

Aus dem Institut für Pathologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Irene Esposito

-Funktionsbereich Cytopathologie-

**Diagnostische Treffsicherheit des Lungenkarzinoms bei  
endobronchial entnommenen zytologischen  
Untersuchungsmaterialien**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Liudmila Li-Arnold

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit 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. Ulrich Germing

# Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis .....	III
II.	Abbildungsverzeichnis .....	IV
III.	Tabellenverzeichnis .....	V
1	Einleitung .....	1
1.1	Das Lungenkarzinom .....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie .....	2
1.1.3	Einige molekularbiologische Alterationen .....	3
1.1.4	Histogenetische Einteilung der Lungentumoren gemäß der WHO .....	5
1.1.5	Diagnostik und Therapie .....	7
1.2	Zytologie des Lungenkarzinoms.....	8
1.3	Adjuvante Methoden in der Zytologie.....	13
1.3.1	Immunzytochemie .....	14
1.3.2	FISH .....	15
1.3.3	DNA-Zytometrie .....	17
1.4	Zielsetzung.....	18
2	Material und Methoden .....	19
2.1	Patientenkohorte .....	19
2.2	Aufbau der Excel-Tabelle .....	19
2.3	Referenzstandard .....	20
2.4	Follow-up und Anonymisierung der Datensätze .....	21
2.5	Ethikvotum.....	22
2.6	Ablauf der zytologischen Untersuchung im Funktionsbereich Cytopathologie .....	22
2.7	Adjuvante Methoden.....	23
2.7.1	Immunzytochemie .....	24
2.8	Statistische Auswertung des Vergleichs von zytologischen Diagnosen und Follow-up Diagnosen .....	26
2.8.1	Deskriptive Bestimmung der Treffsicherheit der zytologischen Malignitätsdiagnose .....	26
2.8.2	Kreuztabellen für die Korrelationsanalyse bei Tumortypisierung .....	28
3	Ergebnisse .....	29
3.1	Das Patientenkollektiv .....	29
3.2	Treffsicherheit der Zytologie .....	34

3.2.1	Auswertung für sämtliche Untersuchungsmaterialien.....	34
3.2.2	Auswertungen pro Untersuchungsart .....	35
3.3	Einsatz von adjuvanten Methoden und deren Treffsicherheit .....	37
3.3.1	DNA-Bildzytometrie .....	37
3.3.2	FISH .....	38
3.4	Treffsicherheit der Zytologie mit adjuvanten Methoden.....	38
3.5	Genauigkeit der zytologischen Tumortypisierung.....	40
3.5.1	Beschreibung der Auswertungsvarianten für die Tumortypisierung.....	40
3.5.2	Konventionelle (mikroskopische) zytologische Tumortypisierung .....	42
3.5.3	Tumortypisierung nach sämtlichen adjuvanten Verfahren, insbesondere Immunzytochemie.....	43
3.5.4	Tumortypisierung nur der immunzytochemisch untersuchten Fälle .....	45
4	Diskussion.....	48
4.1	Patientenkollektiv .....	48
4.2	Erwartete Verteilung zytologischer Befundkategorien.....	49
4.3	Malignitätswahrscheinlichkeit zytologischer Diagnosegruppen .....	50
4.4	Treffsicherheit der alleinigen mikroskopischen Zytologie.....	51
4.4.1	Bronchiale Bürstenabstriche.....	54
4.4.2	Bronchiallavagen und sekrete- .....	55
4.4.3	EBUS TbNa.....	56
4.5	Falsch positive und falsch negative zytologische Diagnosen.....	58
4.6	Adjuvante Untersuchungen nach unklaren zytologischen Befunden .....	59
4.7	Immunzytochemische Tumorzelltypisierung.....	62
4.7.1	Tumorzelltypisierung im Gesamtkollektiv.....	63
4.7.2	Tumortypisierung nur der immunzytochemisch untersuchten Fälle .....	68
4.8	Gegenwärtiger (2021) Stellenwert der Zytologie in der Diagnostik und Behandlung des Lungenkarzinoms .....	70
5	Zusammenfassung.....	72
6	Literaturverzeichnis.....	74

## I. Abkürzungsverzeichnis

AAH	<i>Atypische adenomatöse Hyperplasie</i>
ABC-Methode	<i>Avidin-Biotin-Komple-Methode</i>
ADC	<i>Adenokarzinom</i>
AEC	<i>3-Amino-9-ethylcarbazol</i>
AIS	<i>Adenocarcinoma in situ</i>
ALK	<i>Anaplastic large cell lymphoma receptor tyrosine kinase</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAL	<i>Bronchiallavage, Bronchiallavage</i>
BRAF-Gen	<i>Proto-oncogene B-Raf</i>
CDX2	<i>Caudal-related homeobox transcription factor 2</i>
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>
C-MYC	<i>Myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
COPD	<i>Chronisch obstruktive Lungenerkrankung</i>
CT	<i>Computertomografie</i>
EBUS-TbNa	<i>Endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGFR	<i>Epidermal-Growth-Factor-Receptor</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
FISH	<i>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</i>
GATA3	<i>GATA-binding protein 3 (Trans-acting T-cell-specific transcription factor)</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPV	<i>Humanes Papillomavirus</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IASLC	<i>The International Association for the Study of Lung Cancer</i>
LCNEC	<i>Large cell neuroendocrine carcinoma</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MET	<i>The hepatocyte growth factor receptor</i>
NKZ-Ca	<i>Nicht-kleinzelliges Karzinom</i>
nNGM	<i>Nationales Netzwerk Genomische Medizin</i>
NPW	<i>Der negative Prädiktionswert</i>
NSCLC	<i>Non-small-cell lung carcinoma</i>
PAS-Reaktion	<i>Perjodsäure-Schiff-Reaktion</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PET	<i>Positronenemissionstomografie</i>
PPW	<i>Der positive Prädiktionswert</i>
PR	<i>Progesterone receptor</i>
ROS1	<i>ROS proto-oncogene 1</i>
SCLC	<i>Small-cell lung carcinoma</i>
SqCC	<i>Plattenepithelkarzinom</i>
STARD	<i>Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy</i>
TTF-1	<i>Thyroid transcription factor-1</i>
WHO	<i>Weltgesundheitsorganisation</i>
WT-1	<i>Wilms' tumor protein</i>

### III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flussdiagramm zur Treffsicherheit aller endobronchialen Untersuchungsmaterialien. ....	29
Abbildung 2: Flussdiagramm zur Treffsicherheit nach Untersuchungsart (Bürstenabstrich)..	31
Abbildung 3: Flussdiagramm zur Treffsicherheit nach Untersuchungsart (Bronchiallavagen und Bronchialsekrete).....	31
Abbildung 4: Flussdiagramm zur Treffsicherheit nach Untersuchungsart (EBUS-TbNa). ....	32
Abbildung 5: Übersicht der Fälle mit Tumortypisierung. ....	41

## IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 (Anfang): SOP-gemäßer Ablauf der immunzytochemischen ABC-Methode.....	25
Tabelle 2 (Fortsetzung): SOP-gemäßer Ablauf der immunzytochemischen ABC-Methode...	25
Tabelle 3: Prinzip der Vier-Felder-Tafel (Hilgers et al., 2007).....	26
Tabelle 4: Auswertbare Untersuchungsmaterialien nach Diagnosekategorien. ....	32
Tabelle 5: Prä-Testwahrscheinlichkeit der zytologischen Diagnosegruppen für eine maligne Diagnose.....	33
Tabelle 6: Klinische Daten der Patienten (pro Untersuchungsmaterial). ....	33
Tabelle 7: Treffsicherheit der rein mikroskopischen Zytologie, verschiedene Auswertungsvarianten. ....	35
Tabelle 8: Treffsicherheit der rein mikroskopischen Zytologie nach Untersuchungsart (Bürstenabstrich), verschiedene Auswertungsvarianten.....	35
Tabelle 9: Treffsicherheit der rein mikroskopischen Zytologie nach Untersuchungsart (Bronchiallavagen und -sekrete), verschiedene Auswertungsvarianten.....	36
Tabelle 10: Treffsicherheit der rein mikroskopischen Zytologie nach Untersuchungsart (EBUS-TbNa), verschiedene Auswertungsvarianten.....	36
Tabelle 11: Zusammenfassung der Fälle mit adjuvanten Methoden.....	37
Tabelle 12: Vierfeldertafel zur Treffsicherheit der DNA-Zytometrie an zunächst zytologisch unklaren Präparaten .....	38
Tabelle 13: Auswertungsvarianten zur Sensitivität und Spezifität der Zytologie mit dem Einsatz der adjuvanten Methode. ....	39
Tabelle 14: Die Vierfeldertafel. Auswertungsvariante 1. zur Sensitivität und Spezifität der Zytologie mit dem Einsatz der adjuvanten Methoden.....	39
Tabelle 15: Die Vierfeldertafel. Auswertungsvariante 2. zur Sensitivität und Spezifität der Zytologie mit dem Einsatz der adjuvanten Methoden.....	40
Tabelle 16: Die Vierfeldertafel. Auswertungsvariante 3. zur Sensitivität und Spezifität der Zytologie mit dem Einsatz der adjuvanten Methoden.....	40
Tabelle 17: Zusammenfassung der Fälle mit adjuvanten Methoden. ....	41
Tabelle 18: Konventionelle zytologische Tumortypisierung. ....	42
Tabelle 19: Tumortypisierung nach sämtlichen eingesetzten adjuvanten Verfahren.....	44
Tabelle 20: Zytologische Tumortypisierung vor Immunzytochemie.....	46
Tabelle 21: Zytologische Tumortypisierung nach Immunzytochemie.....	46

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Lungenkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Weltweit ist Lungenkrebs nach wie vor die häufigste Todesursache infolge eines Tumors. Bei Männern ist dieses der Fall in den meisten Ländern Osteuropas, Westasiens (insbesondere in der ehemaligen Sowjetunion), Nordafrikas und in bestimmten Ländern in Ostasien und Südostasien (z. B. Myanmar, Philippinen und Indonesien). Auch bei Frauen stellt Lungenkrebs in 28 Ländern die Krebsart dar, die die meisten Todesfälle verursacht. Die höchsten Inzidenzraten mit bis zu 30,7 pro 100.000 sind in Nordamerika, Nord- und Westeuropa (insbesondere in Dänemark und den Niederlanden) sowie in Australien/Neuseeland zu verzeichnen. Es ist anzumerken, dass die Inzidenzraten bei chinesischen Frauen (22,8 pro 100.000) nicht anders aussehen als bei Frauen in mehreren westeuropäischen Ländern (z. B. in Frankreich 22,5 pro 100.000), trotz erheblicher Unterschiede in der Raucherprävalenz zwischen den beiden Bevölkerungsgruppen. Es wird angenommen, dass die hohen Inzidenzraten für Lungenkrebs bei chinesischen Frauen trotz ihrer geringen Raucherprävalenz auf eine erhöhte Rauchexposition durch Verbrennen von Holzkohle zum Erhitzen und Kochen zurückzuführen sind (Bray et al., 2018).

Die Anzahl der Neuerkrankungen an Krebs hat sich in Deutschland seit Anfang der 1970er Jahre fast verdoppelt. Gemäß dem Robert-Koch Institut (RKI) sind in Deutschland rund 492.000 Menschen im Jahr 2016 an Krebs neuerkrankt, hiervon entfielen schätzungsweise 57.500 auf Lungenkrebs (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V., 2019).

Immer mehr Frauen erkranken auch in Deutschland an Lungenkrebs. Die Zunahme der Neuerkrankungs- und Sterberaten bei Frauen, die sich europaweit im Mittelfeld positionieren, wird mit dem bis zum Beginn des 21. Jahrhunderts stetig ansteigenden Tabakkonsum in Verbindung gebracht. Bei den Männern liegen die Werte in Deutschland im Vergleich zu den übrigen EU-Staaten im unteren Drittel. Laut Angaben des Robert Koch-Institutes verbesserten sich in Deutschland die relativen 5-Jahres-Überlebensraten von 10% in den 1980er Jahren auf 21% bei Frauen bzw. 15% bei Männern im Zeitraum von 2015 bis 2016. Die relative 10-Jahres-Überlebensrate von 2015-2016 wird mit 11% (Männer) bzw. 16% (Frauen) angegeben (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V.,

2019). Damit liegen die Überlebensraten bei Lungenkrebs deutlich unter dem Durchschnitt aller malignen Tumor und gemeinsam mit den Oberbauchkarzinomen (Gallenwege, Leber, Pankreas) und dem malignen Mesotheliom ganz am Ende der prognostischen Skala.

### **1.1.2 Ätiologie**

Der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge sind etwa ein Drittel aller Krebserkrankungen durch Tabak- und Alkoholkonsum, ungesunde Ernährung oder Bewegungsmangel bedingt (Osmani et al., 2018). So ist bei rund 80% aller Lungenkrebsfälle Rauchen die Ursache für die Tumorentstehung. Erstmals bestätigt wurde der Zusammenhang von Rauchen und Lungenkrebs in den 1950er Jahren in einer Studie der beiden US-Amerikaner E.L. Wynder und E.A. Graham (Wynder E.L und Graham E. A., 1950). In Großbritannien wurde die erste Studie zur Untersuchung der Korrelation von Rauchen und Lungenkrebs von R. Doll und A.B. Hill durchgeführt, die den Zusammenhang ebenfalls darlegten (Doll und Hill, 1950). Ätiologisch wird das Rauchen als größter Risikofaktor für das Entstehen von Lungenkrebs angesehen, doch gilt es auch andere Risikofaktoren zu berücksichtigen. Radon, ein natürlich vorkommendes radioaktives Edelgas, ist nach dem Rauchen die zweitwichtigste Ursache für Lungenkrebs (Darby et al., 2005). Radon-222 und seine Zerfallsprodukte wurden 1988 von der Internationalen Agentur für Krebsforschung als bekannte Krebsursache beim Menschen eingestuft (Gaskin et al., 2018). Eine Radonexposition kann zu genomischen Veränderungen und molekularen Alterationen führen, die zur Entstehung eines Tumors beitragen (Choi et al., 2018). Das Ausmaß des mit der Radonexposition verbundenen Lungenkrebsrisikos ist für Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern signifikant erhöht (Lantz et al., 2013).

Auch das berufliche Umfeld ist für die Entstehung von Krebserkrankungen von Bedeutung (Butz, 2012). Nowak und Huber haben im Jahr 2015 einen Anteil beruflicher Einflüsse am Lungenkrebsgeschehen von 10–20% ermittelt. Etwa 75% aller beruflich bedingten malignen Tumoren in Deutschland sind durch Asbest verursacht (Nowak und Huber, 2015). Die Latenzzeit zwischen Exposition und Diagnose der durch Asbest hervorgerufenen Tumorerkrankungen beträgt durchschnittlich 35–40 Jahre (Biesterfeld et al., 2014; Neumann et al., 2009). Die berufliche Exposition gegenüber anderen exogenen Noxen wie polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, Chromaten, kristallinem Siliziumdioxid, Arsen, Nickel und Dichlordimethylether gilt ebenfalls als ein wichtiger Faktor für die Entstehung von Lungenkarzinomen (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF

(Leitlinienprogramm Onkologie), 2018). Auch die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Infektionen mit humanem Papillomavirus (HPV), HIV sowie dem Epstein-Barr-Virus werden mit einem höheren Risiko für Lungenkrebs in Verbindung gebracht, dieser Zusammenhang ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt (Akhtar und Bansal, 2017).

### **1.1.3 Einige molekularbiologische Alterationen**

In den letzten Jahren wurden in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) zunehmend neue molekulare Veränderungen identifiziert, darunter Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (Reckamp, 2016). Molekulare Onkogene stellen wichtige prädiktive Biomarker und hervorragende therapeutische Ziele dar (Oberndorfer und Müllauer, 2018). Mutationen in Onkogenen sind oft für das Tumorwachstum entscheidend (sogenannte Treibermutationen). Molekular zielgerichtete Therapien gegen Aberrationen von Treibergenen haben die Behandlungsstrategien für bösartige Tumoren dramatisch verändert. Aberrationen von Treibergenen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Krebs und induzieren die konstitutive Aktivierung der intrazellulären Signalübertragung. Daher wird angestrebt, eine gezielte Therapie mit einer signifikant höheren positiven Ansprechrate im Vergleich zu herkömmlichen zytotoxischen Chemotherapien anzubieten (Saito et al., 2018).

#### **Beispiele für molekulare Ansatzpunkte zugelassener zielgerichteter Krebstherapeutika:**

##### Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (Epidermal-Growth-Factor-Receptor, EGFR) wurde ursprünglich als Onkogen eines akut transformierenden Retrovirus, das bei infizierten Vögeln Erythroblastose und Sarkome verursacht, identifiziert (Arteaga, 2001). Die Aktivierung des EGFR führt zu einer Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinaseaktivität, die eine Kaskade von Ereignissen auslöst, die zur Zellwachstumsstimulation führen und den apoptotischen Zelltod verhindern (Ranson et al., 2002). Erlotinib und Gefitinib verlängern das progressionsfreie Überleben in Vergleich mit der Standardtherapie bei den Patienten mit bestimmten aktivierenden EGFR-Mutationen (Lindeman et al., 2018).

## BRAF-Gen

Das BRAF-Gen („proto-oncogene B-Raf“ oder „v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1“) kodiert für das Protein Serin/Threonin-Protein Kinase B-Raf. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung einer zellulären Signalkaskade, die die Zellteilung und Differenzierung beeinflusst (Baik et al., 2017). Mutationen des BRAF-Gens führen zur konstitutiven Aktivierung dieser Signalkaskade (MAP-Kinase-Signalweg) und sind bei etwa 1 - 3% der Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge vorhanden und treten häufiger bei gegenwärtigen oder ehemaligen Rauchern auf (Baik et al., 2017; Oberndorfer und Müllauer, 2018). BRAF-Inhibitoren sind z.B. Dabrafenib und Trametinib (Planchard et al., 2016).

## ALK

Das Gen ALK (anaplastic large cell lymphoma receptor tyrosine kinase) kodiert eine Transmembranrezeptor-Tyrosinkinase aus der Insulin-Rezeptorfamilie, die im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert wird (Holla et al., 2017).

Die häufigsten Mutationen des ALK Gens sind Fusionen mit einem anderen Partnergen, die zu einer konstitutiven Aktivierung der ALK-Kinase führen und somit zu einer wachstumsfaktor-unabhängigen Proliferation und Wachstum von Tumorzellen (Webb et al., 2009). Crizotinib ist ein oraler kompetitiver ATP-Inhibitor von ALK-Tyrosinkinasen mit Aktivität gegen ALK-Fusions-positives NSCLC (Herbst et al., 2018). Die Translokation von ALK wurde bei etwa 3 - 7% der Lungentumoren festgestellt (Reckamp, 2016).

## ROS1

Auch ROS1 (ROS proto-oncogene 1) gehört zur Familie der Insulinrezeptoren. Es ist ein integrales Membranprotein mit Tyrosinkinaseaktivität. Durch Translokationen und Deletionen entstehen, ähnlich wie bei ALK-Mutationen, onkogene Fusionsproteine (Oberndorfer und Müllauer, 2018). ROS1-Fusionsgene sind in 1% der Adenokarzinome der Lunge vorhanden und treten häufiger bei jüngeren Patienten und Patienten, die noch nie geraucht haben, auf. Aufgrund der hohen Homologie zwischen den Kinasedomänen von ROS1 und ALK zeigten Arzneimittel zur Behandlung von ALK-positiven Tumoren, einschließlich Crizotinib, Ceritinib und Lorlatinib, auch bei ROS1-positiven Tumoren eine ausgeprägte Aktivität (Herbst et al., 2018).

#### 1.1.4 Histogenetische Einteilung der Lungentumoren gemäß der WHO

Im Jahr 2011 wurde die neue IASLC (The International Association for the Study of Lung Cancer)/ATS (American Thoracic Society)/ERS (European Respiratory Society)-Klassifikation für pulmonale Adenokarzinome (ADC) zunächst als Vorschlag publiziert (Bohle und Schnabel, 2016). Die vorangegangenen WHO-Klassifikationen von 1967, 1981, 1999 und 2004 basierten hauptsächlich auf Untersuchungen an Resektaten (Travis et al., 2015). Da jedoch viele Lungenkarzinome aufgrund des bei Erstdiagnose bereits fortgeschrittenen Stadiums nicht mehr operativ behandelt werden, erfolgt eine histogenetische Diagnose in diesen Fällen ausschließlich an kleinen Biopsien oder zytologischen Proben. Bei der gegenwärtig (2021) aktuellen WHO-Klassifikation von 2015 handelte es sich um die erste Klassifikation, die standardisierte Kriterien und Terminologie für die Diagnose von Lungenkrebs an kleinen Biopsien (Bronchoskopie, Nadel- oder Kernbiopsien) und zytologischen Präparaten miteinschließt (Travis et al., 2013). Die neuen Behandlungsstrategien und ein besseres Verständnis der Lungenkrebsbiologie führten zu wesentlichen Änderungen gegenüber der vorherigen histogenetischen Klassifizierung.

Die aktuelle (2021) histogenetische Klassifikation nach WHO/IARC unterteilt Lungentumoren in (Travis et al., 2015; Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG, 2015):

- **Plattenepithelkarzinom (SqCC)**
  - präinvasiv (Plattenepithelkarzinom in situ)
  - verhornend
  - nicht verhornend
  - basaloid
- **Adenokarzinom (ADC)**
  - präinvasiv (atypische adenomatöse Hyperplasie, Adenokarzinom in situ)
  - minimal invasiv
  - invasiv
    - G1: lepidisch
    - G2: azinär, papillär
    - G3: mikropapillär, solide

-weitere histologische Subtypen

- **großzelliges Karzinom**
- **neuroendokrine Tumore**
  - Karzinoid
    - typisches Karzinoid
    - atypisches Karzinoid
  - kleinzelliges Karzinom (SCLC)
  - großzelliges neuroendokrines Karzinom (LCNEC)
- weitere Karzinom-Entitäten (adenosquamöses Karzinom, sarkomatoides Karzinom, andere und unklassifizierbare Karzinome)
- Speicheldrüsentumoren
- Papillome
- Adenome
- Metastasen anderer Primärtumore
- weitere seltene Entitäten (mesenchymale Tumoren, lymphohistiozytäre Tumoren, Tumoren ektooper Herkunft)

Nach Angaben des Robert Koch-Institutes machen Adenokarzinome ca. 42% aller Bronchialkarzinome aus, Plattenepithelkarzinome ca. 25% und kleinzellige Karzinome ca. 20% (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V., 2019).

In der aktuellen WHO-Klassifikation wurden der sogenannte Mischtyp, der früher ca. 80% aller ADC ausmachte, und die Bezeichnung des bronchioloalveolären ADC aufgegeben (Petersen, 2013; Bohle und Schnabel, 2016). Die neue Klassifikation differenziert zwischen folgenden drei Subtypen von ADC: präinvasiv, minimalinvasiv und invasiv. Zu den präinvasiven Läsionen zählen die atypische adenomatöse Hyperplasie (AAH) und das Adenocarcinoma in situ (AIS). Eine begleitende atypische adenomatöse Hyperplasie wird in Lungenresektaten mit pulmonalem Adenokarzinom, aber auch in primär nicht-neoplastischen Lungenresektaten und etwa 7% der Plattenepithelkarzinome gefunden (Kerr, 2001; Bubendorf, 2011).

Die Plattenepithelkarzinome werden in verhornende, nicht-verhornende und basaloide Typen unterteilt. Als basaloid wird ein Plattenepithelkarzinom eingestuft, wenn die basaloide Komponente, unabhängig von der Verhornung, mehr als 50% beträgt (Kadara et al., 2016). Im mehrstufigen Prozess der Karzinogenese zählen zu den präinvasiven Läsionen der

Plattenepithelkarzinome die Plattenepitheldysplasie und darauffolgend das Carcinoma in situ (CIS) (Osmani et al., 2018).

Die WHO-Klassifikation von 2015 unterteilt neuroendokrine Tumoren in vier Hauptkategorien: typisches Karzinoid, atypisches Karzinoid, kleinzelliges Karzinom (oder SCLC) und großzelliges neuroendokrines Karzinom (LCNEC) (Travis et al., 2015). Ausgehend von der Proliferationsrate der Tumorzellen sowie An- oder Abwesenheit der Nekrose werden neuroendokrine Tumoren entsprechend der prognostischen Signifikanz differenziert: typisches Karzinoid mit nur geringgradiger Atypie und wenigen Mitosen; atypisches Karzinoid mit erhöhter Mitoserate und /oder Nekrose und neuroendokrine Karzinome mit zum Teil hochgradiger Atypie, entsprechend SCLC und LCNEC (Zheng, 2016).

### **1.1.5 Diagnostik und Therapie**

Das Lungenkarzinom ist eine meist durch exogene Noxen verursachte Erkrankung. Daher ist neben der Nikotinanamnese auch eine detaillierte Berufsanamnese, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Asbestbelastung, unabdingbar. Um die Diagnose zu sichern und eine Stadieneinteilung vornehmen zu können, umfasst die Basisdiagnostik des Lungenkarzinoms neben der Anamnese und klinischen Untersuchung auch die konventionellen bildgebenden Verfahren Röntgen und Computertomografie (CT). Neben diesen konventionellen Verfahren wird beim Bronchialkarzinom immer häufiger die Positronenemissionstomografie (PET) bzw. heutzutage die integrierte PET/CT eingesetzt. Diese Verfahren dienen der Bestimmung der lokalen Tumorausbreitung und ggf. der Suche nach lokoregionären Metastasen und Fernmetastasen und dienen damit der Einteilung in ein klinisches Tumorstadium. Zur Sicherung der Diagnose sowie ggf. der Sicherung einer Metastase ist aber eine histologische oder zytologische mikroskopische Untersuchung einer Gewebeprobe oder Zellprobe aus dem Primärtumor oder Metastase(n) unumgänglich. Diese erfolgen heute CT-gesteuert oder auch mittels endoskopischer Verfahren wie z.B. der endobronchialen ultraschallgesteuerten transbronchialen Nadelaspiration (EBUS-TBNA) (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie), 2018). So können Lymphknotenmetastasen auf der Grundlage der Ergebnisse einer zytologischen oder pathologischen Untersuchung diagnostiziert werden (Kuo et al., 2011). Eine detaillierte Beschreibung der

Verfahren zur Gewinnung zytologischer Proben, deren diagnostische Treffsicherheiten in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden sollen, findet sich im nachfolgenden Kapitel.

Die Therapie des Lungenkarzinoms ist komplex und richtet sich nach der Ausbreitung und dem histologischen Typ des Tumors (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2018). Eine detaillierte Beschreibung geht aber weit über die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit hinaus und erfolgt hier nicht. Bei 70% der Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) wird die Erkrankung in fortgeschrittenen, inoperablen Stadien mittels zytologischer Proben und kleiner Biopsien diagnostiziert (Savic et al., 2012; Kraywinkel und Schönfeld, 2018). Diese fortgeschrittenen Lungenkarzinome werden in der Regel nicht mehr operiert, sondern multimodal behandelt. Es existieren zahlreiche Algorithmen für eine Chemotherapie, Strahlentherapie oder auch eine individualisierte Tumortherapie (vgl. auch Kapitel 1.1.3). Fortgeschrittene nicht-kleinzellige Lungenkarzinome werden in der Regel auf molekulare Veränderungen und Treibermutationen hin untersucht. Das nationale Netzwerk genomische Medizin Lungenkrebs (nNGM) bietet hierbei die Plattform für eine standardisierte molekularpathologische Charakterisierung und ggf. bei Vorliegen behandelbarer Veränderungen die Möglichkeit des Einschlusses der Patienten in Therapiestudien (Büttner et al., 2019).

Das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC) ist eine schwer zu therapierende und aggressive Krebserkrankung (Taniguchi et al., 2020). Nur in sehr begrenzten Stadien in Einzelfällen, bei fehlendem mediastinalem Befall, kommt eine Resektion infrage. Im Stadium der „Limited Disease“, das sich auf den initialen Hemithorax mit oder ohne seine regionalen Lymphknotenmetastasen begrenzt, kann eine simultane Radiochemotherapie eingesetzt werden (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie), 2018; Serke, 2019).

## **1.2 Zytologie des Lungenkarzinoms**

Früher wurde die diagnostische Differenzierung zwischen SCLC und NSCLC für therapeutische Zwecke als ausreichend angesehen, da in allen NSCLC-Fällen ähnliche Therapieschemata verwendet wurden. Heute ist zumindest die weitere histologische oder zytologische Differenzierung der NSCLC in Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom oder großzellig-neuroendokrines Karzinom notwendig, sofern möglich. Wo dies nicht möglich ist,

verbleibt die Diagnose eines nicht weiter spezifizierbaren NSCLC (Gasparini, 2010). Etwa 20-30% (nach mündlicher Kommunikation mit den klinischen Partnern des Funktionsbereichs Cytopathologie am UKD), nach anderen Angaben 40% der fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome werden allein durch zytologische Untersuchungen diagnostiziert (Bubendorf et al., 2017). Im Gegensatz zu einer häufig invasiveren oder risikoreicheren Biopsie wird die Gewinnung zytologischer Proben von den Patienten in der Regel besser toleriert (Mariano et al., 2017).

