

**Entwicklung molekularbiologischer, immunologischer und
DNA-zytometrischer Verfahren zur Charakterisierung
von Tumorzellen am Beispiel maligner
Pleuramesotheliome des Menschen**

Von dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl-Biol. Mario Bachmann

geboren am 13. März 1968 in Hildesheim

Hannover, im Juli 2002

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Drommer

Korreferent: Prof. Dr. S. Steinlechner

Tag der Promotion: 10. Juli 2002
(Als Tag der Promotion gilt der Tag der mündlichen Prüfung)

Tag der Veröffentlichung:

meiner Familie

Kurzfassung

Das maligne Pleuramesotheliom ist ein seltener Tumor, dessen Vorkommen eng mit einer stattgehabten Asbestexposition assoziiert ist. Mesotheliome werden seit der Verordnung aus dem Jahr 1977 als Berufskrankheit anerkannt und entsprechend finanziell abgegolten. Die hierfür zuständigen Berufsgenossenschaften fordern daher von den Pathologen eine exakte Diagnosestellung. Die Differenzierung zwischen malignen Pleuramesotheliomen und sekundären Pleurakarzinosen ist jedoch aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit im histologischen Schnittpräparat problematisch. Aufgrund der diffusen, nicht lokalisierten Lage der Tumoren und des oftmals stark nekrotisierten Materials kann ein korrekter, histopathologischer Befund an den meist sehr kleinen Proben in vielen Fällen erst gar nicht erfolgen. Eine alternative Untersuchungsmethode wäre die Zytologie, sie ist jedoch bezüglich der Anerkennung von malignen Pleuramesotheliomen als Berufskrankheit nicht etabliert. Ziel dieser Arbeit ist es daher, molekularbiologische-, immunologische- und DNA-zytometrische Verfahren zu entwickeln, um die malignen Tumoren der Pleura im Erguss qualitativ und quantitativ zu charakterisieren. Anhand dieser Charakterisierung und dem direkten Vergleich mit den parallel erstellten histologischen sowie zytologischen Befunden soll festgestellt werden, ob die zytologische Untersuchungsmethode zu einer Verbesserung bei der Differenzierung zwischen einem malignen Pleuramesotheliom und einer sekundären Pleurakarzinose beitragen kann. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde ein Kombinationskonzept erarbeitet, welches den Nachweis der intrazellulären Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie den Nachweis intrazellulären Glykogens umfasst. Der zusätzliche Einsatz eines Thrombomodulin- und 7 oder eines HEA (BerEP4)-Antikörpers verbessert die Sensitivität dieser qualitativen Nachweise. In 107 von 151 Fällen gab es eine Übereinstimmung der zytologischen und histologischen Diagnosen. In 16 Proben konnte histopathologisch kein Tumor nachgewiesen werden. Um bei stark differenten Diagnosen dennoch eine Entscheidung zu treffen, wurde für das quantitative DNA-zytometrische Verfahren ein Standard erarbeitet. In 10 untersuchten Fällen konnte eine Aneuploidie und somit das Vorliegen eines malignen Tumors nachgewiesen werden. Die Wertigkeit der zytologischen Untersuchung liegt bei mindestens 70 %. Die Vorteile dieser Methode liegen in der Früherkennung von malignen Prozessen durch den bereits früh auftretenden Erguss und in der geringen Invasivität der Methode. Der Anforderung an die Pathologie sichere Diagnosen an immer kleineren Proben vorzunehmen kann durch die Zytologie entsprochen werden. In diesem Bereich ist eine stärkere Zusammenarbeit der beiden unterschiedlichen Untersuchungsverfahren zur gegenseitigen Ergänzung anzuraten.

Schlüsselwörter: Pleuramesotheliome, Zytologie, Histologie

Abstract

The occurrence of the malignant mesothelioma, which is a very rare tumour, is associated with asbestosis exposition that has happened. Since 1977 malignant mesotheliomas are accepted as an occupational disease and patients are indemnified financially. The competent authorities demand exact diagnosis from pathologists however the differentiation between malignant mesothelioma and secondary pleural tumours is problematic because of their morphological similarity in histological cuts. Diffuse location of malignant mesotheliomas as well as strongly necrotic and small specimens make it almost impossible to deliver correct histopathological findings. An alternative way to make a diagnosis for malignant mesothelioma is the cytological examination of the pleural effusion however this method has not been established as proof that malignant mesothelioma is an occupational disease. Aim of this study is to develop molecular-, immunological- and DNA-cytometrical procedures to characterise malignant mesothelioma and secondary tumours in pleural effusions in a quantitative and qualitative way. The direct comparison between this characterisation and the cytological and histological findings which were created at the same time should give information on whether the cytological method can contribute to an improvement regarding differential diagnosis. On the basis of these results a combination concept was developed which comprised the proof of intracellular activities of alkaline phosphatase as well as the proof of intracellular glycogene. Immunocytochemical examinations can provide additional information by using alkaline phosphatase, a thrombomodulin- and a HEA (BerEP4)-antibody and by proving intracellular glycogene. In 107 out of 151 cases we found corresponding cytological and histological findings. In 16 samples of the histological examination no tumour could be diagnosed. In order to be able to make proper decisions despite highly different diagnosis a standard for the DNA-cytometric method was compiled. In 10 cases an aneuploidy and thus a tumour could be diagnosed. The validity of the cytological examination is at a minimum of 70 %. The advantage of this method is the early diagnosis of malignant processes because of early effusion and because of the small invasivity of this method. Cytology meets the requirements on pathology to deliver correct diagnosis in spite of small tissue specimens. In this area of work a stronger co-operation of both ways of examination is recommended to complement each other.

Key words: mesothelioma, cytology, histology

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
As	Aszites-Punktat
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumine)
CEA	Carcino Embryonales Antigen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-PAS	Periodic Acid Schiff'sche Reaktion mit Diastasevorbehandlung
g	Gramm
h	Stunde (engl.: hour)
HEA	Human Epitheliales Antigen
Ig	Immunglobulin
l	Liter
M	Mol (mol/Liter)
mg	Milligramm
Min.	Minute
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
PAS	Periodic Acid Schiff
PBS	Phosphatpuffer (engl.: phosphate buffered saline)
Peric-P	Pericard-Punktat
PP	Pleura-Punktat
PPE	Pleurale Probeexzision
s	Sekunde
S.	Seite
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TbB	Transbronchiale Biopsie
TPA	Tissue-Polypeptid Antigen
WP	Weichteil-Punktat

Inhaltsverzeichnis

<u>1. EINLEITUNG.....</u>	<u>3</u>
1.1 PROBLEMSTELLUNG.....	4
<u>2. SCHRIFTTUM.....</u>	<u>5</u>
2.1 ZYTOMORPHOLOGISCHE KRITERIEN.....	8
2.2.1 MALIGNEN MESOTHELIOME.....	10
2.2 ZYTOCHEMIE.....	14
2.2.1 ALKALISCHE PHOSPHATASE.....	16
2.2.2 PAS.....	17
2.3 IMMUNZYTOCHEMIE.....	17
2.3.1 DIFFERENTIALDIAGNOSE VON MALIGNEN MESOTHELIOMEN UND ADENOKARZINOMEN.....	18
2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	25
2.4.1 DNA-ZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	25
2.4.2 GELELEKTROPHORESE; WESTERNBLOT UND DETEKTION IMMUNOGENER PROTEINE.....	27
<u>3. MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>28</u>
3.1 MATERIAL.....	28
3.1.1 PATIENTENANGABEN.....	28
3.1.2 CHEMIKALIEN.....	32
3.1.3 ANTIKÖRPER.....	33
3.1.4 UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND VERSUCHSAUFBAU.....	35
3.2 METHODEN.....	38
3.2.1 AUFARBEITUNG DES MATERIALS.....	38
3.2.2 FÄRBUNGEN.....	39
3.2.3 BEGUTACHTUNGSKRITERIEN.....	45
3.2.4 DNA-ZYTOMETRIE.....	48
3.2.5 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE).....	49
<u>4. ERGEBNISSE.....</u>	<u>55</u>
4.1 PERSONENBEZOGENE DATEN.....	55
4.2 MATERIALBEZOGENE DATEN.....	56
4.3 ZYTOMORPHOLOGISCHE METHODEN.....	57
4.3.1 WACHSTUMSTYPEN UND LOKALISATION DER GEWEBEPROBEN.....	57
4.3.2 WACHSTUMSTYP UND PATIENTENALTER.....	61
4.4 ZYTOCHEMISCHE BEFUNDE.....	62
4.4.1 ALKALISCHE PHOSPHATASE.....	62
4.4.2 PERIODIC ACID SCHIFF REACTION (PAS).....	63

4.5 IMMUNZYTOCHEMISCHE BEFUNDE.....	69
4.5.1 ANTI-THROMBOMODULIN.....	69
4.5.2 ANTI-VIMENTIN.....	73
4.5.3 ANTI-HUMAN-EPITHELIALES ANTIGEN (ANTI-HEA).....	77
4.5.4 ANTI-CARCINO-EMBRYONIC ANTIGEN (ANTI-CEA).....	80
4.5.5 ANTI-TISSUE POLYPEPTIDE ANTIGEN (ANTI-TPA).....	84
4.5.6 ZUSAMMENFASSUNG DER ZYTO- UND IMMUNZYTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE.....	87
4.6 VERGLEICH ZYTOLOGISCHER UND HISTOLOGISCHER BEFUNDE.....	88
4.6.1 IMMUN-UND ENZYMZYTOCHEMISCHE GESICHTSPUNKTE.....	89
4.6.2 DNA-ZYTOMETRISCHE GESICHTSPUNKTE.....	94
4.6.3 DARSTELLUNG IMMUNOGENER PROTEINE.....	101
<u>5. DISKUSSION.....</u>	<u>103</u>
5.1 ALLGEMEINE GESICHTSPUNKTE.....	103
5.2 ALTERSVERTEILUNG.....	103
5.3 GESCHLECHTSVERTEILUNG.....	104
5.4 ZYTOCHEMISCHE REAKTIONEN.....	105
5.4.1 ALKALISCHE PHOSPHATASE.....	105
5.4.2 PAS/D-PAS.....	106
5.5 IMMUNZYTOCHEMISCHE REAKTIONEN.....	109
5.5.1 ALLGEMEINE GESICHTSPUNKTE.....	109
5.5.2 ANTI-THROMBOMODULIN.....	109
5.5.3 ANTI-VIMENTIN.....	111
5.5.4 ANTI-HUMAN-EPITHELIALES ANTIGEN (ANTI-HEA).....	113
5.5.5 ANTI-CARCINO EMBRYONIC ANTIGEN (ANTI-CEA).....	114
5.5.6 ANTI-TISSUE POLYPEPTIDE ANTIGEN.....	115
5.5.7 SCHLUSSFOLGERUNGEN DER IMMUNZYTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE.....	116
5.6 DNA-ZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	118
5.7 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN IM WESTERNBLOT.....	118
5.8 VERGLEICH ZYTOLOGISCHER UND HISTOLOGISCHER DIAGNOSEN.....	119
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>122</u>
<u>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>125</u>
<u>8. ANHANG.....</u>	<u>134</u>

1. Einleitung

Das maligne Pleuramesotheliom ist ein seltener Tumor, dessen Vorkommen eng mit einer Asbestexposition assoziiert ist. Mesotheliome sind versicherungsmedizinisch relevant, da sie meistens maligne und bei entsprechendem Kontakt mit dem Magnesiumsilikat als Berufskrankheit anerkannt sind. Ein Mesotheliom manifestiert sich klinisch als ein Erguss der serösen Höhle, der häufig auch das erste für eine Untersuchung zur Verfügung stehende Material ist. Die morphologische Diagnose eines malignen Mesothelioms gestaltet sich jedoch als schwierig, denn Mesotheliome sind in ihrer Form sehr vielgestaltig. Zudem können Mesothelzellen infolge chronischer Entzündungen und anderweitiger Reizungen stark proliferieren. Oftmals sind sie dann von gut differenzierten adenoiden Tumoren kaum zu unterscheiden. Mit dem Verfahren der Immunzyto- bzw. Immunhistochemie können bei der Diagnostik der Tumoren Zusatzinformationen gewonnen werden. Die Methoden erlangen gerade bei Differentialdiagnosen von malignen Mesotheliomen und sekundärer Tumorausbreitungen anderer Primärtumoren in den serösen Höhlen durchaus Gewicht.

Obwohl die zytologische Untersuchungen in der präoperativen Abklärung der Bronchialkarzinome neben der Histologie ihren Platz als gleichberechtigte Methode haben, werden unterschiedliche Befunde in der Zytologie und Histologie häufig als Fehler der zytopathologischen Untersuchung gewertet, weil die histologische Untersuchung als Standard der Tumordiagnostik gilt. Andererseits erwarten Klinikärzte von den Histopathologen präzise Diagnosen an zunehmend kleineren Gewebeproben. Die diagnostische Sicherheit wird jedoch mit abnehmender Probengröße geringer.

1.1 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, molekularbiologische, immunologische und DNA-zytometrische Verfahren zu entwickeln, um die malignen Tumoren der Pleura im Erguss qualitativ und quantitativ zu charakterisieren. Anhand dieser Charakterisierung und dem direkten Vergleich mit den parallel erstellten histologischen sowie zytologischen Befunden soll die Wertigkeit der zytopathologischen Diagnostik als frühzeitige Untersuchungsmethode und die in der Routine eingesetzten Tumormarker überprüft werden. Dabei soll festgestellt werden, ob die zytologische Untersuchungsmethode zu einer Verbesserung bezüglich der Differentialdiagnose „malignes Pleuramesotheliom“ versus „sekundäre Pleurakarzinose“ beitragen kann.

Als Kontrollfunktion und Referenz wurden die genannten Befunde am Institut für Pathologie/Deutsches Mesotheliomregister der Universitätsklinik der Ruhruniversität Bochum (Prof. Dr. med. K-M. Müller) oder eines Referenzpathologen parallel analysiert oder sind als anerkannte Mesotheliomfälle im Deutschen Mesotheliomregister gemeldet.

2. Schrifttum

Die Pleura ist aus funktioneller Sicht eine Verschiebefläche, die Lunge, Brustwand, Zwerchfell und Mediastinalorgane bedeckt. Sie besteht aus zwei Blättern, der Pleura parietalis und der Pleura visceralis (Pleura pulmonalis). Als Pleurahöhle wird der mit 3 ml Pleuraflüssigkeit gefüllte kapilläre Spaltraum bezeichnet, der die beiden Pleurablätter voneinander trennt. Auf die oberflächliche Deckschicht (Mesothel) schließt sich eine bindegewebige Hauptschicht an. Primäre gutartige und bösartige Tumoren, die von der mesothelialen Auskleidung und dem submesothelialen Gewebe ausgehen, werden als Mesotheliome bezeichnet. Unter Punkt 2.1 sind die einzelnen zytomorphologischen Kriterien von normalen, ausdifferenzierten Mesothelzellen bis hin zu den malignen Mesotheliomen aufgeführt.

Neben den für diese Studie relevanten malignen Mesotheliome sind auch benigne Mesotheliome sowie primäre benigne Neoplasien der pleuralen Höhle bekannt. Mesotheliome gehen von der mesothelialen Auskleidung aus. Man unterscheidet zwei Formen: die lokalisierte und die diffuse Form (*Klemperer und Rabin, 1931*). Diese Einteilung ist prognostisch von grosser Bedeutung, da es sich bei der ersten Form vorwiegend um benigne und bei der zweiten Form ausschliesslich um maligne Veränderungen handelt. Primär benigne Tumoren entstehen aus dem submesotheliale Bindegewebe oder aus den peripheren Ausläufern der darunter liegenden Organe. Tabelle 1 (siehe Seite 7) zeigt eine Übersicht der primären benignen und malignen Neoplasien der Pleura.

90% alle malignen Mesotheliome sind mit einer gesicherten Asbestexposition assoziiert (*Müller, 1983*). Die Zunahme der Mesotheliominzidenz zeigt dabei eine Abhängigkeit von der Zeitdauer und der Intensität einer Asbestexposition sowie von der Asbestart (*Rosenstock und Hudson, 1987*). Maligne Mesotheliome werden deshalb seit der Verordnung vom 01. Januar 1977 als Berufskrankheit anerkannt und sind finanziell zu entschädigen (BeKV Nr. 4105).

Seit dem Inkrafttreten der genannten Verordnung ist eine Zunahme der angezeigten malignen Mesotheliomfälle zu beobachten. Die jährliche Inzidenz der sehr seltenen, malignen Mesotheliome beträgt näherungsweise $2,8 \cdot 10^{-6}$ für das männliche und $0,7 \cdot 10^{-6}$ für das

weibliche Geschlecht (*Riede, 1995*). Im Jahr 1978 wurden dagegen gerade einmal 20 Mesotheliomfälle anerkannt. Das Deutsche Mesotheliomregister in Bochum geht von etwa 1000 Mesotheliomen und 10 000 sekundären malignen Erkrankungen der Pleura pro Jahr aus (*Müller, 1994*).

Die Prognose des malignen Pleuramesothelioms ist bis zum heutigen Zeitpunkt extrem schlecht. Die Überlebenszeit nach Diagnosenstellung wird mit etwa neun Monaten angegeben (*Ruffie et al., 1989; Achatzy et al., 1989*). Das liegt vor allem an dem Fehlen eines kurativen Therapieansatzes. Bisherige Therapieansätze erfolgen ausschliesslich unter palliativen Gesichtspunkten und ändern nichts an der schlechten Prognose.

Bei den sekundären Pleurakarzinosen, darunter versteht man die Metastasierung maligner Tumoren in die Pleura, steht beim männlichen Geschlecht das primäre Bronchialkarzinom an erster Stelle. Die Ursache liegt sicherlich in der engen Beziehung zum benachbarten Lungengewebe begründet. Unter optimalen therapeutischen Bedingungen erreichen 13 % aller Patienten die 5-Jahres-Überlebensrate; 80 % sterben bereits im ersten Jahr nach Diagnosestellung (*Colby et al, 1995*). In der Bundesrepublik Deutschland starben 1996 36784 Patienten an einem Bronchialkarzinom, davon waren 28362 Männer und 8422 Frauen betroffen (*Statistisches Bundesamt, 1997*). Die korrekte und reproduzierbare Typisierung ist für die Einschätzung der Prognose sowie für die optimale Kombination des Therapieansatzes (Operation, Bestrahlung, Chemotherapie) enorm wichtig.

Beim weiblichen Geschlecht steht das Mammakarzinom als sekundäre Pleurakarzinose an erster Stelle (*Huzly, 1989*), welches sich oft erst nach 10 Jahren nach Diagnosestellung als Metastase in der Pleura manifestiert. Als weitere sekundäre Pleurakarzinosen kommen die malignen Tumoren des Magens, des Pankreas und der Leber sowie des Dickdarmes in Betracht. Seltener findet man Nierenkarzinome, Weichteilsarkome und Melanome.

Die Hauptaufgabe der Pathologen besteht bei der Verdachtsdiagnose „malignes Pleuramesotheliom“ vor allem in der Unterscheidung zwischen malignen Mesotheliomen und sekundären Pleurakarzinosen (Metastase eines malignen Tumors). Zum Einen ist das für die Auswahl der korrekten Therapie wichtig, zum Anderen besteht eine finanzielle Relevanz, da eine maligne Mesotheliomerkrankung als Berufskrankheit anerkannt ist. Die morphologische

Diagnose eines malignen Mesothelioms erweist sich jedoch als schwierig, denn maligne Mesotheliome sind in ihrer Form sehr vielgestaltig und können zudem adenoide Wachstumsmuster imitieren (*Hansen et al., 1984*). Des Weiteren liegen die Schwierigkeiten der Histopathologie (Gewebeuntersuchungen von Probeexzisionen und/oder Autopsiematerial) in den zunehmend kleineren Gewebeproben, die von den klinischen Ärzten zur pathologischen Begutachtung eingesandt werden. *Merkle und seine Mitarbeiter (1989)* wiesen in ihren Studien nach, dass mit abnehmender Probengröße die diagnostische Sicherheit geringer ausfällt.

Die zytopathologische Untersuchung (Zelluntersuchung an Ergüssen oder Abtupfpräparaten von Probeexzisionen) hat zwar neben der Histopathologie ihren Platz als gleichberechtigte Methode in der präoperativen Abklärung, in der abschliessenden Diagnose gilt die Histopathologie trotzdem immer noch als Standard der Tumordiagnostik. *Tao und seine Mitarbeiter (1984)* berichteten über „falsch positive“ zytologische Befunde in der Lunge bei anfangs negativen histologischen Befunden. Diese erwiesen sich jedoch im weiteren klinischen Verlauf und bei zusätzlichen histopathologischen Untersuchungen am Operationsgut als „richtig positiv“. Die zytopathologische Untersuchung ist kostengünstiger, weniger invasiv und damit weniger belastend für den Patienten, da für die zytologische Diagnose lediglich die zur Frühsymptomatik der malignen Mesotheliomen gehörenden Entwicklung von Brusthöhlenergüssen (*Müller, 1997*) punktiert werden müssen. Aus diesen Aspekten heraus, ergibt sich die unter Punkt 1.1 aufgeführte Aufgabenstellung.

Primäre benigne Neoplasien	Benigne Mesotheliome (lokal)	Maligne Mesotheliome (diffus)
Cysten, Lipom, Myom, Fibrom, Neurinom, Gangliozytom, Paragangliom, Hämangiom, Hämangioperizytom, Chordom, Myxom und Pseudotumore. Sie entstehen nicht aus den Mesothelien, sondern aus dem submesothelialen Bindegewebe oder aus den peripheren Ausläufern der darunter liegenden Organe.	Benignes epitheliales Mesotheliom Syn.: Adenomatöses Mesotheliom Syn.: Papillom Lokalisiert, Zellen gelangen nicht in den Erguss.	Malignes epitheliales Mesotheliom Syn.: Adenomatöses Mesotheliom Differenzierung: endothelial, carcinomatös oder anaplastisch. Diffus.
	Benignes biphasisches Mesotheliom Syn.: Biphasisches Mesotheliom Lokalisiert, Zellen gelangen nicht in den Erguss.	Malignes biphasisches Mesotheliom Syn.: Biphasisches Mesotheliom Diffus.
	Benignes fibromatöses Mesotheliom Syn.: Sarkomatöses Mesotheliom Syn.: Mesenchymales M. Lokalisiert, Zellen gelangen nicht in den Erguss.	Malignes fibromatöses Mesotheliom Syn.: Sarkomatöses Mesotheliom Diffus.

Tabelle 1: Übersicht primärer, benignen und malignen Pleuratumoren.

2.1 Zytomorphologische Kriterien

2.1.1 Normale Mesothelzellen

Mesothelzellen sind pluripotente Zellen, die sich bei proliferierenden Prozessen sehr vielgestaltig differenzieren können. Zwei wichtige Faktoren sind dabei relevant: Zum Einen bietet die Ergussflüssigkeit den abgeschilferten Mesothelzellen ein Nährmedium, in dem sie einen langen Zeitraum überleben können. Dieses Nährmedium jedoch weist zum natürlichen Milieu (Serum, Blut) eine unterschiedliche Konzentration und Zusammensetzung der Nährstoffe auf. Zum Anderen liegen die Zellen in der Ergussflüssigkeit nicht im Verband, sondern einzeln und können ungestört wachsen.

Die Mesothelzellen liegen in den Tupfpräparaten in einer platten, einschichtigen Lage. Die Zellbegrenzung ist polygonal bzw. rhomboid und unscharf. Das Zytoplasma ist grau-basophil gefärbt, oftmals hell oder transparent. Der Kern weist eine zentrale Lagerung auf, ist leicht ovoid und enthält mitunter Makrokerneinschlüsse. Die mittlere Zellgröße beträgt 15 bis 30 μm , die Kerngröße 10 bis 15 μm . Abbildung 1A zeigt die Zellmorphologie von natürlichen, epithelialen Mesothelzellen einer gesunden Pleura. Der Unterschied zu einer proliferierenden Mesothelzelle einer gereizten Pleura ist auffällig (Abbildung 1 B). Die proliferierenden Mesothelzellen weisen hier eine starke Anisokaryose und eine Hyperchromasie auf. Abbildung 2 zeigt eine Asbestose in einem Tupfpräparat einer gereizten Pleura. Typisch für Asbestfasern sind die streichholzähnlichen Auftreibungen der Enden (Pfeil).

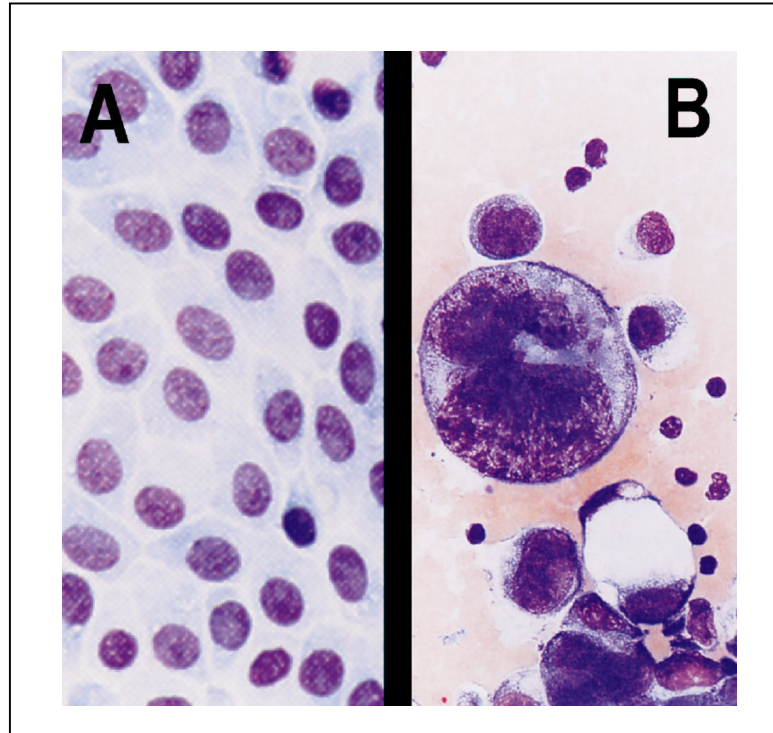


Abbildung 1: Vergleich normaler und stark proliferierender Mesothelzellen. Tupfpräparate von Probeexzisionen. Pappenheim-Färbung (Ölimmersion, 60).

A: Normale Mesothelzellen einer gesunden Pleura.

B: Stark proliferierende Mesothelzellen mit starker Anisokaryose einer gereizten Pleura.

