

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

Direktorin: Prof. Dr. Irene Esposito

- Funktionsbereich Zytopathologie -

Diagnostische Treffsicherheit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung in endosonographisch gesteuerten Feinnadelpunktaten des pankreatobiliären Systems

Dissertation

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

vorgelegt von

Anna Heywinkel

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein

Für Papa

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen diagnostischen Vergleich der Treffsicherheit der endosonographisch gesteuerten Feinnadelaspirationsbiopsie (EUS-FNA) bei malignomverdächtigen Raumforderungen des Pankreas mit Hilfe der Kombination von Zytologie und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zu ermitteln. Das Pankreaskarzinom ist ein seltener, aber aggressiver und schnellwachsender Tumor. Frühsymptome sind kaum vorhanden, so dass bei Erstdiagnose häufig keine kurative Therapie mehr möglich ist. Mit Hilfe von ultraschall-gesteuerten Punktionen in der Endosonographie können verdächtige Herde minimalinvasiv untersucht werden. Neben laborchemischen Untersuchungen zystischer Läsionen sind an den Punktaten auch zytologische Untersuchungen mit guten Treffsicherheiten bezüglich maligner Tumore möglich. Allerdings bleibt neben tumorpositiven und -negativen zytologischen Diagnosen auch ein Anteil von unklaren „zweifelhaften“ oder „dringend tumorverdächtigen“ Befunden. Insbesondere für diese Fälle sind zusätzliche Untersuchungsverfahren möglich, wie zum Beispiel die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH). Der simultane Einsatz von 4 mittels unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffen markierten DNA-Sonden in einer Mehrfarben FISH (UroVysion) unter Einschluss von Zentromersonden der Chromosomen 3, 7 und 17 sowie einer genortspezifischen Sonde für den Abschnitt 9p21 ermöglicht eine Bestimmung von chromosomalen Imbalancen im Sinne chromosomaler Aneuploidie, von Polysomien einzelner Chromosomen sowie einer Deletion von 9p21. Letzterer Genabschnitt codiert unter anderem das Tumorsuppressorgen *CDKN2A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*).

In der vorliegenden Studie wurde die diagnostische Treffsicherheit der Zytologie, FISH und deren Kombination von mittels EUS-FNA des Pankreas gewonnenen Präparaten untersucht. In diese Untersuchung eingeschlossen wurde eine aus 273 Präparaten bestehende Kohorte diagnostisch zureichender, zellhaltiger Punktate des Zeitraums zwischen Januar 2011 und Dezember 2012. Insgesamt konnte für 213 Präparate ein klinisches und/oder histologisches *Follow-Up* eingeholt werden.

Die Sensitivität der zytologischen Diagnostik für pankreatobiliäre Karzinome betrug 87,2%, die Spezifität 88,6%. Für die FISH wurden verschiedene Auswertungsalgorithmen untersucht, wobei eine Sensitivität bis 82% bei einer Spezifität von 96% erreicht wurde. Durch die Kombination von zytologischer Diagnostik und zusätzlicher FISH bei zytologisch unklaren Präparaten konnte eine Sensitivität von 77,6% bei einer Spezifität von 97,1% erreicht werden. Zusätzlich wurden Punktate von 11 pankreatisch metastasierten Primärtumoren anderer Lokalisation sowie 7 neuroendokrine Tumoren des Pankreas in die Studie eingeschlossen, die auf Einzelfallbasis untersucht, aber nicht statistisch bewertet wurden.

Insgesamt betrachtet zeigen unsere Ergebnisse, dass durch die Kombination von morphologischer Zytodiagnostik als Suchtest und adjuvanter Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung als Bestätigungstest in zytologisch unklaren Fällen die Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik bei endosonographisch gesteuerten Feinnadelaspirationsbiopsien pankreatischer Raumforderungen gesteigert werden kann. Eine Kombination beider Methoden ist sinnvoll, um die Rate unklarer Befunde zu reduzieren und um genauere Befunde an die klinisch behandelnden Ärzte übermitteln zu können. Letztlich können so eindeutigere Diagnosen für den Patienten gestellt und teure Wiederholungsuntersuchungen vermieden werden.

Abstract

The aim of this work was to determine a diagnostic comparison of the accuracy of the endosonographically guided fine needle aspiration biopsy (EUS-FNA) in suspected malignant masses of the pancreas with the help of the combination of cytology and fluorescence in situ hybridization (FISH). Pancreatic cancer is a rare but aggressive and rapidly growing tumor. At the time of the initial diagnosis there is often no possibility of a curative therapy due to the fact that there are hardly any early symptoms. With the help of ultrasound-controlled punctures in endosonography, suspicious foci can be examined with the help of a minimally invasive procedure. In addition to laboratory examinations of cystic lesions, accurate cytological examinations relating to malignant tumors are also possible on the punctures. However, in addition to tumor-positive and negative cytological diagnoses, there is also a proportion of unclear "doubtful" or "urgently suspicious of a tumor" findings. In these cases in particular, additional testing methods are possible, such as fluorescence in situ hybridization (FISH). The simultaneous use of 4 DNA probes marked with different fluorescent dyes in a multicolor FISH (UroVysion) including centromer probes of chromosomes 3, 7 and 17 as well as a locus-specific probe for section 9p21 enables the determination of chromosomal imbalances in terms of chromosomal aneuploidy of Polysomies of single chromosomes and a deletion of 9p21. The latter gene segment encodes, among other things, the tumor suppressor gene CDKN2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A).

In the present study, the diagnostic accuracy of cytology, FISH and their combination of preparations obtained from the pancreas using EUS-FNA was examined. A cohort consisting of 273 preparations of diagnostically adequate, cell-containing punctures obtained between January 2011 and December 2012 was included in this study. A clinical and/or histological follow-up was obtained for a total of 213 specimens.

The sensitivity of the cytological diagnosis for pancreatobiliary carcinoma was 87.2%, the specificity 88.6%. Various evaluation algorithms were investigated for the FISH, with a sensitivity of up to 82% and a specificity of 96% being achieved. By combining cytological diagnostics and additional FISH for cytologically unclear specimens, a sensitivity of 77.6% with a specificity of 97.1% has been achieved. In addition, punctures from 11 pancreatic metastatic primary tumors in other locations and 7 neuroendocrine tumors of the pancreas were included in the study, which were examined on a case-by-case basis but not statistically evaluated.

Overall, our results show that the combination of morphological cytodiagnosics as a search test and adjuvant fluorescence in situ hybridization as a confirmatory test in cytologically unclear cases can increase the accuracy of cytological diagnostics in endosonographically guided fine needle aspiration biopsies of pancreatic masses. A combination of both methods is useful to reduce the rate of unclear findings and to be able to transmit more precise findings to the clinically treating physicians. Ultimately, this enables clearer diagnoses for the patient and expensive repeat examinations can be avoided.

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria	FNA	Feinnadelaspiration
Abb.	Abbildung	FNAB	Feinnadelaspirationsbiopsie
AMS	Arteria mesenterica superior	FNP	Feinnadelpunktion
AUC	<i>Area under the curve</i>	FPC	Familiäres Pankreaskarzinom
BRCA-2	<i>Breast Cancer 2</i>	HCL	Chlorwasserstoff (sinngemäß: Salzsäure)
Ca	Karzinom	HE	Hämatoxylin-Eosin
CDKN2A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor</i> = Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor	HER-2/neu	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> . Offizielle Bezeichnung: V-ERB-B2 <i>avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i> , ERBB2 <i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
CEP	<i>Chromosome Enumeration Probe</i>	HNPCC	hereditäres non-polypöses Colonkarzinom
CT	Computertomographie	IPMN	Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
CUP	<i>Cancer of unknown primary</i>	LK	Lymphknoten
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	LSI	<i>Locus Specific Identifier</i> = Locus spezifische Identifikationssonde
DD	Differentialdiagnose	MEN-1	Multiple endokrine Neoplasie - 1
DNA	<i>Desoxyribonuclein acid</i> = Desoxyribonukleinsäure	MRT	Magnetresonanztomographie
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatographie	NaOH	Natriumhydroxid
EUS	Endoskopischer Ultraschall	NEC	Neuroendokrines Karzinom
FAMMM-Syndrom	familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanomsyndrom	neg.	Negativ
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis coli		
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung		

neg. präd. Wert	Negativer prädiktiver Wert	PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
NET	Neuroendokriner Tumor	ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
NOS	<i>not otherwise specified</i> = nicht weiter spezifiziert	RT	Raumtemperatur
NP-40	Nonoxynol-40	SSC	<i>Standard sodium Citrate</i> = Natriumcitratpuffer
NPV	<i>negative predictive value</i> = negativer prädiktiver Wert	STARD	<i>Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy</i>
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie	UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
PAP	Papanicolaou	V.	Vena
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> = phosphatgepufferte Salzlösung	VIPom	Neuroendokriner Tumor mit Sekretion des vasoaktiven intestinalen Peptids
PET	Positronen-Emissions-Tomographie	VMS	Vena mesenterica superior
pos.	Positiv	WCP	<i>Whole Chromosome Painting Probe</i>
pos. präd. Wert	Positiver prädiktiver Wert	WF	<i>worrisome features</i> = verdächtige Eigenschaften, Fukuoka Kriterien
PPV	<i>positive predictive value</i> = positiver prädiktiver Wert	WHO	<i>World Health Organization</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 WHO Klassifikation für Tumore des Pankreas 2019 [51].....	4
Tabelle 2 UICC Stadieneinteilung 2017 [114].....	9
Tabelle 3 Klassifikation zytologischer Befunde nach Empfehlung der Deutschen Gesellschaften für Pathologie und Zytologie [13].....	23
Tabelle 4 Verwendete Geräte für die Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	26
Tabelle 5 UroVysion, FISH Sonden. Verwendete DNA-Sonden: CEP®- <i>Chromosome Enumeration Probe</i> , LSI®-Locus spezifische Identifikationssonde	27
Tabelle 6 Ansatz des Hybridisierungsmixes für Deckglasgröße 18x18 mm, verschiedene Sondenkonzentrationen und Konzentrationen.....	27
Tabelle 7 Benötigte Menge für den Hybridisierungsmix nach Deckglasgröße.....	28
Tabelle 8 Laborprotokoll für die Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	33
Tabelle 9 Allgemeine Darstellung einer Vierfeldertafel [38]	42
Tabelle 10 Angaben zum Patientenkollektiv, soweit aus den Krankenakten zu erhalten.....	47
Tabelle 11 Drei Methoden der statistischen Auswertung der zytologischen Diagnosen durch Dichtomisierung (n=195).....	48
Tabelle 12 Treffsicherheiten der Zytologie nach Dichtomisierung im Vergleich zur abschließenden klinischen Diagnose (n=195).....	49
Tabelle 13 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit einer aneuploiden Zelle mit Berechnung der Sensitivität, Spezifität, dem positiven prädiktiven Wert und negativen prädiktiven Wert	51
Tabelle 14 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit zwei aneuploiden Zellen.....	51
Tabelle 15 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit drei aneuploiden Zellen.....	52
Tabelle 16 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit vier aneuploiden Zellen	52
Tabelle 17 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit fünf aneuploiden Zellen.....	52
Tabelle 18 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit sechs aneuploiden Zellen.....	53
Tabelle 19 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit sieben aneuploiden Zellen.....	53
Tabelle 20 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit acht aneuploiden Zellen.....	53
Tabelle 21 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit neun aneuploiden Zellen.....	54
Tabelle 22 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit zehn aneuploiden Zellen.....	54
Tabelle 23 Prävalenz verschiedener Grenzwerte chromosomal aneuploider Zellen bei neuroendokrinen Tumoren und Metastasen im Pankreas.....	55
Tabelle 24 Youden-Index, Sensitivität und Spezifität für die Grenzwerte 1 bis 10.....	57
Tabelle 25 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "negativ" und Grenzwert fünf.....	59
Tabelle 26 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "negativ" und Grenzwert sieben	59
Tabelle 27 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "zweifelhaft" und Grenzwert fünf	60
Tabelle 28 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "zweifelhaft" und Grenzwert sieben	60
Tabelle 29 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "dringender Verdacht" und Grenzwert fünf.....	61

Tabelle 30 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "dringender Verdacht" und Grenzwert sieben	61
Tabelle 31 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "positiv" und Grenzwert fünf.....	62
Tabelle 32 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "positiv" und Grenzwert sieben..	62
Tabelle 33 Zytologische Diagnosen im Vergleich zu den Ergebnissen der FISH mit den Grenzwerten 5 und 7 bei NET und Metastasen des Pankreas	63
Tabelle 34 Übersicht der repetitiven Punktationen mit den Ergebnissen der Zytologie, der FISH und dem Referenzstandard bezüglich der ersten und zweiten Punktation.....	64
Tabelle 35 Sonderfall Nr. 4 mit insgesamt fünf repetitiven Punktationen, dargestellt mit den Ergebnissen der Zytologie, der FISH und dem Referenzstandard bezüglich der fünf Punktationen.	65
Tabelle 36 Vierfeldertafel Zytologie plus FISH bei einem Grenzwert von fünf chromosomal-aneuploiden Zellen für alle Präparate mit erhobenem Referenzstandard (n=213)	67
Tabelle 37 Vierfeldertafel Zytologie plus FISH bei einem Grenzwert von sieben chromosomal-aneuploiden Zellen für alle Präparate mit erhobenem Referenzstandard (n=213)	67
Tabelle 38 Vierfeldertafel Zytologie plus FISH bei einem Grenzwert von fünf chromosomal-aneuploiden Zellen für pankreatobiliäre Karzinome und benigne Pankreaserkrankungen (n=195).....	68
Tabelle 39 Vierfeldertafel Zytologie plus FISH bei einem Grenzwert von sieben chromosomal-aneuploiden Zellen für pankreatobiliäre Karzinome und benigne Pankreaserkrankungen (n=195).....	69
Tabelle 40 Trisomie des Chromosoms 7 bei pankreatobiliären Karzinomen und benignen Pankreaserkrankungen (n=195).....	70
Tabelle 41 Tetra- oder höhere Polysomie des Chromosoms 7 bei pankreatobiliären Karzinomen und benignen Pankreaserkrankungen (n=195).....	70
Tabelle 42 Fallbericht: Präparate mit ausgeprägter Trisomie des Chromosoms 7 bei klinisch bestätigtem pankreatobiliärem Karzinom.....	71
Tabelle 43 Auswertung bei heterozygoter, homozygoter und relativer Deletion von 9p21 sowie chromosomaler Aneuploidie (Cut-Off 7)	72
Tabelle 44 Details der abweichenden Fälle mit den Ergebnissen der Zytologie, der FISH und dem Referenzstandard	73
Tabelle 45 Zytologie und FISH (Cut-Off von 5 chromosomal-aneuploiden Zellen) der Metastasen im Pankreas.....	76
Tabelle 46 Zytologie und FISH (Cut-Off von 5 chromosomal-aneuploiden Zellen) der neuroendokrinen Tumoren im Pankreas	80
Tabelle 47 Sensitivität, Spezifität, PPV und NPV von Zytologie und FISH bei pankreatobiliären Karzinomen und benignen Pankreaserkrankungen. Übersicht Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.....	84
Tabelle 48 Übersicht der verfügbaren Literatur (UroVysion-Sonde, FNA des Pankreas)	86
Tabelle 49 Initial diskrepante Fälle mit nach erneuter Durchsicht der FISH-Präparate übereinstimmendem Ergebnis mit dem <i>Follow-up</i>	94

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 (1) negative Zytologie UP134; (2) zweifelhafte Zytologie P107, jeweils 40x Vergrößerung, Färbung nach Papanicolaou.....	24
Abb. 2 (3) dringend verdächtige Zytologie UP113; (4) positive Zytologie UP138, jeweils 40x Vergrößerung, Färbung nach Papanicolaou.....	24
Abb. 3 Laborarbeitsplatz der Färberei.....	31
Abb. 4 Wasserbad.....	34
Abb. 5 Kasten mit feuchtem Milieu	35
Abb. 6 Beispiele von fluoreszenz-markierten Zellkernen der eigenen Serie: (1) Disomie (UP87), 63x Öl-Immersionsoobjektiv (2) Tetrasomie (UP39), 100x Öl-Immersionsoobjektiv	38
Abb. 7 Beispiele von fluoreszenz-markierten Zellkernen der eigenen Serie: (3) drei Zellkerne mit Aneusomie, 63x Öl-Immersionsoobjektiv, (4) ein Zellkern mit Aneusomie im Detail, 100x Öl-Immersionsoobjektiv.....	38
Abb. 8 Flussdiagramm der Präparate der Studie (STARD-Diagramm)[24].....	45
Abb. 9 Verteilung der tatsächlichen zytologischen Diagnosen.....	48
Abb. 10 Angaben über die Lokalisation der Pankreaspunktate für die Zytopathologie der eingeschlossenen 195 Präparate	50
Abb. 11 ROC-Kurve.....	56
Abb. 12 Klinische Diagnose im Vergleich zu der FISH Diagnose bei einem Grenzwert von sieben aneuploiden Zellen	57
Abb. 13 Klinische Diagnose im Vergleich zu der FISH Diagnose bei einem Grenzwert von fünf aneuploiden Zellen	58
Abb. 14 FISH Befunde bei zweifelhafter und dringend verdächtiger Zytologie.....	66

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Die Anatomie des Pankreas	1
1.2 Klinischer Verlauf der pankreatobiliären Karzinome	2
1.3 Klassifikation der Pankreastumoren	3
1.3.1 Karzinomvorstufen und IPMN (intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie)	4
1.3.2 Maligne Läsionen	6
1.3.3 Neuroendokrine Neoplasien	7
1.3.4 Nichtepitheliale Läsionen und Metastasen	7
1.4 Diagnostik und Therapieverfahren	8
1.5 Zytologische Untersuchung des Pankreas	11
1.6 Untersuchung von Chromosomenaberrationen mit Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	15
1.7 Pathogenese des Pankreaskarzinoms	17
1.8 Problemstellung und methodischer Ansatz der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Patientenkollektiv und Studienaufbau	19
2.2 Abgrenzung der eigenen Leistung	20
2.3 EUS-FNA und zytologische Diagnostik	21
2.3.1 Färbung der Präparate nach Papanicolaou	22
2.3.2 Beurteilung und Interpretation in der Zytologie	23
2.4 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	24
2.4.1 Geräte	26
2.4.2 FISH Sonden und Lösungen	27
2.4.3 Laborprotokoll für FISH	31
2.4.4 Auswertung der FISH Präparate	37
2.5 Klinisches <i>Follow-Up</i>	39

2.6	Referenzstandard	41
2.7	Statistische Auswertung	41
3	Ergebnisse	44
3.1	Studienausschluss und <i>Follow-up</i>	44
3.2	Treffsicherheit der Zytologie von Pankreaskarzinomen	48
3.3	Entnahmeorte der zytologischen Präparate	50
3.4	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	50
3.4.1	Treffsicherheiten der FISH für Pankreaskarzinome bei verschiedenen Grenzwerten aneuploider Zellen	50
3.4.2	ROC-Kurve und Youden-Index	56
3.4.3	Subgruppenanalyse verschiedener zytologischer Diagnosekategorien bei pankreatobiliären Karzinomen und benignen Pankreaserkrankungen (n=195)	58
3.4.4	Subgruppenanalyse neuroendokriner Tumore und Metastasen im Pankreas	62
3.4.5	Repetitive Punktionen	63
3.5	Klinische Anwendung der FISH in der zytologischen Pankreaskarzinomdiagnostik	65
3.5.1	Auswertung für alle Präparate mit erhobenem Referenzstandard	66
3.5.2	Auswertung für pankreatobiliäre Karzinome und benigne Pankreaserkrankungen	68
3.6	Trisomie und Polysomie des Chromosoms 7	69
3.7	Deletion von Chromosom 9p21	71
3.8	Sonderfälle	72
3.8.1	Diskrepante Fälle	73
3.8.2	Metastasen anderer Primärtumore im Pankreas	74
3.8.3	Neuroendokrine Tumore im Pankreas	78
4	Diskussion	81
4.1	Zielsetzung und Einordnung in den diagnostischen Kontext der pankreatobiliären Zytologie	81
4.2	Treffsicherheit der Zytologie bei endosonographisch gesteuerten Feinnadelpunktion des Pankreas	83
4.3	Treffsicherheit der FISH bei endosonographisch gesteuerten Feinnadelpunktion des Pankreas	85
4.4	Treffsicherheit der kombinierten Zytologie und FISH	90
4.5	Diskrepante Fälle	92
4.6	Metastasen und Neuroendokrine Tumoren im Pankreas	95

4.7	Schlussfolgerung und Ausblick	97
5	Literaturverzeichnis	99
6	Anhang	109
6.1	Fragebogen für persönliche Akteneinsicht	109
6.2	Fragebogen durch Kliniker auszufüllen	111
7	Danksagung	112

1 Einleitung

Das Pankreaskarzinom gehört zu den eher seltenen Krebserkrankungen, aber leider auch zu denen, deren Häufigkeit derzeit zunimmt und die mit der ungünstigsten Prognose behaftet sind. Möglichkeiten der Früherkennung sind nicht vorhanden und eine exakte präoperative Diagnostik, zum Beispiel mit Hilfe der Zytologie, stellt sich oft als schwierig dar. Wenn es möglich ist, präoperativ eine Probe zu gewinnen, können bei nicht eindeutig beurteilbaren zytologischen Präparaten am gleichen Untersuchungsmaterial zusätzliche Untersuchungen wie z.B. Immunzytochemie, DNA-Bildzytometrie (Desoxyribonukleinsäure) oder auch, wie in der vorliegenden Arbeit untersucht, die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) die Diagnose sichern.

1.1 Die Anatomie des Pankreas

Das Pankreas liegt im Oberbauch retroperitoneal. In direkt benachbarter Lage befinden sich das Duodenum, die extrahepatischen Gallenwege, der Milzhilus sowie die Arteria und Vena mesenterica superior (VMS). [8] Die Abschnitte des Pankreas werden nach dem Verlauf der VMS und der Aorta eingeteilt. Der Pankreaskopf mit dem Processus uncinatus liegt rechts der VMS, der Pankreaskörper reicht von VMS bis zum linken Rand der Aorta, der Pankreasschwanz reicht bis in den Milzhilus. [40]

Das Pankreas besteht aus einem exokrinen und einem endokrinen Anteil. Der exokrine Teil ist eine merokrine, seröse Drüse. Der Hauptausführungsgang des exokrinen Pankreas ist der Ductus pancreaticus, im klinischen Alltag Ductus Wirsungianus genannt. Er verläuft durch das gesamte Pankreas nahe der Rückseite, vereinigt sich mit dem Ductus choledochus der ableitenden Gallenwege und mündet auf der Papilla duodeni major, auch Papilla Vateri genannt, in das Duodenum. [8] Durch die anatomische Nähe der ableitenden Gallenwege und des Pankreas kommt es bei Erkrankungen der einen Struktur häufig zur Mitbeteiligung der anderen, dadurch erklärt sich bei einem Pankreaskopfkarzinom das gehäufte Auftreten eines Stauungsikterus. [16] Das exokrine Pankreassekret enthält verschiedene Verdauungsenzyme in ihren inaktiven Vorstufen, unter anderem Trypsin, Elastase, Lipase und Amylase. Das Sekret ist dünnflüssig und wegen des hohen Bikarbonatgehaltes alkalisch. Reguliert wird die Sezernierung durch Hormone der endokrinen Zellen des Magens, des Dünndarms sowie des vegetativen Nervensystems. [8]

Der endokrine Teil des Pankreas macht im Vergleich zum exokrinen Teil einen deutlich geringeren Anteil aus (2-5%). Die endokrinen Zellen liegen als Inselapparat, oder auch Langerhans-Inseln genannt, in Gruppen zusammen und geben die produzierten Hormone direkt an das Blut ab. Produziert wird dabei hauptsächlich Insulin durch die B-Zellen (60-80%), Glukagon durch die A-Zellen (20%) und Somatostatin durch die pp-Zellen (5%). [94]

1.2 Klinischer Verlauf der pankreatobiliären Karzinome

Das exokrine Pankreaskarzinom macht von allen Krebsneuerkrankungen 3,4% bei den Männern und 3,8% bei den Frauen aus. Bei den Krebssterbefällen liegt das Pankreaskarzinom bei Männern und Frauen auf Platz 4 in Deutschland. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt in Deutschland für Männer bei 9% und für Frauen bei 10%. Die Inzidenz- und Mortalitätsrate sind auf Grund der kurzen Überlebenszeit nahezu identisch. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Frauen bei 76 Jahren und bei Männern bei 72 Jahren. [86]

Die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms folgt aus der späten Diagnosestellung. [57] Symptome zeigen sich spät und sind unspezifisch, wie Rückenschmerzen [50], Gewichtsverlust und ein schmerzloser Ikterus mit Leberinsuffizienz. [57] Bei Patienten über 60 Jahren stellt das Pankreas- oder Gallengangskarzinom mit 20% sogar die häufigste Ursache für einen neu auftretenden Ikterus dar. [82] Aufgrund der häufigen Lokalisation im Kopfbereich des Organs entsteht häufig eine tumoröse Stenose der Gallengänge und des Pankreasgangsystems. Die Diagnosestellung von Tumoren des Pankreasschwanzes und -körpers erfolgt meist später. Sie sind bei Diagnosestellung größer als im Kopfbereich und können bereits zu Leber- oder Lungenmetastasen oder einer Peritonealkarzinose geführt haben. [57] Im Randbereich der Karzinome entwickelt sich häufig eine chronische Pankreatitis. [50] Die genaue Ätiologie ist unbekannt. Man kennt aber signifikante Risikofaktoren, unter anderem Nikotinabusus, chronische Pankreatitiden, Diabetes mellitus und Übergewicht. Exzessiver Alkoholkonsum wird ebenfalls mit einem erhöhten Risiko in Verbindung gebracht. Als wichtigster prädisponierender Faktor gilt das Lebensalter. Das durchschnittliche Lebensalter bei Diagnosestellung liegt zwischen 60 und 80 Lebensjahren. [3][92]

Eine familiäre oder hereditäre Komponente bezüglich des Pankreaskarzinoms ist für verschiedene Syndrome und Genmutationen bekannt. Ein deutlich erhöhtes Risiko zeigt sich bei dem Peutz-Jeghers-Syndrom (Lebenszeitrisiko 36-42%), bei hereditären Pankreatitiden (Risiko bis zum 70. Lebensjahr zu erkranken 40-44%) und beim FAMMM-Syndrom (familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanomsyndrom) (Lebenszeitrisiko 17%). Ein erhöhtes Risiko zeigt sich auch bei Familien, in denen die Keimbahnmutation der Gene BRCA1 und 2 (*Breast Cancer*) vorliegt und bei Familien mit dem Syndrom der familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP). [3][6][57]

Davon abzugrenzen ist das familiäre Pankreaskarzinom (FPC). Von einem FPC muss immer dann ausgegangen werden, wenn zwei erstgradige Verwandte in einer Familie erkranken, ohne dass Kriterien für ein anderes hereditäres Syndrom vorliegen. Das FPC ist mit 1-3% der Pankreaskarzinome so häufig wie andere erbliche Tumorerkrankungen. Das mittlere Erkrankungsalter unterscheidet sich nicht von sporadischen Pankreaskarzinomen, es zeigt sich aber in der Vererbung eine Antizipation und Kinder von FPC-Patienten erkranken bis zu zehn Jahre früher am Pankreaskarzinom. Eine genetische Analyse ist bei familiärer Häufung anzuraten, ein Ergebnis zeigt sich jedoch nur in wenigen Fällen. [3][104]

1.3 Klassifikation der Pankreastumoren

Epitheliale organeigene Tumore des Pankreas haben zwei entscheidend unterschiedliche Ursprungsorte, entweder im exokrinen oder im endokrinen Gewebe. Die Pathogenese sowie Klinik der Tumore unterscheiden sich je nach ihrem Ursprungsort deutlich. [16][60] Zur Einteilung siehe die Klassifikation für Tumore des Pankreas der WHO (*World Health Organization*) von 2019, Tabelle 1. [49]

Benigne epitheliale Tumore und Vorstufen

Seröses Zystadenom mit verschiedenen histologischen Subtypen

Seröses Zystadenokarzinom NOS (nicht weiter spezifiziert)

Glanduläre intraepitheliale Neoplasie, *low grade*

Glanduläre intraepitheliale Neoplasie, *high grade*

Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) mit *low grade* Dysplasie

Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) mit *high grade* Dysplasie

Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) mit assoziiertem invasiven Karzinom

Intraduktale onkozytäre papilläre Neoplasie NOS

Intraduktale onkozytäre papilläre Neoplasie mit assoziiertem invasiven Karzinom

Intraduktale tubopapilläre Neoplasie

Intraduktal papilläre Neoplasie mit assoziiertem invasiven Karzinom

Muzinös zystische Neoplasie mit *low grade* Dysplasie

Muzinös zystische Neoplasie mit *high grade* Dysplasie

Muzinös zystische Neoplasie mit assoziiertem invasiven Karzinom

Maligne epitheliale Tumore

Duktales Adenokarzinom mit verschiedenen histologischen Subtypen

Azinuszellkarzinom

Azinuszellzystadenokarzinom

gemischt azinär-neuroendokrines Karzinom

gemischt azinär-endokrin-duktales Karzinom

gemischt azinär-duktales Karzinom

Pankreatoblastom

Solide pseudopapilläre Neoplasie des Pankreas

Neuroendokrine Neoplasien des Pankreas

Neuroendokrines Mikroadenom

Neuroendokrine Tumore (NET)

NET G1

NET G2

NET G3

Neuroendokrine Tumore (NET), nicht funktionell, mit verschiedenen histologischen Subtypen

Funktionelle Neuroendokrine Tumore des Pankreas

Insulinom

Gastrinom

VIPom

Glukagonom

Somatostatinom

ACTH produzierender Tumor

Enterochromaffinzell Karzinoid

Serotonin-produzierender Tumor

Neuroendokrines Karzinom (NEC)

Großzelliges NEC

Kleinzelliges NEC

Gemischte neuroendokrine - nicht neuroendokrine Neoplasie (*Mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasm*, MiNEN)

Tabelle 1 WHO Klassifikation für Tumore des Pankreas 2019 [49]

1.3.1 Karzinomvorstufen und IPMN (intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie)

Die höhergradige pankreatisch intraepitheliale Neoplasie (PanIN) Grad 3 gilt als möglicher Vorläufer des duktales Adenokarzinoms des Pankreas. [16][57] Die schweren Zellatypien der PanIN 3 beinhalten den Verlust der Zellpolarität, sowie atypische oder gehäufte Mitosen, große Zellkerne mit Kernunregelmäßigkeiten und luminalen Nekrosen. [46] Die Bedeutung von PanIN-1 und -2 ist in der klinischen Praxis im Gegensatz zu PanIN 3 umstritten. [47][76] Für das extrahepatische Gallengangskarzinom ist in Analogie eine hochgradige biliär intraepitheliale Neoplasie (BiIIN) existent.

Differentialdiagnostisch muss die PanIN von der intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie (IPMN) unterschieden werden. Entscheidend ist dabei eine makroskopische Größe von mehr als einem Zentimeter, welche für eine IPMN spricht. [47][67]

Die intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) macht bei den zystischen Neoplasien des Pankreas die größte Subgruppe aus (20%) und gehört zu den wichtigsten Vorläuferläsionen für das duktales Adenokarzinom. Unterteilt wird sie in einen Hauptgangtyp, einen Seitengangtyp und einen gemischten Typ. Alle drei Typen kommen zu gleichen Teilen vor. Der Hauptgangtyp zeigt eine schlechtere Prognose und entwickelt anders als der Seitengangtyp häufiger eine invasive Komponente. Er zeigt sich zu 80% im Pankreaskopf. Mikroskopisch kann zwischen *low und high grade* Dysplasien unterschieden werden, denen ein unterschiedliches Progressionsrisiko zukommt, je nach zytologischem Erscheinungsbild oder je nach Bildgebung entsprechend den Fukuoaka Kriterien.

Eine Richtlinie für die Therapie bieten die klinisch-morphologisch basierten internationalen Konsensusrichtlinien der *International Association of Pancreatology*, die Fukuoaka Kriterien. [67][103] Während Hauptgang-IPMN meist einer operativen Therapie zugeführt werden, ist das Vorgehen aufgrund des niedrigeren Progressionsrisikos bei Seitengang-IPMN oft konservativ. Zur Entscheidung für oder gegen ein operatives Vorgehen sind Hochrisikostigmata oder verdächtige Eigenschaften (*worrisome features* – WF) publiziert worden. Die jeweiligen Kriterien werden unter „1.4 Diagnostik und Therapieverfahren“ aufgeführt. [71][103]

Die Überlebensrate der IPMN liegt bei 90%, trotz invasiver Komponente mit 35%. Diese zeigt sich meist fokal und mikroinvasiv, was eine komplette Einbettung der Läsion für die histopathologische Untersuchung erforderlich macht. Das entsprechende Entartungsrisiko ist für die jeweiligen Untergruppen der IPMN unterschiedlich. Ohne bildgebende Risikofaktoren (Fukuoka Kriterien) liegt das Risiko bei 2-3%. Mit bildgebenden Risikofaktoren und zusätzlichen Hochrisikoläsionen liegt das Entartungsrisiko bei ca. 50%. Ohne diese Hochrisikoläsionen, nur mit verdächtigen Struktureigenschaften liegt die Karzinomrate innerhalb von 5 Jahren bei 4%. [71][103]

Die muzinös-zystische Neoplasie des Pankreas ist die zweithäufigste Subgruppe der zystischen Neoplasien (10%). Diese Neoplasie tritt besonders häufig bei perimenopausalen Frauen auf (Alter 40-50 Jahre). Das Stroma, welche die Zyste umgibt, zeigt ähnliche Muster wie das Stroma des Ovars. Auch immunhistochemische Färbungen zeigen eine gleichartige Expression von z.B. Alpha-Inhibin oder dem Progesteronrezeptor. Insgesamt ist dies ein möglicher Hinweis auf die Histogenese der muzinös-zystischen Neoplasien des Pankreas. Als Lokalisation kommen sie fast ausschließlich im Pankreasschwanz vor (mehr als 90%). Sie zeigen in 30% der Fälle ein assoziiertes duktales Adenokarzinom des Pankreas. [67] [103]

1.3.2 Maligne Läsionen

Das duktales Adenokarzinom geht vom Gangepithel aus und zeigt sich mit infiltrierend wachsenden, schleimbildenden Drüsenstrukturen sowie ausgeprägter Entzündungsreaktion und Stromabildung. Es imitiert in Form und Funktion die mittelgroßen und kleinen Pankreasgänge. [57]

Zum duktalem Adenokarzinom des Pankreas gehören mehrere histologische Varianten: das colloide Karzinom, das diffuse Karzinom, das Siegelringzellkarzinom, das medulläre Karzinom, das adenosquamöse Karzinom, das hepatoide Karzinom, das großzellige rhabdoide Karzinom, das undifferenzierte Karzinom und das undifferenzierte Karzinom mit Osteoklasten-ähnlichen Riesenzellen. [49]

Im Folgenden werden die weiteren bekannten malignen Läsionen des Pankreas beschrieben, welche nicht zum duktalem Pankreaskarzinom zählen, vgl. Tabelle 1.

Das Azinuszellkarzinom ist ein seltener Tumor des Pankreas und tritt meist bei älteren Männern auf. Histologisch zeigt sich das Karzinom gut abgrenzbar und solide. In wenigen Fällen kommt es bei diesem Karzinom zu einer Lipasehypersekretion, wodurch das Enzym in die Blutbahn übertritt und zu schmerzhaften Fettgewebsnekrosen führen kann. Das Azinuszellkarzinom zeigt sich in allen Abschnitten des Pankreas. Differentialdiagnostisch sollte ein neuroendokriner Tumor ausgeschlossen werden. Eine positive immunhistochemische Reaktion von Trypsin oder Amylase spricht für ein Azinuszellkarzinom. [16]

Neben den malignen Läsionen, welche nur einer histologischen Ursprungskomponente entsprechen, zeigen sich auch gemischte Tumoren im Pankreas, wie gemischte azinär-duktales Karzinome oder gemischte azinär-neuroendokrine Karzinome. [49] Gemischte Karzinome mit neuroendokrinen Tumoren kommen sowohl bei duktalem als auch bei azinären Karzinomen vor, und können diagnostiziert werden, wenn der Anteil des neuroendokrinen Tumors mindestens 30% ausmacht. [54][56]

Abgesehen von pankreaseigenen Läsionen kann aufgrund der anatomischen Nähe auch ein extrahepatisches Gallengangskarzinom (CCC) durch die gemeinsame Endstrecke von Pankreasgang und ableitenden Gallenwegen intrapankreatisch liegen. Zytologisch sind die Entitäten kaum zu unterscheiden, selbst die immunhistochemischen Eigenschaften sind sehr ähnlich, so dass oft nur nach der histopathologischen Aufarbeitung des Präparates (z.B. nach Whipple Operation) beurteilt werden kann, welche Tumorentität vorliegt. Hilfreich ist dabei das Vorliegen von Krebsvorstufen im Randbereich des Tumors (biliäre intraepitheliale Neoplasie (BilIN), Pan-In oder IPMN) oder das Ausbreitungsmuster im Pankreaskopf und der anatomischen Bezug.

1.3.3 Neuroendokrine Neoplasien

Die Pathogenese und Klinik der neuroendokrinen Neoplasien werden durch ihren Grad der Differenzierung zusammen mit dem Proliferationsindex sowie der Hormonsekretion bestimmt. Hormonell unterscheidet man Serotonin-produzierende Neoplasien, Insulinom, Glukagonom, Somatostatinom, Gastrinom und VIPom (Vasoaktives intestinales Peptid). Sind die Tumore hormonell aktiv, zeigen sie je nach Funktion des Hormons charakteristische klinische Symptome. Bei den separat klassifizierten, hormonell inaktiven Tumoren fehlen diese Symptome. Durch den Proliferationsindex und den Differenzierungsgrad gelingt die Abgrenzung neuroendokriner Tumoren (NET) gegenüber neuroendokrinen Karzinomen (NEC). Die Prävalenz der neuroendokrinen Neoplasien beträgt weniger als 1/100000. [57][60] Sie sind selten, ermöglichen aber oft einen spezifischeren Therapieansatz. [55][56]

Histologisch sind neuroendokrinen Tumore (NET) gut bis schlecht differenziert (G1, G2 oder G3; Proliferationsindex Ki-67 <3%, 3-20% bzw. >20%) und weisen ein potentiell malignes Verhalten auf, besonders die nicht funktionellen, neuroendokrinen Tumoren des Pankreas (60-80%). [56][57][60] Im Unterschied zum neuroendokrinen Tumor zeigt das neuroendokrine Karzinom immer einen hohen Proliferationsindex (Ki-67 >20%; G3) und zusätzlich eine schlechtere Differenzierung. Durch diese schlechte Differenzierung findet keine Hormonproduktion mehr statt. [56][72]

Klinisch ergeben sich je nach Tumorart verschiedene typische Symptome. Serotonin produzierende NET zeigen eine typische Trias aus Flush, Diarrhoe und kardialer Manifestation mit Endokardfibrose (Karzinoidsyndrom) [69][116]. Das Gastrinom bewirkt eine vermehrte Sezernierung von Magensäure und führt so zum Auftreten von Magenulzera und Diarrhoen. Das klinische Bild wird als Zollinger-Ellison-Syndrom bezeichnet. In 20-30% der Fälle ist dieser NET mit der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN-1) assoziiert. [23][56]

Das Insulinom ist mit 40-70% der häufigste funktionell aktive Tumor des Pankreas. In über 90% der Fälle zeigt diese Art der neuroendokrinen Tumore ein benignes Verhalten, unabhängig von der Hormonaktivität des Tumors, und tritt im Pankreas solitär auf. Durch die Übersekretion von Insulin besteht als Symptom eine Hypoglykämie. Die meisten Insulinome treten sporadisch auf, können aber auch mit dem MEN-1 assoziiert sein. Wenn keine Metastasen vorliegen, gelten Patienten nach kompletter chirurgischer Resektion als geheilt. [56][98]

1.3.4 Nichtepitheliale Läsionen und Metastasen

Primär mesenchymale Tumore des Pankreas sind extrem selten (0,3-0,5%). Dabei zeigen sich verschiedenste Entitäten, benigne und borderline Tumore wie Fibrome, Hämangiome, Schwannome oder Hamartome, aber auch undifferenzierte Sarkome, Leiomyosarkome oder

Ewing Sarkome. Das mediane Überleben der Patienten mit Sarkomen des Pankreas unterscheidet sich nicht von Patienten mit duktalem Adenokarzinom. Präoperativ ist eine richtige Diagnostik erschwert aufgrund der geringen Erfahrung mit dieser Art des Tumors im Pankreas. [51][118]

Im Pankreas finden sich sehr selten reife Teratome. Es wurden wenige Fallberichte veröffentlicht. Dabei wurden gemischt solide zystische Tumoren beschrieben. Tumormarker, Amylase und Lipase lagen im Normbereich. Der EUS mit FNA zeigte einen muzinösen Zysteninhalt mit Verdacht auf ein muzinöses Zystadenom. Bei der operativen Versorgung wurden Haare und zum Teil Zähne nachgewiesen. Ein Anhalt für Malignität ergab sich nicht. [21]

Lymphome, welche primär im Pankreas auftreten, sind extrem selten. Klinisch treten ähnliche Symptome wie bei einem Karzinom im Bereich des Pankreaskopfes, unter anderem mit Oberbauchschmerzen, Ikterus, Diarrhoe und Gewichtsverlust, auf. Ein gehäuftes Auftreten findet sich bei Männern. Eine genaue Diagnostik und Klassifikation, zum Beispiel mittels histologischer oder zytologischer Biopsie, ist obligat. Die Therapie des primären Lymphoms besteht nicht in der chirurgischen Resektion, sondern in einer Kombination aus Radiochemotherapie mit gegebenenfalls notwendiger Stammzelltransplantation. Die Prognose ist deutlich günstiger als beim Adenokarzinom des Pankreas. [89]

Metastasen im Pankreas sind selten. Der Primarius ist am häufigsten ein Nierenzell-, Colon-, oder Bronchialkarzinom oder ein Melanom. Mitunter können Metastasen histologisch mit neuroendokrinen Tumoren verwechselt werden, besonders Metastasen von Melanomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen und klarzelligen Nierenzellkarzinomen. [20][56][85] Sie lassen sich aber in der Regel immunhistochemisch gut abgrenzen.

