

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin II an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. B. Osten)

und der Klinik für Innere Medizin I des Diakoniekrankenhauses Halle (Saale)

## **Untersuchungen zur Bedeutung von Zytokeratinen in der klinischen Zytologie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Andrea Mertz

geboren am 09.06.1978 in Düsseldorf

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. B. Osten (Halle/Saale)
2. PD Dr. med. J. Schreiber (Magdeburg)

Eröffnungsdatum: 26.02.2008

Verteidigungsdatum: 10.07.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000014067**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014067>]

## Kurzreferat und bibliographische Angaben

Die klinische Zytologie stellt einen wichtigen Teilbereich der Diagnostik von verschiedenen benignen und malignen Erkrankungen dar. Allerdings gilt die Histologie im Hinblick auf Tumorerkrankungen als Goldstandard bezüglich der morphologischen Diagnosesicherung, Tumortypenbestimmung und Klassifikation. Mittels einer z.Z. in der Immunhistochemie etablierten Färbemethode sollte anhand zytologischer Präparate überprüft werden, ob die Aussagekraft der Routinezytologie in Kombination mit dieser immunzytochemischen Färbung an Zytologiepräparaten aus pulmonalen Prozessen im Vergleich zur Histologie gesteigert werden kann. Hierbei handelte es sich im Speziellen um ein Alkalische Phosphatase – Anti-Alkalische Phosphatase-Detektionssystem zur Darstellung verschiedener Zytokeratine.

Zunächst wurden von 84 Patienten mittels verschiedener invasiver Entnahmetechniken zytologische Präparate aus pulmonalen Prozessen gewonnen. Nach Herstellung von Giemsa-Präparaten erfolgte die Befundinterpretation (Dignität, Tumortyp) durch einen klinisch tätigen Zytologen. Weiterhin wurde ein anderer Teil der Nativpräparate der immunzytochemischen Färbung zur Darstellung von CK 5/6, CK 7, CK 20 und einem CK-Komplex (CK 5, CK 6 und CK 18) unterzogen und im Verlauf ausgewertet. Nach Feststellung der jeweiligen Zytokeratinmuster konnte sich unter Zuhilfenahme einer Vergleichstabelle eine Tumortypenbestimmung anschließen. Retrospektiv wurden als Referenz dazu die entsprechenden Histologiebefunde verwendet.

Zusammenfassend stellte sich in Bezug auf die Dignitätsbeurteilung der vorliegenden Befunde ein positiver prädiktiver Wert von 0,986 der Routinezytologie ein. Das primäre Adenokarzinom der Lunge wurde zytologisch in 53,85% der Fälle eindeutig erkannt und die Aussagekraft durch das spezielle Zytokeratinmuster auf 80,77% der Fälle verbessert. Im Hinblick auf das pulmonale Plattenepithelkarzinom lag die zytologische Diagnostik bei nahezu 74%, ohne dass eine eindeutige Effektivitätssteigerung durch die Zytokeratinfärbung verzeichnet werden konnte. Auch in der Diagnostik des undifferenzierten großzelligen Karzinoms, des anaplastisch kleinzelligen Karzinoms, anderer seltener Tumore und pulmonaler Metastasen konnte die immunzytochemische Färbung nicht überzeugen.

Insgesamt führte die hier angewandte Darstellung der Zytokeratine in der Diagnostik pulmonaler Prozesse lediglich beim Adenokarzinom zu neuen Erkenntnissen. Wegen enormer Materialkosten und des hohen Zeitaufwandes des Färbeprozesses ist diese Methode als routinemäßige Ergänzung zur konventionellen Zytologie nicht zu empfehlen.

Mertz, Andrea: Untersuchungen zur Bedeutung von Zytokeratinen in der klinischen Zytologie. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Dissertation, 79 Seiten, 2008

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Aufgabenstellung	1
2. Vorbetrachtungen	3
2.1 Einführung in die Thematik	3
2.2 Stand der Erkenntnisse – Epidemiologie und Diagnostik intrapulmonaler Tumore	3
2.3 Theoretischer Hintergrund – Zytokeratine: Aufbau, Funktion und mikroskopische Darstellung	7
2.3.1 Aufbau und Funktion der Zytokeratine	8
2.3.2 Das Prinzip des immunzytochemischen Zytokeratinnachweises	10
2.4 Kriterien der Malignität am zytologischen Befund	11
2.4.1 Veränderungen des Zellkerns	12
2.4.2 Veränderungen des Zellplasmas	14
2.4.3 Gesamtbild der malignen Zellen	14
2.4.4 Tumorkriterien im Zellverband	17
2.5 Klassifizierung der Tumore	17
2.5.1 Anaplastisch kleinzelliges Karzinom	18
2.5.2 Nichtkleinzellige Karzinome	18
2.5.2.1 Adenokarzinom	19
2.5.2.2 Plattenepithelkarzinom	20
2.5.2.3 Undifferenziertes großzelliges Karzinom	21
2.5.2.4 Alveolarzellkarzinom	21
2.5.2.5 Seltene Tumore	22
2.5.3 Pulmonale Metastasen	22
2.5.4 Benigne Tumore	23
3. Eigene Untersuchungen	24
3.1 Patientengut	24
3.2 Methode	25
3.3 Praktische Durchführung	26
3.3.1 Auswahl der Zytokeratinmarker	26
3.3.2 Materialgewinnung und Herstellung der Präparate	28
3.3.3 Die Giemsa-Färbung	30
3.3.4 Die Zytokeratin-Färbung	31

	Seite
4. Ergebnisse	34
4.1 Darstellung und Auswertung der Ergebnisse	34
4.1.1 Zytologiebefunde	34
4.1.2 Histologiebefunde	35
4.1.3 Zytochemiebefunde	38
4.1.3.1 Befundinterpretation – Adenokarzinom	41
4.1.3.2 Befundinterpretation – Plattenepithelkarzinom	42
4.1.3.3 Befundinterpretation – Fehlerhaftes Material	42
4.1.3.4 Probleme der Befundinterpretation	43
4.1.4 Zytologie und Histologie im Vergleich	45
4.1.5 Zytologie und Zytokeratin-Färbung im Vergleich zur Histologie	49
4.2 Fehlerquellen	55
5. Diskussion	56
5.1 Konventionelle Zytologie und Immunzytochemie	56
5.2 Bedeutung von Tumormarkern in der Diagnostik pulmonaler Malignome	60
5.3 Zytokeratine – Bedeutung in der modernen Medizin	60
5.3.1 Zytokeratin 5/6	61
5.3.2 Zytokeratin 7 und 20	63
5.3.3 Pan-CK (Zytokeratin 5,6 und 18)	66
5.4 Zeitaufwand und Kosten	68
5.5 Schlussfolgerungen	69
6. Zusammenfassung	70
7. Literaturverzeichnis	72
8. Thesen	78

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
ADH	antidiuretisches Hormon
Ak	Antikörper
anapl.	anaplastisch
APAAP	Alkalische Phosphatase – Anti-Alkalische Phosphatase
Aufl.	Auflage
bzw.	beziehungsweise
Ca	Karzinom
CA 19-9	Carbohydrat-Antigen 19-9
CEA	karzinoembryonales Antigen
CK	Zytokeratin
CT	Computertomographie
Cyfra 21-1	Zytokeratin 19-Fragment
Da	Dalton (Maßeinheit)
DD	Differentialdiagnose
diff.	differenziert
DNS	Desoxyribonukleinsäure
evtl.	eventuell
FNA	Feinnadelaspiration
FP	falsch positiv
G1-3	Differenzierungsgrade
GFAP	glial fibrillary acidic protein
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GZ	Gesamtzahl
i.d.	in der
IF	Intermediärfilamente
IGF I/II	Insulin-like growth-faktor
IgG	Immunglobulin G
i.S.	im Sinne
k	Kilo (Maßeinheit)
klin.	klinisch
LCA	Leucocyte Common Antigen

M.	Morbus
mal.	maligne
metastat.	metastatisch
mm	Millimeter (Maßeinheit)
µl	Mikroliter (Maßeinheit)
n	Anzahl
nekrot.	nekrotisch
nichtkleinzell.	nichtkleinzellig
NSE	neuronspezifische Enolase
o.g.	oben genannt
p.a.	per analysis
Pan-CK	Pan-Zytokeratin
Pat.-Nr.	Patientennummer
PE-Ca	Plattenepithelkarzinom
PET	Positronenemissionstomographie
RP	richtig positiv
S.	Seite
SCC-Ag	squamous cell carcinoma antigen
SIAD	Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion
sIL-2r	Interleukin-2-Rezeptor
sog.	sogenannt
TK	Teilkollektiv
TNM	T: lokale Tumorausbreitung, N: Lymphknotenbefall, M: Fernmetastasen
TPA	tissue polypeptide antigen
u.	und
u.a.	unter anderem
undiff.	undifferenziert
v.	von
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
z.Z.	zur Zeit
-	negativ
+	positiv

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Die Zytologie, als Lehre von Aufbau und Funktion der Zelle, stellt die Wurzel in einem Geflecht aus mikroskopischer Anatomie, Pathologie und Histologie dar. Untersuchungen an einzelnen Zellen (die kleinsten in-vitro lebensfähigen Einheiten) haben wissenschaftlich gesehen die Erforschung des Feinbaus von Organen und deren Wirkungsweisen im Organismus bewirkt (15). Selbst in der modernen Medizin kann auf die Betrachtung und Interpretation von Zellen und Zellverbänden nicht verzichtet werden, denn viele krankhafte Veränderungen des menschlichen Körpers lassen ihr pathologisches Korrelat auf Zellularebene erkennen. Die Zytologie hat auch heute noch eine große Bedeutung für die Diagnostik von Entzündungen, degenerativen Veränderungen und Tumorerkrankungen.

Historisch gesehen stand die Zytologie bis in das späte 18. Jahrhundert im Schatten der makroskopischen Anatomie. Es fehlten technische Voraussetzungen, die eine mikroskopische Untersuchung ermöglichen. Bis dahin kam die Entwicklung der diagnostischen Hilfsmittel nicht über den Stand von speziell geschliffenen Linsen hinaus. Im Verlauf des 19. Jahrhunderts allerdings erweiterte sich mit fortschreitendem wissenschaftlichen Interesse an der Zelle auch die Mikroskopie. Als Meilensteine der Zytologie gelten bis heute die Zellphysiologie, durch Albert von Koelliker (1804-1881) initiiert, und die Zellulärpathologie, die durch den Pathologen Rudolf Virchow (1821-1902) geprägt wurde. Heutzutage hat die Zytologie durch die Erfindung von Phasenkontrast-, Fluoreszenz-, Polarisations- und Elektronenmikroskopen ein umfassendes Spektrum an Analysemöglichkeiten (45).

Als eigenes Teilgebiet der Medizin befasst sich die Zytodiagnostik mit der Klärung von pathologischen Veränderungen des menschlichen Organismus anhand von Untersuchungen zytologischer Materials. Zum einen kann dieses in Form der sogenannten Einsendungszytologie erfolgen. Hierbei werden nach der Materialgewinnung die Präparate in zentrale Laboreinrichtungen geschickt. Die diagnostischen Aussagen fallen bei dieser Methode fernab vom Patienten und beinhalten die nüchterne Analytik des vorliegenden Präparates. Ein wichtiger Pfeiler der Einsendungszytologie ist die Früherkennung von bösartigen gynäkologischen Tumoren, z.B. des Zervixkarzinoms. Andererseits gibt es die Methode der klinischen Zytologie, die in einem Labor umgesetzt wird, welches direkt einer medizinischen Abteilung angeschlossen ist. In diesem Fall nimmt ein klinisch tätiger Arzt die zytologische Diagnostik vor, wobei ihm zusätzlich umfassende Patientendaten in Form von Anamnese, klinischen und bildgebenden Befunden zur Verfügung stehen (23, 50).

Sowohl in der Frage zur Dignität einer krankhaften Veränderung als auch in der differenzierten Malignomdiagnostik bietet sich die Befundung von Zellmaterial an. Hierbei stehen den klinisch tätigen Zytologen Vorgaben zur Herstellung der Präparate und deren Beurteilung zur Verfügung (50). Gleiches gilt für die histologische Untersuchung von Tumorgewebe, wobei allerdings die als Goldstandard bezeichnete Histologie zusätzlich Rückschlüsse auf umliegende Gewebeprozesse zulässt. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die Leistungsfähigkeit der klinischen Zytologie an Effektivität gewinnen könnte, wenn histologisch etablierte Prozeduren in den Ablauf der klinisch-zytologischen Arbeitsweise eingeführt werden. Dabei ist primär an die Darstellung von Tumormarkern zu denken, die in der Immunhistologie bereits einen großen Stellenwert einnehmen.

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Zytodiagnostik maligner intrathorakaler Tumore liegen soll, ist zu klären, ob anhand zytochemischer Färbungen ein Nachweis tumorspezifischer Zytokeratinmuster gelingt, der eine Effektivitätssteigerung der Methodik mit sich bringen würde. Bei der Verwendung von bronchopulmonalem Material eignet sich insbesondere die Analyse von Zytokeratinen, die bereits immunhistochemisch bei der Klassifikation von Bronchialkarzinomen genutzt wird. Aus diesem Grund soll pulmonales Tumormaterial mit zytochemischen Methoden, die z.Z. nur für die histologische Diagnostik standardisiert sind, angefärbt und danach beurteilt werden. Im Verlauf schließt sich ein Vergleich dieser Resultate mit den Befunden von konventionell gefärbten Zytologiepräparaten (Giemsa-Färbung) an. Zusätzlich erfolgt eine retrospektive Auswertung der histologischen Befunde, die im Rahmen der Basisdiagnostik angefertigt worden sind, so dass letztendlich eine direkte Gegenüberstellung aller drei Methoden vorgenommen werden kann. Weiterhin ist zu prüfen, ob sich die immunzytochemische Darstellung von Zytokeratinen im klinischen Alltag als praktikabel und effektiv erweist.

## **2. Vorbetrachtungen**

### **2.1 Einführung in die Thematik**

Unter den neoplastischen Erkrankungen des menschlichen Körpers ist das Bronchialkarzinom führend im epidemiologischen und klinischen Sinn, da es 25% aller Malignomtodesfälle mit deutlichem Überwiegen des männlichen Patientengutes bedingt. Außerdem beeinflussen steigende Inzidenz und Mortalität der allgemein als „Lungenkrebs“ bezeichneten Erkrankung die medizinischen Statistiken (34, 54, 55, 71).

Aus diesem Grund gab es in den letzten Jahren immer wieder Überlegungen bezüglich einer Vorsorgeuntersuchung bzw. Frühdiagnostik dieser Tumorerkrankung, die hauptsächlich aus Röntgenreihenuntersuchungen des Thorax und konventionellen Sputumanalysen bestanden. Allerdings scheiterte dieses Vorhaben zum einen an zu hohen Kosten, wobei hier besonders das Röntgen-Screening zu erwähnen ist (29). Zum anderen konnte bisher nicht bewiesen werden, dass Vorsorgeuntersuchungen die Mortalität des Bronchialkarzinoms senken konnten. Da jedoch eine frühzeitige und mit Anspruch auf Vollständigkeit durchgeführte Diagnostik bei Verdacht auf Bronchialkarzinom objektiv eine Verbesserung der kurativen Therapiemöglichkeiten und Prognose bedeutet, ist die Weiterentwicklung und Vertiefung bekannter medizinischer Untersuchungsmethoden von großer Wichtigkeit.

### **2.2 Stand der Erkenntnisse – Epidemiologie und Diagnostik intrapulmonaler Tumore**

Pathogenetisch wird das Bronchialkarzinom mit 85% dem inhalativen Zigarettenrauchen zugeschrieben. Des weiteren spielen berufsbedingte Karzinogene wie Arsen, Asbest und Uran mit 8%, Umwelteinflüsse mit 5% und andere Faktoren mit 2% eine eher untergeordnete Rolle (34). Die Inzidenz der Erkrankung wird mit 60/100.000 angegeben. Der Häufigkeitsgipfel liegt im Lebensalter von 55 - 65 Jahren und ist bei der männlichen Bevölkerung zur Zeit noch die häufigste bösartige Tumorerkrankung mit einem Überwiegen von 3:1 im Geschlechterverhältnis (28). Studien aus den 80er Jahren zeigten in diesem Zusammenhang noch ein Verhältnis von 5:1, wobei der Grund für die steigende Zahl der Bronchialkarzinomerkrankungen bei Frauen u.a. im zunehmenden Nikotinabusus zu sehen ist (36).

Um einen Überblick über den histologischen Typ, die Lokalisation und die Ausdehnung des Tumors zu bekommen, stehen zur Zeit zwei gängige Klassifikationen zur Verfügung:

- WHO-Klassifikation mit Berücksichtigung der Histologie (1999)
- TNM-Klassifikation (1998) zur klinischen Stadieneinteilung (Charakterisierung des Primärtumors hinsichtlich Größe, Infiltration benachbarter Organe, Lymphknoten- und Fernmetastasierung)

Zur Veranschaulichung soll in diesem Zusammenhang die WHO-Klassifikation in vereinfachter Form (Tabelle 1) dargestellt werden.

**Tabelle 1: Histologische Einteilung des Bronchialkarzinoms (67)**

Histologische Einteilung des Bronchialkarzinoms (nach WHO 1999)	
Plattenepithelkarzinom	spindelzellig
kleinzelliges Karzinom	Oat-cell-Typ Intermediärtyp kombiniertes Oat-cell-Karzinom
Adenokarzinom	azinär papillär bronchiolo-alveolär solide
großzelliges Karzinom	Riesenzellkarzinom Klarzellkarzinom
adenosquamöses Karzinom	-----
Karzinoidtumor	-----
Bronchusdrüsenkarzinom	adenoid-zystisch Mukoepidermoidkarzinom

Neben den primär intrathorakalen Malignomen ist die Differentialdiagnose einer sekundären Metastasierung extrapulmonaler Tumore in die Lunge stets zu berücksichtigen. Ein breites Spektrum an Diagnostikmethoden ermöglicht den klinisch tätigen Ärzten in den meisten Fällen eine exakte Tumortypenbestimmung.

Primär zählen bildgebende Verfahren, die jedoch nur bedingt zur Beurteilung der Dignität geeignet sind, zur Basisdiagnostik intrathorakaler Prozesse. Des weiteren stehen

(teil-)invasive Techniken zur Materialgewinnung für die histologische und zytologische Untersuchung sowie die Analyse von Tumormarkern zur Verfügung. In diesem Kontext ist auf die Bedeutung der Histologie zu verweisen, denn nur der Befundinterpretation histologischer Präparate obliegt eine definitive Aussage bezüglich Dignität und Klassifikation des vorliegenden Materials. Nach histologischer Absicherung einer Tumordiagnose kann Anspruch auf Vollständigkeit und Korrektheit erhoben werden, so dass an dieser Stelle vom sog. Goldstandard zu sprechen ist. Allein die feingewebliche Untersuchung erlaubt eine Beurteilung des Verhaltens eines Prozesses zum gesunden Gewebe und liefert damit den Beweis des Vorliegens von Benignität oder Malignität. Wenngleich die zytologische Diagnostik eine Bewertung des umliegenden Gewebes nicht zulässt, handelt es sich dabei um eine leistungsfähige Methode, deren Spezifität hinsichtlich der Tumordiagnosestellung bei nahezu 100% anzusetzen ist. Zusätzlich liegt die Sensitivität der Zytologie höher als die der Histologie. Zytologie und Histologie sind sich ergänzende Verfahren (39).

Nachfolgend soll ein kurzer Überblick der zur Zeit gängigen Diagnostikmethoden beim Bronchialkarzinom gegeben werden (10, 34, 67, 71):

#### **a) Bildgebende Verfahren:**

- **Röntgenübersichtsaufnahme** des Thorax
- **Computertomographie** des Thorax zur Darstellung der Tumorausdehnung und Metastasierung
- **Kernspintomographie** des Gehirns bei Verdacht auf Hirnmetastasen
- **Sonographie** von Thorax und Abdomen, **transösophageale Sonographie** und **endobronchialer Ultraschall** zur Beurteilung von thoraxwandnahen bzw. mediastinalen Prozessen und zur Metastasensuche
- **Skelettszintigraphie** bei Knochenmetastasierung
- **Positronenemissionstomographie** zur Klärung gezielter Fragestellungen (z.Z. nur zur Evaluation der Methode empfohlen) (71)

#### **b) Invasive Techniken zur Gewinnung von Material für die morphologische Diagnostik**

##### **1. Bronchoskopische Verfahren:**

- Probeexzision mittels Zange
- Imprintzytologie von Probeexzisionen
- Katheterbiopsie

- Bürstenbiopsie
- perbronchiale Punktion (blind oder unter Durchleuchtung)

## 2. Transösophageale und transtracheale Sonographie mit Nadelbiopsie

### 3. Transthorakale Punktion:

- CT-gestützt
- sonographisch gestützt

## 4. Thorakoskopie und Mediastinoskopie

## 5. Thorakotomie und operative Tumorexstirpation

### c) Tumormarker im Serum:

**Tabelle 2: Tumormarker in der Diagnostik des Bronchialkarzinoms (7, 20, 25, 29, 71)**

<b>Tumorassoziierte Antigene</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>Klinische Bedeutung</b>
Karziñoembryonales Antigen	CEA	Diagnose u. Therapiekontrolle verschiedener Karzinome, DD: Lebertumore
Cytokeratin 19-Fragment	Cyfra 21-1	nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom – hohe Sensitivität bei PE-Ca
squamous cell carcinoma antigen	SCC-Ag	PE-Ca der Cervix uteri u. der Lunge (höchste Sensitivität aller Tumormarker)
tissue polypeptide antigen	TPA	Prognosebeurteilung verschiedener Karzinome (u.a. Kolon-, Rectum-, Mamma-, Uterus- u. Bronchialkarzinom)
<b>Polypeptide</b>		
Ferritin	----	Eisenverteilungsstörung (Neoplasien, Entzündungen)
Interleukin-2-Rezeptoren	sIL-2r	Aktivitätsbeurteilung der Sarkoidose, Lymphomdiagnostik (für die eigentliche Diagnostik des Bronchial-Ca´s bedeutungslos)
<b>Tumorassoziierte Enzyme</b>		
Neuronspezifische Enolase	NSE	kleinzelliges Bronchialkarzinom (Sensitivität >80%)
<b>Tumorassoziierte Hormone</b>		
Adrenokortikotropes Hormon	ACTH	u.a. ektope ACTH-Produktion bei Bronchialkarzinom, sonst: Nebennieren-diagnostik
Antidiuretisches Hormon	ADH	u.a. SIAD bei malignen Tumoren (oft kleinzelliges Bronchialkarzinom)
Insulin-like growth factor	IGF I/II	geringe Bedeutung i. d. Malignomdiagnostik
Kalzitonin	----	u.a. paraneoplastische Hyperkalziämie; sonst: Schilddrüsenkarzinom, Störungen des Calcium-Stoffwechsels

Die oben genannten Vorgehensweisen im Rahmen der pulmonalen Tumordiagnostik stellen zu einem Teil die Basis der klinischen Untersuchung dar (Röntgen, CT, Sonographie, Bronchoskopie, Histologie und Zytologie). Andererseits gehen sie oft über ein praktikables Maß im klinischen Alltag hinaus, da es z.B. in vielen Kliniken an erfahrenen Zytologen mangelt, die im Rahmen der klinischen Diagnostik das Spektrum erweitern könnten. Des Weiteren ist die Analyse des Serum-Tumormarker-Profiles zu nennen, welche trotz großen wissenschaftlichen Interesses bis heute einer standardisierten Vorgehensweise entbehrt.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob nicht eine kombinierte Betrachtung von Zytologie und Interpretation von zytochemischen Markern eine Verbesserung der Gesamtaussage bzw. der Zweckmäßigkeit ergibt. Eine Verbindung dieser Methoden ließe sich auf der Ebene der Immunzytochemie erreichen, da mittels spezieller Färbungen der Präparate über die Routinezytologie hinaus die Darstellung von tumorassozierten Strukturen der Zelle erfolgen könnte. Hierbei wären insbesondere die Marker von Bedeutung, die einen bestimmten Zelltyp charakterisieren und zusätzlich den Grad der Differenzierung widerspiegeln. Besonders in der zytologischen Tumordiagnostik hätte eine solche Methode Vorteile, da mit minimalem Materialbedarf eine Klassifikation von Zell-Linien stattfinden könnte.

Mit diesen Aspekten als Voraussetzung ist noch die Problematik zu klären, welche zytochemisch darstellbaren Zellstrukturen die oben genannten Voraussetzungen erfüllen würden. Unter zusätzlicher Berücksichtigung der histologischen Arbeitsweise fiel in dieser Arbeit die Entscheidung zu Gunsten der Zytokeratine, deren Darstellung mittels monoklonaler Antikörper bereits in der Immunhistochemie zur Tumorklassifikation etabliert ist. Zytokeratine ergeben in ihrer jeweiligen Zusammensetzung ein spezielles Profil, das für verschiedene Epithelzellen festgelegt ist und damit für diagnostische Zwecke geeignet erscheint.

### **2.3 Theoretischer Hintergrund – Zytokeratine: Aufbau, Funktion und mikroskopische Darstellung**

Im folgenden Abschnitt soll ein kurzer Überblick über Zytokeratine und deren Funktionen als Bestandteil des Zytoskeletts geschaffen werden. Des Weiteren schließt sich eine Darstellung der bei der zytochemischen Färbung verwandten Reagenzien und deren Wirkungsweise an.

### 2.3.1 Aufbau und Funktion der Zytokeratine

Als eine Untergruppe der Intermediärfilamente (IF) (Tabelle 3) nehmen die Zytokeratine mit der Errichtung des Zytoskeletts einen wichtigen Stellenwert in Aufbau und Funktion der Zelle ein und sind somit maßgeblich an der Zellstabilität beteiligt.

**Tabelle 3: Übersicht der Intermediärfilamente (2, 22, 75)**

Intermediärfilamente	
Klasse I und II	Zytokeratine
Klasse III	Vimentin, Desmin, GFAP, Peripherin
Klasse IV	Neurofilament-Proteine, alpha-Internexin, Nexin
Klasse V	Lamine (nukleäre Lokalisation)

Die Zytokeratine gehören mit einem Molekulargewicht von 40-68kDa zu den hochkomplexen Polypeptiden. Immunologische und elektrophoretische Untersuchungen konnten bis heute 20 Formen unterscheiden, die wiederum in zwei Gruppen eingeteilt werden:

- saure Typ I-Keratine (CK 9-20) und
- basische Typ II-Keratine (CK 1-8).

Diese Klassifikation und auch die Nummerierung werden den Publikationen von Moll und Vyberg zugrunde gelegt (56, 75).

Die paarweise Anordnung von jeweils einem Zytokeratin der Gruppe I und II bedingt eine Dimerbildung. Die Verbindung zweier Dimere lässt einen Komplex entstehen, der Tetramer genannt wird (64). Durch Tetramer-Polymerisation wird ein Protofilament gebildet, das mit 7 weiteren Protofilamenten ein Tonofilament aufbaut (65). Je nach Zellart liegen die Filamente in einem lockeren Gefüge oder in dicht gedrängten Bündeln (mehrschichtiges Plattenepithel) vor. Eine Verbindung zur Zellwand wird über Desmosomen erreicht, die als Verankerungsstelle dienen (47).

Wird die Zusammensetzung der Zytokeratine in der einzelnen Zelle betrachtet, kann sowohl auf den Zelltyp als auch auf die Differenzierung geschlossen werden. Besonders die Epithelzellen exprimieren ein breites Spektrum an Zytokeratinen. Die folgende Tabelle stellt in diesem Zusammenhang das Vorkommen der einzelnen Zytokeratine im menschlichen Körper dar:

**Tabelle 4: Zytokeratinmuster von Epi- und Mesothel (8, 12, 26, 27)**

<b>einschichtiges Epithel (Zylinderepithel)</b>	<b>CK 7, CK 8, CK 18, CK 19, CK 20 (eingeschränkt)</b>
<b>mehrschichtiges Epithel</b>	<b>CK 5, CK 7, CK 8, CK 14, CK 17, CK 18</b>
<b>Plattenepithel</b>	<b>CK 5, CK 14, CK 19</b>
<b>Mesothel</b>	<b>CK 5, CK 7, CK 8, CK 14, CK 17, CK 18, CK 19</b>

Entartet eine Zelle maligne, behält sie - zumindest teilweise - das Muster der IF-Zusammensetzung bei und wird dadurch für die Tumordiagnostik interessant (68). Denn durch die Ermittlung des Zytokeratin-Profiles der Tumorzellen kann auf den Epitheltyp und den Differenzierungsgrad der Zelle geschlossen werden (3). Beispielsweise überwiegen bei einem Plattenepithelkarzinom die Zytokeratine 5, 6, 14, 16 und 17, wohingegen ein Adenokarzinom mehrheitlich Zytokeratin 7, 8, 18 und 19 exprimiert. Weitere Beispiele zeigt die nachfolgende Darstellung.