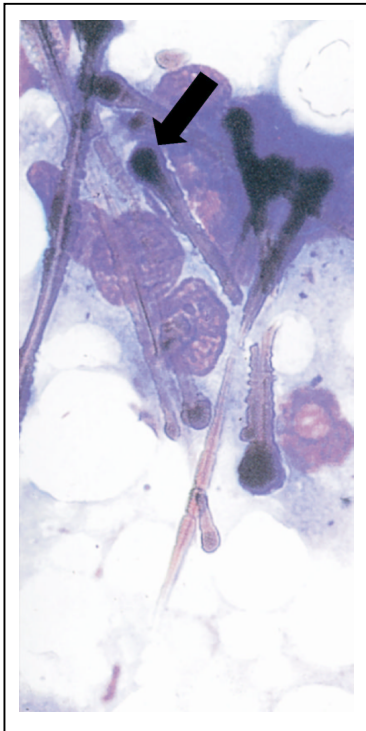


Abbildung 2: Asbestose einer gereizten Pleura. Deutlich zu erkennen sind die streichholzähnlich aufgetriebenen Enden der Asbestfasern (Pfeil). Tupfpräparat einer Probeexzision. Pappenheim-Färbung (Ölimmersion, 60).

2.1.2 Maligne Mesotheliome

Nach der WHO-Klassifikation (1981) werden histologisch grundsätzlich drei Mesotheliom-Formen unterschieden:

Epitheliales (Syn.: Adenomatöses) Mesotheliom: maligne-benigne.

Biphasisches (Syn.: Bivalentes) Mesotheliom: maligne-benigne.

Fibromatöses (Syn.: Sarkomatöses) Mesotheliom: maligne-benigne.

Die Bezeichnungen „adenomatöses“- , „bivalentes“- bzw. „sarkomatöses Mesotheliom“ werden in der Literatur als Synonyme verwendet. Für diese Studie werden jedoch ausschließlich die Begriffe „epitheliales“- , „biphasisches“- , und „fibromatöses Mesotheliom“ verwendet. Nachfolgend werden die zytomorphologischen Kriterien der malignen Mesotheliome im Einzelnen beschrieben.

2.1.2.1 Malignes epitheliales Mesotheliom

Atay und Topalidis (1994) unterscheiden bei dem malignen epithelialen Mesotheliom zytomorphologisch drei Wachstumsformen:

1. Endothelialer Typ
2. Carcinomatöser Typ
3. Anaplastischer Typ

In den Ausstrichen von Probeexzisionen sind polygonal-kubisch begrenzte Zellen mit zum Teil geschwänzt Zytosplasma und zentraler Kernlagerung zu finden. Doppelkernigkeit ist häufig anzutreffen. Das Zytosplasma ist hell oder basophil gefärbt. Die Tumorzellen bilden vorwiegend papilläre und acinäre Gruppen. Dagegen sind die Tumorzellen im Erguss oftmals runde, mittelgrosse Zellen mit zentraler Kernlagerung. Charakteristisch ist das scharf begrenzte, helle Zytosplasma mit feiner Vakuolisierung. Häufig bildet das Zytosplasma auch Ausläufer. Abbildung 3 zeigt ein epitheliales Mesotheliom mit carcinomatösen (A) und endothelialen (B) Wachstums muster. Charakteristisch für die endotheliale Differenzierung eines epithelialen Mesothelioms ist das feingranuläre Chromatin und die flache Lagerung der Zellen (Follikelbildung). Ein epitheliales Mesotheliom mit überwiegend carcinomatösem Wachstums muster weist ein geschwänzt, oftmals zweischichtig angefärbtes Zytosplasma auf.

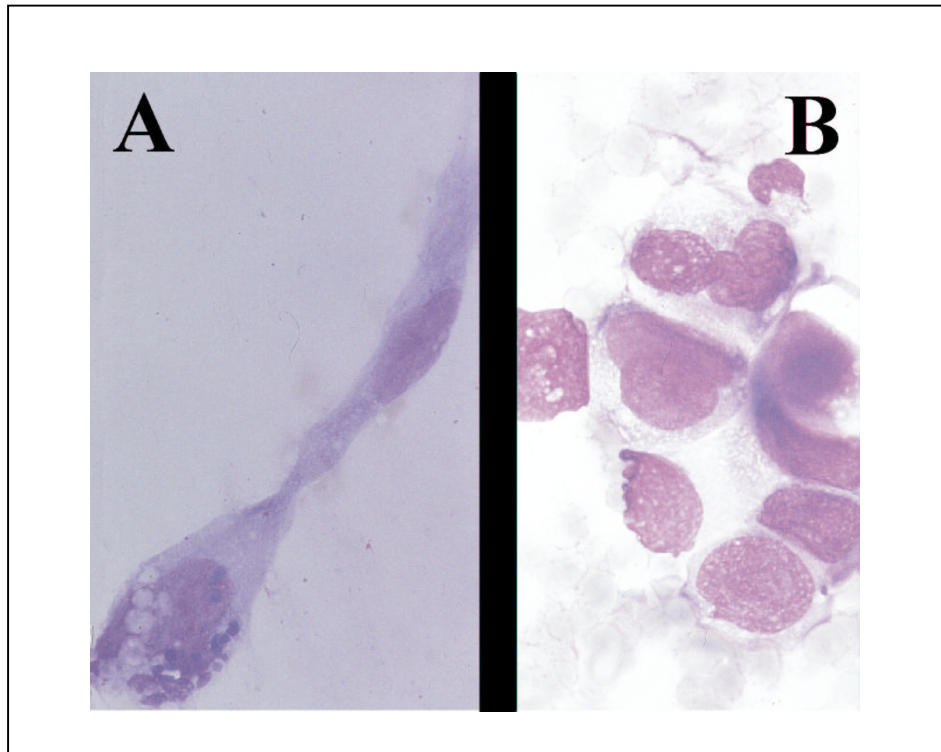


Abbildung 3:

Malignes epitheliales Mesotheliom der Pleura mit

A: carcinomatöser Wachstumsdifferenzierung

B: endothelialer Wachstumsdifferenzierung. Tupfpräparate von Probeexzisionen. Pappenheim-Färbung (Olympus-Ölimmersion 60).

Zytomorphologisch weisen maligne, epitheliale Mesotheliome mit überwiegend anaplastische Wachstumsformen eine maximal verschobene Kern-Plasma-Relation auf. Die Zelle ist einkernig, das Zytoplasma fast vollständig verdrängt. Abbildung 4 zeigt dasselbe maligne, epitheliale Mesotheliom mit einer anaplastischen Differenzierung im Ausstrich eines luftgetrockneten Pleuraergusses (B) und im Tupfpräparat einer Probeexzision (A).

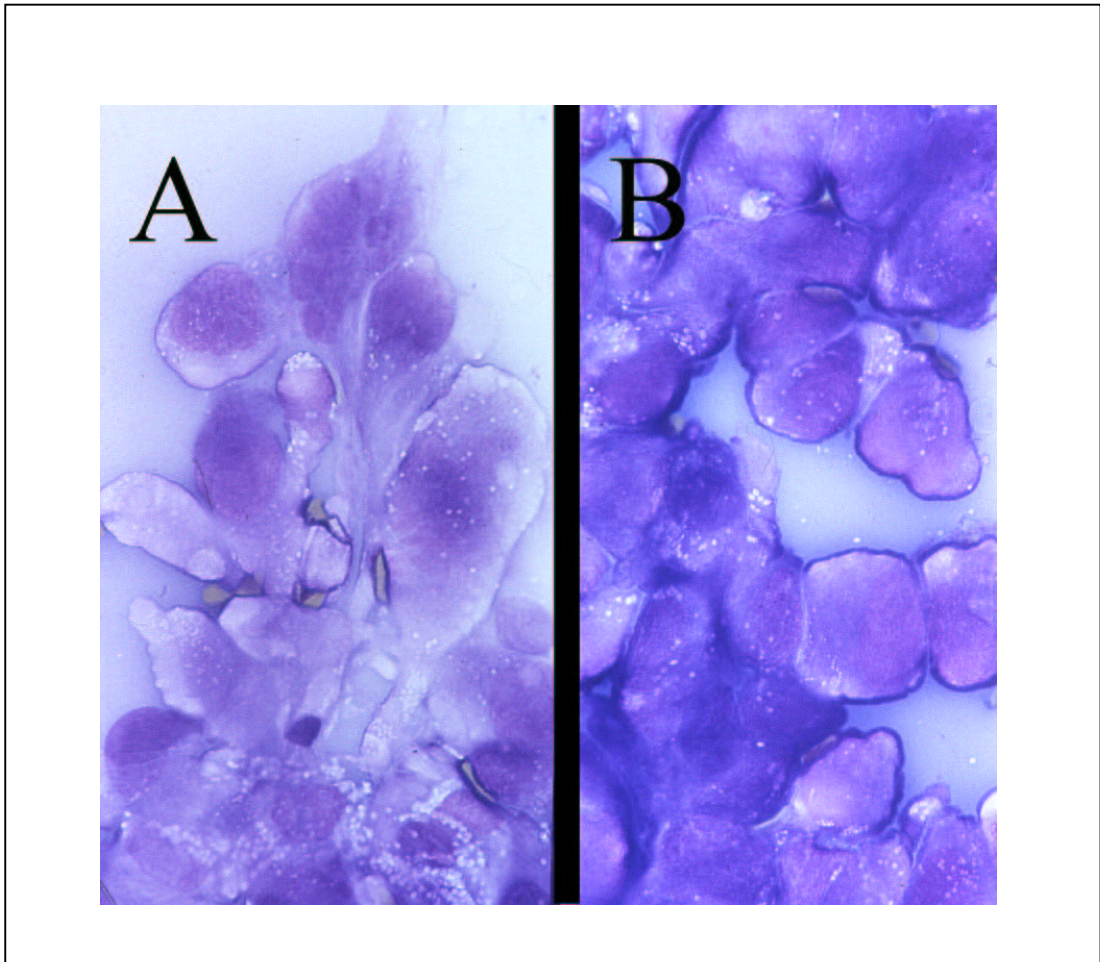


Abbildung 4:

Malignes, epithiales Mesotheliom der Pleura mit anaplastischer Differenzierung. Pappenheim-Färbung (Olympus-Ölimmersion, 60).

A: Tupfpräparat einer Probeexzision.

B: luftgetrocknetes Ausstrichpräparat eines Pleuraergusses.

2.1.2.2 Malignes biphasisches Mesotheliom

Es treten vor allem spindelige Tumorzellen auf, die ein relativ helles Zytoplasma besitzen. Die Zellkernlagerung ist zentral, die Nukleolen sind groß. Das Vorkommen von fibrillärer und amorpher Bindegewebssubstanz ist charakteristisch. In den Ergüssen werden hauptsächlich epithelial differenzierte Zellen gefunden, so dass das biphasische Mesotheliom oftmals als epithiales Mesotheliom verkannt wird (*Dejmek and Hjerpe, 1994*). Leichter wird die Diagnose in den Biopsie-Ausstrichen, in denen Zellen mit biphasischen Kriterien gefunden werden. Abbildung 5 zeigt ein malignes, überwiegend biphasisches Mesotheliom (geschwänztes Zytoplasma, oberer Pfeil) mit epithelialen Anteilen (polygonales Zytoplasma; unterer Pfeil).

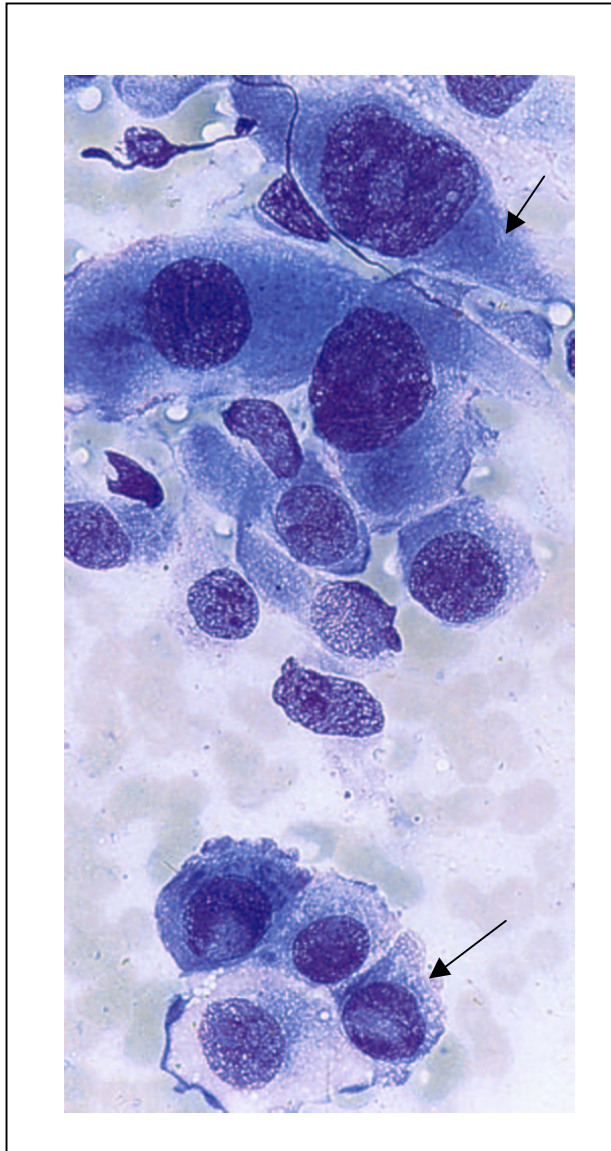


Abbildung 5:

Malignes, biphasisches Mesotheliom der Pleura mit epithelialen Anteilen. Oberer Pfeil: biphasische Anteile (geschwänztes Zytoplasma). Unterer Pfeil: epitheliale Anteile (polygones Zytoplasma). Tupfpräparat einer Probeexzision der Pleura. Pappenheim-Färbung (Olympus-Ölimmersion, 60).

2.1.2.3 Malignes fibromatöses Mesotheliom

Zu diesem Mesotheliomtyp gehören oftmals einzeln liegende Tumorzellen mit geschwänztem Zytoplasma. Abbildung 6 zeigt ein malignes, fibromatöses Mesotheliom mit hellem Zytoplasma und deutlich ausgeprägter Mehrkernigkeit, jedoch mit zentraler Kernlagerung. Die Kernbegrenzung verläuft unregelmäßig, die Nukleolen sind prominent. Die genannten zytomorphologischen Kriterien des malignen, fibromatösen Mesothelioms sind sowohl in

Tupfpräparaten von Probeexzisionen als auch in luftgetrockneten Ausstrichpräparaten gut zu erkennen (Abbildung 6).

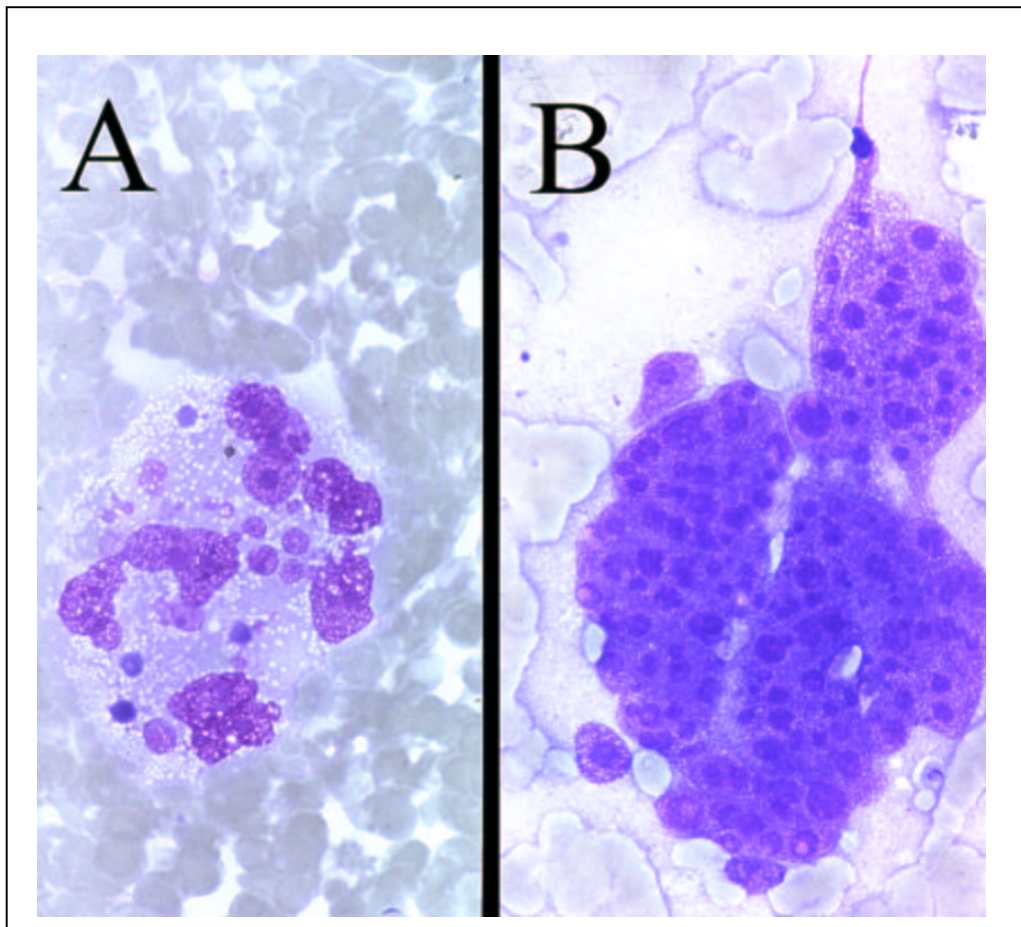


Abbildung 6:

Malignes, fibromatöses Mesotheliom der Pleura. Pappenheim-Färbung (Olympus Ölimmersion, 60).

A: Tupfpräparat einer Probeexzision

B: Luftgetrocknetes Ausstrichpräparat eines Pleuraergusses.

2.2 Zytochemie

Wie bereits erwähnt, ist eine exakte Diagnose für den korrekten Therapieansatz sowie für die Frage nach einer berufsbedingten Pleuraerkrankung im Sinne eines malignen Mesothelioms und der damit verbundenen finanziellen Entschädigung des Patienten von Nöten. Die Differentialdiagnose sekundäre Pleurakarzinose (Metastase eines malignen Karzinoms in die Pleura) versus malignem Pleuramesotheliom ist jedoch sowohl histomorphologisch (Gewebeuntersuchung) als auch zytomorphologisch (Zelluntersuchung) oftmals sehr

schwierig, da jeder adenomatöser Tumor mit Ausbreitung in die Pleura prinzipiell ein epitheliales Mesotheliom (syn.: adenomatöses Mesotheliom) imitieren kann (siehe Abbildung 7). Um eine Aussage über die Wertigkeit der zytomorphologischen Untersuchungen (siehe auch Problemstellung dieser Studie, Punkt 1.1) treffen zu können, wurden für den Einsatz der enzymzytochemischen Untersuchung die alkalischen Phosphatase (AP) sowie die Periodic Acid Schiff-Reaktion (PAS) mit und ohne Diastase-Vorbehandlung (D-PAS bzw. PAS) eingesetzt. Zum Einen können diese genannten enzymzytochemischen Reaktionen Zusatzinformationen bezüglich einer Differentialdiagnose bringen. Zum Anderen besteht die Möglichkeit durch den Vergleich übereinstimmender zytomorphologischer und histopathologischer Diagnosen die Sensitivitäten dieser zytochemischen Reaktionsmuster zu berechnen.

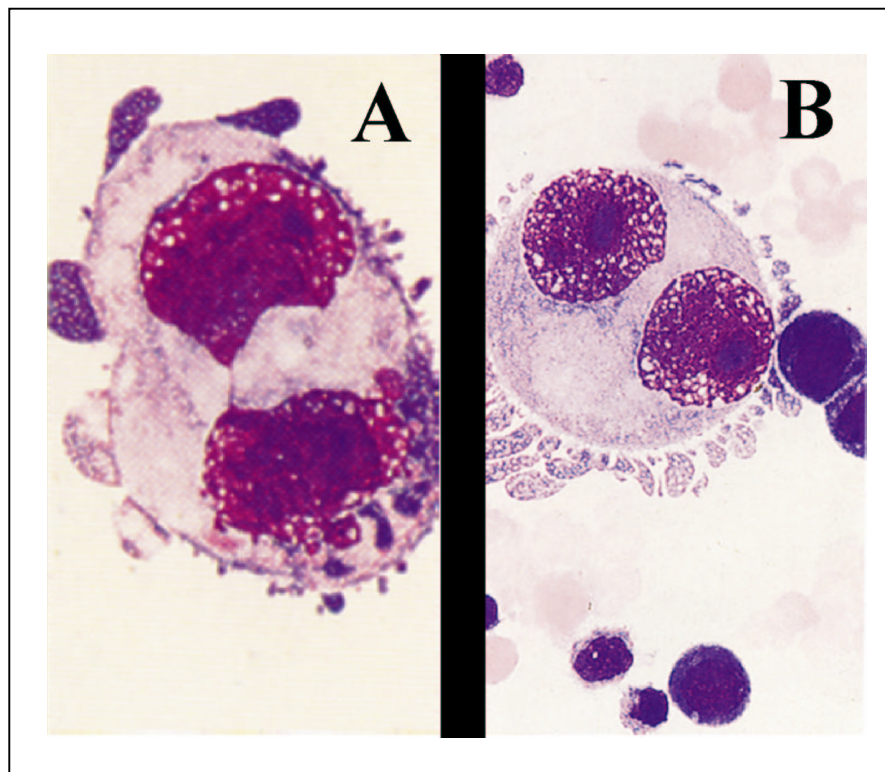


Abbildung 7:

Vergleich des Zellbildes einer Metastase eines Bronchiolo-Alveolarzellkarzinoms in der Pleura (A) und eines malignen, epithelialen Pleuramesothelioms (B).

Fast identische Zellbilder; Stark unregelmässig begrenzte Kerne passen eher zu einem Bronchiolo-Alveolarzellkarzinom. Pappenheim-Färbung, luftgetrocknete Ausstrichpräparate von Pleuraergüssen (Olympus, Ölimmersion, 60)

2.2.1 Alkalische Phosphatase

Die Phosphatasen gehören zu der Gruppe von Enzymen, die organische Phosphorsäuremonoester oder Phosphorsäurediester hydrolysieren. Die humane alkalische Phosphatase liegt in mehreren Isoenzymen vor, d.h. sie wirken substratspezifisch gleich, unterscheiden sich jedoch in der Proteinstruktur und ihren physikalischen Eigenschaften (isoelektrischer Punkt, Hitzeempfindlichkeit und pH-Optimum). Die alkalische Phosphatase hat ihr pH-Optimum bei pH 7 bis 8.

Die weite Verbreitung des Enzyms im Gewebe, Aktivitätsänderungen im Blut und Gewebe als Folge eines Krankheitszustandes sowie die Einfachheit mit der die Aktivität des Enzyms bestimmt werden kann, sind Ursache für den bevorzugten Einsatz in Studien und Diagnostik. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt durch das α -Naphthol, welches aus dem Natrium- α -naphthylphosphat freigesetzt wird und mit dem zugefügtem Diazoniumsalz ein gelbbraunes Reaktionsprodukt bildet, das sich in den Tumorzellen in Form von feinen Körnchen niederschlägt.

Fishman und seine Mitarbeiter (1968) berichteten als Erstes über eine Aktivität der alkalischen Phosphatase im Tumorgewebe sowie im Serum eines 30jährigen Patienten mit einem Bronchialkarzinom. Bei der Autopsie wurden ausgedehnte Metastasen in Nebennieren, Milz, Niere und Gehirn gefunden. Dieses tumorspezifische Isoenzym konnte nicht im tumorfreien Gewebe detektiert werden.

Mit Hilfe von zytochemischen Untersuchungen (Alkalische Phosphatase, Saure Phosphatase, Unspezifische Esterase und Leucinaminopeptidase) versuchte *Eckert* (1981 und 1991) Tumorzellen von Mesothelzellen in Pleuraergüssen zu unterscheiden. Dieses gelang ihm relativ gut, vorrangig verließ er sich dabei auf den Nachweis der alkalischen Phosphatase, die eine hohe Positivitätsrate bei den Tumorzellen, nicht jedoch in den Mesothelzellen zeigte. Die pulmonalen Bronchialkarzinome als wichtigster Primärtumor der Pleurakarzinosen zeigten dabei in allen Fällen eine positive Reaktion.

2.2.2 PAS

Mit Hilfe der Periodic Acid Schiff- (PAS)- Reaktion können Kohlenhydrate, Mucoproteide, Glykoproteide, Kerasin, Cerebroside, und Acetalphosphatide dargestellt werden. Die Darstellung erfolgt als Reaktion benachbarter Aldehydgruppen mit fuchsin-schwefeliger Säure (*Burck, 1973*). Eingesetzt wird die PAS-Reaktion für die Differentialdiagnose zwischen diffusem Pleuramesotheliom und einer sekundären Pleurakarzinose.

Fisher und Hellstrom (1960) zeigten in ihren Studien, dass Mesotheliome häufig eine PAS-positive Reaktion aufweisen. Das intrazytoplasmatische, feingranuläre Material hielten sie für Glykogen. Diese Annahme konnte 1976 durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden (*Klima et al. und Suzuki et al.*). Nach einer Diastase- bzw. Amylasevorbehandlung verläuft die PAS-Reaktion negativ. Neben dem Glykogennachweis wird mit der PAS-Reaktion epithelialer Schleim nachgewiesen. Bei PAS-positivem, extrazellulärem Schleim handelt es sich um Basalzellstrukturen mit hohen Mucopolysaccharidanteilen (*Roggli et al., 1987*). Intrazellulärer, PAS-positiver und Diastase-resistenter, epithelialer Schleim schliesst ein Mesotheliom aus (*Kannerstein et al., 1977b; Adams und Unni, 1984; Cibas et al., 1987*).

2.3 Immunzytochemie

Wie unter 2.1.1 bereits erwähnt, sind proliferierende Mesothelzellen pleomorph. Besonders schwierig ist die Unterscheidung zwischen adenoid-epithelial wachsenden Mesotheliomen und in die Pleura metastasierten Adenokarzinomen. Zytochemische und immunzytochemische Untersuchungen können sich bei der differentialdiagnostischen Abgrenzung als sehr hilfreich erweisen. Eine korrekte Diagnose ist für den Therapieansatz unerlässlich, denn Mesotheliome sind eine Gruppe von Tumoren, die eine relativ geringe Sensitivität gegenüber chemotherapeutischen Maßnahmen aufweist (*Ruffie und Minkin, 1989; Dejmek et al., 1992*). Zudem kann eine kostenintensive Suche nach einem etwaigen Primärtumor vermieden werden.

