGG-Färbung (links) und die Feulgen-Färbung (rechts) im Vergleich; Objektvergrößerung 40x (Biesterfeld, 2015)

2.3.2 Vorbereitung der Präparate

Nach der Feulgen-Färbung wurden die Präparate sowohl für die herkömmliche manuelle als auch für die automatisierte Messung vorbereitet. Dazu wurden die Präparate von Fällen, die in der Routinediagnostik als „zweifelhaft oder höher“ beurteilt worden waren, von einem erfahrenen Zytopathologen (Prof. Dr. Biesterfeld) begutachtet. Präparate, die zu wenige Zellen enthielten, wurden von der Messung ausgeschlossen, ebenso Ergusspräparate, bei denen die zytologische Diagnostik ein kleinzelliges Karzinom ergeben hatte. Für diese Art von Tumorzellen ist ein Klassifikator für die automatisierte DNA-Bildzytometrie noch nicht entwickelt. Bei den übrigen Präparaten wurden Bereiche, die potentiell verdächtige Zellen enthielten, mit einem wasserfesten Filzstift eingekreist, um ein späteres Wiederauffinden der Bereiche bei der anschließenden Messung zu erleichtern. Die zytologisch als negativ klassifizierten Präparate wurden standardisiert an zwei Stellen in möglichst zellreichen Arealen ebenfalls mit wasserfestem Filzstift eingekreist. Auch in dieser Gruppe wurden Präparate, die eine zu geringe Anzahl an Zellen

enthielten, von der Messung ausgeschlossen. Alle Präparate wurden sowohl der herkömmlichen manuellen DNA-zytometrischen Messung als auch der neu entwickelten automatisierten DNA-zytometrischen Messung zugeführt.

2.3.3 Manuelle DNA-Bildzytometrie

Die manuelle DNA-Bildzytometrie erfolgte durch ein TV-Bildanalysesystem (Moti-Cyte DNA Manual System V1.0, China Group, Ltd., China). Dieses besteht aus einem Mikroskop (Motic BA410) mit einem 40-fach vergrößernden Messobjektiv (n.A. 0,65, W.D.: 0,5 mm), einem Kondensor (n.A. 0,65) und einem Kameraadapter (Vergrößerungsfaktor 0.87), einer CCD-Kamera (Scientific grade Moticom Pro 285 A) sowie einem Pentium-PC mit Tastatur, Maus und einem hochauflösenden Monitor. Vor jeder Messung wurde sowohl die Beleuchtung nach dem Köhler'schen Beleuchtungsprinzip optimiert, um das Streulicht zu reduzieren, als auch mit Hilfe des Programms ein Weiß- und ein Schwarzbild zur Kalibration erzeugt.

Nach erfolgter Kalibration konnte nun die eigentliche Messung beginnen. Die Betrachtung der Zellen erfolgte unter einer 40-fachen Objektivvergrößerung. Die vom Untersucher ausgewählten Zellen wurden per Maus angeklickt. Das Programm bestimmte dann automatisch die integrierte optische Dichte (IOD) innerhalb des automatisch markierten Zellkernrandes. Die Kernbilder der gemessenen Zellen wurden nach den Vorgaben des Untersuchers zu Referenzzellen oder Analysezellen zugeordnet in einer Bildgalerie hinterlegt, sodass eine spätere Kontrolle durch den Untersucher möglich war. Zudem können Zellkerne, deren Rand nur ungenau oder unzureichend dargestellt ist, manuell angepasst und nachgearbeitet werden. Auch das nachträgliche Trennen von Zellkernen, die so dicht beieinander liegen, dass sie vom Computer als ein einzelner Kern gemessen werden, ist möglich. Für die Messung wurden vom Untersucher je nach der im Präparat enthaltenen Zellmenge ca. 300 Analysezellen ausgewählt. Die Auswahl erfolgte hierbei zufällig innerhalb der vorher markierten Areale des Präparats. Während bei der Messung der zuvor zytologisch als positiv oder dringend verdächtig zugeordneten Präparate atypische und / oder verdächtige Zellen ausgewählt

wurden, erfolgte die Messung der negativen Kontrollgruppe mit Mesothelzellen. Bei jeder Messung erfolgt eine interne Eichung über Referenzzellen (Böcking et al., 1995). Dazu wurden während der Untersuchung mindestens 30 Referenzzellen, meist Lymphozyten, markiert. Der Mittelwert der gemessenen IOD-Werte dieser Zellen wird als Referenzwert von 2c festgelegt. Der so gemessene „2c-Referenz-IOD“ wird vom Programm im Report automatisch ausgegeben. 1c entspricht hierbei einem halben mittleren DNA-Gehalt einer normalen, nicht veränderten Zelle in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus (Haroske et al., 1998). Wichtig hierbei ist allerdings, dass der Variationskoeffizient (in der Messung als CV-Wert angegeben) unter 5 % liegt, um die Fehlerwahrscheinlichkeit gering zu halten (Böcking, 1995). Die gemessenen Werte werden von dem Programm automatisch in einem DNA-Histogramm dargestellt (Abb. 2). Abzulesen ist hier zum einen die Anzahl der Zellen, die den gleichen DNA-Gehalt aufweisen (y-Achse), zum anderen der DNA-Wert, im Diagramm als „c-Wert“ angeben (x-Achse).

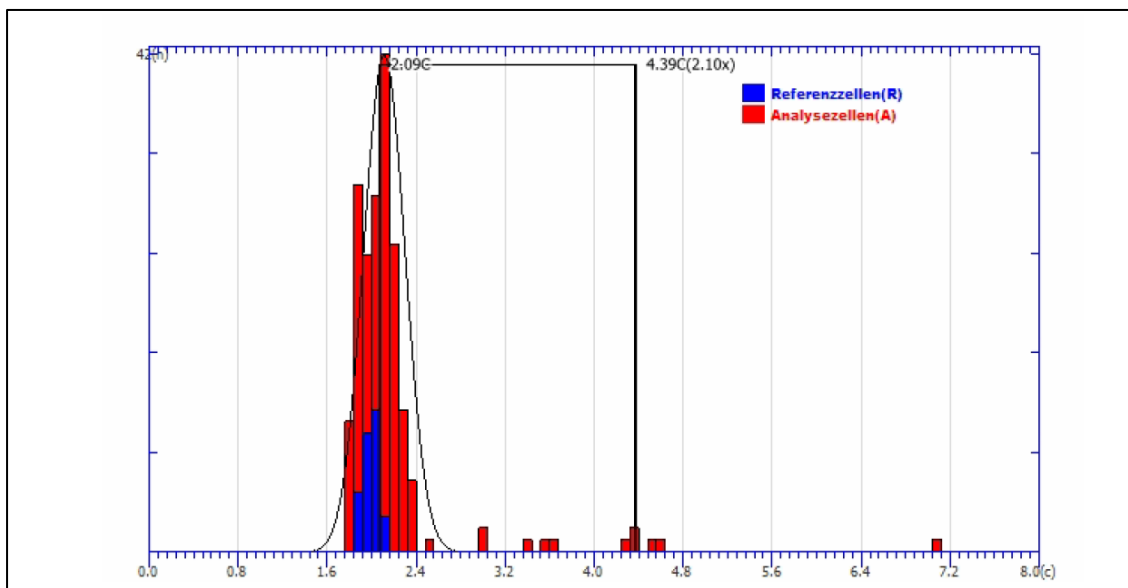


Abb. 2: DNA-Histogramm eines Präparates

Auf der x-Achse eingetragen ist der c-Wert, auf der y-Achse die Anzahl der gemessenen Zellen. Die Stammlinie liegt in diesem Fall bei 2,09c, das Präparat würde somit als diploid klassifiziert (Biesterfeld, 2015).

2.3.4 Automatisierte Messung

Die automatisierte DNA-Bildzytometrie wurde in Kooperation mit der RWTH Aachen durchgeführt. Verwendet wurde hierfür ein Mikroskop BA610 mit einem 40er Objektiv (n.A. = 0.65), zudem eine Kamera (Motic 285A, 1360x1024). Die Software MotiCyte Screener 2.3 sowie der zugehörige Klassifikator waren auf dem dazugehörigen Computer gespeichert. Der Klassifikator wurde so programmiert, dass er automatisch verschiedene Zelltypen erkennt und diese automatisch zuordnet. Er soll somit in der Lage sein, abnorme Zellen („*abnormals*“) zu erkennen und von Mesothelien zu unterscheiden. Nur die als „*abnormals*“ klassifizierten Zellen werden vom Programm den Analysezellen zugeordnet. Mathematische und technische Details in der Entwicklung der verschiedenen erhältlichen Klassifikatoren wurden in einer naturwissenschaftlichen Dissertation zusammengestellt (Friedrich, 2016)

Sowohl die Messung als auch der mäanderförmige Vorschub des Objektträgers laufen vollautomatisch ab. Die erwartete Messzeit beträgt ca. 40 - 60 min. Alle gemessenen Zellen werden in einer Galerie hinterlegt. Zudem ist ein sogenanntes „Sicherheitsnetz“ integriert, sodass alle als Artefakte identifizierten Zellen und alle Objekte mit Messwerten oberhalb von 9c, die somit 9c *Exceeding Events* (9cEE) entsprechen könnten, nach abgeschlossener Messung noch einmal vom Untersucher überprüft und ggf. umklassifiziert werden können.

Artefakte können in den Präparaten in verschiedener Form vorliegen. Möglich sind z.B. Dubletten, also mehrfach gemessene Zellen. Aber auch defokussierte, unscharfe Zellen werden als Artefakte erkannt und in dieser Kategorie einsortiert. Zellen, die übereinander liegen und sich teilweise gegenseitig verdecken, werden auch als Artefakt erkannt, ebenso Lufteinschlüsse, Verunreinigungen etc. Nach abgeschlossener Messung kann der Behandler all diese Artefakte noch einmal in der Galerie aufrufen und überprüfen. Auch die potentiellen 9cEE werden vom Untersucher nach der Messung noch einmal genau überprüft. Hier geht es vor allem darum, ggf. übereinanderliegende

Zellen bzw. Zellen mit Verunreinigungen zu erkennen und ggf. statt den Analysezellen doch den Artefakten zuzuordnen.

Im Gegensatz zur manuellen DNA-zytometrischen Messung werden alle auf dem Objektträger bzw. innerhalb der zuvor angebrachten Filzstiftmarkierung (s. Kapitel 2.3.2) erfasst und gemessen. Die Anzahl sowohl der Analyse- als auch der Referenzzellen liegt je nach Präparat somit normalerweise über derjenigen der manuell gemessenen Präparate.

2.3.5 Auswertung der DNA Zytometrie

Grundlage der DNA-Bildzytometrie ist die Tatsache, dass die meisten Tumoren charakteristische Veränderungen der DNA hervorrufen. Bei den meisten neoplastischen Veränderungen sind Chromosomenaberrationen festzustellen. DNA-Aneuploidie, die auf numerischer Chromosomenaberration beruht, kann als das zytometrische Äquivalent zur chromosomalen Aneuploidie angesehen werden. Aneuploidie kann als Marker für Neoplasien betrachtet werden. Wichtig ist dabei, dass im Umkehrschluss ein Fehlen von DNA-Aneuploidie eine neoplastische oder maligne Entartung nicht ausschließt (Böcking, 1995).

Der DNA-Gehalt einer Zelle kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Durch Replikation, Polyploidisierung, DNA-Zuwachs oder DNA-Verlust kann die Größe oder die Anzahl der Chromatiden verändert werden. Dies kann z.B. durch virale Infektionen, Chemo- oder Strahlentherapie, Vitamin-B12-Mangel, Apoptose, Autolyse oder Nekrose ausgelöst werden (Haroske et al., 2001). Durch Biesterfeld et al. (1994) wurde zudem in verschiedenen Studien gezeigt und aus der Literatur zusammengestellt, dass in nicht-neoplastisch veränderten Geweben eine euploide Polyploidisierung vorliegen kann. Hierzu zählen Gliazellen, Endothel der Cornea, orales Plattenepithel bei Lichen planus, endokrine Pankreaszellen, Cytotrophoblastzellen, Urothel, Thyreozyten, Zellen des Endometriums mit Arias-Stella-Effekt, Lymphozyten bei HIV-positiven Patienten, Hepatozyten, Herzmuskelzellen, Megakaryozyten, Samenblasenepithelien sowie Mesothelien. Polyploidie tritt hier zwar meist nur in einem geringen Prozentsatz der Zellen auf, ist jedoch nicht ungewöhnlich; auch sind

verschiedene organtypische Stufen bekannt, bis zu denen bestimmte Gewebe polyploidisieren (Biesterfeld et al., 1994).

Die Auswertung der DNA-zytometrischen Messungen erfolgte gemäß den Kriterien der ESACP (Haroske et al., 2001):

1. Bei der Stammlinieninterpretation wird der mittlere DNA-Gehalt der G_0/G_1 -Fraktion einer Zellpopulation, bezogen auf den 2c-Referenzwert der Referenzzellen $\pm 10\%$, beurteilt. Liegt der Wert der DNA-Stammlinie entsprechend bei $2c \pm 0,2c$, so liegt eine diploide Stammlinie vor. Bei einem Wert bei $4c \pm 0,4c$ spricht man von einer tetraploiden Stammlinie. Eine Stammlinie wird als aneuploid definiert, sofern sie außerhalb von $2c \pm 0,2c$ oder $4c \pm 0,4c$ liegt (Haroske et al., 2001).
2. Für die Einzelzellinterpretation wird das Vorliegen sogenannter *rare events* untersucht, also von Zellen, deren DNA-Gehalt oberhalb bestimmter Grenzen liegt. Am weitesten Verbreitung gefunden haben dabei der 5c- bzw. der 9c *Exceeding Event* (5cEE, 9cEE) als Maß für Zellen, deren DNA-Gehalt oberhalb von 5c bzw. 9c liegt. Dahinter steht die Überlegung, Zellen zu beurteilen, die (unter Berücksichtigung eines großzügigen Messfehlers von bis zu 1c) oberhalb der Werte für die G_2/M -Phase von 4c bzw. im Falle eines polyploidisierenden Gewebes oberhalb dessen doppelten Wertes von 8c liegen (Haroske et al., 2001). Als Schwellenwert für die Diagnose von DNA-Aneuploidie wurde das Vorliegen von mindestens drei solcher Zellen als Grenze vorgeschlagen (Böcking, 1990). Möglich ist auch, die Zahl der gefundenen Zellen als Prozentsatz der Analysezellen und somit als 5c- bzw. 9c *Exceeding Rate* (5cER, 9cER) anzugeben.

Im Fall der Mesothelien nimmt man für die Einzelzellinterpretation einen DNA-Gehalt von 9c als Marker für Aneuploidie an, da hier euploide Polyploidisierung bis 8c bekannt ist. Die Berechnung des Modalwertes der Stammlinie und der 9cEE wurden hierbei automatisch von dem Programm übernommen.

Für die Interpretation des computergenerierten DNA-Histogramms wurden mit beiden Messmethoden diejenigen Präparate als aneuploid gewertet, die mindestens eine aneuploide Stammlinie aufwiesen und / oder bei denen mindestens drei 9cEE ($9cEE \geq 3$) auftraten.

2.4 Statistische Datenauswertung

Die statistische Auswertung der vorliegenden Untersuchung wurde mittels des Programms SPSS, Version 22.0.0.1, durchgeführt. Als Grunddaten standen als Parameter der deskriptiven Statistik Mittelwert, Minimal- und Maximalwert sowie die Standardabweichung zur Verfügung. Zudem wurden Korrelationen zwischen den Messverfahren mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten errechnet sowie der Interklassenkorrelationskoeffizient (ICC) bestimmt. Zur Berechnung der Güte der Übereinstimmung der Messungen wurde Cohens Kappa berechnet. Ferner wurde mit Hilfe des t-Tests untersucht, inwieweit verschiedene Datensätze einer gleichen Grundgesamtheit zugeordnet werden konnten. Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha = 0,05$ angenommen.

Im Folgenden werden die angewandten Testverfahren noch einmal kurz erläutert.

2.4.1 Korrelationskoeffizient nach Pearson und Interklassenkorrelationskoeffizient

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) beschreibt Stärke und Richtung (positiv / negativ) einer linearen Beziehung zwischen zwei intervallskalierten und normal verteilten Daten. Der Pearson-Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Der Wertebereich ist wie folgt zu interpretieren:

- $r = +1$: perfekter positiver Zusammenhang
- $r = -1$: perfekter negativer Zusammenhang
- $r = 0$: kein linearer Zusammenhang

Der Interklassenkorrelationskoeffizient (ICC) zeigt die Übereinstimmung zwischen mehreren Beurteilern in Bezug auf mehrere Beobachtungsobjekte.

Auch dieser Korrelationskoeffizient wird für intervallskalierte Daten verwendet. Sein Wertebereich ist wie der Pearson-Korrelationskoeffizient zu betrachten.

2.4.2 t-Test

Zum Vergleich der Mittelwerte wird in der folgenden Studie ein t-Test für abhängige Stichproben gerechnet. Mit ihm wird überprüft, ob sich Daten einer gleichen Grundgesamtheit zuordnen lassen. Er setzt eine Normalverteilung der Daten voraus.

2.4.3 Cohens Kappa-Koeffizient

Das Maß Kappa dient zur Beurteilung der Güte von Übereinstimmungen und misst den zufallskorrigierten Anteil übereinstimmender Bewertungen, das heißt, er berücksichtigt die möglichen zufälligen Übereinstimmungen bei zwei Betrachtern. Kappa berechnet sich also wie folgt:

$$\kappa = \frac{\rho_0 - \rho_e}{1 - \rho_e}$$

Hierbei ist ρ_0 der Anteil der tatsächlich beobachteten Übereinstimmungen und ρ_e der Anteil der zufälligen Übereinstimmungen. Kappa kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen.