1.4 Diagnostik und Therapieverfahren

Die TNM Klassifikation und Einteilung der Tumorstadien nach der *Union internationale contre le cancer* (UICC), welche für Karzinome des exokrinen Pankreas anzuwenden ist, ist Grundlage der Prognose und Therapieplanung des duktalem Pankreaskarzinoms. Dargestellt in Tabelle 2.

Bei Tx ist der Primärtumor nicht beurteilbar. T0 zeigt keinen Anhalt für einen Primärtumor. Als Tis wird das *Carcinoma in situ* inklusive der PanIN-III-Läsion klassifiziert. Bei T1 ist der Tumor maximal 2cm oder weniger groß. Weiter unterteilt wird das Stadium in T1a mit einer Größe von 0,5cm oder kleiner, T1b liegt zwischen 0,5cm und 1cm, T1c zwischen 1cm und 2cm. Sobald die Ausdehnung größer als 2cm ist, aber kleiner als 4cm, spricht man von einem Ausbreitungsstadium T2. T3 beschreibt eine Ausdehnung von mehr als 4cm. Durch die Infiltration des Truncus coeliacus, der Arteria mesenterica superior (AMS) und/oder der Arteria hepatica communis definiert sich das Ausbreitungsstadium T4. Bei T1 bis T3 liegt der

Primärtumor innerhalb des Pankreas, kann aber das peripankreatische Weichteilgewebe mit infiltrieren. [112]

Die peripankreatischen Lymphknoten für Tumore des Pankreas werden nach Lokalisation des Primarius eingeteilt. Man unterscheidet Pankreaskopf-, Pankreaskörper- und Pankreasschwanztumoren. Die regionären Lymphknoten sind bei Nx nicht beurteilbar, bei N0 existieren keine, bei N1 existieren 1 bis 3 regionäre Lymphknotenmetastasen, bei N2 existieren 4 oder mehr regionäre Lymphknotenmetastasen. Für eine pNO Beurteilung sollten nach UICC Einteilung 12 regionäre Lymphknoten untersucht werden. Das Verhältnis von befallenen zu entnommenen Lymphknoten sollte angegeben werden. [3][112] Bei M0 sind keine, bei M1 sind Fernmetastasen vorhanden. [112]

UICC Stadium	TNM		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium III	T1, T2, T3	N2	M0
	T4	Jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 2 UICC Stadieneinteilung 2017 [112]

Neu auftretende Oberbauch- und Rückenschmerzen sollten zur diagnostischen Abklärung eines Pankreaskarzinoms führen. Ein neu aufgetretener oder bestehender Diabetes muss nur abgeklärt werden, wenn zusätzliche Symptome wie ein schmerzloser Ikterus bestehen. [3]

Die Diagnostik führt über bildgebende Verfahren zu Zytologie, Labordiagnostik und ggf. schlussendlich zur histologischen Gewebegewinnung.

Es stehen verschiedene bildgebende Verfahren zur Verfügung für die Abklärung eines Tumorverdachts im Pankreas, wie Sonographie, Endosonographie (EUS), Computertomographie (CT) mit Kontrastmittel, Magnetresonanztomographie (MRT) mit Kontrastmittel und die Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP). Durch die Bildgebung kann eine Verdachtsdiagnose gestellt werden und gleichzeitig das Vorhandensein von Metastasen geklärt werden. Eine Klärung der Dignität ist selten möglich. Ebenfalls zur Diagnostik ist eine ERCP durchführbar, allerdings zeigt diese nur Gangstrukturen und nicht

die gesamte Raumforderung. Deshalb ist dieses Verfahren ohne zusätzliche Diagnostik nicht ausreichend. [3][16][40]

Zur Risikostratifizierung von Pankreaszysten, insbesondere von IPMN vom Seitengangtyp, werden in der Bildgebung die sogenannten Fukuoka Kriterien angewandt. Die Einteilung erfolgt in Fukuoka negative Läsionen, Fukuoka positive Läsionen mit verdächtigen Eigenschaften und Fukuoka positive Läsionen mit Hochrisikoläsionen. Fukuoka negative Läsionen weisen ein niedriges Entartungsrisiko auf, positive Läsionen ein erhöhtes Risiko, vergleiche „1.3.1 Karzinomvorstufen und IPMN (intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie)“. Hochrisikoläsionen einer IPMN werden über einen obstruktiven Ikterus mit zystischen Läsionen im Pankreas definiert sowie kontrastreiche solide Komponenten innerhalb der Zyste oder einer Dilatation des Ductus pancreaticus (Ductus wirsungianus) >10mm. Läsionen mit verdächtigen Eigenschaften weisen eines der folgenden Kriterien auf: Pankreatitis ohne anderen Fokus, Zyste >3 cm mit verdickter oder kontrastreicher Zystenwand, Dilatation des Ductus pancreaticus (Ductus wirsungianus) auf 5-9mm, beziehungsweise Kalibersprung des Ductus pancreaticus mit distaler Gewebeatrophie, kontrastarme Zystenwand-Noduli, Lymphadenopathie. [71][103]

Tumore des Pankreas lassen sich durch eine Bildgebung, wie bereits erwähnt, nur bedingt differenzieren. Mittels endosonographisch gesteuerter Feinnadelaspiration (EUS-FNA) jedoch kann ein bildgebendes Verfahren simultan mit Probengewinnung, z.B. für die Zytologie, genutzt werden. Leitliniengerecht sollte eine Diagnosesicherung durch Zytologie oder Histologie erfolgen, insbesondere vor der Durchführung einer spezifischen palliativen Therapie, unabhängig davon, ob es sich um ein lokal fortgeschrittenes oder metastasiertes Karzinom handelt. [3][16] Mehr zur zytologischen Diagnostik ist im Kapitel „1.5 Zytologische Untersuchung des Pankreas“ beschrieben.

Ergänzend in der Diagnostik des Pankreaskarzinoms kann der Tumormarker Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA19-9) genutzt werden. [50] Er sollte allerdings nicht in der Präventiv- oder in der Primärdiagnostik genutzt werden. Zum einen ist der Marker im Frühstadium des Pankreaskarzinoms nicht erhöht, zum anderen lässt sich auch bei nicht-malignen Erkrankungen, z.B. einer Cholangitis, ein Anstieg des Tumormarkers feststellen. Der Tumormarker ist zur Therapieüberwachung und zur laborchemischen Rezidivkontrolle geeignet. [3][100]

Das Therapieschema richtet sich nach dem Stadium der UICC. Bei Stadium I, II und III erfolgt, wenn möglich, die vollständige operative Entfernung des Malignoms, gefolgt von einer adjuvanten Chemotherapie. Bei Stadium IV stehen palliative Chemotherapie und molekularer Therapiestrategien („Targeted therapies“) zur Verfügung. Eine palliative Strahlentherapie ist bei symptomatischen Metastasen eine Option, insbesondere bei Skelett- und zerebralen Metastasen. [3]

Bei Erstdiagnose besteht für 25-30% aller Patienten die Möglichkeit einer kurativen Resektion. Die R0 Resektion bestimmt die Prognose des Pankreaskarzinoms, das mediane

Gesamtüberleben wird signifikant verlängert. [3][30][109] Die Operationstechnik richtet sich nach der Lage und Ausdehnung des Tumors. Mögliche Verfahren sind die pyloruserhaltende oder nicht erhaltende Duodenopankreatektomie (Operation nach Kausch-Whipple), die distale Pankreatektomie oder Pankreaslinksresektion und die totale Pankreatektomie. [109] Die Resektionsoperation sollte nicht laparoskopisch durchgeführt werden, zur Diagnostik im Rahmen einer Staging-Untersuchung ist eine Laparoskopie im Einzelfall zu überlegen. [3][109] Postoperative Komplikationen liegen am häufigsten in Anastomoseninsuffizienz, Pankreasfisteln und Magenentleerungsstörungen. [109] Ein Stent in die Gallenwegen bei anstehender Operation sollte nur bei einer vorhandenen Cholangitis gelegt werden. Wenn aber ein operatives Vorgehen nicht möglich oder zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht möglich ist, kann dieses Verfahren zur Symptomlinderung genutzt werden. [3]

In der adjuvanten Standardtherapie gelten Gemcitabin und FU/Folinsäure (Mayo-Protokoll) als gleichwertig. Beide Substanzen verbessern signifikant das Gesamtüberleben. [73] Bei lokal fortgeschrittenem, inoperablem oder metastasiertem Pankreaskarzinom bewirkt eine palliative Chemotherapie eine signifikante Verlängerung des rezidivfreien Intervalls und des Überlebens bei gleichzeitiger Verbesserung der Lebensqualität. [3][35][74] Als Erstlinientherapie kann dabei Gemcitabin als Monotherapie oder als Kombinationstherapie aus Gemcitabin und dem EGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Erlotinib eingesetzt werden. [3]

Zusätzlich ist auf eine ausreichende Schmerztherapie nach WHO Stufenschema zu achten. Bei unzureichender Schmerzkontrolle kann eine Coeliacusblockade erwogen werden. Ausreichende Ernährung und appetitanregende Medikamente stellen eine weitere Basis in der palliativen Betreuung dar. [3]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Patienten mit zystischen Neoplasien ohne assoziiertem Karzinom nach vollständiger Resektion als geheilt gelten, bei soliden Tumoren ist dies selten der Fall. [57] Die einzige Möglichkeit das Überleben zu verlängern, besteht im operativen Vorgehen. Hierbei kann die 5-Jahres Überlebensrate auf knapp 20% gesteigert werden. [111] Für die Prognose des duktales Adenokarzinoms des Pankreas ist die Infiltration des Duodenums mitentscheidend. Studien zeigten, dass das mediane Überleben bei einer Infiltration des Duodenums von median 26 Monaten auf 19 Monate deutlich sinkt. [26]

1.5 Zytologische Untersuchung des Pankreas

Zur Gewinnung von zytologischem Material bei Verdacht auf ein Pankreatobiliäreskarzinom sind verschiedene Verfahren möglich. Am häufigsten kommt die endosonographisch gesteuerte Feinnadelaspiration (EUS-FNA) und der Bürstenabstrich der Gangstrukturen zum Einsatz. Der Bürstenabstrich wird während einer ERCP gewonnen. Die Gewinnung der Probe sollte vor der Kontrastmittelgabe erfolgen. Die Sensitivität bei diesen Verfahren ist

verbesserungsbedürftig und liegt zwischen 33 und 75%. [16][97]. Dieses Verfahren wird in der aktuellen Leitlinie zur Pankreaskarzinomdiagnostik daher nicht empfohlen. [3]

Die andere Möglichkeit besteht in der EUS-FNA. Die Untersuchung ist einfacher und komplikationsärmer, die Belastung für den Patienten ist gering. Das zytologische Material kann unter endosonographischer Sicht vom Magen oder Duodenum aus gezielt gewonnen werden. Die verdächtige Raumforderung wird mittels FNA durch die Wandschichten des Magens oder des Duodenums punktiert. In einer Sitzung sind mehrere Punktionen sowie verschiedene Punktionsstellen möglich. [15] Für die Punktion ist keine lokale Anästhesie erforderlich. Bei der Durchführung ist darauf zu achten, den Kolben der Spritze erst bei richtiger Lage in das zu untersuchende Tumorgewebe zurückzuziehen. Die Nadel wird unter Aspiration bei ausreichender Größe des Tumors vor- und zurückgezogen. Nach Beendigung der Punktion wird der Kolben sorgfältig gelassen und von der Nadel entfernt, bevor die Nadel aus dem Gewebe gezogen wird, um Verletzungen von Nachbarorganen bei eventuell noch bestehendem Unterdruck zu vermeiden. [18] Ohne direkt invasiv vorzugehen, kann so eine Aussage über die Dignität einer Gewebsveränderung getroffen werden. Der Erfolg der Punktion ist von der Erfahrung des Punkteurs und von der Einhaltung technischer Abläufe abhängig. Bei erfahrenen Klinikern beträgt die Rate der Fehlpunktionen weniger als 10%. Entscheidend für die Menge an beurteilbaren Zellen ist nicht nur eine exakte Punktion, auch die Zusammensetzung des punktierten Gewebes ist für den Zellgehalt entscheidend, zum Beispiel bei degenerativ verändertem Gewebe oder Narbengewebe, welche bindegewebsreich sind. [16][18] Die Sensitivität liegt laut Literatur bei 80-90%, die Spezifität bei 99-100%. Auch ein negatives Punktionsergebnis ist in Übereinstimmung mit dem klinischen Befund glaubhaft. Eine Wiederholung der Punktion und somit eine Verifizierung der Diagnose ist jederzeit möglich. [14][15] Nachdem das Material vollständig und nicht zu dünn auf mehreren Objektträgern ausgestrichen wurde, muss die Fixierung schnell mit ausreichendem Fixierungsmittel erfolgen. Für die Fixierung ist es wichtig zu wissen, welche Färbung später angewandt werden soll. Die Papanicolaou-Färbung benötigt zum Beispiel eine alkoholische Fixierung. Komplikationen bei diesem Weg der Zellgewinnung bestehen vor allem in vorübergehenden abdominalen Schmerzen, Entzündungen, Sickerblutungen und laborchemisch positiv verlaufende Pankreatitiden. [15][16][18]

Die zytologische Interpretation der gewonnenen Aspiration erfordert Erfahrung und die Kenntnis des histologisch normalen Organaufbaus sowie des histologischen Bildes der verschiedenen entzündlichen und neoplastischen, aber auch hereditären Läsionen. Eine detaillierte Beschreibung der zytologisch diagnostizierbaren Entitäten ist nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, es werden lediglich grundlegende Prinzipien dargestellt. Die zytologischen Diagnosen in der vorliegenden Arbeit erfolgten im Rahmen der Routinediagnostik und wurden von spezialisierten Pathologen des Funktionsbereichs Zytopathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf gestellt.

In Feinnadelaspiraten aus dem gesunden Pankreas zeigen sich hauptsächlich Azinuszellen und Gangepithelien. Gelegentlich kommen Zellen aus dem Punktionsweg, wie Epithel der

Magen- oder Darmschleimhaut, Mesothelien oder Leberepithelien, im Punktat vor. [16][57] Diese sind gelegentlich schwer von einer organeigenen Läsion abzugrenzen. Entscheidend und zugleich am schwierigsten ist die Differenzierung zwischen einer chronischen Pankreatitis und einem duktalem Adenokarzinom. Bei der chronischen Pankreatitis findet sich im Aspirat eine bunte Vielfalt von verschiedenen Entzündungszellen, sowie regenerativ veränderte Epithelien. Eine gewisse Überschneidung in der Zytomorphologie reaktiver und neoplastischer Zellveränderungen macht hier zum Teil eine rein mikroskopische Unterscheidung gutartiger und bösartiger Zellveränderungen unmöglich. Es wurden daher, wie auch für andere Organsysteme üblich, unklare Diagnosekategorien wie „zweifelhaft“ oder „dringender Verdacht“ eingeführt (vgl. Kapitel 2.3.2). Bei einem duktalem Adenokarzinom enthält das Punktat meist mehr Zellen, außerdem liegen die Verbände eher in dreidimensionalen Haufen, oder es besteht eine Abweichung von einer regelhaften bienenwabenartigen Lagerungsform der Zellverbände („*drunken honeycombs*“). Zusätzlich sprechen Kernatypien mit Kerngrößenvariabilität, deutlichem Nucleolus, unregelmäßiger Kernkontur und Chromatinstruktur sowie Hypo- oder Hyperchromasie für ein Karzinom. [114][16] Im Falle eines malignen Tumors sollte die Differenzierung (Grading) geklärt werden. Zusätzliche molekularbiologische Methoden, welche an zytologischen Präparaten sehr gut durchzuführen sind, ermöglichen oft eine eindeutige Zuordnung bzw. die Identifikation spezifischer Genveränderungen für die Indikationsstellung einer gezielten Tumorthherapie. Für die Differenzierung zwischen malignen und benignen Tumoren sind verschiedene Malignitätskriterien der Zytologie beschrieben. Grundsätzlich ist zu sagen, dass mit steigendem Malignitätsgrad und damit auch zunehmender DNA-Aneuploidie, die Zellmorphologie immer weiter von der Zellmorphologie des Ausgangsgewebes abweicht. [17][32]

Die zytologische Klassifikation erfolgte in der vorliegenden Studienkohorte der Jahrgänge 2011 und 2012 nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaften für Pathologie und Zytologie [11] Es werden hier fünf verschiedene Diagnosekategorien je nach Auswertbarkeit und Malignitätswahrscheinlichkeit unterschieden. Es wird klassifiziert in die Kategorien „diagnostisch unzureichend“, „negativ“, „zweifelhaft“, „dringender Verdacht“ und „positiv“. Eine genauere Beschreibung erfolgt in Kapitel 2.3.2. Diese bereits 1998 vorgeschlagene Klassifikation ist in der deutschen Zytopathologie nach wie vor für verschiedenste Präparationen in der extragynäkologischen Zytologie gebräuchlich. In den letzteren Jahren sind Bemühungen einer international einheitlichen Klassifikation entstanden und 2014 publiziert worden. [77] Durch die Papanicolaou Society of Cytopathology wurde eine Richtlinie zur Einteilung von Proben der FNA des pankreaticobilären Systems entwickelt. Dabei kommen sechs Kategorien zum Einsatz: ohne relevante Zellen, negativ, atypisch, neoplastisch (benigne oder andere), verdächtig und positiv/maligne. Da diese Klassifikation bereits gute Treffsicherheiten erbracht hat [113] und die Einführung einer gegenüber dem deutschen System zusätzlichen Kategorie des Nachweises neoplastischer Zellen als ebenso „positiv“ für den Kliniker gut verständlich ist, soll sie im Folgenden näher dargestellt werden.

Bei fehlenden relevanten Zellen handelt es sich meist um ein technisches Problem der Probengewinnung. Trotzdem sollte dieses Ergebnis in einen klinischen Zusammenhang gebracht werden, zum Beispiel sprechen fehlende epitheliale Zellen für eine Pseudozyste. Allerdings ist eine zelluläre Atypie durch eine Probe ohne relevante Zellen nicht zu beurteilen.

Ein negatives Ergebnis bedeutet, dass keine malignen oder atypischen Zellen in der Zytologie vorkommen und ist nicht automatisch gleichzusetzen mit einem gutartigen Befund, wie einer chronischen Pankreatitis oder einer Pseudozyste, ohne dem Vorliegen einer zusätzlichen zytologischen Interpretation. Es bedeutet aber, dass ausreichend zelluläres Material gewonnen wurde. Im Fall, dass sowohl klinisch und bildgebend der dringende Verdacht auf ein Pankreaskarzinom vorliegt, wird von einem falsch negativem Ergebnis ausgegangen. Die falsch negativ Rate bei soliden Tumoren liegt bei ca. 15%, bei zystischen Läsionen mit 60% deutlich höher.

In die Kategorie atypisch fallen verschiedene Gruppen: reaktive Veränderungen, wenig Zellmaterial, aber auch prä-maligne Veränderungen (Dysplasien). Das Malignitätsrisiko liegt hier je nach Studie zwischen 44% und 82%. In der Befundkategorie atypisch zeigt sich neben normalem Gewebe auch reaktives Gewebe, welches aber zytologisch gut zu beurteilen ist. Es ist möglich, dass aufgrund von Überschneidungen in der Zytomorphologie reaktiver und neoplastischer Zellveränderungen in dem Vorliegenden Material eine Neoplasie vorliegt, aber die vorhandenen zytologischen Veränderungen zeigen keinen hochgradigen Malignitätsverdacht. Über eine Kontrolluntersuchung sollte nachgedacht werden.

Die Kategorie neoplastisch stellt eine besondere Kategorie dar, hierbei kann es sich um eine benigne Neoplasie handeln, zum Beispiel ein seröses Zystadenom, oder eine andere Neoplasie, hierzu zählen IPMN, prä-maligne muzinöse Zystadenome, neuroendokrine Tumoren oder solide-pseudopapilläre Neoplasien.

Diese Tumoren sind oft gut differenziert, wachsen langsam, besitzen aber maligne Eigenschaften. Die Einordnung in diese Kategorie hilft bei der Abgrenzung zu aggressiven Neoplasien und bei der Unterscheidung der Behandlungsoptionen. Es gilt bezüglich möglicher zystischer Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms, wie IPMN oder MCN, dass zwei wichtige Fragen zu klären sind. Erstens die Zuordnung zu einer muzinösen oder nicht muzinösen Zyste, zweitens die Beurteilung des Atypiegrades der vorliegenden Epithelzellen.

Die Kategorie „Verdacht auf Malignität“ wird insbesondere bei Verdacht auf das Adenokarzinom des Pankreas verwendet, kann aber auch bei Verdacht auf andere aggressiv maligne Tumorentitäten angewandt werden. Eine verdächtige Läsion ist noch keine bestätigte Diagnose und muss mit Klinik und Bildgebung korreliert werden. Diese Kategorie ist gerechtfertigt, da das duktales Karzinom manchmal zytologisch nicht eindeutig gesichert werden kann. So können Pankreaskarzinome gut differenziert und damit schwer als maligne zu erkennen sein, die EUS-FNA weist manchmal eine nur geringe Anzahl an repräsentativen atypischen Zellen auf und eine Kontamination durch reaktiv veränderte Epithelien aus dem

Gastrointestinaltrakt kann die Zuordnung der suspekten Zellen erschweren. In dieser diagnostischen Kategorie besteht bei EUS-FNA ein Malignitätsrisiko von 96%. Wird diese zytologische Kategorie gewählt, ist eine therapeutische Intervention zu rechtfertigen.

Als positiv oder maligne werden aggressive Tumore eingeordnet, wie das duktales Adenokarzinom des Pankreas, mit eindeutigen Malignitätskriterien. [77]

1.6 Untersuchung von Chromosomenaberrationen mit Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Maligne Tumoren gehen mit einer Akkumulation genetischer Veränderungen einher. [1] Diese Veränderungen der Chromosomen können mithilfe von molekularbiologischen Methoden wie der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) dargestellt werden. [18] Dieses Verfahren lässt sich besonders gut in der Zytologie anwenden, da bei zytologischen Präparaten im Gegensatz zu histologischen Präparaten die Zellkerne nicht geschnitten, und damit noch vollständig sind. Dabei werden einzelne Abschnitte der DNA bis hin zu ganzen Chromosomensträngen durch sogenannte DNA-Sonden markiert und quantifiziert. [110] Bei der FISH-Sonde handelt es sich um eine einsträngige DNA-Sequenz. Die Sonde lagert sich nach Denaturierung der Ziel-DNA an die komplementäre DNA-Sequenz eines Chromosoms an. [90] Dadurch ist es möglich, numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen nachzuweisen. [18] Chromosomenaberrationen sind Veränderungen der DNA, welche die Struktur, die Anzahl von Chromosomen oder Genen betreffen. Unterschieden werden numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen.

Zu den numerischen Chromosomenaberrationen zählen Aneuploidie, Polyploidie und die Sonderform der euploiden Polyploidie. Bei der Aneuploidie kommt es zum Zugewinn oder Fehlen einzelner Chromosomen. Bei Karzinomen zeigen sich ausgeprägte Formen der Aneuploidie mit mehreren Anomalien zur gleichen Zeit. [101] Eine Polyploidie liegt vor, wenn alle Chromosomen mehr als zweimal vorkommen. [59] Eine bei der diagnostischen Anwendung zu beachtende Ausnahme stellen euploid-polyploide Chromosomensätze, zum Beispiel tetraploide, oktaploide und so weiter, dar. Diese finden sich in einigen Organen physiologisch, aber auch in reaktiv oder entzündlich veränderten Geweben, z.B. Urothelien, und ergeben keinen Hinweis auf eine Neoplasie. [9] Veränderungen des Chromosomensatzes können auch einzelne Chromosomen betreffen, dann unterscheidet man zwischen dem Verlust eines Chromosoms, Monosomie, oder dem Zugewinn, Polysomie. Die Polysomie ist meist durch chromosomale Instabilität verursacht. Durch die Vervielfältigung von Genabschnitten oder ganzen Chromosomen ist eine Aktivierung von Onkogenen möglich. [90]

Strukturelle Chromosomenaberrationen sind Veränderungen einzelner Chromosomen, welche meist auf Bruchstellen im Chromosom zurückzuführen sind. Dazu gehören Deletionen, Insertionen, Inversionen, Translokationen und Duplikationen.

Als Deletion wird der Verlust eines chromosomalen Abschnitts bezeichnet. Hierbei kann es sich um eine einzelne Base handeln oder um größere Sequenzen. Bei der Deletion kann es zum Verlust von Tumorsuppressorgen kommen. Zu unterscheiden ist, ob beide Genabschnitte gleichzeitig betroffen sind (homozygote Deletion), oder ob nur eines der zwei Chromosomen eine Deletion aufweist (heterozygote Deletion). Im Fall einer Polysomie kann eine relative Deletion vorliegen, wenn in Relation zum gesamten Chromosom oder zum vorliegenden Chromosomensatz die Kopienzahl des zu untersuchenden Gens geringer ist. [22]

Im Gegensatz zu Protein- bzw. Expressionsmarkern, welche auch bei Gesunden schwanken können, kommen nicht hereditäre Chromosomenaberrationen praktisch nur in neoplastisch veränderten Zellen vor. Eine Ausnahme bildet die euploide Polyploidisierung, das Vorliegen ganzzahliger Verdopplungen von Chromosomensätzen (2^n), z.B. einem tetraploiden Chromosomensatz. Diese finden sich auch in reaktiv veränderten Geweben, zum Beispiel auf Grund von Entzündungsprozessen. [90] Die FISH kommt in vielen Bereichen der Diagnostik zur Anwendung, da eine chromosomale Aberration detektiert oder eine vollständige Karyotypisierung durchgeführt werden kann. [63] Auch können chromosomale oder genetische Veränderungen bei Malignomen, wie zum Beispiel beim Harnblasenkarzinom, Lungenkarzinom, malignen Mesotheliom, Mammakarzinom oder leukämischen Erkrankungen, detektiert werden. [25][64][90]

Eine besondere Anwendung, die sich insbesondere für nicht geschnittene und damit vollständige Zellen im zytologischen Untersuchungsgut eignet, ist der simultane Einsatz von vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten FISH-Sonden. So können innerhalb eines Zellkerns je nach Auswahl der DNA-Sonden unterschiedliche Chromosomen und Gene untersucht werden. Die oft bei malignen Tumoren vorliegenden numerischen Chromosomenaberrationen im Sinne einer Aneuploidie werden mittels FISH mit verschiedenen Auswertungsalgorithmen detektiert. Es können somit bei deren Fehlen gutartige von bösartigen Zellen unterschieden werden. Diese Mehrfarben-FISH bietet sich insbesondere zur weiteren Abklärung diagnostisch nicht eindeutig klassifizierter, z.B. „zweifelhafter“ oder „dringend tumorverdächtiger“ Befunde an. Insbesondere ist die FISH an konventionell gefärbten und vorbefundeten zytologischen Präparaten möglich. So können gleiche Zellen sowohl zytologisch-mikroskopisch als auch mittels FISH beurteilt werden. Dies wurde bereits für verschiedene zytologische Untersuchungsmaterialien in der Literatur beschrieben, u.a. für Urin, Gallenwegszytologie und endobronchiale Zytologie. [90][93] Die diagnostische Anwendung der Mehrfarben-FISH bei Pankreaskarzinomen ist sowohl an histologischem als mittlerweile auch am zytologischen Untersuchungsmaterial beschrieben, wobei zum Beginn der eigenen Untersuchungen an EUS-FNA des Pankreas nur eine diesbezügliche Publikation vorlag. [29][62][106]

1.7 Pathogenese des Pankreaskarzinoms

In der Pathogenese des Pankreaskarzinoms spielt vor allem die Akkumulation von Chromosomenanomalien, wie Punktmutationen, Amplifikationen, Deletionen, Translokationen und Inversionen, eine entscheidende Rolle. Pankreaskarzinome zeigen sich in einem hohen Maß (bis zu 97%) aneuploid, was den Einsatz der Mehrfarben-FISH in der diagnostischen Abgrenzung zu reaktiven Läsionen ermöglicht. [22][29] Man konnte feststellen, dass eine Akkumulation verschiedener Genmutationen zur Tumorprogression führt. Die Kanzerogenese führt möglicherweise ausgehend von zentroazinären Zellen über präneoplastische Veränderungen zum duktalem Adenokarzinom. Entscheidend ist dabei die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. [41] Die Dysregulation des Zellzyklus ist kennzeichnend für den aggressiven klinischen Verlauf des Pankreaskarzinoms. [36] Im Vergleich zu anderen malignen Veränderungen zeigen Pankreaskarzinome die größte Anzahl an Mutationen pro Tumor. [45]

Tumorsuppressorgene wirken wachstumshemmend und differenzierungsinduzierend durch die Beendigung oder Reduktion der positiven Wachstumssignale. [36] Tumorsuppressorgene besitzen rezessive Eigenschaften. Das bedeutet, dass beide Allele defekt oder supprimiert sein müssen, um die Funktion eines Gens auszuschalten. Meist handelt es sich um eine Mutation oder den Verlust größerer chromosomaler Regionen, bei denen dann nur noch ein Allel vorhanden ist. [58] Bei verschiedenen Karzinomentitäten kommt die Mutation des Tumorsuppressorgens p53, das für die Zellzykluskontrolle zuständig ist, am häufigsten vor. Im Pankreaskarzinom zeigt sie sich in 70% der Fälle. [22][48][81] Das Tumorsuppressorgen p53 befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17. [39] Das Tumorsuppressorgen CDKN2A, welches für das Protein p16 kodiert, befindet sich auf dem Chromosom 9p21. [5] Es gehört wie p53 zu den Zellzykluskontrollgenen und induziert die Expression inhibitorischer Proteine. [96] Im Pankreaskarzinom finden sich bei ca. 98% eine Inaktivierung des Gens, eine Mutation weisen 38% auf und 41% zeigen eine homozygote Deletion. [24][22][95] Die Dysregulation der Zellzykluskontrolle bewirkt einen aggressiven klinischen Verlauf. [36] Schon bei den Karzinomvorstufen wie der IPMN kann man chromosomale Anomalien auch mittels FISH nachweisen. So wurde eine adenomatöse Veränderung der IPMN in Zusammenhang gebracht mit der Deletion vom Tumorsuppressorgen p16. Ein Risikomarker für ein assoziiertes Karzinom bei einer IPMN ist die Deletion des Tumorsuppressorgens p53. [68]

Die Zentromer-Region des Chromosom 17 und der kurze Arm des Chromosom 9p21 wurden neben den Zentromerregionen der Chromosomen 3 und 7 in der eigenen Versuchsreihe mit Hilfe der Mehrfarben FISH mikroskopisch dargestellt. Diese ist in einer kommerziell erhältlichen FISH-Sonden-Kombination (UroVysion™) enthalten. Vergleiche Kapitel „2.4 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung“.

1.8 Problemstellung und methodischer Ansatz der Arbeit

Die Dignität einer tumorösen Veränderungen im Pankreas ist oft allein durch bildgebende Verfahren nicht zu stellen. Die Zytologie spielt für die präoperative Diagnostik eine wichtige Rolle. [16] Hierdurch ist häufig eine Tumorklassifikation, zum Beispiel duktales Adenokarzinom, Azinuszellkarzinom oder NET, möglich. Entscheidend für die weitere Therapieplanung ist aber auf jeden Fall die Bestimmung der Dignität der in der Bildgebung suspekten Läsion. Es gibt allerdings Fälle, in denen kein eindeutig Tumor-positiver oder -negativer Befund erhoben werden kann. [12] Um diese diagnostisch zweifelhaften oder dringend verdächtigen Fälle klären zu können, wird eine zusätzliche, über die mikroskopisch-morphologische Diagnostik hinausgehende Methode benötigt. Als Untersuchungsmethode kann hier am gleichen, bereits entnommenen Untersuchungsmaterial die FISH angeschlossen werden. In der zytologischen Tumordiagnostik an den ableitenden Gallenwegen und anderer Organe wurde bereits dargestellt, dass die Kombination der zytologischen Diagnose mit der Bestimmung chromosomaler Aberrationen mittels FISH oftmals eine eindeutig Tumor-positive oder -negative Diagnose ermöglicht.

In dieser Studie soll geklärt werden, ob der obige Sachverhalt auch für das Untersuchungsmaterial aus dem „endosonographisch gesteuerten Feinnadelpunktat des Pankreas“, das dem Funktionsbereich Zytopathologie der Uniklinik Düsseldorf eingesandt wurde, zutrifft. So wurden alle zellhaltigen Pankreaspunktate solider und zystischer Läsionen der Jahre 2011 und 2012 zusätzlich zur Zytologie mit Hilfe der FISH untersucht. Neben den zytologisch nicht eindeutig Tumor-positiven oder -negativen Präparaten, wurden auch sicher Tumorzell-haltige (positive) sowie Tumorzell-freie (negative) Präparate einbezogen. Der Vergleich mit dem *Follow-up* der Patienten ermöglichte die Etablierung eines Schwellenwertes für die FISH, wie sie in der Aneuploidie-Diagnostik üblich ist. In der vorliegenden Arbeit wird das kommerziell erhältliche UroVysion Sonden-Kit (Abbott Molecular, Abbott Park, Illinois), welches Zentromer-Proben für Chromosomen 3, 7, und 17 sowie eine Lokus-spezifische Probe für 9p21 enthält, verwendet.

Ziel ist es, durch Kombination der Zytologie mit anschließender FISH die Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik an endosonographisch gewonnenen Feinnadelpunktaten des Pankreas zu bestimmen. Anzunehmen ist, wie auch bereits für andere Organsysteme beschrieben, eine Steigerung der Treffsicherheit.

2 Material und Methoden

Diese Arbeit umfasst zwei Abschnitte, zum einen die Aufbereitung der zytologischen Präparate, deren Untersuchung mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und deren Auswertung und zum anderen die Datenerhebung des klinischen Verlaufs des zuvor untersuchten Patientenkollektivs.

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten (Anmeldung bei der Medical Research School Düsseldorf am 23.05.2011) wurde in der damals gültigen Promotionsordnung noch kein positives Ethikvotum gefordert. Es wurde aber nachträglich ein Ethikantrag gestellt, da im Verlauf der Jahre 2012 und 2013 die Notwendigkeit eines positiven Ethikvotums seitens der Promotionskommission von jedem Doktoranden gesehen wurde. Dieser wurde unter der Studiennummer 4181 am 22.02.2013 positiv beurteilt. Der Titel des Antrages lautet "Adjuvante Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) nach diagnostisch unklarer Zytologie von Feinnadelaspirationsbiopsien des Pankreas".

2.1 Patientenkollektiv und Studienaufbau

Bei unserer Versuchsreihe handelt es sich um eine retrospektive Kohortenstudie. Hierbei werden die Fälle entsprechend einer Längsschnittstudie untersucht und die Daten zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhoben. Während des Beobachtungs- oder *Follow-Up*-Zeitraumes wird das Auftreten eines zuvor definierten Ereignisses erfasst. Die ausgewählten Stichproben werden nach exponierten und nicht exponierten Personen, in unserem Fall nach Karzinom vorhanden oder nicht vorhanden, unterschieden und bilden eine Kohorte. [61]

Insgesamt beziehen sich die Einsendungen auf den Zeitraum von Januar 2011 bis Dezember 2012. Alle Proben stammen aus dem Eingang des Funktionsbereichs Zytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf. Insgesamt wurden Pankreaspunktate von 24 einsendenden Kliniken in der vorliegenden Studie untersucht. Die einsendenden Kliniken sind in Düsseldorf oder im näheren Umkreis angesiedelt. Das Patientenkollektiv setzt sich aus Patienten zusammen, bei denen der Verdacht auf eine karzinomverdächtige Raumforderung im Pankreas bestand. Diese wurde mit Hilfe der endosonographisch gesteuerten Feinnadelaspiration (EUS-FNA) diagnostisch abgeklärt. Eingesandt wurden fertige Ausstrichpräparate, welche durch den Punkteur unmittelbar nach der Punktion erstellt wurden.

Zunächst erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik eine zytopathologische mikroskopische Diagnostik (vgl. Kapitel 2.3). Die Diagnosekategorien „zweifelhaft“ und „dringender Verdacht“ wurden hierbei bezüglich der weiteren Notwendigkeit der Abklärung mittels Mehrfarben-FISH als „diagnostisch unklare“ Diagnosen zusammengefasst. Bei der Auswertung der Treffsicherheit der zytopathologisch mikroskopischen Diagnostik wurden „zweifelhafte“ und „dringend verdächtige“ Punktate aber wieder getrennt betrachtet.

Zusätzlich wurden alle Patienten mit positiven Diagnosen als Positivkontrolle und alle mit negativen Diagnosen als Negativkontrolle im oben vorgegebenen Zeitraum mittels FISH untersucht, um die Häufigkeit falsch positiver oder falsch negativer Untersuchungsbefunde zu ermitteln.

Eingeschlossen wurden alle im Untersuchungszeitraum eingegangenen EUS-FNA eines Patienten in der Zytopathologie, gegebenenfalls auch wiederholte EUS-FNA eines Patienten, da dies erfahrungsgemäß die Treffsicherheit erhöht. In die Kohortenstudie wurden alle Präparate der Feinnadelaspiration eingeschlossen, bei denen eine ausreichende Anzahl beurteilbarer pankreatisch epithelialer Zellen vorhanden war. Punktate von zellfreien zystischen Läsionen, insbesondere Pseudozysten, wurden somit ausgeschlossen.

Ebenfalls ausgeschlossen wurden Präparate, von denen nach der zytologischen Routineuntersuchung keine Objektträger mehr für die FISH zur Verfügung standen, sowie zytologisch unzureichende Untersuchungsmaterialien. Ebenso wurden Proben von Patienten ausgeschlossen, deren zytologisch positive Diagnose einen gutartigen Tumor ergab. Diese wenigen Präparate wurden zwar aus wissenschaftlichem Interesse mituntersucht. Es geht in der Studie aber primär um den Nachweis von malignen Tumoren des Pankreas in Abgrenzung zu reaktiven Veränderungen, zum Beispiel bei chronischer Pankreatitis. Es wurde keine weitere Vorauswahl getroffen. Die Treffsicherheit der zytologischen Befunde und der FISH-Ergebnisse wurden abschließend mittels klinischem *Follow Up* bestimmt. Eine detaillierte Darstellung findet sich in den Kapiteln „2.5 Klinisches *Follow-Up*“ und „3.1 Studienausschluss und *Follow-up*“.

2.2 Abgrenzung der eigenen Leistung

Die Herstellung der Ausstrichpräparate der EUS-gesteuerten Pankreaspunktate erfolgte durch den jeweiligen Punkteur. Die Präparate wurden von Medizinisch-technischen Assistentinnen des Funktionsbereichs Zytopathologie nach Papanicolaou gefärbt. Die mikroskopische Befundung erfolgte durch Prof. Dr. S. Biesterfeld und Dr. N. Pomjanski, beide Fachärzte für Pathologie am Funktionsbereich Zytopathologie. Die vorab geschilderten Verfahren sind Teil der Patientenversorgung und nicht Teil, aber Voraussetzung für die vorliegende Arbeit zur Treffsicherheit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Pankreaspunktaten.