### **Endobronchiale zytologische Diagnostik**

Zytologische Untersuchungen finden im Rahmen der Primärdiagnostik, des Stagings und bei Verlaufsuntersuchungen einschließlich Überwachung des Mutationsstatus unter molekular gerichteter Therapie Anwendung. Zur Primärdiagnostik werden in der Regel bronchoskopisch gewonnene Proben zytologisch untersucht (Engels, 2020). Eine transthorakale, CT-gesteuerte Feinnadelpunktion zur Zytologie ist möglich, findet heute aber vergleichsweise selten Anwendung. Derart entnommene zytologische Untersuchungsmaterialien sind im Untersuchungszeitraum der vorliegenden Arbeit nicht im Funktionsbereich Cytopathologie eingegangen.

Je nach Typ des Bronchoskops lassen sich 2 Formen der Bronchoskopie unterscheiden:

- flexible Bronchoskopie: Oral (durch den Tubus bzw. die Trachealkanüle) oder nasopharyngeal (unter Lokalanästhesie) wird ein flexibles Endoskop eingeführt. Während der Bronchoskopie ist die Entnahme von Gewebeproben mit Spülkathetern, Bürsten, Zangen und Nadeln möglich (Kroegel und Costabel, 2014).
- starre Bronchoskopie: Hierbei wird unter Vollnarkose ein hartes Tubusrohr in die Trachea und die Hauptbronchien eingeführt. Die Bronchoskopie mittels eines starren Endoskopes wurde mittlerweile wegen des für die Patienten wesentlich geringeren Trauma- und Komplikationsrisikos weitestgehend von der flexiblen Bronchoskopie abgelöst, ist aber in bestimmten Situationen noch notwendig (Arastéh und Baenkler, 2013).

## **- Transbronchiale Nadelaspiration**

Zu den im Rahmen einer Bronchoskopie gewinnbaren Probesorten gehören, neben Spülungen und Bürstenabstrichen, **transbronchiale Nadelaspirationen** (TBNA) eventuell unter zusätzlicher Anwendung des **endobronchialen Ultraschalls** (EBUS) (Engels, 2020).

Seit über 30 Jahren findet die konventionelle transbronchiale Nadelaspiration (TBNA) Anwendung, um Gewebeproben aus Tumoren und verdächtigen Lymphknoten zu entnehmen (Jiang et al., 2014). Bei der transbronchialen Nadelaspiration wird mit einer Biopsienadel punktiert und aspiriert. Danach wird das entnommene Material auf einen Objektträger ausgestrichen und in der Regel alkoholisch fixiert (Feichter und Dalquen, 2000). Alternativ können für zusätzliche Untersuchungen, sofern sie nicht an den Objektträgern etabliert sind, Zellblöcke angefertigt werden. Diese und das bioptisch gewonnene Gewebe sollten in 10%ig gepuffertem Formalin fixiert werden (Herth et al., 2013).

Die Treffsicherheit der TBNA kann durch die gleichzeitige Anwendung des endoluminalen / endobronchialen Ultraschalls gesteigert werden (Herth et al., 2002). Derzeit ist die endobronchiale ultraschallgesteuerte transbronchiale Nadelaspiration (EBUS-TbNa) das am häufigsten durchgeführte minimalinvasive Verfahren zur Untersuchung mediastinaler als auch hilärer Lymphknoten (Lilo et al., 2017), das wegen seiner exakten Steuerbarkeit auch die Punktion kleinerer Lymphknoten unter 1 cm ermöglicht (Herth et al., 2004).

Die klinische Anwendbarkeit und der diagnostische Zugewinn von EBUS-TbNa wurden in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen. Chandra et al. bestimmten eine gepoolte Sensitivität von 92% bei einer 100%igen Spezifität für die mediastinale und hiläre Lymphadenopathie maligner und benigner Erkrankungen (Chandra et al., 2012). Ernst et al. haben eine höhere diagnostische Ausbeute für EBUS-TbNa im Vergleich zu Mediastinoskopie ermittelt (91% versus 78%;  $p=0,007$ ) (Ernst et al., 2008). Rooper et al. berichteten, dass 96% der EBUS-TBNA Proben für eine immunzytochemische Untersuchung technisch brauchbar waren und NSCLC in 77% - 79,5% der Fälle weiter histogenetisch typisiert werden konnten (Rooper et al., 2016).

## **- Bronchus-Bürstenabstriche:**

Diese von Hattori et al. beschriebene Methode ist eine Weiterentwicklung der früher üblichen Kathetersaugbiopsie (Hattori et al., 1964; Hengstmann und Wittekind, 1950). Das Biopsiegerät besteht aus einer durch eine Scheide geschützten feinen Nylonbürste, die unter Lokalanästhesie

in das zu untersuchende Gebiet eingeführt wird. Nach der Abstrichentnahme wird die Bürste wieder in die Scheide zurückgezogen und anschließend aus dem Endoskop entfernt (Smith et al., 1980). Es gibt verschiedene Methoden, die mittels Bronchialbürsten entnommenen Zellen für eine spätere zytologische Untersuchung zu fixieren: (1) luftgetrocknete Ausstriche zur May-Grünwald-Färbung, (2) in 95%igem Alkohol oder mittels Alkoholspray fixierte Ausstriche. Bei diesen direkten Ausstrichtechniken kann es zu einem Verlust von diagnostisch relevanten Zellen kommen. Eine Alternative ist die (3) Saccomanno-Bürstenwäsche, bei der mit einem Fläschchen mit schmalen Mund die Zellen direkt von der Bürste in ein Fixiermittel abgekratzt werden. Die Bürste wird dann in einem Saccomanno-Bürstenwaschfläschchen geschüttelt, das daraufhin zentrifugiert wird, wodurch das Untersuchungsmaterial über einen vorbestimmten Bereich eines Objektträgers verteilt wird. Diese Technik hat bessere Ergebnisse gezeigt als die direkten Ausstrichtechniken (Thunnissen et al., 2012). Auf der Grundlage von Meta-Analysen konnten Schreiber und McCrory 2003 aufzeigen, dass die Sensitivität der bronchialen Bürstenbiopsie international im Median bei 59% für zentrale Tumoren und 52% für periphere Tumoren liegt (Schreiber und McCrory, 2003).

#### **- Bronchiallavagen und Bronchialsekrete**

Bronchialsekret kann mittels eines durch den Instrumentierkanal eines Bronchoskopes geführten Katheters von der Bronchialwand abgesaugt werden. Eine ähnliche Methode zur Gewinnung exfolierter Bronchialepithelien und gegebenenfalls Tumorzellen ist die Bronchiallavage, bei der das abhängige Bronchialsystem nach Sondieren eines größeren Bronchus mit physiologischer, auf 37°C erwärmter physiologischer Kochsalzlösung gespült wird. Die zellhaltige Spülflüssigkeit wird wieder abgesaugt und kann zytologisch untersucht werden. Hierzu werden nach Zentrifugation hergestellte Sedimentausstriche - ähnlich wie bereits bei der Bürstenbiopsie beschrieben - fixiert und gefärbt. Die Sensitivität der Lavage bei zentralen und peripheren Karzinomen beträgt in einer großen Metaanalyse 48% bzw. 43% (Schreiber und McCrory, 2003).

#### **-Bronchioalveoläre Lavage**

Primär 1922 bei der Behandlung von Phosgen-Vergiftungen eingesetzt, wurde für die BAL 1961 im Tierversuch die hohe Reinheit der auf diesem Wege gewinnbaren Proben (hier: Alveolarmakrophagen) beschrieben (Gee, 1980; Myrvik et al., 1961). Seitdem hat sich diese

Methode zunehmend in der Humanmedizin, insbesondere – durch die Entwicklung flexibler Bronchoskope – in der Pneumologie, etabliert (Kleeh H., 1989; Reynolds, 1987).

Eine BAL wird insbesondere bei speziellen Fragestellungen zu Lungenerkrankungen, welche die Alveolen betreffen, eingesetzt. Für die Diagnostik des Lungenkarzinoms ist sie weniger relevant. Neben der zytologisch-mikroskopischen Beurteilung ist hier die Quantifizierung der enthaltenen Zelltypen relevant, welche mittels Laboranalysegeräten automatisiert möglich ist. Da für diagnostische Zwecke meist mehrere der oben genannten Untersuchungsmaterialien sowie auch Gewebebiopsien entnommen werden, ist die Reihenfolge der Entnahme relevant.

Die optimale Reihenfolge für die Durchführung von Lavage, Bronchialbürstung und transbronchialer Nadelaspiration ist sehr umstritten. Lee et al. empfehlen, die Bronchiallavagen vor dem Bürsten und der Biopsie durchzuführen, um zu verhindern, dass Blut die Probe kontaminiert und die Durchführung der zytologischen Diagnostik erschwert. Die Autoren sagen, dass eine Ausnahme von dieser Empfehlung Läsionen mit submukosaler Beteiligung sein können, bei denen Änderungen der Integrität der Schleimhaut tatsächlich die Ausbeute der anschließend durchgeführten Bronchiallavagen erhöhen können (Lee et al., 2007). In der Studie von Lim et al. betrug die diagnostische Gesamtausbeute bei Patienten mit peripherem Lungenkrebs 52,4%, wenn die bronchiale Spülung nach dem Bürstenabstrich gemacht wurde, und die Spülung hatte eine signifikant höhere diagnostische Ausbeute als der Bürstenabstrich (Lim et al., 2020).

Angesichts der Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten in den letzten Jahren und dem daraus resultierenden gestiegenen Gewebe- bzw. Zellbedarf kann bereits die Wahl der Methode zur Probengewinnung entscheidend sein, z. B. in Abhängigkeit der Tumorage (Herth et al., 2013).

### **Nomenklatur für zytologische Befunde:**

Die zytologische Bewertung erfolgte standardisiert nach der von den Deutschen Gesellschaften für Pathologie (DDP) und Zytologie (DGZ) herausgegebenen Nomenklatur für die extragenitale Zytologie nach Böcking und Freudenberg. Die zytologischen Diagnosen werden gemäß ihrer Malignitätswahrscheinlichkeit in fünf Kategorien eingeteilt (Böcking, 1998a; Böcking, 1998b):

- unzureichendes Zellmaterial

- keine bösartigen Zellen nachweisbar (= negativ)
- bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen (= zweifelhaft)
- bösartige Zellen wahrscheinlich (= dringender Verdacht)
- bösartige Zellen nachweisbar (= positiv)

Hierbei beträgt die Malignitätswahrscheinlichkeit in der Kategorie „negativ“ bei 0%, in der Kategorie „zweifelhaft“ liegt sie bei ca. 30%, bei „dringendem Verdacht“ bei ca. 70% und in der Kategorie „positiv“ ist sie sicher (100%) (Böcking et al., 2000).

Unter die Definition „unzureichendes Material“ fallen alle Untersuchungsmaterialien, die zu wenige oder zu schlecht erhaltene diagnostisch relevante Zellen enthalten (Böcking, 1998b).

Manchmal ist eine eindeutige zytologische Diagnose nicht möglich (Schramm et al., 2011; Böcking, 1998b), sei es aufgrund einer zu geringen Zahl auffälliger Zellen oder aufgrund von Abgrenzungsschwierigkeiten dysplastischer oder neoplastischer Zellen von reaktiv veränderten Zellen; auch Fixationsartefakte spielen bei der Beurteilbarkeit von Zellbildern eine wichtige Rolle. Solche Präparate, in denen Auffälligkeiten vorliegen, aber Tumorzellen nicht eindeutig zu identifizieren sind, gelten als „zweifelhaft“ oder „dringend verdächtig auf das Vorliegen von Tumorzellen“. Insbesondere Präparate mit dysplastischen Zellen, die als Präkanzerosen für maligne Tumoren gelten, werden in diese Kategorien eingeordnet. Da mit steigendem Schweregrad der Dysplasie das Risiko der Karzinomentstehung steigt, werden leichte und mittlere Dysplasie mit der Diagnose „zweifelhaft“ und schwere Dysplasien mit der Diagnose des „dringenden Verdachts“ belegt (Böcking, 1998b).

### **1.3 Adjuvante Methoden in der Zytologie**

Ein beträchtlicher Teil dieser „unklaren Befunde“ kann durch Hinzunahme adjuvanter Verfahren wie der diagnostischen DNA-Bildzytometrie und der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) letztlich gelöst und im Nachtragsbericht eine sicher tumor-positive oder -negative Diagnose gestellt werden. In einer entsprechenden Studie des Funktionsbereichs Cytopathologie wurde so für die DNA-Bildzytometrie eine Sensitivität von 79% (Spezifität 98%) und für die FISH eine Sensitivität von 78% (Spezifität ebenfalls 98%) erreicht (Schramm et al., 2011). Die Immunzytochemie wird in diesem Zusammenhang nur gelegentlich zur weiteren

Abklärung zytologisch unklarer Befunde; ihre Domäne liegt vielmehr in der histogenetischen Tumorklassifikation.

### **1.3.1 Immunzytochemie**

Anfang der 1940er Jahre entwickelte Albert Coons ein Verfahren zur Visualisierung von Antigen-Antikörperkomplexen, um Pneumokokken-Antigene in Gewebeschnitten von mit Pneumokokken infizierten Mäusen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar zu machen (Coons, 1942). Bei diesem Verfahren werden Antigene und Rezeptoren des Zytoplasmas oder des Kerns immunzytochemisch nachgewiesen. Die Immunzytochemie erlaubt die Bestimmung der Zellherkunft sowie eine über morphologische Kriterien hinausgehende Subtypisierung (Pokieser et al., 2001). Bei der indirekten Immunzytochemie, welche in der zytologischen Routinediagnostik zum Einsatz kommt, bindet ein nicht markierter Antikörper an Zellen und wird daraufhin durch einen markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Durch unterschiedliche Markierungen an Primärantikörpern besteht die Möglichkeit von Mehrfachfärbungen (Mix und Zettl, 2015).

Eine immunhistochemische Diagnostik kann auch an zytologischen (Ausstrich-)Präparaten durchgeführt werden, insbesondere bei der Verwendung von am Kern bindenden Primärantikörpern. Schwierigkeiten können bei zytoplasmatisch bindenden oder membranären Antikörpern auftreten, insbesondere bei sogenannten Tumornacktkernen. Unmöglich sein kann eine Anwendung, wenn es um die Beziehung von immunhistochemischen Expressionen von Tumorzellen und benachbarten Entzündungszellen geht, wie es bei manchen PD-L1-Auswertungen verlangt wird; solche Anwendungen müssen an histologischen Schnittpräparaten etabliert werden (Wagner und Buettner, 2020).

Seit der Einführung der WHO-Klassifikation 2015 in die klinische Praxis spielt die histogenetische Tumortypisierung eine entscheidende Rolle bei der Diagnose von Lungenkrebs (Yatabe et al., 2019). Neben der traditionellen Unterscheidung von kleinzellig-neuroendokrinen und nicht-kleinzelligen Tumoren gilt dies insbesondere für die präzise Klassifikation, die zwischen unterschiedlichen Adenokarzinomtypen, adenosquamösen Karzinomen, verschiedenen seltenen Subtypen von großzelligen Karzinomen (Wagner und Buettner, 2020), primären und metastasierten Karzinomen sowie kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC) und Karzinoidtumoren unterscheidet. Die früher ausreichende klinische Unterscheidung zwischen

NSCLC und SCLC ist heutzutage nicht mehr tragbar. Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Prognose- und Behandlungsauswirkungen bei verschiedenen Lungentumoren ist eine genaue Subtypisierung mit molekularer Charakterisierung von entscheidender Bedeutung. Dies gilt insbesondere für die häufigsten NSCLC-Typen, nämlich das Adenokarzinom und das Plattenepithelkarzinom, da die Behandlungsoptionen und die Rolle von molekularen und zytogenetischen Nebenstudien für beide Tumoren sehr unterschiedlich sind (Woo et al., 2017). So wird auch die früher übliche meist ausschließlich morphologische Diagnose in der zytologischen Beurteilung von Lungenkarzinomen heute aufgrund zunehmender therapeutischer Bedeutung einer exakten Tumorzelltypisierung zusätzlich durch die Immunzytochemie ergänzt. In der diagnostischen Routine werden an zytologischen Ausstrichpräparaten oder Zellblockpräparaten eine Kombination verschiedener Primärantikörper gegen typische Antigene, Strukturen von verschiedenen histogenetischen Typen des Lungenkarzinoms oder bei entsprechendem Verdacht von Lungenmetastasen, eingesetzt. Je nach Ausprägung der Immunreaktion lassen sich so die verschiedenen in Frage kommenden Entitäten unterscheiden. Da zytologisches Untersuchungsmaterial in der Regel spärlich ist, muss bereits hier überlegt werden, welche Primärantikörper diagnostisch zwingend notwendig sind und welche weiteren Untersuchungen an den zytologischen Präparaten eventuell sonst noch erforderlich werden, wie z.B. die weitere molekulare Charakterisierung des Tumors vor einer Therapie (Travis et al. 2015; Dietel et al., 2016).

### **1.3.2 FISH**

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine sensitive molekularbiologische Technik, die unter Verwendung speziell markierter Nukleinsäure-Sonden genetische Aberrationen wie Translokationen (Genfusionen, Rearrangements), Amplifikationen und Deletionen nachweisen kann (Schmitz und Schildhaus, 2015). Abhängig von den untersuchten Krankheiten oder malignen Erkrankungen werden unterschiedliche Sonden verwendet (Song et al., 2011). In der Lungenzytologie werden zum einen einige in der molekularen Charakterisierung von Lungenkarzinomen etablierte Translokationen und Genamplifikationen untersucht. Zusätzlich hat die FISH einen gewissen Stellenwert in der weiteren Abklärung eines zytologisch unklaren, also „zweifelhaften“ oder „dringend malignitätsverdächtigen“ Befundes, um letztlich noch zu einer Karzinomdiagnose zu kommen bzw. diese eher abzulehnen (Savic et al., 2006).

Zum Nachweis von Translokationen (z.B. ALK-, ROS1-Translokationen (Savic und Bubendorf, 2016) werden sogenannte Break-Apart-Sonden eingesetzt. Mit einer sog. Break-Apart-Sonde werden die Gene auf Bruchpunkte oder Insertionsereignisse untersucht. Bei Break-Apart-Sonden wird ein etablierter Bruchpunkt auf einem Chromosom durch zwei unterschiedlich farblich markierte Sonden „eingerahmt“. Im Normalfall überlappen sich daher aufgrund der räumlichen Nähe die beiden unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Signale bei der mikroskopischen Auswertung, die Fluoreszenz erscheint weiß. Im pathologischen Fall finden sich neben einem überlappenden Signal zwei zusätzliche, je farblich unterschiedliche Signale (z.B. rot und grün) als Hinweis auf das Auseinanderbrechen ("break apart") der DNA-Struktur des Gens bzw. DNA-Abschnittes auf einem Chromosom (Rooney und Czepulkowski, 2001). Die Translokation führt bei den beiden oben genannten Genen zu einer Aktivierung der Kinase-Untereinheiten der kodierten Membranrezeptoren, welche in einem vermehrten Tumorwachstum resultiert (Treibermutation). Das Vorliegen von über 15% break-aparts bei 50 ausgezählten Zellen zeigt ein Rearrangement des ALK-Gens an, welches medikamentös mittels Crizotinib behandelt werden kann (Savic und Bubendorf, 2012).

Amplifikations- und Deletionssonden sind zweifarbig - meist orange und grün - markiert, eine Farbe markiert das Ziel-Gen, die andere zumeist die Alpha-Satelliten-Region des Zentromers oder ein anderes Referenz-Gen desselben Chromosoms. Diese zweite Markierung dient der Feststellung der Ploidie der Tumorzelle (Schmitz und Schildhaus, 2015). Ein Beispiel ist die Amplifikation oder Polysomie des MET-Gens. Diese tritt in unbehandelten NSCLC in einer Frequenz von 2-4%, in EGFR-mutierten NSCLC mit Resistenzentwicklung gegen EGFR-Thyrosinkinaseinhibitoren jedoch in 20% auf. MET kodiert für eine Rezeptor-Thyrosinkinase, die bei Überexpression ebenfalls von Crizotinib blockiert wird (Savic und Bubendorf, 2016).

Die meisten in diagnostischen Laboratorien verwendeten Sonden sind kommerziell erhältlich und direkt mit Fluorochromen markiert (Ventura et al., 2006). Zur Abklärung eines zytologisch unklaren, also „zweifelhaften“ oder „dringend malignitätsverdächtigen“ Befundes ist eine Sonden-Kombination aus 4 verschiedenfarbig fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden etabliert. Diese Kombination wurde zunächst als Multitarget-LAVision-FISH-Assay (Firma Abbott) vertrieben, aber inzwischen eingestellt. Die ortsspezifischen Sonden für 5p15, 7p12 (EGFR), 8q24 (C-MYC) und eine Zentromer-Sonde für Chromosom 6 sind jetzt einzeln erhältlich und müssen zu einem Assay zusammengegeben werden. Der Assay dient dem Nachweis einer

chromosomalen Aneuploidie, welche mit einer hohen Treffsicherheit mit einer malignen Transformation einer Zellpopulation assoziiert ist. Der Nachweis von Aneuploidie in einer zytologisch unklaren Zellpopulation kann als Beweis für Malignität eingesetzt werden und führt zu einer Befundklassifikation als „positiv“ im Nachbericht. Die Treffsicherheit der Mehrfarben-FISH in der Abklärung von unklaren Befunden in der Lungenzytologie erreicht eine Sensitivität von 79% bei einer an 100% heranreichenden Spezifität (Schramm et al., 2011; Savic und Bubendorf, 2012).

### **1.3.3 DNA-Zytometrie**

In einer normalen Zelle gibt es zwei Kopien aller 23 Chromosomen. Diese Zellen werden als diploid bezeichnet (2c). Zellen mit nur einer Kopie aller 23 Chromosomen werden haploide Zellen (1c) genannt. Von euploiden Zellen spricht man bei Zellen mit vollständigen Vielfachen des haploiden Satzes (1c), während aneuploide Zellen kein ganzzahliges Vielfaches des Grundsatzes der Chromosomen enthalten (Ganten und Ruckpaul, 2003; Garner, 2014). DNA-Aneuploidie ist das quantitative zytometrische Äquivalent zur chromosomalen Aneuploidie und soll die Karzinogenese vorantreiben (Schramm et al., 2011; Böcking und Motherby, 1999). Aneuploidie bezeichnet unterschiedliche Aberrationen unterschiedlicher Genese in der DNA und zeigt sich in Imbalancen (Unter- oder Überzahl) einzelner Chromosomen oder Chromosomenabschnitte (Petersen, 2011). Lässt sich anhand der Zytomorphologie mikroskopisch keine finale Diagnose erstellen (diagnostische Kategorien „zweifelhaft“ und „dringend tumorverdächtig“), kann die Prüfung der DNA-Ploidie, also des DNA-Gehalts der suspekten Zellpopulation, zurate gezogen werden (Kaur et al., 2016). Für die Analyse der DNA-Ploidie existieren verschiedene Methoden. In der diagnostischen Lungenzytologie gebräuchlich ist die DNA-Bildzytometrie. Die DNA-Bildzytometrie ermöglicht Messungen des DNA-Gehaltes an Zellen oder Kernen, die auf einem Objektträger aufgebracht sind (Schramm et al., 2011). Eine Kombination aus Zytologie und DNA-Zytometrie, welche insbesondere an Präparaten sinnvoll eingesetzt werden kann, die nach mikroskopischer Zytologie noch diagnostisch unklar bleiben, verbessert die diagnostische Effizienz der Zytologie weiter (Schramm et al., 2011). So ließ sich in einer Studie an Bronchiallavagen, Bürstenabstrichen und transbronchialen Feinnadelpunktaten bei Lungentumorverdacht die Spezifität der Lungenzytologie von 69,8% auf 98,2% verbessern bei einem nur geringen Sensitivitätsabfall von 83,7% auf 79% (Schramm et al., 2011). Der Vorteil der DNA-Bildzytometrie besteht darin, dass die Messung des DNA-

Gehaltes computergestützt an den gleichen Zellen möglich ist, die bereits in den konventionellen mikroskopischen Färbungen auffällig waren. Die gleichen Objektträger werden nach der Färbemethode nach Feulgen (Feulgen und Rossenbeck, 1924) gefärbt. Hierbei wird ausschließlich DNA in einer stöchiometrischen Farbreaktion dargestellt. Es resultiert eine je nach eingesetztem Farbstoff bläuliche oder violette Kernfärbung. Suspekte Zellen können mittels eines Bildanalyseystems bezüglich ihrer integrierten optischen Dichte - einem Maß aus Farbintensität und Fläche des Zellkerns - untersucht und einer so gut wie immer im gleichen Untersuchungsmaterial enthaltenen Referenzzellpopulation (normale Bronchialepithelien oder Entzündungszellen) gegenübergestellt werden. Die integrierte optische Dichte der Referenzzellpopulation wird dabei einem diploiden Chromosomensatz zugeordnet und entspricht einem DNA-Gehalt von  $2c$ . Durch Vergleich der integrierten optischen Dichten der Referenzzellen und einer suspekten Analysezellpopulation in einer graphischen Darstellung, dem DNA-Histogramm, kann eine DNA-Aneuploidie untersucht werden (Böcking, 1995). Eine DNA-Aneuploidie spricht für eine maligne Transformation der suspekten Zellpopulation, welches in der Routinediagnostik in einem Nachbericht mitgeteilt wird. Es existieren seitens der Europäischen Gesellschaft für analytische zelluläre Pathologie (ESACP) internationale Empfehlungen für die Durchführung und Interpretation sowie Qualitätssicherung der DNA-Bildzytometrie (Haroske et al., 2001).

#### **1.4 Zielsetzung**

In der vorliegenden Studie sollen Diagnosen von endobronchial entnommenen zytologischen Proben, also endosonographisch gezielten Feinnadelpunktaten, Bronchiallavagen und Bronchialbürstungen zur Bestimmung der diagnostischen Treffsicherheit mittels deskriptiver Statistik mit der klinischen Enddiagnose verglichen werden. Die klinische Enddiagnose wird anhand der Unterlagen in den Patientenakten wie Arztbriefen sowie Befunden der Bildgebung und Histopathologie ermittelt. Außerdem soll untersucht werden, welchen Zugewinn die Anwendung adjuvanter Methoden wie DNA-Zytometrie und FISH für die weitere Abklärung konventionell-mikroskopisch zytologischer Diagnosen bringt. Ferner soll die Genauigkeit der zytologischen Tumorzelltypisierung ohne und durch den Einsatz der immunzytochemischen Diagnostik bestimmt werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkohorte**

In dieser retrospektiven Studie wurden sämtliche zytologische Diagnosen der im Funktionsbereich Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf eingesandten endobronchial entnommenen Untersuchungsmaterialien des Jahres 2015 aus der Klinik für Pneumologie, Kardiologie und internistische Intensivmedizin des Florence-Nightingale-Krankenhauses Düsseldorf einbezogen. Die eingesandten Untersuchungsmaterialien, also endosonographisch gezielte Feinnadelpunktionen von tumorsuspekten Läsionen und suspekten pulmonalen und mediastinalen Lymphknoten, Bronchialsekrete, Bronchiallavagen und Bronchialbürstungen, stammten von Patienten mit bekannten oder vermuteten Lungenerkrankungen, die zur diagnostischen Abklärung eine Bronchoskopie erhielten. Die zytologischen Diagnosen wurden der Befunddatenbank dc-pathos im Funktionsbereich Cytopathologie entnommen.

### **2.2 Aufbau der Excel-Tabelle**

Es wurde eine Excel-Tabelle erstellt, in der die wesentlichen Aspekte zum jeden zytologischen Untersuchungsmaterial festgehalten wurden. In der Tabelle wurden die verfügbaren Informationen zu den Patienten aus dem Einsendeschein der Proben und der zytologischen Diagnostik dokumentiert, nämlich zunächst Name, Geschlecht, Geburtsdatum, Datum der eingesandten Probe, Einweisungsdiagnose bzw. Verdachtsdiagnose, die zytopathologische Diagnose und Entnahmeort. Die zytologische Diagnose wurde wie folgt in mehreren Ausprägungen notiert:

1. Qualitative, rein mikroskopisch ermittelte zytologische Diagnosegruppe gemäß der derzeit gültigen Konsensusklassifikation der deutschen Gesellschaften für Zytologie und Pathologie von 1998 (positiv, negativ, dringend verdächtig, zweifelhaft und unzureichend) (Böcking, 1998a; Böcking, 1998b).
2. Diagnose im Wortlaut, wie z.B. „Bronchialsekret mit geringen unspezifischen, entzündlichen Veränderungen“.
3. Gegebenenfalls zusätzlich eingesetzte adjuvante Untersuchungsmethoden zur Tumortypisierung und/oder zur weiteren Abklärung der Diagnose, die v.a. bei dringend verdächtigen und zweifelhaften Zytologieergebnissen erfolgte. Hierzu gehörten die Immunzytochemie, die

FISH und die DNA-Bildzytometrie, jeweils mit Angabe des Ergebnisses der Methode in Klartextform. Die hier in der Studie eingesetzten adjuvanten Methoden werden in Kapitel 2.7 weiter beschrieben.

4. Abschließende qualitative zytologische Diagnose, gegebenenfalls nach zusätzlicher obiger adjuvanter Diagnostik. Erfolgte keine zusätzlichen diagnostischen Verfahren, wurde hier die qualitative zytologische Diagnose wiederholt.

