

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

Expressionsprofil von GATA3, TTF-1, Napsin A und MUC1
an alkoholfixierten Ausstrichpräparaten
von Körperhöhlenergüssen

Dissertation

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

vorgelegt von
Caroline Brossmann

2024

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

Zusammenfassung

Adjuvante immunhistochemische Untersuchungen sind nicht nur in der Histologie, sondern auch in der cytologischen Routinediagnostik etabliert. Insbesondere in der Ergusscytologie hat die Immuncytochemie u.a. bei der histogenetischen Klassifikation eines metastasierten Tumorleidens einen hohen Stellenwert. Nichtsdestotrotz finden sich in der internationalen Literatur größtenteils Daten zu immuncytochemischen Untersuchungen an Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Zellblockpräparaten, da diese in der präparatorischen Aufarbeitung und Färbung den histologisch untersuchten Geweben gleichen. Ebenso sind jedoch immuncytochemische Untersuchungen an alkoholfixierten und nach PAP gefärbten direkten Ausstrichpräparaten möglich. Ziel dieser Arbeit war es, das Expressionsprofil von GATA3, TTF-1, Napsin A und MUC1 an alkoholfixierten Ausstrichpräparaten von malignen Körperhöhlenergüssen zu untersuchen. Das Expressionsprofil wurde an einer Kohorte von 348 Ergussflüssigkeiten immuncytochemisch untersucht, in die endgültige Auswertung konnten 339 Präparate (257 Pleuraergüsse, 70 Asciten, 12 Perikardergüsse) eingehen. Zunächst wurde die Häufigkeit verschiedener Tumorentitäten in der Kohorte und je nach Ergussart ermittelt. Außerdem wurde der Grad der Übereinstimmung der cytologisch im Rahmen der Routinediagnostik ermittelte Tumorart semiquantitativ mit den Follow-Up Daten verglichen. Insgesamt zeigt sich eine vollständige Übereinstimmung (Wertungskategorie 1) in 87% der Fälle.

65% (26/40) aller Mammakarzinome exprimierten GATA3 und 100% (3/3) der Urothelkarzinome. Weitere relevante Karzinome mit positiver GATA3 Expression waren einige Lungenkarzinome (9/141), einige Ovarialkarzinome (3/44) sowie ein Pankreaskarzinom (1/27). 73% (103/141) aller Bronchialkarzinome exprimierten TTF1 (davon 79 Adenokarzinome, 15 nicht näher bezeichnete NSCLC, 9 Kleinzeller). Extrapulmonale Karzinome mit TTF1 Expression waren neben dem zu erwartenden Schilddrüsenkarzinom, Mammakarzinome (2/40), Karzinome des gastroösophagealen Übergangs (2/10) sowie je ein Prostatakarzinom (1/1) und ein Ovarialkarzinom (1/44). Die Sensitivität einer TTF1 Expression für Bronchial- oder Schilddrüsenkarzinome betrug 75,4%, die Spezifität 96,8%. 69% (70/101) aller pulmonalen Adenokarzinome und 52% (11/21) der nicht näher bezeichneten NSCLC zeigten eine Napsin A Expression. Die Sensitivität für Adenokarzinome und nicht näher bezeichnete NSCLC der Lunge betrug 66,4%, die Spezifität 97%. Die einzigen extrapulmonalen Karzinome mit Napsin A Expression waren je zwei Ovarial- sowie Mammakarzinome. Durch Kombination der drei oben genannten Antigene zu einem Markerpanel lässt sich die Treffsicherheit für die Tumorentitäten mit der höchsten Prävalenz wie bronchopulmonale Karzinome und Mammakarzinome steigern. Lediglich drei Tumorentitäten zeigten keine MUC1 Expression. Die Analyse der MUC1 Expression ist somit für eine histogenetische Tumordifferenzierung nicht hilfreich.

Zusammenfassend finden sich an alkoholfixierten Ausstrichpräparaten ähnliche Expressionsprofile wie schon aus der Histologie bekannt. So zeigte GATA3 die höchste Prävalenz bei Mamma- sowie Urothelkarzinomen und TTF1 sowie Napsin A bei Bronchialkarzinomen. Die wenigen Fälle mit unerwarteter Expression in anderen primären Tumorentitäten waren vergleichbar mit in der Literatur beschriebenen Entitäten. Auffällig war eine mit dem Literaturvergleich geringere Sensitivität insbesondere der GATA3 Expression für Mammakarzinome sowie der Napsin A Expression für pulmonale Adenokarzinome. Mögliche Gründe hierfür könnten, neben der veränderten Präparationsmethode, eine lange Versanddauer, eine verspätete Fixierung oder auch eine verringerte Immunogenität der oft bereits mehrjährig archivierten Ausstrichpräparate sein.

Abstract

Adjuvant immunohistochemical examinations are not only well established in histology, but also in cytological routine diagnostics. Immunohistochemistry is highly relevant in classifying metastatic cancer, particularly in effusion cytology. Nonetheless, in international literature are mostly found references of immunocytochemical examinations on formalin-fixed paraffin-embedded cell block preparation, as those resemble the histological specimens in preparational reprocessing and staining the most. Equally possible is the use of alcohol-fixed PAP stained smear preparations. The aim of this thesis is to analyze the expression profile of GATA3, TTF-1, Napsin A and MUC1 on alcohol-fixed smear preparations of malignant body cavity effusions. The expression profile was examined immunocytochemically on a cohort of 348 effusions between January 2011 up to June 2015. After eliminating nine specimens, the remaining 339 specimens (257 pleural effusions, 70 ascites, 12 pericardial effusions) were all included in the final study. Initially, the frequency of different tumor entities in the cohort was determined collectively and in accordance with the occurring effusion type. Furthermore, the degree of similarity between the cytological diagnosis, which was determined within the scope of routine diagnostic, and the follow up data was compared. Overall, the evaluation revealed an agreement rate (rating category 1) in 87% of all cases.

In 65% (26/40) of all breast carcinomas and 100% (3/3) of the urothelial carcinomas GATA3 expression was seen. Further relevant carcinomas with positive GATA3 expression were several bronchial carcinomas (9/141), several ovarian carcinomas (3/44), and one pancreatic carcinoma (1/27). 73% (103/141) of all bronchial carcinomas showed TTF1 positivity (among them 79 adenocarcinoma, 15 not otherwise specified NSCLC, 9 small cell lung cancer). Extrapulmonary carcinoma with TTF1 expression were, aside from the expected thyroid carcinoma, breast cancer (2/40), two oesophagogastric junctional adenocarcinoma (2/10), one prostatic (1/1) and one ovarian carcinoma (1/44). The sensitivity and specificity of TTF1 expression for bronchial and thyroid carcinoma were 75,4% and 96,8%, respectively. 69% (70/101) of all pulmonary adenocarcinoma and 52% (11/21) of the not otherwise specified NSCLC expressed Napsin A. In these cases, the sensitivity for adenocarcinoma and not otherwise specified NSCLC was at 66,4% and the specificity at 97%. The only extrapulmonary carcinoma with Napsin A expression were two ovarian and two mammary carcinomas. By combining the three above mentioned antibodies to one marker panel, the accuracy for tumor entities with the highest prevalence, like bronchial and mammary carcinomas, can be increased significantly. Only three cancer entities remained without MUC1 expression. Therefore, further examination of MUC1-expression for histogenetically differentiation of malignant cells was not success-promising.

In summary, the expression pattern of ethanol-fixed direct smears resembles the patterns known from histology. GATA3 expression was highest in mammary and urothelial carcinoma and the highest expression of TTF1 and Napsin A was seen in bronchial carcinoma. The few cases with unexpected expression in other primary tumor entities were comparable to those known from literature. There was a noticeable lower sensitivity, particular in GATA3 expression for mammary carcinomas and in Napsin-A expression for pulmonary adenocarcinomas. This might be due to the modified preparation method, a delayed fixation or a decreased immunogenicity because of long lasting storage.

Abkürzungsverzeichnis

ABC	-	Avidin-Biotin-Komplex
ACC	-	<i>Adrenocortical carcinoma</i>
AEC	-	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AML	-	Akute myeloische Leukämie
APAAP	-	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
BRCA1	-	<i>Breast Cancer 1</i>
CA	-	<i>Cancer Antigen</i>
CCC	-	Cholangiozelluläres Karzinom
CEA	-	Carcinoembryonales Antigen
CDX	-	Caudale-Homöobox
CK	-	Cytokeratin
COPD	-	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
CSA	-	<i>Catalyzed signal amplification</i>
CT	-	Computertomographie
CUP	-	<i>Cancer of unknown primary</i>
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	-	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EpCAM	-	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ER	-	Östrogenrezeptor
FISH	-	Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung
FNA	-	Feinnadelaspirationsbiopsie
GATA3	-	<i>GATA-3 binding protein</i>
GCDFP-15/BRST 2	-	<i>Gross Cystic Disease Fluid Protein-15</i>
GÖ	-	Gastroösophageal
HCL	-	Chlorwasserstoff
HEA	-	<i>Human epithelial antigen</i>
HER2	-	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>

HIV	-	Humanes Immundefizienz-Virus
LDH	-	Laktatdehydrogenase
LSAB	-	<i>Labelled-Streptavidin-Biotin</i>
MGG	-	May-Grünwald-Giemsa
MRT	-	Magnetresonanztomographie
MUC1	-	Mucin 1
NapA	-	Napsin A
NHL	-	Non-Hodgkin-Lymphom
NOR	-	Nukleäre Negative prädiktive Wert Organisationsregionen
NPW	-	Negativer prädiktiver Wert
NSCLC	-	<i>Non small cell lung carcinoma</i>
OT	-	Objektträger
PAP	-	Papanicolaou
PAP	-	bei Immuncytochemie: Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	-	<i>Phosphate buffered saline</i>
PD-L1	-	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PPW	-	Positiver prädiktiver Wert
PR	-	Progesteronrezeptor
PSA	-	Prostata-spezifisches Antigen
RT	-	Raumtemperatur
RPM	-	<i>Revolutions per minute</i>
SA-A	-	<i>Surfactant apoprotein A</i>
SAAG	-	Serum-Ascites-Albumin-Gradient
SOP	-	<i>Standard Operating Procedure</i>
TTF1	-	Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
UKD	-	Universitätsklinikum Düsseldorf
VEGF	-	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WARD cells	-	<i>Worrisome atypical cells of regenerative-degenerative processes</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: LSAB Methode	28
Abbildung 2: Flussdiagramm aller Tumorzell-positiven Ergussflüssigkeiten, welche aus dem UKD oder der Kaiserswerther Diakonie im Zeitraum vom 01.01.2011 bis zum 30.06.2015 eingesandt wurden	36
Abbildung 3: Flussdiagramm der immuncytochemisch untersuchten Präparate.....	37
Abbildung 4: Geschlechterverteilung der malignen Ergüsse in %	37
Abbildung 5: Patientenalter in Jahren zum Zeitpunkt der Punktion des untersuchten Ergusses....	38
Abbildung 6: Patientenalter in Jahren zum Zeitpunkt des untersuchten <u>Pleura</u> ergusses	38
Abbildung 7: Patientenalter in Jahren zum Zeitpunkt des untersuchten <u>Ascites</u>	39
Abbildung 8: Übersicht über die Häufigkeit der Primärtumoren aller untersuchten Ergüsse inklusive histogenetischer Klassifizierung (soweit bekannt).....	41
Abbildung 9: relative Häufigkeitsverteilung der sechs häufigsten Primärtumoren bei Männern...	42
Abbildung 10: relative Häufigkeitsverteilung der sechs häufigsten Primärtumoren bei Frauen	43
Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung der fünf häufigsten Primärtumoren aller Pleuraergüsse dieser Studie	43
Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung der sechs häufigsten Primärtumoren aller Asciten dieser Studie	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Semiquantitative Beurteilung der immuncytochemischen Reaktion.....	32
Tabelle 2: Vierfeldertafel zur Berechnung der Treffsicherheiten der Immunreaktion.....	34
Tabelle 3: Darstellung einiger Fälle mit Abweichung der cytologischen Diagnose vom Referenzstandard.	46
Tabelle 4: Häufigkeitsverteilung der Score-Werte aller GATA3 positiven Tumorentitäten.....	47
Tabelle 5: Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW sowie Youden-Index einer GATA3 Expression für das Mamma- sowie Urothelkarzinom.....	48
Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der Score-Werte aller TTF1 positiven Tumorentitäten	49
Tabelle 7: Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW sowie Youden-Index einer TTF1 Expression für Bronchial- oder Schilddrüsenkarzinome	50
Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung der Score-Werte aller Napsin A-positiven Tumorentitäten;.....	50
Tabelle 9: Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW sowie Youden-Index der Napsin A- Expression von pulmonalen Adenokarzinomen und Nicht-Kleinzellern	51
Tabelle 10: Häufigkeitsverteilung der Score-Werte aller MUC1 positiven Tumorentitäten.....	52
Tabelle 11: Prävalenzen für Bronchial-, Mamma-, Urothel-, sowie Schilddrüsenkarzinome bei Kombination der Antikörper GATA3, TTF1 und Napsin A.	53
Tabelle 12: Darstellung der fünf "unklären Fälle" aus Tabelle 11.....	54

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Körperhöhlenergüsse.....	1
1.1.1	Pleuraerguss – Ätiologie und Systematik.....	1
1.1.2	Pleuraerguss - benigne Zellen im Pleuraerguss.....	3
1.1.3	Maligne Pleuraergüsse.....	4
1.1.4	Perikarderguss.....	4
1.1.5	Ascites.....	5
1.2	Tumordiagnostik – Allgemeiner Überblick.....	6
1.3	Was ist Cytologie?.....	7
1.4	Tumordiagnostik in der Ergusscytologie.....	8
1.4.1	Präanalytik.....	8
1.4.2	Morphologische Basisdiagnostik.....	9
1.5	Adjuvante Verfahren in der Cytologie.....	9
1.6	Immunverfahren in der Ergusscytologie.....	9
1.6.1	Färbeprinzip.....	10
1.6.2	Immunhistochemische Färbemethoden.....	10
1.6.3	Monoklonale und Polyklonale Antikörper.....	11
1.6.4	Antikörper-Panels und diagnostische Treffsicherheiten.....	12
1.7	Häufig genutzte Antikörper in der Ergusscytologie.....	13
1.7.1	GATA3.....	13
1.7.2	TTF1.....	14
1.7.3	Napsin A.....	14
1.7.4	Mucin 1.....	15
1.8	Ziel der Arbeit.....	16
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Patientenkollektiv.....	18
2.2	Ethikvotum.....	18
2.3	Einschluss- und Ausschlusskriterien.....	18
2.4	Follow-Up.....	19
2.5	Klinisch-histologischer Referenzstandard.....	20
2.6	Treffsicherheit der cytomorphologischen und immuncytochemischen Bestimmung des Primärtumors einer Karzinose in der Routinediagnostik.....	21
2.7	Materialien.....	21
2.8	Aufarbeitung der Proben.....	25

2.8.1	May-Grünwald-Giemsa-Färbung (MGG-Färbung).....	26
2.8.2	Färbung nach Papanicolaou	26
2.9	Immuncytochemische Färbung.....	26
2.9.1	Vorbereitung der Präparate	26
2.9.2	ABC-Methode (einschließlich LSAB- und CSA-Methode)	27
	28
2.9.3	Färbeprotokoll ABC Methode	28
2.10	Cytologische Beurteilung	31
2.10.1	Malignitätskriterien.....	31
2.10.2	Auswertung der immuncytochemischen Färbung	32
2.11	Abgrenzung der persönlichen Leistung.....	33
2.12	Statistische Analyse.....	33
3	Ergebnisse	36
3.1	Patientenkollektiv	36
3.1.1	Geschlechterverteilung	37
3.1.2	Altersverteilung.....	37
3.2	Referenzstandard	39
3.3	Tumorentitäten	40
3.3.1	Häufigkeitsverteilung in der Gesamtkohorte.....	40
3.3.2	Geschlechterspezifische Häufigkeitsverteilung der Tumorentitäten in der Gesamtkohorte	42
3.3.3	Häufigkeitsverteilung nach Ergussort	43
3.3.4	Treffsicherheit der cytomorphologischen und immuncytochemischen Bestimmung des Primärtumors einer Karzinose in der Routinediagnostik	45
3.4	Expression von GATA3, TTF1, Napsin A und MUC1	46
3.4.1	GATA3.....	47
3.4.2	Treffsicherheit der GATA3 Expression bei Karzinosen von Mamma- und Urothelkarzinomen	48
3.4.3	TTF1	48
3.4.4	Treffsicherheit der TTF1 Expression bei Karzinosen von Lungen- und Schilddrüsenkarzinomen.....	49
3.4.5	Napsin A	50
3.4.6	Treffsicherheit der Napsin A Expression bei Karzinosen von Adenokarzinomen der Lungen	51
3.4.7	MUC1.....	51
3.4.8	Kombinierte Auswertung	53

4	Diskussion.....	55
4.1	Patientenkollektiv, Geschlechterverteilung, Altersverteilung	55
4.2	Häufigkeitsverteilung der Tumorentitäten	56
4.3	Genauigkeit der cytologischen Tumorklassifikation	57
4.4	GATA3.....	61
4.4.1	Expression bei Mamma- und Urothelkarzinomen	61
4.4.2	Expression in der eigenen Arbeit (Mamma- und Urothelkarzinome).....	62
4.4.3	Expression bei anderen Tumoren (nicht Mamma- oder Urothelkarzinom)	63
4.5	TTF1.....	64
4.5.1	Expression bei Bronchialkarzinomen	64
4.5.2	Expression bei unterschiedlicher Methodik.....	65
4.5.3	Expression bei extrapulmonalen Karzinomen.....	66
4.5.4	Expression in der eigenen Arbeit	67
4.6	Napsin A	68
4.6.1	Expression bei pulmonalen Adenokarzinomen.....	68
4.6.2	Expression bei unterschiedlicher Methodik.....	68
4.6.3	Expression bei Plattenepithelkarzinomen (Lunge und extrapulmonal) und kleinzelligen Lungenkarzinomen	69
4.6.4	Expression bei extrapulmonalen Karzinomen.....	70
4.7	Mucin 1.....	70
4.8	Kombinierte Auswertung	71
4.9	Schlussfolgerung	73
5	Literaturverzeichnis.....	74

1 Einleitung

Deutschlandweit sind Herz-Kreislaufkrankungen seit Jahrzehnten die häufigste Todesursache, im Jahr 2020 starben 34% der Deutschen an den Folgen kardiovaskulärer Krankheiten ¹. Maligne Tumore stellen mit beachtlichen 23,5% aller Todesfälle die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. In der Subgruppe der 45- bis 65-jährigen war 2019 eine Krebserkrankung mit 39% aller Todesfälle sogar die häufigste Todesursache. Zwar betreffen maligne Erkrankungen auch Kinder und junge Erwachsene, dennoch sind bösartige Tumore hauptsächlich eine Erkrankung älterer Menschen.

Seit Jahrzehnten steigt die Lebenserwartung der Deutschen: Ein Mädchen, das 2020 geboren wurde, hat eine durchschnittliche Lebenserwartung von 83,6 Jahren. Männliche Neugeborene liegen mit 78,9 Jahren etwas darunter. Vergleichsweise lag die Lebenserwartung vor 50 Jahren bei 73,4 Jahren für Frauen und die der Männer bei 67,2 Jahren ².

Durch das zunehmende Lebensalter steigt auch die Inzidenz der bösartigen Tumore, also die Zahl der Krebsneuerkrankungen innerhalb eines Jahres. Trotz größer werdender Inzidenz sinkt aber die Mortalität, also die Anzahl an Personen, die an malignen Erkrankungen sterben. Dies resultiert aus der immer besser werdenden Prävention, Diagnostik und Therapie bösartiger Tumore. Insbesondere der Frühdiagnostik kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. So konnte beispielsweise durch die bevölkerungsweit mögliche Vorsorgekoloskopie ab dem 50. Lebensjahr die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms in den letzten zehn Jahren um rund 20% gesenkt werden³.

Mit knapp 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr ist das Mammakarzinom der mit Abstand häufigste Tumor der weiblichen deutschen Bevölkerung, bei den Männern führt mit rund 65.000 jährlichen Neuerkrankungen das Prostatakarzinom. Zweithäufigste maligne Erkrankung der Frauen ist das kolorektale Karzinom, gefolgt vom Bronchialkarzinom. Bei der männlichen Bevölkerung hingegen steht das Lungenkarzinom mit etwa 35.300 Neuerkrankungen pro Jahr knapp vor dem kolorektalen Karzinom (circa 34.000 Neuerkrankungen pro Jahr)³.

Insbesondere das Mamma- und das Bronchialkarzinom gehen in fortgeschrittenen Stadien mit der Ausbildung von Körperhöhlenergüssen einher. Wie vorhin bereits erwähnt, führt die Alterszunahme der deutschen Bevölkerung zum Anstieg der Krebserkrankungen, womit ebenfalls die Anzahl der malignen Körperhöhlenergüsse steigt. An dieser Stelle kommt die diagnostische Cytologie zum Einsatz. Wie genau ein solcher maligner Erguss entsteht, welche anderen Ursachen der Ergussbildung möglich sind und welche diagnostischen Möglichkeiten eine Punktion und darauffolgende cytologische Untersuchungen mit sich bringen, soll im Folgenden genauer erläutert werden.

1.1 Körperhöhlenergüsse

1.1.1 Pleuraerguss – Ätiologie und Systematik

Pleuraergüsse sind ein häufiges Symptom im Klinikalltag. Physiologischer Weise befindet sich zur Gewährleistung der Verschieblichkeit der Pleuraablätter eine geringe Menge von etwa 5-15ml seröser Flüssigkeit zwischen der Pleura visceralis und der Pleura parietalis ⁴.

Sobald der Kreislauf von Filtration und Resorption der Pleuraflüssigkeit durch eine pathologische Veränderung gestört wird, bildet sich ein Pleuraerguss, eine pathologisch erhöhte Flüssigkeitsansammlung im Interpleuralspalt.

Die Einteilung von Pleuraergüssen erfolgt nach der Höhe des Gesamteiweißgehaltes und des spezifischen Gewichts des Ergusses. Noch genauer wird die Definition, wenn parallel zu den Werten des Ergusses auch die Proteinmenge und die Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum bestimmt wird. Entscheidend ist nun das Verhältnis der Proteinkonzentration (bzw. LDH-Konzentration) im Erguss zu der Konzentration im Blutserum. Trifft mindestens eins der folgenden drei „Light“ Kriterien zu, so handelt es sich um ein Exsudat ⁵:

- Pleura-Gesamteiweiß/ Serum-Gesamteiweiß $>0,5$
- Pleura-LDH/ Serum-LDH $>0,6$
- Pleura-LDH >200 U/L

Durch korrekte Anwendung der Light Kriterien lassen sich nahezu 100% aller Exsudate korrekt als solche diagnostizieren, es werden jedoch bis zu 25% der Transsudate falsch als Exsudat klassifiziert ⁶.

Die Differentialdiagnosen eines Pleuraergusses sind vielfältig, da je nach Quelle die Häufigkeitsverteilung variiert. Allgemein zählen die Herzinsuffizienz, pulmonale Infekte sowie maligne Erkrankungen zu den drei meistgenannten Ursachen eines Pleuraergusses.

Die Herzinsuffizienz stellt die häufigste Ursache eines beidseitig auftretenden Transsudats dar, insbesondere in der Subgruppe der über 80-jährigen ⁷. Mögliche weitere Ursachen für Transsudate sind eine Lungenembolie, ein Lungeninfarkt oder die Leberzirrhose ⁸. Bei unklarem Erguss sollte differentialdiagnostisch immer eine Lungenembolie als mögliche Genese in Erwägung gezogen werden, so weisen 20–55% aller Patienten mit Lungenembolie einen Pleuraerguss auf ⁹. Ebenso sollte, insbesondere in der Subgruppe der unter 40-jährigen, eine Tuberkulose erwogen werden ⁷.

Je nach Studie werden parapneumonische Ergüsse ¹⁰ oder maligne Ergüsse ^{11, 7} als häufigste Ursache eines Exsudats genannt. Bintliffe et al. führten 46% der untersuchten neu aufgetretenen, einseitigen Ergüsse auf eine maligne Grunderkrankung zurück, in dieser Studie war nur in 9% der Fälle eine Pneumonie Ursache des Ergusses, 19% waren auf eine Herzinsuffizienz zurückzuführen.

Multifaktorielle Pleuraergüsse erschweren die Diagnostik, etwa 30% aller Patienten mit dem Leitsymptom Pleuraerguss leiden unter mehr als einer Grunderkrankung als möglicher Ursache des Ergusses ¹¹.

Pleuraergüsse im Rahmen einer rheumatoiden Grunderkrankung stellen eine seltenere Ursache eines Exsudats dar ⁹.

Lässt sich trotz abgeschlossener Diagnostik inklusive Thorakoskopie keine eindeutige Ursache finden, wird häufig die Diagnose einer „unspezifischen Pleuritis“ gestellt. Follow-Up Daten zeigen, dass nur in etwa 8% der Fälle nach zwei Jahren eine maligne Grunderkrankung diagnostiziert wird, die allermeisten Ergüsse sistierten spontan und ließen sich so auf eine benigne Ursache zurückführen ¹².

Überblick über die Ursachen eines Pleuraergusses (modifiziert nach ⁸⁾)

Transsudat	Exsudat
<ul style="list-style-type: none"> • Herzinsuffizienz • Leberzirrhose mit Ascites • Hypoproteinämie bei nephrotischem Syndrom • Postpartal • Vena-cava-Kompressionssyndrom • Postoperativ nach Abdominalchirurgie 	<ul style="list-style-type: none"> • Infektiös <ul style="list-style-type: none"> ○ Parapneumonisch (bakteriell, viral oder mykotisch) ○ Tuberkulose ○ Lungenabszess • Neoplasien • Lungenembolie • Trauma (v.a. Hämatothorax) • Chylothorax • Rheumatologisch <ul style="list-style-type: none"> ○ Rheumatoide Arthritis ○ Systemischer Lupus erythematodes • Gastrointestinal <ul style="list-style-type: none"> ○ Pankreatitis ○ Ösophagusruptur ○ Subphrenischer Abszess

Bei der Bildung maligner Ergüsse spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle. Einerseits kommt es durch die lokale Obstruktion von Kapillaren oder Lymphgefäßen zu einer verminderten Resorptionsleistung. Des Weiteren steigt die Gefäßpermeabilität durch chemische Mediatoren, welche von Tumorzellen ausgeschüttet werden.

Vor allem Lungentumore können durch eine endobronchiale Obstruktion zusätzlich das Pneumonie- und Atelektaserisiko erhöhen, welche beide an sich ein Risiko für einen Pleuraerguss darstellen. Ein weiterer indirekter Grund, der die Ergussbildung erleichtert, ist die allgemeine Gefahr der Mangelernährung. Diese führt zur Kachexie und Hypoproteinämie, wodurch der hydrostatische Druck sinkt. Außerdem haben Tumorpatienten ohnehin eine erhöhte Thromboseneigung und ein gesteigertes Risiko für eine Lungenembolie, welche ebenfalls ursächlich für eine Ergussbildung sein kann ¹⁵.

1.1.2 Pleuraerguss - benigne Zellen im Pleuraerguss

In allen Körperhöhlenergüssen können physiologischer Weise verschiedene Zelltypen gefunden werden. Zu den häufigsten benignen Zellen zählen Mesothelzellen, Histozyten, also sessile Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten ¹³.

Mesothelzellen sind daher relevant für die cytologische Diagnostik, da sie im reaktiven Zustand eine Vielzahl verschiedener Zelltypen nachahmen können, u.a. auch maligne Zellen. Insbesondere bei schweren Systemerkrankungen wie beispielweise einer fulminanten Lungenarterienembolie, einer akuten Leberzirrhose, einer ausgeprägten Pankreatitis oder einer Langzeitdialyse kann es zur Ausbildung so genannter „worrisome atypical cells of regenerative-degenerative processes“ (WARD cells) kommen, welche diverse mikroskopische Atypiekriterien aufweisen, wodurch leicht Tumorzellen fehldiagnostiziert werden können.

Neutrophile Granulozyten finden sich zu hoher Zahl bei inflammatorischem Geschehen, bei malignen Ergüssen ohne begleitende Entzündungsreaktion stellen sie eher eine Rarität dar.

In einer Vielzahl von Ergüssen finden sich Lymphozyten, insbesondere bei chronischen Ergüssen. Sie sind jedoch unspezifisch und liefern wenig diagnostische Hinweise bezüglich der Dignität des Ergusses. Bei hoher Tuberkuloseinzidenz, wie sie in früheren Zeiten auch in Deutschland vorlag, ist ein besonders lymphozytenreicher Erguss auch immer verdächtig auf tuberkulöse Genese.

Eosinophile Granulozyten finden sich oft als reaktive Komponente nach schwerem Trauma, einer großen Operation, Infektionen oder bei hyperinflammatorischem Geschehen. Grob gilt die Faustregel: je höher die Anzahl eosinophiler Zellen, desto unwahrscheinlicher wird die Diagnose eines malignen Ergusses¹³.

1.1.3 Maligne Pleuraergüsse

Besteht der Verdacht auf einen malignen Erguss, so ist eine diagnostische Pleurapunktion in fast allen Fällen obligat, auch wenn der Erguss für den Patienten symptomlos bleibt. Das typischste Symptom ist die Dyspnoe, aber auch Thoraxschmerzen oder Husten sind möglich¹⁴. Sollte die (wiederholte) cytologische Untersuchung ohne Tumornachweis bleiben, so sollte eine weitere Probengewinnung mit histologischer Diagnostik angeschlossen werden¹⁵.

Übersicht über die häufigsten Primärtumoren eines malignen Pleuraergusses^{16,17}

- Lungenkarzinom (Adenokarzinom > kleinzelliges Karzinom)
- Mammakarzinom
- Adenokarzinom mit unbekanntem Primarius
- Lymphome oder Leukämien
- Andere (gastrointestinal, urogenital)

Über 50% der Patienten mit disseminiertem Befall eines Lungen- oder Mammakarzinoms weisen einen Pleuraerguss auf. Dabei stellt das Lungenkarzinom die häufigste Ursache eines malignen Pleuraergusses insgesamt dar, bei Frauen wird je nach Literatur auch das Mammakarzinom als häufigste Ursache eines Pleuraergusses genannt¹⁶. Innerhalb der Lungenkarzinome liegt das Adenokarzinom an Platz eins. Dieses ist eher peripher lokalisiert und kann daher früh die Pleura infiltrieren und so zu einem Erguss führen. An zweithäufigster Stelle steht das Mammakarzinom. Bronchial- und Mammakarzinome machen allein 50-65% aller malignen Pleuraergüsse aus¹⁵. Weitere typische Primärtumore sind das Ovarialkarzinom, Lymphome, Mesotheliome oder ein gastrointestinaler Tumor¹⁸. In 90% der Fälle sind maligne Ergüsse unilateral und in der Regel auch ipsilateral lokalisiert¹⁵.

1.1.4 Perikarderguss

Der Perikarderguss soll an dieser Stelle nur sehr kurz thematisiert werden, da maligne Ergüsse des Perikards zahlenmäßig deutlich seltener sind. Auch in dieser Arbeit wurden nur wenige Färbungen an Perikardausstrichen durchgeführt. Allerdings ist der relative Anteil maligner Perikardergüsse an allen Perikardergüssen sehr hoch. 2014 wurde im Institut für Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf eine Arbeit zur diagnostischen Treffsicherheit der Perikardergusscytologie veröffentlicht¹⁹. Hierbei konnte an einem großen Patientenkollektiv von 424 Fällen in 193 Fällen (45,5%) der Perikarderguss auf eine maligne Genese zurückgeführt werden. Dabei konnte eine sehr zufriedenstellende Treffsicherheit der Diagnose eines malignen Ergusses von 85,5% nachgewiesen werden.

Ebenso wie bei Ergüssen der Pleura stellen bei Perikardergüssen das Bronchialkarzinom mit 56% und das Mammakarzinom mit knapp 40% die häufigsten Tumorentitäten dar. Interessanterweise enthalten maligne Perikardergüsse auffallend wenig reaktive Zellen wie Lymphozyten oder Histiocyten. Außerdem sind maligne Ergüsse am Herzen häufig hämorrhagisch. Dabei sollte bedacht werden, dass Blut im Perikardbeutel auch durch andere (nicht seltene) Ursachen wie eine Aortendissektion, ein rupturiertes Aortenaneurysma, einen Myokardinfarkt oder durch ein Trauma bedingt sein kann ⁸.

1.1.5 Ascites

Auch beim Ascites wird zwischen Transsudaten und Exsudaten unterschieden. Hauptkriterien sind der Eiweißgehalt im Ascites sowie der Serum-Ascites-Albumin-Gradient (SAAG). Der SAAG ist die Differenz von Albumingehalt im Serum und Albumingehalt im Ascites. Liegt der Wert unter 1,1g/dl, so handelt es sich um ein Exsudat. Ein Exsudat liegt außerdem vor, wenn der Gesamteiweißgehalt im Ascites über 2,5g/dl liegt.

Zusätzlich zu den oben genannten Werten wird der Ascites cytologisch untersucht. Einerseits zum Ausschluss maligner Erkrankungen, andererseits kann die Anzahl der segmentierten Granulozyten bestimmt werden. Liegt diese über 250/µl, so ist eine spontan bakterielle Peritonitis sehr wahrscheinlich ²⁰.

Übersicht über die Ursachen eines Ascites ⁴

Transsudat	Exsudat
<ul style="list-style-type: none"> • Leberzirrhose • (Rechts-) Herzinsuffizienz • Hypoproteinämie (z.B. bei nephrotischem Syndrom) • Diffuse hepatische Metastasierung • Portalvenenverschluss 	<ul style="list-style-type: none"> • Infektionen <ul style="list-style-type: none"> ○ Primär bakterielle Peritonitis ○ Tuberkulose • Neoplasien • Pankreatitis • Trauma • Biliäre Peritonitis • Chylöse Ursachen (z.B. Lymphfisteln)

Die häufigste Ursache eines Ascites stellt mit 75% aller Ergüsse die Leberzirrhose dar ²¹. Der Großteil der Leberzirrhosen in der westlichen Welt ist wiederum äthyltoxisch bedingt ²⁰.

Liegt ein Ascites ohne Leberzirrhose vor, so ist häufig eine Peritonealkarzinose Ursache. Bis zu 10% aller Ergüsse der Bauchhöhle lassen sich auf eine maligne Genese zurückführen, in rund 3% ist eine Herzinsuffizienz ursächlich, etwa 10% sind gemischter Genese ²¹.

Eine Peritonealkarzinose kann seltener bedingt sein durch einen primär peritoneal wachsenden Tumor wie beispielsweise Mesotheliome oder primäre seröse peritoneale Karzinome. Häufiger findet sich ein abdominell wachsender Tumor wie ein Magen-, pankreatobiliäres oder kolorektales Karzinom. Ebenfalls möglich sind metastasierte Tumore wie Bronchial- oder Mammakarzinome.

Das Ovarialkarzinom liegt mit 32% aller Peritonealkarzinosen deutlich an erster Stelle. Danach folgen das Mammakarzinom (12%), Lymphome bzw. Leukämien und Magenkarzinome. In immerhin 15% der Fälle kann kein eindeutiger Primarius identifiziert werden.

Übersicht über die häufigsten Primarien eines malignen Ascites bei Frauen (modifiziert nach ²²)

- Ovarialkarzinom (32%)
- Mammakarzinom (12%)
- Lymphom/ Leukämie (7%)
- Magenkarzinom (6%)
- kolorektales Karzinom (5%)
- Endometriumkarzinom (5%)
- Pankreaskarzinom (4%)
- Lungenkarzinom (4%)

Die beschriebene Häufigkeitsverteilung ist älteren Datums. Leider fanden sich in der aktuellen Literatur keine vergleichbaren neuen Daten über die prozentuale Häufigkeitsverteilung der Tumorentitäten im malignen Ascites bei Frauen.

Nach Einschätzung des Instituts für Cytopathologie der UKD sind Ovarialkarzinome weiterhin führender Primarius eines malignen Ascites bei Frauen, jedoch scheinen derzeit pankreatobiliäre Karzinome bei beiden Geschlechtern entsprechend der steigenden Inzidenzen dieser Entitäten ebenfalls einen beachtlichen Teil (deutlich über den oben angegebenen 4%) auszumachen (persönliche Kommunikation Dr. Schramm).

Die häufigsten Primärtumoren eines Ascites bei Männern sind in absteigender Reihenfolge Lymphome und Leukämien, gastrointestinale Tumore sowie das Pankreaskarzinom ¹⁷.

1.2 Tumordiagnostik – Allgemeiner Überblick

Besteht bei einem Patienten Verdacht auf ein malignes Geschehen, so beginnt die Diagnostik grundsätzlich möglichst nicht-invasiv. Dazu zählen beispielsweise eine ausführliche Krankheitsanamnese und eine gründliche körperliche Untersuchung mit der Fragestellung nach geschwollenen Lymphknoten oder tastbaren Verhärtungen ²⁰. Bleibt der Verdacht bestehen, so folgen bildgebende Verfahren wie eine Sonographie, ein konventionelles Röntgen, eine Computertomographie (CT) oder eine Magnetresonanztomographie (MRT). Die Wahl der Bildgebung ist abhängig von der vermuteten Tumorentität, und sowohl Sensitivität als auch Spezifität der Verfahren variieren stark.

Ergänzend werden spezielle Blutuntersuchungen auf Tumormarker durchgeführt. Dies sind biologische Produkte, die bei Vorliegen eines malignen Prozesses deutlich erhöht sein können. Beispiele hierfür sind das Prostata-spezifische Antigen (PSA), welches zum Screening eines Prostatakarzinoms eingesetzt werden kann, das CA19-9 bei Pankreas-, Magen-, Gallengangs-, oder Kolonkarzinomen sowie das Carcinoembryonale Antigen (CEA), welches bei diversen Adenokarzinomen erhöht ist. Nachteil dieser Tumormarker ist eine häufig niedrige Spezifität und Sensitivität, weshalb in der Routinediagnostik häufig Kombinationen verschiedener Tumormarker genutzt werden und die Marker eher in der Verlaufsdagnostik angewendet werden ^{23, 24}.