Die FISH der von Januar 2011 bis November 2011 eingesandten Präparate wurden retrospektiv durch mich als Doktorandin untersucht. Dies bezieht sich auf sämtliche Laboruntersuchungen (FISH-Protokoll und Auswertung). Es sind 137 Proben (Präparate mit Kürzel "P"), darunter 32 mit diagnostisch unklarer Zytologie. Die ersten 20 Präparate wurden im Rahmen der Einarbeitungsphase in Doppelbestimmung (zusätzlich durch Frau Kazimirek, MTA am Funktionsbereich Zytopathologie) untersucht, bei Diskrepanz erfolgte eine dritte Durchsicht (Dr. Schramm, Arzt am Funktionsbereich Zytopathologie) und es wurde eine Mehrheitsentscheidung getroffen. Diese Ergebnisse sind in Kapitel „3.8.1 Diskrepante Fälle“

dargestellt. Die Präparate des Zeitraumes Dezember 2011 bis Dezember 2012 wurden durch Frau Kazimirek untersucht. Dies waren 136 Proben (Präparate mit Kürzel "UP"), davon 36 nach diagnostisch unklarer Zytologie. Die Erhebung des *Follow-Up* durch Einsichtnahme in die Patientenakten sowie die Auswertung erfolgte ausschließlich durch mich.

2.3 EUS-FNA und zytologische Diagnostik

Die Indikation zur zytologischen Diagnostik von Läsionen des Pankreas besteht in der Abklärung einer Raumforderung, welche den Verdacht auf ein Pankreaskarzinom nahelegt. [14]

Die Punktion über die Endosonographie (EUS-FNA) ist ein häufig gewähltes Vorgehen. Das Pankreas ist mit einer hohen Treffsicherheit punktierbar. Entlang des Magen-Darm-Trakts sind Nachbarorgane, wie z.B. das Pankreas, mittels durch die Wand des Hohlorgans geführten dünnen Nadeln gut erreichbar. [15][16] Der Nachteil liegt darin, dass mitaspierte Epithelien des Gastrointestinaltrakts zu Fehldiagnosen, insbesondere von zystischen Läsionen, wie z.B. einer IPMN, führen können. [16] Komplikationen treten bei der EUS-FNA in 1-2% der Fälle auf. [75] Häufig sind dies: abdominelle Schmerzen, Blutungen in punktierte Zysten, Sickerblutungen in den Magen-Darm-Trakt und eine subklinisch verlaufende Pankreatitis. [15] Die Rate der Komplikationen bei Stanzbiopsien (9%) und Keilexzisionen (3%) ist wesentlich höher. Unzureichendes Untersuchungsmaterial kommt in 10-20% der Fälle vor und ist bei kleinen Tumoren häufiger. [14][16]

Dünne Ausstriche sollten sofort alkoholisch fixiert werden. [15] Durch die Fixierung kommt es zum Wasserentzug, um Abbauvorgänge im entnommenen Material aufzuhalten. Fixierungen können über Lufttrocknung oder Feuchtfixierung erfolgen. In der eigenen Versuchsreihe wurden die Ausstriche auf Glasobjektträger durch den Punkteur mit Hilfe von Alkohol feucht fixiert. Die Punkteure gehören in der Regel den gastroenterologischen Abteilungen der jeweiligen Kliniken an. Durch die Fixierung mit Alkohol ist eine Standardfärbung nach Papanicolaou möglich. Zellkerne werden blau bis schwarz angefärbt, das Zytoplasma erscheint zyanophil bis eosinophil, Nukleolen schwarz bis rot und Erythrozyten rot. [33] Die Färbung nach Papanicolaou und das Procedere im Institut für Zytopathologie der Uniklinik Düsseldorf wird im Abschnitt 2.3.1 weiter beschrieben.

Die allgemeine zytologische Diagnostik beinhaltet die mikroskopische Untersuchung der Zelle mit ihrem Zellkern und dem Zytoplasma. Für jede Zellart zeigt sich eine definierte Kern-Plasma-Relation. [34] In der Zytologie werden Einzelzellen oder aus dem anatomischen Kontext herausgelöste Zellverbände beurteilt, die Beurteilung von strukturellen Gegebenheiten ist daher nicht möglich. Die zytologische Untersuchung erfolgte in der eigenen Versuchsreihe durch Prof. Dr. S. Biesterfeld und Dr. N. Pomjanski, beide Fachärzte für Pathologie am Funktionsbereich Zytopathologie. Die diagnostische Klassifikation ist in Abschnitt 2.3.2 beschrieben.

Nach der mikroskopischen Untersuchung kann das gewonnene Material weiter immunhistochemisch oder molekularbiologisch untersucht werden. [15] In der eigenen Versuchsreihe sind die molekularbiologischen Methoden von besonderer Bedeutung. Die gewonnenen zytologischen Präparate wurden zusätzlich mittels Mehrfarben-FISH untersucht, siehe „2.4 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung“. Neben der FISH kommt im Funktionsbereich Zytopathologie zusätzlich die DNA-Zytometrie als morphometrisch basierte Methode zur Abklärung unklarer zytologischer Befunde zum Einsatz. Hierbei wird ein zytologisches Präparat nach Feulgen umgefärbt und die Farbintensität sowie die Fläche von normalen Zellen mit suspekten Zellen im gleichen Untersuchungsmaterial verglichen. Es werden hierbei ca. 30 normale Zellen und ca. 300 Analysezellen benötigt. Der Messwert aus Farbintensität und Fläche eines Zellkerns wird integrierte optische Dichte genannt und kann nach Eichung mit den normalen Zellen dem DNA-Gehalt eines diploiden Chromosomensatzes zugeordnet werden. Jetzt kann der DNA-Gehalt der Analysezellen ermittelt und in einem Histogramm aufgetragen werden. Durch derartige Messung der DNA-Ploidie können gutartige von bösartigen Läsionen mit guter Treffsicherheit unterschieden werden. [10]

2.3.1 Färbung der Präparate nach Papanicolaou

Zu den verschiedenen Färbemethoden in der Zytologie gehört die Färbung nach Papanicolaou, welche im Funktionsbereich Zytopathologie Düsseldorf die meistverwendete Färbung darstellt. Hierbei wurde die Hämatoxylin-Eosinfärbung (HE-Färbung) zur besseren Darstellung der zyklusbedingten Veränderungen des Vaginalepithels weiterentwickelt. Zu Beginn fand die Methode Anwendung in der gynäkologischen Früherkennungsuntersuchung, später auch in anderen zytologischen Tumordiagnostiken. [16]

Die Vorteile liegen in der besseren Darstellung der Chromatinstrukturen im Zellkern, außerdem sind Störfaktoren, wie Blut oder Fibrin, durch den sehr dünnen Zellausstrich weniger ein Problem. Zellen, die in Sekreten liegen, sind in ihrer Darstellung nicht eingeschränkt und können beurteilt werden. [16]

Die gute Chromatindarstellung bringt allerdings Nachteile in der Darstellung des Zytoplasmas. Zwar ist die Präparation im Vergleich zur Trockenfixation zeit- und arbeitsaufwendiger. Die Ausstriche müssen feucht gehalten und vor Licht geschützt werden, da sie sonst sehr schnell verblassen. Die höhere Sicherheit in der Tumordiagnostik lohnt aber den Aufwand. Verblasste Präparate können nahezu beliebig oft neu eingefärbt werden, ohne dass Zellgehalt, Zellerhalt oder Beurteilbarkeit leiden. [16]

Der Arbeitsaufwand konnte durch Färbeautomaten deutlich reduziert werden. Im Funktionsbereich Zytopathologie Düsseldorf wird der Färbeautomat Varistain der Firma Thermo-Electron verwendet.

Die Papanicolaou-Färbung der Pankreaspunktate der vorliegenden Studienpopulation wurde von Medizinisch-technischen Assistentinnen des Funktionsbereichs Zytopathologie unter Verwendung von Standardprotokollen angefertigt.

2.3.2 Beurteilung und Interpretation in der Zytologie

Aspirate aus dem gesunden Pankreas enthalten hauptsächlich Azinuszellen und Gangepithelien. Gelegentlich kommen durch die Aspiration auch Zellen aus dem Punktionsweg wie Epithel der Magen- oder Darmschleimhaut, Mesothelien oder Leberepithelien im Punktat vor. Die pathologischen Veränderungen lassen sich grob in neoplastisch (vgl. Kapitel 1.3) und nichtneoplastisch einteilen. [16][57] Da sich die Zytomorphologie von reaktiven Veränderungen, wie z.B. bei Regeneration des Epithels bei Pankreatitiden, und neoplastischen Veränderungen überschneiden können, lassen sich zytologische Präparate nicht immer sicher als gutartig (Diagnosekategorie „negativ“) oder bösartig (Diagnosekategorie „positiv“) klassifizieren. Dies ist ein Unterschied zur histologischen Diagnostik am Resektat, wo der anatomische Zusammenhang einer Läsion, und damit z.B. ein invasives Tumorwachstum, gut dargestellt wird. Es gibt daher in der zytomorphologischen Diagnostik notwendigerweise unklare diagnostische Kategorien. Entsprechend einer Empfehlung der Deutschen Gesellschaften für Pathologie und Zytologie von 1998 [13], werden zytologische Diagnosen gemäß ihrer Malignitätswahrscheinlichkeit, wie für zytologische Klassifikationen traditionell üblich, klassifiziert.

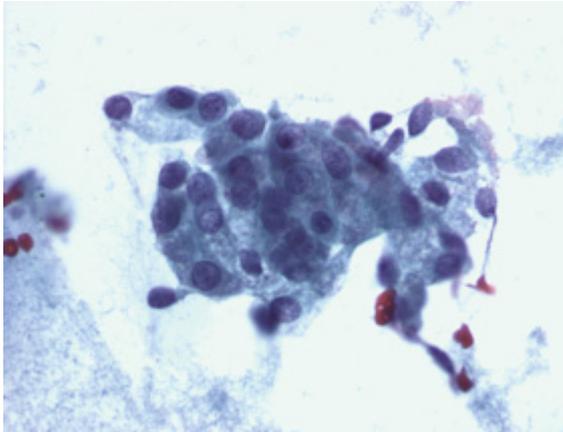
Folgende Kategorien der zytologischen Diagnosen werden dabei unterschieden: Unzureichend, negativ, zweifelhaft, dringender Verdacht und positiv, vergleiche Tabelle 3: Die histogenetische Klassifikation wird so genau wie möglich ermittelt. [13]

Diagnose Kategorien	Beschreibung
Unzureichend	Zu wenig / falsches Zellmaterial, starke Lufttrocknungsartefakte, starke Zellüberlagerungen, ggf. mit Begründung (z.B. falscher Zelltyp),
Negativ	Keine malignen Zellen
Zweifelhaft	Maligne Zellen nicht sicher auszuschließen, wenige abnorme Zellen unklarer Dignität, starke Lufttrocknungsartefakte machen eine sichere Tumordiagnose unmöglich. Die Wahrscheinlichkeit eines malignen Tumors beträgt ca. 30%.
Dringender Verdacht	Maligne Zellen wahrscheinlich, wenige atypische Zellen unklarer Dignität. Die Wahrscheinlichkeit eines malignen Tumors beträgt 70%.
Positiv	Maligne Zellen nachgewiesen

Tabelle 3 Klassifikation zytologischer Befunde nach Empfehlung der Deutschen Gesellschaften für Pathologie und Zytologie [13]

Beispiele zytologischer Präparate von Pankreaspunktaten verschiedener Diagnosekategorien zeigen Abb. 1 und Abb. 2.

(1)



(2)

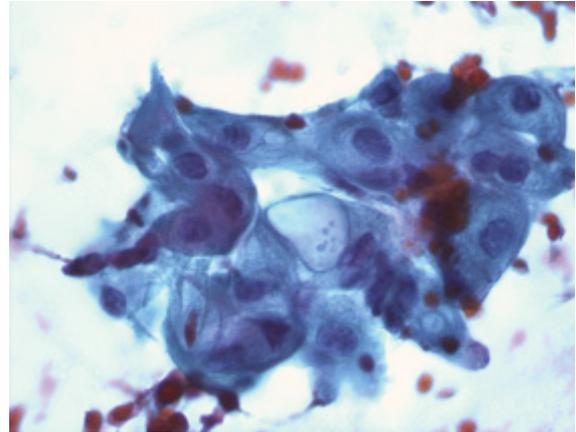
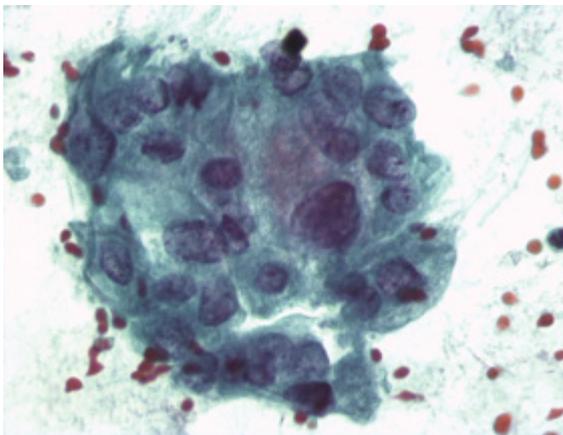


Abb. 1 (1) negative Zytologie UP134; (2) zweifelhafte Zytologie P107, jeweils 40x Vergrößerung, Färbung nach Papanicolaou

(3)



(4)

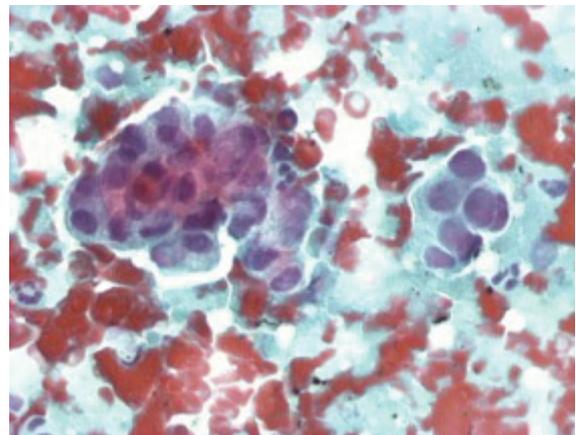


Abb. 2 (3) dringend verdächtige Zytologie UP113; (4) positive Zytologie UP138, jeweils 40x Vergrößerung, Färbung nach Papanicolaou

2.4 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Der Vorteil der zytologischen Gewinnung liegt in der Vollständigkeit des Zellkerns und die Möglichkeit der Aussage über den Chromosomengehalt oder mögliche numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen. Bei histologischen Präparaten werden die Zellkerne häufig angeschnitten und es ist nicht möglich, von einem vollständigen DNA Gehalt auszugehen. [16]

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) gehört zu den molekularbiologischen Methoden der Zytologie. Dabei werden einzelne Bereiche der DNA oder ganze Chromosomen dargestellt und es lassen sich numerische sowie strukturelle Chromosomenaberrationen nachweisen. Bei den mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelten DNA Sonden handelt es sich um denaturierte, einzelsträngige Sequenzen, die mit den zu untersuchenden Abschnitten hybridisieren können. [18][90] Die FISH kann hier auch in der Interphase des Zellzyklus erfolgen. [29] FISH Sonden können zwischen 30-40 und mehreren 100 Kilobasen groß sein. Ausstriche, Zytozentrifugenpräparate und Dünnschichtpräparate, sowie luft- oder alkoholfixierte zytologische Präparate sind gleichermaßen geeignet. Die Präparate können ungefärbt, aber auch mittels zytologischer Routinefärbungen (Papanicolau- oder May-Grünwald-Giemsä) vorgefärbt sein; letzteres ermöglicht die sequentielle zytologische und FISH Diagnostik am gleichen Präparat. Die Verwendung von beschichteten Objektträgern ist ratsam, dadurch verringert sich das Risiko des Abschwimmens von Zellen während des Färbeprozesses. [90]

In der vorliegenden Arbeit wird das kommerziell erhältliche UroVysion Sonden-Kit ((Abbott Molecular, Abbott Park, Illinois) verwendet. Hier handelt es sich um eine Mischprobe aus vier fluoreszenzmarkierten FISH Sonden für die Zentromer-Regionen der Chromosomen 3, 7 und 17 sowie eine Regionen-spezifische Sonde für 9p21. [19] Dieses Sonden-Kit, welches ursprünglich für die Urothelkarzinomdiagnostik entwickelt wurde, wird auch in der Abstrich-Diagnostik von Tumoren des pankreatobiliären Systems eingesetzt. [52][70][83][99]

Vor der FISH Untersuchung wurden die zytologischen Präparate, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, zunächst durch einen Facharzt der Pathologie im Rahmen der Routinediagnostik untersucht. Dabei wurden Stellen, an denen viele auffällige Zellen auffindbar waren, mit einem Filzschreiber auf dem Deckglas markiert und der Objektträger fotokopiert. Die Fotokopie macht es leichter, die Region für die Hybridisierung festzulegen und die Stelle nach der Hybridisierung mit den FISH-Sonden wieder aufzufinden, da das Deckglas abgelöst werden muss. Die Untersuchung der Präparate erfolgte anschließend dann mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops, vergleiche Kapitel 2.4.4.

2.4.1 Geräte

In Tabelle 4 sind alle verwendeten Geräte der FISH Färbung und Diagnostik aufgeführt.

	Hersteller	Typennummer
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach	WB/0B7-45 WBU 45
Wärmeschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau	B 6060
Präzisionsheizplatte	Harry Gestig GmbH, Düsseldorf	Präzitherm Type PZ-28-1T
Thermometer	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein	Checkfridge HI47-00
Pipetten	Eppendorf	10µl, 100µl, 1000µl
Zentrifuge	Qualitron	DW-41-230
Vortexer	JKA Technische Dienstleistung GmbH & Co. KG, Arnstein	Minishaker MS-1
Präzisionswaage	Kern & Sohn	EW 600-2M
Analysewaage	Satorius AG, Göttingen	Basic Plus 210 S
Kühlschrank	Liebherr International S.A., Ehingen	ES
Gefrierschrank	Liebherr International S.A., Ehingen	Comfort
Hybridisierungskasten	verdunkelter Diakasten (ohne Herstellerangabe)	
Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss AG, Jena	Axiolmager M1
	Filter im Axiolmager	
	Sp. Green	<i>excitation 500 / beamsplitter 515 / emission 535</i>
	Sp. Red	<i>excitation 575 / beamsplitter 593 / emission 624</i>
	Sp. Aqua	<i>excitation 436 / beamsplitter 455 / emission 480</i>
	Sp. Gold	<i>excitation 546 / beamsplitter 555 / emission 575</i>
Mikroskop- Beleuchtungseinrichtung	Zeiss AG, Jena	HBO-100
Netzteil	Zeiss AG, Jena	Power Supply 231
Kamera	Zeiss AG, Jena	AxioCam MRm
Immersionöl	Immersionöl 518 F	
Auswertungssoftware	Zeiss AG, Jena	AxioVision und QuantifiFISH 4.6

Tabelle 4 Verwendete Geräte für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

2.4.2 FISH Sonden und Lösungen

UroVysion FISH-Sonden-Kit (Abbott Molecular, Abbott Park, Illinois):

Sonde	Chromosom / Genlokus	Farbmarkierung	Wellenlängen (nm)
CEP® 3	Chromosom 3	Spectrum rot	624
CEP® 7	Chromosom 7	Spectrum grün	535
CEP® 17	Chromosom 17	Spectrum aqua	480
LSI® 9p21	Genlokus 9p21	Spectrum gold	575

Tabelle 5 UroVysion, FISH Sonden. Verwendete DNA-Sonden: CEP®-Chromosome Enumeration Probe, LSI®-Locus spezifische Identifikationssonde

Hybridisierungsmix:

- kurz vor Verwendung ansetzen, bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln aufbewahren.
- Puffer und Sonde mindestens 5 Minuten (langsam) bei RT erwärmen. (Sonde im Dunkeln)
- Nach Gebrauch sofort bei -20°C lagern.
- Bei Kombination aus Locus spezifischer Sonde und chromosomaler Sonde (LSI- und CEP-Sonden, vgl. Tabelle 5) wird ein LSI/WCP-Puffer (*Whole Chromosome Painting Probe*, Hersteller Abbott) verwendet.
- Nach dem Erwärmen Puffer und Sonde jeweils kurz vortexen und kurz zentrifugieren.

Hybridisierungsmix zentrifugieren, kurz vortexen und noch einmal kurz zentrifugieren. In Tabelle 6 ist der Ansatz des Hybridisierungsmixes für die gleichzeitige Präparation von einem oder vier Objektträgern sowie für zwei verschiedene Sondenkonzentrationen angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurde in der Regel eine Sondenkonzentration von 1:10 verwendet. Bei anderen Deckglasgrößen verändert sich die benötigte Menge des Hybridisierungsmixes entsprechend Tabelle 7.

Sondenmix	Uro-Vysion 1:10, Deckglas 18x18mm	40T 1:10	Uro-Vysion 1:5 Deckglas 18x18mm	4 0T 1:5
Puffer (LSI/WCP)	4,9µl	19,6	4,9µl	19,6
Aqua dest.	1,4µl	5,6	0,7µl	2,8
DNA-Sonde	0,7µl	2,8	1,4µl	5,6
Ansetzen	7µl	28µl	7µl	28

Tabelle 6 Ansatz des Hybridisierungsmixes für Deckglasgröße 18x18 mm, verschiedene Sondenkonzentrationen und Konzentrationen

Deckglas	Menge
18x18mm	7 µl
15x15mm	5 µl
12x12mm	4 µl
12mm φ	3 µl
10mm φ	2 µl

Tabelle 7 Benötigte Menge für den Hybridisierungsmix nach Deckglasgröße

Stamm- und Gebrauchslösungen

20x SSC Stammlösung:

6 Monate bei RT haltbar.

132g	20x SSC (20x konzentriert, Hersteller Abbott) in
400ml	Aqua dest. lösen, mit HCL auf pH 5,3 einstellen, mit Aqua dest. auf
500ml	auffüllen.

Durch Filtereinheit mit 0,45µm Porendurchmesser filtern.

2x SSC Gebrauchslösung:

6 Monate bei RT haltbar.

100ml	20x SSC Stammlösung (pH 5,3) mit
850ml	Aqua dest. auffüllen, mit NaOH auf pH 7 einstellen, mit Aqua dest. auf
1000ml	auffüllen.

Benutzte Lösung jeweils am Ende des Tages verwerfen.

0,4x SSC mit 0,1% Nonoxynol-40 (NP-40) Gebrauchslösung (Abbott Laboratories, Illinois, U.S.A):

6 Monate bei RT haltbar.

20ml	20x SSC Stammlösung (pH 5,3) mit
950ml	Aqua dest. auffüllen,
1ml	NP-40 hinzugeben, mit NaOH auf pH 7 – 7,5 einstellen, mit Aqua dest. auf
1000ml	auffüllen.

Benutzte Lösung jeweils am Ende des Tages verwerfen.

Pepsin Stammlösung (10%, 0,1 g/ml):

Aliquots bei -20°C mehrere Jahre haltbar. Können ca. 10x wieder aufgetaut werden.

100mg (0,1g)	Pepsin (Hersteller Sigma-Aldrich Co., Louis, EUA) in Aqua dest. lösen.
1ml	

Aliquots zu je 100µl in Eppendorfcups pipettieren.

Pepsin Gebrauchslösung (0,02%):

10 Minuten vor Gebrauch ansetzen.

5ml Arbeitslösung	4,9ml Aqua dest. +
	100µl 1 M HCL +
	10µl Pepsin-Stammlösung

Röhrchen mit durchmischter Arbeitslösung in den Wärmeschrank 37°C stellen.

0,5% HCl in 70% Ethanol:

2 Monate bei RT haltbar. Bei schlechter Entfärbung der Präparate erneuern.

8ml 25% HCl in
392ml 70% Ethanol (vergällt) lösen.

1% Formalin / PBS:

6 Wochen bei RT haltbar.

1g Paraformaldehyd in
100ml PBS Puffer lösen (bei 50°C auf Wärmeplatte mit Magnetrührer)

PBS Stammlösung:

1,46g Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot x2\text{H}_2\text{O}$)
0,24g Kaliumhydrogenphosphat (0,24g KH_2PO_4)
0,2g Kaliumchlorid (KCl) und
8,0g Natriumchlorid (NaCl), mit
900ml Aqua dest. auffüllen, unter ständigem Rühren vollständig lösen, mit 1 N HCl
auf pH 7,3 einstellen, mit Aqua dest. auf

1000ml auffüllen.

PBS Gebrauchslösung (1x):

4 Wochen bei RT haltbar.

50ml PBS Stammlösung (1:20) mit
950ml Aqua dest. auffüllen, pH von 7,3 einstellen.

Benutzte Lösung am Ende des Tages verwerfen.

Ethanolwaschlösung:

Aus 100%igem Ethanol und Aqua dest. je eine 70%ige, 80%ige, 85%ige und 96%ige Verdünnung ansetzen. Die Verdünnungen können eine Woche lang verwendet werden, solange keine Verdunstung stattfindet (Küvetten mit Deckel verschlossen halten) und die Lösungen nicht durch übermäßigen Gebrauch verdünnt werden. Die Lösungen dienen zur vollständigen Dehydrierung der Präparate.

2.4.3 Laborprotokoll für FISH

Abb. 3 zeigt den Arbeitsplatz.

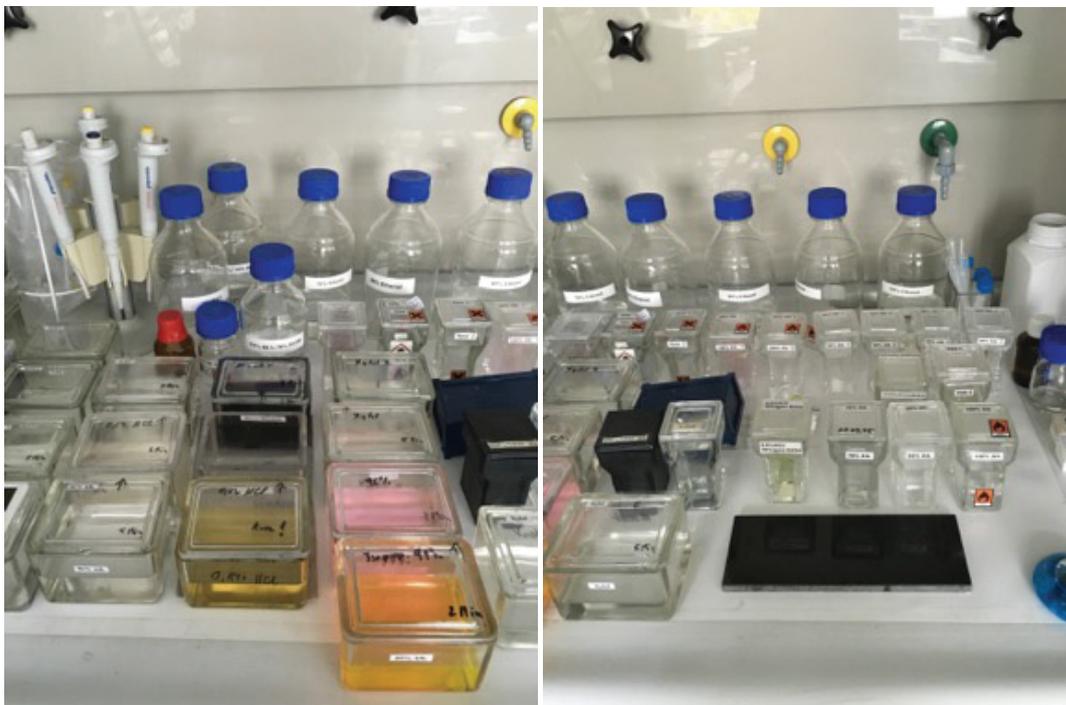


Abb. 3 Laborarbeitsplatz der Färbereihe

Vorbereitung:

- Küvette mit 2x SSC füllen und im Wasserbad auf 73°C erwärmen. (Thermostat auf ca. 73,6 – 74°C)
- Temperatur von Wärmeschrank und Wasserbad überprüfen.
- Feuchte Kammer im Wärmeschrank auf 37°C vorwärmen.
- Ab Schritt 22 (ab Ansatz des Hybridisierungsmixes und Aufpipettieren der Sonde) in Dämmerlicht arbeiten. (Deckenbeleuchtung aus)
- Die Küvetten mit Xylol und 100% Ethanol werden jedes Mal frisch aufgefüllt, die Küvetten mit 70% - 96% Ethanol werden jede Woche erneuert.

Zur besseren Übersicht ist das Laborprotokoll für die Hybridisierung in Tabelle 8 dargestellt.

Tag 1 ca. 2h			
Wasserbad auf 73°C vorwärmen, Temperatur im Wärmeschrank prüfen			
1	PAP gefärbte Monolayer markieren, Fotokopie anfertigen		
2	Xylol 1	1-3 Tage, bis Deckglas abgelöst	
3	Xylol 2	ca. 4 h	
4	2x 100% Ethanol	je 10 min	
5	2x 96% Ethanol	je 5 min	
6	2x 80% Ethanol	je 5 min	
7	0,5% HCL / 70% Ethanol	15 min	Pepsin ansetzen
8	Aqua dest.	5 min	
9	2x SSC, 73°C (vorgewärmtes Wasserbad)	5 min	
10	Pepsin, 37°C (vorgewärmt, feuchte Kammer, Wärmeschrank)	15 min	Heizplatte einschalten
11	PBS, RT	5 min	
12	1% Formalin / PBS, RT	5 min	
13	PBS, RT	5 min	Sonde ansetzen
14	70%, 85%, 100% Ethanol	je 2 min	
15	Trocknen bei RT	2 min	
16	Hybridisierungsmix hinzu pipettieren, Deckglas auflegen	Präparate ab jetzt vor Licht schützen	
17	Mit Fixogum umranden		
18	Fixogum antrocknen, 37°C Wärmeschrank	5 min	
19	Denaturierung, 73°C Heizplatte	10 min	
20	Hybridisierung, 37°C Wärmeschrank, feuchte Kammer	14-16 h	

Tag 2 ca. 15 min		
Wasserbad auf 73°C vorwärmen, Temperatur im Wärmeschränk prüfen		
21	Fixogum mit Pinzette entfernen	
22	0,4x SSC + 0,1% NP-40, RT	1-5 min
23	0,4x SSC + 0,1% NP-40, 73°C Wasserbad	2 min
24	0,4x SSC + 0,1% NP-40, RT	2 min
25	Aqua dest, RT	3-5 sec
26	Trocknen bei RT	2 min
27	DAPI	
28	Deckglas auflegen	
29	Mit Fixogum umranden	
30	Lagerung bei 4°C	

Tabelle 8 Laborprotokoll für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Der erste Versuchstag startet mit der Vorbereitung. Die Küvetten mit 2x Standard Natriumcitrat-Lösung (SSC) werden im Wasserbad für den Waschschrift (Schritt 9, Tabelle 8) auf 73°C vorgewärmt, um große Temperaturschwankungen beim späteren Hinzufügen der Objektträger zu vermeiden. In Studien konnte gezeigt werden, dass eine Kombination aus diesem Temperaturoptimum und das Hinzuziehen der SSC Lösung die Morphologie der vorhandenen Chromosomen bei der Denaturierung schützen kann. [80] Das Wasserbad ist in Abb. 4 dargestellt.

Die genauen Zusammensetzungen der Stamm- und Gebrauchslösungen wurden im Kapitel 2.4.3 dargestellt.

Schritt 1: Für die FISH-Untersuchung vorgesehene, eingedeckelte und mittels Filzschreiber markierte Objektträger werden zum leichteren Wiederauffinden der suspekten Zellen fotokopiert.



Abb. 4 Wasserbad

Schritte 2 und 3: Zunächst werden die Objektträger für ein bis drei Tage in Xylol belassen, bis sich das Deckglas leicht ablösen lässt und das Eindeckmedium Eukitt weitgehend abgewaschen werden kann. Anschließend werden die Objektträger in frisches Xylol umgesetzt. Dies führt zum Entfernen eventuell verbliebener Reste des Eindeckmediums.

Schritte 4 bis 6: Zur Überführung in ein wässriges Milieu folgt eine absteigende Alkoholreihe, je zwei Inkubationen bei 100%, zwei bei 96% und zwei bei 80% Ethanol. Ethanol 100% dient der Entfernung des Xylols. Damit die Färbung im wässrigen Milieu fortgeführt werden kann und keine Zellen abschwimmen, wird der Alkoholgehalt langsam verringert. Im Ethanol 100% verbleiben die Objektträger je zehn Minuten, in den beiden anderen Konzentrationen jeweils 5 Minuten, so dass die Ethanol-Reihe insgesamt 40 Minuten beansprucht. Die Küvetten müssen jede Woche erneuert werden, da Alkohol verdunstet.

Schritt 7: Entfärbung der nach Papanicolaou oder MGG vorgefärbten Ausstrichpräparate mit einer Kombination aus 0,5% HCL mit 70% Ethanol für 15 Minuten. An dieser Stelle ist es ratsam, die Pepsinlösung anzusetzen. Die Pepsin Gebrauchslösung 0,2% sollte nach Ansetzen im Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt werden. Von der angefertigten Gebrauchslösung reichen 5 ml für ungefähr vier Objektträger.

Schritt 8: Die Objektträger werden für 5 Minuten in eine Küvette mit Wasser gestellt. In diesem Waschschrift werden die Chemikalien entfernt und deren Reaktionen gestoppt. [90] Außerdem dient dies zur Anpassung an das folgende wässrige Milieu.

Schritt 9: Bei Schritt neun wird die DNA in 2x SSC im vorgewärmten Wasserbad bei 73°C für 5 Minuten erneut gewaschen und denaturiert.

Schritt 10: Durch Einwirkung von Pepsin werden zelluläre Proteine verdaut. [90] Die Kernmembran wird durchlässiger und restliche Gewebebestandteile des Punktats können leichter entfernt werden. Nach Entnahme der Objektträger aus dem Wasserbad wird die zuvor bei 37°C gelagerte 0,2%ige Pepsinlösung auf die horizontal gelegten Objektträger gegeben und diese für 15 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Diese Zeit sollte zur Vermeidung eines Über- oder Unterverdaus möglichst exakt eingehalten werden. Die Inkubation geschieht in einen Kasten mit feuchtem Milieu. Das bedeutet, dass unter den Objektträgern mit Wasser angefeuchtete Kosmetiktücher platziert werden, dargestellt in Abb. 5. Zu diesem Zeitpunkt wird die Heizplatte eingeschaltet.



Abb. 5 Kasten mit feuchtem Milieu

Schritt 11 bis 13: Die Objektträger werden jeweils in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei Raumtemperatur für 5 Minuten gewaschen. PBS neutralisiert und spült die Präparate, um die Pepsinreaktion zu stoppen. Schritt 12 enthält zur Fixierung zusätzlich 1% Formalin in PBS. Eine Inkubation erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Zu diesem Zeitpunkt wird die Hybridisierungssonde vorbereitet. Der Puffer und die Sonde werden langsam bei Raumtemperatur erwärmt. Als Puffer wird der LSI/WCP-Puffer verwendet, da der verwendete UroVysion-Sondenmix eine Kombination aus Lokus-spezifischen (LSI)- und Zentromer Sonden (CEP) enthält. Nach Auftauen des Puffers und der Sonde sollten diese kurz durchmischt (Vortexer) und zentrifugiert werden. Im Hybridisierungsmix sind LSI/WCP-Puffer, Aqua dest. und die DNA Sonden enthalten. Wir haben eine Verdünnung der Sonden von 1:10 verwendet. Die benötigte Menge des Hybridisierungsmixes richtet sich nach der benötigten Fläche des zu hybridisierenden Bereiches. Bei einer Größe von 18x18mm wird 7µl, bei 15x15mm 5µl, bei 12x12mm 4µl, bei 12mm im Durchmesser 3µl und bei 10mm im Durchmesser wird 2µl Hybridisierungsmix benötigt.

Schritt 14: Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%, 80% und 100% Ethanol für jeweils 2 Minuten. Dabei wird den Präparaten Wasser entzogen.

Schritt 15: Trocknen der Objektträger für ca. 2 Minuten bei Raumtemperatur. Verbliebene Flüssigkeit am Objektträgerrand wird vorsichtig mit einem Kosmetiktuch entfernt.

Schritt 16 bis 19: Nun wird der Hybridisierungsmix hinzu pipettiert. Ab jetzt müssen die Objektträger vor Licht geschützt werden. Das Deckglas wird luftblasenfrei aufgelegt und mit Fixogum (Montagekleber, Hersteller Marabu) abgedichtet, um das Präparat vor Austrocknung zu schützen. Das Antrocknen des Fixogums geschieht für 5 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C. Anschließend wird die DNA durch Platzieren des Objektträgers auf einer Heizplatte bei 73°C für 10 Minuten denaturiert.

Schritt 20: Hybridisierung der FISH-Sonden mit der DNA des Untersuchungsmaterials für 14-16 Stunden über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank und feuchter Kammer.

Tag zwei des Laborprotokolls beginnt erneut mit dem Vorwärmen des Wasserbades auf 73°C und der Überprüfung der Temperatur des Wärmeschrankes, welche 37°C sein soll. Sämtliche weiteren Schritte sollten ebenfalls lichtgeschützt zur Vermeidung einer Schwächung der Fluoreszenz durchgeführt werden.

Schritt 21: Bevor die Präparate weiterbearbeitet werden können, wird das Fixogum von den Objektträgern durch Abziehen mit einer Pinzette entfernt.

Schritt 22 bis 24: Es wird 0,1% Nonoxynol-40 (NP-40) verwendet. Es dient als Detergens zum Entfernen nicht gebundener Sonde und Fixogum-Resten. Zunächst werden die Objektträger für ca. 5 Minuten in 0,4xSSC-Puffer mit 0,1% NP-40 bei Raumtemperatur in einem abgedunkelten Gefäß inkubiert, bis sich das Deckglas abgelöst hat. Anschließend wird ebenfalls mit 0,4xSSC-Puffer mit 0,1% NP-40 bei 73°C im vorgeheizten Wasserbad für 2 Minuten intensiviert gewaschen. Dieser Schritt sollte so exakt wie möglich eingehalten werden. Danach erfolgt ein erneuter Waschschrift mit 0,4xSSC-Puffer mit 0,1% NP-40 für 2 Minuten bei Raumtemperatur.

Schritte 25 bis 30: Zunächst werden die Objektträger für drei bis fünf Sekunden in einer Küvette in Aqua dest. bei Raumtemperatur gespült, um Salze zu entfernen. Danach trocknen die Präparate für zwei Minuten bei Raumtemperatur. Eventuell verbliebene Flüssigkeit am Objektträgerrand wird mit einem Tuch entfernt. Auf die Objektträger wird ein Tropfen des Fluoreszenzfarbstoffes 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gegeben und ein Deckglas aufgelegt, welches nahezu den gesamten Objektträger mit Ausnahme des Mattrandes bedeckt. Um ein Verrutschen zu verhindern, wird das Deckglas an den seitlichen Rändern mit Fixogum fixiert. Die Präparate werden nun bis zum Mikroskopieren bei 4°C im Dunkeln gelagert. Es empfiehlt sich erfahrungsgemäß, mindestens etwa vier Stunden zu warten, da sich die Fluoreszenz mit der Zeit intensiviert. Infolgedessen ist es sinnvoll, mit der Auswertung der Präparate gegebenenfalls erst am Folgetag zu beginnen.

2.4.4 Auswertung der FISH Präparate

Die Detektion von DNA-Sequenzen in Interphase-Chromosomen mittels direkt mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markierter RNA- oder DNA-Sonden wurde bereits Anfang der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts entwickelt. [7] Hierbei geschieht die Visualisierung nach Hybridisierung der markierten einzelsträngigen Nukleinsäure an einer Zielsequenz durch Anregung des Fluoreszenz-Farbstoffes mit Licht einer definierten Wellenlänge. Im Rahmen der Relaxation wird Licht mit größerer, aber ebenso definierter Wellenlänge emittiert. Das benötigte Licht wurde mittels Quecksilberdampf-Lampe erzeugt und je nach zu detektierender FISH-Sonde entsprechend der zur Anregung sowie Detektion benötigten Wellenlängen gefiltert. Die Objektträger werden mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops untersucht. Es wurden fünf verschiedene Filter entsprechend der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Spectrum *Green*, Spectrum *Red*, Spectrum *Gold*, Spectrum *Aqua* (Axiolmager M1, Zeiss AG, Jena) sowie ein Filter zur Visualisierung der DAPI-Fluoreszenz verwendet. DAPI stellt Nukleinsäuren dar, dient zur Darstellung der Zellkernstruktur und damit zur Detektion von morphologisch auffälligen Zellkernen. In Pankreaspunktaten sind sehr oft normale duktale Epithelien oder auch azinäre Pankreasepithelien untermischt, die mit Hilfe der DAPI-Färbung von morphologisch auffälligen Zellkernen abgegrenzt werden können. Auffällig sind hierbei z.B. Kernvergrößerungen und -entrundungen, vermehrte Fluoreszenz, eine inhomogene Chromatinstruktur oder Nukleolen.