### **2.3 Referenzstandard**

Zur Analyse der Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik bezüglich des Vorliegens eines malignen Tumors mittels deskriptiver Statistik wurde zu Beginn der Studie ein positiver sowie ein negativer Referenzstandard definiert:

Bei einem positiven Referenzstandard lag eine am operativ oder bioptisch entnommenen, histologischen Präparat ermittelte Diagnose eines malignen Tumors vor. Die Zeitdifferenz zwischen der Gewinnung der Zytologie und der Histologie sollte hierfür weniger als 6 Monate betragen. Der Referenzstandard war auch dann positiv, wenn die zytologische Diagnose „positiv“ war und sich ein hierzu passender klinischer Verlauf in den Krankenakten fand wie beispielsweise eine aufgrund der zytologischen Diagnose eingeleitete onkologische Therapie.

Ein negativer Referenzstandard lag bei einer “negativen“ zytologischen Diagnose, welche mit dem klinischen Gesamtbild übereinstimmte, vor oder falls sich nach Entnahme der Zytologie ein mindestens einjähriger tumorfreier klinischer Verlauf in den Krankenakten fand. Der Referenzstandard wurde nach Follow-up für jede zytologische Probe ermittelt und ist jeweils streng bezogen auf die Entnahmelokalisation in der Lunge. Zum Beispiel lag bei einem Adenokarzinom des linken Lungenoberlappens für eine zytologische Probe nur dann ein Referenzstandard vor, wenn diese auch dazu geeignet war, Zellen aus dieser Region zu enthalten, beispielsweise eine Bronchialbürste aus dem linken Oberlappen oder auch aus dem linken Hauptbronchus.

## 2.4 Follow-up und Anonymisierung der Datensätze

Anhand der Krankengeschichten, Konsilschreiben, OP-Befunde, bildgebenden Befunde, der klinischen Diagnosen in den Arztbriefen und der histologischen Befunde konnten die zytologischen Diagnosen verifiziert bzw. falsifiziert werden (siehe Ergebnisse) und somit ein Follow-up hinsichtlich der retrospektiven Auswertung erstellt werden. Folgende Follow-up-Daten wurden aus den digitalen Akten der Kaiserswerther Diakonie entnommen und in die Excel-Tabelle eingetragen:

- der aus dem abschließenden Arztbrief entnommene histopathologische Befund einer bioptischen Gewebeprobe oder eines Operationspräparates, sofern vorliegend und möglichst im vollen Text
- bei Vorliegen eines Tumors: die Klassifizierung des Tumortyps gemäß des abschließenden Arztbriefs
- Angabe zum Differenzierungsgrad eines bestimmten Tumors, sofern angegeben
- Angabe, ob zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Nekrose im Untersuchungsmaterial bekannt war oder nicht
- die TNM-Klassifikation des Tumors
- die abschließende klinische Diagnose im Arztbrief
- die Art der durchgeführten Therapie (z.B. Operation, Chemotherapie etc.)
- das Datum des letzten Arztbriefes oder möglicherweise das Sterbedatum des Patienten
- der Follow-up Zeitraum in Tagen, ausgehend vom Entnahmedatum der zytologischen Probe
- der Referenzstandard (ja /nein) bezogen auf die Lokalisation des Materials

Bei Eintrag der Follow-up Daten in die Excel-Tabelle wurden die personenbezogenen Daten des Patienten (Name, Vorname, Geburtsdatum, Eingangsnummer der Cytopathologie) entfernt und damit die Datensätze anonymisiert.

Die laufende Nummer, die jedem Datensatz bei der Anonymisierung erteilt wurde, setzt sich aus drei Komponenten zusammen, genauer gesagt zwei Nummern und einem Buchstaben: Die erste Nummer beschreibt die laufende Nummer eines Patienten, d.h. jede Nummer ist genau einem Patienten zugeordnet. Die zweite Nummer beschreibt die laufende Nummer der Untersuchung, die an einem bestimmten Patienten durchgeführt worden ist (z.B. erste oder zweite etc. Bronchoskopie im Untersuchungszeitraum). Die Buchstaben wiederum sind einem bestimmten Untersuchungsmaterial des Untersuchungstages zugeordnet (z.B. bedeuten die

Buchstaben A bis C, dass insgesamt drei Untersuchungsmaterialien bei einer Untersuchung entnommen worden sind).

## 2.5 Ethikvotum

Für diese Arbeit liegt ein positives Ethikvotum mit dem Aktenzeichen §§§ 5811 vom 28.02.2017 von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vor. Um den datenschutzrechtlichen Aspekten gerecht zu werden, fand zum Zeitpunkt der Zusammenführung der aus der diagnostischen Routine im Funktionsbereich Cytopathologie bereits vorliegenden Daten mit den Daten des Follow-ups aus den Krankenakten der Kaiserswerther Diakonie eine Anonymisierung der Datensätze statt. Mithilfe des VeraCrypt-Programms (VeraCrypt 1.17 für Windows 10, **IDRIX Cryptography**) wurden Studiendaten aller Art sicher in verschlüsselter Form auf dem Datenträger gespeichert.

## 2.6 Ablauf der zytologischen Untersuchung im Funktionsbereich Cytopathologie

Da lediglich das Ergebnis der zytologischen Routinediagnostik für die vorliegende Arbeit aus der Befunddatenbank dc-pathos übernommen wurde, wird die Bearbeitung der unterschiedlichen, in diese Studie eingeschlossenen Untersuchungsmaterialien kurz beschrieben. Die Bearbeitung und Färbung der Proben erfolgte gemäß den entsprechenden Arbeitsanweisungen im Funktionsbereich Cytopathologie vom dortigen Personal.

- Bronchialsekrete und Bronchiallavagen: Eingang als in Saccomannos‘-Fixativ fixierte Flüssigkeit. Zentrifugation und Anfertigung von 2-4 Sedimentaustriechen. Färbung von 2-3 Ausstrichen nach Papanicolaou (Standardfärbung), 1 Ausstrich nach der PAS-Reaktion (Perjodsäure-Schiff-Reaktion, Schleimdarstellung, Pilze etc.). Eindecken. Mikroskopische Befundung und Angabe des Befundes gemäß der Klassifikation der Deutschen Gesellschaften für Zytologie und Pathologie sowie im Klartext (Böcking, 1998a; Böcking, 1998b).
- Bronchialbürstungen und Feinnadelpunktate (auch endosonographisch gesteuert): Eingang als fertig vom Bronchoskopiker auf Objektträgern ausgestrichene Präparate im Funktionsbereich Cytopathologie. Färbung der Ausstriche nach Papanicolaou (Standardfärbung), bei Bürstenabstrichen 1 Ausstrich nach der PAS-Reaktion.

Eindecken. Mikroskopische Befundung und Angabe des Befundes gemäß der Klassifikation der Deutschen Gesellschaften für Zytologie und Pathologie sowie im Klartext.

## 2.7 Adjuvante Methoden

Für die weitere Abklärung der nach Mikroskopie diagnostisch unklaren, das heißt der zweifelhaft oder dringend verdächtig klassifizierten Präparate, wurden bereits im Rahmen der Routinediagnostik im Funktionsbereich Cytopathologie die adjuvanten Untersuchungsmethoden der DNA-Bildzytometrie und der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), soweit möglich, eingesetzt. Außerdem wurde die Immunzytochemie zur Tumortypisierung eingesetzt und in drei Fällen zur Dignitätssicherung. Diese Untersuchungen erfolgten im Rahmen der Diagnostik und wurden nicht von mir persönlich durchgeführt. Die entsprechenden Befunde wurden im Rahmen dieser Studie aus der Befunddatenbank dc-pathos entnommen und wie oben beschrieben in die Excel-Tabelle eingetragen.

Adjuvante Untersuchungen wurden am bereits konventionell-mikroskopisch untersuchten zytologischen Material durchgeführt, so dass zusätzliche Probenentnahmen nicht erforderlich waren.

Da die DNA-Bildzytometrie in nur 29 Fällen zum Einsatz kam und nicht von mir persönlich durchgeführt wurde, wird bezüglich der technischen Durchführung auf die Arbeitsanweisungen des Funktionsbereichs Cytopathologie verwiesen. Als diagnostisches Kriterium wird eine DNA-Aneuploidie hier definiert als das Vorliegen einer Stammlinien-Aneuploidie (Modalwert einer Stammlinie in c-Werten außerhalb der 10%-Toleranzbereiche um 2c, 4c oder 8c) oder einer Einzelzell-Aneuploidie (abnorm hohe Einzelzell-Werte  $>9c$ , so genannte 9c-exceeding events, 9cEE) (vgl. auch Schramm et al., 2011). Eine Beschreibung des diagnostischen Prinzips findet sich in der Einleitung der Arbeit in Kapitel 1.3.3.

FISH-Untersuchungen zur weiteren diagnostischen Abklärung nach unklarer mikroskopischer Zytologie wurden in 9 Fällen durchgeführt. Es wurde hier zur Bestimmung einer chromosomalen Aneuploidie die Mehrfarben-FISH mit Sonden für 5p15, 7p12 (EGFR), 8q24 (C-MYC) und Zentromer des Chromosoms 6 eingesetzt. Eine chromosomale Aneuploidie wird angenommen bei Erfüllung folgender Kriterien (Schramm et al., 2011):

- Mehr als 2 Fluoreszenzsignale bei mehr als 2 der 4 cDNA-Sonden in 6 oder mehr Zellen.
- Untersuchen von mindestens 25 Zellen. Falls das oben genannte Kriterium noch nicht erreicht ist, werden bis 60 Zellen ausgezählt.
- Tetrasomie oder selbst Oktasomie, definiert als jeweils 4 oder 8 Fluoreszenzsignale bei mindestens drei der 4 cDNA-Sonden, wird nicht als aneuploid definiert.

Aufgrund der geringen Fallzahl wird hier ebenfalls auf eine detaillierte Beschreibung des Laborverfahrens verzichtet und auf die SOPs des Funktionsbereichs Cytopathologie verwiesen. Eine Darstellung des Prinzips findet sich in der Einleitung der vorliegenden Arbeit in Kapitel 1.3.2.

### **2.7.1 Immunzytochemie**

Im Funktionsbereich Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) verwendet. Bei dieser macht man sich die hohe Affinität des Glykoproteins Avidin für das wasserlösliche Vitamin Biotin zunutze. Es wird über einen biotinylierten Antikörper ein vorgefertigter Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex an ein gewebegebundenes Antigen fixiert. Die Peroxidase kann anschließend mittels einer Färbereaktion nachgewiesen werden (Remmele, 1999).

Die konkrete Anwendung der Immunzytochemie erfolgte gemäß den Standard Operating Procedures mit einer adaptierten ABC-Methode über zwei Tage, wobei die Schritte 1 - 22 am ersten Tag und die Schritte 23 - 37 am zweiten Tag durchgeführt wurden. Es wurde eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle für das gesamte Verfahren mitgeführt. Vom Prinzip her wurde zunächst das Deckglas der bereits mikroskopierten und nach Papanicolaou gefärbten Präparate und das Eindeckmedium durch Xylol entfernt und daran eine aufsteigende Alkoholreihe zur Rehydrierung angeschlossen (Schritte 1 - 5). Hieran schloss sich, sofern ein kernbindender Antikörper verwendet werden sollte, ein Zwischenschritt zur Demaskierung des Kernantigens an (sogenanntes Antigen Retrieval, Schritt 6). Danach folgten zur Verminderung unspezifischer Bindung die Blockierung der endogenen Peroxidase (Schritte 7 - 9) und die Behandlung mit dem Primärantikörper nach vorheriger Inkubation in Normalserum (Schritte 10 - 11). Verbunden mit mehreren Spülvorgängen zur Entfernung überschüssiger Substrate schlossen sich die Gabe des Sekundärantikörpers und der AEC(3-Amino-9-ethylcarbazol) - Substrate (Schritte 13, 15 und 17) an. Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Schritt 19) erfolgt

nach einem weiteren Spülschritt die Eindeckung unter einem Deckglas. Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 (Anfang): SOP-gemäßer Ablauf der immunzytochemischen ABC-Methode.

Schritt	Küvetteninhalt	Inkubationszeit
<b>Vorbehandlung der gefärbten Routineausstriche</b>		
1	Xylol	10 min
2	Xylol	10 min
3	Ethanol 100%	10 min
4	Ethanol 100%	10 min
5	Ethanol 96%	10 min
6	Ethanol 96%	10 min
7	Ethanol 50%	10 min
<b>Hitzebehandlung für die Kernantikörper TTF-1, CDX2, ER, PR, WT-1, p40, p63</b>		
8	PBS-Puffer	5 min
9	Citrat-Puffer (TTF-1, CDX2, ER, PR, GATA3, p63)	
10	EDTA-Puffer (p40, WT1) ansetzen und in Coplinküvette füllen	
11	OT (Coplinküvette) im Wasserbad	20 min 80°C

Tabelle 2 (Fortsetzung): SOP-gemäßer Ablauf der immunzytochemischen ABC-Methode.

Schritt	Küvetteninhalt	Inkubationszeit
12	OT in der Coplinküvette abkühlen lassen	20 min
13	PBS-Puffer	5 min
<b>Stoppen der endogenen Peroxidase</b>		
14	Blockierungslsg. (100ml Methanol+1ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	30 min
15	gut in PBS-Puffer spülen	
16	PBS-Puffer	10 min
17	PBS-Puffer	10 min
18	PBS-Puffer/Tween20	1 min
<b>Inkubation Primärantikörper 1. Tag (feuchte Kammer)</b>		
19	Normalserum	20 min
20	Flüssigkeit vom OT ablaufen lassen	
21	Primär-AK, ca. 1ml auftragen	12-24 h
22	Alternativ im Brutschrank	60 min 37°C
<b>Fortsetzung 2. Tag</b>		
23	Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 min
24	Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 min
25	Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10/Tween20	1 min
<b>Inkubation Sekundär-Antikörper</b>		
26	biotinylierter-Sekundär-AK universal	30 min
27	Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 min
28	Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 min
29	Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10/Tween20	1 min
<b>Inkubation Avidin-Biotin-Complex</b>		
30	ABC-Elite Standard	30 min
31	Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 min
32	Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 min
<b>Substrat-Chromogen-Reaktion</b>		
33	AEC-Reagenz	25 min
34	Aqua dest steril	5 min
35	Aqua dest steril	5 min

Schritt	Küvetteninhalt	Inkubationszeit
<b>Gegenfärbung</b>		
36	Mayer' Hämalaun	ca 1 min
37	Wässern unter fließendem Leitungswasser	10 min
<b>Eindecken mit Aquatex</b>		

## 2.8 Statistische Auswertung des Vergleichs von zytologischen Diagnosen und Follow-up Diagnosen

### 2.8.1 Deskriptive Bestimmung der Treffsicherheit der zytologischen Malignitätsdiagnose

Statistische Berechnungen wurden mit dem Programm IBM® SPSS® Statistics (IBM Deutschland GmbH) durchgeführt. Die Auswertung der Daten der Patientenpopulation lässt sich wie in der Tabelle 2 in einer Vier-Felder-Tafel darstellen (Hilgers et al., 2007).

Tabelle 3: Prinzip der Vier-Felder-Tafel (Hilgers et al., 2007).

		Krankheit		
		ja	nein	Summe
Test	+	Anzahl der richtig Positiven (a)	Anzahl der falsch Positiven (c)	<b>Alle Positiven</b>
	-	Anzahl der falsch Negativen (b)	Anzahl der richtig Negativen (d)	<b>Alle Negativen</b>
		<b>Anzahl der tatsächlich Positiven</b>	<b>Anzahl der tatsächlich Negativen</b>	<b>Summe</b>

Für die Auswertung der Treffsicherheit der rein morphologischen Zytologie und der Zytologie unter Zuhilfenahme der DNA-Bildzytometrie und der FISH (wenn eingesetzt) aller eingeschlossenen Diagnosen wurden jeweils die Maßzahlen für Sensitivität und Spezifität, positiven und negativen Prädiktionswert sowie für die Gesamttreffsicherheit berechnet.

Außerdem wurden Sensitivität, Spezifität, positiver prädiktiver Wert, negativer prädiktiver Wert sowie Gesamttreffsicherheit für jede Untersuchungsart (EBUS-TbNa, Bürstenabstrich und Bronchiallavagen/-sekrete) ermittelt.

Die Sensitivität ist definiert als der Anteil positiver Tests unter den Kranken und die Spezifität als der Anteil der negativen Tests unter den Gesunden. Unter Hinzunahme der Klassifizierung gemäß der Vier-Felder-Tafel werden die Kennzahlen wie folgt formelmäßig abgebildet (Bender, 2001):

$$\text{Sensitivität} = a/(a+b)$$

$$\text{Spezifität} = d/(c+d)$$

Der positive Prädiktionwert (PPW) ist der prozentuale Wert von Krankheitsdiagnosen, die sich im Nachhinein als richtig herausstellten:

$$\text{PPW} = a/(a+c)$$

Der negative Prädiktionwert (NPW) entspricht dem Anteil von richtig-negativen Ergebnissen von allen als negativ diagnostizierten:

$$\text{NPW} = d/(b+d)$$

Die Gesamttreffsicherheit beschreibt den Prozentsatz aller richtig positiven und richtig negativen erkannten Diagnosen, bezogen auf die Gesamtzahl aller Fälle:

$$\text{Gesamttreffsicherheit} = (a+d)/(a+b+c+d)$$

## 2.8.2 Kreuztabellen für die Korrelationsanalyse bei Tumortypisierung

Kreuztabellen dienen zur Analyse von Zusammenhängen zwischen zwei qualitativen Variablen. Man unterscheidet zwischen der abhängigen Variablen, deren Ausprägungen erklärt werden sollen, und der unabhängigen „erklärenden“ Variablen. Die unabhängige Variable ist damit „Referenzstandard Tumortyp“. Die unabhängige Variable definiert in der Regel die Spalten der Tabelle, die abhängige Variable die Zeilen. „Die sich daraus ergebenden Zellen stellen die Ausprägungen der abhängigen Variable für die verschiedenen Kategorien der unabhängigen Variablen dar“ (Stegmann und Schwab, 2012).

In dieser Studie wurden die Ergebnisse der alleinigen mikroskopischen Tumortypisierung und der Typisierung nach Immunzytochemie jeweils mit dem Follow-up verglichen.

Für mehr Genauigkeit bei der Korrelationsanalyse zwischen zytologisch bestimmten Tumortypen und Referenzstandard-Tumortypen wurden drei Übereinstimmungsgrade eingeführt:

1. Keine Übereinstimmung: Der zytologisch bestimmte Tumortyp stimmt nicht mit dem Follow-up Tumortyp überein.
2. Partielle Übereinstimmung: Die grobe Differenzierung des Gewebetyps zwischen Follow-up und Zytologie stimmt überein, aber nicht die genaue histogenetische Klassifikation.
3. Komplette Übereinstimmung: Der zytologisch bestimmte Tumortyp stimmt mit dem Tumortyp im Follow-up überein.

Ein Beispiel für den Fall mit dem Grad 1 (keine Übereinstimmung) aus der aktuellen Studie wäre der zytologisch bestimmte Tumortyp „Plattenepithelkarzinom“ verglichen mit dem Follow-up Tumortyp „Adenokarzinom“.

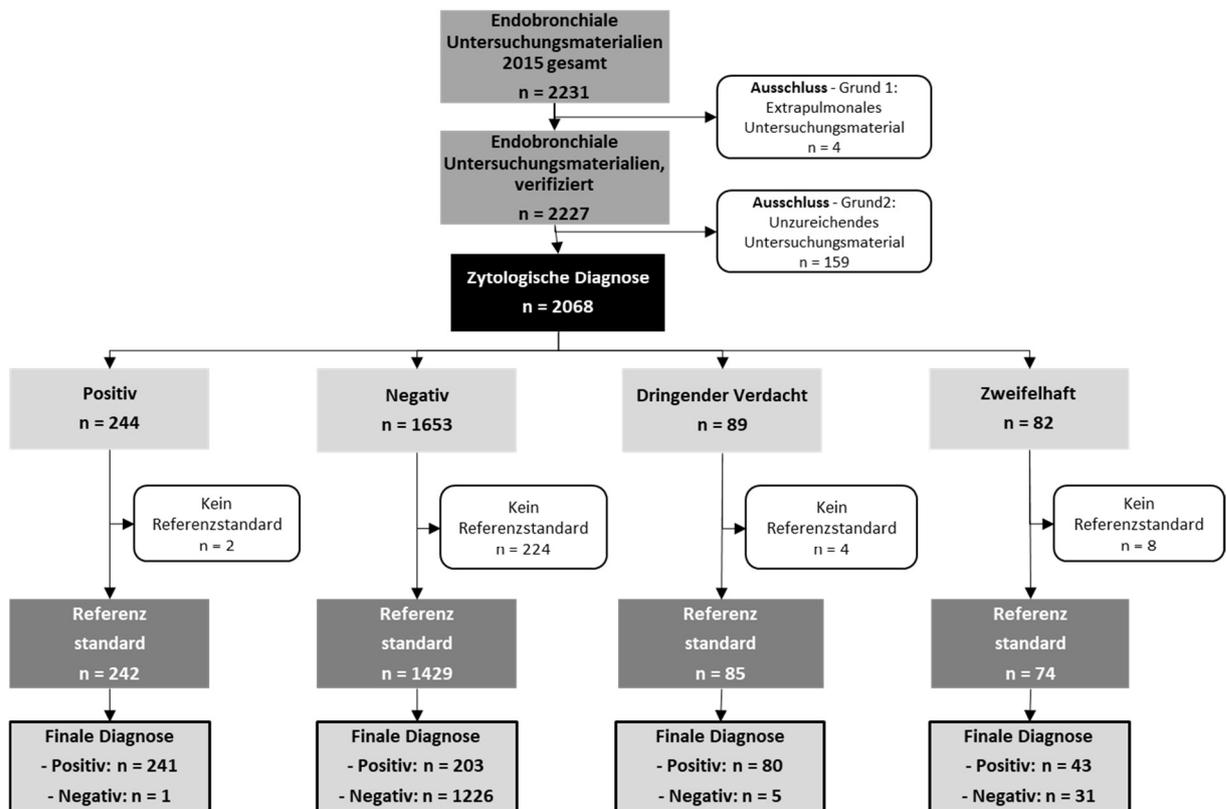
Ein häufiges Fallbeispiel des Grades 2 stellt die Kombination aus dem zytologischen Tumortyp „NSCLC“ und dem histopathologischen bestimmten Tumortyp „Adenokarzinom“ dar. Diese wurde dem Grad 2 zugeordnet, da das Adenokarzinom eine histologische Untergruppe des NSCLC ist. Bei der Follow-up Diagnose „Metastase“ erfolgte selbst bei vollständiger Übereinstimmung von zytologischem und Follow-up Tumortyp eine Zuordnung zum Übereinstimmungsgrad 2.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Das Patientenkollektiv

Die Abbildung 1, welche entsprechend den Empfehlungen der STARD-Initiative erstellt wurde (Cohen et al., 2016), gibt den Studienverlauf wieder.

Abbildung 1: Flussdiagramm zur Treffsicherheit aller endobronchialen Untersuchungsmaterialien.



Es sind zunächst alle Einsendungen der endobronchialen Zytologie aus der Kaiserswerther Diakonie des Jahres 2015 mit ihrer jeweiligen zytologischen Diagnose aufgeführt. Von insgesamt 2231 Präparaten wurden vier Untersuchungsmaterialien aufgrund einer extrapulmonalen Entnahmestelle aus der späteren statistischen Auswertung ausgeschlossen. Weitere 159 Präparate, davon 157 endosonographisch gesteuerte transbronchiale Nadelaspirationen (EBUS-TBNA) und 2 Bronchiallavagen (BAL), fielen, bedingt durch Abwesenheit von diagnostisch verwertbaren Zellen, unter die Definition "unzureichendes Untersuchungsmaterial" und wurden ebenfalls nicht mit statistisch ausgewertet. Meist wurden

hier nur 2 Ausstrichpräparate bei einer EBUS-TbNA eingesandt, welche ausschließlich Blut und Zellen aus dem Zugangsweg enthielten.

Die verbleibenden 2068 Untersuchungsmaterialien, von denen 1830 über einen Referenzstandard (Follow-up-Daten) verfügten, wurden entsprechend der zytologischen Diagnose in vier Gruppen kategorisiert (Böcking, 1998a) (s. Kapitel 1.2).

#### *Positiv – maligne Zellen nachweisbar*

Von den 244 als „tumorzell-positiv“ klassifizierten Untersuchungsmaterialien mussten zwei Fälle aufgrund fehlenden Follow-ups aus der statistischen Auswertung herausgenommen werden. Somit konnten 242 Fälle zur weiteren Analyse herangezogen werden. Bei einer Gesamtzahl von 1830 Untersuchungsmaterialien mit vollständigem und zureichendem Follow-up entspricht dies einem Anteil von 13,2%.

#### *Negativ – maligne Zellen nicht nachweisbar*

Als „negativ“ wurden 1653 Präparate klassifiziert. Von 224 Fällen lag kein ausreichendes Follow-up vor. Die verbleibenden 1429 Untersuchungsmaterialien entsprechen einem Anteil von 78,1% an allen Fällen mit ausreichendem Follow-up.

#### *Dringender Verdacht – bösartige Zellen wahrscheinlich*

Insgesamt waren in dieser Studie 89 „dringend verdächtige“ Fälle vorzufinden. Da vier dieser Fälle wegen fehlendem Follow-up nicht geklärt werden konnten, standen in dieser Kategorie 85 Fälle, entsprechend 4,7% aller Fälle mit vollständigem und zureichendem Follow-up zur Analyse zur Verfügung.

#### *Zweifelhaft – bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen*

Bei acht der 82 „zweifelhaften“ Untersuchungsmaterialien ließen sich aus den Angaben in den Krankenakten kein ausreichender Referenzstandard heranziehen. Somit blieben 74 Fälle dieser diagnostischen Kategorie für eine statistische Auswertung, entsprechend 4,0% aller Fälle mit vollständigem und zureichendem Follow-up.

Die 1830 Untersuchungsmaterialien mit Follow-up Daten stammen von 836 Patienten. Die nachfolgenden Abbildungen 2, 3 und 4 zeigen Einsendungen mit zytologischen Diagnosen untergliedert nach der Untersuchungsart.

Abbildung 2: Flussdiagramm zur Treffsicherheit nach Untersuchungsart (Bürstenabstrich).

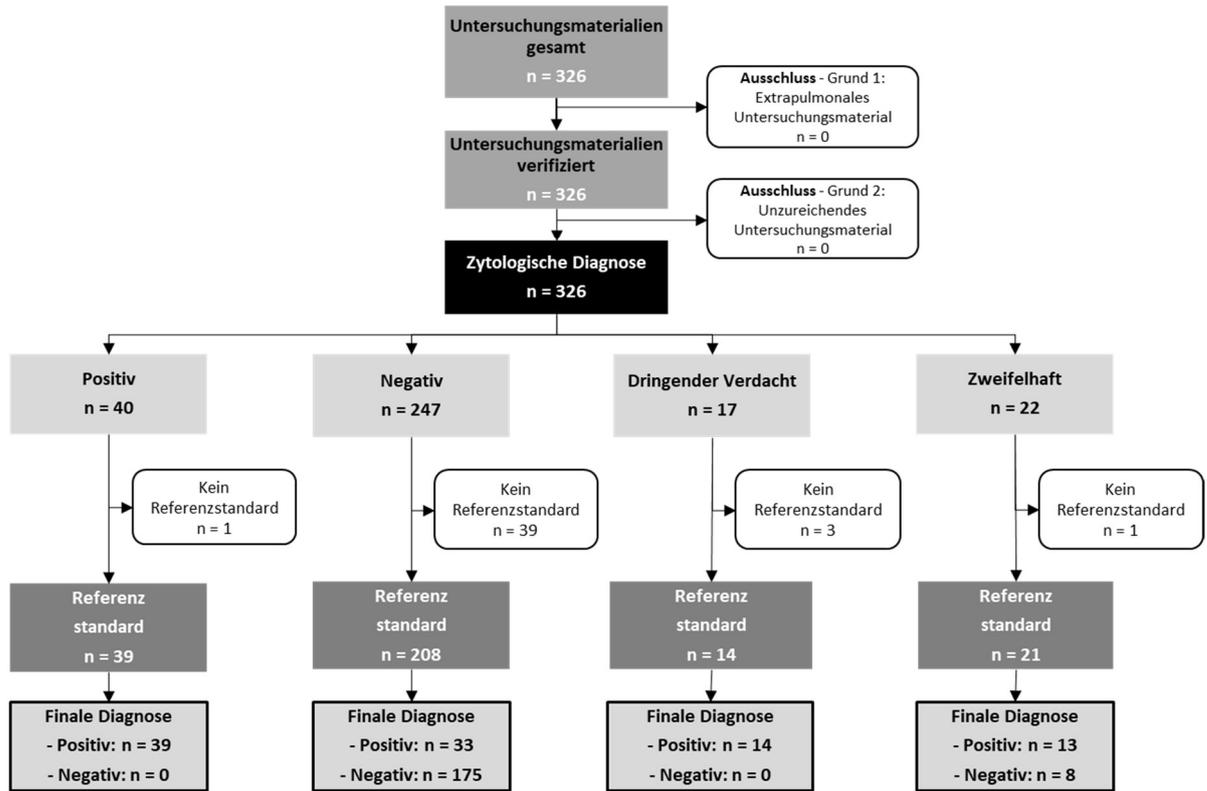


Abbildung 3: Flussdiagramm zur Treffsicherheit nach Untersuchungsart (Bronchiallavagen und Bronchialsekrete).