Auch wenn das Ergebnis der Bildgebung und der Tumormarker hoch malignitätsverdächtig ist, so ist eine endgültige Tumorsicherung lediglich durch eine diagnostische Probenentnahme aus dem Tumor oder einer Metastase und histologischer oder cytologischer Untersuchung durch einen Pathologen möglich. Liegt bei einem Patienten ein Körperhöhlenerguss vor, so muss dieser meist

aus therapeutischen Gesichtspunkten heraus punktiert werden, und die entnommene Flüssigkeit kann als Probematerial weiter diagnostisch genutzt und untersucht werden. An dieser Stelle kommt die cytologische Untersuchung zur Anwendung.

1.3 Was ist Cytologie?

Die Cytologie ist eine mikroskopisch-morphologische Methode zur Beurteilung von Einzelzellen oder kleineren Zellverbänden, die physiologisch oder forciert im Körper aus ihrem Gewebeverband gelöst wurden ²⁵.

Ihren Hauptstellenwert hat die Cytologie in der Diagnostik von Tumoren und deren Vorstufen. Ziel ist eine nicht-invasive Früherkennung von Tumoren oder idealerweise von Tumorstufen in einem bestenfalls noch heilbaren Stadium der Erkrankung. Bedeutsam ist die Cytologie auch für die histogenetische Klassifikation des diagnostizierten Tumorleidens sowie in der Tumornachsorge zur Abklärung eventueller Rezidive. Der große Vorteil gegenüber der Probengewinnung zur Histologie ist der nur geringe, oft sogar nicht-invasive Charakter der Cytologie. Die Cytologie ist Teil der präoperativ nicht oder wenig invasiven diagnostischen Tumorabklärung und ergänzt die radiologische und klinische Untersuchung.

Es werden verschiedene Methoden der Materialgewinnung unterschieden ²⁷:

Im Allgemeinen wird die Exfoliativcytologie von der Punktions- bzw. Aspirationscytologie unterschieden. Die Exfoliativcytologie, auch Abstrichcytologie genannt, basiert auf der Entnahme spontan oder forciert abgeschilfter Zellen. Diese Zellen stammen von Schleimhäuten und werden mittels Spatel oder Bürste entnommen. Die Zellen werden auf Glasobjektträger übertragen und mittels Lufttrocknung oder alkoholischer Fixative fixiert. Eine weitere Möglichkeit ist das Einbringen der Zellen nach dem Abstrich in ein flüssiges Fixationsmedium - die sogenannte flüssigkeitsbasierte Cytologie -, aus dem dann im cytologischen Labor Ausstrichpräparate hergestellt werden können. Ein Gros der Abstriche wird im Rahmen der Gebärmutterhalskrebsvorsorge aus der Cervix angefertigt, aber auch Zellen sämtlicher Schleimhäute, wie zum Beispiel des Mundes, des Gastrointestinaltraktes inklusive der Gallen- und Pankreasgänge, des Bronchialtrakts, aber auch der Bindehaut können auf diese Weise gewonnen und untersucht werden. Vorteilhaft ist, dass aufgrund der hohen regenerativen Aktivität von Schleimhäuten immer wieder neue Zellen gebildet und alte abgeschilfert werden und Abstriche somit problemlos mehrfach entnommen werden können. Andererseits sind die Zellen teilweise schlecht erhalten und neben den Zellen von Interesse finden sich auch viele andere Zellgruppen, z.B. Entzündungszellen, welche bei sehr starker Beimischung die mikroskopische Diagnostik erschweren können.

Bei der Punktionscytologie ist eine gezieltere Entnahme der suspekten Zellen möglich. Feinnadelaspirationsbiopsien (FNA) lassen sich potentiell an vielen inneren Organen sowie auch an nicht organbezogenen Raumforderungen durchführen. Verbreitet sind besonders die Punktion von Lymphknoten, der Schilddrüse oder der Speicheldrüsen. Auch im Rahmen endoskopischer Untersuchungen des Gastrointestinaltrakts ist die FNA z.B. aus Raumforderungen von Magen, Pankreas, Leber oder Nebenniere möglich. Die Punktionen können sonografisch, endosonografisch, CT-gesteuert oder auch ohne diese Hilfsmittel durchgeführt werden. Perkutane Punktionen werden mittels einfacher Spritzen mit aufgesetzten Kanülen durchgeführt, die z.B. in einen speziellen Spritzenhalter für eine leichtere einhändige Punktion eingesetzt werden können. Die andere Hand des Untersuchers fixiert und lokalisiert dabei die Raumforderung. Durch fächerförmiges Vor- und

Zurückschieben der Kanüle streng innerhalb der Raumforderung unter gleichzeitiger Aspiration werden Zellen repräsentativ aus dem Gewebe herausgelöst und zusammen mit wenig Gewebsflüssigkeit gewonnen. Die zellhaltige Flüssigkeit wird anschließend auf Glasobjektträger aufgetragen, ausgestrichen und fixiert. Alternativ kann das Aspirat in ein flüssiges Fixationsmedium für die flüssigkeitsbasierte Cytologie eingebracht werden. Endosonografische Punktate werden nach endoskopischem Zugang über das nächstgelegene Hohlorgan und nach Einstellung der Läsion im Schallweg über einen durch den Instrumentierkanal des Endoskops geführten Katheter mittels spezieller Nadeln punktiert. Hierbei wird nach Einbringen der Nadelspitze in die Läsion aspiriert und die Nadel durch Manipulation am Katheter vorsichtig in der Läsion vor- und zurückgeschoben. Die aspirierte zellhaltige Flüssigkeit kann wie vorstehend beschrieben ausgestrichen werden.

Einen weiteren großen Stellenwert nimmt die Punktion der Körperhöhlenergüsse (Pleuraerguss, Ascites sowie Perikarderguss) ein, welche Gegenstand dieser Arbeit ist. Die Mesothelien, welche die Körperhöhlen auskleiden, schilfern kontinuierlich Zellen ab und finden sich im Erguss wieder. Ebenso finden sich abgeschilferte Zellen von in die Körperhöhlen metastasierten Tumoren. Der Vollständigkeit halber seien auch noch die Liquorpunktion, die Punktion eines Gelenkergusses oder anderer Flüssigkeitsansammlungen, z.B. Hämatomen, Seromen oder Abszessen genannt.

1.4 Tumordiagnostik in der Ergusscytologie

1.4.1 Präanalytik

Bei den präparatorischen Methoden in der Ergusscytologie stehen die Ausstriche den Zellblöcken gegenüber^{26, 27}: Ein Ausstrich kann

- a) luftgetrocknet (fixiert) werden. In der Cytopathologie des UKD folgt darauf für die konventionelle mikroskopische Diagnostik standardmäßig eine Färbung nach May-Grünwald-Giemsa. An diesen Präparaten kann keine weitere immuncytochemische Untersuchung angeschlossen werden. Sie eignen sich aber z.B. für Versilberungen oder die Feulgen Färbung zur DNA-Bildcytometrie.
- b) alkoholfixiert werden (beispielsweise mittels Spray) und daraufhin mit der Färbung nach Papanicolaou gefärbt werden. Eine spätere Umfärbung zu Spezialfärbungen wie Kongorot, Silberkolloid oder Feulgen ist möglich. Diese Ausstriche eignen ebenfalls sich gut für eine weitere immuncytochemische Untersuchung.
- c) luftgetrocknet werden und ungefärbt bleiben. Diese Ausstriche sind ebenfalls für eine immuncytochemische Untersuchung geeignet.

Des Weiteren ist die Anfertigung von Formalin-fixierten Zellblöcken möglich. Diese dienen als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Schnittpräparaten. Derzeit fertigt die Cytopathologie am UKD von sämtlichen zellreichen tumorzellhaltigen Körperhöhlenergüssen Zellblöcke an. Dies ist deshalb sinnvoll, da bestimmte quantitative immuncytochemische Untersuchungen nur am Zellblockpräparat durchgeführt werden sollten, wie z.B. die Bestimmung der PD-L1 (programmed death-ligand 1) Expression für die Planung einer eventuellen Therapie mit Immuncheckpoint-inhibitoren²⁸. Dies war zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit aber noch nicht realisiert, so dass sämtliche immuncytochemische Untersuchungen für die vorliegende Arbeit an Ausstrichpräparaten durchgeführt wurden.

Je nach Expertise und Vorlieben des Cytopathologen hat jedes Labor eigene Standards bezüglich der Präparationsmethoden. Ein Problem der Immuncytologie insgesamt und der Präanalytik im Besonderen ist die fehlende Standardisierung und Diversität der Methodik, so dass Konsensusverfahren nur schwer umgesetzt werden können, was z.B. die Vergleichbarkeit von Studienergebnissen erschwert. Beim Ergebnisvergleich von Studien muss deshalb in besonderer Weise die jeweils verwendete Methodik beachtet werden. Es werden verschiedene Färbe- und Fixationsverfahren genutzt, die Methode der Immuncytochemie variiert und nicht zuletzt steht immer die Entscheidung zwischen Zellblöcken oder dem Ausstrich. Noch immer wird kontrovers diskutiert, welche Methode die höhere Sensitivität bzw. Spezifität aufweist. Eine ausreichende Kenntnis der Präanalytik ist wichtig, da diese Einfluss auf das Färbeergebnis hat. So werden Antigene auf unterschiedliche Weisen zugänglich gemacht und unterschiedlich gut stabilisiert, was zur Folge hat, dass bestimmte Antikörper besser oder schlechter binden können.

1.4.2 Morphologische Basisdiagnostik

Genauso wie in der Histologie erfolgen in der Cytologie nach der Materialentnahme und Präparation verschiedene Schritte der Diagnostik. Zunächst erfolgt die Routine-Diagnostik, in der die Ausstriche lichtmikroskopisch hinsichtlich Zellzusammensetzung sowie Zelltypen, Wachstumsmuster und weiteren Malignitätskriterien untersucht wird.

1.5 Adjuvante Verfahren in der Cytologie

Eine rein lichtmikroskopische Sicherung der Diagnose ist jedoch nicht immer ausreichend. Daher werden heutzutage ergänzende, spezialisierte Methoden wie die Immuncytochemie, die DNA-Cytometrie sowie die AgNOR-Analyse oder molekularbiologische Verfahren wie beispielsweise die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) oft bereits routinemäßig genutzt. Diese Zusatzverfahren ermöglichen z.B. die Sicherung von Malignität, erleichtern einerseits die Differenzialdiagnostik, liefern andererseits aber auch wichtige Informationen für in Frage kommende Therapieverfahren.

Das am häufigsten angewandte adjuvante Verfahren ist die Immuncytochemie. Da die immuncytochemische Färbung Gegenstand dieser Arbeit ist, wird sie hier ausführlicher thematisiert.

1.6 Immunverfahren in der Ergusscytologie

Grundsätzlich sind drei verschiedene Konstellationen denkbar, in denen der Einsatz der Immuncytochemie sinnvoll ist:

1. Lässt sich anhand der morphologischen Kriterien das Vorliegen maligner Zellen nicht ausschließen, so kommen Antikörper zum Einsatz, die zum Ausschluss bzw. Beweis eines Tumorleidens dienen. In der Literatur findet sich eine Vielzahl an Studien, welche den Nutzen der Immuncytochemie bei der Klärung der Dignität beweisen. Uneinigkeit herrscht jedoch darüber, welche Immunreaktionen am besten geeignet sind. Häufig genutzt werden die Antikörper Ber-EP4, HEA 125 oder MOC31, mit denen das von epithelialen Tumorzellen exprimierte Antigen EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) nachgewiesen wird²⁹. Typischerweise sind epitheliale Tumore außerdem negativ für Calretinin, ein Antigen, welches zum Nachweis von Mesothelzellen dient. Calretinin kann zudem hilfreich sein, um Mesothelien von Zellen eines Bronchialkarzinoms zu differenzieren³⁰. Gut geeignet ist außerdem Claudin4. Claudine sind Strukturelemente der

Tight Junctions, welche den Zellkontakt zwischen Epithelzellen bilden. Somit finden sie sich auch in Karzinomen, wohingegen reaktive Mesothelien oder Mesotheliome keine Claudine exprimieren³¹.

2. Ist das Vorliegen maligner Zellen bereits konventionell mikroskopisch oder auch nach Immunocytochemie gesichert, wird im nächsten Schritt die histogenetische Klassifikation des Primärtumors identifiziert. Dazu werden aus einer Vielzahl von Antikörpern basierend auf dem mikroskopischen Erscheinungsbild der Tumorzellen jene gewählt, mit deren Kombination der vermutete Primarius am besten nachgewiesen oder ausgeschlossen werden kann.
3. Ein Ansatz zur Therapieplanung besteht z.B. durch die Bestimmung der PD-L1-Expression für die Planung einer eventuellen Therapie mit Immuncheckpointinhibitoren bei einer Vielzahl von Tumorentitäten oder die Bestimmung der Östrogenrezeptor- oder Progesteronrezeptorexpression zur Planung einer antihormonellen Therapie bei metastasierten Mammakarzinomen.

1.6.1 Färbeprinzip

Als immunchemische Untersuchung bezeichnet man den sichtbaren Nachweis eines spezifischen Antigens mit Hilfe eines gegen dieses Antigen gerichteten, spezifischen Antikörpers. Wird diese Untersuchung an einem histologischen Schnitt durchgeführt, nennt man das Prinzip Immun*histo*chemie. Nutzt man die Methode hingegen an cytologischem Material, spricht man von Immun*cyto*chemie.

Heute existiert eine Vielzahl immunchemischer Nachweismethoden. Da es sich bei der Cytologie nach wie vor um einen kleinen Teilbereich der Pathologie handelt, ist bzw. wird ein Großteil dieser Methoden und Immunreaktionen primär an histologischen Materialien erforscht (siehe auch: Ziel dieser Arbeit). Dennoch bleibt das Prinzip der Nachweisreaktion dasselbe und soll im Folgenden kurz erläutert werden. Der Übersicht halber wird in diesem Abschnitt der Begriff der Immunhistochemie verwendet, dabei wird aber stets auch der Bereich der Immunocytochemie mit eingeschlossen.

Jeder Tumor exprimiert zahlreiche Antigene, die idealerweise für eben diesen Tumor spezifisch sind. Diese Antigene wiederum besitzen eine Vielzahl an Epitopen und jedes dieser Epitope stellt eine potentielle Bindungsstelle für einen Antikörper dar.

1.6.2 Immunhistochemische Färbemethoden

Es gibt diverse Detektionssysteme, mit denen man an Antigene gebundene Antikörper nachweisen kann. Ihnen allen gemeinsam ist eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion. In der Regel wird entweder Alkalische Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase zusammen mit einem Substrat-Chromogen verwendet.

Der Übersicht halber kann man alle hier aufgeführten Methoden grob in zwei Teilreaktionen einteilen. Zunächst muss über einen oder auch mehrere Teilschritte das gewünschte Enzym entweder direkt oder indirekt über „Konnektoren“ an das gesuchte Tumorantigen gebunden werden. An die Enzymbindung schließt sich in einem zweiten Teil immer die durch das Enzym katalysierte Chromogen-Substrat-Reaktion an. Dabei gilt: je mehr Enzym im ersten Teilabschnitt gebunden werden konnte, desto stärker fällt die Farbintensität aus.

Bei der heute fast ausschließlich genutzten indirekten Methode wird ein unmarkierter Primärantikörper verwendet und in einem zweiten Schritt ein für diesen spezifischer enzymmarkierter Sekundärantikörper hinzugegeben.

Im Laufe der Zeit wurden immer sensitivere indirekte Färbemethoden entwickelt, sodass heute eine Vielzahl zur Verfügung steht. Beispiele hierfür sind die Peroxidase-Anti-Peroxidase- (PAP) und Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP), die Polymerkonjugat-Methoden sowie die Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC-Methode) mit der Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode (LSAB) sowie catalyzed signal amplification-Methode (CSA) als Weiterentwicklung. Letztere ist Gegenstand dieser Arbeit. Daher wird das theoretische Färbeprinzip der ABC Methode bzw. ihrer Weiterentwicklungen im Teil Material und Methoden näher erläutert.

1.6.3 Monoklonale und Polyklonale Antikörper

Es werden monoklonale von polyklonalen Antikörpern unterschieden ^{32, 33}.

Monoklonale Antikörper entstammen alle derselben Plasmazelle, es handelt sich also um immunchemisch identische Klone, die alle mit demselben Epitop eines Antigens reagieren. Für die Produktion monoklonaler Antikörper werden in der Regel Mäuse genutzt. Der Maus wird hierbei das gewünschte Antigen appliziert und die Maus reagiert mit einer Immunantwort: Sie produziert Antikörper gegen das Antigen. Nun werden B-Lymphozyten aus der Milz entnommen und mit Tumorlymphozyten fusioniert, da Tumorzellen eine gewisse Immortalität mit sich tragen. Die so gewonnene Hybridomzelle ist durch Fusion eines antigenspezifischen Lymphozyten mit einem immortalen Tumorlymphozyten entstanden und bildet daher monoklonale Antikörper. Sie ist darüber hinaus besonders langlebig, sodass sie gut kultiviert werden kann.

Ein Vorteil der monoklonalen Antikörper besteht in ihrer hohen Spezifität, fehlender ungewollter Hintergrundfärbung und nur selten vorkommender Kreuzreaktionen. Voraussetzung für eine Tumorspezifität und damit für eine gute Verwendbarkeit in der Tumordiagnostik ist, dass der Antikörper gegen ein Epitop gerichtet ist, das nicht von mehreren Tumorentitäten exprimiert wird. Nachteilig ist hingegen, dass monoklonale Antikörper sehr sensibel auf mögliche pH-Wert-Veränderungen oder nur mäßige Fixationsverhältnisse reagieren und es so zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann.

Polyklonale Antikörper sind eine Mischpopulation verschiedener Antikörper, die alle gegen dasselbe Antigen gerichtet sind, allerdings an unterschiedliche Epitope binden. Sie gehen nicht auf eine Ursprungszelle zurück, sondern werden von verschiedenen Plasmazellen gebildet. Diese mehrfache Rekrutierung verschiedener B-Zellen entspricht der physiologischen Abwehrreaktion des Körpers bei einem Antigenkontakt.

Ein Vorteil besteht darin, dass polyklonale Antikörper auch dann noch an das Antigen binden können, wenn sich dessen Oberflächenstruktur etwas verändert hat. Außerdem ist die Herstellung polyklonaler Antikörper leichter, kostengünstiger als die der monoklonalen und benötigt weniger Zeit. In der Regel werden Kaninchen oder größere Tiere wie Pferde zur Antikörperproduktion genutzt, sodass auch größere Mengen des Antikörperserums produziert werden können.

Das Hauptproblem der polyklonalen Antikörper sind vermehrt auftretende unspezifische Kreuzreaktionen. Sie kommen einerseits zustande, da neben den gewünschten Antikörpern auch noch

viele weitere Antikörper im Tiereserum enthalten sind, beispielsweise durch ungewollte, unbemerkte Infekte des Tieres. Des Weiteren sind Epitope nicht notwendigerweise für ein Antigen spezifisch, ein Epitop kann also bei verschiedenen Antigenen vorkommen.

1.6.4 Antikörper-Panels und diagnostische Treffsicherheiten

Unabhängig vom Verwendungszweck der Immuncytochemie sollte nicht vergessen werden, dass kein Antikörper eine 100%ige Sicherheit bei der Detektion des für ihn spezifischen Antigens mit sich bringt. Es sollte in der Diagnostik daher immer, sofern möglich, eine Kombination mehrerer Antikörper ausgewählt werden, ein sogenanntes Antikörper-Panel.

Im Idealfall wird mit einem Such-Panel begonnen. Dieses besteht aus Antikörpern, welche eine Unterscheidung zwischen den großen Tumorklassen wie Karzinomen, Sarkomen, Mesotheliomen, neuroendokrinen Tumoren etc., die unterschiedlichen Gewebsursprungs sind, ermöglichen. Ist diese Zuteilung gelungen, erfolgt im zweiten Schritt die nähere Eingrenzung der jeweiligen Tumorklasse mit Hilfe möglichst weniger weiterer Antikörper. Je nach Ergebnis der Immunreaktion wird erneut entschieden, welche Antigen-Antikörperreaktionen im nächsten Schritt zielführend sind und wie viele weitere Durchläufe nötig sind, um zu der endgültigen Diagnose zu gelangen. Dieses schrittweise Vorgehen ist die kosten- und materialsparendste Vorgehensweise.

Dennoch findet sie im klinischen Alltag nur wenig Gebrauch, da viel Zeit und Arbeitsschritte benötigt werden. Bei der Zusammenstellung des individuellen diagnostischen Antikörper-Panels sind für den Pathologen neben der rein morphologischen Basisdiagnostik auch die Krankheitsgeschichte, das Geschlecht sowie Alter des Patienten wegweisend. Ebenfalls einen Einfluss auf die Wahl der Antikörper haben Vorlieben des Pathologen sowie laborinterne Standards. Hat der Pathologe eine Auswahl getroffen, so erfolgen zumeist alle immuncytochemischen Untersuchungen mit den ausgewählten Antikörpern in einem Durchlauf, da in der Krankenversorgung in der Regel zu enge zeitliche Vorgaben bestehen, um das oben beschriebene, schrittweise Vorgehen durchzuführen. Dies kann „unnötige“ Untersuchungen bzw. Färbungen zur Folge haben.

Im Institut für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität werden die sechs Antigene CK5/6, CK7, CK20, CA 125, TTF1 sowie cdx 2 zur Identifizierung eines unbekanntes Primärtumors (CUP: Cancer of unknown primary) verwendet³⁴. Mit Hilfe dieser Antikörper lässt sich in rund 85% der Fälle eines Tumors mit unbekanntem Primarius eine korrekte Diagnose stellen. Bei einzelnen Tumorentitäten wie beispielsweise dem Ovarialkarzinom (94%) sowie dem Lungenkarzinom (88%) ist die Treffsicherheit noch höher³⁴. Dieses Basispanel wird je nach mikroskopischem Bild durch weitere Antikörper ergänzt.

Insgesamt finden sich in der Literatur wenige Studien, welche Antikörper-Panels zur CUP-Diagnostik bei malignen Ergüssen bevorzugt eingesetzt werden könnten bzw. sollten. Viele Studien befassen sich hingegen mit der Frage, welches Antikörper-Panel am besten geeignet ist, um entweder maligne von benignen Zellen zu unterscheiden oder welche Antikörper zwischen einem (Adeno)Karzinom der Lunge und einem Mesotheliom differenzieren können. Außerdem existiert eine Vielzahl an Literatur über die Sensitivitäten *einzelner* Antikörper, aber eben nicht zu der bestmöglichen Kombination dieser. Die richtige Auswahl von Antikörpern in der Tumordiagnostik und deren Kombination zu einem Panel ist Gegenstand der fachärztlichen Ausbildung zum Pathologen und erfordert eine jahrelange diagnostische Erfahrung.

1.7 Häufig genutzte Antikörper in der Ergusscytologie

Im Folgenden werden die vier Antikörper eingeführt, deren Immunreaktion in der Ergusscytologie Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit ist.

1.7.1 GATA3

Der Transkriptionsfaktor GATA3 (GATA-3 binding protein) erhielt seinen Namen aus der DNA-Sequenz bestehend aus **G**uanin, **A**denin, **T**hymidin und **A**denin, an welcher er bindet. GATA3 gehört zur Familie der Transkriptionsfaktoren mit Zinkfingerdomäne und ist essenziell für die Zellproliferation und Zelldifferenzierung vieler verschiedener Gewebe³⁵. So ist GATA3 unter anderem Bestandteil der physiologischen Entwicklung von Brust- und Urothelzellen sowie einiger Lymphozyten^{36, 37}.

Außerdem wurde, zunächst bei der immunchemischen Untersuchung von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Zellblöcken, eine vermehrte nukleäre GATA3 Expression in Mamma- und Urothelkarzinomen beobachtet. Im Folgenden wurden auch cytologische Studien an Körperhöhlenergüssen durchgeführt, welche eine gute Sensitivität und Spezifität für GATA3 bei der Diagnostik von Mammakarzinomen bestätigen konnten. Insbesondere im Vergleich zu anderen immunchemischen Markern für Mammakarzinome wie Mammaglobin, GCDFP-15/BRST-2 (Gross Cystic Disease Fluid Protein-15), ER (Östrogenrezeptor), PR (Progesteronrezeptor) und HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) weist GATA3 in der Ergusscytologie eine deutlich bessere Sensitivität und Spezifität auf³⁶. Auch die mit einer schlechten Prognose einhergehenden triple-negativen Mammakarzinome (also Mammakarzinome, die weder ER, noch PR oder HER2 exprimieren) zeigen je nach Studie in 44-66% der Fälle³⁸ bzw. in 83% der Fälle³⁶ eine positive, wenn auch eher diffuse Immunreaktion für GATA3.

Dennoch zeigen auch weitere Tumorentitäten eine positive Immunreaktion für GATA3. So zeigen Lew und Kollegen 2015 in einer Studie an 355 malignen Körperhöhlenergüssen von 306 verschiedenen Patienten eine Spezifität von 88,5% bei der Erkennung von Mammakarzinomen. Eine positive Immunreaktion wurde außerdem bei Karzinomen der Lunge, des pankreatobiliären Systems, des oberen Magendarmtrakts sowie einigen Keimzelltumoren beobachtet³⁶.

Auch Miettinen und Kollegen kamen in einer 2014 durchgeführten Studie mit einer sehr hohen Fallzahl von 2500 untersuchten Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Proben zu dem Ergebnis, dass diverse Tumore, vor allem epitheliale, eine nukleäre GATA3 Expression aufweisen können. Plattenepithelkarzinome, insbesondere der Haut, Hautadnextumoren, Chorionkarzinome- und Dottersacktumoren sowie Mesotheliome zeigen besonders oft eine positive Immunreaktion für GATA3. Diese Immunreaktion bei Mesotheliomen wäre insbesondere in der Ergusscytologie zu beachten. Immerhin 37% aller dukталen Pankreaskarzinome exprimieren GATA3 und auch über die Hälfte aller chromophoben Nierenzellkarzinome, wobei bei keiner weiteren Entität von Nierenzellkarzinomen eine Expression beobachtet werden konnte. Tumore, die sehr selten bis nie GATA3 exprimieren, sind Karzinome des Kolons bzw. des Rektums, Karzinome des Ovars, des Endometriums und der Prostata. Alles in allem ergab sich eine Multispezifität für GATA3 bei einer guten Sensitivität von über 90%³⁹.

1.7.2 TTF1

TTF1 (thyroid transcription factor 1) ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, welcher während der Embryogenese die Gen-Expression in der Lunge, der Schilddrüse und dem Diencephalon reguliert. In der Lunge ist TTF1 wichtig für die Transkription verschiedener in Typ II-Pneumozyten produzierter Surfactant-Proteine. Karzinome der Lunge, der Schilddrüse (außer dem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom) und auch sowohl pulmonale als auch extrapulmonale kleinzellige sowie nichtkleinzellige neuroendokrine Karzinome exprimieren TTF1 ^{40, 41}.

Bei den Bronchialkarzinomen wird TTF1 v.a. von Adenokarzinomen und kleinzelligen Karzinomen exprimiert, aber auch pulmonale Plattenepithelkarzinome zeigen in 7 bis 10% der Fälle eine Expression von TTF1. Extrapulmonale Kleinzeller weisen allerdings auch in bis zu 90% eine TTF1 Expression auf ⁴⁰.

Typische extrapulmonale bzw. extrathyreoidale nicht neuroendokrine Tumore mit positiver TTF1-Expression sind einige Ovarialkarzinome. So beschreiben Conner et al. bei serösen Ovarialkarzinomen (7 von 19) sowie etwas seltener bei klarzelligen Ovarialkarzinomen (1 von 3) und endometrioiden Karzinomen (1 von 5) eine positive nukleäre Expression von TTF1. Auch Endometriumkarzinome, extrahepatische cholangiozelluläre Karzinome sowie einige Speicheldrüsentumore ⁴² können TTF1 exprimieren. Siami et al. konnten insbesondere bei endometrioiden Adenokarzinomen eine TTF1-Expression nachweisen. 6 der 32 untersuchten endometrioiden Adenokarzinome (19%) zeigten eine TTF1-Expression mit Score-Werten zwischen 1 und 4, jedoch nur 2 Fälle (6%) zeigten ein diffuses Färbemuster ⁴³.

Die Sensitivität für TTF1 bei der Diagnostik pulmonaler Adenokarzinome schwankt zwischen 54% ⁴⁴ und 70-90% ⁴², üblicherweise werden aber Sensitivitäten zwischen 60 und 70% angegeben ^{34, 40}. Mit rund 90% ist die Spezifität für pulmonale Adenokarzinome und Schilddrüsenkarzinome von TTF1 vergleichsweise gut ^{34, 40}.

1.7.3 Napsin A

Napsin A (NapA) ist eine cytoplasmatische Aspartat-Proteinase, welche besonders in der Lunge und dem Tubulussystem der Niere, in geringem Maße aber auch in einigen exokrinen Drüsen wie z.B. im Pankreas exprimiert wird ⁴⁰. Auch einige Lymphozyten sowie die Milz zeigen eine schwache Immunreaktion mit Antikörpern gegen Napsin A ⁴⁵. Innerhalb der Lunge findet sich Napsin A vornehmlich in Alveolarmakrophagen und Typ II-Pneumozyten, in welchen es an der proteolytischen Spaltung der Surfactantvorläuferproteine beteiligt ist ^{40, 46}.

Napsin A hat sich vornehmlich bei der Diagnostik pulmonaler Adenokarzinome bewährt. In Studien zeigte Napsin A für Adenokarzinome der Lunge mit 80 bis 90% eine durchweg gute Sensitivität ^{40, 47, 48}. In allen drei hier genannten Studien wurde die immunocytochemische Untersuchung an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Zellblöcken durchgeführt. Die größte Studie stellt dabei die von Turner et al. dar ⁴⁰: 1674 Tumorpräparate wurden immunocytochemisch untersucht, davon 555 Lungenkarzinome, die sich wiederum in 303 Adenokarzinome, 200 Plattenepithelkarzinom und 52 kleinzellige Karzinome unterteilen.

Kim und Kollegen zeigten außerdem, dass in einem Großteil der Napsin A exprimierenden Tumore über 75% der Tumorzellen eine positive Immunreaktion zeigten. Bei TTF1 hingegen war dies nur in etwa 20% gegeben. Überhaupt war Napsin A mit einer Detektion von 83% (44/53) der pulmonalen

Adenokarzinome gegenüber 57% (30/53) bei TTF1 durchweg deutlich überlegen bei der Erkennung pulmonaler Adenokarzinome⁴⁸. Die kombinierte Untersuchung mit beiden Antikörpern ergab mit 80% eine ähnliche Sensitivität wie Napsin A allein⁴⁹.

Unter den extrapulmonalen Tumoren mit Napsin A Expression sind Nierenzellkarzinome, insbesondere das papilläre Nierenzellkarzinom mit Expression in 70-90% der Fälle, klarzellige Ovarialkarzinome sowie in 10-20% das Nebennierenrindenzellkarzinom (ACC) zu nennen⁴².

Turner und Kollegen verglichen in einer großen Studie die beiden Antigene Napsin A und TTF1 im Hinblick auf das Expressionsprofil bei NSCLC (non small cell lung carcinoma). Die weitere histogenetische Klassifikation von NSCLC ist entscheidend für die Therapiewahl: Adenokarzinome können EGFR (epidermal growth factor receptor) Mutationen aufweisen, welche mittels Tyrosinkinaseinhibitoren behandelt werden können. Zudem kommen beim Adenokarzinom Anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) Antikörper zum Einsatz, wohingegen diese Therapie bei Plattenepithelkarzinomen aufgrund eines deutlich erhöhten Blutungsrisikos sogar gefährlich ist. Letztlich zeigte sich folgendes Expressionsprofil innerhalb der Lungenkarzinome: Adenokarzinome exprimierten sowohl Napsin A als auch TTF1, Kleinzeller wiesen lediglich eine Expression von TTF1 auf und Plattenepithelkarzinome zeigten keine Immunreaktion⁴⁰.

Ein Großteil der Studien wurde an Zellblöcken von Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe durchgeführt. Knoepf et al. konnten jedoch auch bei der immunocytochemischen Untersuchung von luftgetrockneten und Formalin-fixierten Ergussausstrichen eine fast 80%ige Sensitivität der Immunreaktion mit Napsin A für pulmonale Adenokarzinome feststellen. Auch hier war der Nachweis der Napsin A Expression derjenigen des Transkriptionsfaktors TTF1 in der Erkennung metastasierter Adenokarzinome der Lunge überlegen⁵⁰.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der immunchemische Nachweis einer Napsin A Expression im Vergleich zur TTF1 Expression sensitiver für das pulmonale Adenokarzinom ist. Lediglich bei der Differentialdiagnose zu papillären Nierenzellkarzinomen und klarzelligen Ovarialkarzinomen ist Vorsicht geboten, wobei extrapulmonale Tumore im Durchschnitt eine deutlich schwächere Färbung zeigen. Kritisch hinterfragt werden sollte bei starkem Verdacht auf ein pulmonales Adenokarzinom auch immer der Differenzierungsgrad des Tumors. Bei schlecht differenzierten Karzinomen kann die Napsin A Expression fehlen⁴⁰.

1.7.4 Mucin 1

Mucin 1 (MUC1) ist ein cytoplasmatisches Membran-assoziiertes Glykoprotein, welches physiologischer Weise an der apikalen Seite epithelialer Zellen verschiedener Gewebe zu finden ist. Zu diesen Zellen zählen Drüsenzellen des Endometriums, in welchem die MUC1 Expressionshöhe zyklusabhängig variiert⁵¹, sowie zentroazinäre Zellen des Pankreas und einige Zellen intralobulärer Gänge des Pankreas. In allen anderen gesunden Zellen des Pankreas- oder Gallengangsgewebes konnte keine Expression gezeigt werden⁵².

Außer im gesunden Gewebe wird MUC1 auch von vielen muzinösen Tumoren exprimiert. In malignen Zellen ist die Polarität der Zelloberflächenverteilung aufgehoben und MUC1 findet sich zusätzlich zur apikalen Seite auch an der cytoplasmatischen sowie lateralen Zellwand⁵¹. Eine Überexpression von MUC1, wie sie in vielen Tumorzellen zu finden ist, führt durch die große, rigide Mucin-Struktur zu verminderter Zell-Zell-Interaktion, MUC1 fungiert als „Anti-Adhäsionsmolekül“.

So wird unter anderem die Interaktion mit cytotoxischen T-Lymphozyten vermindert, wodurch invasives Wachstum erleichtert wird ⁵³.

Insgesamt geht eine MUC1-Expression in Neoplasien mit einem aggressiven und prognostisch schlechten Krankheitsverlauf einher. In fast allen Formen pankreatobiliärer Adenokarzinome findet sich eine MUC1-Überexpression. Insbesondere in duktalem und intraduktalem tubulärem Pankreas- und cholangiozellulärem Karzinom sowie Papillenkarcinomen vom pankreatobiliären Typ lässt sich MUC1 immunhistochemisch nachweisen ⁵².

Da MUC1 physiologisch von Drüsenzellen z.B. der Mamma, des Ösophagus, des Magens und des Duodenums, des Uterus sowie der Prostata und der Lunge exprimiert wird, können auch alle von diesen Zellen ausgehenden Adenokarzinome eine MUC-1 Überexpression aufweisen. So findet sich eine gesteigerte MUC1 Expression auch bei Mamma- und Endometriumkarzinomen, Prostatakarzinomen, Lungenkarzinomen, Ösophaguskarzinomen oder Magenkarzinomen. Weniger häufig beobachtet man auch eine MUC1 Expression bei hämatopoetischen Zellen.

Epithelzellen der Haut sowie mesenchymale Zellen zeigen typischerweise keine MUC-1 Expression ⁵⁴.

Kleinzellige Lungenkarzinome können ebenfalls eine MUC1-Expression aufweisen und auch hier gilt MUC1, insbesondere im Vergleich zum surfactant apoprotein A (SA-A), als Marker für einen aggressiven Verlauf ⁵⁵.

1.8 Ziel der Arbeit

Die oben beschriebene Spezifitätsverteilung der Antikörper ist vor allem in der *histologischen* Diagnostik untersucht worden.

Ogleich es auch einige Arbeiten zum Färbeverhalten von Antikörpern in der Cytologie gibt, so untersuchen diese in der Regel Zellblockpräparate, welche z.B. aus Feinnadelpunktaten aber auch von Körperhöhlenergüssen gewonnen werden. Zellblockpräparate werden - ebenso wie histologisches Gewebe - durch Formalinfixation sowie Paraffineinbettung weiter aufbereitet. Die nahezu identische Präparation erlaubt somit auch eine identische Interpretation des Farbeergebnisses wie sie der Pathologe in der histopathologischen Diagnostik gewohnt ist.

Im Funktionsbereich Cytologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hingegen werden in der Standarddiagnostik luftgetrocknete und mit Alkohol fixierte Ausstrichpräparate immunocytochemisch untersucht. Dies ist notwendig, da oft lediglich bereits vom Kliniker angefertigte Ausstrichpräparate zur Diagnostik verfügbar sind. Von diesen Ausstrichen können nachträglich keine Zellblockpräparate mehr hergestellt werden und es ist daher mit Unterschieden in der Methodik und Interpretation immunochemischer Untersuchungen zu rechnen.

Ziel der Arbeit ist es, das Expressionsmuster der primären Antikörper GATA3 (als Antikörper zur Detektion für Mammakarzinome und Urothelkarzinome), Napsin A und TTF1 (als Antikörper zur Erkennung von Bronchial- und Schilddrüsenkarzinome) und Mucin 1 (als eher unspezifischem Antikörper vieler Adenokarzinome) an pleural,- peritoneal und perikardial metastasierten Tumoren der verschiedenen Organe an alkoholfixierten Ausstrichpräparaten zu untersuchen. Insbesondere geht es um die Frage, ob es Tumore gibt, die für einen der o.g. Antikörper eine Immunreaktion zeigen, ohne dass dieses am cytologischen Untersuchungsmaterial in der Routinediagnostik erwartet wird. Konkret bedeutet dies beispielsweise, dass Lungenkarzinome gelegentlich eine positive Immunreaktion für GATA3 zeigen können, obwohl dieser allgemein als ein Antikörper für Mamma- und Urothelkarzinome gilt.