Es gibt in der Literatur verschiedene Grenzwerte zur Beurteilung der Übereinstimmung; üblich ist die folgende Einteilung (Grouven et al., 2007):

- | | | |
|---------|-----------|------------------------------|
| • Kappa | < 0,20 | schwache Übereinstimmung |
| • Kappa | 0,21-0,40 | leichte Übereinstimmung |
| • Kappa | 0,41-0,60 | mittelmäßige Übereinstimmung |
| • Kappa | 0,61-0,80 | gute Übereinstimmung |
| • Kappa | >0,81 | sehr gute Übereinstimmung |

In der vorliegenden Studie wird Kappa immer dann berechnet, wenn Übereinstimmungen zwischen zwei Betrachtungen beurteilt werden sollen.

2.4.4 Sensitivität und Spezifität

Zur Auswertung der Treffsicherheit der beiden unterschiedlichen Verfahren wurden Sensitivität und Spezifität berechnet. Die Daten lassen sich in einer Vier-Felder-Tafel darstellen, anhand derer die Sensitivität und Spezifität berechnet werden können. Eine entsprechende Einteilung lässt sich in Tabelle 6 ablesen.

Tabelle 6: Aufteilung der Häufigkeiten in einer 4-Felder-Tafel

Krankheit		Test		Summe
		+	-	
+	Anzahl der richtig positiven (a)	Anzahl der falsch negativen (b)		Anzahl der tatsächlich positiven
-	Anzahl der falsch positiven (c)	Anzahl der richtig negativen (d)		Anzahl der tatsächlich negativen
Summe	Anzahl der erkannten positiv	Anzahl der erkannten negativ		Summe

Sensitivität bezeichnet in der Medizin den Anteil der Patienten, bei denen durch ein positives Testergebnis die richtige Diagnose (= krank) erkannt wird. Sie berechnet sich somit durch das Verhältnis der positiven Testergebnisse (in diesem Fall als richtig positiv erkannte Präparate) zur Gesamtzahl der tatsächlich positiven Präparate. Der Idealwert für die Sensitivität liegt bei 100 %.

$$\rightarrow \text{Sensitivität} = \left(\frac{a}{a+b} \right)$$

Spezifität quantifiziert den Anteil der negativen Messergebnisse unter allen gesunden Probanden. Sie beschreibt somit das Verhältnis der als richtig negativ eingestuft Präparate zu der Gesamtanzahl von tatsächlich negativen Präparaten. Auch hier liegt der Idealwert bei 100 % (Hilgers et al., 2007).

$$\rightarrow \text{Spezifität} = \left(\frac{d}{c+d} \right)$$

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Betrachtung und Vergleich der Parameter für beide Messmethoden

Im Folgenden werden die Ergebnisse der manuellen und der automatischen Messung systematisch dargestellt. Zunächst werden einzelne Parameter der manuellen und der automatischen Messung deskriptiv betrachtet und anschließend miteinander verglichen. Anschließend wird ihr jeweiliger Einfluss auf die DNA-zytometrische Diagnose untersucht. Die so analysierten Parameter sind die Anzahl der gemessenen Referenz- und Analysezellen, die 9c *Exceeding Events* (9cEE) sowie die Anzahl der aneuploiden Stammlinien.

3.1.1 Anzahl gemessener Analyse- und Referenzzellen

Zunächst wurde die Anzahl der gemessenen Analyse- und Referenzzellen für beide Methoden verglichen. Für beide Messverfahren wurden die statistischen Parameter Mittelwert, Standardabweichung sowie Minimum und Maximum erhoben. Die entsprechenden Werte für die untersuchten Referenzzellen sind in Tabelle 7 aufgeführt:

Tabelle 7: Statistische Kennwerte für die Anzahl der gemessenen Referenzzellen

	Anzahl gemessener Referenzzellen (manuelle Messung)	Anzahl gemessener Referenzzellen (automatische Messung)
Mittelwert	33,82	3.743,13
SD	5,02	4.846,53
Minimum	12	48
Maximum	50	32.106

Natürliche Zahlen sind ohne Nachkommastelle angegeben, zur besseren Übersicht sind die übrigen Werte auf zwei Nachkommastellen gerundet, SD = Standardabweichung.

Insgesamt wurden für die vorliegende Studie 4.092 Referenzzellen bei den manuellen Messungen und 441.689 Referenzzellen bei den automatischen Messungen erfasst.

Auch für die untersuchten Analysezellen wurden die entsprechenden Werte erhoben. Diese sind in Tabelle 8 abzulesen. Insgesamt wurden 28.480

Analysezellen bei den manuellen Messungen untersucht und 35.711 bei den automatischen Messungen.

Tabelle 8: Statistische Kennwerte für die gemessenen Analysezellen

	Anzahl gemessener Analysezellen (manuelle Messung)	Anzahl gemessener Analysezellen (automatische Messung)
Mittelwert	235,37	302,64
SD	85,25	866,31
Minimum	30	0
Maximum	472	7.942

Natürliche Zahlen sind ohne Nachkommastelle angegeben, zur besseren Übersicht sind die übrigen Werte auf zwei Nachkommastellen gerundet, SD = Standardabweichung.

Bei der automatischen Messung wurden im Schnitt pro Präparat 3,08 Objekte durch den Klassifikator automatisch als 9cEE erkannt, von denen nach Überprüfung im Durchschnitt 0,15 (4,9%) den Artefakten zugeordnet wurden. Im Gegenzug wurden von durchschnittlich 157,30 zugeordneten Artefakten pro Präparat 0,63 (0,4%) zu einer Analysezelle umklassifiziert (s. Kapitel 2.3.4).

3.1.2 9c Exceeding Events

Zunächst wurden die 9cEE beider Messungen genauer analysiert. Es wurden alle 121 verbliebenen Fälle betrachtet, unabhängig davon, ob 9cEE gefunden wurden oder nicht. Für beide Messungen wurden zunächst die statistischen Kennwerte Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum berechnet. Diese sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Statistische Kennwerte der 9cEE der manuellen und der automatischen Messung, n = 121

	9cEE (manuelle Messung)	9cEE (automatische Messung)
Mittelwert	2,00	3,60
Standardabweichung	6,17	15,40
Varianz	38,10	236,88
Minimum	0	0
Maximum	36	137

Natürliche Zahlen sind ohne Nachkommastelle angegeben, zur besseren Übersicht sind die übrigen Werte auf zwei Nachkommastellen gerundet.

Die Häufigkeitsverteilung der 9cEE für die manuelle Messung ist im folgenden Balkendiagramm (Abb. 3) dargestellt.

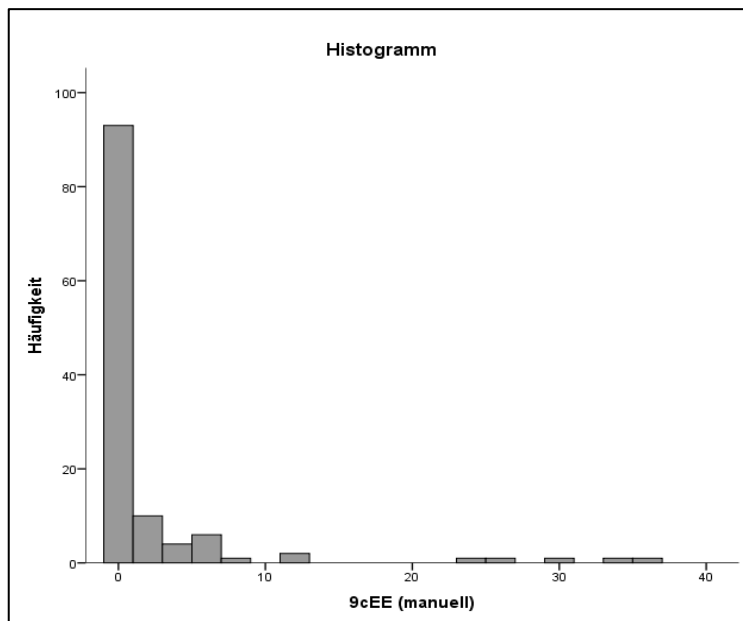


Abb. 3: Häufigkeiten der 9cEE bei der manuellen Messung

Auf der Abszisse sind die 9cEE angezeigt, auf der Ordinate findet sich die Häufigkeit. Mittelwert = 2, SD = 6,17, n = 121

Bei der Häufigkeitsverteilung der 9cEE stellt sich vor allem dar, dass die Anzahl der gefundenen 9cEE in den meisten Fällen eher gering ist (M = 2; SD = 6,173). Größere Anzahlen von 9cEE treten nur selten auf.

Die Häufigkeiten für die automatische Messung sind in Abb. 4 dargestellt.

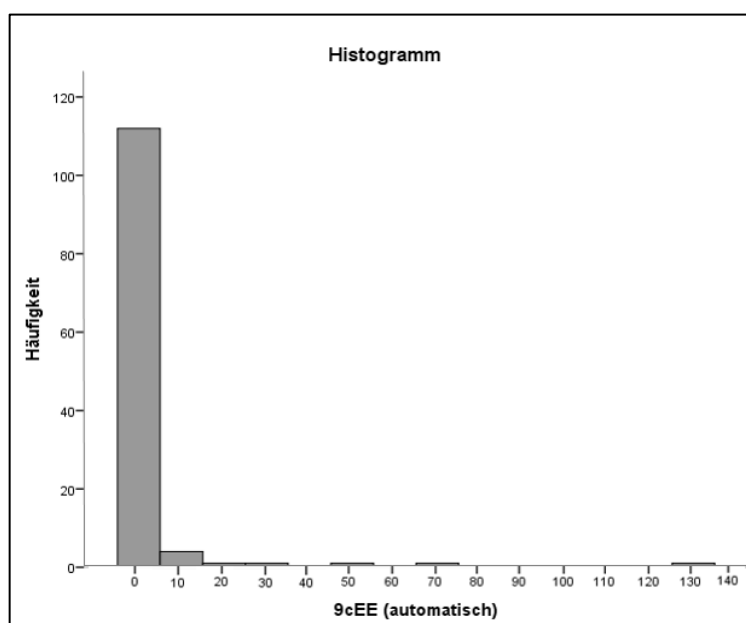


Abb. 4: Häufigkeiten der 9cEE der automatischen Messung

Auf der Abszisse sind die 9cEE angezeigt, auf der Ordinate die Häufigkeit. Mittelwert = 3,60, SD = 15,40, n = 121

Bei der automatischen Messung liegen die Werte für die 9cEE generell etwas höher ($M = 3,60$; $SD = 15,4$). Zudem lässt sich dem Diagramm entnehmen, dass in einzelnen Fällen der Maximalwert der 9cEE (36) der manuellen Messung deutlich überstiegen wird.

Zum Vergleich der unterschiedlichen Messmethoden wurden die Fälle in Wertungskategorien zwischen 0 gefundenen 9cEE und ≥ 3 gefundenen 9cEE eingeteilt (vgl. Kapitel 2.3.5.) und anschließend mit verschiedenen Grenzziehungen korreliert (Tabelle 10).

Tabelle 10: Korrelationsmatrix für die Einordnung von 9cEE im Vergleich manuell / automatisch

		9cEE automatisch				
		0	1	2	≥ 3	gesamt
9cEE manuell	0	87	3	3	0	93
	1	0	4	0	0	4
	2	2	2	0	2	6
	≥ 3	0	2	1	15	18
gesamt		89	11	4	17	121

Für die 121 Fälle ergibt sich nach dieser Einteilung eine Übereinstimmung von 87,6 % (106 / 121). Zur Messung der Güte der Übereinstimmung wurde Kappa berechnet. Der Wert $Kappa = 0,697$ bedeutet in diesem Fall eine gute Übereinstimmung.

Kategorisiert man in zwei Gruppen für $9cEE = 0$ gegen $9cEE > 0$, so beträgt die Übereinstimmung 93,4 % (113/121) und der Kappa-Wert 0,823, was einer sehr guten Übereinstimmung entspricht.

Für einen Vergleich in drei Gruppen ($9cEE = 0$, $0 < 9cEE < 3$, $9cEE \geq 3$) liegt die Übereinstimmung bei 89,3 % (108/121) und der Kappa-Wert bei 0.734. Dies entspricht einer guten Übereinstimmung. Diese Interpretation spiegelt die diagnostische Anwendung des 9cEE in der Beurteilung einer etwaigen Einzelzellaneuploidie wider, bei der man bei einem $9cEE = 0$ keinen Hinweis hierfür sieht, die Konstellation von $9cEE = 1$ oder $9cEE = 2$ als eine Art

Grauzone betrachtet und einen $9cEE \geq 3$ als Nachweis von Aneuploidie versteht. Der p-Wert im Pearson-Chi²-Test lag bei allen diesen Korrelationen bei $< 0,0001$.

Die Übereinstimmung der gefundenen 9cEE beider Messmethoden ist in Abb. 5 als Bland-Altman-Plot dargestellt.

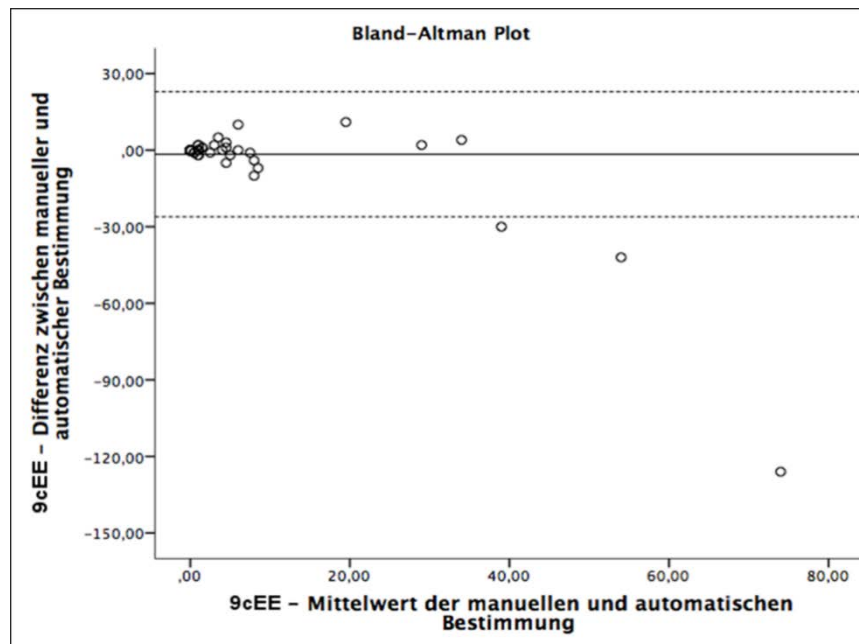


Abb. 5: Bland-Altman-Plot zur Darstellung der 9cEE

Auf der Abszisse ist der Mittelwert, auf der Ordinate die Differenz zwischen den Messungen dargestellt. Die gepunkteten Linien repräsentieren den Mittelwert der Differenz $\pm 1,96 \cdot SD$. Mittelwert der Differenz = -1,60, Standardabweichung 12,50.

Dieser zeigt für die Übereinstimmung der Messmethoden hinsichtlich des Parameters 9cEE eine größere Streuung bei höheren Werten. Zudem befanden sich 3 Fälle außerhalb des 95 % Konfidenzintervalls. Zur Überprüfung der Güte der Übereinstimmung wurde der Interklassenkorrelationskoeffizient (ICC) berechnet. Er beträgt für den Parameter $r_{9cEE} = 0,602$ ($p < 0.05$) und zeigt somit eine mittlere signifikante Übereinstimmung.

Wie oft bei der manuellen Messung und wie häufig bei der automatischen Messung die Anzahl der 9cEE höher war, ist in Tabelle 11 wiedergegeben.

Tabelle 11: Einteilung der Fälle mit *Exceeding Events* nach ihrer Häufigkeit bei der automatischen und der manuellen Messung, n = 39

	Anzahl der Fälle mit 9cEE
manuell > automatisch	17
manuell = automatisch	6
manuell < automatisch	16

Es zeigt sich, dass nur bei 15 % aller Fälle die exakt gleiche Anzahl von 9cEE bei beiden Messungen gefunden wurde. Der Anteil von Messungen, bei denen entweder bei der manuellen Messung oder der automatischen Messung mehr 9cEE gefunden wurden, ist hingegen ausgeglichen.

Bei beiden Messungen wurde untersucht, inwieweit die 9cEE Einfluss auf die Diagnose hatten. Der Zusammenhang zwischen gefundenen 9cEE und der anschließenden DNA-zytometrischen Diagnose ist den folgenden Tabellen 12 und 13 zu entnehmen. Zunächst wird in Tabelle 12 die Verteilung zwischen der Anzahl der 9cEE und der Diagnose der manuellen Messung dargestellt.