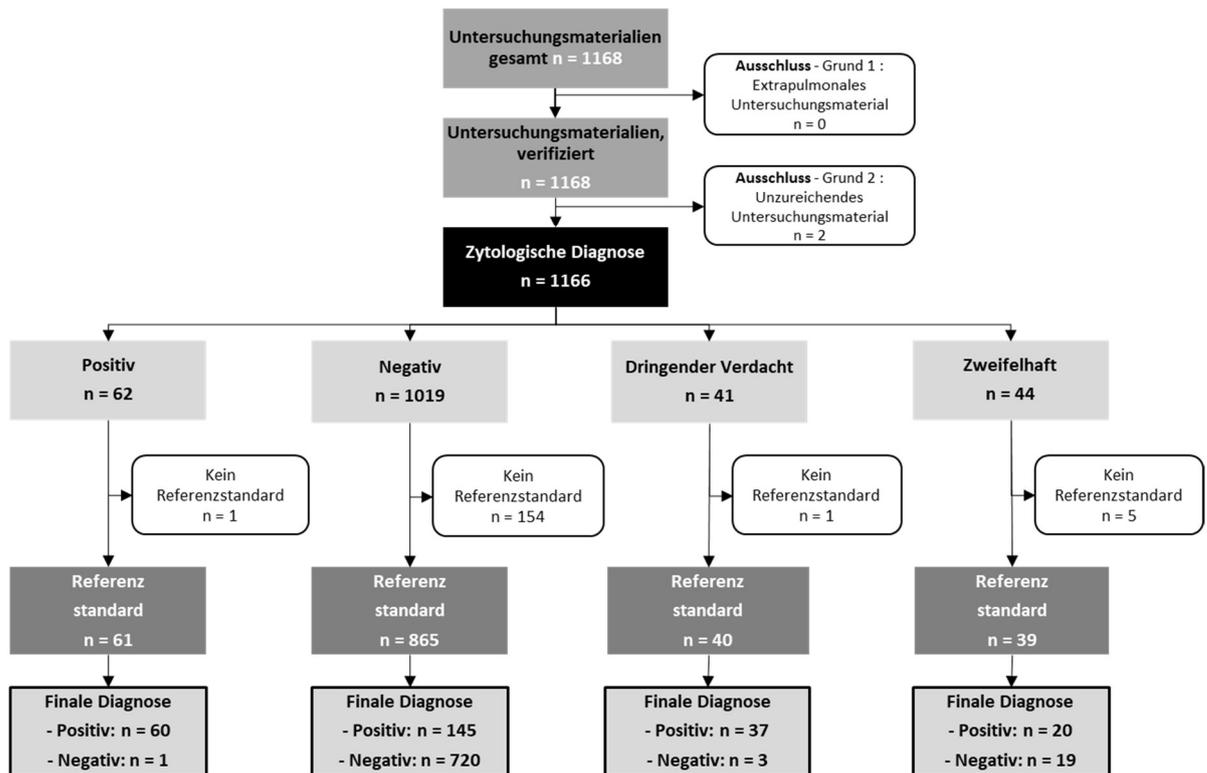
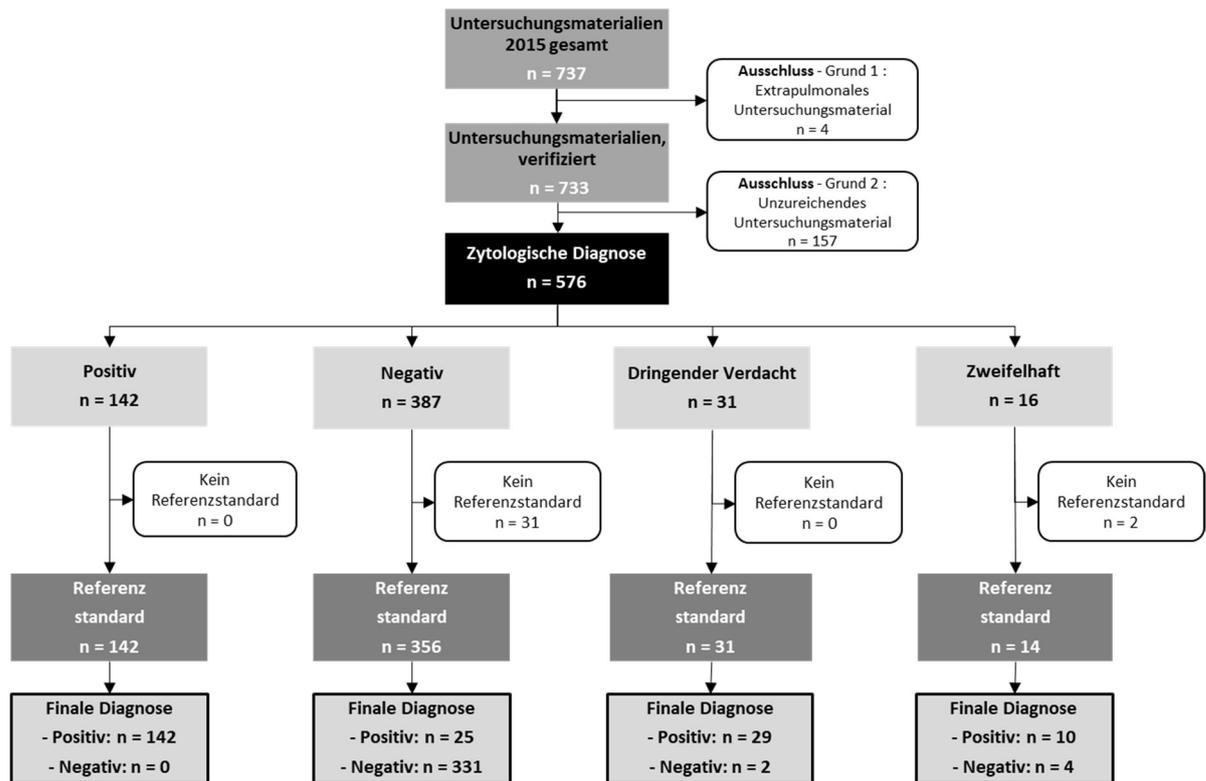


Abbildung 4: Flussdiagramm zur Treffsicherheit nach Untersuchungsart (EBUS-TbNa).



Der Anteil der jeweiligen zytologischen Diagnosekategorien bei allen auswertbaren Untersuchungsmaterialien mit ausreichenden Follow-up Daten ist zusammenfassend in folgender Tabelle dargestellt:

Tabelle 4: Auswertbare Untersuchungsmaterialien nach Diagnosekategorien.

Zytologische Diagnose	Bürstenabstrich	Bronchiallavage/-sekret	EBUS-TbNA	Alle Materialien
positiv	39/282 = 13,8%	61/1005 = 6,1%	142/543 = 26,2%	242/1830 = 13,2%
Dringender Verdacht	14/282 = 5%	40/1005 = 4%	31/543 = 5,7%	85/1830 = 4,6%
Zweifelhaft	21/282 = 7,4%	39/1005 = 3,9%	14/543 = 2,6%	74/1830 = 4%
Negativ	208/282 = 73,8%	865/1005 = 86%	356/543 = 65,5%	1429/1830 = 78,1%

Außerdem lässt sich aus den Abbildungen 1 bis 4 die Prä-Testwahrscheinlichkeit der jeweiligen zytologischen Diagnosegruppen für eine maligne Diagnose im Follow-up ableiten. Diese soll nach Schätzungen der Autoren der Klassifikation (Böcking et al. 1998a und b) für die Gruppe „negativ“ idealerweise 0%, für „zweifelhaft“ ca. 30%, für „dringender Verdacht“ ca. 70% und für „positiv“ idealerweise 100% betragen. Die aus der vorliegenden Arbeit ermittelbaren Werte finden sich in der nachfolgenden Tabelle 5:

Tabelle 5: Prä-Testwahrscheinlichkeit der zytologischen Diagnosegruppen für eine maligne Diagnose.

Zytologische Diagnose	Bürstenabstrich	Bronchiallavage/-sekret	EBUS-TbNA	Alle Materialien
positiv	39/39 = 100%	60/61 = 98,4%	142/142 = 100%	241/242 = 99,6%
Dringender Verdacht	14/14 = 100%	37/40 = 92,5%	29/31 = 93,5%	80/85 = 94,1%
Zweifelhaft	13/21 = 61,9%	20/39 = 51,3%	10/14 = 71,4%	43/74 = 58,1%
Negativ	33/208 = 15,9%	145/865 = 16,8%	25/356 = 7%	203/1429 = 14,2%

In der Tabelle 6 sind die klinischen Daten des Patientenkollektivs der Studie (pro Untersuchungsmaterial), von denen Follow-up Daten vorliegen, zusammengefasst.

Tabelle 6: Klinische Daten der Patienten (pro Untersuchungsmaterial).

	gutartige Lungenerkrankung*, n=1027	primäres Lungenkarzinom, n=713	Ander e**, n=90
<b>Ø-Alter / (Spanne Alter)</b>	63 / (22-90)	68 / (38-91)	65 / (37-87)
<b>Geschlecht</b>			
weiblich	476 (46,3%)	307 (43,1%)	45 (50,0%)
männlich	551 (53,7%)	406 (56,9%)	45 (50,0%)
<b>Raucheranamnese</b>			
Raucher	275 (26,8%)	302 (42,4%)	20 (22,2%)
EX-Nikotinabusus	301 (29,3%)	285 (40,0%)	23 (25,6%)
Nieraucher	139 (13,5%)	35 (4,9%)	12 (13,3%)
keine Angaben	312 (30,4%)	91 (12,8%)	35 (38,9%)
<b>Tumortyp</b>			
SCLC		94 (13,2%)	
NSCLC		39 (5,5%)	
Adenokarzinom		337 (47,3%)	
Adenosquämoses Karzinom		33 (4,6%)	
Plattenepithelkarzinom		182 (25,5%)	
Mischdifferenzierung NSCLC und SCLC		13 (1,8%)	
primäre Lungentumoren, sekundäre Lungentumoren und andere Tumoren		15 (2,1%)	90 (100%)
<b>Lokalisation</b>			
zentral		83 (11,6%)	2 (2,2%)
peripher		28 (3,9%)	1 (1,1%)
keine Angaben		602 (84,4%)	87 (96,7%)
<b>Tumorstadium</b>			
0		10 (1,4%)	
IA		38 (5,3%)	
IB		52 (7,3%)	
IIA		21 (2,9%)	
IIB		21 (2,9%)	
IIIA		151 (21,2%)	
IIIB		103 (14,4%)	
IV		234 (32,8%)	
nicht ermittelt		83 (11,6%)	

\*u.a: interstitielle Lungenerkrankungen, COPD, Pneumonie, Lungenembolie, Hämoptysen, chronische Bronchitis

\*\*u.a: pulmonale Metastasen von Mamma-, Vulva-, Rektum-, Nierenzellkarzinom, Melanom sowie verschiedene andere Entitäten

1027 Untersuchungsmaterialien hatten zytologisch und histopathologisch keinen Anhalt für Malignität oder für einen gutartigen Tumor und zeigten im Follow-up benigne Lungen-erkrankungen, in 713 Fällen wurde ein primäres Lungenkarzinom diagnostiziert, weitere 90 Fälle wurden in die Kategorie „Andere“ eingestuft. Diese 90 Untersuchungsmaterialien hatten folgende Tumordiagnosen: B-Zell-Lymphom (21), Hodgkin Lymphom (4), Maligner Tumor (14), Neurinom (1), SFT (Solitärer fibröser Tumor) (1), epitheloides malignes Mesotheliom (2), Thymom (6), pulmonale Metastasen (40). In einem Fall war die Differenzierung zwischen primären pulmonalen Plattenepithelkarzinom und Metastasen des vorbekannten Vulvakarzinom nicht möglich.

## **3.2 Treffsicherheit der Zytologie**

### **3.2.1 Auswertung für sämtliche Untersuchungsmaterialien**

567 der 1830 Untersuchungsmaterialien hatten ein gemäß dem Referenzstandard positives Follow-up für einen malignen Tumor und 1263 ein negatives Follow-up. Die zytologische Diagnosekategorie nach rein mikroskopischer Beurteilung der Objektträger lässt allerdings weitere Zuordnungsmöglichkeiten zu, da es nicht nur die eindeutig „negative“ und „positive“ Diagnosekategorien, sondern auch noch „zweifelhaft“ und „dringender Verdacht“ gibt. Unter der Prämisse der Dichotomisierung in „positiv“ und „negativ“ zur Analyse mittels Vierfeldertafel gibt es hier daher drei verschiedene mögliche Zuweisungsoptionen für die unklaren Diagnosekategorien.

In der ersten Variante werden die dringend zytologisch verdächtigen und zweifelhaften Fälle als statistisch positiv gewertet, in der zweiten Auswertungsvariante werden die dringend verdächtigen als positiv und die zweifelhaften Fälle als statistisch negativ gewertet, die dritte Auswertungsvariante wertet die dringend verdächtigen Fälle und die zweifelhaften als statistisch negativ.

In Tabelle 7 sind die drei Auswertungsvarianten und deren Ergebnisse für die Sensitivität und Spezifität, den positiven prädikativen Wert und negativen prädikativen Wert sowie die Gesamttreffsicherheit aufgeführt.

Tabelle 7: Treffsicherheit der rein mikroskopischen Zytologie, verschiedene Auswertungsvarianten.

	Auswertungsvarianten		
	1 (d.V. und zw = positiv)	2 (d.V=positiv, zw=negativ)	3 (d.V. und zw = negativ)
Sensitivität	64,2% (364 von 567)	56,6% (321 von 567)	42,5% (241 von 567)
Spezifität	97,1% (1226 von 1263)	99,5% (1257 von 1263)	99,9% (1262 von 1263)
PPW	90,7% (364 von 401)	98,2% (321 von 327)	99,6% (241 von 242)
NPW	85,8% (1226 von 1429)	83,6% (1257 von 1503)	79,5% (1262 von 1588)
Gesamttreffsicherheit	86,9% (1590 von 1830)	86,2% (1578 von 1830)	82,1% (1503 von 1830)

### 3.2.2 Auswertungen pro Untersuchungsart

In den Tabellen 8, 9 und 10 auf dieser und der folgenden Seite sind jeweils die drei im Vorkapitel beschriebenen Auswertungsvarianten pro Untersuchungsart (Bronchialbürstungen, Bronchiallavagen und EBUS-TbNA) und deren Maßzahlen der diagnostischen Treffsicherheit der alleinigen mikroskopischen Zytologie aufgeführt.

#### Bürstenabstriche

Tabelle 8: Treffsicherheit der rein mikroskopischen Zytologie nach Untersuchungsart (Bürstenabstrich), verschiedene Auswertungsvarianten.

- 1) zweifelhafte und dringend verdächtige Fälle = statistisch positiv

Sensitivität	66,7% (66 von 99)
Spezifität	95,6% (175 von 183)
PPW	89,2% (66 von 74)
NPW	84,1% (175 von 208)
GT	85,5% (241 von 282)

- 2) zweifelhafte und dringend verdächtige Fälle = statistisch negativ

Sensitivität	39,4% (39 von 99)
Spezifität	100% (183 von 183)
PPW	100% (39 von 39)
NPW	75,3% (183 von 243)
GT	78,7% (222 von 282)

- 3) zweifelhafte Fälle = statistisch negativ und dringend verdächtige = positiv

Sensitivität	53,5% (53 von 99)
Spezifität	100% (183 von 183)
PPW	100% (53 von 53)
NPW	79,9% (183 von 229)
GT	83,7% (236 von 282)

## Bronchiallavagen und Bronchialsekrete

Tabelle 9: Treffsicherheit der rein mikroskopischen Zytologie nach Untersuchungsart (Bronchiallavagen und -sekrete), verschiedene Auswertungsvarianten.

- 1) zweifelhafte und dringend verdächtige Fälle = statistisch positiv

Sensitivität	44,7% (117 von 262)
Spezifität	96,9% (720 von 743)
PPW	83,6% (117 von 140)
NPW	83,2% (720 von 865)
GT	83,3% (837 von 1005)

- 2) zweifelhafte und dringend verdächtige Fälle = statistisch negativ

Sensitivität	22,9% (60 von 262)
Spezifität	99,9% (742 von 743)
PPW	98,4% (60 von 61)
NPW	78,6% (742 von 944)
GT	79,8% (802 von 1005)

- 3) zweifelhafte Fälle = statistisch negativ und dringend verdächtige = positiv

Sensitivität	37,0% (97 von 262)
Spezifität	99,5% (739 von 743)
PPW	96,0% (97 von 101)
NPW	81,7% (739 von 904)
GT	83,2% (836 von 1005)

## EBUS TbNa

Tabelle 10: Treffsicherheit der rein mikroskopischen Zytologie nach Untersuchungsart (EBUS-TbNa), verschiedene Auswertungsvarianten.

- 1) zweifelhafte und dringend verdächtige Fälle = statistisch positiv

Sensitivität	87,9% (181 von 206)
Spezifität	98,2% (331 von 337)
PPW	96,8% (181 von 187)
NPW	93,0% (331 von 356)
GT	94,3% (512 von 543)

- 2) zweifelhafte und dringend verdächtige Fälle = statistisch negativ

Sensitivität	68,9% (142 von 206)
Spezifität	100% (337 von 337)
PPW	100% (142 von 142)
NPW	84,0% (337 von 401)
GT	88,2% (479 von 543)

- 3) zweifelhafte Fälle = statistisch negativ und dringend verdächtige = positiv

Sensitivität	83,0% (171 von 206)
Spezifität	99,4% (335 von 337)
PPW	98,8% (171 von 173)
NPW	90,5% (335 von 370)
GT	93,2% (506 von 543)

### 3.3 Einsatz von adjuvanten Methoden und deren Treffsicherheit

DNA-Bildzytometrie sowie Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) dienen der Diagnosesicherung bei mikroskopisch nicht eindeutig als positiv oder negativ zu klassifizierenden Befunden. Eine Übersicht der adjuvanten Untersuchungen sowie die abschließende Diagnose ist in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Fälle mit adjuvanten Methoden.

		DNA-Zytometrie	FISH
Gesamtzahl		29	9
hiervon: Nicht aufgeklärt		3	3
Adjuvante Untersuchung			
Diagnose vor adjuvanter Untersuchung	Diagnose nach adjuvanter Untersuchung		
Zweifelhaft	Negativ	6	0
Zweifelhaft	Positiv	6	1
Positiv	Positiv	2	0
Dringender Verdacht	Positiv	12	5
Summe		26	6

#### 3.3.1 DNA-Bildzytometrie

Von 29 Fällen konnten 3 Fälle durch den Einsatz der DNA-Bildzytometrie nicht aufgeklärt werden, weil das Resultat der DNA Zytometrie nicht eindeutig bezüglich des Vorliegens einer DNA-Aneuploidie interpretierbar war, d.h. die initiale (unklare) mikroskopische zytologische Diagnose blieb bestehen. Zwei Fälle hatten schon vor der DNA-Bildzytometrie eine positive zytologische Diagnose und die DNA-Bildzytometrie wurde zur reinen Bestätigung angeschlossen. Außerdem wurden 12 initial zytologisch zweifelhafte sowie 12 zytologisch dringend verdächtige Fälle untersucht und bei Vorliegen einer DNA-Aneuploidie letztlich eine

maligne Transformation bestätigt (=positiv) (vergleiche Tabelle 11). Lag eine DNA-Aneuploidie nicht vor, wurden die mikroskopisch auffälligen Zellveränderungen in der Regel als entzündlich oder regenerativ interpretiert (=negativ).

Vergleicht man die diagnostische Genauigkeit der 24 DNA-bildzytometrischen Untersuchungen nach einer unklaren zytologischen Diagnose mit der finalen Diagnose aus dem Follow-up, ergibt sich eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 100%. Die Gesamttrefferquote beträgt 91,7%, der positive prädikative Wert liegt bei 100%, der negative prädikative Wert bei 66,7% (vergleiche Vierfeldertafel Tabelle 12).

Tabelle 12: Vierfeldertafel zur Treffsicherheit der DNA-Zytometrie an zunächst zytologisch unklaren Präparaten.

		Follow-up		Total
		negativ	positiv	
Abschließende zytologische Untersuchung	negativ	4	2	6
	positiv	0	18	18
Total		4	20	24

### 3.3.2 FISH

Bei 3 Fällen war die Mehrfarben-FISH aufgrund zu geringer Zahl auswertbarer suspekter Zellen nicht auswertbar und die Verdachtsdiagnose der Zytologie blieb bestehen. In 6 zytologisch unklaren Fällen konnte mittels FISH als Zeichen einer malignen Transformation der suspekten Zellpopulation eine chromosomale Aneuploidie bestätigt werden (=positiv). Diese abschließende zytologische Diagnose stimmte mit dem Referenzstandard in allen 6 Fällen komplett überein.

### 3.4 Treffsicherheit der Zytologie mit adjuvanten Methoden

Im Folgenden wird der potenzielle Zugewinn an diagnostischer Treffsicherheit durch den Einsatz von DNA-Bildzytometrie und FISH untersucht. Letztlich ergaben hier 24 DNA-bildzytometrische Untersuchungen und 6 FISH Untersuchungen eine weitere Abklärung der initial „zweifelhaften“ oder „dringend verdächtigen“ Zytologie im Sinne einer finalen „positiven“ oder „negativen“ Diagnose bezüglich des Vorliegens eines malignen Tumors. In 3

Fällen wurde alleinige immunzytochemische Untersuchung zur Dignitätssicherung eingesetzt. Dies betrifft eine „zweifelhafte“ Zytologie mit finaler „negativer“ zytologischer und einer „negativen“ Follow-up Diagnose, sowie zwei „dringend verdächtige“ Zytologie mit finaler „positiver“ zytologischer und einer „positiven“ Follow-up Diagnose (vgl. Tabelle 17). In diesen Fällen ersetzt bei der Auswertung das Ergebnis der adjuvanten Untersuchung die initiale zytologische Diagnose. In Analogie zur deskriptiven statistischen Auswertung der alleinigen Zytologie in Kapitel 3.2.1. wird die diagnostische Treffsicherheit bei Verwendung von FISH, DNA-Bildzytometrie und Immunzytochemie in drei Auswertungsvarianten in Tabelle 13 wiedergegeben. Bei den zytologisch „zweifelhaften“ oder „dringend verdächtigen“ Untersuchungsmaterialien, an denen keine adjuvante Untersuchung durchgeführt werden konnte, bleibt die Diagnose bestehen.

Tabelle 13: Auswertungsvarianten zur Sensitivität und Spezifität der Zytologie mit dem Einsatz der adjuvanten Methode.

	Auswertungsvarianten		
	1 (d.V. und zw = positiv)	2 (d.V=positiv, zw=negativ)	3 (d.V. und zw=negativ)
Sensitivität	63,8% (362 von 567)	58,4% (331 von 567)	47,1% (267 von 567)
Spezifität	97,5% (1231 von 1263)	99,5% (1257 von 1263)	99,9% (1262 von 1263)
PPW	91,9% (362 von 394)	98,2% (331 von 337)	99,6% (267 von 268)
NPW	85,7% (1231 von 1436)	84,2% (1257 von 1493)	80,8% (1262 von 1562)
Gesamtreffsicherheit	87% (1593 von 1830)	86,8% (1588 von 1830)	83,5% (1529 von 1830)

Tabelle 14: Die Vierfeldertafel. Auswertungsvariante 1. zur Sensitivität und Spezifität der Zytologie mit dem Einsatz der adjuvanten Methoden.

		Follow-up		Total
		negativ	positiv	
Abschließende zytologische Untersuchung	negativ	1231	205	1436
	positiv	32	362	394
Total		1263	567	1830

Tabelle 15: Die Vierfeldertafel. Auswertungsvariante 2. zur Sensitivität und Spezifität der Zytologie mit dem Einsatz der adjuvanten Methoden.

		Follow-up		Total
		negativ	positiv	
Abschließende zytologische Untersuchung	negativ	1257	236	1493
	positiv	6	331	337
Total		1263	567	1830

Tabelle 16: Die Vierfeldertafel. Auswertungsvariante 3. zur Sensitivität und Spezifität der Zytologie mit dem Einsatz der adjuvanten Methoden.

		Follow-up		Total
		negativ	positiv	
Abschließende zytologische Untersuchung	negativ	1262	300	1562
	positiv	1	267	268
Total		1263	567	1830

Da bei insgesamt 1830 Datensätzen nur bei 35 eine Diagnose mit DNA-Bildzytometrie, FISH oder Immunzytochemie vorliegt, ist der Effekt auf die diagnostische Treffsicherheit im Vergleich zur alleinigen mikroskopischen Zytologie (vgl. Tabelle 7) insbesondere bei Auswertungsvariante 1 (dV/zw = positiv) nur gering. Den größten diagnostischen Zugewinn unter Berücksichtigung der Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie und der FISH ergibt sich bei Auswertungsvariante 2 (dV/zw = negativ), mit einer gegenüber der alleinigen Zytologie gestiegenen Sensitivität von 42,5% auf 47,1% bei gleichbleibender Spezifität. Auch bei Auswertungsvariante 3 (dV = positiv, zw = negativ) ergab sich eine allerdings geringere Steigerung der Sensitivität von 56,6% auf 58,4% bei gleichbleibender Spezifität.

### 3.5 Genauigkeit der zytologischen Tumortypisierung

#### 3.5.1 Beschreibung der Auswertungsvarianten für die Tumortypisierung

Im folgenden Abschnitt soll die Genauigkeit der histogenetischen Klassifikation eines malignen Tumors am zytologischen Untersuchungsmaterial ermittelt werden. Dies kann nun für die initiale, rein mikroskopisch ermittelte Tumorklassifikation erfolgen (n=241) oder für die

abschließende tumorpositive zytologische Diagnose nach sämtlichen eingesetzten adjuvanten Verfahren der Immunzytochemie, DNA-Bildzytometrie und FISH. Da insbesondere aufgrund der beiden letztgenannten Untersuchungsverfahren initial als „zweifelhaft“ oder „dringend verdächtig“ klassifizierte Fälle nachträglich „positiv“ klassifiziert werden konnten, ist die Zahl der für eine statistische Betrachtung verfügbaren Fälle hier größer (n=267) (vgl. folgende Abbildung 5).

Abbildung 5: Übersicht der Fälle mit Tumortypisierung.

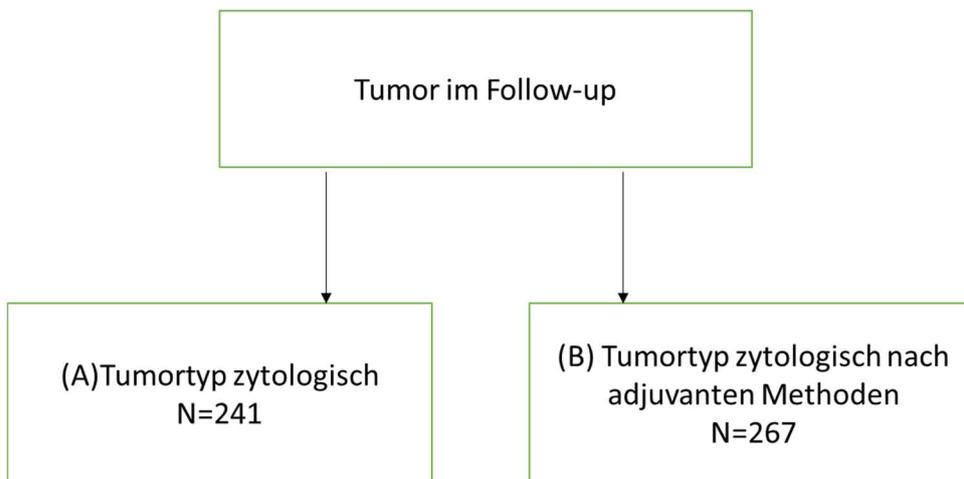


Tabelle 17: Zusammenfassung der Fälle mit adjuvanten Methoden.

		Immunzytochemie	Immunzytochemie und DNA-Zytometrie	DNA-Zytometrie	FISH
Gesamtzahl		76	4	29	9
hiervon: nicht abschließend beurteilbar		1	0	3	3
Adjuvante Untersuchung					
Zytologische Diagnose vor adjuvanter Untersuchung	Zytologische Diagnose nach adjuvanter Untersuchung				
Zweifelhaft	Negativ	1	1	5	0
Zweifelhaft	Positiv	0	0	6	1
Positiv	Positiv	72	0	2	0
Dringender Verdacht	Positiv	2	3	9	5

Die in Tabelle 17 grün hinterlegten Felder werden für die Korrelationsbestimmung der abschließenden zytologische Tumordiagnose mit dem Follow-up zusätzlich verwendet.

Für das Maß der Korrelation zwischen Zytologie und Follow-up wurden, wie im Kapitel 2.4 beschrieben, drei Grade der Übereinstimmung definiert:

1. Keine Übereinstimmung: der zytologisch bestimmte Tumortyp stimmt nicht mit dem Follow-up Tumortyp überein.
2. Partielle Übereinstimmung: die grobe Differenzierung des Gewebetyps zwischen Follow-up und Zytologie stimmt überein, aber nicht die genaue histogenetische Klassifikation.
3. Komplette Übereinstimmung: der zytologisch bestimmte Tumortyp stimmt mit dem Tumortyp im Follow-up überein.

### 3.5.2 Konventionelle (mikroskopische) zytologische Tumortypisierung

In dieser Auswertung wurden 241 Fälle, in denen konventionell zytologisch eine Tumordiagnose gestellt werden konnte, analysiert. Um die Richtigkeit der histogenetischen Tumorklassifikation zu überprüfen, werden diese Tumordiagnosen mit dem Follow-up verglichen (vergleiche Tabelle 18).