2.3.1 Differentialdiagnose von malignen Mesotheliomen und Adenokarzinomen

Antigene, die hauptsächlich von Mesotheliomen, aber nicht von Adenokarzinomen exprimiert werden, sind erst in den letzten Jahren identifiziert worden. Zu diesen – den sogenannten „Positiv-Markern“ - gehören das Thrombomodulin, das Zytokeratin 5/6, Calretinin, HBME-1, N-cadherin, das Vimentin und das CD44S. Zu den „Negativ-Markern“, also den Antigenen, die vor allem von Adenokarzinomen und nur selten von Mesotheliomen exprimiert werden, zählen das Ber-EP4 (Human Epithelial Antigen), das CEA, das B72.3, das Leu-M1 (CD15), das MOC-31, das E-Cadherin und das TPA (*Nelson und Ordonez, 1998*). Die nachstehenden Beschreibungen beschränken sich auf die in dieser Studie verwendeten Marker Thrombomodulin, HEA (Ber-EP4), CEA, Calretinin, Zytokeratin, Vimentin und das TPA. Wie auch bei dem Einsatz der enzymzytochemischen Untersuchungen (Punkt 2.2) wird mit den hier durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen zum Einen bezweckt Zusatzinformationen für die Differentialdiagnose sekundärer Pleurakarzinose versus malignem Pleuramesotheliom zu treffen, um eine Aussage über die Wertigkeit der zytomorphologischen Untersuchungen zu erhalten (siehe Problemstellung Punkt 1.1). Zum Anderen wird zusätzlich eine Berechnung der Sensitivitäten und Spezifitäten der Tumormarker durch den Vergleich übereinstimmender zyto- und histopathologischer Enddiagnosen angestrebt.

2.3.1.1 Anti-Thrombomodulin

Die erste Studie über die Thrombomodulin-Expression in Pleuramesotheliomen wurde von *Collins und seinen Mitarbeitern 1992* veröffentlicht. 100% aller Mesotheliome (n = 31) und nur 8,3% aller Adenokarzinome der Lunge (n = 48) zeigten eine immunologische Reaktion. Nur in einem Fall zeigte ein Adenokarzinom eine starke, einwandfreie Reaktion für das Thrombomodulin. Ein Jahr später publizierten *Brown und Mitarbeiter (1993)* in einer ähnlichen Studie jedoch ganz andere Zahlen. Sie berichteten über Thrombomodulin Reaktivität in nur 58,8% aller Mesotheliome (n = 34) und in 58,3% aller Adenokarzinome der Lunge (n = 103). In den nächsten Jahren folgten weitere Untersuchungen, doch nur die Studie von *Dogliani und seinen Mitarbeitern (1996)* lieferte ähnlich hohe Sensitivitäten für das Adenokarzinom (siehe Tabelle 2, S. 19).

Autoren	Mesotheliome	Adenokarzinome
Collins et al., 1992	31/31 (100%)	4/48 (8%)
Brown et al., 1993	20/34 (60%)	60/103 (58%)
Ascoli et al., 1995	33/33 (100%)	13/31 (42%)
Attanoos et al., 1996	12/16 (75%)	2/32 (6%)
Doglioni et al., 1996	16/20 (80%)	17/22 (77%)
Kennedy et al., 1997	49/57 (86%)	7/61 (11%)
Ordonez, 1997	28/35 (80%)	7/46 (15%)
Riera et al., 1997	28/57 (49%)	13/211 (6%)

Tabelle 2: Übersicht über Anti-Thrombomodulin Reaktivität in Mesotheliomen und in Adenokarzinomen der Lunge, nach Ordonez (1998).

Thrombomodulin ist ein transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 75 kDa. Es enthält sechs sich wiederholende Domänen, ähnlich dem „Epidermal Growth Factor“ (EGF), und eine terminale Aminodomäne (Fink et al., 1993). Thrombomodulin wird durch den Anstieg der Protein C-Konzentration (Gerinnungshemmer durch Bindung von Protein S und Thrombin) aktiviert. Die Thrombomodulin-Synthese stellt somit einen wichtigen Mechanismus dar, um eine Thrombinresistenz aufrecht zu erhalten und damit eine Gerinnung auf Zelloberflächen von endothelialen Zellen zu vermindern. Die vermehrte Expression des Glykoproteins erfolgt durch alle Agenzien, die die Konzentration des cyclischen AMP erhöhen; das Herunterregulieren dieser Proteinsynthese hingegen erfolgt durch das Interleukin 1, TNF (Tumor Nekrose Faktor) und bestimmte Endotoxine.

Der von uns benutzte Klon (DAKO-TM 1009) ist ein monoklonaler Mausantikörper des Isotyps IgG1 mit 2 identischen L-Ketten vom Typ Kappa. Die Gesamtproteinkonzentration des Antikörpers beträgt 17,2 mg/ml nach Lowry; der Anteil der IgG-Maus-Konzentration beträgt 237 µg/ml. Die Epitopbindung erfolgt an den EGF Domänen 4-6.

2.3.1.2 Anti-Zytokeratin 5/6

Anhand der Aminosäuresequenz können zwei Typen von Keratinen unterschieden werden: die sauren Keratine des Typs I und die neutralen/basischen Keratine des Typs II. Heterodimere aus Keratinen können sich zu Intermediärfilamenten zusammenlagern, Homodimere sind dazu nicht in der Lage. Eine einzelne Epithelzelle kann verschiedene Keratine exprimieren, die alle zu einem einzigen System von Keratin-Filamenten copolymerisieren. Diese Heterogenität ist für die Tumordiagnostik relevant: Anhand der jeweils exprimierten Kombination von Keratinen kann festgestellt werden, aus welchem Epithelgewebe der Tumor stammt.

Moll und seine Mitarbeiter berichteten 1989 über ihre immunhistochemischen Studien, die sie mit dem monoklonalen Antikörper AE14 durchführten. Dieser Antikörper reagiert ausschliesslich mit dem Zytokeratin 5-Antigen. In 12 von 13 (92%) epithelialen und biphasischen Mesotheliomen konnte eine Reaktion aufgezeigt werden. Dagegen reagierte der Antikörper in keinem einzigen Fall mit den 21 Adenokarzinomen der Lunge. AE14 geriet trotz dieser positiven Eigenschaften als Differenzierungsantikörper sehr schnell in Vergessenheit, denn er ist kommerziell nicht erhältlich und hat den Nachteil, dass er mit Formalin fixierten Materialien keine Reaktion eingeht.

Clover und seine Mitarbeiter (1997) führten Studien mit dem monoklonalen Antikörper D5/16B4 durch. Der gegen Zytokeratin 5 und 6 gerichtete Antikörper zeigte mit 23 Mesotheliomen (100%) und mit 5 von 27 Adenokarzinomen der Lunge eine positive Reaktion. Allerdings wurden 4 der 5 positiven Adenokarzinomen als nicht eindeutig bewertet.

Die Herstellung des von uns benutzten Klons (Anti-Zytokeratin 5/6) erfolgte durch Immunisierung von Balb/c-Mäuse mit gereinigtem Human-Zytokeratin Nr. 5 und anschliessender Fusionierung der Milzzellen mit X63Ag8.653-Myelomzellen. Die Antikörper wurden aus Ascites-Flüssigkeit mittels Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt, in Kaliumphosphatpuffer (10 mmol/l), NaCl (50mmol/l), Natriumazid (0,1 % (w/v)), Rinderserumalbumin (5 mg/ml), pH 7,4 aufgenommen und lyophilisiert. Der Antikörper gehört der Subklasse IgG1 an. Er reagiert mit humanem Zytokeratin Nr. 5 auf Immunoblots und Gewebeschnitten (*Lobeck et al., 1989*). Auf Immunoblots von Zytoskelettpräparationen nicht-verhornenden Epithels bzw. Epidermis konnte eine Kreuzreaktion mit Zytokeratin Nr. 6 und eine schwache Reaktion mit Zytokeratin Nr. 4 gezeigt werden. Der Antikörper reagiert jedoch nicht mit den Zytokeratinen Nr. 7, 8, 18 oder 19.

2.3.1.3 Anti-Calretinin

Calretinin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 29 kDa, welches zu der Familie der Kalzium-bindenden Proteine gehört (*Schwaller, 1993*). Es enthält 6 EF-Domänen mit jeweils einer kleinen Aminosäuresequenz, die für die Kalzium-Bindung verantwortlich sind. Calretinin wird hauptsächlich in zentralen sowie peripheren neuralen Geweben exprimiert und ist ebenso in normalen und proliferierenden Mesothelzellen vorhanden. 1992 berichteten *Gotzos und seine Mitarbeiter* über Calretinin Expression in 7 epithelialen Mesotheliomen (100%) und in den epithelialen Anteilen von allen 15 epithelial/fibromatös differenzierten Mesotheliomen. Alle 4 Adenokarzinome der Lunge waren dagegen negativ. Auch *Dogliani (1996)* beobachteten eine positive Reaktivität des Antikörpers bei 44 Mesotheliomen (100%), 10 % aller *Adenokarzinome* unterschiedlicher Herkunft waren jedoch ebenfalls positiv gefärbt.

2.3.1.4 Anti-Human Epitheliales Antigen (HEA)

Der Antikörper gegen das Human Epitheliales Antigen (HEA) reagiert mit zwei Glykoproteinen von 34 und 49 kDa, die sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma von Epithelzellen, mit Ausnahme von Hepatozyten, vorhanden sind. Die Herstellung des von uns benutzten Klons (Ber-EP4) erfolgte durch Immunisierung von Mäusen (Balb/c) mit gereinigtem HEA (Ber-EP4) und anschließender Fusionierung mit der Zelllinie MCF-7. Die Gesamtproteinkonzentration des monoklonalen Mausantikörpers beträgt 6,1 g/l nach Lowry, die Maus-Immunglobulin-Konzentration beträgt 235 mg/l. Er gehört zum Isotyp IgG1 mit 2 identischen L-Ketten vom Typ Kappa. Der von uns benutzte Klon Ber-EP4 weist eine äquivalente Spezifität wie Klon HEA 125 auf (*Moldenhauer et al., 1987 und Momburg et al., 1987*). *Latza und seine Mitarbeiter (1990)* waren die Ersten, die das Human Epitheliale Antigen als wichtiges Hilfsmittel bei der Unterscheidung zwischen Adenokarzinomen und Mesotheliomen einstuften. In ihrer Studie reagierten 142 (99%) von insgesamt 144 Adenokarzinomen mit dem entsprechenden Antikörper, dagegen ergab es bei den 14 Mesotheliomen keine einzige positive Reaktion. Es folgten Berichte von *Sheibani und Mitarbeitern* im Jahr 1991, die ähnliche Ergebnisse lieferten. Übereinstimmend beschrieben beide Arbeitsgruppen die immunchemische Färbelokalisationen. Im Gegensatz zu den diffusen Färbungen der meisten Adenokarzinomen, reagierten mit einer einzigen Ausnahme

alle Mesotheliome fokal-membranös. Eine Übersicht über die genannten Studien gibt die nachstehende Tabelle 3.

Autoren	Mesotheliome	Adenokarzinome
Latza et al., 1990	0/14 (0%)	142/144 (98,6%)
Kuhlmann et al., 1991	3/20 (15%)	18/20 (90%)
Sheibani et al., 1991	1/115 (0,9%)	72/83 (87%)
Gaffey et al., 1992	10/49 (20%)	103/120 (85,8%)
Frisman et al., 1993	1/9 (11%)	43/55 (78%)
Dejmek und Hjerpe, 1994	14/103 (13,5%)	28/43 (65%)
Maguire et al., 1994	2/44 (4%)	13/23 (56%)
Ascoli et al., 1995	0/33 (0%)	145/152 (95,3%)
Dogliani et al., 1996	2/20 (10%)	22/22 (100%)
Riera et al., 1997	0/57 (0%)	135/211 (63,9%)
Ordonez, 1998	18/70 (26%)	101/110 (91,8%)

Tabelle 3:

Übersicht über Anti-HEA Reaktivität in Mesotheliomen und in Adenokarzinomen der Lunge, nach Ordonez (1998).

2.3.1.5 Anti-Carcinoembryonale Antigen (CEA)

Der bestuntersuchte Marker zur Differenzierung zwischen Mesotheliomen und Adenokarzinomen der Lunge ist zweifelsfrei das Anti-Carcinoembryonale Antigen (CEA). Das Carcinoembryonale Antigen ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 180 kDa und gehört ebenso wie das nonspecific cross-reacting antigene (NCA) und das biliary glycoprotein (BGP) zu der Immunglobulin-Supergen-Familie. Die Codierung des Carcinoembryonalen Antigens besteht aus 10 Genen, die auf 2 Clustern im Chromosom 19 lokalisiert sind. Phänotypisch bestehen die Antigenbindungsstellen der Immunglobuline der

Supergen-Familie aus einer N-terminalen variablen Region von ca. 110 Aminosäuren-Länge, die innerhalb eines bestimmten Isotyps von Immunglobulinen identische Aminosäuresequenzen aufweisen und durch intramolekulare Disulfidbrücken zu globulären Regionen gefaltet sind. Das NCA, welches aus dem Lungengewebe isoliert wurde und das BGP, welches sowohl in der Gallenblase als auch in den Gallengängen sowie den Gallenkanälchen nachgewiesen wurde, werden ausserdem in der Literatur zu den CEA-verwandten Antigenen gezählt. Kreuzreaktionen monoklonaler Antikörper bzw. polyklonaler Antiseren entstehen durch gemeinsame Antigenderterminanten der CEA-Familie. Eine Übersicht der Kreuzreaktionen sind in der Publikation von *Wick und seinen Mitarbeitern (1988)* aufgeführt. Aufgrund von Untersuchungen mit kompetitiven Immunoassays konnten die monoklonalen Antikörper gegen das CEA in 5 Gruppen (GOLD 1-5) mit nicht überlappenden Epitopen eingeteilt werden (*Hammarstrom et al., 1989*). Monoklonale Antikörper mit einem hohen Grad an Spezifität gegen das CEA gehören der Epitopgruppen 1,2 oder 3 an (*Hammarstrom et al., 1989 und Hedin et al., 1986*). Der von uns benutzte Klon (II-7) gehört in die Epitopgruppe GOLD 1.

Wang und seine Mitarbeiter berichteten bereits 1979 über eine CEA- Expression in allen 12 (100%) Adenokarzinomen und in keinem einzigen Mesotheliom (0%). Abweichend von diesen Zahlen berichten andere Arbeitsgruppen über CEA-Reaktivität in 15-45 % aller Mesotheliome (*Ordenez, 1998*). Diese Diskrepanzen lassen sich mit den unterschiedlichen Sensitivitäten und Spezifitäten und der damit verbundenen Kreuzreaktionen der verschiedenen Klone des CEA-Antikörpers, die in den jeweiligen Studien benutzt worden sind, erklären.

2.3.1.6 Anti-Vimentin (V9)

Der in dieser Studie benutzte monoklonale Antikörper reagiert mit dem 57 kDa Intermediärfilament Vimentin, einem Protein, welches in den meisten Zelltypen mesenchymaler Herkunft präsent ist. Anders als die Keratine können Vimentin und Vimentin-ähnliche Proteine Intermediärfilamente bilden, die Polymere aus Proteinmolekülen eines einzigen Typs darstellen. Vimentin ist das am weitesten verbreitete Protein der Intermediärfragmente im Zytoplasma.

Vimentin-positive Reaktionen sind bei der Mehrzahl der Lymphome, Knochtumoren und bei Leukämie bekannt (*Altmannsberger et al., 1986*). Einige Tumore koexprimieren Vimentin

und Zytokeratin, dazu gehören die Schilddrüsenkarzinome (*Miettinen et al., 1984*) einige Nierenzellkarzinome (*Holthöfer et al., 1983*), die Mammakarzinome (*Raymond et al., 1989*) und die Mesotheliome (*Churg, 1985*). Bei einigen Weichteiltumoren wie das Rhabdomyosarkom und das Leiomyosarkom ist eine Koexpression von Desmin und Vimentin bekannt (*Azumi et al., 1987 und Buley et al., 1987*).

Verbreitet unter der Vielzahl von monoklonalen und auch polyklonalen Antikörpern gegen das Vimentin sind Kreuzreaktionen. Der von uns benutzte Klon (V9) weist eine breite Kreuzreaktion zwischen den Spezies auf; es erkennt humanes Vimentin ebenso wie das Vimentin von Ratten und Hühnern. Im Immunoblot sind aber keine Reaktionen mit anderen Intermediärfilamenten, inklusive Desmin, Keratin und Neurofilament, nachgewiesen worden. Dieser monoklonale Mausantikörper gehört zum Isotyp IgG1 und besteht aus zwei identischen L-Ketten des Typs Kappa. Die Gesamtproteinkonzentration beträgt 14,3 g/l, die Konzentration des Maus-Immunglobulins beträgt 290 mg/l.

2.3.1.7 Anti-Tissue-Polypeptide Antigen (TPA)

Anti-Tissue-Polypeptide Antigen (TPA) ist ein allgemeiner Tumormarker, der in verschiedenen Organen Tumorstadium anzeigt. Eine hohe Relevanz weist er im klinischen Einsatz bei der Therapiekontrolle, sowie bei der Rezidivdiagnostik, welche die Mamma, den Gastrointestinalen Trakt, die Respirationsstrakt, das Harnblasenkarzinom, das Prostata- und das Ovarialkarzinom betreffen. Nicht-maligne Erkrankungen wie Hepatitis, Leberzirrhose oder Diabetes, weisen zunächst einen hohen Level an TPA auf, der jedoch nach Abklingen der akuten Phase endet. Progressive Malignität jedoch ist mit einem persistent steigendem TPA-Level assoziiert.

TP-Antigene sind in humanen Karzinomen und in den meisten Ziellinien von einschichtigen oder mehrschichtigen Epithelien von inneren Geweben zu finden und weisen ein Molekulargewicht von 20 kDa auf.

In dieser Studie wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das TPA (Klon TPA:B1) verwendet, der Kreuzreaktionen gegen Epitope der Zytokeratine 8, 18 und 19 aufweist. Spezifische Reaktionen mit anderen Tumormarkern sind nicht bekannt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Studie verwendeten molekularbiologischen Methoden beschränken sich auf DNA-zytometrische Untersuchungen und auf die Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen im SDS-PAGE mit anschliessendem Westernblot und Detektion der immunogenen Proteine. Wie bereits erwähnt (siehe auch Problemstellung, Punkt 1.1) soll durch diese Studie eine Aussage über die Wertigkeit (Sensitivität, Spezifität) der zytomorphologischen Diagnose durch den direkten Vergleich mit den Referenzanalysen der Histopathologie und den durchgeführten zytochemischen- und immunzytochemischen Untersuchungen getroffen werden. Die DNA-zytometrische Untersuchung soll dann eingesetzt werden, wenn die zytologischen und histologischen Enddiagnosen nicht übereinstimmen und die histopathologische Referenz keinen malignen Tumor nachweisen konnte. Mit dieser Methode soll geklärt werden, ob eine chromosomale Aneuploidie (siehe 2.4.1 DNA-zytometrische Untersuchungen) und damit eine Karzinose tatsächlich vorliegt oder nicht. Stimmen die Enddiagnosen der zytologischen und histologischen Untersuchungen nur im Sinne eines malignen Tumors überein, nicht aber in der Histogenese des Tumors (malignes Pleuramesotheliom versus metastatische Ausbreitung eines pleurafremden Tumors) soll durch die Ermittlung des Molekulargewichtes des immunogenen Proteins nach Reaktion mit einem „Positiv-Tumormarker“ und einem „Negativ-Tumormarker“ (siehe auch 2.3.1) die tatsächliche Histogenese geklärt werden.

2.4.1 DNA-zytometrische Untersuchungen

Biologische Grundlagen der DNA-zytometrischen Nachweisverfahren sind die charakteristische, numerische oder strukturelle Aberrationen der Chromosomen.

Eine normale Population proliferierender diploider Zellen zeigt in einem DNA-Histogramm einen ersten Häufigkeitsgipfel bei 2c (entsprechend der G₀ bzw. G₁-Phase des Zellzyklus) und einen zweiten bei 4c (entsprechend der G₂/M-Phase). Zwischen den beiden Gipfeln findet die Synthesephase statt (S-Phase), in der das genetische Material verdoppelt wird. Hier treten in der Onkogenese primäre, sekundäre und tertiäre Aberrationen auf.

Die entsprechenden quantitativen Abweichungen der DNA-Verteilung der Zellkerne von der Norm werden zur Diagnostik herangezogen.

Unter euploide Polyploidisierung versteht man die Vervielfachung des normalen Chromosomensatzes entsprechend den ganzzahligen Potenzen des normalen 2c-DNA-Gehaltes (4c, 8c, 16c). Ursache dieser euploiden Polyploidisierung kann u.a. ein HPV-Infekt oder ein Vitamin B-12 Mangel sein.

Unter DNA-Aneuploidie versteht man chromosomale Aneuploidien (numerische oder strukturelle Abweichungen des normalen Chromosomensatzes), die DNA-zytometrisch als signifikante Normabweichungen identifiziert werden.

Mit dem DNA-zytometrischen Verfahren können alle zytologischen Präparate sowie formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe nach enzymatischer Zellvereinzellung untersucht werden. Das zu untersuchende Material wird nach *Feulgen et al. (1924)* behandelt, wobei die Zellkern-DNA mit Thionin oder Pararosanilin spezifisch gefärbt wird.

Das Prinzip dieses Nachweises beruht darauf, dass fuchsinschweflige Säure mit mindestens zwei Aldehydgruppen eine rot gefärbte Verbindung eingeht (Schiff'sche Reaktion). Von der DNA werden durch saure Hydrolyse die Purinbasen Adenin und Guanin entfernt, wobei Aldehydgruppen entstehen. An diese „Apurinsäure“ lagert sich die fuchsinschweflige Säure an.

Bei der RNA verläuft diese Reaktion negativ, da der Abstand der Aldehydgruppen keine Verbindung mit dem Farbstoff ermöglichen.

Die Messung der optischen Dichte der gefärbten Zellkerne erfolgt am Monitor eines TV-Bildanalyse-Systems, welches mit einem konventionelle Mikroskop gekoppelt ist. Dabei ist die Messung der Lichtabsorption nach dem Lambert-Beerschen Gesetz der DNA-Menge proportional, so dass durch Vergleich mit normalen Eichzellen (Lymphocyten, Granulocyten, Epithelzellen) das DNA-Histogramm aufgenommen werden kann. Die Anzahl der zu messenden Zellen sollte nicht kleiner als 50 sein.

Die diagnostische Einzel-Zell-Interpretation geht davon aus, dass das Vorhandensein von 3 oder mehr aneuploider Zellen ein eindeutiger Marker für Aneuploidie der gesamten Zellpopulation ist. Die Frage mit welchem Wert eine Zelle als aneuploid angesehen wird, hängt davon ab, ob in der jeweiligen Probe Polyploidisierung vorliegt oder nicht.

Der Nachweis von 3 oder mehr Zellen mit $> 5c$ bzw. $> 9c$ spricht für eine Aneuploidie der Zellpopulation.

2.4.2 Gelelektrophorese, Westernblot und Detektion immunogener Proteine

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird als Modifikation nach *Laemmli (1970)* durchgeführt. Bei dieser Methode erfolgt die Trennung der Proteine ausschliesslich nach dem Molekulargewicht.

Die Proteine werden mit Mercaptoethanol und SDS aufgekocht, wobei reduzierende und denaturierende Bedingungen entstehen. Mercaptoethanol spaltet alle Disulfidbrücken im Protein, so dass die Polypeptide analysiert werden können.

Die Proteine selbst befinden sich in einem Medium, das ein starkes, negativ geladenes Detergens enthält, das Natriumdodecylsulfat (SDS). SDS bindet an die Proteine und bildet mit ihnen negativer Komplexe. Durch Spaltung der Disulfid- und Wasserstoffbrückenbindungen und Aufhebung hydrophober Wechselwirkungen wird die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine zerstört. Dadurch strecken sich die Moleküle, so dass auch unterschiedlich geformte Proteine gleiche Mengen an SDS binden können (*Westermeier, 1990*).

Die Auftrennung erfolgt in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Trenn- und Sammelgel).

3. Material und Methoden

3.1 Material

Die in dieser Studie verwendeten Geräte sind im Einzelnen im Anhang aufgeführt. Ich beschränke mich an dieser Stelle auf eine Übersichtstabelle mit Patientenangaben und den für diese Studie durchgeführten Untersuchungen sowie auf die Chemikalien- und Antikörperangaben.

3.1.1 Patientenangaben

In der nachfolgenden Tabelle 4 sind alle 151 Patienten anonymisiert unter Angaben des Geschlechts und des Alters zum Zeitpunkt der zytopathologischen Diagnosestellung im Sinne eines malignen Pleuramesothelioms aufgeführt. Im rechten Abschnitt der Tabelle sind den Patienten Anzahl und Art der in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen zugeordnet. Hierzu gehören die enzymzytochemischen Untersuchungen der alkalischen Phosphatase (AP), die Periodic Acid Schiff Reaction mit (D-PAS) und ohne (PAS) Diastasevorbehandlung, die immunzytochemischen Reaktionen gegen das Human-Epitheliale Antigen (HEA), das Carcino-Embryonale Antigen (CEA), das Vimentin- (Vim) und das Thrombomodulin-Antigen (Thr), das Tissue-Polypeptide Antigen (TPA) sowie die molekularbiologischen Methoden der DNA-Zytometrie (DNA) und der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE, Transfer im Westernblot und der abschliessenden Detektion immunogener Proteine (SDS-PAGE).