Tabelle 12: Einteilung der 121 Präparate nach 9c Exceeding Events (9cEE) und der DNA-zytometrischen Diagnose (manuelle Messung)

Anzahl der 9c EE	Diagnose (manuelle Messung)		Gesamt
	aneuploid	euploid	
0	9	84	93
1	4	0	4
2	6	0	6
3	1	0	1
4	3	0	3
5	2	0	2
6	4	0	4
7	1	0	1
11	2	0	2
24	1	0	1
25	1	0	1
30	1	0	1
33	1	0	1
36	1	0	1

Betrachtet man die Tabelle, so zeigt sich, dass in neun Fällen (= 24,3 %) die DNA-zytometrische Analyse die Diagnose „aneuploid“ ergab, obwohl keine 9cEE auftraten, entsprechend basierend auf einer aneuploiden Stammlinie. Knapp die Hälfte aller aneuploiden Fälle, nämlich 18 (= 48,6 %), wiesen 9cEE über dem Schwellenwert von $9cEE \geq 3$ auf. Die übrigen zehn als aneuploid

klassifizierten Fälle wiesen einen oder zwei 9cEE auf. Bei den als euploid diagnostizierten 84 Fällen hingegen traten nie 9cEE auf.

In Tabelle 13 werden die 9cEE und Diagnosen der automatischen Messung dargestellt.

Tabelle 13: Einteilung der 121 Präparate nach 9c Exceeding Events (9cEE) und der DNA-zytometrischen Diagnose (automatische Messung)

Anzahl der 9cEE	Diagnose (automatische Messung)		
	aneuploid	euploid	gesamt
0	10	79	89
1	11	0	11
2	4	0	4
3	2	0	2
4	2	0	2
6	2	0	2
7	1	0	1
8	1	0	1
10	1	0	1
12	1	0	1
13	1	0	1
14	1	0	1
28	1	0	1
32	1	0	1
54	1	0	1
75	1	0	1
137	1	0	1

Auch bei der automatischen Messung liegen 10 Fälle vor (23,8 %), bei denen die Diagnose „aneuploid“ lautete und keine 9cEE gemessen wurden. Bei 40,4 % (n = 17) aller als aneuploid diagnostizierten Fälle lagen mindestens drei 9cEE vor. Insgesamt zeigt sich auch hier noch einmal, dass bei der automatischen Messung mehr 9cEE gefunden wurden als bei der manuellen Messung.

Zur Darstellung der Korrelation zwischen 9cEE und Diagnose wurde für beide Messverfahren der Pearson-Korrelations-Koeffizient r berechnet. Es ergibt sich für die manuelle Messung eine signifikante negative Korrelation zwischen 9cEE und der Diagnose, $r_{\text{manuell}} = -0,49$; $p < .001$. Für die automatische Messung beträgt $r_{\text{automatisch}} = -0,322$; $p < .001$. Dies bedeutet, dass höhere Werte in 9cEE eher die Diagnose aneuploid (= 1) statt euploid (= 2) zur Folge haben.

3.1.3 Anzahl der aneuploiden Stammlinien

Weiterhin wurden die Anzahl und die Lage der gefundenen aneuploiden Stammlinien untersucht und verglichen. Hierfür wurden zunächst Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum erhoben. Diese Werte sind in Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 14: Statistische Kennwerte der aneuploiden Stammlinien, n=121

	Anzahl aneuploider STL (manuelle Messung)	Anzahl aneuploider STL (automatische Messung)
Mittelwert	0,44	0,37
SD	0,77	0,69
Minimum	0	0
Maximum	3	3

Natürliche Zahlen sind ohne Nachkommastelle angegeben, zur besseren Übersicht sind die übrigen Werte auf zwei Nachkommastellen gerundet, SD = Standardabweichung.

Anschließend wurden die Häufigkeiten für die Anzahl aneuploider Stammlinien beider Messmethoden bestimmt. Die Häufigkeiten aneuploiden Stammlinien der manuellen Messung sind im folgenden Balkendiagramm (Abb. 6) dargestellt.

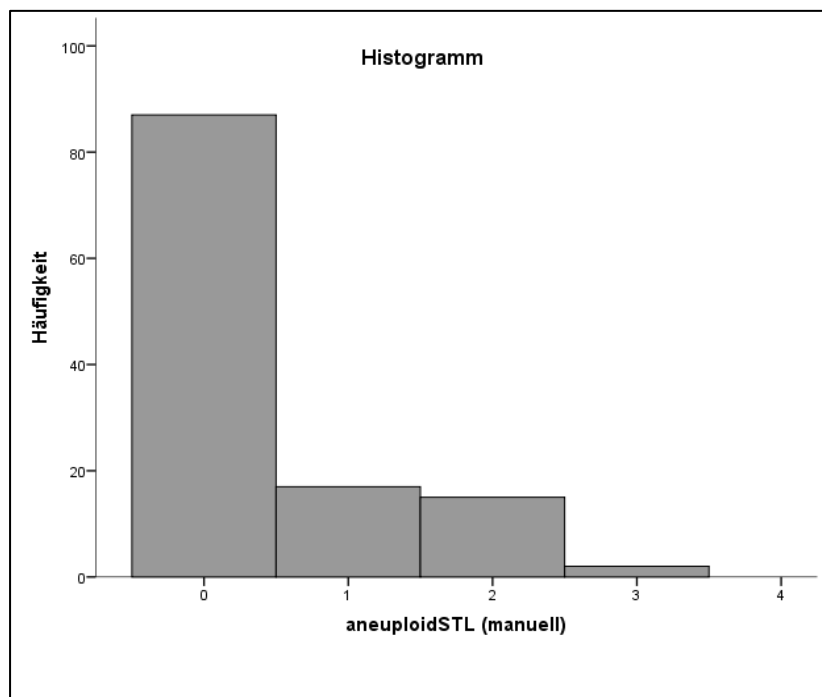


Abb. 6: Häufigkeitsverteilung der Zahl aneuploider Stammlinien der manuellen Messung

Auf der Abszisse ist die Anzahl der aneuploiden Stammlinien angezeigt, auf der Ordinate findet sich die Häufigkeit. Mittelwert = 0,44, SD = 0,77, n = 121

Die Häufigkeitsverteilung der Anzahl aneuploider Stammlinien für die automatische Messung folgt im nächsten Balkendiagramm (Abb. 7).

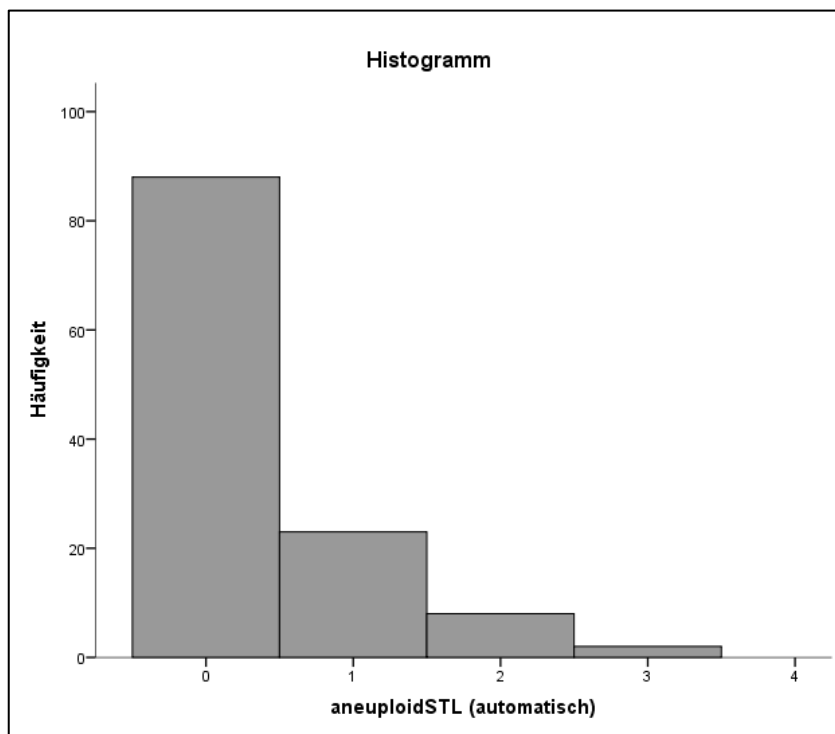


Abb. 7: Häufigkeitsverteilung der Anzahl aneuploider Stammlinien der automatischen Messung

Auf der Abszisse ist die Anzahl der aneuploiden Stammlinien angezeigt, auf der Ordinate findet sich die Häufigkeit. Mittelwert = 0,37, SD = 0.69, n = 121

Auch diese Daten werden nun korreliert. Die Korrelationsmatrix ist in Tabelle 15 wiedergegeben.

Tabelle 15: Korrelationsmatrix für die Einordnung der Zahl aneuploider Stammlinien im Vergleich automatisch/manuell

		Zahl aneuploider Stammlinien automatisch				gesamt
		0	1	2	3	
Zahl aneuploider Stammlinien manuell	0	81	6	0	0	87
	1	3	9	4	1	17
	2	4	8	2	1	15
	3	0	0	2	0	2
gesamt		88	23	8	2	121

Die Übereinstimmung bezogen auf die genaue Zahl von Stammlinien beträgt 76 % (92 / 121) und ist somit etwas geringer als beim Parameter 9cEE. Auch in diesem Fall wurde Kappa als Maß der Güte der Übereinstimmung berechnet. Der Wert $Kappa = 0,458$ zeigt in diesem Fall eine mittelmäßige Übereinstimmung.

Betrachtet man ausschließlich, ob überhaupt aneuploide Stammlinien vorlagen oder nicht, so beträgt die Übereinstimmung 89,3 % (108 / 121): 81 Fälle zeigten jeweils keine aneuploiden Stammlinien, 27 wiesen mindestens eine auf, und in 13 Fällen wurde mit einem der beiden Messverfahren eine aneuploide Stammlinie gefunden. Dabei lag in sieben Fällen lediglich in der manuellen Messung Aneuploidie vor, in sechs Fällen lediglich in der automatisierten Messung.

Die Übereinstimmung hinsichtlich der Anzahl aneuploider Stammlinien ist im folgenden Bland-Altman-Plot dargestellt (Abb. 8).

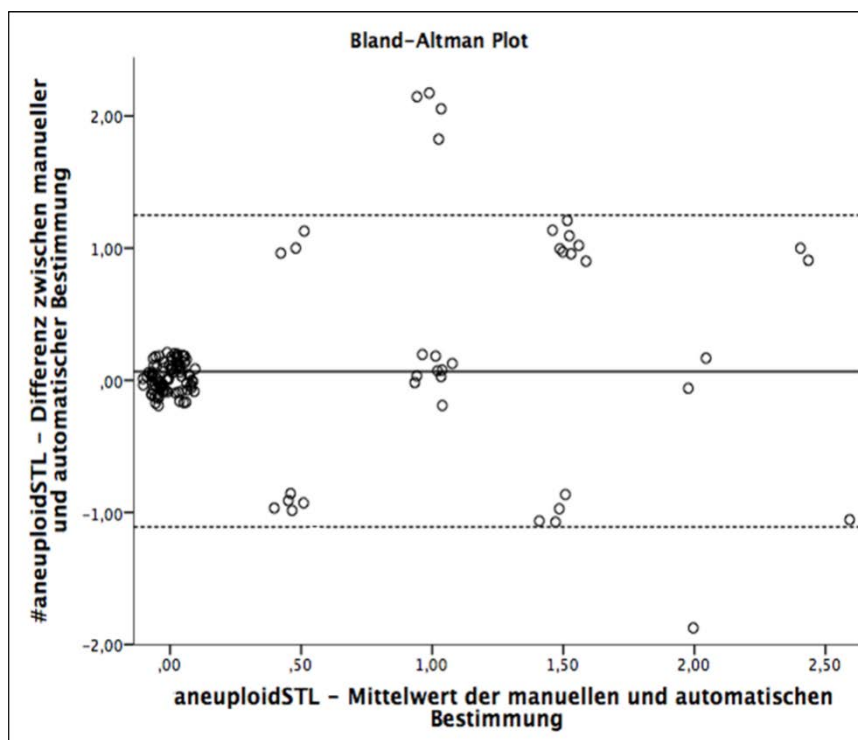


Abb. 8: Bland-Altman-Plot zur Darstellung der Übereinstimmung der beiden Messmethoden bei der Anzahl aneuploider Stammlinien

Auf der Abszisse ist der Mittelwert, auf der Ordinate die Differenz zwischen den Messungen dargestellt. Die gepunkteten Linien repräsentieren den Mittelwert der Differenz $\pm 1,96 \cdot SD$. Mittelwert der Differenz = 0,66, Standardabweichung 0,60.

Die Darstellung als Bland-Altman-Plot illustriert für die Übereinstimmung der Messmethoden in Bezug auf den Parameter „Anzahl der aneuploiden Stammlinien“ eine gewisse Streuung, bedingt durch die Fälle mit unterschiedlicher Zahl aneuploider Stammlinien. Außerhalb des 95 %-Konfidenzintervalls liegen die vier Fälle, in denen mit dem manuellen Messverfahren zwei und mit den automatisierten Messverfahren keine aneuploide Stammlinie gefunden worden war.

Auch für diesen Parameter wurde zur Berechnung der Güte der Übereinstimmung der Interklassenkorrelationskoeffizient (ICC) berechnet. Er beträgt in diesem Fall 0,299. Somit ist die Übereinstimmung für die beiden Messmethoden bei dem Parameter „Zahl aneuploider Stammlinien“ eher als moderat zu betrachten ($p < 0.05$).

Die Unterschiede in der Anzahl aneuploider Stammlinien beider Messungen sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Unterschiedliche Verteilung von aneuploiden Stammlinien bei manueller und automatischer Messung

Anzahl der Fälle mit aneuploiden Stammlinien	
manuell > automatisch	17
manuell = automatisch	11
manuell < automatisch	12

Bei der Anzahl der aneuploiden Stammlinien wurde in 27,5 % aller 40 Fälle, in denen wenigstens mit einer der beiden Messmethoden eine aneuploide Stammlinie vorlag, die gleiche Anzahl aneuploider Stammlinien ermittelt.

3.2 Betrachtung einzelner Parameter bei nur einer Messmethode

Zusätzlich wurden die Parameter CV abnormal (s.2.3.2) und 2c-Referenz-IOD einzeln analysiert. Die Ergebnisse dieser Beobachtungen sind im Folgenden erörtert.

Zunächst wird der Zusammenhang zwischen dem Variationskoeffizienten der abnormen Zellen (CV abnormal) und der Diagnose der DNA-Bildzytometrie analysiert. Dieser Parameter wurde nur für die automatische Messung erhoben und vom Computer automatisch berechnet.

Für die manuelle Messung wurde ebenfalls ein Parameter gesondert untersucht, nämlich die integrierte optische Dichte der Referenzzellen (2c-Referenz-IOD) für unterschiedlich vorbehandelte Präparate.

Es handelt sich bei beiden Parametern um Besonderheiten, die während des Vergleiches der beiden Messmethoden auffielen und deshalb gesondert überprüft wurden.

3.2.1 Zusammenhang zwischen CV abnormal und Diagnose der automatischen Messung

Bei der automatisierten Messung wurde untersucht, inwiefern der CV der abnormalen Zellen Einfluss auf die Diagnose (aneuploid/euploid) hat. Die statistischen Kennwerte für den CV abnormal sind für aneuploide und euploide Präparate in der folgenden Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: CV abnormal der automatischen Messung

	CV abnormal (automatisch)	
	aneuploid	euploid
n	42	79
Mittelwert	32,24	7,63
Standardabweichung	14,33	7,76
Median	30,58	6,27
Minimum	12,29	0
Maximum	85,62	39,24

Natürliche Zahlen sind ohne Nachkommastelle angegeben, zur besseren Übersicht sind die übrigen Werte auf zwei Nachkommastellen gerundet.

Die Verteilung der Werte der Variablen „CV abnormal (%)“ für die beiden Diagnosen wird im folgenden Boxplot-Diagramm (Abb. 9) dargestellt.

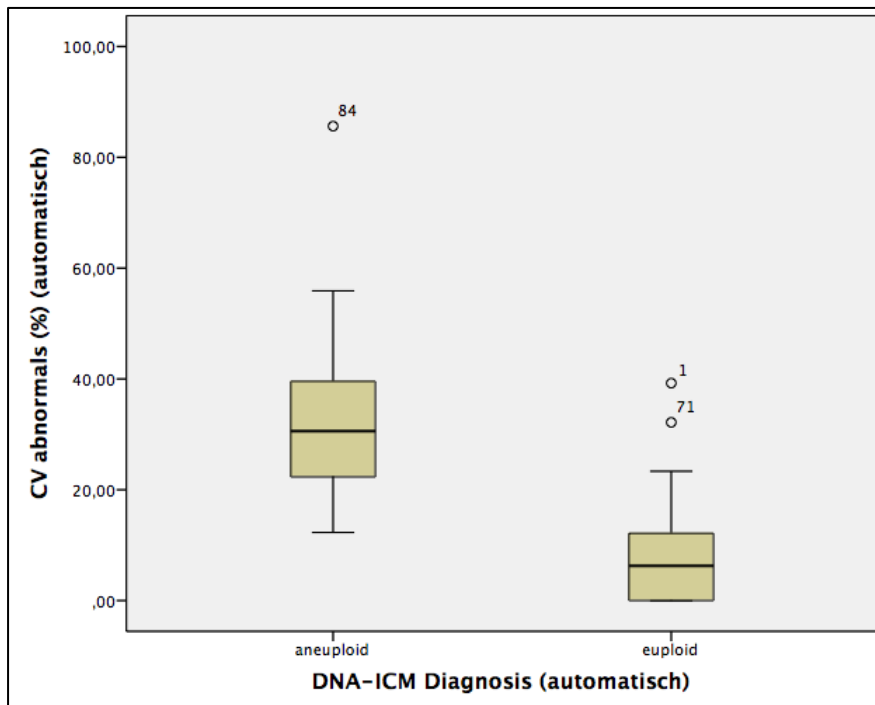


Abb. 9: CV abnormalities (automatische Messung) für die DNA-zytometrischen Diagnosen aneuploid/euploid

Die Boxen repräsentieren das 2. und 3. Quartil sowie den Median (30,58 / 6,27), die Linien das 1. und 4. Quartil sowie Minima und Maxima, sofern sie keine Ausreißer sind. Ausreißer (o) sind definiert als Werte, die mehr als eineinhalb Boxenlängen außerhalb liegen.