Im linken Teil der Tabelle sind jeweils die zytologisch bestimmten Tumortypen genannt. Die Korrelation mit der Tumorklassifikation im Follow-up gemäß der vordefinierten Grade der Übereinstimmung findet sich nebenstehend in absoluten Zahlen sowie als prozentuale Häufigkeiten für die jeweilige Tumorentität.

Tabelle 18: Konventionelle zytologische Tumortypisierung.

		Übereinstimmungsgrad (zytologisch vs klinisch)			
		keine Übereinstimmung	partielle Übereinstimmung	komplette Übereinstimmung	Total
Tumortyp (zytologisch)	Adenokarzinom	0 0,0%	5 21,7%	18 78,3%	<b>23</b> <b>100,0%</b>
	Maligner Tumor	0 0,0%	11 100,0%	0 0,0%	<b>11</b> <b>100,0%</b>
	Mischdifferenziertes Karzinom	0 0,0%	2 100,0%	0 0,0%	<b>2</b> <b>100,0%</b>
	Neuroendokrines Karzinom	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	<b>1</b> <b>100,0%</b>
	NKZ-Ca	3 2,3%	127 97,7%	0 0,0%	<b>130</b> <b>100,0%</b>
	Plattenepithelkarzinom	0 0,0%	1 3,6%	27 96,4%	<b>28</b> <b>100,0%</b>
	NSCLC	0 0,0%	11 100,0%	0 0,0%	<b>11</b> <b>100,0%</b>
	SCLC	4 11,4%	2 5,7%	29 82,9%	<b>35</b> <b>100,0%</b>
	<b>Total</b>	<b>7</b> <b>2,9%</b>	<b>159</b> <b>66,0%</b>	<b>75</b> <b>31,1%</b>	<b>241</b> <b>100,0%</b>

Ausgehend von insgesamt 241 Studienfällen, in denen zuvor konventionell zytologisch eine Tumordiagnose bereits gestellt werden konnte, wurde in 75 Fällen (31,1%) eine komplette Übereinstimmung ermittelt, in 159 Fällen (66,0%) eine partielle Übereinstimmung und in 7 Fällen (2,9%) keine Übereinstimmung mit dem Tumortyp des im Follow-up bestimmten Referenzstandards.

4 Fälle, in denen konventionell zytologisch die Diagnose eines „SCLC“ gestellt wurde, hatten keine Übereinstimmung mit den Follow-up Diagnosen. Hier wurde in zwei Fällen die Diagnose „Plattenepithelkarzinom“ sowie in jeweils einem Fall die Diagnosen „Adenokarzinom“ bzw. „B-Zell-Lymphom“ gestellt. Die 3 verbleibenden Fälle ohne Übereinstimmung mit dem zytologisch bestimmten Tumortyp „Nicht-kleinzelliges Karzinom (NKZ-Ca)“ erwiesen sich in zwei Fällen im Follow-up als malignes Melanom und in einem Fall als SCLC.

Der häufigste Tumortyp innerhalb dieser Subkohorte war das "Nicht-kleinzellige Karzinom" (n=130), das analog dieser sehr allgemein gehaltenen Diagnose in 98% (n=127) der Fälle partiell mit dem Referenzstandard-Tumortyp übereinstimmte. Komplette Kongruenz und somit korrekte zytologische Typisierung wies das Plattenepithelkarzinom aufgrund seiner in der konventionellen Mikroskopie oft charakteristischen zytologischen Merkmale in 96% der Fälle auf (n=27). Auch das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC), welches mikroskopisch ebenfalls gut zu diagnostizieren ist, wurde in 83% (n=29) richtig klassifiziert.

### **3.5.3 Tumortypisierung nach sämtlichen adjuvanten Verfahren, insbesondere Immunzytochemie**

In der Tabelle 19 wurden die abschließenden positiven zytologischen Diagnosen nach sämtlichen eingesetzten adjuvanten Verfahren der Immunzytochemie, DNA-Bildzytometrie und FISH mit dem Tumortyp im Follow-up verglichen. Ist bei einer initialen zytologischen tumorpositiven Diagnose keine adjuvante Untersuchung eingesetzt worden, wurde unabhängig von den Gründen die initiale zytologische Diagnose für diese Auswertung als abschließende zytologische Diagnose übernommen.

Tabelle 19: Tumortypisierung nach sämtlichen eingesetzten adjuvanten Verfahren.

		Übereinstimmungsgrad (zytologisch abschließend vs klinisch)			
		keine Übereinstimmung	partielle Übereinstimmung	komplette Übereinstimmung	Total
Tumortyp (zytologisch abschließend)	Adenokarzinom	0	1	22	23
		0,0%	4,3%	95,7%	100,0%
	Adenosquamöses Karzinom	0	0	2	2
		0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	LCNEC	0	0	1	1
		0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	Maligner epithelialer Tumor	0	1	0	1
		0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	Maligner Tumor	0	10	0	10
		0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	Metastase	0	0	10	10
		0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	Mischdifferenziertes Karzinom	3	3	0	6
		50,0%	50,0%	0,0%	100,0%
	Neuroendokrines Karzinom	0	0	1	1
		0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	NKZ-Ca	2	65	0	67
		3,0%	97,0%	0,0%	100,0%
	NSCLC	0	7	0	7
		0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
Plattenepithelkarzinom	1	7	39	47	
	2,1%	14,9%	83,0%	100,0%	
Pulmonales Adenokarzinom	1	2	52	55	
	1,8%	3,6%	94,6%	100,0%	
SCLC	2	2	33	37	
	5,4%	5,4%	89,2%	100,0%	
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>98</b>	<b>160</b>	<b>267</b>	
	<b>3,4%</b>	<b>36,7%</b>	<b>59,9%</b>	<b>100,0%</b>	

Der Einsatz von adjuvanten Methoden, insbesondere der Immunzytochemie, verbesserte erwartungsgemäß die Genauigkeit der histogenetischen Klassifikation der Tumoren: das macht sich bemerkbar durch die gestiegene Anzahl der Tumortypen im Vergleich zu den Ergebnissen der alleinigen mikroskopischen Tumortypisierung. Nachdem die adjuvanten Untersuchungen durchgeführt wurden, lag die prozentuelle Verteilung zwischen Fällen mit keiner, partieller und kompletter Übereinstimmung entsprechend bei 3%, 37% und 60%. Im Vergleich zu den Ergebnissen der rein zytologischen Tumortypisierung stieg die Anzahl der Fälle mit kompletter Übereinstimmung durch den zusätzlichen Einsatz der adjuvanten Methoden um 29 Prozentpunkte von 31% auf 60%. Die Anzahl der Fälle mit partieller Übereinstimmung ist von 66% auf 37% um 29 Prozentpunkte gesunken. Der Anteil der fehlklassifizierten Tumoren blieb insgesamt nahezu konstant. Nach den adjuvanten Untersuchungen wurden 9 Fälle ohne Übereinstimmung bei insgesamt 267 Proben identifiziert, was einen Anteil von 3,4% bedeutet.

Von den 9 Fällen ohne Übereinstimmung entfielen 3 Fälle auf das zytologisch bestimmte „mischdifferenzierte Karzinom“ und 2 Fälle „NKZ-Ca“, jeweils mit einer Follow-up Diagnose „SCLC“. Die Follow-up Diagnose „Adenokarzinom“ betraf jeweils ein Fall mit den zytologischen Tumortypen „Plattenepithelkarzinom“ und „SCLC“. Eine Follow-up Diagnose „B-Zell-Lymphom“ wurde zytologisch als „SCLC“ diagnostiziert. Der verbleibende Fall ohne Übereinstimmung bezog sich auf den zytologischen Tumortyp „pulmonales Adenokarzinom“ mit der Follow-up Diagnose „Plattenepithelkarzinom“. Durch zusätzliche Untersuchungen war ebenfalls eine differenziertere Klassifizierung des Adenokarzinoms möglich. Circa 1/3 der Fälle (n=52) mit dem rein zytologisch bestimmten Tumortyp NKZ-Ca wurden nach adjuvanter Untersuchung in kompletter Übereinstimmung mit dem Follow-up als „pulmonales Adenokarzinom“ klassifiziert. Insgesamt hat sich die Anzahl der Untersuchungsmaterialien mit dem Tumortyp NKZ-Ca im Vergleich zur entsprechenden Anzahl vor den adjuvanten Untersuchungen von 130 Fällen auf 67 reduziert.

#### **3.5.4 Tumortypisierung nur der immunzytochemisch untersuchten Fälle**

Es ist interessant, nur bei den auch tatsächlich immunzytochemisch untersuchten Fällen zu betrachten, wie sich die Verteilung der diagnostizierten Tumorentitäten vor- und nachher ergibt. Diese Korrelation ist bei 75 Untersuchungsmaterialien des untersuchten Kollektivs möglich. In dieser Auswertung wird zunächst die konventionelle zytologische Diagnose ohne den Einsatz der Immunzytochemie betrachtet (vergleiche Tabelle 20).

Tabelle 20: Zytologische Tumortypisierung vor Immunzytochemie.

		Übereinstimmungsgrad (zytologisch vor Immunzytochemie vs klinisch)			
		keine Übereinstimmung	partielle Übereinstimmung	komplette Übereinstimmung	Total
Tumortyp (zytologisch vor Immunzytochemie)	Adenokarzinom	0	1	4	5
		0,0%	20,0%	80,0%	100,0%
	Maligner Tumor	0	8	0	8
		0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	mischdifferenziertes Karzinom	0	1	0	1
		0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	NKZ-Ca	0	51	0	51
		0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	NSCLC	0	5	0	5
		0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
Plattenepithelkarzinom	0	0	3	3	
	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%	
SCLC	2	0	0	2	
	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>66</b>	<b>7</b>	<b>75</b>	
	<b>2,7%</b>	<b>88,0%</b>	<b>9,3%</b>	<b>100,0%</b>	

Eine Auswertung nach Immunzytochemie ist in Tabelle 21 angegeben:

Tabelle 21: Zytologische Tumortypisierung nach Immunzytochemie.

		Übereinstimmungsgrad (zytologisch abschließend vs klinisch)			
		keine Übereinstimmung	partielle Übereinstimmung	komplette Übereinstimmung	Total
Tumortyp (zytologisch abschließend)	Adenokarzinom	0	0	3	3
		0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	Adenosquamöses Karzinom	0	0	1	1
		0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	Maligner epithelialer Tumor	0	1	0	1
		0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	Maligner Tumor	0	2	0	2
		0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	Metastase	0	0	5	5
		0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	Mischdifferenziertes Karzinom	1	1	0	2
		50,0%	50,0%	0,0%	100,0%
	Neuroendokrines Karzinom	0	0	1	1
		0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	NKZ-Ca	0	12	0	12
		0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	Plattenepithelkarzinom	1	3	9	13
		7,7%	23,1%	69,2%	100,0%
Pulmonales Adenokarzinom	1	2	30	33	
	3,0%	6,1%	90,9%	100,0%	
SCLC	1	0	1	2	
	50,0%	0,0%	50,0%	100,0%	
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>21</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	
	<b>5,3%</b>	<b>28,0%</b>	<b>66,7%</b>	<b>100,0%</b>	

Im Vergleich zu den Ergebnissen der rein zytologischen Tumortypisierung stieg die Anzahl der Fälle mit kompletter Übereinstimmung durch den zusätzlichen Einsatz der Immunzytochemie um 58 Prozentpunkte von 9% auf 67%. Durch den Einsatz der Immunzytochemie ergab sich also meist eine exaktere Tumortypisierung; in Folge reduzierte sich die Zahl der Fälle mit partieller Übereinstimmung um 60 Prozentpunkte von 88% auf 28%.

Die Anzahl der zytologisch typisierten Fälle mit keiner Übereinstimmung ist von 2 auf 4 Fälle gestiegen. Die 2 Fälle ohne Übereinstimmung vor der immunzytochemischen Untersuchung betrafen den zytologisch bestimmten Tumortyp „SCLC“ mit den Follow-up Diagnosen „B-Zell-Lymphom“ sowie „Plattenepithelkarzinom“. Hiervon wurde ein Fall nach dem Einsatz der Immunzytochemie umklassifiziert von „SCLC“ zur abschließenden zytologischen Diagnose „Plattenepithelkarzinom“ und hatte folglich komplette Kongruenz mit dem Referenztumortyp. 3 weitere Fälle ohne Übereinstimmung nach dem Einsatz der Immunzytochemie betrafen die zytologischen Diagnosen „mischdifferenziertes Karzinom“ (Referenztumortyp „SCLC“), „Plattenepithelkarzinom“ (Referenztumortyp „Adenokarzinom“) und pulmonales „Adenokarzinom“ (Referenztumortyp „Plattenepithelkarzinom“).

Insbesondere konventionell mikroskopisch allgemein als „nicht-kleinzellig“ diagnostizierte Karzinome, insgesamt 51 Fälle, konnten nach Immunzytoschemie meist richtig subklassifiziert werden. Es verblieben hier lediglich 12 nicht weiter zu klassifizierenden Tumoren. Entsprechend stieg gleichzeitig die Anzahl der korrekt klassifizierten Tumorentitäten, z.B. beim „Plattenepithelkarzinom“, von 3 auf 9 oder der Diagnose eines „pulmonalen Adenokarzinoms“. Diese wurde in 30 Fällen mit kompletter Übereinstimmung erst durch die Immunzytochemie möglich. Die Anzahl der ebenfalls sehr allgemeinen zytologischen Diagnosen eines „malignen Tumors“ sank nach dem Einsatz der immunzytochemischen Untersuchungen von 8 auf 1. Die 5 Fälle pulmonaler Metastasen konnten nach Immunzytochemie korrekt als solche erkannt werden.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die zytologischen Diagnosen von endobronchial entnommenen zytologischen Proben, insbesondere endosonographisch gezielten Feinnadelpunktaten, Bronchiallavagen und Bronchialbürstungen, der klinischen Enddiagnose gegenüberzustellen, um die diagnostische Treffsicherheit dieser in der Krankenversorgung eingesetzten Verfahren im Zeitraum des Jahres 2015 zu ermitteln. Da in der Routinediagnostik nicht nur die rein mikroskopisch-morphologische Zytologie, sondern bei unklaren Fällen auch Zusatzmethoden wie DNA-Bildzytometrie und FISH sowie zur Tumortypisierung auch die Immunzytochemie zum Einsatz kommen, wurden diese Methoden ebenfalls evaluiert.

### 4.1 Patientenkollektiv

Insgesamt sind in der EU 85% der Lungenkrebstodesfälle auf das Rauchen zurückzuführen (91% Männer, 65% Frauen) (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie), 2018). Auch in dieser Arbeit wurde in den meisten Fällen ein Zusammenhang zwischen Lungenkrebs und Rauchen festgestellt. 42,3% der untersuchten Patienten waren im Erhebungszeitraum aktive und weitere 40% ehemalige Raucher. 4,9% der Patienten hatten nie geraucht. In 12,8% der Fälle gab es dazu keine anamnestischen Angaben.

Darüber hinaus zeigte sich eine geschlechtsspezifische Verteilung: Mit 56,9% liegt der Anteil der an Lungenkrebs erkrankten Männer höher als der der Frauen mit 43,1%. Der Trend der geschlechtsspezifischen Verteilung bei den eigenen Daten stimmt mit den Daten des RKI überein; auch dort liegt die Quote der an bösartigen Tumoren der Lunge neuerkrankten Männer mit 62,5% (35.960 Männer) höher als der der Frauen mit 37,6% (21.500 Frauen) (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V., 2019).

Weiterhin ließ sich feststellen, dass das Lungenkarzinom im größten Teil der Fälle erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie), 2018). Aus Tabelle 5 geht hervor, dass 35,6% der Untersuchungsmaterialien dem Stadium III zuzuordnen waren und 32,8% dem Stadium IV.

## 4.2 Erwartete Verteilung zytologischer Befundkategorien

Gemäß der Konsensusklassifikation der Deutschen Gesellschaften für Pathologie und Zytologie erfolgte anlässlich der Krankenversorgung nach mikroskopischer Zytologie in einem initialen Befundbericht die Einteilung in vier diagnostische Kategorien der Malignitätswahrscheinlichkeit (Böcking, 1998a; Böcking, 1998b). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten endobronchialen Entnahmeverfahren unterscheiden sich nach Metaanalysen in ihrer erwarteten Häufigkeit für einen zytologisch positiven Befund. Die Sensitivität für die Diagnostik zentraler und peripherer Lungentumoren beträgt für die Bürstenzytologie 59% und 52% und für die Lavage 48% und 43% und ist damit deutlich niedriger als für die EBUS-TbNa mit 93% (Schreiber und McCrory 2003; Gu et al. 2009). Da die Sensitivität in höherem Maße von der erfolgreichen Probenentnahme als von der mikroskopischen Diagnostik abhängt (Naryshkin und Bedrossian, 1995; Afify und Dávila, 1999; Crapanzano und Zakowski, 2001; Nodit et al., 2005), ist bei Entnahmemethoden mit niedriger Sensitivität wie Bürstenabstrichen, Bronchiallavagen und -sekreten bereits bei der mikroskopischen Untersuchung mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von suspekten Zellen zu rechnen.

Dies lässt sich gut an den in Tabelle 4 angegebenen Werten des eigenen Kollektivs ableiten: Die EBUS-TbNa war in 26,2% der Fälle „positiv“ und zeigte in weiteren 8,3% suspekten Zellen im Untersuchungsmaterial (zytologisch „zweifelhaft“ oder „dringender Verdacht“), wohingegen bei den Bürstenabstrichen nur 13,8% „positiv“ und 12,4% suspekt sowie bei den Bronchiallavagen und -sekreten sogar nur 6,1% „positiv“ und 7,9% suspekt waren.

In der Arbeit von Ren et al. waren die EBUS-TbNa-Proben in 47,5% „positiv“ und in 10,6% suspekt (Ren et al., 2021). Als für die zytologische Diagnostik unzureichend waren davon 0,98% einzustufen. Zum Vergleich: In der vorliegenden Arbeit lag dieser Wert bei 21,4%. Als ursächlich für die niedrigere Rate positiver EBUS-TbNa und höhere Rate unzureichender Befunde des eigenen Kollektivs mag möglicherweise die Aufteilung des Punkts für eine parallele histologische Untersuchung in einem anderen pathologischen Institut, wie sie seit einigen Jahren seitens der punktierenden Ärzte der Kaiserswerther Diakonie vorgenommen wird, herangezogen werden (persönliche Mitteilung Dr. Schramm 2021). Es gelangen meist nur noch zwei Ausstrichpräparate zur zytologischen Untersuchung. Diese Entwicklung hat etwa um den Studienzeitraum herum begonnen. Der genaue Beginn ist aber retrospektiv nicht mehr zu ermitteln, deswegen bleibt diese Einschätzung in gewisser Weise spekulativ.

Für Bronchialabstriche ermittelten Zhai et al. einen mit 18,5% den eigenen Daten gleichwertigen Anteil an suspekten und positiven Untersuchungsmaterialien. Bei den Bronchiallavagen lag der Anteil der positiven Untersuchungsmaterialien bei 7,3% in einer vergleichbaren Größenordnung und der der suspekten mit 21,9% um ein dreifaches höher (Zhai, 2015).

### **4.3 Malignitätswahrscheinlichkeit zytologischer Diagnosegruppen**

Die im Vorkapitel genannte Konsensusklassifikation gibt die Malignitätswahrscheinlichkeit mit folgenden diagnostischen Kategorien an: „Negativ“ = 0%, „Zweifelhaft“ = ca. 30%, „Dringender Verdacht“ = ca. 70% und „Positiv“ = 100%.

Die aus den eigenen Daten ermittelte Prä-Test-Wahrscheinlichkeit für eine maligne Läsion bei einer positiven Diagnose (vergleiche Tabelle 4) stimmte bei Bürstenabstrich und EBUS-TbNa in 100% mit den Erwartungswerten der Konsensusklassifikation überein. Bei den Bronchiallavagen und -sekreten gab es eine falsch positive Diagnose, entsprechend 98,4%. Da bei der endobronchialen Zytologie insbesondere bei Bürstenabstrichen, Bronchiallavagen und -sekreten mit einem größeren Stichprobenfehler gerechnet werden muss (Naryshkin und Bedrossian, 1995; Afify und Dávila, 1999; Crapanzano und Zakowski, 2001; Nodit et al., 2005; Chrabańska et al., 2020), sollte die Malignitätswahrscheinlichkeit der (dann falsch) negativen Diagnosen erwartungsgemäß von dem idealen Wert 0% abweichen. Dies war im eigenen Kollektiv bei 14,2% der Fall und für Bürstenabstriche mit 15,9%, 16,8% für Bronchiallavagen und -sekrete deutlich häufiger der Fall als für 7% der EBUS-TbNa. Aber auch bei „dringend verdächtiger“ Zytologie war die Prä-Test-Wahrscheinlichkeit für eine maligne Läsion mit 94,1% für das Gesamtkollektiv höher als die nach der Konsensusklassifikation erwarteten 70%. Bei Bürstenabstrichen lag die Malignitätswahrscheinlichkeit bei dieser Diagnosekategorie sogar bei 100% (14 Untersuchungsmaterialien). Auch bei „zweifelhafter“ Zytologie war die Malignitätswahrscheinlichkeit mit 58,1% deutlich höher als der Erwartungswert von 30%, insbesondere bei der EBUS-TbNa mit 71,4%.

Zusammenfassend stellte sich also heraus, dass die ermittelten Werte für die Prä-Test-Wahrscheinlichkeit bei „dringend verdächtigen“ und „zweifelhaften“ Diagnosen deutlich über den in der Konsensusklassifikation angegebenen Werten lagen. Eine mögliche Ursache hierfür wäre eine sehr vorsichtige Interpretation atypischer Zellveränderungen, welche einer malignen Läsion entstammen, und deren Klassifizierung als „dringend verdächtig“ oder als

„zweifelhaft“. Der Funktionsbereich Cytopathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf pflegt eine intensive Forschungstätigkeit der Abklärung zytologisch unklarer Befunde mittels adjuvanter Methoden wie AgNOR-Analyse, DNA-Bildzytometrie, Multicolour-FISH oder auch Analyse von Promotorhypermethylierung (Schmiemann et al., 2005; Onofre et al., 2008; Böcking et al., 2011; Schramm et al., 2011). Deshalb wird ein großes Methodenspektrum hierzu vorgehalten, was bei kleinsten Zweifeln an der Dignität einer Läsion seitens der diagnostizierenden Ärzte auch genutzt wird, das heißt die Schwelle zur Anwendung liegt niedrig. Die initiale zytologische Diagnose wird daher zunächst „zweifelhaft“ oder „dringend verdächtig“ sein und wird dann im Nachbericht - je nach Befund der adjuvanten Diagnostik - in vielen Fällen erst abschließend als „positiv“ oder „negativ“ klassifiziert.

Eine Studie von Layfield et al. (Layfield et al., 2015) untersuchte retrospektiv die Prä-Testwahrscheinlichkeitswerte der zytologischen Diagnosen der EBUS-TbNA-Proben aus pulmonalen Lymphknoten. Die Studie bewertete die Diagnosekriterien gemäß den Richtlinien der Papanicolaou-Gesellschaft für Zytologie als nicht-diagnostisch, gutartig, zweifelhaft (atypisch), dringend verdächtig und positiv. Als „zweifelhaft“ wurden Untersuchungsmaterialien mit wenigen atypischen Veränderungen der Zellkerne bezeichnet und „dringend verdächtig“ waren diejenigen Untersuchungsmaterialien, in denen stark abnorme Zellen in zu geringer Anzahl vorhanden waren, um eine definitive Diagnose zu ermöglichen (Layfield, 2016). Die Richtlinien der Papanicolaou-Gesellschaft für Zytologie sind hier also in etwa vergleichbar mit der deutschen Klassifikation. Die Malignitätswahrscheinlichkeit für „zweifelhafte“ Diagnosen lag hier bei 54% und für dringend verdächtige Fälle bei 82%, also ebenso wie die eigenen Werte für die EBUS-TbNA von 71,4% (zweifelhaft) und 93,5% (dringender Verdacht) über den in der deutschen Konsensusklassifikation hierfür angenommenen Werten.

#### **4.4 Treffsicherheit der alleinigen mikroskopischen Zytologie**

Da es in zytologischen Klassifikationssystemen nicht nur eindeutig „negative“ und „positive“ Diagnosekategorien, sondern auch noch „zweifelhafte“ und „dringende verdächtige“ gibt, muss für die Bestimmung der diagnostischen Treffsicherheit in „positiv“ und „negativ“ mittels Vierfeldertafeln dichotomisiert werden. Dies ergibt für die Analyse der eigenen Daten drei verschiedene mögliche Zuweisungsoptionen für die unklaren Diagnosekategorien, deren Ergebnisse für das Gesamtkollektiv in Tabelle 7 dargestellt sind. Wie auch das in Deutschland

und in der vorliegenden Arbeit verwendete Klassifikationssystem für die Zytologie haben auch in anderen Ländern verwendete Klassifikationssysteme eine Einteilung gemäß Malignitätswahrscheinlichkeit als Grundlage und verwenden in der Regel ebenso mindestens zwei Kategorien der diagnostisch unklaren Zytologie (Papanicolaou, 1954; Nayar und Wilbur, 2015; Layfield, 2016). Gelegentlich existiert in Abweichung von dieser Regel noch eine zytologisch „positive“ Kategorie für die Diagnose benigner Tumoren. Aufgrund der heterogenen Klassifikation und unterschiedlicher Zuordnungsmöglichkeiten unklarer zytologischer Befunde bei der Bestimmung der diagnostischen Treffsicherheit ist die Literaturlage im internationalen Vergleich unübersichtlich. Beim Literaturvergleich muss jeweils beachtet werden, welche Malignitätswahrscheinlichkeit einer Befundkategorie zugrunde liegt und wie die Dichotomisierung der unklaren zytologischen Befunde erfolgte. Deshalb wurden die Daten der vorliegenden Arbeit für drei mögliche Dichotomisierungsvarianten der unklaren zytologischen Befunde angegeben.

Variante 1: Einordnung von „zweifelhaften“ und „dringend verdächtigen“ Befunden als statistisch „positiv“: Diese Einteilung entspricht dem Stellenwert der Zytologie eines Suchtests und zielt auf eine möglichst hohe Sensitivität ab, die anhand der eigenen Daten für das Gesamtkollektiv 64,2% betrug.

Variante 2: Einordnung von „zweifelhaften“ und „dringend verdächtigen“ Befunden als statistisch „negativ“: Hierbei ist die Spezifität maximal, da ausschließlich zytologische Diagnosen eines malignen Tumors als statistisch „positiv“ gewertet werden. Bei einer derartigen Evaluation zeigt sich die hohe Spezifität zytologischer Malignitätskriterien, die in der Regel Werte von 99%-100% und in den eigenen Daten 99,9% erreicht. Die eigene Sensitivität ist dementsprechend im Gesamtkollektiv mit 42,5% geringer als bei den anderen Auswertungsvarianten.

Variante 3: Einordnung von „zweifelhaften“ Befunden als statistisch „negativ“ und „dringend verdächtigen“ Befunden gemäß der höheren theoretischen Malignitätswahrscheinlichkeit als statistisch „positiv“: Diese Variante ist in vielen überwiegend älteren Arbeiten zur zytologischen Treffsicherheit realisiert und stellt eine Balance zwischen Sensitivität und Spezifität dar. Eine Diskussion der eigenen Daten vor dem Hintergrund von Metaanalysen mit dieser Auswertungsvariante ist unten vorgenommen worden.

Bei sämtlichen Auswertungsvarianten ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Einordnung unklarer zytologischer Befunde als entweder „positiv“ oder „negativ“ lediglich einen statistischen Effekt darstellt. Für die klinische Versorgungsrealität ist beispielsweise eine zytologisch „positive“ Diagnose ganz anders zu werten als eine „dringend verdächtige“ oder „zweifelhafte“. Im ersteren Fall kann eine therapeutische Entscheidung erfolgen, wohingegen unklare Diagnosen weitere Abklärungsmaßnahmen oder Befundkontrollen nach sich ziehen. Dieser Aspekt kommt bei der bloßen statistischen Betrachtung von „Zahlen“ nicht heraus, muss aber immer mit bedacht werden, wenn aus Studienergebnissen zur diagnostischen Treffsicherheit Entscheidungen für einen zukünftigen Einsatz eines Tests in der Krankenversorgung erfolgen sollen. Im Funktionsbereich Cytopathologie wird die Auffassung vertreten, dass unklare zytologische Befunde weiter mittels adjuvanter Verfahren an bereits entnommenem Material abzuklären sind, wo immer möglich (persönliche Kommunikation Dr. Schramm). Neben Kosteneffizienz resultiert insbesondere für die Patienten eine Minimierung weiterer und belastender diagnostischer Prozeduren (Schramm et al., 2011). Entsprechend wird die mikroskopische Zytologie als Suchtest angesehen und auf maximale Sensitivität eingestellt, d. h. bereits „zweifelhafte“ Befunde lösen adjuvante Untersuchungen zur Abklärung und meist möglicher Überführung in eine abschließend „positive“ oder „negative“ Diagnose bezüglich eines malignen Tumors aus.