**Tabelle 5: Zytokeratinmuster einiger Karzinome (9, 13, 19, 20, 32, 43, 49, 58, 70, 74, 75)**

<b>Plattenepithelkarzinom</b>	<b>CK 5 +, CK 7 -, CK 13 +, CK 8/18/19 +/-</b>
<b>Adenokarzinom der Lunge/ Mamma/ des Endometriums</b>	<b>CK 7 +, CK 8/18/19 +, CK 20 -</b>
<b>Adenokarzinom des Kolons/ Rektums</b>	<b>CK 7 -, CK 20 +</b>
<b>Adenokarzinom der Schilddrüse</b>	<b>CK 7 +, CK 19 -, CK 20 -</b>
<b>Adenokarzinom des Magens/ Pankreas/ der Gallenwege</b>	<b>CK 7 +, CK 13 -, CK 20 +</b>
<b>Prostatakarzinom, Nierenzellkarzinom, hepatozelluläres Karzinom</b>	<b>CK 7 -, CK 20 -</b>
<b>Urothelkarzinom</b>	<b>CK 7 +, CK 13 +, CK 20 +</b>

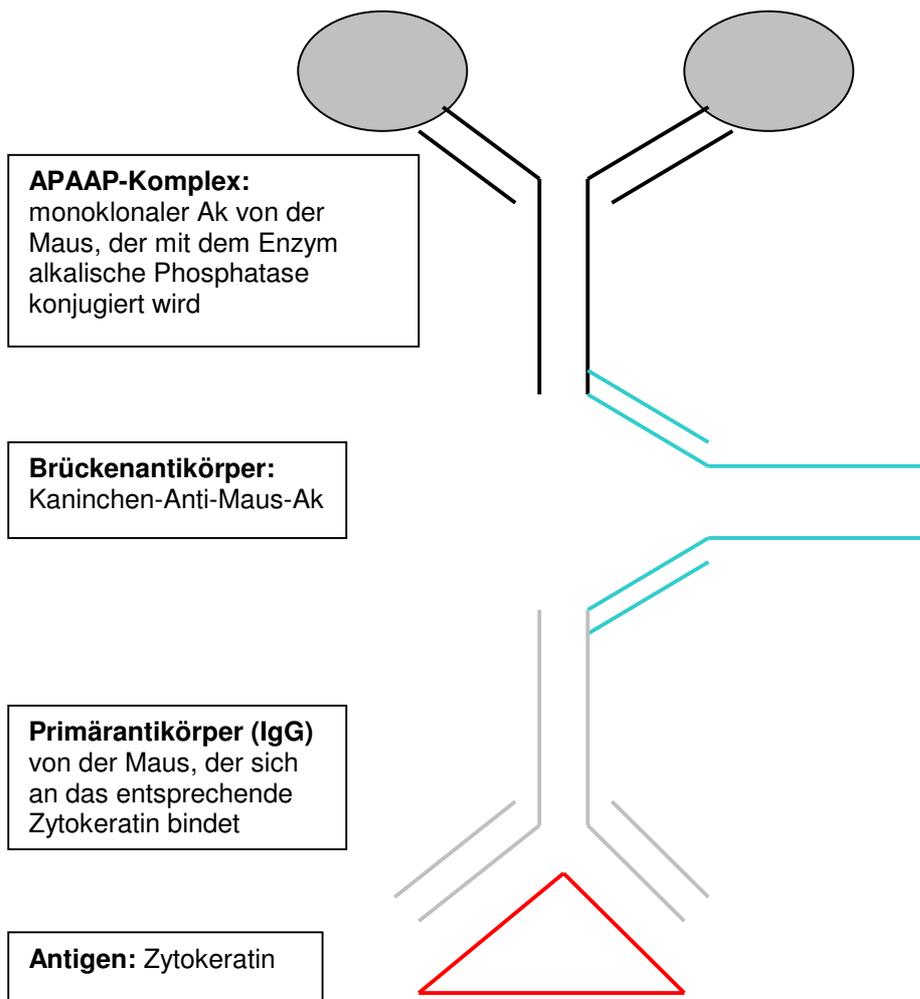
Durch lichtmikroskopische Darstellung der Zytokeratine mittels immunhistochemischer Färbungen der Tumorpräparate besteht die Möglichkeit, ein solches Profil zu erstellen und anhand von Tabellen zu klassifizieren. Allerdings muss stets bedacht werden, dass im Rahmen der Entartung ein Teil der Zellen die Fähigkeit verliert, das ursprüngliche CK-Muster auszubilden und sich somit die Struktur der Ausgangszellen verändert. Hinzu kommt, dass in einigen Fällen bereits in der Fetalzeit verlorengegangene Zytokeratin-Expressionen erneut gebildet werden können. Hierbei ist z.B. auf die Expression von CK 19 im hepatozellulären Karzinom bzw. von CK 8, 18 und 19 in Plattenepithelkarzinomen zu verweisen, so dass an dieser Stelle diagnostische Schwierigkeiten entstehen können (75).

### **2.3.2 Das Prinzip des immunzytochemischen Zytokeratinnachweises**

Die Zytokeratindarstellung basiert auf dem Prinzip einer Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der das Intermediärfilament dem Antigen entspricht, dem in einer festgelegten Reihenfolge Primär-, Sekundärantikörper und ein farbloses Chromogen-Substrat hinzugefügt werden. Diese Methode wird als indirekt bezeichnet, da nicht der Primärantikörper mit einem Chromogen-Substrat ein farblisches Endprodukt entstehen lässt (sogenannte direkte Methode), sondern durch Zwischenschalten von Sekundärantikörpern eine Steigerung der Sensitivität erreicht wird (11, 60).

Im vorliegenden Fall erfolgt die Inkubation des zytokeratinhaltigen Zellmaterials zuerst mit dem optimal verdünnten monoklonalen Maus-Primärantikörper (Immunglobuline, IgG). Dabei koppelt sich dieser Primärantikörper, der spezifisch für das Antigen ist, an das entsprechende Zytokeratin. Die überschüssigen Antikörper werden im nachfolgenden Spülgang aus dem Zellmaterial gewaschen. An dieser Stelle schließt sich eine weitere Inkubationszeit mit einem an alkalische Phosphatase konjugierten Antikörper (Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobuline) an, der den Primärantikörper bindet und eine Überbrückungsfunktion hat. Daher stammt der Name „Brückenantikörper“, der auch als Sekundärantikörper bezeichnet wird. Das Substrat, das mittels des Brückenantikörpers an den Primärantikörper gekoppelt werden soll, ist ein APAAP-Detektionssystem (APAAP: **A**lkalische **P**hosphatase – **A**nti-**A**lkalische **P**hosphatase). Dieser Komplex setzt sich aus monoklonalen Maus-Antikörpern zusammen, die eine hohe Affinität zur alkalischen Phosphatase des Kälberdarms besitzen, den Sekundärantikörper aufspüren und binden. Dieses Gefüge aus Immunglobulinen muss einem speziellen Farbstoff ausgesetzt werden, der in der Lage ist, mit den Antikörpern ein gefärbtes Endprodukt zu erzeugen. In diesem Fall wurde das sog. „Fast Red“-Substrat-System verwendet, das für

zytochemische Verfahren geeignet ist, bei denen alkalische Phosphatase als Enzymmarker dient. In organischen Verbindungen bildet „Fast Red“ einen löslichen roten Farbstoff. Abschließend kommt ein nicht-alkoholisches Färbemittel (Hämalaun-Lösung) zur Gegenfärbung und Kontrastierung zum Einsatz. In der Abbildung 1 ist das Prinzip der indirekten Methode des Zytokeratinnachweises graphisch dargestellt.



**Abbildung 1: Grundprinzip der immunhistochemischen Färbung (60)**

## 2.4 Kriterien der Malignität am zytologischen Befund

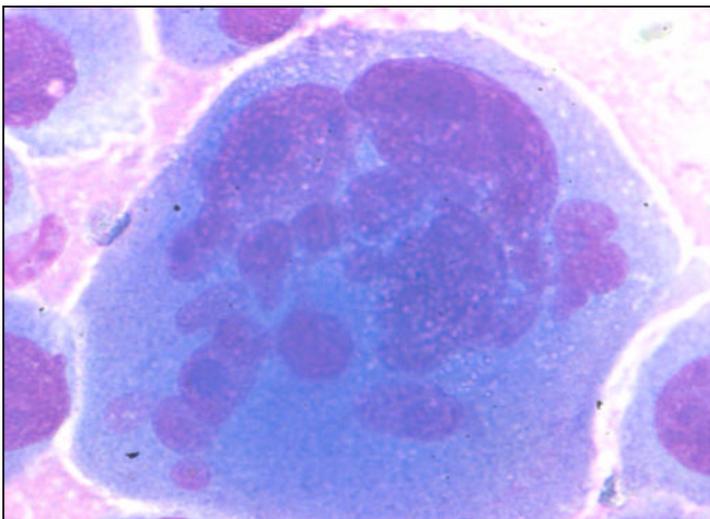
Die Befundinterpretation der Giemsa-Präparate, die im Rahmen dieser Arbeit angefertigt worden waren, erfolgte durch einen klinisch tätigen Zytologen des Diakoniekrankenhauses Halle anhand festgelegter Kriterien, die nachfolgend erläutert werden sollen.

Als allgemeine Charakteristika maligne entarteter Zellen gelten (31, 39, 50):

1. Veränderungen des Zellkerns
2. Veränderungen des Zellplasmas
3. Gesamtbild der malignen Zellen
4. Tumorkriterien im Zellverband

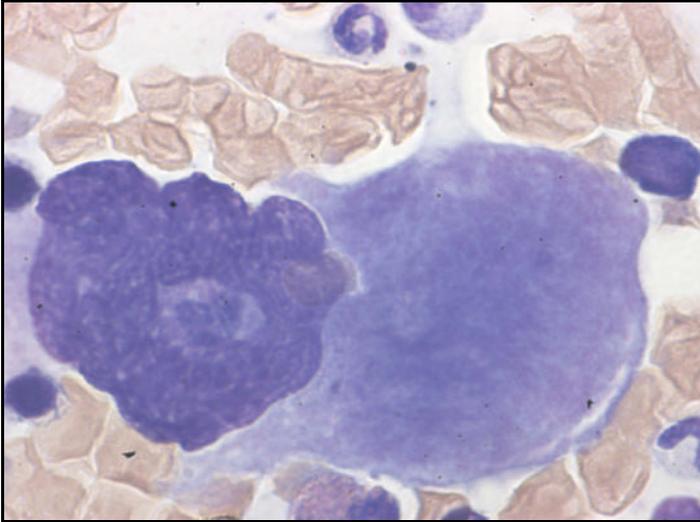
#### **2.4.1 Veränderungen des Zellkerns**

Da der Zellkern durch den Sitz der genetischen Information (DNS) direkt vom pathologischen Geschehen auf der Chromosomenebene betroffen ist, sind an dieser Stelle Abweichungen in Form von Hypertrophie des Nukleus, Mehrkernigkeit (Abb. 2) und unproportioniertes Wachstum zu beobachten (39).



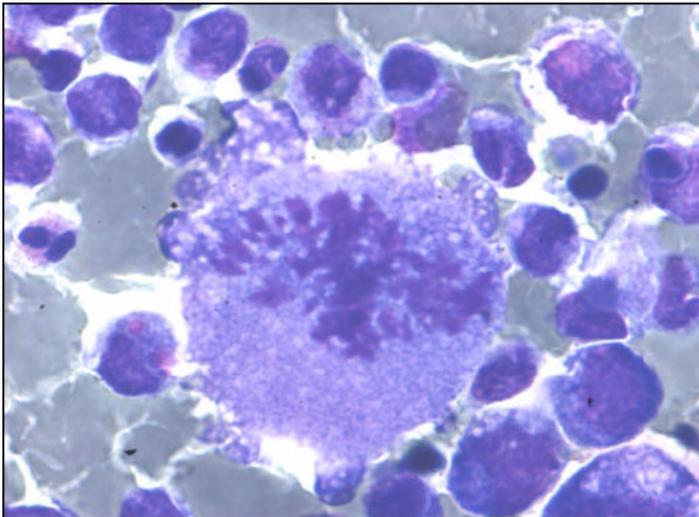
**Abbildung 2: Hypertrophie i.S. von Mehrkernigkeit mit Kernen unterschiedlicher Größe (39)**

Veränderungen der Kernform können durch unvollständige Teilungen entstehen. Oftmals ergeben sich hierdurch bizarre Formen der Zellkerne. Weiterhin variieren die Kernkörperchen (Nukleoli) in Anzahl, Morphologie und Anfärbbarkeit (Abb. 3).



**Abbildung 3: Bizarre Kernform durch unvollständige Teilung. Riesiger Nukleolus (39)**

Außerdem sind pathologische Mitoseformen ein wesentlicher Hinweis für das Vorliegen von Malignität (Abb. 4).

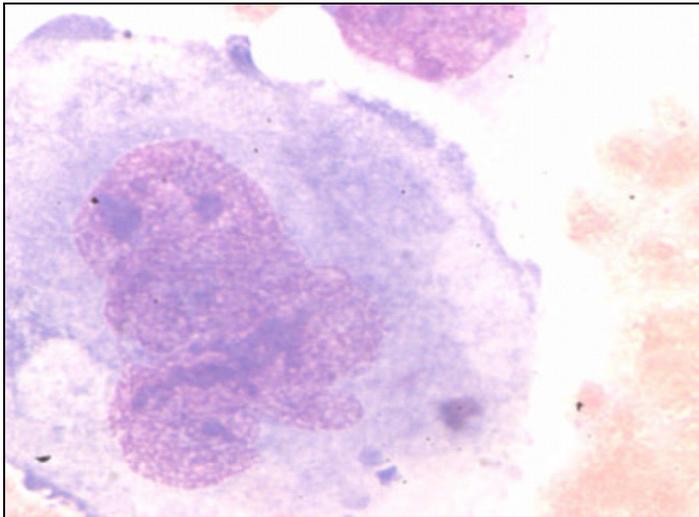


**Abbildung 4: Atypische Mitose (39)**

Unter anderem bedingen Hyperchromasie und Verklumpung des Chromatins die oben genannten Modifikationen. Jedoch auch Degenerationszeichen wie Vakuolen- und Hydropsbildung, Schrumpfung, Pyknose oder Karyorrhesis können das Bild des Zellkerns verändern (39).

### 2.4.2 Veränderungen des Zellplasmas

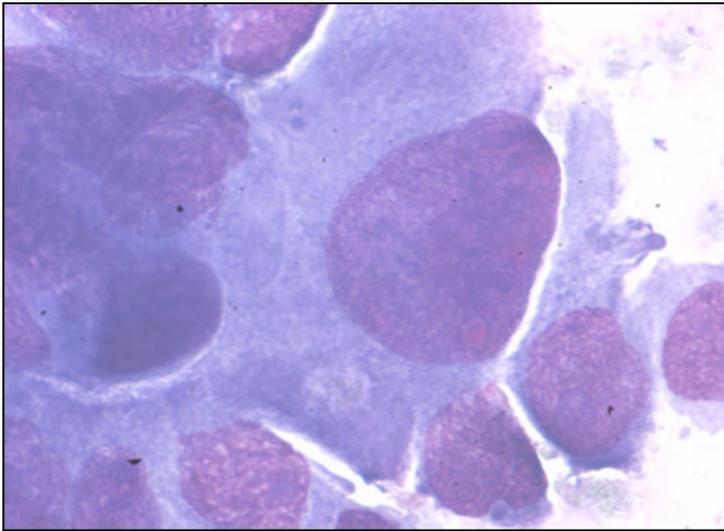
Aufgrund der veränderten genetischen Information der Zelle zeigen sich auch im Plasma modifizierte Strukturen und Funktionen. In diesem Zusammenhang gehört die Basophilie neben pathologischen Zelleinschlüssen (Hornperlen, Vakuolen) zum Bild der malignen Zelle. Abbildung 5 zeigt die Entmischung des Zytoplasmas.



**Abbildung 5: Entmischung des Zytoplasmas (39)**

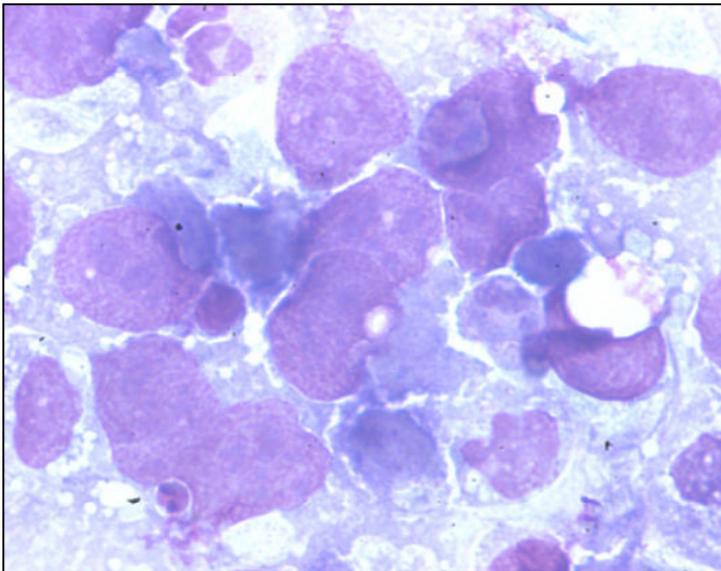
### 2.4.3 Gesamtbild der malignen Zellen

Erfolgt die Betrachtung der Zelle im Ganzen, so lässt sich oben Gesagtes bezüglich Zellkern und -plasma auch auf die Gesamterscheinung übertragen. Hypertrophie mit Riesenzellbildung kann häufig beobachtet werden, stellt allerdings kein obligates Kriterium dar. Formveränderungen (z.B. Schlangenzellen) gelten ebenfalls als charakteristische Erscheinung von malignen Zellen. Ein relativ sicheres Kennzeichen der malignen Transformation spiegelt sich in dem zu Gunsten des Zellkerns verschobenen Kern-Plasma-Verhältnis wider (Abb. 6) (39, 50).



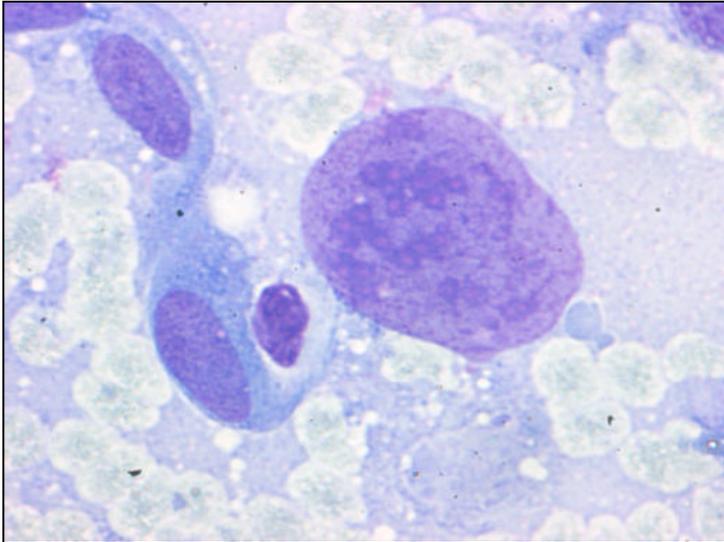
**Abbildung 6: Verschobenes Kern-Plasma-Verhältnis zu Gunsten der Kerne (39)**

Abweichendes Verhalten der Zellen zur Umgebung mit leichter Lädierbarkeit (Abb. 7) der Zellstruktur prägt zusätzlich die Gesamterscheinung.



**Abbildung 7: Leichte Lädierbarkeit der Zellen (39)**

In Abbildung 8 lassen sich diverse Hinweise für eine maligne Veränderung der Zellen wiederfinden. Hierbei wird besonders auf die unterschiedliche Größe und bizarre Form der Zellkerne mit Nukleoli hingewiesen. Die leichte Lädierbarkeit äußert sich in der Darstellung von Zytoplasmabrei, der sowohl Zellen als auch den Nukleus umgibt.

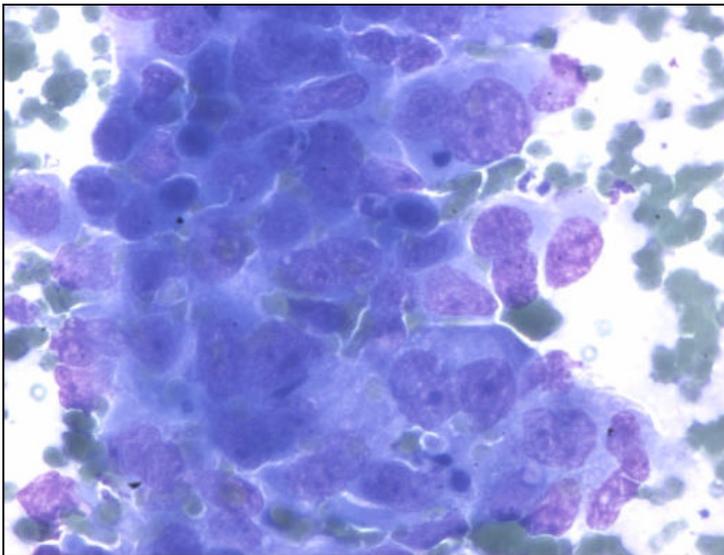


**Abbildung 8: Zellen und Kern (unterschiedlich große und z.T. bizarr geformte Nukleoli) im Zytoplasmabrei (39)**

Weiterhin besteht die Möglichkeit - typischerweise beim Adenokarzinom - dass der Zellkern eine für ihn ungewöhnliche, z.B. exzentrische Lage in der Zelle einnimmt. Allerdings ist die exzentrische Kernlage kein Malignitätskriterium per se.

#### 2.4.4 Tumorkriterien im Zellverband

Erfolgt die Betrachtung eines Zellverbandes hinsichtlich des Gesamteindrucks, so kann sich ein buntes Bild von Veränderungen ergeben: Kernreichtum und dreidimensionale Lagerung der Kerne (nuclear crowding) (Abb. 9).



**Abbildung 9: Nuclear crowding (39)**

Zum anderen kommen durch lokale Wachstumssteigerung mosaikartige Lagerungen der Zellen bzw. der Kerne zustande, wobei das rasche Zellwachstum das Ineinanderschieben von Zellen herbeiführt. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass der Zusammenhalt im Verband nur in differenzierten Geweben vorliegt. In einem unreifen Karzinom ist die Zellverankerung nicht gegeben und der Tumor neigt infolgedessen zum Gewebszerfall.

#### 2.5 Klassifizierung der Tumore

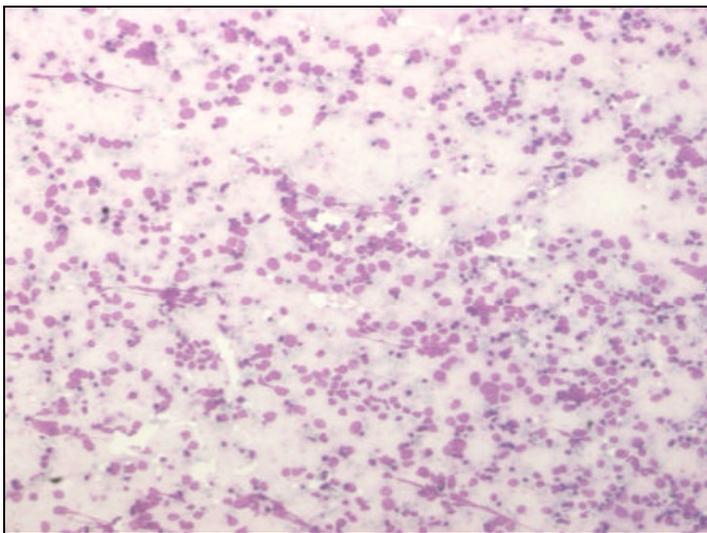
Die zytologische Untersuchung erlaubt im Allgemeinen eine Einteilung hinsichtlich Tumortyp. Folgende Tumortypen lassen sich zytologisch unterscheiden (31, 50).

1. anaplastisch kleinzelliges Karzinom
2. nichtkleinzellige Karzinome
  - a) Adenokarzinom
  - b) Plattenepithelkarzinom
  - c) undifferenziertes großzelliges Karzinom

- d) Alveolarzellkarzinom
- e) seltene Tumore
- 3. pulmonale Metastasen
- 4. benigne Tumore

### 2.5.1 Anaplastisch kleinzelliges Karzinom

Das anaplastisch kleinzellige Bronchialkarzinom zeichnet sich durch seine rasche Wachstumstendenz und, wie der Name schon sagt, durch seine verhältnismäßig kleinen Zellen aus, die etwa Lymphozytengröße besitzen. Es besteht nur ein geringer Zusammenhalt unter den Zellen. Diese finden sich im zytologischen Präparat meist einzeln oder in kleinen Gruppen. Der hyperchromatische Zellkern nimmt einen Großteil der Zelle ein, so dass überwiegend kein Zytoplasma vorhanden ist (Nacktkernigkeit) (Abb. 10).



**Abbildung 10: Polymorphie der Zellkerne, Nacktkernigkeit beim kleinzelligen Karzinom (39)**

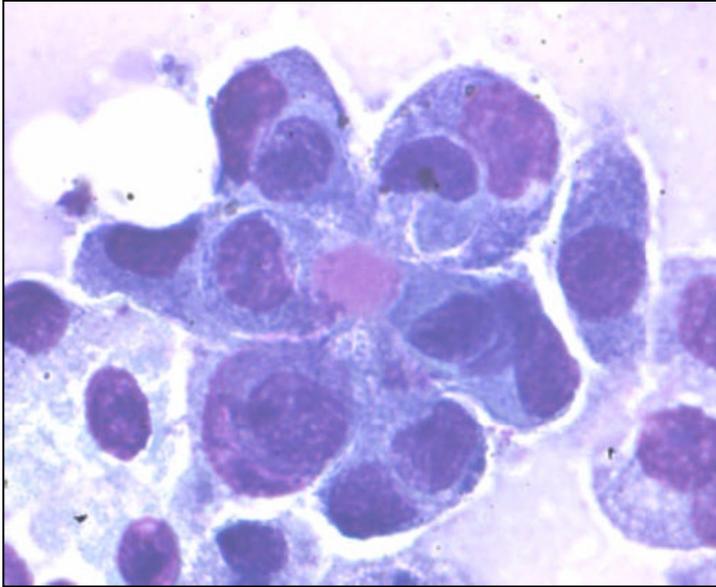
Sehr feines und homogen wirkendes Chromatin verleiht dem Kern ein regelmäßiges Aussehen. Wird eine Ansammlung von Tumorzellen betrachtet, so kann das als „moulding“ bezeichnete Ineinanderschieben der Zellen beobachtet werden.

### 2.5.2 Nichtkleinzellige Karzinome

Dem anaplastisch kleinzelligen Karzinom wird die heterogene Gruppe der nichtkleinzelligen Karzinome gegenübergestellt. Im Folgenden soll auf diese einzelnen Tumortypen eingegangen werden.

### 2.5.2.1 Adenokarzinom

Im Überblick erscheinen die Zellen des Adenokarzinoms zylindrisch, oval oder kubisch. Ein wichtiges Charakteristikum des Adenokarzinoms ist eine rosetten- oder schlauchförmige Anordnung im Zellgefüge (Abb. 11).