Berechnet man die punktbiseriale Korrelation zwischen der prozentualen Abweichung und der Diagnose, so ergibt sich für den Pearson-Korrelationskoeffizienten $r = -0,747$; $p < 0,01$; zweiseitig getestet. Es zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der prozentualen Abweichung und der Diagnose. Der CV-Wert ist bei der Diagnose aneuploid signifikant höher als bei der Diagnose euploid. Der anschließend durchgeführte t-Test zeigt, dass tatsächlich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der mittleren prozentualen Abweichung zwischen den beiden Diagnosen besteht. Der CV der Gruppe aneuploid ($M_{\text{aneuploid}} = 32,242$; $SD = 14,333$) ist signifikant größer als der CV der Gruppe euploid ($M_{\text{euploid}} = 7,627$; $SD = 7,761$), $t(121) = 10,352$; $p < 0,05$.

3.2.2 2c Referenz-IOD der manuellen Messung

Im Folgenden wird ein Parameter der manuellen Messung betrachtet. Hier wurde der 2c Referenz-IOD (s. 2.3.3.) der aus der MGG-Färbung umgefärbten (Präparate 7.x) mit dem der zuvor ungefärbt gebliebenen Präparate (8.x)

verglichen. Es handelte sich um einen randomisierten Teilversuch mit kleinerer Stichprobe von 20 Fällen. Ziel war, einen eventuellen Einfluss der MGG-Vorfärbung auf die Intensität der Feulgen-Färbung zu erkennen und zu beschreiben. Als Präparate wurden genau diejenigen ausgewählt, deren Eingangsnummer auf 0 oder 5 endete.

Die statistischen Kenndaten sind Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle18: Statistische Kennwerte der 2c-Referenz-IOD für vorgefärbte (7.x) und ungefärbte (8.x) Präparate, n = 20

	vorgefärbtes Präparat (7)	ungefärbtes Präparat (8)
Mittelwert	298,20	341,83
Standardabweichung	19,62	28,06

Zur besseren Übersicht sind die Werte auf zwei Nachkommastellen gerundet.

Die Ergebnisse werden in einem Bland-Altman-Plot dargestellt (Abb. 10).

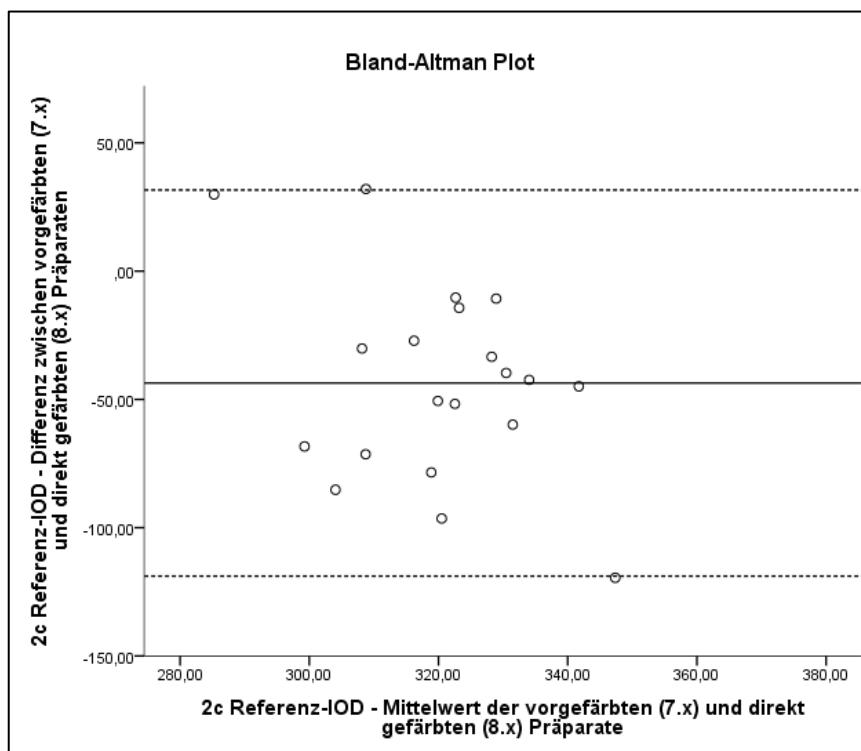


Abb. 10: Bland-Altman-Plot zur Darstellung der Übereinstimmung des 2c-Referenz-IOD bei den vorgefärbten (7.x) und den direkt gefärbten (8.x) Präparaten.

Auf der Abszisse ist der Mittelwert, auf der Ordinate die Differenz zwischen den Messungen dargestellt. Die gepunkteten Linien repräsentieren den Mittelwert der Differenz $\pm 1,96 \cdot SD$. Mittelwert der Differenz = -43,63, Standardabweichung = 38,39

Die Darstellung als Bland-Altman-Plot zeigt für die Übereinstimmung der 2c Referenz-IODs eine deutliche Streuung und veranschaulicht graphisch, dass in 18 der 20 Fälle die direkt Feulgen-gefärbten Präparate eine höhere IOD aufwiesen als die zuvor MGG-gefärbten. Inhaltlich steht eine höhere IOD für eine stärkere Anfärbung, was zu einer besseren und fehlerfreieren Detektion führen sollte.

Der anschließend durchgeführte t-Test zeigt, dass die Unterschiede in den Referenz-IODs zwischen den vorher ungefärbten (also direkt Feulgen gefärbten) Präparaten ($M_8 = 341,83$; $SD = 28,05$) und den MGG-vorgefärbten Präparaten ($M_7 = 298,20$; $SD = 19,622$) statistisch signifikant sind ($t(20) = -5,08$; $p < 0,05$).

3.3 Übereinstimmung der Diagnosen

Zuletzt wurden die Präparate sowohl hinsichtlich ihrer zytologischen als auch ihrer DNA-zytometrischen Diagnose verglichen. Die untersuchten Präparate wurden zytologisch sowohl in der Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf untersucht als auch an der RWTH Aachen (s. Kapitel 2.2). Die unterschiedlichen zytologischen Diagnosen werden im folgenden Abschnitt miteinander verglichen. Anschließend werden die Unterschiede der in Düsseldorf bzw. in Aachen festgestellten Diagnosen mit der finalen Diagnose dargestellt. Im nächsten Schritt werden die Ergebnisse der automatischen und manuellen Messung untereinander verglichen. Im letzten Schritt erfolgt dann jeweils der Vergleich mit der finalen Diagnose um eine Treffsicherheit zu ermitteln.

3.3.1 Vergleich der zytologischen Diagnosen in Aachen und Düsseldorf

Die unterschiedlichen zytologischen Diagnosen von Aachen und Düsseldorf lassen sich der folgenden 9-Felder-Tafel (Tabelle 19) entnehmen.

Tabelle 19: Gegenüberstellung der zytologischen Diagnosen aus Aachen und Düsseldorf

	zytologische Diagnose Aachen			
		negativ	dV/zw	positiv
	negativ	59	3	0
	dV/zw	3	1	7
zytologische Diagnose Düsseldorf	positiv	4	4	40

dV = dringender Verdacht, zw = zweifelhaft

Wie man der Tabelle entnehmen kann, wurden die Routinepräparate in Düsseldorf und die Studienpräparate in Aachen zum Teil unterschiedlich zytologisch befundet. In 82,6 % aller Fälle kam es zur gleichen Diagnose. Die Berechnung von Kappa zur Güte der Übereinstimmung zeigt $Kappa = 0,654$ und gibt somit eine gute Übereinstimmung an.

Aus den unterschiedlichen Diagnosen wurde unter Einbeziehung der Ergebnisse der Immunzytochemie und / oder eines follow-ups eine finale zytologische Diagnose gebildet (s. Kapitel 2.2). Die Vergleiche zwischen der Düsseldorfer bzw. der Aachener und der finalen zytologischen Diagnose sind den nächsten beiden 9-Felder-Tafeln (Tabellen 20 und 21) zu entnehmen.

Tabelle 20: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der zytologischen Diagnose aus Düsseldorf und der finalen Diagnose

	finale zytologische Diagnose			
		negativ	dV/zw	positiv
	negativ	59	3	0
	dV/zw	0	4	7
zytologische Diagnose Düsseldorf	positiv	0	1	47

dV = dringender Verdacht, zw = zweifelhaft

Die Übereinstimmung zwischen der zytologischen Diagnose der Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf und der finalen Diagnose beträgt 91 %. Auch Kappa zeigt mit einem Wert von 0,843 eine sehr gute Übereinstimmung an.

Tabelle 21: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der zytologischen Diagnose Aachen und der finalen Diagnose

	finale zytologische Diagnose			
		negativ	dV/zw	positiv
	negativ	59	2	5
	dV/zw	0	4	4
zytologische Diagnose Aachen	positiv	0	2	45

dV = dringender Verdacht, zw = zweifelhaft

Die Übereinstimmung zwischen der zytologischen Diagnose Aachen durch Prof. Dr. Böcking und der finalen Diagnose beträgt 89,2 % (n = 121). Kappa beträgt 0,774 und bedeutet somit auch hier eine gute Übereinstimmung.

3.3.2 Vergleich der DNA-zytometrischen Diagnosen der manuellen und der automatischen Messung

Zunächst wurden alle 121 gültigen Messungen hinsichtlich ihrer DNA-zytometrischen Diagnose verglichen. Die Ergebnisse werden in einer 4-Felder-Tafel dargestellt (Tabelle 22).

Tabelle 22: 4-Felder-Tafel zur Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Diagnosen von beiden Messverfahren

Diagnose automatische Messung	Diagnose manuelle Messung	
	aneuploid	euploid
aneuploid	37	5
euploid	0	79

Die prozentuale Übereinstimmung der Diagnosen beträgt somit 95,9 %. Kappa = 0,906 bedeutet in diesem Fall eine sehr gute Übereinstimmung. Lediglich bei 5 der 121 Präparate kam es zu einer unterschiedlichen Diagnose. In allen Fällen waren es Präparate, die bei der manuellen Messung als „euploid“ eingestuft waren und bei denen die automatische Messung die Diagnose „aneuploid“ ergab (s. Kapitel 4.2.2).

3.3.3 Vergleiche zwischen zytologischen und DNA-zytometrischen Diagnosen

Anschließend wurden die finale zytologische Diagnose mit ggf. vorliegenden Ergebnissen der Immunzytochemie bzw. follow-up als Goldstandard gewertet und jeweils mit den Ergebnissen der DNA-zytometrischen Messungen verglichen. Hier wurden zunächst jeweils die Parameter 9cEE und Anzahl aneuploider Stammlinien im Vergleich mit der finalen Diagnose für beide Messreihen analysiert. Anschließend erfolgt der Vergleich der DNA-zytometrischen Diagnose mit der finalen Diagnose.

Der Vergleich zwischen den 9cEE der manuellen Messung und der finalen Diagnose ist Tabelle 23 zu entnehmen.

Tabelle 23: 12-Felder-Tafel zur Darstellung von finaler Diagnose und der Anzahl der 9cEE der manuellen Messung

		9cEE (manuelle Messung)			
		0	1	2	≥3
finale Diagnose	negativ	59	0	0	0
	dV/zw	8	0	0	0
	positiv	26	4	6	18

dV = dringender Verdacht, zw = zweifelhaft

Man kann erkennen, dass gemäß der ESACP Kriterien keine 9cEE bei negativen Fällen gefunden wurden. Im Gegensatz dazu gibt es aber 26 Fälle, bei denen keine 9cEE gefunden wurden und welche trotzdem in der finalen Diagnose als positiv gewertet wurden.

In der folgenden Tabelle 24 ist der Vergleich der 9cEE der automatischen Messung mit der finalen Diagnose dargestellt.

Tabelle 24: 12-Felder-Tafel zur Darstellung von finaler Diagnose und der Anzahl der 9cEE der automatischen Messung

		9cEE (automatische Messung)			
		0	1	2	≥3
finale Diagnose	negativ	59	0	0	0
	dV/zw	8	0	0	0
	positiv	22	11	4	17

dV = dringender Verdacht, zw = zweifelhaft

Auch bei der automatischen Messung treten keine 9cEE bei negativen Fällen auf. 22 Fälle sind auch ohne das Auftreten von 9cEE zytologisch eindeutig positiv.

Der anschließende Vergleich der Anzahl aneuploider Stammlinien der manuellen Messung mit der finalen Diagnose liefert folgendes Ergebnis (Tabelle 25):

Tabelle 25: 12-Felder-Tafel zur Darstellung von finaler Diagnose und der Zahl aneuploider Stammlinien der manuellen Messung

		Anzahl aneuploider STL (manuelle Messung)			
		0	1	2	≥3
finale Diagnose	negativ	59	0	0	0
	dV/zw	8	0	0	0
	positiv	20	17	15	2

dV = dringender Verdacht, zw = zweifelhaft, STL = Stammlinien

Auch hier lässt sich erkennen, dass in keinem der negativen Fälle eine aneuploide Stammlinie gefunden wurde. Es liegen jedoch 20 in der finalen zytologischen Diagnose positive Fälle vor, die keine aneuploide Stammlinie aufweisen.

Der Vergleich der Anzahl aneuploider Stammlinien der automatischen Messung und der finalen Diagnose lässt sich in der nächsten 12-Felder-Tafel (Tabelle 26) ablesen.

Tabelle 26: 12-Felder-Tafel zur Darstellung von finaler Diagnose und der Anzahl aneuploider Stammlinien der automatischen Messung

		Anzahl aneuploider STL (automatische Messung)			
		0	1	2	≥3
finale Diagnose	negativ	59	0	0	0
	dV/zw	7	1	0	0
	positiv	23	21	8	2

dV = dringender Verdacht, zw = zweifelhaft, STL = Stammlinien

Bei der automatischen Messung zeigt sich, dass auch hier kein negativer Fall eine aneuploide Stammlinie aufweist. Es liegen 23 Fälle vor, in denen die finale Diagnose ohne aneuploide Stammlinie „positiv“ lautet.

Zuletzt folgt der Vergleich der finalen Diagnose mit der DNA-zytometrischen Diagnose. Die Übereinstimmung zwischen der DNA-zytometrischen Diagnose der manuellen Messung und der finalen Diagnose ist der folgenden 6-Felder-Tafel (Tabelle 27) wiedergegeben.

Tabelle 27: 6-Felder-Tafel zur Darstellung von finaler Diagnose und DNA-zytometrischer Diagnose der manuellen Messung

		Diagnose manuelle Messung	
		euploid	aneuploid
finale Diagnose	negativ	59	0
	dV/zw	8	0
	positiv	17	37

dV = dringender Verdacht, zw = zweifelhaft

Bei den 37 „richtig positiven“ Diagnosen gegenüber der Gesamtzahl aller tatsächlich positiven Fälle (n = 54) stellt sich somit eine Sensitivität von 68,5 % dar, wenn man die dringend verdächtigen / zweifelhaften Fälle als negativ

wertet. Als Quotient der richtig euploiden Fälle ($n = 67$) und der Gesamtzahl aller tatsächlich negativen Fälle ($n = 67$, dringend verdächtige / zweifelhafte Fälle als negativ gewertet) beträgt die Spezifität 100 %.

Zählt man die dringend verdächtigen / zweifelhaften Fälle mit in die Kategorie der positiven Fälle, so sinkt die Sensitivität auf 59,7 % bei einer Spezifität von 100 %.

Die Übereinstimmung zwischen der Diagnose der automatischen DNA-zytometrischen Messung und der finalen Diagnose ist der folgenden 6-Felder-Tafel (Tabelle 28) zu entnehmen.

Tabelle 28: 6-Felder-Tafel zur Darstellung von finaler Diagnose und DNA-zytometrischer Diagnose der automatischen Messung

	Diagnose automatische Messung	
	euploid	aneuploid
finale Diagnose		
negativ	59	0
dV/zw	7	1
positiv	13	41

dV = dringender Verdacht, zw = zweifelhaft

Bei den 41 „richtig positiven“ Diagnosen gegenüber der Gesamtzahl aller tatsächlich positiven Fälle ($n = 54$) stellt sich somit eine Sensitivität von 75,9 % dar, wenn auch hier die dringend verdächtigen / zweifelhaften Fälle als negativ gewertet werden. Als Quotient der richtig euploiden Fälle ($n = 66$) und der Gesamtzahl aller tatsächlich negativen Fälle ($n = 67$, dringend verdächtige / zweifelhafte Fälle als negative gewertet) erreicht die Spezifität 98,5 %.

Zählt man in diesem Fall die dringend verdächtigen/ zweifelhaften Fälle mit zu den positiven Fällen, so beträgt die Sensitivität 67,7 % bei einer Spezifität von 100 %.

4 Diskussion

Ergüsse seröser Höhlen können eine Vielzahl von gutartigen oder bösartigen Erkrankungen zur Ursache haben. Es wird angenommen, dass 46 % aller Patienten mit Pleurakarzinose zum Zeitpunkt der Untersuchung keinen vorher bekannten Primärtumor haben (Bedrossian, 1994).