Da die in der vorliegenden Arbeit betrachteten Untersuchungsmaterialien jeweils unterschiedliche diagnostische Möglichkeiten haben, soll hier nur kurz ein Vergleich der Treffsicherheiten im Gesamtkollektiv mit Metaanalysen erfolgen und später detaillierter auf das jeweilige Untersuchungsmaterial eingegangen werden. Die Sensitivität und Spezifität der konventionell-mikroskopischen Diagnostik für alle Untersuchungsmethoden betrug in den eigenen Daten für das gesamte Kollektiv 56,6% und 99,5%, wobei zytologisch „dringend verdächtige“ Ergebnisse als statistisch positiv und „zweifelhafte“ Resultate als statistisch negativ gewertet wurden.

In einer retrospektiven Metaanalyse von Schreiber und McCrory hat die Bronchoskopie bei zentralen Tumoren eine Gesamtsensitivität aller bronchoskopischen Entnahmemethoden (endobronchiale Zangenbiopsie, Bürstenbiopsie, Bronchiallavage und EBUS-TbNa) von 88% (Schreiber und McCrory, 2003). Da hier die bei zentral gelegenen Tumoren mögliche Zangenbiopsie zur histologischen Untersuchung mit ausgewertet wurde, ist die Sensitivität naturgemäß höher als für die rein zytologischen Entnahmeverfahren aus der eigenen

Untersuchung. Für peripher gelegene Tumoren lag die Gesamtsensitivität der Metaanalyse bei 69%.

Eine Metaanalyse von Rivera et al. von Studien aus dem Zeitraum von 1970 bis 2001 beschreibt eine Gesamtsensitivität aller bronchoskopischen Methoden bei zentralen Tumoren von 88%. Bei peripheren Tumoren größer als 2 cm liegt der Wert bei 63% und bei einer Tumorgöße kleiner als 2 cm bei 34% (Rivera et al., 2013).

Die Sensitivitätswerte aus den oben genannten Metaanalysen berichten von recht großen Schwankungen, abhängig von Lokalisation, Größe des Tumors und Untersuchungsmethoden. Sie sind mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur Gesamtsensitivität nur eingeschränkt vergleichbar, insbesondere, weil die Unterscheidung „zentral“ und „peripher“ gelegener Tumoren hier nicht berücksichtigt wurde.

#### **4.4.1 Bronchiale Bürstenabstriche**

Bei der Analyse der verschiedenen Auswertungsvarianten für bronchiale Bürstenabstriche fällt auf, dass die Sensitivität eine große Bandbreite von 39,4% (Tabelle 8, Auswertungsvariante 2) bis 66,7% (Tabelle 8, Auswertungsvariante 1) zeigt. Die Spannbreite zwischen diesen Auswertungsvarianten ist mit 27,3% auch höher als für bronchiale Spülungen und Sekrete mit 21,8% und für EBUS-TbNA mit 19%. Eine mögliche Ursache wird nach Rücksprache mit den diagnostizierenden Ärzten des Funktionsbereichs Cytopathologie darin gesehen, dass häufiger aufgrund von Lufttrocknungsartefakten Befunde nur als zytologisch unklar klassifiziert werden können. So beträgt der Anteil von „zweifelhaften“ und „dringend verdächtigen“ Befunden bei den Bürstenabstrichen in der vorliegenden Arbeit 12,4% (vgl. Tabelle 4) und liegt damit höher als bei Bronchiallavagen und -sekreten mit 7,9% und EBUS-TbNA mit 8,3%. Die Werte der Bürstenabstriche für Sensitivität, Spezifität, PPW, NPW und Gesamttreffericherheit lagen in der Auswertungsvariante 2 (zweifelhaft = statistisch negativ, dringender Verdacht = statistisch positiv) bei 53,5%, 100%, 100%, 79,9% und 83,7%.

Chen et al. identifizierten in einer insgesamt 2538 Patienten umfassenden Metaanalyse eine gepoolte Sensitivität von 67% und Spezifität von 91% für Bronchialabstriche. Die in der Metaanalyse eingeschlossenen 17 Studien wiesen eine hohe Bandbreite der Sensitivitätswerte von 18% bis 86% auf. Nach Ansicht der Autoren könnte diese große Bandbreite auf unterschiedliche Studiendesigns, Patientenpopulationen sowie Tumorlagen zurückzuführen

sein. Die Zuordnung der zytologisch unklaren Proben für die statistische Auswertung ließ sich aus den Daten der Studien nicht konkret ableiten (Chen et al., 2021).

Eine Metaanalyse von Rivera et al. ergab eine gepoolte Sensitivität für Bürstenabstriche für das periphere Lungenkarzinom von 54% und für das zentrale Lungenkarzinom von 61% (Rivera et al., 2013).

In einer retrospektiven Metaanalyse von Schreiber und McCrory lag die ermittelte Sensitivität von Bürstenbiopsien für zentrale Lungentumore bei 59% und für periphere Lungentumore bei 52% (Schreiber und McCrory, 2003).

Da in der vorliegenden Arbeit nicht zwischen zentral und peripher gelegenen Lungenkarzinome differenziert wurde, sind die eigenen Ergebnisse nur bedingt mit den Metaanalysen von Rivera und Schreiber und McCrory vergleichbar. Dennoch ist die Sensitivität bei Auswertungsvariante 1 mit 66,7% höher und bei Auswertungsvariante 3 mit 53,5% gleich bis wenig geringer als die der Metaanalysen. Da insbesondere in der älteren Literatur meist zytologisch zweifelhafte Diagnosen als statistisch negativ und dringend verdächtige als statistisch positiv gewertet wurden, zeigt insbesondere die entsprechende Auswertungsvariante 3 (siehe Tabelle 8) eine vergleichbare Sensitivität und darüber hinaus eine perfekte Spezifität von 100%.

#### **4.4.2 Bronchiallavagen und sekrete-**

Ausgehend von der bereits genannten Interpretation zytologisch „zweifelhafte“ Fälle als negativ und zytologisch „dringend verdächtiger“ Fälle als positiv ergab die Auswertung der eigenen Kohorte für Bronchiallavagen und -sekrete eine Sensitivität von 37%, eine Spezifität von 99,5%, einen PPW von 96%, einen NPW von 81,7% und eine Gesamttrefferquote von 83,2% (Tabelle 9).

Bei den nachfolgenden drei Studien ist anzumerken, dass diese keine Erläuterungen zur Einordnung der zytologisch zweifelhaften oder dringend verdächtigen Diagnosen beinhalten:

In einer Studie von Bandyopadhyay et al. wurden insgesamt 50 Patienten mit vermutetem Lungenkrebs untersucht. Die bronchoskopischen Proben wurden bei jedem Patienten in folgender Reihenfolge entnommen: präbiopsische Bronchiallavage, Bürstenabstrich, Biopsie und postbiopsische Bronchiallavage. Die Sensitivität der präbiopsischen Bronchiallavagen lag

bei 32,4% und die der postbioptischen bei 35,1%. Die Spezifität lag in beiden Fällen bei 92,3% (Bandyopadhyay et al., 2016).

Auch Bodh et al. ermittelten in einer prospektiven Studie mit insgesamt 200 Untersuchungsmaterialien eine Sensitivität der postbioptischen Bronchiallavagen von 36,7% und eine Spezifität von 88,8% (Bodh et al., 2013).

Eine andere prospektive Studie von Choudhury et al. beinhaltete 35 Untersuchungsmaterialien und zeigte eine Sensitivität der Bronchiallavagen von 47,6% und eine Spezifität von 71,4% (Choudhury et al., 2012).

Die beiden erstgenannten Studien zeigen eine mit den eigenen Daten in etwa vergleichbare Sensitivität, allerdings bei einer deutlich schlechteren Spezifität. Insgesamt wird aber deutlich, dass die Technik der Lavage nicht selten keine Tumorzellen enthält, obwohl ein Tumorleiden vorliegt. Die wahrscheinlichste Ursache besteht darin, dass heutzutage Lungentumoren in der Mehrzahl der Fälle eher peripher lokalisiert sind. Zellen solcher Tumoren finden sich seltener bei bronchialen Spülungen und Sekretentnahmen, da hier die zentralen Atemwege besser zu erfassen sind. Insgesamt hat die Zahl der Bronchiallavagen und -sekrete in den letzten Jahren im Funktionsbereich Cytopathologie deutlich abgenommen (persönliche Mitteilung Dr. Schramm). Insbesondere mit den endobronchialen Punktionstechniken sind sensitivere Untersuchungsverfahren verfügbar und ermöglichen darüber hinaus eine molekularpathologische Untersuchung der gewonnenen Tumorzellen. Dies ist bei Lavagen nur selten möglich.

#### **4.4.3 EBUS TbNa**

Aus der Tabelle mit der Prä-Test-Wahrscheinlichkeit für EBUS-TbNa (Tabelle 5) ließ sich ableiten, dass für „zweifelhafte“ Diagnosen die Malignitätswahrscheinlichkeit bei 71,4% und für zytologisch „dringend verdächtige“ Diagnosen bei 93,5% lag. Somit wäre eine Auswertungsvariante zu präferieren, bei der "zweifelhafte" und "dringend verdächtige" Fälle als statistisch positiv gewertet werden, da überwiegend tumorpositive Krankheitsverläufe erwartet werden dürften. Diese Auswertung entspricht einem Einsatz als „Suchtest“. Bei dieser Interpretation („zweifelhafte“ und „dringend verdächtige“ Diagnosen statistisch positiv) lag die Sensitivität bei 87,9% und die Spezifität bei 98,2% (Tabelle 10).

Eine Metaanalyse von Gu et al. wertete 11 Studien mit insgesamt 1299 Patienten mit vermutetem oder zuvor diagnostiziertem Lungenkrebs aus und zeigte eine gepoolte Sensitivität der EBUS-TbNA von 93% und eine gepoolte Spezifität von 100% (Gu et al., 2009).

Adams et al. analysierten die Daten aus 10 Studien, die sich mit dem Staging mediastinaler Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit vermutetem oder zuvor diagnostiziertem Lungenkarzinom befassten (Adams et al., 2009). Sie bestimmten eine gepoolte Sensitivität für EBUS-TbNA von 88% und eine gepoolte Spezifität von 100%.

Figueiredo et al. evaluierten in einer Metaanalyse Studienresultate, die die diagnostische Treffsicherheit von EBUS-TbNA-Proben mit mediastinoskopisch entnommenen Proben verglichen haben. Die gepoolte Sensitivität der EBUS-TbNA-Proben lag bei 81% und Spezifität bei 100% (Figueiredo et al., 2020).

Die genannten Metaanalysen kalkulierten Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW gemäß der Standardparameter (richtig negativ, richtig positiv, falsch positiv und falsch negativ). Es lässt sich diesen Metaanalysen aber nicht entnehmen, ob einheitliche Kriterien der eingeschlossenen Studien für die statistische Zuordnung der zytologisch „zweifelhaften“ und „dringend verdächtigen“ zugrunde liegen. Da die Treffsicherheit aber hochgradig von der statistischen Einordnung der zytologisch unklaren Diagnosekategorien abhängig ist, sind die Ergebnisse der Metaanalysen nur eingeschränkt mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar (vergleiche Tabelle 10).

Ren et al ermittelten eine Sensitivität von 92,9% und eine Spezifität von 98,9%, wobei, wie in dieser Arbeit, die dringend verdächtigen Fälle als positiv und die zweifelhaften Fälle als negativ gewertet wurden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass abweichend von der Definition in dieser Arbeit die gutartigen Tumore als „positiv“ und nicht als „negativ“ klassifiziert worden sind.

Die mittels EBUS-TbNA entnommenen Untersuchungsmaterialien, insbesondere die zytologisch tumornegativen, müssen, um als adäquat bewertet werden zu können, die der Raumforderung entsprechenden Zellen enthalten. In verschiedenen Studien wurden beispielsweise die ausreichende Anwesenheit von Lymphozyten (z. B. > 40 Lymphozyten pro Gesichtsfeld mit 400facher Vergrößerung (HPF, high-power field) oder > 5 Felder bei 100facher Vergrößerung (LPF, Low-power field) mit jeweils >100 Lymphozyten und < 2 Gruppen von Bronchialzellen in jedem Feld) oder von Ansammlungen pigmentbeladener Makrophagen als Qualitätskriterium für ein repräsentatives Untersuchungsmaterial vorausgesetzt (Alsharif et al., 2008; VanderLaan et al., 2014). Auch die in Deutschland verwendete Konsensusklassifikation (Böcking 1998 a und b), die auch in der vorliegenden

Studie angewendet wurde, stuft Untersuchungsmaterialien mit Zellen, die nicht repräsentativ für den Entnahmeort bzw. die klinische Fragestellung sind, als „unzureichend“ ein, nennt allerdings keine Kriterien für die EBUS-TbNA.

#### **4.5 Falsch positive und falsch negative zytologische Diagnosen**

Im Gegensatz zu den zumeist ausgezeichneten Werten der Spezifität sind die Ergebnisse der mikroskopischen Zytologie für die Sensitivität noch optimierbar. Falsch negative Diagnosen bei Anwendung der Zytologie als Suchtest (jeweils Auswertungsvariante 1, Tabellen 7-10) traten im eigenen Gesamtkollektiv bei 14,2% auf und waren mit 15,9% bei Bürstenabstrichen und 16,8% bei Bronchiallavagen und -sekreten deutlich häufiger als bei EBUS-TbNa mit 7%. Die Mehrzahl der falsch-negativen Diagnosen wird in der Regel eher auf Stichprobenfehler (sampling error) als auf Interpretationsfehler (screening error) zurückgeführt (Afify und Dávila, 1999; Naryshkin und Young, 1993; Crapanzano und Zakowski, 2001). In einer von Nodit et al. durchgeführten Studie spielten Stichprobenfehler eine wichtige Rolle bei Fehldiagnosen in 97% der Bronchiallavagen und Bürstenproben (Nodit et al., 2005).

Die Studie von Biancosino et al. zeigte, dass intraoperativ entnommene Untersuchungsproben – aufgrund ihrer geringeren Sensibilität gegen Stichprobenfehler – eine gute diagnostische Treffsicherheit zeigen: Die Sensitivität betrug 94,8%, die Spezifität 98,8% und der PPW 99,8% (Biancosino et al., 2016). Dies spricht für eine gute Qualität der zytomorphologischen Malignitätsdiagnostik. Allerdings ist eine regelhafte operative diagnostische Abklärung nicht möglich und so bleibt die bronchoskopische Probengewinnung, die mit Schwierigkeiten der Materialentnahme behaftet ist zu Gunsten einer weniger invasiven Gewinnung.

Im Gegensatz zu falsch-negativen Befunden ist eine falsch-positive Diagnose häufig auf einen Interpretationsfehler zurückzuführen, der auf wenigen atypischen Zellen im Untersuchungsmaterial gründet (Biancosino et al., 2016). Auch atypische Typ-II-Pneumozyten, die oft in Zusammenhang mit einer organisierenden Pneumonie, Lungeninfarkt, ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrome), hyperbarer Sauerstofftherapie und verschiedenen Formen der Lungenfibrose (Saad und Silverman, 2010) auftreten, sind potentiell mit Tumorzellen verwechselbar, und führen möglicherweise zu einer falsch-positiven Interpretation (Idowu und Powers, 2010). Weiterhin können Pilzinfektionen und andere granulomatöse Erkrankungen, insbesondere Tuberkulose, zu reaktiven Plattenepithelatypen führen, die das verhornende

Plattenepithelkarzinom nachahmen (Crapanzano und Zakowski, 2001). Auch durch Strahlen- oder Chemotherapie induzierte zelluläre Veränderungen vermögen signifikante zelluläre Atypien hervorzurufen und so potentiell falsch-positive Diagnosen zu verursachen (Saad und Silverman, 2010).

In der vorliegenden Arbeit gab es eine Bronchiallavage, die zytologisch falsch als tumorpositiv klassifiziert wurde. Aus der Patientenakte konnte entnommen werden, dass die zytologische Diagnose falsch positiv war: die histopathologische Untersuchung zeigte chronisch-rezidivierende Entzündungszeichen mit umschriebener Plattenepithelmetaplasie ohne Anhalt für Malignität. Die klinische Diagnose entsprechend der anlässlich des Follow-ups eingesehenen Patientenakte lautete „multiples Myelom“. Zur Sicherheit wurde jedoch eine Verlaufskontrolle der Plattenepithelmetaplasien im linken Oberlappen mittels CT-Thorax und Bronchoskopie angeraten. Daten zum weiteren Verlauf lagen in der Patientenakte aber leider nicht vor, weshalb die letztliche Ursache für die zytologische Fehlinterpretation leider unklar bleiben muss.

Zur Einordnung und Vermeidbarkeit falsch positiver bronchiopulmonaler Zytologie findet sich folgende interessante Untersuchung: In einer Online-Befragung mit 137 teilnehmenden internationalen Zytomorphologen an 30 Präparationen der bronchiopulmonalen Zytologie, darunter 23 unklaren Befunden, wurden letztere eher falsch positiv als falsch negativ klassifiziert. Für die 5 am häufigsten falsch zugeordneten Fälle war das Ergebnis selbst der 20 besten Teilnehmer nicht besser als die Ratewahrscheinlichkeit (Glatz et al., 2006). Dies zeigt deutlich, dass einige Fälle rein mikroskopisch nicht lösbar sind und Zusatzuntersuchungen erforderlich machen.

#### **4.6 Adjuvante Untersuchungen nach unklaren zytologischen Befunden**

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden adjuvanten Methoden der chromosomalen Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und der DNA-Bildzytometrie in Hinblick auf ihre diagnostische Aussagekraft in der Anwendung an zytologisch „zweifelhaft“ oder „dringend verdächtig“ klassifizierten Präparaten für die Diagnostik von Malignomen der Lungen analysiert. Aus organisatorischen und ökonomischen Gesichtspunkten heraus ist eine Anwendung morphologiebasierter zusätzlicher Methoden zur Sicherung der Diagnose von

Malignität oder Gutartigkeit an zytologisch „negativ“ oder „positiv“ klassifizierten Untersuchungsmaterialien nicht sinnvoll. Eine zytologisch „positive“ Diagnose ist aufgrund hervorragender Spezifität der mikroskopischen Zytologie (Schreiber und McCrory 2003) nicht weiter abklärungsbedürftig. Bei „negativen“ Präparationen bringt aufgrund des Überwiegens von Stichprobenfehlern eine zusätzliche morphologiebasierte Diagnostik keinen oder nur einen marginalen Zugewinn und ist darüber hinaus bei der Vielzahl zytologisch „negativer“ Diagnosen zu aufwändig und teuer. Die initiale Vorstellung (Beispiel Urinzytologie (Sokolova et al., 2000; Halling und Kipp, 2008)), eine Mehrfarben-FISH zum Screening einzusetzen, ist aus vorgenannten Gründen selbst in reichen Industrienationen nicht in der diagnostischen Realität angekommen. Eine Anwendung in Entwicklungs- und Schwellenländern ist schwierig. So berichtet eine Studie der Khulna University of Engineering & Technology (KUET, Bangladesh), dass aufgrund der hohen Kosten und dem Mangel an Experten FISH-Untersuchungen in Entwicklungsländern äußerst selten eingesetzt werden (Ratan et al., 2017). Am meisten Sinn macht daher als zusätzliche Anwendung nach diagnostisch unklarer Zytologie ein sogenannter Reflextest. Diverse Studien zeigen, dass bei zytologisch unklaren bronchopulmonalen Präparaten eingesetzte FISH-Untersuchungen deutlich verbesserte Sensitivitätswerte hervorbringen. Savic et al. konnten mittels computergestützter Relokalisation und Multicolour-FISH bei diagnostisch unklaren Präparationen von 20 Bronchialbürstungen, 12 Bronchiallavage, 8 TBNAs und 4 Sputen bei hiervon insgesamt 45 auswertbaren Präparaten eine Sensitivität von 79% bei einer Spezifität von 100% erzielen (Savic et al., 2006). Schramm und Mitarbeiter erzielten durch FISH-Applikation in der Gruppe der diagnostisch unklaren zytologischen Befunde (n=56) mittels Multicolour-FISH eine Sensitivität von 79% bei einer Spezifität von 93% (Schramm et al., 2011). Es wurden hierbei die gleichen FISH-Sonden wie bei Savic et al. und in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Zum Vergleich wurde in der vorliegenden Arbeit eine Abklärung mittels FISH bei 9 Präparaten versucht. Bei 3 Fällen blieb auch nach Einsatz der FISH-Untersuchung die Verdachtsdiagnose der Zytologie aufgrund einer zu geringen Zahl suspekter Zellen bestehen. In 5 initial zytologisch „dringend verdächtigen“ Präparaten und einem „zweifelhaften“ Präparat wurde mittels FISH abschließend eine tumorpositive Diagnose gestellt. Alle 6 Fälle ließen sich eindeutig zuordnen und die zytologische Diagnose stimmte mit dem Referenzstandard in allen 6 Fällen komplett überein.

Die DNA-Bildzytometrie wurde bei 29 Untersuchungsmaterialien angewandt. Auch hier blieb bei 3 Fällen nach Einsatz der DNA-Bildzytometrie die Verdachtsdiagnose der Zytologie. Bei 2 von 29 Untersuchungsmaterialien wurde eine „positive“ zytologische Diagnose nach Einsatz

der DNA-Bildzytometrie bestätigt. Die verbleibenden 24 unklaren Fälle konnten eindeutig zugeordnet werden: von den 12 initial zytologisch zweifelhaften Präparaten wurde in 6 Fällen eine „negative“ und 6 Fällen eine „positive“ Diagnose gestellt. Die 12 initial „dringend verdächtigen“ Präparate wurden mittels DNA-Bildzytometrie als tumorpositiv diagnostiziert. Wertet man die DNA-Zytometrie-Untersuchungen dieser 24 Präparate unabhängig von der mikroskopischen zytologischen Diagnose aus, ergibt sich eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 100%. Die Gesamttrefferquote beträgt 91,7%, der PPW liegt bei 100%, und der NPW bei 66,7%. Schramm et al. erreichten bei unklaren zytologischen Diagnosekategorien eine den eigenen Daten vergleichbare Sensitivität der DNA-Bildzytometrie von 83% und eine Spezifität von 100% (Schramm et al. 2011). Die Untersuchungen wurden an einem Studienkollektiv bronchopulmonaler zytologischer Präparate (Bronchiallavagen, -bürstungen und TBNA) durchgeführt, das sich jeweils zu einem Drittel aus „positiven“, „negativen“ und unklaren Präparaten zusammensetzte. 48 der 64 zytologisch unklaren Präparate mit Follow-up Daten konnten hier mittels DNA-Bildzytometrie untersucht werden. Dies zeigt, dass die gut etablierten diagnostischen Kriterien einer Stammlinienaneuploidie und Einzelzellaneuploidie sehr gut geeignet sind, gutartige und bösartige Läsionen in der Lunge zu unterscheiden. Weiterhin wurde in der eigenen Arbeit eine Auswertung der Trefferquote für das gesamte Untersuchungskollektiv durchgeführt, bei der das Ergebnis der DNA-Bildzytometrie in diesen 24 Fällen den unklaren zytologischen Befund ersetzt. Diese Auswertung hat lediglich einen geringen Effekt mit 0,4%iger Verbesserung auf die Spezifität bei Wertung der nicht DNA-bildzytometrisch untersuchten verbleibenden „zweifelhaften“ und „dringend verdächtigen“ Präparate als statistisch positiv, allerdings bei Reduktion der Sensitivität ebenfalls um 0,4%. Der größte Zugewinn ergibt sich bei der Auswertung der nicht DNA-bildzytometrisch untersuchten „zweifelhaften“ und „dringend verdächtigen“ Präparate als negativ mit 4,6% gesteigener Sensitivität bei gleichbleibender Spezifität. Der Effekt ist bedingt durch die geringe Zahl adjuvanter DNA-bildzytometrischer Untersuchungen nicht groß. In der Literatur ist eine vergleichbare Auswertung an bronchopulmonalen Untersuchungsmaterialien nicht beschrieben. Velleuer et al. führten eine ähnliche Art der Auswertung an oralen Bürstenabstrichen durch (Velleuer et al., 2020). Die diagnostisch unklaren „zweifelhaften“ und „dringend verdächtigen“ zytologischen Befunde wurden in der Auswertung der diagnostischen Trefferquote der Zytologie als statistisch positiv gewertet. Die Sensitivität betrug 97,7%, die Spezifität 84,5%. In einer weiteren Auswertung mit zusätzlicher DNA-Bildzytometrie ersetzte die adjuvante DNA-bildzytometrische Diagnose die mikroskopische Zytologie, wenn das Präparat so zusätzlich untersucht werden konnte. Die so erreichte deutliche Steigerung der

Sensitivität auf 100% (Spezifität 92,2%) ist aber nur eingeschränkt mit den eigenen Daten vergleichbar, da Velleuer et al. orale Bürstenabstriche mit einem deutlich höheren Anteil zytologisch unklarer Präparate untersuchten.

Aus den Literaturdaten und der eigenen Arbeit kann man schließen, dass die Treffsicherheit der rein morphologischen Zytologie durch den Einsatz von adjuvanten Untersuchungen verbessert wird. In dieser Arbeit hatte die zusätzliche Anwendung der DNA-Bildzytometrie und FISH, bedingt durch eine nur geringe Fallzahl, statistisch keinen großen Effekt auf die Treffsicherheit im Gesamtkollektiv. Allerdings ist bei der rein statistischen Betrachtung der Wert in der diagnostischen Realität nicht berücksichtigt. Die unklaren Diagnosen werden nach adjuvanter Diagnostik mittels DNA-Bildzytometrie oder Mehrfarben FISH in eine abschließende „negative“ oder „positive“ Diagnose bezüglich Malignität überführt, was ein weiteres klinisches Handeln ermöglicht und zusätzliche und wiederholte Untersuchungen zur Abklärung reduziert.

#### **4.7 Immunzytochemische Tumorzelltypisierung**

Neben der Abklärung unklarer Ergebnisse nach rein zytologischen Untersuchungen kommen die adjuvanten Methoden auch bei der Tumorzelltypisierung zum Einsatz. In dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungsgut wurde bei 75 zytologisch „positiven“ oder „dringend verdächtigen“, nach DNA-Bildzytometrie und Immunzytochemie aber „positiven“ Untersuchungsmaterialien eine Tumortypisierung mittels Immunzytochemie durchgeführt (siehe Tabelle 17). Die histogenetische Tumorklassifikation der zytologischen Methoden wurde denen des klinischen Follow-ups gegenübergestellt. Dabei erschien eine Angabe des Grades der Übereinstimmung erforderlich. Es wird zwischen keiner Übereinstimmung, partieller Übereinstimmung und kompletter Übereinstimmung unterschieden. Anknüpfend wird detailliert besprochen, welchen Zugewinn immunzytochemische Untersuchungen für die Genauigkeit der Tumortypisierung bedeuten.

#### 4.7.1 Tumorzelltypisierung im Gesamtkollektiv

Hierbei wurde zunächst das Gesamtkollektiv mit 241 tumorpositiven Diagnosen und entsprechend tumorpositivem Follow-up vor Anwendung der Immunzytochemie betrachtet. Außerdem vergleichend hierzu die Genauigkeit der Tumortypisierung nach dem Einsatz sämtlicher adjuvanter Verfahren. Da einige zunächst unklare zytologische Diagnosen nach adjuvanter Verfahren abschließend positiv zu werten waren, war die Zahl der zu bewertenden Diagnosen hier mit 267 höher. Da bei dieser Auswertung nur in 75 Fällen eine Immunzytochemie vorlag, wurde zur Bestimmung der Genauigkeit der Tumorklassifikation im Gesamtkollektiv in den anderen Fällen das Ergebnis der morphologischen Zytologie zugrunde gelegt.

In der vorliegenden Arbeit hat die rein zytologische Tumortypisierung sehr verlässliche Ergebnisse gebracht. Die Anzahl der Fälle, bei denen keine Übereinstimmung zwischen dem zytologisch bestimmten Tumortyp und dem Referenzstandard-Tumortyp bestand, hat sich in beiden Analysen vor und nach sämtlichen eingesetzten adjuvanter Verfahren (Immunzytochemie, DNA-Bildzytometrie und FISH) mit 7 bzw. 9 Fällen ohne Übereinstimmung kaum verändert.

Probleme bei der (falschen) rein zytomorphologischen Klassifikation als SCLC bereiteten hier 2 Plattenepithelkarzinome, ein Adenokarzinom und ein B-Zell-Lymphom. Weiterhin wurden 2 Melanome und ein SCLC als Nicht-kleinzelliges Karzinom fehlklassifiziert.

4 von den 7 rein zytomorphologisch falsch als SCLC und NKZ-Ca klassifizierten Untersuchungsmaterialien stimmten nach dem Einsatz der immunzytochemischen Untersuchungen mit der Follow-up Diagnose (2 Plattenepithelkarzinome und 2 Melanome) überein. Die verbleibenden 3 Fälle hatten auch nach dem Einsatz sämtlicher adjuvanter Verfahren keine Übereinstimmung mit dem Follow-up Tumortyp (2 falsch rein zytomorphologisch als SCLC und 1 als NKZ-Ca typisierten Untersuchungsmaterialien).

Nach dem Einsatz sämtlicher adjuvanter Verfahren blieben insgesamt 9 Fälle ohne Übereinstimmung mit dem Follow-up Tumortyp. Hierunter entfielen 3 auf die oben genannten Fälle.