Fragen wie diese haben große Auswirkungen für den Patienten, da je nach Ergebnis der immunocytochemischen Untersuchung unterschiedliche Primärtumoren erwartet werden und ggf. noch weiter klinisch abgeklärt werden müssen. Oft ist ein maligner Erguss Erstsymptom einer malignen Erkrankung und je nach Entität stehen für den Patienten verschiedene Therapieoptionen zu Verfügung. So unterscheidet sich auch die Lebenserwartung eines metastasierten Pankreaskarzinoms deutlich von der eines metastasierten Mammakarzinoms. Somit ist es ebenfalls Ziel der Arbeit, durch bessere Kenntnis der Expressionsprofile der untersuchten Antigene Fehldiagnosen nach immunocytochemischen Untersuchungen zu minimieren und die Differentialdiagnostik zu verbessern.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Dem Institut für Pathologie, Funktionsbereich Cythopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf werden jährlich etwa 3200 spontan entstandene Pleuraergüsse, Asciten und Perikardergüsse zu diagnostischen Zwecken zugesandt. Bei ca. 37% der untersuchten Pleuraergüsse ist eine maligne Grunderkrankung Ursache der Ergussbildung^{56,57}. Eine cytologisch tumorpositive Diagnose wird in ca. 18% der Pleuraergüsse gestellt⁵⁷.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine ausschließlich an Archivmaterial durchgeführte experimentelle, retrospektive Kohortenstudie, in der Ergüsse mit positivem Tumorzellnachweis weiter untersucht wurden. Des Weiteren wurden die klinischen Akten bei den einsendenden Kliniken eingesehen, um mittels Krankengeschichte, Arztbriefen und histologischen Befunden im sogenannten „Follow-Up“ Daten zu Krankengeschichte und zugrundeliegenden Tumorerkrankung zu erhalten.

Berücksichtigt wurden alle malignen Ergüsse, die dem Funktionsbereich Cytopathologie im Zeitraum vom 01.01.2011 bis zum 30.06.2015 entweder aus verschiedenen Fachabteilungen der Uniklinik Düsseldorf selbst oder der Klinik für Pneumologie, Kardiologie und internistische Intensivmedizin des Florence-Nightingale-Krankenhauses Düsseldorf zur punktionscytologischen Untersuchung zugesandt wurden. Andere externe Einsender wurden nicht berücksichtigt, da aus früheren Studien bereits Probleme bei der Erhebung des Follow-Ups bekannt waren.

Es wurden solche Patienten ausgeschlossen, deren **primärer** Befund **nicht** „Tumorzell-positiv“ lautete. Dies beinhaltet sowohl die cytologischen Diagnosekategorien „dringender Verdacht“ als auch „zweifelhaft“. Eine solche Situation ist beispielsweise dann denkbar, wenn sich anhand der Zellmorphologie lediglich ein Hinweis für Tumorzellen ergibt, ein maligner Erguss aber nicht sicher diagnostiziert werden kann.

Somit ergab sich ein Studienkollektiv von malignen Körperhöhlenergüssen, welche im Rahmen dieser Studie näher betrachtet wurden. Da von einigen Patienten mehrfach Ergüsse zur cytologischen Diagnostik eingesandt wurden, sind Patienten-Doppelungen möglich.

2.2 Ethikvotum

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität hat das Projekt hinsichtlich der ethischen und rechtlichen Unbedenklichkeit geprüft (Studennummer 5320, Votum vom 22.12.2015).

2.3 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Die Gesamtzahl der zu untersuchenden Ergüsse wurde im Folgenden weiter eingrenzt:

1. Zuerst wurden alle Präparate ausgeschlossen, bei denen im cytologischen Befund bereits notiert war, dass für ergänzende immunocytochemische Untersuchungen nicht genug Zellmaterial zur Verfügung stand.
2. Außerdem mussten noch jene Fälle aus der Studie ausgeschlossen werden, bei denen nicht genug archivierte Ausstrichpräparate zur weiteren Untersuchung vorhanden waren.

3. Im nächsten Schritt wurden alle übrigen Ausstrichpräparate mikroskopiert und hinsichtlich Zellzahl, ausreichender alkoholischer Fixation und Zellerhalt untersucht. Die Einteilung der Zellzahl erfolgte dabei semiquantitativ in drei Stufen. Alle Ergüsse mit sehr geringer und damit für die Studie unzureichender Tumorzellzahl wurden mit einem „+“ bewertet, ausreichende Zellzahl mit „++“ und all jene Ergüsse, die massenhaft Tumorzellen enthielten, erhielten den Score „+++“. In zwei Fällen wurden jedoch auch Ergüsse mit nur einer geringen Tumorzellzahl (also dem Wert „+“) einbezogen. Dies war möglich, da die Präparate insgesamt zwar wenige Zellen trugen, es sich bei den vorliegenden Zellen aber fast ausschließlich um Tumorzellen handelte, sodass eine Beurteilung der Färbung dennoch gut möglich war. Eine Gefahr der Fehlbeurteilung von Nicht-Tumorzellen (z.B. Mesothelien) bestand hier also nicht. Außerdem wurden die Ausstrichpräparate hinsichtlich der gleichmäßigen Verteilung der Tumorzellen untersucht, da wenn möglich der Objektträger in zwei Bereiche für verschiedene Immunreaktionen unterteilt werden sollte.

Nach oben beschriebener ausführlicher Selektion aller eingegangenen Ergüsse der Jahre 2011 - Juni 2015 wurden die verbliebenen Präparate mithilfe immuncytochemischer Färbungen auf das Expressionsprofil von GATA3, TTF1, Napsin A sowie Mucin 1 hin untersucht.

2.4 Follow-Up

Die Erhebung des Follow-Up zur Ermittlung des Referenzstandards fand sowohl in der Uniklinik Düsseldorf als auch am Florence-Nightingale-Krankenhaus Düsseldorf statt.

Es wurden die Krankenakten der eingeschlossenen Patienten eingesehen und folgende Punkte der Krankengeschichte aus den Arztbriefen, der klinischen Dokumentation, den Befunden der Bildgebung sowie den histologischen Befunden entnommen:

- Art der Diagnosesicherung (Biopsie, Bildgebung)
- Histogenetische Tumorklassifikation
- TNM-Klassifikation bei Erstdiagnose
- Datum der Erstdiagnose sowie Überlebenszeit / Dauer der Nachverfolgung nach Diagnosestellung
- Ggf. erfolgte Therapie vor bzw. nach Punktion des Ergusses
- Zweit-Tumore
- Risikofaktoren (sofern bekannt): insbesondere Nikotinabusus, Alkoholabusus, positive Familienanamnese bezüglich früher Tumorerkrankungen, genetische Risikofaktoren wie z.B. BRCA1 (Breast Cancer 1) Keimbahnmutation, berufliche Exposition wie z.B. Asbestbelastung
- Relevante Grunderkrankungen (kardiale Grunderkrankungen wie z.B. Herzinsuffizienz, Vorhofflimmern, pulmonale Grunderkrankungen wie z.B. COPD (chronic obstructive pulmonary disease) oder Asthma bronchiale, chronische Niereninsuffizienz, Leberzirrhose, HIV (Humane Immundefizienz-Virus), Hepatitis)

2.5 Klinisch-histologischer Referenzstandard

Als Referenzstandard für die histogenetische Tumorklassifikation wurde diejenige für den Körperhöhlenerguss ursächliche Tumorentität definiert, auf welche sich die klinisch behandelnden Ärzte nach Auswertung aller in der Krankenakte vorliegenden Untersuchungsergebnisse im endgültigen Arztbrief festlegten.

Bei der Definition des Referenzstandards wurde bewusst die Entscheidung getroffen, nicht ausschließlich die vorliegenden histologischen Befunde allein als Referenzstandard zu nutzen. Einerseits, weil bei hinreichendem klinischem Verdacht und eventuellen Risiken einer nötigen (operativen) Gewebeentnahme eine histologische Sicherung aus dem Primärtumor nicht zwingend notwendig ist, wenn eine cytologische Diagnose der Metastase (z.B. Pleurakarzinose) vorliegt. Andererseits, weil auch bei histologischer Sicherung Fehldiagnosen möglich sind. Dies ist beispielsweise dann der Fall, wenn das eingesandte Gewebe keine malignen Zellen oder nur nekrotisches Material enthält. Ist eine solche Konstellation gegeben, stellt der Pathologe ggf. fälschlicherweise die Diagnose „kein Anhalt für Malignität“. Das Gewebe für die histologische Untersuchung wurde oftmals bioptisch aus einem tumorsuspekten Herdbefund gewonnen, teilweise auch durch die Exzision suspekter Lymphknoten oder -bei bereits erfolgter Tumoroperation- aus dem OP-Präparat selbst.

In den Fällen, wo der histologische Befund nicht mit zur Bestimmung der histogenetischen Tumorklassifikation herangezogen wurde oder wo kein histologischer Befund vorlag, wurden andere Parameter zur klinischen Entscheidung der Tumorentität herangezogen. Relevant war hier zunächst die individuelle Krankheitsgeschichte des Patienten. Neben Alter, Geschlecht und Risikofaktoren wie Nikotin-, Alkohol-, oder Drogenabusus war auch eine ausführliche Anamnese hinsichtlich Tumorerkrankungen in der Familie hilfreich.

Mithilfe einer gezielten Patientenanamnese konnten die klinisch behandelnden Ärzte die wahrscheinlichsten Diagnosen eingrenzen. Anschließend wurden diese Diagnosen durch weitere Untersuchungen gestützt oder widerlegt. Zu den durchgeführten Untersuchungen zählten verschiedenste bildgebende Verfahren - am häufigsten genutzt wurden die Computertomographie, die Magnetresonanztomographie, das konventionelle Röntgen sowie seltener die Positronen-Emissions-Tomographie. Weiterhin kamen endoskopische Untersuchungen wie die Endosonographie, die Bronchoskopie oder die Gastro- bzw. Koloskopie zum Einsatz. Nach Abwägung all dieser Befunde sowie Berücksichtigung des Befunds der Ergusscytologie wurde die abschließende klinische Diagnose gestellt, welche den Referenzstandard für die vorliegende Arbeit darstellt.

2.6 Treffsicherheit der cytomorphologischen und immunocytochemischen Bestimmung des Primärtumors einer Karzinose in der Routinediagnostik

In der vorliegenden Arbeit wird die Treffsicherheit der cytologischen Tumorklassifikation in Kategorien mit absteigendem Grad der Übereinstimmung zur klinisch-histologischen Referenzdiagnose gegliedert:

1. Die cytologische Tumorklassifikation stimmt mit der klinisch-histologischen Diagnose überein
2. Die cytologische Tumorklassifikation stimmt mit der klinischen Diagnose weitgehend überein
3. Die (ungenau) cytologische Tumorklassifikation stimmt nicht mit der klinischen Diagnose überein, schließt sie aber auch nicht aus
4. Die cytologische Tumorklassifikation und die klinische Diagnose stimmen nicht überein

Wird beispielsweise cytopathologisch die Diagnose eines „Nicht kleinzelliges Karzinoms“ gestellt und im weiteren Verlauf nach histologischer Sicherung ein „Adenokarzinom der Lunge“ als Primärtumor diagnostiziert, so ist dies eine Konstellation der dritten Wertungskategorie. Die cytologische Diagnose schließt dabei das Adenokarzinom der Lunge mit ein und ist somit nicht falsch, alleinig allerdings nicht hinreichend für den behandelnden Arzt, um eine konkrete Diagnose zu stellen und eine entsprechende Therapie beginnen zu können.

2.7 Materialien

Die im Folgenden genannten Chemikalien und Geräte wurden für die von mir persönlich durchgeführte immunocytochemische Färbung selbst oder für ihre vorgeschalteten Prozesse benötigt.

Reagenzien	Artikelnummer	Hersteller	Menge
Xylol	1.08586.2500	VWR	2,5l
Ethanol 99,5%	3413132	VWR	1l
Ethanol 96%	3417696	VWR	1l
Aqua dest steril	3404939	Otto Fischar	10l
Methanol	1.06008.2500	VWR	2,5l
Mayers Hämalun	1.09249.1000	VWR	1l
Aquatex	1.08562.0050	VWR	50ml
Für den PBS-Puffer			
di-Natriumhydrogenphosphat	1.06586.0500	VWR	500g
Kalium-di-hydrogenphosphat	104873	VWR	250g
Natriumchlorid	1.06404.1000	VWR	1kg
Aqua dest steril	3404939	Otto Fischar	10l
1 N HCL	1.09970.0001	VWR	1l
Für den Tris-Puffer			

Tris-hydroxymethyl-aminomethan	1.08382.0500	VWR	500g
Aqua dest steril	3404939	Otto Fischar	10l
5 N HCL	1.09911.0001	VWR	1l
PBS-Puffer- Gebrauchslösung (s.o.)			
Für den Acetat-Puffer			
Essigsäure 100%	818755	VWR	1l
Natriumacetat-Trihydrat	1.06267.0500	VWR	500g
Für den Citrat-Puffer			
Natriumcitrat	359084-250G	Merck	250g
Citronensäure	1.00244.0500	(VWR) Merck	500g
Für das Normalserum (Mouse Antikörper)			
Normalserum Horse	S-2000	Vector	20ml
Tris-Stammlösung (s.o.)			
Für den Sekundär- Antikörper			
Biotinylated Universal Anti-Mouse IgG/ Anti- Rabbit	BA-2000	Vector	1,5mg
Normalserum Horse	S-2000	Vector	20ml
Tris-Stammlösung (s.o.)			
Für das ABC-Elite- Standard-Reagenz			
Vectastain ABC-Elite Standard (Lösung A und B)	PK-6100	Vector	4ml
Tris-Puffer (s.o.)			
Für die AEC-Chromogen Lösung			
3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC)	AC131C100	DCS	100ml
N,N-Dimethylformamid	40252-25ML-F	Merck	25ml
Wasserstoffperoxid 30%	1.07209.0250	VWR	250ml
Acetat-Puffer (s.o.)			
Antikörper			
GATA3	CM405B	Cytomed	0,5ml
TTF1	TI6I4C002	DCS	0,2ml
NapA	Mob 463-05	Cytomed	0,5ml
MUC1	MI992C01	DCS	1ml

Geräte	Artikelnummer	Hersteller
Glasküvetten mit Deckel		Welabo
Schieferdeckerglaskasten mit Deckel		Welabo
Glasobjekträgerhalter		Welabo
Eppendorfpipetten		Welabo
Pipettenspitzen		Starlab
Eppendorfcups 1,5ml	72.690.001	Sarstedt
Ständer für Eppendorfcups		Starlab/UKD

Plastikpasteurpipetten	3217236	ratiolab
Kurzzeitwecker		Welabo
Vortexer		Welabo
Plastikpinzette		Welabo
Dako-Pen	S 2002	Dako
Feuchte Kammer		Eigenbau
1l Laborglasflaschen mit Verschluss		Welabo
250ml Becherglas von Schott		Welabo
150ml Becherglas von Schott		Welabo
50ml Becherglas von Schott		Welabo
Faltenfilter 520 B ½	10 331 551	Whatmann
Trichter		Welabo
Objekträger mit Mattrand, 76x76mm	3217222	Engelbrecht
Deckglas		
Analysenwaage	Basic Plus 201	Satorius AG, Göttingen
Feinwaage	EW	Kern & Sohn
Wasserbad	WB/0B7-45 WBU 45	Memmert GmbH
Kühlschrank	ES.	Liebherr S.A
Magnetrührer		
Magnetrührstab		
15ml Greiner-Spitzröhrchen		
15ml Plastiktropfflaschen		
pH-Meter 765	Climatic	Knick
Zentrifuge	Rotina 46	Hettich

PBS-Stammlösung

- 8g NaCl in 500ml Aqua dest steril mittels Magnetrührer lösen lassen
- 1,463g di-Natriumhydrogenphosphat und
- 0,245g Kaliumdihydrogenphosphat hinzugeben, vollständig lösen lassen, mit
- Aqua dest steril auf 900ml auffüllen, mit
- 1N HCL auf pH 7,6 einstellen und mit
- Aqua dest steril auf 1000ml auffüllen

PBS-Gebrauchslösung (1:20)

- 50ml PBS-Stammlösung mit
- 950ml Aqua dest steril auf
- 1000ml Gebrauchslösung auffüllen

Tris-Stammlösung 0,5M

- 60,57g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan in 750ml Aqua dest steril mittels Magnetrührer lösen lassen, mit
- 5 N HCL auf pH 7,6 einstellen und mit
- Aqua dest steril auf 1000ml auffüllen

Tris-Gebrauchslösung in PBS-Puffer (1:10)

- 100ml Tris-Stammlösung mit
- 900ml PBS-Puffer-Gebrauchslösung (s.o.) auf
- 1000ml Tris-Gebrauchslösung auffüllen

Acetat-Puffer 0,1M pH 5,2

- 700 ml 0,1M Natriumacetatlösung (dazu 13,61g Natriumacetat-Trihydrat mit Aqua dest steril auf 1000ml auffüllen) und
- 210 ml 0,1M Essigsäure (dazu 5,75 ml 100% Essigsäure mit Aqua dest steril auf 1000ml auffüllen) vermischen, mit
- 5 N HCL auf pH 5,2 einstellen und mit
- 0,1M Natriumacetatlösung auf 1000ml auffüllen

Citrat-Puffer 10mM pH 6,0

- 1,8ml Stammlösung A (21,014 g Citronensäure mit Aqua dest steril auf 1000ml auffüllen,) und
- 8,2ml Stammlösung B (29,41 g Natriumcitrat mit Aqua dest steril auf 1000ml auffüllen) vermischen, mit
- Aqua dest steril auf 100ml auffüllen

Normalserum Mouse Antikörper

- 1,5ml Normalserum Horse in
- 100ml 1:10 verdünnter Tris-Stammlösung (dazu 10ml Tris-Stammlösung mit 90ml Aqua dest steril vermischen) auflösen lassen, in
- 15ml Greiner-Spitzröhrchen füllen, bei 4°C kühl lagern

Universal Sekundär-Antikörper (Link)

- 1,5ml Normalserum Horse und
- 1 ml Biotinylated Universal Anti-Mouse IgG/ Anti-Rabbit in
- 100ml 1:10 verdünnter Tris-Stammlösung (dazu 10ml Tris-Stammlösung mit 90ml Aqua dest steril vermischen) pipettieren und gut auflösen lassen, in
- 15ml Greiner-Spitzenröhrchen füllen, bei 4°C kühl lagern

ABC-Elite-Standard-Reagenz

- 36 Tropfen ABC-Elite-Standard **A** sowie
- 36 Tropfen ABC-Elite-Standard **B** zu
- 90ml 1:10 verdünnter Tris-Stammlösung pipettieren (dazu 9ml Tris-Stammlösung mit 81ml Aqua dest steril ad 90ml auffüllen), mittels Magnetührer gut vermischen, in
- 15ml Plastiktropfflaschen füllen, vor Verwendung 30min bei Raumtemperatur (RT) stehen lassen

AEC-Chromogen-Lösung

- 7,2ml N-N-Dimethylformamid zu
- 28mg AEC pipettieren, mittels Magnetrührer gut lösen lassen, zu
- 100ml 0,1M Acetatpuffer pH 5,2 geben, gut mischen,
- 106µl 30% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) dazu pipettieren, gut mischen, filtrieren
- Filtrieren mittels Faltenfilter, zügig verwendet (max. 1h haltbar)

2.8 Aufarbeitung der Proben

Die Herstellung der Ausstichpräparate aus dem Jahr 2011 unterscheidet sich von der der übrigen Präparate, da die Standardmethodik der Fixation im Jahr 2011 umgestellt wurde. Die Präparation, Fixierung und Färbung folgte dabei den jeweils gültigen Standardprotokollen des Funktionsbereichs Cytopathologie und wurde von den dortigen medizinisch-technischen Assistentinnen durchgeführt.

Zunächst wird die Methodik bis 30.04.2011 kurz aufgeführt:

Sofern nicht bereits bei Einsendung des Ergusses in einem solchen Röhrchen vorliegend, wurden zunächst 50ml des nativen Ergusses in ein Greiner- oder Sarstedt-Spitzröhrchen gegeben. Dabei war sowohl Farbe als auch Konsistenz des Ergusses zu dokumentieren, da deren Ausprägung Einfluss auf die Diagnosestellung haben kann. Außerdem wurden acht Objektträger mit der Eingangsnummer (C-Nummer) des Labors beschriftet und durchnummeriert. Das weitere Standardprocedere beinhaltete die folgenden Schritte:

- Zentrifugation bei 500g (1800rpm) über 5min
- Durch Zentrifugation entstandenen Überstand in separates Spitzröhrchen dekantieren
- Sediment in der Restflüssigkeit aufschütteln
- Anfertigung von acht Ausstrichen: jeweils ca. 20µl Sedimentflüssigkeit auf einen OT geben, mit einem weiteren, aufgesetzten OT dünn in Längsrichtung ausstreichen
- 5 Ausstriche (OT 1-5) zügig in eine Glasküvette mit Delaunay-Fixativ stellen und nach mindestens 20min Fixation nach PAP (Papanicolaou) färben (s.u.)
- 3 (OT 6-8) Ausstriche lufttrocknen lassen und nach MGG (May-Grünwald-Giemsa) färben (s.u.)

Bei der Methodik ab dem 01.05.2011 unterscheidet sich die Vorbereitung samt Zentrifugation und das Ausstreichen der Präparate nicht von der früheren Methode. Der Unterschied besteht lediglich darin, dass die mit Delaunay fixierten Ausstriche durch alkoholfixierte Präparate ersetzt wurden. Außerdem werden insgesamt nur noch sechs Präparate ausgestrichen, welche nun wie folgt zu fixieren und zu färben sind:

- OT 1 bis 3 werden luftgetrocknet und nach MGG (May-Grünwald-Giemsa) gefärbt (s.u.)
- OT 4 bis 6 werden nach dem Ausstrich aus etwa 20cm Entfernung sofort mit einem alkoholischen Fixationsspray (Merckofix) besprüht und nach Pap (Papanicolaou) gefärbt (s.u.)

2.8.1 May-Grünwald-Giemsa-Färbung (MGG-Färbung)

Die May-Grünwald-Giemsa-Färbung wird auch Pappenheim-Färbung genannt und ist die Standardfärbung für luftgetrocknete Präparate in der extragenitalen Cytologie, also der Färbung von z.B. Pleuraergüssen, Ascites, Schilddrüsenpunktaten, Liquores oder Knienpunktaten.

Das Färbeprinzip basiert auf der Reaktion von sauren (Eosin), basischen (Methylenblau) und neutralen Anteilen im Farbstoff mit sauren und basischen Bestandteilen der Zellen. Alle basischen Proteine weisen positive Ladungen auf, da sie als Protonenakzeptoren fungieren, und reagieren daher gut mit den negativ geladenen sauren Farbstoffen. So färbt sich beispielsweise das Hämoglobin der Erythrozyten auf Grund eines hohen Anteils an basischen Proteinen rot. Insgesamt ergibt sich für die MGG-Färbung folgendes Farbverteilungsmuster:

Zellen bzw. Zellbestandteile	Farbe
Kerne	Blau-violett
Cytoplasma	Blau bis rosa
Erythrozyten	Rot
Bakterien und Pilze	Blau
Nukleolen	Blau
Schleim	Rosa

2.8.2 Färbung nach Papanicolaou

Im Unterschied zur MGG-Färbung wird die Färbung nach Papanicolaou an alkoholfixierten Präparaten durchgeführt. Sie dient hierbei als Standardfärbung in der Cytopathologie und ist besonders gut für die Krebsdiagnostik geeignet, da das Kernchromatin mit dieser Färbung sehr gut dargestellt werden kann.

Die Zellkerne werden mit der Papanicolaou-Färbung typischerweise dunkelviolett angefärbt und sind auffällig gut erhalten. Das Farbergebnis des Cytoplasmas ist abhängig von der Dichte und variiert zwischen blaugrün bis orange.

2.9 Immuncytochemische Färbung

2.9.1 Vorbereitung der Präparate

Für die vorliegende Arbeit wurden lediglich alkoholfixierte Präparate verwendet, an denen die Immuncytochemie im Funktionsbereich Cytopathologie etabliert ist. Die übrigen luftgetrockneten Präparate verblieben zur Sicherstellung der Aufbewahrungspflicht im Archiv.

Die immuncytochemische Färbung erfolgte dabei entsprechend dem im Funktionsbereich Cytopathologie etablierten Routineprotokoll⁵⁸ und auch die spätere Auswertung (siehe Auswertung der immuncytochemischen Färbung) erfolgte nach diesem Protokoll. Es wurden vier primäre Antikörper verwendet: GATA3, TTF-1, Mucin 1 und Napsin A. Diese vier Antikörper kommen auch in der Routinediagnostik der Cytopathologie der Uniklinik Düsseldorf zum Einsatz. So ergab es sich gelegentlich, dass bei einigen Körperhöhlenergüssen einige der für diese Arbeit untersuchten Antikörper bereits in der Routinediagnostik mitgefärbt und ausgewertet worden waren. Um Kosten und Arbeit zu minimieren, wurden die Ergebnisse für die Auswertung in der vorliegenden Arbeit verwendet. Des Weiteren wurden zur Einsparung von Archivmaterial und

Antikörperreagenz möglichst immer zwei Antikörper in zwei verschiedenen Hälften des Objektträgers gefärbt. Dies war allerdings nur dann möglich, wenn die Tumorzellen gleichmäßig über den gesamten Objektträger verteilt vorlagen.

Bei GATA3 und TTF-1 handelt es sich um nukleäre Marker, bei MUC1 und NapA hingegen um cytoplasmatische Antikörper. Da sich das Färbeprotokoll für nukleäre und cytoplasmatische Antikörper leicht unterscheidet, wurde GATA3 gemeinsam mit TTF-1 auf dem einen und MUC1 mit NapA auf einem anderen Objektträger gefärbt. Lediglich in einem Fall wurden GATA3 und MUC1 auf einem Objektträger gefärbt, da nur ein einziger alkoholfixierter Objektträger zur Verfügung stand und diese beiden Antikörper die einzig fehlenden waren.

Während des Mikroskopierens wurde auf den Deckgläschen mittels Folienstift eine Trennlinie entsprechend der Zellverteilung gezogen, um zu gewährleisten, dass auf jeder Hälfte des Objektträgers ausreichend und etwa gleich viel Zellmaterial vorhanden war. Es wurde ebenfalls notiert, welche Immunreaktion auf der oberen und welche auf der unteren Hälfte stattfinden sollte. Die vollständig beschrifteten Präparate wurden anschließend fotokopiert, damit auch nach Ablösen der Deckgläschen für den Färbeprozess die Höhe der Trennlinie übertragen werden konnte. Die präparatorische Trennlinie, welche einen Übertritt von aufgebrauchten Lösungen verhindert, wurde vor Beginn der eigentlichen immunocytochemischen Färbung mithilfe des Dako-Pens S 2002 gezogen.

2.9.2 ABC-Methode (einschließlich LSAB- und CSA-Methode)

Gegenstand dieser Arbeit ist die LSAB-Methode, der Vollständigkeit halber werden die übrigen Subtypen der ABC-Methode jedoch auch kurz beschrieben.

Sowohl die ABC-Methode als auch ihre Weiterentwicklungen nutzen die hohe Affinität des Avidins für Biotin. Avidin ist ein basisches Glykoprotein mit vier hydrophoben Bindetaschen, in denen theoretisch je ein Biotin-Molekül gebunden werden kann. Tatsächlich binden auf Grund der molekularen Ausrichtung der Bindungsstellen jedoch weniger als vier Biotin-Moleküle. Dem Avidin kommt außerdem zugute, dass es leicht mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen verknüpft werden kann. Allerdings weist Avidin einen isoelektrischen Punkt von $pI=10$ auf, sodass es bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegt und somit leicht an positiv geladene Gewebsbestandteile bindet. Um diese ungewollte, unspezifische Bindung zu verhindern, wird Avidin heute häufig durch Streptavidin ersetzt⁵⁹. Biotin ist ein wasserlösliches Molekül mit einer geringen Molekülgröße, sodass es gut an Makromoleküle gebunden werden kann, ohne deren Struktur oder chemische, immunologische und physikalische Funktion zu verändern.

Die ABC-Methode zählt zu den indirekten Färbemethoden. Im ersten Schritt wird ein unkonjugierter Primärantikörper zu dem zu untersuchenden Material gegeben und bindet mit dem Antigen. Daraufhin wird ein biotinylierter Sekundärantikörper hinzugegeben, welcher an den Primärantikörper bindet. Wird ein Maus-Primärantikörper genutzt, so ist der Sekundärantikörper ein „Anti-Maus“-Immunglobulin. Dieser Sekundärantikörper ist mit Biotin konjugiert. Im nächsten Schritt wird der namensgebende „Avidin-Biotin-Komplex“ hinzugefügt. Dies ist ein Komplex aus biotinyliertem Enzym sowie Avidin (siehe Abbildung 1), welcher kurz vor der Inkubation angesetzt wird. Das Avidin bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers⁶⁰, es wird also ein „Tertiärkomplex“ benötigt. Als Enzym wird üblicherweise Meerrettichperoxidase verwendet. Im letzten Schritt folgt die Inkubation mit der Substrat-Chromogenlösung.

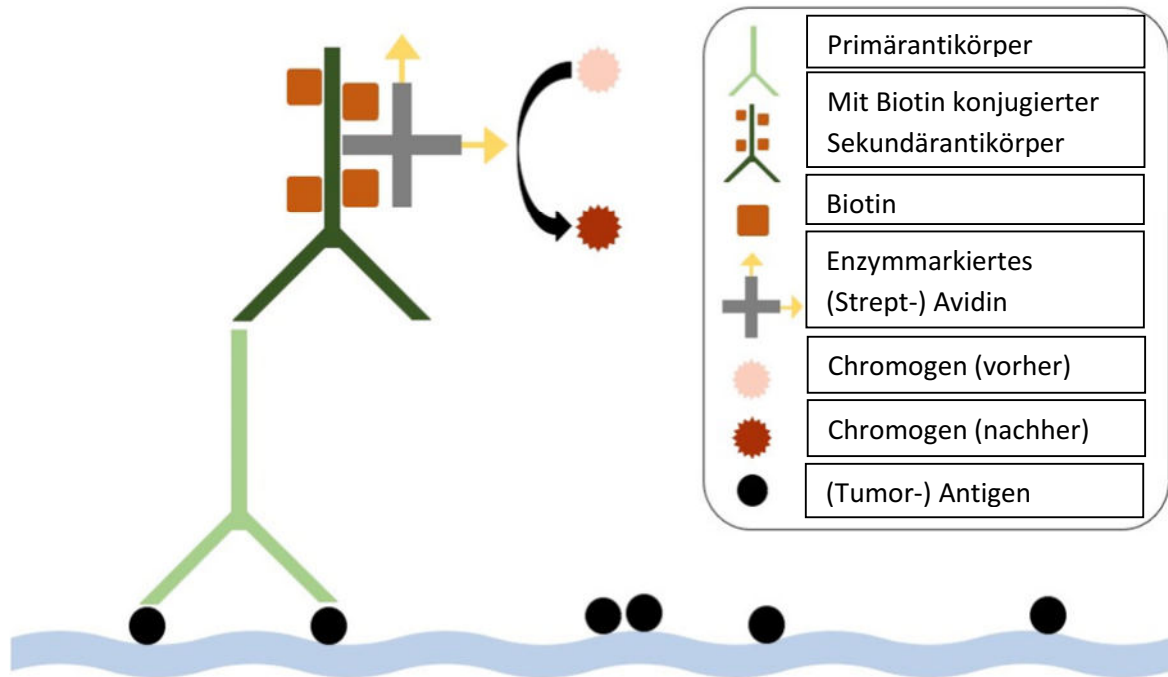


Abb. 1: LSAB Methode

Auch die ABC-Methode wurde weiter modifiziert, einerseits um die Sensitivität weiter zu erhöhen und andererseits, um das Färbeprotokoll zu vereinfachen. Eine Weiterentwicklung stellt die LSAB-Methode dar, welche in Abbildung 1 kurz skizziert wurde. Ihre Sensitivität ist noch einmal vier bis achtmal höher als die der einfachen ABC-Methode ⁶¹. Im Gegensatz zur herkömmlichen ABC-Methode liegt bei der LSAB-Methode ein *enzymkonjugiertes* Streptavidin vor, das an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet. Bei der ABC-Methode wird ein (Strept)Avidin-Biotin-Enzymkomplex genutzt, das Enzym ist also indirekt über das Biotin mit dem (Strept)Avidin verbunden.

Eine andere Abwandlung der ABC-Methode ist die CSA-Methode. Hierbei folgt auf die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex die Zugabe eines Amplifikationsreagenz'. Dieses Reagenz ist biotinhaltig. Das Biotin wird durch die Peroxidase des Avidin-Biotin-Komplexes in eine unlösliche Form überführt und es kommt zur Präzipitation des Biotins. Nach Zugabe eines Avidin-Peroxidase-Konjugats kann dieses an das ausgefällte Biotin binden und es stehen nun zusätzliche Enzyme für die Substrat-Chromogen-Reaktion zur Verfügung. Hierdurch ist eine nochmalige Steigerung der Färbesensitivität auf ein 100faches der Standard ABC-Methode möglich ⁶².

2.9.3 Färbeprotokoll ABC Methode

Die manuelle Färbung der alkoholfixierten Präparate nach der ABC Methode benötigt zwei Tage. Während des gesamten Färbeporgangs war auf eine ausreichende Befeuchtung der Objektträger zu achten, damit diese nicht austrocknen. Vor Beginn der immunocytochemischen Färbung musste das Deckglas durch Stehenlassen der Objektträger in Küvetten mit Xylol abgelöst werden.

Am ersten Tag wurden die Objektträger mit Hilfe von einer absteigenden Ethanolreihe gewässert und entfärbt. Alle nukleären Antikörper wie GATA3 oder TTF1 mussten daraufhin im Citratpuffer

hitzebehandelt werden, damit die Kernantigene besser zugänglich wurden für die folgenden Reaktionen. Dieser Schritt entfiel bei den cytoplasmatischen Antikörpern.

Anschließend wurde bei allen Präparaten die endogene Peroxidase durch ein Gemisch aus Methanol und Wasserstoffperoxid gehemmt. Die endogene Peroxidase befindet sich beispielsweise in Erythrozyten, Granulozyten oder Muskelzellen. Sie stellt einen potenziellen Störfaktor dar, da sie mit dem später hinzugegebenen Substrat reagiert und so zu einer falsch positiven Färbung führt.

Nach der Blockierung der endogenen Peroxidase folgte die Inkubation der Präparate mit dem Primärantikörper, welcher nun an das jeweils spezifische Antigen der Tumorzelle binden konnte. Da diese Reaktion bei Raumtemperatur sehr langsam abläuft, erfolgte die Inkubation in dieser SOP (Standard Operating Procedure) über Nacht.

Am zweiten Tag wurden die Präparate zunächst mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, auch Link-Antikörper genannt, inkubiert. Dieser bindet mit dem Primärantikörper und enthält außerdem mit dem Biotin eine Bindestelle für den im folgenden Schritt zugegebenen, enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplex. Bei dem Enzym handelt es sich um eine Peroxidase, welche im letzten Schritt der Immunreaktion mit dem Substrat-Chromogen-Reagenz reagiert. Je mehr Peroxidase gebunden wird, desto stärker fällt die Farbreaktion aus. Das Substrat-Chromogen-Reagenz, in unserem Fall das 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), ist sehr instabil und muss daher immer frisch zubereitet werden. Nach etwa 25-minütiger Inkubation mit dem AEC-Reagenz erfolgte abschließend die Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun zur besseren Beurteilbarkeit der Zellmorphologie unter dem Mikroskop.

Um falsch negative Färbegergebnisse durch Fehler in der Methodik bzw. Durchführung als solche zu erkennen, wurden bei jedem Färbegang Positivkontrollen mitgeführt.

Für den Antikörper GATA3 dienten histologische Schnitte eines Mammakarzinoms als Positivkontrolle, bei TTF1 wurden histologische Schnittpräparate eines Schilddrüsenkarzinoms verwendet und für MUC1 entweder Schnitte eines Kolon- oder eines Mammakarzinoms. Diese Präparate stammten aus Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe.

Lediglich für Napsin A wurden Ausstrichpräparate einer alkoholisch fixierten bronchoalveolären Lavage genutzt. Bei dem seltenen Ausfall dieser externen Kontrollen wurde eine positive Immunreaktion bei einem der im gleichen Ansatz untersuchten Präparate als externe Kontrolle für die übrigen Präparate des Ansatzes gewertet. Somit konnte in jedem Fall die korrekte Durchführung des Färbeprotokolls gewährleistet werden.