Tritt ein Erguss ohne vorher bekannten Primärtumor auf, wird die zytologische Untersuchung dementsprechend oft ohne zuvor erhobene, weitreichende klinische Befunde durchgeführt. Besonders in solchen Fällen ist es also umso wichtiger, Ergüsse diagnostisch richtig einzustufen, da die zytologische Diagnose oft die entscheidenden Weichen für das weitere therapeutische Vorgehen stellt. Es gilt somit Fehldiagnosen zu vermeiden. Wichtig ist es hierbei nicht nur, maligne Tumoren als solche zu erkennen und ggf. zu klassifizieren, sondern ein besonderes Augenmerk sollte auch auf der Vermeidung falsch-positiver Diagnosen mit all ihren Folgen liegen (Koss & Melamed, 2006).

Ziel des in dieser Studie erprobten Verfahrens sowie aller anderen adjuvanten Verfahren ist es somit, die Sensitivität zu erhöhen und gleichzeitig die Spezifität auf einem hohen Niveau zu halten bzw. nach Möglichkeit noch zu verbessern.

4.1 Relevanz und Treffsicherheit der Ergusszytologie

Die reine zytologische Diagnostik bot bisher bei Ergüssen meistens eine nur befriedigende Sensitivität bei hoher Spezifität. Eine bekannte Literaturübersicht aus dem Jahr 1989 geht im Mittel von einer Sensitivität von 58 % bei einer Spezifität von 97 % aus. Die Autoren berichten zudem, dass im Mittel 6 % aller Fälle der Ergusszytologie tumorzell-verdächtig bzw. zweifelhaft sind (Spriggs & Boddington, 1989). Dieser Wert liegt etwas unter den in der vorliegenden Studie ermittelten Zahlen, wo die Rate der tumorzell-verdächtigen / zweifelhaften Präparate bei 8,8 % lag.

Die Rate der tumorzell-verdächtigen Präparate verdeutlicht die Probleme der Diagnosefindung. Präparate werden aus verschiedenen Gründen als „zweifelhaft“ oder „dringend verdächtig“ diagnostiziert. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass eine ganze Population atypischer Zellen verdächtig erscheint, die Kriterien für Malignität jedoch nicht alle erfüllt werden. In diesem Fall besteht oft die Schwierigkeit, reaktive Mesothelien gegen neoplastisch veränderte Zellen abzugrenzen. Zum anderen besteht auch die Möglichkeit, dass zwar eine gewisse Anzahl von abnormalen Zellen gefunden wird, diese jedoch zu gering für eine definitive Tumordiagnose inmitten einer sonst gutartigen Population von mesothelialen Zellen ist (Motherby, Nadjari, et al., 1998).

Für die falsche Zuordnung von Präparaten bezogen auf die endgültige klinische Diagnose werden üblicherweise zwei mögliche Fehlerquellen, zum einen der sog. *sampling-error* und zum anderen der sog. *screening error*, angenommen.

Für den *sampling error* ist normalerweise der Kliniker verantwortlich, da hier der Fehler bereits bei Entnahme der Probe entsteht. Die Treffsicherheit der Ergusszytologie hängt nicht nur von der Erfahrung des Behandlers, sondern auch von der Fixierung, der Färbung und dem Volumen der entnommenen Probe sowie der Anzahl der untersuchten Proben ab (Motherby, Nadjari, et al., 1999). Häufig ist das Probenvolumen zu gering. Es wird empfohlen, möglichst ein Probenvolumen von 50 - 100 ml einzusenden (Böcking et al., 2000); Rooper empfiehlt bspw. ein Probenvolumen von mindestens 60 ml bei Perikardergüssen (Rooper et al., 2016). Auch der Pathologe selbst muss natürlich die Probe ordnungsgemäß aufbereiten und den Vorschriften entsprechend färben. Am Schwerpunkt Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf werden – wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben – pro Patient in der Routine 6 Objektträger hergestellt, von denen 3 nach May-Grünwald-Giemsa (MGG) und je 3 nach Papanicolaou (Pap) gefärbt werden. Je nach Institut werden teilweise deutlich weniger Präparate für eine zytologische Untersuchung angefertigt.

Der *screening error* bei der zytologischen Untersuchung selbst spielt ebenfalls eine Rolle. So können bspw. beim Mikroskopieren leicht Zellen übersehen

werden oder falsch zugeordnet werden. Dies kann aufgrund mangelnder Erfahrung des Untersuchers der Fall sein, aber im Einzelfall auch unumgänglich sein, da sich das morphologische Spektrum bspw. von Reizformen der Mesothelien und von Zellen eines gut bis mäßig differenzierten Karzinoms recht deutlich überschneidet. Da falsch-positive Diagnosen, wie die hohen Werte der Spezifität ausweisen, kaum vorkommen, geht man in der klinischen Zytologie wohl eher zurückhaltend als zu forsich an schwierige differentialdiagnostische Fragestellungen heran.

Bisher liegen keine gesicherten systematischen Untersuchungen über die Bedeutung der beiden einzelnen Fehlerarten vor. Man schätzt, dass auf den *sampling error* etwa zwei Drittel der nicht erkannten malignen Tumoren zurückgeht und auf den *screening error* etwa ein Drittel. Von Ergussart zu Ergussart muss darüber hinaus nicht unbedingt jeder der beiden Fehlerarten eine gleich hohe Bedeutung haben: Gerade bei den Perikardergüssen fällt auf, dass (vgl. Einleitung) die Sensitivität bei ihnen deutlich höher ist als bei Pleuraergüssen oder Aszites, was möglicherweise auf die geringere Sedimentation der Zellen, bedingt durch die Herzaktion, zurückgehen könnte.

Eine dritte Fehlerart wird in den Diskussionen bislang kaum berücksichtigt: Es könnte auch die klinische Diagnose der Karzinose falsch sein. Ein älterer Patient mit einem peripheren Bronchialkarzinom und gleichzeitiger Linksherzinsuffizienz sowie nachlaufendem Pleuraerguss bspw. muss nicht unbedingt eine Pleurakarzinose haben, sondern könnte durchaus auch an einem Stauungserguss leiden. Streng genommen könnte man auch hier nur von einem „dringenden Verdacht“ auf Karzinose sprechen - es wäre also zu überlegen, ob man nicht auch für die klinischen Diagnosen neben „tumor-positiv“ und „tumor-negativ“ noch Verdachtskategorien wie „zweifelhaft“ oder „dringender Verdacht“ entwickeln müsste. Dieses wird bislang nicht gemacht; in Studien zur Treffsicherheit wird immer von einer endgültigen klinischen Diagnose ausgegangen, die nicht mehr hinterfragt werden kann.

Andere Untersuchungen haben außerdem ergeben, dass die Reproduzierbarkeit einer zytologischen Diagnose auf diesem Gebiet ähnlichen

Schwankungen unterliegt wie eine vergleichbare histologische Diagnose. Fassina et al. haben gezeigt, dass die Sensitivität für dieselben Präparate bei mehreren Betrachtern zwischen 65,5 % und 90,3 % schwankte, während die Spezifität zwischen 64,3 % und 100 % lag (Fassina et al., 2008). Ähnlich sieht dieses aber auch im Tumorgading in der Histologie oder in der Zuordnung präkanzeröser Veränderungen als leichte, mittlere oder schwere Dysplasie aus. Die Morphologie unterliegt sowohl in der Histologie als auch in der Zytologie einer gewissen Schwankungsbreite von Einschätzungen und bleibt auf bestimmten Teilgebieten subjektiv.

4.2 Kritische Beurteilung der eigenen Ergebnisse

Die herkömmliche, manuelle DNA-Bildzytometrie wird schon länger als bewährtes adjuvantes Verfahren in der Ergusszytologie angewandt. Sie weist aber auch einige Nachteile dadurch auf, dass die Messungen zeitaufwändig und kostenintensiv sind. Zudem müssen sie durch einen erfahrenen Zytopathologen oder eine zytologisch ausgebildete MTA durchgeführt werden (Meng et al., 2013).

Ziel dieser Arbeit war es, eine neue Methode der DNA-Bildzytometrie in Form der automatisierten, computergesteuerten DNA-Bildzytometrie zu erproben und mit der herkömmlichen Methode zu vergleichen. Die zentralen Kriterien waren zum einen der Vergleich der unterschiedlich ermittelten Parameter und zum anderen, sich hieraus im Grunde ableitend, die generelle Treffsicherheit beider Verfahren. Die vorliegende Studie sollte unter Verwendung eines der bisher fertiggestellten Klassifikatoren untersuchen, inwieweit das automatisierte Verfahren die herkömmliche DNA-Bildzytometrie ergänzen bzw. ersetzen kann. Die automatisierte Messung stellt bis dato die höchste Stufe der technischen Weiterentwicklung der DNA-Bildzytometrie dar.

Bei der hier vorliegenden Untersuchung sollte nicht nur auf die Treffsicherheit bei manuellen und automatischen Verfahren eingegangen werden, sondern es sollten auch allgemeine Parameter untersucht werden. Als erster direkter Vergleich dieser Art zwischen dem manuellen Verfahren und der auto-

matisierten Messung sollten nicht nur die DNA-zytometrischen Diagnosen als solche, sondern auch die einzelnen Parameter, welche zu der jeweiligen Diagnose führen, auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede hin überprüft werden.

4.2.1 Kritische Beurteilung des Vergleichs einzelner Parameter

Problematisch beim Vergleich der deskriptiven Statistik zwischen dem automatischen und dem manuellen Verfahren der DNA-Bildzytometrie ist die unterschiedliche Art der Zuordnung der Analysezellen bei beiden Verfahren. Bei der manuellen Messung werden Zellen subjektiv durch den Untersucher ausgewählt und der Messung zugeführt, bei der automatisierten Messung werden alle vorhandenen Zellen erfasst und durch den Klassifikator automatisch einer Zellkategorie zugeteilt. Als Analysezellen werden somit nur Zellen erfasst, die der Klassifikator zuvor der Kategorie „*abnormals*“ zugeteilt hat. Somit weichen die Ergebnisse der deskriptiven Statistik stark ab und sind nur bedingt vergleichbar (s. Kapitel 3.1.1).

Betrachtet man z.B. den erhobenen Parameter der 9cEE, fällt auf, dass bei der automatischen Messung generell mehr Zellen > 9c gefunden wurden ($M_{\text{manuell}} = 2,00$; $M_{\text{automatisch}} = 3,60$) und dass auch der in den einzelnen Präparaten gefundene Maximalwert der 9cEE deutlich höher war als bei der manuellen Messung (36 / 137). Dies lässt sich jedoch dadurch erklären, dass bei der manuellen Messung nur die 300 durch den Untersucher manuell ausgewählten Zellen analysiert wurden, während es beim automatischen Verfahren möglich ist, das gesamte Präparat und somit alle Zellen innerhalb der markierten Areale zu messen. In der vorliegenden Studie waren auf den Objektträgern bereits besonders zellreiche Areale mit einem Filzstift vorgekreist, sodass die automatische Messung nicht auf dem gesamten Objektträger – sondern wie bei der manuellen Messung auch – nur in diesen Arealen stattfand. Gerade für die Einzelzellinterpretation scheint hier ein Vorteil für das automatische Verfahren zu bestehen, da alle Zellen gemessen werden und somit die Chance erhöht wird, Zellen über 9c zu finden. Andererseits zeigte sich jedoch, dass in 6 Fällen die gleiche Anzahl an 9cEE gefunden wurde und die Fälle, bei denen entweder

die manuelle oder die automatische Messung mehr 9cEE ergaben, in etwa ausgeglichen sind (17 / 16).

Ergänzend stellt sich die Frage, ob man nicht ggf. auch mit den Grenzwerten für den 9cEE (oder bei anderen Anwendungen für den 5cEE) experimentieren müsste. Möglicherweise müsste, wenn sich bei „zu vielen“ Messzellen auch in größerem Maße entsprechende EEs zeigen, der Schwellenwert für die Einzelzellaneuploidie erhöht werden. Alternativ wäre es möglich, zu einer prozentualen Angabe, die auch durchaus in Gebrauch ist, zurückzukehren, und statt des 9cEE („9c *Exceeding Events*“) den 9cER („9c *Exceeding Rate*“) zu verwenden.

Anders verhält es sich bei der Anzahl der ermittelten aneuploiden Stammlinien, also Stammlinien, die außerhalb von $> 1,8c < 2,2c$ oder $< 3,6c > 4,4c$ lagen. Hier zeigt sich, dass in 17 Fällen die manuelle Messung eine höhere Anzahl von aneuploiden Stammlinien ergab als andersherum (12 Fälle). Auch hier spielt wohl die gemessene Zellzahl eine Rolle.

Bei der Lage der Stammlinien zeigt die Korrelation nach Pearson für die erste Stammlinie einen signifikanten Zusammenhang ($r = 0,42$; $p < .05$). Im Gegensatz dazu zeigt sich für die übrigen Stammlinien kein signifikanter Unterschied zwischen manuell und automatisch untersuchten Präparaten. Ein statistischer Vergleich zwischen der Lage der Stammlinien scheint ohnehin schwierig, da die Anzahlen der Stammlinien zwischen manueller und automatischer Messung ebenfalls schwankten. Auch die genaue Lage der Stammlinien scheint in diesem Fall wohl durch die unterschiedliche Zahl der Analysezellen zustande zu kommen. Für die Interpretation eines DNA-zytometrischen Histogramms und der Einstufung in die Kategorien euploid / aneuploid spielt es aber ohnehin nur eine Rolle, ob die Stammlinie aneuploid ist, nicht jedoch ihre genaue Lage.

Ebenfalls festzuhalten in Bezug auf die automatische Messung ist, dass ein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen dem Variationskoeffizienten (CV) der abnormen Zellen und dessen Einfluss auf die Diagnose. Der t-Test

ergab, dass der CV der abnormen Zellen der Gruppe „aneuploid“ ($M = 32,24$) signifikant höher war als der CV der Gruppe „euploid“ ($M = 7,63$). Der CV für die abnormen Zellen wird nur bei der automatischen Messung ausgegeben, sodass dieser Zusammenhang ggf. in weiteren Untersuchungen mathematisch überprüft werden sollte. Aus biologischer Sicht ist ein solcher Zusammenhang ohnehin zu erwarten gewesen. Stellt man sich vor, dass die Entstehung von stärkerer numerischer DNA-Aneuploidie aus einer Zunahme der genetischen Instabilität der Tumorzellen mit eventueller Bildung mehrerer Subklone resultiert, dann ist die Zunahme des CV im Grunde die Abbildung der Zunahme einer genetischen Variation.

Bei der manuellen Messung gab es ebenfalls Besonderheiten. Jeweils ein Präparat wurde wie in der Routine üblich zunächst nach May-Grünwald-Giemsa (MGG) gefärbt und anschließend nach Feulgen umgefärbt (s. Kapitel 2.3.1). Für diese Studie wurde jedoch auch ein zweites Präparat angefärbt, welches direkt der Feulgen-Färbung zugeführt wurde. Bei beiden Präparaten wurde der Referenz-IOD als Maß für die Farbintensität bestimmt, wobei die Prüfung mit dem t-Test zeigte, dass die zuvor ungefärbten Präparate signifikant höhere Referenz-IODs aufwiesen als die in der Routine gefärbten Präparate ($M_{\text{ungefärbt}} = 341,83$; $SD = 28,05$, $M_{\text{vorgefärbt}} = 298,20$; $SD = 19,62$). In nur zwei der 20 Fälle war die Referenz-IOD nach vorheriger MGG-Färbung höher. Inhaltlich bleibt somit festzuhalten, dass diese Färbung die Intensität der Feulgen-Färbung üblicherweise negativ beeinflusst, was so nicht erwartet worden war. Damit ist eine vorherige MGG-Färbung nicht nur bei der Immunzytochemie, sondern auch bei der DNA-Bildzytometrie kritisch zu sehen. Andererseits ist es bisher kein realistisches Szenario, ein zuvor nicht morphologisch untersuchtes Präparat DNA-bildzytometrisch zu untersuchen; dieses allerdings könnte sich im Kontext der nunmehr möglichen automatischen Messung ändern. Vergleichsmöglichkeiten mit der Literatur gibt es zu diesem Teilaspekt nicht. Sinnvoll wäre, auch andere gängige Vorfärbungen (Papanicolaou-Färbung, HE-Färbung) in gleichem Maße zu überprüfen. Hierzu müsste dann ein Versuchsaufbau gewählt werden, der unseren Ansatz parallel an vier Präparaten pro Fall (MGG, Pap, HE, ungefärbt) wiederholt bzw. ausbaut.

4.2.2 Beurteilung der Treffsicherheiten und Darstellung diskrepanter Messergebnisse

In der vorliegenden Studie betrug die Sensitivität für die manuelle Messung 68,5 % bei einer Spezifität von 100 %. Für die automatisierte Messung ergab sich eine Sensitivität von 75,9 % bei einer Spezifität von 98,5 %. Generell lag die Übereinstimmung für beide Verfahren bei 95,9 %.

Bei fünf Präparaten kam es zu unterschiedlichen Diagnosen bei beiden Messverfahren. In all diesen Fällen wurde ein Präparat bei der manuellen DNA-Bildzytometrie als euploid eingestuft, während die automatische DNA-Bildzytometrie dieses als aneuploid identifizierte. In vier dieser Fälle konnte geklärt werden, dass das Präparat letztendlich klinisch positiv war.