Vor dem Mikroskopieren sollte wenige Minuten gewartet werden, bis sich die Objektträger auf Raumtemperatur erwärmt haben. Die Präparate werden systematisch mit einem 63x Öl-Objektiv untersucht. Dabei ist es ratsam, an einem Randbereich zu starten und das Präparat Zeile für Zeile zu durchmustern. Die zytologisch auffälligen Stellen, die zuvor markiert und fotokopiert wurden, bieten für das Auffinden der verdächtigen Bereiche eine Hilfestellung. Wenn in der Übersicht ein morphologisch atypischer Zellkern aufgefunden wurde, wird dieser mit allen Einzelfiltern ggf. unter dem 100x Öl-Objektiv untersucht und die jeweilige Anzahl der Fluoreszenzsignale notiert. Unauffällige Zellen zeigen eine Disomie mit jeweils zwei Fluoreszenzsignalen einer Farbe (siehe Abb. 6 (1)). Eine korrekte FISH-Färbung wurde jeweils anhand von unauffälligen im Untersuchungsmaterial enthaltenen diploiden Zellen, wie normalen dukталen Epithelien oder Entzündungszellen überprüft.

Es wurden mehrere diagnostische Kriterien untersucht: Chromosomale Aneuploidie, Trisomie und Polysomie des Chromosoms 7 und eine Deletion von 9p21. Eine chromosomale Aneusomie ist ein Hinweis für ein Ungleichgewicht der Kopienzahl der untersuchten chromosomalen Regionen. Physiologisch wäre dies zum Beispiel in der S-Phase des Zellzyklus, wenn die DNA bereits einiger aber noch nicht aller Chromosomen verdoppelt ist. Sie kann aber auch bei maligner Transformation einer Zelle auftreten und wird für die eigene Arbeit in Anlehnung an bereits publizierte Kriterien definiert, sobald mehr als zwei Fluoreszenzsignale einer Farbe in einem Zellkern erscheinen und dies der Fall bei mindestens zwei der vier Sonden ist [62] (siehe Abb. 7).

(1)



(2)

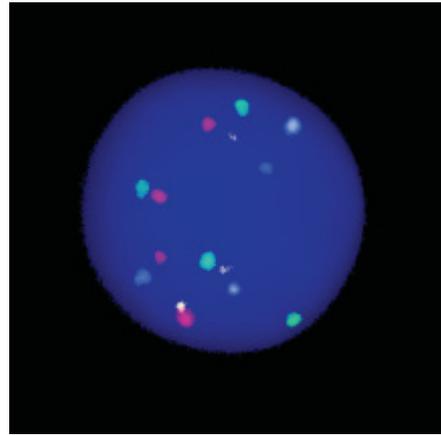
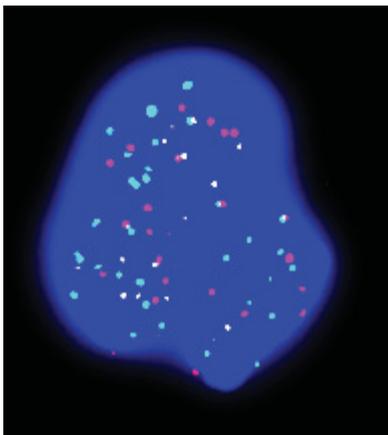


Abb. 6 Beispiele von fluoreszenz-markierten Zellkernen der eigenen Serie: (1) Disomie (UP87), 63x Öl-Immersionsobjektiv (2) Tetrasomie (UP39), 100x Öl-Immersionsobjektiv

(3)



(4)

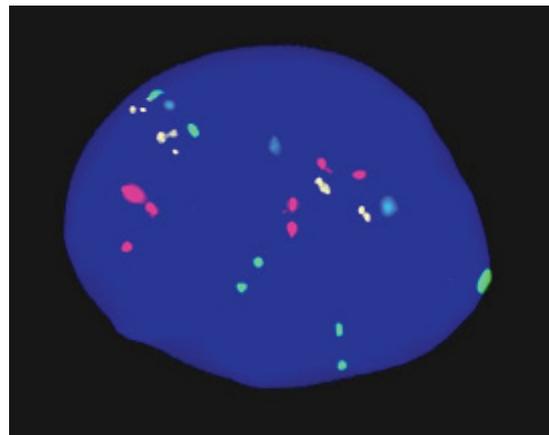


Abb. 7 Beispiele von fluoreszenz-markierten Zellkernen der eigenen Serie: (3) drei Zellkerne mit Aneusomie, 63x Öl-Immersionsobjektiv, (4) ein Zellkern mit Aneusomie im Detail, 100x Öl-Immersionsobjektiv

Da dies wie oben gesagt auch in der S-Phase des Zellzyklus vorkommen kann, reicht in der Regel nicht die Detektion von einer chromosomal aneuploiden Zelle für eine maligne Transformation, sondern es werden hierfür meist mehrere Zellen benötigt. In der Literatur wird häufig ein positives Ergebnis bei einer Amplifikation von zwei der vier untersuchten Zielregionen in mindestens fünf Zellkernen gewertet. [37][70] Auch in der eigenen Arbeit ist dies einer der errechneten Grenzwerte mit guter Treffsicherheit. Siehe hierzu „3.4.1 Treffsicherheiten der FISH für Pankreaskarzinome bei verschiedenen Grenzwerten aneuploider Zellen“. Berechnet wird der optimale Grenzwert mit Hilfe einer ROC Kurve sowie durch den Youden-Index (vgl. Kapitel 2.7). Für die Bestimmung des Cut-Off wurden, wenn möglich 60, mindestens jedoch 25 morphologisch auffällige Zellkerne ausgezählt.

Ebenfalls wird in der eigenen Arbeit das positive FISH-Ergebnis bei einer Anzahl der Kopien des Chromosoms 7 von ≥ 3 (Trisomie) oder ≥ 4 (Polysomie) in ≥ 10 Zellkernen untersucht.[4][70]

Sekundär, nach Abschluss der primären Datenerhebung, wurde anhand der Rohdaten aus den Auszählprotokollen der FISH eine Auswertung der homozygoten, heterozygoten und relativen Deletion des Chromosom 9p21 von der wissenschaftlichen Mitarbeiterin des Funktionsbereichs Zytopathologie der Uniklinik Düsseldorf Frau Isabela Karoline de Santana Almeida Araujo durchgeführt. Eine homozygote Deletion ist definiert als das Fehlen von Fluoreszenzsignalen der Sonde für 9p21 in einem Zellkern und eine heterozygote Deletion als das Vorliegen eines Fluoreszenzsignals. Eine relative Deletion ist definiert als das Vorliegen von weniger Fluoreszenzsignalen, verglichen mit der durchschnittlichen Kopienzahl der 3 übrigen Sonden im UroVysion Sondenmix. Letzteres Kriterium wurde von Zellweger et al. 2006 [117], der dies für Urothelkarzinome untersuchte, vorgeschlagen. Bei der Untersuchung der Aneuploidie ist auch bei der FISH die in einigen Organen physiologisch oder z.B. im Rahmen von entzündlichen oder regenerativen Prozessen vorkommende euploide Polyploidisierung zur Vermeidung falsch-positiver Diagnosen im Auswertungsalgorithmus zu berücksichtigen. [9] [93] Diese bezeichnet die ggf. mehrfache Verdopplung vollständiger Chromosomensätze, z.B. Tetrasomie oder Oktasomie. Bei einer Tetrasomie beispielsweise lassen sich, übertragen auf die Untersuchung von nur vier chromosomalen Regionen mittels der UroVysion Sonde, jeweils vier Fluoreszenzsignale einer Farbe detektieren, z.B. 4-4-4-4. Es wird hier zur Vermeidung von falsch-positiven Resultaten durch gesplittete oder überlagerte Signale eine Abweichung bei einer Sonde toleriert, z.B. 4-4-4-3 (siehe Abb. 6 (2)) oder 4-5-4-4 (vgl. auch Schramm et al 2011 [93]). Derartige Muster werden daher nicht als chromosomal aneuploid gewertet.

In einigen Fällen wurde das Präparat wiederholt durch einen anderen Untersucher (Frau Marietta Kazimirek oder Dr. Martin Schramm) bewertet, um Unsicherheiten aufzulösen. Bei Diskrepanz wurde ein drittes Mal mikroskopiert und bezüglich des endgültigen Ergebnisses eine Mehrheitsentscheidung getroffen.

2.5 Klinisches Follow-Up

Das klinische *Follow-Up* wurde mit zwei verschiedenen Arten von Fragebögen (siehe Anhang 6.1 und 6.2) durchgeführt. Die Kliniken, die im direkten Umfeld lagen, wurden um Einsicht in die Patientenakten vor Ort gebeten. Den Kliniken, die weiter entfernt lagen, wurde ein Fragebogen mit der Bitte um Rücklauf zugesandt. Hierbei wurden verschiedene Aspekte bezüglich Erkrankungen des Pankreas erfragt: so zum Beispiel die Symptome vor Punktion, Allgemeinzustand des Patienten, Krankengeschichte, Risikofaktoren, bisher erfolgte klinische Diagnostik, bisherige histologische bzw. zytologische Abklärung und der weitere Krankheitsverlauf, aber auch Alter und Geschlecht des Patienten.

Der Zeitpunkt der Erhebung des *Follow-ups* lag frühestens sechs Monate nach der zytologischen Untersuchung. Insbesondere bei den Punktaten ohne Tumornachweis wurde aber ein zusätzliches, angemessenes Zeitintervall der klinischen Nachbeobachtung von weiteren drei Monaten gewählt, um einen malignen Tumor, welcher sich bei den häufigsten zu erwartenden, hochmalignen Entitäten des duktales Pankreaskarzinoms und des Gallengangskarzinoms in diesem Zeitintervall sicher manifestiert hätte, auszuschließen.

Zur klinischen Symptomatik vor Punktion wurde erfragt, mit welchen Beschwerden der Patient in das Krankenhaus kam, ob gravierende Vorerkrankungen bestanden haben und welche Therapien, z.B. Zytostatika, der Patient bis dahin erhalten hat. Dazu gehörte auch die Frage nach Nikotin- oder Alkoholkonsum, da dies Risikofaktoren für das Auftreten des Pankreaskarzinoms sind. [3]

Für die klinische Abklärung wurde die Art der Diagnostik, z.B. CT, MRT oder Endosonographie, und der dabei festgestellte Befund mit Lage und Größe der Läsion dokumentiert.

Falls neben dem Befundbericht der zytologischen Punktion noch ein histologischer Befund vorlag, wurde dieser mit der zytologischen Diagnose verglichen. Auch Zytologiebefunde, welche nicht in der Zytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf untersucht wurden, dienten zur Überprüfung der Diagnose. Bei der Histologie wurde zusätzlich die Art der Gewinnung der Probe erfragt: ob durch Punktion, mittels Stanzbiopsie oder operativ. Wenn Ergebnisse adjuvanter zytologischer Methoden, wie DNA-Bildzytometrie oder Immunzytochemie, vorlagen, flossen diese ebenfalls in das *Follow-up* ein. Zur Bewertung der Treffsicherheit der Zytologie wurde ausschließlich die konventionelle, rein mikroskopische Zytologie verwendet.

Für die Befundung von zytologischen Präparaten ist es hilfreich zu wissen, ob Komplikationen bei der Punktion aufgetreten sind. Blutungen können beispielsweise das Auffinden von Tumorzellen im Ausstrich erschweren.

Bezüglich des weiteren Krankheitsverlaufs ging es neben dem Erfragen des Allgemeinzustands des Patienten und Staging der Tumorerkrankung, auch um die Frage der Therapie. Wurde z.B. der Tumor chirurgisch angegangen oder konnte nur eine palliative Therapie durchgeführt werden.

Der Allgemeinzustand des Patienten kann einen Hinweis auf das Vorliegen eines malignen Tumors geben. Der Verlauf wäre in diesem Fall progredient und ginge gegebenenfalls mit einer deutlichen Verschlechterung des Gesundheitszustandes einher. Umgekehrt kann die fehlende rasche Verschlechterung des klinischen Verlaufes ein Hinweis auf eine benigne Erkrankung sein, wie z.B. der chronischen Pankreatitis.

Lag ein histologischer Befund vor, konnte zusätzlich die histogenetische Klassifikation der zytologischen Tumordiagnose überprüft werden.

Insgesamt wurden diese Daten aus der Datenbank „Medico“ der Uniklinik Düsseldorf sowie anhand der Patientenakten externer Krankenhäuser im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit erhoben.

2.6 Referenzstandard

Ziel der Datenerhebung des klinischen Verlaufs war die Ermittlung eines Referenzstandards für die Beurteilung der Treffsicherheit der zytologischen- und FISH-Diagnostik.

Der **positive Referenzstandard** definiert sich dadurch, dass der zytologische Befund bezüglich der Diagnose eines malignen Tumors dem positiven, operativ oder bioptisch erhaltenen, histologischen Präparat entspricht. Dabei durfte die maximale Zeitdifferenz zwischen der Gewinnung der Zytologie und der zum Vergleich herangezogenen Histologie 6 Monate nicht überschreiten. Eine Tumorpositive zytologische Diagnose in Zusammenhang mit dazu passendem klinischen Verlauf wurde ebenfalls als ausreichend valide angesehen. Dieses Kriterium ist dann sinnvoll, wenn aufgrund einer insgesamt palliativen Situation keine histologische, insbesondere operative Sicherung der Diagnose mehr erfolgte.

Der **negative Referenzstandard** definiert sich durch die zytologische Diagnose „negativ“ plus Übereinstimmung mit dem klinischen Gesamtbild oder durch ein Tumor-negatives *Follow-Up* während des oben genannten Zeitraumes (9 Monate).

2.7 Statistische Auswertung

Die Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik sowie der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung erfolgte mittels deskriptiver Statistik. Für Zytologie und FISH wurden Sensitivität, Spezifität, positiver prädiktiver Wert und negativer prädiktiver Wert angegeben. Zusätzlich wurde für die FISH die für eine tumorpositive Diagnose erforderliche Zahl der Zellkerne mit Aneusomie in einem Präparat ermittelt (Cut-Off). Dies geschah mit Ermittlung der Youden-Indizes sowie mit Hilfe der *Receiver Operating Characteristic* (ROC) Kurve.

Sensitivität, Spezifität, positiv prädiktiver Wert und negativ prädiktiver Wert sind Kenngrößen, welche mit Hilfe einer Vierfeldertafel berechnet werden können. Hierbei ist es möglich, einen Test mit einem Referenzstandard zu vergleichen. Dabei werden die wahren Testergebnisse den Fehldiagnosen gegenübergestellt. Das Testergebnis wird üblicherweise in den Zeilen wiedergegeben, die tatsächliche klinische Situation in den Spalten. Feld a zeigt die richtig positiven, Feld d die richtig negativen, Feld b die falsch positiven und Feld c die falsch negativen Diagnosen (vgl. Tabelle 9). [38]

Tatsächlicher klinischer Zustand (Referenzstandard)

Testergebnis		krank	gesund	
	positiv	a	b	a+b
	negativ	c	d	c+d
		a+c	b+d	

Tabelle 9 Allgemeine Darstellung einer Vierfeldertafel [38]

Die Sensitivität beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Erkrankter als krank erfasst wird. Berechnet wird dieser Wert, indem die Anzahl aller richtig als krank diagnostizierten Patienten durch die Summe aller Erkrankten geteilt wird. (Sensitivität= $a/(a+c)$) [38]

Die Spezifität beschreibt, welcher Anteil der gesunden Patienten als gesund erkannt wird. Hierfür wird die Anzahl der richtig als gesund erkannten Patienten durch die Summe der Gesunden geteilt. (Spezifität= $d/(b+d)$) [38]

Mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Testergebnis dem tatsächlichen klinischen Zustand entspricht, wird mit Hilfe des prädiktiven Wertes berechnet. Man unterscheidet den positiven prädiktiven Wert und den negativen prädiktiven Wert. Der positive prädiktive Wert (PPV) gibt an, wie viele Patienten mit einem positiven Testergebnis tatsächlich erkrankt sind (PPV= $a/(a+b)$). Wie viele Patienten mit einem negativen Testergebnis tatsächlich gesund sind, zeigt der negative prädiktive Wert (NPV= $d/(c+d)$). [38]

Bei der *Receiver Operating Characteristic* (ROC) handelt es sich um ein Verfahren, welches durch einen individuell gesetzten Schwellenwert die erfassten Merkmale in positiv und negativ trennt. Für diesen Schwellenwert wird die jeweilige Sensitivität und Spezifität berechnet. [108] Man trägt in einem Koordinatensystem die Rate der falsch positiven Diagnosen, 1-Spezifität, auf der X-Achse gegen die Rate der richtig positiven Diagnosen, Sensitivität, auf der Y-Achse auf. Durch das Eintragen der Wertepaare jedes angenommenen Schwellenwerts erhält man eine ROC Kurve. [108] Optimaler Weise verläuft die ROC Kurve so nah wie möglich entlang der linken oberen Ecke des Koordinatensystems, da in diesem Fall die Differenzierung durch einen Test am zutreffendsten ist. [42] Die Sensitivität und Spezifität liegen in diesem Fall bei nahezu 100%. Eine ROC Kurve, die entlang der Diagonalen des Koordinatensystems verläuft, entspricht der Ratewahrscheinlichkeit, was bedeutet, dass der gewählte Schwellenwert keinen diagnostischen Wert hat. [27] Um einen diagnostischen Test zu quantifizieren, kann man sich zum einen die Fläche unter der ROC Kurve, *area under the curve* (AUC), zu Nutzen machen, zum anderen ist es möglich, den Youden-Index zu berechnen. Bei der AUC zeigt ein Wert von 0,5, dass das Testverfahren nicht besser als der Zufall ist. Ein optimaler Wert von 1 kann nur erreicht werden, wenn falsche Befunde ausgeschlossen wurden. [102] [108] Beim Youden-Index wird das optimale Verhältnis

zwischen Sensitivität und Spezifität objektiv berechnet. Der bestmögliche Grenzwert zeigt eine hohe Sensitivität sowie gleichzeitig eine hohe Spezifität. Hierbei wird die berechnete Sensitivität mit der Spezifität addiert und eins subtrahiert (Youden-Index = Sensitivität + Spezifität -1). Er wird für den jeweils gewählten Schwellenwert einzeln berechnet und sollte möglichst nahe der Eins liegen. [88][91][115] In unserer Studie wurde zur Objektivierung der Ergebnisse der Youden-Index genutzt.

Zur Ermittlung des jeweils "richtigen" Schwellenwertes, müssen die therapeutischen und klinischen Konsequenzen des diagnostischen Tests sowie ggf. auch der Einsatz einer Kombination von Tests berücksichtigt werden. Auf eine hohe Sensitivität sollte geachtet werden, wenn es sich um eine Erkrankung mit schwerwiegenden Folgen handelt, es gute und sichere Therapieverfahren gibt und falsch positive Ergebnisse ohne großen Aufwand und psychische Belastung für den Patienten geklärt werden können. Außerdem kann ein Test mit hoher Sensitivität als Suchtest eingesetzt werden. Auf eine hohe Spezifität sollte man im Gegenzug achten, wenn es für die diagnostizierte Erkrankung keine ausreichenden Therapiemöglichkeiten gibt und Folgeuntersuchungen mit großen psychischen Belastungen verbunden wären. Ein Test mit hoher Spezifität eignet sich auch als Bestätigungstest. Ein optimaler Schwellenwert zeichnet sich nicht nur durch reine Wahrscheinlichkeitstheorien aus, sondern benötigt auch ethische und medizinische Überlegungen hinsichtlich der Konsequenzen. [108]

Für die eigene statistische Auswertung wurde Microsoft Excel 2011 für Mac genutzt. Zur Analyse der 9p21-Deletion sowie damit zusammenhängenden kombinierten Auswertungen wurde von Frau de Santana Almeida Araujo das Programm SPSS Statistics (v.25, IBM Inc., Deutschland) verwendet (siehe auch Kapitel „2.2 Abgrenzung der eigenen Leistung“). Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ gesetzt.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik sowie der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung von endosonographisch gezielten Feinnadelpunktaten des Pankreas zur Pankreaskarzinomdiagnostik durch Vergleich mit dem klinischen Verlauf der Patienten untersucht.

3.1 Studienausschluss und *Follow-up*

Das Sichten der Krankenakten für das klinische *Follow-Up* wurde erst begonnen, nachdem alle Präparate für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung hybridisiert und mikroskopiert worden waren. Durch ein Zeitintervall von mindestens neun Monaten nach zytologischer Diagnostik für einen negativen Referenzstandard (vgl. Kapitel 2.6 Referenzstandard) wurde sichergestellt, dass nachfolgende diagnostische Maßnahmen in der Zwischenzeit weitgehend abgeschlossen worden waren. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass sich innerhalb dieses Zeitintervalls ein pankreaseigenes Karzinom klinisch bestätigt hätte.

Die Darstellung des Studienverlaufs mit Angabe der Zahlen der endosonographischen Punktionen und der daraus resultierenden Präparate erfolgt mittels eines STARD Diagramm (*Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy*), siehe Abb. 8. [24]

Eingeschlossen wurden 593 Feinnadelpunktate von soliden und zystischen, tumorverdächtigen Pankreasläsionen der Jahre 2011 und 2012 (vgl. Kapitel 2.1). Nur mikroskopisch zellfreie Präparate oder Punktate von Zysten, bei denen keine Zellen der Zystenauskleidung vorhanden waren, wurden von der Studie ausgeschlossen. Alle anderen Punktate wurden zusätzlich mittels FISH untersucht. 7 waren nicht auswertbar, was zum Studienausschluss führte.

Für einige Patienten und Präparate war es nicht möglich, ein *Follow-Up* zu erheben. Zunächst fehlten Rückmeldungen zur *Follow-Up*-Befragung von zwei Einsendern. Aus diesen Abteilungen stammte aber jeweils nur ein Präparat der Studie. Des Weiteren konnte für einige Patienten keine archivierte Akte mit ausreichenden Angaben gefunden werden. Dies traf für elf Präparate zu. Insgesamt konnten deshalb 13 Präparate nicht weiter ausgewertet werden.

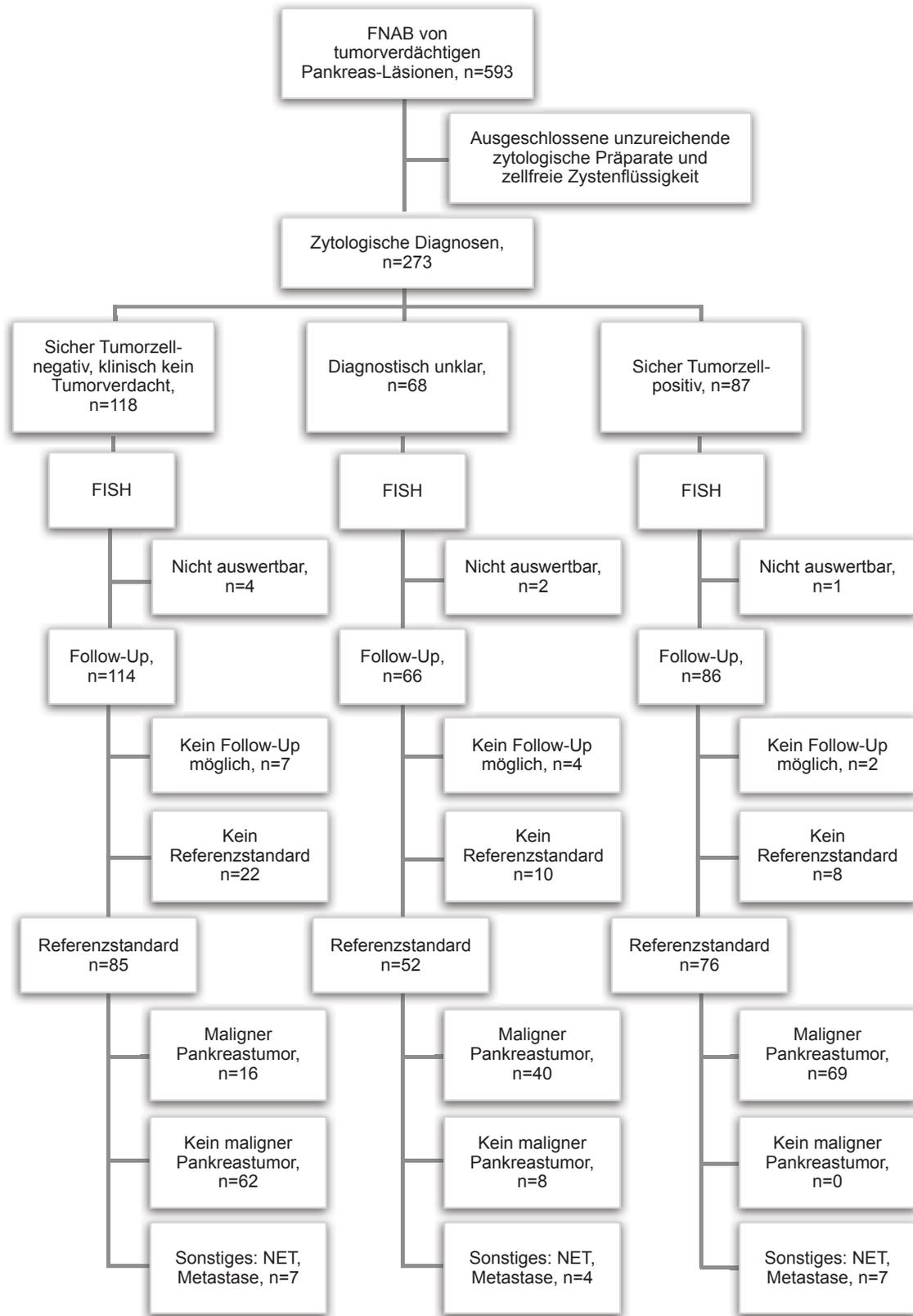


Abb. 8 Flussdiagramm der Präparate der Studie (STARD-Diagramm)[24]

Bei insgesamt 40 Präparaten war nach Einsicht der Krankenakten der vorab definierte Referenzstandard nicht eindeutig bestimmbar. Diese Präparate mussten ebenfalls ausgeschlossen werden. Der häufigste Grund hierfür war ein nicht ausreichend langer Nachbeobachtungszeitraum (vgl. Kapitel 2.6 Referenzstandard), gefolgt von einer nicht ausreichend zu beurteilenden Histologie ohne erneute Probenentnahme.

Vollständig auswertbar waren 213 Punktate von insgesamt 201 Patienten. Bei einigen Patienten wurden repetitive Punktionen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.4.5 Repetitive Punktionen).

Bei 11 Punktaten handelte es sich um Metastasen im Pankreas und bei 7 Punktaten um neuroendokrine Tumore. Für die Bestimmung der diagnostischen Treffsicherheit des Pankreaskarzinoms werden sie daher nicht in die statistische Berechnung und die tabellarischen Darstellungen einbezogen, sondern gesondert im Kapitel 3.7 beschrieben.

195 Punktate von Pankreaskarzinomen und benignen Pankreaserkrankungen konnten letztendlich statistisch ausgewertet werden.

In Tabelle 10 sind Daten zu Symptomen, Vorerkrankungen und Risikofaktoren der einbezogenen 201 Patienten dargestellt, soweit sie in den Krankenakten aufgeführt waren. Nicht zu jedem Patienten waren hier Daten verfügbar.

	insgesamt	kein Malignom	Pankreaskarzinom	NET	Metastase
Anzahl der Patienten	201	61	122	7	11
Durchschnittsalter (Jahre)	68,66	64,15	71,4	64	66,5
Symptome	Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl
Ikterus	14	3	11	0	0
Oberbauchschmerzen in den Rücken ausstrahlend	13	1	11	1	0
Gewichtsverlust	49	7	40	2	0
Völlegefühl	75	17	55	3	0
Auffälligkeiten der Blutwerte (z.B. Lipase, CA19-9, CEA)	9	3	5	1	0
Auffälligkeiten in der Bildgebung	33	12	16	3	2
Neu diagnostizierter Diabetes mellitus	6	2	3	0	1
Sonstige Symptome ¹⁾	49	15	28	2	4
Keine Angaben	31	11	15	1	3
Vorerkrankungen					
Pankreatitiden	11	7	3	1	0
bekanntes Pankreaskarzinom	4	0	4	0	0
Leberzirrhose	7	2	4	0	1
Pankreasinsuffizienz	2	1	1	0	0
bekannte Zysten	12	6	5	0	1
bekannte Raumforderung des Pankreas oder bekannte IPMN	5	5	0	0	0
Keine Angaben	166	42	109	6	8
Risikofaktoren					
Rauchen	32	12	18	1	1
Alkohol	12	9	3	0	0
Keine Angaben	153	41	96	6	9

1) sonstige Symptome: Oberbauchschmerzen, Unterbauchschmerzen, Obstipationen, Diarrhoen, Erbrechen, Dyspnoe, Schwellung eines Beines, B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust), Appetitlosigkeit, Hämatemesis, erneute FNAP, unklare Leberaumforderungen

Tabelle 10 Angaben zum Patientenkollektiv, soweit aus den Krankenakten zu erhalten.

3.2 Treffericherheit der Zytologie von Pankreaskarzinomen

In der folgenden Statistik werden die 195 Präparate von Pankreaskarzinomen und benignen Pankreaserkrankungen ausgewertet, für welche sowohl Daten aus der FISH-Untersuchung und dem *Follow-Up* vorlagen. Während die eindeutig tumorpositiven oder -negativen Diagnosegruppen in der statistischen Auswertung keine Probleme bereiten, können die diagnostisch unklaren Diagnosegruppen "dringender Verdacht" und "zweifelhaft" auf verschiedene Arten statistisch positiv oder negativ abgebildet werden. Die Verteilung der tatsächlichen zytologischen Diagnosen ist dargestellt in Abb. 9.

Tatsächliche zytologische Diagnosen (n=195)

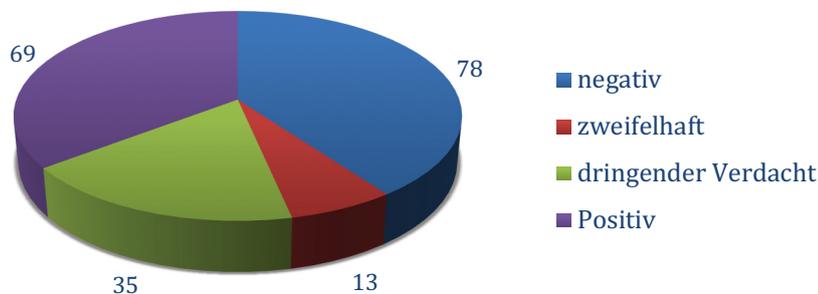


Abb. 9 Verteilung der tatsächlichen zytologischen Diagnosen

Qualitative Diagnose	Tatsächliche Diagnosegruppe	Qualitative Diagnose	Tatsächliche Diagnosegruppe	Qualitative Diagnose	Tatsächliche Diagnosegruppe
negativ (126)	negativ (78)	negativ (78)	negativ (78)	negativ (91)	negativ (78)
	zweifelhaft (13)		zweifelhaft (13)		zweifelhaft (13)
	dringender Verdacht (35)	dringender Verdacht (35)	dringender Verdacht (35)	positiv (104)	dringender Verdacht (35)
positiv (69)	positiv (69)	positiv (117)	positiv (69)	positiv (104)	positiv (69)

Absolute Zahlen in Klammern.

Tabelle 11 Drei Methoden der statistischen Auswertung der zytologischen Diagnosen durch Dichotomisierung (n=195)

Es gibt drei Möglichkeiten zur Dichotomisierung, welche in Tabelle 11 dargestellt sind. Entweder werden alle unklaren Diagnosen statistisch den negativen zugeordnet, oder alle unklaren Diagnosen werden den positiven zugeordnet, oder aber die zweifelhaften Diagnosen werden den negativen und die dringend verdächtigen den positiven Diagnosen zugeordnet.

Entsprechend der Intention eines Suchtestes der Zytologie sollte die Sensitivität möglichst hoch sein. Um dies zu erreichen, sollten alle Zytologien ab einem zweifelhaften Befund einer qualitativ positiven Zytologie zugeordnet werden, vergleiche Tabelle 11 mittlerer Bereich. Für die beschriebene Dichotomisierung ergibt sich eine Sensitivität von 87,2% und eine Spezifität von 88,57%. Im Vergleich zu den anderen beiden Varianten liegt die Sensitivität bei dieser Methode am höchsten. Wenn nur die positiven Zytologien zu den qualitativ positiven Zytologien gezählt werden, liegt die Sensitivität bei 55% und die Spezifität bei 100%. In einer Aufteilung, bei der die negativen und zweifelhaften Zytologien die qualitativ negativen Zytologien darstellen und die dringend verdächtigen und positiven Zytologien die qualitativ positiven Zytologien, liegt die Sensitivität bei 82,4% und die Spezifität bei 98,57%. Übersicht der Ergebnisse in Tabelle 12.

Da die Zytologie initial als Suchtest mit einer möglichst hohen Sensitivität durchgeführt wird, sollte die weitergehende Untersuchung der Präparate mit Hilfe der FISH dann ein Bestätigungstest mit einer möglichst hohen Spezifität ergeben. Details siehe unter Kapitel „3.4 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung“.

Tatsächliche Zytologie	klinische Diagnose	Qualitative Zytologie	klinische Diagnose	Qualitative Zytologie	klinische Diagnose	Qualitative Zytologie	klinische Diagnose
negativ (78)	negativ (62) positiv (16)	negativ (126)	negativ (70) positiv (56)	negativ (78)	negativ (62) positiv (16)	negativ (91)	negativ (69) positiv (22)
zweifelhaft (13)	negativ (7) positiv (6)		positiv (117)	negativ (8) positiv (109)	negativ (1)		positiv (104)
dringender Verdacht (35)	negativ (1) positiv (34)		positiv (69)	negativ (0) positiv (69)			
positiv (69)	negativ (0) positiv (69)						
Absolute Zahlen in Klammern.		Sensitivität	55% (69/125)	Sensitivität	87,20% (109/125)	Sensitivität	82,40% (103/125)
		Spezifität	100% (70/70)	Spezifität	88,57% (62/70)	Spezifität	98,57% (69/70)
		PPV	100% (69/69)	PPV	93,16% (109/117)	PPV	99,04% (103/104)
		NPV	55,56% (70/126)	NPV	79,49% (62/78)	NPV	75,82% (69/91)

Tabelle 12 Treffsicherheiten der Zytologie nach Dichotomisierung im Vergleich zur abschließenden klinischen Diagnose (n=195)

3.3 Entnahmeorte der zytologischen Präparate

Angaben über die Lokalisation der 195 ausgewerteten Pankreaspunktate fanden sich auf den Einsendescheinen für die Zytologie der Uniklinik Düsseldorf.

Ohne nähere Angaben über den Entnahmeort waren 115 Präparate. Aus dem Bereich des Pankreaskopfes stammten 39 Präparate, 20%, aus dem Pankreaskorpus stammten 7 Präparate, 3,6%, aus dem Pankreasschwanz stammten 13 Präparate, 6,7%. Ein Präparat war sowohl mit Pankreaskopf als auch mit Pankreasschwanz gekennzeichnet. Bei insgesamt 20 Präparaten handelte es sich um Punktate zystischer Pankreastumoren, 10,3%. Darstellung in Abb. 10.

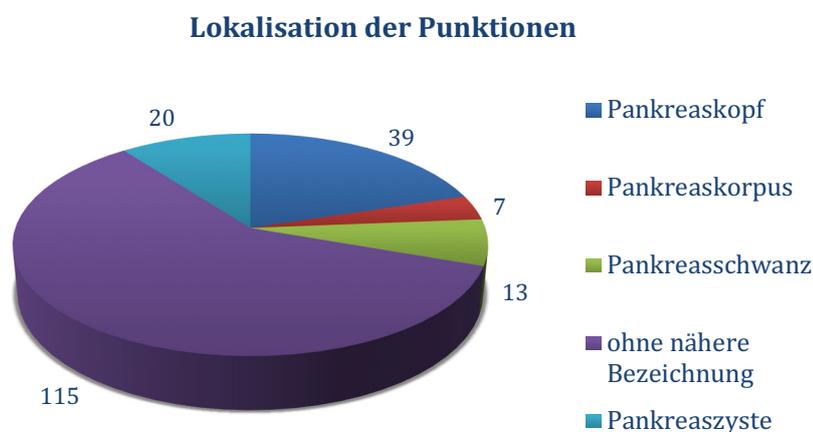


Abb. 10 Angaben über die Lokalisation der Pankreaspunktate für die Zytopathologie der eingeschlossenen 195 Präparate

3.4 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Um die Ergebnisse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zur Abgrenzung eines Pankreaskarzinoms von einer benignen Pankreaserkrankung auswerten zu können, wurde zunächst anhand der ROC-Kurve und des Youden-Index die Sensitivität und die Spezifität bei einer Reihe möglicher Grenzwerte aneuploider Zellen überprüft.

3.4.1 Treffsicherheiten der FISH für Pankreaskarzinome bei verschiedenen Grenzwerten aneuploider Zellen

Um eine Diagnose im Sinne einer malignen Transformation in der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung stellen zu können, muss zunächst ein Cut-Off Wert für die Anzahl der hierfür erforderlichen chromosomal aneuploiden Zellkerne festgelegt werden. Dazu wurde die Anzahl an aneuploiden Zellkernen für die Werte 1 – 10 untersucht. Für jeden Grenzwert

wurde eine Vierfeldertafel erstellt und damit verbunden die Sensitivität, Spezifität, der positive prädiktive Wert und der negative prädiktive Wert berechnet und in Tabelle 13 bis Tabelle 22 dargestellt. Die Auswertung erfolgt anhand der 195 Präparate von Pankreaskarzinomen und benignen Pankreaserkrankungen.

Der Vollständigkeit halber wird für neuroendokrine Tumore (NET) und Metastasen im Pankreas die Prävalenz am Ende des Kapitels angegeben, vergleiche Tabelle 23. Details zu NET und Metastasen im Pankreas sind im Kapitel „3.8 Sonderfälle“ zu finden.

Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse für den Grenzwert eins. Das bedeutet, dass die Diagnose einer malignen Transformation (hier Pankreaskarzinom) bereits bei einer im Präparat enthaltenen chromosomal aneuploiden Zelle gestellt würde. In unserem Kollektiv hätten 70% (49/70) der Gesunden eine nicht zutreffende Pankreaskarzinom-Diagnose. Die Rate an falsch negativen Befunden liegt bei 6% (8/125).

Grenzwert 1 aneuploide Zelle				
	krank	gesund		
				Sensitivität 94% (117/125)
Test pos.	117	49	166	Spezifität 30% (21/70)
Test neg.	8	21	29	pos. präd. Wert 70% (117/166)
	125	70		neg. präd. Wert 72% (21/29)
n = 195				

Tabelle 13 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit einer aneuploiden Zelle mit Berechnung der Sensitivität, Spezifität, dem positiven prädiktiven Wert und negativen prädiktiven Wert

Wenn der Grenzwert auf zwei erhöht wird, ändern sich die Ergebnisse, wie in Tabelle 14 dargestellt. Der Anteil an falsch positiven Fällen fällt auf 49% (34/70). Die Rate der falsch negativen Fällen steigt auf 10% (12/125).

Grenzwert 2 aneuploide Zellen				
	krank	gesund		
				Sensitivität 90% (113/125)
Test pos.	113	34	147	Spezifität 51% (36/70)
Test neg.	12	36	48	pos. präd. Wert 77% (113/147)
	125	70		neg. präd. Wert 75% (36/48)
n = 195				

Tabelle 14 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit zwei aneuploiden Zellen

Tabelle 15 zeigt, wie sich die Werte bei einer Grenze von drei aneuploiden Zellen ändern. Damit werden 24% (17/70) der Gesunden falsch positiv bewertet. Die Rate der falsch negativen Diagnosen steigt auf 13% (16/125).

Grenzwert		krank	gesund	
3 aneuploide Zellen				
	Test pos.	109	17	126
	Test neg.	16	53	69
		125	70	
		n = 195		
	Sensitivität			87% (109/125)
	Spezifität			76% (53/70)
	pos. präd. Wert			87% (109/126)
	neg. präd. Wert			77% (53/69)

Tabelle 15 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit drei aneuploiden Zellen

Bei einem Grenzwert von vier aneuploiden Zellkernen liegt die Rate der falsch negativen Fälle bei 13% (16/125). Falsch positive Diagnosen kommen bei 14% (10/70) der Gesunden vor. Dargestellt in Tabelle 16.