Detailliertes Färbeprotokoll

Tag 1

Reagenz	Einwirkzeit	Reaktionsvorgang
Xylol (zwei Inkubationen)	jeweils 10 min RT	Lösen von Resten des Eindeckmediums, Entfärben, Wässern
Ethanol 100% (zwei Inkubationen)	jeweils 10 min RT	
Ethanol 96% (zwei Inkubationen)	jeweils 10 min RT	

Nur nukleäre Antikörper:

Reagenz	Einwirkzeit	Reaktionsvorgang
PBS-Puffer	5 min RT	Hitzebehandlung der Präparate zum <i>Antigen retrieval</i> , Abkühlen
Citratpuffer	20 min 80°C im Wasserbad	
Abkühlen	20 min RT	
PBS-Puffer	5 min RT	

Ab hier wieder für alle Antikörper

Reagenz	Einwirkzeit	Reaktionsvorgang
100ml Methanol+1ml H ₂ O ₂	30 min RT	Hemmung der endogenen Peroxidase, Vorbereitung des OT mit Dako-Pen
PBS-Puffer	wenige Sek.	
PBS-Puffer (zwei Inkubationen)	jeweils 10 min RT	
PBS-Puffer/ 1ml Tween20	1 min RT	
Normalserum	20 min RT	Inkubation mit Normalserum und Primärantikörper
Flüssigkeit ablaufen lassen		
Primärantikörper, etwa 1ml	12 h RT	

Tag 2

Reagenz	Einwirkzeit	Reaktionsvorgang
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 min RT	Waschen
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 min RT	
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10/ 1ml Tween20	1 min RT	
Biotinylated Universal Anti-Mouse IgG/ Anti-Rabbit	30 min RT	Inkubation mit biotinyliertem Sekundär-AK, Waschen
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 min RT	
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 min RT	
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10/ 1ml Tween20	1 min RT	Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Complex, Waschen
ABC-Elite Standard	30 min RT	
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 min RT	
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 min RT	Inkubation mit dem Substrat-Chromogen-Reagenz, Wässern
AEC-Reagenz	25 min RT	
Aqua dest steril	5 min RT	
Aqua dest steril	5 min RT	Gegenfärbung mit Mayer' Hämalaun, Wässern und Eindecken
Mayer' Hämalaun	1 min RT	
Fließendes Leitungswasser	10 min RT	
Aquatex zum Eindecken der OT		

2.10 Cytologische Beurteilung

Alle immunocytochemisch gefärbten Präparate wurden von mir selbst sowie zusätzlich von einem erfahrenen Cytologen des Funktionsbereichs mikroskopiert. Der Fokus lag dabei auf der Beurteilung der Immunreaktion der Tumorzellen mit den jeweiligen Antikörpern.

2.10.1 Malignitätskriterien

Um die Immunfärbung korrekt beurteilen zu können, mussten zunächst die Tumorzellen sicher identifiziert werden. Die cytologische Diagnostik maligner Zellen basiert zuerst auf der Betrachtung morphologischer Kriterien wie der Zelle an sich, ihrer Umgebung sowie der Beurteilung eventuell vorliegender Zellverbände. Auch wenn in der cytologischen Fachliteratur diverse so genannte „Malignitätskriterien“ wissenschaftlich fundiert sind^{16, 27, 63}, ist für sich genommen keines der Kriterien pathognomonisch für das Vorhandensein maligner Zellen¹³. Allgemein ist bei der Ergusscytologie darauf zu achten, ob neben den allgegenwärtigen Mesothelzellen und Entzündungszellen eine fremde Zellpopulation auffällig ist. Das Vorhandensein bizarr oder andersartig aussehender Zellen ist immer suspekt und diese Zellen sind somit potentiell maligne. Weisen diese fremdartigen Zellen nun zudem mehrere Malignitätskriterien auf, so erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Malignität. Insbesondere das Vorliegen von Kernatypien ist Voraussetzung für die Diagnose maligner Zellen. Dazu zählen u.a.^{13, 27}:

- Kernvergrößerung
- Unregelmäßiger Verlauf der Kernmembran
- Kernpleomorphie
- Abnorme Chromatinmuster und Hyperchromasie
- Verschobene Kern-Plasma-Relation zu Gunsten der Kerne
- Prominente oder abnorm geformte Nukleoli
- Vermehrte oder abnorme Mitosefiguren
- Basophiles und Vakuolen-gefülltes Cytoplasma

Liegen die suspekten Zellen in Zellverbänden geordnet vor, so erhöhen die folgenden Kriterien die Wahrscheinlichkeit der Malignität:

- Große Zellaggregate
- 3-dimensionale Struktur
- Weiche, glatte Zellgrenzen
- Papilläre Formationen
- Kettenförmig geordnete Zellen

Nichtsdestotrotz können Tumorzellen auch einzeln vorliegen und bei beispielweise inflammatorisch geprägten Hintergrund übersehen werden. Dies gilt insbesondere für Lymphome, Sarkome und Melanome, aber auch Zellen aus invasiv-lobulären Mammakarzinomen oder aus

Tumoren des Gastrointestinaltraktes, insbesondere Zellen diffuser Magenkarzinome, können in Körperhöhlenergüssen isoliert vorliegen.

2.10.2 Auswertung der immunocytochemischen Färbung

Nachdem die Tumorzellen sicher identifiziert wurden, wurde das Ergebnis der Färbung entsprechend der Tumorzellzahl und Färbeintensität semiquantitativ bestimmt und einem Punktwert zugeordnet (0-5) ³⁴. Dabei wurde jeweils beurteilt, wie viel Prozent der Tumorzellen angefärbt wurden (siehe Tabelle 1). Diese semiquantitative Zuordnung zu verschiedenen Score-Werten ist für die Cytologie gut geeignet, da sich leicht Cut-Off Werte festlegen lassen. Ein Cut-off ist nötig, weil bestimmte Antikörper an Antigene vieler verschiedener Tumorentitäten binden können, d.h. möglicherweise nicht tumorspezifisch sind. Darunter gibt es sowohl Tumoren mit kräftiger, charakteristischer Immunreaktion als auch solche mit schwächerer, uncharakteristischer Immunreaktion. Zeigen diese Immunreaktionen eine nur leichte Farbreaktion (beispielsweise ein Score-Wert von 1 oder 2), so ist die Verwendung des Antikörpers in dem beschriebenen Fall nicht notwendigerweise zielführend für die genaue Klassifizierung des Tumors.

Soweit im Folgenden, insbesondere im Rahmen der Auswertung, nicht anders erwähnt, schließt das Ergebnis „positiv“ zunächst alle Score-Werte ungleich null ein, das heißt Score 1 bis Score 5.

Kategorie	Positive Farbreaktion [%]	Score
Keine Expression	0-10	0
Geringe fokale Expression	10-20	1
Fokale Expression	21-40	2
Starke fokale Expression	41-60	3
Fast homogene Expression	61-80	4
Starke homogene Expression	81-100	5

Tabelle 1: Semiquantitative Beurteilung der immunocytochemischen Reaktion

Nachdem die Score-Werte für alle eingeschlossenen Präparate bestimmt wurden, erfolgte die weitere Auswertung in drei Schritten.

Für jede Tumorentität und jeden Antikörper wurde die Häufigkeitsverteilung der Score-Werte zusammengetragen. Dabei wurde jedoch zunächst jeder Antikörper isoliert betrachtet und die Häufigkeitsverteilung rein deskriptiv beschrieben.

Im nächsten Schritt wurden die Scores der jeweils für den Antikörper charakteristischen Tumorentitäten (Mamma- sowie Urothelkarzinom für GATA-3, Bronchial- sowie Schilddrüsenkarzinom für TTF1 und nicht-kleinzellige-Bronchialkarzinome für Napsin A) genauer analysiert.

Zuletzt wurden alle vier Antikörper als ein zusammenhängendes „Panel“ betrachtet und es erfolgte die abschließende kombinierte Auswertung der vier Antikörper. Dabei wurden entsprechende Treffsicherheiten (Sensitivität, Spezifität, PPW, NPW, Youden-Index) für die jeweils charakteristischen Tumore bei verschiedenen Cut-Off-Werten berechnet. Interessant war dabei die Frage, ob durch die Kombination der vier Antikörper die Treffsicherheiten für die charakteristischen Tumore erhöht werden konnte.

Nach Zusammenschau der Punktwerte der vier verschiedenen gefärbten Antikörper sowie der zuvor erfolgten morphologischen Beurteilung der Tumorzellen ergab sich eine cytologische (Verdachts-) Diagnose. Diese wurde mit der im Follow-Up erhobenen Diagnose verglichen. Insbesondere war die Frage von Interesse, ob die verwendeten Antikörper auch in cytologischen Präparaten nur bei den für sie besonders charakteristischen Tumorentitäten positive Farbreaktionen zeigten oder ob weitere Tumore die untersuchten Antigene exprimierten.

Lagen deutliche Diskrepanzen zwischen der cytologischen (Verdachts-) Diagnose und der im Follow-Up erhobenen Diagnose vor oder lagen aus anderen Gründen interessante Kombinationen der Immunreaktionen vor, so wurden diese Fälle ausführlicher aufgegriffen und diskutiert.

Ausführlicher beschrieben wurden ebenso alle Fälle mit „CUP-Syndrom“ als endgültige Follow-Up-Diagnose, da diese eine Bestimmung der Treffsicherheiten nicht zuließen und auch die Zuordnung der Genauigkeit der cytologischen Tumorklassifikation erschwert wurde.

2.11 Abgrenzung der persönlichen Leistung

Einige Schritte der Probenaufarbeitung wurden im Rahmen der Routinediagnostik von Mitarbeitern der Cytopathologie erledigt. Hierzu zählen:

- Probenannahme inklusive Zentrifugation
- Anfertigung der Ausstrichpräparate und anschließende Färbung nach PAP bzw. MGG
- Sofern bereits im Rahmen der Routinediagnostik erfolgt: immuncytochemische Färbung
- Anfertigung einer Liste aller tumorzellpositiven Ergüssen, welche im Beobachtungszeitraum der Cytopathologie des UKD eingegangen waren
-

Von mir persönlich erbrachte Leistungen waren:

- Schrittweise Selektion aller tumorzellpositiven Präparate durch
 - Durchsicht aller archivierten Präparate mit der Frage nach ausreichendem Archivmaterial
 - Mikroskopie aller Präparate mit der Frage nach ausreichendem Tumorzellgehalt
- Händische immuncytochemische Färbung all jener Präparate, welche nicht im Rahmen der Routinediagnostik mit den untersuchten Antikörpern GATA3, TTF-1, MUC-1 und Napsin A gefärbt worden waren
- Erneute Mikroskopie aller gefärbten Präparate mit semiquantitativer Auswertung der immuncytochemischen Reaktion
- Erhebung der Follow-Up Daten durch Einsicht aller Patientenakten
- Statistische Analyse

2.12 Statistische Analyse

Die Datenauswertung erfolgte deskriptiv statistisch mit Hilfe der so genannten Vierfeldertafel, einer speziellen Form der Kontingenztafel. Es handelt sich dabei um eine binäre Tabelle, in der die zwei Merkmale A und B eingetragen werden. Beide Merkmale haben je zwei Ausprägungen: Merkmal A trifft zu oder Merkmal A trifft nicht zu (gleiches gilt für Merkmal B). Anhand der Vierfeldertafel und ihrer Randsummen (siehe dazu Tabelle 2) können statistische Parameter wie die Sensitivität, die Spezifität, der positive prädiktive Wert (PPW) sowie der negative prädiktive Wert (NPW) der

Treffsicherheit der untersuchten Immunreaktionen für eine charakteristische Tumorentität errechnet werden ⁶⁴.

	erwartete Tumorentität +	erwartete Tumorentität -	Summe
Immunreaktion +	Anzahl der richtig Positiven (A)	Anzahl der falsch Positiven (B)	Anzahl der positiv diagnostizierten Fälle (A+B)
Immunreaktion -	Anzahl der falsch Negativen (C)	Anzahl der richtig Negativen (D)	Anzahl der negativ diagnostizierten Fälle (C+D)
Summe	Anzahl der tatsächlich positiven Fälle (A+C)	Anzahl der tatsächlich negativen Fälle (B+D)	Summe

Tabelle 2: Vierfeldertafel zur Berechnung der Treffsicherheiten der Immunreaktion

In diesem Beispiel entspricht Merkmal A der erwarteten Tumorentität und Merkmal B beschreibt das Ergebnis der Immunreaktion (positiv oder negativ).

Die **Sensitivität** gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der das Merkmal A auch als solches erkannt wird. Sie errechnet sich als Quotient aus der Anzahl der richtig Positiven (A) und der Anzahl der tatsächlich positiven Fälle (A+C).

$$Sens = \frac{A}{A + C}$$

Bildet man den Quotienten aus der Anzahl der richtig Negativen (D) und der Gesamtzahl aller Patienten ohne Merkmal B (B+D), so erhält man die **Spezifität**. In diesem Fall ist die Spezifität also ein Marker dafür, wie gut ein Patient ohne die erwartete Tumorentität (also ohne Marker A) auch als solcher erkannt wird.

$$Spez = \frac{D}{B + D}$$

Sensitivität und Spezifität ermöglichen eine Qualitätsbeurteilung der (neuen) diagnostischen Methode. Der Idealwert der beiden Parameter beträgt jeweils 100%, das diagnostische Tool würde somit jeden Fall richtig voraussagen bzw. korrekt diagnostizieren.

Der **positive prädiktive Wert** gibt die Wahrscheinlichkeit an, bei positivem Testergebnis auch wirklich an der erwarteten Tumorentität (Merkmal A) zu leiden. Er errechnet sich als Quotient aus der Anzahl der richtig Positiven (A) an der Gesamtzahl aller positiv diagnostizierten Fälle (A+B).

$$PPW = \frac{A}{A + B}$$

Äquivalent dazu ist der **negative prädiktive Wert** ein prozentualer Vorhersagewert für die Höhe der Wahrscheinlichkeit, tatsächlich ohne Merkmal A zu sein, wenn ein negatives Testergebnis vorliegt. Gebildet wird er aus dem Quotienten der richtig Negativen (D) und der Anzahl aller durch den Test negativ diagnostizierten Fälle (C+D).

$$NPW = \frac{D}{C + D}$$

Da bei der Auswertung der immunocytochemischen Färbungen Cut-Off-Werte bestimmt wurden, wurde weiterhin der **Youden-Index** berechnet. Hiermit lässt sich errechnen, welcher der Cut-Off-Werte am besten geeignet ist, um Patienten mit Merkmal A von Patienten ohne Merkmal A zu differenzieren. Er berechnet sich wie folgt:

$$\text{Youden Index} = \text{Sens} + \text{Spez} - 1$$

Der Youden-Index nimmt Werte zwischen -1 und 1 an. Umso näher er an 1 liegt, desto besser ist die diagnostische Aussagekraft.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum vom 01.01.2011 bis zum 30.06.2015 wurde bei insgesamt 694 aus der Universitätsklinik Düsseldorf sowie der Kaiserswerther Diakonie eingesandten Ergussflüssigkeiten primär die Diagnose „Tumorzell-positiv“ gestellt. Bei 66 dieser Ergüsse lag nicht genug Archivmaterial zur weiteren Diagnostik vor. Weitere 280 Fälle schieden nach semiquantitativer mikroskopischer Auswertung (siehe Einschluss- und Ausschlusskriterien im Kapitel Material und Methoden) auf Grund einer unzureichenden Zellzahl auf den Objektträgern aus (Abbildung 2).

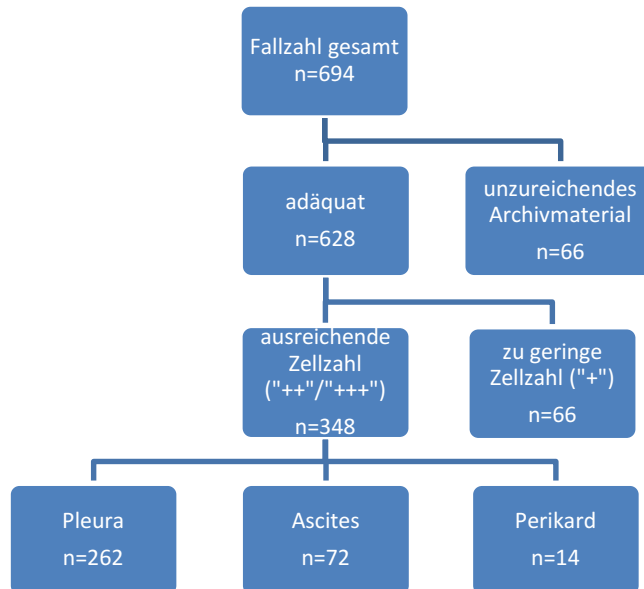


Abb. 2: Flussdiagramm aller Tumorzell-positiven Ergussflüssigkeiten, welche aus dem UKD oder der Kaiserswerther Diakonie im Zeitraum vom 01.01.2011 bis zum 30.06.2015 eingesandt wurden

Somit wurde insgesamt die Expression von GATA3, TTF1, Napsin A und MUC1 an 348 Ergussflüssigkeiten von 275 Patienten immunocytochemisch untersucht. Davon waren 262 Pleuraergüsse, 72 Asciten und 14 Perikardergüsse.

Nach immunocytochemischer Färbung mussten drei Präparate aus der Studie ausgeschlossen werden. Ein Ausstrich war durch mangelhafte Färbung methodisch nicht auswertbar, in zwei anderen Fällen waren die Präparate nach dem Färbeverfahren nicht mehr eindeutig einem Patienten zuzuweisen, da die Markierung der Objektträger unleserlich geworden war.

Von den daraufhin verbliebenen 345 Fällen mussten weitere sechs Ergüsse auf Grund unvollständiger Follow-Up-Daten aus der Studie ausgeschlossen werden: Bei vier Patienten konnte aus der Patientenakte keine endgültige Tumordiagnose eruiert werden. Zwei Patienten waren vor Diagnosestellung in ein anderes Klinikum verlegt worden und somit einer Nachverfolgung nicht mehr zugänglich.

Somit ergab sich nach Auswertung der gefärbten Präparate sowie nach Erhebung des Follow-Ups eine Zahl von 339 auswertbaren Präparaten. Diese Zahl beinhaltet 257 Pleuraergüsse, 70 Asciten sowie 12 Perikardergüsse (Abbildung 3). Somit wurden insgesamt 97,4% (339/348) der Präparate zur endgültigen Auswertung herangezogen.

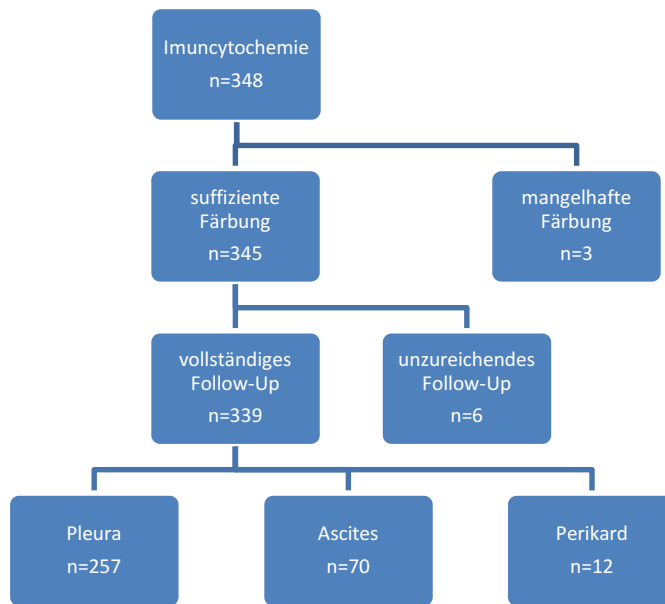


Abb. 3: Flussdiagramm der immunocytochemisch untersuchten Präparate

3.1.1 Geschlechterverteilung

185 Ergussflüssigkeiten stammten von Frauen, 154 von Männern. Somit lag der Frauenanteil des Studienkollektivs bei 54,6%, der Anteil der männlichen Patienten war 45,4%. Die Geschlechterverteilung für Pleuraergüsse, Asciten und Perikardergüsse zeigt Abbildung 4.

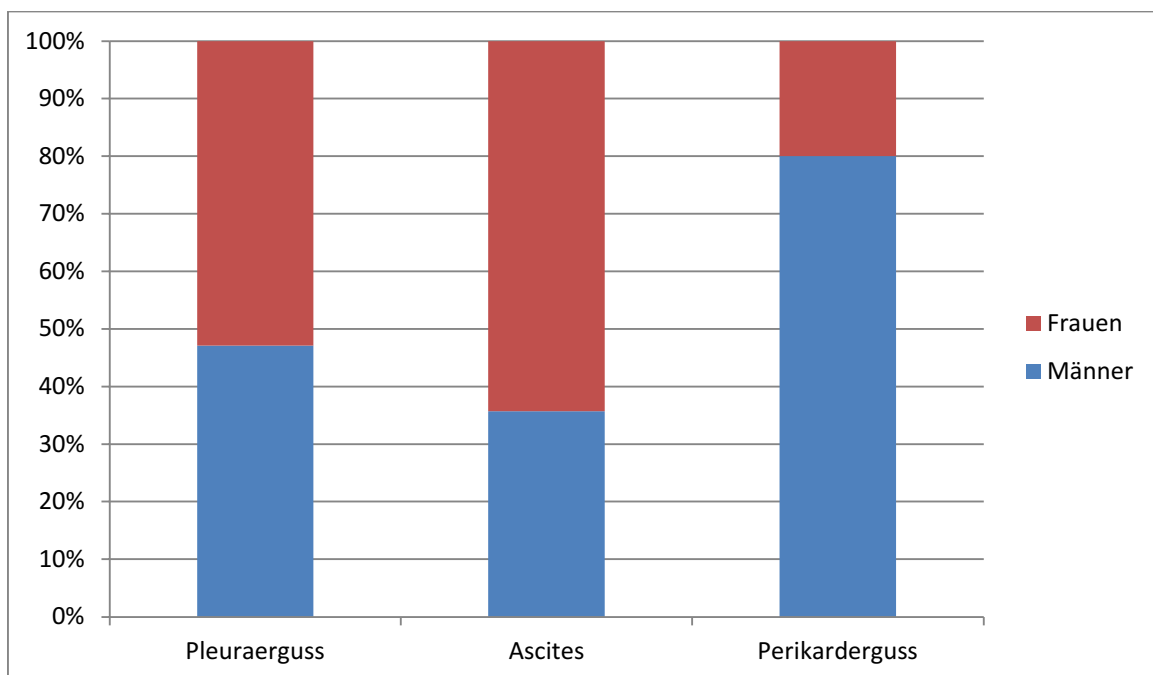


Abb. 4: Geschlechterverteilung der malignen Ergüsse in %

3.1.2 Altersverteilung

Die Altersspanne aller eingesandten Ergussflüssigkeiten reichte von 3 bis 97 Jahren, wie in Abbildung 5 dargestellt. Das mittlere Alter lag bei 67,3 Jahren und das mediane Alter betrug 69 Jahre.

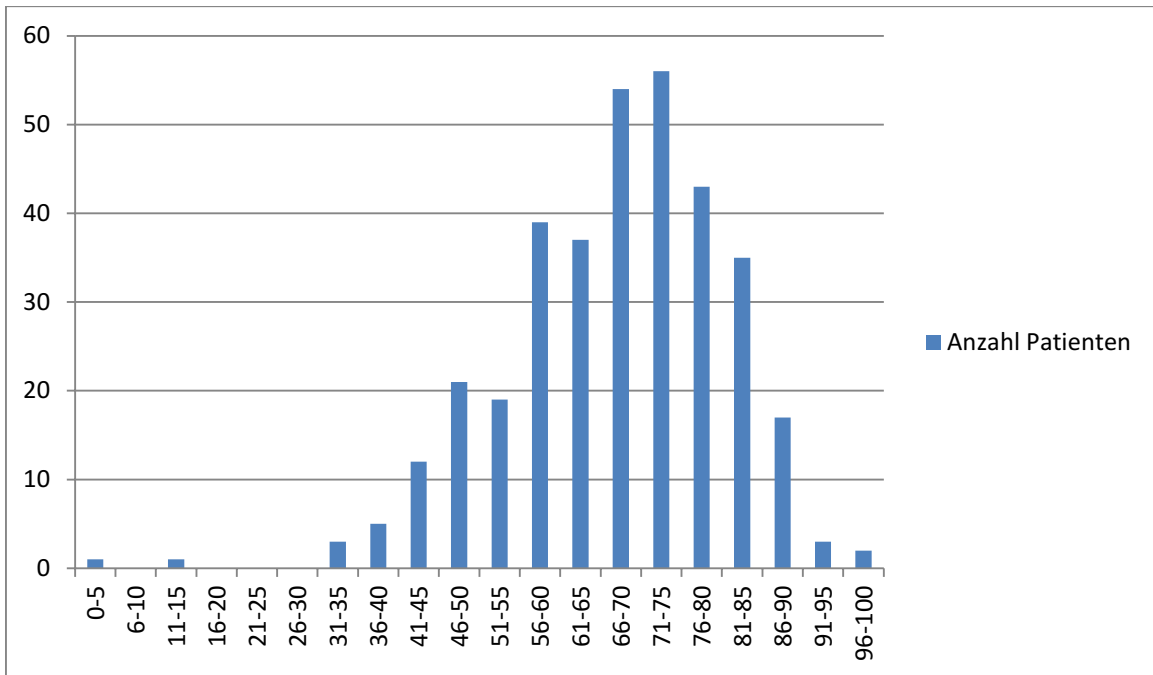


Abb. 5: Patientenalter in Jahren zum Zeitpunkt der Punktion des untersuchten Ergusses

Die Altersverteilung für Pleuraergüsse und Asciten zeigen Abbildung 6 und 7.

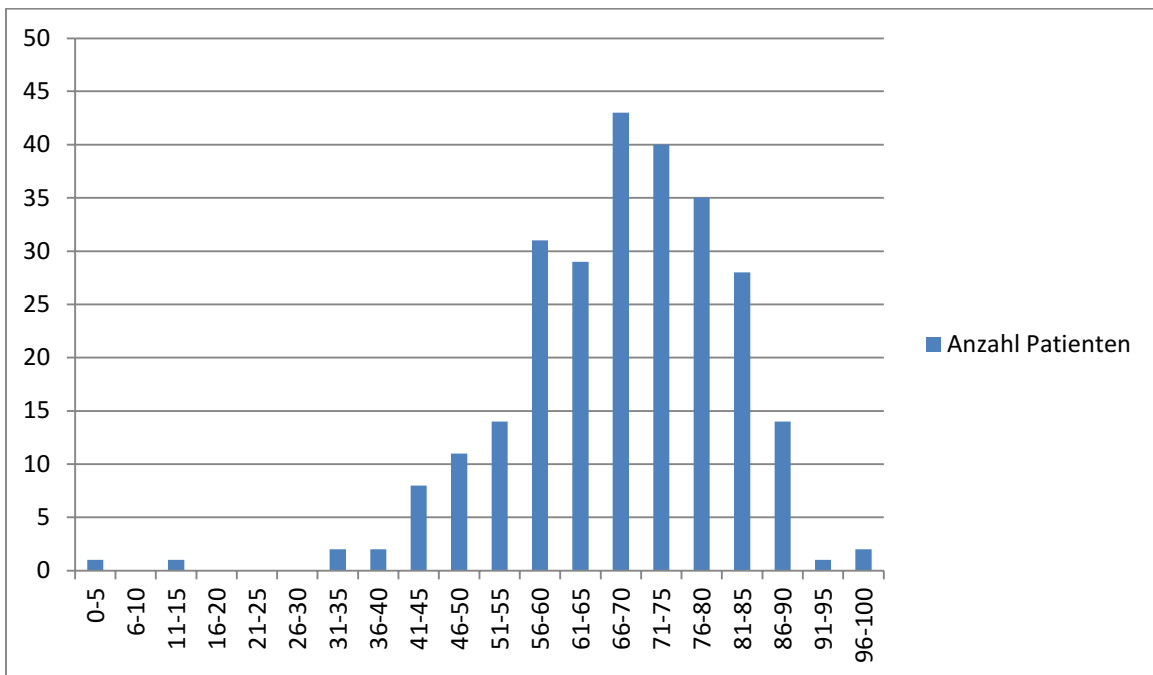


Abb. 6: Patientenalter in Jahren zum Zeitpunkt des untersuchten Pleuraergusses

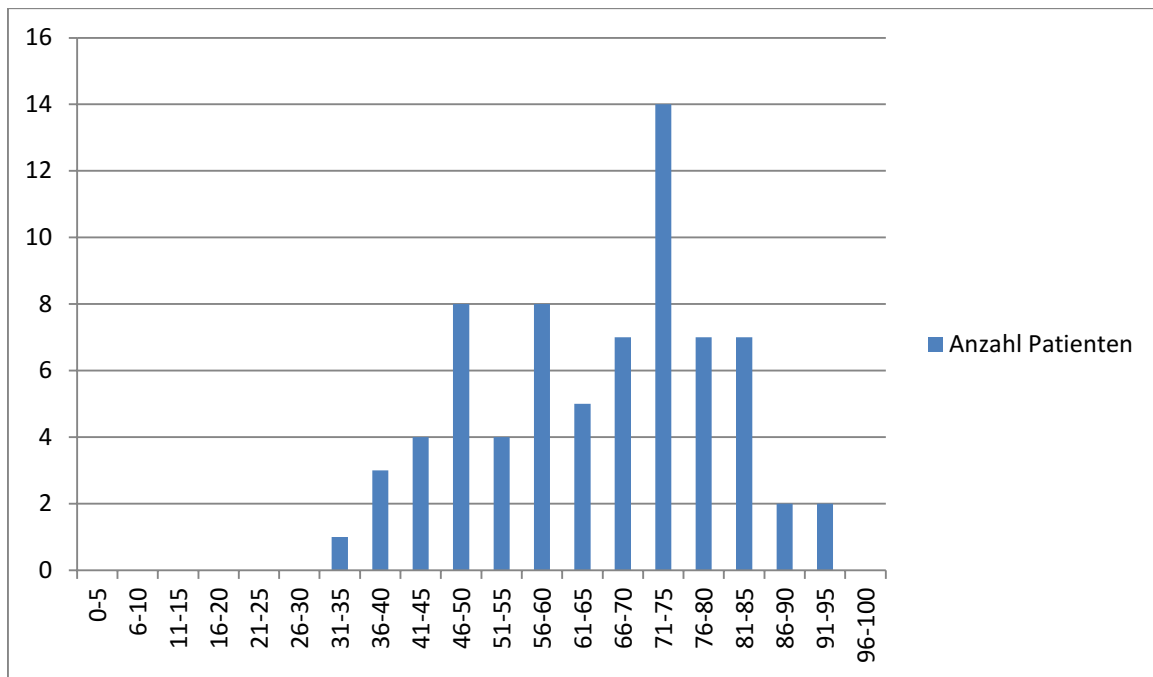


Abb. 7: Patientenalter in Jahren zum Zeitpunkt des untersuchten Ascites

Das mittlere Alter unter den Patienten mit Pleuraergüssen lag bei 68 Jahren, das mediane Alter bei 70. Die Patienten mit Ascites waren zum Zeitpunkt der Punktion im Mittel 65,2 Jahre alt, das mediane Alter betrug hier 68 Jahre. Auf Grund der geringen Fallzahl wird bei den Patienten mit Perikarderguss auf eine grafische Darstellung der Altersverteilung verzichtet. Das mittlere Alter betrug hier 65,6 Jahre bei einem medianen Alter von 66 Jahren.

3.2 Referenzstandard

Als Referenzstandard für die vorliegende Arbeit wurde diejenige für den Körperhöhlenerguss ursächliche Tumorentität definiert, auf welche sich der Kliniker nach Auswertung aller ihm vorliegenden Untersuchungsergebnisse im endgültigen Arztbrief festlegte. In 87% (296/339) der ausgewerteten Präparate lag ein histologischer Befund vor. Das Gewebe für die histologische Untersuchung stammte in der Regel nicht aus einer Punktion von Pleura, Peritoneum oder Perikard, sondern wurde oftmals bioptisch aus dem Primärtumor gewonnen, teilweise auch durch die Exzision suspekter Lymphknoten oder -bei erfolgter Tumoroperation- aus dem OP-Präparat selbst. Direkte Biopsien der Pleura bzw. des Peritoneums erfolgten lediglich bei einigen primären Tumoren der serösen Höhlen. So wurden beispielweise drei der vier Pleuramesotheliome dieser Studie über eine direkte thorakoskopische Pleurabiopsie gesichert. Ebenso wurden drei der fünf primären Peritonealkarzinome über eine Biopsie des Peritoneums histologisch gesichert.

In den übrigen 43 Fällen ohne vorliegende Histologie wurde die wahrscheinliche Entität des Primärtumors seitens der behandelnden Ärzte anhand der cytologischen Diagnose der Ergussflüssigkeit, anamnestischen Daten, weiteren bildgebenden Verfahren wie Computertomographie, Magnetresonanztomographie, konventionelle Röntgenaufnahmen sowie seltener Positronen-Emissions-Tomographie oder endoskopischen und endosonografischen Untersuchungen bestimmt. In einem Fall erfolgte die endgültige Diagnose der Tumorentität nach einer Obduktion.

3.3 Tumorentitäten

3.3.1 Häufigkeitsverteilung in der Gesamtkohorte

Die häufigste Tumorentität stellte mit 141 Fällen das Lungenkarzinom dar. Davon waren 101 Adenokarzinome, 4 Plattenepithelkarzinome, 15 kleinzellige Bronchialkarzinome und 21 nicht näher subklassifizierte nicht-kleinzellige Karzinome. Informationen über den Differenzierungsgrad der Tumore lag bei 63 der 101 pulmonalen Adenokarzinomen vor. Ein Karzinom war undifferenziert (G4), 44 gering differenziert (G3) 17 Karzinome zeigten eine mäßige Differenzierung (G2) und ein Karzinom war gut differenziert (G1). Von den übrigen 21 NSCLC war in fünf Fällen der Differenzierungsgrad bekannt (jeweils gering differenziert). Die kleinzelligen Bronchialkarzinome sind per Definitionem entdifferenziert (G4), bei den vier Plattenepithelkarzinomen war der Differenzierungsgrad nur in einem Fall bekannt (G3).

Zweithäufigster Tumor in den untersuchten Ergüssen war mit einer Fallzahl von 44 das Ovarialkarzinom. 29 der 44 Ovarialkarzinome ließen sich dem serösen(-papillären) Typ zuordnen, ein nicht-kleinzelliges Karzinom des Ovars zeigte ein solides Wachstumsmuster, ein Ovarialkarzinom zählte zu den großzelligen Adenokarzinomen und 11 weitere Adenokarzinome des Ovars wurden nicht weiter bezeichnet. In zwei Fällen lag keine Histologie vor.

Mit 40 Fällen stellte das Mammakarzinom die dritthäufigste Tumorentität dieser Studie. Davon waren 20 duktale und 3 lobuläre Karzinome sowie jeweils eines inflammatorisch bzw. adenosquamös. Sechs weitere Adenokarzinome der Mamma wurden nicht näher subklassifiziert. Leider lag in acht weiteren Fällen das genaue histologische Ergebnis nicht vor, da die operativen Eingriffe und die onkologische Therapie in einem externen, uns für das Follow-Up nicht zugänglichem Krankenhaus erfolgte. In einem Fall erfolgte keine histologische Sicherung des Tumors. Leider konnte nur bei 11 der 40 Mammakarzinomen der Hormonrezeptorstatus eruiert werden. Von diesen waren vier positiv für ER sowie PR, aber HER2 negativ, ein Mammakarzinom wies eine Expression aller drei Rezeptoren auf und ein Mammakarzinom blieb ER und HER2 positiv, aber PR negativ. Bei weiteren fünf Mammakarzinomen konnten nur der PR und ER Status bestimmt werden (drei Fälle ER und PR negativ, ein Fall ER und PR positiv, ein Fall ER positiv und PR negativ).

Andere häufige Tumore der Studie waren das Adenokarzinom des Pankreas (27 Fälle), das Magenkarzinom (11), das Karzinom des gastroösophagealen-Übergangs (10) sowie das kolorektale Karzinom (11). Zur genaueren histogenetischen Klassifizierung dieser Tumore siehe Abbildung 8. Des Weiteren kamen auch Ergussbeteiligungen von Tumoren des lymphatischen Systems (davon zwei diffus großzellige NHL (Non-Hodgkin-Lymphom), ein anaplastisch großzelliges NHL, zwei nicht näher klassifizierte NHL sowie vier Fälle einer akuten myeloischen Leukämie (AML), davon eine AML M4 und drei nicht näher bezeichnete, des Uterus (drei Endometriumkarzinome) und des Urogenitaltrakts (drei Urothelkarzinome) vor. In fünf Fällen wurde ein malignes Melanom als Primarius diagnostiziert und drei Mal wurde die Diagnose eines cholangiozellulären Karzinoms gestellt. Weitere, weniger häufige Tumorentitäten waren das primäre seröse Peritonealkarzinom (fünf Fälle) sowie das Pleuramesotheliom (vier Fälle).

Folgende drei Tumorentitäten waren jeweils nur mit einem Fall in der Arbeit vertreten: Das papilläre Schilddrüsenkarzinom, das Adenokarzinom der Prostata sowie ein nicht näher bezeichnetes Nierenzellkarzinom.

Auch einige seltene Tumore wie ein embryonales Rhabdomyosarkom, ein endometriales Stromasarkom, ein pleuropulmonales Blastom Typ III sowie ein Plattenepithelkarzinom des Penis waren Primärtumoren der untersuchten Kohorte.