Beim ersten dieser Präparate, welches zytologisch als positiv eingestuft worden war, stellte sich bei Analyse der manuellen Messung heraus, dass eine Stammlinie bei 1,86c mit Verdopplungsgipfel bei 3,68c, sowie eine weitere Stammlinie bei 3,69c bei 400 gemessenen Analysezellen vorlagen. Die automatisierte Messung ergab jedoch eine aneuploide Stammlinie bei 2,32c, also knapp außerhalb des Bereichs von $2c \pm 0,2c$ auf Basis von 354 als Abnormals klassifizierten Analysezellen. Die beiden Histogramme sind in der folgenden Abb. 11 dargestellt.

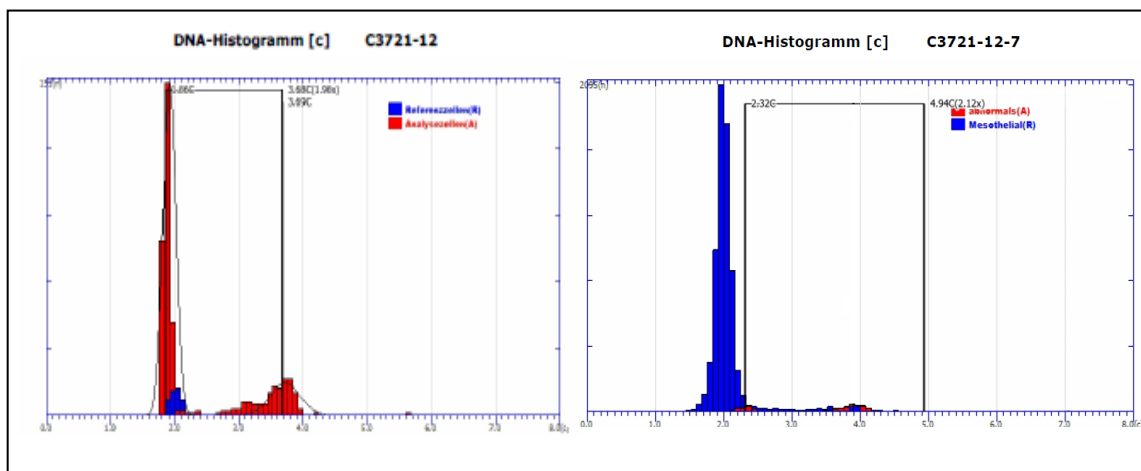


Abb. 11: Histogrammvergleich der manuellen Messung (links) und der automatischen Messung (rechts) des ersten diskrepanten Falls

Der Vorteil scheint bei der automatisierten Messung darin zu bestehen, durch die automatische Zuordnung über den Klassifikator mehr abnormale Zellen zu erkennen, und somit auch Stammlinien zu identifizieren, die knapp außerhalb des „normalen“ Bereichs liegen.

Ähnlich verhielt es sich beim zweiten diskrepanten Fall. Auch dieses Präparat war bei der zytologischen Diagnostik als positiv eingestuft worden. Auch hier wurde bei der manuellen Messreihe eine Stammlinie bei 1,90c detektiert (231 Analysezellen). Bei der automatischen Messung hingegen wurde eine Stammlinie bei 3,54c gefunden (51 Analysezellen). Die Histogramme der beiden Messungen sind in Abb. 12 dargestellt.

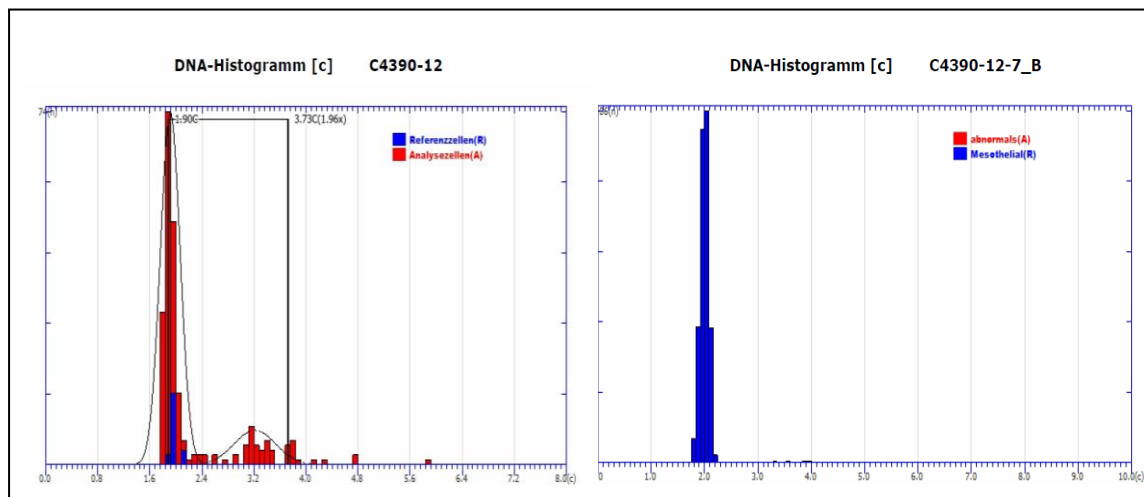


Abb. 12: Histogrammvergleich der manuellen Messung (links) und der automatischen Messung (rechts) des zweiten diskrepanten Falls

Das dritte der diskrepanten Präparate war zytologisch ebenfalls als positiv eingestuft worden. Für die manuelle Messung wurde jedoch keine Stammlinie angezeigt (38 Analysezellen), während die automatisierte Messung eine aneuploide Stammlinie bei 3,0c auf der Basis von 21 Analysezellen sowie 2 9cEE identifizierte. Die beiden Histogramme zu diesem Fall sind in Abb.13 dargestellt.

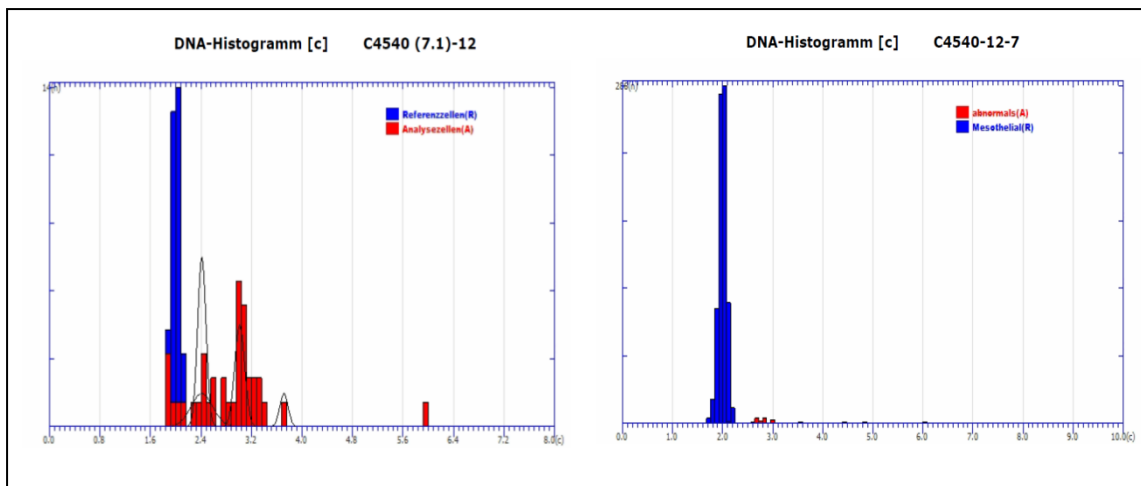


Abb. 13: Histogrammvergleich der manuellen Messung (links) und der automatischen Messung (rechts) des dritten diskrepanten Falls

Der vierte Fall war zytologisch als zweifelhaft / dringend verdächtig eingestuft worden. Die manuelle Messung ergab nach Messung von 289 Analysezellen eine euploide Stammlinie bei 1,91c, mit Verdopplung bei 3,75c sowie eine Stammlinie bei 3,75c mit Verdopplung bei 7,62 c. Es wurden zusätzlich noch sechs Zellen oberhalb von 7c („7cEE“) identifiziert, welche die Diagnose aber nicht beeinflussten, da der Schwellenwert von 9c nicht erreicht wurde (9cEE = 0). Die automatisierte Messung hingegen erkannte eine Stammlinie bei 2,93c sowie zwei 9cEE bei 745 als „abnormals“ klassifizierten Analysezellen.

Die Immunzytochemische Untersuchung ergab im Anschluss ebenfalls einen positiven Befund. Die beiden Histogramme finden sich in Abb. 14.

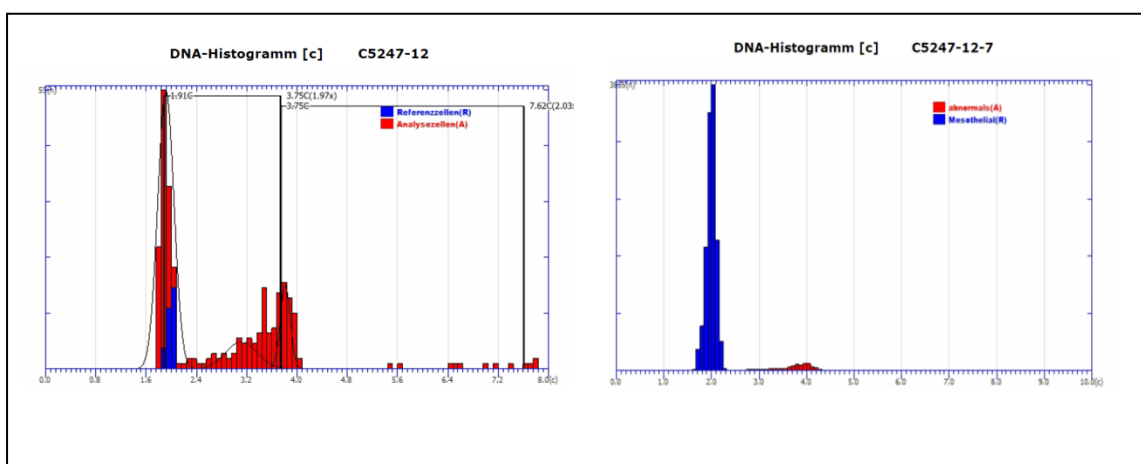


Abb. 14: Histogrammvergleich der manuellen Messung (links) und der automatischen Messung (rechts) des vierten diskrepanten Falls

Bei dem verbleibenden fünften diskrepanten Fall, bei dem die zytologische Diagnose dringend verdächtig / zweifelhaft gestellt worden war, wurde das Präparat bei der manuellen Messung auf Basis von 300 Analysezellen als „euploid“ mit einer Stammlinie bei 1,87 c mit Verdopplung bei 3,56c diagnostiziert. Bei der automatisierten Messung ergab die Auswertung jedoch die Einstufung des Präparats als „aneuploid“ mit einer Stammlinie bei 2,91c. Hier wurden 158 als „abnormals“ klassifizierte Analysezellen untersucht. Für diesen Fall konnte jedoch die endgültige Diagnose nicht eindeutig abgeklärt werden. Der Erguss war zytologisch als „dringend verdächtig“ klassifiziert worden. Bei der anschließend durchgeführten Immunzytochemie wurde negativ auf die epithelialen Marker Ber-EP4 und HEA 125 getestet, sodass die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchung gegen das Vorliegen epithelialer Tumorzellen im Pleuraerguss sprechen; Hinweise auf ein Mesotheliom, das eine aneuploide Stammlinie aufweisen kann und für epitheliale Marker negativ wäre, hatten sich morphologisch nicht ergeben. Ein zytologisch untersuchter Folgeerguss wurde als negativ diagnostiziert. Ein endgültiges Follow-up konnte bisher leider nicht ermittelt werden. Die beiden Histogramme für diesen Fall finden sich in Abb. 15.

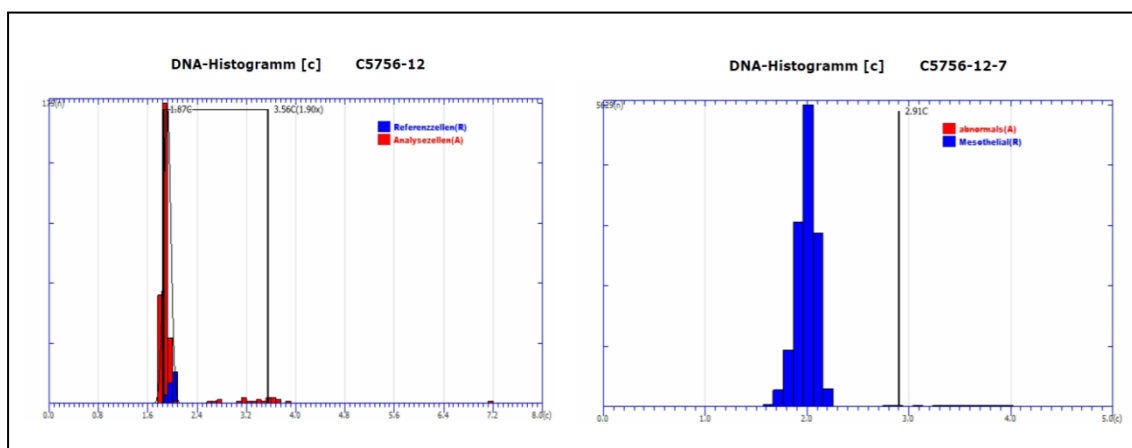


Abb. 15: Histogrammvergleich der manuellen Messung (links) und der automatischen Messung (rechts) beim fünften diskrepanten Fall

4.3 Kritischer Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der wissenschaftlichen Literatur

4.3.1 DNA-zytometrische Studien an Ergüssen seröser Höhlen

In der Literatur werden die Sensitivität und die Spezifität für die DNA-Bildzytometrie bei Ergüssen seröser Körperhöhlen unterschiedlich eingeschätzt. Dies liegt auch am unterschiedlichen Aufbau der dort aufgeführten Studien. So werden in einigen Forschungsarbeiten ausschließlich zytologisch als „zweifelhaft“ diagnostizierte Fälle untersucht, in anderen Studien werden auch zytologisch negative und positive Präparate für die DNA-zytometrische Messung verwendet. Im Folgenden sollen einige Studien und die dort ermittelten Treffsicherheiten genauer erläutert werden.

In einer Studie aus dem Jahr 1998, bei der 100 zytologisch zweifelhafte Präparate seröser Körperhöhlen untersucht wurden, lagen die Sensitivität bei 55,9 % und die Spezifität bei 94,1 %. Bei dieser Untersuchung wurde DNA-Aneuploidie angenommen, wenn entweder eine aneuploide Stammlinie oder 3 Zellen, die den Schwellenwert von 9c überschritten, vorlagen, oder der Variationskoeffizient der ersten Stammlinie ≥ 10 % lag (Motherby, Nadjari, et al., 1998). Damit ähneln die damals angesetzten Kriterien in großem Maße denen in der jetzigen Studie.

In einer Arbeit, einer Vergleichsstudie zwischen manueller DNA-Bildzytometrie und DNA-Flow Zytometrie, wurden 200 Ergüsse seröser Körperhöhlen untersucht. Von diesen Präparaten waren 80 Fälle zuvor zytologisch tumorzell-positiv, 74 Fälle tumorzell-negativ und 46 Fälle als dringend verdächtig bzw. zweifelhaft diagnostiziert worden. Für das Vorliegen von DNA-Aneuploidie wurden dieselben Kriterien wie bei o.g. Studie angewandt. Die Sensitivität der DNA-Bildzytometrie betrug bei dieser Untersuchung 75 %, die Spezifität 100 % (Motherby et al., 2002).

Bei einer weiteren Vergleichsstudie, diesmal zwischen DNA-Bildzytometrie und Immunzytochemie, wurde eine Stichprobe von 65 zytologisch zuvor als

zweifelhaft diagnostizierten Präparaten DNA-zytometrisch untersucht. Die Sensitivität für Aneuploidie als Zeichen für Malignität betrug in dieser Studie 82,9 %, die Spezifität 94,7 % (Motherby, Friedrichs, et al., 1999).

Eine ebenfalls sehr hohe Sensitivität erreichten Decker et al. in einer Studie an 80 Ergusspräparaten. Für diese Studie wird eine Sensitivität von 94,8 % bei einer Spezifität von 100 % angegeben (Decker et al., 1998). Als Parameter für das Vorliegen maligner Zellen wurde das Auftreten aneuploider Stammlinien gewertet.

Kayser et al. untersuchten im Jahr 2000 an 294 Pleuraergüssen die Treffsicherheit einer computergestützten Auswertung von DNA-zytometrischen Messfiles, die zum Dresdener „Euroquant-Server“ gesendet worden waren. Für das Vorliegen einer DNA-Aneuploidie wurden die Richtlinien der ESCAP angewandt. In dieser Studie konnte eine Sensitivität von 91 % bei einer Spezifität von 100 % erreicht werden. Von den 294 Ergusspräparaten konnten dort allerdings nur 120 Fälle gemessen werden, die übrigen wurden zum Beispiel auf Grund unzureichender Zellanzahlen oder unzureichender Färbung ausgeschlossen (Kayser et al., 2000).

Eine neuere Forschungsarbeit aus dem Jahr 2013 von Meng et al. untersuchte bereits die Treffsicherheit bei automatisierter DNA-Bildzytometrie. Im Unterschied zu vorherigen Studien (Motherby, Marcy, et al., 1998) wurde jedoch bereits ein Schwellenwert von > 4 Zellen $> 2,5c$ ($2,5cEE > 4$) als Nachweis von Malignität gewertet. Nach diesem Kriterium erreichte die Sensitivität bei der automatischen DNA-Bildzytometrie 83,3 % und die Spezifität 100 % bei 117 als messbar klassifizierten Präparaten (Meng et al., 2013).