Patientenangaben				Anzahl und Art der durchgeführten Untersuchung									
lfd. Nr.	Pat-code	Geschlecht	Alter	AP	PAS	D-PAS	HEA	CEA	Vim	Thr	TPA	DNA	SDS-PAGE
1	58321	männlich	54		1	1			1	1			
2	77698	männlich	65	1	1	1			1	1			
3	58472	männlich	74						1	1			
4	27216	männlich	60				1				1	1	
5	10317	männlich	64	1	1	1		1		1	1		
6	94516	männlich	70	1						1	1		
7	66175	männlich	76					1		1		1	
8	7950	männlich	61	1							1		
9	104906	männlich	70	1						1	1		
10	14175	männlich	79	1	1	1	1		1	1			
11	31544	weiblich	49				1				1		
12	13591	weiblich	72	1					1				
13	107610	männlich	61	1				1	1	1			
14	65986	männlich	59	1	1	1			1	1	1		
15	16882	männlich	61					1	1	1	1		
16	59989	männlich	59							1			
17	101805	männlich	47	1			1		1	1			
18	91012	männlich	67	1	1	1				1	1		
19	74856	männlich	64					1	1	1			
20	49616	männlich	64	1	1	1				1	1		
21	96917	männlich	68	1				1		1			
22	32815	männlich	65	1	1	1			1	1			
23	88594	männlich	65	1					1	1	1		
24	59829	männlich	64					1	1	1			
25	18713	männlich	53	1	1	1				1			
26	45941	männlich	63	1	1	1		1		1			
27	35276	männlich	82	1					1	1			
28	76426	männlich	66		1	1			1				
29	57072	männlich	66	1	1			1					
30	76342	männlich	63				1				1		
31	80727	weiblich	81	1	1				1	1		1	
32	60985	weiblich	67					1		1	1		
33	105671	männlich	69	1	1	1	1		1	1			
34	12737	männlich	51				1				1	1	
35	13574	männlich	84				1		1				
36	31183	männlich	83				1		1	1			
37	98439	männlich	60						1	1			
38	56240	männlich	76	1	1	1			1	1			1
39	48612	männlich	72	1	1	1				1	1		
40	99670	männlich	73	1	1	1			1	1			
41	28915	männlich	69				1		1	1			
42	44218	weiblich	67		1	1				1			
43	96482	männlich	54				1						
44	18795	weiblich	77	1	1	1	1				1		
45	50643	männlich	69	1				1	1	1			
46	24610	männlich	71				1						
47	22384	weiblich	70						1	1			
48	18221	männlich	65	1	1								
49	88413	männlich	72		1	1			1				
50	66411	männlich	75					1	1	1			

Patientenangaben				Anzahl und Art der durchgeführten Untersuchung									
lfd. Nr.	Pat-code	Geschlecht	Alter	AP	PAS	D-PAS	HEA	CEA	Vim	Thr	TPA	DNA	SDS-PAGE
51	83693	männlich	74				1					1	
52	79882	männlich	69	1	1	1							
53	23787	männlich	71	1	1	1							
54	61646	weiblich	86	1	1	1		1		1			
55	93059	männlich	63		1					1			
56	63983	männlich	55	1	1	1		1	1	1			
57	69951	männlich	78	1	1	1				1	1		
58	27244	männlich	62	1	1				1	1			
59	55701	männlich	72	1					1	1			
60	81490	männlich	59				1			1		1	
61	6327	männlich	72	1						1	1		
62	56705	männlich	77				1						
63	31014	männlich	51		1	1		1	1	1			
64	62937	männlich	68	1	1				1				
65	45982	männlich	77	1				1	1				
66	97530	männlich	72		1	1		1		1			
67	92996	männlich	59		1	1			1	1			
68	16031	männlich	77	1	1	1			1		1	1	
69	4428	männlich	63				1						
70	39878	männlich	78		1	1		1	1	1			
71	40523	männlich	54	1	1				1			1	
72	16839	männlich	69	1	1	1			1				
73	18532	männlich	44	1	1								
74	53083	männlich	61	1	1	1		1	1	1			
75	104307	männlich	53	1	1		1		1	1			
76	60047	weiblich	41				1		1	1			
77	66144	männlich	72						1	1			
78	21633	männlich	52	1	1	1			1				
79	105977	männlich	73	1			1		1	1		1	
80	42757	männlich	61	1	1	1			1	1			
81	44458	männlich	78		1	1			1	1			
82	110794	männlich	65	1	1								
83	39631	männlich	77					1	1	1			
84	4998	männlich	49				1						
85	97825	männlich	62	1				1	1	1			
86	11103	männlich	69	1	1				1	1			
87	53679	männlich	53		1					1			
88	88855	männlich	57					1		1		1	
89	48217	männlich	62					1	1	1			
90	29469	männlich	83	1	1	1		1	1	1	1		
91	67848	männlich	80	1				1	1	1	1		
92	86841	männlich	84	1				1			1		
93	91000	männlich	69	1				1					
94	58987	männlich	53		1	1				1			
95	57576	männlich	71				1						
96	66237	männlich	64	1					1	1			
97	14521	weiblich	49	1	1					1	1	1	
98	93545	männlich	69	1	1					1	1		
99	48933	männlich	56	1	1						1		

Patientenangaben				Anzahl und Art der durchgeführten Untersuchung									
lfd. Nr.	Pat-code	Geschlecht	Alter	AP	PAS	D-PAS	HEA	CEA	Vim	Thr	TPA	DNA	SDS-PAGE
100	57984	männlich	67							1		1	
101	90204	männlich	66	1						1	1		
102	47070	männlich	37	1						1			
103	18487	männlich	53						1	1			
104	24261	männlich	57	1	1			1	1	1			
105	22321	männlich	55						1	1			
106	94462	männlich	75	1	1					1			
107	16622	männlich	54						1			1	
108	103629	männlich	71	1	1	1				1	1		
109	19836	männlich	55	1	1				1				
110	35362	weiblich	70	1					1	1	1		
111	3634	weiblich	38	1	1				1	1			
112	18024	männlich	54				1						
113	12899	männlich	71	1	1	1							
114	3683	männlich	64					1	1	1	1		
115	38921	männlich	53		1					1			
116	86257	männlich	66	1	1			1					
117	10435	männlich	67		1	1							
118	18426	männlich	63	1	1	1			1	1			
119	34882	männlich	63					1	1	1			
120	50718	weiblich	79	1	1					1	1	1	
121	88312	männlich	74				1					1	
122	52305	männlich	66	1				1	1	1	1		
123	39217	männlich	88	1				1		1	1		
124	82758	männlich	58	1	1					1			
125	9137	männlich	39	1						1			
126	69890	weiblich	86				1		1	1			
127	3392	weiblich	73	1	1					1	1		
128	4440	männlich	65					1		1	1		
129	84039	männlich	65	1	1				1	1			1
130	109573	männlich	58	1	1	1			1	1			
131	73432	männlich	73	1	1	1							
132	49466	männlich	72	1	1				1	1		1	
133	63119	männlich	64	1				1		1			
134	102815	weiblich	77							1			
135	23156	männlich	63					1	1				
136	4793	männlich	68							1			
137	78359	männlich	68						1				
138	78853	männlich	63	1	1			1	1	1			
139	48192	weiblich	70	1				1	1	1			
140	89612	männlich	52	1	1				1	1			
141	64599	männlich	47					1		1	1		
142	103540	männlich	61	1	1					1	1		
143	14125	männlich	65	1	1								
144	80679	männlich	74				1						
145	85468	männlich	77	1	1			1					
146	95388	männlich	64						1				
147	29850	weiblich	76	1	1					1			
148	9094	männlich	72					1	1				
149	100464	männlich	61							1			

Patientenangaben				Anzahl und Art der durchgeführten Untersuchung									
lfd. Nr.	Pat-code	Geschlecht	Alter	AP	PAS	D-PAS	HEA	CEA	Vim	Thr	TPA	DNA	SDS-PAGE
150	102014	männlich	61	1	1			1	1	1			
151	76513	männlich	60		1	1			1				

Tabelle 4: Anonymisierte Patientenangaben und Zuordnung der innerhalb dieser Studie durchgeführten enzymzytochemischen, immunzytochemischen sowie molekularbiologischen Untersuchungen.

3.1.2 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt.
Acrylamid	Serva, Heidelberg.
Aluminiumsulfat	Merck, Darmstadt.
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg.
Barbitalnatrium	Merck, Darmstadt.
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg.
Butanol	Merck, Darmstadt.
Chloroform	Merck, Darmstadt.
Diastase	Merck, Darmstadt.
Ethanol	CG Chemikalien, Hannover.
Eukitt	I. Hecht, Kiel.
Fast Garnet GBC	Sigma, Deisenhofen.
Formaldehyd	Merck, Darmstadt.
Giemsa-Lösung	Merck, Darmstadt; Art.-nr.: 9204
H ₂ O ₂	Aldrich, Steinheim.
Harnstoff	Fluka, Buchs/Schweiz.
HCl	Merck, Darmstadt.
Immersionsöl f. Lichtmikroskop	Merck, Darmstadt.
K ₂ S ₂ O ₅	Merck, Darmstadt.
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt;
Kaliumhexacyanoferrat II	Merck, Darmstadt.
Kernechtrot	Merck, Darmstadt.
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt.
L-Leucin-β-naphtyl-amid-hydrochlorid	Sigma, Deisenhofen.
2-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg.
Meiers-Hämalaun	Jürgens & Co, Bremen.
May-Grünwald-Lösung, konzentriert.	Merck, Darmstadt; Art.-nr.: 1424
Methanol	CG Chemikalien, Hannover.
NaOH	CG Chemikalien, Hannover.
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt.
Natriumnaphtylphosphat	Merck, Darmstadt; Art.-nr.: 6815.
Perjodsäure	Merck, Darmstadt.
Prestained SDS-PAGE-Standards, LR.	BioRad, München.
Bovines Serum Albumin	Serva, Heidelberg.
Schiff'sche Reagenz	Sigma, Deisenhofen.
TEMED	Serva, Heidelberg.
Tris-Puffer	DAKO, Hamburg; Code Nr.: S3001
Tween 20	Merck, Darmstadt.
Variaminblausalz	Fluka Chemie AG; Buchs.

3.1.3 Antikörper

Nachfolgend werden die in dieser Studie verwendeten Antikörper mit Spezifizierungs- und Herkunftsangaben aufgeführt. Unter Punkt 2.3 (Schrifttum, S. 17 ff.) ist bereits im Einzelnen auf die genannten monoklonalen Antikörper eingegangen worden.

Anti-Vimentin

Beschreibung: Monoklonaler Maus-Antikörper, liquid als Gewebekultur (Medium 1640, enthält fetales Kälberserum), gereinigt mit 0,05 M Tris/HCl, 15 mM NaN₃, pH 7,2.
Maus Ig Konzentration: 290 mg/l.
Isotyp: IgG₁, kappa.
Proteinkonzentration: 14,3 g/l.

Herkunft: DAKO A/S, Glostrup/Dänemark.

Klon: V9.

Anti-Human Epitheliales Antigen (HEA)

Beschreibung: Monoklonaler Maus-Antikörper, dialysiert gegen 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2, enthält 15 mM NaN₃.
Maus Ig-Konzentration: 235 mg/L.
Isotyp: IgG1, kappa.
Proteinkonzentration: 6,1 g/l.

Herkunft: DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg/Deutschland.

Klon: Ber-EP4.

Anti-Thrombomodulin

Beschreibung: Monoklonaler Maus-Antikörper, dialysiert gegen 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2, 15 mM Natriumazid.
Proteinkonzentration: 17,2 mg/ml (Lowry).
Maus-IgG Konzentration: 237 µg/ml.
Isotyp: IgG₁, kappa.

Herkunft: DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg/Deutschland.

Klon: 1009.

Anti-Carcino Embryonic Antigen

Beschreibung: Gereinigte Immunglobulinfraktion eines Kaninchen Anti-Human CEA-Antiserums.
Gelöst in. 0,1 M NaCl und 15 mM NaN₃.
Proteinkonzentration: 2,0 g/l.

Herkunft: DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg/Deutschland.

Klon: II-7.

Anti-Tissue Polypeptide Antigen (TPA)

Beschreibung: Monoklonaler Maus-Antikörper, dialysiert gegen 0,05 M Tris/HCl, pH 7,2, 15 mM Natriumazid.

Herkunft: Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach/Deutschland

Klon: B1.

Anti-Humanes Zytokeratin, 5/6

Beschreibung: Gereinigte Ascites-Immunglobulinfraktion, gelöst in 0,05 M Tris-HCl, pH 7,2, 15 mM Natriumazid und Carrier Proteine, Liquid.
Proteinkonzentration: 0,09 mg/ml (Lowry).
Maus-IgG Konzentration: 87 µg/ml.
Isotyp: IgG₁, kappa.

Herkunft: DAKO Corporation, Carpinteria, CA 93013 USA.

Anti-Human Mesothelial Cell (HBME-1)

Beschreibung: Monoklonaler Maus-Antikörper, liquid als Gewebekultur (enthält fetales Kälberserum), gereinigt 0,05 M Tris HCl, und 15 mM Natriumazid, pH, 7,2.
Proteinkonzentration: 9,4 mg/ml (Lowry).
Maus-IgM Konzentration: 337 µg/ml.
Isotyp: IgM, kappa.

Herkunft: DAKO Corporation, Carpinteria, CA 93013 USA.

3.1.4 Untersuchungsmaterial und Versuchsaufbau

Die Darstellung der Zytomorphologie, der Zytochemie und der Immunzytochemie stützt sich auf die Auswertung von insgesamt 151 Pleura-Probeexzisionen (PPE), Pleura-Punktaten (PP), Aszites-Punktaten (As), transbronchiale Biopsien (TbB) , Pericard- und Weichteil-Punktaten, die in der Zeit von Januar 1996 bis Juni 1999 am Institut für Zytologie in Hannover zytologisch untersucht und als maligne Pleurakarzinosen bewertet wurden. Unabhängig von den in der Routineuntersuchungen gestellten Diagnosen wurde das Patientenmaterial nochmals auf die zytomorphologische Kriterien (siehe auch Punkt 2.1, Schrifttum, S. 8 ff.)

hin überprüft. Das Material, welches nach Auswertung der zytomorphologischen Kriterien tatsächlich für ein malignes Mesotheliom sprach, wurde für die weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Studie heraus sortiert. Je nach Anzahl der von den Klinikern mitgesandten und noch verbliebenen, d.h. nicht für die Routineuntersuchung verwendeten, luftgetrockneten Ausstrichpräparate wurde das Material zytochemisch und immunzytochemisch gefärbt und anhand der unter Punkt 3.2.3.3 und 3.2.3.4 (siehe S. 47) aufgeführten Begutachungskriterien ausgewertet. Bei nicht eindeutigen Färberesultaten sind die zytochemischen und immunzytochemischen Färbungen wiederholt worden. Um die Sensitivitäten und Spezifitäten der zytopathologischen Untersuchungen und der zytochemischen sowie immunzytochemischen Reaktionen (siehe Punkt 1.1, Problemstellung, S. 4) berechnen zu können wurden die Ergebnisse mit den histopathologischen Enddiagnosen verglichen. Die genannten Befunde wurden am Institut für Pathologie/Deutsches Mesotheliomregister der Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum (Prof. Dr. med. K.-M. Müller) oder von einem Referenzpathologen parallel analysiert oder sind als anerkannte Mesotheliomfälle im Deutschen Mesotheliomregister gemeldet. Weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit sind am Institut für Pathologie des Nordstadtkrankenhauses in Hannover und im Labor des Bernward-Krankenhauses in Hildesheim durchgeführt worden.

Mit einer weiteren Versuchsreihe sollten die zytologischen Auswertungen, die histopathologisch nicht bestätigt und als „nicht maligne“ eingestuft wurden, mittels des DNA-zytometrischen Verfahrens überprüft werden. Ziel dieser Versuchsreihe ist es, den zytopathologisch diagnostizierten und in der histologischen Probe nicht vorhandenen Tumor zu bestätigen. Dazu wurden die zunächst nach Pappenheim gefärbten Ausstrichpräparate entfärbt und anschließend nach Feulgen gefärbt. Nach Durchführung der zytometrischen Untersuchungen wurden die Präparate anschließend wieder entfärbt und zur Archivierung original nach Pappenheim gefärbt.

Anhand zweier Fallbeispiele konnten wir eine elektrophoretische Auftrennungen der Proteine der Pleuraergüsse im SDS-PAGE und anschließendem Westernblot durchführen. Die immunogenen Proteine wurden mit jeweils einem Positivmarker (Tumormarker, die von Pleuramesotheliomen, jedoch nicht von Adenokarzinomen exprimiert werden) und jeweils einem Negativmarker (Tumormarker, die vor allem von Adenokarzinomen und nur selten von Pleuramesotheliomen exprimiert werden) dargestellt. Ziel dieser Versuchsreihe ist es, die

Antigene gelelektrophoretisch aufzutrennen und zu isolieren, um sie anschließend mittels monoklonaler Antikörper zu detektieren. Dieses Erstellen des Antigenprofils geschieht, um bei unterschiedlichen zyto- und histopathologischen Diagnosen (malignes Mesotheliom der Pleura versus sekundäre Pleurakarzinose) eine Aussage über die tatsächliche Histogenese des Tumors treffen zu können.

Die nachstehende Abbildung 8 zeigt eine Übersicht der soeben beschriebenen Versuchsanordnung.

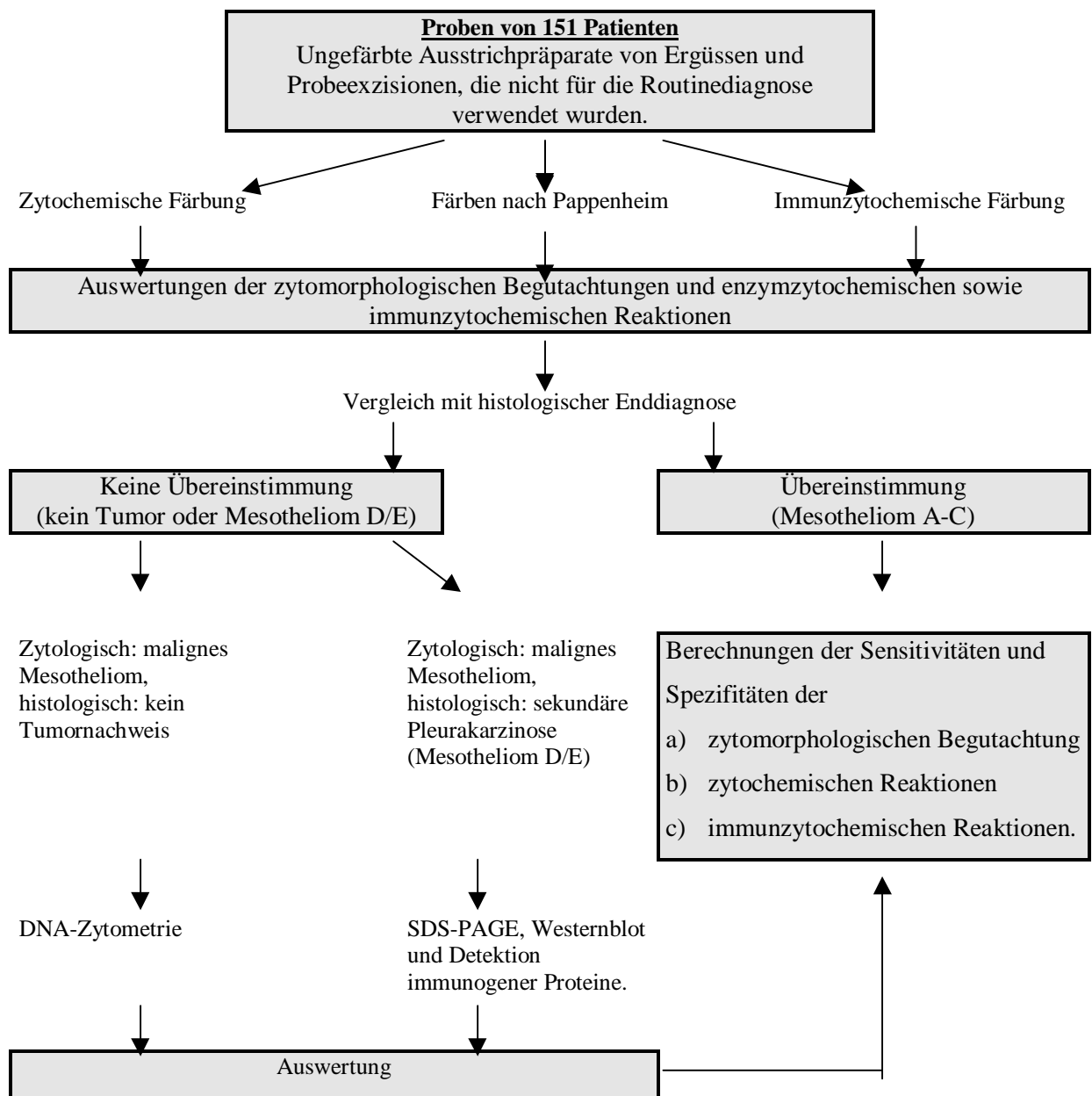


Abbildung 8: Versuchsanordnung

3.2 Methoden

3.2.1 Aufarbeitung des Materials

Die Materialaufarbeitung erfolgt in sechs Schritten, wobei die Schritte 1-5 vorab in den Kliniken erfolgen; Schritt 6 (Färbung des Materials) passiert bereits im Rahmen dieser Studie (siehe auch Abbildung 8, Versuchsanordnung) und wird deshalb als eigener Punkt aufgegriffen (Punkt 3.2.2 Färbungen).

1. Materialgewinnung
2. Ausstreichen bzw. Abtupfen
3. Fixation
4. Versand
5. Aufarbeitung
6. Färbung

Die Materialgewinnungsmethoden beschränken sich in dieser Arbeit auf die nachstehende Formen:

- Ergusspunktion (Aufarbeitung und Untersuchung als Sedimentausstrich oder Zytozentrifugenpräparate.
- Die Probeexzisionen als thorakoskopische Biopsien (Aufarbeitung und Untersuchung als Imprint-Zytologie.
- Die Probeexzision als Feinnadelbiopsie.

Das gewonnene Gewebstück wird vor der Fixation auf entfetteten Objektträgern sanft, unter leichtem Druck, möglichst von allen Seiten ausgestrichen bzw. abgetupft.

Die Feinnadelpunktate werden auf die Objektträger aufgespritzt und mit einem zweiten Objektträger ausgestrichen. Eine Anfertigung von 8-12 Ausstrichen ist empfehlenswert.

Die Fixation erfolgt in einem nicht zu feuchten Raum als Lufttrocknung. Die Feuchtfixation (Ethanol 70% [w/v] im Verhältnis 1:1) verändert die Oberflächenstruktur und die biochemische Zusammensetzung der Zelle, so dass eine zytochemische oder immunzytochemische Untersuchung der Zelle nicht mehr optimal gegeben ist. Für die

zytochemischen sowie immunzytochemischen Färbungen wurde aus diesem Grunde nur trockenfixiertes Material verwendet.

Der Versand der beschrifteten Objektträger erfolgt in den dafür vorgesehenen Objektträgerhülsen. Falls eine sofortige Aufarbeitung nicht möglich ist, werden 10-20 ml Flüssigkeit ohne Zusatz einer Fixationslösung versandt.

Die bei der Ergusspunktion gewonnene Flüssigkeit wird bei 2000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und vom Sediment werden 8-12 Ausstriche angefertigt, die nach luftgetrockneter Fixierung eingesandt werden. Es können auch Zytozentrifugen-Präparate angefertigt werden. Dazu wird die Flüssigkeit 10 Minuten lang bei 500 U/min zentrifugiert.

Falls eine Ergussgerinnung zu erwarten ist, kann dies durch Zugabe von EDTA (im Verhältnis 1:5) oder Heparin (0,3 cm Heparin auf 100 ml Flüssigkeit) verhindert werden.

3.2.2 Färbungen

Für die primäre zytologische Begutachtung wurden die Präparate in dieser Studie ausnahmslos nach Pappenheim (Punkt 3.2.2.1) gefärbt. Die zytochemischen Färbungen (Punkt 3.2.2.2) beschränken sich auf den Nachweis der alkalischen Phosphatase, die Periodic Acid Schiff-Reaktion mit und ohne Diastasevorbehandlung sowie die Leucinbehandlung und die Berliner-Blau Reaktion als Eisennachweis. Für die immunzytochemische Färbungen (Punkt 3.2.2.3) sind monoklonale Antikörper gegen folgende Antigene verwendet worden: Vimentin, Thrombomodulin, Carcino-Embryonic Antigen, Human-Epitheliales Antigen und das Tissue-Polypeptid-Antigen.

3.2.2.1 Pappenheim-Färbung

Pufferlösung:

2000 ml Aq. dest.

25 ml NaOH; 0,2 M

58 ml KH₂PO₄; 0,2 M

Puffer auf pH 6,8 einstellen

Färbung:

May-Grünwald-Lösung (konzentriert) 2 min.

Spülen in Pufferlösung 1 min.

Giemsa-Lösung (1:5 mit Puffer verdünnen und anschließend filtrieren.) 5 ½ min.

Zweimal spülen in Pufferlösung Je 1 min.

Lufttrocknen

Eindecken mit Eukitt

3.2.2.2 Zytochemie

Folgende enzymzytochemische Nachweisverfahren wurden anhand der beigefügten Ausstrichpräparate im Rahmen dieser Studie durchgeführt:

1. Alkalische Phosphatase (AP)
2. Periodic Acid Schiff Reaction mit (D-PAS) und ohne Diastase (PAS)
3. Leucin
4. Berliner-Blau Reaktion (Eisennachweis)

Alkalische Phosphatase (nach Rick, 1977)

Veronalnatriumpufferlösung:

20,618 g Barbitalnatrium auf 1000 ml Aq. dest. (0,1 m; pH 9,4).

Pufferlösung:

Natriumnaphtylphosphat, 17,5 mg und

Variaminblausalz B Konz., 35 mg

in 35ml Veronalnatriumpufferlösung lösen und filtrieren.

Alkalische Phosphatase-Reaktion:

Luftgetrocknete Ausstriche in Methanol-Formol-Gemisch (9:1) bei 4° C 30 sek. fixieren.

Spülen mit Leitungswasser und anschließend lufttrocknen.

Inkubieren in Pufferlösung bei 4° C. 60 min.

Spülen mit Leitungswasser und anschließend lufttrocknen.

Gegenfärben mit Meiers-Hämalaun. 12 min.

Bläuen mit fließendem Leitungswasser 10 min.

Eindecken mit Glyzeringelatine

Periodic Acid Schiff-Reaktion mit (D-PAS) und ohne Diastasevorbehandlung (PAS)

Diastasevorbehandlung:

1. Herstellen der Diastaselösung:

1 g Diastase in 100 ml 0,1 m Phosphatpuffer pH 6,8 lösen.

2. Inkubieren des Materials in der Diastaselösung:

bei 37° C für 60 min. inkubieren. Spülen mit Aq. dest.; PAS anschließen.

PAS-Reaktion:

Luftgetrocknete Ausstriche in Ethanol-Formol-Gemisch (9:1) fixieren.	5 min.
Spülen mit Aq. dest.	
Inkubieren in 0,5% iger Perjodsäure.	10 min.
Inkubieren in frisch angesetzttem SO ₂ -Wasser.	5 min.
Inkubieren in Schiff'sche Reagenz.	30 min.
Inkubieren in SO ₂ -Wasser.	5 min.
Spülen mit Leitungswasser.	10 min.
Gegenfärben mit Meiers-Hämalaun.	12 min.
Bläuen mit fließendem Leitungswasser und anschließend lufttrocknen.	
Eindecken mit Eukitt.	