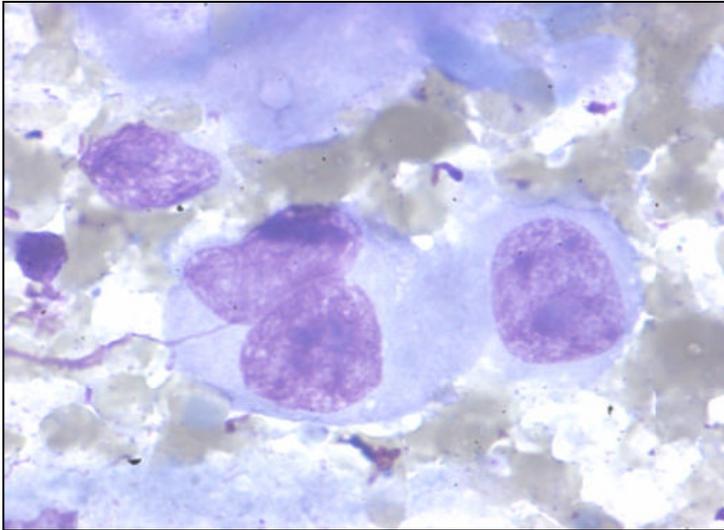


**Abbildung 11: Rosettenförmige Anordnung der Zellen beim Adenokarzinom (39)**

Bei einer relativ unauffälligen Kern-Plasma-Relation fällt ein exzentrisch gelegener, hyperchromatischer und vergrößerter Kern auf, der meist von ovaler bis runder Gestalt ist. Die Kerne können auch hyperchromatisch und dicht sein und Nukleoli schwer erkennen lassen. Falls es sich um sekretorische Zellen handelt, so können kernnah die dafür typischen Vakuolen gefunden werden.

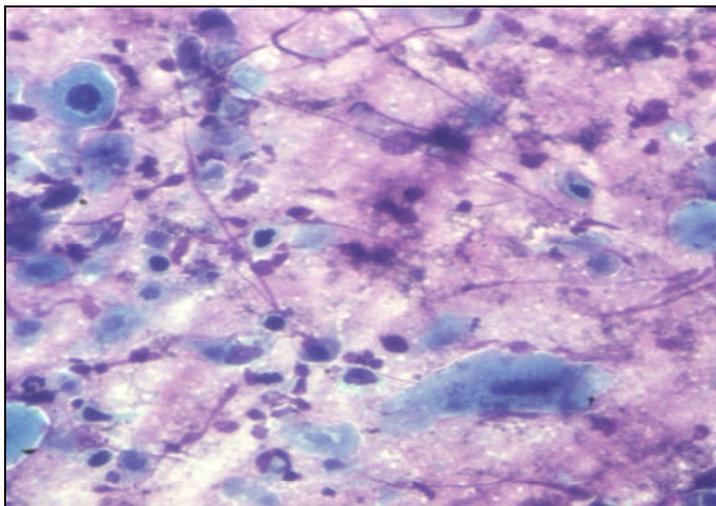
### 2.5.2.2 Plattenepithelkarzinom

Dem Untersucher stellt sich ein buntes Zellbild dar, das neben mehrkernigen Riesenzellen auch kleine Zellen aufweist. Das Zytoplasma wird als basophil beschrieben (Abb. 12).



**Abbildung 12: Schwache Basophilie des Zytoplasmas, unterschiedliche Zellgröße, prominente Nukleoli, Chromatinirregularität beim Plattenepithelkarzinom (39)**

Polygonale Zellformen prägen das Bild des Intermediärzell-Typs, dem auch die o.g. Kernbeschreibungen entsprechen. Bei einer eventuellen Verhornung der Zellen, die in den transformierten Basalzellen nicht vorkommt, wird der Kern pyknotisch (Abb. 13).



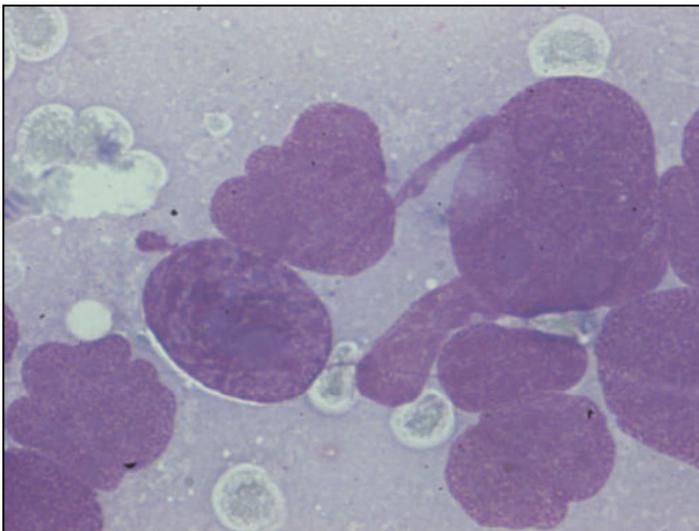
**Abbildung 13: Pyknotische Kerne und stahlblaues Zytoplasma bei Verhornung (39)**

Die oberflächlichen Zellen können eine polygonale, spindel-, schlangen- oder zigarrenförmige Gestalt annehmen (78). Einige sehen Kaulquappen ähnlich und werden deswegen auch tadpole cells genannt. Die hyperchromatischen Zellkerne sind hier kleiner und teilweise bizarr geformt, wobei dieses Kriterium besonders für verhornende Tumore gilt.

### **2.5.2.3 Undifferenziertes großzelliges Karzinom**

Undifferenzierte großzellige Karzinome sind zytologisch nicht klassifizierbar. Sie sollen an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

Aufgrund der undifferenzierten polymorphen Zellen und Zellkerne ergibt sich ein Bild, das nicht spezifisch für einen bestimmten Tumortyp ist, so dass differentialdiagnostisch fast alle Karzinome, besonders schlecht differenzierte Plattenepithelkarzinome und Sarkome in Betracht kommen (Abb. 14).

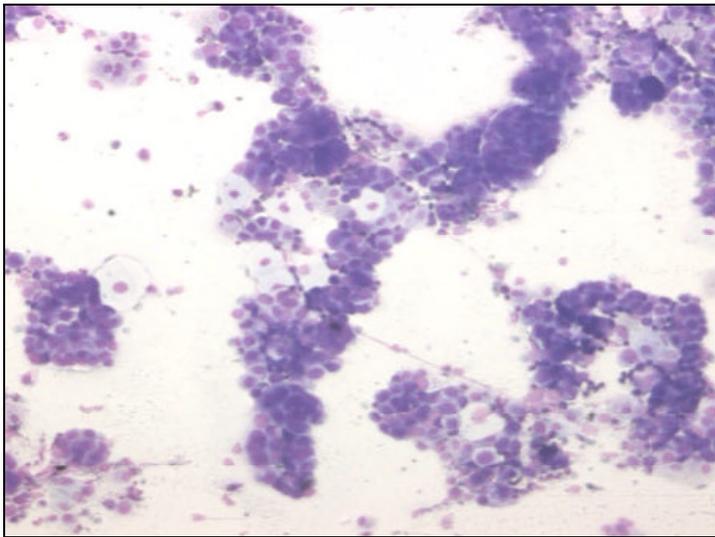


**Abbildung 14: Undifferenzierte polymorphe Zellen beim undifferenzierten großzelligen Karzinom (39)**

### **2.5.2.4 Alveolarzellkarzinom**

Das auffälligste Merkmal des Alveolarzellkarzinoms ist sicherlich die Ausbreitung der Tumorzellen, die tapetenartig den Innenraum der Alveolen auskleiden. Die hohen, zylinderförmigen Zellen sind zu einer erheblichen Schleimbildung fähig und bewirken eine Verdickung der Alveolarwand. Histologisch kann dieses Karzinom gut differenziert werden. Im zytologischen Präparat ist es allerdings kaum von einem Adenokarzinom oder

dessen Filiae zu unterscheiden. Erfolgt die lichtmikroskopische Betrachtung einzelner Zellen, so fällt die Ähnlichkeit zu normalen Alveolarzellen auf. Kubische oder zylindrische Zellformen mit vergrößerten, hyperchromatischen Kernen dominieren das Bild (Abb. 15). Das Plasma stellt sich oft glatt oder körnig dar, selten können größere Sekretgranula erkannt werden.



**Abbildung 15: Polymorphie des Zellbildes, irreguläre Kernlagerungen, wenig Zytoplasma beim Alveolarzellkarzinom (39)**

#### **2.5.2.5 Seltene Tumore**

Zu den seltenen Tumoren zählen die Sarkome, die Karzinosarkome, Teratome und maligne Lymphome der Lunge (50). Wegen ihres geringen Vorkommens soll hierauf nicht näher eingegangen werden.

#### **2.5.3 Pulmonale Metastasen**

Die Lunge ist in vielen Fällen Zielorgan für Metastasen extrapulmonaler Malignome. Hierbei müssen die lymphogene und die hämatogene Ausbreitung der Zellen differenziert werden. Zudem kommen Aspirationsmetastasen bei weiter apikal gelegenen Tumoren der Atemwege in Betracht (16).

Handelt es sich bei einem zytologischen Tumorpräparat um Zellen metastatischen Ursprungs, so kann oft eine Zuordnung zum vorliegenden Zelltyp erfolgen. Die Diagnose des Primärtumors allerdings bleibt in vielen Fällen ungeklärt. Adenokarzinometastasen sind im allgemeinen mannigfaltiger als der Primärtumor. Metastasen eines Platten-

epithelkarzinoms lassen sich in der Regel nicht vom Primum abgrenzen. Kolonkarzinommetastasen z.B. sind oft schwer von primären Adenokarzinomen der Lunge zu unterscheiden. Allerdings ermöglichen folgende Zusatzinformationen die Diagnose der Metastase: Schleim und Blutzellen zwischen nekrotisch zerfallenen Zellen, pfeilerartig angeordnete, zylinderförmige Tumorzellen mit irregulären, länglichen Kernen (77). Metastasen eines Magenkarzinoms können beim Vorliegen von Siegelringzellen gut dem Primärtumor zugeordnet werden. Bei pigmentspeichernden Tumorzellen (z.B. in Form von Melanin) muss immer an eine Melanommetastase gedacht werden. Liegt so eine Pigmentspeicherung vor, muss mittels Spezialfärbungen geklärt werden, ob es sich bei der gespeicherten Substanz um Melanin handelt. Im Fall einer pulmonalen Metastasierung eines Hypernephroms stellen sich die Zellen zytologisch oft folgendermaßen dar: teils einzeln, teils in kleinen Gruppen liegende uniforme Zellen mit runden Kernen und feinvakuolisiertem Zytoplasma. Das metastasierte Prostatakarzinom zeichnet sich durch das Vorliegen großer Tumorzellen mit irregulären Kernen mit z.T. atypischen Mitosen und feinvakuolisiertem Plasma aus (77).

#### 2.5.4 Benigne Tumore

Nach dieser differenzierten Darstellung der malignen intrapulmonalen Tumore schließt sich nun eine Liste der benignen Geschwülste an. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Malignomklassifizierung liegt, soll die Veranschaulichung lediglich tabellarisch erfolgen.

**Tabelle 6: Benigne intrathorakale Tumore (50)**

Bronchialadenome	Karzinoid: kubische Zellen; runde, exzentrisch gelegene Zellkerne mit Ausstülpungen; fleckiger Chromatinaufbau (A-Zellen); kleine, pyknotische Kerne (B-Zellen) Zylindrome: leicht lädierbare Zellen; hyperchromatische, runde Zellkerne mit Nukleoli; Nacktkernigkeit
Fibrome	eintöniges Zellbild mit fibrozyten-/ fibroblasten-ähnlichem Aussehen; Faserreichtum; runde Kerne mit grober Chromatinstruktur; Zytoplasmaausläufer
Hamartome	mesenchymale und epitheliale Anteile: knorpel-, fett-, muskel-, bindegewebsähnliche und lymphoide Zellen
Chondrome	mesenchymaler Ursprung; Knorpelgewebe des Bronchialbaumes
Dermoidzysten	Plattenepithelzellen; Interzellulärsubstanz und Zelldetritus; z.T. blasige, z.T. pyknotische Kerne; Plasmavakuolen
Lipome	Fettzellen; zytologische Beurteilung bei Biopsien nur eingeschränkt möglich wegen Ähnlichkeit zu subkutanem Fettgewebe
Zysten unterschiedlicher Genese	keine definitive zytologische Diagnose, variables Bild von zylindrischen Zellen oder Plattenepithelzellen; Zelldetritus

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Patientengut

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 56 Männern (66,7%) und 28 Frauen (33,3%) zusammen (Abb. 16).

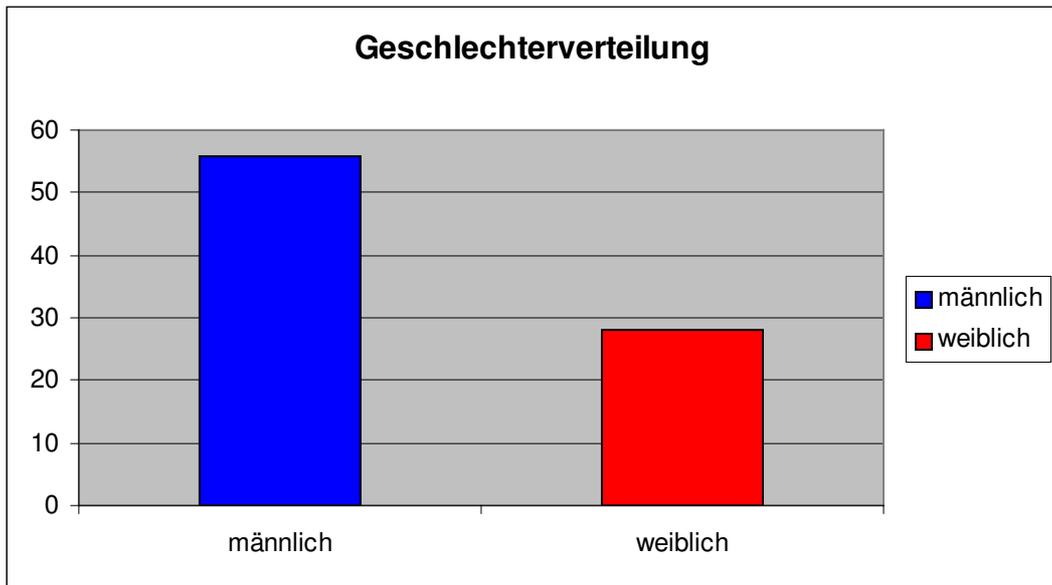


Abbildung 16: Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs

Das Durchschnittsalter belief sich auf 65,6 Jahre, wobei der jüngste Patient 32 Jahre und der älteste Patient 89 Jahre alt war. Zur weiteren Verdeutlichung wurden die Patienten anhand ihres Alters zum Untersuchungszeitpunkt in 6 Gruppen - den Altersdekaden entsprechend - eingeteilt (Abb. 17).

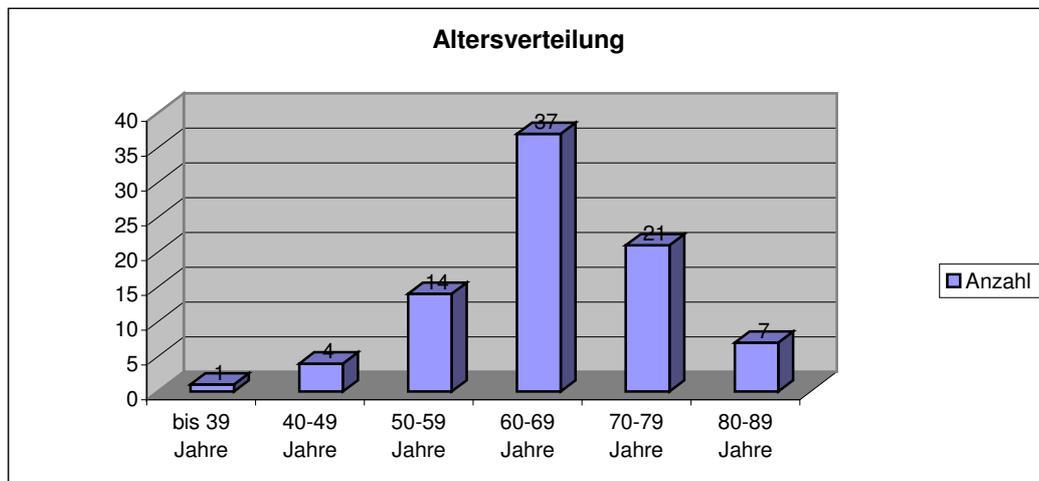
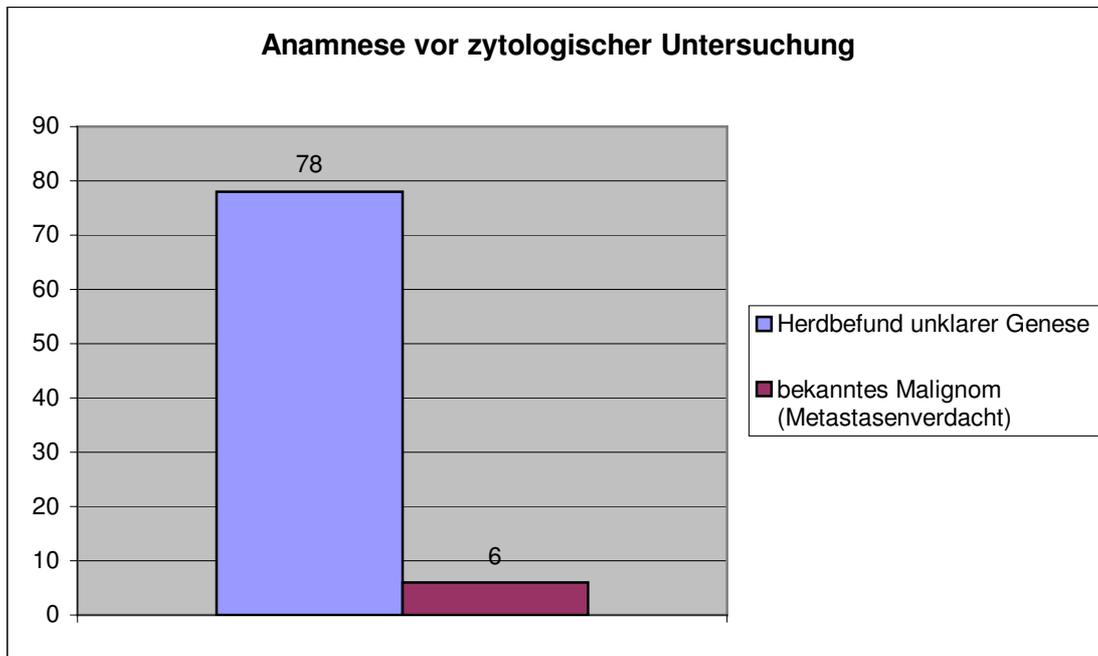


Abbildung 17: Altersverteilung des Patientenkollektivs

Bei 78 Patienten musste im Rahmen der Basisdiagnostik die Frage der Dignität eines pulmonalen Prozesses geklärt werden. Falls sich Hinweise für ein malignes Geschehen ergäben, sollte eine Zuordnung der Prozesse zum jeweiligen Primärtumor erfolgen. Bei 6 Patienten war ein malignes Grundleiden bereits bekannt. Somit stand an dieser Stelle die Klärung der Frage einer Metastasierung oder eines Zweitkarzinoms im Vordergrund. Es handelte sich in zwei Fällen um ein gesichertes primäres Bronchialkarzinom (ein schlecht differenziertes Plattenepithelkarzinom und ein Adenokarzinom). Bei einem Patient war ein malignes fibröses Histiozytom des linken Oberschenkels bekannt. Ein Patient litt an einem malignen Hodentumor (mischzelliges, embryonales Karzinom und Seminom) und ebenfalls ein Patient war an einem Prostatakarzinom erkrankt. Bei einer Patientin bestand klinisch der Verdacht auf eine pulmonale Metastasierung bei Vorliegen eines Harnblasenkarzinoms.



**Abbildung 18: Anamnestische Informationen vor zytologischer Diagnostik**

### **3.2 Methode**

Die in dieser Arbeit verwandte Methode der immunzytochemischen Färbung musste zunächst in den Arbeitsablauf des Zytologielabors eingeführt werden. Da die Vorgehensweise lediglich für die Histologie standardisiert ist, wurden sämtliche Prozeduren und Arbeitsschritte für die zytologischen Präparate neu festgelegt und den gegebenen Voraussetzungen des Zytologielabors angepasst. Zuerst wurden die

Techniken zur Materialentnahme bestimmt. Hierbei handelte es sich um Tupfpräparate oder Zellmaterial aus Katheter- und Feinnadelbiopsien pulmonaler Prozesse. Im Verlauf wurde ein Teil der Präparate konventionell der Giemsa-Färbung (Kapitel 3.3.3) und ein anderer Teil der immunzytochemischen Färbung zur Zytokeratindarstellung (Kapitel 3.3.4) unterzogen. Nachdem die zytologischen und immunzytologischen Präparate analysiert worden waren, schloss sich eine Gegenüberstellung der jeweiligen Ergebnisse mit den entsprechenden Histologiebefunden an, die im Rahmen der Basisdiagnostik angefertigt und retrospektiv ausgewertet worden waren. Hierbei lagen die Schwerpunkte auf der einen Seite in der Dignitätsbeurteilung der Präparate und auf der anderen Seite in der Tumortypenbestimmung.

### **3.3 Praktische Durchführung**

#### **3.3.1 Auswahl der Zytokeratinmarker**

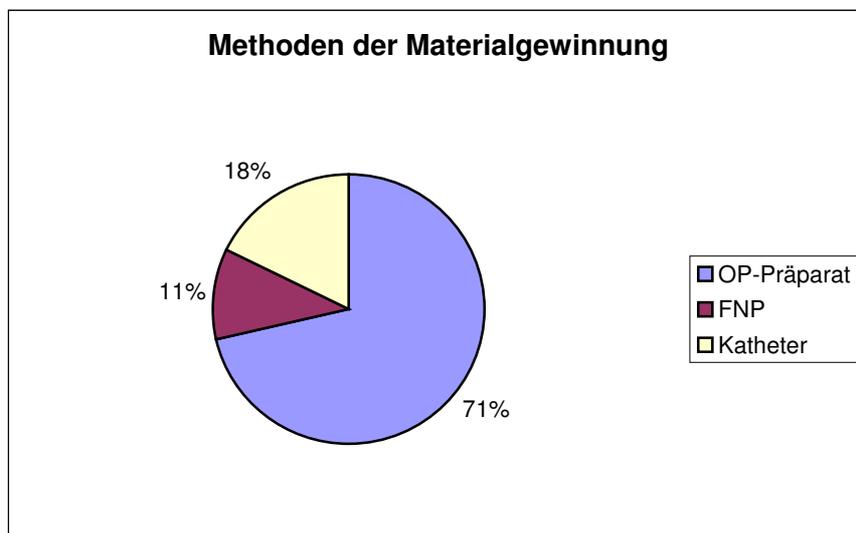
Zunächst musste eine Auswahl an Tumormarkern erfolgen, die in Kombination verwendet, eine aufschlussreiche und möglichst vollständige Beurteilung von pulmonalen Neoplasien ermöglichen. Die Entscheidung fiel zu Gunsten von 4 Zytokeratinmarkern, die bereits in der Immunhistochemie zur Malignomdiagnostik etabliert sind. Es handelt sich hierbei um die Darstellung von CK 5/6, CK 7, CK 20 und einem Pan-CK (CK 5, 6 und 18). Die Kenntnis von CK 5/6-, CK 7- und CK 20-Positivität bzw. Negativität erlaubt prinzipiell eine Einteilung von malignen Befunden entsprechend des Tumortyps und des Ursprungsorgans, so dass z.B. bei zytologisch nicht eindeutig klassifizierbaren Befunden eine Tumortypenbestimmung möglich sein müsste. Die Färbung mittels Pan-CK wurde zur Erweiterung des CK-Spektrums hinzugezogen, da dieses hilfreich in der Unterscheidung von Karzinomen und nicht-epithelialen Tumoren ist. Zudem ermöglichte die Pan-CK-Darstellung eine relative Kontrolle der Färbeergebnisse von CK 5/6. Explizite Angaben zu den Antikörpern können der Tabelle 7 entnommen werden.

**Tabelle 7: Vorkommen der darzustellenden Zytokeratine und klinische Bedeutung der entsprechenden Zytokeratinmarker (11, 12, 22, 24, 52)**

<b>Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 5/6:</b>
<p><b>Vorkommen CK 5:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Basal-, Intermediär- und Superfizialzellen des mehrschichtigen Epithels und im Mesothel</li> <li>• mit wenigen Ausnahmen nicht im einschichtigen Epithel und in nicht-epithelialen Zellen</li> </ul> <p><b>Vorkommen CK 6:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• proliferierendes Plattenepithel</li> </ul> <p><b>Klinische Bedeutung von Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 5/6</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• DD: wenig-differenziertes Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom</li> <li>• DD: Mesotheliom und Bronchialkarzinom (in Kombination mit Kalretinin und Thrombomodulin)</li> <li>• DD: Atypien der Mamma</li> </ul>
<b>Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 7:</b>
<p><b>Vorkommen CK7:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• sekretorisches Epithel und Übergangsepithel</li> <li>• in fast allen eukaryotischen Zellen</li> </ul> <p><b>Klinische Bedeutung von Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 7:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• DD: Adenokarzinom der Lunge, Mamma, Schilddrüse, des Endometriums und Ovars</li> <li>• Urothelkarzinom (Übergangsepithel)</li> </ul>
<b>Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 20:</b>
<p><b>Vorkommen CK 20:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• in normalen und veränderten Epithelien des Magen-Darm-Trakts und des Urothels</li> <li>• in Merkelzellen der Haut</li> </ul> <p><b>Klinische Bedeutung von Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 20</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• DD: Adenokarzinom des Kolons, Gallengangsystems und Pankreas</li> <li>• muzinöse Tumore des Ovars</li> <li>• Übergangszell- und Merkelzellkarzinome</li> <li>• weniger als 2% der Bronchial- und Plattenepithelkarzinome der Lunge sind CK 20-positiv</li> </ul>
<b>Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin (Clone LP 34):</b>
<p><b>Klinische Bedeutung von Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin (Clone LP 34)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• breites Wirkungsfeld: von einschichtigem Epithel bis Plattenepithel; Epithelzellen, die ekto-, meso- oder entodermalen Ursprungs sind (z.B. Mesothelzellen)</li> <li>• nicht dargestellt werden: Langerhans-Zellen, Epithel der Linse, Nervenzellen, Gliazellen, Muskelzellen und Mesenchym</li> <li>• erkennt CK 5, CK 6 und CK 18; reagiert nicht mit CK 1, CK 8 und CK 19</li> </ul>

### 3.3.2 Materialgewinnung und Herstellung der Präparate

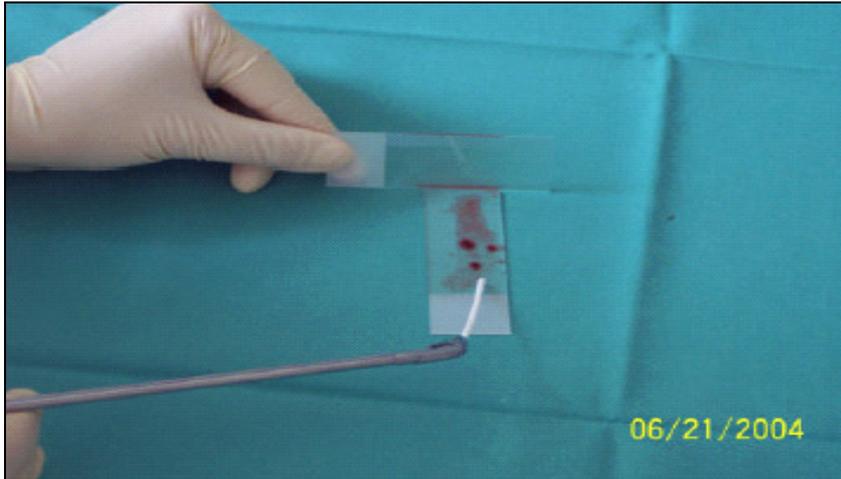
Die Materialgewinnung zur zytologischen Diagnostik stützte sich auf drei verschiedene Entnahmetechniken. Bei 60 Patienten konnten intraoperativ durch Aufbringen des karzinomverdächtigen Gewebes auf Objektträger Tupfpräparate hergestellt werden. Weiterhin wurden 15 Patienten einer Katheterbiopsie unterzogen, in deren Verlauf das benötigte Zellmaterial ebenfalls auf einen Objektträger ausgestrichen wurde. Als dritte Technik zur Entnahme des Materials ist bei 9 Patienten die Feinnadelpunktion (Chiba-Nadel: 0,7mm) angewandt worden (Abb. 19).