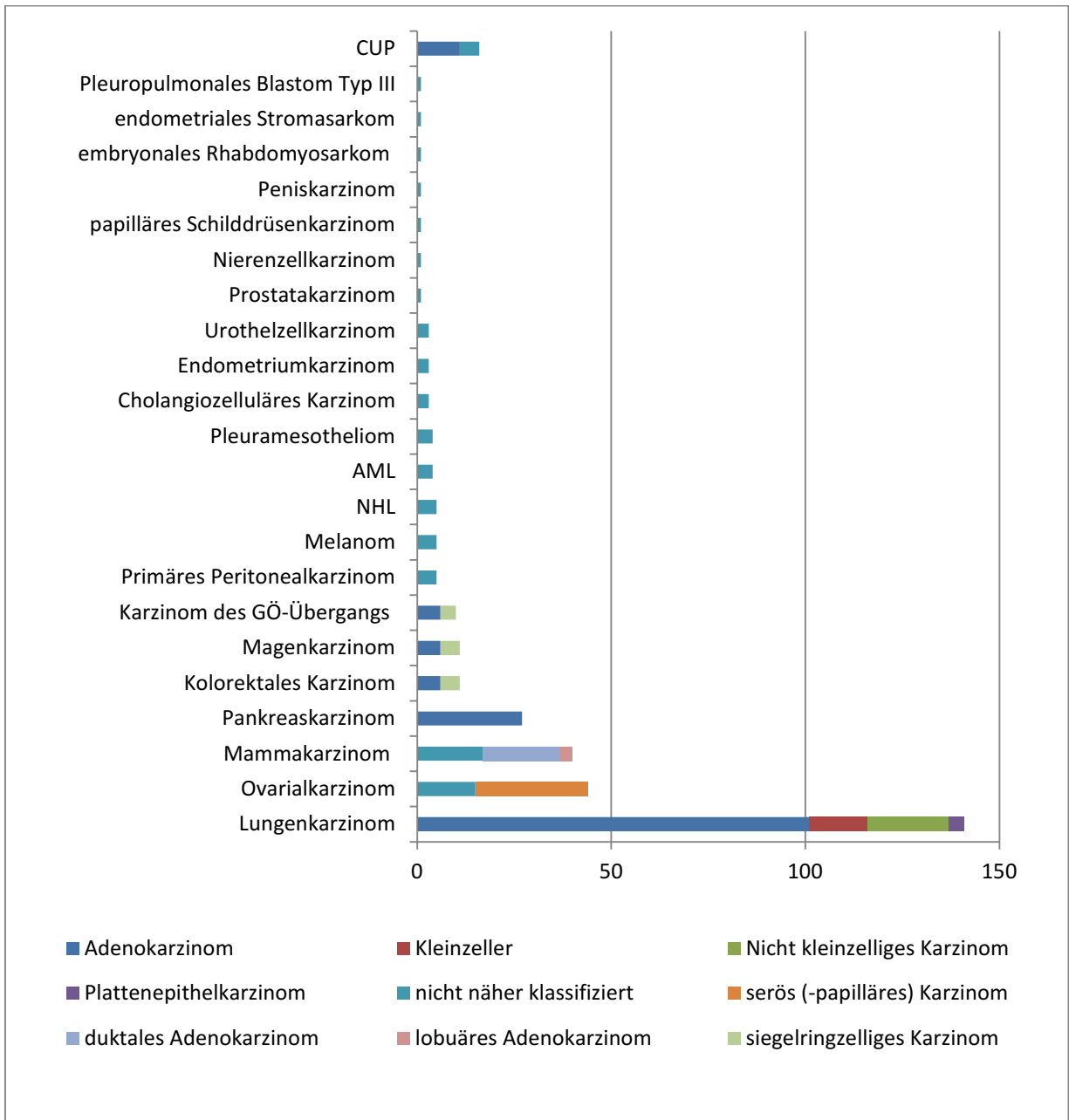


Abb. 8: Übersicht über die Häufigkeit der Primärtumoren aller untersuchten Ergüsse inklusive histogenetischer Klassifizierung (soweit bekannt)

In 16 Fällen ließen sich das untersuchte Gewebe bzw. die untersuchten Zellen weder morphologisch, noch durch adjuvante Methoden einem Ursprungsgewebe zuordnen, sodass die Diagnose eines CUP-Syndroms gestellt wurde.

3.3.2 Geschlechterspezifische Häufigkeitsverteilung der Tumorentitäten in der Gesamtkohorte

Betrachtet man die Häufigkeit der Tumorentitäten nach Geschlechtern getrennt, so bleibt sowohl bei Männern als auch bei Frauen das Lungenkarzinom an erster Stelle.

In Abbildung 9 sind die sechs häufigsten Tumoren bei Männern und in Abbildung 10 die häufigsten Tumoren bei Frauen aufgeführt.

1. Bronchialkarzinom (58%), davon

- Adenokarzinom (69%)
- Nicht-Kleinzelliges Karzinom (18%)
- Kleinzelliges Karzinom (9%)
- Plattenepithelkarzinom (4%)

2. Pankreaskarzinom (10%)

3. Karzinom des gastroösophagealen Übergangs (5%)

4. Magenkarzinom (4%)

5. Non-Hodgkin-Lymphom (3%)

5. CUP (3%)

Abb. 9: relative Häufigkeitsverteilung der sechs häufigsten Primärtumoren bei Männern, betrachtet wurden hierbei alle untersuchten malignen Ergusstypen (Pleuraerguss, Ascites sowie Perikarderguss)

Auffällig ist, dass das Lungenkarzinom bei den Männern mit einem Anteil von 58% weit vor allen anderen Primärtumoren steht, wohingegen die drei häufigsten Tumore bei den Frauen ähnliche Häufigkeiten aufweisen. Bei den Patientinnen führte das Bronchialkarzinom mit 28%, dicht gefolgt vom Ovarialkarzinom (24%) und dem Mammakarzinom (22%).

Erwähnenswert ist außerdem, dass bei den Patientinnen mit fast 80% das Adenokarzinom die häufigste histologische Diagnose innerhalb der Lungenkarzinome darstellte. 12,5% (5/40) der Frauen mit Adenokarzinom waren Nichtraucherinnen, bei 20% (8/40) war die Nikotinanamnese nicht zu erheben und alle übrigen 67,5% (27/40) hatten einen Nikotinabusus von mindestens 10 PY. Im Vergleich hierzu wiesen alle Frauen mit einem kleinzelligem Lungenkarzinom eine positive Nikotinanamnese auf (7/7) und 60% (3/5) der Patientinnen mit nicht näher klassifiziertem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom. Bei den männlichen Patienten lag der Anteil der Raucher mit einem Nikotinabusus von mindestens 10 PY unter den pulmonalen Adenokarzinomen bei 72% (44/61), unter den kleinzelligen Lungenkarzinomen bei 63% (5/8), unter den nicht-kleinzelligen Karzinomen ebenfalls bei 63% (10/16) und alle vier Patienten mit Plattenepithelkarzinom wiesen eine positive Raucheranamnese auf. Insgesamt konnte bei beiden Geschlechtern in 71% ein Nikotinabusus erhoben werden (37/52 bei den Frauen und 63/89 bei den Männern).

1. Bronchialkarzinom (28%), davon

- Adenokarzinom (77%)
- Kleinzelliges Karzinom (13%)
- Nicht-kleinzelliges Karzinom (10%)

2. Ovarialkarzinom (24%)

3. Mammakarzinom (22%)

4. Pankreaskarzinom (6%)

4. CUP (6%)

6. Colorektales Karzinom (4%)

Abb. 10: relative Häufigkeitsverteilung der sechs häufigsten Primärtumoren bei Frauen. Betrachtet wurden hierbei alle untersuchten malignen Ergusstypen (Pleuraerguss, Ascites sowie Perikarderguss)

3.3.3 Häufigkeitsverteilung nach Ergussort

Die Abbildung 11 zeigt die fünf häufigsten Primärtumore, welche den 257 Pleuraergüssen dieser Studie zu Grunde lagen.

1. Bronchialkarzinom (49,0%), davon

- Adenokarzinom (72%)
- Nicht-kleinzelliges Karzinom (16%)
- Kleinzelliges Karzinom (11%)
- Plattenepithelkarzinom (1%)

2. Mammakarzinom (13,6%)

3. Ovarialkarzinom (9,7%)

4. CUP (5,0%)

5. Pankreaskarzinom (4,2%)

Abb. 11: Häufigkeitsverteilung der fünf häufigsten Primärtumoren aller Pleuraergüsse dieser Studie

In nahezu der Hälfte aller Pleuraergüsse wurde letztlich ein Bronchialkarzinom als Primärtumor diagnostiziert, womit Pleurakarzinosen des Lungenkarzinoms zahlenmäßig deutlich vor denen des Mamma- sowie des Ovarialkarzinoms liegen. Die noch verbliebenen 27,7% der für die Pleurakarzinose ursächlichen Primärtumoren verteilten sich mit nur wenigen Fallzahlen

Unterschied auf das CUP-Syndrom (5,0%), das Pankreaskarzinom (4,2%), das Karzinom des gastroösophagealen-Übergangs (3,5%), das Ösophaguskarzinom, das Magen- und das kolorektale Karzinom (jeweils 2,7%), die Non-Hodgkin-Lymphome (zusammen 2%), das Pleuramesotheliom und das maligne Melanom (jeweils 1,6%) sowie die akute myeloische Leukämie und das primäre seröse Peritonealkarzinom (mit jeweils 0,7%). Bei weiteren 3% der diagnostizierten Primärtumore wurde im Rahmen dieser Studie jeweils einmal eine Pleurabeteiligung beobachtet. Dies waren folgende Tumore: Das Nierenzellkarzinom, das Prostatakarzinom, das papilläre Schilddrüsenkarzinom, das Urothelkarzinom, das embryonale Rhabdomyosarkom, das Pleurapulmonale Blastom Typ III sowie das Endometriumkarzinom des Uterus.

Die Abbildung 12 zeigt die 5 häufigsten Primärtumore, welche den 70 Asciten dieser Studie zugrunde lagen.

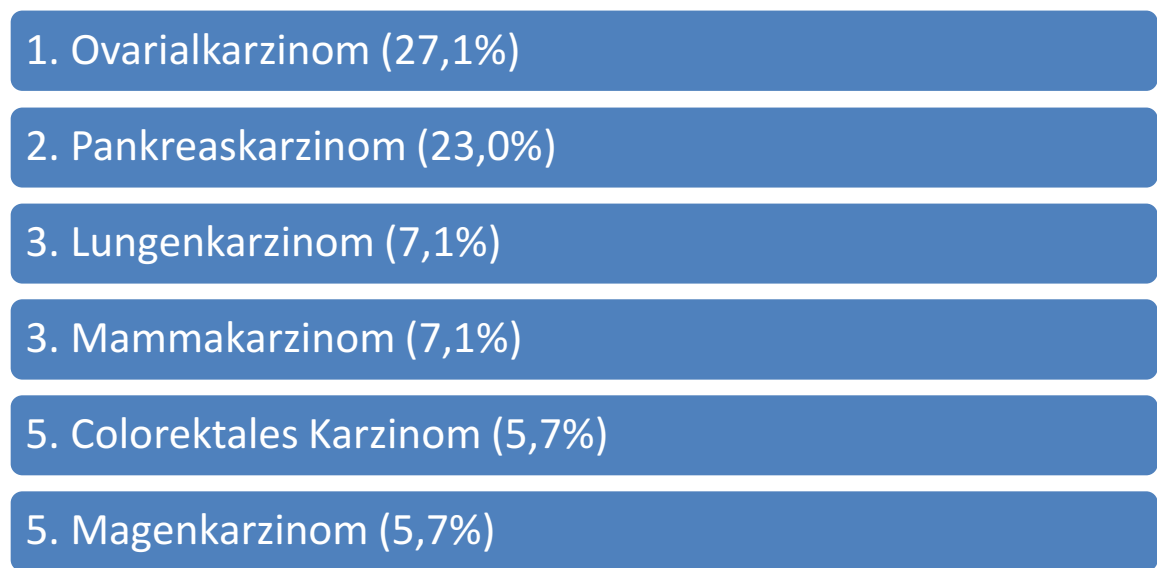


Abb. 12: Häufigkeitsverteilung der sechs häufigsten Primärtumoren aller Asciten dieser Studie

Deutlich häufiger lassen sich als Ursache einer Peritonealkarzinose im Rahmen dieser Studie nur das Ovarialkarzinom mit gut einem Viertel aller Fälle sowie das Pankreaskarzinom, welches in 23% der Fälle den Primarius darstellte, abgrenzen. Die verbleibende Hälfte aller Fälle verteilt sich fast gleichmäßig auf die folgenden Primärtumoren, welche sich jeweils nur um ein bis vier Fälle unterscheiden: Mammakarzinom und Bronchialkarzinom (jeweils 7,1%), Magen und kolorektales Karzinom mit jeweils 5,7%, das CCC (Cholangiozelluläres Karzinom), das primäre seröse Peritonealkarzinom sowie das CUP-Syndrom mit jeweils 4,3% sowie das Endometriumkarzinom und das Urothelkarzinom mit jeweils 2,9% und mit je einem Fall das Plattenepithelkarzinom des Penis, das Melanom, das endometriale Stromasarkom sowie ein Adenokarzinom des gastroösophagealen-Übergangs (je 1,4%).

Maligne *Perikardergüsse* treten selten auf und so wurden in dieser Studie nur zwölf Fälle in die endgültige Auswertung miteinbezogen. Zehn Mal wurde dabei die Diagnose eines Bronchialkarzinoms gestellt, die beiden anderen Fälle traten im Rahmen einer AML auf. Zu beachten ist hierbei, dass Mehrfacheinsendungen eines Ergusses möglich sind und die zwei untersuchten Fälle der AML hier auf ein und denselben Patienten zurückzuführen sind. Die zehn

Perikardergüsse, welche letztlich auf ein Bronchialkarzinom zurückzuführen waren, stammten von neun verschiedenen Patienten.

3.3.4 Treffsicherheit der cytomorphologischen und immuncytochemischen Bestimmung des Primärtumors einer Karzinose in der Routinediagnostik

In den allermeisten Fällen ist der Tumorzellnachweis in Körperhöhlenergüssen nicht auf einen lokoregionären Primärtumor zurückzuführen, sondern stellt vielmehr ein metastasiertes Tumorleiden dar. Daher werden in der cytologischen Diagnostik von Körperhöhlenergüssen regelmäßig immuncytochemische Verfahren angewandt, um den durch rein morphologische Kriterien erhobenen Befund bezüglich des Primärtumors zu ergänzen. Oftmals ist rein morphologisch keine eindeutige Bestimmung der Tumorentität möglich. Die in diesem Kapitel beschriebenen immuncytochemischen Untersuchungen sind Teil der Routinediagnostik im Rahmen der Krankenversorgung, wurden nicht von mir persönlich durchgeführt, sollen aber hier näher bezüglich der Genauigkeit der Tumorklassifikation ausgewertet werden. Hierbei wird der Grad der Übereinstimmung der cytologischen bzw. immuncytochemischen Diagnose mit der Follow-Up Diagnose in 4 Wertungskategorien eingeteilt und untersucht (siehe Treffsicherheit der cytomorphologischen und immuncytochemischen Bestimmung des Primärtumors einer Karzinose in der Routinediagnostik im Kapitel Material und Methoden).

133 von 339 Ergüssen wurden im Rahmen der klinisch-cytologischen Diagnostik bezüglich des Primärtumors immuncytochemisch untersucht. In 206 Fällen wurde die cytologische Diagnose rein morphologisch gestellt. Hiervon war in 144 Fällen der Primärtumor bei der Punktion des Ergusses bekannt und wurde auf dem Einsendeschein vom Kliniker mitgeteilt. In den übrigen rein cytologisch-morphologisch diagnostizierten Fällen lagen für die Ansprüche der Routinediagnostik jeweils zu wenig Tumorzellen für eine immuncytochemische Klassifikation vor. 120 der 133 in der Routinediagnostik immuncytochemisch untersuchten Ergussflüssigkeiten konnten mittels eines Antikörper-Panels, die übrigen nur mittels einzelner ausgewählter Antikörper, weiter immuncytochemisch untersucht werden. Insgesamt stimmte in 87% der Fälle (296 von 339) die cytologische Diagnose mit der klinischen Diagnose als Referenzstandard im Sinne der Wertungskategorie 1 überein.

Insgesamt 16-mal wurde vom Kliniker die Diagnose eines CUP gestellt. Diese 16 Präparate verteilen sich auf 12 verschiedene Patienten. Von den 16 CUP-Diagnosen ließen sich neun Fälle der Wertungskategorie 3 (keine explizite Übereinstimmung, Übereinstimmung aber auch nicht ausgeschlossen) zuordnen, die übrigen sieben fielen in die Wertungskategorie 2 (weitgehende Übereinstimmung).

Die übrigen 27 Präparate der Kategorien 2, 3 und 4 (Kategorie 4: keine Übereinstimmung) stammen von 24 verschiedenen Patienten und Patientinnen. Tabelle 3 zeigt eine Auflistung der Gegenüberstellungen von Cytologie und klinisch-histologischer Primärtumordiagnose einiger exemplarischer, interessanter Fälle, welche in der Diskussion noch ausführlich erörtert werden. Bei Fall 2 und Fall 4 wurden im Rahmen der Routinediagnostik keine adjuvanten immuncytochemischen Untersuchungen durchgeführt. Die vier Antikörper, welche in der Spalte „immuncytochemisches Expressionsprofil“ dieser zwei Fälle aufgeführt sind, stammen nicht aus der cytologischen Routinediagnostik im Rahmen der Krankenversorgung, sondern sind nachträglich im Rahmen dieser Studie eingesetzt worden.

Somit ergibt sich insgesamt 296-mal die Wertungskategorie 1, in die Wertungskategorie 2 fallen elf Präparate, in die Wertungskategorie 3 16 Präparate und in die Wertungskategorie 4 ebenfalls 16 Präparate.

Fall	Cytologische Diagnose laut Befund (Wortlaut)	Immuncytochemisches Expressionsprofil	Relevante klinische Informationen des Einsendescheins	klinische Diagnose	Kategorie
1	Die Ergebnisse sprechen für das Vorliegen von Zellen eines metastasierten <u>Adenokarzinoms der Lunge</u>	GATA3: Score 0 Napsin A: Score 5 TTF1: Score 5 MUC1: Score 4 CK 5/6: Score 4 CK 7: Score 5 CK 20: Score 0 CA 125: Score 2 Cdx-2: Score 0 CEA: Score 4 p40: Score 0	Keine	Mamma- karzinom, nicht näher bezeichnet	4
2	Als Primärtumor kommt gut das klinisch angegebene <u>Pankreas- karzinom</u> in Frage	GATA3: Score 0 Napsin A: Score 0 TTF1: Score 0 MUC1: Score 3	Pankreaskarzinom, metastasiert, maligne Zellen?	Adenokarzi- nom des Magens, intestinaler Typ	4
3	Insofern sprechen die Ergebnisse für das Vorliegen von Zellen eines metastasierenden <u>nicht-kleinzelligen Karzinoms</u> . Einen Ursprung in der Lunge können wir nicht nachweisen, es könnte sich auch um ein <u>Magen-oder Pankreaskarzinom</u> handeln	GATA3: Score 2 Napsin A: Score 0 TTF1: Score 0 MUC1: Score 3 berEP 4: Score 5. Cdx 2: Score 1. P 40: Score 0.	Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom	Plattenepithel karzinom der Lunge	3
4	Als Primärtumor kommt durchaus das klinisch bekannte <u>Ovarialkarzinom</u> in Frage	GATA3: Score 0 Napsin A: Score 0 TTF1: Score 0 MUC1: Score 3	Ovarialkarzinom	Kolorektales Adenokarzi- nom, siegel- ringzellig	4

Tabelle 3: Darstellung einiger Fälle mit Abweichung der cytologischen Diagnose vom Referenzstandard. Die Ergebnisse der Immuncytochemie aller untersuchten Antikörper sowie relevante klinische Angaben auf dem Einsendeschein sind ebenfalls aufgeführt

3.4 Expression von GATA3, TTF1, Napsin A und MUC1

Bei 16 der 339 zur endgültigen Auswertung herangezogenen Ergüsse wurde die Diagnose eines CUP-Syndroms gestellt. Diese 16 Fälle können nicht in die Berechnung von Treffsicherheiten bei den Untersuchungen für die jeweiligen Antikörper einbezogen werden, da keine endgültige „korrekte“ Tumordiagnose festgelegt wurde, welche als Referenzstandard dienen könnte. Somit

reduziert sich die auswertbare Kohorte für eine Analyse der Treffsicherheit der einzelnen Antikörper für die in den folgenden Unterkapiteln angegebenen Entitäten jeweils auf 323 Ergüsse.

3.4.1 GATA3

Insgesamt zeigten 44 der 339 gefärbten und ausgewerteten Präparate eine positive Immunreaktion (Score>0) für GATA3. Tabelle 4 zeigt alle Tumorentitäten mit Expression von GATA3.

Primarius	gefärbt	positiv	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4	Score 5
Mamma Gesamt	40	26 (65)	3	2	4	5	12
-duktales Adenokarzinom	20	12 (60)	2	1	2	1	6
-lobuläres Adenokarzinom	3	2 (67)	0	0	0	0	2
-nicht näher bezeichnet	17	12 (71)	1	1	2	4	4
Lunge	141	9 (6)	4	3	1	1	0
Urothel	3	3 (100)	0	2	0	0	1
Ovar	44	3 (7)	1	2	0	0	0
CUP	16	2 (13)	1	0	0	0	1
Pankreas	27	1 (4)	1	0	0	0	0

Tabelle 4: Häufigkeitsverteilung der Score-Werte aller GATA3 positiven Tumorentitäten; absoluter Zahlenwert (Prozentwert)

Mit 26 positiven Fällen war das Mammakarzinom die mit Abstand häufigste Tumorentität mit Immunreaktion für GATA3. Dies entspricht, je nach Subtyp, einer Prävalenz mindestens einer schwachen fokalen Immunreaktion (Score 1) von 60% (duktales Mammakarzinom) bis 71% (nicht näher klassifizierte Mammakarzinome). Die Prävalenz (ab Score 1) für alle Mammakarzinome zusammen liegt bei 65% (26 von 40).

In neun Fällen gab es einen positiven GATA3-Nachweis bei einem Lungenkarzinom. Davon waren sechs Adenokarzinome mit Score-Werten zwischen 1 und 4. Zwei weitere waren Plattenepithelkarzinome der Lunge, jeweils mit einem Score-Wert von 2, und im letzten Fall fand sich ein nicht kleinzelliges Karzinom der Lunge als Primärtumor, ebenfalls mit dem Score-Wert 2. Insgesamt exprimierten jedoch nur wenige Lungenkarzinome GATA3 (9 von 141), entsprechend einer Prävalenz (ab Score 1) von 6%.

Eine geringe Expression mit Score-Werten von 1 bzw. 2 zeigte sich außerdem bei drei von insgesamt 44 untersuchten Ovarialkarzinomen. In einem Fall wies ein Pankreaskarzinom ebenfalls eine positive Immunreaktion mit einem Score 1 auf (1 von 27).

Von den drei untersuchten Urothelkarzinomen zeigten alle eine positive Immunreaktion für GATA3. Zwei erhielten den Score 2, eines den Score 5. Dies entspricht einer Prävalenz (ab Score 1) von 100% (3 von 3).

Folgende Tumorentitäten zeigten keine GATA3 Expression: das kleinzellige Bronchialkarzinom, das Magenkarzinom sowie das Karzinom des gastroösophagealen Übergangs, das kolorektale Karzinom, das Endometriumkarzinom, das Pleuramesotheliom, das cholangiozelluläre Karzinom, das primäre seröse Peritonealkarzinom, die AML, die NHL, das Melanom, das Nierenzellkarzinom, das Adenokarzinom der Prostata, das papilläre Schilddrüsenkarzinom, das embryonale Rhabdo-

myosarkom, das endometriale Stromasarkom, das pleuropulmonale Blastom III sowie das Plattenepithelkarzinom des Penis.

3.4.2 Treffsicherheit der GATA3 Expression bei Karzinosen von Mamma- und Urothelkarzinomen

GATA3 ist eine in der Routinediagnostik oft verwendeter Marker für Mamma- sowie Urothelkarzinome. Eine signifikante Expression wird zwar noch in einer Reihe anderer Tumorentitäten beobachtet, welche aber selten bzw. nie zu einer Karzinose führen³⁹ und daher für eine Auswertung von Treffsicherheiten hier vernachlässigt werden können. Legt man daher diese beiden Tumorentitäten unter allen in der Arbeit enthaltenen Tumoren als „richtig positiv“ für eine Expression von GATA3 fest, so lässt sich die Treffsicherheit einer GATA3 Expression bestimmen.

Betrachtet man die Gesamt-Sensitivität und Spezifität ab einem Score-Wert von 1 für den Antikörper GATA3, so ergab sich eine Sensitivität von 67,4% und eine Spezifität von 95,4%. Der positive prädiktive Wert betrug 69,0% und der negative prädiktive Wert 95,0%. Erhöht man den „Cut-Off“, also jenen Score-Wert, ab dem das Ergebnis als positiv gewertet wird, so verändert sich auch die Treffsicherheit der Expressionsanalyse eines Antikörpers. Tabelle 5 zeigt Sensitivität, Spezifität, positiven prädiktiven Wert sowie den negativen prädiktiven Wert für die Treffsicherheit der GATA3 Expression zur Diagnose eines Mamma- oder Urothelkarzinoms bei den Cut-Off Werten 1, 2, 3, 4 und 5. Der höchste Youden-Index, also die bestmögliche erreichbare Kombination von Sensitivität und Spezifität, findet sich bei einem Score ≥ 1 .

Cut-Off	Sensitivität	Spezifität	PPW	NPW	Youden-Index
≥ 1	67,4% (29/43)	95,4% (267/280)	69,0% (29/42)	95,0% (267/281)	0,63
≥ 2	60,5% (26/43)	97,5% (273/280)	78,8% (26/33)	94,1% (273/290)	0,58
≥ 3	51,2% (22/43)	99,3% (278/280)	91,7% (22/24)	93,0% (278/299)	0,50
≥ 4	41,9% (18/43)	99,6% (279/280)	94,7% (18/19)	91,8% (279/304)	0,42
=5	30,2% (13/43)	100% (280/280)	100% (13/13)	90,3% (280/310)	0,30

Tabelle 5: Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW sowie Youden-Index einer GATA3 Expression für das Mamma- sowie Urothelkarzinom, jeweils für die Score-Werte 1, 2, 3, 4 und 5 als Cut-Off

3.4.3 TTF1

Der Antikörper TTF1 zeigte in 113 von 339 Ergüssen eine positive Immunreaktion. Tabelle 6 zeigt alle Tumorentitäten mit Expression von TTF1. Bei 103 Ergüssen bestand ein Lungenkarzinom als Primarius. Die Prävalenz der TTF1 Expression ab einem Score-Wert von 1 betrug 78% für Karzinosen pulmonaler Adenokarzinome, 71% für nicht-kleinzellige Lungenkarzinome und 60% für Kleinzeller. Von den 15 kleinzelligen Bronchialkarzinomen waren sieben im Follow-Up näher als kleinzellige neuroendokrine Karzinome bezeichnet, in vier Fällen lag keine histologische Untersuchung vor und in vier weiteren Fällen war die histologische Diagnose „kleinzelliges Bronchialkarzinom“. Zur genauen Verteilung des jeweiligen Score-Wertes siehe Tabelle 6.

Primarius	gefärbt	positiv	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4	Score 5
Lunge Gesamt	141	103 (73)	5	5	15	26	52
-Adenokarzinom	101	79 (78)	5	4	9	23	38
-Plattenepithelkarzinom	4	0 (0)	0	0	0	0	0
-Kleinzeller	15	9 (60)	0	1	4	1	3
-Nicht-kleinzelliges Karzinom	21	15 (71)	0	0	2	2	11
CUP	16	3 (19)	1	0	0	1	1
GÖ-Übergang	10	2 (20)	1	0	1	0	0
Mamma	40	2 (5)	1	0	0	0	1
Schilddrüse, papillär	1	1 (100)	0	0	0	1	0
Prostata	1	1 (100)	1	0	0	0	0
Ovar	44	1 (2)	1	0	0	0	0

Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der Score-Werte aller TTF1 positiven Tumorentitäten; absoluter Zahlenwert (Prozentwert)

In drei Fällen gab es einen positiven TTF1 Nachweis bei den CUPs, die Score-Werte betragen 1, 4 und 5. 20% der Adenokarzinome des oberen Gastrointestinaltrakts wiesen mit einem Score von 1 bzw. 3 ebenfalls positive TTF1-Werte auf. Auch bei dem einzig untersuchten Adenokarzinom der Prostata konnte eine positive Farbreaktion mit dem Score 1 beobachtet werden, genauso wie in einem Fall eines serösen Ovarialkarzinoms (Prävalenz 2% der untersuchten Karzinosen eines Ovarialkarzinoms).

Das einzige papilläre Schilddrüsenkarzinom dieser Studie wies ebenfalls eine deutliche Immunreaktion für TTF1 auf, welche mit dem Score-Wert 4 bewertet wurde.

5% (2 von 40) der untersuchten Karzinosen von Mammakarzinomen wiesen eine TTF1 Expression auf. In einem Fall war die Farbreaktion sehr schwach und wurde mit dem Score 1 bewertet. Auffällig war das zweite positive Mammakarzinom, da es eine ausgeprägte Immunreaktion mit einem Score 5 für TTF1 zeigte.

Negativ fiel hingegen die Immunreaktion gegen TTF1 für die folgenden Tumorentitäten aus: Magenkarzinom, kolorektales Karzinom, Endometriumkarzinom, Pankreaskarzinom, Pleuramesotheliom, cholangiozelluläres Karzinom, primäres seröses Peritonealkarzinom, AML, NHL, Melanom, Nierenzellkarzinom, Urothelkarzinom, embryonales Rhabdomyosarkom, endometriales Stromasarkom, pleuropulmonales Blastom Typ III sowie das Plattenepithelkarzinom des Penis.

3.4.4 Treffsicherheit der TTF1 Expression bei Karzinosen von Lungen- und Schilddrüsenkarzinomen

TTF1 ist ein in der Routinediagnostik oft verwendeter Marker für pulmonale Karzinome (mit Ausnahme der Plattenepithelkarzinome) sowie differenzierte Schilddrüsenkarzinome. Legt man daher diese beiden Tumorentitäten unter allen in der Arbeit enthaltenen Tumoren als „richtig positiv“ für eine Expression von TTF1 fest, so lässt sich die Treffsicherheit einer TTF1 Expression bestimmen.

Tabelle 7 zeigt Sensitivität, Spezifität, PPW sowie NPW für die Treffsicherheit der TTF1 Expression zur Diagnose eines Adeno-, nicht-kleinzelligen oder neuroendokrinen Lungenkarzinoms oder Schilddrüsenkarzinoms bei den Cut-Off Werten 1, 2, 3, 4 und 5. Die Sensitivität für das Schilddrüsenkarzinom lag bei 100% (Cut-Off Wert: Score 1-4), Bereits bei einem Score 1 zeigt sich eine sehr hohe Spezifität für Karzinosen eines Lungen- oder Schilddrüsenkarzinoms von 96,8%, die sich ab einem Score-Wert von 4 bis auf 99,5% steigern lässt. Die Sensitivität nimmt allerdings von 75,4% bis auf 37,7% ab. Das pulmonale Plattenepithelkarzinom zeigte in keinem Fall eine positive Immunreaktion für TTF1. Der höchste Youden-Index findet sich bei einem Score ≥ 1 .

Cut-Off	Sensitivität	Spezifität	PPW	NPW	Youden-Index
≥ 1	75,4% (104/138)	96,8 (179/185)	94,5% (104/110)	84,0% (179/213)	0,72
≥ 2	71,7% (99/138)	99,0% (183/185)	98,0% (99/101)	82,4% (183/222)	0,71
≥ 3	68,1% (94/138)	99,0% (183/185)	97,9% (94/96)	80,6% (183/227)	0,67
≥ 4	57,2% (79/138)	99,5% (184/185)	98,8% (79/80)	75,7% (184/243)	0,57
=5	37,7% (52/138)	99,5% (184/185)	98,1% (52/53)	68,1% (184/270)	0,37

Tabelle 7: Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW sowie Youden-Index einer TTF1 Expression für Bronchial- oder Schilddrüsenkarzinome, jeweils für die Score-Werte 1, 2, 3, 4 und 5 als Cut-Off

3.4.5 Napsin A

In 89 von 339 untersuchten Ergüssen ließ sich für Napsin A eine positive Immunreaktion nachweisen. Auch hier schließt das Ergebnis „positiv“ alle Score-Werte ungleich null ein. Ebenso wie bei der Untersuchung der TTF1 Expression war auch hier zumeist, nämlich zu 93% (83 von 89 Fällen), ein Bronchialkarzinom Ursache des Ergusses. Die Prävalenz der Napsin A Expression ab einem Score-Wert 1 bei den Karzinosen der pulmonalen Adenokarzinome betrug 69% (70 von 101), bei den nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen 52% (11 von 21), bei den Plattenepithelkarzinomen 25% (1 von 4) und bei den kleinzelligen (neuroendokrinen) Karzinomen 7% (1 von 15), wobei die beiden letztgenannten jeweils eine eher schwache Expression (Score 2) zeigten. Details zur Napsin A Expression bei den Score-Werten 1-5 der jeweiligen Tumorentitäten finden sich in Tabelle 8.

Primarius	gefärbt	positiv	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4	Score 5
Lunge Gesamt	141	83 (59)	13	7	15	18	30
-Adenokarzinom	101	70 (69)	12	3	13	17	25
-Plattenepithelkarzinom	4	1 (25)	0	1	0	0	0
-Kleinzeller	15	1 (7)	0	1	0	0	0
-Nicht-Kleinzeller	21	11 (52)	1	2	2	1	5
CUP	16	2 (12)	0	1	1	0	0
Mamma	40	2 (5)	0	0	1	0	1
Ovar	44	2 (5)	2	0	0	0	0

Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung der Score-Werte aller Napsin A-positiven Tumorentitäten; absoluter Zahlenwert (Prozentwert)

Ebenfalls positiv für Napsin A waren 5% (2 von 44) der Karzinosen von serösen Ovarialkarzinomen, jeweils mit einem schwachen Ausprägungsgrad, entsprechend einem Score 1. 12% (2 von 16) der CUPs zeigten eine positive Immunreaktion für Napsin A. Außerdem konnte bei 5% (2 von 40) der Mammakarzinome ein positives Ergebnis für Napsin A beobachtet werden. Das eine Mammakarzinom erhielt dabei den Score 3. Auffällig war auch hier wieder das zweite für Napsin A-positive Mammakarzinom, welches eine sehr deutliche Farbreaktion vom Score-Wert 5 zeigte. Es handelte sich hierbei um denselben Erguss, welcher auch eine starke TTF1 Expression zeigte. Auch nach zweimaliger mikroskopischer Kontrolle bestätigte sich sowohl für Napsin A als auch für TTF1 jeweils der höchste Score-Wert 5. Für einen erneuten Färbevorgang lag nicht genügend Material vor.

Eine Vielzahl von Tumoren im Studienkollektiv zeigte keine Napsin A Expression: Magenkarzinom, Karzinom des gastroösophagealen Übergangs, kolorektales Karzinom, Endometriumkarzinom, Pleuramesotheliom, cholangiozelluläres Karzinom, Pankreaskarzinom, primäres seröses Peritonealkarzinom, AML, NHL, Melanom, Nierenzellkarzinom, Urothelkarzinom, Adenokarzinom der Prostata, papilläres Schilddrüsenkarzinom, embryonales Rhabdomyosarkom, endometriales Stromasarkom, pleuropulmonales Blastom Typ III sowie Plattenepithelkarzinom des Penis.

3.4.6 Treffsicherheit der Napsin A Expression bei Karzinosen von Adenokarzinomen der Lungen

Napsin A wird in der cytologischen und histologischen Routinediagnostik als Marker für pulmonale Adenokarzinome verwendet. Die Treffsicherheit der Napsin A Expression bei unterschiedlichen Score-Werten der Expression (1-5) für Karzinosen pulmonaler Adenokarzinome und nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome ist in Tabelle 9 angegeben. Die Spezifität ist bereits ab einem Wert von Score 1 sehr gut, die Sensitivität nimmt naturgemäß mit steigendem Score ab. Der höchste Youden-Index mit 0,63 findet sich bei einem Score ≥ 1 .

Cut-Off	Sensitivität	Spezifität	PPW	NPW	Youden-Index
≥ 1	66,4% (81/122)	97,0% (195/201)	93,1% (81/87)	82,6% (195/236)	0,63
≥ 2	55,7% (68/122)	98,0% (197/201)	94,4% (68/72)	78,5% (197/251)	0,54
≥ 3	51,6% (63/122)	99,0% (199/201)	96,9% (63/65)	77,1% (199/258)	0,51
≥ 4	39,3% (48/122)	99,5% (200/201)	98,0% (48/49)	73,0% (200/274)	0,39
=5	24,6% (30/122)	99,5% (200/201)	96,8% (30/31)	68,5% (200/292)	0,24

Tabelle 9: Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW sowie Youden-Index der Napsin A- Expression von pulmonalen Adenokarzinomen und Nicht-Kleinzellern, jeweils für die Score-Werte 1, 2, 3, 4 und 5 als Cut-Off

3.4.7 MUC1

Wertet man alle Untersuchungen der MUC1 Expression mit einem Score größer null als „positiv“, so wiesen lediglich drei Tumorentitäten eine negative Expression für MUC1 auf. Dies waren die akute myeloische Leukämie (insgesamt vier Ergüsse), das endometriale Stromasarkom sowie das pleuropulmonale Blastom Typ III (mit je einem Ergusspräparat). Alle anderen Tumorentitäten

zeigten eine mehr oder minder stark ausgeprägte Immunreaktion mit dem Antikörper gegen Mucin
 1. Die Ergebnisse mit jeweiligem Score-Wert sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Primarius	gefärbt	positiv	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4	Score 5
Lunge Gesamt	141	128 (91)	11	16	27	35	39
-Adenokarzinom	101	95 (94)	10	10	18	27	30
-Plattenepithelkarzinom	4	4 (100)	0	1	2	1	0
-Kleinzeller	15	9 (60)	1	3	4	1	0
-Nicht-Kleinzeller	21	20 (95)	0	2	3	6	9
Mamma Gesamt	40	36 (90)	4	2	7	17	6
-duktales Adenokarzinom	20	19 (95)	2	0	5	8	4
-lobuläres Adenokarzinom	3	2 (67)	0	0	0	2	0
-nicht näher bezeichnet	17	15 (88)	2	2	2	7	2
Magen	11	11 (100)	2	3	2	3	1
Ovar	44	40 (91)	4	4	8	14	10
Endometrium	3	3 (100)	0	0	0	1	2
Pankreas	27	27 (100)	0	1	6	7	13
Kolorektal	11	8 (73)	1	2	3	2	0
GÖ Übergang	10	10 (100)	1	3	2	1	3
Pleuramesotheliom	4	4 (100)	0	1	1	2	0
CCC	3	3 (100)	1	0	1	1	0
Seröses, primäres Peritonealkarzinom	5	5 (100)	0	1	0	1	3
NHL	5	1 (20)	1	0	0	0	0
Melanom	5	1 (20)	1	0	0	0	0
Urothel	3	3 (100)	0	1	1	0	1
Niere	1	1 (100)	0	1	0	0	0
Prostata	1	1 (100)	1	0	0	0	0
Schilddrüse, papillär	1	1 (100)	0	0	1	0	0
Rhabdomyosarkom	1	1 (100)	1	0	0	0	0
Penis, Plattenepithel	1	1 (100)	0	0	0	0	1
CUP	16	14 (88)	2	3	2	2	5

Tabelle 10: Häufigkeitsverteilung der Score-Werte aller MUC1 positiven Tumorentitäten; absoluter Zahlenwert (Prozentwert)

Nach Anhebung des Cut-Off-Wertes auf den Score-Wert 3 sind immer noch 231 der 339 untersuchten Fälle als positiv zu werten. Folgende Tumore weisen ab einem Score-Wert von 3, zusätzlich zu den drei oben bereits genannten Tumorentitäten, eine fehlende Expression von MUC1 auf: Non-Hodgkin-Lymphome, malignes Melanom, Prostata- und Nierenkarzinom sowie embryonales Rhabdomyosarkom.