Leucin-Amino-Peptidase (Wasastjerna)

Färbelösung:

17,5 ml 0,85% iger NaCl-Lösung
25,0 ml Acetatpuffer, pH 6,5
5,0 ml Aq. dest.
20,0 mg L-Leucin β -naphtyl-amid-hydrochlorid
25,0 mg Fast Garnet GBC

Leucin-Färbung:

Luftgetrocknete Ausstriche in Chloroform-Aceton (1:1) bei 4° C 3 min. fixieren.	
Spülen mit Leitungswasser und lufttrocknen.	
Inkubieren bei 37° C in Färbelösung.	1-4 h
Spülen mit Leitungswasser und lufttrocknen.	

Gegenfärben mit Mayers Hämalaun	12 min.
Bläuen in fließendem Leitungswasser.	10 min.
Eindecken mit Glyceringelatine.	

Berliner-Blau Färbung

Kernechtrotlösung:

5,0 g Aluminiumsulfat in 100 ml Aq. dest lösen und
0,1 g Kernechtrot hinzufügen.
Lösung erhitzen, aufkochen lassen und nach Erkalten filtrieren.

Kaliumhexacyanoferratlösung:

Lösung A: 2%iges Kaliumhexacyanoferrat II, wässrig
Lösung B: 0,2 N HCl
Lösung A und B im Verhältnis 1:1 zusammengeben.

Berliner-Blau Färbung:

Luftgetrocknete Ausstriche in 100% Methanol fixieren.	10 min.
Spülen in Aq. dest. und lufttrocknen.	
Inkubieren in Kaliumhexacyanoferratlösung bei 50° C.	20 min.
Wässern mit fließendem Leitungswasser.	20 min.
Spülen mit Aq. dest.	
Kernfärbung mit Kernechtrot.	5-10 min.
Spülen mit Aq. dest. und anschließend lufttrocknen.	
Eindecken mit Eukitt.	

3.2.2.3 Immunzytochemie

In allen 151 Fällen sind anhand der beigefügten Ausstrichpräparate nachfolgende immunzytochemische Nachweisverfahren im Rahmen dieser Studie durchgeführt worden. Einzelheiten und Spezifikationen dieser monoklonalen Antikörper sind bereits unter Punkt 2.3 (Schrifttum, S. 17 ff.) und unter Punkt 3.1.3 (Material und Methoden, S. 33 ff.) aufgeführt.

- Anti-Vimentin, Klon V9.
- Anti-Thrombomodulin, Klon 1009.
- Anti-Carcino Embryonic Antigen (Anti-CEA), Klon II-7.
- Anti-Human-Epithelial Antigen (Anti-HEA), Klon Ber-EP4.
- Anti-Tissue-Polypeptide Antigen (Anti-TPA), Klon B1.

Angewandt wurde das DAKO LSAB[®]2 System HRP, welches eine modifizierte Form der sogenannten labeled avidin-biotin (LAB)-Technik darstellt. In diesem Verfahren bildet der biotinylierte, sekundäre Antikörper einen Komplex mit den Peroxidase-konjugierten Streptavidin-Molekülen (*Guesdon et al., 1979*). Im Gegensatz zu dem avidin-biotin-complex (ABC)-Methode (*Hsu et al., 1981*) scheint die LAB/LSAB-Methode bis zu 8 mal sensitiver zu sein (*Giorno et al., 1984*).

Färbeverfahren:

1. Überschichten und inkubieren der luftgetrockneten Ausstriche mit 5 min. 3% igem H₂O₂ bei Raumtemperatur.
2. Spülen mit Tris-Puffer.
3. Überschichten und Inkubieren der Ausstrichpräparate mit dem 10 min. primären Antikörper bei Raumtemperatur.
4. Spülen mit Tris-Puffer.
5. Überschichten und Inkubieren der Ausstrichpräparate mit dem 10 min. biotinylierten, sekundären Antikörper bei Raumtemperatur.

6. Spülen mit Tris-Puffer.
7. Überschichten und inkubieren der Ausstrichpräparate mit 10 min.
Peroxidase-konjugiertem Streptavidin.
8. Spülen mit Tris-Puffer.
9. Überschichten und inkubieren der Ausstrichpräparate mit AEC 10 min.
(3-Amino-9-Ethyl-Carbazolsubstrat) bei Raumtemperatur.
10. Gegenfärben mit Mayers Hämatoxylin. 2-5 min.
11. Eintauchen der Ausstrichpräparate in 37mM Ammonium-Lösung 10 mal
(2,5 ml 15M Ammoniumhydroxid auf 1 l H₂O).
12. Spülen mit Aq. dest. 2-5 min.
13. Eindecken mit Kaisers Glyzerin Gelatine.

3.2.3 Begutachungskriterien

3.2.3.1 Zytopathologische Mesotheliom-Klassifikation

Die zytopathologische Beurteilung der gemusterten Präparate erfolgte mit Hilfe einer modifizierten Klasseneinteilung nach Papanicolaou (1928). Da jede Ergussbildung eine pathologische Veränderung darstellt, wird jeder gutartige Erguss mit der PAP-Klasse II bewertet. Eine artifizielle Blutung ohne zellulären Inhalt erhält die PAP-Klasse 0, zellarme Flüssigkeiten, die bei Thorakoskopien gewonnen wurden, werden mit der PAP-Klasse I beurteilt.

PAP 0	Keine Mesothelzellen, nur peripheres Blut.
PAP I	Zellarme Flüssigkeit, die bei einer Thorakoskopie gewonnen wurde.
PAP II	Alle gutartigen Ergüsse, unabhängig von der Zellzusammensetzung.
PAP III	Atypische Zellen. Hyperplasie mit Atypien.
PAP IVb	Vereinzelt Tumorzellen.
PAP V	Mehrere sichere Tumorzellen oder Tumorzellgruppen.

In Anlehnung an die WHO-Klassifikation (1981) wird bei den Befunden der PAP-Klasse IV und V, der histogenetische Tumortyp und der Differenzierungsgrad des Tumors bestimmt. Die Zuordnung des Differenzierungsgrades erfolgt nach Beurteilung der Kern/Plasma-Relation, der Zell- und Zellkernpolymorphie sowie der mitotischen Zellaktivität (Riede, 1993).

3.2.3.2 Histopathologische Mesotheliom-Klassifikation

Die Interpretation der vorliegenden pathologischen Gutachten des Deutschen Mesotheliomregisters in Bochum (Prof. Dr. med. Müller) und/oder der Referenzpathologen erfolgte nach dem Wertungsschema des Europäischen Mesotheliom-Panels zur Abgrenzung primärer und sekundärer bösartiger Pleuratumoren (Jones *et al.*, 1984). Danach werden folgende 5 Gruppen unterschieden:

- „*Mesotheliom A*“: Sicheres Mesotheliom. Kein Zweifel an der histologischen Diagnose.
- „*Mesotheliom B*“: Wahrscheinliches Mesotheliom. Die Zurückhaltung kann ihre Begründung in der mangelhaften Gewebsgröße, der schlechten Qualität und der mangelhaften Differenzierung finden, oder das Fehlen gewisser histologischer Details kann zu leichten Zweifeln Anlass geben.
- „*Mesotheliom C*“: Mögliches Mesotheliom. Die Diagnose kann nicht abgelehnt werden, aber es fehlen ausreichende Hinweise für eine positive Diagnose.
- „*Mesotheliom D*“: Wahrscheinlich kein Mesotheliom. Die Diagnose „Pleuramesotheliom“ ist zwar unwahrscheinlich, kann aber nicht absolut von der Hand gewiesen werden.
- „*Mesotheliom E*“: Sicher kein Mesotheliom. Die konkrete Diagnose eines anderen Tumors sollte angegeben werden.

3.2.3.3 Begutachungskriterien der zytochemischen Reaktionen

Die Auswertung der zytochemischen Farbreaktion wurde nach folgenden Kriterien, unter Überprüfung der Farblokalisation (diffus zytoplasmatisch, peripher membranös oder peripher fokal), bewertet:

Negativ (-)	Keine Reaktion.
Leicht positiv (+)	Weniger als 10% der Tumorzellen zeigen eine zytochemische Reaktion.
Mässig positiv (++)	10-50% aller Tumorzellen zeigen eine zytochemische Reaktion.
Stark positiv (+++)	Mehr als 50% aller Tumorzellen zeigen eine zytochemische Reaktion.

3.2.3.4 Begutachungskriterien der immunzytochemischen Reaktionen

Die Überprüfung der immunzytochemischen Reaktionen erfolgte anhand nachfolgender Kriterien. Um die Auswertung zu optimieren, wurden entsprechende Positivkontrollen (siehe Tabelle 3, S. 48) mitgefärbt und mit den für diese Studie relevanten Mesotheliomfällen verglichen.

1. Anteil der Positivzellen in Prozent

Negativ (-)	Keine Antikörperreaktion.
Leicht positiv (+)	Weniger als 10% der Tumorzellen zeigen eine Antikörperreaktion.
Mässig positiv (++)	10-50% aller Tumorzellen zeigen eine Antikörperreaktion.
Stark positiv (+++)	Mehr als 50% aller Tumorzellen zeigen eine Antikörperreaktion.

2. Farbeintensität

Negativ (-)	Keine Farbreaktion.
Leicht positiv (+)	Blass-rote Farbreaktion.
Mässig positiv (++)	Deutlich rot bis leicht braune Farbreaktion.
Stark positiv (+++)	Intensive rot-braune Farbreaktion.

	Antikörper	Verdünnung	Positivkontrolle
•	Anti-HEA (Klon Ber-EP4)	1:10	Bronchialepithelien
•	Anti-CEA	1:100	Kolonkarzinom
•	Anti-Thrombomodulin (Klon 1009)	1:100	
•	Anti-Vimentin (KlonV9)	1:10	Kapillarendothelien
•	Anti-TPA (Klon B1)	1:100	Bronchialepithelien

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper und die entsprechenden Positivkontrollen.

3.2.4 DNA-Zytometrie

Feulgen-Färbung:

5N HCl	50 min. bei 22 °C.
Aq. dest.	2 min.
Aq. dest.	2 min.
Schiff'sche Reagenz	60 min. im Dunkeln.
Sulfid-Lösung	3 min.
Aq. dest.	2 min.
Ethanol 50 %	30 s
Ethanol 70 %	30 s
Ethanol 80 %	30 s
Ethanol 95 %	30s
Xylol : Ethanol	30 s

Die Sulfid-Lösung muss täglich frisch angesetzt werden:

1 N HCl	20 ml
K ₂ S ₂ O ₅	1 g
Aq. dest.	360 ml

3.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Ziel dieser Versuchsreihe ist es, Antigene der malignen Pleuraergüsse gelelektrophoretisch aufzutrennen und zu isolieren, um anschließend die immunogenen Proteine mit monoklonalen Antikörpern darzustellen. Dieses Erstellen des Antigenprofils geschieht, um bei nicht übereinstimmenden zyto- und histopathologische Diagnosen (malignes Mesotheliom der Pleura versus sekundäre Pleurakarzinose) eine Aussage über die tatsächliche Histogenese des Tumors treffen zu können (siehe auch Abbildung 8, S. 37).

3.2.5.1 Trenn- und Sammelgel:

a) Trenngel

30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	5,90 ml
10%ige SDS-Lösung	0,17 ml
1,5 M Tris-Lösung, pH 8,8	4,10 ml
30%ige Harnstofflösung	1,80 ml
Aq. tridest.	5,60 ml
Katalysatoren:	
10%ige Ammoniumpersulfatlösung	60,00 µl
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	9,00 µl

Die Trenngellösung wird mit einer Glaspipette in die Gelkassette pipettiert und mit n-Butanol überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 1 Stunde wird das Butanol abgeschüttet und das Gel mit Aq. dest. gespült. Auf das Trenngel wird ein „Overlay“-Puffer gefüllt, der bis auf die Acrylamidlösung und die Katalysatoren die gleiche Zusammensetzung wie das Trenngel hat. Das Gel wird über Nacht polymerisiert.

b) Sammelgel

30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	1,20 ml
10%ige SDS-Lösung	0,10 ml
0,5 M Tris-Lösung, pH 6,8	2,50 ml
30%ige Harnstofflösung	1,00 ml

Katalysatoren:	
TEMED	5,00 μ l
10%ige Ammoniumpersulfatlösung	100,0 μ l

Der „Overlay“-Puffer wird abgegossen und das Sammelgel aufgeschichtet. In das noch nicht polymerisierte Gel wird ein 1-Kanal-Kamm eingesetzt.

3.2.5.2 Proteinbestimmung (Bradford, 1976)

Um die Proteine der Pleuraergüsse elektrophoretisch auftrennen zu können, wird die Proteinkonzentration bestimmt und auf einem Wert von 1 μ g/ μ l eingestellt.

Um den Proteingehalt bestimmen zu können, muss vorab eine Eichgerade mit bekannten Proteinkonzentration erstellt werden. Dazu wird eine BSA (Bovines Serum Albumin)-Stammlösung im Spektralphotometer bei 280 nm gegen Aq. dest. gemessen. Die Extinktion soll dabei einen Wert von 0,7 annehmen. In einer Verdünnungsreihe der BSA-Stammlösung (siehe auch Tabelle 6) werden anschließend die Proteinstandards angesetzt.

BSA-Stammlösung (μl)	Aq. dest. (μl)	Endkonzentration (μg/ml)
5	995	5
10	990	10
20	980	20
30	970	30
40	960	40
60	940	60
80	920	80
100	900	100

Tabelle 6: Verdünnungsreihe der BSA-Stammlösung.

Zu 100 µl dieser Proteinstandards wird jeweils 1 ml Bradford-Reagenz gegeben, die Lösung gut durchmischt und für 3 min. inkubiert. Die Extinktion dieser Standards wird im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen den Leerwert (100µl PBS und 1 ml Bradford) gemessen. Die Extinktionswerte werden gegen die entsprechenden Proteinkonzentration aufgetragen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Pleuraergüsse erfolgt nach Probenaufbereitung (siehe Punkt 3.2.5.3).

3.2.5.3 Probenaufbereitung

Die Pleuraergüsse werden jeweils a` 1 ml proportioniert und auf eine Proteinkonzentration von 1 µg Protein/µl mit Spaltpuffer eingestellt.

Die Durchführung erfolgt nach folgender Methode:

Zentrifugieren der Proben.	14000 Upm(16000g); 4°C; 12 min.
Überstand absaugen.	
Waschen mit PBS.	
Vorgang 1-3 2mal wiederholen.	

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wird das Pellet anschließend in 100 µl PBS gelöst und entsprechend weiterbehandelt (siehe Proteinbestimmung). Die restlichen Proben für die Auftrennung werden mit Spaltpuffer auf eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt.

Proben kochen.	5 min. bei 100°C.
----------------	-------------------

3.2.5.4 Auftragen der Probe und Lauf der Elektrophorese

Die aufbereiteten Proben werden mit einer Mikroliterspritze (Hamilton) aufgetragen. Alle Geltaschen werden mit 25 µl Probenvolumen beschickt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA und Kühlung der Gele auf 15 °C. Dauer der Auftrennung: ca. 4 bis 5 Stunden.

3.2.5.5 Auswertung

Um die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wird in jedem Gel ein Molekulargewichtsmarker (BioRad: Prestained SDS-PAGE-Standards, Low Range) mitgeführt. Anhand der bekannten Molekulargewichte der Markerbanden und deren Laufstrecke im Gel kann eine Eichkurve erstellt werden, die eine lineare Abhängigkeit zwischen dem reziproken Wert der Laufstrecke des Proteins und dem Molekulargewicht der Markerproteine aufweist. Aus dieser Eichkurve können die Molekulargewichte der unbekannt Proteine bestimmt werden. Die Einstellung der Eichkurve und die Berechnung der Molekulargewichte werden mit dem Programm „Fragments“ (Jürgen Hermans, Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt. Der Algorithmus dieses Programms beruht auf der oben genannten mathematischen Beziehung.

Der Molekulargewichtsmarker setzt sich aus den folgenden Proteinen zusammen:

Phosphorylase B	101,0 kDa
Bovines Serum Albumin	83,0 kDa
Ovalbumin	50,6 kDa
Carboanhydrase	35,5 kDa
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	29,1 kDa
Lysozym	20,9 kDa

3.2.5.6 Westernblotting (Towbin et al. 1979, Burnett 1981)

Die Durchführung des Westernblots erfolgt in Anlehnung an die Methode von *Towbin et al. (1979) und Burnett (1981)*.

Im Westernblot werden die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf NC-Filter übertragen und anschließend mittels monoklonaler Antikörper detektiert. Für diese Nachweismethode wird ein sekundäres, an Peroxidase gekoppeltes Antiserum gebraucht, das an den primären Antikörper bindet. Das Enzym Peroxidase reagiert dann mit dem im Substrat enthaltenem H₂O₂.

Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf NC-Filter:

Die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine werden im Westernblot vom Gel auf ein Nitrocellulose-Filter (Schleicher und Schüll, Porengröße 0,45 µm) übertragen. Für den Transfer wird eine Nass-Blot-Kammer und ein dazugehöriges Steuergerät verwendet.

Um Luftblasen, die den Transfer stören können, zu vermeiden, erfolgt der Zusammenbau der Blotkassette in Towbin-Puffer. Die Abbildung 9 zeigt den Aufbau der Blotkassette und die Ausrichtung im elektrischen Feld in der Blotkammer. Die Übertragung der Proteine wird in einem nassen Transfersystem durchgeführt. Blotkammer und Blotkassette wird mit Towbin-Puffer gefüllt. Bei einer angelegten Stromstärke von 1 A dauert der Transfer ca. 1,5 Stunden.

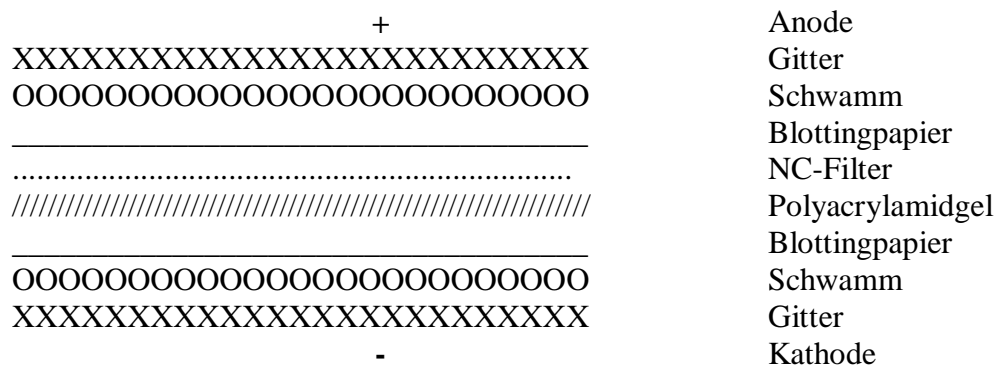


Abbildung 9: Aufbau der Blotkassette und Ausrichtung im elektrischen Feld.

Nachweis immunogener Proteine:

Zur Detektion immunogener Proteine werden die entsprechenden primären Tumormarker und sekundären Antiseren in der jeweiligen Verdünnung (siehe auch Tabelle 5, S.48) eingesetzt.

Dazu werden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

Blockieren unspezif. Bindungsstellen auf dem NC-Filter mit BSA (3% ig).	Über Nacht bei 4 °C.
Waschen mit PBS/Tween.	3 x 15 min.
Inkubation mit dem primären Antikörper.	3 h
Waschen mit PBS/Tween.	3 x 15 min.
Inkubation mit dem sekundären Antiserum.	2 h
Waschen mit PBS.	3 x 15 min.
Entwickeln mit Substratlösung.	5-10 min.
Abstoppen mit Leitungswasser.	30 s
Trocknen mit Filterpapier.	

Die Berechnung der Molekulargewichte erfolgt wie unter Punkt 3.2.5.5 bereits beschrieben.

4. Ergebnisse

4.1 Personenbezogene Daten

Alters- und Geschlechtsverteilung der Patientenkollektive:

Der besseren Übersicht wegen erfolgt der Vergleich der zytopathologischen, einschließlich der zytochemischen und immunzytochemischen Reaktionen und den histopathologischen Gutachten der Referenzpathologen (siehe Punkt 3.1.4 „Untersuchungsmaterial und Versuchsaufbau“, S. 35 ff.) in dem die Patienten in nachfolgenden Gruppen eingeteilt werden:

Patientenkollektiv A:

Gesamtkollektiv aller Patienten (n = 151) mit zytopathologisch diagnostiziertem, malignem Pleuramesotheliom.

Patientenkollektiv B:

Patientenkollektiv aller Patienten, deren zytopathologische Diagnose im Sinne eines malignen Mesothelioms der Pleura durch das histopathologische Gutachten bestätigt werden konnte (n = 107).

Im Patientenkollektiv A sind 18 (11,92%) Frauen und 133 (88,08%) Männer. Insgesamt konnten durch den Vergleich mit den histopathologischen Gutachten 107 von 151 zytopathologisch getroffene Mesotheliomdiagnosen bestätigt werden (Patientenkollektiv B); die letztgenannte Gruppe umfasst dabei 101 Männer (94,39 %) und 6 Frauen (5,60 %). Deutlich wird bei beiden Patientenkollektiven der hohe Anteil des männlichen Geschlechts an dieser malignen Erkrankung.

Die nachstehende Abbildung 10 (S. 56) zeigt die Altersverteilung des Patientenkollektivs A, zum Zeitpunkt der zytopathologischen Diagnosenstellung. Die Abbildung umfasst beide Geschlechter. Der jüngste Patient ist zum besagten Zeitpunkt 37 Jahre, der älteste Patient 88 Jahre alt. Der Mittelwert beträgt 65,48 (\pm 10,11) Jahre, der Median liegt bei 66 Jahren. Das mittlere Alter des weiblichen Anteils in diesem Kollektiv beträgt 68,22 (\pm 14,49) Jahre, der Median liegt bei 71 Jahren. Der Altersmedian des Patientenkollektivs B (107/151) liegt ebenfalls bei 66 Jahren. Der Mittelwert beträgt 65,58 (\pm 10,23) Jahre.

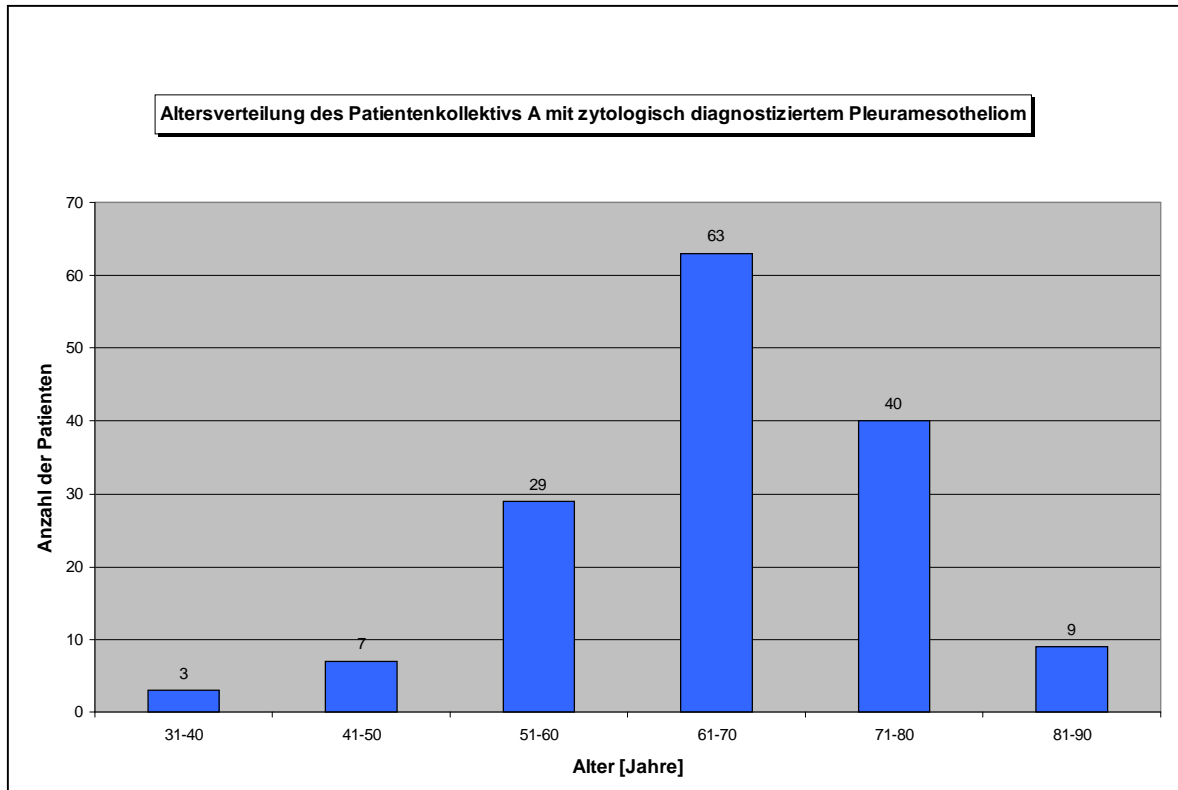


Abbildung 10:

Altersverteilung des Patientenkollektivs A ($n = 151$). Die Abbildung umfasst beide Geschlechter.

4.2 Materialbezogene Daten

Tabelle 7 auf Seite 57 zeigt die zahlenmässige Verteilung des im Rahmen dieser Studie zytologisch untersuchten Materials. Von insgesamt 151 Patienten lagen für diese Studie ausschließlich 78 Pleuraergüsse in Form von Pleura-Punktaten (51,66 %) vor. Dagegen wurden 14 mal Pleura-Probeexzisionen (9,27 %) untersucht. Bei 46 Patienten (30,46 %) waren sowohl Pleura-Probeexzisionen als auch Pleura-Punktate vorhanden. Weiterhin wurden auch 6 Aszites-Punktate (3,97 %), 2 transbronchiale Biopsien (1,32 %), 3 Weichteilpunktate (1,99 %) und 2 Pericard-Punktate (1,32 %) untersucht.

Material	Anzahl	[%]
Pleura-Punktate (PP)	n = 78	51,66
Pleura-Probeexzisionen (PPE)	n = 14	9,27
Pleura-Punktate und Pleura-Exzisionen	n = 46	30,46
Aszites-Punktate (AsP)	n = 6	3,97
Transbronchiale Biopsien (TbB)	n = 2	1,32
Pericard-Punktate (PericP)	n = 2	1,32
Weichteil-Punktate (WP)	n = 3	1,99
Insgesamt	n = 151	100

*Tabelle 7:
Zahlenmässige Verteilung des zytologisch untersuchten Materials.*

4.3 Zytomorphologische Befunde

4.3.1 Wachstumstypen und Lokalisation der Gewebeproben

Von den zytologisch diagnostizierten Mesotheliomen (Patientenkollektiv A; n=151) zeigten 124 (82,12%) ein rein epitheliales (syn.: adenomatöses) Wachstumsmuster. 42 dieser epithelialer Tumoren konnten exakter differenziert werden. Danach wiesen 30 (19,87%) dieser Mesotheliome eine endotheliale Differenzierung und 12 (7,95%) eine carcinomatöse Differenzierung auf.