Grenzwert		krank	gesund	
4 aneuploide Zellen				
	Test pos.	109	10	119
	Test neg.	16	60	76
		125	70	
		n = 195		
	Sensitivität			87% (109/125)
	Spezifität			86% (60/70)
	pos. präd. Wert			92% (109/119)
	neg. präd. Wert			79% (60/76)

Tabelle 16 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit vier aneuploiden Zellen

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse für einen Grenzwert von fünf aneuploiden Zellen dargestellt. Die Rate der falsch positiven Diagnosen liegt bei 7% (5/70). Die Rate der Erkrankten, die nicht erkannt wurden, liegt bei 16% (20/125).

Grenzwert		krank	gesund	
5 aneuploide Zellen				
	Test pos.	105	5	110
	Test neg.	20	65	85
		125	70	
		n = 195		
	Sensitivität			84% (105/125)
	Spezifität			93% (65/70)
	pos. präd. Wert			95% (105/110)
	neg. präd. Wert			76% (65/85)

Tabelle 17 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit fünf aneuploiden Zellen

Wird der Grenzwert weiter auf sechs aneuploide Zellen erhöht, ändern sich die Werte wie in Tabelle 18 dargestellt. Die Rate der falsch negativen Fälle steigt auf 18% (22/125). Die Rate mit falsch positiver Diagnose fällt auf 6% (4/70).

Grenzwert 6 aneuploide Zellen			
	krank	gesund	
Test pos.	103	4	107
Test neg.	22	66	88
	125	70	
			n = 195

Sensitivität	82% (103/125)
Spezifität	94% (66/70)
pos. präd. Wert	96% (103/107)
neg. präd. Wert	75% (66/88)

Tabelle 18 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit sechs aneuploiden Zellen

Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse bei einem Grenzwert von sieben aneuploiden Zellkernen. Die Rate der falsch positiven Fälle liegt bei 4% (3/70). Die Rate der Erkrankten, die nicht erkannt werden, bleibt mit 18% (22/125) gleich.

Grenzwert 7 aneuploide Zellen			
	krank	gesund	
Test pos.	103	3	106
Test neg.	22	67	89
	125	70	
			n = 195

Sensitivität	82% (103/125)
Spezifität	96% (67/70)
pos. präd. Wert	97% (103/106)
neg. präd. Wert	75% (67/89)

Tabelle 19 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit sieben aneuploiden Zellen

Bei einem Grenzwert von acht aneuploiden Zellkernen zeigen sich die in Tabelle 20 dargestellten Werte. Die Rate der falsch positiven liegt bei 3% (2/70). Die Rate der falsch negativen steigt an auf 24% (30/125).

Grenzwert 8 aneuploide Zellen			
	krank	gesund	
Test pos.	95	2	97
Test neg.	30	68	98
	125	70	
			n = 195

Sensitivität	76% (95/125)
Spezifität	97% (68/70)
pos. präd. Wert	98% (95/97)
neg. präd. Wert	69% (68/98)

Tabelle 20 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit acht aneuploiden Zellen

In Tabelle 21 wurde ein Grenzwert von neun aneuploiden Zellen dargestellt. Falsch positive Diagnosen ergeben sich bei 3% (2/70) der Gesunden. Die Anzahl der falsch negativen Diagnosen steigt auf 28% (35/125).

Grenzwert					
9 aneuploide Zellen		krank	gesund		
Test pos.	90	2	92	Sensitivität	72% (90/125)
Test neg.	35	68	103	Spezifität	97% (68/70)
	125	70		pos. präd. Wert	98% (90/92)
				neg. präd. Wert	66% (68/103)
n = 195					

Tabelle 21 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit neun aneuploiden Zellen

Tabelle 22 zeigt den höchsten Grenzwert, den wir untersucht haben, mit zehn aneuploiden Zellkernen. Dabei zeigen sich keine falsch positiven Diagnosen. Falsch negative Diagnosen steigen auf 33% (41/125).

Grenzwert					
10 aneuploide Zellen		krank	gesund		
Test pos.	84	0	84	Sensitivität	67% (84/125)
Test neg.	41	70	111	Spezifität	100% (70/70)
	125	70		pos. präd. Wert	100% (84/84)
				neg. präd. Wert	63% (70/111)
n = 195					

Tabelle 22 Vierfeldertafel für den Grenzwert mit zehn aneuploiden Zellen

Bei den neuroendokrinen Tumoren des Pankreas liegt die Prävalenz chromosomal aneuploider Zellen je nach Grenzwert von 1-10 zwischen 43 und 86%. Ab einem Grenzwert von 6 aneuploiden Zellen ändert sich die Prävalenz nicht mehr. Für Metastasen im Pankreas liegt die Prävalenz entsprechend zwischen 55 und 82%. Unter 70% sinkt die Prävalenz erst ab einem Grenzwert von 8 oder mehr Zellen mit chromosomaler Aneuploidie. Die Ergebnisse für verschiedene Grenzwerte bei NET und Metastasen im Pankreas sind in Tabelle 23 dargestellt.

Grenzwert		NET	Metastase
1	Prävalenz	86%	82%
	Test pos.	6	9
	krank	7	11
2	Prävalenz	71%	82%
	Test pos.	5	9
	krank	7	11
3	Prävalenz	71%	82%
	Test pos.	5	9
	krank	7	11
4	Prävalenz	71%	82%
	Test pos.	5	9
	krank	7	11
5	Prävalenz	57%	82%
	Test pos.	4	9
	krank	7	11
6	Prävalenz	43%	82%
	Test pos.	3	9
	krank	7	11
7	Prävalenz	43%	73%
	Test pos.	3	8
	krank	7	11
8	Prävalenz	43%	64%
	Test pos.	3	7
	krank	7	11
9	Prävalenz	43%	64%
	Test pos.	3	7
	krank	7	11
10	Prävalenz	43%	55%
	Test pos.	3	6
	krank	7	11

Tabelle 23 Prävalenz verschiedener Grenzwerte chromosomal aneuploider Zellen bei neuroendokrinen Tumoren und Metastasen im Pankreas

3.4.2 ROC-Kurve und Youden-Index

Anhand der Werte, die für die zehn Grenzwerte durch die Vierfeldertafel berechnet wurden, konnte eine ROC-Kurve erstellt werden. Die Sensitivität wird gegen 1-Spezifität in einem Koordinatensystem aufgetragen. Der Verlauf dieser Kurve ist in Abb. 11 zu sehen. Der Wert, mit dem besten Verhältnis von Sensitivität zu Spezifität liegt im Koordinatensystem links oben. Hierbei ist zu erkennen, dass die Werte für einen Cut-Off bei fünf, sechs und sieben chromosomal aneuploider Zellen sehr eng beieinander liegen.

Gleichzeitig wurde wie oben beschrieben der Youden-Index verwendet, vergleiche Kapitel „2.7 Statistische Auswertung“. In unserer Studie liegt der Grenzwert von sieben aneuploiden Zellen am nächsten an 1. Der höchste Youden Index beträgt 0,781, dargestellt in Tabelle 24. Die Sensitivität für diesen Grenzwert liegt bei 82%, die Spezifität bei 96%. Details zum Grenzwert 7 siehe Tabelle 19 und Abb. 12.

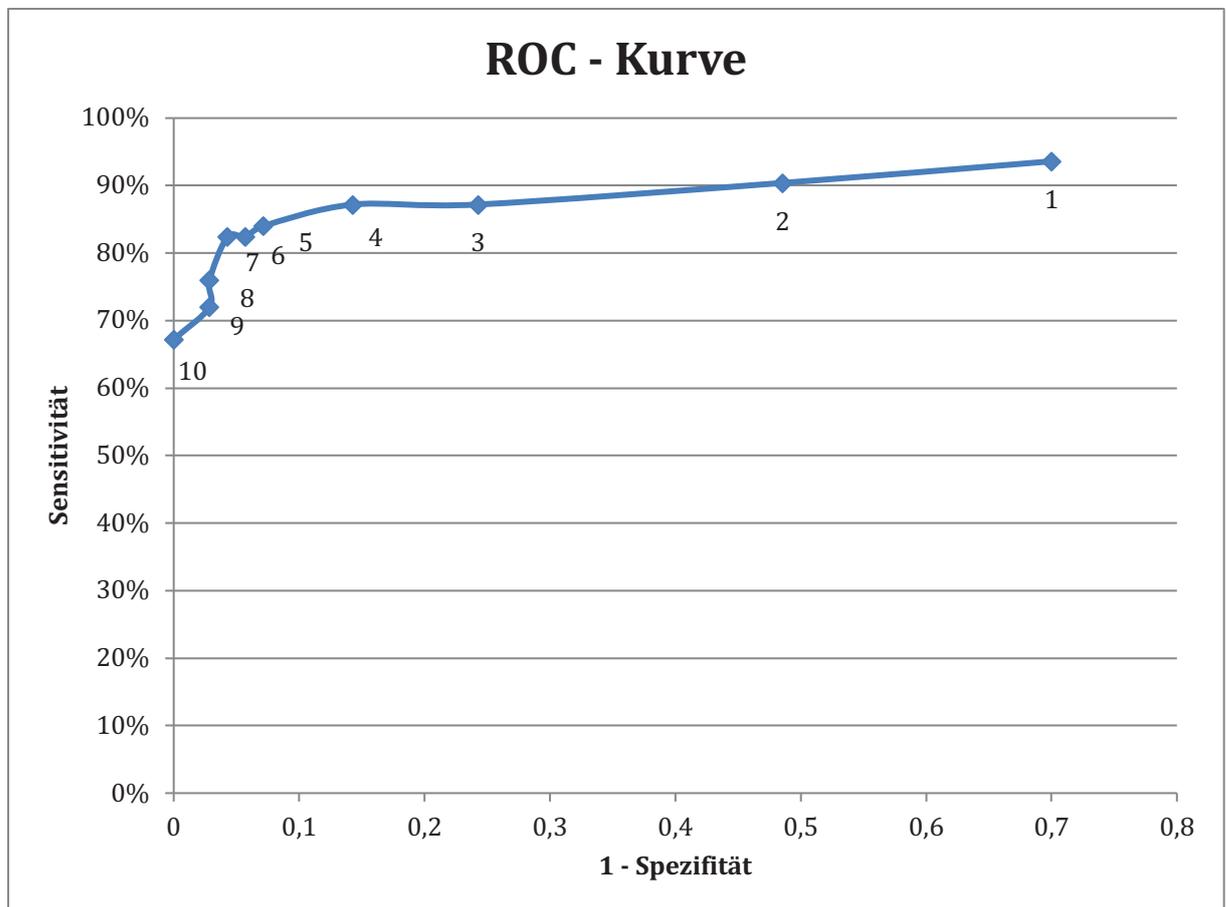


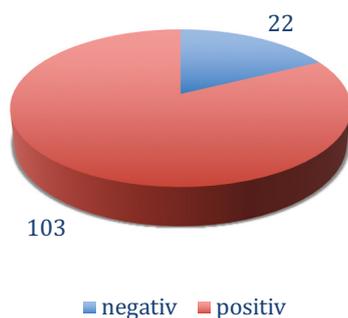
Abb. 11 ROC-Kurve

Zahl aneuploider Zellkerne	Sensitivität	Spezifität	Youden-Index
1	94%	30%	0,236
2	90%	51%	0,418285714
3	87%	76%	0,629142857
4	87%	86%	0,729142857
5	84%	93%	0,768571429
6	82%	94%	0,766857143
7	82%	96%	0,781142857
8	76%	97%	0,731428571
9	72%	97%	0,691428571
10	67%	100%	0,672

Tabelle 24 Youden-Index, Sensitivität und Spezifität für die Grenzwerte 1 bis 10

Der Grenzwert fünf könnte auf Grund seiner Konstellation mit um 2% verbesserter Sensitivität und 3% verschlechterter Spezifität zusätzlich berücksichtigt werden, vergleiche Tabelle 17 und Abb. 13. Ein Wert von fünf aneuploiden Zellkernen wird in der Literatur häufig für die FISH Diagnostik verwendet und zeigt statistisch gute Ergebnisse. [37][52][53] In unseren Ergebnissen zeigt der Grenzwert sieben aber ein besseres statistisches Ergebnis.

Klinische Diagnose positiv im Vergleich zu den FISH Ergebnissen, Cut-Off 7



Klinische Diganose negativ im Vergleich zu den FISH Ergebnissen, Cut-Off 7

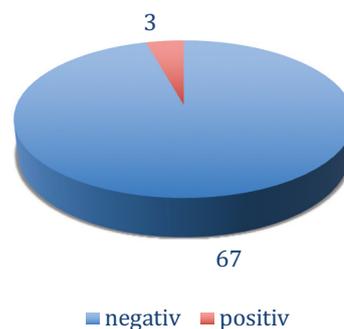
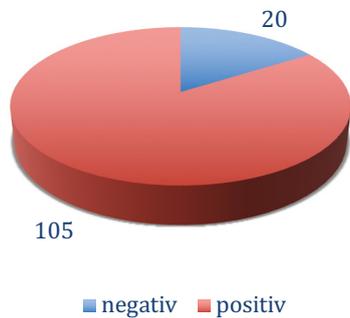


Abb. 12 Klinische Diagnose im Vergleich zu der FISH Diagnose bei einem Grenzwert von sieben aneuploiden Zellen

Klinische Diagnose positiv im Vergleich zu den FISH Ergebnissen, Cut-Off 5



Klinische Diagnose negativ im Vergleich zu den FISH Ergebnissen, Cut-Off 5

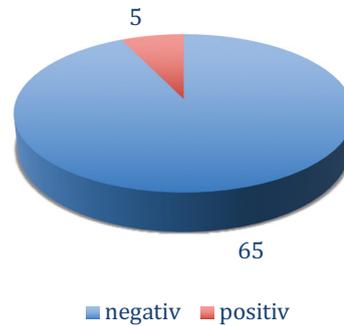


Abb. 13 Klinische Diagnose im Vergleich zu der FISH Diagnose bei einem Grenzwert von fünf aneuploiden Zellen

3.4.3 Subgruppenanalyse verschiedener zytologischer Diagnosekategorien bei pankreatobiliären Karzinomen und benignen Pankreaserkrankungen (n=195)

In Vorbereitung einer eventuellen Anwendung der FISH als bestätigende adjuvante Methode lautet die zu beantwortende Frage: wie ist die diagnostische Treffsicherheit der FISH bei den vorstehend ermittelten Grenzwerten in den verschiedenen zytologischen Diagnosekategorien negativ, zweifelhaft, dringender Verdacht und positiv. Hierbei werden die NET und Metastasen im Pankreas nicht eingeschlossen, es werden nur Pankreaskarzinome und benigne Pankreaserkrankungen betrachtet (n=195).

Im Folgenden werden die FISH-Ergebnisse der nach zytologischer Diagnosekategorie geordneten Präparate gesondert mit dem *Follow-Up* verglichen.

3.4.3.1 Diagnostische Maßzahlen der Subgruppe zytologische Diagnose „negativ“

Auswertung bei zytologisch negativen Befunden (n=78). Für die Grenzwerte bei fünf und sieben chromosomal aneuploiden Zellen zeigen die 62 klinisch negativen Präparate auch ein negatives FISH Ergebnis. Ausnahme bildet ein falsch FISH-positiver Fall beim Cut-off von fünf aneuploiden Zellen.

Bei 16 Fällen eines pankreatobiliären Karzinoms zeigten sich durchweg neben der negativen Zytologie auch ein falsch negatives FISH Ergebnis (15 Fälle). Diese Konstellation spricht eher dafür, dass die Läsion bei der Punktion nicht erfasst wurde (sampling error), als dass in der Diagnostik Zellen (screening error) übersehen wurden. Ein Fall ist in der FISH-Diagnostik bei

einem Grenzwert von fünf sowie sieben aneuploiden Zellen positiv. Vergleiche Tabelle 25 und Tabelle 26.

		<i>Follow Up</i>		
			positiv	negativ
FISH	positiv	1	1	2
	negativ	15	61	76
		16	62	n=78

Sensitivität 6,25% (1/16)

Spezifität 98,39% (61/62)

Positiver Prädiktionswert 50% (1/2)

Negativer Prädiktionswert 80,26% (61/76)

Tabelle 25 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "negativ" und Grenzwert fünf

		<i>Follow Up</i>		
			positiv	negativ
FISH	positiv	1	0	1
	negativ	15	62	77
		16	62	n=78

Sensitivität 6,25% (1/16)

Spezifität 100% (62/62)

Positiver Prädiktionswert 100% (1/1)

Negativer Prädiktionswert 80,52% (62/77)

Tabelle 26 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "negativ" und Grenzwert sieben

3.4.3.2 Diagnostische Maßzahlen der Subgruppe zytologische Diagnose „zweifelhaft“

Auswertung bei zytologisch zweifelhaften Befunden (n=13). Die Grenzwerte bei fünf und sieben chromosomal aneuploiden Zellen zeigen die gleichen Ergebnisse in der Auswertung, vergleiche Tabelle 27 und Tabelle 28. Sechs von 13 Proben in der zytologischen Diagnosekategorie zweifelhaft stammen von pankreatobiliären Karzinomen. Keines kann

hier mittels chromosomaler Aneuploidie in der FISH detektiert werden. Es sind andererseits bei beiden Grenzwerten zwei Präparate falsch positiv.

		<i>Follow Up</i>		
			positiv	negativ
FISH	positiv	0	2	2
	negativ	6	5	11
		6	7	n=13

Sensitivität 0% (0/6)
Spezifität 71,43% (5/7)
Positiver Prädiktionswert 0% (0/2)
Negativer Prädiktionswert 45,45% (5/11)

Tabelle 27 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "zweifelhaft" und Grenzwert fünf

		<i>Follow Up</i>		
			positiv	negativ
FISH	positiv	0	2	2
	negativ	6	5	11
		6	7	n=13

Sensitivität 0% (0/6)
Spezifität 71,43% (5/7)
Positiver Prädiktionswert 0% (0/2)
Negativer Prädiktionswert 45,45% (5/11)

Tabelle 28 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "zweifelhaft" und Grenzwert sieben

3.4.3.3 Diagnostische Maßzahlen der Subgruppe zytologische Diagnose „dringender Verdacht“

Auswertung bei zytologisch dringend verdächtigen Befunden (n=35). Die meisten Pankreaskarzinome werden bei beiden Grenzwerten für eine chromosomale Aneuploidie richtig als maligne erkannt, bei einem Grenzwert von fünf sind es 82,35% (28/34), bei einem

Grenzwert von sieben 76,47% (26/34), vergleiche Tabelle 29 und Tabelle 30. Ein falsch positives Ergebnis zeigt sich in der Auswertung bei keinem Grenzwert.

		<i>Follow Up</i>		
			positiv	negativ
FISH	positiv	28	0	28
	negativ	6	1	7
		34	1	n=35

Sensitivität 82,35% (28/34)

Spezifität 100% (1/1)

Positiver Prädiktionswert 100% (28/28)

Negativer Prädiktionswert 14,29% (1/7)

Tabelle 29 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "dringender Verdacht" und Grenzwert fünf

		<i>Follow Up</i>		
			positiv	negativ
FISH	positiv	26	0	26
	negativ	8	1	9
		34	1	n=35

Sensitivität 76,47% (26/34)

Spezifität 100% (1/1)

Positiver Prädiktionswert 100% (26/26)

Negativer Prädiktionswert 11,11% (1/9)

Tabelle 30 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "dringender Verdacht" und Grenzwert sieben

3.4.3.4 Diagnostische Maßzahlen der Subgruppe zytologische Diagnose „positiv“

Auswertung bei zytologisch positiven Befunden (n=69). Bei den hier eingeschlossenen 69 Fällen eines pankreatobiliären Karzinoms werden 65 (Cut off 7) beziehungsweise 66 (Cut off 5) als richtig positiv mittels FISH detektiert, vergleiche Tabelle 31 und Tabelle 32. Ein Fehlen

chromosomaler Aneuploidie und damit ein falsch negatives Ergebnis zeigt sich in 3 beziehungsweise 4 Präparaten je nach Grenzwert.

		<i>Follow Up</i>		
		positiv	negativ	
FISH	positiv	66	0	66
	negativ	3	0	3
		69	0	n=69

Sensitivität 95,65% (66/69)

Spezifität -

Positiver Prädiktionswert 100% (66/66)

Negativer Prädiktionswert -

Tabelle 31 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "positiv" und Grenzwert fünf

		<i>Follow Up</i>		
		positiv	negativ	
FISH	positiv	65	0	65
	negativ	4	0	4
		69	0	n=69

Sensitivität 94,2% (65/69)

Spezifität -

Positiver Prädiktionswert 100% (65/65)

Negativer Prädiktionswert -

Tabelle 32 Subgruppenanalyse bei zytologischer Diagnose "positiv" und Grenzwert sieben

3.4.4 Subgruppenanalyse neuroendokriner Tumore und Metastasen im Pankreas

Zusammengefasst sind die Ergebnisse des Vergleichs zwischen Zytologie und FISH der NET und der Metastasen in Tabelle 33. Bei 3 der 7 NET wird sowohl mit Zytologie als auch mittels FISH die Diagnose übersehen. Bei den Metastasen gibt es zytologisch nur sicher tumorpositive oder -negative Befunde. Mit Hilfe der FISH Diagnostik ergeben sich allerdings im letzteren Fall noch eine (Cut-Off 7) bzw. zwei (Cut-Off 5) positive Diagnosen.

Zytologie	FISH	Neuroendokrine Tumore (n=7)		Metastasen (n=11)	
		Cut-Off 5	Cut-Off 7	Cut-Off 5	Cut-Off 7
Negativ	negativ	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/4 (50%)	3/4 (75%)
	positiv	0	0	2/4 (50%)	1/4 (25%)
Positiv	negativ	0	0	0	0
	positiv	0	0	7/7 (100%)	7/7 (100%)
Zweifelhaft	negativ	0	0	0	0
	positiv	0	0	0	0
Dringender Verdacht	negativ	0	1/4 (25%)	0	0
	positiv	4/4 (100%)	3/4 (75%)	0	0

Tabelle 33 Zytologische Diagnosen im Vergleich zu den Ergebnissen der FISH mit den Grenzwerten 5 und 7 bei NET und Metastasen des Pankreas

3.4.5 Repetitive Punktionen

In acht Fällen von pankreaseigenen Tumoren und in einem Fall einer Metastase wurden bei zunächst unzureichendem Material oder nicht eindeutiger Diagnose Punktionen der suspekten Raumforderung wiederholt. In acht von neun Fällen wurde eine wiederholte Punktion zu einem anderen Zeitpunkt durchgeführt als die primäre Punktion. Zwischen den Punktionen lagen einige Tage bis maximal 6 Monate.

Die Nummer 4 in dieser Auflistung nimmt eine Sonderposition ein, siehe Tabelle 35, und fehlt daher in Tabelle 34.

In einem Fall (Nr. 1, Tabelle 34) wurde nur eine Punktion durchgeführt, es wurden aber zwei zytologische Fraktionen getrennt präpariert und untersucht. Es zeigte sich in der Zytologie einmal ein positives Ergebnis und einmal ein dringender Tumorverdacht. Die durchgeführten FISH Untersuchungen bestätigten den Verdacht beziehungsweise das positive Ergebnis, der Referenzstandard war positiv.

Bei sieben Fällen wurde insgesamt zweimal eine repetitive Untersuchung durchgeführt. In einem Fall (Nr. 4, Tabelle 35) sogar fünfmal, dieser Fall wird am Ende des Abschnitts gesondert besprochen.

Lfd. Nr. ¹⁾	Zweizeitig	Zeitpunkte der Punktionen	Präparat Nr.	Punktion 1			Punktion 2		
				Zytologie	FISH (5 / 7) ²⁾	Referenzstandard	Zytologie	FISH (5 / 7) ²⁾	Referenzstandard
1	nein	01/2011	P5, P9	pos	pos / pos	pos	d.V.	pos / pos	pos
2	ja	01/2011, versch. Tage	P17, P18	neg	neg / neg	pos (Met)	neg	pos / pos	pos (Met)
3	ja	02/2011, 03/2011	P25, P41	pos	neg / neg	pos	zw	neg / neg	pos
5	ja	06/2011, 08/2011	P71, P108	neg	neg / neg	pos	zw	neg / neg	pos
6	ja	08/2011, 10/2011	P82, P106	neg	neg / neg	neg	zw	pos / pos	neg
7	ja	08/2011, versch. Tage	P105, P116	neg	neg / neg	neg	neg	neg / neg	neg
8	ja	09/2011, versch. Tage	P121, P123	neg	neg / neg	neg	neg	neg / neg	neg
9	ja	03/2012, 06/2012	UP62, UP87	neg	neg / neg	neg	neg	neg / neg	neg

¹⁾ Daten zu Lfd. Nr. 4 siehe Tabelle 35

²⁾ Grenzwerte für die FISH: fünf bzw. sieben Zellen mit Aneuploidie definieren ein positives FISH Ergebnis. Details siehe Kapitel „3.4.1 Treffsicherheiten der FISH für Pankreaskarzinome bei verschiedenen Grenzwerten aneuploider Zellen“.

pos: positiv; neg: negativ; d.V.: dringender Verdacht, zw: zweifelhaft; Met: Metastase

Tabelle 34 Übersicht der repetitiven Punktionen mit den Ergebnissen der Zytologie, der FISH und dem Referenzstandard bezüglich der ersten und zweiten Punktion.

In den meisten Fällen zeigte sich keine bedeutsame Änderung der Diagnose durch eine wiederholte Punktion. In drei von sieben Fällen (Nr. 7-9, Tabelle 34) zeigte sich durchweg das gleiche tumornegative Ergebnis in der Zytologie, der FISH und dem Referenzstandard. Bei zwei Fällen (Nr. 3 und 5, Tabelle 34) war das Ergebnis der FISH auch in der Wiederholung falsch negativ. Der klinische Referenzstandard war bei beiden Fällen positiv. Zytologisch war einer der beiden Fällen initial richtig positiv, wohingegen die Wiederholungspunktion nur eine zweifelhafte Diagnose erbrachte. In einem Fall (Nr. 6, Tabelle 34) zeigte sich sogar initial bei der ersten Punktion ein richtig negatives Ergebnis in Zytologie und FISH. In der Wiederholungspunktion mit zweifelhafter Zytologie war die FISH falsch positiv.

Bei einer Pankreasmetastase (Nr. 2, Tabelle 34) war die FISH im Gegensatz zur wiederholt negativen Zytologie in der Wiederholungspunktion richtig positiv.

Lfd. Nr.	Mehrzeitig	Zeitraum	Präparat Nr.
4	Ja	02/2011-11/2012	P28, P112, UP63, UP 93, UP127
	Zytologie	FISH	Referenzstandard
Punktion 1	zw	neg / neg	neg
Punktion 2	neg	neg / neg	neg
Punktion 3	neg	neg / neg	neg
Punktion 4	zw	neg / neg	neg
Punktion 5	zw	neg / neg	neg

Legende: neg = negativ; zw = zweifelhaft;

²⁾ Grenzwerte für die FISH: fünf bzw. sieben Zellen mit Aneuploidie definieren ein positives FISH Ergebnis. Details siehe Kapitel „3.4.1 Treffsicherheiten der FISH für Pankreaskarzinome bei verschiedenen Grenzwerten aneuploider Zellen“.

Tabelle 35 Sonderfall Nr. 4 mit insgesamt fünf repetitiven Punktionen, dargestellt mit den Ergebnissen der Zytologie, der FISH und dem Referenzstandard bezüglich der fünf Punktionen.

In einem Fall wurde eine Punktion fünfmal wiederholt in einem Zeitraum von 21 Monaten, siehe Tabelle 35. Zweimal zeigte die Zytologie ein negatives, dreimal ein zweifelhaftes Ergebnis. Bei allen fünf Punktionen zeigte die FISH sowohl bei einem Grenzwert von fünf sowie sieben Zellen mit chromosomaler Aneuploidie ein negatives Ergebnis. Auch der klinische Referenzstandard war immer negativ für ein Pankreaskarzinom. Endosonographisch wurde der Befund als oligozystische Raumforderung im Pankreaskopf beschrieben, nebenbefundlich zeigten sich bekannte Leberzysten.

Zusammengefasst hätte bei neun repetitiv punktierten Patienten die FISH lediglich in einem Fall eine zum klinischen Referenzstandard passende Änderung der Diagnose erbracht.

3.5 Klinische Anwendung der FISH in der zytologischen Pankreaskarzinomdiagnostik

Eine tumorpositive oder -negative zytologische Diagnose ist in den eigenen Fällen korrekt. Eine zusätzliche Anwendung der FISH bestätigt meist die qualitative Diagnose tumorpositiv oder -negativ und bringt nur in wenigen Fällen einen diagnostischen Zugewinn, allerdings auch mit dem erhöhtem Risiko falsch-positiver Befunde (vgl. Kapitel 3.4). Den größten diagnostischen Zugewinn der FISH ergibt sich als Zweitmethode nach diagnostisch unklarer Zytologie, wie im Folgenden dargestellt. Der Zugewinn ist nach Subgruppenanalyse, wie im Kapitel 3.4.3 beschrieben, insbesondere bei dringend verdächtiger Zytologie groß, wohingegen nach zweifelhafter Zytologie keine Malignität zusätzlich detektiert werden konnte, allerdings waren einige finale Befunde hier richtig negativ.

Anhand der Ergebnisse der zusätzlichen FISH-Untersuchung wurden im Rahmen der Studie die zunächst als diagnostisch unklar befundenen Zytologien, zweifelhaft und dringend verdächtig, final tumorpositiv oder –negativ gewertet. Für die folgende Auswertung wird bei zytologisch tumorpositiven oder –negativen Präparaten keine zusätzliche FISH mit ausgewertet und das Ergebnis der Zytologie bestimmt allein die finale Diagnose. Dadurch ergeben sich Vierfeldertafeln, welche alle positiven und negativen Zytologien sowie die durch eine zusätzliche FISH eindeutig als tumorpositiv oder –negativ klassifizierten bei zunächst zytologisch unklaren Diagnosekategorien beinhalten.

3.5.1 Auswertung für alle Präparate mit erhobenem Referenzstandard

Unter Einbezug der Pankreaseigenen Tumoren, benignen Pankreaserkrankungen, NET und pankreatischen Metastasen (n=213) ergibt sich folgendes Bild: 85 Präparate mit einem negativen und 76 Präparate mit einem positiven zytologischen Befund liegen vor. Bei 52 Präparaten liegt ein unklarer (zweifelhafter und dringender verdächtiger) zytologischer Befund vor (Abb. 14).

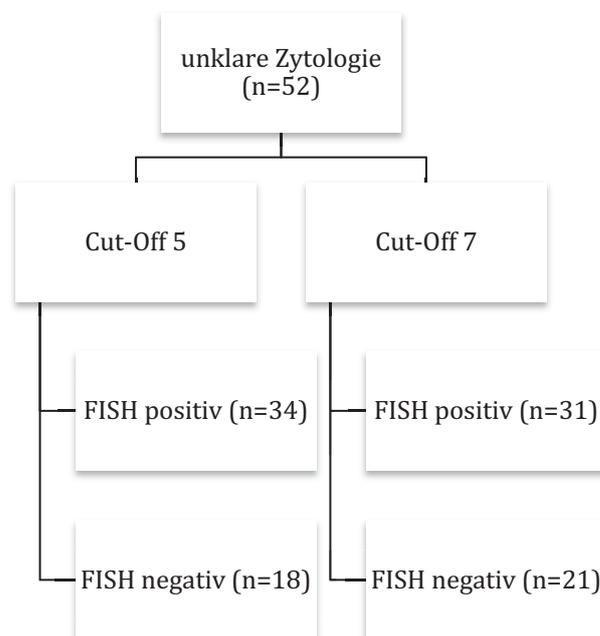


Abb. 14 FISH Befunde bei zweifelhafter und dringend verdächtiger Zytologie

Bei einem Cut-Off Wert von fünf chromosomal-aneuploiden Zellkernen in der FISH Diagnostik zeigen 18 von 52 unklaren zytologischen Befunden ein negatives FISH Ergebnis, bei den restlichen 34 Präparaten zeigt sich ein positives FISH Ergebnis (vgl. Abb. 14). Durch die Dichotomisierung der Ergebnisse mit Hilfe der zusätzlichen FISH Untersuchung bei

unklaren Zytologien für alle Präparate mit erhobenem Referenzstandard (n=213) kommt es zu lediglich 2 falsch positiven finalen Diagnosen. Dargestellt in Tabelle 36.

		<u>Cut-Off 5:</u>	<i>Follow Up:</i> positiv	<i>Follow Up:</i> negativ	
unklare Zytologie:	FISH pos. (34/52)	Finale Diagnose positiv	108	2	110
	FISH neg. (18/52)	Finale Diagnose negativ	28	75	103
			136	77	
					n=213
			Sensitivität	79,41% (108/136)	
			Spezifität	97,4% (75/77)	
			Positiver prädiktiver Wert	98,18% (108/110)	
			Negativer prädiktiver Wert	72,82% (75/103)	

Tabelle 36 Vierfeldertafel Zytologie plus FISH bei einem Grenzwert von fünf chromosomal-aneuploiden Zellen für alle Präparate mit erhobenem Referenzstandard (n=213)

		<u>Cut-Off 7:</u>	<i>Follow Up:</i> positiv	<i>Follow Up:</i> negativ	
unklare Zytologie:	FISH pos. (31/52)	Finale Diagnose positiv	106	2	108
	FISH neg. (21/52)	Finale Diagnose negativ	30	75	105
			136	77	
					n=213
			Sensitivität	77,94% (106/136)	
			Spezifität	97,4% (75/77)	
			Positiver prädiktiver Wert	98,15% (106/108)	
			Negativer prädiktiver Wert	71,43% (75/105)	

Tabelle 37 Vierfeldertafel Zytologie plus FISH bei einem Grenzwert von sieben chromosomal-aneuploiden Zellen für alle Präparate mit erhobenem Referenzstandard (n=213)

Bei einem Cut-Off Wert von sieben chromosomal-aneuploiden Zellen in der FISH Diagnostik zeigen 21 von 52 unklare Zytologien ein negatives FISH Ergebnis, bei den restlichen 31

Präparaten zeigt sich ein positives FISH Ergebnis (vgl. Abb. 14). Durch die Dichotomisierung der Ergebnisse mit Hilfe der zusätzlichen FISH Untersuchung bei unklaren Zytologien für alle Präparate mit erhobenem Referenzstandard (n=213) zeigt sich im Vergleich zu einem Cut-off von 5 eine um 1,47% niedrigere Sensitivität, da zwei Präparate durch den höheren Cut-Off falsch negativ bewertet werden, dargestellt in Tabelle 37.

3.5.2 Auswertung für pankreatobiliäre Karzinome und benigne Pankreaserkrankungen

Werden nur pankreatobiliäre Karzinome in der Abgrenzung zu benignen Pankreaserkrankungen betrachtet (n=195) ergibt sich folgendes Bild: 78 Präparate mit einem negativen, 69 Präparate mit einem positiven und 48 Präparate mit einem unklaren zytologischen Befund liegen vor.

Bei einem Cut-Off Wert von fünf chromosomal-aneuploiden Zellkernen in der FISH Diagnostik zeigen 18 von 48 unklaren zytologischen Befunden ein negatives FISH Ergebnis, bei den restlichen 30 Präparaten ist das FISH Ergebnis positiv.

Durch die Dichotomisierung der Ergebnisse mit Hilfe der zusätzlichen FISH Untersuchung bei unklaren Zytologien für alle Präparate von pankreatobiliären Karzinomen und benignen Pankreaserkrankungen (n=195) kann eine hohe Spezifität erreicht werden. Es zeigen sich lediglich 2 falsch positive finale Diagnosen, dargestellt in Tabelle 38.

		<u>Cut-Off 5:</u>	<i>Follow Up:</i> positiv	<i>Follow Up:</i> negativ	
unklare Zytologie:	FISH pos. (30/48)	finale Diagnose positiv	97	2	99
	FISH neg. (18/48)	finale Diagnose negativ	28	68	96
			125	70	
n=195					
			Sensitivität	77,6% (97/125)	
			Spezifität	97,14% (68/70)	
			Positiver prädiktiver Wert	97,98% (97/99)	
			Negativer prädiktiver Wert	70,83% (68/96)	

Tabelle 38 Vierfeldertafel Zytologie plus FISH bei einem Grenzwert von fünf chromosomal-aneuploiden Zellen für pankreatobiliäre Karzinome und benigne Pankreaserkrankungen (n=195)

Bei einem Cut-Off Wert von sieben chromosomal-aneuploiden Zellen in der FISH Diagnostik zeigen 20 von 48 zytologisch unklaren Präparaten ein negatives FISH Ergebnis, bei den restlichen 28 Präparaten zeigt sich ein positives FISH Ergebnis.

Durch die Dichotomisierung der Ergebnisse mit Hilfe der zusätzlichen FISH Untersuchung bei unklaren Zytologien für alle Präparate von pankreatobiliären Karzinomen und benignen Pankreaserkrankungen (n=195) zeigt sich im Vergleich zu einem Cut-off von 5 Aneuploidien eine um 1,6% niedrigere Sensitivität, da auch hier durch den höheren Cut-Off zwei Präparate falsch negativ bewertet werden, dargestellt in Tabelle 39.

		<u>Cut-Off 7:</u>	<i>Follow Up:</i> positiv	<i>Follow Up:</i> negativ	
unklare Zytologie:	FISH pos. (28/48)	endgültige Diagnose positiv	95	2	97
	FISH neg. (20/48)	endgültige Diagnose negativ	30	68	98
			125	70	
					n=195
			Sensitivität	76% (95/125)	
			Spezifität	97,14% (68/70)	
			Positiver prädiktiver Wert	97,94% (95/97)	
			Negativer prädiktiver Wert	69,39% (68/98)	

Tabelle 39 Vierfeldertafel Zytologie plus FISH bei einem Grenzwert von sieben chromosomal-aneuploiden Zellen für pankreatobiliäre Karzinome und benigne Pankreaserkrankungen (n=195)

3.6 Trisomie und Polysomie des Chromosoms 7

Neben Algorithmen zur Grenzwertbestimmung für chromosomale Aneuploidie bei simultanem Einsatz von 4 FISH-Sonden wird auch eine Trisomie des Chromosoms 7 in mindestens zehn Zellkernen eines Präparats als positiver FISH Befund diskutiert. [4][52] In der vorliegenden Arbeit wird eine Trisomie sowie eine Tetra- oder höhere Polysomie des Chromosoms 7 zusätzlich separat ausgewertet und hier für Karzinome des pankreatobiliären Systems und für benigne Pankreaserkrankungen angegeben. Die Ergebnisse sind dargestellt Tabelle 40 und Tabelle 41.

Eine Trisomie des Chromosom 7 findet sich bei 11 von 195 Präparaten. Der Befund ist bei einem Präparat falsch positiv. Die Berechnung der Sensitivität und Spezifität ist bei der kleinen Fallzahl wenig aussagekräftig, zeigt aber den Trend, dass bei Vorliegen einer Trisomie 7 ein Pankreaskarzinom sehr wahrscheinlich ist. Vier der elf Präparate sind

zytologisch unklar (dringender Verdacht), jedoch mit positivem *Follow-Up* Ergebnis. Das mittels FISH falsch positive Präparat ist in der konventionellen Zytologie negativ. Die übrigen 6 Präparate sind sowohl in der Zytologie als auch im *Follow-Up* positiv.

Wenn nicht nur eine Trisomie sondern eine Polysomie des Chromosoms 7 beobachtet wird, zeigen 74/195 Präparaten ein positives Ergebnis. Dabei ergibt sich eine falsch positiv Rate von 1,43% (1/70). Die falsch negativ Rate liegt bei 41,6% (52/125). Zytologisch sind 50 der 74 Präparate mit positivem FISH-Ergebnis ebenfalls positiv, 22 Präparate dringend verdächtig und 2 Präparate negativ. Das mittels FISH falsch positiv befundene Präparat ist eins von den beiden zytologisch negativ befundenen Präparate.

		<i>Follow Up:</i> positiv	<i>Follow Up:</i> negativ		
FISH	pos.	10	1	11	Sensitivität 8,00% (10/125)
	neg.	115	69	184	Spezifität 98,57% (69/70)
		125	70		PPV 90,91% (10/11)
				n=195	NPV 37,5% (69/184)

Tabelle 40 Trisomie des Chromosoms 7 bei pankreatobiliären Karzinomen und benignen Pankreaserkrankungen (n=195)

		<i>Follow Up:</i> positiv	<i>Follow Up:</i> negativ		
FISH	pos.	73	1	74	Sensitivität 58,4% (73/125)
	neg.	52	69	121	Spezifität 98,57% (69/70)
		125	70		PPV 98,65% (73/74)
				n=195	NPV 57,02% (69/121)

Tabelle 41 Tetra- oder höhere Polysomie des Chromosoms 7 bei pankreatobiliären Karzinomen und benignen Pankreaserkrankungen (n=195)

Als Besonderheit sollen zwei Fälle hervorgehoben werden, die zur Übersicht in Tabelle 42 dargestellt sind. Die zwei Präparate zeigen in der FISH Untersuchung nur eine relativ geringe Anzahl von chromosomalaneuploiden Zellen, einmal fünf und einmal sieben aneuploide Zellen. Bei Bewertung eines positiven FISH-Ergebnisses ab 7 chromosomal-aneuploiden Zellen wäre ersterer Fall negativ. Nach Hinzunahme einer befundenen Trisomie des Chromosoms 7 ergibt sich ein eindeutig positiver Befund der FISH, entsprechend des positiven klinischen Verlaufs.