Werden nur die Fälle mit dem Score-Wert 5 als positiv für MUC1 gewertet, so ergibt sich immer noch ein recht breites Tumorspektrum mit positiver Expression. Mit dem Score 5 bewertet wurden Karzinosen des Adenokarzinoms (Prävalenz 30% (30 von 101)) sowie des nicht-kleinzelligen Karzinoms (Prävalenz 43% (9 von 21)) der Lunge, des duktales Mammakarzinoms (Prävalenz 20% (4 von 20)), des Magenkarzinoms (Prävalenz 9% (1 von 11)), des Ovarialkarzinoms (Prävalenz 23% (10 von 44)) und des Endometriumkarzinoms (Prävalenz 67% (2 von 3)), des Pankreaskarzinoms

(Prävalenz 48% (13 von 27)) sowie des Karzinoms des gastroösophagealen Übergangs (Prävalenz 30% (3 von 10)). Ebenfalls einen Score 5 zeigten der eine Fall des Urothelkarzinoms dieser Studie (Prävalenz 100% (1 von 1)), das Plattenepithelkarzinom des Penis (Prävalenz 100% (1 von 1)), sowie drei der fünf untersuchten serösen primären Peritonealkarzinome (Prävalenz 60% (3 von 5)).

Da MUC1 von einer Vielzahl epithelialer Tumore, insbesondere von zahlreichen Adenokarzinomen, exprimiert wird, ist es ein unspezifischer Marker, welcher für die histogenetische Klassifikation der Tumorzellen in Ergüssen nur eine untergeordnete Rolle spielen kann. Aufgrund der sehr breit gestreuten und unspezifischen Expression wurde auf eine weitere statistische Auswertung bezüglich diagnostischer Treffsicherheit verzichtet.

3.4.8 Kombinierte Auswertung

In der Cytopathologie und Histopathologie werden Antikörper-Panels zur Identifizierung und histogenetischen Klassifizierung von Tumoren eingesetzt. Die Zusammenstellung der Antikörper-Panels erfolgt dabei für jeden Patienten individuell nach Abwägung der wahrscheinlichsten Tumorentitäten (siehe dazu auch „Antikörper-Panels und diagnostische Treffsicherheiten“ im Kapitel Einleitung) und ist in hohem Maße von der morphologischen Erfahrung des diagnostizierenden Pathologen aber auch von exakten Angaben zu klinischen Untersuchungsbefunden abhängig.

Auch die vier untersuchten Antikörper dieser Arbeit bilden gemeinsam ein - wenn auch kleines - Antikörper-Panel. Da Mucin 1 ein sehr unspezifischer, wenig diskriminierender Antikörper ist, soll er im Folgenden nicht weiter betrachtet werden. Es verbleiben also die drei übrigen Antikörper GATA3, TTF1 sowie Napsin A für die weitere Analyse.

Setzt man voraus, dass GATA 3 ein Marker für Mamma- sowie Urothelkarzinome ist, TTF1 als Antikörper für die Erkennung eines Bronchialkarzinoms, Plattenepithelkarzinome ausgenommen, sowie Schilddrüsenkarzinome genutzt wird und Napsin A ein Antikörper zur Diagnostik der Adenokarzinome der Lunge ist, so lassen sich nach Definition der Cut-Off Werte kombinierte Treffsicherheiten für dieses Antikörper-Panel berechnen.

Legt man den Cut-Off für alle drei Antikörper auf den Score 1 fest (alle Werte ≥ 1 gelten also als „positiv“) so ergeben sich die in Tabelle 11 dargestellten Zahlen für die Treffsicherheit bei der Erkennung eines Bronchial- oder Mammakarzinoms.

	erkannt	nicht erkannt	unklar
Lunge Gesamt	106 (75,2)	31 (22,0)	4 (2,8)
-Adenokarzinom	81 (80,2)	16 (15,8)	4 (4,0)
-Nicht-Kleinzeller	15 (71,4)	6 (28,6)	0 (0)
-Kleinzeller	9 (60,0)	6 (40,0)	0 (0)
Mamma	25 (62,5)	14 (35,0)	1 (2,5)
Urothel	3 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Schilddrüse	1 (100,0)	0 (0)	0 (0)

Tabelle 11: Prävalenzen für Bronchial-, Mamma-, Urothel-, sowie Schilddrüsenkarzinome bei Kombination der Antikörper GATA3, TTF1 und Napsin A. In die Kategorie „unklar“ fallen solche Fälle, in denen sowohl TTF1 und/oder Napsin A und GATA 3 positiv sind. Absoluter Wert (Prozentwert)

Ist die Konstellation gegeben, dass „widersprüchliche Expression“, also entweder TTF1 und GATA3 oder Napsin A und GATA3, gleichzeitig positiv sind, also einen Score ≥ 1 aufweisen, so wird diese

Kombination zunächst als „unklar“ gewertet. Bei näherer Betrachtung der Ausprägung der jeweiligen Expression (Score-Werte) lässt sich abwägen, welcher Primärtumor letztlich wahrscheinlicher ist. Ist GATA3 beispielsweise mit dem Score 1 positiv, TTF1 weist hingegen den Score 4 auf, so ist die Diagnose „Bronchialkarzinom (Adenokarzinom oder neuroendokrines Karzinom)“ deutlich wahrscheinlicher. Tabelle 12 zeigt die „unklaren“ Fälle mit genauen Score-Werten:

	Klinische Diagnose	Score GATA3	Score TTF1	Score Napsin A	Cytologische Diagnose
Fall 1	Bronchialkarzinom	1	0	3	Pulmonales Adenokarzinom
Fall 2	Bronchialkarzinom	1	3	0	Bronchialkarzinom
Fall 3	Bronchialkarzinom	1	4	0	Bronchialkarzinom
Fall 4	Bronchialkarzinom	3	1	0	Mammakarzinom
Fall 5	Mammakarzinom	1	0	3	Pulmonales Adenokarzinom

Tabelle 12: Darstellung der fünf "unklaren Fälle" aus Tabelle 11, Score-Wert als absoluter Wert, die „klinische Diagnose“ entspricht dem Referenzstandard dieser Arbeit, die "cytologische Diagnose" ist diejenige, welche auf Grund der gegebenen Kombination der drei betrachteten Immunreaktionen am ehesten gestellt würde

Interessant ist insbesondere, inwiefern die Kombination der Immunreaktionen mit TTF1 und Napsin A die Sensitivität bei der Erkennung eines Bronchialkarzinoms erhöht hat. Bei gleichem Cut-Off (Score ≥ 1) wurden unter alleiniger Verwendung von TTF1 75% der Bronchialkarzinome (Plattenepithelkarzinome ausgenommen) richtig als positiv erkannt. Napsin A allein detektierte insgesamt 66% aller nicht kleinzelligen Bronchialkarzinome (Plattenepithelkarzinome ausgenommen) korrekt positiv. Durch Kombination der beiden Antikörper wurde (auch unter Einbezug entsprechender Abwägung bei den zunächst „unklaren“ Fällen) eine Sensitivität von 77% erreicht.

Da GATA3 unter den drei hier näher betrachteten Antikörpern der Einzige zur Erkennung eines Mammakarzinoms ist, ist hierbei keine Steigerung der Sensitivität zu erwarten. Dennoch wurde bei Nutzung des Antikörper-Panels ein Mammakarzinom weniger erkannt als bei alleiniger Betrachtung der GATA3 Expression. Dies ist dadurch zu begründen, dass dieser eine Fall zu den „unklaren“ Fällen zählte und zusätzlich zu dem GATA3-Score 1 einen Napsin A-Score von 3 aufwies und somit, unter alleiniger Betrachtung der beiden Antikörper, eher als Bronchialkarzinom gewertet würde. Nach Erhebung der Follow-Up-Referenzdiagnose ergab sich für dieses Karzinom letztlich dennoch die Diagnose eines Mammakarzinoms.

4 Diskussion

4.1 Patientenkollektiv, Geschlechterverteilung, Altersverteilung

Im viereinhalbjährigen Einschlusszeitraum dieser Studie wurden 694 tumorzell-positive Körperhöhlenergüsse aus dem Archiv des Funktionsbereichs Cytopathologie erfasst. Davon konnten letztlich 339 Ergüsse immunocytochemisch untersucht und mit Follow-Up-Daten abgeglichen werden. Ausschlussgründe dabei waren: 1. zu wenig restliche Objektträger im Archiv, 2. zu geringer Tumorzellgehalt, 3. technisch nicht auswertbar und 4. keine ausreichenden Follow-Up-Daten. Von den eingeschlossenen Präparaten bildeten Pleuraergüsse mit einem Anteil von 75,8% den Großteil aller untersuchten Präparate, 20,7% der Ergüsse waren Ascites und nur in 3,5% lag ein Perikarderguss vor.

Der hohe Anteil der Pleuraergüsse lässt sich durch die Wahl der einsendenden Kliniken erklären. Neben verschiedenen Abteilungen der Uniklinik selbst wurden Ergüsse aus der Pneumologie der Kaiserswerther Diakonie in das Studienkollektiv eingeschlossen. Aus der Pneumologie wurden lediglich Pleuraergüsse eingeschendet, sodass sich auch der hohe Anteil an Bronchialkarzinomen erklären lässt (s.u.).

Die Geschlechterverteilung des gesamten Studienkollektivs ist mit einem Frauenanteil von 54,6% und somit 45,4% männlicher Patienten relativ ausgewogen. Lediglich beim Ascites dominierte ein Frauenanteil von 64%, welcher durch den hohen Anteil von Ovarialkarzinomen als Primarius des Ascites (44 von 70 Ascites) erklärbar ist. Der mit 80% hohe Anteil der von Männern stammenden Perikardergüsse ist auf Grund einer niedrigen Fallzahl (12 Präparate von 10 verschiedenen Patienten) nicht sinnvoll interpretierbar. Valerio et al. untersuchten in einer retrospektiven Studie 519 Pleuraergüsse von 385 Patienten hinsichtlich der cytologischen Treffsicherheit. Ein tumorzellpositives Ergebnis ergab sich in 141 Fällen⁶⁹. Im Vergleich mit den eigenen Daten ergab sich eine ähnliche Geschlechterverteilung von 54% Frauen bei Valerio et al. bzw. 53% in der eigenen Studie.

Zur Frage, ob die Geschlechterverteilung bei malignen Ergüssen nicht etwa allgemein mit der Geschlechterverteilung maligner Tumoren korreliert, werden hier Krebsregisterdaten herangezogen: Deutschlandweit wurden 2018 498.000 Krebserkrankungen erstmalig diagnostiziert, davon 265.200 bei Männern (53,3%) und 232.700 bei Frauen (46,7%)³. Somit zeigt sich in dieser Studie mit einem weiblichen Anteil sowohl im Vergleich zu den oben genannten Studien als auch im Vergleich zu den Krebsneuerkrankungen in Deutschland mit einem Anteil von 54,6% ein vergleichsweise höherer Frauenanteil. Im Vergleich mit den Krebsregisterdaten aller Tumorentitäten ist der höhere Frauenanteil des eigenen Kollektivs möglicherweise mit Tumorentitäten zu erklären, die häufiger zu malignen Ergüssen führen. Bei Frauen nehmen solche Entitäten wie z.B. Mammakarzinome, Darmkrebs, Gebärmutterkrebs, Lungenkarzinome oder Ovarialkarzinome häufiger einen Platz unter den 10 häufigsten Krebsneuerkrankungen in Deutschland ein, als bei den Männern. Bei diesen finden sich hier z.B. mit Prostatakarzinomen oder auch Harnblasenkarzinomen Entitäten, die seltener zu einer malignen Ergussbildung führen³.

Das durchschnittliche Alter der Patienten der eigenen Serie betrug 67,3 Jahre, wobei die Patienten mit Ascites im Schnitt mit 65,2 Jahren etwas jünger waren als diejenigen mit Pleuraerguss (68 Jahre). Bei den Patienten mit Ascites zeigte sich zudem ein Peak bei der Altersspanne von 71-75

Jahren. In der oben genannten Studie von Valerio et al. lag das Durchschnittsalter bei 60 Jahren und somit unter dem der eigenen Studie⁶⁹. Insgesamt ähnelt das Patientenalter in der eigenen Studie dem durchschnittlichen Erkrankungsalter bei Tumorerstdiagnose in Deutschland. Seit zehn Jahren liegt dieses bei der weiblichen Bevölkerung bei 69 Jahren, die Männer waren bei Erstdiagnose durchschnittlich 70 Jahre alt³.

4.2 Häufigkeitsverteilung der Tumorentitäten

Sowohl bei Frauen (mit einem Anteil von 28%) als auch bei Männern (mit einem Anteil von 58%) war das Bronchialkarzinom die häufigste Tumorentität in der eigenen Studie. Unter den Frauen stellte das Adenokarzinom mit 80% den mit Abstand häufigsten histologischen Subtyp dar. Das Adenokarzinom der Lunge ist mittlerweile mit 43% der häufigste histologische Subtyp in Deutschland und metastasiert schnell auch hämatogen, wohingegen der mit circa 22% zweithäufigste Subtyp, das Plattenepithelkarzinom, zunächst eher lymphogen metastasiert und sich regional ausbreitet³. Außerdem ist es eine klinische Erfahrung, dass pulmonale Plattenepithelkarzinome nur selten zur Pleurakarzinose mit Ergussbildung neigen (persönliche Kommunikation Dr. Schramm). Da bei beiden Geschlechtern ein Raucheranteil von 71% erhoben werden konnte und insbesondere bei den Adenokarzinomen jeweils 68% (Frauen) bzw. 72% (Männer) eine bestätigte Raucheranamnese hatten, lässt sich hier kein Zusammenhang zwischen Rauchverhalten und histologischen Subtyp des Lungenkarzinoms ziehen.

Bei den Patientinnen unterschieden sich die drei häufigsten Tumorentitäten nur geringfügig in ihrer Fallzahl. Das Bronchialkarzinom (28%) lag nur wenig vor dem zweithäufigsten Karzinom, dem Ovarialkarzinom (24%), am dritthäufigsten war das Mammakarzinom (22%) ursächlich für den malignen Erguss. Mit 58% lag das Bronchialkarzinom bei den Männern mit Abstand an erster Stelle. Das Pankreaskarzinom (10%) war hier das zweithäufigste Karzinom und das Karzinom des gastroösophagealen Übergangs lag mit 5% an dritter Stelle. Diese geschlechtsspezifischen und auch tumorspezifischen Häufigkeitsunterschiede der eigenen Daten lassen wieder einen Zusammenhang mit der gemäß den Krebsregisterdaten unterschiedlichen Häufigkeit verschiedener zu einer Karzinose führender Tumorentitäten bei Männern und Frauen vermuten. Häufigstes Karzinom der Frau ist allgemein mit 30,0% das Mammakarzinom, gefolgt vom kolorektalen Karzinom (11,5%) und erst an dritter Stelle steht das Bronchialkarzinom mit 9,4%, wobei die Inzidenz des Bronchialkarzinoms in den letzten Jahren stieg, die des kolorektalen Karzinoms jedoch fiel. Auch bei den Männern steht das Bronchialkarzinom mit einem Anteil von 13,3% hinter dem Prostatakarzinom (24,6%)³. Sowohl Mammakarzinome als auch Bronchialkarzinome können bereits früh metastasieren und auch zu Karzinosen führen, was deren hohen Anteil im Studienkollektiv erklärt. Ein weiterer Grund für die hohe relative Fallzahl von Bronchialkarzinomen ist sicherlich, wie bereits im Kapitel Patientenkollektiv angesprochen, die hohe Einsendezahl aus der pneumologischen Klinik. Im gesamten Studienkollektiv war lediglich in einem Fall ein Prostatakarzinom Primarius des malignen Ergusses. Dies steht in scheinbarem Widerspruch dazu, dass es zahlenmäßig der häufigste maligne Tumor bei Männern ist. Dies lässt sich auf die im Vergleich zu anderen Karzinomen langsame Wachstumsgeschwindigkeit sowie oft späte oder sogar ausbleibende Metastasierung zurückführen. Auch im Falle einer Metastasierung sind selten die Pleura, das Perikard oder das Peritoneum betroffen, sodass maligne Ergüsse beim Prostatakarzinom eine Seltenheit darstellen⁶⁵.

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung der Tumorentitäten nach Ergussort gesondert, so war das Bronchialkarzinom mit Abstand häufigste Entität der Pleuraergüsse. Genau wie beim Mammakarzinom, welches die zweithäufigste Entität darstellte, ist dies einerseits durch die räumliche Nähe zur Pleura zu erklären⁶⁶. Ebenso metastasiert das Mammakarzinom hämatogen nach den Knochen am zweithäufigsten in die Lunge, wodurch die Ausbildung von Pleuraergüssen ebenfalls begünstigt wird²⁵. Beim pleuranahen Lungenkarzinom ist ein Wachstum per continuitatem ebenfalls möglich.

In der oben genannten Studie von Valerio et al verteilten sich die Tumorentitäten wie folgt: 29,8% (n=42) Mammakarzinome (42 Fälle), 27,7% (n=39) Bronchialkarzinome, 7,1% (n=10) Ovarialkarzinome, 5,7% (n=8) Karzinome des Darmtraktes, 5% (n=7) Magenkarzinome, 3,5% (n=5) Pankreaskarzinome sowie seltener weitere Tumorentitäten. Im Vergleich mit den eigenen Daten waren deutlich weniger Bronchialkarzinome und etwas weniger Ovarialkarzinome, dafür deutlich mehr Mammakarzinome die Primärtumoren. Auch hier ist wieder der hohe Anteil an Bronchialkarzinomen in der eigenen Studie durch die Wahl des Einsenders zu bedenken. Die vergleichsweise hohe Zahl von Ovarialkarzinomen und geringe Zahl von Mammakarzinomen in der eigenen Studie lässt sich dadurch jedoch nicht erklären⁶⁹.

Auch die Häufigkeitsverteilung der Tumorentitäten bei Ascites lässt sich entsprechend erklären. Insbesondere das Ovarialkarzinom und das Pankreaskarzinom metastasieren früh und primär intraperitoneal und zeigen beide wenig bzw. unspezifische Frühsymptome. So klagten Patientinnen mit Ovarialkarzinom häufig über vermehrten Meteorismus, Völlegefühl sowie eine durch Ascites bedingte Bauchumfangvermehrung⁶⁷. Das Ovarialkarzinom stellt in der weiblichen deutschen Bevölkerung mit 3,1% der jährlichen Neuerkrankungen lediglich das achthäufigste Karzinom dar, wohingegen es in der eigenen Studie dennoch auf Grund der frühen Metastasierung die häufigste Tumorentität im Aszites und die dritthäufigste Tumorentität im Pleuraerguss war⁶⁷. Das in der vorliegenden Arbeit jeweils 6% der Peritonealkarzinosen ausmachende kolorektale Karzinom sowie das Magenkarzinom weisen ebenfalls eine anatomische Nähe zum Peritoneum auf. Insbesondere das Magenkarzinom weist bei 80% aller Patienten zu Beginn ein langes, symptomfreies Intervall auf, sodass eine Peritonealkarzinose bereits bei Diagnosestellung häufig ist⁶⁸. Zwar metastasieren Bronchial- und Mammakarzinome eher spät peritoneal, jedoch lässt sich durch die hohe Fallzahl dieser Karzinome im Kollektiv der Anteil von jeweils 7% erklären.

4.3 Genauigkeit der cytologischen Tumorklassifikation

Nach Erhebung der Follow-Up-Daten und Festlegung des Referenztumortyps anhand des abschließenden Arztbriefs stimmte letztlich in 87% der Fälle die cytologische Diagnose des Tumortyps mit dem Follow-Up im Sinne der Wertungskategorie 1 (vollständige Übereinstimmung) überein.

Die gute Treffsicherheit lässt sich einerseits dadurch erklären, dass die Cytopathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf eine eigene, spezialisierte Abteilung darstellt und somit die Untersucher über gute cytomorphologische Kenntnisse verfügen. Somit erfolgt die Wahl der Antikörper für weiterführende immunocytochemische Untersuchungen zur Tumorzelltypisierung sehr gezielt. Oft werden zur Tumorzelltypisierung insbesondere bei zunächst unbekanntem Primärtumor standardisiert Antikörperpanel verwendet³⁴. Ebenso könnte eine hohe Anzahl

vorbekannter Tumorleiden, welche bereits auf dem Einsendeschein vom Kliniker mitgeteilt worden war, die Diagnosestellung erleichtert haben. Letzteres war in 144 von 339 Ergüssen der Fall.

Bereits im Rahmen der Routinediagnostik wurden an 39% aller Präparate immuncytochemische Untersuchungen durchgeführt, ein Großteil hiervon (90%) bereits mit einem ausführlichen Marker-Panel, sodass eine gute, treffsichere Einordnung des Primarius möglich war. Von den Fällen ohne weitere Immuncytochemie in der Routinediagnostik war in 71% bereits durch die klinischen Informationen des Einsendescheins der Primarius bekannt, sodass bei fehlender Konsequenz auf eine erneute immuncytochemische Untersuchung des Tumortyps verzichtet werden konnte. In diesen Fällen ist natürlich die Korrelation mit dem Follow-Up sehr gut. In den verbleibenden 29% der Fälle, bei denen keine immuncytochemischen Untersuchungen bereits in der Routinediagnostik erfolgten, war häufig eine unzureichende Tumorzellzahl des eingesendeten Materials ursächlich für den Verzicht der weiteren Diagnostik.

In der oben bereits erwähnten Studie von Valerio et al. wurde ebenfalls die cytologische Treffsicherheit an Pleuraergüssen bestimmt. Ein Großteil der Patienten (96.1%) wies eine positive Tumoranamnese auf, es wurde jedoch nur in 141 von 519 untersuchten Fällen cytologisch die Diagnose eines tumorzellpositiven Ergusses gestellt. Eine immuncytochemische Untersuchung erfolgte in 58 Fällen (11,2%), die meistgenutzten Antikörper waren Calretinin, Ber-EP4, TTF1 und GATA3. Eine Übereinstimmung der cytologischen mit der finalen Diagnose, welche mittels Pleurabiopsie gesichert wurde, gelang mit 79,3% der Fälle (46/58) etwas seltener als in der eigenen Studie ⁶⁹.

Interessant sind an dieser Stelle jedoch nicht die „korrekt“ gestellten cytologischen Diagnosen der vorliegenden Studie, sondern die 43 Fälle mit mehr oder weniger großen Diskrepanzen zwischen cytologischer Diagnose und Follow-Up der Wertungskategorien 2 (weitgehende Übereinstimmung), 3 (keine explizite Übereinstimmung, Übereinstimmung aber auch nicht ausgeschlossen) und 4 (keine Übereinstimmung). Diese 43 Ergüsse stammen von 24 Patienten, sodass hier Dopplungen auftraten. 16 Ergüsse blieben letztlich mit der finalen Diagnose eines CUP-Syndroms nicht weiter klärbar.

Unter den verbliebenen 27 Ergüssen fielen Fälle in die Wertungskategorie 4, bei denen sich die cytologische und klinische Diagnose entweder widersprachen (beispielsweise die cytologische Diagnose „**nicht** kleinzelliges Karzinom“ und die klinische Diagnose „kleinzelliges Karzinom der Lunge“) oder sehr weit auseinander lagen (beispielsweise Magenkarzinom gegenüber Lungenkarzinom). In der Wertungskategorie 3 waren Fälle eingeschlossen, bei denen die cytologische Diagnose sehr ungenau war (beispielsweise „Adenokarzinom“). Dies war entweder dann gegeben, wenn keine klinischen Angaben bezüglich eines möglichen Primarius gemacht worden waren, oder wenn trotz angegebenem Primärtumor in der cytologischen Diagnose der Primärtumor im Befundtext nicht näher benannt wurde. In die Wertungskategorie 2 fielen Fälle, bei denen der Cytopathologe sich nicht auf eine konkrete Diagnose festgelegt hatte, die korrekte Diagnose jedoch als die wahrscheinlichste aus dem Befundtest hervor ging (beispielsweise „Als Primärtumor kommt am ehesten ein Mammakarzinom in Frage. Differentialdiagnostisch wäre auch ein Ovarialkarzinom denkbar, dies scheint jedoch auf Grund der untypischen Marker Konstellation unwahrscheinlich“). Von den 27 Ergüssen sollen einige Fälle und deren Problematik exemplarisch ausführlicher dargestellt werden.

Besonders hervorzuheben ist hier zunächst folgender Fall (Fall 1 aus Tabelle 3 des Ergebnisteils), bei der die Antigenkonstellation aus cytologischer Sicht recht klar erscheint, aber dennoch nicht mit dem Follow-Up korreliert: Die vorliegende Antigenkonstellation mit fehlender GATA3 Expression sowie starker Napsin A und TTF 1 Expression (jeweils mit dem Score 5), ist in Kombination wegweisend für das Vorliegen eines Lungenkarzinoms. Klinisch wurde die Diagnose „Mammakarzinom“ gestellt und aus dem aktuellen Arztbrief wurde ersichtlich, dass die Patientin für mindestens ein Jahr in einer gynäkologischen Klinik chemotherapeutisch auf Grund dieses Mammakarzinoms behandelt wurde. Aus cytologischer Sicht ist aber zumindest das Vorliegen eines pulmonalen Zweitkarzinoms (Adenokarzinom) zu diskutieren. Positive Napsin A oder TTF1 Expressionen bei Mammakarzinomen stellen die Ausnahme dar. Yatabe et al. beschrieben, je nach verwendetem TTF1-Klon, eine TTF1 Expression von 1,5% (4 von 297) bzw. 2,4% (13 von 580) bei Adenokarzinomen der Mamma⁷⁰.

Zwei weitere Fälle (Fall 2 und Fall 4 aus Tabelle 3) demonstrieren den Einfluss der klinischen Angaben für die cytologische Diagnosestellung. Zu beachten ist hierbei, dass bei Diagnosestellung keinerlei immuncytochemische Untersuchungen erfolgt waren. In einem Fall (Fall 2) wurde vom Kliniker ein metastasiertes Pankreaskarzinom als Vordiagnose angegeben, ohne etwaigen Zusatz wie „Verdacht auf“ o.ä. Nach rein morphologischer Diagnostik war der mikroskopische cytologische Befund mit einem Pankreaskarzinom vereinbar, auf eine adjuvante Immuncytochemie wurde verzichtet. Letztlich erfolgte eine Lymphknotenbiopsie und histologisch konnte ein gering differenziertes Adenokarzinom des Magens (intestinaler Typ nach Lauren, G3) nachgewiesen werden. Die endgültige Erstdiagnose des Tumors erfolgte erst drei Wochen nach Eingang des Pleuraergusses in der Cytopathologie, war also zum Einsendezeitpunkt keineswegs bekannt, wie vom Kliniker - möglicherweise unabsichtlich – geäußert. Rein cytomorphologisch aber auch immuncytochemisch wäre bei einem gering differenzierten Adenokarzinom des Magens eine Abgrenzung zu einem (dann ebenfalls gering differenzierten) Adenokarzinom des Pankreas aufgrund ähnlicher Morphologie und Antigenkonstellation schwierig, wenn nicht gar unmöglich. Die finale Zuordnung muss dann von klinischer Seite anhand von Staginguntersuchungen unter Berücksichtigung bildgebender Verfahren erfolgen. Ähnlich verhielt sich der folgende Fall (Fall 4): eingesandt wurde ein Ascites mit der klinischen Angabe „Ovarialkarzinom“. Cytologisch wurde, erneut ohne weiterführende immuncytochemische Diagnostik, eine Karzinose des Ovarialkarzinoms bestätigt. Nach chirurgischer Tumorsektion konnte histologisch ein siegelringzelliges Karzinom des kolorektalen Übergangs mit Infiltration der Adnexe nachgewiesen werden. Rein cytomorphologisch sind siegelringzellige Adenokarzinome des Ovars nicht auszuschließen, wenngleich auch selten, so dass eine weitere immuncytochemische Untersuchung hier retrospektiv angezeigt gewesen wäre. Natürlich ist der (Cyto)Pathologe darauf angewiesen, sich auf die auf dem Probenbegleitschein angegebenen klinischen Diagnosen verlassen zu können. Dennoch zeigen die o.g. Beispiele, wie sehr vermeintlich richtige Angaben die Urteilsfindung beeinflussen und auf ggf. sinnvolle Untersuchungen verzichtet wird. In beiden Fällen wären ausführliche immuncytochemische Untersuchungen nötig gewesen, um die Diagnose besser eingrenzen zu können. Es wäre kritisch zu überlegen, ob auch bei scheinbar als bekannt angegebenem Primarius häufiger eine immuncytochemische Untersuchung des Ergusses erfolgen sollte, was allerdings auch Kostenaspekte aufwirft und arbeitsintensiv ist. Die im Rahmen dieser Studie erfolgten Untersuchungen der Expression von GATA3, TTF1, NapA und MUC1 ergaben in beiden Fällen lediglich für MUC1 eine mittelstarke Expression (jeweils Score 3), welche in der

Differentialdiagnostik zwischen Ovarial- und kolorektalem Karzinom bzw. zwischen Magen- und Pankreaskarzinom wenig zielführend gewesen wäre.

Interessant ist ebenfalls Fall 3 der Tabelle 3. Untersucht wurde hierbei ein Ascites, in den klinischen Angaben wurde bereits ein NSCLC erwähnt. Bereits im Rahmen der Routinediagnostik war eine immunocytochemische Untersuchung vor allem mit nukleären Antigenen erfolgt. Auffällig waren hierbei besonders ein Score 0 für TTF1 sowie Napsin A, ebenso negativ blieb der Antikörper gegen p40. Eine starke homogene Expression hingegen zeigte berEP-4 (Score 5), ein Antikörper gegen EpCAM, welcher insbesondere zur Diagnostik epithelialer Tumormetastasen sowie der Differenzierung zwischen Karzinosen pulmonaler Adenokarzinome und Mesothelien genutzt wird⁷¹. Mit einem Score 1 zeigte sich außerdem eine schwache Cdx-2 Expression, welche Hinweis auf einen möglicherweise gastrointestinalen Ursprung des Karzinoms ist. Lungenkarzinome exprimieren typischerweise selten Cdx-2⁷². Im Rahmen dieser Studie wurde die Routinediagnostik noch um eine Untersuchung der GATA3 Expression ergänzt. Interessanterweise ergab sich auch hier eine geringe fokale Expression (Score 2). Da von demselben Patienten in kurzer Zeit zwei Mal Ascites eingesandt wurde und es sich somit um zwei Studienfälle handelte, wurde im Rahmen dieser Studie die immunocytochemische Färbung mit GATA3, TTF1, NapA sowie MUC1 wiederholt. Es ergab sich erneut ein Score 2 für GATA 3, ein Score 2 für MUC1 (zuvor Score 3), NapA und TTF1 blieben weiterhin negativ. Bei positiver Immunreaktion mit GATA3 wäre generell ein metastasiertes Mammakarzinom denkbar, auf Grund des männlichen Geschlechts des Patienten würde dies jedoch eine Seltenheit darstellen. Aus cytologischer Sicht scheint jedoch bei fehlender TTF1 und Napsin A Expression ein pulmonaler Ursprung ebenso unwahrscheinlich, sodass im cytologischen Befund (da noch ohne den GATA3 Befund) differentialdiagnostisch ein Magen- oder Pankreaskarzinom als möglicher Primarius diskutiert wurde. Eine, wenn auch nur gering fokale GATA 3 Expression ist jedoch insbesondere für das Magenkarzinom nicht typisch. Mietinen et al. konnten nur in 5% (6 von 133) eine positive GATA3 Expression bei Adenokarzinomen des Magens nachweisen, bei Pankreaskarzinomen war eine GATA3 Expression mit 37% (23 von 62) häufiger³⁹. Shield et al. untersuchten mit insgesamt 74 Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Zellblockpräparaten von Körperhöhlenergüssen eine deutlich kleinere Kohorte als Mietinen et al., Insbesondere waren darunter nur drei Magenkarzinome und ein Pankreaskarzinom, jeweils ohne GATA3 Expression³⁵. Somit ist nach eigener Untersuchung der GAT3-Expression die cytologische Verdachtsdiagnose eines Magen- oder Pankreaskarzinoms unwahrscheinlich. Letztlich erfolgte die Diagnose des Primärtumors zunächst aus einem Biopsat der Carina und später an einem OP-Präparat nach Unterlappenresektion rechts – und es ergab sich histologisch ein Plattenepithelkarzinom der Lunge. Bei der klinischen Angabe eines NSCLC auf dem Einsendeschein des Ergusses muss diese Histologie bereits vorgelegen haben.

Auffällig ist in diesem Fall auch die fehlende Expression von p40 im cytologischen Untersuchungsmaterial, was ebenfalls zur Fehleinschätzung des Primärtumors beitrug. P40 wird typischerweise von Plattenepithelkarzinomen exprimiert⁷³. Jain et al. untersuchten 50 Feinnadelpunktate von Plattenepithelkarzinomen der Lunge hinsichtlich ihres p40 Expressionsprofils. Die Immunocytochemie erfolgte an entfärbten PAP-Ausstrichen. Jain et al. konnten eine Korrelation der p40 Expression und des Differenzierungsgrads des Tumors nachweisen. Gering differenzierte Karzinome zeigten eine deutlich höhere Expression, während bei gut differenzierten Karzinomen lediglich eine schwache oder gar fehlende p40 Expression nachgewiesen wurde⁷⁴. Affandi et al. verglichen an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten

Zellblöcken das Expressionsprofil von p40 und p63 bei Plattenepithelkarzinomen sowie Adenokarzinomen der Lunge. 77,1% (27/35) der Plattenepithelkarzinome exprimierten p40, sodass immerhin 23% negativ für p40 blieben ⁷⁵. Anders als in der Studie von Jain et al. waren dies jedoch schlecht differenzierte Karzinome. Zu beachten ist hier die unterschiedliche Präparation der Gewebe bzw. Zellen. Nichtsdestotrotz werden in der Literatur gehäuft p40 negative Plattenepithelkarzinome der Lunge beschrieben. An dieser Stelle wäre es interessant gewesen, das genaue Expressionsmuster des untersuchten Antigenpanels des OP-Materials zu kennen. Somit hätte man differenzieren können, ob es sich lediglich um ein pulmonales Plattenepithelkarzinom mit einem ungewöhnlichen Expressionsprofil handelt, oder ob die fehlende Expression auf die cytologische Präparation zurückzuführen ist. Leider lagen diese Informationen nicht vor.

4.4 GATA3

4.4.1 Expression bei Mamma- und Urothelkarzinomen

GATA 3 wurde schon vielfach als geeigneter Marker bei der Identifizierung von Mamma- sowie Urothelkarzinomen genannt.

Die Prävalenz der GATA3 Expression von Mammakarzinomen variiert je nach Studie. Insgesamt finden sich in der Literatur deutlich mehr Studien an Formalin-fixierten Gewebeblöcken als an cytologischen Ausstrichen. Es gibt Unterschiede hinsichtlich der Präanalytik, des histologischen Subtyps bzw. der Expression in Abhängigkeit vom Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status.

Leng et al. untersuchten in einer mit dem eigenen Ansatz vergleichbaren Studie die GATA3 Expression von 178 Tumoren (89 Mammakarzinome, 22 Urothelkarzinome und 67 Tumore anderen Ursprungs) und unterschieden dabei zwischen Präparaten von Feinnadelaspirationsbiopsien (FNA) und Ergüssen sowie zwischen Ausstrichen und Zellblockpräparaten. Die Prävalenz einer GATA3 Expression bei Mammakarzinomen war bei den FNA Proben sowie den Ergüssen sehr ähnlich (74% und 77%), die Ausstriche zeigten mit 89% eine deutlich höhere Prävalenz der GATA3 Expression im Vergleich zu den Zellblöcken (71%) ⁷⁶. Alle Urothelkarzinome, ungeachtet der Präparation, zeigten eine GATA3 Expression. Bei den übrigen Tumoren wiesen je ein Ovarialkarzinom, ein metastasiertes Plattenepithelkarzinom des Oropharynx, ein Karzinom des Thymus sowie ein Karzinom der Hautanhangsgebilde eine GATA3 Expression auf.

Miettinen et al. untersuchten in einer großen Studie Formalin-fixierte Gewebeblöcke von insgesamt 2500 epithelialen sowie mesenchymalen Tumoren auf ihr Expressionsprofil von GATA3. Die Prävalenz von GATA3 bei Mammakarzinomen lag je nach histologischem Subtyp zwischen 92% (duktales Mammakarzinom) und 100% (lobuläres Mammakarzinom) ³⁹. Shield et al. konnten ebenfalls eine hohe Expression von GATA3 bei Mammakarzinomen nachweisen, 90% (27/30) aller Mammakarzinome zeigten eine positive Immunreaktion für GATA 3, wobei bei allen positiven Fällen mindestens 50% der Tumorzellen GATA3 exprimierten ³⁵. Untersucht wurden Zellblockpräparate von malignen Ergüssen. Auch Lew et al. untersuchten Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Zellblöcke von 306 malignen Pleuraergüssen, Ascites sowie Perikardergüssen hinsichtlich der GATA3 Expression. Darunter waren 62 Mammakarzinome und 244 Karzinome anderen Ursprungs. 93,5% aller Mammakarzinome exprimierten GATA3 ³⁶. Lew et al. nutzen ebenfalls ein semiquantitatives Scoring System zur Beurteilung der Expressionsstärke. Dabei wurden sowohl für die Intensität der Färbung als auch den Anteil der gefärbten Zellen bis zu drei Punkte vergeben und

addiert. 91% der Mammakarzinome mit GATA3 Expression zeigten eine starke, homogene Expression (Maximalscore 6), die übrigen 9% wiesen mindestens einen Score 3 auf.