12 (7,95%) aller untersuchten Mesotheliome zeigten ein biphasisches, 4 (2,66%) zeigten ein fibromatöses Wachstumsmuster. In einem Fall wurde ein biphasisch/fibromatöses Mesotheliom diagnostiziert, wobei beide Tumorkomponenten nahezu gleich stark vertreten waren. In 10 Fällen (6,62%) konnte keine Untergruppierung vorgenommen werden.

Wie in Tabelle 7 aufgeführt, lagen bei 78 Patienten nur Pleura-Punktate (Ergüsse) als Untersuchungsmaterial vor. In 43 Fällen (55,13%) wurde ein epitheliales Mesotheliom ohne weitere Differenzierung diagnostiziert. 20 Mesotheliome (25,64%) gehörten in die Untergruppe der endothelialen, 7 (8,97%) in die Untergruppe der carcinomatösen Mesotheliome. Obwohl der Anteil der Patienten mit epitheliales Mesotheliom und endothelialer Differenzierung sehr hoch ist (n = 30), konnte diese Diagnose in keiner Pleuraexzision, sondern immer nur in Verbindung mit einem Pleura-Punktat gestellt werden.

Insgesamt 2 mal (2,56%) wurde anhand der Pleura-Punktaten ein biphasisches Mesotheliom diagnostiziert, in keinem Fall ein sarkomatöses Mesotheliom. In 5 Proben (6,41%) konnten keine Angaben zum Wachstumsmuster gemacht werden. Ein Pleuraerguss wies ein Mesotheliom mit einer biphasisch/fibromatöser Differenzierung auf. Wie bereits erwähnt, waren beide Tumorkomponenten gleichmässig ausgeprägt.

Bei 14 Patienten lagen ausschliesslich Probeexzisionen der Pleura als Untersuchungsmaterial vor (siehe Tabelle 7, S. 57). In 4 Fällen (28,57%) wurde ein epitheliales Mesotheliom ohne weitere Differenzierung diagnostiziert. In 2 Fällen (14,29 %) wurde ein epitheliales Mesotheliom mit einer carcinomatösen Differenzierung erfasst. Insgesamt 4 mal (28,57%) wurde anhand der Probeexzisionen ein biphasisches Mesotheliom diagnostiziert, in 2 Fällen (14,29%) ein sarkomatöses Mesotheliom. In 2 (14,29%) von 14 Probeexzisionen konnte zum Wachstumsmuster keine Angaben gemacht werden.

Wie aus Tabelle 7 zu entnehmen ist, lagen bei 46 Patienten sowohl Pleura-Punktate (Ergüsse) als auch Probeexzisionen der Pleura als Untersuchungsmaterial vor. In 28 Fällen (60,87%) wurde ein epitheliales Mesotheliom ohne weitere Differenzierung nachgewiesen. 8 Mesotheliome (17,39%) gehörten in die Untergruppe der endothelialen, 2 (4,35%) in die Untergruppe der carcinomatösen Mesotheliome. Insgesamt 5 mal (10,87%) konnte anhand der Probeexzisionen und der Pleura-Punktate ein biphasisches Mesotheliom diagnostiziert werden, in 2 (4,35%) Fällen ein fibromatöses Mesotheliom. Nur in einem Befund konnten keine Angaben zum Wachstumsmuster angegeben werden.

Von 3 untersuchten Weichteil-Punktaten der Thoraxwand wurde 2 mal ein epitheliales Mesotheliom nachgewiesen, ohne Angaben über das Wachstumsmuster machen zu können. Ein Mesotheliom zeigte ein biphasisches Wachstumsmuster auf.

Von den 6 vorliegenden Aszites-Punktaten wurde in 2 Fällen ein epitheliales Mesotheliom ohne weitere Differenzierungsangaben diagnostiziert. 2 weitere epitheliale Mesotheliome wiesen ein endotheliales Wachstumsmuster auf. Bei weiteren 2 Mesotheliomen konnten keine Angaben zum Wachstumsmuster gemacht werden.

Beide Pericardergüsse zeigten jeweils ein epitheliales Mesotheliom. In einem Fall konnte keine weitere Untergruppierung vorgenommen werden, in dem anderen vorliegenden Fall wies das Mesotheliom eine carcinomatöse Differenzierung auf.

Beide transbronchialen Biopsien zeigten jeweils ein epitheliales Mesotheliom. Eine Angabe zur Differenzierung konnte auch hier nicht vorgenommen werden.

Nachstehende Tabelle 8 (Ergebnisse, S. 60) zeigt eine Gesamtübersicht über das im Rahmen dieser Studie untersuchte Material im Patientenkollektiv A (siehe auch Seite 55) in Abhängigkeit der getroffenen zytologischen Diagnosen im Sinne eines malignen Mesothelioms mit Angaben über Differenzierung und Wachstumstyp. In Abbildung 11 (S. 61) ist die Abhängigkeit noch einmal graphisch dargestellt.

Zytopathologische Diagnosen im Patientenkollektiv A	PPE	PP	PPE / PP	WP	As	Peric-P	TbB	Anzahl der gestellten Diagnosen
Epitheliales Mesotheliom <i>(ohne weitere Differenzierung)</i>	4	43	28	2	2	1	2	82
Epitheliales Mesotheliom <i>Carcinomatöse Differenzierung</i>	2	7	2	0	0	1	0	12
Epitheliales Mesotheliom <i>Endotheliale Differenzierung</i>	0	20	8	0	2	0	0	30
Biphasisches Mesotheliom	4	2	5	1	0	0	0	12
Fibromatöses Mesotheliom	2	0	2	0	0	0	0	4
Biphasisches/Fibromatöses Mesotheliom	0	1	0	0	0	0	0	1
Keine Angaben	2	5	1	0	2	0	0	10
Summe der untersuchten Proben	14	78	46	3	6	2	2	n = 151

Tabelle 8:

Anzahl und Differenzierung der Pleuramesotheliome im Patientenkollektiv A in Abhängigkeit des Materials. PPE=Pleura-Probeexzision, PP=Pleura-Punktat, WP=Weichteil-Punktat, As=Aszites-Punktat, Peric-P=Pericard-Punktat, TbB=transbronchiale Biopsien.

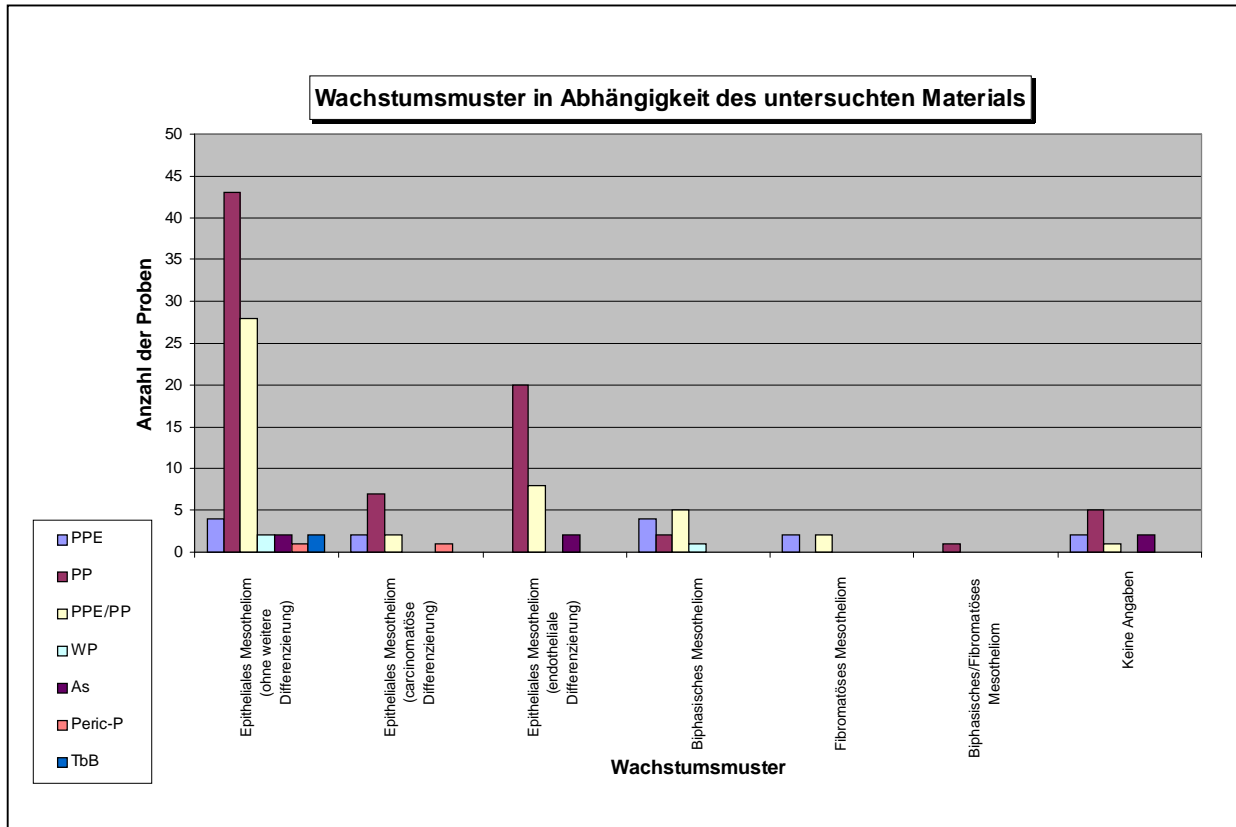


Abbildung 11:

Das Wachstumsmuster der zytologisch diagnostizierten Mesotheliome (Patientenkollektiv A) in Abhängigkeit des untersuchten Materials. PPE=Pleura-Probeexzision, PP=Pleura-Punktat, WP=Weichteil-Punktat, As=Aszites-Punktat, Peric-P=Pericard-Punktat, TbB=transbronchiale Biopsien.

4.3.2 Wachstumstyp und Patientenalter

Eine Abhängigkeit zwischen dem Patientenalter und des diagnostizierten Wachstumstyp im Patientenkollektiv A aufzuzeigen, ist aufgrund der einerseits hohen Anzahl von epithelialen Pleuramesotheliomen und andererseits sehr geringen Anzahl von biphasischen bzw. fibromatösen Mesotheliomen der Pleura nur bedingt möglich. Der Mittelwert des Patientenalters mit einem diagnostizierten epithelialen Pleuramesotheliom beträgt 64,85 (± 10,09) Jahre, der Median beträgt 65,5. Der Mittelwert des Patientenalters mit einem diagnostizierten biphasischen Pleuramesotheliom beträgt 66,3 (± 5,79) Jahre, der Median beträgt 64,5. Der Mittelwert des Patientenalters mit einem diagnostizierten fibromatösen Pleuramesotheliom beträgt 72,5 (± 6,19) Jahre, der Median beträgt 74.

4.4 Zytochemische Befunde

4.4.1 Alkalische Phosphatase

An insgesamt 87 Fällen des Patientenkollektivs A (n = 151) führten wir einen zytochemischen Nachweis der alkalischen Phosphatase durch (57,62%). 86 zytologisch diagnostizierte Mesotheliome zeigten dabei AP-negatives Material (98,85%). Die Vergleich mit den histopathologischen Enddiagnosen ergaben folgende Ergebnisse: 31 der zytologisch diagnostizierten und AP-negativen Mesotheliome wurden als Mesotheliom A bewertet (36,05%), 34 als Mesotheliom B (39,53%), 1 als Mesotheliom C (1,16%), 5 als Mesotheliom D (5,81%), 9 als Mesotheliom E (10,47%) und in 6 Fällen (6,98%) wurde kein tumoröser Prozess diagnostiziert. Insgesamt wurde die zytologisch diagnostizierten Mesotheliome und die AP-negativen Reaktionen in 66 Fällen (76,74%) bestätigt (Anzahl der Mesotheliome A-C). 14 mal (16,28%) konnte die zytologische Diagnose „Pleuramesotheliom“ nicht bestätigt werden (Anzahl der Mesotheliome D und E), wobei in 5 Fällen ein Pleuramesotheliom zwar unwahrscheinlich ist, jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann (Mesotheliom D). Der Nachweis der alkalischen Phosphatase bei den eben erwähnten und histopathologisch nicht bestätigten 14 Mesotheliome der Pleura (Mesotheliom D und E) fiel bei allen Proben negativ aus. Dieses ist jedoch bei Vorliegen einer sekundäre Pleurakarzinose eher nicht zu erwarten. In einem einzigen Fall (n = 87) zeigte sich eine stark positive AP-Reaktion (1,15%). Obwohl der Nachweis der alkalischen Phosphatase bei dieser Probe positiv ausfiel und dieses bei Vorliegen eines Mesothelioms der Pleura nicht zu erwarten ist, wurde aufgrund der Begutachtung der zytomorphologischen Kriterien auf ein malignes Mesotheliom entschieden. Auch in der Routinediagnostik am Institut für Zytologie in Hannover ist dieser Fall als malignes Mesotheliom befundet worden. Tatsächlich wurde dieses Mesotheliom von einem Referenzpathologen bestätigt, der Patient ist im Deutschen Mesotheliomregister in Bochum gemeldet. Die nachstehende Abbildung 12 (S. 63) zeigt die Nachweise der alkalischen Phosphatase im Patientenkollektiv A (87/151) im Vergleich mit den histopathologischen Enddiagnosen in graphischer Form.

Die Positivkontrollen, 20 histologisch bestätigte, primäre Adenokarzinome des Bronchus, zeigten in 17 Fällen positive AP-Reaktionen (85,0 %).

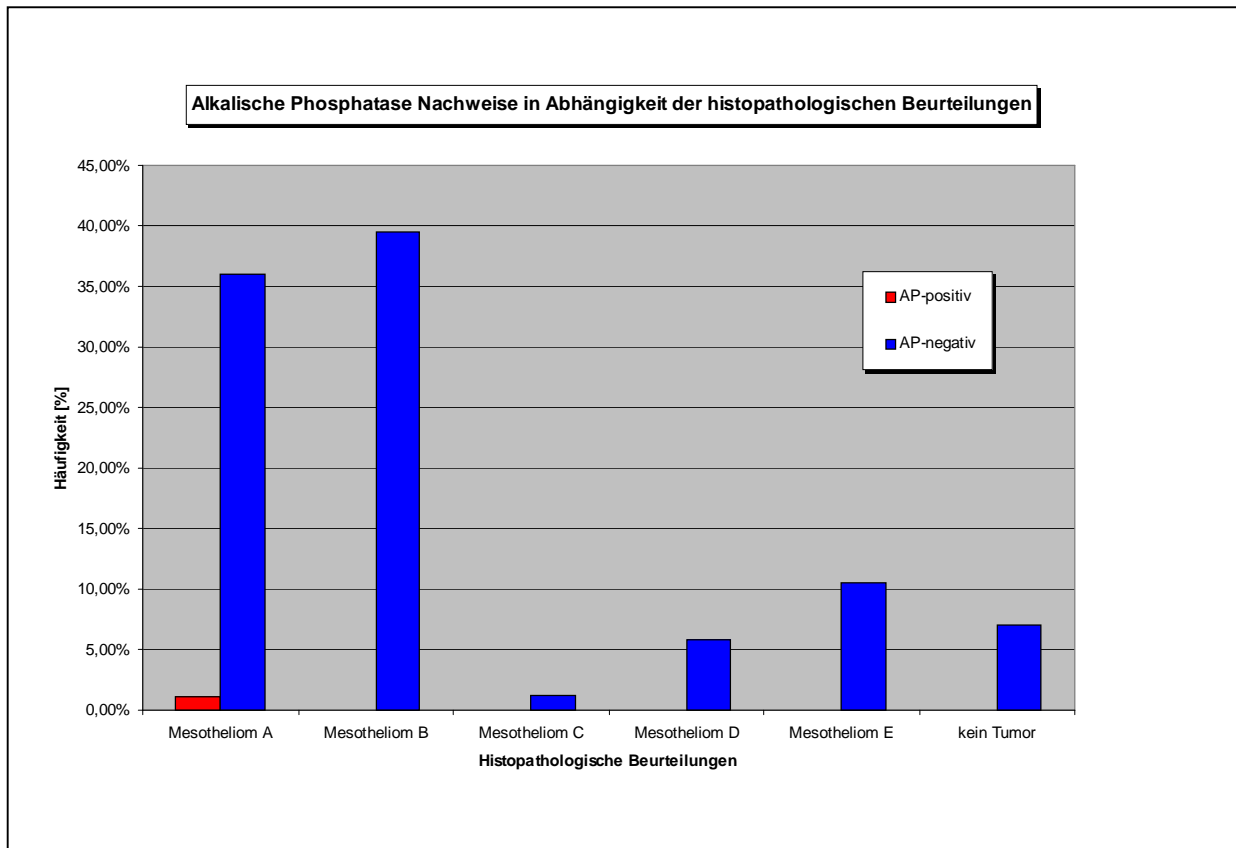


Abbildung 12:

Nachweisreaktionen der alkalischen Phosphatase im Patientenkollektiv A in Abhängigkeit der histopathologischen Enddiagnosen.

4.4.2 Periodic Acid Schiff Reaction (PAS)

Insgesamt wurden bei 75 zytologisch diagnostizierten Mesotheliomen im Patientenkollektiv A (49,67 %; n= 151) eine zytochemische PAS-Reaktion durchgeführt. 32 (42,67 %) zeigten eine stark positive Reaktion, 31 (41,33 %) eine mässig positive, 5 (6,67 %) eine leicht positive und 7 (9,33 %) eine negative Reaktion (siehe auch Tabelle 9 und Abbildung 13; S. 64). In Abbildung 14 (S. 65) ist bei einem epithelialem Mesotheliom deutlich der intrazytoplasmatische, feingranuläre Glykogen nachweis zu erkennen (B) während bei dem abgelichteten, primären Adenokarzinom des Bronchus die Schleimvakuolen PAS-positiv reagiert haben (A).

Histopathologische Beurteilung	Zytochemische PAS-Reaktionen				Anzahl n
	Negative Reaktion	+	++	+++	
Mesotheliom A	1	2	8	19	30
Mesotheliom B	4	1	14	8	27
Mesotheliom C	1	0	1	1	3
Mesotheliom D	1	0	1	0	2
Mesotheliom E	0	1	4	2	7
Kein Tumor	0	1	3	2	6
Summe der untersuchten Proben	7	5	31	32	75

Tabelle 9:

Zytochemische PAS-Reaktionen im Patientenkollektiv A in Abhängigkeit der histopathologischen Beurteilungen.

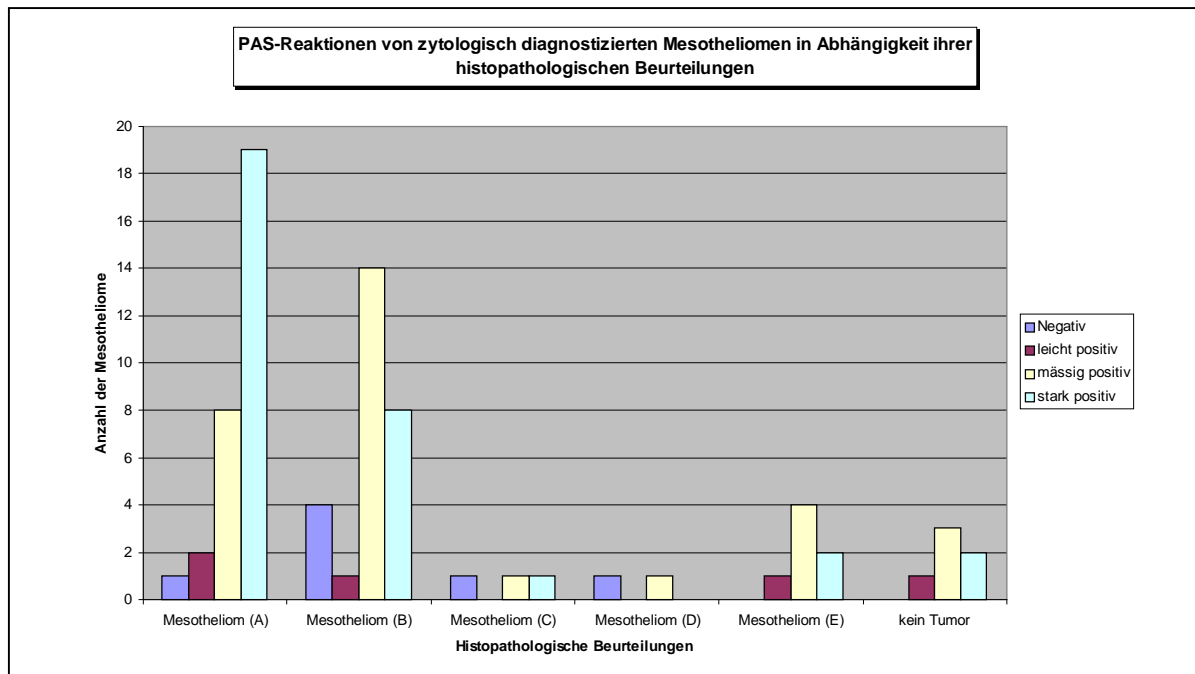


Abbildung 13:

Zytochemische PAS-Reaktionen zytologisch diagnostizierter Mesotheliome im Patientenkollektiv A in Abhängigkeit ihrer histopathologischen Beurteilung.

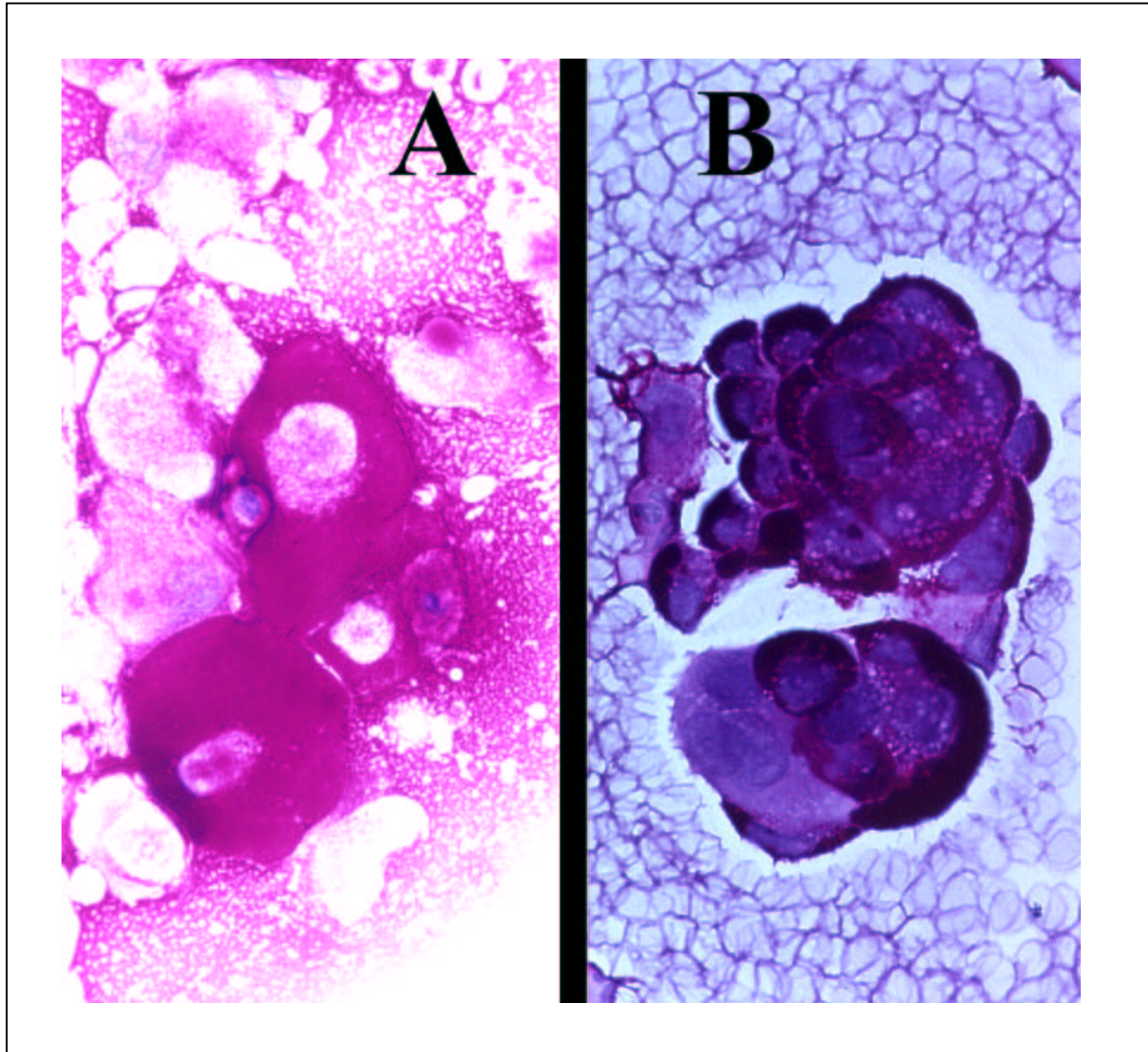


Abbildung 14: Positive PAS-Reaktionen (Olympus-Ölimmersion 60).

A: Nachweis von Schleimvakuolen bei einem primären Adenokarzinom der Lunge.

B: Nachweis von feingranulärem Glykogen bei einem epithelialen Pleuramesotheliom.

In 42 der genannten 75 Fälle (Patientenkollektiv A, n = 151) wurde eine PAS-Reaktion mit Diastasevorbehandlung durchgeführt. 88,06 % (37/42) aller Mesotheliome zeigten nach einer Diastasevorbehandlung PAS-negatives Material. Das intrazytoplasmatische, PAS-positive Glykogen konnte somit durch eine Diastasevorbehandlung reduziert werden. In einem Fall ergab die D-PAS Reaktion ein leicht positives (2,38 %), in drei Fällen ein mässig positives (7,14 %) und in einem Fall (2,38 %) ein stark positives Ergebnis (siehe auch Tabelle 10 und Abbildung 15, S. 66).

PAS-Reaktion	D-PAS-Reaktionen				
	Negative Reaktion	+	++	+++	Anzahl n
Nicht vorhanden	11	1	3	1	16
Keine Reaktion	3	0	0	0	3
+	1	0	0	0	1
++	10	0	0	0	10
+++	12	0	0	0	12
Summe der untersuchten Proben	37	1	3	1	42

Tabelle 10:

Vergleich zytochemischer PAS-Reaktionen mit und ohne Diastasevorbehandlung im Patientenkollektiv A.