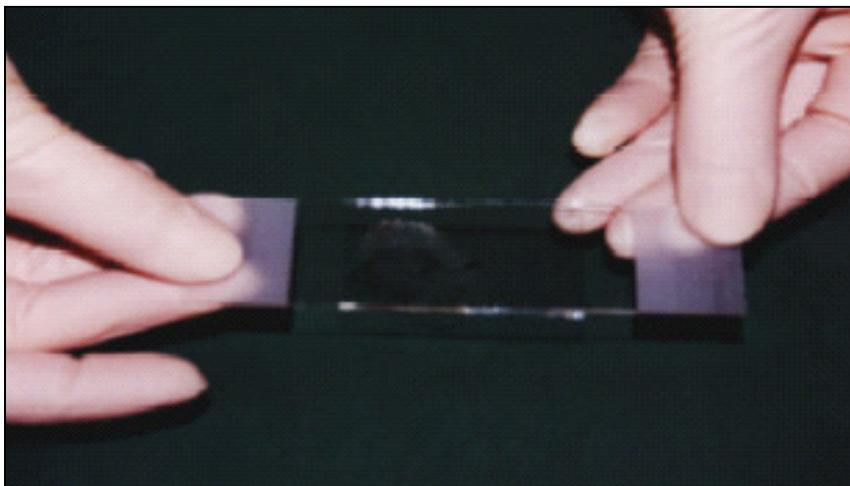
**Abbildung 19: Methoden der Materialgewinnung für die Zytodiagnostik**

Das Aufbringen des Materials auf die Objektträger erfolgte folgendermaßen:

- Bei operativer Entnahme von Lungenherden wurde das Präparat aufgeschnitten und die Schnittfläche mit leichtem Druck über den Objektträger gestrichen.
- Mittels Katheterbiopsie aus peripheren Lungenherden wurde der Katheter über den Arbeitskanal des Bronchoskops unter Durchleuchtungssicht an den Herd herangeführt. Durch die Bewegung des Katheters unter Aspiration wurde das Gewebe traumatisiert und angesaugt. Nach Gewinnung des Biopsats konnte das Zellmaterial auf die bereitliegenden Objektträger gespritzt, mit der Fläche eines zweiten Objektträgers sanft komprimiert und der Länge nach ausgestrichen werden (Abb. 20 und 21) (76).



**Abbildung 20: Materialgewinnung mittels Katheterbiopsie (76)**



**Abbildung 21: Ausstreichen des Zellmaterials (76)**

- Resultierte die Materialgewinnung aus einer Feinnadelpunktion, so wurde die Zellsammlung direkt über die Punktionskanüle auf den Objektträger gespritzt und mit einem zweiten Objektträger in Längsrichtung ausgestrichen.

An dieser Stelle schloss sich bei jeder der drei geschilderten Methoden für die Dauer von wenigstens zwei Stunden der Vorgang des Lufttrocknens an. 2 Präparate wurden nach Giemsa gefärbt und weitere 6 Ausstriche blieben ungefärbt, um diese für die Zytokeratin-Färbung zur Verfügung zu haben.

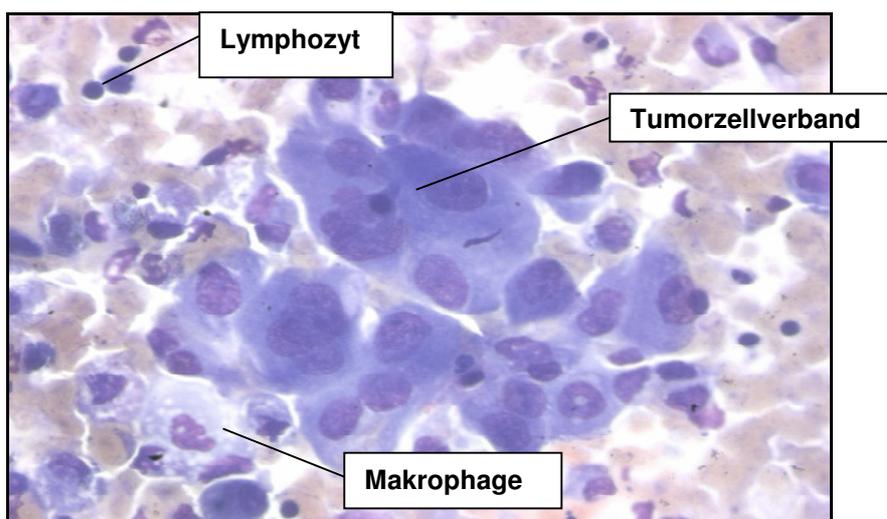
### 3.3.3 Die Giemsa-Färbung

Für die zytologische Routinefärbung der Präparate wurde die Giemsa-Färbung angewandt (50):

1. Nach dem Lufttrocknen der Ausstriche konnte eine Fixierung durch kurzes Eintauchen der Zellausstriche in 70%-igem Alkohol erreicht werden.
2. An die Alkoholfixierung schloss sich ein vorsichtiger Spülvorgang mit Aqua destillata an.
2. Es folgte die eigentliche Färbung der Präparate mit der 1:10 verdünnten Giemsa-Gebrauchslösung für 5-10 Minuten, je nach Dichte des Zellmaterials.
3. Durch vorsichtiges Spülen der Objektträger mit Aqua destillata konnten Farbüberstände beseitigt werden.
4. Anschließend wurden die Objektträger zur Lufttrocknung nach Reinigung der Unterseiten mit Zellstoff in Schräglage gestellt.

Nach dem Trocknen der Präparate erfolgte durch die klinischen Zytologen eine Analyse der Präparate. Hierbei fand die Beurteilung in Kenntnis der Anamnese und der klinischen Befunde statt.

Die Abbildung 22 zeigt ein Imprintpräparat, welches nach Giemsa gefärbt wurde (Pat.-Nr. 1012/03). Es handelt sich hierbei um Zellen eines Adenokarzinoms, das auch histologisch bestätigt wurde.



**Abbildung 22: Pat.-Nr.: 1012/03, Giemsa-Färbung, 400-fache Vergrößerung: Zellen eines Adenokarzinoms, Makrophagen und Lymphozyten**

### 3.3.4 Die Zytokeratin-Färbung

Für die Zytokeratin-Färbung wurden die ungefärbten Ausstrichpräparate verwendet.

Pro Patient waren insgesamt 6 Objektträger vorgesehen. Diese Anzahl resultierte aus der Überlegung, 4 Präparate für die Zytokeratin-Färbung und 2 Präparate als Kontrollen (in Form von Positiv- und Negativ-Kontrolle) zu verwenden. Die Positiv- und Negativ-Kontrollen wurden gezielt eingesetzt, um eventuelle Färbefehler zu erkennen.

Bei Einführung dieser immunzytochemischen Färbung ergaben sich initial mehrere Fragen hinsichtlich der praktischen Vorgehensweise:

- a) Welche Arbeitsmaterialien sind erforderlich und wie soll sich der zeitliche Ablauf der Färbung gestalten?
- b) Welche Fixierung soll für die Präparate eingesetzt werden und welche Konzentration ist für die Herstellung der Verdünnung der einzelnen Antikörper notwendig?
- c) Welche Inkubationszeiten müssen eingehalten werden?
- d) Wann und nach welchen Kriterien kann die Auswertung der Präparate erfolgen?

Zur Klärung o.g. Fragen konnte einerseits die Erfahrung der Mitarbeiter des Zytologielaors des Diakoniekkrankenhauses Halle genutzt werden. Der allgemeine Arbeitsablauf eines zytologischen Färbeprozesses, die dafür notwendigen Materialien und die Handhabung der Instrumentarien bzw. technischen Geräte wurden in diesem Zusammenhang vorgestellt und erläutert. Zudem ermöglichte eine Hospitation im histologischen Labor des Pathologischen Institutes der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. S. Hauptmann), Einsicht in die immunhistochemische Färbemethode zu nehmen. Hierbei wurde von den medizinisch-technischen Assistenten eine standardisierte Vorgehensweise des Färbeprozesses zur Darstellung von Zytokeratinen in histologischen Präparaten demonstriert und veranschaulicht. Der Ablauf einer kompletten Zytokeratin-Färbung von der Fixierung der Präparate bis zur Gegenfärbung konnte so nachvollzogen werden. Außerdem zeigte die Produktinformation der verwandten Antikörper (Hersteller: DAKO Diagnostika GmbH) zur Zytokeratindarstellung eine empfohlene Vorgehensweise zur Präparatevorbereitung, Herstellung von entsprechenden Verdünnungen, Festsetzungen von Inkubationszeiten und Aufbewahrung der Antikörper auf.

Unter Berücksichtigung dieser Informationen wurde ein Färbestandard festgelegt.

Nach dem Lufttrocknen der Präparate schloss sich folgender Arbeitsgang an:

1. Der Zellausstrich wurde für 10 Minuten in Azeton p.a. fixiert.

2. Es folgte eine kurze Phase der Lufttrocknung, in der gleichzeitig ein zur späteren Färbung geeignetes Zellareal mit einem Markierungsstift kreisförmig gekennzeichnet wurde.
3. Schließlich konnte der 1:50 verdünnte Primärantikörper (50µl Mouse-Immunglobulin, Hersteller: DAKO Diagnostika GmbH) mit einer Pipette aufgetragen werden, wobei auf eine komplette Bedeckung des markierten Areal geachtet werden musste. Zur Positiv-Kontrolle kamen das 1:50 verdünnte LCA (50µl Leucocyte Common Antigen, Hersteller: DAKO Diagnostika GmbH) und zur Negativ-Kontrolle eine Pufferlösung (Tris-Puffer) zur Anwendung. Die Objektträger wurden danach für eine Zeit von 30 Minuten in eine feuchte Kammer gelegt.
4. Nach Ablauf der 30 Minuten schloss sich ein zweimaliger Waschvorgang (je 5 Minuten) an, wobei die Präparate in einem Puffer-Bad (Tris-Puffer) von dem Primärantikörper gereinigt wurden.
5. Die zwischenzeitlich hergestellte 1:100 Verdünnung des Sekundärantikörpers (50µl Kaninchen-Anti-Mouse-Immunglobulin, Hersteller: DAKO Diagnostika GmbH) wurde nach dem Spülvorgang auf die Objektträger pipettiert und anschließend für weitere 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert.
6. An dieser Stelle war erneut ein zweimaliges Spülen im Pufferbad für insgesamt 10 Minuten notwendig.
7. Nun erfolgte das Aufbringen der 1:100 verdünnten APAAP-Lösung (50µl Alkalische Phosphatase – Anti-Alkalische Phosphatase) mit anschließender 30-minütiger Aufbewahrung der Präparate in der feuchten Kammer.
8. Im 10-minütigen Pufferbad konnte das Zellmaterial von den Lösungsüberständen gereinigt werden.
9. Zum Sichtbarmachen der in den Zellen gebundenen Antikörper kam nun das Fast-Red-Substrat zum Einsatz (nach Herstellung der Lösung gemäß Herstellerangaben 1-2 Tropfen aus der beiliegenden Pipette), das für 15 Minuten auf das markierte Areal pipettiert wurde.
10. Wiederum war 2-faches Spülen mit der Pufferlösung notwendig.
11. Um den Kontrast der einzelnen Zellen untereinander mittels Gegenfärbung zu gewährleisten, wurden die Objektträger noch für 60 Sekunden in eine Hämalaun-Färbelösung getaucht.
12. Im weiteren Verlauf schloss sich ein Spülvorgang unter lauwarmem, fließendem Leitungswasser an, das sogenannte „Bläuen“. Hierbei standen die Objektträger senkrecht in einer Glasküvette. An dieser Stelle sollte ein direkter Kontakt des

Wasserstrahls mit den Objektträgern vermieden werden, um ein Abwaschen des Zellmaterials zu vermeiden.

Im Anschluss an den Färbevorgang mussten die Präparate an der Luft trocknen, bevor sie lichtmikroskopisch betrachtet und ausgewertet werden konnten. Hierbei fand das Axioskop 50 (Firma Carl Zeiss Jena) mit einer 100-, 400- und 1000-fachen Vergrößerung Verwendung.

Der Befunderhebung und Interpretation von zytochemisch gefärbten Präparaten musste eine Festlegung von Auswertungskriterien vorausgehen. Diese stützten sich auf Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen, die zusätzlich bei jeder Untersuchungsreihe mit angefertigt worden waren. Hierbei konnte im Rahmen der Positiv-Kontrolle auf die hohe Affinität des Leucocyte Common Antigens (LCA) bei der Färbung von Zellen lymphoiden Ursprungs zurückgegriffen werden. In diesem Zusammenhang bestätigten die rot angefärbten Leukozyten des Präparates den Erfolg des gesamten Färbevorganges. Ein Ausbleiben der Färbung musste dagegen als Zeichen eines fehlerhaften Färbeprozesses gewertet werden. In Hinblick auf die mikroskopische Auswertung der Untersuchungsergebnisse ermöglichte die bereits erwähnte Negativ-Kontrolle mittels Pufferlösung (Tris-Puffer) eine weitere Überprüfung der gesamten Färbereihe. In diesem Fall durfte sich bei regelrechter Durchführung der Prozedur keine Rotfärbung der Zellmembranen bzw. des Zytoplasmas ergeben.

## 4. Ergebnisse

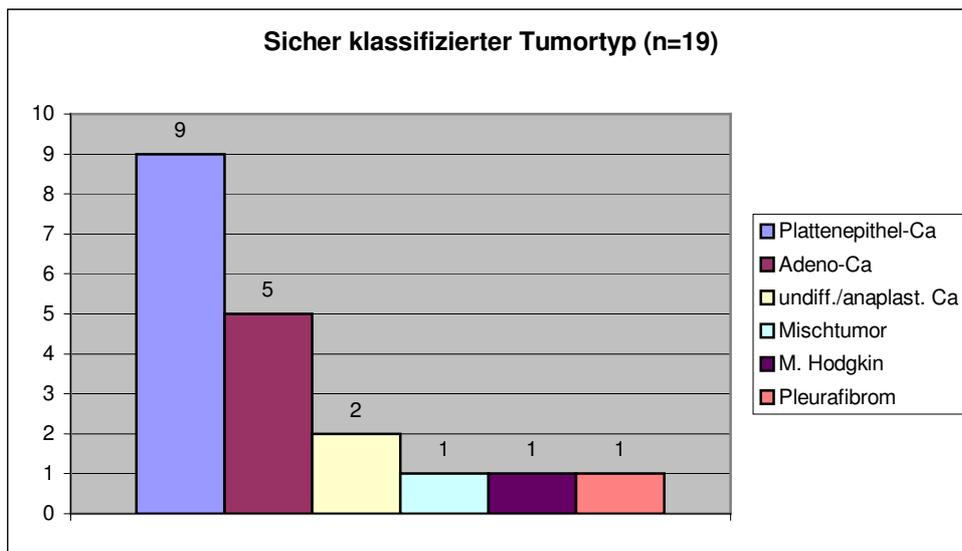
### 4.1 Darstellung und Auswertung der Ergebnisse

#### 4.1.1 Zytologiebefunde

Die zytologische Analyse aus OP-Präparaten, Katheterbiopsien und Feinnadelpunktionen ergab folgende Ergebnisse:

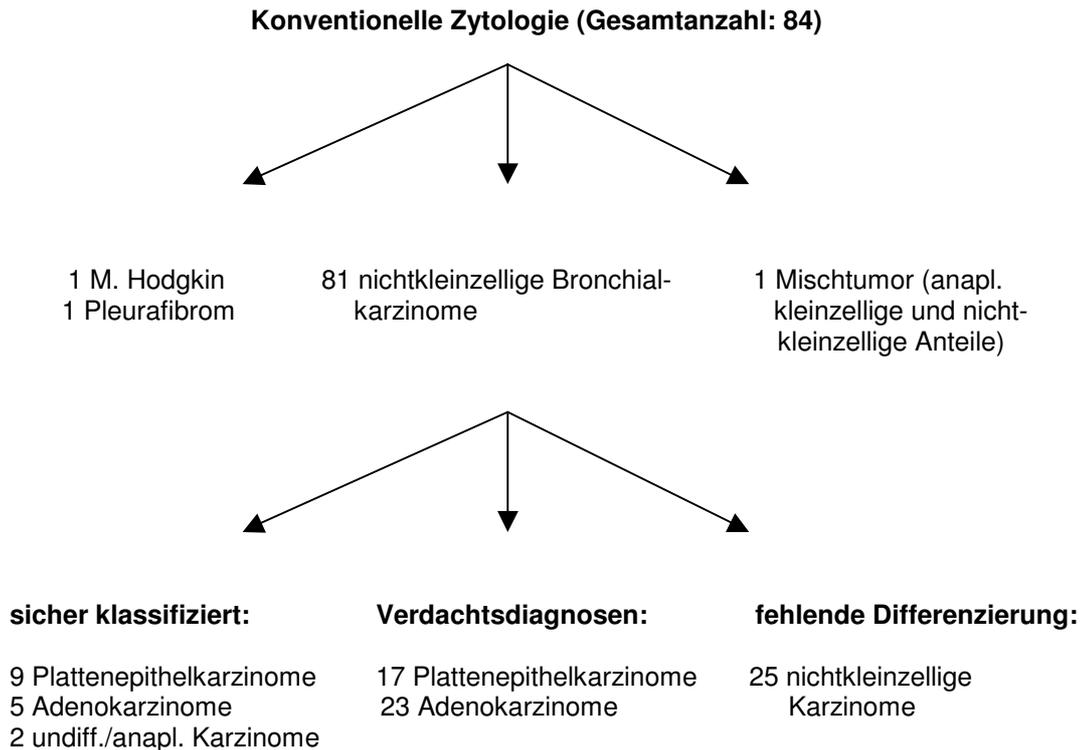
Durch die konventionelle zytologische Untersuchung wurde in 81 Fällen ein nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom diagnostiziert.

Der Untersucher identifizierte sicher 9 Plattenepithelkarzinome, 5 Adenokarzinome und 2 undifferenzierte Karzinome. Einmal zeigte das vorliegende Material einen Misch tumor mit Anteilen eines anaplastisch kleinzelligen und eines undifferenzierten nichtkleinzelligen Karzinoms. Darüber hinaus wurde mittels konventioneller Zytologie einmal ein M. Hodgkin und einmal ein Pleurafibrom festgestellt (Abb. 23).



**Abbildung 23: Mittels konventioneller Zytologie sicher klassifizierte Tumortypen bei insgesamt 84 Untersuchungen**

17 mal sprach der Befund für das Vorliegen eines Plattenepithelkarzinoms und 23 mal für ein Adenokarzinom. In 25 Fällen wurde nur ein nichtkleinzelliges Karzinom erkannt, ohne dass eine weitere Differenzierung vorgenommen werden konnte.



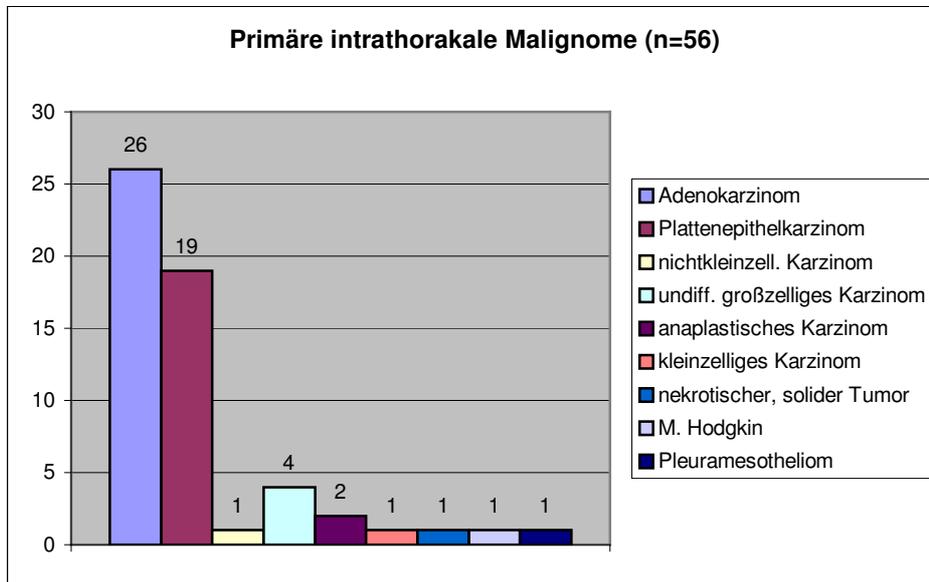
**Abbildung 24: Gesamtergebnisse der konventionellen Zytologie**

#### 4.1.2 Histologiebefunde

Zur Kontrolle der zytologischen Auswertung erfolgte eine retrospektive Analyse der Histologiebefunde, die bei allen 60 OP-Präparaten, bei 6 Katheterbiopsien und 5 Feinnadelpunktionen erhoben wurde. An dieser Stelle muss je ein Teil der Katheterbiopsien (9 Fälle) und Feinnadelpunktionen (4 Fälle) ausgeklammert werden, da kein Material für die histologische Untersuchung gewonnen wurde. Folglich standen der Durchsicht 71 histologisch gesicherte Enddiagnosen zur Verfügung, die nachfolgend aufgeführt werden sollen. Die histologischen Untersuchungen wurden im Pathologischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgenommen.

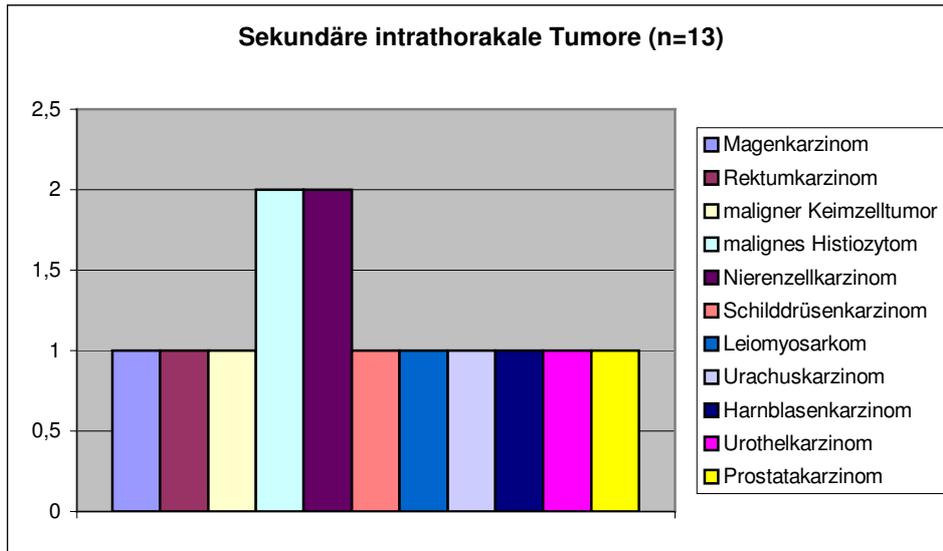
Bei 26 Patienten fand sich ein histologisch gesichertes Adenokarzinom der Lunge. Diese Diagnose stellte mit 36,6% des Patientengutes den zahlenmäßig größten Anteil der Befunde dar. Weiterhin zeigte die Durchsicht bei 19 Patienten ein primäres Plattenepithelkarzinom der Lunge und bei einem Patienten konnte ein nichtkleinzelliges Karzinom ohne weitere Differenzierung bezüglich adenoiden oder plattenepithelialen Ursprungs konstatiert werden. 10 Präparate ergaben bei der Analyse eher seltene intrapulmonale Malignome. Im Einzelnen fanden sich 4 undifferenzierte großzellige Karzinome, 2 anaplastische Karzinome, ein nekrotisch solides Karzinom, ein kleinzelliges

Karzinom, ein Pleuramesotheliom und ein M. Hodgkin mit direktem Lungenbefall (Abb. 25).



**Abbildung 25: Histologiebefunde – Primäre intrathorakale Malignome**

Außerdem konnte in 13 Fällen eine andere maligne Grunderkrankung in Form von metastatischer Ausbreitung einer extrapulmonalen Neoplasie dokumentiert werden. Dabei handelte es sich bei je einem Patienten um ein Adenokarzinom des Magens bzw. des Rektums und bei einem Patienten um einen malignen Keimzelltumor des Hodens. Außerdem lag in 2 Fällen die Metastasierung eines malignen sarkomatösen Tumors vor, der sich als fibröses Histiozytom darstellte. Weiterhin wurde bei 2 Patienten der Primärtumor als Nierenzellkarzinom, bei einem Patienten als Schilddrüsenkarzinom und bei einem weiteren als pleomorphes Leiomyosarkom beschrieben. Je ein Patient litt an einem Urachus-, einem Harnblasen-, einem Urothel- bzw. einem Prostatakarzinom (Abb. 26).

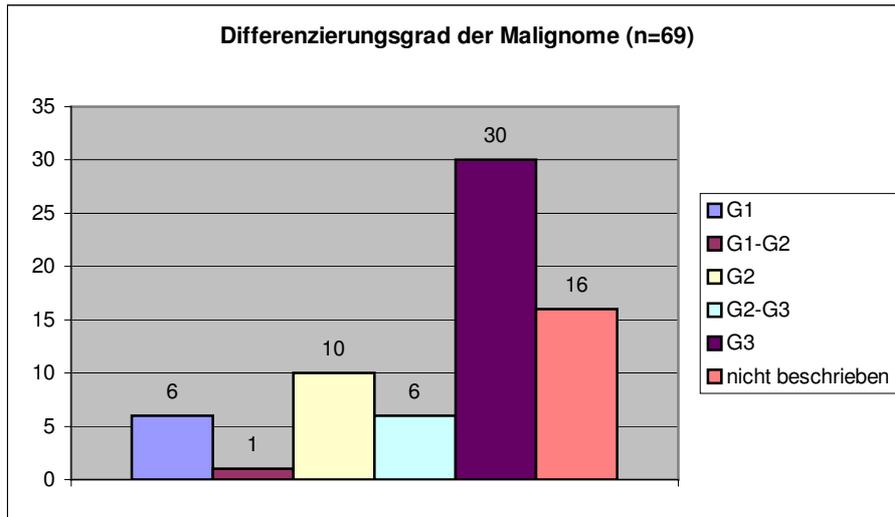


**Abbildung 26: Histologiebefunde - Sekundäre intrathorakale Tumore**

Bei einem Patienten stellte sich ein benigner Tumor im Sinne eines Pleurafibroms heraus und bei einem weiteren Patienten ergab die Untersuchung folgendes Ergebnis: diskrete chronische Bronchitis mit partieller Vernarbung sowie beginnender Reservezellmetaplasie. Kein Anhalt für Malignität.

Mit der weiterreichenden Klassifikation der Neoplasien wurde im Fall von bewiesener Malignität in 53 Fällen zusätzlich ein Differenzierungsgrad festgelegt:

Bei 30 Patienten handelte es sich hierbei um schlecht differenzierte Karzinome (entspricht dem histologischer Differenzierungsgrad G3), bei 10 Patienten um mäßig differenzierte (Differenzierungsgrad G2) und in 6 Fällen um gut differenzierte Tumore (Differenzierungsgrad G1). Außerdem konnte bei weiteren 6 Patienten das Vorliegen von schlecht bis mäßig (Differenzierungsgrad G2-G3) und in einem Präparat die Existenz von mäßig bis gut differenzierten Malignomen (Differenzierungsgrad G1-G2) dokumentiert werden. In 16 Fällen war aus dem Histologiebefund kein Differenzierungsgrad zu entnehmen (Abb. 27).



**Abbildung 27: Histologiebefunde - Differenzierungsgrad der Malignome**

#### 4.1.3 Zytochemiebefunde

Auf der Basis der bereits aufgeführten Kriterien für die Auswertung erfolgte die Beurteilung der Präparate an einem Axioskop 50 (Firma Carl Zeiss Jena), ebenso wie die vorangegangene Diagnostik der Giemsa-Präparate.