Zu beachten ist eine unterschiedliche Expression von GATA3 je nach histologischem Subtyp bzw. je nach Expressionsprofil der Hormonrezeptoren ER/PR bzw. der Expression von HER2. So zeigen triple-negative Mammakarzinome durchgehend eine geringere Expression von GATA3. Krings et al. untersuchten an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Proben die GATA3 Expression von 111 triple-negativen Mammakarzinomen, 39 Mammakarzinomen mit positiver ER/PR, aber negativer HER2 Expression und 31 Mammakarzinomen mit sowohl positiver ER/PR als auch HER2 Expression. Die immunhistochemische Färbung erfolgte in 179 Fällen an OP-Präparaten nach Mammaresektion und in zwei Fällen nach Biopsie der Mamma. Krings et al. zeigten, je nach verwendetem Antikörperklon, eine GATA3 Expression von 44-66% bei den triple-negativen Karzinomen. Die Karzinome mit Expression von ER und PR zeigten hingegen in 79-93% eine Reaktion mit GATA3 und jene Karzinome mit Expression von ER, PR und HER2 in bis zu 100%³⁸.

Clark et al. untersuchten Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Gewebe von 186 Mammakarzinomen sowie 205 weiteren Tumoren (u.a. weitere gynäkologische Tumore und Karzinome des Pankreas, des Magens, der Blase sowie cholangiozelluläre Karzinome und einige Plattenepithelkarzinome der Vulva bzw. der Cervix) hinsichtlich ihrer GATA3 Expression. Sie postulierten im Vergleich mit Krings et al. eine leicht höhere Prävalenz der GATA3 Expression triple-negativer Mammakarzinome von 70% (21/30), wohingegen bei den ER, PR und HER2-positiven Karzinomen bzw. ER, PR-negativen und HER2-positiven Karzinomen 100% eine relevante GATA3 Expression zeigten⁷⁷. Leider konnten die Proben der eigenen Arbeit nicht entsprechend mit diesen Literaturdaten korreliert werden, da detaillierte Informationen über den histologischen oder molekularen Subtyp der Mammakarzinome oft nicht vorlagen. Dennoch wird deutlich, dass es eine Reihe von besonderen Situationen bei Mammakarzinomen gibt, bei denen eine GATA3 Expression nicht unbedingt zu erwarten ist.

4.4.2 Expression in der eigenen Arbeit (Mamma- und Urothelkarzinome)

Wohingegen sämtliche in der eigenen Studie eingeschlossenen Urothelkarzinome GATA 3 exprimierten, wurde im Vergleich zur oben beschriebenen Datenlage eine niedrigere Sensitivität für GATA3 bei Karzinosen von Mammakarzinomen beobachtet. Lediglich 26 von 40 Mammakarzinomen exprimierten GATA 3 bei einem Score ≥ 1 , einer Prävalenz von 65% entsprechend. Erhöht man den für eine GATA3 Expression notwendigen Score Wert, so verändert sich die Treffsicherheit der Expressionsanalyse, die Sensitivität fällt und die Spezifität steigt. Fasst man das Mamma- sowie Urothelkarzinom zusammen, so fällt die Sensitivität bei einem Score von 5 verglichen mit Score ≥ 1 von 67,4% auf 30%, wohingegen die Spezifität von 95,4% auf 100% ansteigt. Der optimale Youden-Index lag mit 0,63 entsprechend beim Cut-Off ≥ 1 . Aus klinischer Sicht ist daher der „Cut-Off“ Wert ≥ 1 am sinnvollsten, da eine möglichst hohe Sensitivität zur Tumordiagnostik essenziell ist. Eine geringere Spezifität einer Immunreaktion kann in der diagnostischen Praxis oft durch die Untersuchung einer Markerkombination aufgefangen werden. Auch wenn in der eigenen Studie nur bei elf von 40 Mammakarzinomen weiterführende Informationen über den Rezeptorstatus vorlagen, scheint das mögliche vermehrte Vorliegen triple-negativer Karzinome nicht der Grund der im Literaturvergleich relativ niedrigen Sensitivität zu sein, da unter den Karzinomen mit bekanntem Rezeptorstatus kein triple-negatives war.

Mit Ausnahme der Studie von Leng et al., der Ausstrichpräparate mit einschloss, wurden bei allen oben zitierten Studien histologische formalinfixierte und Paraffin-eingebettete Gewebeproben zur Analyse der GATA 3 Expression verwendet. So ist nicht auszuschließen, dass die in dieser Studie genutzte Methodik der Immunocytochemie an Ausstrichpräparaten zu einem Rückgang der Sensitivität führt. Obwohl Leng et al. hier sogar eine höhere Sensitivität im Vergleich zu formalinfixierten Paraffin-eingebetteten Zellblockpräparaten zeigen konnten⁷⁶, sind diese zunächst alkoholisch fixierten und nach Papanicolaou-gefärbten Ausstriche doch sehr empfindlich für einen verzögerte oder unzureichende Fixierung. Auch wenn dies im Einzelfall für die vorliegende Studie rückwirkend nicht mehr eruiert werden kann, zeigt dies die Erfahrung aus der Routinediagnostik. Hier kommt es bei der alkoholischen Sprayfixation im Eingangslabor oft zu einer besseren Fixierung im Randbereich von dreidimensionalen Zellverbänden oder sogar zu einer inhomogenen Fixation der Präparate (persönlich Kommunikation Dr. Schramm). Ebenso mag die zum Teil mehrjährige Archivierung der Ausstrichpräparate zu einer Abnahme der Immunogenität führen. Auch wenn bislang keine Studien eine mögliche Abnahme der Immunogenität nach jahrelanger Aufbewahrung von (alkoholfixierten) Ausstrichpräparaten von Ergüssen untersucht haben, so existieren viele Studien an histologischem Gewebe. Grillo et al. untersuchten beispielsweise an Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Geweben eine mögliche Abnahme der Immunogenität von 14 Antikörpern über einen Zeitraum von 36 Monaten. Sie berücksichtigten dabei auch verschiedene Aufbewahrungsmethoden (Raumtemperatur, gekühlt bei 4°C, Paraffin-eingebettet). Sie beobachteten eine Abnahme der Immunogenität proportional zum Alter der Proben, insbesondere für Antikörper gegen nukleäre Antigene. Dabei fiel der Antigenverfall unter gekühlten Bedingungen am geringsten aus⁷⁸.

4.4.3 Expression bei anderen Tumoren (nicht Mamma- oder Urothelkarzinom)

Neben der zu erwartenden GATA 3 Expression von Urothel- sowie Mammakarzinomen exprimierten in der eigenen Studie auch 9 von 141 (6,4%) Bronchialkarzinomen, 3 von 44 (6,8%) Ovarialkarzinomen sowie eines von 27 (3,7%) Pankreaskarzinomen GATA 3. Während die Stärke der Expression bei den Ovarialkarzinomen und beim Pankreaskarzinom mit Scores von 1 oder 2 vergleichsweise gering blieben, waren unter den neun GATA 3 positiven Bronchialkarzinomen auch zwei Tumore mit einem Score Wert 3 bzw. 4, also einer Expressionsstärke, die über eine unspezifische Färbung sicher hinaus geht. Kleinzellige Bronchialkarzinome zeigten in keinem Fall eine GATA 3 Expression, jedoch zwei Karzinosen eines Plattenepithelkarzinoms, welche jedoch beide vom selben Patienten stammten. In der Literatur wird eine GATA3 Expression bei Plattenepithelkarzinomen ebenfalls beschrieben. Vidarsdottir et al. untersuchten Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete OP-Resektate von 665 Lungenkarzinomen und 425 pulmonalen Metastasen hinsichtlich ihres immunhistochemischen Expressionsprofils. Hierbei zeigten 2% der primären Adenokarzinome der Lunge eine GATA3 Expression und sogar 20% der pulmonalen Plattenepithelkarzinome exprimierten GATA3⁷⁹. Miettinen et al. beschrieben ebenfalls eine GATA3 Expression bei neun von 74 pulmonalen Plattenepithelkarzinomen (12%)³⁹. Somit entspricht die positive GATA3 Expression des pulmonalen Plattenepithelkarzinoms dieser Studie durchaus den aus der Literatur bekannten Daten. Miettinen et al. beschrieben eine seltenere Expression für 4 der 73 untersuchten serösen Ovarialkarzinome sowie 15 der 155 untersuchten Adeno- und Plattenepithelkarzinome der Lunge³⁹.

Ohne Expression blieben alle sonstigen Tumore des gastrointestinalen Systems wie Magenkarzinome, kolorektale Karzinome sowie Karzinome der Gallenwege. Die Fallzahl dieser

Karzinome in der eigenen Arbeit betrug zusammen 35. Es wäre somit die Aussage möglich, dass bei den differentialdiagnostischen Überlegungen zum Primärtumor einer Karzinose mit GATA3 Expression ein Karzinom des gastrointestinalen Systems, der Gallenwege oder ein kolorektales Karzinom unwahrscheinlich ist. Miittinen et al. beobachteten hier ähnliche GATA3 Expressionsmuster wie in der eigenen Arbeit. Es wird eine nur geringe Prävalenz (2 von 169) der GATA 3-Expression bei kolorektalen Karzinomen und bei 5 von 57 der cholangiozellulären Karzinome beschrieben, sodass eine GATA 3 Expression bei diesen Tumorentitäten eher selten ist und somit in der klinischen Diagnostik eine untergeordnete Rolle spielt ³⁹. Es wird allerdings eine im Vergleich mit den eigenen Daten häufigere GATA3 Expression bei 23 von 62 Pankreas-Adenokarzinomen beschrieben. Diese Daten stammen von Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Blöcken der Primärtumoren und werden in den eigenen Daten der metastasierten Situation in die serösen Höhlen nur in sehr viel geringerem Maße beobachtet. Eine GATA3 Expression wird in der Arbeit von Miittinen aber bei 37 von 64 malignen Mesotheliomen beschrieben und wäre damit in der immunocytochemischen Ergussdiagnostik durchaus relevant. Die vier Pleuramesotheliome der eigenen Serie waren allerdings durchweg GATA3 negativ.

Ebenfalls Daten zu Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Zellblöcken, welche aus malignen Ergüssen angefertigt wurden, außerhalb der Mamma bzw. des Urogenitaltrakts beschrieben Lew et al. Auch sie beobachteten ähnliche GATA3 Expressionsmuster bei Lungenkarzinomen wie in der eigenen Studie, so zeigten auch bei Lew et al. 14% (6/44) der Bronchialkarzinome eine GATA3 Expression (hiervon fünf Adenokarzinome und ein Plattenepithelkarzinom) und 11% der Pankreaskarzinome (2/18). Außerdem exprimierten zwei Magenkarzinome (2/12), ein Ösophaguskarzinom (1/12) und ein cholangiozelluläres Karzinom (1/8) GATA3, ohne Expression blieben alle kolorektalen Karzinome (0/14) ³⁶. Zusammengefasst ähneln die hier beschriebenen Expressionsmuster denen der eigenen Studie. Auch wenn sich hier einige wenige Karzinome des gastrointestinalen Trakts mit positiver GATA3 Expression zeigen, scheint dies eher eine Seltenheit zu sein.

Eine weitere Studie von Kriegsmann et al. gab weitere Aufschlüsse bezüglich der GATA3 Expression bei Bronchialkarzinomen. Sie untersuchten in einer großen Studie an Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten OP-Präparaten von 1291 NSCLCs (darunter 636 Adenokarzinome, 536 Plattenepithelkarzinome, 65 großzellige Karzinome, 34 pleomorphe Karzinome und 20 großzellige neuroendokrine Karzinome) die Karzinome bezüglich des ER-, PR-, HER2-, Mammaglobin- sowie GATA3 Expressionsprofils. Auch Kriegsmann et al. konnten mit 20% (109/536) vor allem bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge, aber auch bei pulmonalen Adenokarzinomen mit 8% (49/636) eine relevante GATA3 Expression nachweisen ⁸⁰. Somit ist differentialdiagnostisch bei nachgewiesener GATA3 Expression, insbesondere in Pleuraergüssen, immer auch ein Bronchialkarzinom in Erwägung zu ziehen.

4.5 TTF1

4.5.1 Expression bei Bronchialkarzinomen

Die in der Literatur beschriebenen Daten für die Sensitivität von TTF1 in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen variieren deutlich. Kim et al. untersuchten an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Zellblöcken, welche aus dem Sediment von 84 Pleuraergüssen gewonnen wurden, die Napsin A sowie TTF1 Expression von pulmonalen sowie extrapulmonalen Karzinomen. Sie

beschrieben in der Ergusscytologie eine Sensitivität von 58% (30/52) für TTF1 bei der Erkennung pulmonaler Adenokarzinome bei einer Spezifität von 100%⁴⁸. Es wurden aber auch höhere Sensitivitäten in der Ergusscytologie postuliert. So untersuchten auch Ng et al. Körperhöhlenergüsse (17 Pleuraergüsse, 18 Ascites, ein Perikarderguss) von metastasierten Adenokarzinomen, fertigten aus dem Erguss Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Zellblöcke an und bestimmten die TTF1 Expression. 17 der 36 Karzinome waren pulmonale Adenokarzinome und die Prävalenz für eine TTF1 Expression betrug 88% (15/17)⁴¹. Allgemein kann TTF1 vor allem bei Adenokarzinomen der Lunge und in etwas geringerem Maße auch bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden, Plattenepithelkarzinome exprimieren typischerweise kein TTF1. Dies konnte auch in der eigenen Studie bestätigt werden. Hier fehlte eine Expression bei den pulmonalen Plattenepithelkarzinomen, wohingegen Adeno- bzw. kleinzellige Karzinome eine Prävalenz von 78% bzw. 60% aufwiesen. Bei 15 von 21 (71%) der nicht weiter subklassifizierten Nicht kleinzelligen Lungenkarzinome lag ebenfalls eine TTF1 Expression vor.

4.5.2 Expression bei unterschiedlicher Methodik

Die oben genannten Studien mit Ausnahme der eigenen Arbeit basieren auf derselben Methodik. Es wurden Schnittpräparate Formalin-fixierter Paraffinblöcke aus dem zentrifugierten Sediment der Ergüsse immunocytochemisch untersucht. Eine der wenigen der mit der eigenen Methodik direkter vergleichbaren Studien zu immunocytochemischen Untersuchungen an direkten Ausstrichpräparaten stammt von Knoepp et al. Sie führten die immunocytochemischen Untersuchung von Napsin A sowie TTF1 an luftgetrockneten, ungefärbten Ausstrichen von 49 malignen und 17 reaktiven Ergüssen durch⁵⁰. Sie konnten bei 67% der Lungenadenokarzinome eine im Vergleich zu den eigenen 78% geringere TTF1 Expression nachweisen. Eine ähnliche Studie von Roh et al. untersuchte ebenso wie Knoepp et al. an luftgetrockneten, ungefärbten Ausstrichen u.a. die TTF1 Expression von NSCLC. Die insgesamt 25 Ausstriche (18 Adenokarzinome, sechs Plattenepithelkarzinome, ein nicht näher klassifiziertes nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom) wurden entweder aus abgeschabten Zellen von Lungenresektionspräparaten (zehn Fälle), von transbronchialen FNAs (13 Fälle) oder aus dem zentrifugierten Sediment von Pleuraergüssen (zwei Fälle) gefertigt. Eine TTF1 Expression zeigte sich bei 83% (15/18) der Adenokarzinome, alle Plattenepithelkarzinome blieben ohne TTF1 Expression und auch das nicht näher klassifizierte nicht-kleinzellige Karzinom zeigte keine TTF1 Expression⁸¹. Eine vergleichbare Studie von Liu et al. nutzte, ebenso wie die eigene Studie, alkoholfixierte und nach Papanicolaou gefärbte Ausstriche für die immunocytochemische Untersuchung. Sie untersuchten an Feinnadelaspirationsbiopsien von 34 Bronchialkarzinomen (14 pulmonale Adenokarzinome, 12 Plattenepithelkarzinome und 8 Kleinzellern) sowie neun pulmonal metastasierten Karzinomen anderen Ursprungs (drei Mammakarzinome, zwei Kolonkarzinome, ein Cervixkarzinom, ein Magenkarzinom, ein Melanom sowie ein Zungenkarzinom) die TTF1 Expression. Dabei erfolgte die immunocytochemische Untersuchung einerseits an aus den FNAs gewonnenen alkoholfixierten und nach Papanicolaou gefärbten Ausstrichen sowie ebenfalls vergleichend an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Zellblöcken, welche zusätzlich aus den FNAs gefertigt wurden. Alle extrapulmonalen Tumore zeigten, unabhängig von der gewählten Methode, keine TTF1 Expression und auch bei der TTF1 Expression der pulmonalen Karzinome konnte kein Unterschied zwischen Zellblöcken und Ausstrichen nachgewiesen werden. So wiesen jeweils 86% (12/14) der pulmonalen Adenokarzinome, 75% (6/8) der Kleinzeller und kein Plattenepithelkarzinom der Lunge eine TTF1 Expression auf⁸².

Insgesamt legen die vorgenannten Studien nahe, dass die Analyse der Expression von TTF1 mittels unterschiedlicher Methodik zu in der Größenordnung gut vergleichbaren Ergebnissen führt. Ebenso wie bei GATA3 lag der optimale Youden-Index für die Detektion einer TTF1 Expression in der eigenen Arbeit bei einem Cut-Off ≥ 1 . Grund hierfür ist erneut die mit steigendem Cut-Off-Wert deutlich abfallende Sensitivität. Wertet man lediglich Karzinome mit einem TTF1-Score > 3 als positiv, so beträgt die Sensitivität nur noch 56%, was für den klinischen Alltag deutlich zu viele falsch negative Tumore bedeuten würde. Selbst bei einem Cut-Off ≥ 1 ist die Spezifität mit fast 97% vergleichsweise hoch.

Teilweise wurde in der Literatur ein Rückgang der Sensitivität bei schlecht differenzierten Karzinomen beschrieben. Selves et al. beschrieben einen Abfall der Sensitivität von nahezu 100% bei den gut differenzierten Bronchialkarzinomen auf etwa 50% bei den schlecht differenzierten Karzinomen⁸³. Unter den Karzinosen pulmonaler Karzinome mit mäßiger bzw. schlechter Differenzierung ist daher möglicherweise vermehrt mit falsch negativen Befunden zu rechnen. Auch wenn in der eigenen Studie nur bei 63 von 101 aller pulmonalen Adenokarzinome eine Information über den Differenzierungsgrad vorlag, ließ sich erkennen, dass die gering differenzierten Karzinome mit einem Anteil von 83% (52/63) deutlich überwogen. Eine hohe Anzahl schlecht differenzierter Karzinome dieser Studie könnte ein Grund für eine etwas niedrigere Sensitivität im Vergleich mit manchen Studien sein.

4.5.3 Expression bei extrapulmonalen Karzinomen

TTF1 Expression in extrapulmonalen Karzinomen findet sich nur selten. Wenn überhaupt, werden eine Expression in Magenkarzinomen oder kolorektalen Karzinomen sowie Karzinomen des weiblichen Genitaltrakts (Ovarialkarzinome, Endometriumkarzinome) oder der Brust beschrieben: Matoso et al. verglichen die TTF1 Expression zwei verschiedener TTF1-Antikörperklone (8G7G3/1 und SPT24) in pulmonalen sowie extrapulmonalen Tumoren. Hierzu führten sie eine immunhistochemische Untersuchung an Tissue-Microarrays von Paraffin-eingebetteten Gewebeproben von 374 Lungenkarzinomen und 726 extrapulmonalen Tumoren (hiervon 160 Prostatakarzinome, 120 Kolonkarzinome, 110 Magenkarzinome, 110 Adenokarzinome des Pankreas, 98 invasive Urothelkarzinome der Harnblase, 34 duktales Mammakarzinome sowie 56 Tumore der Speicheldrüse und 38 Plattenepithelkarzinome des Kopfs bzw. Halses) durch. Eine TTF1 Expression zeigten fünf (5%) der Harnblasenkarzinome, drei (2,5%) Kolonkarzinome, zwei (1,2%) Prostatakarzinome und je ein Magen- sowie Speicheldrüsenkarzinom. Negativ blieben die Mammakarzinome, die Plattenepithelkarzinome sowie alle Pankreaskarzinome. Die Ergebnisse der extrapulmonalen Tumore waren für beide Antikörperklone gleich⁸⁴. Compérat et al. untersuchten vor allem kolorektale Karzinome auf ihre TTF1 Expression hin. Sie bestimmten an Tissue-Microarrays die TTF1 Expression von 232 Tumoren (56 in die Lunge metastasierte Karzinome - hiervon 41 kolorektale Karzinome, sechs Nierentumore, zwei Mammakarzinome, zwei Karzinome der Leber, drei Sarkome, sowie je ein Schilddrüsenkarzinom und ein Tumor der Speicheldrüse-, 90 primäre Kolonkarzinome und 86 pulmonale Adenokarzinome). Von den 56 pulmonal metastasierten Karzinomen zeigten fünf eine TTF1 Expression, hiervon das eine Schilddrüsenkarzinom sowie vier kolorektale Karzinome, letztere mit einer fokalen Expression. Ebenso exprimierten vier der 90 primären Kolonkarzinome TTF1⁸⁵. Ebenso wird eine TTF1 Expression in gynäkologischen Tumoren beschrieben. Fujiwara et al. untersuchten an Formalinfixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeproben von OP-Präparaten die TTF1 Expression von 83 Ovarialkarzinomen, 55 endometrioiden Adenokarzinomen des Uterus, 28 Adenokarzinomen der

Cervix sowie von 20 Leiomyosarkomen des Uterus. Eine TTF1 Expression zeigte sich bei 11 (13%) Ovarialkarzinomen und 5 (10%) der endometrioiden Adenokarzinome des Uterus. Die anderen Karzinome blieben alle ohne TTF1 Expression⁸⁶. Außerdem wird, wie bereits im Kapitel „Genauigkeit der cytologischen Tumorklassifikation“ kurz beschrieben, vereinzelt eine TTF1 Expression von bis zu 2,4% bei Adenokarzinomen der Mamma beschrieben⁷⁰. Auch Robens et al. wiesen in einer Studie an Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Zellblöcken von 546 OP-Präparaten bzw. FNA von Mammakarzinomen eine TTF1 Expression von 2,4% (13/546) nach⁸⁷. Des Weiteren finden sich in der Literatur Fallberichte einzelner Patienten von extrapulmonalen Tumoren mit positiver TTF1 Expression. So berichteten Pegolo et al. von einem hepatisch metastasiertem Adenokarzinom des Magens sowie eines Adenokarzinoms der Gallenblase, jeweils mit diffuser TTF1 Expression und ohne jeglichen Anhalt für ein Bronchialkarzinom⁸⁸.

4.5.4 Expression in der eigenen Arbeit

Auch in der eigenen Studie war die Spezifität der TTF1 Expression für pulmonale Karzinome (außer Plattenepithelkarzinome) und Schilddrüsenkarzinome mit 97% hoch und eine extrapulmonale TTF1 Expression trat lediglich bei zwei Karzinomen des gastroösophagealen Systems, einem Ovarialkarzinom, einem Prostatakarzinom und zwei Mammakarzinomen auf. Bis auf zwei Fälle (ein Mammakarzinom mit einem Score 5 (Diskussion vergleiche Kapitel „Genauigkeit der cytologischen Tumorklassifikation“) sowie ein Karzinom des gastroösophagealen Übergangs mit einem Score 3) war die Expression nur schwach (Score 1). Insgesamt zeigten sich also ähnliche extrapulmonale Tumorentitäten wie bereits in der Literatur beschrieben wurden. Die seltene kräftige TTF1 Expression bei extrapulmonalen Karzinomen muss aber in der diagnostischen Routine bedacht werden, da es sonst zu Fehldiagnosen kommen kann. Durchweg ohne Expression von TTF1 blieben Karzinome des pankreatobiliären Systems sowie des Urogenitaltrakts und das Pleuramesotheliom. Diese Tumorentitäten können somit in der Differentialdiagnostik weitgehend ausgeschlossen werden.

Eine TTF1 Expression kommt regelhaft bei Schilddrüsenkarzinomen vor. Daten zur Expression dieser Entität in der eigenen Serie sind aber limitiert, da nur ein pleural metastasiertes papilläres Schilddrüsenkarzinom (TTF1: Score 4) erfasst ist. Schilddrüsenkarzinome sind nur äußerst selten Primärtumoren bei (Pleura-)karzinosen (persönliche Kommunikation Dr. Schramm). Diese Einschätzung wird von einer Studie von Broome et al. bestätigt. Diese untersuchten in einer retrospektiven Studie von 143 Patienten mit metastasiertem Schilddrüsenkarzinom (104 papilläre, 30 follikuläre, fünf anaplastische und vier onkozytäre Schilddrüsenkarzinome) Risikofaktoren, welche mit einer schlechten Prognose einhergehen. Häufigster Metastasierungsort war mit 53 Fällen die Lunge. 19% (10/53) der Patienten mit Lungenmetastasen wiesen einen Pleuraerguss auf, es handelte sich jedoch nur in fünf Fällen um einen exsudativen Pleuraerguss und maligne Zellen konnten cytologisch nur in vier Fällen nachgewiesen werden⁸⁹. Cytologisch positive Pleuraergüsse sind somit selbst unter den metastasierten Schilddrüsenkarzinomen eher selten. Zu bedenken ist hier, dass das Patientenkollektiv von 143 Patienten über einen Zeitraum von 20 Jahren gesammelt wurde und somit das Vorliegen von Fernmetastasen bei Erstdiagnose eines Schilddrüsenkarzinoms ohnehin eine Seltenheit darstellt.

Insgesamt konnte in der eigenen Studie gezeigt werden, dass sich das Expressionsprofil von TTF1 an alkoholfixierten Ausstrichpräparaten nicht signifikant von dem in der Literatur vor allem an Formalin-fixierten Zellblockpräparaten beschriebenen Expressionsprofil unterscheidet.

4.6 Napsin A

4.6.1 Expression bei pulmonalen Adenokarzinomen

Napsin A ist eine Aspartat Proteinase, welche in humanen Zellen der Lunge sowie der Niere zu finden ist. Der Antikörper ist bekannt für seine hohe Spezifität bei der Diagnostik pulmonaler Adenokarzinome und insbesondere zur Differenzierung pulmonaler und extrapulmonaler Adenokarzinome geeignet^{40, 90}. Außerdem kann Napsin A zwischen Plattenepithelkarzinomen, neuroendokrinen Tumoren und Adenokarzinomen der Lunge differenzieren, da typischerweise nur das Adenokarzinom eine positive Napsin A Expression aufweist bzw. Plattenepithelkarzinome der Lunge nur in wenigen Fällen.

Turner et al. verglichen in einer großen Studie an 1674 Präparaten die Sensitivität und Spezifität von TTF1 und Napsin A in der Diagnostik von Bronchialkarzinomen. Die Untersuchung erfolgte an Tissue Microarrays von 555 Bronchialkarzinomen (303 Adenokarzinome, 200 Plattenepithelkarzinome, 52 Kleinzeller) sowie 1119 extrapulmonalen Tumoren, darunter Karzinome der Niere, der Schilddrüse, des Gallentrakts, der Harnblase, der Brust, des Kolon, der Leber, der Ovarien, des Pankreas, der Prostata, des Magens sowie des Uterus. Kurz zusammengefasst wies Napsin A durchweg eine höhere Sensitivität (87% für Napsin A gegenüber 64% für TTF1) sowie, mit Ausnahme der Nierentumore, auch eine höhere Spezifität (97% für Napsin A gegenüber 90% für TTF1), in der Erkennung pulmonaler Adenokarzinome auf als TTF1⁴⁰.

Auch in der eigenen Studie zeigten in erster Linie Adenokarzinome bzw. nicht weiter spezifizierte nicht-kleinzellige Karzinome der Lunge eine Expression von Napsin A. Unter den letzteren dürften sich einige Adenokarzinome verbergen. Der optimale Youden-Index von 0,63 für die Bestimmung der Treffsicherheit dieser Entitäten lag bei einem Cut-Off ≥ 1 . Die Sensitivität fiel mit Anhebung des Cut-Offs auf einen Wert von 5 auf lediglich 25% ab, was für den klinischen Alltag einen deutlich zu niedrigen und somit unpraktikablen Wert darstellt. Dabei ergab sich für diese beiden Tumorentitäten eine Sensitivität von 66,4% bei einem Cut-Off ≥ 1 , welche insgesamt unterhalb den in der Literatur angegebenen Sensitivitäten von 80-90% bei der Erkennung pulmonaler Adenokarzinome liegt^{40, 47, 48}. Bei allen hier vergleichend zitierten Studien wurden die immunocytochemischen Untersuchungen an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Zell- oder Gewebeblöcken durchgeführt.

4.6.2 Expression bei unterschiedlicher Methodik

Vergleichbare Studien zu immunocytochemischen Untersuchungen an direkten Ausstrichpräparaten finden sich selten. Die bereits oben genannte Studie von Knoepp et al. an Ausstrichpräparaten von malignen bzw. reaktiven Pleuraergüssen konnte in 78% der pulmonalen Adenokarzinome eine Napsin A Expression nachweisen. Somit ist die Prävalenz bei Knoepp et al. höher als die Prävalenz von 69% bei pulmonalen Adenokarzinomen der eigenen Studie⁵⁰. Auch die bereits zitierte Studie von Roh et al. an direkten Ausstrichpräparaten untersuchte neben TTF1 auch die Napsin A Expression von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen. Dabei konnte eine Napsin Expression bei 83% (15/18) der pulmonalen Adenokarzinome nachgewiesen werden. Alle sechs Plattenepithelkarzinome der Lunge sowie das eine nicht näher klassifizierte nicht-kleinzellige Karzinom blieben ohne Napsin A Expression⁸¹. Sehr wohl finden sich in der Literatur verschiedene Studien zum Expressionsprofil von Napsin A an malignen Ergüssen, jedoch erfolgt die immunocytochemische Untersuchung hier in der Regel in Zellblocktechnik an Formalin-fixierten

Paraffinblöcken aus dem zentrifugierten Sediment der Ergüsse. El Hag et al. untersuchten beispielsweise an ebenso aufgearbeiteten Proben von 139 malignen Ergüssen das Expressionsprofil von TTF1 und Napsin A ⁹¹. Eingeschlossen waren 26 pulmonale und 108 extrapulmonale Adenokarzinome, zwei pulmonale Plattenepithelkarzinome sowie drei Kleinzeller der Lunge. Die Prävalenz einer Napsin A Expression bei den pulmonalen Adenokarzinomen entsprach mit 65% (17/26) fast der Prävalenz der eigenen Studie (69%). Eine Napsin A Expression bei den kleinzelligen Karzinomen der Lunge sowie den pulmonalen Plattenepithelkarzinomen konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch ist die diesbezügliche Aussagekraft auf Grund einer niedrigen Fallzahl nur eingeschränkt. Auch in der oben bereits zitierten Studie von Kim et al. aus dem Jahr 2011 wurde die Napsin A Expression an Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Zellblöcken von insgesamt 84 malignen Pleuraergüssen untersucht. 83% (44/53) der pulmonalen Adenokarzinome zeigten eine Napsin A Expression, alle 31 extrapulmonalen Adenokarzinome blieben ohne Expression ⁴⁸.

Somit ist die Sensitivität der Napsin A Expression für Karzinosen pulmonaler Adenokarzinome in der eigenen Studie etwas niedriger als in der Literatur unabhängig von der Präanalytik (Paraffinblöcke, Ausstrichpräparate...) berichtet. Bereits im Kapitel zur TTF1 Expression wurden hier mögliche Ursachen ausführlicher diskutiert. Ursächlich könnten eine verzögerte oder unzureichende Alkoholspray-Fixierung sein oder ebenso die zum Teil mehrjährige Archivierung der Ausstrichpräparate. Letztere kann zu einer Abnahme der Immunogenität insbesondere nukleärer, aber auch zytoplasmatischer Antigene führen ⁷⁸.

4.6.3 Expression bei Plattenepithelkarzinomen (Lunge und extrapulmonal) und kleinzelligen Lungenkarzinomen

Allgemein zählen Plattenepithelkarzinome sowie kleinzellige Karzinome der Lunge zu den Tumoren mit fehlender Napsin A Expression, Turner et al. beobachteten eine Napsin A Expression lediglich bei 3% (5 von 200) der pulmonalen Plattenepithelkarzinome und bei keinem kleinzelligen Karzinom der Lunge (0/52). Plattenepithelkarzinome anderen Ursprungs waren in dieser Studie nicht vorhanden ⁴⁰. Es werden jedoch auch höhere Zahlen bei der Napsin A Expression pulmonaler Plattenepithelkarzinome genannt. So untersuchten Pereira et al. Tissue Microarrays von 194 Plattenepithelkarzinomen verschiedenen Ursprungs, darunter 35 Biopsien von Lungenkarzinomen, hinsichtlich ihrer Napsin A Expression. Eine positive Expression zeigte sich in 26% (9/35) der pulmonalen Plattenepithelkarzinome und 35% (3/8) der Plattenepithelkarzinome des Penis ⁹². In der eigenen Studie zeigten je ein pulmonales Plattenepithelkarzinom sowie ein kleinzelliges Karzinom der Lunge eine fokale Expression von Napsin A, einem Score 2 entsprechend. Das einzige Plattenepithelkarzinom des Penis in der eigenen Studie wies keine Napsin A Expression auf. Auf Grund der niedrigen Fallzahl (vier Plattenepithelkarzinome der Lunge, 15 kleinzellige Karzinome der Lunge), insbesondere der nur selten pleural metastasierenden pulmonalen Plattenepithelkarzinome, lässt sich nur schwer beurteilen, ob es sich hier lediglich um eine zufällige, unspezifische Färbung handelt. Eine verallgemeinernde Aussage ist somit nicht möglich. Hier wären ergänzende Untersuchungen unter Einschluss einer großen Fallzahl von kleinzelligen Karzinomen sowie Plattenepithelkarzinomen der Lunge mit der Frage nach positiver Napsin A Expression sinnvoll. Eine Napsin A Expression bei kleinzelligen Karzinomen der Lunge wird in der Literatur nicht beschrieben. Weder nach ausführlicher PubMed Recherche noch nach Printwerk-Lektüre (u.a. *Leong's Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology*) konnten Fallberichte oder Textpassagen hierzu gefunden werden.

4.6.4 Expression bei extrapulmonalen Karzinomen

Laut Literatur ist Vorsicht geboten bei der Differentialdiagnostik extrapulmonaler muzinöser Adenokarzinome. Heymann et al. untersuchten an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Zellblöcken von FNA Biopsien bzw. chirurgischen Präparaten von 32 muzinösen Tumoren der Lunge und 33 extrapulmonalen muzinösen Tumoren die Napsin A Expression, darunter 18 Tumore des gastrointestinalen Trakts. Heymann et al. beschrieben hier eine Spezifität von nur 52%, da 83% (15/18) aller muzinösen Adenokarzinome des gastrointestinalen Trakts ebenfalls polyklonal Napsin A exprimierten⁹³. Von den 33 extrapulmonalen muzinösen Adenokarzinomen wiesen 16 eine Napsin A Expression auf, hiervon neben den 15 Tumoren des gastrointestinalen Trakts ein Ovarialkarzinom. In der eigenen Studie blieben alle Karzinome des gastrointestinalen Trakts ohne Napsin A Expression, der histologische Subtyp, insbesondere eine muzinöse Differenzierung, war den Unterlagen aber nicht zu entnehmen. Somit ist möglich, dass keine muzinösen Karzinome eingeschlossen waren.

Napsin A spielt ebenfalls eine Rolle in der Diagnostik von Nierenzellkarzinomen, insbesondere papilläre Nierenzellkarzinome exprimieren zu über 70% Napsin A. Die Ausbildung von malignen Körperhöhlenergüssen stellt bei den (dann meist klarzelligen) Nierenzellkarzinomen eine Rarität dar, was die sehr niedrige Fallzahl von einem hier Napsin A negativem Nierenzellkarzinom in der eigenen Studie unterstreicht. Somit lässt sich in der eigenen Serie keine statistische Aussage über eine Expression von Napsin A bei Nierenzellkarzinomen treffen. Selten kann auch eine Expression bei Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen und Endometriumkarzinomen, Leber- und Pankreaskarzinomen sowie kolorektalen Karzinomen nachgewiesen werden.^{40, 90}. Davon sind lediglich Karzinomen der hepatozellulären Karzinome und der Endometriumkarzinome seltener. Die anderen genannten Entitäten wären differentialdiagnostisch zu beachten. Die einzigen extrapulmonalen Karzinome der eigenen Serie mit positiver Immunreaktion für Napsin A waren zwei seröse Ovarialkarzinome jeweils mit einer schwachen Expression (Score 1) sowie zwei Mammakarzinome. Ein Mammakarzinom wies einen Score 3 auf, das andere einen Score von 5. Dasselbe letztere Mammakarzinom zeigte auch eine TTF1 Expression mit einem Score 5 und wurde bereits im Kapitel „Genauigkeit der cytologischen Tumorklassifikation“ hinsichtlich eines aus cytologischer Sicht möglichen pulmonalen Zweitkarzinoms diskutiert.