In der vorliegenden Untersuchung erreichte die Sensitivität der manuellen DNA-Bildzytometrie 68,5 % und die Spezifität 100 %. Bei der automatischen Messung ergab sich eine Sensitivität von 75,9 % bei einer Spezifität von 98,5 %.

Die Ergebnisse der verschiedenen Studien sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

Tabelle 29: Studien zur diagnostischen Treffsicherheit der DNA-Zytometrie

Autor	Stichprobengröße	Sensitivität	Spezifität
Motherby, Nadjari et al., 1998	100	55,9 %	94,1 %
Motherby et al., 2002	200	75 %	100 %
Motherby, Friedrichs et al., 1999	65	82,9 %	94,7 %
Decker et al., 1998	80	94,8 %	100 %
Kayser et al., 2000	120	91 %	100 %
Meng et al., 2013	117	83,3 %	100 %
eigene Studie, manuelle Messung, 2016	121	68,5 %	100 %
eigene Studie, automatische Messung, 2016	121	75,9 %	98,5 %

Betrachtet man die Tabelle ohne die Ergebnisse der aktuellen Forschungsarbeit, so liegt die mittlere Sensitivität bei 80,5 % und die mittlere Spezifität bei 98,1 %. Unter Gewichtung der Fallzahlen liegen die entsprechenden Werte mit 76,3 % bzw. 98,5 % ähnlich hoch. Sowohl für die manuelle als auch für die automatisierte Messung liegt die Treffsicherheit unserer Studie also leicht unter dem Durchschnitt der zuvor aufgeführten Studien. Die Fallzahlen und auch die Methodik der einzelnen Studien variieren teilweise aber nicht unerheblich. In einigen Fällen erfolgte die Auswertung der verschiedenen Forschungsarbeiten auch nach anderen Parametern als in der hier vorliegenden Arbeit.

Hervorzuheben ist bei allen Arbeiten vor allem die hohe Spezifität. Sie bedeutet, dass (ähnlich wie bei der konventionellen Zytologie auch) ein Vermeiden falsch positiver Diagnosen auch bei der Verwendung der DNA-Bildzytometrie fast immer gelingt. Dies ist eine indirekte Bestätigung der biologischen Hypothese, dass numerische Aneuploide bei normalen, reaktiven oder regenerativen Verhältnissen nicht auftritt, sondern Neoplasien vorbehalten ist.

4.3.2 Treffsicherheiten anderer adjuvanter Methoden

Die Treffsicherheiten, die in dieser Studie für die beiden DNA-zytometrischen Messverfahren ermittelt wurden, sollen auch mit den Treffsicherheiten der bereits in Kapitel 1.4 aufgeführten adjuvanten Methoden verglichen werden. In

vielen Fällen werden, je nach konkreter klinischer Fragestellung, verschiedene adjuvante Verfahren kombiniert, um die Treffsicherheiten bzw. die Tumortypisierung zu verbessern.

Für die Immunzytochemie als adjuvante Methode bei zytologisch zweifelhaften Ergüssen stehen insbesondere Marker aus der EpCam-Gruppe, insbesondere Ber-EP4, zur Verfügung. Diese Marker stellen in der Theorie überwiegend epithelial differenzierte Zellen dar und sind in Mesothelien überwiegend negativ. Diese Tatsache hat zu ihrem Einsatz in Ergüssen geführt; die differentiellen Zytokeratine (z.B. CK5, CK7 oder CK20) bzw. Pan- oder Breitbandzytokeratine, die an anderen Organen zur Darstellung epithelialer Zellen angewandt werden, sind an Präparaten aus den serösen Höhlen nicht anwendbar, weil sie auch von Mesothelzellen exprimiert werden. Ggf. lassen sich Ber-EP4-Anwendungen auch mit Markern wie Calretinin (positiv in Mesothelien) und CD68 (positiv in Makrophagen) kombinieren.

In einer Untersuchung wurde bei 100 Ergüssen mit Ber-EP4 als verwendetem Marker eine Sensitivität 98 % bei einer Spezifität von 86 % erreicht (Arora et al., 2011). Eine andere Studie berichtet für denselben Marker bei 65 zytologisch als zweifelhaft klassifizierten Präparaten über eine Sensitivität von 77,8 % bei einer Spezifität von 100 % (Motherby, Friedrichs, et al., 1999). Ferner wurde dort untersucht, wie der Zuwachs von Sensitivität und Spezifität bei einer Kombination beider Verfahren ist. Für den Marker Ber-EP4 und die DNA-Zytometrie zusammen konnte eine Sensitivität von 88,9 % bei einer Spezifität von 95 % erreicht werden (82,9 % / 94,7 % für DNA-Zytometrie alleine). Ber-EP4 war also geeignet, die Sensitivität noch etwas zu erhöhen, ohne die Spezifität negativ zu beeinflussen.

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) als Methode zeigen Studien eine Erhöhung der Sensitivität auf 53,9 % im Vergleich zur konventionellen Zytologie (44,4 %) bei 358 untersuchten Ergusspräparaten. Bei Kombination von Zytologie und FISH mit *alpha-satellite* Sonden lag die Sensitivität bei 60,9 % (Fiegl, Massoner, et al., 2004) bei nicht angegebener Spezifität. Eine andere Studie desselben Autors gibt bei 157 untersuchten Präparaten den

Zuwachs der Sensitivität von 46,2 % (Zytologie alleine) auf 53,3 % (FISH alleine) und 61,6 % (Kombination von FISH und Zytologie) bei korrespondierenden Sensitivitäten von 94,4 %, 97 % und 90,9 % an (Fiegl, Haun, et al., 2004). In der Routineanwendung wird FISH allein aus Kostengründen heute an Ergüssen nicht mehr eingesetzt. Domänen in der Zytologie sind Abklärungen von Rezidiven urothelialer Karzinome in Urinflüssigkeit oder Harntraktspülungen mit dem gewerblich erhältlichen UroVysion-Test, dessen Anwendung auch an Gallenwegszytologien oder Pankreaspunktaten hilfreich ist (Halling & Kipp, 2008).

Für die AgNOR-Analyse als adjuvantes Verfahren zeigt eine Studie von Rocher et al. bei 330 Fällen, dass mit dieser Technik die Sensitivität auf 95 % bei einer Spezifität von 100 % erhöht werden konnte (Rocher et al., 2011).

Die Treffsicherheiten der anderen adjuvanten Verfahren sind in Tabelle 31 zusammengefasst.

Tabelle 30: Studien zur diagnostischen Treffsicherheit der anderen adjuvanten Verfahren

Autor	adjuvantes Verfahren	Fallzahl	Sensitivität	Spezifität
Arora et al., 2001	Ber-EP4	100	98 %	86 %
Motherby, Friedrichs et al., 1999	Ber-EP4	65	77,8 %	100 %
Motherby, Friedrichs et al., 1999	Ber-EP4 & DNA-Zytometrie	65	88,9 %	95 %
Fiegl, Massoner et al, 2004	FISH	358	53,9 %	/
Fiegl, Massoner et al, 2004	FISH plus Zytologie	358	60,9 %	/
Fiegl, Haun et al, 2004	FISH	157	53,3 %	97 %
Fiegl, Haun et al, 2004	FISH plus Zytologie	157	61,1 %	90,9 %
Rocher	AgNOR plus Zytologie	330	95 %	100 %

Vergleicht man die Treffsicherheiten dieser adjuvanten Verfahren, so lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Studie gut in den Literaturüberblick einordnen.

5 Schlussfolgerungen

Betrachtet man als bewährte adjuvante Methode die manuelle DNA-Zytometrie und als technische Weiterentwicklung die im Fokus dieser Forschungsarbeit stehende automatisierte Messung, lässt sich zusammenfassend sagen, dass die automatische DNA-Bildzytometrie im Vergleich zur manuellen DNA-Bildzytometrie eine verbesserte Treffsicherheit aufweist. Die Sensitivität liegt für die automatische Messung bei 75,9 % bei einer Spezifität von 98,5 % vs. einer Sensitivität von 68,5 % bei einer Spezifität von 100 % bei der manuellen Messung.

Generell lassen sich unabhängig von der verbesserten Treffsicherheit mehrere positive Aspekte bei der automatisierten Messung erkennen:

Der erste Vorteil besteht in der automatischen Erkennung von Zellen und deren vollautomatischer Einstufung in abnormale Zellen bzw. Mesothelzellen. Durch die große Datenbasis, auf der der Klassifikator beruht, lassen sich so in kurzer Zeit alle Zellen klassifizieren. Im Anschluss an jede erfolgte Messung erfolgt zudem als Sicherheitsnetz immer die manuelle Kontrolle durch den Untersucher.

Der zweite Vorteil liegt darin, dass Artefakte, defokussierte Zellen sowie *exceeding events* über 9c automatisch in der Galerie als solche hinterlegt werden und der Untersucher somit trotz automatischer Messung die Möglichkeit hat, manuell alle Zellen im Anschluss zu überprüfen und ggf. umzuklassifizieren. Die allerletzte Entscheidung für die gesamte Messung liegt somit immer beim Untersucher selbst.

Drittens ist die automatische Methode deutlich effizienter, da die manuelle Überprüfung automatisch gemessener Zellkerne deutlich weniger Zeit in Anspruch nimmt als die vollständige manuelle Messung und zudem weniger Personal benötigt. Die manuelle Messung mit anschließender Überprüfung der gemessenen Zellkerne in der Galerie dauert ca. 40 - 60 min. Bei der automatisierten Messung liegt die Messzeit zwar ebenfalls bei 40 - 90 min, wird

allerdings vollautomatisch durchgeführt. Im Anschluss benötigt der Untersucher zur abschließenden Überprüfung der gemessenen Zellen und der möglicherweise nötigen Umklassifizierung lediglich 5 - 10 min.

Insgesamt stellt die automatische DNA-Bildzytometrie somit eine gute Ergänzung oder einen guten möglichen Ersatz zur herkömmlichen manuellen DNA-Bildzytometrie dar, zumindest bezogen auf den hier angewandten Klassifikator für luftgetrocknete Ausstrichpräparate der serösen Höhlen. Eine Durchführung ähnlicher Untersuchungen zur Testung der Qualität der übrigen Klassifikatoren für Präparationen an Drüsenepithel der Prostata, Urothel und Plattenepithel (Mundhöhle, Gebärmutterhals) ist ebenfalls notwendig, da die Güte der Messungen und auch die Möglichkeiten und Notwendigkeiten der Überprüfung der gemessenen Objekte nicht nur von der Morphologie und Anfärbbarkeit der zu untersuchenden Zellen abhängen, sondern insbesondere auch von der Klassifizierung der Objekte.

6 Literaturverzeichnis

- Abdallah, R., & Atar, S. (2014). Etiology and characteristics of large symptomatic pericardial effusion in a community hospital in the contemporary era. *QJM*, 107(5), 363-368.
- Antony, V. B., Loddenkemper, R., Astoul, P., Boutin, C., Goldstraw, P., Hott, J., et al. (2001). Management of malignant pleural effusions. *Eur Respir J* 18(2), 402-419.
- Arora, R., Agarwal, S., Mathur, S. R., Verma, K., Iyer, V. K., & Aron, M. (2011). Utility of a limited panel of calretinin and Ber-EP4 immunocytochemistry on cytopsin preparation of serous effusions: A cost-effective measure in resource-limited settings. *Cytojournal*, 8, 14.
- Auffermann, W., Repges, R., & Böcking, A. (1984). Rapid Diagnostic DNA Cytometry with an Automatic Microscop and a TV Image-Analysis System. *Anal Quant Cytol Histol*, 6(3), 179-188.
- Bedrossian, C. W. (1994). *Malignant effusions: A multimodal approach to cytologic diagnosis* New York, Tokio: Igaku-Shoin.
- Bibbo, M., & Wilbur, D. C. (2008). *Comprehensive Cytopathology* (Vol. 3). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Biesterfeld, S. (2015). Zurverfügungstellung urheberrechtlich geschützter Abbildungen aus dem Bestand des Schwerpunktes Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf.
- Biesterfeld, S., Beckers, S., Del Carmen Villa Cadenas, M., & Schramm, M. (2011). Feulgen staining remains the gold standard for precise DNA image cytometry. *Anticancer Res*, 31(1), 53-58.
- Biesterfeld, S., Gerres, K., Fischer-Wein, G., & Böcking, A. (1994). Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J Clin Pathol*, 47(1), 38-42.
- Böcking, A. (1990). DNA-Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik. *Beitr. Onkol.*, 38, 298-347.
- Böcking, A. (1995). DNA-Measurements. When and Why? In K. C. Wied L, Rosenthal DL, Schenck U, Somrak TM, Vooijs GP (Ed.), *Compendium on quality assurance, proficiency testing and workload limitations in clinical cytology. Tutorials of Cytology*. (pp. 170-188). Chicago, Illinois, USA.
- Böcking, A. (1998). Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Pathologie*, 19(3), 235-236.
- Böcking, A., Giroud, F., & Reith, A. (1995). Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol*, 8(1), 67-74.

- Böcking, A., Motherby, H., & Pomjanski, N. (2000). Treffsicherheit der Ergusszytologie samt adjuvanten Untersuchungsmethoden. *Dtsch Arztebl*, 97(40), 2626-2630.
- Böhm, N. (1968). Einfluß der Fixierung und der Säurekonzentration auf die Feulgen-Hydrolyse bei 28 C. *Histochem Cell Biol*, 14(2), 201-211.
- Bubendorf, L., Grote, H. J., & Syrjänen, K. (2008). Molecular Techniques. In M. Bibbo & D. C. Wilbur (Eds.), *Comprehensive Cytopathology* (Vol. 3, pp. 1071-1088). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Ceelen, G. H. (1964). The cytologic diagnosis of ascitic fluid. *Acta Cytol*, 8(3), 175-185.
- Chatelain, R., Willms, A., Biesterfeld, S., Auffermann, W., & Böcking, A. (1989). Automated Feulgen staining with a temperature-controlled staining machine. *Anal Quant Cytol Histol*, 11(3), 211.
- Chieco, P., Jonker, A., Melchiorri, C., Vanni, G., & Van Noorden, C. J. (1994). A user's guide for avoiding errors in absorbance image cytometry: a review with original experimental observations. *Histochem J*, 26(1), 1-19.
- Corey, G. R., Campbell, P. T., Van Trigt, P., Kenney, R. T., O'Connor, C. M., Sheikh, K. H., et al. (1993). Etiology of large pericardial effusions. *Am J Med*, 95(2), 209-213.
- Crocker, J., & Nar, P. (1987). Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol*, 151(2), 111-118.
- Dannenberg, K. (2014). *Diagnostische Treffsicherheit der Perikardergusszytologie* (Med. Diss.), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Decker, D., Stratmann, H., Springer, W., Schwering, H., Varnai, N., & Bollmann, R. (1998). Benign and malignant cells in effusions: diagnostic value of image DNA cytometry in comparison to cytological analysis. *Pathol Res Pract*, 194(11), 791-795.
- Fassina, A., Fedeli, U., Corradin, M., Da Frè, M., & Fabbris, L. (2008). Accuracy and reproducibility of pleural effusion cytology. *Leg Med*, 10(1), 20-25.
- Feichter, G., & Dalquen, P. (2000). *Zytopathologie*, 1. Auflage (pp. 17-22). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Feulgen, R., & Rossenbeck, H. (1924). Mikroskopisch chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 135, 203-248.
- Fiegl, M., Haun, M., Massoner, A., Krugmann, J., Müller-Holzner, E., Hack, R., et al. (2004). Combination of Cytology, Fluorescence in Situ Hybridisation for Aneuploidy, and Reverse-Transcriptase Polymerase

- Chain Reaction für Human Mammaglobin/Mammaglobin B Expression Improves Diagnosis of Malignant Effusions. *J Clin Oncol*, 22(3), 474-483.
- Fiegl, M., Massoner, A., Haun, M., Sturm, W., Kaufmann, H., Hack, R., et al. (2004). Sensitive detection of tumour cells in effusions by combining cytology and fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Br J Cancer*, 91(3), 558-563.
- Fink, C. (2015). *Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik an Pleuraeffusionen unter Berücksichtigung adjuvanter Methoden*. (Med. Diss.), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Fremed, M. A., Levin, T. L., Sun, K. Y., & Weiser, D. A. (2015). Ovary preservation in the treatment of childhood Meigs syndrome. *Pediatr Blood Canc*, 62(11), 2011-2014.
- Freudenberg, N., Kortsik, C., & Ross, A. (2002). *Grundlagen der Zytopathologie. Kurzlehrbuch und Atlas der allgemeinen und speziellen Zytodiagnostik*. Basel, Freiburg: Karger.
- Friedrich, D. (2016). *Effective improvement of cancer diagnostics and prognostics by computer-assisted cell image analysis* (Diss.), RWTH Aachen.
- Friedrich, D., Jin, C., Zhang, Y., Demin, C., Yuan, L., Berynskyy, L., et al. (2012). Identification of prostate cancer cell nuclei for DNA-grading of malignancy *Bildverarbeitung für die Medizin 2012* (pp. 334-339): Springer.
- Gill, M., Singh, U., Mahapatra, Q. S., Gehlot, S., Gupta, V., & Sen, R. (2011). Role of argyrophilic nucleolar organizer region staining in identification of malignant cells in effusion. *J Cytol*, 28(4), 191-195.
- Goldstein, D. J. (1975). Aspects of scanning microdensitometry. III. The monochromator system. *J Microsc*, 105(1), 33-56.
- Grouven, U., Bender, R., Ziegler, A., & Lange, S. (2007). Der Kappa-Koeffizient. *Dtsch Med Wochenschr*, 132(1), 65-68.
- Halling, K. C., & Kipp, B. R. (2008). Bladder cancer detection using FISH (UroVysion assay). *Adv Anat Pathol*, 15(5), 279-286.
- Haroske, G., Baak, J. P., Danielsen, H., Giroud, F., Gschwendtner, A., Oberholzer, M., et al. (2001). Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol*, 23(2), 89-95.
- Haroske, G., Giroud, F., Reith, A., & Böcking, A. (1998). 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry, Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. *Anal Cell Pathol*, 17, 189-200.