Die 6 verbleibenden Fälle unterteilten sich wie folgt: 3 Fälle mit der abschließenden zytologischen Diagnose „mischdifferenziertes Karzinom“ sowie 1 NKZ-Ca mit der Follow-up Diagnose „SCLC“, 1 Plattenepithelkarzinom mit der Follow-up Diagnose Adenokarzinom und 1 Adenokarzinom mit der Follow-up Diagnose Plattenepithelkarzinom.

Insbesondere das SCLC bietet gute zytomorphologische Diagnosekriterien, so dass gelegentlich nicht die Notwendigkeit einer weiteren Absicherung der Diagnose durch die Immunzytochemie gesehen wird oder auch aufgrund der bei dieser Entität häufigen regressiven Zellveränderungen technisch nicht möglich ist (Rivera und Mehta, 2007). Wie die eigenen Daten zeigen, ist eine Fehlklassifikation aber durchaus möglich. Auch das allerdings in Proben aus der Lunge sehr seltene amelanotische maligne Melanom ist zytomorphologisch oft schlecht von nicht-kleinzelligen Karzinomen abzugrenzen und findet sich in vielen Fallserien als fehlklassifizierte Entität (Giorgi et al., 2006; Kannapilly et al., 2013; Thomas et al., 2014; Xhemalaj et al., 2015).

Sigel et al. ermittelten anhand untersuchter Bronchialabstriche, Bronchiallavagen und trans-thorakaler FNA eine gute Übereinstimmung zwischen konventioneller zytologischer und histologischer Tumortypisierung für zwei Tumorentitäten (Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom) mit einem Konkordanzwert von 93% (Sigel et al., 2011). Also sind diese Entitäten konventionell-mikroskopisch bereits ohne die Anwendung der Immunzytochemie gut abzugrenzen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genauigkeit der Tumortypisierung bei Adenokarzinomen, Plattenepithelkarzinomen, mischdifferenzierten Karzinomen, neuroendokrinen Karzinomen, Nicht-kleinzelligen Karzinomen, SCLC und NSCLC untersucht. Der Anteil der partiell oder vollständig mit dem Referenzstandard übereinstimmenden Diagnosen lag hier bei 97,1%.

Kimbrell et al. ermittelten die Genauigkeit der konventionellen zytologischen Tumortypisierung von NSCLC an Bronchiallavagen, Bürstenabstrichen und CT-gesteuerten FNA's. In der Studie wurden die zytologischen mit den histologischen Diagnosen verglichen. Basierend allein auf zytomorphologischer Diagnostik konnte in 50% der Untersuchungsmaterialien (18 von 36 Proben) zytologisch ein Plattenepithelkarzinom und in 68% (49 von 72 Proben) ein Adenokarzinom spezifiziert werden (Kimbrell et al., 2012). Für die eigene Arbeit können hier Werte von 96,4% für das Plattenepithelkarzinom (27 von 28 Fällen mit kompletter Übereinstimmung) und 78,3% für das Adenokarzinom (18 von 23 Fällen mit kompletter Übereinstimmung) gegenübergestellt werden.

Rekhtman et al. konnten in 169 von 196 (88%) Zytologieproben allein nach zytomorphologischen Kriterien eine definitive Diagnose des NSCLC-Subtyps stellen. Es wurden nur primäre Lungenkarzinome ohne Metastasen anderer Tumoren in der Lunge berücksichtigt (Rekhtman et al., 2011).

Trotz relativ guter Genauigkeit der konventionellen Zytologie bei der histogenetischen Tumorklassifikation der häufigen Entitäten muss jedoch hervorgehoben werden, dass einige Fälle des NSCLC nicht weiter im Sinne eines Adenokarzinoms oder Plattenepithelkarzinoms subklassifiziert werden können und auch einige Fehlklassifikationen vorkommen. Vor dem in den letzten 10 Jahren deutlich gestiegenen Anspruch der Klassifizierungsgenauigkeit bedingt durch verfügbare differente Therapiemodalitäten bei den unterschiedlichen Entitäten, sollte allerdings, wenn immer möglich, eine weitere immunzytochemische Tumorklassifikation erfolgen. Hierbei ist materialschonend vorzugehen, da weitere molekularpathologische Untersuchungen auch an zytologischen Proben erfolgen können (Dietel et al., 2016; Travis et al., 2015).

Nach Einsatz der Immunzytochemie-, FISH- und DNA-Zytometrie hat sich die Zahl der Fälle mit kompletter Übereinstimmung in der eigenen Serie verdoppelt und stieg um 29 Prozentpunkte von 31% auf 60%. Somit lässt sich durch den Einsatz adjuvanter Methoden ein deutlicher Zugewinn der Typisierungsgenauigkeit für alle tumorpositiven Diagnosen feststellen. Die Fälle mit partieller Übereinstimmung sanken um 29 Prozentpunkte von 66% auf 37%. Die größte Gruppe mit partieller Übereinstimmung vor dem Einsatz der adjuvanten Methoden war erwartungsgemäß das Nicht-kleinzellige Karzinom mit 127 Fällen. Obwohl die NSCLC-Subtypisierung am chirurgischen Resektat relativ einfach durchzuführen ist, gibt es objektive Schwierigkeiten bei der Untersuchung kleiner Biopsien und zytologischer Proben, die meistens diejenigen Materialien sind, auf deren Basis die endgültige Diagnose gestellt wird (Rossi et al., 2009). Besonders bei schlecht differenzierten Tumoren liegen oft keine eindeutigen morphologischen Differenzierungszeichen vor. Daraus resultiert ein relativ hoher Prozentsatz von Fällen, die als nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom "*not otherwise specified*" diagnostiziert werden (Sigel et al., 2011). Auch wird heutzutage vor dem Hintergrund der Notwendigkeit der weiteren Subklassifizierung nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome für eine Stratifizierung insbesondere zur molekularen Therapie zytomorphologisch konservativ eher als „nicht-kleinzelliges Karzinom“ klassifiziert und wenn möglich eine weitere Klassifizierung der Immunzytochemie überlassen. Da die Lunge ein häufiges Metastasenorgan ist, wird mit der mikroskopischen Diagnose eines nicht-kleinzelligen Karzinoms auch noch die Möglichkeit einer Metastase offengelassen (Herold et al., 1996; Mitry et al., 2010; Xhemalaj et al., 2015). Es wird daher zunächst konventionell zytologisch eher nicht die Diagnose eines NSCLC gestellt. Erwartungsgemäß ist die Zahl der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Tumor-entitäten nach Immunzytochemie höher, vor allem aufgrund der weiteren Unterteilung der nicht-kleinzelligen Karzinome. Insbesondere die mit 52 Fällen häufige Entität des pulmonalen

Adenokarzinoms trat erst nach immunzytochemischer Diagnostik auf. 10 von 10 Metastasen wurden immunzytochemisch korrekt klassifiziert.

In der eigenen Arbeit lag der prozentuale Anteil der allgemein als Nicht-kleinzelliges Karzinom diagnostizierten Proben vor dem Einsatz der adjuvanten Methoden bei 53,9% (130 von 241 Fällen) und nach den adjuvanten Untersuchungen bei 25% (67 von 267 Fällen). Auch die Anzahl der Fälle mit der Diagnose NSCLC ließ sich auf diesem Wege von 11 auf 7 senken. Immunhistochemie (IHC) wird in der klinischen Praxis routinemäßig in der Diagnostik von Lungenkrebs angewandt, insbesondere bei kleinen Biopsaten oder zytologischen Proben (dann als Immunzytochemie) sowie schlecht zu differenzierenden Tumoren. Aktuell werden Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom effizient mit dem Schilddrüsen-Transkriptionsfaktor 1 (TTF1) und der p40-Färbung separiert, was in einem eigenen Abschnitt der WHO-Klassifikation von 2015 explizit empfohlen wird (Travis et al., 2015).

Mikroskopisch basieren die Definitionen von Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom (SqCC) auf ihren morphologischen Eigenschaften. Das Adenokarzinom wird als ein Karzinom mit azinären, papillären oder tubulären Strukturen oder Mucinproduktion definiert und zeigt zytologisch oft eine polare Zelldifferenzierung, wohingegen SqCC als ein Karzinom mit Keratinisierung oder interzellulären Brücken, zytologisch oft in fischzugähnlichen Verbänden und mit einem strähnig-wabig strukturiertem Zytoplasma verstanden wird (persönliche Kommunikation Dr. Schramm).

In der aktuellen WHO-Klassifikation wird empfohlen, ein solides Karzinom ohne Drüsenstrukturen oder Mucinproduktion, aber einer immunhistochemischen Positivität für „Adenokarzinom-Marker“ - z. B. TTF-1 und/oder Napsin A - als Adenokarzinom zu diagnostizieren. In ähnlicher Weise wird empfohlen, ein Karzinom ohne Keratinisierung oder interzelluläre Brücken, jedoch mit immunhistochemischer Positivität für „SqCC-Marker“ wie p40, Cytokeratin 5/6 und p63, als SqCC zu diagnostizieren (Inamura, 2018). Aber auch ein negativer TTF1-Befund kann das Vorliegen eines Adenokarzinoms nicht 100%ig ausschließen. Ebenso ist ein TTF1-positiver Befund differenziert zu bewerten, da auch andere Tumore wie z.B. großzellig-neuroendokrine Lungenkarzinome oder das allerdings nur äußerst selten pulmonal metastasierende Schilddrüsenkarzinom eine Immunreaktion zeigen können (Osmani et al., 2018). Die mikroskopischen Tumorkriterien verschiedener Entitäten sind daher auch bei der Interpretation der Immunreaktionen zu berücksichtigen.

Die Immunhistochemie (und Immunzytochemie) ist heute ein unverzichtbares Werkzeug für die diagnostische Pathologie, weist jedoch viele Fallstricke auf. Z.B. können neben zahlreichen anderen Entitäten einige schleimbildende Adenokarzinome des gastrointestinalen und des pankreatobiliären Traktes sowie muzinöse Karzinome der Eierstöcke, der Brust und anderer Organe in die Lunge metastasieren. Angesichts der Tatsache, dass die morphologische, insbesondere zytomorphologische Unterscheidung von primären Lungenadenokarzinomen mit muzinösen Merkmalen von metastasierten Läsionen oft schwierig ist, haben mehrere Forschungsgruppen die Rolle der Immunhistochemie in diesem Zusammenhang untersucht (Yatabe et al., 2019).

Für Therapie- und Staging-Zwecke ist es wichtig, zwischen primärem Lungenkrebs und Lungenmetastasen zu unterscheiden (Deniffel et al., 2021). Die Kenntnis der klinischen Anamnese eines bekannten extrapulmonalen Primärtumors und der radiologischen Befunde der Lunge könnten insbesondere bei limitiertem Untersuchungsmaterial wie in der Zytologie hilfreich sein, um durch richtige Auswahl der Primärantikörper gezielt zur richtigen Diagnose zu gelangen (Jin et al., 2018). Einige Tumore können ausreichend charakteristische zytomorphologische Merkmale aufweisen und so bei der Diagnostik an einen metastasierenden extrapulmonalen Primärtumor denken lassen. Zum Beispiel sollte das Vorhandensein großer Cluster von lose-kohäsiv bis diskohäsiv wachsenden Zellen mit ziemlich gleichmäßigen, langgestreckten und hyperchromatischen Kernen, die in Einheiten zum Teil „gartenzaunartig“ gelagert sind, an Darmkrebs als Primärtumor denken lassen. In ähnlicher Weise können zytomorphologisch täuschend unauffällige Zellcluster mit schaumigem, multivakuolisiertem Zytoplasma mit niedriger Kern-Plasma-Relation, runden Kernen, feinem Chromatin und variablen Nukleolen die Möglichkeit eines Nierenzellkarzinoms beinhalten. Das maligne Melanom wiederum kann eine ganze Vielzahl von Tumoren imitieren. Es erscheint jedoch üblicherweise als große diskohäsive, pleomorphe Zellen. Die Identifizierung von intranukleären Einschlüssen oder Melaninpigment hilft, die richtige Diagnose zu stellen. Dennoch ist das amelanotische maligne Melanom in der zytologischen diagnostischen Praxis oft schwer zu erkennen, wie auch die beiden fehlklassifizierten Fälle der eigenen Serie zeigen. Dennoch hilft die Kenntnis zytomorphologischer Besonderheiten bei der korrekten Auswahl der Primärantikörper zur immunzytochemischen Bestätigung.

In den schwierigeren Fällen sind keine besonderen morphologischen Unterscheidungsmerkmale vorhanden, die auf einen bestimmten Primärtumor hinweisen. Dieser Punkt ist einer der Gründe für den relativ hohen Anteil der 130 zunächst konventionell-mikroskopisch als Nicht-kleinzelliges Karzinom diagnostizierten Proben. Selbst in diesen Fällen sollte in der

pulmonalen Zytologie an eine Metastasierung gedacht werden und es sind zusätzliche immunzytochemische Tests erforderlich, um die Eingrenzung des Primärtumors vorzunehmen (Idowu und Powers, 2010). Nahezu die Hälfte der Fälle der eigenen Serie konnte mit diesem Vorgehen weiter charakterisiert werden und es verblieben noch 67 Proben mit der allgemeinen Diagnose eines Nicht-kleinzelligen Karzinoms.

#### **4.7.2 Tumortypisierung nur der immunzytochemisch untersuchten Fälle**

In der eigenen Serie wurde der Grad der Übereinstimmung der Tumortypisierung von Follow-up und Zytologie bei den 75 tumorpositiven Fällen untersucht, die auch tatsächlich immunzytochemisch weiter abgeklärt wurden. Durch diese Auswertung lässt sich der Wert des Zugewinns an diagnostischer Aussage noch eindrücklicher hervorheben als in der Analyse des Gesamtkollektivs. In Tabellen 20 und 21 ist dabei die Übereinstimmung zum Follow-up vor und nach der Anwendung der Immunzytochemie dargestellt. Bei den 5 hier erfassten Fällen bestätigte sich die zytologische Tumordiagnose „Metastase“ in Übereinstimmung mit dem Follow-up erst nach der immunzytochemischen Diagnostik. Durch den zusätzlichen Einsatz der Immunzytochemie stieg die mit dem Follow-up vollständig übereinstimmende Tumortypisierung um 56 Prozentpunkte von 9% auf 67%. Gleichzeitig reduzierten sich die Zahl der Fälle mit partieller Übereinstimmung um 60 Prozentpunkte von 88% auf 28%. Immunzytochemisch wurden 39 von 51 zunächst zytomorphologisch sehr allgemein als „nicht-kleinzellig“ diagnostizierte Karzinome richtig subklassifiziert. Entsprechend stieg gleichzeitig die Anzahl der korrekt klassifizierten Tumorentitäten, z.B. „Plattenepithelkarzinom“ von 3 auf 9 oder 30 Fälle eines „pulmonalen Adenokarzinoms“, die erst nach Immunzytochemie bei positiver Reaktion von TTF1 und/oder Napsin A möglich wurden. 4 Fälle (5,3%) wurden auch mittels Immunzytochemie wirklich fehlklassifiziert (siehe Tabelle 21). Dies betraf die Diagnose eines SCLC (Follow-up: B-Zell-Lymphom), eines mischdifferenzierten Karzinoms (Follow-up: SCLC), eines Adenokarzinoms (Follow-up: Plattenepithelkarzinom) und eines Plattenepithelkarzinoms (Follow-up: Adenokarzinom). Hier ist in erster Linie von technischen Schwierigkeiten bei der Immunzytochemie, insbesondere aufgrund präanalytischer Probleme wie z.B. Lufttrocknungsartefakten mit deshalb inkompletter Immunreaktion auszugehen (siehe folgender Abschnitt). Bei der Fehldiagnose eines Mischdifferenzierten Karzinoms kann

ursächlich die Möglichkeit einer Fehlinterpretation von im Untersuchungsmaterial vorkommenden pleomorphen Tumorzellen bei SCLC vorgelegen haben (Travis et al., 2015). Dies ist aber beschrieben und passt zur Diagnose eines SCLC.

Immunhistochemische Techniken spielen heute eine entscheidende Rolle als Diagnose- und Screening-Instrument für Lungenkrebs. Die Einschränkungen der Immunzytochemie sollten jedoch vollständig verstanden und beachtet werden. Die Genauigkeit der immunzytochemischen Untersuchung kann durch mehrere Faktoren beeinflusst werden: So führen verspätet oder ungenügend fixierte Untersuchungsmaterialien potenziell zu einem Verlust der immunzytochemischen Anfärbbarkeit. Auch ist die Beurteilung von immunzytochemischen Präparaten – ebenso wie die Beurteilung zytologischer und pathohistologischer Präparate – subjektiv. Die anhand des mikroskopischen Bildes richtige Auswahl eines Panels primärer Antikörper und die suffiziente Interpretation der immunzytochemischen Untersuchungen erfordert tiefgehende Fachkenntnisse sowie ein gewisses Maß an beruflicher Erfahrung des diagnostizierenden Pathologen (Inamura, 2018).

In einer Zeit der Präzisionsmedizin spielt die Immunhistochemie eine entscheidende Rolle bei der histogenetischen Klassifizierung von Tumoren und bei der Bewertung von Biomarkern für eine gezielte Therapie (Woo et al., 2017; Rossi et al., 2017; 2000; Thunnissen et al., 2018). Im Vergleich zu anderen Techniken bietet die Immunhistochemie eine Reihe von Vorteilen, darunter die Tatsache, dass sie allgemein verfügbar, technisch weniger anspruchsvoll und kostengünstig ist und eine schnelle Durchlaufzeit bietet (Inamura, 2018). Außerdem ist sie in Abgrenzung gegenüber molekularen Verfahren eine morphologische Methode, deren Ergebnis durch fachärztliche Expertise an der konkret zur Diagnostik anstehenden Zellpopulation überprüft werden kann. Auch wenn in vielen Fällen zur definitiven Diagnose eine immunhistochemische Untersuchung unentbehrlich ist, weist letztendlich kein immunhistochemischer Marker eine absolute Spezifität oder Sensitivität auf. Meist ist eine Markerkombination erforderlich. Das Immunprofil wie auch die molekularpathologische Analyse eines Tumors sollte immer im morphologischen Kontext interpretiert werden (Yatabe et al., 2019; Engels, 2020).

Zusammenfassend zeigt sich, dass sich in der Diagnostik des Lungenkarzinoms in der eigenen Serie zwei Drittel der Tumore zytomorphologisch und immunzytochemisch eindeutig klären ließen. Die Zahl der fehlklassifizierten Tumoren blieb gering. Auf diesem Wege gelingen über

die Tumorsicherung hinaus mit großer Zuverlässigkeit eine Zuordnung zu kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Karzinomen und die Subtypisierung nicht-kleinzelliger Karzinome als Basis für den Nachweis molekularer Besonderheiten (Gütz, 2011).

#### **4.8 Gegenwärtiger (2021) Stellenwert der Zytologie in der Diagnostik und Behandlung des Lungenkarzinoms**

In Abklärung, Staging, Behandlungsplanung sowie Verlaufsuntersuchungen des Lungenkarzinoms ist die Probengewinnung zur zytologischen Untersuchung ein fester Bestandteil neben der klinischen Untersuchung, der Bildgebung und der Histologie. Dabei wird für den Fall, dass eine Operabilität der Läsion besteht, angestrebt, die Dignität der Veränderung präoperativ zu klären und im Falle von Malignität eine Tumortypisierung vorzunehmen. In den vielen Fällen, in denen Lungenkarzinome in so fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert werden, dass sie nicht mehr mit operativ kurativem Therapieansatz primär behandelt werden können, stellen zytologische Materialien oder histologisch gewonnene Biopsien das einzige zur Verfügung stehende Tumorgewebe dar.

Daher kommt bioptisch bzw. zytologisch gewonnenem Untersuchungsmaterial eine besondere Bedeutung im oben genannten Kontext zu. Vor allem die endobronchialen Entnahmeverfahren mit Sekret- und Spülzytologie, Bürstenabstrichen, endobronchialen und transbronchialen Gewebebiopsien und der EBUS-TbNA lassen mittels morphologischer und morphologie-basierter immunhistochemischer und immunzytochemischer Verfahren eine präzise Diagnose der Tumorentität zu. Außerdem ist an den Proben eine auf der Tumorentität basierende molekulare Diagnostik zur Behandlungsplanung möglich. Da sämtliche adjuvanten molekularen Untersuchungen in der Regel nur an bioptisch gewonnenen histologischen und zytologischen Proben durchgeführt werden (Savic et al., 2012; Kraywinkel und Schönfeld, 2018), ist eine zell- und gewebeschonende Planung sämtlicher Untersuchungen und Prozessierung der Proben unbedingt erforderlich, um Wiederholungen der bronchoskopischen Probeentnahme möglichst zu vermeiden (Dietel et al., 2016). Molekulare Untersuchungen zur Zweit- oder Drittlinientherapie lassen sich dabei an archivierten zytologischen Proben auch viele Jahre nach der initialen Lungenkrebsdiagnose noch durchführen. Allerdings muss einschränkend hierbei das Spektrum der (therapierbaren) molekularen Veränderungen auf Grund der Evolution des Tumors nicht mehr dem Zustand bei Erstdiagnose entsprechen. Das

nationale Netzwerk genomische Medizin Lungenkrebs (nNGM) in Köln bietet eine Plattform für die standardisierte molekularpathologische Charakterisierung und ggf. die Möglichkeit des Einschlusses der Patienten in Therapiestudien (Büttner et al., 2019).

Die Anforderung an die Beurteilung zytologischen Untersuchungsmaterials für ein korrektes Staging von Lungentumoren und eine zielgerichtete Anwendung molekularer Methoden ist eine sichere Abgrenzung gut- und bösartiger Zellveränderungen sowie eine möglichst präzise Bestimmung der Tumorentität, wobei stets auch die Möglichkeit des Vorliegens einer Lungenmetastase eines anderweitigen Primärtumors, der klinisch noch gar nicht bekannt sein muss, zu berücksichtigen ist. Die korrekte Auswahl der geeigneten Zellen im zytologischen Untersuchungsmaterial für weitere immunzytochemische und molekularpathologische Untersuchungen setzt spezielle zytomorphologische Kenntnisse und Erfahrungen voraus, die insbesondere an zytologisch spezialisierten Standorten wie der Cytopathologie in Düsseldorf vorgehalten werden.

## 5 Zusammenfassung

Lungenkrebs ist eine der häufigsten Todesursachen unter allen Krebserkrankungen weltweit. Zytologische Untersuchungen sind neben klinischer Diagnostik, bildgebenden und endoskopischen Verfahren sowie bioptischen und operativen Gewebentnahmen leitliniengemäßer fester Bestandteil der morphologischen Diagnostik zur Tumorsicherung, Stadieneinteilung und Verlaufskontrolle. Hierbei werden vor allem endoskopisch gestützt zytologische Proben entnommen, wie endosonographisch gesteuerte Feinnadelpunktate von Tumorherden, regionalen Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen (EBUS TbNA), Bronchialsekrete, Bronchiallavagen und Bronchialbürstungen. Im Rahmen der Krankenversorgung werden diese Untersuchungsmaterialien konventionell mikroskopisch sowie – falls erforderlich – auch immunzytochemisch oder mittels DNA-Bildzytometrie sowie Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) weiter charakterisiert. Während immunzytochemische Untersuchungen eine Aussage über die histogenetische Tumorklassifikation ermöglichen, dienen die beiden letztgenannten Methoden der Diagnosesicherung bei mikroskopisch nicht eindeutig tumorpositiven oder -negativen Befunden.

Im Rahmen dieser statistischen Arbeit wurden die zytologischen Befunde des Funktionsbereichs Cytopathologie am UKD von endobronchial entnommenen Untersuchungsmaterialien aus der Klinik für Pneumologie, Kardiologie und internistische Intensivmedizin der Kaiserswerther Diakonie einem klinisch-histologischen Referenzstandard gegenübergestellt. Als positiver Referenzstandard für die Treffsicherheit der Zytologie wurde der den Krankenakten entnommene klinisch-histologische, zeitnahe (< 6 Monate) positive Tumorbefund definiert. Ein negativer Referenzstandard liegt vor bei einem mindesten 12monatigen tumorfreien Krankheitsverlauf. Zur Angabe der diagnostischen Treffsicherheit der zytologischen Methoden wurden Sensitivität, Spezifität, positiver prädikativer Wert, negativer prädikativer Wert sowie die Gesamttreffsicherheit mittels deskriptiver Statistik bestimmt. Ebenso wurden die zytologischen Tumordiagnosen mit dem Referenzstandard verglichen und die Klassifizierungsgenauigkeit mittels einer 3-stufigen Graduierung semiquantitativ angegeben.

Von insgesamt 2231 konsekutiv Untersuchungsmaterialien des Jahres 2015 entfielen insgesamt 401 Untersuchungsmaterialien, vor allem aufgrund zu spärlicher Follow-up Daten oder diagnostisch unzureichenden Untersuchungsmaterials. Auswertbar waren 543 EBUS-TbNA,

282 Bürstenabstriche und 1005 Bronchiallavagen von insgesamt 836 Patienten. Meist konnten zytologisch eindeutig tumorpositive- oder negative Diagnosen gestellt werden. Der Anteil unklarer, zytologisch zweifelhafter oder dringend verdächtiger Befunde aller Untersuchungsmaterialien war 8,6%. Die aus den Daten ermittelte Prä-Test-Wahrscheinlichkeit für eine maligne Läsion bei „dringend verdächtigen“ und „zweifelhaften“ Diagnosen lag deutlich über den in der Konsensusklassifikation der Deutschen Gesellschaften für Pathologie und Zytologie angegebenen Werten („dringender Verdacht“: 94,1% im Vergleich zu 70%; „zweifelhaft“: 58,1% im Vergleich zu 30%).

Je nach statistischer Zuordnung unklarer zytologischer Befunde als statistisch positiv oder negativ ergaben sich eine Sensitivität von 42,5% bis 64,2% bei einer Spezifität von 99,9% bis 97,1%. Bedingt durch eine nur geringe Fallzahl, hat die zusätzliche Anwendung der DNA-Bildzytometrie und FISH- keinen großen statistischen Effekt auf die Treffsicherheit (Sensitivität 47,1% bis 63,8%, Spezifität 99,9% bis 97,5%). In der klinischen Praxis werden aber zytologisch unklare Diagnosen weiter abgeklärt und in sicher tumorpositive oder –negative diagnostische Kategorien überführt, was ein klinisches Handeln ermöglicht.

Eine zusätzliche immunzytochemische Untersuchung wurde bei 75 Fällen angewandt. Im Gesamtkollektiv mit 241 tumorpositiven Diagnosen stimmten 31,1% und 66% mit dem entsprechend tumorpositiven Follow-up vollständig oder zumindest partiell überein. Diagnostische Probleme bei den 2,9% nicht übereinstimmenden Diagnosen bereiten hier insbesondere kleinzellige Tumoren sowie das (amelanotische) Melanom. Nach Immunzytochemie erhöhte sich der Anteil vollständig übereinstimmender Diagnosen auf 59,9%. Bei isolierter Betrachtung ausschließlich der 75 immunzytochemisch untersuchten Fälle ergab sich eine deutliche Steigerung der vollständig übereinstimmenden Tumorklassifikationen um 57,4%.