	Anzahl der untersuchten Zellen	Anzahl der aneuploiden Zellen	Anzahl der Zellen mit Trisomie 7	Follow-Up
UP53	44	5	35	positiv
UP126	25	7	18	positiv

Tabelle 42 Fallbericht: Präparate mit ausgeprägter Trisomie des Chromosoms 7 bei klinisch bestätigtem pankreatobiliärem Karzinom

Die Klinik des Patienten, von dem das Präparat UP53 stammt, zeigte einen klassischen Verlauf mit den Symptomen eines Ikterus und Gewichtsabnahme. Histologisch konnte ein hoch differenziertes, duktales Pankreaskarzinom gesichert werden. Der Patient, von dem das Präparat UP126 stammt, zeigte klinisch neben Gewichtsverlust und epigastrischen Schmerzen eine einengende Struktur in der Gastroskopie im Bereich des Magens Richtung Pylorus. Histologisch wurde ein mäßig differenziertes Adenokarzinom des Pankreas gesichert. Beide Patienten waren weiblich und bei Diagnosestellung 86 beziehungsweise 74 Jahre alt.

3.7 Deletion von Chromosom 9p21

Im Nachgang zu den vorherbeschriebenen Auswertungen erfolgte eine zusätzliche Auswertung der homozygoten, heterozygoten und der relativen Deletion von 9p21 an Präparaten von pankreatobiliären Karzinomen und benignen Pankreaserkrankungen (n=195). Diese sekundäre Auswertung der erhobenen Daten erfolgte durch die Statistikerin und Mitarbeiterin der Zytopathologie der Uniklinik Düsseldorf Frau Isabela Karoline de Santana Almeida Araujo. Tabelle 43 zeigt die Ergebnisse der Auswertungen in Bezug auf homozygote, heterozygote und relative Deletionen und eine zusätzliche Auswertung unter Einbezug der Aneuploidie-Diagnostik mit Cut-Off 7.

Einige Auswertungen sollen besonders hervorgehoben werden:

Bei einer relativen 9p21 Deletion in vier Zellkernen zeigt sich eine Sensitivität von 40% bei einer Spezifität von 100%. Diese Auswertung hat zwar mit 0,4 nicht den höchsten Youden Index, allerdings ermöglicht sie die Aussage, dass die Detektion einer relativen 9p21 Deletion bei dem gewählten Cut-Off spezifisch für eine maligne Transformation ist.

Die Berechnung der Treffsicherheiten für eine Auswertung von entweder vier Zellen mit homozygoter Deletion oder vier Zellen mit relativer Deletion von 9p21 ergibt eine Sensitivität von 68% bei einer Spezifität von 97,1%. Der Youden Index beträgt 0,651 und ist der dritthöchste der in Tabelle 43 gezeigten Auswertungen. Einen höheren Youden-Index von 0,663 hätte die Hinzunahme einer heterozygoten 9p21-Deletion (Cut-Off >3 Zellen), allerdings ist die Spezifität hier mit 94,3% deutlich schlechter. Die kombinierte Auswertung

von chromosomaler Aneuploidie und relativer Deletion von 9p21 ergibt den höchsten Youden Index bei 0,773. Die Sensitivität beträgt 81,6%, die Spezifität 95,7%.

	Sensitivität	Spezifität	Youden Index	AUC	AUC (IC)	AUC (p)
Homozygote Deletion (3)	45,0%	92,9%	0,379	0,695	0,622-0,768	<0,001*
Heterozygote Deletion (1)	38,4%	85,7%	0,241	0,620	0,541-0,699	0,006*
Relative Deletion (1)	73,6%	84,3%	0,579	0,823	0,765-0,880	<0,001*
Relative Deletion (4)	40,0%	100,0%	0,400	0,700	0,629-0,771	<0,001*
3 homozygote Deletion und 1 relative Deletion	36,8%	98,6%	0,354	0,677	0,603-0,750	<0,001*
3 homozygote Deletion oder 1 relative Deletion	81,6%	78,6%	0,602	0,801	0,733-0,869	<0,001*
3 homozygote Deletion oder 4 relative Deletion	72,0%	92,9%	0,649	0,824	0,764-0,884	<0,001*
4 homozygote Deletion oder 4 relative Deletion	68,0%	97,1%	0,651	0,826	0,768-884	<0,001*
4 homozygote oder 4 heterozygote Deletion oder 4 relative Deletion	72,0%	94,3%	0,663	0,831	0,773-0,890	<0,001*
7 Aneuploidien oder 4 relative Deletion	81,6%	95,7%	0,773	0,887	0,837-0,936	<0,001*

Tabelle 43 Auswertung bei heterozygoter, homozygoter und relativer Deletion von 9p21 sowie chromosomaler Aneuploidie (Cut-Off 7)

3.8 Sonderfälle

Bei einigen Fällen fiel während der Auswertung auf, dass es einen Widerspruch zwischen der zytologischen Befundgruppe, der FISH-Befundung oder dem im *Follow-Up* ermittelten Referenzstandard gab. Darüber hinaus zeigte sich bei einigen untersuchten Präparaten in der Datenerhebung, in der Zytologie oder anhand einer vorliegenden Histologie, dass es sich bei den abschließenden Befunden nicht um eine Form des Pankreaskarzinoms oder des Gallengangkarzinoms handelte. Zum einen wurden pankreatische Metastasen anderer Primärtumore gefunden, zum anderen zeigten sich neuroendokrine Tumoren des endokrinen Pankreas. Da diese Fälle mit einer gewissen Häufigkeit zu finden waren, sich die Zielsetzung der Studie aber zunächst auf Tumoren des exokrinen Pankreas und Gallengangskarziome erstreckte, werden sie im Folgenden gesondert genauer beschrieben.

3.8.1 Diskrepante Fälle

Die in den verschiedenen Auswertungen oder im Referenzstandard abweichenden Befunde sind in Tabelle 44 zusammengefasst. Die diskrepanten Fälle sind nach dem zytologischen Befund aufgelistet, gefolgt von der Nummer des Präparats. Stimmt der zunächst erhobene FISH Befund nicht mit dem zytologischen Befund oder dem Referenzstandard überein, wurde das FISH Präparat zur genaueren Abklärung der Diskrepanz nachträglich erneut untersucht, zum Teil nach 1½ Jahren.

Es bleibt natürlich für die statistische Auswertung der initial erhobene FISH-Befund entscheidend, um eine Beeinflussung der Datenlage durch eine erneute Durchsicht zu vermeiden. Diese ist lediglich informativ für eine Diskussion der Ergebnisse und relevant für zukünftige Anwendungen. Sie werden im Kapitel „4 Diskussion“ weiter besprochen

Zytologie-befund	Präparat Nr.	Initiales FISH Ergebnis mit Cut-Off 5	relevantes FISH Ergebnis der Wiederholung mit Cut-Off 5	FISH Diagnose mit Cut-Off 5	FISH Diagnose mit Cut-Off 7	Referenzstandard	Bemerkung
dringender Verdacht	P23	neg.	neg.	falsch neg.	falsch neg.	POSITIV	
	P38	neg.	pos.	falsch neg.	falsch neg.	POSITIV	
	P85	neg.	pos.	falsch neg.	falsch neg.	POSITIV	
	P102	neg.	pos.	falsch neg.	falsch neg.	POSITIV	
	UP71	neg.	neg.	falsch neg.	falsch neg.	POSITIV	
zweifelhaft	P41	neg.	pos.	falsch neg.	falsch neg.	POSITIV	
	P51	pos.	neg.	falsch pos.	falsch pos.	NEGATIV	
	P66	neg.	neg.	falsch neg.	falsch neg.	POSITIV	
	P93	neg.	neg.	falsch neg.	falsch neg.	POSITIV	
	P106	pos.	neg.	falsch pos.	falsch pos.	NEGATIV	
negativ	P29	pos.	neg.	falsch pos.	neg.	NEGATIV	
	P133	neg.	pos.	falsch neg.	falsch neg.	POSITIV	
	UP50	pos.	pos.	pos.	falsch neg.	POSITIV	Metastase
	UP82	neg.	neg.	falsch neg.	falsch neg.	POSITIV	

Tabelle 44 Details der abweichenden Fälle mit den Ergebnissen der Zytologie, der FISH und dem Referenzstandard

3.8.2 Metastasen anderer Primärtumore im Pankreas

Die Durchsicht der Patientenakten ergab in elf Fällen kein Karzinom des pankreatobiliären Systems, sondern eine Metastase eines extrapancreatischen Primarius oder einer malignen Systemerkrankung. In 9 Fällen lag hierbei ein histologischer Befund vor, in zwei Fällen ergab die klinische Gesamtkonstellation die Diagnose. Es fanden sich sechs verschiedene, definierte Tumorentitäten; zweimal ein Multiples Myelom, einmal ein Urothelkarzinom, zweimal ein Nierenzellkarzinom, einmal ein Melanom, zweimal ein Lymphom und zweimal handelte es sich um ein Colonkarzinom. In einem Fall blieb die Diagnose eines *Cancer of unknown primary* (CUP)-Syndroms; letztlich war als Differentialdiagnose die Metastase eines Rektumkarzinoms aber nicht auszuschließen. Diese Fälle sind zusammengefasst dargestellt in Tabelle 45.

Die klinischen Verläufe der einzelnen Fälle sind sehr unterschiedlich. Gemeinsam haben sie, dass der Primarius in den meisten Fällen im Verlauf bekannt war. Zum Zeitpunkt der zytologischen Diagnosestellung bestand bei fünf pankreatische Raumforderung die Frage nach einer möglichen Metastasierung bei bereits bekanntem Primarius auf dem Einsendeschein. Als Tumorentität eines anderen Primarius wurde durch die Zytologie drei Präparat diagnostiziert. Zeitgleich mit der zytologischen Untersuchung oder kurz danach postoperativ wurden insgesamt acht Präparate von acht Patienten histologisch diagnostiziert. Durch den klinischen Gesamtverlauf während des *Follow-ups* ergab sich für drei untersuchte Proben von zwei Patienten die Diagnose. In keinem Fall stand allein der Verdacht eines Pankreaskarzinoms im Vordergrund. Retrospektiv wiesen Vorerkrankungen, Symptome oder Untersuchungsergebnisse auf einen anderen Primärtumor hin, dieser Verdacht wurde allerdings nicht mit der untersuchenden Zytopathologie kommuniziert.

Primarius	Präparat	Diagnose gestellt durch Klinisches Gesamtbild/ Histologie	FISH Ergebnis (aneuploide Zellkerne/gezählte Zellkerne)	Zytologiebefund und Diagnosetext
Multiples Myelom	P17	klinische Beurteilung	negativ (0/57)	negativ Chronische Pankreatitis mit zystischen Veränderungen
	P18		positiv (21/25)	negativ Chronische Pankreatitis. Eine autoimmun Pankreatitis ist nicht ausgeschlossen. Bei Frage nach Metastase des bekannten multiplen Myeloms ergibt sich mikroskopisch kein Hinweis auf eine Pankreasbeteiligung

Urothelkarzinom	P127	Histologie	positiv (7/60)	positiv Gering differenziertes kleinzelliges Karzinom, bekanntes Urothelkarzinom. Immunhistochemie spricht für Urothelkarzinom: CK 5/6 Score 5, CK 7 Score 5, CK 20 Score 0, CDX Score 0, Uroplak III Score 1
Nierenzellkarzinom	P134	Histologie	negativ (0/60)	negativ Regressiv verändertes Epithel.
	UP50	Histologie	positiv (6/60)	negativ Chronische Pankreatitis, kein Hinweis auf eine autoimmun Pankreatitis.
Melanom	UP81	Histologie	positiv (9/20)	positiv Maligner Tumor, V.a. Pankreaskarzinom. Bekanntes Melanom. Immunhistochemie: MelanA Score 0
Lymphom	P78	Histologie	positiv (12/60)	positiv V.a. Magenlymphom. Klinisch bekanntes malignes Non-Hodgkin Lymphom. Immunhistochemie spricht für Lymphom der B-Zell Reihe: CD20 Score 5, CD45R0 Score 0.
	UP109	Histologie	positiv (21/26)	positiv Lymphknoten Punktat, Nähe Pankreaskopf. Maligner Tumor. Zum Ausschluss NET, Immunhistochemie spricht für malignes Non-Hodgkin Lymphom <i>high grade</i> : CD45 positiv, Chromogranin A positiv, Synaptophysin negativ.
Colonkarzinom	UP25	Histologie	positiv (25/25)	positiv Gering differenziertes Adenokarzinom. Klinisch bekanntes Colonkarzinom. Immunhistochemie spricht für ein primäres Pankreaskarzinom, differentialdiagnostisch Metastase des bekannten Colonkarzinoms: CK7 Score 0, CK20 Score 1, CDX Score 2

	UP70	Histologie	positiv (24/25)	positiv Gut differenziertes, teils papilläres Adenokarzinom im Pankreas. Klinische Fragestellung CUP Syndrom. Immunhistochemie spricht für neuroendokrine Differenzierung: Chromogranin A <i>Score</i> 0, Synaptophysin <i>Score</i> 3
CUP-Syndrom	UP91	klinische Beurteilung	positiv (12/26)	positiv Mäßig differenziertes Adenokarzinom, differenzialdiagnostisch Metastase eines Rektumkarzinoms. Keine weitere Differenzierung möglich, Zellen schlecht erhalten

Tabelle 45 Zytologie und FISH (Cut-Off von 5 chromosomal-aneuploiden Zellen) der Metastasen im Pankreas

Bei einem Fall einer Pankreasbeteiligung eines multiplen Myeloms war neben dem klassischen Befall des Knochenmarks auch eine Tumormanifestation am gastroösophagealen Übergang aufgefallen. Es wurden zwei Präparate dieses Falls einer Patientin untersucht. Vor der Punktion war als nächste Therapieoption eine Hochdosismethotherapie mit Stammzelltransplantation geplant. Bei symptomatischer Pankreatitis wurde eine Abdomensonographie durchgeführt, in welcher eine Raumforderung des Pankreas entdeckt wurde. Nebenbefundlich waren bereits Manifestationen des multiplen Myeloms in der rechten Tränendrüse sowie in der linken Mamma festgestellt worden. Auf Grund der klinischen Konstellation schloss man bei der sonographisch auffälligen pankreatischen Raumforderung in diesem Fall auf einen weiteren Myelom-Herd. Beide Feinnadelpunktate ergaben eine tumornegative zytologische Diagnose, vereinbar mit einer chronischen Pankreatitis. Ein Präparat zeigte in der FISH ein negatives Ergebnis und war somit passend zur Zytologie. Das zweite Präparat zeigte ein klar positives FISH Ergebnis.

Bei einem anderen Patienten wurde ein vermutetes CUP (*Cancer of unknown primary*) Syndrom, welches seit zwei Monaten bekannt war, untersucht. Ein Urothelkarzinom war bereits diagnostiziert und zweimalig vorbehandelt worden, jeweils mit einer transurethralen Resektion und Mitomycin-Instillation. In der Endosonographie wurden suspekter Lymphknoten im Bereich des Pankreaskopfes beschrieben. Die entnommene Zytologie sowie die FISH ergaben einen positiven Befund. Zytologisch sprach der Befund für ein Urothelkarzinom. Der histologische Befund aus dem Pankreas bestätigte den Verdacht eines Rezidivs des bekannten Urothelkarzinoms.

Die beiden Fälle von Nierenzellkarzinommetastasen im Pankreas verliefen sehr unterschiedlich. Bei einem Patienten ist nur bekannt, dass ein Nierenzellkarzinom als Vorerkrankung bestand, der genaue Grund für die eingeleitete Diagnostik war nicht zu

erheben. Mehrere Histologien, entnommen aus der Papille, führten über immunhistochemische Färbungen zu dem Ergebnis, dass es sich um eine Absiedlung des bekannten Nierenzellkarzinoms handelte, negativ für Zytokeratin 7, Zytokeratin 20, TTF-1 und Ca19-9 und positiv für Pan-Zytokeratin, Zytokeratin 8 und Vimentin. Die Zytologie und die FISH waren beide negativ. In der FISH wurden hier keine chromosomal-aneuploiden Zellen gefunden. Bei dem zweiten Patienten war der zytologische Befund der Feinnadelpunktion zwar ebenfalls tumornegativ, in der FISH wurden aber 6 chromosomal-aneuploide Zellen gefunden. Vorgestellt wurde der Patient auf Grund einer auffälligen Raumforderung im Pankreas in der Abdomensonographie. Ein Nierentumor unbekannter Entität war lange bekannt. Durch eine CT-gesteuerte Punktion konnte die Entität der Pankreasraumforderung geklärt werden. Histologisch handelte es sich um ein mäßiggradig differenziertes klarzelliges Nierenzellkarzinom G1-2.

Im Fall der Metastase des Melanoms liegen keine expliziten klinischen Daten vor. Durch die Histologie mit zusätzlicher immunhistochemischer Untersuchung konnte eine Melanommetastase im Pankreas nicht bestätigt werden. Die Immunreaktion war negativ für Melan-A sowie negativ für Zytokeratin 7, Zytokeratin 20 und CA19-9. Die Zytologie war tumorpositiv. In der FISH zeigte sich damit übereinstimmend eine chromosomale Aneuploidie.

In einem Fall wurde ein Lymphom des Magens vermutet. Der zytologische Befund und die FISH waren übereinstimmend positiv. In der Histologie aus einem Magenuleus wurde ein hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zell-Reihe festgestellt. Weitere klinische Angaben fehlten. Bei einem weiteren Patienten mit Lymphom ergab die Histologie eine lymphozytäre Proliferation mit hoher proliferativer Aktivität, eine weitere Zuordnung war aufgrund der spärlichen quantitativen Verhältnisse jedoch nicht möglich. Damit wurde aber die positive Zytologie sowie die positive FISH Diagnostik bestätigt.

Bei zwei Patienten bestand eine pankreatische Metastase eines Colonkarzinoms. In einem Fall waren keine Vorerkrankungen bekannt. Es wurden in der Bildgebung Raumforderungen in der Leber und in der Lunge beschrieben, sowie ein Colonkonglomerattumor, bei dem klinisch zunächst nicht zwischen einer Pankreasraumforderung und einer Colonneoplasie unterschieden werden konnte. In der Histologie der Colontransversumprobe wurde die Diagnose eines Colonkarzinoms gestellt, immunhistochemisch positiv für Zytokeratin 20 und CDX2 und negativ für Zytokeratin 7. Zytologie und FISH waren positiv. Bei dem zweiten Präparat mit dem Verdacht auf eine Metastase eines Colonkarzinoms waren die FISH und die Zytologie übereinstimmend positiv. Zytologisch handelte es sich um ein gut differenziertes, teils papilläres Adenokarzinom im Pankreas. In diesem Fall war ein Colonkarzinom des Sigmas in der Vorgeschichte bekannt. In der Endosonographie zeigte sich eine Raumforderung im Pankreas, differentialdiagnostisch war auch an pathologisch vergrößerte Lymphknoten zu denken. Die Resektion des Colons bestätigte den Verdacht eines Rezidivs des Adenokarzinoms auch im Sigma.

Bei einem Fall einer pankreatischen Raumforderung konnte der Primarius nicht abschließend gesichert werden. Es war ein Rektumkarzinom in der Vorgeschichte bekannt. In der Zytologie sowie der FISH zeigten sich positive Ergebnisse. Zytologisch wurde der Tumor als mäßiggradig differenziertes Adenokarzinom klassifiziert, differentialdiagnostisch zu einer Metastase des bekannten Rektumkarzinoms zu sehen. Klinisch zeigte sich ein entgleister Diabetes mellitus. In der Endosonographie stellte sich eine Raumforderung im Pankreas mit Kompression der Vena lienalis dar. Es wurde keine weitere Histologie zur Diagnosesicherung gewonnen. Im Verlauf fanden sich in der bildgebenden Diagnostik Lebermetastasen, Nebennierenmetastasen beidseits und der Verdacht auf Lungenmetastasen. Der Nachverfolgungszeitraum betrug etwas mehr als ein Jahr. Der Tumor galt weiter als CUP-Syndrom. Im letzten dokumentierten Aufenthalt wurde eine Chemotherapie des FOLFOX-Schemas durchgeführt, welches bei colorektalen Karzinomen angewendet wird.

3.8.3 Neuroendokrine Tumore im Pankreas

Sieben Pankreasraumforderungen waren neuroendokrine Tumore. Der Verdacht auf einen NET war durch die Zytologie in vier von sieben Fällen gestellt worden, diese 4 Fälle zeigten alle eine chromosomale Aneuploidie in der FISH. Eine chromosomale Aneuploidie bei einem NET ist allerdings nicht unbedingt zu erwarten. Drei Pankreaspunktate neuroendokriner Tumoren enthielten offensichtlich keine diagnoserelevanten Zellen (sampling error). Die zytologische Diagnose sowie auch die FISH ergaben somit übereinstimmend negative Befunde. Die jeweiligen Diagnosen sind in Tabelle 46 zusammenfassend dargestellt und die klinische Situation der Fälle wird im Folgenden beschrieben.

Bei einem Patienten zeigte sich in schon in der Zytologie des Pankreaspunktats der dringende Verdacht auf das Vorliegen eines NET, welcher mittels Immunhistochemie für Synaptophysin bestätigt werden konnte. Klinisch war der Patient allein durch eine Lipase-Erhöhung im Blut aufgefallen. Das durchgeführte CT konnte nicht zwischen einer chronischen Pankreatitis oder einem Pankreaskarzinom differenzieren. Das durch eine Whipple-Operation gewonnene Untersuchungsmaterial wurde histologisch als NET im Stadium pT3 N1 G1 R0 klassifiziert, infiltrierend in das Treitz-Band und das Duodenum. Im weiteren klinischen Verlauf stellte sich der Patient mit einem Rezidiv vor. Als Therapie wurde eine palliative Chemotherapie mit Sonitinib durchgeführt.

Der klinische Verlauf in einem anderen Fall ist leider weitgehend unbekannt. Die Zytologie wies ebenso wie die FISH ein negatives Ergebnis auf. Auch eine histologische Probe aus dem Pankreas führte hier nicht zur Diagnose, da kein diagnostisch relevantes Gewebe gewonnen werden konnte. Die histologische Probe einer hepatischen Raumforderung war aber positiv für Chromogranin A und Synaptophysin. Diese Befunde sprechen im Zusammenhang mit dem klinischen Gesamtbild für eine Lebermetastase eines NET Grad 2 des Pankreas.

Bei einem Patienten war ein NET in der linken Leiste bekannt. In einer Bildgebung wurde eine Signalanreicherung im Pankreas gesehen. Zytologie und FISH waren beide negativ. Die Biopsie eines Lymphknotens am Pankreas zeigte histologisch ein ausgedehntes Infiltrat eines kleinzelligen NET G3. Verschiedene Therapien mit Sorafenib, einer Kombination von Cisplatin und Etoposid sowie eines Somatostatinanalogons wurden durchgeführt.

In einem Fall stellte der Patient sich klinisch mit epigastrischen, in den Rücken strahlenden Schmerzen vor. Rezidivierende akute Pankreatitiden waren bekannt. Im CT stellte sich ein auffälliger LK auf Höhe des Pankreaskopfes dar. Die Zytologie der entnommenen Probe ergab ein negatives Ergebnis, differentialdiagnostisch eine Autoimmunpankreatitis, beziehungsweise einer Lymphadenopathie entsprechend, wenn ein Lymphknoten bei der Punktion getroffen wurde. In der pyloruserhaltenden Whipple Operation zeigte die histologische Aufarbeitung einen immunhistochemisch partiell für Somatostatin positiven NET im Stadium pT2 N1 R0 G2.

Ein Präparat ergab in der Zytologie einen dringenden Verdacht auf einen NET, welcher immunzytochemisch durch Nachweis einer Synaptophysin- und Chromograninexpression bestätigt werden konnte. In der histologischen Untersuchung fand sich nur regelrechtes exokrines und endokrines Pankreasgewebe. Klinisch bestanden Oberbauchschmerzen, Gewichtsverlust und Durchfälle. In der Endosonographie wurde ein malignomsuspekter Befund im Pankreas beschrieben, welcher sich im CT bestätigte. In der Somatostatinrezeptorzintigraphie zeigte sich eine erhöhte Expression im Bereich des Pankreaskörpers und -schwanzes. Das Staging erfolgte größtenteils klinisch (sonographisch) mit bioptisch gesicherter Fernmetastase, uT2 uN+ pM1 G2. Auf Grund einer Pfortaderthrombose und einer haemorrhagischen Gastritis war der Patient inoperabel. Therapien mit Sandostatin, Lanreotid und peptidvermittelnden Radionukliden wurden durchgeführt.

Bei einem anderen Präparat ergab die zytologische Untersuchung ebenfalls den dringenden Verdacht auf einen NET des Pankreas. Im Vorfeld wurde bei dem Patienten ein CT durchgeführt, hierbei fand sich eine auffällige Raumforderung des Pankreas. Als Vorerkrankung war ein indolentes Plasmozytom bekannt. Die Endosonographie ergab keinen Hinweis auf eine Hyperperfusion und damit keinen Hinweis auf einen malignen Prozess. Die zeitnah zusätzlich entnommene Histologie bestätigte jedoch den Verdacht der Zytologie mit positiver Immunreaktion für Synaptophysin, Chromogranin A, CD56 und CD99.

Ein weiteres Präparat war in der Zytologie dringend tumorverdächtig. Der untersuchte Pankreastumor war bereits seit einem Jahr bekannt. Klinisch zeigten sich Gewichtsverlust und chronisch abdominelle Schmerzen. Endosonographisch stellte sich eine inhomogene, unscharf begrenzte Raumforderung dar, welche derb palpabel war. Im MRT zeigte sich diese Raumforderung signalinhomogen mit Verdrängung des Duodenums und des Ductus choledochus. Es bestand der Verdacht auf ein NET, welcher durch eine Referenzhistologie als NET G1 bestätigt wurde.

Präparat	Diagnose primär gestellt durch	Zytologie/Histologie/Klinik	FISH Ergebnis	Diagnose-kategorie Zytologie
P12	Zytologie	Zytologie mit dringendem Verdacht auf neuroendokrinen Tumor, Synaptophysin positiv. OP Histologie bestätigt NET (pT3 N1 G1 R0)	positiv (22/25)	dringender Verdacht
P101	Histologie	Histologie aus Pankreas ohne diagnostisches Gewebe. Lebergewebe positiv für Chromogranin A und Synaptophysin. NET Grad 2	negativ (0/60)	negativ
P109	Histologie	Histologie aus Lymphknoten am Pankreas mit kleinzelligem NET, Zytokeratin positiv, G3.	negativ (1/60)	negativ
P138	Histologie	OP Histologie partiell positiv für Somatostatin, NET (pT2 N1 R0 G2). Zytologie negativ bei Autoimmunpankreatitis oder Lymphadenopathie.	negativ (4/60)	negativ
UP27	Zytologie	Zytologie mit dringendem Verdacht auf NET (uT2 uN+ pM1 G2). Synaptophysin und Chromogranin A positiv.	positiv (20/25)	dringender Verdacht
UP96	Zytologie	Histologie bestätigt Verdacht der Zytologie auf NET, positiv für Synaptophysin, Chromogranin A, CD56 und CD 99.	positiv (5/26)	dringender verdacht
UP120	Zytologie	Referenzpathologie: Immunhistochemie der Histologie zeigt einen gut differenzierten NET (G1).	positiv (17/26)	dringender Verdacht

Tabelle 46 Zytologie und FISH (Cut-Off von 5 chromosomal-aneuploiden Zellen) der neuroendokrinen Tumoren im Pankreas

4 Diskussion

4.1 Zielsetzung und Einordnung in den diagnostischen Kontext der pankreatobiliären Zytologie

Das Ziel der Arbeit war es, die für andere Organsysteme, wie z.B. die ableitenden Gallenwege, bereits validierte Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) am Untersuchungsmaterial von endosonographisch gesteuerten Feinnadelpunktaten (EUS-FNA) des Pankreas im Funktionsbereich Zytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zu etablieren. Die FISH ist ein kosten- und personalintensives Untersuchungsverfahren. Die Abrechnungsmöglichkeiten nach dem Einheitlichen Bewertungsmaßstab liegen bei 340,71€ (Stand März 2020, Punktwert.: 10,9871 Cent). Die privatärztlichen Abrechnungsmöglichkeiten nach der Gebührenordnung für Ärzte (GoÄ) liegt derzeit bei 524€ (Stand März 2020).

Aus diesem Grund kann sie in Deutschland sicher nicht die kostengünstige, konventionelle mikroskopische Zytologie in der initialen diagnostischen Beurteilung sonographisch gesteuerter Feinnadelpunktate des Pankreas ersetzen. Es ist daher aus diagnostischen, aber auch aus ökonomischen Erwägungen heraus zu prüfen, ob definierte Anwendungsbereiche, wie z.B. nach konventionell-mikroskopisch unklarer Zytologie, benannt werden können.

Die vorliegende Arbeit wurde als retrospektive Kohortenstudie konzipiert. Zytologisch zellfreie und diagnostisch unzureichende Punktate wurden dabei ausgeschlossen. Insgesamt wurden 273 Punktate eingeschlossen. Dies ist auch im Literaturvergleich (vgl. Tabelle 48) ein großes Kollektiv und sollte daher aussagekräftige Ergebnisse erzielen. Ein klinisch-histologisches *Follow-Up* zur Ermittlung des Referenzstandards für die Treffsicherheitsbestimmungen der Zytologie und der FISH konnte für 213 Punktate ermittelt werden. Dabei ergab sich ein problematischer Aspekt der wissenschaftlichen Arbeit an den primär zur Diagnostik eingesandten Untersuchungsmaterialien. Von einigen Einsendungen nicht universitärer Kliniken waren retrospektiv keine *Follow-Up* Daten zu erhalten. Dies mag an fehlenden personellen Ressourcen oder in einem mangelnden Interesse an der Forschung begründet sein. Von einigen Kliniken stammten nur wenige übersandte Präparate, so dass angenommen werden kann, dass die EUS-FNA des Pankreas nicht schwerpunktmäßig in der Einrichtung, sondern nur bei Bedarf am eigenen Patientengut durchgeführt wird. Der Funktionsbereich Zytopathologie erhält jährlich ca. 200-300 EUS-FNA des Pankreas zur diagnostischen Beurteilung. Man kann deshalb davon ausgehen, dass diese Untersuchung eine breite Anwendung in gastroenterologischen Abteilungen findet. Aus den derzeit in Überarbeitung befindlichen S3-Leitlinien zum exokrinen Pankreaskarzinom [3] aus dem Jahr 2013 sind einige Indikationen für eine EUS-FNA des Pankreas zu entnehmen:

- Primäre Resektion einer potenziell resektablen, karzinomverdächtigen Raumforderung.
- Eine EUS-gesteuerte Biopsie kann bei Änderung dieses Vorgehens, z.B. bei Metastasenverdacht eines anderen Malignoms, erfolgen.
- EUS-FNA vor der Durchführung einer spezifischen palliativen Therapie zur Diagnosesicherung.
- Punktion der am besten und bei möglichst geringem Risiko zugänglichen Läsion.
- EUS-FNA bei abklärungsbedürftigen zystischen Läsionen, ggf. mit Bestimmung von CA19-9 und CEA.

Der Stand dieser Empfehlungen ist das Jahr 2006. Die einbezogene Literatur stammt aus den Jahren 1998 bis 2005, man darf daher auf die überarbeitete Leitlinie gespannt sein. Die klinische Praxis sowie die guten Treffsicherheiten der EUS-FNA (vgl. auch folgendes Kapitel), bestätigen eine breite Anwendung dieser Methode in der differentialdiagnostischen Abklärung des Pankreaskarzinoms und seiner möglichen Vorläuferläsionen. Hierbei liefert die EUS-FNA einen Baustein zur Entscheidung bezüglich eines konservativen oder eines operativen klinischen Vorgehens, welches immer in Zusammenschau von Klinik, Bildgebung, Zytologie, bei Zysten ggf. biochemischer Analyse (Amylase/ CEA) und molekularpathologischer Untersuchung geschieht. [14][15][18]

Aus klinischer Sicht haben zystische und solide tumorverdächtige Läsionen des Pankreas einen unterschiedlichen Stellenwert, da sich unterschiedliche differentialdiagnostische Überlegungen, insbesondere auch zu möglichen zystischen Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms, ergeben. Aus der Sicht des diagnostizierenden Zytopathologen spielt aber das Erkennen maligne transformierter Zellen im Sinne von hochgradigen Zellatypien oder offensichtlich malignen Zellveränderungen in Abgrenzung zu reaktiven oder nur geringgradigen Zellatypien eine größere Rolle. Deshalb werden im Kollektiv der vorliegenden Arbeit meist solide Läsionen, aber zusätzlich auch einige zellhaltige Präparate zystischer Läsionen eingeschlossen und nicht separat voneinander untersucht. Zytologische Diagnosekriterien für Malignität bzw. für eine hochgradige Atypie sind in der Literatur gut beschrieben. [28][78] Eine positive zytologische Diagnose ist im passenden klinischen Kontext sicher [77] und bietet eine gute Entscheidungshilfe für ein konservatives oder operatives Vorgehen. Ein Nachteil der zytologischen Untersuchung von Pankreaszysten ist z.B. der fehlende anatomische Kontext. So ist der Nachweis eines invasiven Wachstums zytologisch allein nicht möglich. Eine negative zytologische Diagnose schließt die Möglichkeit einer Malignität nicht aus, da die Läsion bei der Punktion verfehlt worden sein könnte.

4.2 Treffsicherheit der Zytologie bei endosonographisch gesteuerten Feinnadelpunktion des Pankreas

Feinnadelpunktionen des Pankreas wurden zunächst transkutan durchgeführt, sind heute aber weitgehend durch endosonographisch gesteuerte Punktionen ersetzt worden. Die Literatur zur zytologischen Treffsicherheit bei transkutaner Punktion ist daher nicht auf die heutige Situation zu übertragen und wird im Folgenden auch nicht weiter beachtet. Aufgrund unterschiedlicher Präparationsverfahren ist die Zytologie der EUS-FNA des Pankreas heterogen. Es kommen unterschiedliche Verfahren, wie konventionelle Ausstriche oder auch die flüssigkeitsbasierte Zytologie, zur Anwendung. Ebenso geschieht die Fixation der entnommenen Zellen auf unterschiedliche Weise, z.B. mittels Lufttrocknung oder auf alkoholischer Basis. Dies hat möglicherweise auch Einfluss auf die berichteten diagnostischen Treffsicherheiten. Im Funktionsbereich Zytopathologie wird eine alkoholische Fixation bevorzugt, da an den nach Papanicolaou gefärbten Objektträgern weitere Untersuchungen der oft nur spärlich vorhandenen Zellen und Zellverbänden möglich sind, wie z.B. immunzytochemische Untersuchungen, DNA-Bildzytometrie oder auch FISH. Auch gibt es unterschiedliche Auffassungen darüber, wie mit den bei zytologischen Untersuchungen aufgrund von Überschneidungen in der Zytomorphologie reaktiver und neoplastischer Zellveränderungen notwendigerweise auftretenden unklaren Befunden zu verfahren ist. Gemäß der aktuell für Deutschland gültigen Empfehlung für die zytologische Befundung [13], werden solche zytologisch unklaren Befunde gemäß ihrer Malignitätswahrscheinlichkeit in die Diagnosekategorien "zweifelhaft" (ca. 30% Malignitätswahrscheinlichkeit) und „dringend verdächtig“ (ca. 70% Malignitätswahrscheinlichkeit) eingeteilt. Bei Studien zur zytologischen Treffsicherheit können diese beiden Kategorien statistisch auf verschiedene Weise eingeordnet werden, was die Heterogenität der Datenlage weiter erhöht.

Für die Treffsicherheitsbestimmung der konventionellen Zytologie, aber auch der FISH wurden in der vorliegenden Studie nur die 195 Fälle von pankreatobiliären Karzinomen und benignen Pankreaserkrankungen einbezogen. Die insgesamt 18 Pankreasmetastasen und NET werden fallbezogen gesondert im Kapitel 4.6 besprochen und sind hier nicht Gegenstand der Betrachtung. Zum besseren Verständnis der folgenden Ausführungen werden die prägnanten Ergebnisse der Arbeit in Tabelle 47 einbezogen.

Je nach Einordnung der zweifelhaften und dringend verdächtigen Befunden zu den statistisch positiven Zytologien, ergeben sich drei unterschiedliche in Kapitel 3.2 beschriebene Auswertungsmöglichkeiten. Insgesamt führt die Einordnung bereits der zweifelhaften Fälle zu den statistisch positiven zu einer hohen Sensitivität bei allerdings reduzierter Spezifität (Ergebnisse vgl. Tabelle 47). Diese Einordnung der Zytologie würde dem eines Suchtestes entsprechen, was aus Zeit- und Kostengründen für den diagnostischen Ablauf sinnvoll wäre. Die kostengünstige und schnelle mikroskopisch-morphologische Diagnostik an alkoholisch fixierten Präparaten bildet den Suchtest, daran kann sich ggf. zur nachträglichen Abklärung zytologisch unklarer Befunde und für eine mögliche Steigerung der Spezifität ein

Bestätigungstest anschließen (z.B. FISH wie in der vorliegenden Studie). Die Sensitivität ist gut mit dem Literaturquerschnitt einer Metaanalyse (33 Studien, zusammen 4984 Patienten) von EUS-FNA solider Pankreasläsionen von Hewitt und Mitarbeitern aus dem Jahr 2012 [44] vergleichbar, in der sich mit dieser Auswertungsvariante eine Sensitivität von 91% bei einer Spezifität von 94% ergibt. Die geringere Spezifität der eigenen Daten lässt die Vermutung zu, dass möglicherweise die eigene Malignitätswahrscheinlichkeit für „zweifelhafte“ Befunde von 46% (6/13) und die der „dringend verdächtig“ klassifizierten Befunde von 97% (34/35) insgesamt geringer ist als der Internationale Vergleich. Hewitt et al. inkludierten sowohl amerikanische als auch europäische Studien und beobachteten bei *Follow-up* Zeiten <36 Monaten (wie auch in der eigenen Studie) eine geringere, aber mit der eigenen Studie vergleichbaren Spezifität von 90%, aber eine Spezifität von 97% bei >36monatigem *Follow-Up*.

	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
Zytologie (zw, d.V. statistisch positiv)	87,2%	88,6%	93,2%	79,5%
FISH (Cutoff 5 aneusome Zellen)	84%	93%	95%	76%
FISH (Cutoff 7 aneusome Zellen)	82%	96%	97%	75%
FISH (≥7 aneusome Zellen oder ≥4 Zellen relative Deletion 9p21)	81,6%	95,7%	97,1%	74,4%
FISH Polysomie 7 in ≥10 Zellen	58,4%	98,6%	98,7%	57%
Zytologie + FISH (Cutoff 7 aneusome Zellen)	77,6%	97,1%	97,9%	69,4%

Zw: zweifelhaft; d.V.: dringender Verdacht

Tabelle 47 Sensitivität, Spezifität, PPV und NPV von Zytologie und FISH bei pankreatobiliären Karzinomen und benignen Pankreaserkrankungen. Übersicht Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Die geringere Treffsicherheit der eigenen Daten mag auch damit zusammenhängen, dass hier zusätzlich zystische Läsionen eingeschlossen wurden, für die schlechtere Treffsicherheiten in der Literatur angegeben werden. In einer Metaanalyse (16 Studien, 1024 Patienten) von

Wang und Mitarbeitern aus dem Jahr 2015 [107] wurde die Treffsicherheit der EUS-FNA Zytologie zystischer Pankreasläsionen zusammengefasst. Die Sensitivität ist hierbei 51% bei einer Spezifität von 94%, wenn bereits malignitätsverdächtige Befunde als statistisch positiv gewertet werden. In der eigenen Auswertung mit Klassifikation der zytologisch dringend verdächtigen Fälle als statistisch positiv und den zytologisch zweifelhaften Fällen als statistisch negativ ergeben sich eine Sensitivität von 82,4% und eine Spezifität von 98,6%. Diese liegen somit zwischen den Werten der oben angesprochenen Metaanalysen für solide oder zystische Pankreasläsionen.

Bei Einordnung nur der zytologisch tumorpositiven Fälle zu den statistisch positiven ergibt sich der umgekehrte Fall mit in der vorliegenden Studie perfekter Spezifität von 100%, bei allerdings relativ niedriger Sensitivität von 55%. Diese Auswertung führt für einen diagnostischen Test zu nicht brauchbarer Sensitivität, allerdings zeigt sie eine große Stärke der Zytomorphologie in der nahezu sicheren Erkennung maligner Zellen. Hewitt und Mitarbeiter [44] geben für diese Auswertungsvariante ebenfalls Treffsicherheiten an. Hierbei wird eine gute Sensitivität von 85% erreicht bei einer guten Spezifität von 98%. Die eigene Sensitivität dieser Auswertungsvariante von 55% lässt den Schluss zu, dass sehr vorsichtig diagnostiziert wird und bei geringsten Zweifeln das Präparat als „dringend verdächtig“ statt „positiv“ klassifiziert wird. Hierfür spricht auch die relativ hohe Anzahl „zweifelhafter“ und „dringender verdächtiger“ Befunde von 24,6% (48/195). Leider lässt sich der Anteil der unklaren zytologischen Befunde (atypical und suspicious) aus der Metaanalyse von Hewitt et al. nicht zum Vergleich ableiten.

4.3 Treffsicherheit der FISH bei endosonographisch gesteuerten Feinnadelpunktion des Pankreas

In Tabelle 48 findet sich eine Übersicht von Studien, welche die UroVysion multicolour FISH an Feinnadelpunktaten des Pankreas angewendet haben. Lediglich drei dieser Studien untersuchten ausschließlich FNA des Pankreas, wohingegen die beiden Studien von Levy et al. die Anwendbarkeit der UroVysion FISH auf weitere Organe ausdehnte und die Arbeitsgruppe von Bubendorf und Mitarbeitern (Vlajnic et al. 2014) Feinnadelpunktate und Bürstenabstriche von pankreatobiliären Karzinomen untersuchte.

Studie	Untersuchungs-material	Beschreibung
Levy 2007 [65]	FNA verschiedener Organe, u.a. Pankreas	FNA Pankreas n=19 Methode: FISH mit UroVysion, positiv für Aneuploidie (>5 Zellen) oder 9p21 Deletion in >20% der Zellen Sensitivität und Spezifität nicht separat für FNA des Pankreas angegeben, insgesamt aber Sensitivität 77%, Spezifität 100%

Levy2012 [66]	FNA verschiedener Organe, u.a. Pankreas	FNA Pankreas n=61 Methode: FISH mit UroVysion, positiv für Aneuploidie (≥ 5 Zellen) oder homozygote 9p21 Deletion oder Monosomie eines Chromosoms (jeweils in $>20\%$ der Zellen) oder Polysomie eines Chromosoms in ≥ 10 Zellen Sensitivität und Spezifität nicht separat für FNA des Pankreas angegeben, insgesamt aber Kombination von Zytologie und FISH Sensitivität 86%, Spezifität 96%
Henkes 2013 [43]	Pankreas (FNA)	n = 60 , aber nur bei 46 <i>Follow Up</i> Methode: FISH mit UroVysion, positiv für Aneuploidie (≥ 5 Zellen) oder Trisomie 7 (≥ 10 Zellen). Zusätzliches Kriterium homozygote 9p21 Deletion (ohne Cutoff-Angabe) Sensitivität: FISH 93%; Spezifität: FISH 100%
Kubiliun 2011 [62]	Pankreas (FNA)	n = 212 EUS-FNA, FISH n=69 nach unklarer oder negativer on-site Zytologie Methode: FISH mit UroVysion, positiv bei Aneusomie (≥ 5 Zellen), ≥ 5 Zellen mit homo- oder heterozygoter 9p21 Deletion, ≥ 10 Zellen mit Trisomie 7 Sensitivität bei den n=69 (FISH durchgeführt): Zytologie 61%, FISH 74%, kombiniert 85%; Spezifität bei den n=69 (FISH durchgeführt): Zytologie 100%, FISH 100% Bemerkung: alle unklaren Fälle wurden der negativen Zytologie zugeordnet
Ribeiro 2014 [83]	Pankreas (EUS-FNA)	n = 104 (74 Adenokarzinom, 7 neuroendokriner Tumor, 23 benigne) Methode: Vergleich der Zytologie in Kombination mit der FISH (UroVysion), FISH positiv bei ≥ 5 Zellen mit Aneuploidie, homozygotem oder heterozygotem Verlust von Signal 9p21 in ≥ 5 Zellen und Trisomie 7 in ≥ 10 Zellen. Sensitivität: Zytologie 62%, FISH 81%, Kombination FISH und Zytologie 89% Spezifität: Zytologie, FISH und Kombination 100%
Vlajnic 2014 [106]	FNA Pankreas und Bürstenabstriche extrahepatische Gallenwege	n=61 für FNA Methode: FISH mit UroVysion, positiv für Aneuploidie (≥ 4 Zellen) oder heterozygoter oder homozygoter 9p21 Deletion in ≥ 12 Zellen, Tetrasomie in ≤ 10 Zellen wird als negativ gewertet. Sensitivität und Spezifität nicht separat für FNA des Pankreas angegeben, es werden aber Treffsicherheiten für unterschiedliche Diagnosekategorien (u.a. „atypical“ und „suspicious“) angegeben

Tabelle 48 Übersicht der verfügbaren Literatur (UroVysion-Sonde, FNA des Pankreas)

Die eigenen Ergebnisse der FISH Diagnostik zeigen bei einem Cut-Off von sieben Zellen mit Aneuploidie den höchsten Youden-Index und damit das beste Verhältnis von Sensitivität und Spezifität. Der in der Literatur (vgl. Tabelle 48) meistverwendete Cut-Off für die Detektion chromosomaler Aneuploidie mit der UroVysion Sonde ist 5 oder mehr Zellen. Dies weicht von den Herstellerangaben ab. Der dort allerdings für die Anwendung an den ableitenden

Harnwegen angegebene Cutoff beträgt 4 oder mehr Zellen mit >2 Signalen für zwei der Chromosomen 3, 7 und 17. Lediglich Vlajnic und Mitarbeiter [106] verwenden in ihrer bereits 2003 begonnenen prospektiven Studie den Cut-Off des Herstellers, allerdings mit der dahingehenden Abwandlung, dass die sonst in der Tat problematische Zunahme falsch positiver Befunde durch die Wertung von <10 tetraploiden Zellen als negativ- abgemildert wird. Tetrasomie kann bei euploider Polyploidisierung in Rahmen von entzündlichen und regenerativen Veränderungen vorkommen und muss bei den Auswertungsalgorithmen der FISH-Untersuchung, wie auch in der vorliegenden Studie (vgl. Kapitel „2.4.4 Auswertung der FISH Präparate“) beachtet werden. [9][93] Für einen Cut-Off mit 5 oder mehr chromosomal aneuploiden Zellen beträgt die eigene Sensitivität 84% und die Spezifität, bedingt durch 5 falsch positive Befunde, allerdings nur 93%. Diese falsch positiven Befunde werden später gesondert diskutiert.

Keine der bisher publizierten Arbeiten (vgl. Tabelle 48) gibt Daten zur Treffsicherheiten nur für die chromosomale Aneuploidie an. Die Arbeiten untersuchen als zusätzliches Kriterium die (homo- oder auch heterozygote) Deletion von 9p21 und manche zusätzlich noch die Trisomie (oder Polysomie) des Chromosoms 7. In der Regel sind die Sensitivität und Spezifität für die FISH in den in Tabelle 48 genannten Studien nur für eine Kombination dieser Kriterien angegeben und mit den eigenen Daten, die je nach Parameter getrennt ausgewertet wurden, daher nicht unmittelbar vergleichbar. Einzelne Aspekte, die einen Vergleich ermöglichen, werden für die Trisomie / Polysomie 7, die 9p21-Deletion sowie Treffsicherheiten der FISH in der Subgruppe der unklaren zytologischen Präparate aber im Folgenden diskutiert.

Ribeiro et al. [83] gibt für die Polysomie 7 eine Häufigkeit von 46% (34/74) bei Adenokarzinomen des Pankreas an, wohingegen eigene Daten für die Trisomie 7 eine Sensitivität von 8% (10/125) und für eine erweiterte Polysomie 7 eine Sensitivität von 58,4% (73/125) zeigen. Letzterer Wert ist etwas höher als der von Ribeiro et al. angegebene. Trotz niedriger Sensitivität für ein pankreatobiliäres Karzinom ist der PPV der Trisomie 7 mit 90,9% (10/11) in der eigenen Auswertung sehr hoch und könnte in diesen seltenen Fällen diagnostisch genutzt werden. Dies wird etwas relativiert durch Ergebnisse von Barr Fritcher und Kollegen [4]. Die Hinzunahme des Kriteriums einer Trisomie oder Polysomie des Chromosoms 7 kann auch zu einer Reduktion der Spezifität führen. In der Studie an Bürstenabstrichen pankreatobiliärer maligner Tumoren aus dem Jahr 2007 wurde zwar gezeigt, dass 54% der Patienten mit einer Polysomie oder Trisomie des Chromosoms 7 im *Follow-Up* ein Malignom aufwiesen. Die Sensitivität der FISH in Kombination der Kriterien Aneuploidie und Trisomie/Polysomie 7 betrug 68%, die Spezifität 81%. Allerdings war die Spezifität der FISH ohne Berücksichtigung einer Trisomie / Polysomie des Chromosoms 7 mit 98% deutlich höher. [4]

Bei der Untersuchung der Treffsicherheiten für die 9p21 Deletion war der Youden Index für die Untersuchung der relativen Deletion (verglichen mit der durchschnittlichen Kopienzahl der 3 übrigen Sonden im UroVysion Sondenmix, wie von Zellweger et al. 2006 [117])

vorgeschlagen) am höchsten mit Sensitivität von 40% und Spezifität von 100% bei Detektion von 4 oder mehr Zellen mit diesem Kriterium. Die Berücksichtigung dieses Parameters eignet sich somit gut für die klinische Anwendung. Verschiedene kombinierte Auswertungen von heterozygoter, homozygoter und relativer Deletion bei unterschiedlichen Cut-Offs erbrachten zwar höhere Youden-Indices, doch sank die Spezifität.

Die beste Treffsicherheit ergab die Kombination von 7 oder mehr Zellen mit chromosomaler Aneuploidie und 4 oder mehr Zellen mit relativer Deletion von 9p21. Allerdings sind Sensitivität und Spezifität hier mit der alleinigen Analyse der chromosomalen Aneuploidie nahezu identisch (vgl. Tabelle 47).

Kubiliun und Mitarbeiter [62] zeigten eine Rate homozygoter oder heterozygoter 9p21 Deletion von 58% (29/50) bei negativen oder unklaren zytologischen Diagnose im Rahmen einer on-site Zytologie. Die FISH wurde ebenso wie in der Studie von Ribeiro und Mitarbeitern (Ribeiro et al. 2014) am Material zusätzlicher Nadelpunktionen durchgeführt, entnommen während der gleichen EUS-FNA-Sitzung wie die on-site Zytologie. In der letzteren Studie zeigte sich eine homozygote oder heterozygote 9p21 Deletion in 58% (43/74). Die Spezifität ist explizit für diese Art der Auswertung in beiden Studien nicht angegeben, sondern nur summiert für alle Parameter eines positiven FISH-Ergebnisses. In der Studie von Henkes und Mitarbeitern [43] sind keine Angaben zum Cut-Off einer 9p21 Deletion zu finden. In den Arbeiten von Levy und Mitarbeitern [65][66] ist eine Rate von >20% der untersuchten Zellen für eine Deletion von 9p21 angegeben, homozygote Deletion nur in Levy et al. 2012 [66]. Angaben von beobachteten Häufigkeiten finden sich hier nicht.

Bezüglich der Gesamtbeurteilung aller für eine positive FISH-Diagnose eingeschlossenen Parameter finden sich in der Literatur für EUS-FNA des Pankreas (vgl. Tabelle 48) folgende Treffsicherheiten: Sensitivität von 74% (Kubiliun 2011 [62]), und 81% (Ribeiro 2014 [83]). Die entsprechende Spezifität betrug jeweils 100%. Eigene Daten (Cut-Off ≥ 7 chromosomal aneuploide Zellen oder ≥ 4 Zellen mit relativer Deletion 9p21) zeigen eine Sensitivität von 81,6% bei Spezifität von 95,7%. Es fällt auf, dass hier die Spezifität gegenüber der Literatur zurückbleibt. Das liegt an 3 falsch positiven Befunden nach der FISH-Untersuchung, die im folgenden Kapitel „4.5 Diskrepante Fälle“ weiter besprochen werden. Die Zahl der Nicht-Malignom-Fälle, die naturgemäß ebenfalls Einfluss auf die Spezifität eines diagnostischen Tests haben, ist bei den erwähnten Arbeiten unterschiedlich: 22% (15/69) (Kubiliun et al. 2011 [62]); 22% (23/104) (Ribeiro et al. 2014 [83]). In der eigenen Arbeit finden sich mit 75 Präparaten von nicht malignen Krankheitsverläufen eine deutlich höhere Fallzahl und damit auch ein erhöhtes Risiko für falsch positive Diagnosen. Die Rate der Präparate mit tumornegativem *Follow-Up* betrug 38% (75/195). In der Arbeit von Henkes und Mitarbeitern (Henkes 2013 [43]) wird die Sensitivität mit 93% für die FISH-positiven Fälle der zytologisch gesicherten Adenokarzinome (Spezifität 100%) angegeben. Ein klarer Bezug zu *Follow-Up*

fehlt, insbesondere bei einem zytologisch negativen, aber FISH-positiven Fall. Ein Vergleich mit dieser Arbeit ist diesbezüglich aus methodischen Gründen nur eingeschränkt möglich.

Zwei Arbeiten (Henkes 2013 [43] und Vlajnic 2014 [106]) geben Angaben zu Ergebnissen der FISH-Untersuchung explizit für unklare zytologische Diagnosen. In der erstgenannten Arbeit wurden außerdem die FISH-Resultate bei sieben von 13 unklaren Zytologiebefunden untersucht, für die *Follow-Up* Daten vorlagen. Dabei ergaben sich eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100%. Von 6 der 13 FISH / Zytologie-Befunden lagen allerdings keine *Follow-Up* Informationen vor. [43] Aussagekräftiger ist eine Auswertung zur Anwendung der FISH an zytologisch atypischen (entsprechend zweifelhaft) oder dringend verdächtigen Präparaten, welche an den vorbefundeten zytologischen Präparaten durch computergestützte Relokalisation der suspekten Zellgruppen mit anschließender FISH-Auswertung möglich wurde (Vlajnic et al. 2014 [106]). Bei 50 unklaren zytologischen Präparaten, davon 34 zweifelhafte und 16 dringend verdächtige, war die Sensitivität insgesamt 61,3%, bzw. 26,7% bei zweifelhaften und 93,8% bei dringend verdächtigen Präparaten (Spezifität, wo Berechnung möglich, jeweils 100%). In der eigenen Arbeit beträgt bei einem Cut-Off von 5 oder mehr aneuploiden Zellen die Sensitivität der FISH-Untersuchung im Fall einer dringend verdächtigen Zytologie 82,35% (100% Spezifität) und hat damit eine ebenfalls gute Sensitivität. Ein falsch positiver Befund lag in dieser Subgruppe nicht vor. Dies verhält sich anders in der Subgruppenanalyse der FISH-Anwendung nach zweifelhafter Zytologie. Hier gab es zwei falsch positive FISH-Befunde und damit eine schlechtere Spezifität von 71,43%, was die klinische Anwendung in dieser Subgruppe erschwert. Da die Sensitivität der FISH für ein pankreatobiliäres Malignom in der zytologischen Diagnosekategorie „zweifelhaft“ 0% ist, ist zu überlegen, ob wegen der Gefahr falsch positiver Diagnosen auf den Einsatz der FISH in dieser Subgruppe verzichtet werden sollte. Diese Aussage ist vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl in dieser Kategorie von 13 aber nur mit gewisser Vorsicht zu treffen.

Insgesamt ist die Datenlage zur Anwendung der UroVysion multicolour FISH an EUS-FNA des Pankreas sehr heterogen. Die bisher veröffentlichten Arbeiten unterscheiden sich in den verwendeten Analysen und Cut-Offs zur Bestimmung eines in der FISH positiven Ergebnisses, aber auch im Studiendesign bezüglich Anwendung und Indikationsstellung zur FISH (z.B. Anwendung nach unschlüssigen Ergebnissen in der on-site Zytologie, Anwendung an unklaren Präparate, Analyse sämtlicher Präparate). Insgesamt kommen als Parameter, ebenso wie in der eigenen 2011 begonnenen Arbeit, die chromosomale Aneuploidie, Deletion von 9p21 sowie Trisomie / Polysomie des Chromosoms 7 zur Anwendung. Die Treffsicherheiten sind für einzelne Parameter meist nicht angegeben, sondern nur für die Kombination der Parameter.

4.4 Treffsicherheit der kombinierten Zytologie und FISH

Für eine klinische Anwendung ist die FISH sicher ein wichtiger Baustein. Der größere Nutzen ergibt sich aber in der Kombination von EUS-FNA basierter Probenentnahme, mikroskopisch-zytologischer Analyse und zusätzlicher FISH-Untersuchung. Ein Vorteil der Zytologie an alkoholisch fixierten Präparaten ist die sequentielle Anwendung der FISH an den selben auf den Objektträgern befindlichen Zellen, ggf. mit computergestützter Auswertung der selben Zellgruppen (Vlajnic et al. 2014 [106]). Die Gewinnung zusätzlicher Proben für die FISH ist aber auch in gleicher EUS-FNA Sitzung möglich und erbringt insbesondere nach on-site Zytologie (Ribeiro et al 2014 [83], Kubiliun et al. 2011 [62]) für eine noch nicht sichere zytologische Tumordiagnose ausreichendes Untersuchungsmaterial durch zusätzliche Nadelpassagen. Insgesamt werden durch Kombination von Zytologie und FISH in einem Teil der Fälle erneute diagnostische EUS-FNA Sitzungen vermieden, was zu einer Reduktion der Belastung der oft sehr kranken Patienten und auch zur Reduktion der Kosten führt. Zusätzlich kann die erhöhte Empfindlichkeit der FISH möglicherweise zu einer Verringerung der gesamten Krankheitskosten führen, indem der Bedarf für die Wiederholung von diagnostischen Untersuchungen wegfällt, wie zum Beispiel ERCP, CT, MRT oder PET-Untersuchungen (Positronen-Emissions-Tomographie). Darüber hinaus können die Informationen dieser zusätzlichen zytologischen Tests helfen, komplexere Entscheidungen zu treffen, beispielsweise in Bezug auf teure therapeutische Interventionen wie die Notwendigkeit einer Operation oder Chemotherapie. (vgl. Beginn Kapitel 4.1)

Nach Analyse der eigenen FISH-Ergebnisse für verschiedene zytologische Diagnosekategorien ergibt sich der größte Nutzen für die Anwendung der FISH zusätzlich zur unklaren (zweifelhaften oder dringend verdächtigen) Zytologie (vgl. Kapitel 3.4.3). Nach negativer Zytologie wurde nur 1 von 16 pankreatobiliären Karzinomen mittels FISH (Cut-Off ≥ 5 oder ≥ 7 Zellen) detektiert, eine positive Zytologie allein ist aufgrund fast perfekter Spezifität klinisch glaubhaft und benötigt keine weitere Abklärung durch FISH. Für die statistische Auswertung ist eine künstliche Zuordnung unklarer zytologischer Diagnosen zu einer statistisch positiven oder negativen Diagnosekategorie nicht mehr erforderlich, da die zusätzliche FISH-Untersuchung durch Etablierung eines Cut-Offs hier eine Dichotomisierung erreicht. Die FISH dient dabei als Bestätigungstest. Für die Wahl des Cut-Offs entscheidend ist die Überlegung, dass ein falsch positives Ergebnis bei einer geringen Spezifität schwerwiegende Folgen für den Patienten hat. Ein falsch negatives Ergebnis führt dagegen bei begründetem klinischen Verdacht zu einer weiteren klinischen Diagnostik, ohne dabei in hohem Maße invasiv zu sein.

Die Kombination von Zytologie und FISH nach unklarer Zytologie, ergibt bei einem Cut-Off von fünf beziehungsweise bei einem Cut-Off von sieben für pankreatobiliäre Karzinome und benigne Pankreaserkrankungen (n=195) eine Sensitivität von 77,6% beziehungsweise 76%. Die Spezifität liegt bei beiden Grenzwerten bei 97,1%. Unter Einbezug der Pankreasmastasen und der Neuroendokrinen Tumoren aus der Studienkohorte (n=213) ergibt sich bei einem Cut-Off von 5 beziehungsweise von 7 chromosomal aneuploiden Zellen

eine Sensitivität von 79,4% beziehungsweise 78%. Die Spezifität beträgt je 97,4%. Auf eine zusätzliche Auswertung unter Einbezug der 9p21 Deletion wird hier verzichtet, da sich in der Gesamtkohorte keine Verbesserung der diagnostischen Treffsicherheit ergibt (vgl. auch Tabelle 47). Da die Spezifität sich bei Anwendung eines Cut-Offs von 5 oder 7 chromosomal aneuploiden Zellen nicht unterscheidet, kann der auch in vergleichbaren Studien (vgl. Tabelle 48 und folgende Ausführungen) verwendete Cut-Off von 5 chromosomal aneuploiden Zellen für eine kombinierte diagnostische Evaluation durch Zytologie und FISH genutzt werden.

Dass die Sensitivität bei der kombinierten Auswertung (vgl. Tabelle 47) um 9,6% niedriger ist als bei alleiniger Zytologie, ist aufgrund der Steigerung der Spezifität von 8,5% und der daraus resultierenden therapeutischen Konsequenzen gut hinnehmbar. Eine hohe Sensitivität würde weniger falsch negative Diagnosen bedeuten, allerdings sind diagnostische und therapeutische Folgen genau zu überlegen. Die höhere Sensitivität der alleinigen zytologischen Evaluation suggeriert einen höheren Anteil sicherer Diagnosen, was aber aufgrund der Einordnung der 48 zytologisch zweifelhaften oder dringend verdächtigen Diagnosen als statistisch positiv nur vorgetäuscht wird. Die FISH ermöglicht hier hingegen eine eindeutigere Zuordnung.

Im Literaturvergleich ergibt sich durch den Einsatz der FISH in der Regel eine Steigerung der diagnostischen Treffsicherheit. In der Studie von Kubiliun et al. [62] wurde die FISH nur nach zunächst nicht aussagekräftiger on-site Zytologie eingesetzt. Bei Patienten mit Raumforderungen des Pankreas konnte gezeigt werden, dass durch die FISH-Diagnostik Fälle aufgedeckt werden konnten, welche in der alleinigen Zytologie übersehen worden wären, ohne dabei die Spezifität zu mindern. Die Sensitivität in dieser Konstellation wurde von 61% bei alleiniger Zytologie auf 85% nach zusätzlicher FISH gesteigert. Einen falsch positiven Fall bei den 15 eingeschlossenen gutartigen Pankreasläsionen gab es nicht. Die Sensitivität ist in dieser Studie 7,4% höher als bei den eigenen Daten, allerdings bei einer deutlich kleineren Fallzahl. [62]. Die Ergebnisse der Studie von Levy et al 2007 [65] zeigen, dass die DNA Zytometrie und FISH eine genauere Diagnostik in der endosonographisch gesteuerten FNA als die alleinige Routinezytologie ergeben. Die Daten suggerieren, dass durch den Ansatz, die chromosomalen Aberrationen zur Diagnostik zu nutzen, eine hohe diagnostische Sensitivität entsteht, obwohl die Patientenkohorte unterschiedliche Tumorentitäten inkludiert. In die Untersuchung wurden verschiedene Organsysteme eingeschlossen, unter anderem das Pankreas, Lymphknoten, Ösophagus, Magen sowie Schilddrüse. [65]

Eine aktuelle Studie von Ribeiro et al 2014 [83] untersuchte 104 Patienten mit Raumforderungen des Pankreas. Die Sensitivität der Zytologie betrug 62%, die Sensitivität der FISH 81%. Durch eine Kombination beider Verfahren konnte die Sensitivität auf 89% erhöht werden. Die Spezifität der FISH und Zytologie betrug 100%. Bei 23 negativen Zytologien wurde zusätzlich in der FISH ein Malignom erkannt. [83] Die Sensitivität ist 11,4% höher als bei den eigenen Daten, allerdings auch hier bei einer deutlich kleineren Fallzahl und geringerem Anteil von tumornegativen Fällen in der Studie 22% (23/104) als in der eigenen Studie mit 38%. Vljajnic und Mitarbeiter [106] untersuchten wie in der vorliegenden Arbeit

die Anwendung der FISH in der Subgruppe nach zweifelhafter oder dringend verdächtiger Zytologie. Eine summarische Auswertung der FISH über alle Diagnosegruppen der Zytologie, eingeschlossen positive oder negative Zytologie, wurde nicht durchgeführt. Alle 31 zytologisch positiven Fälle waren aber auch in der FISH positiv und alle 9 zytologisch negativen Fälle auch in der FISH negativ.

Im Vergleich zur Literatur ergab sich in der eigenen Arbeit eine schlechtere Spezifität der kombinierten Evaluation von Zytologie und FISH. In der eigenen Arbeit wurde die Trisomie / Polysomie der Chromosoms 7 zwar als singulärer Parameter mit guter Spezifität und moderater Sensitivität (vgl. Tabelle 47) untersucht. Dieser Parameter ist bei Kubiliun et al. [62] sowie Ribeiro et al. [83] aber als positives FISH-Resultat mit ausgewertet worden. Zur Diskussion sollte daher gestellt werden, ob die Treffsicherheit der eigenen Untersuchungen nicht durch eine Inklusion der Trisomie/ Polysomie des Chromosoms 7 zu den positiven FISH-Diagnosen hätte gesteigert werden können. Es wurde allerdings keine Subgruppenanalyse nach zweifelhafter oder dringend verdächtiger Zytologie durchgeführt. Auch sollte zur Diskussion gestellt werden, dass bei der Auswertung und Beurteilung der Interphase-FISH als einer morphologisch basierten Methode eine Erfahrung in der morphologischen Diagnostik notwendig ist. Bei reaktiven Veränderungen ist eine Tetrasomie physiologisch in der G₂/M-Phase des Zellzyklus, aber sie kommt auch bei euploider Polyploidisierung eines Gewebes (Biesterfeld et al. 1994 [9]) vermehrt vor. Diese Begebenheiten können insbesondere während der S-Phase zu einer vorgetäuschter Aneusomie gemäß der diagnostischen Kriterien dieser Studie führen und damit durch Überschreitung des Cut-Offs zu einer Überbewertung. Es ist zu bedenken, dass zum Erreichen des Cut-Offs nur wenige chromosomal aneuploide Zellen (5 bzw. 7) im Präparat erforderlich sind.

4.5 Diskrepante Fälle

Bei einigen Fällen gab es bei den verschiedenen Auswertungen oder dem Referenzstandard in irgendeiner Form voneinander abweichenden Befunde. Bei einem Teil dieser Präparate zeigte sich in einer nach Erheben des Referenzstandards nachträglich wiederholten FISH Untersuchung ein korrigiertes zutreffendes Ergebnis. Diese wiederholte Auswertung dient nur zu Diskussionszwecken. Für die Ergebnisermittlung blieb der initiale FISH-Befund relevant.

Bei den zytologisch negativ befundeten Präparaten sind vier Präparate diskrepant (vgl. Tabelle 44). Bei zwei Präparaten mit positivem Referenzstandard zeigte sich zunächst ein negatives FISH Ergebnis. Die erneute Durchsicht ergab bei einem Präparat erneut einen negativen FISH-Befund. Dies muss als ein falsch-negativer FISH-Befund bei falsch negativer Zytologie gewertet werden. Es ist am wahrscheinlichsten von einem sampling error auszugehen. Das zweite Präparat zeigte hingegen eine relevante Zahl chromosomal-aneuploider Zellen (Cut-Off 5). Somit besteht hier wahrscheinlich ein screening error der

ersten FISH-Befundung. Bei einem Präparat eines Patienten mit pankreatischer Metastase zeigte sich wiederholt ein positives FISH Ergebnis mit 6 chromosomal-aneuploiden Zellen. Bei Anwendung eines Cut-Off von 5 für eine FISH-positive Diagnose ergibt sich somit ein richtig positiver Befund, wohingegen eine Anwendung des Cut-Offs von 7 zu einer falsch negativen Diagnose führt. Diese geringe im Präparat enthaltene Zahl atypischer Zellen wurde in der Zytologie übersehen, so dass hier von einem screening error der Zytologie auszugehen ist. Ein Präparat mit negativem Referenzstandard wurde bei der ersten Durchsicht als chromosomal-aneuploid (6 Zellen) befundet. Eine doppelte und erneute Durchsicht eines anderen Untersuchers zeigte lediglich 1 bzw. 4 chromosomal-aneuploide Zellen. Es ist von einem falsch-positiven Befund der FISH auszugehen, wobei dies unter Anwendung eines Cut-Offs von 7 nicht mehr zum Tragen kommen würde.

Bei den zytologisch als zweifelhaft befundeten Präparaten blieben 3 Präparate mit positivem Referenzstandard bei erster Durchsicht FISH-negativ. Bei zwei dieser Präparate ergab auch die erneute Durchsicht keinen positiven Befund, die Zahl der chromosomal-aneuploiden Zellen im Präparat war hier also insgesamt zu niedrig. Ein Präparat zeigte bei erneuter Befundung 8 chromosomal-aneuploide Zellen, das Ergebnis der ersten Befundung ist hier somit falsch-negativ. Zwei zytologisch zweifelhafte Präparate mit negativem Referenzstandard waren bei der ersten Befundung unter Anwendung eines Cut-Offs von 5 chromosomal-aneuploider Zellen FISH-positiv. Beide Präparate zeigten 7 oder mehr chromosomal-aneuploide Zellen und wären auch bei Anwendung dieses Cut-Off-Wertes falsch positiv. Bei erneuter Durchsicht zeigten beide Präparate ein FISH-negatives Ergebnis, es ist also von einem falsch-positiven FISH-Befund der ersten Untersuchung auszugehen.

Bei den zytologisch dringend verdächtig befundeten Präparaten waren 5 Präparate mit positivem Referenzstandard bei der initialen FISH-Befundung falsch negativ. Zwei dieser Präparate zeigten auch in der erneuten Befundung nicht mehr als 3 bzw. 4 chromosomal-aneuploide Zellen, so dass somit von einer zu geringen Zahl atypischer Zellen im Präparat auszugehen ist. In den übrigen drei Präparaten fand sich bei zum Teil mehrfacher erneuter Durchsicht 11, 8 bzw. 6 chromosomal-aneuploide Zellen. Sie wurden somit bei der ersten FISH-Untersuchung falsch negativ befundet, wobei das letzte Präparate nur bei Anwendung eines Cut-Offs von 5 chromosomal-aneuploiden Zellen als FISH-positiv bewertet wird. Hier erschwerte sicher die im Untersuchungsmaterial enthaltene geringe Zahl der atypischen Zellen die Diagnose.

Insgesamt zeigt die Wiederholung der FISH-Untersuchung, dass bei drei bzw. zwei Präparaten (Cut-Off 5 bzw. 7) ein falsch positives FISH Ergebnis zu einem richtig negativen Ergebnis geführt hätte.

Die Fälle, bei denen zusätzlich nach Bekanntwerden des *Follow-ups* bei dann bekannt gewordenem diskrepantem Befund eine wiederholte FISH-Untersuchung das richtige Ergebnis ergibt sind zusammengefasst dargestellt in Tabelle 49.

Zytologie- befund	FISH-Nr.	Initiales FISH Ergebnis mit Cut-Off 5	relevantes FISH Ergebnis der Wiederholung mit Cut-Off 5	abschließendes FISH Ergebnis mit Cut-Off 5	abschließendes FISH Ergebnis mit Cut-Off 7	klinische Diagnose
dringender Verdacht	P38 ²⁾	neg.	pos.	neg.	neg.	POSITIV
	P85 ²⁾	neg.	pos.	neg.	neg.	POSITIV
	P102 ²⁾	neg.	pos.	neg.	neg.	POSITIV
zweifelhaft	P41 ²⁾	neg.	pos.	neg.	neg.	POSITIV
	P51 ¹⁾	pos.	neg.	pos.	pos.	NEGATIV
	P106 ¹⁾	pos.	neg.	pos.	pos.	NEGATIV
negativ	P29 ¹⁾	pos.	neg.	pos.	neg.	NEGATIV
	P133 ²⁾	neg.	pos.	neg.	neg.	POSITIV

1) falsch positiv, wiederholte Untersuchung zeigt das richtig negative Ergebnis

2) falsch negativ, wiederholte Untersuchung zeigt das richtig positive Ergebnis

Tabelle 49 Initial diskrepante Fälle mit nach erneuter Durchsicht der FISH-Präparate übereinstimmendem Ergebnis mit dem *Follow-up*

Bei drei, initial falsch positiv beurteilten Präparaten, ergaben sich in der nachträglichen Beurteilung von zwei erfahrenen Untersuchern jeweils negative FISH-Befunden.

Bei diesen drei Präparaten fällt auf, dass keine hohe Anzahl chromosomal-aneuploider Zellen im Präparat vorkamen. Von jeweils ca. 60 untersuchten Zellen waren 6, 8 bzw. 10 aneuploid. Klinisch bestand bei keinem der Patienten primär der Verdacht auf ein Pankreaskarzinom. In einem Fall wurde in einer CT Untersuchung des Beckens eine Osteolyse diagnostiziert. In einem anderen Fall wurde aufgrund eines bekannten Zungengrundkarzinoms eine unklare Raumforderung im Bereich der großen Krümmung des Magens nahe des Antrums abgeklärt. Nebenbefundlich war bei allen drei Patienten ein Alkoholabusus bekannt, dieser geht mit einem erhöhten Risiko für akute sowie chronische Pankreatitiden einher. Diese führen über Nekrosebildung und Fibrosen zu erheblichen Umbauprozessen mit Funktionseinschränkungen des Organs, vergleiche Rocco et al. [87] Für regenerative Prozesse ist bekannt, dass die beteiligten Zellen eine euploid-polyploide DNA-Verteilung haben können (Biesterfeld et al. 1994 [9]). Diese kann durch Vermehrung der Signalzahl, insbesondere auch in der S-Phase des Zellzyklus, wenn die DNA noch nicht vollständig verdoppelt ist, zu Überschneidungen in der Interpretation mit einer chromosomalen Aneuploidie führen. Ein erfahrener Untersucher berücksichtigt bei der FISH-Befundung diese Umstände und ist möglicherweise restriktiver in der Beurteilung von FISH-Signalen, bei denen sich ein Interpretationsspielraum ergibt. Letzter Punkt ist für Morphologie basierte,

diagnostische Methoden, wie auch für die FISH, ein häufig entstehendes Problem und der Methode der Untersuchung immanent.

Bei fünf Präparaten ergab sich der umgekehrte Fall. Die Präparate zeigten in der initialen FISH ein falsch negatives und in der wiederholten Durchsicht nach Kenntnis des *Follow-Ups* dann ein richtig positives FISH Ergebnis. Bei allen Präparaten wurde aber angemerkt, dass wenige repräsentative Zellkerne vorhanden waren. Von zwei Patienten dieser initial falsch negativen Fälle wurde im Verlauf erneut eine Probe eingesandt. In einem Fall erfolgte eine zweite Punktion einen Monat danach (P41). Sie ergab allerdings auch ein negatives Ergebnis, ebenfalls bei nur wenig erhaltenem Untersuchungsmaterial. In dem anderen Fall erfolgte die wiederholte Punktion 5 Monate später und ergab ein richtiges, positives FISH Ergebnis.

Gegeben falls sollte daher bei diagnostischer Unsicherheit bei einem schwierigen FISH-Präparat ein zweiter erfahrener Untersucher hinzugezogen werden. Außerdem kann bei persistierendem klinischem Verdacht auf ein Pankreaskarzinom und bisher negativer oder unklarer Zytologie (+FISH) eine wiederholte Punktion mittels EUS und FNA wegen der geringen Komplikationsrate sinnvoll sein. [15]

4.6 Metastasen und Neuroendokrine Tumoren im Pankreas

Metastasen sowie neuroendokrine Tumoren zeigen jeweils viele Übereinstimmungen zwischen Zytologie, Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und klinischem Verlauf. Die Beurteilung der Treffsicherheiten anhand einer Vierfeldertafel ist in der vorliegenden Arbeit nicht sinnvoll. Bei allen Fällen besteht eine tatsächliche Erkrankung.

Bei den EUS-FNA von pankreatischen Metastasen zeigen zwei Präparate bei einem Grenzwert von fünf chromosomal-aneuploiden Zellen ein falsch negatives FISH Ergebnis und drei Präparate bei einem Grenzwert von sieben. Diese Präparate waren allerdings auch zytologisch bereits negativ und sind daher in erster Linie als sampling error zu werten. Von den verbleibenden neun (bzw. 8) FISH-positiven Fällen waren zwei (bzw. eins) zytologisch negativ, in erster Linie daher entsprechend einem screening error in der Zytologie. Bei den anderen 7 Präparaten zeigte sich sowohl eine positive Zytologie wie ein positives FISH-Ergebnis. Studien zeigen, dass bei malignen Tumorerkrankungen generell eine sehr hohe Rate an Aneuploidie vorliegt. Duesberg et al (2006) [31] geht unter anderem auf den besonderen Stellenwert der Aneuploidie bei der Entstehung von Metastasen ein und der damit einhergehenden aggressiven Tumorbilogie. [31] Ähnliches beschreiben Ried et al (2012) [84]. Für verschiedene Tumorentitäten wird eine Aneuploidie mit spezifischen, numerischen und genomischen Veränderungen berichtet, welche sich bereits in Tumorstufen finden lässt und in den Metastasen erhalten bleibt. Diese Aneuploidie ganzer Chromosomenarme oder Chromosomen resultiert aus der massiven Deregulation des Transkriptom von maligne transformierten Zellen. [84]

Die Präparate der Metastasen und malignen Systemerkrankungen haben gemeinsam, dass auf dem Einsendeschein zur zytologischen Untersuchung in weniger als der Hälfte der Fälle eine Angabe zu einer metastasierten Tumorerkrankung gemacht wurde, so dass in der Differentialdiagnose der Zytomorphologie eine mögliche Metastase nicht von vorne herein alleine beachtet werden konnte. Nach Durchsicht der Krankenakten stand aber in keinem Fall klinisch allein der Verdacht eines Pankreaskarzinoms im Vordergrund. Retrospektiv wiesen Vorerkrankungen, Symptome oder Untersuchungsergebnisse auf einen anderen Primärtumor hin. Einige Entitäten, wie die eingeschlossenen Lymphompräparate inklusive des multiplen Myeloms, sind aufgrund der meist deutlich vom Karzinom abweichenden Morphologie einfacher einer ergänzenden immunzytochemischen Abklärung zuzuführen. Wohingegen Karzinometastasen im Pankreas ohne klinische Angabe des Primärtumors aufgrund des sehr viel häufigeren Pankreaskarzinoms, welches morphologisch ein hohes Maß an Heterogenität aufweisen kann, meist nicht erkennbar sind. In der Regel werden an zytologischen Ausstrichpräparaten bei Karzinomdiagnosen keine weiteren immunzytologischen Untersuchungen zur histogenetischen Tumorklassifikation durchgeführt, da hierfür immer ein Panel verschiedener Antikörper erforderlich ist. Meist liegen nicht genug tumorzellhaltige Ausstrichpräparate vor. Ein unvollständiges immunzytochemisches Markerpanel hilft jedoch meist nicht weiter. Für maligne amelanotische Melanome ist in der diagnostischen Zytologie bekannt, dass sie morphologisch Karzinome imitieren können. Nach persönlichen Mitteilungen von Dr. Pomjanski und Dr. Schramm (Zytopathologen im Funktionsbereich Zytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf) ist in verschiedenen Fallserien aus verschiedenen Organen, wie z.B. auch bei einer Serie von Speicheldrüsenpunktaten, jeweils mindestens eine Melanometastase ohne Anwendung der Immunzytochemie als Karzinom fehldiagnostiziert worden.