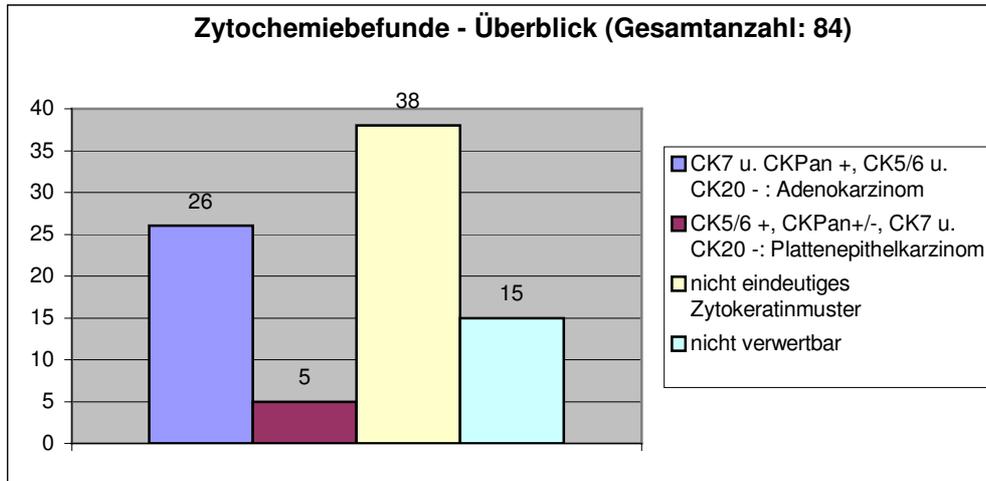
Bei insgesamt 26 Präparaten ergab die Zytokeratinkonstellation eine Anfärbung von CK 7, CK Pan und der Positiv-Kontrolle LCA. Weiterhin stellten sich CK 5/6, CK 20 und die Negativ-Kontrolle (Puffer) als ungefärbt dar. Somit lagen Kriterien für ein Adenokarzinom vor.

In 5 Fällen zeigte die Untersuchung folgendes Zytokeratinmuster: CK 5/6 positiv (+), CK 7 negativ (-), CK 20 -, CK Pan überwiegend positiv (+/-), LCA +, Puffer - und somit das Vorliegen von Plattenepithelkarzinomen.

Des weiteren konnte bei 38 Untersuchungen keine eindeutig richtungsweisende Befundkonstellation hinsichtlich der Zytokeratinmuster herausgearbeitet werden, so dass bei den vorliegenden Präparaten ein Abgleich mit entsprechenden Vergleichstabellen (Tabelle 5, Seite 9 und „Zytokeratin - Expression in diversen Karzinomen“ von H. Lobeck (52)) erfolgen musste.

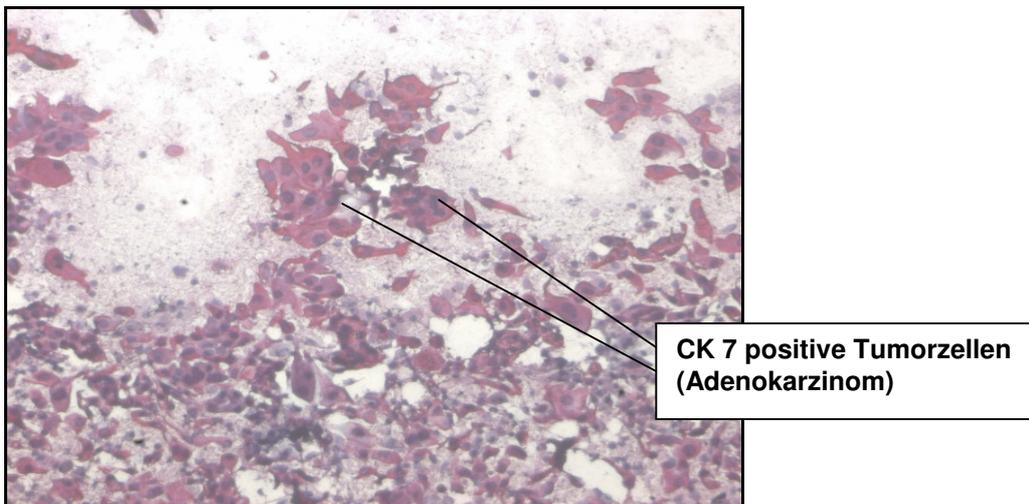
Bei 15 Präparaten war eine Auswertung aus verschiedenen Gründen nicht möglich, die in Kapitel 4.1.3.3 Befundinterpretation – Fehlerhaftes Material aufgeführt werden.

Die Abbildung 28 zeigt eine Übersicht der zytochemischen Resultate.

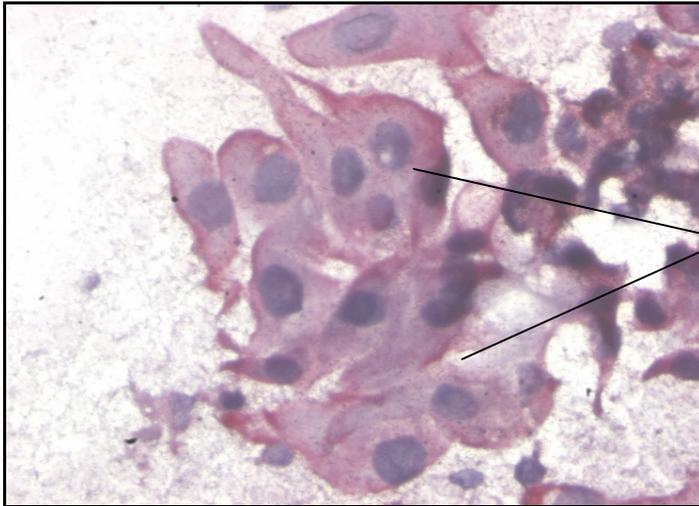


**Abbildung 28: Zytochemiebefunde – Ein Überblick**

Die folgenden Abbildungen zeigen Tumorzellen mit unterschiedlichem Zytokeratinmuster.

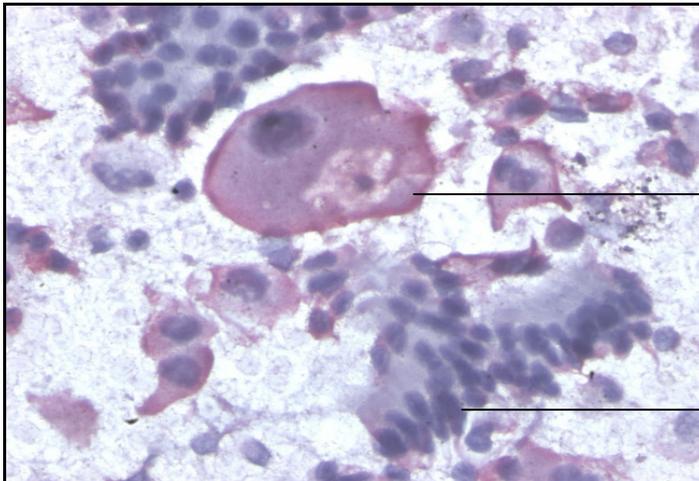


**Abbildung 29: CK 7 positive Tumorzellen eines Adenokarzinoms, 100-fache Vergrößerung, Pat.-Nr. 1012/03**



CK 7 positive Tumorzellen  
(Adenokarzinom)

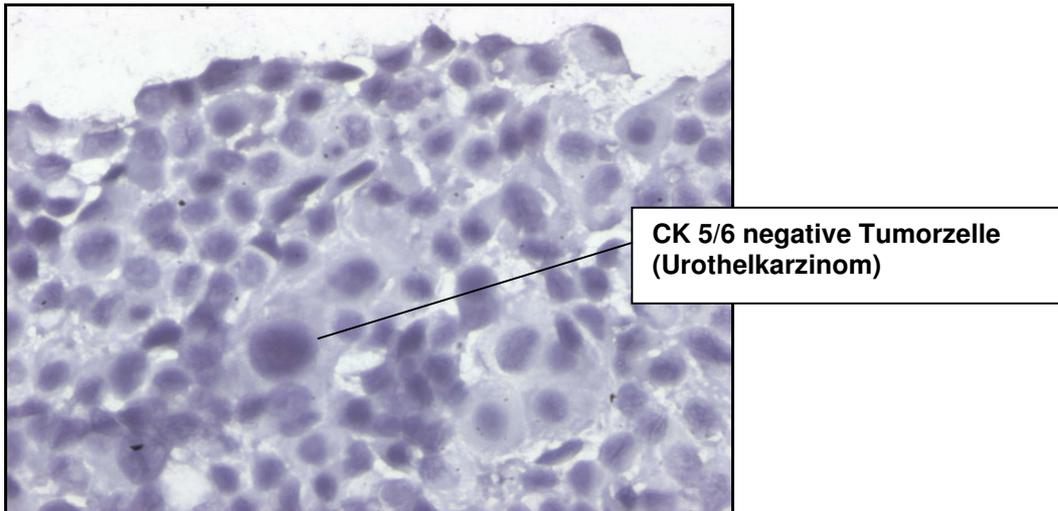
**Abbildung 30: CK 7 positive Tumorzellen eines Adenokarzinoms, 400-fache Vergrößerung, Pat.-Nr. 1012/03**



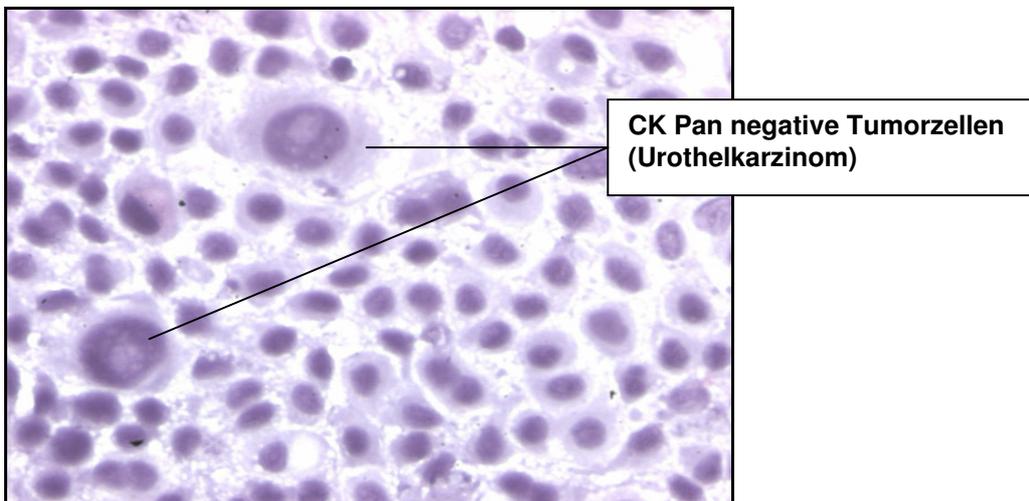
CK7 positive Tumorzelle

Flimmerepithel

**Abbildung 31: CK 7 positive Tumorzellen eines Adenokarzinoms und Flimmerepithel, 400-fache Vergrößerung, Pat.-Nr. 1012/03**



**Abbildung 32: CK 5/6 negative Tumorzellen eines Urothelkarzinoms, 400-fache Vergrößerung, Pat.-Nr. 1438/03**



**Abbildung 33: CK Pan negative Tumorzellen eines Urothelkarzinoms, 400-fache Vergrößerung, Pat.-Nr. 1438/03**

#### **4.1.3.1 Befundinterpretation – Adenokarzinom**

Zunächst soll im Rahmen der Befundinterpretation die Diagnose des Adenokarzinoms, die sich in 26 Fällen ergab, im Vordergrund stehen. Nach Vergleich mit der vereinfachten Arbeitshilfe von H. Lobeck (52) stimmte das entsprechende Zytokeratinmuster mit dem von Adenokarzinomen der Lunge, der Mamma (duktales und lobuläres Ca), der Leber (fibrolaminäres hepatozelluläres und cholangiozelluläres Ca), der Parotis, der Niere (chromophobes und papilläres Ca), der Schilddrüse (follikuläres und medulläres Ca) und der Nebenschilddrüse in allen Kriterien überein. So konnte im Fall einer möglichen Metastasierung eine Zuordnung zum Organ des Primärtumors erfolgen.

Bezüglich der Positiv- und Negativ-Kontrollen ist an dieser Stelle zu bemerken, dass in einem Fall die LCA-Färbung ausblieb, in 3 Fällen die mit Tris-Puffer versetzten Präparate eine Färbung zeigten, in einem Fall beide Kontrollen eine inadäquate Färbung (LCA-Färbung negativ, Puffer positiv) aufwiesen und einmal quantitativ kein aussagekräftiges Zellmaterial zur Verfügung stand. In der Auswertung blieb diese Tatsache jedoch unberücksichtigt.

#### **4.1.3.2 Befundinterpretation - Plattenepithelkarzinom**

In 5 Färbereihen ermöglichte die Zytokeratindarstellung die Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms mit der entsprechenden Formel: CK 5/6 +, CK 7 -, CK 20 - und CK Pan +/- . Nach Vergleich entsprechender Zytokeratinmuster konnten in diesem Zusammenhang folgende mögliche Ausgangspunkte dargestellt werden: Lunge, Mesothel, Mamma (papilläres Ca), Haut, Larynx, Ösophagus, Oropharynx, Peritoneum (serös-papilläres Ca), Anus, Ovar (seröses Ovarial-Ca) und Uterus.

Bei insgesamt 3 Fällen bestätigten die Kontrollen den regelrechten Färbeprozess. In den übrigen 2 Untersuchungsreihen konnte kein entsprechender Abgleich erfolgen, da das erforderliche Zellmaterial fehlte.

#### **4.1.3.3 Befundinterpretation – Fehlerhaftes Material**

Weiterhin waren 15 komplette Färbungen (17,85% von 84 Untersuchungsreihen) einer detaillierten Auswertung nicht zugänglich, wobei an diese Stelle mehrere Gründe zu nennen sind:

In 3 Fällen (3,57%) wurde eine deutliche Überfärbung der Präparate festgestellt, wobei bereits makroskopisch eine starke Rotfärbung des markierten Areals zu verzeichnen war. Mikroskopisch erwiesen sich auch die mit Puffer versetzten Objektträger als gefärbt. Ferner entbehrten 4 komplette Untersuchungsreihen (4,76%) aussagekräftiges Zellmaterial, da dieses im Rahmen von Fixations- und Spülvorgängen verloren gegangen war. In weiteren 8 Präparategruppen (9,52%) mangelte es bei einem oder mehreren CK-Markern an aussagekräftigem Tumormaterial, so dass hier kein komplettes Zytokeratin-Profil erstellt werden konnte.

#### 4.1.3.4 Probleme der Befundinterpretation

Bei 38 der insgesamt 84 analysierten Präparatengruppen (45,23%) ergab die mikroskopische Untersuchung kein eindeutig richtungweisendes Resultat bezüglich der Tumorklassifikation. Im Einzelnen sollen an dieser Stelle die entsprechenden Schwierigkeiten der Auswertung aufgezeigt werden:

1. 6 mal konnte eine alleinige Anfärbung des CK 7 dargestellt werden.
- 2.a) In insgesamt 22 Fällen ließen sich kombiniert CK 5/6 und CK 7 anfärben, wobei zusätzlich 13 Reihen CK 20 positiv waren.
  - b) Die übrigen 9 Präparate wiesen keine CK 20-Positivität auf.
3. 3-malig stellte sich folgendes Muster ein: CK 5/6 negativ; CK 7 , CK 20 und CK Pan positiv.
4. Weiterhin waren in 3 Fällen lediglich CK 20 und CK Pan positiv.
5. 4 Präparate ergaben eine reine CK Pan-Darstellung.

In Bezug auf alle oben genannten Profile (38 von 84 Fällen) ergab sich 27 mal (32,14%) eine regelrechte Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle. In 7 Färbungen (8,33%) hatte sich das mit Puffer versetzte Material rot gefärbt und einmal (1,19%) blieb die LCA-Färbung (Positiv-Kontrolle) aus. Außerdem mangelte es in 3 Sequenzen (3,57%) an einer Negativ-Kontrolle aufgrund fehlenden Zellmaterials.

Im Hinblick auf die erläuterten CK-Kombinationen kamen anhand der vorliegenden Vergleichsmöglichkeiten in Form von Übersichtstabellen (52) folgende Primärkarzinome in Frage (Tabelle 8). Das Färbeergebnis der CK Pan-Darstellung musste allerdings unberücksichtigt bleiben, da es keine expliziten Angaben zu dem verwandten Antikörper gab. Es wurden lediglich die Einzelkomponenten (CK 5, CK 6 und CK 18) in der Vergleichstabelle von H. Lobeck aufgelistet.

**Tabelle 8: Zytokeratinkonstellation und mögliche Primärtumore**

<b>CK-Konstellation</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Vorkommen</b>
CK5/6-, CK7+, CK20-, (CKPan-)	6	Adeno-Ca der Lunge, cholangiozelluläres u. hepatozelluläres (fibrolaminäres) Ca der Leber, ductales u. lobuläres Mamma-Ca, Nierenzell-Ca, Nebenschilddrüsen-Ca, Schilddrüsen-Ca, Adeno-Ca der Parotis
CK5/6+, CK7+, CK20+, (CKPan-)	13	kloakogenes Ca des Anus, Urothel-Ca
CK5/6+, CK7+, CK20-, (CKPan-)	9	papilläres Mamma-Ca, Mesotheliom, seröses Ovarial-Ca, serös-papilläres Peritoneal-Ca, seröses Uterus-Ca
CK5/6-, CK7+, CK20+, (CKPan+)	3	Adenokarzinom des Gallenganges und der Harnblase
CK5/6-, CK7-, CK20+, (CKPan+)	3	Adenokarzinom des Kolons u. des Dünndarms, Merkelzell-Ca der Haut, intestinale Form des Papillenadeno-Ca's
CK5/6-, CK7-, CK20-, (CKPan+)	4	hepatozelluläres (trabekuläres) Ca der Leber, medulläres Mamma-Ca, klarzelliges Nieren-Ca, Granulosazelltumor des Ovars, Adeno-Ca der Prostata

Es ist darauf hinzuweisen, dass sich die entsprechenden hypothetischen Einteilungen mittels Listenvergleich lediglich an der für die Diagnose relevanten CK-Kombinationen orientierten, so dass einige Färbereigenschaften (diverse, in dieser Arbeit nicht dargestellte Zytokeratine; unterschiedliche Färbeintensitäten) unberücksichtigt bleiben mussten.

Im Hinblick auf die o.g. vielfältigen Möglichkeiten der Tumor-Entität, ist an dieser Stelle auf das eventuelle Vorliegen von pulmonalen Metastasen hinzuweisen, deren Ursprung die jeweilige Neoplasie sein könnte. Diese Option soll im weiteren Verlauf der Auswertung in die Analyse der Gesamtergebnisse miteinbezogen werden.

#### 4.1.4 Zytologie und Histologie im Vergleich

Zunächst soll hierbei eine Gegenüberstellung der jeweiligen Dignität der vorliegenden Präparate, die durch beide Untersuchungsmethoden festgestellt wurde, erfolgen.

Insgesamt legte der klinische Zytologe in 83 Fällen eindeutige Malignitätskriterien dar. Ein weiteres Präparat ergab keinen Anhalt für maligne Entartung.

Im Rahmen der histologischen Begutachtung der Präparate wurden in 69 Fällen maligne und in 2 Fällen benigne Gewebsveränderungen dokumentiert.

Beim direkten Vergleich von insgesamt 71 Zytologie- und Histologieergebnissen hinsichtlich der Dignitätsbeurteilung war lediglich in einem Fall eine fehlende Übereinstimmung zu verzeichnen. Dieses entspricht einem Prozentsatz von 1,41. Im Speziellen handelte es sich hierbei um Tupfpräparate, die perioperativ von einem 67-jährigen männlichen Patienten gewonnen worden waren. Im Rahmen der zytologischen Untersuchung war die Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms dokumentiert worden. Histologisch allerdings konnte kein Anzeichen für Malignität gefunden werden. Die histologische Diagnose lautete: diskrete chronische Bronchitis mit partieller Vernarbung sowie beginnender Reservezellmetaplasie.

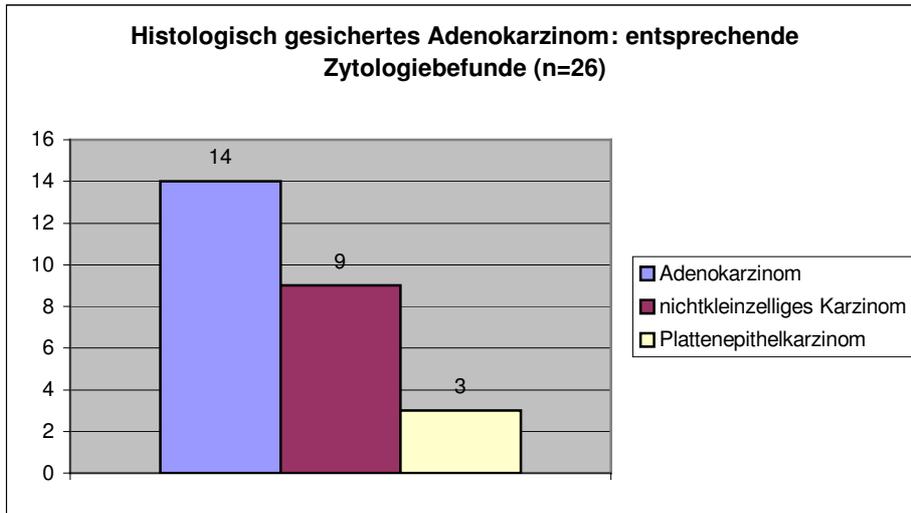
Mit dem Histologieergebnis als Goldstandard liegt also der positive prädiktive Wert der Routinezytologie bei 0,986, wobei dieser Rechnung der Quotient aus der Anzahl richtig positiv diagnostizierter Patienten (RP: 70 Fälle) und der Summe von richtig positiv (70 Fälle) und falsch positiv diagnostizierten Patienten (FP: 1 Fall) zu Grunde gelegt wurde:

Positiver prädiktiver Wert: $RP/(RP+FP)$
--

Nachdem bereits ein Dignitätsvergleich der vorliegenden Präparate erfolgt ist, schließt sich nun im weiteren Verlauf die genaue Gegenüberstellung der einzelnen zytologischen und histologischen Befunde an.

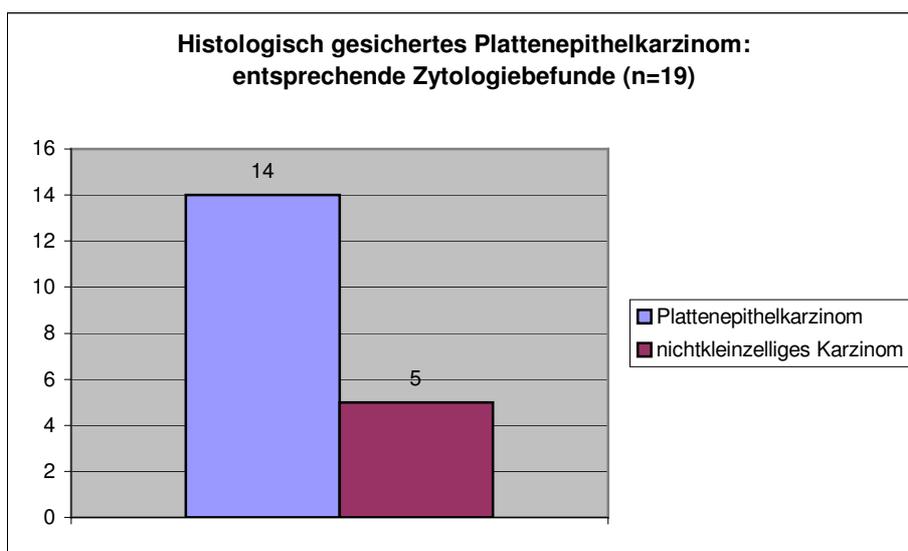
Zunächst soll die größte Patientengruppe betrachtet werden, die in dieser Arbeit aus 26 Patienten mit histologisch gesichertem pulmonalen Adenokarzinom besteht. Zytologisch ergab sich hierbei eine Übereinstimmung der Diagnose in 14 Fällen, wobei sich der Untersucher eindeutig auf ein Adenokarzinom festlegte bzw. die Verdachtsdiagnose äußerte. Diese Tatsache entspricht einem Anteil von 53,85% der betrachteten 26 Fälle (19,72% der Gesamtzahl (GZ) von 71 Patienten mit vorliegenden Zytologie- und Histologiebefunden). 9 mal wurde aus zytologischer Sicht von einem nichtkleinzelligen Karzinom gesprochen (34,61% von 26 Patienten (Teilkollektiv: TK); 12,68% der GZ). In 3

Fällen (11,54% TK; 4,23% GZ) war zytologisch der Verdacht auf ein Plattenepithelkarzinom geäußert worden (Abb. 34).



**Abbildung 34: Zytologische Typendiagnose bei histologisch gesichertem Adenokarzinom**

Die nächsten Vergleiche sollen anhand der 19 histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinome (TK: 19 Patienten) erfolgen. Von diesen wurden zytologisch bereits 14 (73,68% TK; 19,72% GZ) als solche beschrieben und 5 (26,32% TK; 7,04% GZ) als nichtkleinzellige Karzinome eingruppiert. Falsche Typisierungen ergaben sich von Seiten der Zytologie an dieser Stelle nicht. Insgesamt kann also hinsichtlich der pulmonalen Plattenepithelkarzinome eine Übereinstimmung von nahezu 74% der zytologischen Diagnosen des Teilkollektivs (19 Patienten) festgestellt werden (Abb. 35).



**Abbildung 35: Zytologische Typendiagnose bei histologisch gesichertem Plattenepithelkarzinom**

In zwei weiteren Fällen beschrieb der Histologe anaplastisch undifferenzierte Karzinome. Die entsprechenden Zytologiebefunde lauteten: Adenokarzinom und nichtkleinzelliges Karzinom.

Vier histologisch als undifferenziert-großzellig klassifizierte Karzinome wurden zytologisch als nichtkleinzellig-adenoides Karzinom, als schlecht differenziertes Plattenepithelkarzinom, als nichtkleinzelliges und als anaplastisches Karzinom eingeordnet.

Das histologisch gesicherte nichtkleinzellige Karzinom entsprach auch zytologisch diesem Befund.

Weiterhin zeigte das kleinzellige Karzinom zytologisch das Bild eines Mischtumors.

Bezug nehmend auf das weitgehend nekrotische solide Karzinom der Lunge (histologisches Urteil) ist an dieser Stelle die zytologische Klassifikation des schlecht differenzierten Adenokarzinoms zu nennen.

Einen eindeutigen Konsens ergaben beide Untersuchungsmethoden bezüglich des M. Hodgkin, der sich sowohl anhand histologischer als auch mittels zytologischer Kriterien dokumentieren ließ.

In einem Fall stellte der Untersucher histologisch ein Pleuramesotheliom fest. Zytologisch imponierte der Befund als nichtkleinzelliges Karzinom.