- Hausheer, F. H., & Yarbro, J. W. (1987). Diagnosis and treatment of malignant pleural effusion. *Cancer Metastasis Rev*, 6(1), 23-40.
- Hentrich, M., & Hartenstein, R. (1997). Behandlung maligner Körperhöhlenergüsse. *Onkologe*, 3, 163-173.
- Hilgers, R. D., Bauer, P., & Schreiber, V. (2007). *Einführung in die medizinische Statistik* (Vol. 2. Auflage). Berlin Springer.
- Hird, V., Thomas, H., Stewart, J. S., & Epenetos, A. A. (1989). Malignant ascites: review of the literature, and an update on monoclonal antibody-targeted therapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 32(1), 37-45.
- Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29(4), 577-580.
- Jonker, A., Geerts, W. J., Chieco, P., Moorman, A. F., Lamers, W. H., & Van Noorden, C. J. (1997). Basic strategies for valid cytometry using image analysis. *Histochem J*, 29(5), 347-364.
- Kasten, F. (1971). Cytophotometric investigations of the influence of fixation on Feulgen hydrolysis: evidence for random loss of purines and pyrimidines from DNA during acid hydrolysis. *Acta Histochemica Supply*, 9, 637-647.
- Kayser, K., Blum, S., Beyer, M., Haroske, G., Kunze, K. D., & Meyer, W. (2000). Routine DNA cytometry of benign and malignant pleural effusions by means of the remote quantitation server Euroquant: a prospective study. *J Clin Pathol*, 53(10), 760-764.
- Kindermann, D., & Hilgers, C. H. (1994). Glare-correction in DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol*, 6(2), 165-180.
- Koss, L. G., & Melamed, M. R. (2006). *Diagnostic Cytology and its histopathologic bases (5th edition)* (Vol. 1). Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins.
- Kovacs, G. (1999). Molecular genetics and diagnosis of renal cell tumors. *Urologe A*, 38(5), 433-441.
- Krug, H. (1980). *Histo- und Zytophotometrie, Einführung in die Absorptionsmethoden* (Vol. 1). Jena: VEB Gustav Fischer Verlag.
- Levy, P. Y., Corey, R., Berger, P., Habib, G., Bonnet, J. L., Levy, S., et al. (2003). Etiologic diagnosis of 204 pericardial effusions. *Medicine (Baltimore)*, 82(6), 385-391.
- Light, R. (2002). Pleural effusion. *N Engl J Med*, 346(25), 1971-1977.

- Malamou-Mitsi, V., Zioga, A., & Agnantis, N. (1996). Diagnostic accuracy of pericardial fluid cytology: an analysis of 53 specimens from 44 consecutive patients. *Diagn Cytopathol*, 15(3), 197-204.
- McHutchinson, J. G. (1997). Differential Diagnosis of Ascites. *Semin Liver Dis*, 17(3), 191-202.
- Meijer, G., Belien, J., van Diest, P., & Baak, J. (1997). Origins of image analysis in clinical pathology. *J Clin Pathol*, 50, 365-370.
- Meng, Z., Shi, J., Zhu, C., Gu, J., & Zhou, C. (2013). Automated quantification of DNA aneuploidy by image cytometry as an adjunct for the cytologic diagnosis of malignant effusion. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 36(3-4), 107-115.
- Meyers, D. G., & Bouska, D. J. (1989). Diagnostic usefulness of pericardial fluid cytology. *Chest*, 95(5), 1142-1143.
- Mohanty, S. K., & Dey, P. (2003). Serous effusions: diagnosis of malignancy beyond cytomorphology. An analytic review. *Postgrad Med J*, 79(936), 569-574.
- Motherby, H., Friedrichs, N., Kube, M., Nadjari, B., Knops, K., Donner, A., et al. (1999). Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in diagnostic effusion cytology. II. Diagnostic accuracy in equivocal smears. *Anal Cell Pathol*, 19, 59-66.
- Motherby, H., Kube, M., Friedrichs, N., Nadjari, B., Knops, K., Donner, A., et al. (1999). Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in diagnostic effusion cytology I. Prevalence of markers in tumour cell positive and negative smears. *Anal Cell Pathol*, 19(1), 7-20.
- Motherby, H., Marcy, T., Hecker, M., Ross, B., Nadjari, B., Auer, H., et al. (1998). Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology: I. DNA aneuploidy for identification and differentiation of primary and secondary tumors of the serous membranes. *Anal Quant Cytol Histol*, 20(3), 153-161.
- Motherby, H., Nadjari, B., Friegel, P., Kohaus, J., Ramp, U., & Bocking, A. (1999). Diagnostic accuracy of effusion cytology. *Diagn Cytopathol*, 20(6), 350-357.
- Motherby, H., Nadjari, B., Remmerbach, T., Marcy, T., Pomjanskaja, N., Muller, W., et al. (1998). Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology: II. DNA aneuploidy for identification of neoplastic cells in equivocal effusions. *Anal Quant Cytol Histol*, 20(3), 162-168.
- Motherby, H., Pomjanski, N., Kube, M., Boros, A., Heiden, T., Tribukait, B., et al. (2002). Diagnostic DNA-flow-vs.-image-cytometry in effusion cytology. *Anal Cell Pathol*, 24(1), 5-16.

- Müller, H., Böcking, A., & Auer, H. (1994). TV Cytometer CM1 for computer aided tumor diagnosis. *Compendium on the Computerized Cytology and Histology Laboratory*, 376-398.
- Nance, K., Shermer, R., & Askin, F. (1991). Diagnostic efficacy of pleural biopsy as compared with that of pleural fluid examination. *Mod Pathol*, 4(3), 320-324.
- Nowrousian, M., Firusian, N., & Schmidt, C. (1988). Diagnostik und Therapie maligner Perikardergüsse *Maligne Ergüsse* (pp. 114-133): Karger Publishers.
- Pavlidis, N., & Fizazi, K. (2009). Carcinoma of unknown primary (CUP). *Crit Rev Oncol Hematol*, 69(3), 271-278.
- Pomjanski, N., Grote, H. J., Doganay, P., Schmiemann, V., Buckstegge, B., & Böcking, A. (2005). Immunocytochemical identification of carcinomas of unknown primary in serous effusions. *Diagn Cytopathol*, 33(5), 309-315.
- Porcel, J. M., & Light, R. W. (2013). Pleural effusions. *Dis Mon*, 59(2), 29-57.
- Posner, M. R., Cohen, G. I., & Skarin, A. T. (1981). Pericardial disease in patients with cancer. The differentiation of malignant from idiopathic and radiation-induced pericarditis. *Am J Med*, 71(3), 407-413.
- Robert-Koch-Institut. (2015) Krebs in Deutschland 2011/2012. Vol. 10. Berlin.
- Rocher, A. E., Guerra, F., Rofrano, J., Angeleri, A., Canessa, O. E., Mendeluk, G. R., et al. (2011). Sensitivity and specificity of cytodiagnosis of body fluids in a laboratory of urgencies. *Biotech Histochem*, 86(5), 326-332.
- Rodriguez-Panadero, F., Borderas Naranjo, F., & Lopez Mejias, J. (1989). Pleural metastatic tumours and effusions. Frequency and pathogenic mechanisms in a post-mortem series. *Eur Respir J*, 2(4), 366-369.
- Rooper, L. M., Ali, S. Z., & Olson, M. T. (2016). A Minimum Volume of More Than 60 mL Is Necessary for Adequate Cytologic Diagnosis of Malignant Pericardial Effusions. *Am J Clin Pathol*, 145(1), 101-106.
- Runyon, B. A. (1994). Care of Patients with Ascites. *N Engl J Med*, 330(5), 337-342.
- Sagrasta-Sauleda, J., Merce, J., Permanyer-Miralda, G., & Soler-Soler, J. (2000). Clinical clues to the causes of large pericardial effusions. *Am J Med*, 109(2), 95-101.
- Salerno, F., Restelli, B., Incerti, P., Annoni, G., Capozza, L., Badalamenti, S., et al. (1990). Utility of ascitic fluid analysis in patients with malignancy-related ascites. *Scand J Gastroenterol*, 25(3), 251-256.

- Sangisetty, S. L., & Miner, T. J. (2012). Malignant ascites: A review of prognostic factors, pathophysiology and therapeutic measures. *World J Gastrointest Surg*, 4(4), 87-95.
- Savic, S., Franco, N., Grilli, B., Barascud Ade, V., Herzog, M., Bode, B., et al. (2010). Fluorescence in situ hybridization in the definitive diagnosis of malignant mesothelioma in effusion cytology. *Chest*, 138(1), 137-144.
- Sheibani, K., Shin, S. S., Kezirian, J., & Weiss, L. M. (1991). Ber-EP4 antibody as a discriminant in the differential diagnosis of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, 15(8), 779-784.
- Spriggs, A., & Boddington, M. (1989). *Atlas of the serous fluid Cytopathology: A Guide to the Cells of Pleural, Pericardial, Peritoneal and Hydrocele Fluids*. (G. GA Ed. Vol. 14). Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers.
- Ströhlein, P. D. M., Lordick, F., & Stoelben, E. (2011). Behandlung des malignen Aszites und des malignen Pleuraergusses. *best practice onkologie*, 6(3), 16-23.
- Sujathan, K., Kannan, S., Pillai, K. R., Chandralekha, B., Amma, N. S., & Nair, M. K. (1996). Significance of AgNOR count in differentiating malignant cells from reactive mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol*, 40(4), 724-728.
- Tolles, W. E., Horvath, W. J., & Bostrom, R. C. (1961). A study of the quantitative characteristics of exfoliated cells from the female genital tract. I. Measurement methods and results. *Cancer*, 14(3), 437-454.
- Underwood, J. C. E., & Giri, D. D. (1988). Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathol*, 155(2), 95-96.
- Van Haam, E. (1977). *Cytology of Transsudates and Exsudates* (Vol. 5). Basel: S. Karger Verlag.
- Vlajnic, T., Savic, S., & Bubendorf, L. (2014). Pleuramesotheliom. *Pathologe*, 35(6), 591-596.
- Wong, C. L., Holroyd-Leduc, J., & Straus, S. E. (2009). Does this patient have a pleural effusion? *JAMA*, 301(3), 309-317.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die MGG-Färbung (links) und die Feulgen-Färbung (rechts) im Vergleich; Objektivvergrößerung 40x (Biesterfeld, 2015).....	26
Abb. 2: DNA-Histogramm eines Präparates.....	28
Abb. 3: Häufigkeiten der 9cEE bei der manuellen Messung	37
Abb. 4: Häufigkeiten der 9cEE der automatischen Messung	37
Abb. 5: Bland-Altman-Plot zur Darstellung der 9cEE	39
Abb. 6: Häufigkeitsverteilung der Zahl aneuploider Stammlinien der manuellen Messung	42
Abb. 7: Häufigkeitsverteilung der Anzahl aneuploider Stammlinien der automatischen Messung	43
Abb. 8: Bland-Altman-Plot zur Darstellung der Übereinstimmung der beiden Messmethoden bei der Anzahl aneuploider Stammlinien	44
Abb. 9: CV abnormals (automatische Messung) für die DNA-zytometrischen Diagnosen aneuploid/euploid	47
Abb. 10: Bland-Altman-Plot zur Darstellung der Übereinstimmung des 2c-Referenz-IOD bei den vorgefärbten (7.x) und den direkt gefärbten (8.x) Präparaten.	48
Abb. 11: Histogrammvergleich der manuellen Messung (links) und der automatischen Messung (rechts) des ersten diskrepanten Falls	62
Abb. 12: Histogrammvergleich der manuellen Messung (links) und der automatischen Messung (rechts) des zweiten diskrepanten Falls	63
Abb. 13: Histogrammvergleich der manuellen Messung (links) und der automatischen Messung (rechts) des dritten diskrepanten Falls	64
Abb. 14: Histogrammvergleich der manuellen Messung (links) und der automatischen Messung (rechts) des vierten diskrepanten Falls.....	64
Abb. 15: Histogrammvergleich der manuellen Messung (links) und der automatischen Messung (rechts) beim fünften diskrepanten Fall	65

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ablauf der MGG-Färbung am Schwerpunkt Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf (Biesterfeld, 2015)	19
Tabelle 2: Ablauf der Färbung nach Papanicolaou am Schwerpunkt für Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf (Biesterfeld, 2015)	20
Tabelle 3: Einteilung der zytologischen Diagnosen nach ihrer Malignitätswahrscheinlichkeit (nach Böcking, 1998)	22
Tabelle 4: Ablauf der immunzytochemischen Färbung nach der ABC-Methode am Schwerpunkt Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf (Biesterfeld, 2015)	23
Tabelle 5: Reihenfolge und zeitlicher Ablauf der Feulgen-Färbung mit dem Varistain 24-3 (Biesterfeld, 2015)	25
Tabelle 6: Aufteilung der Häufigkeiten in einer 4-Felder-Tafel	34
Tabelle 7: Statistische Kennwerte für die Anzahl der gemessenen Referenzzellen	35
Tabelle 8: Statistische Kennwerte für die gemessenen Analysezellen	36
Tabelle 9: Statistische Kennwerte der 9cEE der manuellen und der automatischen Messung, n = 121	36
Tabelle 10: Korrelationsmatrix für die Einordnung von 9cEE im Vergleich manuell / automatisch	38
Tabelle 11: Einteilung der Fälle mit <i>Exceeding Events</i> nach ihrer Häufigkeit bei der automatischen und der manuellen Messung, n = 39	40
Tabelle 12: Einteilung der 121 Präparate nach 9c Exceeding Events (9cEE) und der DNA-zytometrischen Diagnose (manuelle Messung)	40
Tabelle 13: Einteilung der 121 Präparate nach 9c Exceeding Events (9cEE) und der DNA-zytometrischen Diagnose (automatische Messung)	41
Tabelle 14: Statistische Kennwerte der aneuploiden Stammlinien, n=121 ..	42

Tabelle 15: Korrelationsmatrix für die Einordnung der Zahl aneuploider Stammlinien im Vergleich automatisch/manuell	43
Tabelle 16: Unterschiedliche Verteilung von aneuploiden Stammlinien bei manueller und automatischer Messung	45
Tabelle 17: CV abnormals der automatischen Messung.....	46
Tabelle 18: Statistische Kennwerte der 2c-Referenz-IOD für vorgefärbte (7.x) und ungefärbte (8.x) Präparate, n = 20	48
Tabelle 19: Gegenüberstellung der zytologischen Diagnosen aus Aachen und Düsseldorf	50
Tabelle 20: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der zytologischen Diagnose aus Düsseldorf und der finalen Diagnose	50
Tabelle 21: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der zytologischen Diagnose Aachen und der finalen Diagnose	50
Tabelle 22: 4-Felder-Tafel zur Darstellung der absoluten Häufigkeiten der Diagnosen von beiden Messverfahren	51
Tabelle 23: 12-Felder-Tafel zur Darstellung von finaler Diagnose und der Anzahl der 9cEE der manuellen Messung	52
Tabelle 24: 12-Felder-Tafel zur Darstellung von finaler Diagnose und der Anzahl der 9cEE der automatischen Messung	52
Tabelle 25: 12-Felder-Tafel zur Darstellung von finaler Diagnose und der Zahl aneuploider Stammlinien der manuellen Messung.....	52
Tabelle 26: 12-Felder-Tafel zur Darstellung von finaler Diagnose und der Anzahl aneuploider Stammlinien der automatischen Messung	53
Tabelle 27: 6-Felder-Tafel zur Darstellung von finaler Diagnose und DNA-zytometrischer Diagnose der manuellen Messung.....	53
Tabelle 28: 6-Felder-Tafel zur Darstellung von finaler Diagnose und DNA-zytometrischer Diagnose der automatischen Messung	54
Tabelle 29: Studien zur diagnostischen Treffsicherheit der DNA-Zytometrie	68

Tabelle 30: Studien zur diagnostischen Treffsicherheit der anderen adjuvanten Verfahren.....	70
---	----

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld, ehemals Leiter des Schwerpunktes Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Überlassung des Themas sowie für seine sehr gute und freundliche Betreuung. Auch von Koblenz aus konnte ich mich jederzeit auf seine Unterstützung und Beratung verlassen.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reinke möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ferner danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Schwerpunktes Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für ihre freundliche und kompetente Hilfe bei allen organisatorischen und technischen Angelegenheiten.

Dr. David Friedrich und Prof. Dr. Alfred Böcking danke ich für die technische Umsetzung sowie die Durchführung der automatisierten Messungen.

Zudem möchte ich meiner Familie und meinen lieben Freunden für ihre Unterstützung danken, insbesondere meiner Schwester Lena für ihre Hilfe bei diversen größeren und kleineren Problemen mit Grafiken und Tabellen. Meinem Vater danke ich für die Unterstützung während der Phase der Datenerhebung und meiner Mutter und Anne Klimke für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein großer Dank gilt außerdem meinem Mann Sebastian, der mich die gesamte Zeit beim Erstellen dieser Dissertation und auch sonst in allen Lebenslagen unterstützt hat.

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.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift