

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

**Stellenwert der EMA- und Desmin-Immunzytochemie
in der zytologischen Differentialdiagnostik mesothelialer Läsionen**

Dissertation
zur Erlangung eines Doktorgrades der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Dem Fachbereich Medizin vorgelegt von:
Nathalie Laura Maria Frahsek-Wenz
Düsseldorf, 2024

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. Stefan Biesterfeld

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Günter Niegisch

Zusammenfassung

Die zytologische Differenzialdiagnose zwischen malignen Mesotheliomen und reaktiven mesothelialen Veränderungen ist häufig eine besondere Herausforderung, bei der einfach anwendbare adjuvante Methoden wünschenswert wären. Die vorliegende Arbeit untersucht, ob mit Hilfe der beiden immunhistochemischen Marker EMA und Desmin die Diagnostik maligner Mesotheliome sowie deren Abgrenzung zu reaktiven Prozessen und zu Adenokarzinomen zytologisch verbessert werden kann. Dabei wurde erwartet, dass eine EMA-Positivität bzw. eine Desmin-Negativität auf ein malignes Mesotheliom hinweisen könnte. Eine eindeutige Diagnose ist nicht nur für die Therapie und die weitere Prognose der Patienten wichtig, sondern kann auch ausschlaggebend für einen etwaigen Rentenanspruch gegenüber der gesetzlichen Unfallversicherung im Falle einer beruflichen Asbestexposition sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden zytologische Ausstriche (72 Mesotheliome, 24 Adenokarzinome, 23 reaktive Prozesse) aus den Jahren 2006-2013 retrospektiv untersucht. In allen 119 Fällen war durch ein klinisches Follow-Up oder durch eine histologische Probe am Mesotheliomregister in Bochum eine Diagnosebestätigung möglich. Die untersuchten EMA- und Desmin-gefärbten Sedimentausstriche wurden fachärztlich semiquantitativ ausgewertet und die Ausprägung der Färbung als negativ (0), gering positiv (1), mäßig positiv (2) sowie stark positiv (3) bestimmt. Bei den Tumorfällen wurde die Färbereaktion getrennt für maligne und reaktive Zellen erhoben, bei den reaktiven Fällen getrennt für zytologisch auffällig oder unauffällig erscheinende Zellen.

Für den Marker EMA liegt die Sensitivität bei Mesotheliomen zwischen 44,7% und 82,4% und bei Adenokarzinomen zwischen 50,0% und 77,3%, jeweils bei der Abgrenzung zu reaktiven Zellen und in Abhängigkeit der Gruppierung und Gegenüberstellung der drei Auswertungsmodi (0 vs. 1-3, 0-1 vs. 2-3 und 0-2 vs. 3). Die erzielte Spezifität für EMA bei Mesotheliomen liegt zwischen 76,5% und 96,5% sowie für Adenokarzinome zwischen 81,8% und 95,5%, ebenfalls in Abhängigkeit von den Auswertungsmodi. Zur Differenzierung von unterschiedlichen gutartigen Zellen ist EMA mit einer Sensitivität zwischen 13,0% und

21,7% sowie einer Spezifität zwischen 95,7% und 82,6% ungeeignet. Eine Desmin-Negativität konnte bei Mesotheliomen, Adenokarzinomen und auch bei reaktiven Prozessen beobachtet werden und somit ist ein klinischer Nutzen zur Dignitätsbestimmung der verschiedenen Zellarten ausgeschlossen. Die Gesamttreffer sicherheit liegt hier um 50% und ist somit nicht hinreichend aussagekräftig. Eine Unterteilung der Ergebnisse für EMA und Desmin nach Geschlecht, Patientenalter und der Entnahmelokalisation des Ergusses zeigt keine wesentlichen Unterschiede in der Mesotheliomdiagnostik im Vergleich zu den Gesamtergebnissen.

Im Ergebnis kann EMA, nicht aber Desmin als Ergänzung eines immunhistochemischen Markerpanels oder in Kombination mit weiteren adjuvanten Methoden zur Differenzierung von Tumorzellen eines Mesothelioms oder Adenokarzinoms von reaktiven Zellen genutzt werden.

Abstract

The cytological differential diagnosis between malignant mesotheliomas and reactive mesothelial cells is often a particular challenge, for which easily applicable adjuvant methods would be desirable. The present study investigates whether the diagnosis of malignant mesotheliomas and their differentiation from reactive mesothelial cells and adenocarcinomas can be improved cytologically with the aid of the two immunohistochemical markers EMA and desmin. It was expected that EMA positivity or desmin negativity could indicate malignant mesothelioma. An unambiguous diagnosis is not only important for the therapy and further prognosis of the patients, but can also be decisive for a possible pension claim against the statutory accident insurance in case of occupational asbestos exposure.

In the present study, cytological smears (72 mesotheliomas, 24 adenocarcinomas, 23 reactive processes) from the years 2006-2013 were retrospectively examined. In all 119 cases, confirmation of diagnosis was possible by clinical follow-up or by histological specimen at the Mesothelioma Registry in Bochum. The EMA- and desmin-stained sediment smears were evaluated semi-quantitatively and the degree of staining was determined as negative (0), slightly positive (1), moderately positive (2) and strongly positive (3). In the tumour cases, the staining reaction was recorded separately for malignant and reactive cells, and in the reactive mesothelial cells separately for cells that appeared cytologically conspicuous or inconspicuous.

For the marker EMA, the sensitivity in mesotheliomas was between 44.7% and 82.4% and in adenocarcinomas between 50.0% and 77.3%, in each case when differentiating from reactive cells and depending on the grouping and comparison of the three evaluation modes (0 vs. 1-3, 0-1 vs. 2-3 and 0-2 vs. 3). The specificity achieved for EMA in mesotheliomas ranges from 76.5% to 96.5% and for adenocarcinomas from 81.8% to 95.5%, also depending on the evaluation modes. For the differentiation of different benign cells, EMA is unsuitable with a sensitivity between 13.0% and 21.7% and a specificity between 95.7% and 82.6%. Desmin negativity could be observed in mesotheliomas,

adenocarcinomas and also in reactive mesothelial cells and thus a clinical benefit for the dignity determination of the different cell types is excluded. The overall accuracy here is around 50% and is therefore not sufficiently meaningful. A subdivision of the results for EMA and desmin according to gender, patient age and the sampling location of the effusion shows no significant differences in mesothelioma diagnostics compared to the overall results.

In conclusion, EMA, but not desmin, can be used as an adjunct to an immunohistochemical marker panel or in combination with other adjuvant methods to differentiate tumour cells of mesothelioma or adenocarcinoma from reactive mesothelial cells.

Abkürzungsverzeichnis

5-hmC	5-Hydroxymethylcytosine
9p21	Chromosom 9p21
Ag	Silber
Ag-Nor-Analyse	Silber-Färbung <i>Nukleolus-organisierenden Regionen</i> - Analyse
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaft
BAP-1	Breast cancer 1-associated protein
bcl-2	B-cell lymphoma 2
ber EP4	Anti-EpCAM Antikörper Ber-EP4
BG	Berufsgenossenschaft
BKV	Berufskrankheiten-Verordnung
BK-Ziffer	Berufskrankheiten-Ziffer
BMAS	Bundesministerium für Arbeit und Soziales
C.E.C.	Commision of European Communities
CD117	transmembrane Tyrosinkinase CD117
CD34	Cluster of Differentiation 34
CD47	Cluster of Differentiation 47
cdx-2	Homeobox protein CDX-2
CEP9	Chromosome enumeration probe 9
CISH	Chromogene-in-situ-Hybridisierung
CK20	Cytokeratin 20
CK7	Cytokeratin 7
CT	Computertomographie
D2-40	Podoplanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGUV	Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOG-1	Discovered on GIST-1 Marker
EMA	Epitheliales Membran Antigen
EpCAM-Antikörper	Epithelial cell adhesion molecule-Antikörper
EWR	Europäischer Wirtschaftsraum
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GATA-3	GATA Binding Protein 3
GIST	Gastrointestinale Stromatumoren
GLUT-1	Glucosetransporter 1
HB	Hector Battiflora
HBME-1	Hector Battiflora mesothelial-1 Antigen
HEA125	Humanes epithelspezifisches Antigen 125

HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HPV-Infektion	Humane Papillom Virus-Infektion
ILF	Idiopathische Lungenfibrose
IMP3	Insulin-like growth factor-II messenger RNA-bindende Protein-3
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MOC-31	Monoklonaler-Antikörper 31
MPM	Malignes Pleuramesotheliom
MTAP	Methylthioadenosin-Phosphorylase
MW	Mittelwert
NF2	Neurofibromatose Typ 2-auslösendes Gen
NOR	Nukleolus-organisierenden Regionen
NPV	Negativer Prädiktionswert
P16	CDK-Inhibitor 2A
p53	Tumorsuppressor p53
PAK	Polyzyklisches Kohlenwasserstoff
PAP-Färbung	Papanicolaou-Färbung
PAS-Färbung	Periodic Acid Schiff-Färbung
PAX-8	Paired-Box-Protein 8
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
PPV	Positiver Prädiktionswert
RKI	Robert Koch-Institut
S-100	S-100-Protein
SISH	Silber-basierte-in-situ-Hybridisierung
SOP	Standard Operation Procedures
TTF-1	Thyroidale Transkriptionsfaktor 1
UIP	Unspezifische interstitielle Pneumonie
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
UNO	United Nation Organisation
WHO	World Health Organisation
WT-1	Wilms-Tumorsuppressorgen
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
Inhaltsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Mesotheliom - Übersicht und Forschungsgeschichte	1
1.2 Latenzzeit	2
1.3 Inzidenz	2
1.4 Klinische Symptome	3
1.5 Anatomie der serösen Höhlen am Beispiel der Pleura	4
1.6 Mesotheliom-Subtypen:.....	5
1.6.1 Epitheloider Typ (40-60% aller MPM)	5
1.6.2 Sarkomatoider / Mesenchymaler Typ (20-30% aller MPM).....	5
1.6.3 Biphasisch (20-30% aller MPM).....	6
1.6.4 Desmoplastisch	6
1.7 Morphologische Diagnostik und Differenzialdiagnostik des malignen Mesothelioms.....	6
1.7.1 Immunhistochemische Differenzialdiagnostik zwischen epithelialen und mesothelialen Zellen	7
1.7.2 Immunhistochemische Differenzialdiagnostik zwischen gutartigen und bösartigen mesothelialen Zellen	8
1.8 Prognose	9
1.9 Arbeitsmedizinische Aspekte des malignen Mesothelioms.....	10
1.9.1 Asbest.....	10
1.9.2 Durch Asbest hervorgerufene Berufskrankheiten	11
1.9.3 Asbestose und asbestbedingte benigne Pleuraveränderungen (BK Nr. 4103)	12
1.9.4 Lungenkarzinom (BK Nr. 4104)	13
1.9.5 Lungenkrebs durch Asbestfeinstaub und PAK (BK Nr. 4114)	15
1.9.6 Häufigkeit Asbest-assoziiierter Erkrankungen	15
1.10 Ziel der Arbeit.....	17
1.11 Ethikvotum	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Klinische Daten: Ursprüngliches Patientenkollektiv	20
2.1.1 Klinische Fragestellung und Validierung der zytologischen Diagnosen	20
2.1.2 Immunzytochemische Marker.....	21
2.1.2.1 Desmin	21
2.1.2.2 Epitheliales Membran-Antigen (EMA).....	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Konventionelle zytologische Diagnostik	22
2.2.1.1 Papanicolaou-Färbung	23
2.2.1.2 MGG-Färbung	24
2.2.1.3 Beispielbilder der Färbungen	24
2.2.2 Mikroskopische Diagnostik.....	25
2.2.2.1 Gutartige Zellen	25
2.2.2.2 Bösartige Zellen	26
2.3 Immunzytochemie.....	26
2.4 Statistik.....	29
3. Ergebnisse	31
3.1 Allgemeine Patientendaten.....	31
3.2 Allgemeine Ergebnisübersicht	31
3.3 Methodische Voruntersuchungen zu nicht-neoplastischen Mesothelien	32
3.4 Vergleich von Patienten mit mehreren Untersuchungen	34
3.5 Auswertung der EMA- und Desmin-Expression beim malignen Mesotheliom	36
3.5.1 EMA-Expression in malignen Mesotheliomen	36
3.5.2 Desmin-Expression in malignen Mesotheliomen	38
3.6 Auswertung der EMA- und Desmin-Expression beim Adenokarzinom.....	39
3.6.1 EMA-Expression bei Adenokarzinomen.....	40
3.6.2 Desmin-Expression bei Adenokarzinomen	42
3.7 Auswertung der EMA- und Desmin-Expression bei reaktiven Prozessen	43
3.7.1 EMA-Expression bei reaktiven Prozessen	44
3.7.2 Desmin-Expression bei reaktiven Prozessen	45
3.8 Zusammenfassende Bewertung der EMA- und Desmin-gestützten Diagnostik.....	46
3.9 Ergebnisse nach Geschlechtern	48
3.9.1 Vergleich der Marker-Expressionen nach Geschlechtern zwischen malignen Mesotheliomen und reaktiven Mesothelien ...	49
3.9.2 Vergleich der Marker-Expressionen nach Geschlechtern zwischen Adenokarzinomen und reaktiven Mesothelien.....	50

3.9.3 Vergleich der Marker-Expressionen nach Geschlechtern für reaktive Prozesse.....	51
3.10 Auswertung der verschiedenen Altersklassen.....	51
3.10.1 Vergleich der Marker-Expressionen nach Altersklassen zwischen malignen Mesotheliomen und reaktiven Mesothelien.....	53
3.10.2 Vergleich der Marker-Expressionen nach Altersklassen zwischen Adenokarzinomen und reaktiven Mesothelien.....	53
3.10.3 Vergleich der Marker-Expressionen nach Altersklassen für reaktive Prozesse.....	54
3.11 Ergebnisse nach Entnahmeort des Ergusses.....	54
4. Diskussion.....	56
4.1 Stellenwert der Zytologie in der Mesotheliomdiagnostik bei Konzeption der Studie.....	56
4.2 Adjuvante zytologische Diagnostik mesothelialer Zellpopulationen mit DNA-Bildzytometrie, AgNOR-Histochemie und 9p21-FISH-Analyse: Möglichkeiten und Grenzen	59
4.3 Einsatz immunhistochemischer Marker in der Mesotheliomdiagnostik.....	64
4.3.1 Stand der Forschung bei Konzeption unserer Studie.....	64
4.3.2 Kritische Würdigung der eigenen Studienergebnisse	66
4.4 Aktuelles Konzept in der zytologischen Mesotheliomdiagnostik.....	68
4.5 Ausblick: Kommende Ansätze in der Mesotheliomdiagnostik	73
5. Literatur- und Quellenverzeichnis	76
Danksagung	82

1. Einleitung

1.1 Mesotheliom - Übersicht und Forschungsgeschichte

Bei einem malignen Mesotheliom handelt es sich um einen seltenen, diffus wachsenden bösartigen Tumor, der meist in der Pleura auftritt, aber auch im Perikard, dem Peritoneum und der Tunica vaginalis testis vorkommt. Dieser Tumor ist heterogen und geht vom Mesothel und/oder submesothelialen Gewebe aus.

Das Pleuramesotheliom ist die häufigste Form, weniger als 20 % der Mesotheliome haben ihren Ursprung im Peritoneum, und Mesotheliome des Perikards und der Tunica vaginalis testis sind sehr selten. Bei Männern tritt die Erkrankung deutlich häufiger auf als bei Frauen. Meist wird ein Mesotheliom durch eine regelmäßig beruflich veranlasste Asbestexposition hervorgerufen. Weitere Auslöser können in Umweltfaktoren wie nachbarschaftlichen- oder Haushaltskontakten mit Asbest gefunden werden (Tischoff und Tannapfel 2017).

Die erste Beschreibung des Krankheitsbildes wurde 1767 von Joseph Liteaud durchgeführt (Robertson 1924). Klemperer und Rabin führten die Grundarbeiten weiter und erarbeiteten 1931 eine Mesotheliom-Klassifizierung, nach welcher die folgenden Wachstumstypen unterschieden werden: epithelial, fibrös und biphasisch (Klemperer und Rabin 1931). Diese Unterscheidung gilt im Wesentlichen auch noch heute und folgt zudem der von der WHO empfohlenen Klassifizierung nach ICD 10 von 2004 (vgl. Nummer C45.0 bis C45.9); auf die Klassifikation wird näher unter 1.6 eingegangen.

1960 wurde erstmals eine Asbestexposition bei Minenarbeitern in Südafrika als ätiologische Ursache nachgewiesen (Wagner et al. 1960). Sie untersuchten 33 Fälle von malignen Pleuramesotheliomen in direkter Umgebung von Asbestminen und stellten die Fälle mit ausführlicher tabellarischer Darstellung von Erkrankungs- und Verlaufsdetails dar.

1.2 Latenzzeit

Nach Woitowitz bzw. nach Neumann liegt die Latenzzeit zwischen einer Asbestexposition und dem Auftreten eines malignen Mesothelioms bei im Durchschnitt mehr als 30 Jahren (Woitowitz 1987, Neumann et al. 1999). Ausgehend von einer Exposition während des Berufslebens liegt das durchschnittliche Lebensalter der Patienten bei der Erstdiagnose folglich zwischen dem 55. und 75. Lebensjahr (Yates et al. 1991), nicht selten aber im Einzelfall deutlich darüber. Bei einer unterstellten fortdauernden Asbestexposition bis zum Zeitpunkt des allgemeinen Asbestverbotes im Jahr 1993 ist ein Inzidenzmaximum bis ins Jahr 2023 zumindest nicht gänzlich auszuschließen. Allerdings vermeldet das RKI in seinen aktuellen Daten Tumorzahlen bereits einen rückläufigen Trend (RKI 2021), wie er schwach bereits in Abbildung 2 unten zu erahnen ist.

Maligne Mesotheliome gehören zu den meldepflichtigen Berufserkrankungen, auch wenn zunächst kein beruflicher Asbestkontakt erkennbar ist. Im Jahr 2014 waren die am häufigsten von einer Mesotheliomerkrankung betroffenen Geburtsjahrgänge 1935-1943. Die Hochzeit der beruflichen Asbestexposition war zwischen 1960 und 1980. Heute geht das Mesotheliomregister von einer Latenzzeit zwischen 35-55 Jahren aus, da die meisten Betroffenen im Alter zwischen dem 80. und 93. Lebensjahr erkrankten. (Deutsches Mesotheliomregister 2015).

1.3 Inzidenz

Die Inzidenz des malignen Mesothelioms lag 2018 bei 0,4:100.000 für Frauen und bei 1,8:100.000 für Männer in Deutschland. 2018 gab es 1.630 Neuerkrankungen, was einem minimalen Rückgang der Neuerkrankungszahlen entspricht (RKI 2021). Im Vergleich zu früheren Erwartungen geht allerdings die Zahl der Fälle langsamer zurück als prognostiziert.

In Abbildung 1 sind Schätzungen zur Inzidenz der malignen Mesotheliome bis zum Jahr 2025 abgebildet, wie man sie sich 2000 vorstellte (Konietzko et al. 2000). In Wirklichkeit verläuft der Abfall der Neuerkrankungsrate (Inzidenz) offenbar deutlich langsamer. Dies verdeutlicht vorgreifend die umseitige Abbildung 2, die die Daten des

Robert-Koch-Institutes (RKI 2019) für den vorletzten Berichtszeitraum 2015/16 wiedergibt und eine Prognose bis zum Jahr 2020 zeigt. In der neuesten Ausgabe des RKI (RKI 2021) ist diese Darstellung so nicht mehr zu finden, weswegen auf die frühere Ausgabe zurückgegriffen wurde.

Abbildung 1: Zeitliche Abfolge von Asbestexposition und Auftreten maligner Pleuramesotheliome mit historischen Schätzungen der Entwicklung bis über 2025 hinaus (Konietzko und Teschler, 1992); die Inzidenzzahlen haben sich abweichend aber im Bereich von ca. 1200 Fällen pro Jahr stabilisiert; ein starker Abfall wird derzeit nicht erwartet.

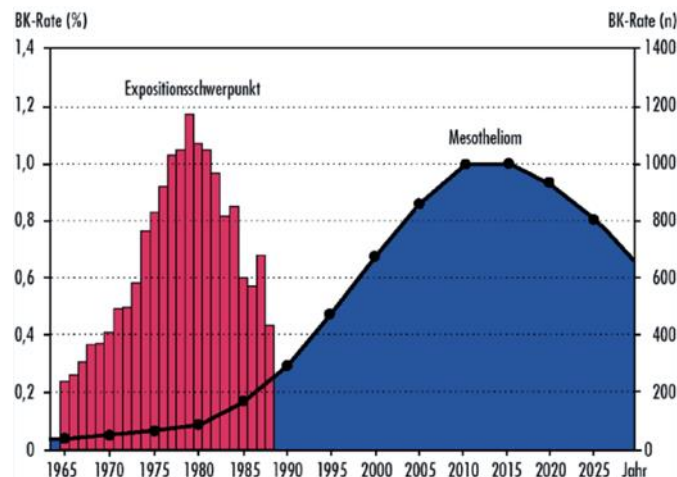
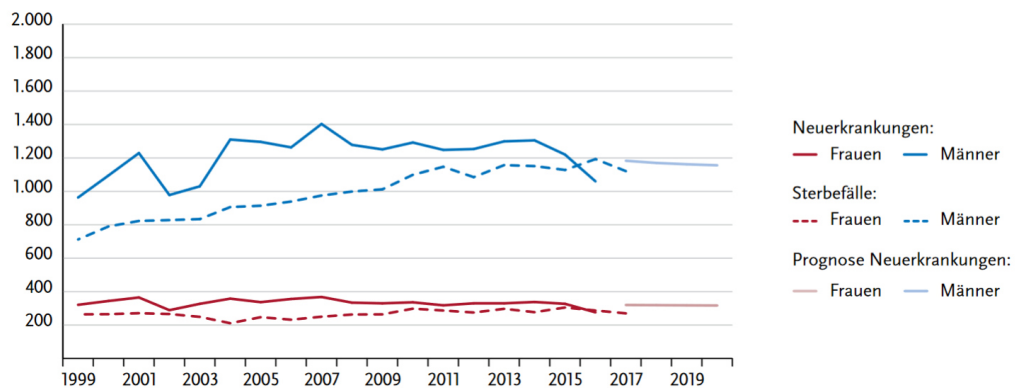


Abbildung 2: Inzidenz und Mortalität des malignen Mesothelioms in Deutschland von 1999 bis 2016 sowie Prognose der Inzidenz bis 2020 (RKI 2019).



1.4 Klinische Symptome

Die ersten klinischen Symptomen bei einem Mesotheliom der Pleurahöhle sind meist unspezifisch, weshalb es bis zu einem halben Jahr dauern kann um aus den ersten Symptomen zu einer endgültigen Diagnose zu gelangen (Chambell und Kindler 2011). In ca. 90% der Fälle kommt es zuerst zu einer Dyspnoe (Scherpereel et al. 2010) sowie

Thoraxschmerzen, die durch Irritationen der Zwischenrippennerven oder durch Infiltration der Brustwand auftreten. Die Brustschmerzen erscheinen meist einseitig und dumpf. Im Frühstadium werden die Atembeschwerden meist durch einen Pleuraerguss verursacht. Die Symptome können im weiteren Krankheitsverlauf sehr unterschiedlich auftreten. Ein Zwerchfellhochstand, Reizhusten, symptomatische Metastasen, paraneoplastische Symptome oder ein Spontanpneumotorax sind eher unüblich (Neumann et al. 2001).

Für Mesotheliome anderer Lokalisation sind ebenfalls in erster Linie unspezifische Symptome zu erwarten, beispielsweise Bauchschmerzen, Obstipation und Aszitesbildung beim abdominellen Tumorbefall oder kardiale Leistungseinschränkungen beim perikardialen Tumorbefall.

1.5 Anatomie der serösen Höhlen am Beispiel der Pleura

Die Pleura ist eine dünne seröse Haut der Brusthöhle und besteht aus einem parietalen und einem viszeralen Blatt. Das innere Blatt, die Pleura visceralis, bedeckt die Lunge. Die Pleura parietalis grenzt die Thoraxwand, das Zwerchfell sowie das Mediastinum ab und bildet das äußere Blatt. Beide Pleurablätter bestehen aus der zweischichtigen Tunica serosa (Lamina epithelialis und der Lamina propria) und der Tela subserosa. Die Epithelzellen der Lamina Epithelialis produzieren die zähe Serosaflüssigkeit für die Pleurahöhle. Die Blutgefäße und Lymphgefäße werden in der Lamina propria geführt. Am Lungenhilus gehen beide Lungenblätter ineinander über, wodurch ein Spalt entsteht. In diesem Pleuraspalt befindet sich eine kleine Menge (ca. 5ml) Flüssigkeit, die das reibungsfreie Gleiten der beiden Pleurablätter bei der Expiration und Inspiration ermöglicht. Unter physiologischen Bedingungen stehen die Filtration und die Resorption der Pleuraflüssigkeit im Gleichgewicht. Durch eine Reihe von pathologischen Ursachen kann es zu Pleuraergüssen kommen, der zur Verbesserung der Atmung abpunktiert werden sollte (Aumüller 2007,2010). Pleuraergüsse können durch ein Vielzahl an Erkrankungen entstehen. Die Hauptursachen für einen Erguss im Plauraspalt sind eine Herzinsuffizienz, eine Pneumonie, ein Malignom oder eine Lungenembolie. Auch die Einnahme von einigen Medikamenten wie z.B. Nitrofurantoin

und Betablocker kann zur Entstehung eines Pleuraergusses führen (Jany und Welte 2019).

1.6 Mesotheliom-Subtypen:

Die Weltgesundheitsorganisation der UNO (WHO) differenziert vier, im Folgenden mit ihren ICD-M-Codes angegebene Subtypen (WHO, 2015), die zur Zeit der Erstellung dieser Studie definiert waren. Der desmoplastische Typ wird heute aber als Sonderform des sarkomatoiden Mesothelioms geführt (WHO 2021):

- Epitheloides Mesotheliom (*epithelioid mesothelioma*) 9052/3
- Sarkomatoides Mesotheliom (*sarcomatoid mesothelioma*) 9051/3
- Biphasisches Mesotheliom (*biphasic mesothelioma*) 9053/3
- Desmoplastisches Mesotheliom (*desmoplastic mesothelioma*) 9051/3

Die Möglichkeit des Mesothels, sich im Falle der Entartung sowohl in eine epitheliale Richtung, als auch in eine mesotheliale Richtung zu differenzieren, ergibt sich aus der Herkunft der Mesothelien aus dem Mesoderm.

1.6.1 Epitheloider Typ (40-60% aller MPM)

Dieser Typ zeigt eine epithelähnliche Differenzierung (Konietzko, Teschler 1992), wächst häufig tubulopapillär und ist durch verästelnde Azini charakterisiert, die von kubischen Zellen begrenzt werden. Die angrenzenden kubischen oder zylindrischen Zellen sind oft mit Muzin gefüllt. Da der epitheloide Typ und Adenokarzinome in ihren morphologischen Eigenschaften sehr ähnlich sind, braucht man häufig verschiedene immunhistochemische Marker zur Abgrenzung zwischen ihnen.

1.6.2 Sarkomatoider / Mesenchymaler Typ (20-30% aller MPM)

Der mesenchymale Typ zeichnet sich durch variable Mengen an Bindegewebe aus und ähnelt Fibrosarkomen oder Myxomen. Er zeichnet sich durch zahlreiche Mitosen, spindelförmigen Zellen und einer starken Polymorphie aus (Schütte, Blankenburg 2007). Beim sarkomatoiden Mesotheliom findet man Fernmetastasen, aber kaum Pleuraergüsse oder nur sehr kleine Ergüsse.

1.6.3 Biphasisch (20-30% aller MPM)

Der gemischte Typ enthält die histopathologischen Charakteristika sowohl des epitheloiden- als auch des mesenchymalen Typs (Konietzko, Teschler 1992).

1.6.4 Desmoplastisch

Der desmoplastische Typ ist ein sehr aggressiver Subtyp des biphasischen Mesothelioms (Junker und Krismann 2008).

1.7 Morphologische Diagnostik und Differenzialdiagnostik des malignen Mesothelioms

Zur morphologischen Diagnosestellung eines malignen Mesothelioms kommen sowohl histologisch aufgearbeitete Gewebeproben als auch zytologisch aufgearbeitete Proben von Ergussflüssigkeiten in Betracht.

Histologische Proben werden beim häufigen Pleuramesotheliom oft gezielt aus Bereichen von Pleuraverdickungen entnommen, vorzugsweise im Rahmen einer Thorakoskopie. Selten nur sind sie Zufallsbefund bei anderweitigen Lungeneingriffen. Bei peritonealen Mesotheliomen ist andererseits nicht ganz selten, dass im Rahmen z.B. einer Appendektomie oder einer Sigmaresektion bei Divertikulitis eine peritoneale Verdickung gesehen wird und mitbiopsiert wird, so dass dort Zufallsbefunde nicht so selten sind. Histologisch wären dann in den Schnittpräparaten Tumorzellinfiltrate zu sehen, die als Mesotheliome in Abgrenzung zu anderen Tumorarten erkannt werden müssen und den einzelnen Subtypen zugeordnet werden müssen.

Zytologische Proben wiederum sind häufig in der Mesotheliomdiagnostik, da Ergüsse ein wichtiges Leitsymptom der Mesotheliome sind und insbesondere auch zur Verbesserung der klinischen Symptomatik punktiert werden (müssen). Sie können nämlich sowohl respiratorisch (bei Pleuraerguss) als auch kardial (bei Perikarderguss) durchaus relevant sein. Für die zytologische Diagnose eines malignen Mesothelioms gibt es durch gut definierte zytologische Kriterien, die in Monographien und Lehrbüchern bereits abgehandelt wurden (Koss und Melamed 2006, Shidham und Atkinson 2007, Cibas und Ducatman 2020, Dey 2022). Sie bleiben allerdings in gewisser Weise relativer

Natur und sind nicht als so „hart“ anzusehen wie diejenigen in der Karzinomdiagnostik. Ein typisches zytologisches Bild bei epitheloiden Mesotheliom sind flache mosaikartige Zellanlagerungen. Die Zellen liegen meist eng beieinander oder sind durch einen schmalen Spalt getrennt. Häufig kann man maulbeerartige, flache und/oder dreidimensionale kugelige Tumorzellverbände sehen (Pokieser 2001). Bei diesen Tumorzellen sind die Kerne meist in der Peripherie gelagert. Zytologisch können auch wenige Einzelzellen erkennbar sein, aber auch reichlich Einzelzellen oder Verbände. Oft sind auch viele Leukozyten und/oder reaktive Mesothelzellen zu finden.

1.7.1 Immunhistochemische Differenzialdiagnostik zwischen epithelialen und mesothelialen Zellen

Maligne Mesotheliome lassen sich oft nicht ohne Anwendung immunhistochemischer (Histologie) bzw. immunzytochemischer Verfahren (Zytologie) in Abgrenzung gegenüber Karzinomen diagnostizieren. Hierzu wurden viele Marker charakterisiert und zu Markerpaneln zusammengefasst (zur Übersicht siehe Ordóñez 2013). Wichtige positive Marker bei der Zuordnung einer Läsion zu einer mesothelialen Herkunft sind dabei Calretinin, WT-1, D2-40 (Podoplanin) bzw. mit geringerer Sensitivität der historisch erste Mesothelmarker, das nach Hector Battifora (Initialen „HB“), einem der wichtigsten Pioniere in der Immunhistochemie, benannte HBME-1. Adenokarzinome hingegen, die die wichtigste Differenzialdiagnose gegenüber einem epitheloiden Mesotheliom darstellen, würden positiv mit EpCAM-Antikörpern (MOC-31, HEA125, berEP4 etc.) sein und würden darüber hinaus in der Regel auch organotypische Marker je nach Tumorherkunft (z.B. GATA-3, TTF-1, cdx-2, PAX-8, Androgen-, Östrogen- und Progesteronrezeptor) oder bestimmte differenzielle Zytokeratine exprimieren. In der Abgrenzung von Mesotheliomen gegenüber Sarkomen kämen ebenfalls die Mesothel-typischen Marker zum Einsatz, ferner als „Gegenprobe“ mesenchymale Marker wie S100, CD34, Desmin oder Caldesmon.

1.7.2 Immunhistochemische Differenzialdiagnostik zwischen gutartigen und bösartigen mesothelialen Zellen

Für die Mesotheliomdiagnostik ist, wenn der mesotheliale Charakter der in Frage stehenden Zellpopulation immunhistochemisch oder immunzytochemisch gesichert ist, entscheidend, zwischen gutartig-reaktiven und neoplastischen mesothelialen Zellpopulationen zu unterscheiden. Diese Unterscheidung zu treffen, ist weder histologisch, noch zytologisch im Einzelfall leicht, gerade an kleinen Biopsien oder an zytologischen Präparationen mit nicht vollkommen überzeugenden Zellatypien. Mesothelien können nämlich bei oder nach Entzündungen bzw. Einblutungen durchaus polymorphe und auffällige Zellbilder zeigen, ohne dass sie neoplastisch sind (Shidham und Atkinson 2007). Relativ früh wurden Versuche übernommen, die Frage nach Malignität mit Sonderfärbungen zu lösen, die zum Teil heute, von der PAS-Färbung abgesehen, nicht mehr gebräuchlich sind. Als dann in den 70er Jahren die Immunhistochemie entwickelt wurde und in den späten 80er Jahre Routinemethode wurde, suchte man nach Markern, die bei mesothelialen Läsionen zwischen Gut und Böse zu unterscheiden helfen. Aus der Zeit, als die vorliegende Studie konzipiert wurde, wurde der seinerzeitige Stand der Überlegungen übersichtlich bei Henderson et al. 2013 zusammengefasst (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die Expressionsraten immunhistochemischer Marker in gutartig-reaktiven mesothelialen Läsionen und malignen Mesotheliomen; nach Henderson et al. 2013

Marker	Methode	Sensitivität	Spezifität
EMA	Zytologie / Histologie	0% - > 50%	75% - 100%
GLUT-1	Zytologie / Histologie	0% - 20%	40% - 100%
IMP3	Histologie	0% - 6%	36% - 73%
XIAP	Zytologie	~ 10%	~ 80%
bcl-2	Histologie	0%	3% - 11%
p53	Histologie	0%	41% - 61%
Desmin	Zytologie / Histologie	ca. 85%	8% - 10%

Die Übersicht zeigt, dass die meisten der dargestellten Marker in den malignen Mesotheliomen eine höhere Expressionsrate aufweisen als in reaktiven mesothelialen Läsionen, abgesehen von Desmin, das eine umgekehrte Expressionshäufigkeit zeigte.

1.8 Prognose

Bei malignen Mesotheliomen ist die Prognose trotz neuer Therapieverfahren sehr ungünstig.

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Männern 8 % und bei Frauen 13 %. Für Frauen und Männer liegt die relative 10-Jahres-Überlebensrate nur noch bei 5%. Die Zahlen der jährlichen Sterberate und der Neuerkrankungen liegen auch aktuell nahe beieinander (RKI 2021).

Die Therapieform/-en sind abhängig vom Stadium des Mesothelioms, dem Allgemeinzustand des Patienten, dem histologischen Typ sowie klinisch-serologischen Konstellationen. Die Therapieformen basieren dabei auf verschiedenen Ansätzen und schließen Chemotherapie, Strahlentherapie und operative Verfahren ein. Der Stellenwert der einzelnen Therapieverfahren ist schwierig zu beurteilen, da nur wenig aussagekräftige Studien existieren und sich die Technik der Therapieverfahren in den letzten Jahren wesentlich weiterentwickelt hat.

Die Strahlentherapie verfolgt meist einen palliativen Ansatz zur Schmerzlinderung und versucht die Komplikationen zu minimieren. Mesotheliomzellen zeigen grundsätzlich eine Empfindlichkeit bei Bestrahlung und es wird eine Strahlendosis von mindestens 40 Gy empfohlen. Die Strahlentherapie zeigt besonders bei Stichkanalmetastasen eine positive Wirkung.

Für die operative Behandlung stehen folgende Verfahren zur Verfügung: Pleurodese, Pleurektomie, Dekortikation und extrapleurale Pneumonektomie. Bei der Pleurodese wird durch das Einbringen von Substanzen wie Talkum oder Doxycyclin in die Pleurahöhle eine Entzündungsreaktion verursacht. Diese Entzündung führt zur Verklebung der Pleura visceralis und Pleura parietalis. Die Resektion der parietalen und viszeralen Pleura sowie des Perikards und das Diaphragma kann eine Ausbreitung des Mesothelioms bis in die Lunge zur Folge haben und wird als Pleurektomie bezeichnet. Bei der extrapleuralen Pneumektomie werden bei einer En-Bloc-Resektion die parietale und viszerale Pleura, der Lungenflügel, das Perikard und das Diaphragma der entsprechenden Seite entfernt.

Die Chemotherapie zeigt meist maximale Ansprechraten von 20% der verschiedenen Substanzen. Die entsprechenden Studien konnten keine verwertbare Aussage zur Überlebenswahrscheinlichkeit liefern (Schütte, Blankenburg 2007).

1.9 Arbeitsmedizinische Aspekte des malignen Mesothelioms

Da die allermeisten malignen Mesotheliome auf einen wiederholten Kontakt der Patienten mit Asbest zurückgehen, soll im Folgenden auf diese Tumorgenese kurz eingegangen werden.

1.9.1 Asbest

Asbest, im Folgenden zusammengefasst nach Galateau-Sallé et al. (2006), ist kein Stoff, sondern ein Oberbegriff für eine Stoffgruppe von SiO_4 -Verbindungen, die natürlich in der Erdkruste vorkommen. Sie werden in mehrere Untergruppen eingeteilt, insbesondere in Serpentin-Asbeste (Chrysotil - weißer Asbest) und Amphibol-Asbeste (Chrocidolit - blauer Asbest und Amosit - brauner Asbest). Aufgrund ihrer Hitze-Resistenz wurden Asbestmodifikationen insbesondere im Schiffbau, aber auch im Fahrzeug- und Aufzugbau sowie in der Bauindustrie eingesetzt - im Grunde überall dort, wo eine gute und Material-beständige Isolation gegenüber Hitze vonnöten war.

Chrysotil-Fasern kamen häufig in der Textilbranche zum Einsatz, da sie länger, flexibler und spiralenförmig sind. Durch die Wasserlöslichkeit der Serpentin-Asbeste sind sie leichter von der Lunge zu eliminieren als Amphibol-Asbeste.

Amphibol-Asbeste eignen sich gut für thermische oder elektrische Isolierungen, da sie kurz, fest und gerade sind.

Im Jahr 1993 wurde die Herstellung und Verwendung von asbesthaltigen Stoffen wegen seiner gesundheitsgefährdenden Eigenschaften in Deutschland verboten. Gleiches gilt auch für praktisch alle Staaten des Europäischen Wirtschaftsraumes (EWR), für einige Länder im Mittleren Osten, für Australien und Neuseeland und einige weitere Staaten. In vielen anderen Ländern, darunter auch bevölkerungsreichen Ländern wie China, Indien, Russland und Brasilien, ist Asbest aber weiter in Verwendung. Auch in Deutschland sind Asbestkontakte, beispielsweise im Rahmen von Sanierungsarbeiten und Entsorgungen von Abfällen, aber bis heute naturgemäß nicht auszuschließen.

1.9.2 Durch Asbest hervorgerufene Berufskrankheiten

Es gelten gemäß der Berufskrankheitenverordnung (BKV, Version 2009) folgende Erkrankungen in Zusammenhang mit Asbest als Berufskrankheiten (Bundesregierung 1997 / 2009):

- Asbestose bzw. durch Asbeststaub verursachte Erkrankungen der Pleura (BK-Nr. 4103),
- Lungenkrebs, Kehlkopfkrebs bzw. Eierstockkrebs (BK-Nr. 4104), wobei mit "Eierstockkrebs" ausschließlich primäre Ovarialkarzinome gemeint sind, nicht hingegen anderweitige Malignome der Ovarien oder in den Ovarien,
- malignes Mesotheliom des Rippenfells, Bauchfells oder Herzbeutels (BK-Nr. 4105) sowie
- Lungenkrebs nach Einwirkung von Asbest und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) (BK-Nr. 4114) (Falkensteiner Empfehlung 2011).

Mesotheliome des Rippenfells, des Bauchfells oder des Perikards, die durch Asbest hervorgerufen worden sind, werden somit nach Ziffer 4105 der Berufskrankheiten-Verordnung als Berufserkrankung in Deutschland anerkannt (Bundesregierung 1997 / 2009). Für das Rippenfell und das Bauchfell gilt dieses seit 1977, für das Perikard seit 1992. Auf dem Boden der Bestimmungen der BKV ist die gesetzliche Unfallversicherung bei Eintritt einer Berufserkrankung gemäß §1 SGB VII im Wortlaut verpflichtet, „die Gesundheit und Leistungsfähigkeit der Versicherten (...) wiederherzustellen und sie bzw. ihre Hinterbliebenen durch Geldleistungen zu entschädigen“.

Bei Verdachtsfällen eines malignen Mesothelioms ist ein Verdacht auf eine Berufskrankheit nach BK-Nr. 4105 bereits à priori gegeben. Eine Anerkennung wurde früher oft erst nach dem Tod per Obduktion vorgenommen, was heute nur noch in Zweifelsfällen immer noch der Fall ist. Heute wird eine Sicherung des Mesothelioms zu Lebzeiten angestrebt und in der Regel auch erreicht. Dabei werden die Fälle nach dem fünfstufigen Wertungsschema des europäischen Mesotheliom-Panels (Commission of European Communities = C.E.C) kategorisiert, das auch Eingang in die bis 2025 gültige deutsche S2k-Leitlinie "Diagnostik und Begutachtung asbestbedingter Berufskrankheiten" gefunden hat (AWMF 2020):

- Mesotheliom A: Sicheres Mesotheliom
- Mesotheliom B: Wahrscheinliches Mesotheliom
- Mesotheliom C: Mögliches Mesotheliom
- Mesotheliom D: Wahrscheinlich kein Mesotheliom
- Mesotheliom E: Sicher kein Mesotheliom

Nur bei der Diagnose eines Mesothelioms A oder B nach dem europäischen Mesotheliom-Panel ist bei entsprechenden beruflichen Voraussetzungen die Berufskrankheit der Ziffer 4105 (malignes Mesotheliom) im Vollbeweis gesichert (Falkensteiner Empfehlung 2011).

1.9.3 Asbestose und asbestbedingte benigne Pleuraveränderungen (BK Nr. 4103)

Eine Asbestose ist eine durch Asbestfaserstaub verursachte Fibrose der Lunge. Sie ist nicht granulomatös und häufig azinär betont, begleitet von einer gewöhnlichen interstitiellen Pneumonie (UIP, ILF) sowie chronischer Entzündung im bevorzugt unteren und mittleren Lungenabschnitt. Die Erkrankung wird meist erst Jahre oder Jahrzehnte nach dem Asbestkontakt manifest. Typische Symptome sind Kurzatmigkeit, Reizhusten und Brustschmerzen. Im späteren Verlauf treten häufig eine chronische Bronchitis und in manchen Fällen eine emphysematöse Lungenveränderung hinzu (AWMF-Register Nr. 002/038).

Zu den asbestbedingten benignen Pleuraveränderungen gehören Pleuraplaques, Verdickungen der Pleura an der seitlichen Brustwand im Rahmen einer diffusen Pleurafibrose und rezidivierende Ergüsse mit Pleurahyalinose.

An dieser Stelle soll nur auf die Problematik der Ergüsse eingegangen werden ("Asbestpleuritis"). Sie werden auch als benigner asbestinduzierter Pleuraerguss bezeichnet. Meist liegt die Latenz bei ca. 30 Jahren mit relativ großen Schwankungen. Die Pleuritis ist dabei meist ein Zufallsbefund, kann aber auch klinisch symptomatisch sein. Die Mehrzahl der betroffenen Patienten verspürt keine oder nur eine geringe Beeinträchtigung durch den Pleuraerguss. Seltener leiden Patienten an einseitigen Pleuraschmerzen, Husten und Dyspnoe. Der Pleuraerguss hat häufig eine Verklebung der viszeralen und der parietalen Pleura zur Folge, die zur Pleurafibrose führen kann.

Manchmal fehlen jedoch auch Pleuraplaques oder steife Verdichtungen im Lungenparenchym, die bei Asbestosen üblich sind. Bei dieser Erkrankung treten ipsi- und kontralaterale Rezidive auf, wobei die kontralateralen Rezidive wahrscheinlicher sind. Bei Rezidiven liegt der Verdacht eines Mesothelioms nahe. Oft kommt es aber auch zu einer Spontanremission innerhalb von 3-4 Monaten. Der Pleuraerguss ist meist Eosinophilen-reich und gemischt lympho-/granulozytär. Ob die Asbestpleuritis als Risikofaktor für eine Mesotheliomentstehung gilt, konnte wissenschaftlich noch nicht geklärt werden. Eine regelmäßige Kontrolle des Pleuraergusses wird angeraten, da eine Mesotheliomentstehung auch Jahre später möglich ist (Konietzko et al. 1994; Köhler et al. 2014; Kroegel und Costabel, 2014).

1.9.4 Lungenkarzinom (BK Nr. 4104)

Als wesentlichster Risikofaktor für die Entstehung eines Lungenkarzinoms gilt das inhalative Rauchen. Weitere Risikofaktoren sind die Inhalation von radioaktivem Radon und viele andere. Asbesteinwirkungen als Ursache der Tumorentstehung sind bezogen auf die hohe Zahl von Fällen (Inzidenz 2016: 56.460 Fälle, RKI 2019) sehr selten und bewegen sich bei unter 2% der Fälle (siehe unten). Lungenkarzinome gelten als die häufigste Krebs-Todesursache bei Männern (23,5% aller Krebstodesfälle) und die zweithäufigste Krebs-Todesursache bei Frauen (15,7%) in Deutschland, sind also auch epidemiologisch und gesundheitspolitisch von großer Bedeutung.

Die Erkrankungswahrscheinlichkeit an einem Lungenkarzinom hängt im Wesentlichen vom Lebensalter, der individuellen Disposition, sowie der beruflichen und nicht beruflichen Aufnahme von krebserzeugenden Noxen ab. Eingeatmete Asbestfasern wirken karzinogen auf die Epithelzellen der mittleren und unteren Atemwege. Bestimmte kritische Asbestfasern können sowohl tumorinitiierend als auch tumorpromovierend sein. Durch die kanzerogenen Eigenschaften der Asbestfasern kann es zu einer Stimulierung des Zellwachstums (Transformation), zu Mitosestörungen, die aneuploide oder polyploide Chromosomen zur Folge hat, und durch Brüche zu einer Veränderung der Chromosomenstruktur kommen.

Bei der Entstehung eines Lungenkarzinoms ist Asbest im Gegensatz zu der Ausbildung eines Mesothelioms lediglich ein Ko-Kanzerogen. Das Hauptkanzerogen ist

das Kondensat aus der Inhalation des Zigarettenrauches, welches sich mit anderen Kanzerogenen wie Asbest multipliziert. Ausschlaggebend bei der Entstehung eines Lungenkarzinoms ist der Fasertyp (Länge, Durchmesser und Form) der Asbestfaser, die Faserkonzentration und deren chemischen Eigenschaften. Auch das individuelle broncho-pulmonale Reinigungsvermögen, d.h. die Selbstreinigung der Lunge und der Atemwege, spielt neben weiteren dispositionellen Faktoren eine wichtige Rolle.

Der asbestverursachte Lungenkrebs unterscheidet sich klinisch und diagnostisch nicht von anderen Lungenkrebsformen. Die ersten Symptome, die oft schon einen fortgeschrittenen Verlauf anzeigen, sind meist uncharakteristisch wie therapieresistenter Reizhusten, blutiger Auswurf, Atelektasen und bronchopneumonische Prozesse mit verzögerter Heilungstendenz. Bevorzugt sind die Unterfelder der Lunge betroffen, wobei der Primärtumor sowohl in der Lungenwurzel als auch in der Lungenperipherie sitzen kann. Differentialdiagnostisch müssen Lungenmetastasen anderer Primärtumore ausgeschlossen werden. Die Latenzzeit zwischen Exposition und Auftreten der Erkrankung beträgt meist Jahrzehnte.

Erkrankungen der Pleura, die durch Asbestfaserstaub verursacht werden, wie z. B. die Lungenasbestose oder die Minimalasbestose, gelten als Marker einer Asbestbelastung und sprechen gleichzeitig für ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko. In manchen Asbestindustrien wurde eine Verdopplung (25 Faserjahre) der Sterberate an Lungenkrebs im Vergleich zur Normalbevölkerung nachgewiesen (Konietzko et al. 1994).

1997 kam es zu einer Änderung der Berufskrankheiten-Liste, in der beschlossen wurde, auch Kehlkopfkarzinome als Berufserkrankung anzuerkennen, wenn es zu einem beruflichen Kontakt mit Asbestfaserstaub gekommen ist. Neben dem Kontakt mit Asbeststaub sind auch andere Noxen im Arbeitsleben ätiologisch für einen Kehlkopfkrebs verantwortlich wie z. B. ionisierende Strahlen oder Arsen. Die absolut führende Hauptursache für Kehlkopfkrebs sind aber chronischer Alkoholabusus und / oder chronischer Tabakkonsum sowie ggfls. auch eine HPV-Infektion.

1.9.5 Lungenkrebs durch Asbestfeinstaub und PAK (BK Nr. 4114)

2009 wurde unter der Berufskrankheiten-Ziffer 4114 auch der durch Asbestfeinstaub und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) verursachte Lungenkrebs seitens des Bundesministeriums für Arbeit und Soziales (BMAS) als Berufskrankheit definiert und anerkannt. Demnach muss die Asbestfeinstaubbelastung arbeitsbedingt sein und kann gleichzeitig mit einer PAK-Belastung stattfinden oder nacheinander, um als Berufskrankheit anerkannt zu werden. Durch das Zusammenwirken der kanzerogenen Arbeitsstoffe Asbest und PAK besteht zumindest eine additive Erhöhung des Lungenkrebsrisikos. Typische Berufe für diese Belastungen sind Arbeiter bei Abbrucharbeiten und/oder Isolierarbeiten, in Gießereien, Stahlwerksarbeiter, Schornsteinfeger und Kokereiarbeiter. Nach Ansicht des BMAS besteht eine hinreichende Sicherheit bzgl. des Wirk-Zusammenhangs zwischen einer Asbest-/ PAK-Exposition sowie dem Entstehen von Lungenkrebs. Hierbei greift das BMAS auf die Ergebnisse mehrerer Studien zurück, welche auch einen (tier-)experimentellen Nachweis liefern. Durch Asbest und PAK werden reaktive Sauerstoffspezies gebildet, die zu DNA-Schäden in Bronchialepithelzellen und Makrophagen in den mittleren und tieferen Atemwegen führen. Lungenkrebs in Zusammenhang mit Asbest oder PAK ähnelt in Klinik und Diagnose anderen Lungenkrebsarten. Differentialdiagnostisch müssen Metastasen anderer Karzinome abgegrenzt werden (Bundesministerium für Arbeit und Soziales, 2009).

1.9.6 Häufigkeit Asbest-assoziiierter Erkrankungen

Asbest-bedingte oder Asbest-assoziierte Erkrankungen sind insgesamt selten, aber arbeitsmedizinisch und auch versorgungsrechtlich von erheblicher Relevanz. In Tabelle 2 sind die wichtigsten Kenndaten zu der Häufigkeit der Erkrankungen wiedergegeben, bezogen auf die jeweils letztverfügbaren vollständigen Daten der Jahre 2019 und 2020 (anerkannte BG-Fälle) bzw. 2017 und 2018 (Tumorfälle). Die BG-Daten des Jahres 2021 wurden nicht berücksichtigt, da in ihnen noch Fälle enthalten sein dürften, die noch nicht abgeschlossen sind.

Tabelle 2: Häufigkeiten BG-anerkannter Fälle zu den BK-Ziffern 4103, 4104, 4105 und 4114 für 2019 und 2020 im Vergleich zu BG-angezeigten Verdachtsfällen (DGUV 2022), bei den Tumorerkrankungen im Kontext der allgemeinen Organtumorinzidenz, dort gemittelt für die letztverfügbaren Neuerkrankungszahlen des RKI für 2017 und 2018 (RKI 2021)

BK-Ziffer	Asbest-bedingte Erkrankung	BG-anerkannte Fälle (in Bezug zu BG-angezeigten Verdachtsfällen)		Tumordaten RKI
		2019	2020	Mittelwert Neuerkrankungen 2017 und 2018
4103	Asbestose / Pleuraerkrankung	1471 von 3955	1649 von 3478	---
4104	Lungen-, Kehlkopf-, Ovarialkarzinom	599 von 5080	629 von 5032	57915 (Lunge) 3350 (Kehlkopf) 7380 (Ovar)
4105	Mesotheliom	827 von 1270	824 von 1221	1615
4114	Lungenkrebs (PAK)	23 von 163	40 von 242	57915

Zusammenfassend zeigt Tabelle 2 als Abschätzung, dass aktuell in Deutschland etwa zwei Drittel der BG-angezeigten Verdachtsfälle von malignen Mesotheliomen als Berufskrankheit anerkannt werden (gemittelt über 2019 und 2020: 66,3%), wobei nicht berücksichtigt ist, wie viele maligne Mesotheliome abschließend bei den Verdachtsfällen wirklich gesichert worden sind und wie viele Verdachtsdiagnosen sich als Pleura- karzinosen oder gutartige Läsionen herausgestellt haben. Innerhalb der Gruppe der definitiven malignen Mesotheliome dürfte die Anerkennungsrate dann wesentlich höher ausfallen. Außerdem lässt sich ableiten, dass andererseits nur gut 50% der malignen Mesotheliome BG-anerkannt sind, bezogen auf den Vergleich mit den Neuerkrankungsraten (gemittelt über 2019 und 2020: 51,1%). Hier wäre zu fragen, wie konsequent der Zusammenhang Asbest - Mesotheliom wirklich in der Anzeige eines Verdachtsfalles bei einer der BGs oder ihrem Dachverband mündet. Der Anteil der Lungen-, Kehlkopf- und Ovarialkarzinome, die auf eine Berufskrankheit durch Asbest zurückgehen, ist hingegen verschwindend gering und liegt über 2019 und 2020 gemittelt bei < 0,9%.

Die berechneten Zahlen setzen dabei in der Abschätzung voraus, dass die Neuerkrankungsraten in den Jahren 2019 und 2020 denen in 2017 und 2018 gleich gewesen sind, was sicher in etwa, aber nicht exakt stimmt.

1.10

Ziel der Arbeit

Die Diagnose eines malignen Mesothelioms war lange im klinischen Alltag an einen histologischen Nachweis gebunden, wohingegen zytologischen Diagnosen bzw. Verdachtsdiagnosen skeptisch begegnet wurde. Inzwischen hat sich, im Besonderen bedingt durch die von der Gruppe um Böcking in der Cytopathologie in Düsseldorf zwischen 2000 und 2009 entwickelten bzw. verfeinerten adjuvanten Methoden in der Zytologie, auch eine zytologische Option zur Mesotheliomdiagnostik ohne Histologie ergeben. Diese basiert auf der als Stufendiagnostik gedachten Anwendung von DNA-Bildzytometrie, AgNOR-Analyse und einer FISH-Untersuchung auf eine homozygote Deletion am Chromosomenabschnitt 9p21 („9p21-FISH“) und ist inzwischen auch so weit anerkannt, dass sie in der neuen S2k-Leitlinie "Diagnostik und Begutachtung asbestbedingter Berufskrankheiten" explizit benannt ist, aber gleichwohl dort immer noch als "Notbehelf" gesehen wird. Dazu wird bei der Besprechung von Anforderungen an die morphologische Diagnostik wie folgt (unter Löschung der Quellenverweise) ausgeführt (AWMF 2020):

"(...) Anforderung an die histologische Diagnose:

- *Sicherung der Diagnose malignes Mesotheliom (Mesotheliom A oder B) mittels Histologie und Immunhistochemie an ausreichend großen Gewebeproben (Vollbeweis).*
- *Wenn ausschließlich zytologische Proben zur Verfügung stehen und repräsentatives Gewebe für histologische Untersuchungen nicht vorliegt und auch nicht mehr gewonnen werden kann, ist im Einzelfall zu prüfen, ob eine Diagnosesicherung (Mesotheliom A bzw. B) unter eingehender Berücksichtigung des klinischen Bildes möglich ist (siehe Ausführungen oben).*
- *Die zytopathologische Diagnose des malignen epithelialen Mesothelioms ist nur durch „multimodale Zellanalysen“ hinreichend sicher möglich. Neben den klassischen Färbetechniken (MGG, Papanicolaou) muss wenigstens ein weiteres Verfahren zur Sicherung der Malignität (DNA-Zytometrie, AgNOR-Analyse oder*

chromosomale FISH) sowie die Anwendung mindestens eines mesotheliom-spezifischen (z. B. Calretinin oder WT1) und eines epithelspezifischen (z. B. BerEP4, HEA 125) monoklonalen Antikörpers verwendet werden.

- *Gerade im Hinblick auf die erheblichen therapeutischen Konsequenzen und auch unter sozialmedizinischen Gesichtspunkten kann eine rein zytologische Diagnostik nur ein Notbehelf bleiben. (...)"*

Dies bedeutet, dass prinzipiell die exakte zytologische Aufarbeitung von insbesondere Ergussmaterial durchaus in der Differentialdiagnostik eines malignen Mesothelioms verwendet werden kann, um möglicherweise riskanten histologischen Gewebsentnahmen bei den oft alten Betroffenen mit nicht selten geschwächter Gesundheit vorbeugen zu können und dennoch zu einer definitiven Diagnose zu gelangen. Problematisch ist dabei aber, dass die oben genannten multimodalen Ansätze der DNA-Bildzytometrie, der AgNOR-Analyse und der FISH-Diagnostik nur in der Cytopathologie in Düsseldorf für Routineanwendung etabliert sind, ihre Anwendung relativ teuer ist und auch nicht von heute auf morgen erbracht werden kann, sondern bei Anwendung nach Art einer Stufendiagnostik 10-14 Tage dauern kann. Diese gewissen Hemmnisse begründen, warum auch an andere Methoden weiterhin gedacht werden muss.

Anders sieht dieses mit der Immunhistochemie bzw. Immunzytochemie aus, die von einem Tag auf den anderen zu erledigen ist. Sie steht als Methode in jedem Institut für Pathologie zur Verfügung. Daher macht es auch Sinn, auf diesem Gebiet neue Marker zu entwickeln bzw. bisher noch nicht ausreichend klar erprobte Marker in der Differentialdiagnostik reaktiver mesothelialer Läsionen und Mesotheliomen anzuwenden. Für die hier vorliegende Arbeit wurden zwei der in Diskussion stehenden Marker ausgewählt, und zwar EMA und Desmin, die beide bereits in der Düsseldorfer Cytopathologie etabliert waren. Sie wurden in wenigen Fällen bereits zum Zeitpunkt der Konzeption unserer Studie primär in der Abklärung mesothelialer Läsionen eingesetzt, obwohl ihr Anwendungsschwerpunkt eigentlich bei anderen Fragestellungen lag. Ziel der Arbeit war, am eigenen Krankengut die Eignung der beiden Marker in der zytologischen Differentialdiagnostik zwischen reaktiven mesothelialen Läsionen und

malignen Mesotheliomen zu überprüfen und eine Aussage zu treffen, ob sie in der „hauseigenen“ Differenzialdiagnostik zum Einsatz kommen sollten oder nicht. Es standen hierzu 72 Fälle aus dem Archiv des Funktionsbereichs Cytopathologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf aus den Jahren 2006 bis 2013 zur Verfügung.

1.11 Ethikvotum

Es liegt für diese Studie ein positives Ethikvotum seitens der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vor (Nr. 5007 vom 03.03.2015).

2. Material und Methoden

2.1 Klinische Daten: Ursprüngliches Patientenkollektiv

Für die vorliegende Studie wurden als Krankheitsgruppe 75 konsekutive Fälle von Ergusspräparaten aus dem Routineeingang des Funktionsbereichs Cytopathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf aus den Jahren 2006 - 2013 ausgewählt, an denen die zytologische Diagnose eines malignen epitheloiden Mesothelioms gestellt worden war. Dabei wurden sowohl Pleuraergüsse, als auch Aszitespunktate und Perikardergüsse berücksichtigt. Üblicherweise wurden die Proben unfixiert eingesandt und noch am Tag des Eingangs labortechnisch verarbeitet (siehe Kapitel 2.2).

Als Krankheitskontrollgruppe wurden 25 Ergusspräparate von Adenokarzinomen aus den Jahren 2012 - 2013 herangezogen, als Negativkontrollgruppe 25 Ergusspräparate von Fällen, in denen rein eine reaktive mesotheliale Veränderung diagnostiziert worden war, z.B. im Rahmen einer Pleuritis oder einer mesothelialen Reizreaktion im Aszites bei Leberzirrhose.

Wie in den Kapiteln 3.1 und 3.2 im Detail ausgeführt, verringerte sich die Zahl der Fälle um sechs; ferner waren bei zwei Fällen die Beobachtungen unvollständig.

2.1.1 Klinische Fragestellung und Validierung der zytologischen Diagnosen

Die klinische Fragestellung der eingesendeten Präparate bestand in der Regel darin, die Ursache für den Erguss zu finden und zu klären, ob es sich um eine maligne Erkrankung handelt. Über die berufliche Anamnese der Patienten war üblicherweise auf dem Einsendeschein keine Angabe gemacht.

Die Fälle, die abschließend als malignes Mesotheliom diagnostiziert wurde, sind entweder durch das Deutsche Mesotheliomregister in Bochum oder durch eine Follow-Up-Untersuchung gesichert. Die Diagnosen der reaktiven Prozesse oder der Adenokarzinome waren durch Follow-Up Untersuchungen histologischer Proben, die aus den Pathologiebefunden entnommen wurden, gesichert. In Einzelfällen wurden die nachbehandelnden Kliniken zur Diagnoseklärung angefragt.

2.1.2 Immunzytochemische Marker

Ergänzend zu den in der Routine angewandten Färbungen, Sonderfärbungen und immunzytochemischen Markierungen wurden in der Studie als weitere immunzytochemische Anwendungen Antikörper gegen Desmin und EMA (Epitheliales Membran-Antigen) eingesetzt.

2.1.2.1 Desmin

Bei Desmin handelt es sich um ein Intermediärfilament vom Typ III. Somit ist es ein Teil des Zytoskeletts in der glatten Muskulatur, der Skelettmuskulatur sowie der Herzmuskulatur. Es hat einen Durchmesser von 8-11 nm. In der Skelettmuskulatur verbindet Desmin die Z-Scheiben im Zytoplasma. Desmin kann als Tumormarker zur histopathologischen Diagnose genutzt werden und dient dort vorwiegend als Marker für eine myogene Differenzierung.

Als Anti-Desmin-Antikörper (im Folgenden "Desmin" genannt), wurde der Antikörper der Firma DAKO (Produktnummer M0760, Verdünnung 1:100) eingesetzt.

2.1.2.2 Epitheliales Membran-Antigen (EMA)

Das epitheliale Membran-Antigen gehört zu der Gruppe der humanen glykosilierten Proteine. Es ist in Milchglobulinen, diversen Epithelzellen und in normalen oder neoplastischen Geweben vorhanden. In der Histologie wird der Antikörper in erster Linie in der Diagnostik von Karzinomen eingesetzt. Da Zylinderepithelien besonders stark auf das Antigen reagieren, werden Mamma- und andere Adenokarzinome besonders stark angefärbt. Der Antikörper eignet sich aber auch zur Markierung von anderen Epithelzelltypen; außerdem werden Plasmazellen angefärbt..

Der gegen EMA gerichtete Antikörper (im Folgenden "EMA" genannt), der für die Anwendungen zur Verfügung stand, stammte ebenfalls von der Firma DAKO (Produktnummer M0613, Verdünnung 1:1600).

2.2 Methoden

Die Dokumentation der Patientenfälle erfolgte tabellarisch. Für jeden Patienten wurden hierzu die folgenden essentiellen Fakten festgehalten: Name, Geburtsdatum, Geschlecht, Alter bei der Probenentnahme, Körperhöhle der entnommenen Probe und die klinische Diagnose. Alle diese Informationen wurden aus dem Einsendeschein entnommen.

2.2.1 Konventionelle zytologische Diagnostik

Die Aufarbeitung des Materials erfolgte gemäß den *Standard Operation Procedures* (SOP) des Funktionsbereichs Cytopathologie der Universität Düsseldorf in folgenden Schritten:

- Überführung des Punktes in 30 ml- bzw. 50 ml-Röhrchen.
- Zentrifugation bei 1.800 rpm (500 g).
- Dekantierung des Überstandes in ein zweites Spitzröhrchen.
- Aufschütteln des Sedimentes.
- Auftragung eines Tropfens (ca. 20 µl) aufgeschüttelten Sedimentes mit einer Pasteurpipette auf einen Objektträger; auf diesen wird ein zweiter flach aufgelegt und durch Übereinanderziehen der beiden Objektträger ein dünner Ausstrich von Zellmaterial auf beide Träger vorgenommen.

Dieser Vorgang wird dreimal durchgeführt, so dass am Ende sechs Objektträger mit Zellmaterial beschickt sind.

- Drei Objektträger werden nach dem Ausstreichen sofort mit einem alkoholischen Fixationsspray (Merckofix) aus satt eingesprüht und nach Trocknung nach PAP (Papanicolaou) gefärbt.
- Die drei anderen Objektträger werden luftgetrocknet, bleiben also frei von einer chemischen Behandlung, und werden nach MGG (May-Grünwald-Giemsa) gefärbt.

Danach wird der Restinhalt des Sedimentröhrchens unfixiert im Kühlschrank aufbewahrt, so dass später ggfls. weitere Präparate gewonnen werden können.

2.2.1.1 Papanicolaou-Färbung

Die Papanicolaou-Färbung („Pap-Färbung“) wurde mithilfe eines Färbeautomaten Shandon Varistain 24-4 SOP-gemäß vorgenommen (Tabelle 3). Als eigentliche Farbstoffe dienten dabei Hämatoxylin (Küvette 6), Orange II 2b (Küvette 14) und Polychrom 3b (Küvette 17). Die früheren und späteren Inkubationen wurden zu Fixations- und Waschwzwecken ausgeführt. Nach der Färbung erfolgt die Eindeckung in einem konventionellen Medium.

Tabelle 3: Ablauf der automatisierten Papanicolaou-Färbung (nach SOP des Funktionsbereichs Cytopathologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf).

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

2.2.1.2 MGG-Färbung

Ebenso wurde die MGG-Färbung ("May-Grünwald-Giemsa"- oder Pappenheim-Färbung) mit dem Färbeautomaten Shandon Varistain 24-4 SOP-gemäß durchgeführt (Tabelle 4). Als Farbstoffe wurden dabei Eosin-Methylenblau-Lösung ("May-Grünwald-Lösung", Küvette 1) und Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung ("Giemsa-Lösung", Küvette 4) verwendet. Auch hier dienten die übrigen Inkubationen Fixations- und Waschzwecken. Danach wurden die gefärbten Präparate mit einem geeigneten Medium eingedeckt.

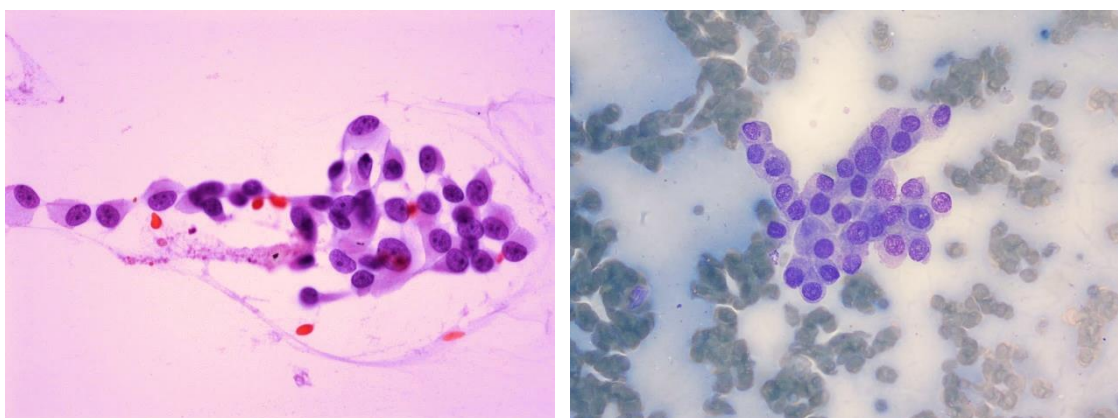
Tabelle 4: Ablauf der automatisierten May-Grünwald-Giemsa-Färbung (nach SOP des Funktionsbereichs Cytopathologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf).

Färbeschritt	Küvetteninhalt	Inkubationszeit
1	May-Grünwald-Lösung	5 Min.
2	Puffer pH 6,8	1 Min.
3	Puffer pH 6,8	1 Min.
4	Giemsa-Lösung	15 Min.
5	Puffer pH 6,8	1 Min.
6	Puffer pH 6,8	1 Min.

2.2.1.3 Beispielbilder der Färbungen

In Abbildung 3 ist jeweils an einem gutartig beurteilten Ergusspräparat ein Beispiel für eine Papanicolaou- und für eine MGG-Färbung in 40x-facher Objektivergrößerung wiedergegeben.

Abbildung 3: Beispiele für eine Papanicolaou- (links) bzw. MGG- (rechts) gefärbte Ausstrichzytologie (40x Obj.)



2.2.2 Mikroskopische Diagnostik

Die zytologische Diagnose nach fachärztlichem Standard des Faches Pathologie setzt in der Fachliteratur hinterlegte Beurteilungskriterien zur Beurteilung von Einzelzellen und Zellpopulationen ein, z.B. nach allgemeinen zytologischen Standardwerken (Koss und Melamed 2006, Cibas und Ducatman 2020, Dey 2022), aber auch nach speziellen Abhandlungen über die Ergusszytologie (Shidham und Atkinson 2007). Wichtige Kriterien, die in Ergusspräparaten für die Beurteilung von Bedeutung sind, umfassen insbesondere:

- Nachweis von Zellverbänden;
- zugunsten der Kerne verschobene Kern-Plasma-Relation;
- ausgeprägte Anisonukleose;
- Kernpolymorphie;
- Hyperchromasie und Anisochromasie;
- Vergrößerung des Chromatins;
- Vermehrung und Vergrößerung von Nukleolen ("Makronukleolen");
- Irregularität der Kernmembran;
- Exzentrität von Zellkernen; sowie
- Überlappung von Zellkernen.

2.2.2.1 Gutartige Zellen

An gutartigen Zellen sind in Ergusspräparaten Erythrozyten, Lymphozyten und Granulozyten in jeweils geringer Zahl als normal anzusehen. Außerdem kommen in variabler Anzahl Mesothelzellen vor. Auch Makrophagen sind nicht à priori als pathologisch zu werten. Treten diese Zellarten in erhöhter Zahl oder mit morphologischen Veränderungen auf, ohne dass Malignitätskriterien erfüllt sind, so sind in der Regel Diagnosen aus dem breiten Formenkreis der Entzündungen mit oder ohne Aktivierung des Mesothels zu stellen.

In seltenen Fällen finden sich außerdem Zellen aus dem Stichkanal, also z. B. epidermale Plattenepithelien, quergestreifte Muskulatur oder Fettzellen.

2.2.2.2 Bösartige Zellen

Prinzipiell sind Zellen jeglicher Art von Malignomen in Ergusspräparaten denkbar. Von besonderer diagnostischer Bedeutung sind insbesondere Karzinomabsiedlungen ("Karzinosen") und epitheloide maligne Mesotheliome; andere Entitäten spielen in der klinischen Medizin hier keine wesentliche Rolle (Lymphome, Melanome etc.), auch nicht die sarkomatoiden malignen Mesotheliome. Vom Befunder wird dabei nicht nur erwartet, dass er die malignen Zellen erkennt, sondern auch, dass eine Zuordnung der Tumorzellen innerhalb der Karzinosen zu Plattenepithelkarzinomen, Adenokarzinomen und kleinzelligen Karzinomen gelingt bzw. bei den Adenokarzinomen auch ein Organbezug des Primärtumors hergestellt werden kann.

Ein wesentliches Problem stellen die Zellen dar, die sich nicht eindeutig als gutartig oder bösartig erkennen lassen. Hier sollte der Befund aber darlegen, ob ein "dringender Verdacht" auf maligne Tumorzellen besteht oder wenigstens ein "zweifelhafter" Befund vorliegt.

2.3 Immunzytochemie

Die Durchführung der Immunzytochemie nach der ABC-Methode erfolgte in aller Regel bereits im Rahmen der primären zytologischen Diagnostik und folgte dabei den Grundsätzen der SOPs der Cytopathologie am UKD. Seinerzeit wurden die immunzytochemischen Inkubationen noch manuell in einem System aufeinander folgender Küvetten vorgenommen, während sie jetzt (Stand: September 2022) durch ein maschinelles Verfahren ersetzt sind und mit einem Färbeautomaten für die Immunzytochemie erfolgen. Die genauen Prinzipien der Immunzytochemie und auch der konkreten SOPs der Cytopathologie wurden von Haastert (2014) im Detail dargestellt. In Tabelle 5 sind die einzelnen Schritte der ABC-Methode wiedergegeben. Die Schritte 1-11 wurden am ersten Arbeitstag vorgenommen, die Schritte 12-21 am zweiten Arbeitstag.

Tabelle 5: SOP-gemäßer Ablauf der immunzytochemischen ABC-Methode (modifiziert nach Kuppaswamy, 2017)

Schritt	Küvetteninhalt	Inkubationszeit
1	Xylol	2 mal 10 Minuten
2	Ethanol 100%	10 Minuten
3	Ethanol 100%	10 Minuten
4	Ethanol 96%	10 Minuten
5	Ethanol 96%	10 Minuten
6	PBS-Puffer	5 Minuten
7	Zitratpuffer im Wasserbad	20 Minuten
8	Objektträger abkühlen lassen	20 Minuten
9	PBS-Puffer	5 Minuten
10	1ml H ₂ O ₂ auf 100 ml Methanol	30 Minuten
11	PBS Puffer	3 mal mehrere Sekunden
12	PBS-Puffer	2 mal 10 Minuten
13	Normalserum	Normalserum 20 Min
14	Primär-Antikörper	12h bei 25 °C in einer "feuchten Kammer"
15	Tris 0,5M in PBS 1:10	2 mal 5 Minuten
16	Sekundär-Antikörper	30 Minuten
17	Tris 0,5M in PBS 1:10	2 mal 5 Minuten
18	ABC-Elite Standard Kit	30 Minuten
19	Tris 0,5M in PBS 1:10	2 mal 5 Minuten
20	AEC-Kit	40 Minuten
21	steriles Aqua dest.	2 mal 5 Minuten
22	Mayer Hämatoxylin	1 Minute
23	fließendes Wasser	10 Minuten
24	Eindecken mit Aquatex	

Die eigentlichen, sich von Anwendung zu Anwendung unterscheidenden Schritte sind die Schritte 14 (Primär-Antikörper) und 16 (hierzu passender Sekundär-Antikörper); die übrigen Schritte dienen Waschprozessen bzw. der optischen Darstellung der Antigen-Antikörper-Bindung.

In der hier vorgelegten Studie wurden zwei Immunreaktionen ausgewertet, und zwar diejenigen mit EMA und mit Desmin. Außerdem lagen von Fall zu Fall sich unterscheidende weitere immunzytochemische Untersuchungen vor, insbesondere zu

Calretinin, ber-EP4, CK7, CK20, TTF-1, cdx-2 oder GATA-3 (zu den Details der Antikörper vgl. die detaillierte Aufstellung bei Kuppuswamy 2017).

Die Auswertung der immunzytochemischen Färbungen erfolgte gemeinsam durch zwei Untersucher nach dem Vier-Augen-Prinzip (Biesterfeld / Frahsek-Wenz). Pro Fall wurde für EMA und Desmin für die regelhaften bzw. auffälligen Mesothelzellen und separat in Tumorfällen für die Tumorzellen der Prozentsatz immunreaktiver Zellen semiquantitativ erhoben. Analog zu anderen Immunmarkern wurde hierzu ein viergliedriges semiquantitatives System, das von 0 bis 3 reichte, angewandt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Auswertung der immunzytochemischen Untersuchungen nach Prozentsatz positiver Zellen

Immunzytochemischer Marker	EMA bzw. Desmin			
Positive Zellen	0%	< 10 %	10% - 50%	> 50%
Beurteilung	0	1	2	3

Für die spätere Auswertung bezüglich einer differentialdiagnostischen Aussage wurden die vier Gruppen in verschiedener Weise weiter zusammengefasst, z.B. in einem Vergleich von 0 vs. 1-3 oder von 0-1 vs. 2-3.

Eine Besonderheit in unserer Studie ist, dass bei einem der beiden Marker, nämlich bei Desmin, bei malignen Mesotheliomen ein Expressionsverlust erwartet wurde, so dass ein „negatives“ Färbergebnis in der biometrischen Auswertung als „positives“ Testergebnis zu interpretieren ist (siehe Kapitel 2.4). Bei EMA hingegen ergibt sich, wie bei den meisten Markern allgemein üblich, bei „positivem“ Färbeergebnis auch ein „positives“ Testergebnis

Die übrigen Immunreaktionen, die aus der Primärdiagnostik mit zur Verfügung standen, waren im Wesentlichen qualitativ beurteilt worden ("Ja-/Nein-Prinzip"). Sie wurden im Rahmen der EMA- und Desmin-Befundung re-evaluiert. Dabei kam es in keinem der Fälle zu einer Befundrevision.

2.4 Statistik

Die zugrunde liegenden Datensätze wurden in Excel angelegt. Für die deskriptive Datenauswertung, die ebenfalls in Excel vorgenommen wurde, standen alle üblichen Variablen (Mittelwert, Median, Standardabweichung etc.) zur Verfügung.

Außerdem wurden Mehrfelder-Tafeln aufgestellt, in denen die Ergebnisse der Immunhistochemie (positiv / negativ) den klinischen Diagnosen gegenübergestellt wurde. Ein Schema einer Vier-Felder-Tafel ist in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7: Berechnung von Kenngrößen der Treffsicherheit mithilfe einer Vier-Felder-Tafel; rp = richtig positiv, fp = falsch positiv, fn = falsch negativ, rn = richtig negativ

Testgröße	Erkrankung		Summe
	vorhanden	nicht vorhanden	
positiv	rp	fp	rp + fp
negativ	fn	rn	fn + rn
Summe	rp + fn	fp + rn	rp + fn + fp + rn

Aus den Datenverteilungen wurden die Werte für Sensitivität, Spezifität, positiven Prädiktionswert, negativen Prädiktionswert und Gesamttreffsicherheit berechnet, die wie folgt definiert sind (nach dem Glossar bei Lenhard 2022):

Die Sensitivität ist ein Maß dafür, wie viele Erkrankte einen positiven Test hatten, die Spezifität, wieviele Gesunde negativ getestet waren; beide Größen ergeben sich aus der Analyse der ersten (Sensitivität) und der zweiten Zeile (Spezifität) der Vier-Felder-Tafel. Der positive Prädiktionswert gibt den Anteil der durch den Test getätigten Krankheitsdiagnosen wieder, die sich als richtig erwiesen (1. Spalte der Vier-Felder-Tafel), der negative Prädiktionswert, wieviele durch den Test als gesund angenommene Patienten tatsächlich gesund waren (2. Spalte der Vier-Felder-Tafel). Die Gesamttreffsicherheit setzt die richtig Positiven und die richtig Negativen in Beziehung zu allen Patienten und bezieht sich somit auf die von links oben nach rechts unten ziehende Diagonale.

In Formeln ausgedrückt bedeutet dieses, wobei alle Werte in Prozent angegeben werden:

Sensitivität	=	$rp / (rp + fp)$
Spezifität	=	$rn / (fn + rn)$
Positiver Prädiktionswert	=	$rp / (rp + fn)$
Negativer Prädiktionswert	=	$rn / (fp + rn)$
Gesamttrefferlichkeit	=	$(rp + rn) / (rp + fn + fp + rn)$

Zur Testung auf statistische Signifikanz wurden der Chi²-Test und der t-Test unter Verwendung von im Internet hinterlegten nicht kommerziellen Programmen (Freeware) der Statistikplattformen Psychometrica (Lenhard 2022) und Statologie (Statologie 2022) durchgeführt. Als Grenzwert für statistische Signifikanz wurde $p \leq 0,05$ angenommen, entsprechend einer Wahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$, die Nullhypothese irrtümlich zu verwerfen.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeine Patientendaten

Von den ursprünglich 125 Fällen konnten sechs nicht verwendet werden (4,8%), da sie im Archiv nicht aufgefunden werden konnten, unvollständig waren oder in ihnen so wenige diagnostisch relevante Zellen enthalten waren, dass keine schlüssige morphologische Diagnose gestellt werden konnte. Es wurde durch Anfragen an die entsprechenden Kliniken versucht, eine diagnostische Klärung herbeizuführen, was aber in diesen Fällen nicht erfolgreich war. Somit verblieben 119 Fälle (72 Mesotheliome, 24 Adenokarzinome, 23 reaktive mesotheliale Prozesse).

Das Alter der 72 Patienten mit einem malignen Mesotheliom lag zwischen 46 und 87 Jahren (MW 71,4 Jahre), die Verteilung der Geschlechter zwischen Männern und Frauen bei 58 zu 14 (80,6% zu 19,4%). Insgesamt lagen 85 Ergusspräparationen vor, und zwar von 61 Patienten eine, von zehn Patienten zwei und von einem Patienten vier; insgesamt also von 72 Patienten. In der Krankheitskontrollgruppe der Adenokarzinome wurden 24 Ergusspräparationen untersucht. Das Patientenalter lag hier zwischen 53 und 86 Jahren (MW 71,9 Jahre), das Verhältnis zwischen Männern und Frauen betrug bei dem Marker EMA 14 zu 8 (63,6% zu 36,6%) und bei Desmin 12 zu 10 (54,5% zu 45,5%); zwei Fälle waren für jeweils einen der beiden Marker unvollständig. Die Negativkontrollgruppe der 23 reaktiven mesothelialen Prozesse (z.B. im Rahmen von Entzündungen) wies eine Altersverteilung von 37 bis 87 Jahren auf (MW 68 Jahre) bei einem Verhältnis zwischen Männern und Frauen von 14 zu 9 (60,9% zu 39,1%).

Das vorgesehene Verhältnis der Fälle in den drei Gruppen, das gemäß Studienplanung 3:1:1 sein sollte, konnte somit mit 72:24:23 fast eingehalten werden.

3.2 Allgemeine Ergebnisübersicht

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen werden zunächst in einer allgemeinen Übersicht tabellarisch dargestellt (Tabelle 8).

Bei zwei Fällen von malignen Mesotheliomen, von denen jeweils nur ein Erguss vorlag, konnte aber keine Desmin-Färbung mehr durchgeführt werden, so dass hier nur

83 statt ansonsten 85 Beobachtungen zur Verfügung standen. Bei den 24 Adenokarzinomen konnte in jeweils zwei verschiedenen Fällen keine EMA- bzw. keine Desmin-Färbung mehr angefertigt werden, weil keine Restpräparate mehr übrig waren bzw. die Färbung am letzten verfügbaren Präparat technisch nicht mehr gelang; es liegen daher bei den Adenokarzinomen pro Marker nur 22 Beobachtungen vor.

Tabelle 8: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von EMA und Desmin in 85 bzw. 83 Ergusspräparationen von malignen Mesotheliomen, 22 Adenokarzinomen und 23 reaktiven mesothelialen Läsionen

Marker	EMA				Desmin			
Immunreaktive Zellen	0%	< 10%	10%-50%	> 50%	0	< 10%	10%-50%	> 50%
Kategorie	0	1	2	3	0	1	2	3
Malignes Mesotheliom	15	11	21	38	64	16	1	2
Adenokarzinom	5	3	3	11	13	6	0	3
Reaktives Mesothel (bei Mesotheliomen)	65	13	4	3	75	6	1	1
Mesothel (bei Adenokarzinomen)	18	3	0	1	19	3	0	0
Auffälliges Mesothel (negative Fälle)	18	2	0	3	15	5	2	1
Unauffälliges Mesothel (negative Fälle)	19	2	1	1	15	7	1	0
Gutartiges Mesothel (außer Mesotheliome)	55	7	1	5	49	15	3	1
Gutartiges Mesothel (alle Fälle)	101	18	4	7	109	14	3	2

3.3 Methodische Voruntersuchungen zu nicht-neoplastischen Mesothelien

Einer klinischen Auswertung müssen methodische Untersuchungen zu denjenigen Mesothelzellen vorausgehen, die als nicht neoplastisch eingestuft worden waren.

Während man aus fachärztlicher Sicht davon ausgehen darf, dass man Mesothelzellen in Ergüssen, die Zellen eines Adenokarzinoms enthalten, zytologisch oder im Vergleich mit geeigneten Immunmarkern erkennen kann, ist dieses bei den Mesotheliomfällen nicht selbstverständlich. Hier ergibt sich der Verdacht auf Tumorzellen zwar charakteristischerweise aus einer oft in dreidimensionalen Verbänden liegenden Zellanordnung ("maulbeerförmig", "morula-artig"), jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass neoplastische Mesothelzellen einzeln liegend angetroffen werden. Da sie oft keine Kernatypien aufweisen, kann dann die

Differenzierung zwischen ihnen und reaktiven nicht-neoplastischen Mesothelzellen unmöglich sein, so dass ein gewisses Verwechslungsrisiko verbleibt.

Gleichermaßen stellt sich in den reaktiven Ergüssen, die im Follow-Up nicht einem Mesotheliom entsprachen, die Frage, ob es überhaupt ausreichend harte Kriterien gibt, um zwischen reaktiven und nicht reaktiven Mesothelien verlässlich zu unterscheiden. Hier stellt sich retrospektiv die Frage, ob das Konzept der Unterscheidung zweier Mesothelarten überhaupt tragfähig ist.

Diesen Fragen soll im Folgenden nachgegangen werden und festgelegt werden, mit welchen nicht-neoplastischen bzw. für nicht-neoplastisch gehaltenen Mesothelzellen nachfolgend klinische Vergleiche angestellt werden sollen. Dabei sollte versucht werden, für EMA und Desmin zu einer gleichartigen Lösung der methodischen Fragen zu gelangen. In der nachfolgenden Tabelle sind die Markerexpressionen von EMA und Desmin in den vier verschiedenen Gruppen nicht-neoplastischer Mesothelzellen dargestellt.

Die entsprechenden Datenverteilungen sind in Tabelle 9 absolut und prozentual wiedergegeben.

Tabelle 9: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von EMA und Desmin in vier Gruppen von nicht-neoplastischen Mesothelien in 85 bzw. 83 Ergusspräparationen von malignen Mesotheliomen, 22 Adenokarzinomen und 23 reaktiven mesothelialen Läsionen

Marker	EMA				Desmin			
Immunreaktive Zellen	0%	< 10%	10%-50%	> 50%	0%	< 10%	10%-50%	> 50%
Kategorie	0	1	2	3	0	1	2	3
Reaktives Mesothel (bei Mesotheliomen)	65 76,5%	13 15,3%	4 4,7%	3 3,5%	75 90,4%	6 7,2%	1 1,2%	1 1,2%
Mesothel (bei Adenokarzinomen)	18 81,8%	3 13,6%	0 0,0%	1 4,6%	19 86,4%	3 13,6%	0 0,0%	0 0,0%
Auffälliges Mesothel (negative Fälle)	18 78,3%	2 8,7%	0 0,0%	3 13,4%	15 65,2%	5 21,7%	2 8,7%	1 4,3%
Unauffälliges Mesothel (negative Fälle)	19 82,6%	2 8,7%	1 4,3%	1 4,3%	15 65,2%	7 30,4%	1 4,3%	0 0,0%

Schon überblicksweise ist aus der prozentualen Datenverteilung ablesbar, dass sich bei EMA innerhalb der vier Gruppen keinerlei wesentlichen Unterschiede ableiten lassen, vielleicht von der starken EMA-Positivität dreier Fälle aus der Negativkontrollgruppe an dort auffälligen Mesothelien (13,4%) abgesehen. Andererseits stellt ein einzelner Fall bereits einen Anteil von 4,3% bei einer Gruppengröße von n = 23. Statistische Signifikanz bestand im Chi²-Test weder

bezogen auf die gesamte 16-Felder-Tafel, noch für ergänzend getestete Einzelvergleiche (p jeweils weit $> 0,05$). Auch im t-Test ergab sich für EMA bei Vergleich einzelner Gruppen, bezogen auf die konkrete Datenverteilung erwartungsgemäß, keine Signifikanz ($p > 0,05$).

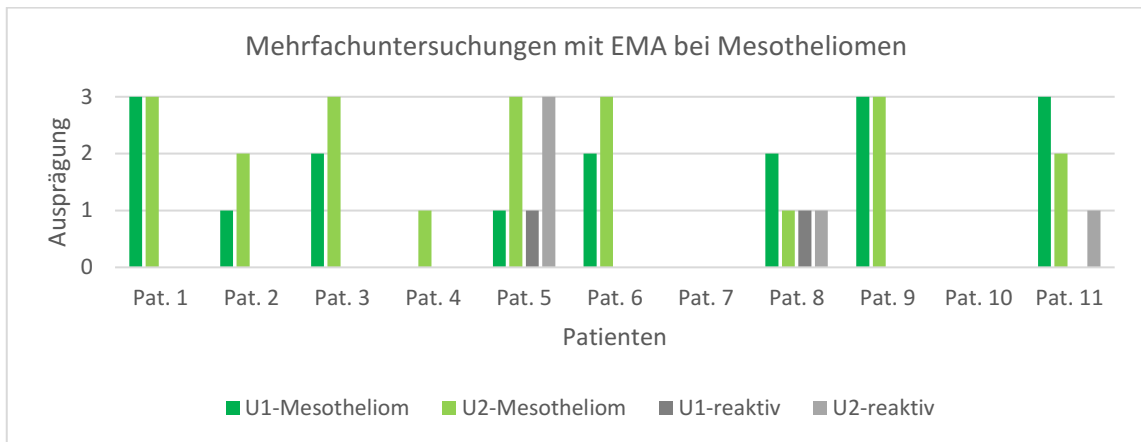
Bei Desmin weisen die Mesothelien in der Gruppe der Negativkontrolle wohl eine Neigung zu einer vermehrten schwachen Desmin-Expression (Gruppe $< 10\%$) auf. Allgemein bestand für die gesamte Tabelle als 16-Felder-Tafel aber knapp keine statistische Signifikanz im χ^2 -Test ($p \sim 0,08$). Zur weiteren Abschätzung möglicher wesentlicher Effekte wurde orientierend eine Vier-Felder-Tafel für Mesothelzellen bei Tumor vs. bei Nicht-Tumor mit einer Gruppierung der Fälle in die Kategorien 0 vs. 1-3 aufgestellt, die für die Tumorfälle eine Aufteilung der Fälle im Verhältnis 94:11 und für die Nicht-Tumorfälle im Verhältnis 30:16 bedeutete. Im χ^2 -Test war das Testergebnis signifikant ($p < 0,0004$). Im t-Test ergaben sich signifikante Unterschiede bei der Desmin-Expression zwischen den reaktiven Mesothelien bei Mesotheliomen (Tabelle 9, Zeile 1) im Vergleich zu den auffälligen Mesothelien der reaktiven Fälle (Zeile 3, $p = 0,0043$) und den unauffälligen Mesothelien der reaktiven Fälle (Zeile 4, $p = 0,0273$).

Insgesamt wurde der Gedanke, ein Pooling der Ergebnisse vorzunehmen, nicht weiter verfolgt. Bei EMA ist es aufgrund der Gleichartigkeit der Markerexpression nicht notwendig und bei Desmin bedeutet die Uneinheitlichkeit der Ergebnisse das Risiko eines Bias und somit einer Ergebnisverfälschung, bezogen auf die unten dargestellten Ergebnisse der klinisch-diagnostischen Auswertung.

3.4 Vergleich von Patienten mit mehreren Untersuchungen

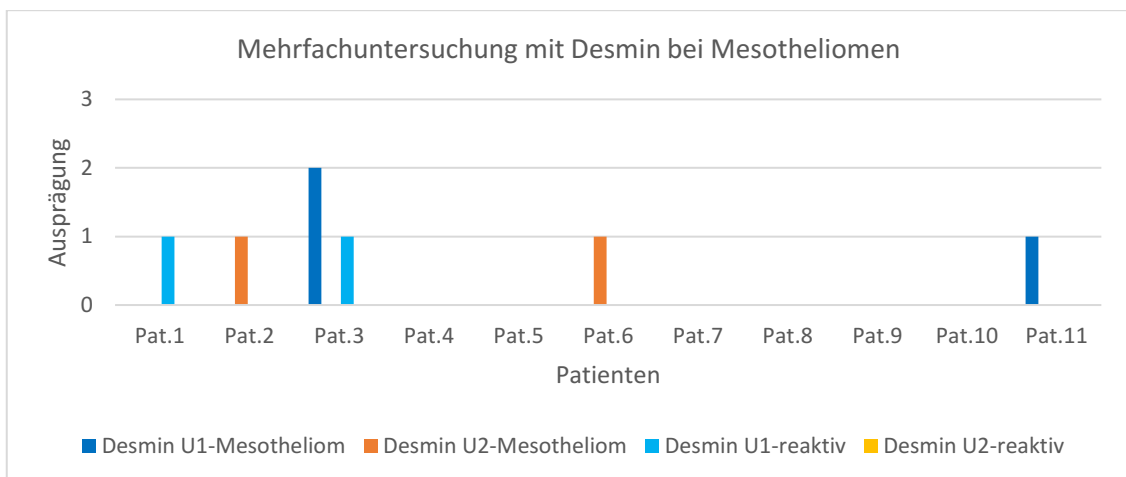
Bei 11 Mesotheliompatienten konnten mehrere Proben von unterschiedlichen Untersuchungen mit EMA und bei zehn Patienten mit Desmin verglichen werden (Abbildung 4). Es lagen jeweils zwei Proben im Abstand von fünf Tagen bis hin zu 2 Jahren und 219 Tagen vom gleichen Patienten vor. Bei einem Patienten waren sogar vier Proben, entnommen zwischen dem 05.07.2006 und dem 08.02.2010, vorhanden, also über einen Zeitraum von mehr als 3 ½ Jahren.

Abbildung 4: Mehrfachuntersuchungen bei Mesotheliompatienten mit EMA; „fehlende Balken“ entsprechen einer Beurteilung als 0 (nicht gefärbt)



Für die EMA-Expression in den Mesotheliomzellen gab es bei vier von 11 Fällen keine Abweichung, in 6 Fällen eine Abweichung um eine Kategorie und in einem Fall eine Abweichung von 2 Kategorien (Abbildung 4). In den drei Fällen, bei denen EMA auch reaktive Zellen markiert, ergab sich in zwei Fällen eine Abweichung um eine Kategorie, die zwischen den Kategorien 0 und 1 liegt, und in einem Fall eine Abweichung um zwei Kategorien.

Abbildung 5 Mehrfachuntersuchung bei Mesotheliompatienten mit Desmin; „fehlende Balken“ entsprechen einer Beurteilung als 0 (nicht gefärbt)



Beim Vergleich der Desmin-Präparate bei der Untersuchung der Mesotheliomzellen wurde in vier von zehn Fällen eine Abweichung von einer Kategorie festgestellt. Bei einem vom zehn Patienten gab es eine Abweichung von zwei Kategorien.

Die Abweichung lag bei vier von zehn Patienten zwischen den Kategorien 0 und 1, in denen unterschieden wird, ob keine Zellen angefärbt (Kategorie 0) oder weniger als 10% der Zellen (Kategorie 1) angefärbt werden.

Bei der Anfärbung der reaktiven Zellen durch Desmin gab es nur bei zwei von zehn Patienten eine Abweichung um eine Kategorie. Hier lag die Abweichung wieder zwischen der Kategorie 0 und 1.

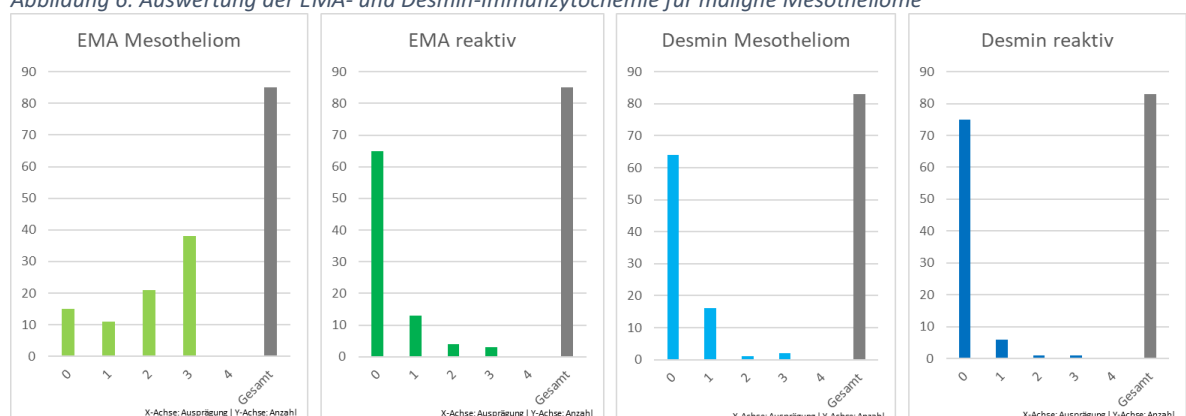
3.5 Auswertung der EMA- und Desmin-Expression beim malignen Mesotheliom

Bezogen auf die allgemeine Ergebnisübersicht werden in Kapitel 3.5 folgende Daten in Beziehung gesetzt (Tabelle 10, Abbildung 6):

Tabelle 10: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von EMA und Desmin in 85 bzw. 83 Ergusspräparationen von malignen Mesotheliomen

Marker	EMA				Desmin			
Immunreaktive Zellen	0%	< 10%	10%-50%	> 50%	0%	< 10%	10%-50%	> 50%
Kategorie	0	1	2	3	0	1	2	3
Malignes Mesotheliom	15	11	21	38	64	16	1	2
Reaktives Mesothel	65	13	4	3	75	6	1	1

Abbildung 6: Auswertung der EMA- und Desmin-Immunzytochemie für maligne Mesotheliome



3.5.1 EMA-Expression in malignen Mesotheliomen

Die Verteilung der EMA-Expression in den Tumorzellen der malignen Mesotheliome im Vergleich zu reaktiven, als nicht-neoplastisch beurteilten Mesothelzellen zeigt Tabelle 11. Die

Tumorzellen der Mesotheliome waren häufiger EMA-positiv als die reaktiven Mesothelien. Bei malignen Mesotheliomen waren 70 von 85 Ergusspräparate EMA-positiv (82,4%), bei den reaktiven Mesothelien nur 20 (23,5%). In der Mehrzahl der Untersuchungen war die EMA-Positivität mindestens in 10 bis 50% der Tumorzellen nachweisbar, oft auch in mehr als der Hälfte der Tumorzellen (59 von 85, 69,4%). Bezogen auf die Rohdatenverteilung und die verschiedenen Möglichkeiten, die Ergebnisse in zwei Expressionsgruppen zusammenzufassen, ergaben sich hochsignifikante Unterschiede im t-Test und im Chi²-Test (p jeweils < 0,0001).

Tabelle 11: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von EMA in 85 Ergusspräparationen von malignen Mesotheliomen, bezogen auf verschiedene Kategorisierungen

Markerexpression	EMA				p-Wert t-Test	p-Wert Chi²-Test
Kategorie	0	1	2	3		
Malignes Mesotheliom	15	11	21	38	< 0,0001	<0,0001
Reaktives Mesothel	65	13	4	3		
Kategorie	0	1-3				
Malignes Mesotheliom	15	70			< 0,0001	< 0,0001
Reaktives Mesothel	65	20				
Kategorie	0 – 1	2 - 3				
Malignes Mesotheliom	26	59			< 0,0001	< 0,0001
Reaktives Mesothel	78	7				
Kategorie	0 – 2	3				
Malignes Mesotheliom	47	38			< 0,0001	< 0,0001
Reaktives Mesothel	82	3				

Die Kennwerte zu Sensitivität, Spezifität, positivem Prädiktionswert (PPV), negativem Prädiktionswert (NPV) und Gesamttrefferbarkeit sind in Tabelle 12 wiedergegeben. Mit EMA ist eine Unterscheidbarkeit zwischen Mesotheliomen und nicht-neoplastischen Mesothelien möglich. Ob man den Vergleich "0 vs. 1-3" oder "0-1 vs. 2-3" bevorzugt, hängt klinisch davon ab, ob man eher eine hohe Sensitivität oder eine hohe Spezifität bevorzugt.

Tabelle 12: Diagnostische Kennwerte zur immunhistochemischen Markerexpression von EMA in 85 Ergusspräparationen von malignen Mesotheliomen, bezogen auf verschiedene Kategorisierungen

EMA in der Diagnostik maligner Mesotheliome			
	0 vs. 1-3	0-1 vs. 2-3	0-2 vs. 3
Sensitivität	82,4%	69,4%	44,7%
Spezifität	76,5%	91,8%	96,5%
PPV	77,8%	89,4%	92,7%
NPV	81,3%	75,0%	63,6%
Gesamtreffsicherheit	79,4%	80,6%	70,6%

3.5.2 Desmin-Expression in malignen Mesotheliomen

Tabelle 13 zeigt die Verteilung der Desmin-Expression in den Tumorzellen der malignen Mesotheliome im Vergleich zu den reaktiven, nicht-neoplastischen Mesothelzellen.

Tabelle 13: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von Desmin in 83 Ergusspräparationen von malignen Mesotheliomen, bezogen auf verschiedene Kategorisierungen

Markerexpression	Desmin				p-Wert t-Test	p-Wert Chi²-Test
Kategorie	0	1	2	3		
Malignes Mesotheliom	64	16	1	2	0,0656	< 0,0001
Reaktives Mesothel	75	6	1	1		
Kategorie	0	1-3				
Malignes Mesotheliom	64	19			0,0206	0,0207
Reaktives Mesothel	75	8				
Kategorie	0 - 1	2 - 3				
Malignes Mesotheliom	80	3			0,6521	0,6498
Reaktives Mesothel	81	2				
Kategorie	0 - 2	3				
Malignes Mesotheliom	81	2			0,5621	0,5601
Reaktives Mesothel	82	1				

Die Desmin-Expression zwischen Tumorzellen maligner Mesotheliome und reaktiven Mesothelien ist im Wesentlichen gleichartig, auch wenn der p-Wert des t-Tests fast noch signifikant gewesen wäre ($p = 0,0656$). Die anschließend durchgeführten statistischen Berechnungen in Subgruppen zeigen zwar statistische Signifikanz bei der Berücksichtigung von vier Expressionskategorien (Chi²-Test: $p < 0,0001$) und auch bei der qualitativen Ja-/Nein-Entscheidung über eine Expression (Vergleich 0 vs. 1-3; Chi²-Test: $p = 0,0207$). Die Berücksichtigung der Desmin-Expression ist bei der Dignitätsbestimmung mesothelialer Zellen insgesamt offenbar nicht hilfreich. Dieses bestätigt sich anhand der Werte für Sensitivität, Spezifität, positiven Prädiktionswert (PPV), negativen Prädiktionswert (NPV) und Gesamttreffericherheit (Tabelle 14). Desmin wäre zwar ein sehr sensibler Marker, würde aber kaum positive Fälle erkennen, da die Spezifität viel zu gering ist.

Tabelle 14: Diagnostische Kennwerte zur immunhistochemischen Markerexpression von Desmin in 83 Ergusspräparationen von malignen Mesotheliomen, bezogen auf verschiedene Kategorisierungen

Desmin in der Diagnostik maligner Mesotheliome			
	0 vs. 1-3	0-1 vs. 2-3	0-2 vs. 3
Sensitivität	77,1%	96,4%	97,6%
Spezifität	9,6%	2,4%	1,2%
PPV	46,0%	49,7%	49,7%
NPV	29,6%	40,0%	33,3%
Gesamttreffericherheit	43,4%	49,4%	49,4%

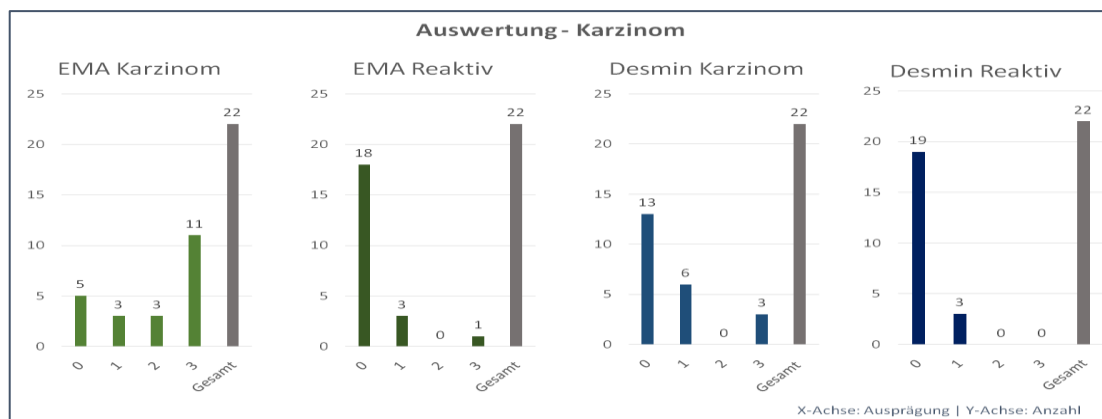
3.6 Auswertung der EMA- und Desmin-Expression beim Adenokarzinom

In Kapitel 3.6 werden gleichartig die Ergebnisse der Kontrollgruppe der Adenokarzinome dargestellt (Tabelle 15, Abbildung 7):

Tabelle 15: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von EMA und Desmin in 22 Ergusspräparationen von Adenokarzinomen

Marker	EMA				Desmin			
	0%	< 10%	10%-50%	> 50%	0%	< 10%	10%-50%	> 50%
Kategorie	0	1	2	3	0	1	2	3
Adenokarzinom	5	3	3	11	13	6	0	3
Mesothel (bei Adenokarzinomen)	18	3	0	1	19	3	0	0

Abbildung 7: Auswertung der EMA- und Desmin-Immunzytochemie für Adenokarzinome



3.6.1 EMA-Expression bei Adenokarzinomen

Tabelle 16 zeigt eine Übersicht über die Verteilung der EMA-Expression bei Adenokarzinomen im Vergleich zu den reaktiven, nicht-neoplastischen Zellen.

Tabelle 16: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von EMA in 22 Ergusspräparationen von Adenokarzinomen, bezogen auf verschiedene Kategorisierungen

Markerexpression	EMA				p-Wert t-Test	p-Wert Chi ² -Test
Kategorie	0	1	2	3		
Adenokarzinom	5	3	3	11	< 0,0001	< 0,0001
Reaktives Mesothel (bei Adenokarzinomen)	18	3	0	1		
Kategorie	0	1-3				
Adenokarzinom	5	17			< 0,0001	0,0001
Reaktives Mesothel (bei Adenokarzinomen)	18	4				
Kategorie	0 - 1	2 - 3				
Adenokarzinom	8	14			< 0,0001	< 0,0001
Reaktives Mesothel (bei Adenokarzinomen)	21	1				
Kategorie	0 - 2	3				
Adenokarzinom	11	11			0,0006	0,0007
Reaktives Mesothel (bei Adenokarzinomen)	21	1				

In der Kontrollgruppe der Karzinome lag in der großen Mehrzahl der Fälle eine EMA-Expression der Tumorzellen vor. Durch EMA werden 77,3% (17 von 22) der Adenokarzinome markiert. Im Gegensatz dazu sind die in 18 der 22 Fälle (81,8%) die reaktiven Mesothelien negativ. Durch eine EMA-Positivität war eine Differenzierung zwischen Zellen von Adenokarzinomen und reaktiven Mesothelzellen möglich. In der Datenverteilung der Karzinome bezogen auf die Gesamtergebnisse dieser Gruppe ergaben sich signifikante Unterschiede im t-Test und im Chi²-Test (p jeweils mindestens bei 0,0006 oder 0,0007, in den meisten Vergleichen bei $p < 0,0001$).

Dass diese Ergebnisse sich so darstellen, überrascht prinzipiell vor dem Hintergrund nicht, dass der EMA-Antikörper mit dem "Epithelialen Membran-Antigen" ein Antigen markiert, dass zum üblichen Repertoire epithelialer Zellen gehört. Entsprechend ergeben sich für EMA auch bei Adenokarzinomen gute Werte für Sensitivität, Spezifität, positiven Prädiktionswert (PPV), negative Prädiktionswert (NPV) und Gesamttreffericherheit (Tabelle 16), die ggfls. diagnostisch nutzbar wären. Ähnlich wie oben bei der Mesotheliomdiagnostik gilt auch hier, dass die Wahl des Ansatzes "0 vs. 1-3" oder "0-1 vs. 2-3" von der Zielsetzung abhängt, eine möglichst hohe Sensitivität oder eine möglichst hohe Spezifität anzustreben.

Tabelle 16: Diagnostische Kennwerte zur immunhistochemischen Markerexpression von EMA in 22 Ergusspräparationen von Adenokarzinomen, bezogen auf verschiedene Kategorisierungen

EMA in der Abgrenzung von Adenokarzinomen zu reaktiven Mesothelien			
	0 vs. 1-3	0-1 vs. 2-3	0-2 vs. 3
Sensitivität	77,3%	63,6%	50,0%
Spezifität	81,8%	95,5%	95,5%
PPV	81,0%	93,3%	91,7%
NPV	78,3%	72,4%	65,6%
Gesamttreffericherheit	79,5%	79,5%	72,7%

3.6.2 Desmin-Expression bei Adenokarzinomen

In Tabelle 17 ist die Verteilung der Desmin-Expression bei Adenokarzinomen und reaktiven, nicht-neoplastischen mesothelialen Zellen zu sehen.

Tabelle 17: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von Desmin in 22 Ergusspräparationen von Adenokarzinomen, bezogen auf verschiedene Kategorisierungen. * = Für eine p-Wert-Berechnung im Chi²-Test sind zu wenige Gruppen mit Daten besetzt.

Markerexpression	Desmin				p-Wert t-Test	p-Wert Chi²-Test
Kategorie	0	1	2	3		
Adenokarzinom	13	6	0	3	0,0248	*
Reaktives Mesothel (bei Adenokarzinomen)	19	3	0	0		
Kategorie	0	1-3				
Adenokarzinom	13	9			0,0432	0,0423
Reaktives Mesothel (bei Adenokarzinomen)	19	3				
Kategorie	0 - 1	2 - 3				
Adenokarzinom	19	3			0,0757	0,0728
Reaktives Mesothel (bei Adenokarzinomen)	22	0				
Kategorie	0 - 2	3				
Adenokarzinom	19	3			0,0757	0,0728
Reaktives Mesothel (bei Adenokarzinomen)	22	0				

Eine Unterscheidbarkeit von Zellen eines Adenokarzinoms von begleitenden Mesothelien erscheint durch Desmin, ähnlich bei der Gruppe der Mesotheliome (Kapitel 3.4.), nicht gegeben, da sich die Datenverteilung relativ ähnlich darstellt. Die meisten Fälle sind sowohl bei Adenokarzinomen (13 von 22, 59,1%), als auch im Mesothel dieser Fälle (19 von 22, 86,4%) Desmin-negativ. Auch wenn der t-Test bezogen auf alle Gruppen noch Signifikanz anzeigt ($p = 0,0248$) und beim qualitativen Vergleich der Expression (0 vs. 1-3) für beide Tests noch eine minimale Signifikanz (p jeweils knapp $< 0,05$) angezeigt wird, sind keine klinisch sinnvollen Unterscheidungen möglich.

Da Desmin auch üblicherweise nicht von epithelialen Zellen exprimiert wird, ist dieses Ergebnis nicht unerwartet und schlägt sich insbesondere auch in einer hohen Sensitivität und einer niedrigen Spezifität nieder (Tabelle 18).

Tabelle 18: Diagnostische Kennwerte zur immunhistochemischen Markerexpression von Desmin in 22 Ergusspräparationen von Adenokarzinomen, bezogen auf verschiedene Kategorisierungen

Desmin in der Abgrenzung von Adenokarzinomen zu reaktiven Mesothelien			
	0 vs. 1-3	0-1 vs. 2-3	0-2 vs. 3
Sensitivität	86,4%	100%	100%
Spezifität	40,9%	13,6%	13,6%
PPV	59,4%	53,7%	53,7%
NPV	75,0%	100%	100%
Gesamtreffsicherheit	63,6%	56,8%	56,8%

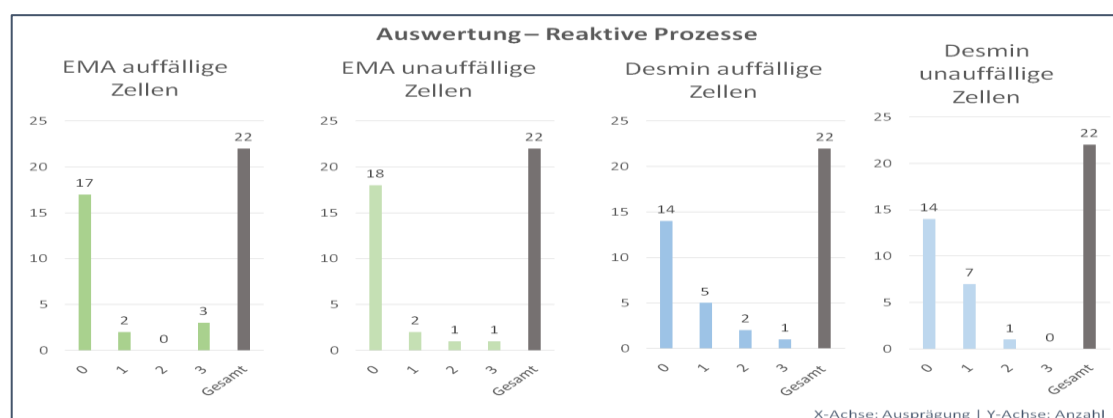
3.7 Auswertung der EMA- und Desmin-Expression bei reaktiven Prozessen

Im folgendem Kapitel 3.7 werden die Ergebnisse der Negativ-Kontrollgruppe der reaktiven Prozesse dargestellt. Tabelle 19 und Abb. 8 zeigen die zugehörige Datenverteilung.

Tabelle 19: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von EMA und Desmin in 23 Ergusspräparationen von reaktiven Prozessen

Marker	EMA				Desmin			
Immunreaktive Zellen	0%	< 10%	10%-50%	> 50%	0%	< 10%	10%-50%	> 50%
Kategorie	0	1	2	3	0	1	2	3
Auffälliges Mesothel (negative Fälle)	18	2	0	3	15	5	2	1
Unauffälliges Mesothel (negative Fälle)	19	2	1	1	15	7	1	0

Abbildung 8: Auswertung der EMA- und Desmin-Immunzytochemie für reaktive Prozesse



3.7.1 EMA-Expression bei reaktiven Prozessen

Ein Überblick der Verteilung der EMA-Expression bei reaktiven Prozessen bei auffälligen Zellen und unauffälligen Zellen ist nachfolgender Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 20: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von EMA in 23 Ergusspräparationen von reaktiven Prozessen, bezogen auf verschiedene Kategorisierungen

Markerexpression	EMA				p-Wert t-Test	p-Wert Chi²-Test
Kategorie	0	1	2	3		
Auffälliges Mesothel (negative Fälle)	18	2	0	3	0,6827	0,5670
Unauffälliges Mesothel (negative Fälle)	19	2	1	1		
Kategorie	0	1-3				
Auffälliges Mesothel (negative Fälle)	18	5			0,7175	0,7101
Unauffälliges Mesothel (negative Fälle)	19	4				
Kategorie	0 - 1	2 - 3				
Auffälliges Mesothel (negative Fälle)	20	3			0,6446	0,6357
Unauffälliges Mesothel (negative Fälle)	21	2				
Kategorie	0 - 2	3				
Auffälliges Mesothel (negative Fälle)	20	3			0,6446	0,2953
Unauffälliges Mesothel (negative Fälle)	22	1				

Erwartungsgemäß (siehe Kapitel 3.3) ergaben sich zwischen als auffällig, aber nicht neoplastisch empfundenen Mesothelzellen und unauffälligen Mesothelzellen keine Unterschiede im Expressionsverhalten für EMA. Die meisten Fälle waren mit 18 (78,2%) bzw. 19 (82,6%) komplett negativ. Insgesamt lässt sich nicht ableiten, dass durch Aktivierung etc. Mesothelzellen die Fähigkeit erwürben, EMA in einem höheren Prozentsatz der Fälle exprimieren zu können. Alle üblichen Testungen gemäß der üblichen Gruppenbildung führten sowohl im t-Test, als auch im Chi²-Test zu nicht signifikanten p-Werten (allesamt $p > 0,05$).

Die Kennwerte zur Treffsicherheit (Tabelle 21) belegen zwar eine hohe Spezifität, aber eine viel zu niedrige Sensitivität. Die Gesamttreffsicherheit liegt insgesamt nur in etwa bei dem der zufälligen Übereinstimmung von 50%.

Tabelle 21: Diagnostische Kennwerte zur immunhistochemischen Markerexpression von EMA in 23 Ergusspräparationen von reaktiven mesothelialen Läsionen, bezogen auf verschiedene Kategorisierungen

EMA in der Abgrenzung zwischen auffälligen und unauffälligen Mesothelien			
	0 vs. 1-3	0-1 vs. 2-3	0-2 vs. 3
Sensitivität	21,7%	13,0%	13,0%
Spezifität	82,6%	91,3%	95,7%
PPV	55,6%	60,0%	75,0%
NPV	51,4%	51,2%	52,4%
Gesamttrefferlichkeit	52,2%	52,2%	54,3%

3.7.2 Desmin-Expression bei reaktiven Prozessen

Eine Darstellung über die Verteilung der Desmin-Expression bei reaktiven Prozessen ist in Tabelle 22 zu finden. Bei dieser Auswertung wurde untersucht, wie sich verdächtige Zellen im Vergleich zu unauffälligen durch Desmin anfärben lassen.

Tabelle 22: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von Desmin in 23 Ergusspräparationen von reaktiven Prozessen, bezogen auf verschiedene Kategorisierungen

Markerexpression	Desmin				p-Wert t-Test	p-Wert Chi ² -Test
Kategorie	0	1	2	3		
Auffälliges Mesothel (negative Fälle)	15	5	2	1	0,5457	0,6443
Unauffälliges Mesothel (negative Fälle)	15	7	1	0		
Kategorie	0	1-3				
Auffälliges Mesothel (negative Fälle)	15	8			1,0000	1,0000
Unauffälliges Mesothel (negative Fälle)	15	8				
Kategorie	0 - 1	2 - 3				
Auffälliges Mesothel (negative Fälle)	20	3			0,3059	0,2953
Unauffälliges Mesothel (negative Fälle)	22	1				
Kategorie	0 - 2	3				
Auffälliges Mesothel (negative Fälle)	22	1			0,3227	0,3120
Unauffälliges Mesothel (negative Fälle)	23	0				

Durch Desmin werden in jeweils 15 von 23 Proben weder auffällige, noch unauffällige Zellen markiert (65,2%), so dass Desmin nicht für eine Differenzierung dieser beiden Zellarten geeignet ist. Alle üblichen Testungen gemäß der üblichen Gruppenbildung erwiesen sich auch hier sowohl im t-Test, als auch im Chi²-Test als nicht signifikant (p-Werte allesamt $p > 0,05$). Hierzu passen auch die niedrigen Werte für die Spezifität von Desmin bei dieser Fragestellung und insbesondere auch die niedrige Gesamttrefferlichkeit, die nur wenig über die zufällige Übereinstimmung von 50% hinausgeht (Tabelle 23).

Tabelle 23: Diagnostische Kennwerte zur immunhistochemischen Markerexpression von Desmin in 23 Ergusspräparationen von reaktiven mesothelialen Läsionen, bezogen auf verschiedene Kategorisierungen

Desmin in der Abgrenzung zwischen auffälligen und unauffälligen Mesothelien			
	0 vs. 1-3	0-1 vs. 2-3	0-2 vs. 3
Sensitivität	65,2%	95,7%	100%
Spezifität	34,8%	13,0%	4,3%
PPV	50,0%	52,4%	51,1%
NPV	50,0%	75,0%	100%
Gesamttrefferlichkeit	50,0%	54,3%	52,2%

3.8 Zusammenfassende Bewertung der EMA- und Desmin-gestützten Diagnostik

Aus den vielen oben dargestellten Daten soll im Folgenden eine kurze vergleichende Bewertung der EMA- und Desmin-gestützten Diagnostik vorgenommen werden (Tabelle 24 umseitig). Dazu wurde als ein neutraler Parameter exemplarisch die Gesamttrefferlichkeit ausgewählt. Bedenkt man, dass nach Dichotomisierungen von Daten prinzipiell eine zufällige Übereinstimmung von 50% besteht, so können diagnostisch sinnvolle Ergebnisse nur angenommen werden, wenn die Gesamttrefferlichkeit deutlich höher liegt.

Mit EMA lassen sich in der Abgrenzung zwischen malignen Mesotheliomen und reaktiven Mesothelzellen zwischen 70,6% und 80,6% erzielen, bei der Abgrenzung zwischen Tumorzellen eines Adenokarzinoms und Mesothelzellen zwischen 72,7% und 79,5%, so dass die EMA-Immunhistochemie bei diesen beiden Fragestellungen zur Diagnosefindung als ergänzender Parameter herangezogen werden könnte. Zur Abgrenzung von unterschiedlichen gutartigen Populationen innerhalb des Mesothels ist EMA nicht geeignet (52,2% bis 54,4%).

Mit Desmin lassen sich bei Gesamttrefferlichkeiten zwischen unter 50% und 54,4% für alle drei vergleichende Untersuchungen keine diagnostisch nutzbaren Aussagen erheben.

Tabelle 24: Gesamttreffsicherheit der EMA- und der Desmin-Immunhistochemie im Vergleich zwischen Mesotheliomen und Adenokarzinomen gegenüber nicht-neoplastischem Mesothel und innerhalb von Zellpopulationen nicht-neoplastischer Mesothelien

Gesamttreffsicherheit zur Abgrenzung zwischen			
	0 vs. 1-3	0-1 vs. 2-3	0-2 vs. 3
Mesotheliom und Mesothel			
EMA	79,4%	80,6%	70,6%
Desmin	43,4%	49,4%	49,4%
Adenokarzinom und Mesothel			
EMA	79,5%	79,5%	72,7%
Desmin	63,6%	56,8%	56,8%
auffälligem und nicht auffälligem Mesothel			
EMA	52,2%	52,2%	54,3%
Desmin	50,0%	54,3%	52,2%

An dieser Stelle stellte sich die Frage, inwieweit eine weitere Auswertung von Teilaspekten der Studie, bezogen auf den begrenzten Stichprobenumfang, möglich bzw. sinnvoll wäre, und wie ausgedehnt man sie darstellen müsste. Dabei wurde entschieden, dass zumindest eine Auswertung nach Geschlecht, Altersklassen und Entnahmeort vorgenommen werden sollte. Da hierbei zum Teil nur kleine Gruppen verglichen werden konnten, sind die Aussagen hierzu insgesamt nur deskriptiver Natur. Soweit statistische Auswertungen vorgenommen wurden, dienen diese nur der Vergleichbarkeit mit den bislang vorgestellten Ergebnissen für alle Patienten. Verzichtet wurde auf eine Aufgliederung der Adenokarzinome nach dem Primärtumor, weil in der Routinediagnostik EMA und Desmin beide keine differenzialdiagnostische Optionen für die Zuordnung einer Karzinose eines Adenokarzinoms zu einem bestimmten Primärtumor eröffnen. Auch prognostische Aspekte blieben unbearbeitet, da sich die Daten hierzu auf einen nicht ausreichend langen Zeitraum bezogen.

3.9 Ergebnisse nach Geschlechtern

In Kapitel 3.9 werden die Ergebnisse nach Geschlechtern für die drei Erkrankungsgruppen ausgewertet. Im Folgenden ist die in Kapitel 3.2 dargestellte Tabelle 8 in vereinfachter Form und nach Geschlechtern geordnet wiedergegeben (Tabelle 25).

Tabelle 25: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von EMA und Desmin in 85 bzw. 83 Ergusspräparationen von malignen Mesotheliomen, 22 Adenokarzinomen und 23 reaktiven mesothelialen Läsionen, unterteilt nach Geschlecht

Marker	EMA				Desmin			
Immunreaktive Zellen	0%	< 10%	10%-50%	> 50%	0	< 10%	10%-50%	> 50%
Kategorie	0	1	2	3	0	1	2	3
Malignes Mesotheliom (Frauen)	3	0	4	9	12	3	0	1
Malignes Mesotheliom (Männer)	12	11	17	29	52	13	1	1
Reaktives Mesothel bei Mesotheliom (Frauen)	14	2	0	0	14	2	0	0
Reaktives Mesothel bei Mesotheliom (Männer)	51	11	4	3	61	4	1	1
Adenokarzinom (Frauen)	1	2	1	4	5	4	0	1
Adenokarzinom (Männer)	4	1	2	7	8	2	0	2
Reaktives Mesothel bei Adeno-Ca. (Frauen)	7	1	0	0	8	2	0	0
Reaktives Mesothel bei Adeno-Ca. (Männer)	11	2	0	1	11	1	0	0
Auffälliges Mesothel negative Fälle (Frauen)	9	0	0	2	7	2	1	1
Auffälliges Mesothel negative Fälle (Männer)	9	2	0	1	8	3	1	0
Unauffälliges Mesothel negative Fälle (Frauen)	9	0	1	1	7	4	0	0
Unauffälliges Mesothel negative Fälle (Männer)	10	2	0	0	8	3	1	0

3.9.1 Vergleich der Marker-Expressionen nach Geschlechtern zwischen malignen Mesotheliomen und reaktiven Mesothelien

Vergleich der EMA-Expression

Bezüglich der EMA-Expression zeigte sich im Vergleich zwischen malignen Mesotheliomen und zugehörigen reaktiven Mesothelzellpopulationen bei Frauen aufgrund der kleinen Stichprobe¹ trotz der sich visuell deutlich unterscheidenden Datenverteilung (siehe Tabelle 3.2, Datenzeilen 1 und 3) im t-Test noch keine statistische Signifikanz ($p = 0,12$), wohl aber bei Männern ($p < 0,0001$). Ferner lag für beide Geschlechter im Chi²-Test statistische Signifikanz bei allen möglichen Gruppierungen der Markerexpression vor.

Im Chi²-Test betrug bei Frauen der p-Wert im Vergleich aller vier Gruppen $p < 0,0001$, ebenso bei den Vergleichen der Expressionen 0 vs. 1-3 und 0-1 vs. 2-3; für 0-2 vs. 3 lag er bei $p = 0,0004$. Bezogen auf die beiden Expressionskategorien 0 und 1-3 ergaben sich eine Sensitivität von 81,3%, eine Spezifität von 87,5%, ein PPV von 86,7%, ein NPV von 82,4% und eine Gesamttrefferlichkeit von 84,4%.

Bei Männern lagen bei den Vergleichen der Expressionen in den genannten Gruppen die p-Werte im Chi²-Test allesamt bei $p < 0,0001$. Die Kennwerte für die Trefferlichkeit waren überwiegend etwas niedriger als bei Frauen und errechneten sich im identischen Vergleich für die Sensitivität als 82,6%, für die Spezifität als 73,9%, für den PPV als 76,0%, für den NPV als 81,0% und für die Gesamttrefferlichkeit als 78,3%.

Vergleich der Desmin-Expression

Alle p-Werte im t-Test und im Chi²-Test waren, wie auch nach der Tabelle 8 und den allgemeinen Ergebnissen in Kapitel 3.2 nicht anders zu erwarten, bei $p > 0,05$, also nicht signifikant, so dass Desmin auch aufgeteilt nach Geschlechtern keine diagnostische Relevanz besitzt. Eine Angabe von Kennzahlen zur Trefferlichkeit ist somit geschlechtsbezogen entbehrlich.

¹ Rechnet man modellhaft bei den Frauen mit in allen Gruppen beispielsweise doppelter Fallzahl, so läge das Ergebnis im t-Test ebenfalls bei $p < 0,0001$, was den Verweis auf die kleine Stichprobe plausibel erscheinen lässt.

3.9.2 Vergleich der Marker-Expressionen nach Geschlechtern zwischen Adenokarzinomen und reaktiven Mesothelien

Die Darstellungen zum Vergleich der Markerexpressionen in Karzinomen und in reaktiven Mesothelien bleibt im Wesentlichen deskriptiv, da insgesamt nur kleine Gruppen von acht (EMA) bzw. zehn Fällen (Desmin) bei Frauen und vierzehn Fällen pro Marker bei Männern zur Verfügung stehen. Rein bei Durchsicht der Zahlen in der obigen Tabelle 8 in Kapitel 3.2 wird dabei deutlich, dass es keine allgemeinen Trends gibt, die auf eine Unterschiedlichkeit hinweisen.

Vergleich der EMA-Expression

Bezüglich der EMA-Expression im Vergleich zum reaktiven Mesothel zeigten sich bei Frauen und Männern im t-Test statistisch signifikante Unterschiede (Frauen: $p = 0,0008$, Männer: $p = 0,0016$). Im χ^2 -Test betrug bei beiden Geschlechtern der p-Wert im Vergleich aller vier Gruppen $p < 0,0001$.

Im Vergleich der Expressionen 0 vs. 1-3 ($p = 0,0027$), 0-1 vs. 2-3 ($p = 0,0070$) und 0-2 vs. 3 ($p = 0,0209$) war er bei den Frauen jeweils etwas höher. Bezogen auf die beiden Expressionskategorien 0 und 1-3 ergaben sich für alle fünf Kenngrößen (Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV und Gesamttrefferbarkeit) Werte von jeweils 87,5%.

Bei den Männern lagen bei den Vergleichen der Expressionen in den genannten Gruppen die p-Werte im χ^2 -Test bei $p = 0,0007$, $p = 0,0034$ und $p = 0,0125$. Die Kennwerte für die Trefferbarkeit im Vergleich der Expressionskategorien 0 und 1-3 betrugen für die Sensitivität 78,6%, für die Spezifität 71,4%, für den PPV 73,3%, für den NPV 76,9% und für die Gesamttrefferbarkeit 75,0%.

Aufgrund der sich um ca. 12-15 Prozentpunkte unterscheidenden Werte für die Trefferbarkeit wurde noch ein t-Test zwischen der EMA-Expression in den Karzinomen bei den Frauen und den Karzinomen bei den Männern durchgeführt, der keine statistische Signifikanz erbrachte ($p = 0,80$).

Vergleich der Desmin-Expression

Alle p-Werte im t-Test und im Chi²-Test wurden, gleichartig wie bei EMA durchgeführt, bei $p > 0,05$, also nicht signifikant, wie dieses bereits auch schon von den Rohdaten der Tabelle 8 in Kapitel 3.2 her zu vermuten gewesen war. Hinweise auf eine geschlechtsbezogen unterschiedliche Desmin-Expression ergeben sich somit nicht. Eine genaue Analyse der Kennzahlen zur Treffsicherheit ist somit auch hier nicht sinnvoll.

3.9.3 Vergleich der Marker-Expressionen nach Geschlechtern für reaktive Prozesse

Bezüglich der Negativkontroll-Gruppe der reaktiven Prozesse lässt schon ein Blick in die Rohdaten in Tabelle 25 oben erkennen, dass sich zwischen auffälligen und nicht auffälligen Mesothelien keine Unterschiede abzeichnen. In der Tat blieben alle wie oben durchgeführten statistischen Untersuchungen mit dem t-Test und dem Chi²-Test ohne jede statistische Signifikanz ($p > 0,05$).

3.10 Auswertung der verschiedenen Altersklassen

In diesem Kapitel erfolgt die getrennte Auswertung der Ergebnisse nach Altersklassen. Dabei ließ die begrenzte Zahl an Mesotheliomfällen in den drei Erkrankungsgruppen nicht mehr als drei unterschiedliche Altersklassen sinnvoll erscheinen, obwohl zunächst an eine stärkere Aufgliederung gedacht worden war. Dabei hatten sich aber zu kleine Gruppen ergeben, weswegen dann die Altersklassen "bis 70 Jahre", "70-80 Jahre" und "über 80 Jahre" gewählt wurden. Dabei besteht die Gruppe "bis 70 Jahre" im Wesentlichen aus Patienten zwischen 60 und 70, nämlich 33 bei EMA und 32 bei Desmin. Jünger als 60 Jahre waren jeweils nur fünf Patienten. Insgesamt ergaben sich Gruppenverteilung für EMA von 38:34:13 und für Desmin von 37:33:13. Bei den Adenokarzinomen teilten sich die Patienten im Verhältnis 7:10:5 (EMA) bzw. 7:11:4 (Desmin) auf, bei den reaktiven Fällen im Verhältnis 16:5:2.

Im Folgenden ist die in Kapitel 3.2 dargestellte Tabelle 8 in vereinfachter Form und nach Altersklassen geordnet dargestellt (Tabelle 26).

Tabelle 26: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von EMA und Desmin in 85 bzw. 83 Ergusspräparationen von malignen Mesotheliomen, 22 Adenokarzinomen und 23 reaktiven mesothelialen Läsionen, unterteilt nach drei Altersklassen

Marker	EMA				Desmin			
Immunreaktive Zellen	0%	< 10%	10%-50%	> 50%	0	< 10%	10%-50%	> 50%
Kategorie	0	1	2	3	0	1	2	3
Malignes Mesotheliom (-70 Jahre)	5	8	11	14	26	8	1	2
Malignes Mesotheliom (70-80 Jahre)	8	1	9	16	27	6	0	0
Malignes Mesotheliom (>80 Jahre)	2	2	1	8	11	2	0	0
Reaktives Mesothel bei Mesotheliom (-70 Jahre)	28	6	3	1	34	2	0	1
Reaktives Mesothel bei Mesotheliom (70-80 J.)	26	6	1	1	29	3	1	0
Reaktives Mesothel bei Mesotheliom (>80 J.)	11	1	0	1	12	1	0	0
Adenokarzinom (-70 Jahre)	1	0	1	5	3	2	0	2
Adenokarzinom (70-80 Jahre)	3	3	0	4	6	4	0	1
Adenokarzinom (>80 Jahre)	1	0	2	2	4	0	0	0
Reaktives Mesothel bei Adeno-Ca. (-70 Jahre)	6	1	0	0	6	1	0	0
Reaktives Mesothel bei Adeno-Ca. (70-80 Jahre)	8	1	0	1	10	1	0	0
Reaktives Mesothel bei Adeno-Ca. (> 80 Jahre)	4	1	0	0	3	1	0	0
Auffälliges Mesothel negative Fälle (-70 J.)	13	2	0	1	10	3	2	1
Auffälliges Mesothel negative Fälle (70-80 J.)	4	0	0	1	3	2	0	0
Auffälliges Mesothel negative Fälle (> 80 J.)	1	0	0	1	2	0	0	0
Unauffälliges Mesothel negative Fälle (-70 J.)	14	2	0	0	11	4	1	0
Unauffälliges Mesothel negative Fälle (70-80 J.)	5	0	0	0	3	2	0	0
Unauffälliges Mesothel negative Fälle (> 80 J.)	0	0	1	1	1	1	0	0

3.10.1 Vergleich der Marker-Expressionen nach Altersklassen zwischen malignen Mesotheliomen und reaktiven Mesothelien

Vergleich der EMA-Expression

Bezüglich der EMA-Expression zeigten sich im Vergleich zwischen malignen Mesotheliomen und zugehörigen reaktiven Mesothelzellpopulationen in allen drei Altersklassen etwa gleichartige Verteilungen der Ergebnisse. Einzig auffällig war (siehe Tabelle 26, Kapitel 3.10, Datenzeilen 1-3), dass bei den jüngeren Mesotheliompatienten etwas häufiger eine schwache EMA-Expression ($n = 8$, 21,1%) auftrat. Im t-Test ergab sich im Vergleich dieser Gruppe mit den Patienten zwischen 70 und 80 ($p = 0,7783$) und mit den Patienten > 80 Jahre ($p = 0,4669$) kein signifikantes Resultat. Auch alle übrigen angestellten Vergleiche zwischen jeweils zwei Gruppen fielen ähnlich aus (jeweils $p > 0,05$).

Bei den reaktiven Mesothelien ergab sich kein erkennbarer Trend. Untersuchungen mit dem t-Test bzw. Chi²-Test zwischen den einzelnen Gruppen ergaben keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$).

Vergleich der Desmin-Expression

Bei Desmin fällt auf, dass die Desminexpression bei malignen Mesotheliomen mit zunehmender Altersgruppe im Vergleich 0 vs. 1-3 abnimmt, und zwar von 29,8% (11/37) über 18,3% (6/33) auf 15,4% (2/13). Bei den reaktiven Mesothelien ergab sich in diesen Patientengruppen kein Trend. Statistisch signifikante Unterschiede traten im t-Test bzw. im Chi²-Test im Vergleich der einzelnen Gruppen nicht auf ($p > 0,05$).

3.10.2 Vergleich der Marker-Expressionen nach Altersklassen zwischen Adenokarzinomen und reaktiven Mesothelien

Die Darstellungen zum Vergleich der Markerexpressionen in Karzinomen und in reaktiven Mesothelien bleibt auch hier im Wesentlichen deskriptiv, da insgesamt nur kleine Gruppen zwischen fünf bzw. vier und zehn bzw. elf Fälle für EMA bzw. Desmin zur Verfügung stehen. Bei Durchsicht der Zahlen in Tabelle 26 sind die Ergebnisse für EMA allerdings zwischen den drei Gruppen nicht ganz gleichmäßig verteilt, wobei sich aber in den drei paarweisen t-Tests keine statistische Signifikanz zeigte (jeweils $p > 0,05$). Ansonsten wird kein wegweisender Trend

deutlich. Dies gilt sowohl für die Expression von Desmin im Tumorgewebe, als auch für EMA und Desmin im reaktiven Mesothel.

3.10.3 Vergleich der Marker-Expressionen nach Altersklassen für reaktive Prozesse

Bezüglich der Negativkontroll-Gruppe der reaktiven Prozesse sind die Altersgruppen zu gering bzw. zu unregelmäßig besetzt, so dass es sich hier im Grunde um Einzelfallbeobachtungen handelt. Führt man formal statistische Untersuchungen mit dem t-Test durch, so bleiben diese allesamt ohne jede statistische Signifikanz ($p > 0,05$), sowohl für EMA, als auch für Desmin.

3.11 Ergebnisse nach Entnahmeort des Ergusses

Bei Konzeption der Studie war geplant gewesen, eine Auswertung nach der Lokalisation der Ergüsse vorzunehmen, sofern neben Entnahmen aus der Pleurahöhle auch Entnahmen aus genügend anderen Lokalisationen vorhanden sein sollten. Es stellte sich dann aber heraus, dass Pleuraergüsse derartig im Vordergrund standen, dass eine genauere getrennte Auswertung nach Lokalisation des Ergusses nicht mehr sinnvoll erschien. Die Ergusspräparate aus der Pleura stellten bei den Mesotheliomen jeweils fast 85% der Fälle (EMA: 72/85, 84,7%; Desmin: 70/83, 84,3%). Auch bei den Adenokarzinomen (16/22, 72,7%) und bei den reaktiven Ergüssen (16/23, 69,6%) lag überwiegend Material aus der Pleurahöhle vor.

Die umseitig folgende Tabelle 27, in der die Expressionen der immunhistochemischen Marker dokumentiert sind, belegt, wie klein die Datengruppen bereits bei der zweithäufigsten Entnahmelokalisation, dem Aszites, sind; bei den malignen Mesotheliomen waren es 10 Fälle, bei den Adenokarzinomen und den reaktiven Veränderungen zwischen zwei und vier Fälle, so dass die Daten nicht über Einzelfallbeobachtungen hinausgehen.

Es wurde jeweils ein t-Test für den Vergleich der Expressionen von EMA und Desmin in Pleuraerguss und Aszites innerhalb der Gruppen der malignen Mesotheliome und der reaktiven Zellen bei Mesotheliomen durchgeführt. Die Unterschiede in der Datenverteilung waren dabei jeweils nicht signifikant ($p > 0,05$): Bei den Mesotheliomen ergab sich für EMA ein Wert von $p = 0,6714$ und für Desmin von $p = 0,9665$; bei den reaktiven Zellen der Mesotheliomfälle lagen die Werte für EMA bei $p = 0,6155$ und für Desmin bei $p = 0,6847$. Für die beiden Kontrollgruppen

wurden wegen der geringen Zahl an Fällen keine statistischen Untersuchungen durchgeführt; Unterschiede in der Datenverteilung lassen sich aus Tabelle 27 nicht ablesen.

Tabelle 27: Übersicht über die immunhistochemische Markerexpression von EMA und Desmin in Ergusspräparationen von 72 bzw. 70 malignen Mesotheliomen, 19 bzw. 20 Adenokarzinomen und 20 reaktiven mesothelialen Läsionen, unterteilt nach den beiden häufigsten Lokalisationen

Marker	EMA				Desmin			
Immunreaktive Zellen	0%	< 10%	10%-50%	> 50%	0	< 10%	10%-50%	> 50%
Kategorie	0	1	2	3	0	1	2	3
Malignes Mesotheliom (Pleuraerguss)	12	10	17	33	54	15	0	1
Malignes Mesotheliom (Aszites)	3	1	3	3	8	1	1	0
Reaktives Mesothel bei Mesotheliom (Pleura)	53	13	4	2	63	5	1	1
Reaktives Mesothel bei Mesotheliom (Aszites)	9	0	0	1	9	1	0	0
Adenokarzinom (Pleuraerguss)	4	1	3	8	9	4	0	3
Adenokarzinom (Aszites)	1	1	0	1	2	2	0	0
Reaktives Mesothel bei Adeno-Ca. (Pleura)	14	1	0	1	14	2	0	0
Reaktives Mesothel bei Adeno-Ca. (Aszites)	2	1	0	0	3	1	0	0
Auffälliges Mesothel negative Fälle (Pleura)	12	1	0	3	12	3	0	1
Auffälliges Mesothel negative Fälle (Aszites)	3	1	0	0	3	1	0	0
Unauffälliges Mesothel negative Fälle (Pleura)	13	1	1	1	12	4	0	0
Unauffälliges Mesothel negative Fälle (Aszites)	3	1	0	0	3	1	0	0

4. Diskussion

4.1 Stellenwert der Zytologie in der Mesotheliomdiagnostik bei Konzeption der Studie

Die Diagnose eines malignen Mesothelioms ist in vielen Fällen weder histologisch, noch zytologisch einfach, selbst wenn klinisch und bildgebend bereits ein dringender Tumorverdacht besteht. Dies gilt sowohl für die epitheloiden, als auch für die sarkomatoiden Grundformen dieser Tumorentität inklusive der von der WHO inzwischen akzeptieren Sonderformen, wobei auf dem Gebiet der Zytologie annähernd ausschließlich epitheloide maligne Mesotheliome zu bedenken sind.

Traditionell wird bzw. wurde in der Mesotheliomdiagnostik auf die Histologie gesetzt, wobei als entscheidendes Kriterium der Nachweis invasiven Wachstums einer mesothelialen Zellpopulation in die parietale Pleura ist. Diesen Nachweis darf man sich dabei an kleinen Proben nicht immer einfach vorstellen, gerade wenn man bedenkt, dass eine Abgrenzung nicht gegen Normalgewebe erfolgen muss, sondern gegenüber einem sekundär entzündlich überlagerten Gewebe mit unterschiedlichem Gehalt an Entzündungszellen und variabler Begleitsklerose. Dass Invasivität in der Regel einer Mesotheliomdiagnose entspricht, ist unstrittig. Dennoch wird auch ihr Stellenwert zwar als sehr wichtiges, aber dennoch nur relatives Kriterium gesehen. In einer gemeinsamen Arbeit aus dem Jahr 2012 stellten beispielsweise Churg und Galateau-Sallé, führende Köpfe in der wissenschaftlichen und diagnostischen Mesotheliomszene, zur Invasivität fest:

„Invasion of the stroma continues to be by far the most reliable criterion for separating benign from malignant mesothelial proliferations. Fat is the stroma most frequently encountered and the finding of mesothelial cells in fat makes the proliferation malignant unless there is an extraordinarily good reason to believe otherwise. The same comment applies [even more so] to invasion of muscle or invasion of lung or another organ.“

Aus der Textpassage lässt sich ablesen, dass es also zumindest Ausnahmen von der Regel „Invasivität belegt ein malignes Mesotheliom“ gibt.

Der Zytologie hingegen wurde in der Mesotheliomdiagnostik in Deutschland eher misstraut, was sich insbesondere gut aus der umfangreichen Leitlinie „*Diagnostik*

und Begutachtung asbestbedingter Berufskrankheiten. Interdisziplinäre S2-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin“ aus dem Jahr 2011 ablesen lässt (Baur et al. 2011); diese Leitlinie galt, als die Konzeption der hier vorgestellten Studie erfolgte. Die Einstellung zu den Möglichkeiten der Zytologie lässt sich dabei in dem Zitat

„Gerade im Hinblick auf die erheblichen therapeutischen Konsequenzen und auch unter sozialmedizinischen Gesichtspunkten kann eine rein zytologische Diagnostik [eines malignen Mesothelioms] nur ein Notbehelf bleiben“

zusammenfassen. Andererseits wird in der Leitlinie anerkannt, dass die in Düsseldorf vorgehaltenen adjuvanten Methoden zur zytologischen Mesotheliomdiagnostik geeignet seien, indem ausgeführt wird:

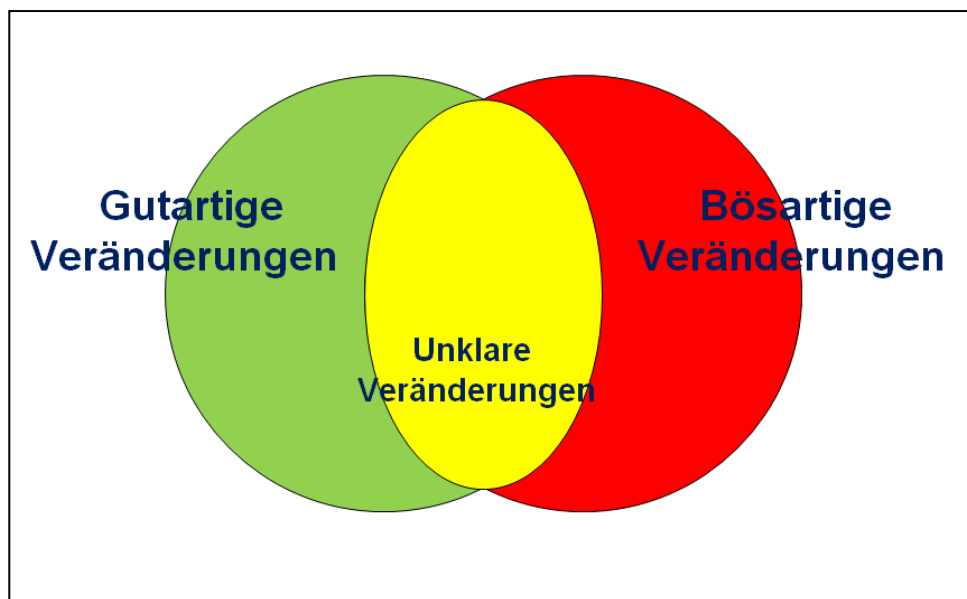
„Die zytopathologische Diagnose des malignen epithelialen Mesothelioms ist nur durch „multimodale Zellanalysen“ hinreichend sicher möglich. Neben den klassischen Färbetechniken (MGG, Papanicolaou [sic!]) muss wenigstens ein weiteres Verfahren zur Sicherung der Malignität (DNA-Zytometrie, AgNOR-Analyse oder chromosomale FISH) sowie die Anwendung mindestens eines mesotheliomspezifischen (z. B. Calretinin oder WT1) und eines epithelspezifischen (z. B. BerEP4, HEA 125) monoklonalen Antikörpers verwendet werden“.

Setzt man diese beiden Statements in Beziehung zueinander, so wird deutlich, dass es bei der Skepsis gegenüber der Zytologie nicht darum ging, dass die Beurteilung anhand von Zellsuspensionen ohne Bezug zum angrenzenden Stroma abgelehnt würde, weil damit der Nachweis einer Invasion der Läsion formal nicht erbracht werden kann. Sondern es ging letztendlich um die Sicherheit der diagnostischen Aussage, also um eine zu geringe diagnostische Treffsicherheit im Sinne einer zu geringen Sensitivität und Spezifität der mit konventioneller Zytologie vorgenommenen Untersuchungen. Dabei lagen für die Sensitivität Zahlenangaben zwischen 16% und 35% vor, in einzelnen Arbeiten auch bis 70% (Renshaw et al. 1997, Walters und Maskell 2011, Husain et al. 2013).

Ursache für die beschränkten Möglichkeiten der konventionellen Zytologie ist die auf der Basis der üblichen Routinefärbungen (HE, Papanicolaou oder MGG) schwierige Abgrenzung zwischen reaktiven und neoplastischen Mesothelien. Die morphologischen Kriterien (Henderson et al. 2013) zeigen einen relativ breiten

Überlappungsbereich zwischen gutartig-reaktiven und neoplastischen Mesothelien, der die Diagnostik erschwert und zu nicht eindeutigen Wahrscheinlichkeitsdiagnosen führt. Stellt man sich (siehe Abbildung 9) nach einem Ampelprinzip die morphologischen Kriterien grüner Zellen als gutartig und diejenigen roter Zellen als bösartig vor, so gibt es in der Betrachtung von Zellpopulationen eben nicht nur grüne gutartige Diagnosen und rote bösartige Diagnosen, sondern auch gelbe unklare Diagnosen, obwohl es keine gelben Zellen gibt. Je nachdem, wie breit der gelbe Bereich ist, sind zytologische Diagnosen eben leichter oder schwerer zu stellen. Diesem „Screening-Problem“ daneben gestellt werden muss das „Sampling-Problem“, dass die zu beurteilenden Zellen möglicherweise gar nicht im Punktat vorhanden sind. In der Histologie gibt es die gleichen Problemfelder in anderer Weise selbstverständlich auch.

Abbildung 9: Sich überschneidende Eigenschaften gutartiger (grün) und bösartiger Zellen (rot) führen dazu, dass diagnostisch nicht eindeutig zu interpretierende Zellbilder (gelb) entstehen (Biesterfeld 2015)



Ziel der Entwicklung adjuvanter Methoden in der Zytopathologie ist die Verbesserung der diagnostischen Treffsicherheit und somit, übertragen auf das Diagramm, die Verkleinerung des gelben diagnostischen Bereiches, in dem man Diagnosen wie „zweifelhaft - ohne sicheren Nachweis von Tumorzellen“ oder „dringender Verdacht auf Tumorzellen“ zuzüglich Klartext formulieren würde. Hierzu dienen Methoden wie die Immunzytochemie, die DNA-Bildzytometrie, FISH-Untersuchungen sowie beim Mesothel auch die AgNOR-Histochemie, die jeweils von Organ zu Organ

gemäß wissenschaftlichen Erfahrungen verschieden eingesetzt werden und damit die klassische zytologische Morphologie ergänzen.

4.2 Adjuvante zytologische Diagnostik mesothelialer Zellpopulationen mit DNA-Bildzytometrie, AgNOR-Histochemie und 9p21-FISH-Analyse: Möglichkeiten und Grenzen

Sind die auffälligen Zellen als Mesothelzellen identifiziert, so stellt sich die Frage nach ihrer Dignität. Wie oben in Kapitel 1.7 bereits angesprochen, ist die Entscheidung hierüber an zytologischen Materialien schwieriger als bei epithelialen Veränderungen. Dieses liegt hauptsächlich daran, dass Mesothelzellen auf verschiedene gutartige Reize wie Entzündung, Einblutung oder Luftkontakt (z. B. nach Pneumothorax) ähnlich morphologisch reagieren wie bei maligner Entartung auch. Insbesondere neigen sie unter solchen Bedingungen zu verbandartiger Lagerung („maulbeerartig“ / „Morula-artig“) und weisen oft dabei nur wenige Kern- bzw. Zellveränderungen auf. Gerade Letzteres ist ein wesentlicher Unterschied zu Epithelien, die in erster Linie an ihren Atypien als prä-maligne oder maligne erkannt werden. Nur relativ wenige Fälle von epithelialen malignen Mesotheliomen zeigen klare Atypien, so dass bereits *prima vista* von Malignität ausgegangen werden kann.

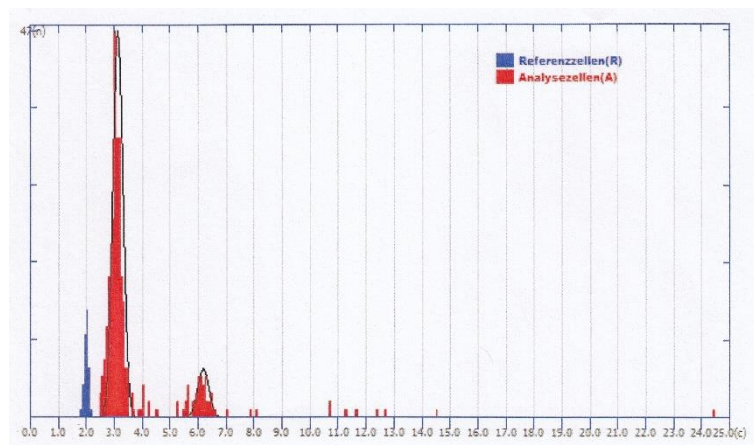
In der Cytopathologie in Düsseldorf wurden in der Vergangenheit adjuvante Methoden entwickelt, mit denen sich die Frage der Dignität mesothelialer Veränderungen in den meisten Fällen lösen lassen. Die inzwischen dort etablierte Vorgehensweise, die ausführlich bei Onofre et al. (2008) beschrieben ist, soll im Folgenden kurz skizziert werden. Dabei soll hier bereits darauf hingewiesen werden, dass die Anwendungen kostenintensiv, zeitintensiv und personalintensiv sind, so dass sie eigentlich nur für Einzelfälle beispielsweise in BG-rechtlichen Verfahren geeignet sind, nicht aber für die tägliche Diagnostik allgemein verdächtiger Fälle. Die Klärung der Dignität mesothelialer Läsionen stützt sich insgesamt auf die drei Methoden der DNA-Bildzytometrie, der AgNOR-Histochemie und der 9p21-FISH-Analyse, die allerdings gemeinsam ausschließlich am Funktionsbereich Cytopathologie in Düsseldorf vorgehalten werden. DNA-Bildzytometrie wird an einzelnen weiteren Standorten diagnostisch betrieben, AgNOR-Analysen werden anscheinend nirgendwo anders in der

adjuvanten Diagnostik angeboten, wohingegen FISH-Verfahren an praktisch allen Standorten etabliert sind, die auch molekularpathologisch arbeiten.

DNA-Bildzytometrie

Bei der international standardisierten DNA-Bildzytometrie (vgl. Haroske et al. 1998) wird mikrodensitometrisch der DNA-Gehalt von ca. 250 morphologisch auffälligen Zellen und von ca. 30 normalen Eichzellen (beispielsweise Lymphozyten) bestimmt und in einem DNA-Histogramm bzw. durch Bestimmung verschiedener Parameter dargestellt. Als DNA-aneuploid und damit als maligne transformiert wird beim Mesothel eine Zellpopulation angesehen, die eine Stammlinienaneuploidie aufweist, so dass der DNA-Gehalt der Zellen in der G₀/G₁-Phase außerhalb des Bereichs von 2c +/- einem Referenzbereich liegt (Abbildung 10).

Abb. 10: Ergebnisausdruck eines DNA-aneuploiden Falles mit einer Stammlinie bei 3,05c und Verdopplungsgipfel bei 6,25c (Biesterfeld 2015)



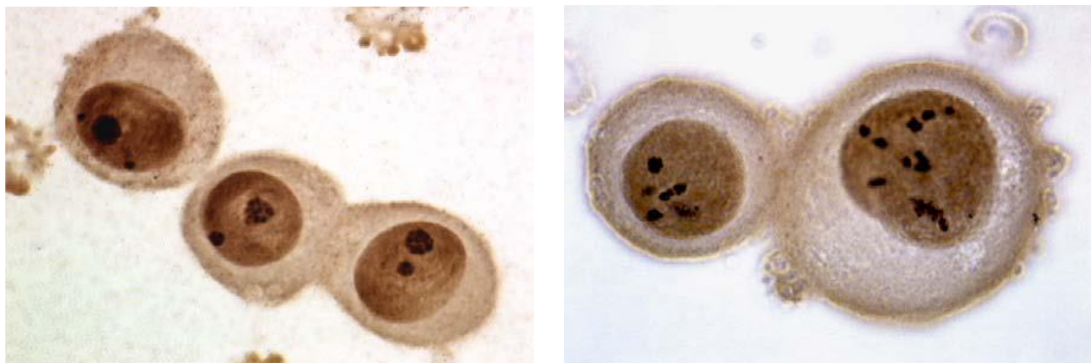
Der Anteil DNA-aneuploider maligner Mesotheliome liegt allerdings bei nur ca. 75% (Onofre et al. 2008); die übrigen Fälle von malignen Mesotheliomen verbleiben bei einer typischen polyploiden DNA-Verteilung, wie sie auch für gutartige mesotheliale Zellpopulationen charakteristisch ist (Biesterfeld et al. 1994), so dass sie nicht über die DNA-Bildzytometrie als maligne erkannt werden können.

AgNOR-Analyse

Nukleolus-organisierenden Regionen (NOR) sind große rRNA-Loops, die auf den Satellitenregionen der p-Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 liegen und in normalen mesothelialen Zellen eine andere Geometrie aufweisen als in maligne transformierten. Die NORs nehmen Aufgaben in der Transkription der rRNA wahr; sie können bei proliferativen Prozessen zahlenmäßig und geometrisch-strukturell verändert sein. Man kann sie durch eine standardisierte Reaktion mit kolloidalem Silber (Öfner et al. 1995) als AgNORs an histologischen Schnitten oder zytologischen Präparaten als schwarze Dots darstellen und ihre Zahl und ihre Einzel- bzw. summativ GröÙe quantifizieren (Biesterfeld et al. 2001).

Die derzeit einzige Indikation zum Einsatz der AgNORs in der zytopathologischen Diagnostik liegt in der Abgrenzung zwischen reaktiven und neoplastischen Mesothelzellen und somit auf dem Gebiet der sicheren Erkennung von malignen Mesotheliomen. Es ließ sich nämlich zeigen, dass die Zahl und Verteilung von AgNORs eine scharfe Trennung von reaktiven und neoplastischen mesothelialen Prozessen erlaubt so dass diese Methode in der Differentialdiagnostik einen hohen Stellenwert hat (Abbildung 11).

Abb. 11: AgNOR-Darstellung in gutartigen Mesothelien (links) und Zellen eines malignen epithelialen Mesothelioms (rechts); in den Tumorzellen sind die AgNORs an Zahl vermehrt, einzeln betrachtet kleiner und von größerer Summenfläche (Böcking 2007, auch verwendet bei Onofre 2008 und bei Onofre et al. 2008)

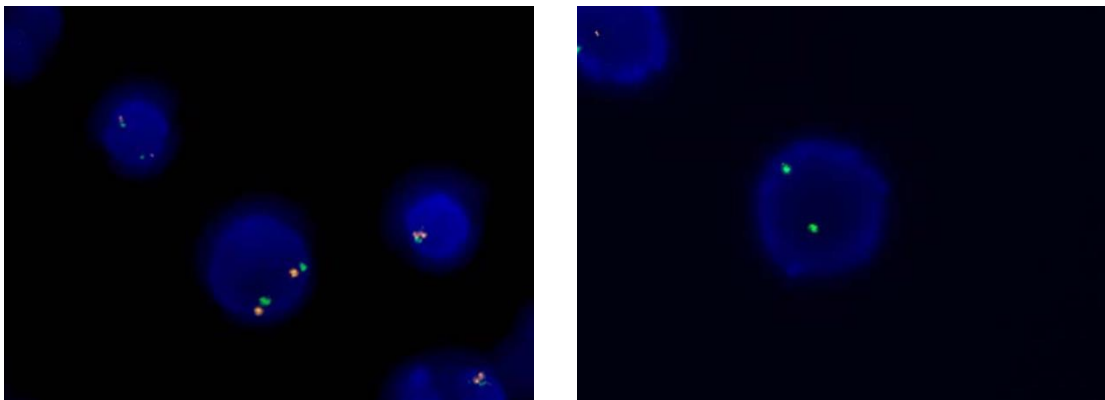


9p21-FISH

Für In-situ-Hybridisierungen stehen die chromogene in situ-Hybridisierung (CISH), die Silber-basierte in situ-Hybridisierung (SISH) und die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) zur Verfügung. Dabei werden durch ein Hybridisierungsverfahren mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte DNA-Sonden an die zuvor durch Hitzedenatu-

rierung einzelsträngig gemachte DNA der Zellkerne gebunden. Bei der sich anschließenden Fluoreszenzmikroskopie werden nach einer Gegenfärbung des Zellkerns mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI die gefundenen Signale auf die Zahl von Kopien der von den DNA-Sonden repräsentierten Genomabschnitte bezogen und auf diese Weise entschieden, ob man einer Einzelzelle einen aneuploiden Charakter zuweisen kann oder nicht. In der Mesotheliomdiagnostik wird ein Zwei-Sonden-Test angewandt, der eine Centromer-nahe Sonde des Chromosoms 9 (CEP 9) und eine Sonde zur Region 9p21 verwendet. Eine homozygote Deletion des Sondenbereichs der Region 9p21, charakterisiert durch einen entsprechenden Signalverlust (Abbildung 12), ist als wichtiges Diagnostikum in der Mesotheliomdiagnostik allgemein anerkannt (WHO 2021).

Abb. 12: 9p21-FISH in der Diagnostik von malignen Mesotheliomen. Grünes Signal: CEP9, Rotes Signal: 9p21. Links eine Zelle aus einer gutartigen mesothelialen Population mit jeweils zwei Signalen, rechts eine Zelle aus einem malignen Mesotheliom mit Verlust beider Signale für 9p21 (Böcking 2007, auch verwendet bei Onofre 2008; rechte Abbildung auch bei Onofre et al. 2008)



In Düsseldorf wurde auf der Basis der Studie von Onofre et al. (2008), die 33 Mesotheliome, 31 Karzinome und 39 reaktive mesotheliale Läsionen umfasste, ein Stufenmodell für die Mesotheliomdiagnostik etabliert. Dieses setzt zunächst die immunzytochemische Identifikation der zur Untersuchung anstehenden tumorverdächtigen Zellpopulation als mesothelialen Ursprungs voraus. Danach wird die DNA-Bildzytometrie eingesetzt und die Diagnostik bei zweifelsfreiem Nachweis von DNA-Aneuploidie als abgeschlossen angesehen. Ist sie nicht eindeutig belegbar, so werden AgNOR-Analyse und 9p21-FISH angeschlossen. In der genannten Studie selber waren 71% der Mesotheliome DNA-aneuploid, 100% der Karzinome und kein reaktiver Erguss. Jeweils ~ 90% der Mesotheliome waren positiv in der AgNOR-Analyse und beim 9p21-FISH. Insgesamt wurde ermittelt, dass mit der Zytologie und der DNA-Bildzytometrie

gemeinsam 87,9% der Mesotheliome erkannt werden konnten. Mit der Hinzunahme der AgNOR-Analyse und im nächsten Schritt der 9p21-FISH waren es 97% bzw. 100%.

Es gibt mehrere Fälle, die für Berufsgenossenschaften (BGs) in Berentungsverfahren gutachterlich bearbeitet wurden, eine zusammenfassende Publikation darüber, wie auch rentenrechtlich relevante Fälle mit ergänzender Anwendung der drei oben dargestellten Methoden gelöst werden konnten und dass die BGs in ihren Entscheidungen den gestellten Diagnosen gefolgt sind (Biesterfeld et al. 2014). Alle Fälle stammten aus auswärtigen Instituten für Pathologie, und die auswärts durchgeführten Untersuchungsergebnisse wurden mitberücksichtigt. Zusammenfassend kann man sagen, dass sechs der dort aufgearbeiteten sieben Fälle rein an zytologischem Material definitiv gelöst werden konnten. In einem Fall, der sich später bei der Obduktion als malignes Mesotheliom herausstellte, waren DNA-Bildzytometrie, AgNOR-Histochemie und 9p21-FISH negativ gewesen, so dass die Diagnose nicht gestellt werden konnte. Der besagte Patient wies aber im Erguss einen sehr hohen Hyaluronsäurespiegel auf. Diese Bestimmung, die nicht Teil der Pathologie, sondern der Labormedizin ist, war an der Lungenklinik in Großhansdorf, aus der der Patient stammte, etabliert. Aus dieser Klinik stammt auch eine grundlegende Studie zum Stellenwert dieser Methode in der Mesotheliomdiagnostik (Welker et al. 2007): Ist bei mesothelialen Läsionen ein bestimmter Grenzwert für den Hyaluronsäurespiegel im Erguss überschritten, so kann offenbar auch aus diesem Laborwert heraus auf Malignität verlässlich geschlossen werden.

Eine systematische Auswertung der in Düsseldorf aus eigenem Material mithilfe der drei Methoden diagnostizierten vielen malignen Mesotheliome war bislang leider nicht möglich, da ein hierzu geplantes Projekt nicht zu Ende geführt werden konnte. Es fehlten zu viele Daten aus dem klinischen Verlauf und der BGs, um zu validen Aussagen gelangen zu können. Bis 2015 waren auf diese Weise ca. 70 Mesotheliome diagnostiziert worden, bis 2022 dürfte mindestens die gleiche Zahl hinzugekommen sein.

4.3 Einsatz immunhistochemischer Marker in der Mesotheliomdiagnostik

Letzten Endes ist es aber nicht realistisch, die vielen Fälle, in denen in der Pathologie morphologische Unregelmäßigkeiten an mesothelialen Zellen gesehen werden, mit den in Düsseldorf etablierten adjuvanten Methoden zu untersuchen. Sie sind einfach zu wenig verbreitet, zu aufwendig und zu teuer, um jedem Betroffenen ausreichend schnell und mit einem adäquaten methodischen und ökonomischen Aufwand angeboten werden zu können. Deswegen sind, wenn sich schon diese adjuvanten Methoden nicht flächendeckend und mit genügender medizinischer Expertise verbreiten lassen, andere Ansätze nötig, um vergleichbar gute, einfacher umsetzbare Angebote zu schaffen.

Hier nun setzen die verschiedenen Überlegungen an, mit adäquaten immunzytochemischen Markern die Mesotheliomdiagnostik zeitlich und inhaltlich zu vereinfachen und Vorgehensweisen zu entwickeln, die eine breite Anwendung finden können. Immunzytochemie nämlich ist eine Methode, die bei manueller Ausführung innerhalb von zwei Tagen durchgeführt werden kann, bei maschineller Ausführung von einem Tag auf den nächsten. Ihre Anwendung ist möglich an Zellblöcken, was von vielen Instituten bevorzugt wird, aber auch an zytologischen Ausstrichen. Die fachärztliche Auswertung pro Marker beläuft sich auf nur wenige Minuten. Aus methodischer Sicht wäre also die Immunzytochemie sicher die Methode der Wahl; aus inhaltlicher Sicht bedarf es aber geeigneter sensitiver und spezifischer Antikörper, die bei Konzeption unserer Studie noch nicht vorlagen.

4.3.1 Stand der Forschung bei Konzeption unserer Studie

Die Studie wurde im Jahr 2015 begonnen und geht in ihrer Konzeption auf die Jahre 2013/2014 zurück, als aus der Düsseldorfer Cytopathologie über die eigenen Erfahrungen in der zytologischen Mesotheliomdiagnostik für BG-Verfahren berichtet wurde (siehe oben, Biesterfeld et al. 2014). Dabei entstand die Überlegung, mit in der Diskussion befindlichen und an der Einrichtung bereits etablierten Markern, die bislang nicht oder nur sporadisch in der Abklärung mesothelialer Läsionen eingesetzt worden waren, eine systematische retrospektive wissenschaftliche Studie am eigenen Krankengut durchzuführen. Zielsetzung war dabei die kritische Überprüfung der diagnostischen

Leistungsfähigkeit der Düsseldorfer Cytopathologie im Hinblick auf die eingesetzten Marker, verbunden mit der Vorstellung, ggfls. über ein geeignetes Markerpanel zu einer schnelleren und dennoch präzisen Mesotheliomdiagnostik zu gelangen.

Als immunhistochemische Markerkandidaten galten damals insbesondere EMA, Glut-1, IMP3 und XIAP. Ihnen wurde in einzelnen wissenschaftlichen Studien an zytologischen Präparaten eine hohe Positivität in Mesotheliomen und eine geringe Positivität in gutartigen mesothelialen Proliferationen zugesprochen; für Desmin war ein gegenteiliges Expressionsmuster berichtet worden. Da EMA und Desmin zum einen bei uns etablierte Marker waren, die für andere Fragestellungen bereits Verwendung fanden, und sie zum anderen den interessanten methodischen Gegensatz vom Expressionsgewinn des einen (EMA) und Expressionsverlustes (Desmin) des anderen Markers zu bieten versprachen, wurde diese Markerkombination ausgewählt.

Für EMA lagen Studien vor, die eine Expression im malignen Mesotheliom in 75%-100% der Tumorzellen und von 0%-25% für reaktive Zellen nahelegten (Attanoos et al. 2003, Shen et al. 2009, Ikeda et al. 2011, noch einmal zusammengefasst bei Le Stang et al. 2020), was berichteten Studien für Glut-1, IMP3 und XIAP glich (Kato et al. 2007, Wu et al. 2007, Shen et al. 2009, Ikeda et al. 2011), Shi et al. 2011). Ebenfalls gab es Studien mit Desmin, bei denen nur etwa 10% der Fälle von malignen Mesotheliomen eine Expression zeigten, hingegen ca. 85% der reaktiven Veränderungen (Davidson et al. 2001, Afify et al. 2002, Attanoos et al. 2003, Hasteh et al. 2010, Hyun et al. 2012). Gegen diese gut klingenden Werte wurde allerdings eingewandt, sie seien sozusagen schön und gut für wissenschaftliche Studien, aber bei mindestens 10%-igem Fehler in beide Richtungen nicht ausreichend für diagnostische Zwecke bei individuellen Patienten geeignet (Churg und Galateau-Sallé 2012).

EMA wurde in der Cytopathologie seinerzeit als ergänzender Marker in der Diagnostik epithelialer Läsionen eingesetzt, insbesondere in Fällen, in denen die klassischen Anwendungen von Zytokeratinen keine eindeutigen Ergebnisse erbrachte. Desmin wurde als klassischer myogener Marker bei der Typisierung von mesenchymalen Raumforderungen verwendet, beispielsweise im Verbund mit S-100, CD117 und DOG-1 bei Punktaten aus der Magenwand zur Differentialdiagnostik zwischen Leiomyomen, Neurinomen und gastrointestinalen Stromatumoren (GIST).

4.3.2 Kritische Würdigung der eigenen Studienergebnisse

Unsere Studie umfasste mit Ergusspräparationen von 85 Mesotheliomen bezogen auf einen bestimmten diagnostischen Zeitraum alle noch verfügbaren Fälle, an denen bereits in der Primärdiagnostik eine EMA- und / oder Desmin-Immunzytochemie vorgenommen worden war oder noch nachträglich durchgeführt werden konnte. Gegenübergestellt wurde diesen als Kontrollen 24 Adenokarzinome (mit pro Marker 22 Beobachtungen) und 23 reaktive mesotheliale Veränderungen.

Bezüglich EMA der Leistungsdaten kann auf Tabelle 10 verwiesen werden, in der die drei Auswertemodi der semiquantitativ erhobenen EMA-Expressionen (0 v. 1-3, 0-1 vs. 2-3 und 0-2 vs. 3) gegenübergestellt sind. Im Groben betrachtet ist die EMA-Expression in Mesotheliomen in der Tat die Regel, in reaktiven Mesothelien die Ausnahme. Je nach dem, welches Maß an Spezifität man wählt, lässt sich eine klinisch nutzbare Sensitivität von 44,7% (0-2 vs. 3, Spezifität 96,5%) bzw. von 69,4% (0-1 vs. 2-3, Spezifität 91,8%) erzielen. Dies bedeutet, dass aufgrund der eigenen Erfahrungen EMA durchaus eine Bedeutung in der Mesotheliomdiagnostik zugesprochen werden könnte, sozusagen als ein gewisser Baustein in einer aus mehreren Markern oder adjuvanten Methoden bestehenden Diagnostik. In Fällen, die in der konventionellen Zytologie unklar wären (Kategorie „zweifelhaft“), könnte eine stärkere EMA-Expression (bei Nachweis einer mesothelialen Herkunft der in Frage stehenden Zellen) als Indikator dafür genommen werden, einen „dringenden Verdacht“ auf ein malignes Mesotheliom zu äußern, somit eine diagnostische Kategorie höher zu gehen und eine weiterführende Diagnostik zu empfehlen. Beweiskraft käme dem Ergebnis der Immunhistochemie aber nicht zu, da die Spezifität unter der Maßgabe, dass aus einer solchen Diagnose auch eine operative oder chemotherapeutische Therapieentscheidung resultieren würde, trotz Werte von > 90% bzw. > 95% noch nicht hoch genug ist.

Bei Desmin zeigte sich in der Tat das aus der Literatur zu erwartende Fehlen einer Expression in den malignen Mesotheliomen. Lediglich 19 Fälle (22,9%) zeigten überhaupt eine Desmin-Expression, und nur in drei Fällen (3,6%) fanden sich mehr als 10% Desmin-positive Mesotheliomzellen. Die Sensitivität des Markers ist somit durchaus sehr hoch, bezogen auf die beiden oben genannten Konstellationen der 19 Fälle (0 vs. 1-3: 90,4%) bzw. der drei Fälle (0-1 vs. 2-3: 94,6%). Das nutzt aber insofern nichts, als auch die große Mehrzahl der reaktiven Mesothelien Desmin-negativ war, so dass sich

Werte für die Spezifität von höchstens knapp 10% ergaben, was den Einsatz als diagnostischen Marker in der Praxis ausschließt.

Letzteres Resultat weicht deutlich von den Erfahrungen, die andere in der Literatur gesammelt haben (siehe Kapitel 4.3.1), ab. Eigentlich durchgehend war beschrieben, dass reaktive oder normale Mesothelien in hohem Maße (gemittelt ca. 85% der Fälle) eine Desmin-Expression aufwiesen. Diese Zahlen wurden in unserer Arbeit in keiner der drei Gruppen (Mesotheliome, Adenokarzinome, reaktive Veränderungen) erreicht, auch nicht, wenn man versuchte, nach morphologischen Kriterien zwischen unauffälligen und auffälligen Mesothelien zu differenzieren. Gründe hierfür lassen sich nicht klar benennen. Allgemein ist bekannt, dass in Histologie und Zytologie die jeweiligen Laborbedingungen auf die einzelnen verwendeten Marker hin optimiert werden müssen, was schon einmal zu Unterschieden in der Intensität der Färbungen von Einrichtung zu Einrichtung führen kann. Dieses kann aber nicht als Argument für derartige grundlegende Abweichungen der Ergebnisse herangezogen werden. Bei Anwendungen in anderen Fragestellungen ist Desmin in der Cytopathologie in Düsseldorf immer verlässlich einsetzbar gewesen, so dass auch der eingesetzte Primärantikörper nicht als möglicherweise zu schwach verantwortlich gemacht werden kann. Seine Domäne in Düsseldorf liegt bis heute in der Differentialdiagnostik von Stromatumoren des Magen-Darm-Traktes, wo er als Panelmarker mit S-100, CD117 (c-kit) und DOG-1 eingesetzt wird.

Bezüglich definierter Untergruppen ergaben sich für EMA und Desmin jeweils keine Unterschiede in der Mesotheliomdiagnostik oder bei der Expression in nicht-neoplastischen Mesothelien, weder beim Geschlecht, noch beim Alter der Patienten oder bei der Entnahmelokalisation, was auch nicht zu erwarten gewesen war. Bei Adenokarzinomen hätte man möglicherweise, wenn die Gruppe größer gewesen wäre, Unterschiede finden können. Bezüglich der Tumorentität führen bei Frauen beispielsweise in der Pleura erfahrungsgemäß Karzinosen durch Mammakarzinome, bei Männern durch Lungenkarzinome. Bezüglich der Lokalisation finden sich einfach in der Pleura häufig Primärtumoren der thorakalen Organe Mamma und Lunge, im Abdomen hingegen der abdominalen Organe des oberen und unteren Gastrointestinaltraktes sowie des inneren weiblichen Genitale.

4.4 Aktuelles Konzept in der zytologischen Mesotheliomdiagnostik

Inzwischen sind seit der Konzeption und Durchführung der Studie ein paar Jahre vergangen, in der viele weitere diagnostische Ansätze erprobt worden sind, die hier nicht nachgezeichnet werden sollen. Aktuell kommt den Antikörpern BAP-1 („*Breast cancer 1-associated protein*“) und MTAP („*Methylthioadenosin-Phosphorylase*“), die um 2018 herum in die Diagnostik eingeführt wurden, eine besondere Bedeutung zu.

Das BAP1-Gen, lokalisiert auf der chromosomalen Region 3p21, kodiert für eine im Zellkern befindliche Deubiquitinase, die als eine antigene Struktur für den BAP1-Antikörper verwendet wird. Erstmals 2011 wurden in einer Arbeit mit dem selbst-erklärenden Titel „*The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma*“ (Bott et al. 2011) über die Inaktivierung des Gens in malignen Mesotheliomen berichtet und später diagnostisch nutzbar gemacht.

Das MTAP-Gen ist auf dem gleichen chromosomalen Abschnitt gelegen wie das p16-Gen auch, nämlich auf 9p21.3. Das MTAP-Protein wiederum ist ein Enzym, das im Purinstoffwechsel eine Rolle spielt und an der Rückgewinnung von Adenosin und Methionin teilhat. Sein diagnostischer Wert liegt in der hohen Korrelation seines Ausfalls mit einer gleichzeitigen Deletion des p16-Gens, so dass hier die Chance für einen immunhistochemischen einfachen Tests als Surrogat für eine FISH-Untersuchung gesehen wurde. Der häufige Ausfall in malignen Mesotheliomen und der Zusammenhang mit dem p16-Ausfall wurden bereits 2003 FISH-basiert beschrieben (Illei et al. 2003), ein Hinweis auf seine diagnostische Wertigkeit in einer immunhistochemischen Anwendung ergab sich etwa 10 Jahre später, offenbar erstmals in einer Arbeit von Zimling et al. (2012).

Heute ist der Wert von BAP-1 und MTAP in der immunhistochemischen Diagnostik von malignen Mesotheliomen so hoch, dass sie alle anderen früheren Marker im Grunde verdrängt haben. Ihre Verwendung wird auch in der neuen WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2021 explizit empfohlen (WHO 2021). Aus dieser ist auch ein grundsätzlicher Paradigmenwechsel in der Diagnostik ablesbar, der auch eine rein zytologisch basierte Diagnostik von malignen Mesotheliomen nunmehr hoffähig macht. Im Kapitel „*Diffuse mesothelioma*“ ist der Unterscheidung zwischen reaktiven und neoplastischen

mesothelialen Erkrankungen ein eigenes Unterkapitel mit dem Titel „*Ancillary studies for distinguishing mesothelioma from benign mesothelial proliferations*“ gewidmet. In diesem wird zwischen zytologischen und histologischen Ansätzen nicht mehr unterschieden.

Insbesondere wird dort herausgestellt, dass mit der Anwendung einer BAP1- bzw. MTAP-Immunhistochemie allein oder in Kombination mit einer 9p21-FISH eine Spezifität in der Unterscheidung beider Krankheitsgruppen von 100% erreicht werden kann, wobei die Sensitivität der Einzeluntersuchungen mit gut 40% bis 65% angegeben wird. Kritisch ist dabei, dass die BAP1- und die MTAP-Immunhistochemie auf einen Expressionsverlust, nicht etwa auf eine Expression, setzen, so dass das Vorhandensein von nicht-neoplastischen Mesothelien oder anderen internen Kontrollen verpflichtend ist. Auf diese Weise wäre auszuschließen, dass aus methodischen Gründen (Autolyse, Degeneration der Zellen, Fehler in der technischen Markeranwendung) die Immunhistochemie nicht funktioniert hat. Üblicherweise sollten aber, von Ausnahmen abgesehen, solche internen Kontrollen zur Verfügung stehen.

Dass diese Anwendungen nicht nur an histologischen (Chapel et al. 2020), sondern auch an zytologischen Materialien funktionieren und sinnbringend sind, wurde aktuell in einer Übersichtsarbeit mit dem Titel „*Evidence-based diagnostic performance of novel biomarkers for the diagnosis of malignant mesothelioma in effusion cytology*“ herausgestellt (Girolami et al. 2022). Im Folgenden sind die Ergebnisse der Übersichtsarbeit bzgl. BAP1 und 9p21 wiedergegeben. Die einzelnen Studien, auf die sich die Arbeit bezieht, sind ganz überwiegend nicht sehr groß und umfassen zum Teil nur weniger als 20 Fälle; andere wiederum sind aber auch umfangreicher. Mehr als 50 maligne Mesotheliome schließt aber bzgl. der 9p21-FISH nur eine von 17 Studien ein, bei BAP1 sind es drei von 18. Summa summarum kommen aber letztendlich für BAP1 665 maligne Mesotheliome und 578 gutartige mesotheliale Prolifere zusammen, für 9p21 sind es 393 bzw. 323 Fälle, also eine insgesamt schon erhebliche Zahl.

Die beiden folgenden modifizierten Abbildungen zeigen Sensitivität und Spezifität der Arbeiten nach aufsteigender Sensitivität angeordnet (Abbildungen 13 und 14).

Abbildung 13: Sensitivität und Spezifität der 9p21-FISH in der Erkennung maligner epitheliale Mesotheliome in 17 Studien, aufsteigend geordnet nach der Sensitivität; modifiziert nach Girolami et al. 2022

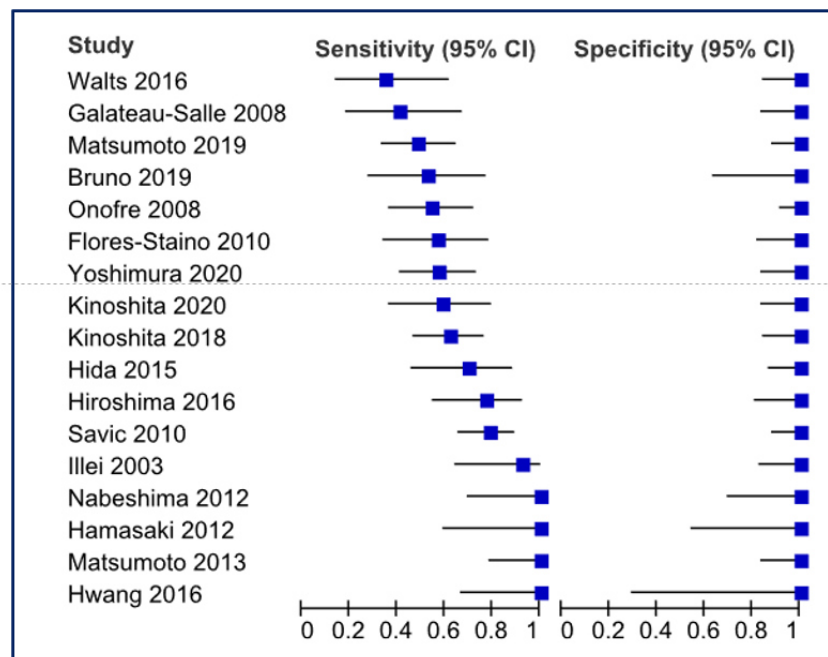
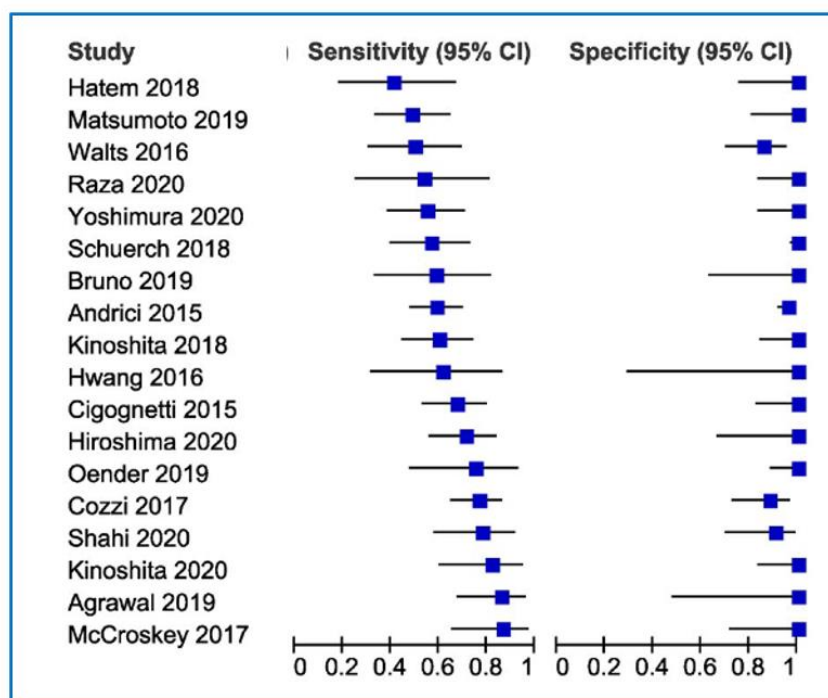


Abbildung 14: Sensitivität und Spezifität der BAP1-Immunhistochemie in der Erkennung maligner epitheliale Mesotheliome in 18 Studien, aufsteigend geordnet nach der Sensitivität; modifiziert nach Girolami et al. 2022



In Tabelle 28 sind die Ergebnisse der 17 bzw. 18 Studien unsererseits aufsummiert in Zahlen wiedergegeben und um die Werte zu Sensitivität, Spezifität, positivem Prädiktionswert und negativem Prädiktionswert sowie zur Gesamttrefferbarkeit ergänzt worden. Mit aufgenommen wurden ferner die von Girolami et al. mit dem Metandi-Schätzer (Harbord und Whiting 2009) ermittelten „Pooled Estimates“ für Sensitivität und Spezifität, also Schätzer, die nach biometrischen Kriterien eine Wichtung zwischen den Studienumfängen vornehmen, um einen Bias in der Ergebnisdarstellung weitestgehend zu vermeiden (Hammer et al. 2009).

Tabelle 28: Summative Daten zur 9p21-FISH und zur BAP1-Immunhistochemie in der zytologischen Erkennung maligner epitheliale Mesotheliome in 17 bzw. 18 Studien (Girolami et al. 2022). Erfasst wurden für 9p21 393 Mesotheliome und 323 reaktive Veränderungen, für BAP1 616 Mesotheliome und 538 reaktive Veränderungen. Normal gedruckte Daten wurden aus der Arbeit selber berechnet, die kursiv gesetzten Werte aus der Arbeit übernommen. Die letzten beiden Zeilen beziehen sich auf die Positivität mindestens einer der beiden Untersuchungsmethoden („nicht ausschließendes oder“). Werte in Klammern geben die Grenzen eines 95%-Konfidenzintervalls an.

Diagnose	9p21-FISH		BAP1-Immunhistochemie	
	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Malignes Mesotheliom	262	131	399	217
Reaktives Mesothel	0	323	17	521
Chi²-Test	< 0,0001		< 0,0001	
Sensitivität	66,7%		64,8%	
Spezifität	100%		96,8%	
Positiver Prädiktionswert	100%		95,9%	
Negativer Prädiktionswert	71,1%		70,4%	
Gesamttrefferbarkeit	81,7%		79,7%	
Pooled Estimate Sensitivity	62% (53%-71%)		59% (65%-71%)	
Pooled Estimate Specificity	100%		99% (93%-100%)	
Pooled Estimate Sensitivity	83% (78%-89%)			
Pooled Estimate Specificity	100%			

Zusammenfassend lässt sich bezogen auf die Pooled-Estimate-Werte sagen, dass mit jeder der beiden Untersuchungen unabhängig voneinander eine Mesotheliomdiagnose jeweils in ca. 60% der Fälle möglich ist und sich durch die Kombination beider Methoden eine Diagnosestellung in > 80% erbringen lässt, ohne dass falsch positive

Diagnosen zu befürchten sind. Auch im 2021 von der WHO neu eingeführten Mesothelioma in situ sind die Markerverluste bereits präsent (Sauter et al. 2022, Louw et al. 2022), so dass es sich um ausreichend früh auftretende Veränderungen handelt und somit vermieden werden können sollte, dass Frühformen übersehen werden.

Nicht eingegangen wird hier auf die Ergebnisse, die in der gleichen Arbeit unter anderem für die Immunmarker IMP3, GLUT1 und MTAP zusammengefasst wurde und die ebenfalls sehr ordentlich waren, insbesondere für MTAP. Mit diesem Marker, bei dem ebenfalls ein Expressionsverlust als „positiv“ interpretiert wird, ergaben sich Pooled-Estimate-Werte für die Sensitivität von 47% (95%-Konfidenzintervall: 38%-57%) und für die Spezifität von 99% (95%-Konfidenzintervall: 99%-100%). Dass dieser Marker in der aktuellen WHO-Klassifikation, die ja weltweit umsetzbare Vorgaben erarbeiten soll, gegenüber der „besseren“ 9p21-FISH in den Empfehlungen vorgezogen wird, könnte daran liegen, dass Immunhistochemie weltweit einen höheren Verfügungsgrad hat als die FISH, so dass es gerade auch in weniger entwickelten Gebieten der Erde leichter und billiger sein dürfte, zwei Immunreaktionen vorzunehmen, als nach einer Immunreaktion den Rest des Gewebes an ein Referenzzentrum zu schicken oder selber die teure FISH-Ausstattung und im Vergleich zur Immunhistochemie auch teurere und technisch kniffligere FISH-Anwendung zu etablieren. Ein Ersatz wiederum der 9p21-FISH durch die p16-Immunhistochemie, was einer immunhistochemischen Surrogat-Darstellung der FISH entsprechen würde, ist nicht möglich, da sich keine gleichwertigen Ergebnisse erzielen lassen (Hida et al. 2017, Berg et al. 2018).

Nicht berücksichtigt wurde die Anwendung des Immunmarkers 5-hmC, der aktuell ebenfalls in der Diskussion steht und als diagnostisch nutzbarer Marker angesehen wird; auch für ihn ergaben sich Werte für die Spezifität von 100% (Chapel et al. 2019, Alsugair et al. 2022). Inwieweit dieser etwas später etablierte Marker sich neben BAP1 und 9p21 bzw. MTAP etablieren wird, muss sich in Zukunft zeigen.

Fasst man die Zahlen noch einmal klinisch zusammen, so lassen sich heute somit > 80% der malignen Mesotheliome zytologisch, d.h. ohne Biopsie und rein unter Verwendung von Ergusspunktaten, diagnostizieren - was für die oft alten und womöglich multimorbiden Patienten einen wirklichen Fortschritt bedeutet. Für sie können somit alle weiteren diagnostischen Eingriffe, die über die häufig schon aus symptomatischen Gründen notwendige Ergusspunktion hinausgehen, komplett wegfallen.

Diese Vorgehensweise wird auch vom Deutschen Mesotheliomregister am Institut für Pathologie der Ruhr-Universität Bochum inzwischen akzeptiert, von dem früher eigentlich regelhaft eine histologische Sicherung von Mesotheliomen verlangt wurde. In dieser hoch angesehenen Einrichtung werden nach wie vor eine Vielzahl von Verdachtsfällen von malignen Mesotheliomen vorgestellt und auch mit versicherungsrechtlicher Relevanz entschieden. Der große Vorteil für die Zuweiser ist dabei, dass das Deutsche Mesotheliomregister unentgeltlich arbeitet, da es über die Berufsgenossenschaften finanziert ist. Es versteht sich dabei allerdings als reiner Dienstleister, wesentliche wissenschaftliche Impulse gehen von ihm nicht aus: Gibt man in einer Pubmed-Recherche die Namen derjenigen beiden Pathologinnen ein, die für die Befunde seit langem verantwortlich zeichnen (konkret: *[(Tannapfel or Theile) and mesothelioma]*), so finden sich seit 2002 lediglich 18 Treffer zu dieser Thematik, darunter auch Korrespondenzen und Übersichtsarbeiten. Die Aufgaben des Registers wurden 2018 in einer solchen Übersichtsarbeit aktuell zusammengefasst (Feder et al. 2018).

4.5 Ausblick: Kommende Ansätze in der Mesotheliomdiagnostik

Es ist klar, dass sich die diagnostische Medizin auch in Zukunft weiterentwickeln wird. Blickt man 25 Jahre zurück in eine Zeit, in der es beispielsweise noch keinen Calretinin-Antikörper und keine EpCAM-Antikörper gab, dann kann man sich vorstellen, wie sehr in der damaligen Epoche der Hochleistungsmedizin in der Ergussdiagnostik schon die Unterscheidung einer mesothelialen Proliferation (gutartig / bösartig) von einer Karzinose eine echte Herausforderung war. Heute ist man auf diesem Gebiet schon wesentlich weiter. Die Problemstellung, die unserer Studie zugrunde lag, nämlich die sattelfeste zytologische Diagnostik von malignen Mesotheliomen, ist heute vielleicht noch nicht allgemein beantwortet, da noch nicht alle Fälle mit der derzeitigen Markerkombination erkannt werden können. Aber in etwa 80% der Fälle auf eine belastende invasive Diagnostik verzichten zu können, sollte schon als wesentlicher Fortschritt anerkannt werden.

In der heutigen Zeit der an Erkenntnissen quasi explodierenden molekularen Medizin steht zu erwarten, dass in den nächsten Jahren entsprechende Testverfahren für die Mesotheliomdiagnostik entwickelt und erprobt werden. Aktuell werden

zunehmend diverse molekulare Mechanismen von Mesotheliomen bekannt, wobei sich anscheinend insbesondere auf dem Gebiet epigenetischer Marker diagnostisch nutzbare Ergebnisse abzeichnen (Rozitis et al. 2020). Molekulare diagnostische Testverfahren sind aber wohl noch in weiter Ferne, solange wie in der oben genannten Arbeit übliche relativierende Formulierungen wie „*larger studies with larger cohorts of patients are needed to assess the use of these (...) markers (...) to clarify clinical relevance*“ verwendet werden.

Auch auf dem Gebiet der Immunhistochemie und der FISH, also im Bereich der mikroskopischen Untersuchungen und der morphologisch visualisierbaren molekularen Verfahren, sind derzeit keine neuen Marker für die Mesotheliomdiagnostik absehbar. So urteilen Churg und Naso in einem Review von 2020, dass über BAP1-Immunhistochemie und 9p21-FISH hinausgehende Anwendungen bislang uneinheitliche Ergebnisse zeigten (z.B. der NF2-FISH) oder einfach noch zu wenige Publikationen vorhanden seien, um zu einer Empfehlung zu gelangen (bezogen auf EZH2, Cyclin-D1, PD-L1 und CD47).

Letztendlich werden sich die Methoden durchsetzen, die zum einen falsch-positive Diagnosen vermeiden, also eine maximale Spezifität haben, dabei über eine hohe, möglicherweise im Verbund mehrerer Anwendungen hohe Sensitivität haben und gleichzeitig in möglichst vielen Institutionen leicht anwendbar sind. Insofern haben die jetzigen, in Kapitel 4.4 skizzierten Verfahren gute Chancen, auch in Zukunft mit vorne berücksichtigt zu werden. Überraschend ist, dass sich manche Autoren Sorgen darum machen, man könne mit den bisherigen Verfahren und wohl auch molekularpathologisch nicht zwischen einem Mesothelioma in situ und einem invasiven malignen Mesotheliom unterscheiden. Dieser Gedanke ist nur dann verständlich, wenn man rein in den Kriterien der Morphologie denkt und Klinik und Bildgebung nicht berücksichtigt. Überlegt man sich aber, welche Patienten man in der Regel vor sich hat, nämlich solche, die (am Beispiel des Pleurabefalls) aufgrund von voluminösen Ergüssen ateminsuffizient sind, punktionspflichtig sind und dann im CT eine Verdickung der pleuralen Membranen zeigen, dann stellt sich diese Differentialdiagnose im praktischen Alltag überhaupt nicht, sondern lediglich die Frage, ob eine entzündliche oder eine neoplastische Läsion vorliegt. Außerdem wäre es möglich, biochemische Bestimmungen wie den Hyaluronsäuregehalt im Erguss als Diagnostikum hinzuzunehmen. Wie auch immer sich die

diagnostischen Tests entwickeln, so ist die eindeutige zytologische Diagnose eines malignen Mesothelioms bereits jetzt in vielen Fällen und mit neueren Methoden in Zukunft vielleicht in noch mehr Fällen möglich.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Afify AM, Al-Khafaji BM, Paulino AFG, Davila RM: Diagnostic use of muscle markers in the cytologic evaluation of serous fluids. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* (2002) 10: 178–182
2. Alsugair Z, Kepenekian V, Fenouil T, Glehen O, Villeneuve L, Isaac S, Hommell-Fontaine J, Benzerdjeb N: 5-hmC loss is another useful tool in addition to BAP1 and MTAP immunostains to distinguish diffuse malignant peritoneal mesothelioma from reactive mesothelial hyperplasia in peritoneal cytology cell-blocks and biopsies. *Virchows Arch* (2022) 481: 23-29
3. Attanoos RL, Griffin A, Gibbs AR. The use of immunohistochemistry in distinguishing reactive from neoplastic mesothelium. A novel use for desmin and comparative evaluation with epithelial membrane antigen, p53, platelet-derived growth factor-receptor, P-glycoprotein and BCL-2. *Histopathology* (2003) 43: 231-238
4. Aumüller, Duale Reihe - Anatomie, 2. Auflage (ISBN 978-3-13-136042-7), © 2007, 2010 Georg Thieme Verlag KG S.501 ff.
5. AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.) (Hrsg.): S2k-Leitlinie "Diagnostik und Begutachtung asbestbedingter Berufskrankheiten", Version 2.1 von November 2020. Online unter https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/002-038l_S2k_Diagnostik_und_Begutachtung_asbestbedingter_Berufskrankheiten_2021-01.pdf, zuletzt aufgerufen am 07.02.2023
6. AWMF-Register Nr. 002/038 Interdisziplinäre S2-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumonie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umwelt. *Onkologe* (2009) 15:250-260, Springer Medizin Verlag, Berlin
7. Baur X, Clasen M, Fisseler-Eckhoff A, Heger M, Hering KG, Hofmann-Preiss K, Köhler D, Kranig A, Kraus T, Letzel S, Neumann V, Tannapfel A, Schneider J, Sitter H, Teschler H, Voshaar T, Weber A: Diagnostik und Begutachtung asbestbedingter Berufskrankheiten. Interdisziplinäre S2-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin. *Pneumologie* 2011; 65: e1– e47
8. Bekanntmachung des Bundesministeriums für Arbeit und Soziales vom 30.12.2009; IVa 4-45222-4114 - GMBI 5/6/2010; S. 107 ff.
9. Berg KB, Dacic S, Miller C, Cheung S, Churg A: Utility of methylthioadenosine phosphorylase compared with BAP1 immunohistochemistry, and CDKN2A and NF2 fluorescence in situ hybridization in separating reactive mesothelial proliferations from epithelioid malignant mesotheliomas. *Arch Pathol Lab Med* (2018) 142: 1549-1553
10. Biesterfeld S: Zurverfügungstellung urheberrechtlich geschützten Bildmaterials aus dem Bestand des Funktionsbereichs Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf, 2015
11. Biesterfeld S, Farokhzad F, Klüppel D, Schneider S, Hufnagl P: Improvement of breast cancer prognostication by cell kinetic based AgNOR quantification of the MIB-1 positive tumor cell compartment. *Virchows Arch* (2001) 438: 478-484
12. Biesterfeld S, Gerres K, Fischer-Wein G, Böcking A. Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J Clin Pathol* (1994) 47:38-42
13. Biesterfeld S, Schramm M, Schad A, Pomjanski N: Zytopathologische Ergussdiagnostik in der berufsgenossenschaftlichen Begutachtung von Asbest-assoziierten malignen Mesotheliomen und Lungenkarzinomen. *Pneumologie* 68: 270-276, 2014

14. Böcking A: Zurverfügungstellung urheberrechtlich geschützten Bildmaterials aus dem Bestand des Instituts für Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf, 2007
15. Botelho de Miranda Onofre M: Adjuvant methods to identify and type tumor cells in serous effusion. Diss., RWTH Aachen, 2008
16. Bott M, Brevet M, Taylor BS, Shimizu S, Ito T, Wang L, Creaney J, Lake RA, Zakowski MF, Reva B, Sander C, Delsite R, Powell S, Zhou Q, Shen R, Olshen A, Rusch V, Ladanyi M: The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat Genet* (2011) 43: 668-672
17. Bundesregierung: Berufskrankheiten-Verordnung vom 31.10.1997 (BGBl I 1997: S. 2623), zuletzt geändert durch Verordnung vom 11.6.2009 (BGBl I; 2009: 1273-1276). Online unter <http://www.gesetze-im-internet.de/bkv/>, zuletzt abgerufen am 07.02.2023
18. Champbell N, Kindler H: Update on malignant pleural mesothelioma. *Semin Respir Crit Care Med* 2011; 32: 102–10
19. Chapel DB, Husain AN, Krausz T: Immunohistochemical evaluation of nuclear 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) accurately distinguishes malignant pleural mesothelioma from benign mesothelial proliferations. *Mod Pathol* (2019) 32: 376-386
20. Chapel DB, Schulte JJ, Husain AN, Krausz T: Application of immunohistochemistry in diagnosis and management of malignant mesothelioma. *Transl Lung Cancer Res* (2020) 9 (Suppl 1): S3-S27
21. Cibas ES, Ducatman BS: Cytology. Diagnostic principles and clinical correlates. 5. Ausgabe, Elsevier, Amsterdam, 2020
22. Churg A, Galateau-Sallé F. The separation of benign and malignant mesothelial proliferations. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 1217-1226
23. Churg A, Naso JR: The separation of benign and malignant mesothelial proliferations. New markers and how to use them. *Am J Surg Pathol* (2020) 44: e100-e112
24. Davidson B, Nielsen S, Christensen J, Asschenfeldt P, Berner A, Tisberg B, Johansen P: The role of desmin and N-cadherin in effusion cytology: a comparative study using established markers of mesothelial and epithelial cells. *Am J Surg Pathol* (2001) 25: 1405-1412
25. Deutsches Mesotheliomregister (2015): Jahresbericht 2014. Online unter <https://www.ruhr-uni-bochum.de/pathologie/mam/content/jahresbericht2014.pdf>, zuletzt abgerufen am 07.02.2023
26. Dey P: Diagnostic Cytology. JP Medical, London, 2022
27. DGUV (Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung) (2022): Berufskrankheitengeschehen. Online unter <https://www.dguv.de/de/zahlen-fakten/bk-geschehen/index.jsp>, von dort aus Links auf Registerkarten unter <https://www.dguv.de/de/zahlen-fakten/bk-geschehen/bk-verdachtsanzeigen/index.jsp> und unter <https://www.dguv.de/de/zahlen-fakten/bk-geschehen/anerkannte-bken/index.jsp>, zuletzt aufgerufen am 07.02.2023
28. Falkensteiner Empfehlung (Zitierform): Empfehlung für die Begutachtung asbestbedingter Berufskrankheiten - Falkensteiner Empfehlung; hrsg. von: Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung und Spitzenverband der landwirtschaftlichen Sozialversicherung, Bochum, 2011: <https://publikationen.dguv.de/versicherungsleistungen/berufskrankheiten/2459/empfehlung-fuer-die-begutachtung-asbestbedingter-berufskrankheiten-falkensteiner-empfehlung>, zuletzt abgerufen am 07.02.2023

29. Feder IS, Jülich M, Tannapfel A, Tischoff I: Das Deutsche Mesotheliomregister. Aktuelle pathologische Diagnostik und Leistungen. *Pathologie* (2018) 39: 241-246
30. Galateau-Sallé F: Pathology of malignant mesothelioma. Springer Verlag, Berlin, 2006
31. Girolami I, Lucenteforte E, Eccher A, Marletta S, Brunelli M, Graziano P, Pisapia P, Malapelle U, Troncone G, Scarpa A, Huang T, Pantanowitz L: Evidence-based diagnostic performance of novel biomarkers for the diagnosis of malignant mesothelioma in effusion cytology. *Cancer Cytopathol* 2022; 130: 96-109
32. Haastert, K.: Diagnostische Treffsicherheit der Perikardergusszytologie einschließlich adjuvanter Methoden. Diss., Heinrich Heine-Universität Düsseldorf, 2014
33. Hammer GP, du Prel JB, Blettner M: Avoiding bias in observational studies. *Dtsch Ärztebl Int* (2009) 106: 664-668
34. Harbord RM, Whiting P: Metandi: Meta-analysis of diagnostic accuracy using hierarchical logistic regression. *The Stata Journal* (2009) 9: 211-229
35. Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A: 1997 ESACP consensus report on diagnostic image cytometry. Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. *Anal Cellul Pathol* 1998; 17: 189-200
36. Hasteh F, Lin GY, Weidner N, Michael CW: The use of immunohistochemistry to distinguish reactive mesothelial cells from malignant mesothelioma in cytologic effusions. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 2010; 118: 90-96
37. Henderson DW, Reid G, Kao SC, van Zandwijk N, Klebe S: Challenges and controversies in the diagnosis of mesothelioma: Part 1. Cytology-only diagnosis, biopsies, immunohistochemistry, discrimination between mesothelioma and reactive mesothelial hyperplasia, and biomarkers. *J Clin Pathol* 2013; 66: 847-853
38. Hida T, Hamasaki M, Matsumoto S, Sato A, Tsujimura T, Kawahara K, Iwasaki A, Okamoto T, Oda Y, Honda H, Nabeshima K: Immunohistochemical detection of MTAP and BAP1 protein loss for mesothelioma diagnosis: comparison with 9p21 FISH and BAP1 immunohistochemistry. *Lung Cancer* (2017) 104: 98-105
39. Husain AN, Colby T, Ordóñez N, Krausz T, Attanoos R, Beasley MB, Borczuk AC, Butnor K, Cagle PT, Chirieac LR, Churg A, Dacic S, Fraire A, Galateau-Salle F, Gibbs A, Gown A, Hammar S, Litzky L, Marchevsky AM, Nicholson AG, Roggli V, Travis WD, Wick M: Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: 2012 update of the consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 647-667
40. Hyun TS, Barnes M, Tabatabai ZL. The diagnostic utility of D2-40, calretinin, CK5/6, desmin and MOC-31 in the differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in pleural effusion cytology. *Acta Cytol.* 2012; 56: 527-532
41. Ikeda K, Tate G, Suzuki T, Kitamura T, Mitsuya T: Diagnostic usefulness of EMA, IMP3, and GLUT-1 for the immunocytochemical distinction of malignant cells from reactive mesothelial cells in effusion cytology using cytopspin preparations. *Diagn Cytopathol* (2011) 39: 395-401
42. Illei PB, Rusch VW, Zakowski MF, Ladanyi M : Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2108-2113

43. Jany B, Welte T. Pleural Effusion in Adults-Etiology, Diagnosis, and Treatment. Dtsch Arztebl Int. 2019 May 24;116(21):377-386. doi: 10.3238/arztebl.2019.0377. PMID: 31315808; PMCID: PMC6647819
44. Junker K, Krismann M, Pathologie der Primären Pleuratumoren; Zentralbl Chir 2008; 133: 222-226 Georg Thieme Verlag
45. Kato Y, Tsuta K, Seki K, Maeshima AM, Watanabe S, Suzuki K, Asamura H, Tsuchiya R, Matsuno Y: Immunohistochemical detection of GLUT-1 can discriminate between reactive mesothelium and malignant mesothelioma. Mod Pathol (2007) 20: 215-220
46. Klemperer P, Rabin CB: Primary neoplasms of the pleura. A report of five cases. Arch. Path. (1931) 11: 385-412
47. Koss LG, Melamed MR: Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases. 5. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006
48. Lenhard A: Psychometrica. Online unter <https://www.psychometrica.de/testkennwerte.html>, zuletzt aufgerufen am 07.02.2023
49. Köhler D, Schönhofer B, Voshaar T: Pneumologie. Ein Leitfaden für rationales Handeln in Klinik und Praxis. Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, 2014
50. Konietzko N, Sohrab S, Hinterthaler M, Stamatis G, Rödelberger K, Woitowitz HJ: Das maligne Pleuramesotheliom. Dtsch Ärzteblatt (2000) 48: 3257-3262
51. Konietzko N, Teschler H: Asbest und Lunge. Steinkopff-Verlag, Darmstadt, 1992, S. 129
52. Kroegel C, Costabel U: Klinische Pneumologie. Thieme-Verlag, Stuttgart, 2014
53. Kuppuswamy, LB: Treffsicherheit der Zytodiagnostik bei endosonographisch gewonnenen Nebennierenpunktaten, Diss., Heinrich Heine-Universität Düsseldorf 2017
54. Le Stang N, Burke L, Blaizot G, Gibbs AR, Lebaillly P, Clin B, Girard N, Galateau-Sallé F for the MESOPATH and EURACAN networks: Differential diagnosis of epithelioid malignant mesothelioma with lung and breast pleural metastasis. A systematic review compared with a standardized panel of antibodies - a new proposal that may influence pathologic practice. Arch Pathol Lab Med (2020) 144: 446-456
55. Louw A, van Vliet C, Peverall J, Colkers S, Acott N, Creaney J, Lee YCG, Chai SM: Analysis of early pleural fluid samples in patients with mesothelioma: A case series exploration of morphology, BAP1, and CDKN2A status with implications for the concept of mesothelioma in situ in cytology. Cancer Cytopathol (2022) 130: 352-362
56. Neumann V, Günther S, Müller K, Fischer M: Malignant mesothelioma – German mesothelioma register 1987 – 1999. Int Arch Occup Health 2001; 74: 383–95
57. Neumann V, Müller KM, Fischer M: Peritoneale Mesotheliome – Häufigkeiten und Ätiologie. Pathologe (1999) 20: 169-176
58. Öfner D, Aubele M, Biesterfeld S, Derenzini M, Gimenez-Mas JA, Hufnagl P, Ploton D, Trerè D, Rüschoff J: Guidelines of AgNOR quantification - first update. Virch Arch (1995) 427: 341
59. Onofre FB, Onofre ASC, Pomjanski N, Buckstegge B, Grote HJ, Böcking A: 9p21 deletion in the diagnosis of malignant mesothelioma in serous effusions additional to immunocytochemistry, DNA-ICM, and AgNOR analysis. Cancer (2008) 114: 204-215

60. Ordóñez NG: Application of immunohistochemistry in the diagnosis of epithelioid mesothelioma: a review and update. *Hum Pathol* (2013) 44: 1-19
61. Pokieser L, Bernhardt K, Kreuzer A, Schalleschak J: *Klinische Zytologie der Lunge und Pleura, Handbuch und Farbatlas*. Springer Verlag, Wien, New York 2001
62. Renshaw AA, Dean BR, Antman KH, Sugarbaker DJ, Cibas ES: The role of cytologic evaluation of pleural fluid in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Chest* (1997) 111: 106-109
63. Robens J, Goldstein L, Gown AM, Schnitt SJ: Thyroid transcription factor-1 expression in breast carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 1881-1885
64. RKI (Zitierform): Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.). *Krebs in Deutschland 2017/2018. Häufigkeiten und Trends*. 13. Ausgabe, Berlin, 2021
65. RKI (Zitierform): Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.). *Krebs in Deutschland 2015/2016. Häufigkeiten und Trends*. 12. Ausgabe, Berlin, 2019
66. Robertson HE: "Endothelioma" of the pleura. *J. Cancer Res* (1924) 8: 317-375
67. Rozitis E, Johnson B, Cheng YY, Lee K: The use of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and emerging epigenetic markers in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma (MPM): A review. *Front Oncol* (2020) 10: 1742
68. Sauter JL, Dacic S, Galateau-Sallé F, Attanoos RL, Butnor KJ, Churg A, Husain AN, Kadota K, Khoor A, Nicholson AG, Roggli V, Schmitt F, Tsao MS, Travis WD: The 2021 WHO Classification of tumors of the pleura: Advances since the 2015 classification. *J Thorac Oncol* (2022) 17: 608-622
69. Scherpereel A, Astoul P, Baas P, et al.: Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleura mesothelioma. *Eur Respir J* 2010; 35: 479–95
70. Schütte W, Blankenburg T: *Diagnostische und therapeutische Konzepte bei Patienten mit Bronchialkarzinom und malignem Pleuramesotheliom*. UNI-MED Verlag, Bremen-London-Boston, 2007, S 140-148
71. Shen J, Pinkus GS, Deshpande V, Cibas ES: Usefulness of EMA, GLUT-1, and XIAP for the cytologic diagnosis of malignant mesothelioma in body cavity fluids. *Am J Clin Pathol* (2009) 131: 516-523
72. Shi M, Fraire AE, Chu P, Cornejo K, Woda BA, Dresser K, Rock KL, Jiang Z: Oncofetal protein IMP3, a new diagnostic biomarker to distinguish malignant mesothelioma from reactive mesothelial proliferation. *Am J Surg Pathol* (2011) 35: 878-882
73. Shidham VG, Atkinson BF: *Cytopathologic diagnosis of serous fluids*, Saunders Elsevier, Amsterdam, 2007
74. Statologie. Online unter <https://statologie.de/zweistichproben-t-test-rechner/> bzw. unter <https://statologie.de/chi-quadrat-unabhaengigkeitstest-rechner/>, zuletzt aufgerufen am 07.02.2023
75. Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P: Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the north western Cape province. *Brit J Industr Med* (1960) 17: 260-271
76. Walters J, Maskell NA: Biopsy techniques for the diagnosis of mesothelioma. In: Tannapfel A (Hrsg.): *Malignant mesothelioma*. Berlin: Springer-Verlag, 2011: 45-55

77. Welker L, Müller M, Holz O, Vollmer E, Magnussen H, Jörres RA: Cytologic diagnosis of malignant mesothelioma – improvement by additional analysis of hyaluronic acid in pleural effusions. *Virch Arch* (2007) 450: 455-461
78. Tischoff I, Tannapfel A: Mesotheliom. *Pathologe* 2017; 38: 547–560
79. WHO 2015 (Zitierform): Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC: Tumours of the lung, pleura, thymus and heart. In: WHO Classification of Tumours. IARC, Lyon, 4. Ausgabe 2015, S. 126-136
80. WHO 2021 (Zitierform): Sauter JL, Bueno R, Dacic S, Gill RR, Husain AN, Kadota K, Ladanyi M, Nowak AK, Schmitt F: Diffuse pleural mesothelioma. In: WHO Classification of Tumours. Thoracic tumours. IARC, Lyon, 5. Ausgabe 2021, S. 204-219
81. Weitowitz HJ: Epidemiologie und Prävention des malignen Pleuramesothelioms. *Med. Klinik* (1987) 82 : 578-581
82. Wu M, Sun Y, Li G, Desman G, Wang B, Gil J, Burstein DE: Immunohistochemical detection of XIAP in mesothelium and mesothelial lesions. *Am J Clin Pathol* (2007) 128: 783-787
83. Yates DH, Corrin B, Stidolp PN, Browne K : Malignant mesothelioma in South East England: clinicopathological experience of 272 cases. *Thorax* (1991) 52: 507-512
84. Zentrum für Krebsregisterdaten; hrsg. v. Robert Koch-Institut. Online unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Mesotheliom/mesotheliom_node.html, zuletzt aufgerufen am 07.02.2023
85. Zimling ZG, Jørgensen A, Santoni-Rugiu E: The diagnostic value of immunohistochemically detected methylthioadenosine phosphorylase deficiency in malignant pleural mesotheliomas. *Histopathology* (2012) 60: E96-E105

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen meinen herzlichen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit auf vielfältige Weise unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Biesterfeld für die ausgezeichnete Betreuung und fachliche Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Ehemann Georg bedanken, der mich auf meinem Weg immer mit Rat und wertvollen Anregungen begleitet hat. Bei dieser Gelegenheit danke ich auch meinem Vater und Maria, die mir immer den Rücken freigehalten haben und mir geholfen haben meine Gedanken zu ordnen. Schließlich danke ich auch meiner Familie und Freunden für ihre Ermutigungen und Zusprüche.