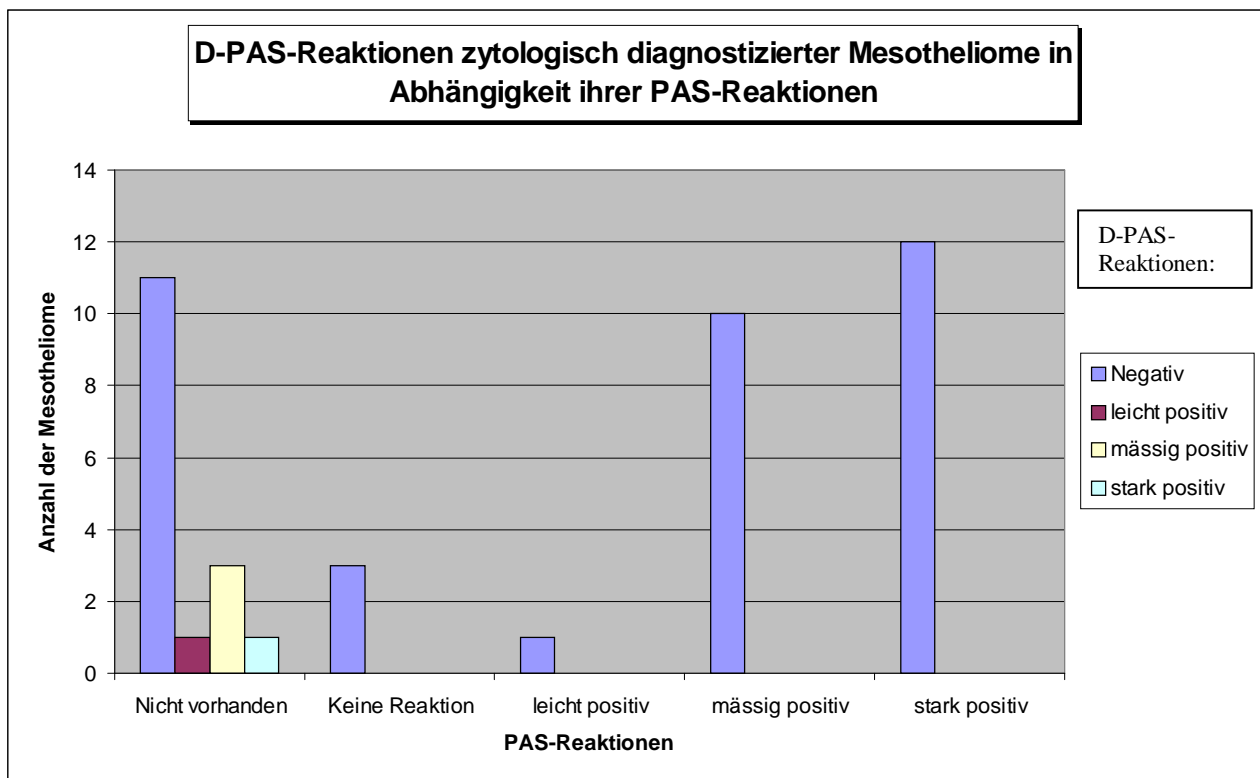


Abbildung 15: D-PAS-Reaktionen in Abhängigkeit ihrer PAS-Reaktionen. Die blauen Balken stellen die D-PAS-negativen Reaktionen dar, während auf der X-Achse die dazugehörige PAS-Reaktion dargestellt ist. Es liegen 11 negative D-PAS-Reaktionen vor bei denen die dazugehörige PAS-Reaktion fehlt. 3 negative D-PAS-Reaktionen mit negativen PAS-Reaktionen, 1 negative D-PAS-Reaktion bei positiver PAS; 10 negative D-PAS-Reaktionen bei mässig positiver PAS und 12 negative D-PAS-Reaktionen bei stark positiver PAS.

Die letztgenannten fünf zytologisch diagnostizierten D-PAS-positiven Mesotheliome wurden histopathologisch wie folgt bewertet: 1 x Mesotheliom E (Deutsche Mesotheliomregister), 1 x Mesotheliom A (Referenzpathologe; Patient mit anerkannter Asbestose), 1 x Mesotheliom A (Deutsche Mesotheliomregister), 1 x Mesotheliom B (Referenzpathologe), 1 x Mesotheliom D (Referenzpathologe). In 23 Fällen (54,76 %) konnte eine PAS-positive Reaktion durch eine Diastasevorbehandlung reduziert werden: 12 Mesotheliome zeigten eine stark positive, 10 eine mässig positive und 1 Mesotheliom zeigte eine leicht positive PAS-Reaktion. Nach einer Diastasevorbehandlung konnte keine PAS-positive, Diastase-resistente intrazytoplasmatische Reaktion mehr festgestellt werden. In 33 Fällen führten wir zwar eine zytochemische PAS-Reaktion durch, aufgrund mangelnder und nicht repräsentativer Ausstriche (fehlende Tumorzellen) konnte aber keine Diastasevorbehandlung zum Vergleich herangezogen werden. Tabelle 11 (S. 67) und Abbildung 16 (S. 68) stellen in tabellarischer und graphischer Form die zytochemische D-PAS-Reaktion im Patientenkollektiv A in Abhängigkeit der histopathologischen Enddiagnosen dar.

Die 20 untersuchten Adenokarzinome des Bronchus zeigten in allen Fällen (20/20) PAS-positiven Schleim, in 3 Fällen konnte zusätzlich intrazytoplasmatisch feingranuläres Glykogen nachgewiesen werden.

Histopathologisch e Beurteilung	Zytochemische D-PAS-Reaktionen				
	Negative Reaktion	+	++	+++	Anzahl n
Mesotheliom A	13	1	1	0	15
Mesotheliom B	15	0	1	0	16
Mesotheliom C	3	0	0	0	3
Mesotheliom D	2	0	0	1	3
Mesotheliom E	3	0	1	0	4
Kein Tumor	1	0	0	0	1
Summe der untersuchten Proben	37	1	3	1	42

Tabelle 11:

Zytochemische D-PAS-Reaktionen in Abhängigkeit ihrer histopathologischen Beurteilungen.

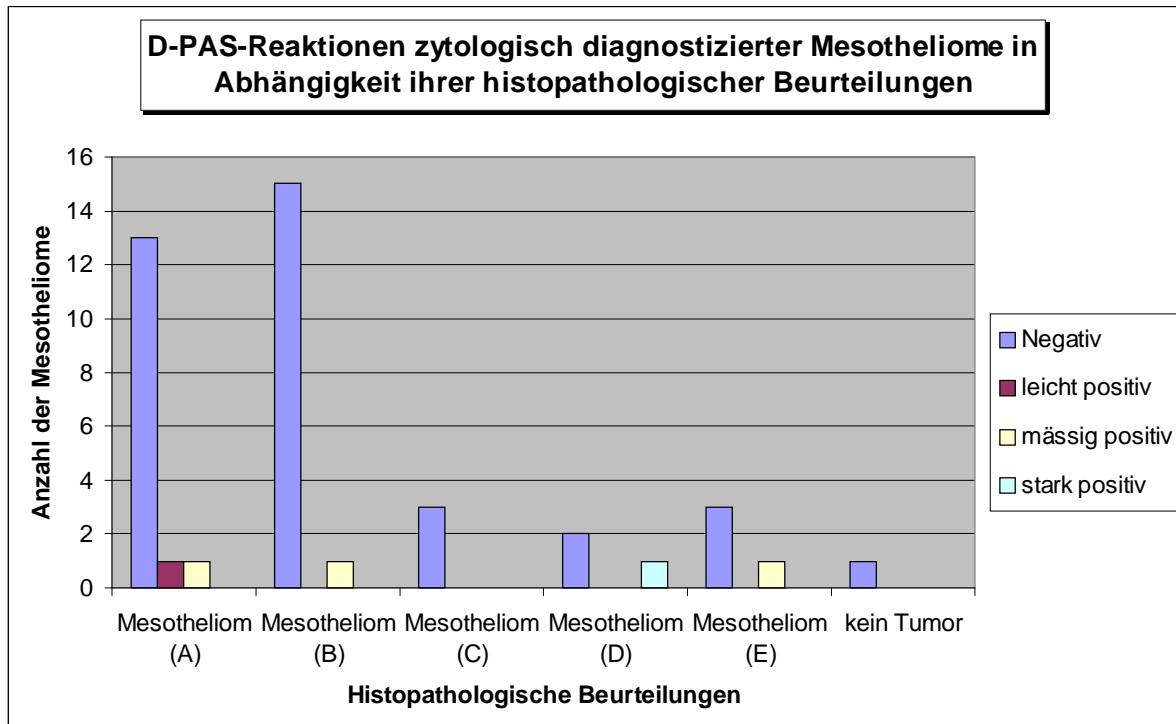


Abbildung 16:

Zytochemische D-PAS-Reaktionen in Abhängigkeit ihrer histopathologischen Beurteilungen.

Zusammenfassend gilt für den feingranulären, intrazytoplasmatischen Glykogennachweis durch die PAS-Reaktion: Die Anzahl der Patienten im Kollektiv A (zytologischer Diagnose im Sinne eines malignen Mesothelioms der Pleura, ohne histopathologischer Bestätigung) und PAS-Reaktion beträgt 75 Personen. Das Patientenkollektiv B (Anzahl aller Patienten mit histopathologischer Bestätigung der zytologischen, malignen Mesotheliomdiagnose) umfasst 60 Patienten. 54 Proben wiesen eine PAS positive Reaktion auf, in nur 6 Fällen konnte mittels der PAS-Reaktion kein Glykogen nachgewiesen werden (siehe auch Tabelle 9, S. 64). Die Sensitivität für die zytochemische PAS-Reaktion beträgt somit 90,0%. Die Spezifität, von 20 Adenokarzinomen des Bronchus wiesen 17 kein intrazytoplasmatisches Glykogen auf, liegt bei 85,0 %. Das Patientenkollektiv B umfasst für die PAS-Reaktion mit einer Diastasevorbehandlung (D-PAS) 34 Patienten (Mesotheliom A-C, siehe auch Tabelle 11, S. 67). Bei 31 Patienten konnte durch die Diastasevorbehandlung kein Glykogen mehr nachgewiesen werden, die D-PAS-Reaktion fiel negativ aus. Die Sensitivität liegt somit bei 91,18 %.

4.5 Immunzytochemische Befunde

4.5.1 Anti-Thrombomodulin

Die immunzytochemische Reaktion gegen das Thrombomodulin (Klon 1009) wurde an insgesamt 103 zytologisch diagnostizierten Pleuramesotheliomen (Patientenkollektiv A) durchgeführt. Die Überprüfung der Reaktion, sie erfolgte anhand der Positivkontrolle (siehe Tabelle 5, S. 48), ergab in 52 Fällen eine stark positive (50,49 %), in 38 Fällen eine mässig positive (36,89 %), in 9 Fällen eine leicht positive (8,74 %) und in 4 Fällen (3,88 %) keine Reaktion (siehe auch Tabelle 12, S. 69). Insgesamt kam es in 99 Fällen (96,12 %) zu einer positiven Ausfall der Anti-Thrombomodulin-Reaktion. Die Abbildung 17 (S. 72) zeigt eine positive Anti-Thrombomodulin-Reaktion bei einem 64 Jahre alten Mann. Deutlich zu sehen ist hier die zarte Reaktionslinie an der Zellmembran (Pfeil). Aus der Sicht der zytologischen Diagnosen gab es lediglich bei 4 Mesotheliomen keine reguläre Reaktion, nämlich 4 negative Anti-Thrombomodulin-Reaktionen. Die histopathologische Untersuchungen der letztgenannten 4 Mesotheliome ergaben folgende Beurteilungen (siehe auch Tabelle 13, S. 71): 2 x Mesotheliom B und 2 x Mesotheliom D.

Zytopathologische Beurteilungen	Anti-Thrombomodulin-Reaktion				Anzahl n
	Negative Reaktion (-)	Leicht positiv (+)	Mässig positiv (++)	Stark positiv (+++)	
Epitheliales Mesotheliom	3	6	31	47	87
Biphasisches Mesotheliom	0	2	4	2	8
Fibromatöses Mesotheliom	1	1	0	0	2
Biphasisches/fibromatöses Mesotheliom	0	0	1	0	1
Keine Angaben zu Wachstumsmuster	0	0	2	3	5
Summe der untersuchten Proben	4	9	38	52	103

Tabelle 12:

Ausfall der Anti-Thrombomodulin-Reaktionen in Abhängigkeit der zytopathologischen Beurteilungen.

Bei Überprüfung der histopathologischen Beurteilungen treten folgende nicht reguläre immunzytochemische Anti-Thrombomodulin-Reaktionen auf: In 2 Fällen wurde jeweils ein Mesotheliom B diagnostiziert, die immunzytochemische Färbungen fielen negativ aus. Bei 7 Patienten wurde jeweils ein Mesotheliom D bzw. E diagnostiziert, hier fielen die immunzytochemischen Reaktionen jedoch mässig positiv aus. In weiteren 10 Fällen ergab die histopathologische Diagnose trotz stark positiver Anti-Thrombomodulin-Reaktion jeweils Mesotheliom D bzw. E, in drei Fällen bei leicht positiver Reaktion wurde Mesotheliom E diagnostiziert. Insgesamt bei 8 Patienten wurde aus histologischer Sicht kein Tumor gefunden, die dazugehörigen immunzytochemischen Färbungen zeigten in einem Fall eine stark positive, in 5 Fällen eine mässige positive und in 2 Fällen eine leicht positive Reaktion. Übereinstimmende zytologische, histologische (Mesotheliom A-C) und immunzytochemische (alle Anti-Thrombomodulin-positive Reaktionen) Ergebnisse traten demnach in 71 Fällen auf, das entspricht einem Prozentsatz von 68,93 %. In 7,67 % der Fälle passen die zytomorphologischen Kriterien und die immunzytochemische Reaktion zu einem Mesotheliom; der histologische Befund geht von einer sekundären Pleurakarzinose aus, ein Mesotheliom ist aber nicht sicher auszuschließen (Mesotheliom D). Keine Übereinstimmungen (Negativer histopathologischer Befund bei übereinstimmenden zytomorphologischen und immunzytochemischen Ergebnissen) finden sich in 19,48 % der Fälle (siehe auch Tabelle 13, S. 71). Die 20 Adenokarzinome des Bronchus zeigten mit den Thrombomodulin-Antikörper keine positiven Reaktionen. Tabelle 14 (S. 71) zeigt eine Gegenüberstellung der zytologischen, immunzytochemischen und histopathologischen Enddiagnosen.

Zusammenfassung: Das Patientenkollektiv A (alle Patienten mit zytologisch diagnostiziertem, malignen Pleuramesotheliom und immunzytochemischer Untersuchung gegen das Thrombomodulin-Antigen) umfasst 103 Personen. Die Anzahl der Patienten mit zytologisch diagnostiziertem und histologisch bestätigtem, malignen Pleuramesotheliom und immunzytochemischer Untersuchung gegen das Thrombomodulin-Antigen (Patientenkollektiv B) beträgt 73 Personen. Im Patientenkollektiv B fielen 71 Anti-Thrombomodulin-Reaktionen positiv aus. Die errechnete Sensitivität der Reaktion für das Patientenkollektiv B beträgt somit 97,26 %. Die Spezifität, kein Adenokarzinom des Bronchus reagierte mit dem Antikörper, liegt bei 100%. Die Bewertung für das Patientenkollektiv A ergibt eine Übereinstimmung von 68,93 % (71/103, siehe auch Tabelle 14, S. 71).

Histopathologische Beurteilungen	Anti-Thrombomodulin-Reaktion				
	Negative Reaktion (-)	Leicht positiv (+)	Mässig positiv (++)	Stark positiv (+++)	Anzahl n
Mesotheliom A	0	1	12	22	35
Mesotheliom B	2	2	11	17	32
Mesotheliom C	0	1	3	2	6
Mesotheliom D	2	0	4	4	10
Mesotheliom E	0	3	3	6	12
Kein Tumor	0	2	5	1	8
Summe der untersuchten Proben	4	9	38	52	103

Tabelle 13:

Ausfall der immunzytochemischen Anti-Thrombomodulin-Reaktionen in Abhängigkeit der histopathologischen Beurteilungen.

Anzahl der Patienten im Kollektiv A	Anzahl der positiven Anti-Thrombomodulin-Reaktionen	Histopathologische Diagnosen	Bewertung
103	35	Mesotheliom A (n = 35)	68,93 % (71/103) Übereinstimmung
	30	Mesotheliom B (n = 32)	
	6	Mesotheliom C (n = 6)	
	8	Mesotheliom D (n = 10)	7,67 % (8/103)
	12	Mesotheliom E (n = 12)	19,48 % (20/103)
	8	Kein Tumor (n = 8)	Keine Übereinstimmung

Tabelle 14:

Gegenüberstellung der zytologischen, immunzytochemischen und histopathologischen Diagnosen im Patientenkollektiv A.

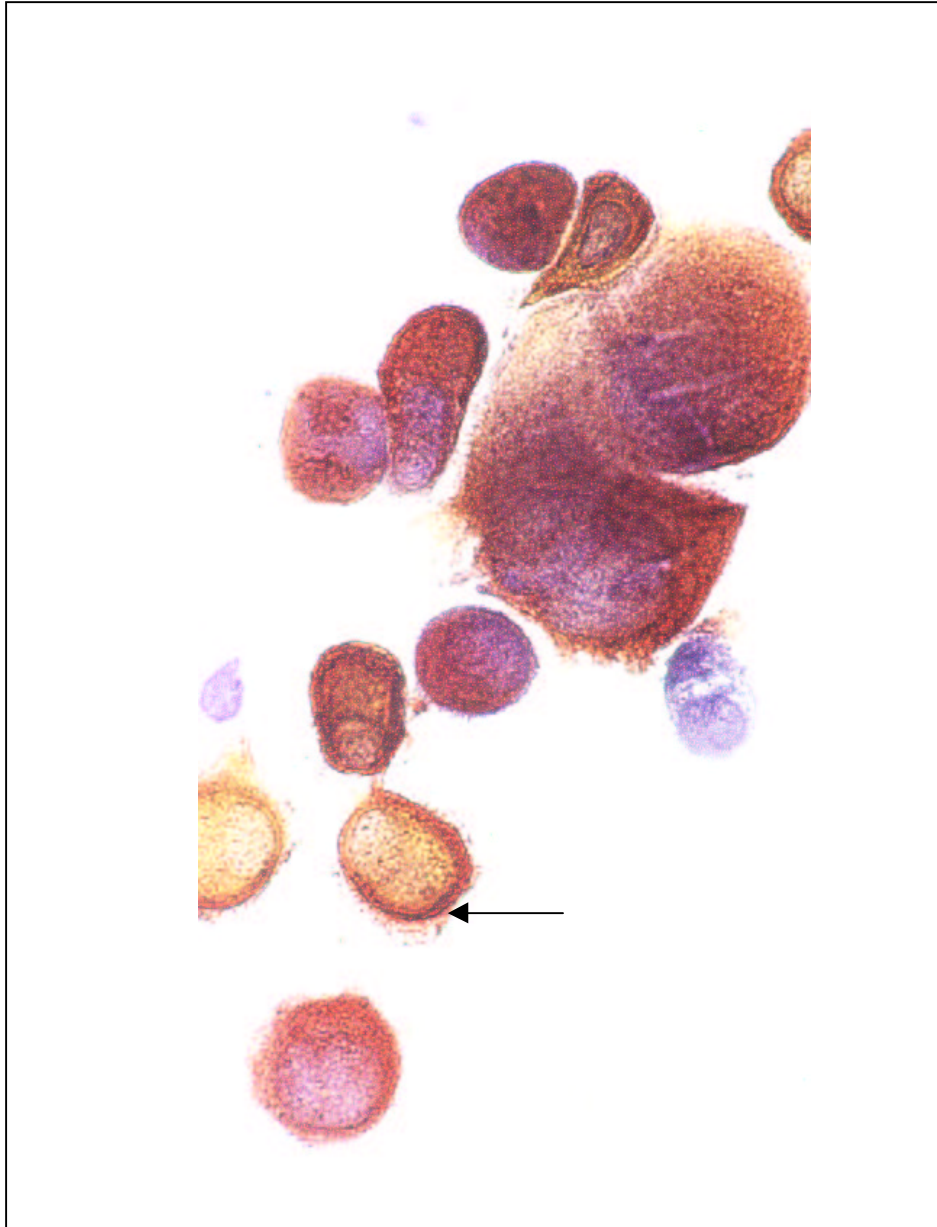


Abbildung 16:

Positive Anti-Thrombomodulin-Reaktion bei einem 64 Jahre alten Mann mit histopathologisch bestätigtem, malignen, epithelialen Pleuramesotheliom. (Olympus-Ölimmersion 60). In malignen Mesotheliomen bilden die Antikörper gegen Thrombomodulin eine dünne Markierung an der Zellmembran (Pfeil).

4.5.2 Anti-Vimentin

Die immunzytochemische Reaktion gegen das Vimentin (Klon V9) wurde an insgesamt 77 (50,99 %; 77/151) zytologisch diagnostizierten Pleuramesotheliomen durchgeführt (Patientenkollektiv A). Die Überprüfung der Reaktion, sie erfolgte anhand der Positivkontrolle (siehe Tabelle 5, S. 48), ergab in 19 Fällen (24,68 %; 19/77) eine stark positive, in 20 Fällen (25,97%; 20/77) eine mässig positive, in 11 Fällen eine leicht positive (14,29 %; 11/77) und in 27 Fällen (35,06 %; 27/77) keine Reaktion. Insgesamt kam es in 50 Fällen (64,94 %; 50/77) zu einem positiven Ausfall der Anti-Vimentin-Reaktion (siehe auch Tabelle 15, S. 73). Parallel zu den entsprechenden negativen Anti-Vimentin-Reaktionen wurden die pleuralen Probeexzisionen histopathologisch untersucht. Die 27 Biopsien wurden wie folgt bewertet: 13 x Mesotheliom A (16,88 %; 13/77), 8 x Mesotheliom B (10,39 %; 8/77), 1 x Mesotheliom C (1,30 %; 1/77), 2 x Mesotheliom E (2,60 %; 2/77) und in 3 Fällen (3,90 %; 3/77) konnte kein Tumor nachgewiesen werden (siehe Tabelle 16 und 17, S. 75).

Zytopathologische Beurteilungen	Anti-Vimentin-Reaktion				Anzahl n
	Negative Reaktion (-)	Leicht positiv (+)	Mässig positiv (++)	Stark positiv (+++)	
Epitheliales Mesotheliom	23	7	17	15	62
Biphasisches Mesotheliom	0	2	3	2	7
Fibromatöses Mesotheliom	0	1	0	2	3
Biphasisches/fibromatöses Mesotheliom	0	1	0	0	1
Keine Angaben zu Wachstumsmuster	4	0	0	0	4
Summe der untersuchten Proben	27	11	20	19	77

Tabelle 15:

Ausfall der Anti-Vimentin-Reaktion in Abhängigkeit der zytopathologischen Beurteilungen.

Übereinstimmende zytomorphologische, histopathologisch-anatomische (Anzahl der Mesotheliome A-C) und immunzytochemische (alle Anti-Vimentin-positiven Reaktionen) Ergebnisse traten demnach in 32 Fällen (41,56 %; 32/77) auf. In 11,69 % der Fälle (9/77) passen sowohl die zytomorphologischen Kriterien als auch die immunzytochemischen Reaktionen zu einem diffusem Pleuramesotheliom; der histopathologische Befund geht von einer sekundären Pleurakarzinose aus, ein Mesotheliom kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden (Mesotheliom D). Keine Übereinstimmungen (negativer histopathologischer Befund bei übereinstimmenden zytomorphologischen und immunzytochemischen Ergebnissen) finden sich jeweils in 6,49 % der Fälle (5/77) und in 2,60 % (2/77) der Fälle (negativer histopathologischer Befund bei negativer Anti-Vimentin-Reaktion). Insgesamt beläuft sich der Prozentsatz der nicht übereinstimmenden Diagnosen bei 9,09 %. Auffällig ist der Reaktionsausfall der Anti-Vimentin-Reaktion der Pleuramesotheliome mit einem biphasischen, fibromatösen und biphasisch/fibromatösen Tumoranteil. 100 % (11/11) dieser Fälle sind Anti-Vimentin positiv, während die Pleuramesotheliome mit einem hauptsächlich epithelialen Tumoranteil lediglich in 62,90 % der Fälle (39/62) Anti-Vimentin positiv sind. 7 von 20 Adenokarzinomen zeigten eine positive, 13 eine negative Vimentin-Reaktion auf. Die Abbildung 18 (S. 76) zeigt eine positive Anti-Vimentin-Reaktion bei einem 55 Jahre alten Mann mit histologisch bestätigtem, malignem Pleuramesotheliom.

Zusammenfassung: Das Patientenkollektiv A (alle Patienten mit zytologisch gestellte Diagnose im Sinne eines malignen Mesothelioms und immunzytochemischer Anti-Vimentin-Reaktion) umfasst 77 Personen. Die Anzahl der Patienten im Patientenkollektiv B (alle Patienten mit zytologisch gestellter und histopathologisch bestätigter Diagnose im Sinne eines malignen Mesothelioms und immunzytochemischer Anti-Vimentin-Untersuchung) beträgt 54 Personen. Bei 32 Proben in diesem Kollektiv fiel die Anti-Vimentin-Reaktion regulär positiv aus, die Sensitivität beträgt somit 59,26 %. Die Berechnung der Spezifität beläuft sich bei 7 positiven Anti-Vimentin-Reaktionen der Adenokarzinome des Bronchus auf 65,0 %. Die Bewertung für das Patientenkollektiv A ergibt 41,56 % (32/77) Übereinstimmung (siehe Tabelle 17, S. 75).

Histopathologische Beurteilungen	Anti-Vimentin-Reaktion				
	Negative Reaktion (-)	Leicht positiv (+)	Mässig positiv (++)	Stark positiv (+++)	Anzahl n
Mesotheliom A	13	2	8	6	29
Mesotheliom B	8	4	2	6	20
Mesotheliom C	1	1	2	1	5
Mesotheliom D	0	1	5	3	9
Mesotheliom E	2	2	1	2	7
Kein Tumor	3	1	2	1	7
Summe der untersuchten Proben	27	11	20	19	77

Tabelle 16:

Ausfall der Anti-Vimentin-Reaktion in Abhängigkeit der histopathologischen Beurteilungen.