In 13 Fällen wurde Material untersucht, bei dem die Frage zu klären war, ob es sich um Metastasen eines bekannten Primums handelte. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

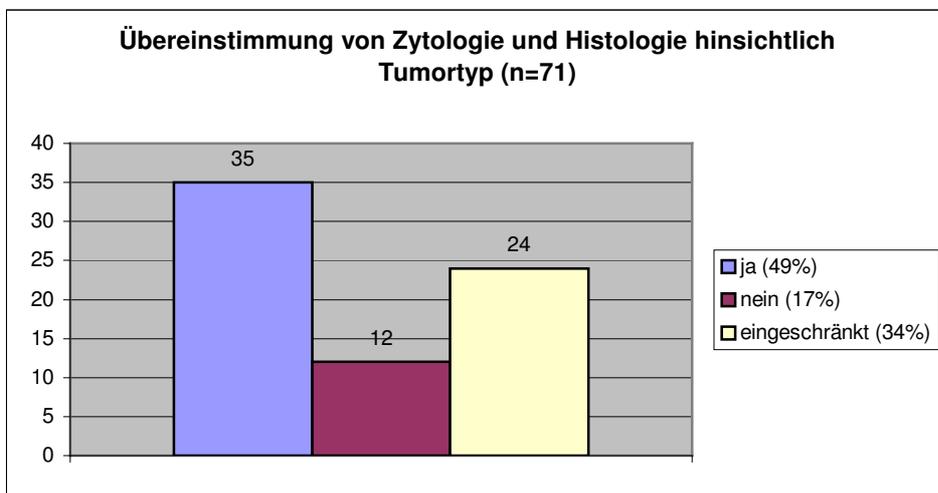
**Tabelle 9: Histologie- und Zytologiebefunde: extrapulmonale Primärtumore**

Befund Histologie	Befund Zytologie	Übereinstimmung	
		Dignität	Tumortyp
schlecht diff. Adenokarzinom des Magens	Adenokarzinom	ja	ja
partiell nekrot. Adenokarzinom; mit einer Metastase des klin. mitgeteilten Rektum-Ca's vereinbar	Plattenepithelkarzinom	ja	nein
verschleimendes Adenokarzinom; mit Metastasen eines bekannten Urachus-Ca's vereinbar	nichtkleinzelliges Karzinom	ja	eingeschränkte Übereinstimmung
solides Karzinom; metastatische Infiltrate eines mal. Keimzelltumors unter dem Bild eines embryonalen Karzinoms	nichtkleinzelliges Karzinom	ja	eingeschränkte Übereinstimmung
solides Karzinom; mit der Metastase eines klin. bekannten Harnblasen-Ca's vereinbar	undiff. Karzinom	ja	eingeschränkte Übereinstimmung
pleomorphes Leiomyosarkom	Adenokarzinom	ja	nein
malignes Histiocytozom	Adenokarzinom	ja	nein
malignes Histiocytozom	Plattenepithelkarzinom	ja	nein
Infiltrate eines hellzelligen Tumors; am ehesten vereinbar mit einem Nierenzellkarzinom	Plattenepithelkarzinom	ja	nein
Pleurakarzinose; hellzelliges Karzinom, vereinbar mit Metastasen eines klin. mitgeteilten Nierenzellkarzinoms	Adenokarzinom	ja	ja
metastat. Infiltrate eines bekannten Prostatakarzinoms	nichtkleinzelliges Karzinom	ja	eingeschränkte Übereinstimmung
Metastase eines Schilddrüsenkarzinoms	Adenokarzinom	ja	ja
metastat. Infiltrat eines Urothel-Ca's	Adenokarzinom	ja	ja
<b>Übereinstimmung %</b>		<b>100%</b>	ja: <b>30,77% TK</b> nein: <b>38,46% TK</b> eingeschränkt: <b>30,77% TK</b>

Hinsichtlich Malignitätskriterien bestand eine 100%-ige Konkordanz der Zytologie- und Histologiebefunde. In 4 von 13 Fällen (30,77% TK; 5,63% GZ) konnte bereits zytologisch sicher der Tumortyp bestimmt werden. Bei weiteren 4 Präparaten hatte sich der Zytologe nicht eindeutig auf einen Tumortyp festgelegt, aber mit den Diagnosen „nichtkleinzelliges Karzinom“ bzw. „undifferenziertes Karzinom“ eine richtungsweisende Tendenz beschrieben (30,77% TK; 5,63% GK). Lediglich bei 5 Befunden (38,46% TK; 7,04% GZ) differierten Zytologie und Histologie. Eine Festlegung des Primärtumors erfolgte nur histologisch. Zytologisch wurde dazu nicht Stellung genommen.

Im Folgenden soll auf die beiden Befunde eingegangen werden, die histologisch keine Malignitätskriterien aufwiesen. In einem Fall konnte eine Übereinstimmung erzielt werden: sowohl histologisch als auch zytologisch wurde ein benignes Pleurafibrom diagnostiziert. Im Vergleich dazu steht der Fall eines Patienten, wo der histologische Befund Hinweise für eine diskrete chronische Bronchitis aufzeigte, zytologisch jedoch die Diagnose Plattenepithelkarzinom dokumentiert worden war. Es handelte sich hierbei um Tupfpräparate. Der voranstehende Kasus stellt zusätzlich, wie oben bereits erläutert, den einzigen Fall dar, in dem Histologie und Zytologie im Rahmen dieser Untersuchungsreihe bezüglich Dignität differieren.

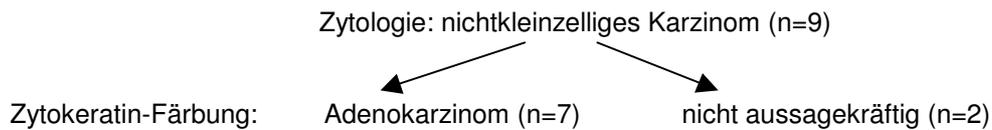
Zur Übersicht soll zusammenfassend eine graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgen (Abb. 36).



**Abbildung 36: Übereinstimmung von Zytologie und Histologie hinsichtlich Tumortyp**

#### 4.1.5 Zytologie und Zytokeratin-Färbung im Vergleich zur Histologie

Insgesamt konnten mittels Routinezytologie bereits 53,85% der histologisch gesicherten Adenokarzinome (14 Patienten) diagnostiziert werden. In 9 Fällen wurde der Befund als „nichtkleinzellig“ formuliert und in 3 Fällen die Diagnose Plattenepithelkarzinom gestellt. Die Zytokeratinkonstellation der nichtkleinzelligen Karzinome entsprach in 7 von 9 Fällen der eines Adenokarzinoms. In je einem Fall war das vorliegende Material der CK-Färbung nicht aussagekräftig bzw. ergab ein uneindeutiges Zytokeratinmuster (Abb. 37).

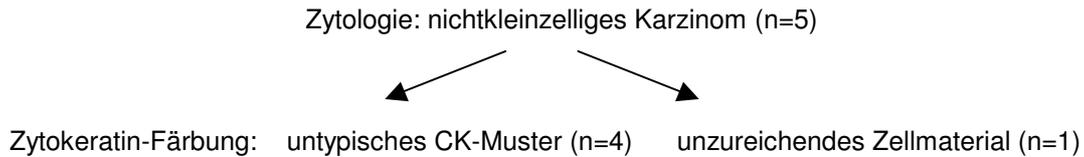


**Abbildung 37: Zytochemische Differenzierung des zytologisch gesicherten nicht-kleinzelligen Karzinoms (Histologie: pulmonales Adenokarzinom)**

Bezüglich der 3 Präparate, die zytologisch als Plattenepithelkarzinom beschrieben worden waren, konnte auch mittels CK-Darstellung keine Effektivitätssteigerung erreicht werden. In 2 Fällen zeigte sich eine CK 5/6-, CK 7-, CK 20- und Pan-CK-Positivität. Einmal ergab sich folgendes Zytokeratinmuster: CK 5/6 +, CK 7+, CK 20 - und CK Pan +.

Zusammenfassend lässt sich für diesen Abschnitt konstatieren, dass die Aussagekraft der Zytologie in Kombination mit der Immunfärbung von 53,85% auf 80,77% (21 eindeutig erkannte Adenokarzinome, Gesamtanzahl: 26) bei der Diagnose des pulmonalen Adenokarzinoms um fast 27%-Punkte gesteigert werden konnte.

Im weiteren Verlauf sei das Augenmerk auf die Betrachtung der pulmonalen Plattenepithelkarzinome (19 Patienten) gerichtet. Wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, konnte bereits in der zytologischen Routinefärbung eine Übereinstimmung in 14 Fällen erreicht werden. Die anderen 5 Präparate erhielten die Beurteilung „nichtkleinzellig“ und boten sich somit ebenfalls für eine weitere Analyse mittels Zytokeratin-Färbung an. In einem Fall konnte kein eindeutiges Zytokeratinmuster wegen fehlenden Zellmaterials erstellt werden. Bei den übrigen 4 Präparaten ließ sich die klassische Kombination CK 5/6 und CK Pan positiv, CK 7 und CK 20 negativ nicht beschreiben. Es fanden sich jeweils 2 mal lediglich eine CK 7- bzw. Pan-CK-Positivität (Abb. 38).



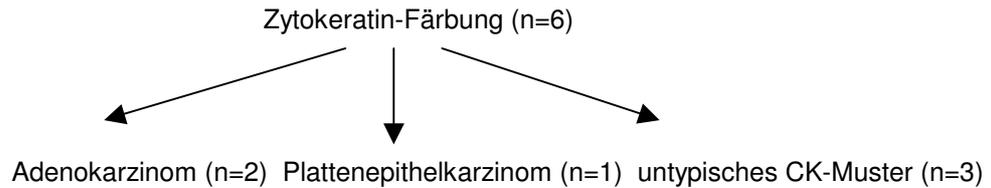
**Abbildung 38: Zytochemische Differenzierung des zytologisch gesicherten nicht-kleinzelligen Karzinoms (Histologie: pulmonales Plattenepithelkarzinom)**

Eine effektive Verbesserung der Gesamtaussagekraft der zytologischen Färbetechniken im Hinblick auf die Enddiagnose lässt sich im Fall des Plattenepithelkarzinoms in dieser Arbeit folglich nicht bestätigen. Die zytologische Diagnostik stimmt in Bezug auf das primäre pulmonale Plattenepithelkarzinom näherungsweise in 74% mit der Histologie überein, ohne dass eine Effektivitätssteigerung mittels Zytokeratinanalyse erreicht werden konnte.

Bei den 6 anaplastischen bzw. undifferenziert-großzelligen Karzinomen konnte routinezytologisch in einem Fall eine exakte Übereinstimmung getroffen werden (anaplastisches Karzinom). 2 Präparate ergaben mit der Aussage des „nichtkleinzelligen Karzinoms“ eine richtungsweisende Interpretation, ohne allerdings den Entwicklungsgrad der Tumore zu berücksichtigen. Zweimal legte sich der klinische Zytologe auf ein Adeno- und einmal auf ein Plattenepithelkarzinom fest. Werden diese Ergebnisse mit der zusätzlichen Darstellung von Zytokeratin-Färbungen kombiniert, so zeigt sich in 3 Fällen ein CK-Muster, das weder eindeutig für das Vorliegen eines Adenokarzinoms noch für ein Plattenepithelkarzinom spricht. Die entsprechenden Resultate sahen wie folgt aus:

- CK 5/6 +, CK 7 +, CK 20 +, CK Pan + (in 2 Fällen)
- CK 5/6 +, CK 7 +, CK 20 -, CK Pan + (in 1 Fall)

Zweimal ließ sich die CK-Konstellation eines Adenokarzinoms finden (CK 7- und Pan-CK-Positivität, CK 5/6- und CK 20-Negativität). In einem Fall konnte sowohl zytologisch als auch immunzytochemisch die Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms gestellt werden.



**Abbildung 39: Zytochemische Differenzierung von histologisch gesicherten anaplastischen bzw. undifferenziert-großzelligen Karzinomen**

Insgesamt konnte auch an dieser Stelle keine effektive Steigerung der Aussagekraft erreicht werden.

Das histologisch gesicherte nichtkleinzellige Karzinom ließ sich bereits in der Routinezytologie beschreiben und ergab im Listenvergleich (52) hinsichtlich der Zytokeratinstruktur Kennzeichen für das Fehlen von Adenokarzinom-typischen Konfigurationen, da eine Positivität aller Zytokeratine vorzuweisen war.

Sowohl kleinzelliges Bronchialkarzinom als auch solides Karzinom ließen sich immunzytochemisch ebenfalls nicht eindeutig klassifizieren. Das gleiche gilt für den Fall des Pleuramesothelioms und des M. Hodgkin. Die entsprechenden Zytokeratinmuster sollen im Verlauf aufgeführt werden:

- kleinzelliges Karzinom: komplette Zytokeratin-Positivität
- solides Karzinom: CK 5/6 -, CK 7 +, CK 20 -, CK Pan -
- Pleuramesotheliom: CK 5/6 -, CK 7 -, CK 20 +, CK Pan +
- M. Hodgkin: CK 5/6 -, CK 20 -, CK Pan +, fehlendes Zellmaterial bei CK 7

Im Fall des Pleurafibroms und des zytologischen Verdachts auf das Vorliegen eines Plattenepithelkarzinoms wiesen die Zellen folgendes Zytokeratinmuster auf:

- Pleurafibrom: CK 5/6 +, CK 7 +, CK 20 -, CK Pan +
- suspekter Zellen mit Hinweis für PE-Ca: CK 5/6 -, CK 7 -, CK 20 -, CK Pan +

Das gewonnene Zytokeratinmuster ergab in beiden Fällen keinen richtungsweisenden Befund. Allerdings kann bei fehlender CK 5/6-Färbung im Fall des zytologisch geäußerten Verdachts eines Plattenepithelkarzinoms diese Aussage relativiert werden.

Abschließend sollen nun noch die extrapulmonalen Primärtumore mit sekundär pulmonalem Befall betrachtet werden. Hierbei trägt Tabelle 10 zur Übersicht bei.

**Tabelle 10: Histologie, Zytologie und Zytochemie im Vergleich**

Befund Histologie	Befund Zytologie	CK-Muster	
		negativ	positiv
schlecht diff. Adenokarzinom des Magens	Adenokarzinom	CK5/6 CK20	CK7 CKPan
partiell nekrot. Adenokarzinom; mit einer Metastase des klin. mitgeteilten Rectum-Ca's vereinbar	Plattenepithelkarzinom	CK5/6 CK20	CK7 CKPan
verschleimendes Adenokarzinom; mit Metastasen eines bekannten Urachus-Ca's vereinbar	nichtkleinzelliges Karzinom	CK5/6 CK20	CK7 CKPan
solides Karzinom; metastatische Infiltrate eines mal. Keimzelltumors unter dem Bild eines embryonalen Karzinoms	nichtkleinzelliges Karzinom		CK5/6 CK7 CK20 CKPan
solides Karzinom; mit der Metastase eines klin. bekannten Harnblasen-Ca's vereinbar	undiff. Karzinom	CK5/6 CK7	CK20 CKPan
pleomorphes Leiomyosarkom	Adenokarzinom	CK5/6 CK7	CK20 CKPan
malignes Histiozytom	Adenokarzinom	CK20  CKPan nicht beurteilbar	CK5/6 CK7
malignes Histiozytom	Plattenepithelkarzinom	CK7 CK20	CK5/6 CKPan
Infiltrate eines hellzellig Tumors; am ehesten vereinbar mit einem Nierenzellkarzinom	Plattenepithelkarzinom	CK5/6 CK7 CK20 CKPan	
Pleurakarzinose; hellzelliges Karzinom, vereinbar mit Metastasen eines klin. mitgeteilten Nierenzellkarzinoms	Adenokarzinom	CK20	CK5/6 CK7 CKPan
metastat. Infiltrate eines bekannten Prostatakarzinoms	nichtkleinzelliges Karzinom	CK5/6 CK7 CK20 CKPan	
Metastase eines Schilddrüsenkarzinoms	Adenokarzinom	CK5/6 CK20 CKPan	CK7
metastat. Infiltrat eines Urothel-Ca's	Adenokarzinom	CK5/6	CK7 CK20 CKPan

Bei der histologisch nachgewiesenen Metastase des schlecht differenzierten Adenokarzinoms des Magens ließ sich sowohl zytologisch als auch anhand des CK-Musters eindeutig ein Adenokarzinom belegen, wobei im Listenvergleich (52) keine eindeutige Zuordnung zu einem Primärtumor möglich war. Hierbei kämen z.B. neben dem Bronchialkarzinom auch das duktales bzw. lobuläre Mammakarzinom oder das cholangiozelluläre Karzinom der Leber infrage.

Das gleiche CK-Muster ergab sich bei der Untersuchung der Metastasen des partiell nekrotischen Adenokarzinoms des Rektums, bei denen der zytologische Befund für das Vorliegen eines Plattenepithelkarzinoms sprach. In diesem Fall hat die zusätzliche Darstellung der Zytokeratine die zytologische Aussage mit Recht angezweifelt. Ähnliches galt für das Urachuskarzinom, wobei die Zytokeratinkonstellation den zytologischen Vorbefund (nichtkleinzelliges Karzinom) richtungsweisend beeinflusste.

Bei den übrigen o.g. Fällen sorgte die zusätzliche Angabe des Zytokeratinmusters eher für Unklarheit als für weiterreichende Informationen. Dieses lag zum einen daran, dass sich im Listenvergleich an wenigstens einer Position der für die Diagnose relevanten CK-Kombinationen Abweichungen fanden. Zum anderen waren dort keine Angaben zum malignen Keimzelltumor (embryonales Karzinom), pleomorphen Leiomyosarkom und malignen Histiozytom dokumentiert.

Im Folgenden soll sich die Betrachtung der 13 Präparatereihen anschließen, bei denen keine Materialentnahme für die histologische Untersuchung vorgenommen worden war und somit kein histologischer Befund als Referenz vorlag.

In 2 Fällen stimmten Zytologie und Immunzytochemie mit der Diagnose eines Adenokarzinoms überein. Gleiches ist für den Fall eines zytologisch und immunzytochemisch bestätigten Plattenepithelkarzinoms zu sagen. Einmal konnte zytologisch ein nichtkleinzelliges Karzinom beschrieben werden, wobei das CK-Muster für das Vorliegen eines Adenokarzinoms sprach. Weiterhin ergab sich einmal mittels Giemsa-Färbung die Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms. Der entsprechende Zytochemiebefund allerdings belegte das Vorhandensein eines Adenokarzinoms. Die übrigen 8 Untersuchungsreihen ergaben folgende Diagnosen: 3 Adenokarzinome, 2 Plattenepithelkarzinome und 3 nichtkleinzellige Karzinome. Das entsprechenden Zytokeratinmuster dagegen war diffus und somit ohne Anhaltspunkte für eine weiterreichende Eingruppierung der Tumore.

Zusammenfassend ist im Hinblick auf die Betrachtung der Kombination aus Zytologiebefund und CK-Profil im Vergleich zur Histologie folgendes Gesamtergebnis zu beschreiben:

1. Beim Vorliegen eines Adenokarzinoms konnte die Aussagekraft der Routinezytologie bezogen auf die Tumortypisierung durch die zusätzliche Darstellung von Zytokeratinmustern gesteigert werden.
2. Deutlich weniger richtungsweisend stellte sich die Zytokeratinanalyse bei der Befundinterpretation der Plattenepithelkarzinome, der undifferenzierten bzw. anaplastischen Karzinome, seltener pulmonaler Prozesse und Lungenmetastasen anderer Primärtumore dar. Hierbei konnte das nachgewiesene CK-Muster die Aussage der Routinezytologie in seltenen Fällen lediglich unterstreichen, ermöglichte allerdings keinen neuen Erkenntnisgewinn.

## **4.2 Fehlerquellen**

Eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung der Zytokeratin-Färbung ist die Materialqualität und -quantität. Die Beurteilbarkeit bei blutigen Ausstrichen wird erheblich eingeschränkt. Befinden sich nur wenige Tumorzellen im Präparat, kann die Aussagefähigkeit des Verfahrens ebenfalls erschwert sein.

Ein weiteres Problem stellt das Abschwemmen des Zellmaterials vom Objektträger im Verlauf des Fixations- und Färbeprozesses dar. Es muss deshalb auf die sorgfältige und schonende Durchführung dieser Arbeitsgänge geachtet werden.

Es ist wichtig, dass alle Substrate der CK-Färbung aufeinander abgestimmt sind und somit einer festgelegten Reihenfolge der Arbeitsschritte bedürfen. Variationen in Bezug auf Inkubationszeiten und Verdünnungsverhältnisse der Antikörper müssen vermieden werden, um stets eine Vergleichbarkeit der Färbungen zu gewährleisten.

Zur Vermeidung bzw. zur Erkennung methodisch bedingter Fehler muss eine Positiv- und Negativ-Kontrolle in jedem Fall erfolgen.

Wenn die Auswertung nicht innerhalb von wenigen Tagen vorgenommen wird, so besteht die Möglichkeit, dass sich kristalline Strukturen auf den Objektträgern bilden, die zu einer erheblich erschwerten Beurteilbarkeit führen. Aus diesem Grund sollte die Betrachtung der gefärbten Präparate sicherheitshalber innerhalb von 1-2 Tagen erfolgen. Exakte Untersuchungen dazu wurden jedoch nicht vorgenommen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Konventionelle Zytologie und Immunzytochemie

Seit vielen Jahrzehnten stellt die Routinezytologie einen wichtigen Teilbereich der Diagnostik bronchopulmonaler Tumore dar. Besonders der Vorteil der schonenden Materialgewinnung und des geringen Materialbedarfs ist für die Präparateherstellung von großer Bedeutung. Jedoch im Hinblick auf die Aussagekraft der Untersuchungsmethode variieren die wissenschaftlichen Daten enorm.

In dieser Arbeit zeigte die Zytologie im Vergleich zur Histologie einen sehr guten positiven prädiktiven Wert in der Dignitätsbeurteilung intrathorakaler Prozesse. Bei insgesamt 71 histologisch gesicherten Diagnosen lag der positive prädiktive Wert bei 0,986. Lediglich in einem Fall differierten die Befunde. Histologisch lautete der Befund: diskrete chronische Bronchitis mit partieller Vernarbung sowie beginnender Reservezellmetaplasie ohne Anhalt für Malignität. Der klinische Zytologe allerdings konnte im vorliegenden Präparat Hinweise für ein nichtkleinzelliges Karzinom mit diagnostischen Anhaltspunkten für ein Plattenepithelkarzinom finden. Auf den ersten Blick scheint eine zytologische Fehldiagnose vorzuliegen. Allerdings muss diese Aussage aufgrund folgender Tatsachen relativiert werden:

Der Zytologie steht im Vergleich zur Histologie ein dezimierter Materialumfang zur Verfügung. Es werden stets nur einzelne Zellen beurteilt, ohne dass Aussagen zur Umgebung getroffen werden können. So besteht die Gefahr, dass gerade pathologisch veränderte Zellen nicht im Präparat erfasst werden bzw. ihre Anzahl deutlich reduziert ist. In diesem Fall handelte es sich um Tupfpräparate, die nach operativer Entfernung eines linksseitigen Oberlappentumors gewonnen worden waren. Unter Berücksichtigung der vorab genannten Malignitätskriterien zeigten sich dem zytologischen Untersucher Zellmerkmale, die richtungsweisend für ein malignes Geschehen waren. Allerdings ist wichtig zu wissen, dass nicht alle Zellen, die einen Teil der Kriterien erfüllen, auch zwangsläufig eine maligne Transformation durchgemacht haben. Ein solcher Grenzfall lässt sich z.B. bei Dysplasien beschreiben. Der vorliegende histologische Befund sprach von partieller Vernarbung im Sinne einer Fibrose. Auch diese Veränderung kann prinzipiell die zytologische Aussagekraft beeinflussen, so dass sich der zytologisch malignitätsverdächtige Befund histologisch als gutartig erwies.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für eine hohe Konkordanz zwischen Histologie und Zytologie stellt die Erfahrung der Untersucher dar. Die zytologische Befunderhebung wurde in diesem Fall von Fachärzten für Innere Medizin/Pneumologie durchgeführt, die

neben der praktischen klinischen Tätigkeit auch mit zytologischen Untersuchungen vertraut sind. Ein ganz interessanter Gesichtspunkt wurde von Feddersen und v. Wichert (29) geäußert, indem sie postulierten, dass es sich bei zytologischen Untersuchungen – speziell bei Sputumanalysen und zytologischer Materialauswertung von Bronchiallavagen – um „ausgezeichnete Methoden zur Bronchialkarzinomdiagnostik“ handele. Allerdings würde diesen Techniken der Stellenwert in der Tumordiagnostik, der ihnen eigentlich zustehen müsste, mangels erfahrener Untersucher nicht eingeräumt. Deshalb sollte dieser Umstand in Vergleichsstudien mit für die Zytologie ungünstigen Ergebnissen berücksichtigt werden. Die Weiterentwicklung bildgebender Apparate und Verbesserung von Punktionstechniken hätten in Phasen der zytologischen Stagnation konsekutiv die Bedeutung der Histologie gesteigert. Im Hinblick auf die in dieser Arbeit erhobenen Befunde seitens der klinisch tätigen Zytologen und Mitarbeiter des zytologischen Labors des Diakoniekrankenhauses Halle ist von einem hohen Erfahrungswert auszugehen. In diesem Fall wird der Arbeit im zytologischen Labor ein großer Stellenwert in der Diagnostik pulmonaler Prozesse zugeschrieben, wobei die Befunderhebung rasch, präzise und besonders patientennah erfolgt.

Offensichtlich gibt es auch im Hinblick auf die verschiedenen Entnahmetechniken zur Materialgewinnung Unterschiede in der Sensitivität. Erfolgt eine alleinige Betrachtung der Sputumzytologie bei der Detektion von Bronchialkarzinomen, so erreicht diese nach Einschätzung von Macha (54) lediglich eine Sensitivität von 20-30%. Linder (51) ermittelte für die Sputumzytologie eine Sensitivität von 50%, für die zytologische Untersuchung von Bronchiallavagen bzw. Bürstenabstrichen eine Sensitivität von 65% und für Feinnadelpunktionen eine Sensitivität von 89%. Als Grund für eine eventuelle Sensitivitätsminderung wird hierbei der mechanische Einfluss der Präparateherstellung angeführt: Durch Verwischen der Ausstriche können Zellzusammenhänge zerstört bzw. schleimhaltige Vakuolen aus den Zellen gepresst werden, womit besonders die Diagnose des Adenokarzinoms und des kleinzelligen Karzinoms erschwert ist. Diese Aussage deckt sich mit den eigenen Erfahrungen der klinischen Zytologen und stellt eine Problematik in der Zytologie dar. In einer aktuellen Publikation von 2006 im Rahmen einer Dissertation von Hessel (40) an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurde für die Sputumzytologie eine Sensitivität von 57% berechnet. Eine Karzinomtypisierung hinsichtlich kleinzelligen und nichtkleinzelligen Karzinoms war in 92,8% der Fälle möglich. Ferner leistete die Sputumzytologie beim Tumor-Restaging einen diagnostischen Beitrag, wohingegen keine signifikante Bedeutung bei der Metastasensuche herausgearbeitet werden konnte. Weitere Untersuchungen ergaben

eine Sensitivität von 91% bei der Materialgewinnung durch Bürstenbiopsie und 88% mittels Katheterbiopsie (39).

Auch die Tatsache, dass sich in einem Tumor Zellen unterschiedlicher Differenzierung befinden können und der Zytologie stets nur ein Bruchteil des Materialumfangs zur Verfügung steht, bewirkt laut Lindner (51) eine eventuelle Diskrepanz zwischen Zytologie- und Histologiebefund. Diese Feststellung gibt auch Anlass zu folgender Frage: Haben unterschiedliche oder schlechte Tumordifferenzierungen Einfluss auf die Aussagekraft der Zytokeratindarstellung mittels Immunzytochemie?

Es ist bekannt, dass Zellen, die maligne entarten, teilweise ihr charakteristisches CK-Muster behalten und somit häufig einem Tumortyp zugeordnet werden können. Allerdings weichen einige Karzinomtypen im Rahmen der malignen Transformation von ihrer ursprünglichen Zytokeratinexpression ab und unterdrücken oder exprimieren verschiedene Zytokeratine. Vyberg und Moll (75) bestätigen diesen Sachverhalt. Auch therapeutische Interventionen wie Chemotherapie und Radiatio können solche Musterveränderungen bedingen. Im Rahmen dieser Arbeit fiel auf, dass bei anaplastischen bzw. undifferenziert großzelligen Karzinomen (6 Fälle) nur ein zytologischer Befund exakt die Diagnose anaplastisches Karzinom ergab. Die übrigen 5 Befunde wurden als maligne erkannt, allerdings gab es keine eindeutige Übereinstimmung der Typendiagnosen. Das immunzytochemische Ergebnis war auf den ersten Blick enttäuschend und brachte keinen weiteren Erkenntnisgewinn. Jedoch mit der Überlegung, dass einige Karzinome das charakteristische Zytokeratinmuster ändern, darf diese Möglichkeit in den vorliegenden – zahlenmäßig geringen Fällen – nicht außer acht gelassen werden. Undifferenziertheit von Tumoren könnte folglich zu konsekutiver Vermischung von Zytokeratineigenschaften führen. Somit ist anzunehmen, dass mit mangelnder Differenzierung der Tumorzellen auch die Aussagekraft der Zytokeratindarstellung eingeschränkt sein könnte. Außerdem ergaben sich ähnliche Ergebnisse für die CK-Färbung von seltenen intrapulmonalen Prozessen, die z.T. noch nicht einmal in der Vergleichsliste (52) aufgeführt werden. Die Mehrzahl der Publikationen befasst sich zudem mit der Untersuchung immunhistochemischer Färbungen von häufig vorkommenden bronchialen Tumoren.