Insgesamt ergaben sich in der eigenen Studie somit ähnliche Befunde mit allerdings in der Sensitivität für pulmonale Adenokarzinome etwas niedrigerem Wert, wie bereits aus der Literatur bekannt. Insbesondere bei den extrapulmonalen Tumoren mit positiver Napsin A Expression zeigten sich lediglich solche, die bereits in der Literatur beschrieben worden waren. Diese Entitäten sollten daher bei der differentialdiagnostischen Abgrenzung beachtet werden und bei Einsatz von Napsin A in einem Panel entsprechend durch weitere Antikörper ausgeschlossen werden, z.B. Cytokeratin 20 und cdx2 für kolorektale Karzinome, WilmsTumor 1 (WT1) oder Pax 8 für seröse Ovarialkarzinome, GATA 3 für Mammakarzinome⁹⁰.

4.7 Mucin 1

Mucine werden von einer Vielzahl Adenokarzinome exprimiert, im Speziellen sind sie bekannt für ihre Expression von Tumoren des gastrointestinalen Systems. Je nach Subtyp unterscheiden sich die Mucine in ihrem Expressionsprofil.

So gilt Mucin 1 als Antigen, das vor allem in pankreatobiliären Tumoren nachgewiesen werden kann, wohingegen Mucin 2 bevorzugt von intestinalen Adenokarzinomen wie dem kolorektalen Karzinom exprimiert wird. Jedoch zeigen die Mucin Subtypen ein sehr heterogenes Färbeverhalten. Co-Expressionen mehrerer Subtypen in einer Tumorentität sind keine Seltenheit, sodass eine strikte Abgrenzung nicht sinnvoll erscheint. Diese diagnostische Grenze der Mucine wurde schon in der Literatur beschrieben ⁷².

Auch in der eigenen Studie präsentierte Mucin 1 ein unspezifisches Färbeverhalten. Die einzigen Tumorentitäten ohne Mucin 1 Expression waren die akute myeloische Leukämie (insgesamt vier Ergüsse), das endometriale Stromasarkom sowie das pleuropulmonale Blastom Typ III (mit je einem Ergusspräparat). Insbesondere die beiden letztgenannten sind seltene Tumorentitäten. Auch hämatologische Erkrankungen wie akute Leukämien führen eher selten zur Ausbildung maligner Ergüsse ⁹⁴, die dann aber cytomorphologisch meist gut von den sonst wesentlich häufigeren Karzinosen abgegrenzt werden können.

Nach Anhebung des Cut-Offs auf den Score-Wert 3 bleiben noch 231 der 339 untersuchten Ergusspräparate positiv. Selbst dann, wenn nur Fälle mit einem Score-Wert 5 als positiv gewertet werden, lassen sich die Tumorentitäten nicht sinnvoll eingrenzen. Insbesondere die relevanten, häufigen Tumorentitäten wie Mammakarzinome, Bronchialkarzinome, Magen- und Pankreaskarzinome sowie Ovarialkarzinome zeigten im Mittel eine Prävalenz von 34% für eine homogene kräftige Expression von Mucin 1 (Score 5) und können so nicht unterschieden werden. Selbst extrapulmonale Plattenepithelkarzinome, in der eigenen Serie ein Plattenepithelkarzinom des Penis, können Mucin 1 mit einem Score 5 exprimieren. Mucin 1 scheint daher zur genauen Eingrenzung der Tumorentität und insbesondere in der Diagnostik von CUP-Syndromen wenig geeignet.

Um dennoch einen Mehrwert aus einer positiven Mucin-Expression zu gewinnen, wurde in der Literatur mehrfach untersucht, inwiefern eine hohe Mucin-Expression eine prognostische Aussage über den Krankheitsverlauf der Patienten zulässt. So wurde in verschiedenen Studien der Verdacht geäußert, dass hohe Expressionsmuster von Mucin 1 beispielsweise bei Magenkarzinomen mit einer erniedrigten 5-Jahres-Überlebensrate einhergehen. Wang et al. gingen dieser Frage mit Hilfe einer Meta-Analyse von zehn Studien mit insgesamt 834 Fällen nach und kamen zu dem Schluss, dass eine hohe Expression von Mucin 1 mit einem schlechteren Krankheitsverlauf einherzugehen scheint. So ging eine hohe Mucin 1 Expression mit einer signifikant schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate sowie einer höheren Rate an Lymphknotenmetastasen und Gefäßinvasion einher ⁹⁵. Die immunocytochemischen Untersuchungen erfolgten dabei an OP-Präparaten von Magenkarzinomen. Auf Grund einer deutlichen Heterogenität zwischen den eingeschlossenen Studien ist die Sicherheit dieses Ergebnis jedoch möglicherweise eingeschränkt.

4.8 Kombinierte Auswertung

Ziel einer kombinierten Auswertung ist es, mit Hilfe eines Antikörperpanels die Sensitivität sowie Spezifität in der Tumorklassifikation zu erhöhen. Dies ist bei Erstdiagnose eines malignen Tumors an der Metastase ein gängiges Verfahren in der diagnostischen Pathologie. Als Untersuchungsmaterial werden daher oft cytologische oder histologische Proben typischer Metastasenlokalisation, wie z.B. Leber, Lymphknoten aber auch Körperhöhlenergüsse eingesandt. Die Auswahl des geeigneten Antikörperpanels ist dabei abhängig vom klinisch vermuteten Sitz des

Primärtumors (vor allem gestützt durch Daten aus der bildgebenden Diagnostik), dem mikroskopischen Erscheinungsbild des Tumors und dem Wissen und der Erfahrung des diagnostizierenden Pathologen. Das Erlernen der verschiedenen Einsatzmöglichkeiten und Expressionsprofile der Immunhistochemie ist integraler Teil der fachspezifischen Ausbildung. Hierbei muss man unterscheiden zwischen Antigenen, die eher die Zuordnung zu einem Gewebe ermöglichen wie z.B. Vimentin für mesenchymale Neoplasien, BerEP4 oder Gesamtzytokeratin für epitheliale Tumoren, Melan A für melanozytäre Neoplasien etc., von Antigenen, die eher entitätenspezifisch sind, z.B. GATA3, Napsin A etc. In Lehrbüchern der immunhistochemischen Diagnostik sind für die Abklärung von Metastasen Entscheidungssequenzen für den sparsamen Einsatz integriert⁹⁶. In der eigenen Studie liegt mit vier Antikörpern ein kleines Panel vor. Da Mucin 1 sich als ein sehr unspezifischer, wenig diskriminierender Antikörper herausstellte, ist er kein idealer Antikörper für eine kombinierte Auswertung, sodass im folgenden lediglich GATA3, TTF1, und Napsin A näher betrachtet werden sollen und können.

Durch Kombination von TTF1 und Napsin A konnten insgesamt 4% mehr Bronchialkarzinome als richtig positiv erkannt werden, was einer absoluten Zahl von 6 und einer kombinierten Sensitivität von 77% entspricht. Napsin A allein konnte 69% (70/101) aller pulmonalen Adenokarzinome und 52% (11/21) aller nicht weiter klassifizierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome korrekt als solche erkennen. Bei TTF1 waren es 78% (79/101) bei den Adenokarzinomen und bei den nichtkleinzelligen Karzinomen der Lunge 71% (15/21). Somit war TTF1 in dieser Studie der Antikörper mit der höheren Sensitivität für die typischen Entitäten. Napsin A dagegen zeigte eine geringfügig höhere Spezifität (97% gegenüber 96,7% ab einem Score ≥ 1).

In der Literatur gilt Napsin A im direkten Vergleich mit TTF1 als der Marker mit der höheren Spezifität sowie Sensitivität. Turner et al. wiesen für Napsin A eine höhere Sensitivität (87% für Napsin A gegenüber 64% für TTF1) sowie Spezifität (97% gegenüber 90%) in der Diagnostik pulmonaler Adenokarzinome nach⁴⁰. In der eigenen Studie lag die Sensitivität für Napsin A jedoch um etwa 10% unterhalb der von TTF1.

Auf Grund der eingeschränkten Datenlage zur Napsin A Expression an alkoholfixierten Ausstrichen von malignen Ergüssen ist ein direkter Literaturvergleich schwierig. Zwar berichten Knoepp et al. und Roh et al. mit 78% bzw. 83% über eine ähnlich hohe Sensitivität der Napsin A Expression für pulmonale Adenokarzinome an alkoholfixierten Ausstrichen, wie sie üblicherweise an formalinfixierten Schnittpräparaten erzielt wird (Roh et al., 2012; Knoepp et al., 2013). Allerdings sind das nur kleine Fallserien. Für einige Antikörper wie beispielsweise PD-L1 ist in der Literatur eine verminderte Expression bei alkoholfixierten Präparaten beschrieben. So verglichen beispielsweise Koomen et al. die PD-L1 Expression von 54 Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinomen, welche mittels Feinnadelbiopsie gewonnen wurden, an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Zellblöcken mit der PD-L1 Expression von alkoholfixiertem Material derselben Proben. Es wurden zwei verschiedene PD-L1 Antikörper untersucht und es zeigte sich durchweg eine höhere Expression bei den Formalin-fixierten Proben. So lag die PD-L1 Expression bei den Formalin-fixierten Präparaten bei einem Cut-Off von 1% (ab 1% angefärbten Tumorzellen wurde die Expression als positiv gewertet) bei 61% bzw. 59% (je nach Antikörper-Subtyp) und bei den Alkohol-fixierten Proben lediglich bei 43% bzw. 50%⁹⁷. Solch eine erhöhte Rate falsch negativer Ergebnisse wird für Napsin A an alkoholfixierten Proben in der Literatur jedoch nicht beschrieben, findet sich aber in der eigenen Serie.

Wie oben bereits für jeden Antikörper einzeln beschrieben, liegt der optimale Youden-Index aller vier einzeln betrachteter Antikörper jeweils bei einem Cut-Off-Wert ≥ 1 . Auch wenn bei diesem Wert bereits eine zufriedenstellende Spezifität vorliegt, treten immer wieder falsch positive Befunde auf. Um diese zu mindern, ist die Untersuchung des Antikörper-Panels ebenfalls sinnvoll. Beispielsweise weisen drei der 40 Mammakarzinome nur eine GATA3 Expression vom Score 1 auf. Wie in Tabelle 12 näher ausgeführt, zeigten jedoch auch je zwei Karzinome mit der cytologischen Diagnose „Adenokarzinom der Lunge“ bzw. „Bronchialkarzinom“ eine geringe GATA3 Expression (ebenfalls Score 1). Hätte man hier keine ergänzende immunocytochemische Färbung mit typischen Antikörpern gegen Antigene pulmonaler Karzinome durchgeführt, hätten diese Tumore fälschlicherweise als Mammakarzinome eingeordnet werden können. Andererseits können ergänzende immunocytochemische Untersuchungen die Diagnosestellung auch erschweren, wie Fall 4 und 5 aus Tabelle 12 zeigen. Cytologisch spricht die Konstellation der Immunreaktion bei Fall 4 (GATA 3 Score 3, TTF1 Score 1, Napsin A Score 0) am ehesten für ein Mammakarzinom. Klinisch wurde im Follow-Up jedoch ein Bronchialkarzinom diagnostiziert. Ähnlich verhält es sich bei Fall 5. Hier spricht die Konstellation der Immunreaktion (GATA 3 Score 1, TTF 1 Score 0, Napsin A Score 3) am ehesten für ein pulmonales Adenokarzinom, klinisch wurde jedoch die Diagnose eines Mammakarzinoms gestellt. Im Rahmen der Routinediagnostik (jeweils ohne Immunocytochemie) wurde in diesen Fällen vom Cytopathologen jeweils die Diagnose gestellt, welche mit dem Follow-Up übereinstimmte und somit von der nach der immunocytochemischen Untersuchung im Rahmen der eigenen Studie zu erwartenden Diagnose abwich. Dies wäre beispielsweise durch eine typische Morphologie der Tumorzellen zu erklären oder dadurch, dass die Tumordiagnose dem Kliniker bereits bekannt war und auf dem Einsendeschein entsprechend vermerkt worden war.

Es wird deutlich, dass selbst durch die Kombination weniger Antikörper die Sensitivität sowie Spezifität für die richtige Erkennung der Tumorentität gesteigert werden können.

4.9 Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es, das Expressionsprofil von GATA 3, TTF1, Napsin A und Mucin 1 an alkoholfixierten Ausstrichpräparaten von Körperhöhlenergüssen zu untersuchen. Auch wenn während der Vorauswahl der archivierten Präparate aufgrund zu wenig restlicher Objektträger im Archiv oder des zu geringen Tumorzellgehalts viele ausgesiebt werden mussten (n=346) und außerdem neun Präparate nicht immunocytochemisch untersuchbar waren bzw. nicht mit ausreichenden Follow-Up Daten korreliert werden konnten, so konnte dennoch eine zufriedenstellende Anzahl von Ergüssen (n=339) in die Endauswertung miteinbezogen werden.

Insgesamt finden sich an alkoholfixierten Ausstrichpräparaten ähnliche Expressionsprofile wie schon aus der Histologie bzw. der Färbung von Zellblockpräparaten bekannt. So zeigte sich für GATA 3 die höchste Prävalenz bei Mamma- sowie Urothelkarzinomen und für TTF1 sowie Napsin A die höchste Expression bei Bronchialkarzinomen. Die Spezifität für die genannten Entitäten ist jeweils mit $>95\%$ hoch. Dennoch gibt es in wenigen Fällen auch eine unerwartete Expression in anderen primären Tumorentitäten. Hier wäre z.B. eine GATA3 Expression bei Lungenkarzinomen und Pankreaskarzinomen zu nennen. Dies ist differentialdiagnostisch zu beachten.

Auffällig ist jedoch eine mit dem Literaturvergleich niedrigere Sensitivität insbesondere bei GATA3 für Mammakarzinome sowie Napsin A für pulmonale Adenokarzinome. Möglicherweise stellt die hier durchgeführte Untersuchung an Ausstrichpräparaten im Vergleich zu in der Literatur meist

verwendeten Zellblockpräparaten eine Ursache der niedrigeren Sensitivität dar. Eine der wenigen Studien, welche alkoholfixierte, direkte Ausstriche für die immunocytochemische Untersuchung einschloss, ist von Ueda et al. Sie untersuchten ein Panel von sieben Antikörpern (MOC-31, Ber-EP4, CA19-9, CEA, EMA, CA125 und HBME-1) hinsichtlich der Differenzierung von Adenokarzinomen und reaktiven Mesothelzellen und verglichen dabei drei verschiedene Präparationsmethoden der Ergusscytologie (alkoholfixierte, direkte Ausstriche, alkoholfixierte Zellblöcke und Formalin-fixierte Zellblöcke) ⁹⁸. Die direkten, alkoholfixierten Ausstriche erzielten dabei die besten immunocytochemischen Ergebnisse. Auch wenn in der Studie von Ueda et al. keiner der in dieser Studie eingeschlossenen Antikörper untersucht wurde, wird deutlich, dass bei optimiertem Fixations- und Färbeprotokoll an alkoholfixierten Ausstrichen von Ergusspräparaten mindestens gleichwertige Resultate möglich scheinen. Auf Grund einer schwierigeren Standardisierung der immunocytochemischen Färbung in der Ergusscytologie an alkoholfixierten Ausstrichpräparaten (inhomogene Fixation, zum Teil lange Archivierungszeit vor Untersuchung in der eigenen Studie) sind teilweise die niedrigeren Expressionsstärken erklärbar.

Zudem könnte die Verarbeitungszeit der Ergüsse die Expressionsstärke beeinflussen. Längere Versandzeiten und Verwahrzeiten bis zur immunocytochemischen Untersuchung der meist nativen Körperhöhlenergüsse führt zu Zelldegeneration. Degenerierte Zellen zeigen häufig ein geringeres Expressionsprofil ^{99, 100}. In der Literatur wird allgemein, allerdings wieder für Formalinfixierte Gewebe, eine verspätete Fixierung (> eine Stunde) als möglicher Grund eines reduzierten Expressionsprofils verschiedener Antikörper angegeben ^{99, 101}. Informationen über die Versanddauer der Ergüsse lagen in dieser Studie nicht vor. Versandzeiten >1 h könnten aber bei den Einsendungen aus der Kaiserswerther Diakonie aufgrund der räumlichen Entfernung zum Universitätsklinikum Düsseldorf häufiger vorkommen und sind auch bei den Einsendungen vom Campus des Universitätsklinikums selbst nicht ausgeschlossen, da der Transport in die Cytopathologie in der Regel nicht separat für jeden Erguss bestellt wird.

Letztlich bleibt die genaue Ursache für die unterschiedlich hohe Sensitivität nicht abschließend geklärt. Hier wären weitere vergleichende Studien z.B. mit direkt weiterverarbeiteten Ergüssen und vergleichenden Zellblockpräparaten sinnvoll.

Dennoch sollte man die Vorteile der Immunocytochemie an Ausstrichpräparaten nicht außer Acht lassen. Für diese Methodik werden weniger Tumorzellen im Erguss benötigt, da sie alle auf der Oberfläche des Objektträgers einsehbar sind, wohingegen Zellen in der Tiefe des Zellblocks nicht angeschnitten sind und daher nicht untersucht werden. Bei zu geringer Zellzahl für die Fertigung eines Zellblocks stellt die Färbung von Ausstrichen eine gute Alternative dar.

Wie erwartet erhöht auch in der vorliegenden Arbeit die kombinierte Auswertung der untersuchten Immunreaktionen im Sinne eines Panels die diagnostische Treffsicherheit für die Tumorentitäten mit der höchsten Prävalenz wie bronchopulmonale Karzinome und Mammakarzinome.

Mucin 1 stellte sich als unspezifischer und wenig diskriminierender Antikörper heraus, sodass hier kein Mehrgewinn für die histogenetische Klassifizierung von Tumoren an alkoholfixierten Körperhöhlenergüssen vorliegt.

5 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt (2021), Todesursachenstatistik 2019 und 2020, Zitiert nach de.statista.com., abgerufen am 27.12.2021.
2. Statistisches Bundesamt (2021), Entwicklung der Lebenserwartung bei Geburt in Deutschland nach Geschlecht in den Jahren von 1950 bis 2060, Zitiert nach de.statista.com., abgerufen am 27.12.2021.
3. Robert Koch Institut, Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2021 ISBN 978-3-89606-309-0 DOI 10.25646/8353.
4. Arastéh KB, Baenkler HW, Bieber C, Brandt R, Chatterjee TT;. *Duale Reihe Innere Medizin* Georg Thieme Verlag; 2013.
5. Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC, Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Annals of internal medicine*. 1972;77:507-513.
6. Skok K, Hladnik G, Grm A, Crnjac A. Malignant Pleural Effusion and Its Current Management: A Review. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*. 2019; doi: 10.3390/medicina55080490
7. Porcel JM, Esquerda A, Vives M, Bielsa S. Etiology of pleural effusions: analysis of more than 3,000 consecutive thoracenteses. *Archivos de bronconeumologia*. 2014;50:161-165.
8. Kjeldsberg CL, Knight, Joseph A. *Body Fluids: Laboratory Examination of Amniotic, Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial Fluids*. Chicago, United States: American Society of Clinical Pathologists Press 1993.
9. Jany B, Welte T. Pleural Effusion in Adults-Etiology, Diagnosis, and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2019;116:377-386.
10. Light RW. Pleural effusions. *The Medical clinics of North America*. 2011;95:1055-1070.
11. Bintlcliffe OJ, Hooper CE, Rider IJ, Finn RS, Morley AJ, Zahan-Evans N, Harvey JE, Skyrme-Jones AP, Maskell NA. Unilateral Pleural Effusions with More Than One Apparent Etiology. A Prospective Observational Study. *Annals of the American Thoracic Society*. 2016;13:1050-1056.
12. Venekamp LN, Velkeniers B, Noppen M. Does 'idiopathic pleuritis' exist? Natural history of non-specific pleuritis diagnosed after thoracoscopy. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2005;72:74-78.
13. DeMay RM. *The Book of Cells: A Breviary of Cytopathology*. American Society for Clinical Pathology; 2016.
14. Herold G. *Innere Medizin 2020*: Herold, Gerd; 2019.
15. Asciak R, Rahman NM. Malignant Pleural Effusion: From Diagnostics to Therapeutics. *Clinics in chest medicine*. 2018;39:181-193.
16. Bedrossian C. *Malignant Effusions. A Multimodal Approach to Cytologic Diagnosis*. Vol 5th. New York, Tokyo: Igaku-Shoin Medical Publishers; 1994.
17. Cibas ES, Ducatman BS. *Cytology: Diagnostic Principles and Clinical Correlates*: Elsevier Health Sciences; 2014.
18. Ried M, Hofmann HS. The treatment of pleural carcinosis with malignant pleural effusion. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2013;110:313-318.
19. Dannenberg K. *Diagnostische Treffsicherheit der Perikardergusszytologie*. [Dissertation, Zahnmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf]; 2014.

20. Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M. *Harrisons Innere Medizin* ABW Wissenschaftsverlagsgesellschaft; 2017.
21. Rochling FA, Zetterman RK. Management of ascites. *Drugs*. 2009;69:1739-1760.
22. Sears D, Hajdu SI. The cytologic diagnosis of malignant neoplasms in pleural and peritoneal effusions. *Acta cytologica*. 1987;31:85-97.
23. Wu LX, Li XF, Chen HF, Zhu YC, Wang WX, Xu CW, Xie DF, Wan Y, Du KQ. Combined detection of CEA and CA125 for the diagnosis for lung cancer: A meta-analysis. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2018;64:67-70.
24. Mettlin C, Littrup PJ, Kane RA, Murphy GP, Lee F, Chesley A, Badalament R, Mostofi FK. Relative sensitivity and specificity of serum prostate specific antigen (PSA) level compared with age-referenced PSA, PSA density, and PSA change. Data from the American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project. *Cancer*. 1994;74:1615-1620.
25. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Höfler G, Kreipe H. *Pathologie (5. Auflage)*: Urban & Fischer in Elsevier; 2012.
26. Mulisch M, Welsch U. *Romeis - Mikroskopische Technik*: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2010.
27. Koss L. *Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1992.
28. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, Jöhrens K, Kirchner T, Reu S, Rüschoff J, Schildhaus HU, Schirmacher P, Tiemann M, Warth A, Weichert W, Fischer RN, Wolf J, Büttner R. Prädiktive PD-L1-Immunhistochemie beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom: Aktueller Stand und Erfahrungen der ersten deutschen Harmonisierungsstudie. *Der Pathologe*. 2016;37:557-567.
29. Lozano MD, Panizo A, Toledo GR, Sola JJ, Pardo-Mindán J. Immunocytochemistry in the differential diagnosis of serous effusions: a comparative evaluation of eight monoclonal antibodies in Papanicolaou stained smears. *Cancer*. 2001;93:68-72.
30. Gotzos V, Vogt P, Celio MR. The calcium binding protein calretinin is a selective marker for malignant pleural mesotheliomas of the epithelial type. *Pathology, research and practice*. 1996;192:137-147.
31. Kim NI, Kim GE, Lee JS. Diagnostic Usefulness of Claudin-3 and Claudin-4 for Immunocytochemical Differentiation between Metastatic Adenocarcinoma Cells and Reactive Mesothelial Cells in Effusion Cell Blocks. *Acta cytologica*. 2016;60:232-239.
32. Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG. Monoclonal antibodies. *Molecular pathology*. 2000;53:111-117.
33. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal*. 2005;46:258-268.
34. Pomjanski N, Grote HJ, Doganay P, Schmiemann V, Buckstegge B, Böcking A. Immunocytochemical identification of carcinomas of unknown primary in serous effusions. *Diagnostic cytopathology*. 2005;33:309-315.
35. Shield PW, Papadimos DJ, Walsh MD. GATA3: a promising marker for metastatic breast carcinoma in serous effusion specimens. *Cancer cytopathology*. 2014;122:307-312.

36. Lew M, Pang JC, Jing X, Fields KL, Roh MH. Young investigator challenge: The utility of GATA3 immunohistochemistry in the evaluation of metastatic breast carcinomas in malignant effusions. *Cancer cytopathology*. 2015;123:576-581.
37. Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H, Thomas R, Shackleton M, Forrest NC, Hartley L, Robb L, Grosveld FG, van der Wees J, Lindeman GJ, Visvader JE. Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nature cell biology*. 2007;9:201-209.
38. Krings G, Nystrom M, Mehdi I, Vohra P, Chen YY. Diagnostic utility and sensitivities of GATA3 antibodies in triple-negative breast cancer. *Human pathology*. 2014;45:2225-2232.
39. Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Czapiewski P, Wazny K, Langfort R, Waloszczyk P, Biernat W, Lasota J, Wang Z. GATA3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. *The American journal of surgical pathology*. 2014;38:13-22.
40. Turner BM, Cagle PT, Sainz IM, Fukuoka J, Shen SS, Jagirdar J. Napsin A, a new marker for lung adenocarcinoma, is complementary and more sensitive and specific than thyroid transcription factor 1 in the differential diagnosis of primary pulmonary carcinoma: evaluation of 1674 cases by tissue microarray. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2012;136:163-171.
41. Ng WK, Chow JC, Ng PK. Thyroid transcription factor-1 is highly sensitive and specific in differentiating metastatic pulmonary from extrapulmonary adenocarcinoma in effusion fluid cytology specimens. *Cancer*. 2002;96:43-48.
42. Conner JR, Hornick JL. Metastatic carcinoma of unknown primary: diagnostic approach using immunohistochemistry. *Advances in anatomic pathology*. 2015;22:149-167.
43. Siami K, McCluggage WG, Ordonez NG, Euscher ED, Mapica A, Sneige N, Silva EG, Deavers MT. Thyroid transcription factor-1 expression in endometrial and endocervical adenocarcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 2007;31:1759-1763.
44. Dejmek A, Naucler P, Smedjeback A, Kato H, Maeda M, Yashima K, Maeda J, Hirano T. Napsin A (TA02) is a useful alternative to thyroid transcription factor-1 (TTF-1) for the identification of pulmonary adenocarcinoma cells in pleural effusions. *Diagnostic cytopathology*. 2007;35:493-497.
45. Schauer-Vukasinovic V, Bur D, Kling D, Gruninger F, Giller T. Human napsin A: expression, immunochemical detection, and tissue localization. *FEBS letters*. 1999;462:135-139.
46. Chuman Y, Bergman A, Ueno T, Saito S, Sakaguchi K, Alaiya AA, Franzén B, Bergman T, Arnott D, Auer G, Appella E, Jörnvall H, Linder S. Napsin A, a member of the aspartic protease family, is abundantly expressed in normal lung and kidney tissue and is expressed in lung adenocarcinomas. *FEBS letters*. 1999;462:129-134.
47. Liu L, Cohen C, Siddiqui MT. Thyroid transcription factor 1 and napsin a double staining in lung adenocarcinoma in pleural fluid. *Acta cytologica*. 2012;56:425-430.
48. Kim JH, Kim YS, Choi YD, Lee JS, Park CS. Utility of napsin A and thyroid transcription factor 1 in differentiating metastatic pulmonary from non-pulmonary adenocarcinoma in pleural effusion. *Acta cytologica*. 2011;55:266-270.
49. Porcel JM, Palma R, Bielsa S, Esquerda A, Gatiús S, Matias-Guiu X, Salud A. TTF-1 and napsin A on cell blocks and supernatants of pleural fluids for labeling malignant effusions. *Respirology (Carlton, Vic.)*. 2015;20:831-833.

50. Knoepp SM, Placido J, Fields KL, Thomas D, Roh MH. The application of immunocytochemistry to direct smears in the diagnosis of effusions. *Diagnostic cytopathology*. 2013;41:425-430.
51. Aplin JD, Hey NA. MUC1, endometrium and embryo implantation. *Biochemical Society transactions*. 1995;23:826-831.
52. Yonezawa S, Goto M, Yamada N, Higashi M, Nomoto M. Expression profiles of MUC1, MUC2, and MUC4 mucins in human neoplasms and their relationship with biological behavior. *Proteomics*. 2008;8:3329-3341.
53. Makiguchi Y, Hinoda Y, Imai K. Effect of MUC1 mucin, an anti-adhesion molecule, on tumor cell growth. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1996;87:505-511.
54. Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in molecular medicine*. 2014;20:332-342.
55. Tsutsumida H, Goto M, Kitajima S, Kubota I, Hirotsu Y, Yonezawa S. Combined status of MUC1 mucin and surfactant apoprotein A expression can predict the outcome of patients with small-size lung adenocarcinoma. *Histopathology*. 2004;44:147-155.
56. Ilse P, Biesterfeld S, Pomjanski N, Fink C, Schramm M. SHOX2 DNA methylation is a tumour marker in pleural effusions. *Cancer genomics & proteomics*. 2013;10:217-223.
57. Fink C. *Treffsicherheit der cytologischen Diagnostik an Pleuraergüssen unter Berücksichtigung adjuvanter Methoden*. [Dissertation, Zahnmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf]; 2015.
58. Motherby H, Kube M, Friedrichs N, Nadjari B, Knops K, Donner A, Baschiera B, Dalquen P, Böcking A. Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in diagnostic effusion cytology I. Prevalence of markers in tumour cell positive and negative smears. *Analytical cellular pathology*. 1999;19:7-20.
59. Bratthauer GL. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2010;588:257-270.
60. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1981;29:577-580.
61. Giorno R. A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagnostic immunology*. 1984;2:161-166.
62. Boenisch T. *Handbuch immunchemische Färbemethoden*. DakoCytomation GmbH 2006; 3:85.
63. Bibbo M. *Comprehensive Cytopathology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1991.
64. Hoyer A, Zapf A. Studies for the Evaluation of Diagnostic Tests—Part 28 of a Series on Evaluation of Scientific Publications. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2021;118:555-560.
65. AWMF, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 6.2. AWMF-Registernummer: 043/022OL <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom> (2021)
66. Penz E, Watt KN, Hergott CA, Rahman NM, Psallidas I. Management of malignant pleural effusion: challenges and solutions. *Cancer management and research*. 2017;9:229-241.

67. AWMF, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Ovarialkarzinom, Langversion 5.1. AWMF-Registernummer: 032/035OL <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom> (2022).
68. AWMF, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Magenkarzinom, Langversion 2.0. AWMF-Registernummer: 032/009OL <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/magenkarzinom> (2019).
69. Valerio E, Nunes W, Cardoso J, Santos A, Bovolim G, Domingos T, De Brot L, Saieg M. A 2-year retrospective study on pleural effusions: A cancer centre experience. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology*. 2019;30:607-613.
70. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, Beasley MB, Thunnissen E, Pelosi G, Rekhtman N, Bubendorf L, Mino-Kenudson M, Yoshida A, Geisinger KR, Noguchi M, Chirieac LR, Boltong J, Chung JH, Chou TY, Chen G, Poleri C, Lopez-Rios F, Papotti M, Sholl LM, Roden AC, Travis WD, Hirsch FR, Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, Wistuba I, Moreira 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.
71. Naso JR, Churg A. Claudin-4 shows superior specificity for mesothelioma vs non-small-cell lung carcinoma compared with MOC-31 and Ber-EP4. *Human pathology*. 2020;100:10-14.
72. Wang HL, Kim CJ, Koo J, Zhou W, Choi EK, Arcega R, Chen ZE, Wang H, Zhang L, Lin F. Practical Immunohistochemistry in Neoplastic Pathology of the Gastrointestinal Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2017;141:1155-1180.
73. Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N. p40 (Δ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2012;25:405-415.
74. Jain D, Mathur SR, Guleria R, Iyer VK. Utility and pattern of positivity of p40 in the diagnosis of squamous cell carcinoma of the lung by cytology: the first study on fine needle aspiration smears. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology*. 2014;25:330-335.
75. Affandi KA, Tizen NMS, Mustangin M, Zin R. p40 Immunohistochemistry Is an Excellent Marker in Primary Lung Squamous Cell Carcinoma. *Journal of pathology and translational medicine*. 2018;52:283-289.
76. Leng B, Guo M, Zhao J, Gong Y. Utility and pitfalls of GATA3 immunocytochemistry for diagnosis of metastatic breast carcinoma and urothelial carcinoma on cytology specimens. *Journal of the American Society of Cytopathology*. 2017;6:73-79.
77. Clark BZ, Beriwal S, Dabbs DJ, Bhargava R. Semiquantitative GATA-3 immunoreactivity in breast, bladder, gynecologic tract, and other cytokeratin 7-positive carcinomas. *American journal of clinical pathology*. 2014;142:64-71.
78. Grillo F, Pigozzi S, Ceriolo P, Calamaro P, Fiocca R, Mastracci L. Factors affecting immunoreactivity in long-term storage of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Histochemistry and cell biology*. 2015;144:93-99.

79. Vidarsdottir H, Tran L, Nodin B, Jirström K, Planck M, Jönsson P, Mattsson JSM, Botling J, Micke P, Brunnström H. Immunohistochemical profiles in primary lung cancers and epithelial pulmonary metastases. *Human pathology*. 2019;84:221-230.
80. Kriegsmann K, Zgorzelski C, Muley T, Christopoulos P, von Winterfeld M, Herpel E, Goeppert B, Mechtersheimer G, Sinn P, Stenzinger A, Schirmacher P, Winter H, Eichinger M, Warth A, Kriegsmann M. Immunohistological expression of oestrogen receptor, progesterone receptor, mammaglobin, human epidermal growth factor receptor 2 and GATA-binding protein 3 in non-small-cell lung cancer. *Histopathology*. 2020;77:900-914.
81. Roh MH, Schmidt L, Placido J, Farmen S, Fields KL, Courey AJ, Arenberg DA, Knoepp SM. The application and diagnostic utility of immunocytochemistry on direct smears in the diagnosis of pulmonary adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Diagnostic cytopathology*. 2012;40:949-955.
82. Liu J, Farhood A. Immunostaining for thyroid transcription factor-1 on fine-needle aspiration specimens of lung tumors: a comparison of direct smears and cell block preparations. *Cancer*. 2004;102:109-114.
83. Selves J, Long-Mira E, Mathieu MC, Rochaix P, Ilié M. Immunohistochemistry for Diagnosis of Metastatic Carcinomas of Unknown Primary Site. *Cancers*. 2018;10.
84. Matoso A, Singh K, Jacob R, Greaves WO, Tavares R, Noble L, Resnick MB, Delellis RA, Wang LJ. Comparison of thyroid transcription factor-1 expression by 2 monoclonal antibodies in pulmonary and nonpulmonary primary tumors. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology*. 2010;18:142-149.
85. Compérat E, Zhang F, Perrotin C, Molina R, Magdeleinat P, Marmey B, Régnard JF, Audouin J, Camilleri- Broët S. Variable sensitivity and specificity of TTF-1 antibodies in lung metastatic adenocarcinoma of colorectal origin. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005;18:1371-1376.
86. Fujiwara S, Nawa A, Nakanishi T, Shimoyama Y, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Nakamura S, Kikkawa F, Yatabe Y. Thyroid transcription factor 1 expression in ovarian carcinomas is an independent prognostic factor. *Human pathology*. 2010;41:560-565.
87. Robens J, Goldstein L, Gown AM, Schnitt SJ. Thyroid transcription factor-1 expression in breast carcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 2010;34:1881-1885.
88. Pegolo E, Machin P, Damante G, Di Loreto C. TTF-1 positivity in 2 cases of adenocarcinoma of the gastrointestinal tract. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2014;22:e27-31.
89. Broome DT, Gadre GB, Fayazzadeh E, Bena JF, Nasr C. Pleural effusion as a novel prognostic factor in metastatic thyroid carcinoma. *Endocrine connections*. 2020;9:812-823.
90. Runjan Chetty UoT, Kumarasen Cooper, University of Pennsylvania , Allen M. Gown, Phenopath Laboratories, Seattle. *Leong's Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology*. 3rd ed: Cambridge University Press; October 2016
91. El Hag M, Schmidt L, Roh M, Michael CW. Utility of TTF-1 and Napsin-A in the work-up of malignant effusions. *Diagnostic cytopathology*. 2016;44:299-304.
92. Pereira TC, Share SM, Magalhães AV, Silverman JF. Can we tell the site of origin of metastatic squamous cell carcinoma? An immunohistochemical tissue microarray study of 194 cases. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology* . 2011;19:10-14.

93. Heymann JJ, Hoda RS, Scognamiglio T. Polyclonal napsin A expression: a potential diagnostic pitfall in distinguishing primary from metastatic mucinous tumors in the lung. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2014;138:1067-1071.
94. Wang ST, Chen CL, Liang SH, Yeh SP, Cheng WC. Acute myeloid leukemia with leukemic pleural effusion and high levels of pleural adenosine deaminase: A case report and review of literature. *Open medicine (Warsaw, Poland)*. 2021;16:387-396.
95. Wang XT, Kong FB, Mai W, Li L, Pang LM. MUC1 Immunohistochemical Expression as a Prognostic Factor in Gastric Cancer: Meta-Analysis. *Disease markers*. 2016;2016:9421571.
96. Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications* Churchill Livingstone 2010.
97. Koomen BM, Vreuls W, de Boer M, de Ruiter EJ, Hoelters J, Vink A, Willems SM. False-negative programmed death-ligand 1 immunostaining in ethanol-fixed endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration specimens of non-small-cell lung cancer patients. *Histopathology*. 2021;79:480-490.
98. Ueda J, Iwata T, Ono M, Takahashi M. Comparison of three cytologic preparation methods and immunocytochemistries to distinguish adenocarcinoma cells from reactive mesothelial cells in serous effusion. *Diagnostic cytopathology*. 2006;34:6-10.
99. Ramos-Vara JA, Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *Veterinary pathology*. 2014;51:42-87.
100. Ikeda K, Tate G, Suzuki T, Mitsuya T. Comparison of immunocytochemical sensitivity between formalin-fixed and alcohol-fixed specimens reveals the diagnostic value of alcohol-fixed cytocentrifuged preparations in malignant effusion cytology. *American journal of clinical pathology*. 2011;136:934-942.
101. van Seijen M, Brcic L, Gonzales AN, Sansano I, Bendek M, Brcic I, Lissenberg-Witte B, Korkmaz HI, Geiger T, Kammler R, Stahel R, Thunnissen E. Impact of delayed and prolonged fixation on the evaluation of immunohistochemical staining on lung carcinoma resection specimen. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2019;475:191-199