Zusammenfassend bestätigen die Daten der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit der Literaturlage die präzise Diagnostik und Bestimmung der Tumorentität mittels morphologiebasierter und immunzytochemischer Verfahren der endobronchial entnommenen Zytologie. Aufgrund der alkoholischen Fixation sind diese Untersuchungsmaterialien deshalb zusätzlich gut geeignet für eine auf der Tumorentität basierende molekulare Diagnostik zur Behandlungsplanung.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams K, Shah PL, Edmonds L, et al.: Test performance of endobronchial ultrasound and transbronchial needle aspiration biopsy for mediastinal staging in patients with lung cancer: systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2009;64:757–762 DOI: 10.1136/thx.2008.109868.
- Afify A, Dávila RM: Pulmonary fine needle aspiration biopsy. Assessing the negative diagnosis. *Acta cytologica* 1999;43:601–604 DOI: 10.1159/000331152.
- Akhtar N, Bansal JG: Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Current problems in cancer* 2017;41:328–339 DOI: 10.1016/j.currproblecancer.2017.07.002.
- Alsharif M, Andrade RS, Groth SS, et al.: Endobronchial ultrasound-guided transbronchial fine-needle aspiration: the University of Minnesota experience, with emphasis on usefulness, adequacy assessment, and diagnostic difficulties. *American journal of clinical pathology* 2008;130:434–443 DOI: 10.1309/BLLQF8KDHWW6MJNQ.
- Arastéh K, Baenkler H-W: *Innere Medizin, 3., überarb. Aufl.* Stuttgart, Thieme, 2013.
- Arteaga CL: The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2001;19:32S-40S.
- Baik CS, Myall NJ, Wakelee HA: Targeting BRAF-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: From Molecular Profiling to Rationally Designed Therapy. *The oncologist* 2017;22:786–796 DOI: 10.1634/theoncologist.2016-0458.
- Bandyopadhyay, Mallika Pal, Indranil Das, et al.: A study of usefulness of washes and brush cytology with respect to histopathology in diagnosis of lung malignancy by using fiberoptic bronchoscopy. *Clinical Cancer Investigation Journal* 2016;5:293 DOI: 10.4103/2278-0513.186107.
- Bender R: Interpretation von Effizienzmaßen der Vierfeldertafel für Diagnostik und Behandlung. *Med Klinik* 2001;96:116–121.  
<https://www.lambertus.de/assets/adb/e0/e02e52d8b8bbaf98.pdf>.
- Biancosino C, Krüger M, Vollmer E, et al.: Intraoperative fine needle aspirations - diagnosis and typing of lung cancer in small biopsies: challenges and limitations. *Diagnostic pathology* 2016;11:59 DOI: 10.1186/s13000-016-0510-6.
- Biesterfeld S, Schramm M, Schad A, et al.: Zytopathologische Ergussdiagnostik in der berufsgenossenschaftlichen Begutachtung von Asbest-assoziierten malignen

- Mesotheliomen und Lungenkarzinomen. *Pneumologie* (Stuttgart, Germany) 2014;68:270–276 DOI: 10.1055/s-0034-1365157.
- Böcking A: DNA measurements. When and why? In: Wied GL, Bartels PH, Rosenthal DL, Schenk V, eds. *Compendium on quality assurance, proficiency testing and workload limitations in clinical cytology*. Chicago: *Tutorials of Cytology* 1995:170–188.
- Böcking A: Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Der Pathologe* 1998a;19:235–236 DOI: 10.1007/s002920050280.
- Böcking A: Standardisierung der zytopathologischen Diagnostik. *Der Pathologe* 1998b;19:236–241 DOI: 10.1007/s002920050281.
- Böcking A, Motherby H: Abklärung zervikaler Dysplasien mittels DNA-Bild-Zytometrie. *Der Pathologe* 1999;20:25–33 DOI: 10.1007/s002920050316.
- Böcking A, Motherby H, Pomjanski N: Treffsicherheit der Ergusszytologie samt adjuvanten Untersuchungsmethoden. *Dtsch Arztebl International* 2000;97(40):A 2626–2630.
- Böcking A, Sproll C, Stöcklein N, et al.: Role of brush biopsy and DNA cytometry for prevention, diagnosis, therapy, and followup care of oral cancer. *Journal of oncology* 2011;2011:875959 DOI: 10.1155/2011/875959.
- Bodh A, Kaushal V, Kashyap S, et al.: Cytohistological correlation in diagnosis of lung tumors by using fiberoptic bronchoscopy: study of 200 cases. *Indian journal of pathology & microbiology* 2013;56:84–88 DOI: 10.4103/0377-4929.118661.
- Bohle RM, Schnabel PA: Grading von Lungenkarzinomen. *Der Pathologe* 2016;37:314–319 DOI: 10.1007/s00292-016-0175-7.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al.: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018;68:394–424 DOI: 10.3322/caac.21492.
- Bubendorf L: Vorläuferläsionen des Lungenkarzinoms. *Der Pathologe* 2011;32 Suppl 2:218–223 DOI: 10.1007/s00292-011-1527-y.
- Bubendorf L, Lantuejoul S, Langen AJ de, et al.: Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens: Number 2 in the Series "Pathology for the clinician" Edited by Peter Dorfmueller and Alberto Cavazza. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 2017;26 (144):170007 DOI: 10.1183/16000617.0007-2017.
- Büttner R, Wolf J, Kron A: Das nationale Netzwerk Genomische Medizin (nNGM) : Modell für eine innovative Diagnostik und Therapie von Lungenkrebs im Spannungsfeld eines

- öffentlichen Versorgungsauftrages. *Der Pathologe* 2019;40:276–280 DOI: 10.1007/s00292-019-0605-4.
- Butz M (ed): *Dokumentation des Berufskrankheiten-Geschehens in Deutschland: Beruflich verursachte Krebserkrankungen; eine Darstellung der im Zeitraum 1978 bis 2010 anerkannten Berufskrankheiten*, 10., überarb. und erg. Aufl., April 2012. Berlin, Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV), 2012.
- Chandra S, Nehra M, Agarwal D, et al.: Diagnostic accuracy of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle biopsy in mediastinal lymphadenopathy: a systematic review and meta-analysis. *Respiratory care* 2012;57:384–391 DOI: 10.4187/respcare.01274.
- Chen C-C, Bai C-H, Lee K-Y, et al.: Evaluation of the diagnostic accuracy of bronchial brushing cytology in lung cancer: A meta-analysis. *Cancer cytopathology* 2021;129(9):739–749 DOI: 10.1002/cncy.22436.
- Choi JR, Koh SB, Kim HR, et al.: Radon Exposure-induced Genetic Variations in Lung Cancers among Never Smokers. *Journal of Korean medical science* 2018;33:e207 DOI: 10.3346/jkms.2018.33.e207.
- Choudhury M, Singh S, Agarwal S: Efficacy of bronchial brush cytology and bronchial washings in diagnosis of non neoplastic and neoplastic bronchopulmonary lesions. *Turk patoloji dergisi* 2012;28:142–146 DOI: 10.5146/tjpath.2012.01113.
- Chrabańska M, Środa M, Kiczmer P, et al.: Lung Cancer Cytology: Can Any of the Cytological Methods Replace Histopathology? *Journal of cytology* 2020;37:117–121 DOI: 10.4103/JOC.JOC\_168\_19.
- Cohen JF, Korevaar DA, Altman DG, et al.: STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. *BMJ (Clinical research ed.)* 2016;6:e012799 DOI: 10.1136/bmjopen-2016-012799.
- Coons AH: The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. *The Journal of Immunology* 1942;45:159–170. <https://www.jimmunol.org/content/45/3/159>.
- Crapanzano JP, Zakowski MF: Diagnostic dilemmas in pulmonary cytology. *Cancer* 2001;93:364–375 DOI: 10.1002/cncr.10136.
- Darby S, Hill D, Auvinen A, et al.: Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ (Clinical research ed.)* 2005;330:223 DOI: 10.1136/bmj.38308.477650.63.
- Deniffel D, Sauter A, Fingerle A, et al.: Improved differentiation between primary lung cancer and pulmonary metastasis by combining dual-energy CT-derived biomarkers with

- conventional CT attenuation. *European Radiology* 2021;31:1002–1010 DOI: 10.1007/s00330-020-07195-9.
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0 2018. <http://leitlinienprogramm-onkologie/Lungenkarzinom.98.0.html>.
- Dietel M, Bubendorf L, Dingemans A-MC, et al.: Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax* 2016;71:177–184 DOI: 10.1136/thoraxjnl-2014-206677.
- Doll R, Hill AB: Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *British medical journal* 1950;2:739–748 DOI: 10.1136/bmj.2.4682.739.
- Engels M: Zytologie der primären Lungenkarzinome. *Der Pathologe* 2020;41:32–38 DOI: 10.1007/s00292-019-00745-z.
- Ernst A, Anantham D, Eberhardt R, et al.: Diagnosis of mediastinal adenopathy-real-time endobronchial ultrasound guided needle aspiration versus mediastinoscopy. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2008;3:577–582 DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181753b5e.
- Feichter G, Dalquen P: *Zytopathologie: Mit 94 Tabellen*. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag Berlin and Heidelberg, 2000.
- Feulgen R, Rossenbeck H: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die- darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 1924;135:203–248 DOI: 10.1515/bchm2.1924.135.5-6.203.
- Figueiredo VR, Cardoso PFG, Jacomelli M, et al.: EBUS-TBNA versus surgical mediastinoscopy for mediastinal lymph node staging in potentially operable non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia* 2020;46:e20190221 DOI: 10.36416/1806-3756/e20190221.
- Ganten D, Ruckpaul K (eds): *Grundlagen der Molekularen Medizin, 2., überarbeitete und erweiterte Auflage*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer, 2003.
- Garner D: Clinical application of DNA ploidy to cervical cancer screening: A review. *World journal of clinical oncology* 2014;5:931–965 DOI: 10.5306/wjco.v5.i5.931.

- Gaskin J, Coyle D, Whyte J, et al.: Global Estimate of Lung Cancer Mortality Attributable to Residential Radon. *Environmental Health Perspectives* 2018;126:057009(1-8) DOI: 10.1289/EHP2503.
- Gasparini S: Histology versus cytology in the diagnosis of lung cancer: is it a real advantage? *Journal of bronchology & interventional pulmonology* 2010;17:103–105 DOI: 10.1097/LBR.0b013e3181dab056.
- Gee JB: Bronchoalveolar lavage. *Thorax* 1980;35:1–8 DOI: 10.1136/thx.35.1.1.
- Giorgi V de, Sestini S, Massi D, et al.: Dermoscopy for "true" amelanotic melanoma: a clinical dermoscopic-pathologic case study. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2006;54:341–344 DOI: 10.1016/j.jaad.2005.04.040.
- Glatz K, Savic S, Glatz D, et al.: An online quiz uncovers limitations of morphology in equivocal lung cytology. *Cancer* 2006;108:480–487 DOI: 10.1002/cncr.22286.
- Gu P, Zhao Y-Z, Jiang L-Y, et al.: Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for staging of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2009;45:1389–1396 DOI: 10.1016/j.ejca.2008.11.043.
- Gütz S: Zytologie in der Pneumologie. *Pneumologie* 2011;8:345–348 DOI: 10.1007/s10405-010-0472-4.
- Halling KC, Kipp BR: Bladder cancer detection using FISH (UroVysion assay). *Advances in anatomic pathology* 2008;15:279–286 DOI: 10.1097/PAP.0b013e3181832320.
- Haroske G, Baak JP, Danielsen H, et al.: Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Analytical cellular pathology : the journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology* 2001;23:89–95 DOI: 10.1155/2001/657642.
- Hattori S, Matsuda M, Sugiyama T, et al.: Cytologic Diagnosis of Early Lung Cancer: Brushing Method under X-ray Television Fluoroscopy. *Diseases of the Chest* 1964;45:129–142. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0096021715343739>.
- Hengstmann H, Wittekind D: Zytologische Frühdiagnose des Bronchialkarzinoms mit Hilfe der gezielten Bronchialsonde. *Dtsch med Wochenschr* 1950;75:101–104 DOI: 10.1055/s-0028-1117800.
- Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C: The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 2018;553:446–454 DOI: 10.1038/nature25183.
- Herold CJ, Bankier AA, Fleischmann D: Lung metastases. *Eur. Radiol.* 1996;6:596–606 DOI: 10.1007/BF00187656.

- Herth F, Becker HD, LoCicero J, et al.: Endobronchial ultrasound in therapeutic bronchoscopy. *The European respiratory journal* 2002;20:118–121 DOI: 10.1183/09031936.02.01642001.
- Herth F, Bubendorf L, Gütz S, et al.: Diagnose und prädiktive Analysen an zytologischen und bioptischen Tumorproben nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome: Aktuelle Strategien und Herausforderungen. *Pneumologie* 2013;67:198–204 DOI: 10.1055/s-0032-1326344.
- Herth FJF, Becker HD, Eberhardt R: Endobronchialer Ultraschall beim Bronchialkarzinom. *Der Radiologe* 2004;44:457–464 DOI: 10.1007/s00117-004-1045-5.
- Hilgers R-D, Bauer P, Scheiber V: Einführung in die Medizinische Statistik, 2. Auflage. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag Berlin and Heidelberg, 2007.
- Holla VR, Elamin YY, Bailey AM, et al.: ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harbor molecular case studies* 2017;3:a001115 DOI: 10.1101/mcs.a001115.
- Idowu MO, Powers CN: Lung cancer cytology: potential pitfalls and mimics - a review. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2010;3:367–385.
- Inamura K: Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer. *Cancers* 2018;10:72 DOI: 10.3390/cancers10030072.
- Jiang J, Browning R, Lechtzin N, et al.: TBNA with and without EBUS: a comparative efficacy study for the diagnosis and staging of lung cancer. *Journal of thoracic disease* 2014;6:416–420 DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.22.
- Jin K, Wang K, Zhang H, et al.: Solitary Pulmonary Lesion in Patients with History of Malignancy: Primary Lung Cancer or Metastatic Cancer? *Ann Surg Oncol* 2018;25:1237–1244 DOI: 10.1245/s10434-018-6360-6.
- Kadara H, Scheet P, Wistuba II, et al.: Early Events in the Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 2016;9:518–527 DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-15-0400.
- Kannapilly A, Heigener D, Feldmann W, et al.: Das amelanotische Melanom: Differenzialdiagnose bei thorakalen Malignomen. *Pneumologie* 2013;67:36 DOI: 10.1055/s-0033-1334569.
- Kaur M, Handa U, Mohan H, et al.: Evaluation of brush cytology and DNA image cytometry for the detection of cancer of the oral cavity. *Diagnostic cytopathology* 2016;44:201–205 DOI: 10.1002/dc.23422.
- Kerr KM: Pulmonary preinvasive neoplasia. *Journal of clinical pathology* 2001;54:257–271 DOI: 10.1136/jcp.54.4.257.

- Kimbrell HZ, Gustafson KS, Huang M, et al.: Subclassification of non-small cell lung cancer by cytologic sampling: a logical approach with selective use of immunocytochemistry. *Acta cytologica* 2012;56:419–424 DOI: 10.1159/000338519.
- Kleeh H.: Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group. *The European respiratory journal* 1989;2 6:561–585.
- Kraywinkel K, Schönfeld I: Epidemiologie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms in Deutschland. *Onkologie* 2018;24:946–951. <https://doi.org/10.1007/s00761-018-0480-2>.
- Kroegel C, Costabel U: *Klinische Pneumologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2014.
- Kuo C-H, Chen H-C, Chung F-T, et al.: Diagnostic value of EBUS-TBNA for lung cancer with non-enlarged lymph nodes: a study in a tuberculosis-endemic country. *PloS one* 2011;6:e16877 DOI: 10.1371/journal.pone.0016877.
- Lantz PM, Mendez D, Philbert MA: Radon, smoking, and lung cancer: the need to refocus radon control policy. *American journal of public health* 2013;103:443–447 DOI: 10.2105/AJPH.2012.300926.
- Layfield LJ: The Papanicolaou Society of Cytopathology classification for pulmonary specimens: an overview. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology* 2016;27:149–152 DOI: 10.1111/cyt.12344.
- Layfield LJ, Dodd L, Witt B: Malignancy risk for the categories: Non-diagnostic, benign, atypical, suspicious, and malignant used in the categorization of endobronchial ultrasound guided-fine needle aspirates of pulmonary nodules. *Diagnostic cytopathology* 2015;43:892–896 DOI: 10.1002/dc.23326.
- Lee HS, Kwon SY, Kim DK, et al.: Determinants of diagnostic bronchial washing in peripheral lung cancers. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2007;11:227–232. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17263296/>.
- Lilo MT, Allison DB, Younes BK, et al.: The critical role of EBUS-TBNA cytology in the staging of mediastinal lymph nodes in lung cancer patients: A correlation study with positron emission tomography findings. *Cancer cytopathology* 2017;125:717–725 DOI: 10.1002/ency.21886.
- Lim JH, Kim MJ, Jeon S-H, et al.: The optimal sequence of bronchial brushing and washing for diagnosing peripheral lung cancer using non-guided flexible bronchoscopy. *Scientific reports* 2020;10:1036 DOI: 10.1038/s41598-020-58010-w.

- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al.: Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2018;13:323–358 DOI: 10.1016/j.jtho.2017.12.001.
- Mariano VS, Leal LF, Pastrez PRA, et al.: Lung cancer samples preserved in liquid medium: One step beyond cytology. *Diagnostic cytopathology* 2017;45:915–921 DOI: 10.1002/dc.23743.
- Mitry E, Guiu B, Cosconea S, et al.: Epidemiology, management and prognosis of colorectal cancer with lung metastases: a 30-year population-based study. *Gut* 2010;59:1383–1388 DOI: 10.1136/gut.2010.211557.
- Mix E, Zettl UK: *Klinische Neuroimmunologie*. Berlin, Boston, De Gruyter, 2015.
- Myrvik QN, Leake ES, Fariss B: Studies on Pulmonary Alveolar Macrophages from the Normal Rabbit: A Technique to Procure Them in a High State of Purity. *The Journal of Immunology* 1961;86:128–132. <https://www.jimmunol.org/content/86/2/128>.
- Naryshkin S, Bedrossian CW: Selected mimics of malignancy in sputum and bronchoscopic cytology specimens. *Diagnostic cytopathology* 1995;13:443–447 DOI: 10.1002/dc.2840130513.
- Naryshkin S, Young NA: Respiratory cytology: a review of non-neoplastic mimics of malignancy. *Diagnostic cytopathology* 1993;9:89–97 DOI: 10.1002/dc.2840090120.
- Nayar R, Wilbur DC: *The Pap Test and Bethesda* 2014. "The reports of my demise have been greatly exaggerated." (after a quotation from Mark Twain). *Acta cytologica* 2015;59:121–132. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25997404/>.
- Neumann V, Kraus T, Fischer M, et al.: Wertigkeit von pathologisch-anatomischen und staubanalytischen Untersuchungen bei asbestassozierten Berufskrankheiten am Beispiel der BK 4104. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 2009;63:588–593 DOI: 10.1055/s-0029-1215093.
- Nodit L, Balassanian R, Sudilovsky D, et al.: Improving the Quality of Cytology Diagnosis. *American journal of clinical pathology* 2005;124:883–892 DOI: 10.1309/BBTC-58MH-D8N8-K9U5.
- Nowak D, Huber R: Lungenkrebs durch Arbeitseinflüsse (außer Asbest). *Pneumologie* 2015;12:317–324 DOI: 10.1007/s10405-014-0873-x.

- Oberndorfer F, Müllauer L: Molecular pathology of lung cancer: current status and perspectives. *Current opinion in oncology* 2018;30:69–76 DOI: 10.1097/CCO.0000000000000429.
- Onofre FBdM, Onofre ASC, Pomjanski N, et al.: 9p21 Deletion in the diagnosis of malignant mesothelioma in serous effusions additional to immunocytochemistry, DNA-ICM, and AgNOR analysis. *Cancer* 2008;114:204–215 DOI: 10.1002/cncr.23413.
- Osmani L, Askin F, Gabrielson E, et al.: Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Seminars in cancer biology* 2018;52:103–109 DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.11.019.
- Papanicolaou GN: Atlas of Exfoliative Cytology. *Arch Intern Med* 1954;94:507. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1954.00250030177023>.
- Pathologie. Berlin, Heidelberg, Springer, 2000.
- Petersen I: The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Deutsches Arzteblatt international* 2011;108:525–531 DOI: 10.3238/arztebl.2011.0525.
- Petersen I: Adenokarzinome der Lunge--die neue Klassifikation. *Zentralblatt für Chirurgie* 2013;138:16-24 DOI: 10.1055/s-0033-1350878.
- Planchard D, Kim TM, Mazieres J, et al.: Dabrafenib in patients with BRAFV600E-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2016;17:642–650 DOI: 10.1016/S1470-2045(16)00077-2.
- Pokieser L, Bernhardt K, Kreuzer A, et al.: *Klinische Zytologie der Lunge und Pleura: Handbuch und Farbatlas*. Vienna, s.l., Springer Vienna, 2001.
- Ranson M, Hammond LA, Ferry D, et al.: ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2002;20:2240–2250 DOI: 10.1200/JCO.2002.10.112.
- Ratan ZA, Zaman SB, Mehta V, et al.: Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science. *Cureus* 2017;9:e1325 DOI: 10.7759/cureus.1325.
- Reckamp KL: *Lung cancer*, 1. Auflage. Cham, Switzerland, Springer International Publishing, 2016.
- Rekhtman N, Brandt SM, Sigel CS, et al.: Suitability of thoracic cytology for new therapeutic paradigms in non-small cell lung carcinoma: high accuracy of tumor subtyping and

- feasibility of EGFR and KRAS molecular testing. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2011;6:451–458 DOI: 10.1097/JTO.0b013e31820517a3.
- Remmele W (ed): *Pathologie: Rechtsfragen in der Pathologie · Einführung in die bioptische Diagnostik · Herz und Gefäßsystem · Hämatologie · Milz · Thymus*. Band 1, 2. Auflage. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 1999.
- Ren W-H, Zou S-M, Zhang Y-M, et al.: The role of cytology in endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration: A study of 813 cases focusing on diagnostic yield, an analysis of misdiagnosed cases and diagnostic accordance rate of cytological subtyping. *Diagnostic cytopathology* 2021;49:119–126 DOI: 10.1002/dc.24608.
- Reynolds HY: Bronchoalveolar lavage. *The American review of respiratory disease* 1987;135:250–263 DOI: 10.1164/arrd.1987.135.1.250.
- Rivera MP, Mehta AC: Initial Diagnosis of Lung Cancer. *Chest* 2007;132:131S-148S DOI: 10.1378/chest.07-1357.
- Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM: Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013;143:e142S-e165S DOI: 10.1378/chest.12-2353.
- Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V.: *Krebs in Deutschland 2015/2016 2019* DOI: 10.25646/5977.
- Rooney DE, Czepulkowski BH: *Human cytogenetics: Constitutional Analysis : A Practical Approach*, 3. Auflage. Oxford United Kingdom, Oxford University Press, 2001.
- Rooper LM, Nikolskaia O, Carter J, et al.: A single EBUS-TBNA procedure can support a large panel of immunohistochemical stains, specific diagnostic subtyping, and multiple gene analyses in the majority of non-small cell lung cancer cases. *Human pathology* 2016;51:139–145 DOI: 10.1016/j.humpath.2015.12.025.
- Rossi G, Pelosi G, Graziano P, et al.: A reevaluation of the clinical significance of histological subtyping of non--small-cell lung carcinoma: diagnostic algorithms in the era of personalized treatments. *International journal of surgical pathology* 2009;17:206–218 DOI: 10.1177/1066896909336178.
- Rossi G, Ragazzi M, Tamagnini I, et al.: Does Immunohistochemistry Represent a Robust Alternative Technique in Determining Drugable Predictive Gene Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer? *Current drug targets* 2017;18:13–26 DOI: 10.2174/1389450116666150330114441.

- Saad RS, Silverman JF: Respiratory cytology: differential diagnosis and pitfalls. *Diagnostic cytopathology* 2010;38:297–307 DOI: 10.1002/dc.21205.
- Saito M, Suzuki H, Kono K, et al.: Treatment of lung adenocarcinoma by molecular-targeted therapy and immunotherapy. *Surgery today* 2018;48:1–8 DOI: 10.1007/s00595-017-1497-7.
- Savic S, Bihl MP, Bubendorf L: Nichtkleinzellige Lungenkarzinome. Subklassifikation und prädiktive molekulare Markeruntersuchungen in der Zytologie. *Der Pathologe* 2012;33:301–307 DOI: 10.1007/s00292-012-1577-9.
- Savic S, Bubendorf L: Role of fluorescence in situ hybridization in lung cancer cytology. *Acta cytologica* 2012;56:611–621 DOI: 10.1159/000339792.
- Savic S, Bubendorf L: Common Fluorescence In Situ Hybridization Applications in Cytology. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2016;140:1323–1330 DOI: 10.5858/arpa.2016-0202-RA.
- Savic S, Glatz K, Schoenegg R, et al.: Multitarget fluorescence in situ hybridization elucidates equivocal lung cytology. *Chest* 2006;129:1629–1635 DOI: 10.1378/chest.129.6.1629.
- Schmiemann V, Böcking A, Kazimirek M, et al.: Methylation assay for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates: a cohort study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005;11:7728–7734 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0999.
- Schmitz K, Schildhaus H-U: Molekularpathologie der Weichgewebstumoren: Beitrag zur Diagnostik und Therapieprädiktion. *Der Pathologe* 2015;36:126–136 DOI: 10.1007/s00292-015-0010-6.
- Schramm M, Wrobel C, Born I, et al.: Equivocal cytology in lung cancer diagnosis: improvement of diagnostic accuracy using adjuvant multicolor FISH, DNA-image cytometry, and quantitative promoter hypermethylation analysis. *Cancer cytopathology* 2011;119:177–192. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21413159/>.
- Schreiber G, McCrory DC: Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence. *Chest* 2003;123:115–128 DOI: 10.1378/chest.123.1\_suppl.115s.
- Serke M: Kleinzelliges Lungenkarzinom: Neue Hoffnung auf eine Präzisionsmedizin mit Chemo-Immuntherapie nach 30 Jahren therapeutischen Stillstands? *Der Pneumologe* 2019;16:373–378 DOI: 10.1007/s10405-019-0267-1.

- Sigel CS, Moreira AL, Travis WD, et al.: Subtyping of non-small cell lung carcinoma: a comparison of small biopsy and cytology specimens. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2011;6:1849–1856 DOI: 10.1097/JTO.0b013e318227142d.
- Smith MJ, Kini SR, Watson E: Fine needle aspiration and endoscopic brush cytology: comparison of direct smears and rinsings. *Acta cytologica* 1980;24:456–459.
- Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, et al.: The Development of a Multitarget, Multicolor Fluorescence in Situ Hybridization Assay for the Detection of Urothelial Carcinoma in Urine. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2000;2:116–123 DOI: 10.1016/S1525-1578(10)60625-3.
- Song J, Mooi WJ, Petronic-Rosic V, et al.: Nevus versus melanoma: to FISH, or not to FISH. *Advances in anatomic pathology* 2011;18:229–234 DOI: 10.1097/PAP.0b013e3182169b69.
- Stegmann M, Schwab J: *Evaluieren und Forschen für die Soziale Arbeit: Ein Arbeits- und Studienbuch - Reihe Hand- und Arbeitsbücher (H 4)*. Freiburg, Lambertus-Verlag, 2012.
- Taniguchi H, Sen T, Rudin CM: Targeted Therapies and Biomarkers in Small Cell Lung Cancer. *Frontiers in oncology* 2020;10:741 DOI: 10.3389/fonc.2020.00741.
- Thomas NE, Krickler A, Waxweiler WT, et al.: Comparison of clinicopathologic features and survival of histopathologically amelanotic and pigmented melanomas: a population-based study. *JAMA dermatology* 2014;150:1306–1314 DOI: 10.1001/jamadermatol.2014.1348.
- Thunnissen E, Allen TC, Adam J, et al.: Immunohistochemistry of Pulmonary Biomarkers: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2018;142:408–419 DOI: 10.5858/arpa.2017-0106-SA.
- Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJF, et al.: The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2012;76:1–18 DOI: 10.1016/j.lungcan.2011.10.017.
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al.: The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2015;10:1243–1260 DOI: 10.1097/JTO.0000000000000630.
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al.: Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung

- Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2013;137:668–684 DOI: 10.5858/arpa.2012-0263-RA.
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG (ed): WHO classification of tumours of lung, pleura, thymus and heart, 4. ed. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2015.
- VanderLaan PA, Wang HH, Majid A, et al.: Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA): an overview and update for the cytopathologist. *Cancer cytopathology* 2014;122:561–576 DOI: 10.1002/cncy.21431.
- Velleuer E, Dietrich R, Pomjanski N, et al.: Diagnostic accuracy of brush biopsy-based cytology for the early detection of oral cancer and precursors in Fanconi anemia. *Cancer cytopathology* 2020;128:403–413 DOI: 10.1002/cncy.22249.
- Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al.: FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2006;8:141–151 DOI: 10.2353/jmoldx.2006.050083.
- Wagner BJ, Buettner R: Immunohistochemische und molekularpathologische Diagnostik von Lungenkarzinomen. *Der Pathologe* 2020;41:3–13 DOI: 10.1007/s00292-019-00732-4.
- Webb TR, Slavish J, George RE, et al.: Anaplastic lymphoma kinase: role in cancer pathogenesis and small-molecule inhibitor development for therapy. *Expert review of anticancer therapy* 2009;9:331–356 DOI: 10.1586/14737140.9.3.331.
- Woo JS, Reddy OL, Koo M, et al.: Application of Immunohistochemistry in the Diagnosis of Pulmonary and Pleural Neoplasms. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2017;141:1195–1213 DOI: 10.5858/arpa.2016-0550-RA.
- Wynder E.L, Graham E. A.: Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *Journal of the American Medical Association* 1950;143:329–336 DOI: 10.1001/jama.1950.02910390001001.
- Xhemalaj DF, Caushi F, Ulazzi L, et al.: Amelanotic metastasing melanoma mimicking lung cancer. *Diagnostic pathology* 2015. Available at: <<https://www.diagnosticpathology.eu/content/index.php/dpath/article/view/86>>. Date accessed: 14 nov. 2021;DOI: <https://doi.org/10.17629/www.diagnosticpathology.eu-2015-1:86>.
- Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al.: Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2019;14:377–407 DOI: 10.1016/j.jtho.2018.12.005.

Zhai J: Multitarget fluorescence in situ hybridization assay for the detection of lung cancer in bronchial cytology specimens: A Comparison With Routine Cytology. *Diagnostic cytopathology* 2015;43:819–824 DOI: 10.1002/dc.23310.

Zheng M: Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surgical oncology clinics of North America* 2016;25:447–468 DOI: 10.1016/j.soc.2016.02.003.

## **Danksagung.**

Ich möchte die Gelegenheit nutzen, mich bei den Personen zu bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben:

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion zu diesem interessanten Thema und seinen konstruktiven Anmerkungen bei der Durchsicht des Manuskriptes.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. med. Martin Schramm für seine große Unterstützung bezüglich aller wissenschaftlichen Fragen und die zahlreichen Ratschläge, welche mir stets eine große Hilfe waren. Ohne sein Wissen, ohne seine Ideen und Kritik wäre ich nicht an diesen Punkt gelangt. Einen herzlichen Dank hierfür.

Ferner möchte ich mich auch bei dem gesamten Team des Schwerpunkts Cytopathologie der Uniklinik Düsseldorf bedanken.

Ich bedanke mich zudem bei Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Germing für die Übernahme des Korreferates.

Ein abschließender Dank gilt meinem Ehemann Christoph für seine liebevolle Unterstützung sowie seinen stetigen Glauben an mich.