Jones et al. (44) untersuchten in ihrer Studie die Bedeutung von Zytologiebefunden (Präparate aus Bronchiallavagen und Bürstenabstrichen) in der Diagnostik des Bronchialkarzinoms im direkten Vergleich zur Histologie (Feinnadelpunktion) mittels flexibler Bronchoskopie. In diesem Zusammenhang konnte die diagnostische Aussagekraft der Histologie alleine mit 71,6% und nach Zuhilfenahme der Zytologie mit 89,3% dokumentiert werden. Dieses gilt besonders für die Diagnose von endobronchialen

Tumoren (95% diagnostiziert). Zusammenfassend hat sich die kombinierte Betrachtungsweise der beiden Untersuchungstechniken als nützlich erwiesen. In dieser Arbeit wurde zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse die Histologie als Referenz eingesetzt, so dass eine Gegenüberstellung von Zytologie in Kombination mit Immunzytochemie auf der einen Seite und der Histologie auf der anderen Seite resultierte. Eine Steigerung der Aussagekraft von 53,85% auf 80,77% konnte mittels Verwendung beider zytologischer Färbemethoden beim Vorliegen eines Adenokarzinoms erreicht werden, so dass von einer sinnvollen Kombination zur Diagnosestellung eines Adenokarzinoms auszugehen ist.

In der Veröffentlichung von Baba et al. (6) wurde die Bedeutung der prä- und intraoperativen Zytodiagnostik (Bürstenabstrich, Zangenbiopsie, transbronchiale und perkutane Feinnadelaspiration) bei Bronchialkarzinomen behandelt. Eine frühzeitige Feststellung der Tumorzellendifferenzierung nehme großen Einfluss auf die Ausdehnung des Resektatumfanges und somit auf die Therapie. Diese Aussage ist durch eigene Erfahrungen mit der klinischen Zytologie des Diakoniekkrankenhauses Halle zu untermauern, da eine präoperative Diagnostik mittels minimal-invasiver Techniken (Bürsten-, Feinnadel- und Katheterbiopsien) zur Materialgewinnung pulmonaler Herdbefunde Einfluss auf das weitere diagnostische und besonders operativ-therapeutische Vorgehen nimmt.

Ähnliches wurde bereits 1982 von Fischnaller (31) konstatiert. Es wurde erneut die Bedeutung der Kombination von verschiedenen Diagnosetechniken betont, wobei Fischnaller (31) eine erste Sputumuntersuchung, eine bronchoskopische oder perthorakale Feinnadelpunktion und im Verlauf eine postbronchoskopische zweite Sputumserie empfahl. Zudem sollte von jedem Material, das intraoperativ gewonnen wurde, ein Tupfpräparat für die zytologische Beurteilung hergestellt werden. Im Diakoniekkrankenhauses Halle wird dieses Prozedere zur raschen Materialgewinnung für die zytologische Beurteilung ebenfalls angewandt, wobei sowohl die Sputumzytologie als auch Katheter-, Feinnadel- und Bürstenbiopsien zum Einsatz kommen. Sowohl die Sputumzytologie als auch die Bürstenbiopsie stellten keinen Schwerpunkt dieser Arbeit dar, jedoch fanden bei 11% der Fälle Feinnadelpunktionen und bei 18% der Fälle Katheterbiopsien statt. Zudem werden regelmäßig von intraoperativ gewonnenen Rundherden Tupfpräparate angefertigt. 71% der untersuchten zytologischen Präparate sind durch diese Methode hergestellt worden. Die sich anschließende zytologische Routinefärbung ermöglicht aufgrund des geringen Zeitaufwandes eine schnelle Beurteilbarkeit der Präparate.

## **5.2 Bedeutung von Tumormarkern in der Diagnostik pulmonaler Malignome**

Obwohl die Bestimmung anderer (Serum)Tumormarker und deren Bedeutung in der Malignomdiagnostik nicht Inhalt dieser Arbeit waren, soll sich an dieser Stelle eine kurze Zusammenfassung der entsprechenden Literatur anschließen.

Die Weiterentwicklung der Methoden zur Karzinomdiagnostik beschränkte sich nicht nur auf die Verbesserung des technischen Bereichs der bildgebenden Apparate und invasiven Techniken, sondern umfasste ebenfalls die Bestimmung von Tumormarkern. In diesem Kontext diente insbesondere die Untersuchung von Bronchialkarzinomen dem Fortschritt der Wissenschaft, wobei zunächst allgemein die Immunzyto- und Immunhistochemie zu erwähnen sind. In mehreren Studien konnten sich einige Tumormarker vielfach bewähren. In anderen Fällen musste allerdings auch die Ineffektivität diverser Marker festgestellt werden (10, 14, 20, 30, 33, 37, 38, 59, 63).

Relevante Marker im Serum für die pulmonale Karzinomdiagnostik wurden bereits im Kapitel „Vorbetrachtungen“ erwähnt. Es ist darauf hinzuweisen, dass im Rahmen der entsprechenden Studien als Gesamtergebnis folgende Tatsache herausgearbeitet werden konnte: Die untersuchten Tumormarker nahmen je nach Bedeutung einen größeren oder kleineren Teilbereich der klinischen Diagnostik ein. Jedoch erfüllte kein Tumormarker alle Kriterien einer idealen Nachweismethode mit hoher Sensitivität zur Tumorart, exakter Korrelation zur Tumormasse, optimaler Verlaufsdarstellung der Therapie und präziser Prognosebeurteilung. Bei der in dieser Arbeit verwandten Immunfärbung stellte sich zu Beginn die Frage, ob eine Darstellung von speziellen Zytokeratinen in zytologischen Präparaten pulmonaler Herdbefunde prinzipiell möglich ist und ein entsprechendes Zytokeratinmuster Hinweise auf einen bestimmten Tumortyp geben könnte. Die übrigen o.g. Faktoren, die einen idealen Tumormarker charakterisieren, waren ebenfalls nicht Bestandteil dieser Untersuchung, so dass die hier erhobenen Daten keine weiteren Rückschlüsse erlauben.

## **5.3 Zytokeratine – Bedeutung in der modernen Medizin**

In vielen publizierten wissenschaftlichen Untersuchungen dieser Intermediärfilamente wurde die jeweilige Aussagekraft anhand von histologischen Präparaten oder Blutserumanalysen dokumentiert, da sich Zytokeratine sowohl innerhalb von Tumoren als auch z.T. fragmentiert, im Blut zirkulierend, als Zeichen von Zell-Lyse und Tumornekrose nachweisen lassen (14). Im Verlauf soll nun auf die einzelnen, in dieser Arbeit verwandten Zytokeratine eingegangen werden.

### 5.3.1 Zytokeratin 5/6

Abutaily et al. (1) bestimmten 2002 in ihrer Studie u.a. den Einfluss von CK 5 in der Differenzierung zwischen primär pulmonalen Adenokarzinomen und malignen Mesotheliomen. Hierbei bedienten sich die Autoren Formalin-fixierter und in Paraffinwachs eingebetteter Histologiepräparate. Im Anschluss an die Zytokeratin-Färbung konnte bei 6% der Adenokarzinome und bei 63% der Mesotheliome ein entsprechender CK-Nachweis dokumentiert werden. Nach dieser Beurteilung wurde eine Empfehlung für die Zytokeratin 5/6-Darstellung in der pulmonalen Malignomdiagnostik – im Speziellen der Mesotheliomdiagnostik – mittels Histologie ausgesprochen. Zum gleichen Endergebnis kamen auch Attanoos et al. (5) und Moll et al. (57), wobei letztgenannte einen speziellen monoklonalen Antikörper zur Zytokeratin 5-Darstellung einsetzten. Dieser zeigte sich in histologischer Färbung allgemein u.a. in Basalzellen von Plattenepithelien, in einigen Myoepithelzellen und auch in Mesothelzellen der Pleura und des Peritoneums. 92,3% der untersuchten Mesotheliome (12 von 13 Fällen) wiesen eine deutliche Färbung auf, wohingegen 21 Adenokarzinome als CK 5-negativ bezeichnet wurden. Auch Ordóñez (61) konnte mit seiner Darstellung von CK 5/6 mittels Immunhistochemie den Einfluss der Zytokeratine in der Differentialdiagnostik von Pleuramesotheliomen (CK 5/6 positiv) und pulmonalen Adenokarzinomen (CK 5/6 negativ) herausarbeiten. 2006 schloss sich dann durch Ordóñez (62) die differentialdiagnostische Betrachtung von pulmonalen Plattenepithelkarzinomen und Mesotheliomen mittels verschiedener immunhistochemischer Marker an, wobei auch CK 5/6 einbezogen wurde. Das Plattenepithelkarzinom stellte sich in 100% der Fälle als CK 5/6 positiv dar und das Mesotheliom wies eine 93%-ige CK 5/6-Positivität auf, so dass dieser Tumormarker alleine nicht effektiv zur Differentialdiagnostik beiträgt. Bereits 1997 kamen Clover et al. (21) zu folgendem Ergebnis: Im Rahmen ihrer histologischen Studie waren sämtliche epitheloide und azinäre Mesotheliome (23 Fälle) hoch positiv für CK 5. In Tumorbereichen mit sarkomatoidem Bild allerdings musste die Reaktion als schwach oder negativ und in einem Fall als uneindeutig gewertet werden. Die histologischen Präparate von 22 Adenokarzinomen waren CK 5 negativ, weitere 4 ergaben ein uneinheitliches Bild und ein Adenokarzinom wurde als positiv beschrieben. Auch diese Studie unterstrich am Schluss die Bedeutung von Zytokeratin 5 in der Mesotheliomdiagnostik. In den eigenen Untersuchungen waren von insgesamt 26 histologisch diagnostizierten primären Adenokarzinomen der Lunge 16 Fälle CK 5/6 negativ (61,54%) und 8 Fälle CK 5/6 positiv (30,77%). Bei 2 Färbereihen konnte keine Aussage getroffen werden, da insuffizientes Zellmaterial vorlag. In den 2 Fällen von Metastasierung bei Adenokarzinomen des

Gastrointestinaltrakts und im Fall des Urachuskarzinoms zeigte sich ebenfalls keine CK 5/6-Färbung. Folglich kann hierbei eine Übereinstimmung mit den zuvor angeführten Studien festgestellt werden. Da sich unter den Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden waren, nur ein Fall mit malignem Mesotheliom befand, sind die erhobenen Befunde nicht signifikant.

2006 untersuchten Camilo et al. (17) u.a. die Bedeutung von CK 5/6 und CK 7 zur Klassifikation nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome. Hierbei stellte sich bei histologisch gesicherten Adenokarzinomen in 56,2% eine CK 5/6-Positivität und in 94,1% eine CK 7-Positivität ein. Gerade die relativ hohe CK 5/6-Positivität überrascht an dieser Stelle, da das typische Zytokeratinmuster primärer pulmonaler Adenokarzinome keine CK 5/6-Färbung erwarten lässt. Da im weiteren bei den untersuchten Plattenepithelkarzinomen nur ein Fall als CK 7 positiv beschrieben wurde, hielten die Autoren dieses Zytokeratin für aussagekräftiger in der Differentialdiagnostik von Adeno- und Plattenepithelkarzinom der Lunge. Als Endpunkt der Untersuchung am eigenen Krankengut kann ein Konsens postuliert werden, denn gerade die CK 5/6-Färbung erwies sich nur in einigen Fällen als diagnostisch richtungsweisend. Eine größere Bedeutung wird auch an dieser Stelle dem Zytokeratin 7 zugestanden.

Einer ganz anderen Fragestellung widmeten sich Kaufmann et al. (46), indem sie den Einfluss des Zytokeratin 5-Markers (monoklonaler Antikörper D5/16B4 zur CK 5/6-Darstellung), der auch in dieser Arbeit verwandt wurde, im Rahmen der Primärtumorsuche bei metastasierten, kaum oder undifferenzierten Karzinomen untersuchten. Hierbei zeigte der Zytokeratin 5-Marker eine Sensitivität von 84% und eine Spezifität von 79% in der Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen als Primärtumore. Die ebenfalls untersuchten Bronchialkarzinome in Form von Adenokarzinomen und kleinzelligen Karzinomen ließen sich im ersten Fall zu 33% und im zweiten Fall gar nicht anfärben, so dass die Autoren in diesem Kontext die Bedeutung von CK 5/6 beim Vorliegen von Karzinomen plattenepithelialen Ursprungs betonten. Da auch in dieser Arbeit Patienten (19 Fälle) mit pulmonalen Plattenepithelkarzinomen betrachtet wurden, sollen die erhobenen Befunde im Hinblick auf o.g. Aussagen dargestellt werden: 7 Färbereihen (36,84%) wiesen eine eindeutige CK 5/6-Färbung auf, wohingegen 12 der untersuchten Präparate CK 5/6 negativ waren (63,16%), so dass eine Diskordanz mit den von Kaufmann et al. (46) erhobenen Daten vorliegt. Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse bei Verwendung des gleichen Antikörpers könnte in dem zu untersuchenden Material liegen. In dieser Arbeit war z.T. nicht bekannt, ob es sich bei den vorliegenden Präparaten um Zellen eines Primärtumors oder einer Metastase handelte. Zudem

mussten die Untersucher den Differenzierungsgrad des Prozesses noch festlegen. Kaufmann et al. (46) dagegen war die Differenzierung und Metastasierung der Tumore bereits bekannt. Somit wurden die diagnostischen Fragestellungen von verschiedenen Ebenen aus betrachtet. Differenzierte Analysen des Sachverhaltes sollten jedoch nicht im Vordergrund dieser Arbeit stehen und bieten somit Anlass zu weiteren Untersuchungen.

### **5.3.2 Zytokeratin 7 und 20**

Ritter et al. (65) untersuchten 1998 u.a. den Einfluss von Zytokeratin 7 und 20 bei der oft schwierigen Differentialdiagnostik primärer pulmonaler Adenokarzinome und Metastasen gastrointestinaler Malignome. Zusammengefasst konnte folgende Aussage dokumentiert werden: Besonders im diffizilen Kasus des muzinösen Adenokarzinoms der Lunge, das Zytokeratin 20 aufwies, war kein Marker explizit in der Lage, das Vorliegen einer pulmonalen Metastase gastrointestinalen Ursprungs auszuschließen. Im speziellen Fall waren neben den genannten Zytokeratinmarkern noch zusätzlich u.a. CEA, CA 19-9 und tumorassoziertes Glykoprotein-72 getestet worden. Ähnliches fanden Shah et al. (66) heraus, indem sie feststellten, dass in der Differentialdiagnostik des primären Adenokarzinoms der Lunge bzw. des Kolons CK 7 und CK 20 effektive Marker zu sein scheinen, wobei das Bronchialkarzinom primär CK 7 und das Kolonkarzinom primär CK 20 exprimieren würde. Im Falle eines muzinösen Adenokarzinoms jedoch ist eine CK 20-Darstellung wahrscheinlich und könnte dementsprechend bei alleiniger Berücksichtigung der Immunhistochemie zu falschen Ergebnissen führen. Lau et al. (49) kamen in ihrer Studie zu vergleichbaren Aussagen.

2002 stellten Amin et al. (4) fest, dass sich im Rahmen ihrer Studie über das mikropapilläre Adenokarzinom 93% der Adenokarzinome (14 von 15 Fällen) mit einem CK 7-Marker und lediglich 13% (2 von 15 Fällen) mit einem CK 20-Marker anfärben ließen. Es ist allerdings zu betonen, dass die Zytokeratin-Färbung in diesem Zusammenhang nicht im Mittelpunkt der Untersuchungen stand, sondern dass als eigentliches Ziel die Bedeutung der mikropapillären Tumorkomponente herausgearbeitet werden sollte.

Besonders die Fragestellung der Differenzierung von Adenokarzinomen der Lunge und des Kolons war Inhalt mehrerer Untersuchungen. Loy (53) fand 1995 heraus, dass die alleinige Betrachtung von Zytokeratin 7 oder 20 in der Immunhistochemie keine verlässliche Aussage ermöglicht. Wenn allerdings beide Marker kombiniert würden, so könne das Muster CK 7 positiv/ CK 20 negativ auf der einen Seite richtungsweisend für ein bronchiales Adenokarzinom sein. Dieses Ergebnis stellte sich in der Studie in 86% der Fälle ein. Auf der anderen Seite kann bei der Kombination CK 7 negativ/ CK 20 positiv

(77% der Fälle) von einem Kolonkarzinom ausgegangen werden. Diese genannten CK-Muster bei Adenokarzinomen der Lunge und des Kolons konnten von Tot et al. (72) bestätigt werden. Unter Einbeziehung der zusätzlichen Analyse von Metastasen neben der Primärtumorfärbung erhoben auch Kummar et al. (48) vergleichbare immunhistochemische Befunde. Dieses Ergebnis konnte in der aktuellen Studie von Ikeda et al. (41) unterstrichen werden. 90,9% der Bronchialkarzinome wiesen eine CK 7-Positivität und 100% eine CK 20-Negativität auf, wohingegen sich die pulmonalen Metastasen der Kolonkarzinome in nur 5,3% der Fälle als CK 7-positiv und in 84,2% CK 20-positiv zeigten. Zusätzlich wurde in derselben Studie noch Beta-Catenin als Tumormarker betrachtet, das allerdings in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt werden soll. Ebenfalls aktuelle Daten zu der immunhistochemischen Darstellung von CK 7 und CK 20 können der Studie von Su et al. (69) entnommen werden. Hierbei stand die gleiche Problematik der Differentialdiagnose primärer Adenokarzinome der Lunge und pulmonaler Metastasen gastrointestinaler Karzinome im Vordergrund. Auch in diesem Zusammenhang wurde die Signifikanz von CK 7-Positivität und CK 20-Negativität in primären pulmonalen Karzinomen unterstrichen. Bereits ein Jahr zuvor waren Inamura et al. (42) in ihrer immunhistochemischen Untersuchung zum gleichen Ergebnis gekommen. 2002 postulierten Shah et al. (66), dass die kombinierte Betrachtung von CK 7 und CK 20 mit dieser differentialdiagnostischen Fragestellung als effektiv zu werten ist. Allerdings wurde darauf hingewiesen, dass der Verschleimungsgrad der Zellen das Zytokeratinmuster beeinflussen kann. Dieser Aspekt fand bei der Analyse des eigenen Patientengutes in dieser Arbeit keine Betrachtung, jedoch erscheint die Aussage nachvollziehbar, da auch verschiedene Differenzierungsgrade, ebenso wie ein unterschiedlicher Verschleimungsgrad der Präparate, Auswirkungen auf das Zytokeratin-Profil haben könnten.

Allgemeiner äußerten sich Haraguchi et al. (35), indem sie die primäre Kombination von CK 7- und CK 20-Darstellung bei der Untersuchung von Metastasen bei unbekanntem Primärtumor empfohlen. Allerdings wurde in diesem Zusammenhang lediglich der Fall eines Patienten beschrieben, der sich zur Diagnostik eines unklaren Bauchwandtumors vorgestellt hatte. Bei CK 7-Positivität und CK 20-Negativität des Tumorresektats konnte im Verlauf von mehreren Monaten ein primäres Adenokarzinom der Lunge diagnostiziert werden.

Insgesamt war das Zytokeratin-Panel CK 7/CK 20 Schwerpunkt vieler Untersuchungen, deren Ergebnisse in einem engen Konsens stehen.

Eine differentialdiagnostische Studie, wie sie z.B. Loy (53) und Tot et al. (72) bei der Diagnose Adenokarzinom der Lunge oder des Kolons durchgeführt haben, war nicht

Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchung. Da jedoch Patienten mit primären Adenokarzinomen der Lunge einen großen Teil dieser Arbeit ausmachten, können die Aussagen der beiden Autoren hinsichtlich der Bronchialkarzinome bestätigt werden. Insgesamt wiesen 80,77% der analysierten Adenokarzinome eine positive CK 7-Färbung auf, wohingegen lediglich 3 Präparate CK 7-negativ (11,54%) und weitere 2 (7,69%) nicht aussagekräftig waren. Weiterhin zeigten sich 16 Adenokarzinome als CK 20-negativ (61,54%), 7 als CK 20-positiv (26,92%) und 3 (11,54%) als nicht beurteilbar. Die Kombination CK 7-positiv und CK 20-negativ konnte 14 mal (53,85%) beschrieben werden.

Van de Molengraft et al. (73) beschrieben bereits 1993 die unterschiedliche Anfärbbarkeit von Zytokeratin 7 in der Diagnostik von pulmonalen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen. Alle 20 untersuchten Adenokarzinome wiesen eine positive CK 7-Färbung in der Immunhistochemie auf, wohingegen keines der 24 Plattenepithelkarzinome, unabhängig vom Differenzierungsgrad, CK 7-positiv war. Auch anaplastische kleinzellige Karzinome ließen sich zu fast 91% als CK 7-negativ darstellen. Eine Übereinstimmung der Befunde kann erneut hinsichtlich der CK 7-Positivität der Adenokarzinome betont werden. Im Folgenden sollen jedoch nun die 19 Fälle von Plattenepithelkarzinomen diskutiert werden. 6 Färbereihen (31,58%) stellten sich als CK 7-negativ dar, wohingegen 12 (63,16%) als CK 7-positiv zu beschreiben waren. Ein Präparat (5,26%) war aufgrund zu niedriger Zellzahl nicht aussagekräftig. Die Zytokeratinmuster der 6 anaplastischen Karzinome ergaben sogar in 5 Fällen (83,33%) eine CK 7-Positivität und nur einmal (16,67%) eine CK 7-Negativität. In beiden wissenschaftlichen Arbeiten muss der relativ geringe Materialumfang aufgrund der niedrigen Patientenzahl berücksichtigt werden. Zudem stellt sich erneut die Frage, ob gerade bei den schlecht differenzierten Tumoren eine Vermischung von Zytokeratineigenschaften das darzustellende CK-Profil beeinflusst. Offensichtlich stellt die Diagnostik der pulmonalen Plattenepithelkarzinome neben den anaplastischen Karzinomen mittels immunzytochemischer Färbung eine Schwierigkeit dar, deren Problembhebung noch Anlass zu weiteren Untersuchungen bietet.

Allgemeine Informationen zu Zytokeratin 20 und dessen Vorkommen in normalen und pathologisch veränderten Epithelien ist der histologischen Studie von Moll et al. (59) zu entnehmen. Hierbei wurde betont, dass sich das Spektrum in Zytokeratin 20-exprimierenden malignen Zellen mit dem in entsprechend normalen Zellen vergleichen lässt. So wurde auf das Vorkommen in Adenokarzinomen des Kolons, muzinösen Ovarialtumoren, Transitoriazell- und Merkelzellkarzinomen und deren nicht-pathologischer Zellen verwiesen. Außerdem wurde eine Anfärbbarkeit in

Adenokarzinomen des Magens, des biliären Systems und des Pankreas beschrieben, wohingegen sich Adenokarzinome der Lunge, der Mamma, des Endometriums und Plattenepithelkarzinome im allgemeinen als CK 20-negativ darstellten.

Die zwei Fälle dieser Arbeit mit vorliegender pulmonaler Metastasierung primärer gastrointestinaler Adenokarzinome (ein Magen- und ein Kolonkarzinom) im eigenen Krankengut zeigten sich beide als CK 20-negativ. Aufgrund des geringen Patientenumfangs kann allerdings keine signifikante Aussage gemacht werden. In den 19 Fällen eines histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinoms wiesen 73,68% (14 von 19 Präparaten) eine CK 20-Negativität auf. Zudem zeigten 21,05% eine CK 20-Färbung (4 von 19 Präparaten) und ein Fall blieb aufgrund mangelnden Zellmaterials ohne Aussagekraft. Parallelen aber keine vollkommene Übereinstimmung sind in der Studie von Suo et al. (70) zur immunhistochemischen Darstellung von verschiedenen Zytokeratinen zu finden, die als Endpunkt formulierten, dass bei der Zytokeratinexpression von Plattenepithelkarzinomen verschiedener Ursprungsorgane eine CK 20-Negativität (100% der Fälle) zu verzeichnen ist.

Chausovsky et al. (18) deklarierten ein Zytokeratin 20-Vorkommen im Blut als aussagekräftig für das eventuelle Vorliegen von Metastasen bei Kolon-, Magen- und Pankreaskarzinomen. Eine Vergleichbarkeit ist somit nicht gegeben, da die Untersuchungsmaterialien (Blutserum auf der einen bzw. zytologische Präparate auf der anderen Seite) und die Nachweismethoden differieren.

### **5.3.3 Pan-CK (Zytokeratin 5, 6 und 18)**

Der verwendete Antikörper Pan-CK zeigt im Idealfall eine positive Färbung von Zytokeratin 5, 6 und 18 und ist deswegen besonders zur Darstellung von epithelialen Zellen und Geweben geeignet, die filamentöse Keratine enthalten. Hierbei kann es sich sowohl um einfache Drüsenepithelien als auch um mehrschichtige Plattenepithelien handeln. Es werden folglich Zellen ektodermalen, mesothelialen und endodermalen Ursprungs nachgewiesen, so dass sich der Pan-CK-Marker besonders für die Basisdiagnostik von Tumorpräparaten anbietet. Im Rahmen dieser Arbeit ist ein relativ schmales CK-Spektrum gewählt worden, um eine gewisse Übersicht zu gewährleisten. Da der Pan-CK-Marker genau wie die Einzel-Marker zu handhaben ist, gab es bei der Herstellung der Färbungen keine Probleme. Allerdings muss in Bezug auf die Auswertung der Präparate betont werden, dass für diesen speziellen Marker keine Referenzangaben in der „Vereinfachten Arbeitshilfe“ von H. Lobeck (52) zu finden waren, so dass ein Abgleich mit den beinhalteten Einzel-Markern (also CK 5, 6 und 18) erfolgen musste.

Indirekt konnte aber somit auch eine Überprüfung der jeweiligen CK 5/6-Färbung erfolgen, da diese prinzipiell – falls eine CK 5/6-Färbung erfolgt war – auch eine Pan-CK-Färbung bedeuten musste. Dieses kann jedoch im Umkehrschluss nicht auf CK 5/6-Negativität übertragen werden, da durch den Pan-Marker zusätzlich CK 18 angefärbt wird. So erhielt die Pan-CK-Darstellung eine doppelte Bedeutung, indem auf der einen Seite eine gewisse Kontrolle der CK 5/6-Färbung gegeben war. Auf der anderen Seite sollte untersucht werden, ob mit einem solchen Antikörper-Panel die Differenzierung zwischen Karzinomen und nichtepithelialen malignen Tumoren gelingt.

Insgesamt konnte in 69 Fällen (bezogen auf die Gesamtanzahl von 84 Präparaten) unabhängig vom Tumortyp und Vorliegen eines histologischen Befundes eine Pan-CK-Positivität beschrieben werden. 7 mal war keine Färbung erfolgt und 8 Präparate wiesen kein ausreichendes Zellmaterial – das Dilemma der Zytologie – auf. Unter den Pan-CK-negativen Fällen waren hinsichtlich der 71 histologisch validierten Befunde ein Adenokarzinom, 2 Plattenepithelkarzinome, die Metastase des Schilddrüsenkarzinoms und die Metastase des Prostatakarzinoms. Bis auf 10 Präparate, die kein aussagekräftiges Zellmaterial enthielten, färbten sich alle Tumortypen einschließlich der Metastasen (56 Präparate) an. Da bis auf das Leiomyosarkom (FP: 1 Fall) alle Tumore (RP: 55 Fälle) epithelialen Ursprungs sind, lässt sich für den Pan-Marker ein positiver prädiktiver Wert von 0,982 errechnen. Das muss in Bezug auf die Differenzierung Tumor mit epithelialem oder nichtepithelialem Ursprung als aussagekräftig beurteilt werden. Zu diesem Umstand konnten in der aktuellen Literatur keine adäquaten Angaben gefunden werden.