Bei den NET gibt es ein Präparat mit falsch negativem FISH-Befund bei einem Grenzwert von sieben aneuploiden Zellen, welches in der Zytologie als dringend verdächtig klassifiziert wurde. Drei weitere Präparate zeigen sowohl in der Zytologie als auch in der FISH ein negatives Ergebnis und müssen daher als sampling error betrachtet werden. Die 4 zytologisch diagnostizierten NET (dringender Verdacht) waren in der FISH (bei cut-off 5) sämtlich chromosomal aneuploid. Dabei handelte es sich nicht nur um höhergradig maligne G3 Tumore, sondern zweimal um G1 und einmal G2 Tumore (der 4. Fall blieb bezüglich der Differenzierung unbekannt). Dies ist etwas überraschend, da die Analyse der Ploidie in neuroendokrinen Tumoren verschiedener Organe mittels DNA Bildzytometrie in mehr als 84% der untersuchten Fälle ein diploides oder euploid-polyploides DNA-Muster ergab. [79] Die DNA-Bildzytometrie ist hier möglicherweise eine zu grobe Methode, weil zur Diagnose einer DNA-Aneuploidie eine Abweichung von mehr als 10% von den normalen diploide oder tetraploide DNA-Gehalte gefordert ist. Das entspricht bei normalen 46 Chromosomen einer Abweichung des diploiden Chromosomensatzes von mehr als 4 Chromosomen, entsprechend einer sehr großen genomischen Veränderung. Mittels einer hier schon etwas feiner unterscheidenden, komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) konnten chromosomale Imbalancen in 96% der enteropankreatischen NET gefunden werden. [105]

Man kann daher vermuten, dass die in der eigenen Studie an den wenigen Fällen beobachtete chromosomale Aneuploidie auch bereits in hoch und mittelgradig differenzierten NET, welche bekanntermaßen bereits metastasieren können, vorkommt. Ein prognostischer Nachweis der DNA-Aneuploidie mittels FISH bezüglich eines Metastasierungsrisikos wäre allerdings noch zu führen. In einer Arbeit von Asa (2011) [2] wird darauf hingewiesen, dass es bei NET eher zum Verlust als zum Zugewinn von Genabschnitten kommt. Bei Metastasen von NET zeigt sich ein vermehrter Zugewinn des Chromosom 7. [2] In der eigenen Studie kann hierzu aufgrund zu geringer Fallzahl keine Aussage gemacht werden.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend ist zu sagen, dass zytologische Diagnostik bei den endosonographisch gestützten Feinnadelpunktaten des Pankreaskarzinoms mit Hilfe der FISH an Sicherheit gewinnt. Durch die weiterführende Untersuchung von unklaren „zweifelhaften“ und „dringend tumorverdächtigen“ zytologischen Diagnosen wird die Spezifität und auch die eindeutige Zuordnung dieser Befunde deutlich verbessert und so ein höherer Anteil von eindeutigen Diagnosen im Sinne des Nachweises oder Ausschlusses von Malignität klinisch nutzbar. Der Zytologie als der schnelleren und billigeren Methode kommt hier der Status eines Suchtestes zu, wohingegen die zusätzliche FISH am gleichen Untersuchungsmaterial bei zytologisch unklaren Fällen als Bestätigungstest genutzt wird. Eine weitere Steigerung der Sensitivität bei den eigenen Ergebnissen könnte möglicherweise die Einführung der Trisomie / Polysomie des Chromosoms 7 als zusätzliches Untersuchungskriterium auch nach unklarer Zytologie bringen, was aber zukünftig zu untersuchen wäre.

Das Verfahren wurde für zytologische Präparate entwickelt, unabhängig von der Präparation als konventioneller Ausstrich oder flüssigkeitsbasiert. Allerdings sind alkoholisch gut fixierte Präparate aufgrund des besseren Zellerhaltes und der Reduktion von Artefaktbildung zu bevorzugen. Zytologische Präparate enthalten ganze Zellen mit vollständigem Zellkern und Chromosomensatz. Eine weiterführende Entwicklung der Aneuploidie-Diagnostik auch für histologische Präparate wäre sicherlich interessant, um schon gewonnene und vorhandene Proben weiter aufzuarbeiten, was für manche FISH-Anwendungen (z.B. Untersuchung der Amplifikation von Her-2/neu) auch gut möglich ist. Für die Aneuploidie-Diagnostik werden Fluoreszenzsignale auf Zellbasis ausgezählt. Da bereits Abweichungen in einigen wenigen Zellkernen ein Untersuchungsergebnis entscheidend verändern können, müssten für diesen Fall andere Grenzwerte etabliert werden, da histologisch Präparate in der Regel als Schnittpräparate vorliegen und man nicht von einem vollständigen Zellkern ausgehen kann.

Für eine weitere Steigerung der Treffsicherheit der EUS-FNA wird aber auch von großer Bedeutung sein, dass mehr Erfahrung auf Seiten der Punkteure in den jeweiligen Kliniken erworben wird. Die technischen Möglichkeiten hinsichtlich der Endosonographie entwickeln sich stetig weiter und können sicherlich zu verbesserter Probengewinnung mit ausreichendem Material führen, auch im Sinne der Gewinnung kleiner Mikrobiopsien, die in

einen Zellblock eingebracht und, z.B. für ergänzende immunhistochemische Untersuchungen, histologisch weiter aufgearbeitet werden können. Gleichzeitig spielt die Häufigkeit der EUS-FNA in einer Abteilung eine Rolle. Zentren mit hohen Fallzahlen bieten Routine und dem Punkteur einen entsprechenden Lernerfolg in der Durchführung der Untersuchung.

5 Literaturverzeichnis

- [1] D.G. Albertson, C. Collins, F. McCormick, J.W. Gray, Chromosome aberrations in solid tumors, *Nat. Genet.* 34 (2003) 369–376.
- [2] S.L. Asa, Pancreatic endocrine tumors, *Mod. Pathol.* 24 Suppl 2 (2011) S66-77.
- [3] AWMF, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0. AWMF Registernummer: 032-010OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>, (2013).
- [4] E.G. Barr Fritcher, B.R. Kipp, J.M. Slezak, L.E. Moreno-Luna, G.J. Gores, M.J. Levy, L.R. Roberts, K.C. Halling, T.J. Sebo, Correlating routine cytology, quantitative nuclear morphometry by digital image analysis, and genetic alterations by fluorescence in situ hybridization to assess the sensitivity of cytology for detecting pancreatobiliary tract malignancy, *Am. J. Clin. Pathol.* 128 (2007) 272–279.
- [5] D. Bartsch, D.W. Shevlin, W.S. Tung, O. Kisker, S.A. Wells Jr, P.J. Goodfellow, Frequent mutations of CDKN2 in primary pancreatic adenocarcinomas, *Genes Chromosomes Cancer.* 14 (1995) 189–195.
- [6] D.K. Bartsch, T.M. Gress, P. Langer, Familial pancreatic cancer--current knowledge, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 9 (2012) 445–453.
- [7] J.G. Bauman, J. Wiegant, P. Borst, P. van Duijn, A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA, *Exp. Cell Res.* 128 (1980) 485–490.
- [8] A. Benninghoff, D. Drenckhahn, Exokrine Bauchspeicheldrüse, in: *Anatomie: makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen 1*, 17. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München [u.a.], 2008: pp. 721–729.
- [9] S. Biesterfeld, K. Gerres, G. Fischer-Wein, A. Böcking, Polyploidy in non-neoplastic tissues, *J. Clin. Pathol.* 47 (1994) 38–42.
- [10] A. Böcking, DNA measurements. When and why?, in: Wied GL, Keebler CM, Rosenthal DL et al., Eds. *Compendium on Quality Assurance, Proficiency Testing, and Workload Limitations. Tutorials of Cytology.*, Chicago, 1995: pp. 170–188.
- [11] A. Böcking, Zytopathologie, in: C. Thomas (Ed.), *Histopathologie*, 12. Auflage, Schattauer-Verlag, Stuttgart-New York, 1998.
- [12] A. Böcking, Standardisierung der zytopathologischen Diagnostik, *Pathologe.* 19 (1998) 236–241.
- [13] A. Böcking, Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie, *Pathologe.* 19 (1998) 235–236.

- [14] A. Böcking, C. Thomas, C.P. Adler, P. Barth, Punktionszytologie Pankreas, in: Histopathologie: Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen Pathologie, 13. Auflage, Schattauer, F.K. Verlag, Stuttgart, 2001.
- [15] L. Bubendorf, G.E. Feichter, E.C. Obermann, P. Dalquen, Magen-Darm-Trakt, in: Pathologie: Zytopathologie, 3. Auflage, Springer Berlin Heidelberg, 2011: pp. 351–375.
- [16] L. Bubendorf, G.E. Feichter, E.C. Obermann, G. Klöppel, W. Remmele, P. Dalquen, H.-H. Kreipe, Pankreas, in: Pathologie: Zytopathologie, 3. Auflage, Springer Berlin Heidelberg, 2011: pp. 397–410.
- [17] L. Bubendorf, G.E. Feichter, E.C. Obermann, G. Klöppel, W. Remmele, P. Dalquen, H.-H. Kreipe, Zytologische Tumorkriterien, in: Pathologie: Zytopathologie, 3. Auflage, Springer Berlin Heidelberg, 2011: pp. 33–45.
- [18] L. Bubendorf, G.E. Feichter, W. Remmele, E.C. Obermann, P. Dalquen, G. Klöppel, H. Kreipe, Zytologische Methoden, in: Pathologie: Zytopathologie, 3. Auflage, Springer Berlin Heidelberg, 2011: pp. 605–641.
- [19] L. Bubendorf, B. Grilli, UroVysion™ Multiprobe FISH in Urinary Cytology, in: J.E. Roulston, J.M.S. Bartlett (Eds.), Molecular Diagnosis of Cancer, Humana Press, 2004: pp. 117–128.
- [20] P. Capelli, G. Martignoni, F. Pedica, M. Falconi, D. Antonello, G. Malpeli, A. Scarpa, Endocrine Neoplasms of the Pancreas: Pathologic and Genetic Features, Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 133 (2009) 350–364.
- [21] K.D. Chakaravarty, C.D. Venkata, I. Manicketh, R. Singh, P. Mathew, S. Devashetty, P.K.A. Chetty, Mature Cystic Teratoma of the Pancreas, ACG Case Rep J. 3 (2016) 80–81.
- [22] J. Cicens, K. Kvederaviciute, I. Meskinyte, E. Meskinyte-Kausiliene, A. Skeberdyte, J. Cicens, KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer, Cancers (Basel). 9 (2017).
- [23] S.R. Cingam, H. Karanchi, Gastrinoma, in: StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2017.
- [24] J.F. Cohen, D.A. Korevaar, D.G. Altman, D.E. Bruns, C.A. Gatsonis, L. Hooft, L. Irwig, D. Levine, J.B. Reitsma, H.C.W. de Vet, P.M.M. Bossuyt, STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration, BMJ Open. 6 (2016) e012799.
- [25] C. Cui, W. Shu, P. Li, Fluorescence In situ Hybridization: Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications, Front Cell Dev Biol. 4 (2016) 89.
- [26] M. Dal Molin, A.L. Blackford, A. Siddiqui, A. Brant, C. Cho, N. Rezaee, J. Yu, J. He, M. Weiss, R.H. Hruban, C. Wolfgang, M. Goggins, Duodenal Involvement is an Independent Prognostic Factor for Patients with Surgically Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Ann. Surg. Oncol. (2017).

- [27] E.R. DeLong, D.M. DeLong, D.L. Clarke-Pearson, Comparing the Areas under Two or More Correlated Receiver Operating Characteristic Curves: A Nonparametric Approach, *Biometrics*. 44 (1988) 837–845.
- [28] R.M. DeMay, *The Book of Cells: A Breviary of Cytopathology.*, ASCP Press, Chicago, 2016.
- [29] G.W. Dewald, T.C. Smyrk, E.C. Thorland, R.R. McWilliams, D.L. Van Dyke, J.G. Keefe, K.J. Belongie, S.A. Smoley, D.L. Knutson, S.R. Fink, A.E. Wiktor, G.M. Petersen, Fluorescence in situ hybridization to visualize genetic abnormalities in interphase cells of acinar cell carcinoma, ductal adenocarcinoma, and islet cell carcinoma of the pancreas, *Mayo Clin. Proc.* 84 (2009) 801–810.
- [30] R. Doi, M. Imamura, R. Hosotani, T. Imaizumi, T. Hatori, K. Takasaki, A. Funakoshi, H. Wakasugi, T. Asano, S. Hishinuma, Y. Ogata, M. Sunamura, K. Yamaguchi, M. Tanaka, S. Takao, T. Aikou, K. Hirata, H. Maguchi, K. Aiura, T. Aoki, A. Kakita, M. Sasaki, M. Ozaki, S. Matsusue, S. Higashide, H. Noda, S. Ikeda, S. Maetani, S. Yoshida, Japan Pancreatic Cancer Study Group, Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial, *Surg. Today*. 38 (2008) 1021–1028.
- [31] P. Duesberg, R. Li, A. Fabarius, R. Hehlmann, Aneuploidy and Cancer: From Correlation to Causation, in: T. Dittmar, K.S. Zaenker, A. Schmidt (Eds.), *Contributions to Microbiology*, KARGER, Basel, 2006: pp. 16–44.
- [32] G.E. Feichter, P. Dalquen, *Zytologische Tumorkriterien*, in: *Zytopathologie*, 1. Auflage, Springer, Berlin, 2000: pp. 17–25.
- [33] N. Freudenberg, C. Kortsik, A. Ross, *Zytologische Methoden*, in: *Grundlagen der Zytopathologie: Kurzlehrbuch und Atlas der Allgemeinen und Speziellen Zytodiagnostik.: Kurzlehrbuch Und Atlas Der Allgeminen Und Speziellen Zytodiagnostik*, 1.Auflage, S. Karger, Basel, 2002: pp. 1–13.
- [34] N. Freudenberg, C. Kortsik, A. Ross, *Allgemeine Zytologie*, in: *Grundlagen der Zytopathologie: Kurzlehrbuch und Atlas der Allgemeinen und Speziellen Zytodiagnostik.: Kurzlehrbuch Und Atlas Der Allgeminen Und Speziellen Zytodiagnostik*, 1.Auflage, S. Karger, Basel, 2002: pp. 14–21.
- [35] B. Glimelius, K. Hoffman, P.O. Sjöden, G. Jacobsson, H. Sellström, L.K. Enander, T. Linné, C. Svensson, Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer, *Ann. Oncol.* 7 (1996) 593–600.
- [36] S.A. Hahn, S.E. Kern, W.-H. Schmiegel, *Neue molekularbiologische Erkenntnisse aus der Pankreaskarzinomforschung*, (1997) A-3342-3350.
- [37] K.C. Halling, W. King, I.A. Sokolova, R.G. Meyer, H.M. Burkhardt, A.C. Halling, J.C. Cheville, T.J. Sebo, S. Ramakumar, C.S. Stewart, S. Pankratz, D.J. O’Kane, S.A. Seelig, M.M. Lieber, R.B. Jenkins, A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the

detection of urothelial carcinoma, *J. Urol.* 164 (2000) 1768–1775.

[38] V. Harms, Die Vierfeldertafel, in: *Medizinische Statistik: Epidemiologie und Evidence Based Medicine*, 8. Auflage, Harms, Volker, Lindhöft, 2012.

[39] C.C. Harris, M. Hollstein, Clinical Implications of the p53 Tumor-Suppressor Gene, *New England Journal of Medicine.* 329 (1993) 1318–1327.

[40] D. Häussinger, M. Beyer, Exokrines Pankreaskarzinom, in: *Düsseldorfer Kompendium: Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie*, 1. Auflage, Dup, Düsseldorf, 2009: pp. 374–381.

[41] Heidemann, T. Heintges, W. Sauer, Pankreaskarzinom, in: G. Herold (Ed.), *Innere Medizin 2012*, Herold, Köln, 2012: pp. 497–498.

[42] P.D.L. Held, D.K. Ruffach, P.D.B. Seifert, Klassifikation und Prognose, in: *Medizinische Statistik - Biometrie, Biomathematik, Medizinische Statistik: Konzepte, Methoden, Anwendungen*, 1. Auflage, Pearson Studium, München, 2013.

[43] D.N. Henkes, S.N. Patel, L.A. Rosenkranz, J.L. Escobedo, The utility of UroVysion fluorescence in situ hybridization in pancreatic fine-needle aspiration samples directed and obtained by endoscopic ultrasonography, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 137 (2013) 64–71.

[44] M.J. Hewitt, M.J.W. McPhail, L. Possamai, A. Dhar, P. Vlavianos, K.J. Monahan, EUS-guided FNA for diagnosis of solid pancreatic neoplasms: a meta-analysis, *Gastrointest. Endosc.* 75 (2012) 319–331.

[45] W. Hiddemann, C.R. Bartram, C.R. Bartram, *Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie*, 2. Auflage, Springer Berlin Heidelberg, 2009.

[46] R.H. Hruban, N.V. Adsay, J. Albores-Saavedra, C.M.D. Compton, E.S. Garrett, S.N.M.D. Goodman, S.E. Kern, D.S. Klimstra, G. Klöppel, D.S. Longnecker, J. Lüttges, G.J.A.M.D. Offerhaus, Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: A New Nomenclature and Classification System for Pancreatic Duct Lesions, *Journal of Surgical Pathology* May 2001. 25 (2001) 579–586.

[47] R.H. Hruban, K. Takaori, D.S. Klimstra, N.V. Adsay, J. Albores-Saavedra, A.V. Biankin, S.A. Biankin, C. Compton, N. Fukushima, T. Furukawa, M. Goggins, Y. Kato, G. Klöppel, D.S. Longnecker, J. Lüttges, A. Maitra, G.J.A. Offerhaus, M. Shimizu, S. Yonezawa, An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms, *Am. J. Surg. Pathol.* 28 (2004) 977–987.

[48] R.F. Hwang, E.M. Gordon, W.F. Anderson, D. Parekh, Gene therapy for primary and metastatic pancreatic cancer with intraperitoneal retroviral vector bearing the wild-type p53 gene, *Surgery.* 124 (1998) 143–151.

[49] International Agency for Research on Cancer, WHO classification of tumours of the pancreas, in: *WHO Classification of Tumours Editorial Board. Digestive System Tumours.*, 5. Auflage, Band 1, Lyon (France), 2019.

- [50] U. Kellner, M. Krams, S.O. Frahm, C. Mawrin, Pankreas, in: *Kurzlehrbuch Pathologie*, 1. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 2010: pp. 294–297.
- [51] J.Y. Kim, J.S. Song, H. Park, J.H. Byun, K.-B. Song, K.-P. Kim, S.C. Kim, S.-M. Hong, Primary mesenchymal tumors of the pancreas: single-center experience over 16 years, *Pancreas*. 43 (2014) 959–968.
- [52] B.R. Kipp, E.G.B. Fritcher, A.C. Clayton, G.J. Gores, L.R. Roberts, J. Zhang, M.J. Levy, K.C. Halling, Comparison of KRAS mutation analysis and FISH for detecting pancreatobiliary tract cancer in cytology specimens collected during endoscopic retrograde cholangiopancreatography, *J Mol Diagn*. 12 (2010) 780–786.
- [53] B.R. Kipp, L.M. Stadheim, S.A. Halling, N.L. Pochron, S. Harmsen, D.M. Nagorney, T.J. Sebo, T.M. Therneau, G.J. Gores, P.C. de Groen, T.H. Baron, M.J. Levy, K.C. Halling, L.R. Roberts, A comparison of routine cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of malignant bile duct strictures, *Am. J. Gastroenterol*. 99 (2004) 1675–1681.
- [54] G. Klöppel, Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms, *Endocr Relat Cancer*. 18 (2011) S1–S16.
- [55] G. Klöppel, Neuroendokrine Neoplasien, in: *Pathologie: Verdauungstrakt Und Peritoneum*, 3. Auflage, Springer, 2013: pp. 761–795.
- [56] G. Klöppel, Klassifikation und Pathologie endokriner Tumore des Pankreas, in: H.G. Beger, M.W. Büchler, H. Dralle, M.M. Lerch, P. Malfertheiner, J. Mössner, J.F. Riemann (Eds.), *Erkrankungen des Pankreas: Evidenz in Diagnostik, Therapie und Langzeitverlauf*, 1. Auflage, Springer, Berlin, 2013: pp. 203–210.
- [57] G. Klöppel, B. Sipos, J. Lüttges, PH.U. Heitz, Pankreas, in: W. Böcker, H. Denk, H. Moch (Eds.), *Pathologie*, 4. Auflage, Elsevier GmbH, München, 2008: pp. 829–842.
- [58] A.G. Knudson Jr, Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes, *Cancer Res*. 45 (1985) 1437–1443.
- [59] H.G. Koch, J. Brix, P.C. Heinrich, DNA-Mutation und ihre Reparatur, in: P.C. Heinrich, M. Müller, L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides Biochemie Und Pathobiochemie*, 9. Auflage, Springer Berlin Heidelberg, 2014.
- [60] P. Komminoth, A. Perren, G. Klöppel, PH.U. Heitz, Disseminiertes neuroendokrines System, in: W. Böcker, H. Denk, H. Moch (Eds.), *Pathologie*, 4. Auflage, Elsevier GmbH, München, 2008: pp. 431–438.
- [61] L. Kreienbrock, I. Pigeot, W. Ahrens, Kohortenstudien, in: *Epidemiologische Methoden*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 2012: pp. 96–106.
- [62] N. Kubiliun, A. Ribeiro, Y.-S. Fan, C.M. Rocha-Lima, D. Sleeman, J. Merchan, J. Barkin, J. Levi, EUS-FNA with rescue fluorescence in situ hybridization for the diagnosis of pancreatic carcinoma in patients with inconclusive on-site cytopathology results, *Gastrointest. Endosc*. 74

(2011) 541–547.

[63] J. Kurreck, C.A. Stein, Genetic Testing, in: *Molecular Medicine: An Introduction*, 1.Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2015: pp. 197–214.

[64] J. Kurreck, C.A. Stein, Molecular Oncology, in: *Molecular Medicine: An Introduction*, 1.Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2015: pp. 85–122.

[65] M.J. Levy, J.E. Clain, A. Clayton, K.C. Halling, B.R. Kipp, E. Rajan, L.R. Roberts, R.M. Root, T.J. Sebo, M.D. Topazian, K.K. Wang, M.J. Wiersema, G.J. Gores, Preliminary experience comparing routine cytology results with the composite results of digital image analysis and fluorescence in situ hybridization in patients undergoing EUS-guided FNA, *Gastrointest. Endosc.* 66 (2007) 483–490.

[66] M.J. Levy, T.N. Oberg, M.B. Campion, A.C. Clayton, K.C. Halling, M.R. Henry, B.R. Kipp, T.J. Sebo, J. Zhang, F.T. Enders, J.E. Clain, F.C. Gleeson, E. Rajan, L.R. Roberts, M.D. Topazian, K.K. Wang, G.J. Gores, Comparison of methods to detect neoplasia in patients undergoing endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration, *Gastroenterology.* 142 (2012) 1112-1121.e2.

[67] J. Lüttges, Histologische Klassifikation von zystischen Pankreasneoplasien, in: H.G. Beger, M.W. Büchler, H. Dralle, M.M. Lerch, P. Malfertheiner, J. Mössner, J.F. Riemann (Eds.), *Erkrankungen des Pankreas: Evidenz in Diagnostik, Therapie und Langzeitverlauf*, 1.Auflage, Springer, Berlin, 2013: pp. 259–265.

[68] K. Miyabe, Y. Hori, T. Nakazawa, K. Hayashi, I. Naitoh, S. Shimizu, H. Kondo, Y. Nishi, M. Yoshida, S. Umemura, A. Kato, H. Ohara, T. Joh, H. Inagaki, Locus/chromosome aberrations in intraductal papillary mucinous neoplasms analyzed by fluorescence in situ hybridization, *Am. J. Surg. Pathol.* 39 (2015) 512–520.

[69] I.M. Modlin, K.D. Lye, M. Kidd, A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors, *Cancer.* 97 (2003) 934–959.

[70] L.E. Moreno Luna, B. Kipp, K.C. Halling, T.J. Sebo, W.K. Kremers., L.R. Roberts, E.G. Barr Fritcher, M.J. Levy, G.J. Gores, Advanced Cytologic Techniques for the Detection of Malignant Pancreatobiliary Strictures, *Gastroenterology.* 131 (2006) 1064–1072.

[71] S. Mukewar, N. de Pretis, A. Aryal-Khanal, N. Ahmed, R. Sah, F. Enders, J.J. Larson, M.J. Levy, N. Takahashi, M. Topazian, R. Pearson, S.S. Vege, S.T. Chari, Fukuoka criteria accurately predict risk for adverse outcomes during follow-up of pancreatic cysts presumed to be intraductal papillary mucinous neoplasms, *Gut.* 66 (2017) 1811–1817.

[72] I.D. Nagtegaal, R.D. Odze, D. Klimstra, V. Paradis, M. Rugge, P. Schirmacher, K.M. Washington, F. Carneiro, I.A. Cree, The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system, *Histopathology.* 76 (2020) 182–188.

[73] J.P. Neoptolemos, D.D. Stocken, C. Bassi, P. Ghaneh, D. Cunningham, D. Goldstein, R.

Padbury, M.J. Moore, S. Gallinger, C. Mariette, M.N. Wente, J.R. Izbicki, H. Friess, M.M. Lerch, C. Dervenis, A. Oláh, G. Butturini, R. Doi, P.A. Lind, D. Smith, J.W. Valle, D.H. Palmer, J.A. Buckels, J. Thompson, C.J. McKay, C.L. Rawcliffe, M.W. Büchler, European Study Group for Pancreatic Cancer, Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial, *JAMA*. 304 (2010) 1073–1081.

[74] H. Oettle, S. Post, P. Neuhaus, K. Gellert, J. Langrehr, K. Ridwelski, H. Schramm, J. Fahlke, C. Zuelke, C. Burkart, K. Gutberlet, E. Kettner, H. Schmalenberg, K. Weigang-Koehler, W.-O. Bechstein, M. Niedergethmann, I. Schmidt-Wolf, L. Roll, B. Doerken, H. Riess, Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial, *JAMA*. 297 (2007) 267–277.

[75] D. O’Toole, L. Palazzo, R. Arotçarena, A. Dancour, A. Aubert, P. Hammel, J. Amaris, P. Ruszniewski, Assessment of complications of EUS-guided fine-needle aspiration, *Gastrointestinal Endoscopy*. 53 (2001) 470–474.

[76] D.C. Ott, E. Heinmöller, A. Gaumann, J. Schölmerich, F. Klebl, Intraepitheliale Neoplasien (PanIN) und intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) des Pankreas als Vorläufer des Pankreaskarzinoms, *Med Klin*. 102 (2007) 127–135.

[77] M.B. Pitman, B.A. Centeno, S.Z. Ali, M. Genevay, E. Stelow, M. Mino-Kenudson, C. Fernandez-del Castillo, C. Max Schmidt, W. Brugge, L. Layfield, Papanicolaou Society of Cytopathology, Standardized terminology and nomenclature for pancreatobiliary cytology: the Papanicolaou Society of Cytopathology guidelines, *Diagn. Cytopathol*. 42 (2014) 338–350.

[78] M.B. Pitman, K.A. Yaeger, W.R. Brugge, M. Mino-Kenudson, Prospective analysis of atypical epithelial cells as a high-risk cytologic feature for malignancy in pancreatic cysts, *Cancer Cytopathology*. 121 (2013) 29–36.

[79] H. Raatz, A. Böcking, S. Hauptmann, Prognostic impact of DNA-image-cytometry in neuroendocrine (carcinoid) tumours, *Cell. Oncol*. 26 (2004) 81–88.

[80] K.H. Ramesh, M.J. Macera, R.S. Verma, Rapid Denaturation Improves Chromosome Morphology and Permits Multiple Hybridizations During Fluorescence in Situ Hybridization, *Biotechnic & Histochemistry*. 72 (1997) 141–143.

[81] M.S. Redston, C. Caldas, A.B. Seymour, R.H. Hruban, L. da Costa, C.J. Yeo, S.E. Kern, p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions, *Cancer Res*. 54 (1994) 3025–3033.

[82] Y. Reisman, C.H. Gips, S.M. Lavelle, J.H. Wilson, Clinical presentation of (subclinical) jaundice--the Euricterus project in The Netherlands. United Dutch Hospitals and Euricterus Project Management Group, *Hepatogastroenterology*. 43 (1996) 1190–1195.

[83] A. Ribeiro, J. Peng, C. Casas, Y.-S. Fan, Endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration with fluorescence in situ hybridization analysis in 104 patients with pancreatic mass, *J*.

Gastroenterol. Hepatol. 29 (2014) 1654–1658.

[84] T. Ried, Y. Hu, M.J. Difilippantonio, B.M. Ghadimi, M. Grade, J. Camps, The consequences of chromosomal aneuploidy on the transcriptome of cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 1819 (2012) 784–793.

[85] E.G. Robbins 2nd, D. Franceschi, J.S. Barkin, Solitary metastatic tumors to the pancreas: a case report and review of the literature, *Am. J. Gastroenterol.* 91 (1996) 2414–2417.

[86] Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland.V.(Hrsg), *Krebs in Deutschland | 2013/2014*, (2017) 154.

[87] A. Rocco, D. Compare, D. Angrisani, M. Sanduzzi Zamparelli, G. Nardone, Alcoholic disease: liver and beyond, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 14652–14659.

[88] L. Sachs, J. Hedderich, Der diagnostische Test, in: *Angewandte Statistik: Methodensammlung Mit R*, 13. Auflage, Springer Berlin Heidelberg, 2009: pp. 155–161.

[89] M.W. Saif, Primary pancreatic lymphomas, *JOP.* 7 (2006) 262–273.

[90] S. Savic, L. Bubendorf, Fluorescence in situ hybridization. A new diagnostic dimension in cytology, *Pathologe.* 28 (2007) 384–392.

[91] E.F. Schisterman, N.J. Perkins, A. Liu, H. Bondell, Optimal cut-point and its corresponding Youden Index to discriminate individuals using pooled blood samples, *Epidemiology.* 16 (2005) 73–81.

[92] R.M. Schmid, T. Gress, R. Jakobs, J.F. Riemann, F. Dobrowolski, M.-D. Saeger, Pankreasneoplasien, in: J.F. Riemann, W. Fischbach, P.R. Galle, J. Mössner (Eds.), *Gastroenterologie: Das komplette Referenzwerk für Klinik und Praxis*, 1. Auflage, Thieme, Stuttgart; New York, NY, 2008: pp. 1872–1894.

[93] M. Schramm, C. Wrobel, I. Born, M. Kazimirek, N. Pomjanski, M. William, R. Kappes, C.D. Gerharz, S. Biesterfeld, A. Böcking, Equivocal cytology in lung cancer diagnosis: improvement of diagnostic accuracy using adjuvant multicolor FISH, DNA-image cytometry, and quantitative promoter hypermethylation analysis, *Cancer Cytopathol.* 119 (2011) 177–192.

[94] M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, Bauchspeicheldrüse (Pankreas), in: *Prometheus : LernAtlas Der Anatomie: Innere Organe*, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2015: pp. 260–261.

[95] M. Schutte, R.H. Hruban, J. Geradts, R. Maynard, W. Hilgers, S.K. Rabindran, C.A. Moskaluk, S.A. Hahn, I. Schwarte-Waldhoff, W. Schmiegell, S.B. Baylin, S.E. Kern, J.G. Herman, Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas, *Cancer Res.* 57 (1997) 3126–3130.

[96] M. Serrano, G.J. Hannon, D. Beach, A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4, *Nature.* 366 (1993) 704–707.

- [97] S. Shimizu, H. Kutsumi, S. Fujimoto, K. Kawai, Diagnostic endoscopic retrograde cholangiopancreatography, *Endoscopy*. 30 (1998) 158–162.
- [98] J.J. Shin, P. Gorden, S.K. Libutti, Insulinoma: pathophysiology, localization and management, *Future Oncol*. 6 (2010) 229–237.
- [99] I.A. Sokolova, K.C. Halling, R.B. Jenkins, H.M. Burkhardt, R.G. Meyer, S.A. Seelig, W. King, The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine, *J Mol Diagn*. 2 (2000) 116–123.
- [100] W. Steinberg, The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen, *Am. J. Gastroenterol*. 85 (1990) 350–355.
- [101] T. Strachan, A.P. Read, Struktur und Funktion der Chromosomen, in: *Molekulare Humangenetik*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2005: pp. 37–66.
- [102] J.A. Swets, Measuring the accuracy of diagnostic systems, *Science*. 240 (1988) 1285–1293.
- [103] M. Tanaka, C. Fernández-del Castillo, V. Adsay, S. Chari, M. Falconi, J.-Y. Jang, W. Kimura, P. Levy, M.B. Pitman, C.M. Schmidt, M. Shimizu, C.L. Wolfgang, K. Yamaguchi, K. Yamao, International consensus guidelines 2012 for the management of IPMN and MCN of the pancreas, *Pancreatology*. 12 (2012) 183–197.
- [104] A.C. Tersmette, G.M. Petersen, G.J. Offerhaus, F.C. Falatko, K.A. Brune, M. Goggins, E. Rozenblum, R.E. Wilentz, C.J. Yeo, J.L. Cameron, S.E. Kern, R.H. Hruban, Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer, *Clin. Cancer Res*. 7 (2001) 738–744.
- [105] H. Tönnies, M.R. Toliat, C. Ramel, U.F. Pape, H. Neitzel, W. Berger, B. Wiedenmann, Analysis of sporadic neuroendocrine tumours of the enteropancreatic system by comparative genomic hybridisation, *Gut*. 48 (2001) 536–541.
- [106] T. Vlajnic, G. Somaini, S. Savic, A. Barascud, B. Grilli, M. Herzog, E.C. Obermann, B.J. Holmes, S.Z. Ali, L. Degen, L. Bubendorf, Targeted multiprobe fluorescence in situ hybridization analysis for elucidation of inconclusive pancreatobiliary cytology, *Cancer Cytopathol*. 122 (2014) 627–634.
- [107] Q.-X. Wang, J. Xiao, M. Orange, H. Zhang, Y.-Q. Zhu, EUS-Guided FNA for Diagnosis of Pancreatic Cystic Lesions: a Meta-Analysis, *Cell. Physiol. Biochem*. 36 (2015) 1197–1209.
- [108] C. Weiß, Diagnosestudien, in: *Basiswissen Medizinische Statistik*, 5. Auflage, Springer, Berlin, 2010.
- [109] J. Werner, Büchler, Pankreaskarzinom und periampulläre Karzinome, in: J.R. Siewert, M. Rothmund, V. Schumpelick (Eds.), *Praxis der Viszeralchirurgie: Onkologische Chirurgie*, 3. Auflage, Springer, Heidelberg, 2010: pp. 563–586.
- [110] M. Werner, L. Wilkens, M. Aubele, M. Nolte, H. Zitzelsberger, P. Komminoth, Interphase

cytogenetics in pathology: principles, methods, and applications of fluorescence in situ hybridization (FISH), *Histochem. Cell Biol.* 108 (1997) 381–390.

[111] J.M. Winter, J.L. Cameron, K.A. Campbell, M.A. Arnold, D.C. Chang, J. Coleman, M.B. Hodgin, P.K. Sauter, R.H. Hruban, T.S. Riall, R.D. Schulick, M.A. Choti, K.D. Lillemoe, C.J. Yeo, 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience, *J. Gastrointest. Surg.* 10 (2006) 1199–1210; discussion 1210-1211.

[112] C. Wittekind, Pankreas, in: *TNM - Klassifikation Maligner Tumoren*, 8. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2017: pp. 126–129.

[113] P.K. Wright, D.A. Shelton, M.R. Holbrook, S.A. Thiryayi, N. Narine, D. Slater, D.N. Rana, Outcomes of endoscopic ultrasound-guided pancreatic FNAC diagnosis for solid and cystic lesions at Manchester Royal Infirmary based upon the Papanicolaou Society of Cytopathology pancreaticobiliary terminology classification scheme, *Cytopathology.* 29 (2018) 71–79.

[114] G.C.H. Yang, L.-C. Tao, Liver and Pancreas, in: M. Bibbo, D. Wilbur (Eds.), *Comprehensive Cytopathology: Expert Consult*, 3. Auflage, Saunders W B Co, Philadelphia, PA, 2008: pp. 873–913.

[115] W.J. Youden, Index for rating diagnostic tests, *Cancer.* 3 (1950) 32–35.

[116] N. Zavras, D. Schizas, N. Machairas, V. Damaskou, N. Economopoulos, A. Machairas, Carcinoid syndrome from a carcinoid tumor of the pancreas without liver metastases: A case report and literature review, *Oncol Lett.* 13 (2017) 2373–2376.

[117] T. Zellweger, G. Benz, G. Cathomas, M.J. Mihatsch, T. Sulser, T.C. Gasser, L. Bubendorf, Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer, *Int. J. Cancer.* 119 (2006) 1660–1665.

[118] H. Zhang, S. Yu, W. Wang, Y. Cheng, Y. Xiao, Z. Lu, J. Chen, Primary mesenchymal tumors of the pancreas in a single center over 15 years, *Oncol Lett.* 12 (2016) 4027–4034.

6 Anhang

6.1 Fragebogen für persönliche Akteneinsicht

Klinische Datenerhebung

Diagnostische Treffsicherheit der FISH an FNAB des Pankreas

Name des Patienten: _____ Vorname: _____

Geburtsdatum: _____ Geschlecht: m w

Eingangsnummer: _____ Einsendedatum: _____

Klinik vor Punktion

Symptomatik: _____

gravierende Vorerkrankungen inkl. Therapie, z.B. Chemo, Radiatio...): _____

Raucher: JA NEIN Menge: _____ Alkoholabusus: JA NEIN Menge: _____

Bildgebung: Sono CT MRT ERCP Endosono

Befund: _____

Datum: _____ Größe: _____

Lokalisation Raumforderung: Pankreaskopf Pankreaskörper Pankreasschwanz o.n.A

Klinisches Staging: cT___ cN___ cM___ Tumormarker: _____

Initiale zytologische Diagnostik

Häufigkeit der Punktion: 1x 2x 3x

Diagnose im Klartext (je Punktion, inklusive immunocytochemischer Tumortypisierung und Datum):

Komplikationen: Blutung Schmerzen Infektion Hämatom

Implantationsmetastase im Stichkanal

Follow Up

Adjuvante Methoden: DNA-Zytometrie Ergebnis: _____

FISH Ergebnis: _____

Histologische Diagnose vorhanden: JA NEIN

Diagnose im Klartext (mit Datum): _____

Postoperatives, wenn nicht vorhanden abschließendes klinisches Staging:

pT_x pT₀ pT₁ pT₂ pT₃ pT₄

pN_x pN₀ pN₁

pM_x pM₀ pM₁

Stadium (UICC 2010): I II III IV

Grading: I II III IV Resektion: R0 R1

Histogenetische Tumortypisierung der Zytologie in Vergleich zum Follow-up:

richtig falsch nicht möglich

weiterer Krankheitsverlauf:

Therapie: _____

Remission Rezidiv

Datum des letzten klinischen Follow-UP: _____

6.2 Fragebogen durch Kliniker auszufüllen

Follow-Up Erfassungsbogen

Diagnostische Treffsicherheit der FISH an FNAB des Pankreas

Einsender: _____

Name des Patienten: _____ Vorname: _____

Geburtsdatum: _____ Geschlecht: m w Eingangsnummer: _____

Klinik vor Punktion:

Symptomatik: _____

gravierende Vorerkrankungen (inkl. Therapie, z.B. Zytostatika...): _____

Raucher: JA NEIN Menge: _____ Alkohol: JA NEIN Menge: _____

Klinische Abklärung: Klinisch Anhalt für einen malignen Tumor? JA NEIN

Lokalisation: _____

durchgeführte Diagnostik (z.B. Bildgebung, Punktion): _____

Befund (inkl. Größe): _____

Histologische/zytologische Abklärung: ausschließlich zytologisch? JA NEIN

Wenn nein, Ergebnis der **histologischen** Abklärung: BIOPSIE OPERATION

Histologische Diagnose im Klartext: _____

_____ Datum: _____

Staging: T ___ N ___ M ___ POSTOPERATIV KLINISCH

Stadium (UICC 2010): ___ Grading: ___

Komplikationen der Punktion: NEIN JA Wenn ja. Welche? _____

weiterer Krankheitsverlauf: _____

Therapieverlauf: _____

Eventuell weiterbehandelnde Einrichtung: _____

Datum des letzten klinischen Follow up: _____

Datum: _____ Gezeichnet durch: _____

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld und Dr. med. Martin Schramm für die ausgezeichnete Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit.

Frau Marietta Kazimirek danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen im Zytologielabor bei Färbungen und beim Mikroskopieren der angefertigten Präparate.

Allen Mitarbeitern der Zytopathologie der Uniklinik Düsseldorf bin ich dankbar für die tatkräftige Unterstützung sowie angenehme Zusammenarbeit.

Meiner Mutter, Elisabeth Heywinkel, meinen Geschwistern, Katharina und Torsten Heywinkel, und meinem Partner, Clemens Wolter, danke ich für ihre Geduld, Ermutigungen und fortwährende Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation.

Für alle lieben Menschen, die mir bei der Fertigstellung und Umsetzung dieser Arbeit geholfen haben, gilt: Ohne sie wäre diese Doktorarbeit in der jetzigen Form nicht möglich gewesen.

Vielen Dank dafür!