Wird die Übereinstimmung der dokumentierten CK 5/6-Positivität mit der entsprechenden Pan-CK-Färbung verglichen, so kann folgendes festgestellt werden: Von 31 CK 5/6-positiven Präparaten ergab die Pan-CK-Darstellung in 29 Fällen eine übereinstimmende Färbung. Ein Präparat wies keine Pan-CK-Färbung auf und ein Fall muss wegen fehlenden Zellmaterials unberücksichtigt bleiben. Somit kann nachstehendes festgehalten werden: In effektiv vergleichbaren 30 Fällen konnte diese Studie eine 96,67%-ige Konkordanz zwischen CK 5/6-Positivität und Pan-CK-Positivität dokumentieren. Auch zu diesen Untersuchungen konnten keine weiteren Daten in der Literatur ausfindig gemacht werden.

## 5.4 Zeitaufwand und Kosten

Die Zytokeratin-Färbung ist eine sehr zeitaufwendige Prozedur und bedarf vieler Arbeitsschritte, die aufeinander abgestimmt sein müssen. Für eine komplette Färbung sollte nach der Materialgewinnung und Trocknungszeit eine Arbeitszeit (Markierung der Präparate, Auftragen und Inkubation von Antikörpern, Spülvorgänge) von mehr als 2 Stunden einkalkuliert werden. Dagegen zu setzen ist die rasche Herstellung der Giemsa-Präparate, deren Färbeprozess nur wenige Minuten in Anspruch nimmt. Folglich kann im ersten Fall nur sehr spät festgestellt werden, ob eine Färbereihe unter Zuhilfenahme von Positiv- und Negativ-Kontrollen korrekt angefärbt worden ist. Giemsa-Präparate können dagegen kurzfristig neu hergestellt werden, falls eine mangelhafte Qualität vorliegt.

Zusätzlich muss noch erwähnt werden, dass im laufenden Klinik- und Praxisbetrieb stets auf Kostenminimierung geachtet wird. Da im Vergleich zur Routinezytologie die Anschaffung von Zytokeratinmarkern und deren Reagenzien ein Vielfaches an finanzieller Aufwendung bedeutet, kann diese nicht Technik der ersten Wahl sein. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Kosten einer immunzytochemischen Färbereihe mit 6 Präparaten. Als Grundlage der Berechnung fand die Preisliste der Firma DAKO Diagnostika GmbH von 2002 Verwendung. Es wurden die tatsächlich entstandenen Gesamtkosten für die einzelne Position ermittelt.

**Tabelle 11: Kostenübersicht einer immunzytochemischen Färbereihe (24)**

Reagenz	Preis pro Präparat
Primärantikörper zur Darstellung von: Zytokeratin 5/6 Zytokeratin 7 Zytokeratin 20 Pan-Zytokeratin LCA	2,72 € 2,58 € 2,72 € 1,86 € 1,59 €
Sekundär-Antikörper	0,57 €
APAAP Fast-Red	2,59 € 3,00 €
Antikörperverdünnungsmedium Puffer	2,60 € 13,30 €
<b>Gesamtbetrag</b>	<b>33,53 €</b>

## 5.5 Schlussfolgerungen

1. Es ist möglich, die Zytokeratine 5/6, 7, 20 und CK 5, 6 und 18 mittels immunzytochemischer Verfahren in zytologischen Ausstrichpräparaten darzustellen.
2. Die Methode ist allerdings kosten- und zeitaufwendig.
3. Die konventionelle Zytologie hat eine hohe Sensitivität hinsichtlich der Erkennung von malignen Prozessen und der Unterscheidung von anaplastisch kleinzelligen und nichtkleinzelligen Karzinomen. Eine weitere Typisierung der Tumore war oft nicht möglich.
4. Durch den Einsatz des Zytokeratinpanels CK 5/6, CK 7, CK 20 und Pan-CK konnte eine Verbesserung der Diagnosestellung von Adenokarzinomen nachgewiesen werden.
5. Pan-CK eignet sich als primärer Antikörperpanel zur Unterscheidung epithelialer und nichtepithelialer Prozesse.
6. Die Kosten-Nutzen-Analyse spricht dafür, dass die Immunzytochemie nicht als Routineverfahren angewendet werden sollte, aber zur Klärung spezieller Fragestellungen geeignet ist.

## 6. Zusammenfassung

Die Auswertung und Interpretation zytologischer Präparate hat einen bedeutenden Einfluss in der Diagnostik intrathorakaler Tumore. Jedoch wird der Histologie als diagnostischer Goldstandard hinsichtlich Dignitäts- und Tumortypenbestimmung bzw. Klassifikation eine größere Bedeutung zugeschrieben, da aufgrund des zur Verfügung stehenden Materialumfangs eine exakte Beurteilung des Tumors und zusätzlich des umliegenden Gewebes möglich ist. Neben konventioneller Färbemethoden sind in der histologischen Diagnostik Immunfärbungen etabliert, die das Spektrum der Analysemöglichkeiten sinnvoll erweitern. Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob eine solche immunhistochemische Färbung auch an Zytologiepräparaten durchführbar ist und welche Aussagekraft das Ergebnis hinsichtlich Tumordiagnose unter zusätzlicher Berücksichtigung der Routinezytologie hat. Die Entscheidung fiel hierbei zu Gunsten der Darstellung von Zytokeratinen. Einerseits liegen für diese Färbemethode bereits histologische Standards vor und andererseits ist die Zytokeratinfärbung immunhistochemisch ein wichtiger Parameter in der Diagnostik intrapulmonaler Tumore. Gerade die Untersuchung bronchopulmonalen Materials sollte im Vordergrund dieser Studie stehen.

Insgesamt wurden bei 84 Patienten mit Lungentumoren mittels diverser invasiver Entnahmetechniken Zytologiepräparate aus den intrathorakalen Prozessen gewonnen, wobei ein Teil der Routinefärbung nach Giemsa unterzogen wurde. Diese Präparate konnten im Verlauf anhand festgelegter Kriterien durch einen klinisch tätigen Zytologen hinsichtlich Dignität und Tumortyp interpretiert werden. Ein weiterer Teil der Nativpräparate wurde immunzytochemisch mit einem APAAP-Detektionssystem zur Darstellung von CK 5/6, CK 7, CK 20 und einem CK-Komplex (CK 5, CK 6 und CK 18) gefärbt. Nach Analyse des jeweiligen Zytokeratinmusters und unter Berücksichtigung einer Vergleichstabelle wurden die Zytologie- und Immunzytochemie-Ergebnisse in einen Kontext gebracht und mit den entsprechenden Histologiebefunden als Vergleich, die retrospektiv gesichtet worden waren, ausgewertet.

Mittels Routinezytologie konnte hinsichtlich der Dignitätsbeurteilung der zu untersuchenden Tumore ein positiver prädiktiver Wert von 0,986 erreicht werden.

Im Fall des primären Adenokarzinoms der Lunge stellte sich durch die zusätzliche Anwendung der CK-Färbung eine Steigerung der zytologischen Aussagekraft von 53,85% auf insgesamt 80,77% ein. Bei der Diagnostik des pulmonalen Plattenepithelkarzinoms ergaben sich keine neuen Erkenntnisse durch die Zytokeratindarstellung. Hierbei lag die eindeutige Klassifikation der Tumore bereits routinezytologisch bei nahezu 74% und konnte durch die Immunzytochemie nicht verbessert werden. Hinsichtlich der

undifferenzierten großzelligen Karzinome der Lunge, des kleinzelligen Karzinoms, anderer seltener Tumore und pulmonaler Metastasen extrapulmonaler Malignome ergaben sich oft verwirrende Zytokeratinmuster, die eine objektive Analyse erschwerten und letztendlich nicht effektiv zur Diagnosesicherung beitrugen.

Die Zytokeratindarstellung mittels einer in der Immunhistochemie etablierten Färbemethode ist prinzipiell auch bei Zytologiepräparaten möglich, jedoch wird ein genereller Einsatz dieser Methode in der täglichen Arbeit im Zytologielabor nicht empfohlen, da neben eingeschränkter diagnostischer Aussagekraft ein hoher Zeitaufwand des Färbeprozesses und enorme Materialkosten berücksichtigt werden müssen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abutaily AS, Addis BJ, Roche WR: Immunohistochemistry in the distinction between malignant mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma: a critical evaluation of new antibodies. *J Clin Pathol.* 55 (2002) 662-668
2. Altmannsberger M: Intermediärfilamentproteine als Marker in der Tumordiagnostik. *Veröff Pathol.* (1988) 1271-1305
3. Altmannsberger M, Osborn M, Droese M, Weber K, Schauer A: Diagnostic value of intermediate filament antibodies in clinical cytology. *Klin Wschr.* 62 (1984) 114-123
4. Amin MB, Tamboli P, Merchant SH, Ordóñez NG, Ro J, Ayala AG, Ro JY: Micropapillary component in lung adenocarcinoma: a distinctive histologic feature with possible prognostic significance. *Am J Surg Pathol.* 26 (2002) 358-364
5. Attanoos RL, Webb R, Dojcinov SD, Gibbs AR: Malignant epitheloid mesothelioma: anti-mesothelial marker expression correlates with histological pattern. *Histopathology* 39 (2001) 584-588
6. Baba M, Iyoda A, Yasufuku K, Haga Y, Hoshino H, Sekine Y, Shibuya K, Iizasa T, Saitoh Y, Hiroshima K, Fujisawa T: Preoperative cytodiagnosis of very small-sized peripheral-type primary lung cancer. *Lung Cancer* 37 (2002) 277-280
7. Blobel GA, Gould VE, Moll R, Lee I, Huszar M, Geiger B, Franke WW: Coexpression of neuroendocrine markers and epithelial cytoskeletal proteins in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Lab Invest.* 52 (1985) 39-51
8. Blobel GA, Moll R, Franke WW, Kayser KW, Gould VE: The intermediate filament cytoskeleton of malignant mesotheliomas and its diagnostic significance. *Am J Pathol.* 121 (1985) 235-247
9. Blobel GA, Moll R, Franke WW, Vogt-Moykopf I: Cytokeratins in normal lung and lung carcinomas. I. Adenocarcinomas, squamous cell carcinomas and cultured cell lines. *Virchows Arch Cell Pathol.* 45 (1984) 407-429
10. Bodemann HH, Arnold H, Wannenmacher M, Kraft A: Stadieneinteilung und Untersuchungsgang beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. *Dtsch med Wschr.* 109 (1984) 910-912
11. Boenisch T, Farmilo AJ, Stead R, Key M, Welcher R, Harvey R, Atwood KN: Immunochemical staining methods, Handbook 3<sup>rd</sup> Edition, DAKO Corporation 2001
12. Broers JL, de Leij L, Rot MK, ter Haar A, Lane EB, Leigh IM, Waagenar SS, Vooijs GP, Ramaekers FC: Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human lung tissues. *Differentiation* 40 (1989) 119-128

13. Broers JL, Ramaekers FC, Rot MK, Oostendorp T, Huysmans A, van Muijen GN, Wagenaar SS, Vooijs GP: Cytokeratins in different types of human lung cancer as monitored by chain-specific monoclonal antibodies. *Cancer Research* 48 (1988) 3221-3229
14. Buccheri G, Ferrigno D: Lung tumor markers of cytokeratin origin: an overview. *Lung Cancer* 34 (2001) 65-69
15. Bucher O, Wartenberg H: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 12. Aufl. Hans Huber, Bern, Göttingen, Toronto (usw.), 1997, S. 11-20
16. Bühling KJ, Lepenies J, Witt K: Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie. 2. Aufl. Urban & Fischer, München, Jena, 2000, S. 254
17. Camilo R, Capelozzi VL, Siqueira SA, Del Carlo Bernardi F: Expression of p63, keratin 5/6, keratin 7, and surfactant-A in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol.* 37 (2006), 542-546
18. Chausovsky G, Luchansky M, Figer A, Shapira J, Gottfried M, Novis B, Bogelmann G, Zemer R, Zimlichman S, Klein A: Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon, stomach and lung. *Cancer* 86 (1999) 2398-2405
19. Chu P, Wu E, Weiss LM: Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol.* 13 (2000) 962-972
20. Chyczewski L, Niklinski J, Chyczewska E, Laudanski J, Furman M: Immunohistochemical analysis of tissue localization of cytokeratin 19 in lung cancer. *Rocz Akad Med Bialymst.* 42 (1997) 162-172
21. Clover J, Oates J, Edwards C: Anti-cytokeratin 5/6: a positive marker for epitheloid mesothelioma. *Histopathology* 31 (1997) 140-143
22. Coulombe PA, Omary MB: "Hard" and "soft" principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 14 (2002) 110-122
23. Crapanzano JP, Zakowski MF: Diagnostic dilemmas in pulmonary cytology. *Cancer* 93 (2001) 364-375
24. DAKO Produkt- und Preisliste 2002
25. Das Laborlexikon der Labormedizin, Internetbeitrag: [www.laborlexikon.de](http://www.laborlexikon.de)
26. Debus E, Moll R, Franke WW, Weber K, Osborn M: Immunohistochemical distinction of human carcinomas by cytokeratin typing with monoclonal antibodies. *Am J Pathol.* 114 (1984) 121-130

27. Debus E, Weber K, Osborn M: Monoclonal cytokeratin antibodies that distinguish simple from stratified squamous epithelia: characterization on human tissue. *EMBO J.* 1 (1982) 1641-1647
28. Fabel H, Konietzko N: *Weißbuch Lunge* 2005. 3. Aufl. Georg Thieme, Stuttgart, New York, 2005, S. 45-48
29. Feddersen CO, v. Wichert P: Diagnostische Strategien beim Bronchialkarzinom. *Internist* 35 (1994) 724-729
30. Ferrigno D, Buccheri G, Biggi A: Serum tumor markers in lung cancer: history, biology and clinical applications. *Eur Respir J.* 7 (1994) 186-197
31. Fischnaller M: Die Bedeutung der Zytologie in der Diagnostik des Bronchialkarzinoms. *Prax Pneumol.* 36 (1982) 196-197
32. Goldstein NS, Thomas M: Mucinous and nonmucinous bronchioloalveolar adenocarcinomas have distinct staining patterns with thyroid transcription factor and cytokeratin 20 antibodies. *Am J Clin Pathol.* 116 (2001) 319-325
33. Gropp C: Tumormarker, Bedeutung für die klinische Diagnostik. *Pneumologie* 45 (1991) 137-139
34. Häußinger K, Huber RM: Bronchialkarzinom (Lungenkrebs). *Pneumologie* 50 (1996) 599-603
35. Haraguchi S, Hioki M, Takushima M, Yanagimoto K, Koizumi K, Shimizu K: Metastatic chest wall tumor suspected to be of lung origin by immunoreactivity for cytokeratin 7 and 20. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg.* 54 (2006), 132-136
36. Hartung W, Schmidt U, Wierch W: Bronchialkarzinom - Pathologische Anatomie (Untersuchungen an 200 Resektionspräparaten). *Prax Pneumol.* 36 (1982) 193-195
37. Hatzakis KD, Froudarakis ME, Bouros D, Tzanakis N, Karkavitsas N, Siafakas NM: Prognostic value of serum tumor markers in patients with lung cancer. *Respiration* 69 (2002) 25-29
38. Heckmeyr M: Stellenwert humoraler Tumormarker in der Diagnostik und Therapie primärer Bronchialkarzinome und intrapulmonaler Metastasen. *Pneumologie* 53 (1999) 276-282
39. Heine R: Dritter Kurs, Klinische Zytologie in der Pneumologie Halle/Saale 24.-26. Juni 2004. Internetbeitrag: [www.diakoniewerk-halle.de/KH\\_Innere1\\_6.html](http://www.diakoniewerk-halle.de/KH_Innere1_6.html)
40. Hessel B: Untersuchungen zum Wert der Sputumzytologie bei Lungentumoren. Internetbeitrag: [www.sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/06/06H123/prom.pdf](http://www.sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/06/06H123/prom.pdf)

41. Ikeda S, Fujimori M, Shibata S, Okajima M, Ishizaki Y, Kurihara T, Miyata Y, Iseki M, Shimizu Y, Tukumoto N, Ozaki S, Asahara T: Combined immunohistochemistry of beta-catenin, cytokeratin 7 and cytokeratin 20 is useful in discriminating primary lung adenocarcinomas from metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 6 (2006) 31
42. Inamura K, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Tsuchiya E, Fukayama M, Ishikawa Y: Pulmonary adenocarcinomas with enteric differentiation: histologic and immunohistochemical characteristics compared with metastatic colorectal cancers and usual pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol.* 29 (2005) 660-665
43. Jang KY, Kang MJ, Lee DG, Chung MJ: Utility of thyroid transcription factor-1 and cytokeratin 7 and 20 immunostaining in the identification of origin in malignant effusions. *Anal Quant Cytol Histol.* 23 (2001) 400-404
44. Jones AM, Hanson IM, Armstrong GR, O'Driscoll BR: Value and accuracy of cytology in addition to histology in the diagnosis of lung cancer at flexible bronchoscopy. *Respiratory Medicine* 95 (2001) 374-387
45. Junqueira LC, Carneiro J: *Histologie*. 4. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1996, S. 1-29
46. Kaufmann O, Fietze E, Mengs J, Dietel M: Markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 116 (2001) 823-830
47. Kühnel W: *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und der mikroskopischen Anatomie*. 9. Aufl. Thieme, Stuttgart, New York, 1995, S. 32-39 u. S. 322-335
48. Kummar S, Fogarasi M, Canova A, Mota A, Ciesielski T: Cytokeratin 7 and 20 staining for the diagnosis of lung and colorectal adenocarcinoma. *British Journal of Cancer* 86 (2002) 1884-1887
49. Lau SK, Desrochers MJ, Luthringer DJ: Expression of thyroid transcription factor-1, cytokeratin 7 and cytokeratin 20 in bronchioalveolar carcinomas: an immunohistochemical evaluation of 67 cases. *Mod Pathol.* 15 (2002) 538-542
50. Leonhardt P: *Atlas der praktischen klinischen Zytodiagnostik bei Erkrankungen im Thoraxbereich*. Johann Ambrosius Barth, Leipzig, 1977, S. 13-14 u. S. 60-63
51. Lindner J: Lung cancer cytology. Something old, something new. *Am J Clin Pathol.* 114 (2000) 169-171
52. Lobeck H: Zytokeratin – Expression in diversen Karzinomen. Vereinfachte Arbeitshilfe, Fassung 05/2006. Internetbeitrag: [www.klinikum-ernst-von-bergmann-potsdam.de/documents/Zytokeratin-Tabelle.pdf](http://www.klinikum-ernst-von-bergmann-potsdam.de/documents/Zytokeratin-Tabelle.pdf)

53. Loy TS: Utility of cytokeratin immunostaining in separating pulmonary adenocarcinomas from colonic adenocarcinomas. *Lung Cancer* 3 (1995) 278
54. Macha HN: Bronchialkarzinom. *Epidemiologie, Diagnostik, Therapie. Internist* 44 (2003) 28-34
55. Marek W, Krampe S, Dickgreber NJ, Nielsen L, Muti A, Khanavkar B, Müller KM, Atay Z, Topalidis T, Nakhosteen JA: Automatisierte quantitative Image-Zytometrie bronchialer Spülflüssigkeiten bei Verdacht auf broncho-pulmonale Tumoren: Vergleich mit Zytologie, Histologie und klinischer Diagnose. *Pneumologie* 53 (1999) 583-595
56. Moll R: Cytokeratine als Differenzierungsmarker. Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren. *Veröff Pathol.* (1993) 1421-197
57. Moll R, Dhoulailly D, Sun TT: Expression of keratin 5 as a distinctive feature of epithelial and biphasic mesotheliomas. An immunohistochemical study using monoclonal antibody AE14. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 58 (1989) 129-145
58. Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW: Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol.* 140 (1992) 427-447
59. Nisman B, Lafair J, Heching N, Lyass O, Baras M, Peretz T, Barak V: Evaluation of tissue polypeptide specific antigen, CYFRA 21-1 and carcinoembryonic antigen in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 82 (1998) 1850-1859
60. Noll S, Schaub-Kuhnen S: *Praxis der Immunhistochemie.* Urban & Fischer, München, Jena, 2000, S. 1-17
61. Ordóñez NG: Value of Cytokeratin 5/6 immunostaining in distinguishing epithelial mesothelioma of the pleura from lung adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol.* 22 (1998) 1215-1221
62. Ordóñez NG: The diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing between epitheloid mesotheliomas and squamous carcinomas of the lung: a comparative study. *Mod Pathol.* 19 (2006) 417-428
63. Pujol JL, Grenier J, Parrat E, Lehmann M, Lafontaine T, Quantin X, Michel FB: Cytokeratins as serum markers in lung cancer: a comparison of CYFRA 21-1 and TPS. *Am J Respir Crit Care Med.* 154 (1996) 725-733
64. Quinlan RA, Schiller DL, Hatzfeld M, Achtstatter T, Moll R, Jorcano JL, Magin TM, Franke WW: Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann NY Acad Sci.* 455 (1985) 282-306

65. Ritter JH, Boucher LD, Wick MR: Peripheral pulmonary adenocarcinomas with bronchioalveolar features: immunophenotypes correlate with histologic pattern. *Mod Pathol.* 11 (1998) 566-572
66. Shah RN, Badve S, Papreddy K, Schindler S, Laskin WB, Yeldandi AV: Expression of cytokeratin 20 in mucinous bronchioalveolar carcinoma. *Hum Pathol.* 33 (2002) 915-920
67. Siewert JR: *Chirurgie.* 7. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 2001, S. 332-358
68. Sundstrom BE, Stigbrand TI: Cytokeratins and tissue polypeptide antigen. *Int J Biol Markers* 9 (1994) 102-108
69. Su YC, Hsu YC, Chai CY: Role of TTF-1, CK 20 and CK 7 immunohistochemistry for diagnosis of primary and secondary lung adenocarcinoma. *Kaohsiung J Med Sci.* 22 (2006) 14-19
70. Suo Z, Holm R, Nesland JM: Squamous cell carcinomas. An immunohistochemical study of cytokeratins and involucrin in primary and metastatic tumours. *Histopathology* 23 (1993) 45-54
71. Thomas M, Gatzemeier U, Goerg R, Matthiessen W, Morr H, Schoenfeld N, Ukena D, Stamatidis G: Empfehlungen zur Diagnostik des Bronchialkarzinoms. *Pneumologie* 2000 (54) 361-371
72. Tot T, Samii S: The clinical relevance of cytokeratin phenotyping in needle biopsy of liver metastasis. *APMIS* 111 (2003) 1075-1082
73. van de Molengraft FJ, van Niekerk CC, Jap PH, Poels LG: OV-TL 12/30 (keratin 7 antibody) is a marker of glandular differentiation in lung cancer. *Histopathology* 22 (1993) 35-38
74. van Dorst EB, van Muijen GN, Litvinov SV, Fleuren GJ: The limited difference between keratin patterns of squamous cell carcinomas and adenocarcinomas is explicable by both cell lineage and state of differentiation of tumor cells. *J Clin Pathol.* 51 (1998) 679-684
75. Vyberg M, Moll R: Cytokeratine in der diagnostischen Histopathologie. DAKO Corporation, 2001, S. 3-15
76. Welker L: Materialgewinnung für die zytologische Diagnostik und Herstellung der Präparate. Internetbeitrag: [www.diakoniewerk-halle.de/KH\\_Innere1\\_6.html](http://www.diakoniewerk-halle.de/KH_Innere1_6.html)
77. Welker L: Zellbefunde bei sekundären Tumoren der Lunge. Internetbeitrag: [www.diakoniewerk-halle.de/KH\\_Innere1\\_6.html](http://www.diakoniewerk-halle.de/KH_Innere1_6.html)
78. Zusman-Harach SB, Harach HR, Gibbs AR: Cytological features of non-small cell carcinomas of the lung in fine needle aspirates. *J Clin Pathol.* 44 (1991) 997-1002

## 8. Thesen

1. Die klinische Zytologie nimmt im Allgemeinen einen wichtigen Stellenwert in der Diagnostik von Tumorerkrankungen, Entzündungen und degenerativen Erkrankungen ein, da mit minimalem Materialaufwand eine Klassifikation von Zell-Linien erfolgt.
2. Lediglich anhand histologischer Befunde kann eine definitive Aussage bezüglich Dignität und Malignität des untersuchten Materials resultieren, da im Gegensatz zur Zytologie zusätzlich der Gewebsverband und das Verhalten der Zellen zum gesunden Gewebe beurteilbar ist.
3. Der positive prädiktive Wert der Routinezytologie bei der Dignitätsbeurteilung intrapulmonaler Tumore mittels Giemsa-Färbung liegt in dieser Arbeit bei 0,986. 53,85% der pulmonalen Adenokarzinome und 73,68% der Plattenepithelkarzinome wurden zytologisch eindeutig klassifiziert. Seltene Tumore und auch pulmonale Metastasen können zytologisch dem Tumortyp entsprechend eingruppiert werden, jedoch fehlt bisweilen eine weiterreichende Klassifikation.
4. Die immunhistochemische Darstellung von Zytokeratinen mittels monoklonaler Antikörper ist bereits in der Histologie zur Tumorklassifikation etabliert und wird vielfach bei der Diagnostik intrapulmonaler Prozesse eingesetzt, da der Nachweis verschiedener Zytokeratinmuster besonders bei epithelialen Zellen Hinweise auf die Zellart und deren Differenzierungsgrad gibt.
5. Mittels auf dem Prinzip einer Antigen-Antikörper-Reaktion basierenden Färbemethode aus der Immunhistochemie (APAAP-Methode) lassen sich Zytokeratine 5/6, 7, 20 bzw. 5, 6 und 18 auch in zytologischen Ausstrichpräparaten darstellen.
6. Die Kombination von Routinezytologie und immunhistochemischer Zytokeratindarstellung gestattet beim Vorliegen eines pulmonalen Adenokarzinoms eine deutliche Steigerung der Aussagekraft hinsichtlich Einteilung des Tumortyps.
7. Bei Plattenepithelkarzinomen, undifferenzierten bzw. anaplastischen Tumoren, seltenen Tumoren und pulmonalen Metastasen bedeutet die kombinierte

Betrachtung von Giemsa-Präparaten und der Immunzytochemie keinen Erkenntnisgewinn.

8. Materialqualität und -quantität und Variationen der Arbeitsabläufe beeinflussen den Färbeprozess und können ggf. die Aussagefähigkeit des Präparates beeinträchtigen.
9. Die zeitaufwendige Prozedur der immunzytochemischen Zytokeratindarstellung und die im Vergleich zur Giemsa-Färbung hohen Materialkosten sind Nachteile dieser Färbemethode.
10. Zur Klärung spezifischer Fragestellungen kann die Zytokeratindarstellung hilfreich sein, jedoch ist der Einsatz als Routineverfahren nicht generell zu empfehlen.

## Lebenslauf

Name: Mertz  
Vorname: Andrea  
Geburtsdatum: 09. Juni 1978  
Geburtsort: Düsseldorf  
Familienstand: ledig  
Eltern: Friedrich Heinrich Mertz  
Walburga Mertz, geb. Berg

Ausbildung:

- 1984-1988 Albert-Schweitzer-Grundschule Lahrfeld, Menden
- 1988-1997 Walburgisgymnasium Menden (Abitur)
- 1997-2004 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- September 2000 ärztliche Vorprüfung (Physikum)
- August 2001 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- September 2002 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- November 2004 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Januar 2005 – Dezember 2007 Assistenzärztin in der Inneren Abteilung am Stadtkrankenhaus Soest
- seit Januar 2008 Assistenzärztin in der Chirurgischen Abteilung (Ambulanz) am Stadtkrankenhaus Soest

Soest, 24.01.2008

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich erkläre, dass ich zu keinem Zeitpunkt weder zu diesem noch zu einem anderen Thema eine Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg oder an einer anderen Hochschule eingereicht habe.

Soest, 24.01.2008

Andrea Mertz

## **Danksagung**

Für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie für die zahlreichen Anregungen und Hinweise zur Fertigstellung danke ich Herrn Prof. Dr. med. B. Osten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. R. Heine für die Überlassung des Themas, der Möglichkeit zur Durchführung der Untersuchungen, vieler fachlicher Hinweise und der kritischen Durchsicht des Manuskripts.

Für die stetige Hilfe und technische Unterstützung während der Arbeit im Zytologielabor danke ich Herrn Dr. med. K.-P. Litwinenko, Frau Gollmann und Frau Land.

Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. med. S. Hauptmann und den Mitarbeitern des histologischen Labors des Pathologischen Institutes der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Möglichkeit zur Hospitation.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich aufrichtig für die sorgfältige Durchsicht der Texte und die unermüdliche Unterstützung während des Studiums.