Anzahl der Patienten im Kollektiv A	Anzahl der positiven Anti-Vimentin-Reaktionen	Histopathologische Diagnosen	Bewertung
77	16	Mesotheliom A (n = 29)	41,56 % (32/77) Übereinstimmung
	12	Mesotheliom B (n = 20)	
	4	Mesotheliom C (n = 5)	
	9	Mesotheliom D (n = 9)	11,69 % (9/77)
	5	Mesotheliom E (n = 7)	11,69 % (9/77) Keine Übereinstimmung
	4	Kein Tumor (n = 7)	

Tabelle 17:

Gegenüberstellung der zytologischen, immunzytochemischen und histopathologischen Diagnosen. Die Bewertungen beziehen sich auf das Patientenkollektiv A.

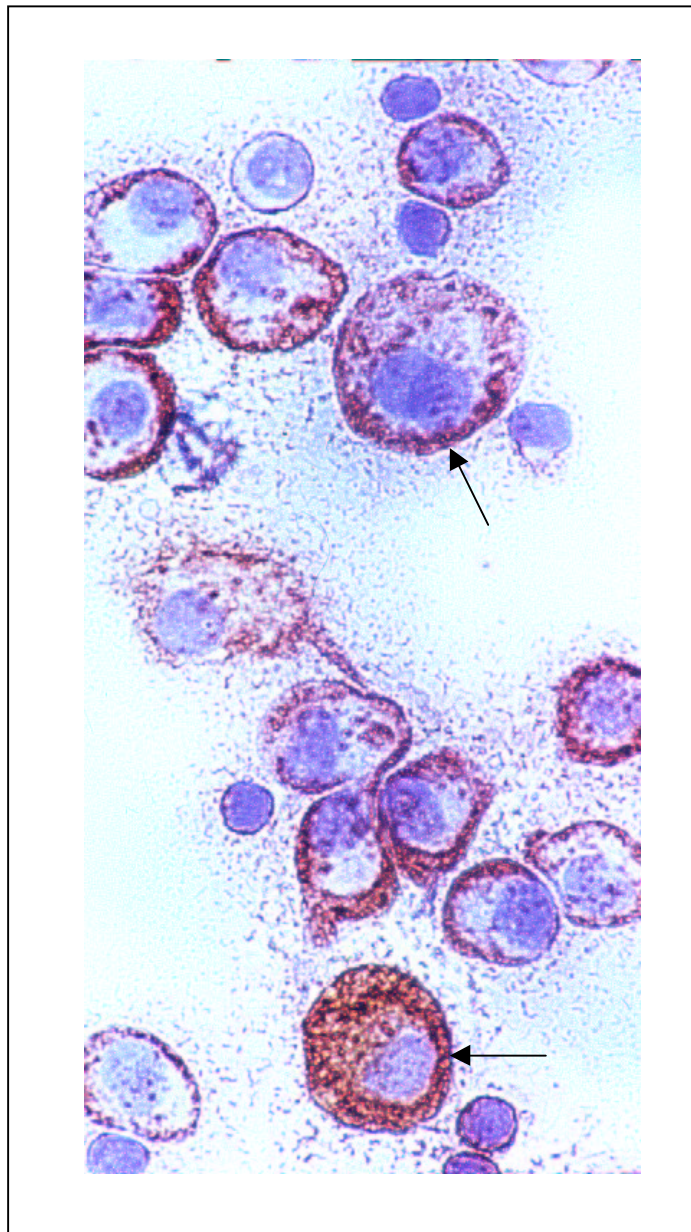


Abbildung 18: Positive Anti-Vimentin-Reaktion bei einem 55 Jahre alten Mann mit histologisch bestätigtem, malignem Mesotheliom der Pleura. Markante Reaktion des Antikörper an der Zellmembran (Pfeile).

4.5.3 Anti-Human-Epitheliales Antigen (HEA)

Die Überprüfung des Reaktionsausfalls mit dem Antikörper gegen das Human-Epitheliale Antigen (Klon: Ber-EP4) bei insgesamt 26 Pleuramesotheliomen (17,22 %; 26/151, Patientenkollektiv A) ergab nachstehende Resultate: In 25 Fällen (96,15 %) fiel die immunzytochemische Reaktion negativ aus, in einem einzigen Fall (3,85 %) kam es zu einer stark positiven Reaktion. Die histopathologische Untersuchung der Probeexzision ergab ein Mesotheliom, Gruppe A. Zytologisch wurden bei den HEA-negativen Mesotheliomen folgende Wachstumstypen diagnostiziert: In 21 Fällen (80,77 %) wurde auf ein epitheliales Wachstumsmuster erkannt, in je einem Fall (3,85 %) auf ein biphasisches, ein fibromatöses und in einem Fall auf ein Mesotheliom mit Anteilen eines biphasischen und fibromatösen Wachstumsmusters. Lediglich bei einem Mesotheliom konnte keine Angabe zu dem Wachstumsmuster gemacht werden (siehe auch Tabelle 18, S. 77).

Zytopathologische Beurteilungen	Anti-HEA-Reaktion				Anzahl n
	Negative Reaktion (-)	Leicht positiv (+)	Mässig positiv (++)	Stark positiv (+++)	
Epitheliales Mesotheliom	21	0	0	1	22
Biphasisches Mesotheliom	1	0	0	0	1
Fibromatöses Mesotheliom	1	0	0	0	1
Biphasisches/fibromatöses Mesotheliom	1	0	0	0	1
Keine Angaben zu Wachstumsmuster	1	0	0	0	1
Summe der untersuchten Proben	25	0	0	1	26

Tabelle 18:

Ausfall der Anti-HEA-Reaktion in Abhängigkeit der zytopathologischen Beurteilungen.

Der Ausfall der Anti-HEA-Reaktion in Abhängigkeit der histopathologischen Beurteilungen der pleuralen Probeexzisionen ergab folgende Resultate: Mesotheliom A (38,46 %; 10/26), Mesotheliom B (46,15 %; 12/26), Mesotheliom D (3,85 %; 1/26) und kein Tumor diagnostizierbar (11,54 %; 3/26). Tabelle 19 (S. 79) zeigt den Ausfall der immunzytochemischen Anti-HEA-Reaktionen in Abhängigkeit der histopathologischen Enddiagnosen. Völlige zytologische, immunzytochemische (alle HEA-negativen Reaktionen) und histologische (Anzahl der Mesotheliome A-C, Patientenkollektiv B) Übereinstimmungen traten somit in 80,77 % (21/26) aller Fälle ein. In 3,85 % (1/26) der Fälle passen sowohl die zytomorphologische und immunzytochemische Kriterien zu einem Mesotheliom; der histopathologische Befund geht dagegen von einer sekundären Pleurakarzinose aus, ein Mesotheliom ist trotzdem nicht sicher auszuschließen (Mesotheliom D). Keine Übereinstimmung liegen in 15,38 % der Fälle (4/26) vor: In 3 Probeexzisionen ist histologisch kein Tumor diagnostiziert worden, in einem Fall fiel die immunzytochemische Reaktion des HEA-Antikörpers stark positiv aus. Die Reaktionen aller 20 Adenokarzinome fielen positiv aus.

Zusammenfassung: Das Patientenkollektiv A (Anzahl aller Patienten mit zytologisch diagnostiziertem, malignem Pleuramesotheliom und immunzytochemischer Untersuchung gegen das Human-Epitheliale Antigen) umfasst 26 Personen. Die Anzahl der Patienten im Kollektiv B (Anzahl aller Patienten mit zytologisch gestellter und histologisch bestätigter Diagnose im Sinne eines malignen Mesothelioms und immunzytochemischer Untersuchung gegen das HE-Antigen) beträgt 22 Personen. Im letztgenannten Kollektiv fielen 21 Anti-HEA-Reaktionen negativ und damit regulär aus. Die Spezifität des Antikörpers in diesem Kollektiv beträgt somit 95,45 %. Die errechnete Sensitivität bei 20 positiv reagierenden Adenokarzinomen des Bronchus beträgt 100%. Die Übereinstimmung der zytologischen, immunzytochemischen und histopathologischen Befunden im Patientenkollektiv A beträgt 80,77 % (21/26, siehe Tabelle 20, S. 79).

Histopathologische Beurteilungen	Anti-HEA-Reaktion				Anzahl n
	Negative Reaktion (-)	Leicht positiv (+)	Mässig positiv (++)	Stark positiv (+++)	
Mesotheliom A	9	0	0	1	10
Mesotheliom B	12	0	0	0	12
Mesotheliom C	0	0	0	0	0
Mesotheliom D	1	0	0	0	1
Mesotheliom E	0	0	0	0	0
Kein Tumor	3	0	0	0	3
Summe der untersuchten Proben	25	0	0	1	26

Tabelle 19:

Ausfall der Anti-HEA-Reaktion in Abhängigkeit der histopathologischen Beurteilungen.

Anzahl der Personen im Kollektiv A	Anzahl der negativen Anti-HEA-Reaktionen	Histopathologische Diagnosen	Bewertung
26	10	Mesotheliom A (n = 9)	80,77 % (21/26) Übereinstimmung
	12	Mesotheliom B (n = 12)	
	0	Mesotheliom C (n = 0)	
	1	Mesotheliom D (n = 1)	3,85 % (1/26)
	0	Mesotheliom E (n = 0)	19,05 % (7/42) Keine Übereinstimmung
	3	Kein Tumor (n = 3)	

Tabelle 20:

Gegenüberstellung der zytologischen, immunzytochemischen und histopathologischen Diagnosen im Patientenkollektiv A.

4.5.4 Anti-Carcino-Embryonic Antigen (CEA)

Von den insgesamt 151 zytologisch diagnostizierten Mesotheliomen wurde lediglich bei 42 Fällen (Patientenkollektiv A) der Reaktionsausfall des Antikörpers (Klon Il-7) gegen das Carcinoembryonale Antigen überprüft. Als Positivkontrolle diente (siehe Tabelle 5, S. 48) ein histologisch bestätigtes Kolonkarzinom. Insgesamt zeigen 38 Fälle (90,48 %) eine negative, in 2 Fällen (4,76 %) eine leicht positive, in einem Fall (2,38 %) eine mässig positive (siehe auch Abbildung 19, S. 83) und in einem weiteren Fall (2,38 %) eine stark positive Reaktion (siehe Tabelle 21, S. 80). Die histopathologische Begutachtung der 4 letztgenannten Fälle ergab zweimal Mesotheliom B (das entspricht den beiden leicht positiv ausgefallenen Reaktionen), in einem Fall Mesotheliom A (entspricht der mässig positiven Reaktion) und im letzten Fall Mesotheliom E (entspricht der stark positiv ausgefallenen Reaktion). Die Abhängigkeit der immunzytochemischen Reaktionen gegen das CE-Antigen von der histopathologischen Enddiagnose zeigt Tabelle 22 (S. 82).

Zytopathologische Beurteilungen	Anti-CEA-Reaktion				Anzahl n
	Negative Reaktion (-)	Leicht positiv (+)	Mässig positiv (++)	Stark positiv (+++)	
Epitheliales Mesotheliom	32	2	0	1	35
Biphasisches Mesotheliom	3	0	0	0	3
Fibromatöses Mesotheliom	2	0	0	0	2
Biphasisches/fibromatöses Mesotheliom	0	0	0	0	0
Keine Angaben zu Wachstumsmuster	1	0	1	0	2
Summe der untersuchten Proben	38	2	1	1	42

Tabelle 21:

Ausfall der Anti-CEA-Reaktionen in Abhängigkeit der zytopathologischen Beurteilungen.

In 5 Fällen (11,90 %) ergab die histopathologische Begutachtung trotz negativer immunzytochemischer Anti-Carcinoembryonales Antigen-Reaktion Mesotheliom D und in 5 weiteren Fällen (11,90 %) Mesotheliom E. Die histologischen Befunde favorisieren bei diesen Patienten eine sekundäre Pleurakarzinose (Adenokarzinom). Bei 2 Patienten konnte kein Tumor diagnostiziert werden. Übereinstimmende zytologische, histologische (Mesotheliom A-C) und immunzytochemische Reaktionen (alle CEA-negativen Reaktionen) traten demnach in 26 Fällen (Patientenkollektiv A) auf, das entspricht einem Prozentsatz von 61,90 % (siehe auch Tabelle 23, S 82). In 11,90 % der Fälle stimmen die zytomorphologischen und immunzytochemischen Reaktionen passend zu einem Mesotheliom überein; der histopathologische Befund geht dabei von einer sekundären Pleurakarzinose aus, wobei ein Mesotheliom nicht sicher auszuschließen ist (Mesotheliom D). Keine Übereinstimmungen finden sich in 16,67 % (7/42) der Fälle (siehe auch Tabelle 23, S. 82). Trotz positiven immunzytochemischen Reaktionsausfall stimmen die zyto- und histopathologischen Diagnosen in 29 Fällen (69,05 %) überein.

Zusammenfassung: Die Anzahl der Patienten im Kollektiv A (alle Patienten mit zytologisch gestellter Diagnose im Sinne eines malignen Mesothelioms und immunzytochemische Untersuchung gegen das CE-Antigen) beträgt 42 Personen. Das Patientenkollektiv B (alle Patienten mit zytologisch gestellter und histologisch bestätigter Diagnose im Sinne eines malignen Mesothelioms und immunzytochemischer Untersuchung gegen das CE-Antigen) umfasst 29 Personen. Die immunzytochemische Untersuchungen ergaben 26 reguläre negative Reaktionen gegen das Antigen. Die Spezifität des Antikörpers in diesem Kollektiv beträgt folglich 89,65 %, die Reaktivität des Antikörpers bei histologisch bestätigten Pleuramesotheliomen liegt bei 10,34 %. Bei den 20 Adenokarzinomen konnten wir in 17 Fällen eine positive Reaktion und damit eine CEA-Expression nachweisen, die errechnete Sensitivität beträgt 85 %. Im Patientenkollektiv A liegt eine Übereinstimmung von 61,9 % vor (siehe auch Tabelle 23, S. 82).

Histopathologische Beurteilungen	Anti-CEA-Reaktion				Anzahl n
	Negative Reaktion (-)	Leicht positiv (+)	Mässig positiv (++)	Stark positiv (+++)	
Mesotheliom A	15	0	1	0	16
Mesotheliom B	9	2	0	0	11
Mesotheliom C	2	0	0	0	2
Mesotheliom D	5	0	0	0	5
Mesotheliom E	5	0	0	1	6
Kein Tumor	2	0	0	0	2
Summe der untersuchten Proben	38	2	1	1	42

Tabelle 22:

Ausfall der Anti-CEA-Reaktion in Abhängigkeit der histopathologischen Beurteilungen.

Anzahl der Patienten im Kollektiv A	Anzahl der negativen Anti-CEA-Reaktionen	Histopathologische Diagnosen	Bewertung
42	15	Mesotheliom A (n = 16)	61,90 % (26/42) Übereinstimmung
	9	Mesotheliom B (n = 11)	
	2	Mesotheliom C (n = 2)	
	5	Mesotheliom D (n = 5)	11,90 % (5/42)
	5	Mesotheliom E (n = 6)	16,66 % (7/42)
	2	Kein Tumor (n = 2)	Keine Übereinstimmung

Tabelle 23:

Gegenüberstellung der zytologischen, immunzytochemischen und histopathologischen Diagnosen im Patientenkollektiv A.

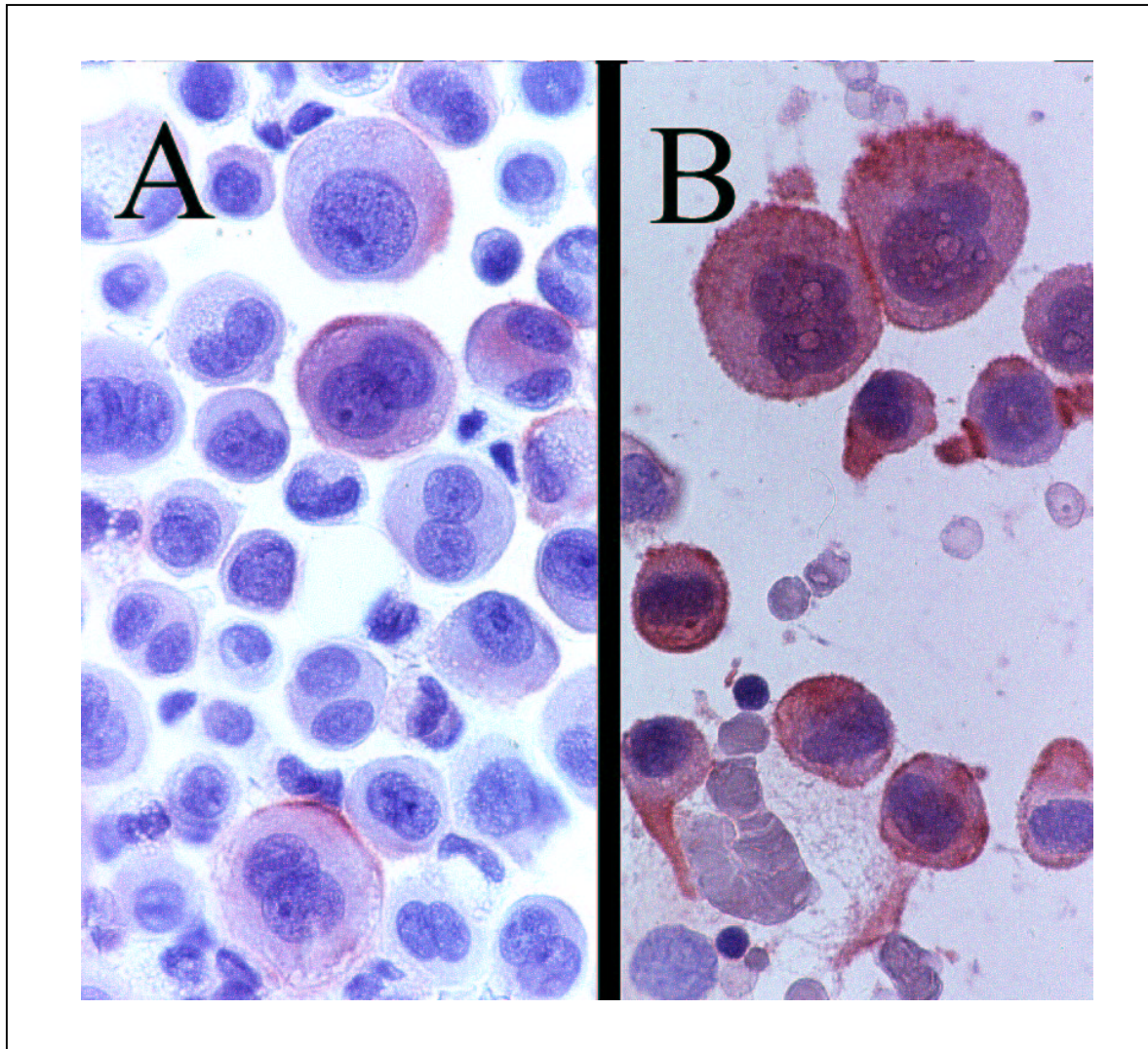


Abbildung 19:

(A): Leicht positive und nicht reguläre Anti-CEA-Reaktion bei malignem epithelialen Pleuramesotheliom (Olympus-Ölimmersion).

(B): Mässig positive und nicht reguläre Anti-CEA-Reaktion bei malignem epithelialen Pleuramesotheliom (Olympus-Ölimmersion 60).

4.5.5 Anti-Tissue Polypeptide Antigen (TPA)

Die immunzytochemische Reaktion mit dem TPA-Antikörper (Klon B1) wurde an insgesamt 36 zytologisch diagnostizierten Pleuramesotheliomen durchgeführt (Patientenkollektiv A). Die Überprüfung der Reaktion erfolgte anhand der Positivkontrolle (siehe auch Tabelle 5, S. 48) und ergab in 9 Fällen (25 %) eine stark positive, in 4 Fällen (11,11%) eine mässig positive, in 6 Fällen eine leicht (16,67 %) positive und in 17 Fällen (47,22 %) keine Reaktion (siehe auch Tabelle 24, S.84). Insgesamt fielen 19 Reaktionen mit dem TPA-Antikörper positiv aus (52,78 %). Die histopathologische Untersuchungen dieser 19 Mesotheliome ergaben folgende Beurteilungen (siehe Tabelle 25, S.86): 8 x Mesotheliom A (42,11 %; 8/19), 7 x Mesotheliom B (36,84 %; 7/19), 3 x Mesotheliom D (15,79 %; 3/19) und in einem Fall Mesotheliom E (5,26 %; 1/19). Die histopathologischen Untersuchungen der entsprechenden pleuralen Probeexzisionen der TPA-negativen Reaktionen ergaben folgende Beurteilungen: 3 x Mesotheliom A (17,65 %; 3/17), 5 x Mesotheliom B (29,41 %; 5/17), 1 x Mesotheliom C (5,88 %; 1/17), 3 x Mesotheliom D (17,65 %; 3/17), 2 x Mesotheliom E (11,76 %; 2/17), und in 3 Fällen (17,65 %; 3/17) war kein Tumor nachweisbar.

Zytopathologische Beurteilungen	Anti-TPA-Reaktion				Anzahl n
	Negative Reaktion (-)	Leicht positiv (+)	Mässig positiv (++)	Stark positiv (+++)	
Epitheliales Mesotheliom	12	6	4	8	30
Biphasisches Mesotheliom	2	0	0	1	3
Fibromatöses Mesotheliom	0	0	0	0	0
Biphasisches/fibromatöses Mesotheliom	0	0	0	0	0
Keine Angaben zu Wachstumsmuster	3	0	0	0	3
Summe der untersuchten Proben	17	6	4	9	36

Tabelle 24:

Ausfall der Anti-TPA-Reaktion in Abhängigkeit der zytopathologischen Beurteilungen.

Übereinstimmende zytomorphologische, histopathologisch-anatomische (Mesotheliome A-C) und immunzytochemische (alle Anti-TPA-negativen Reaktionen) Ergebnisse traten demnach in 9 Fällen (25,0 %; 9/36) auf. In 8,33 % der Fälle (8/36) passen sowohl die zytomorphologischen Kriterien als auch die immunzytochemischen Reaktionen zu einem Mesotheliom; der histopathologische Befund geht von einer sekundären Pleurakarzinose aus, ein Mesotheliom kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden (Mesotheliom D). Keine Übereinstimmungen (Negativer histopathologischer Befund bei übereinstimmenden zytomorphologischen und immunzytochemischen Ergebnissen) finden sich in 13,89 % der Fälle. Diese Berechnungen gelten für das Patientenkollektiv A (siehe auch Tabelle 26, S. 86).

Zusammenfassung: Das Patientenkollektiv A, also alle Patienten mit zytologisch gestellter Diagnose im Sinne eines malignen Mesothelioms und immunzytochemischer Untersuchung gegen das TP-Antigen, umfasst 36 Personen. Die Anzahl der Patienten im Kollektiv B, also die Anzahl der Patienten mit zytologisch gestellter und histopathologisch bestätigter Diagnose im Sinne eines malignen Mesothelioms und immunzytochemischer Untersuchung gegen das TP-Antigen, beträgt 27 Personen. In dem letztgenannten Kollektiv fielen 18 immunzytochemische Reaktionen gegen das TP-Antigen positiv aus. Die errechnete Spezifität beträgt somit 33,3 %. Von 20 Adenokarzinomen des Bronchus zeigten 13 eine positive Reaktion, 7 Nachweise verliefen negativ, die Sensitivität liegt bei 65,0 %. Die Übereinstimmung der zytologischen, immunzytochemischen und histopathologischen Befunden im Verhältnis zum Patientenkollektiv A beträgt 25,0 % (siehe auch Tabelle 26, S. 86).

Histopathologische Beurteilungen	Anti-TPA-Reaktion				Anzahl n
	Negative Reaktion (-)	Leicht positiv (+)	Mässig positiv (++)	Stark positiv (+++)	
Mesotheliom A	3	3	1	8	15
Mesotheliom B	5	3	2	1	11
Mesotheliom C	1	0	0	0	1
Mesotheliom D	3	0	1	0	4
Mesotheliom E	2	0	0	0	2
Kein Tumor	3	0	0	0	3
Summe der untersuchten Proben	17	6	4	9	36

Tabelle 25:

Ausfall der Anti-TPA-Reaktion in Abhängigkeit der histopathologischen Beurteilungen.

Anzahl der Patienten im Kollektiv A	Anzahl der negativen Anti-TPA-Reaktionen	Histopathologische Diagnosen	Bewertung
36	3	Mesotheliom A (n = 3)	25,0 % (9/36) Übereinstimmung
	5	Mesotheliom B (n = 5)	
	1	Mesotheliom C (n = 1)	
	3	Mesotheliom D (n = 3)	8,33 % (8/36)
	2	Mesotheliom E (n = 2)	13,89 % (5/36) Keine Übereinstimmung
	3	Kein Tumor (n = 3)	

Tabelle 26:

Gegenüberstellung der zytologischen, immunzytochemischen und histopathologischen Diagnosen im Patientenkollektiv A.

4.5.6 Zusammenfassung der zyto- und immunzytochemischen Ergebnisse

In allen 151 untersuchten Fällen (Patientenkollektiv A) wurde als Ergebnis der zytomorphologischen Untersuchungen ein diffuses und damit malignes Mesotheliom der Pleura diagnostiziert. Lediglich 51 Mesotheliome (33,77 %) konnten durch eine histopathologische Untersuchung der entsprechenden Pleura-Probeexzisionen mit Sicherheit bestätigt werden (Mesotheliom A). Weitere 50 Fälle (33,11 %) wurden histopathologisch in die Pleuratumoren der Gruppe B (wahrscheinlich Mesotheliom) eingeordnet, 6 Pleuramesotheliome (3,97 %) wurden als Mesotheliom C (mögliches Mesotheliom) bewertet. Die Anzahl der Patienten im Kollektiv B (alle Patienten mit zytologisch gestellter und histopathologisch bestätigter Diagnose im Sinne eines malignen Mesothelioms) beträgt 107 Personen. Die nachstehende Tabelle 27 (S. 87) zeigt eine Übersicht über die ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten der zytochemischen und immunzytochemischen Reaktionen im Patientenkollektiv B. Die sogenannten „Negativmarker“, also die Tumormarker, die hauptsächlich nicht mit Antigenen von malignen Mesotheliomen reagieren, sind in der Tabelle farblich markiert. Ebenso sind alle zytochemischen Untersuchungen an malignen Pleuramesotheliomen, bei denen regulär eine negative Reaktion zu erwarten ist (D-PAS, AP) grau hervorgehoben.

Art des Nachweises	Anzahl Personen im Kollektiv B	Anzahl Mesotheliom-Reaktionen	Anzahl Adenokarzinom-Reaktionen	Ermittelte Sensitivität [%]	Ermittelte Spezifität [%]
AP	66	1/66	17/20	85,0	98,48
PAS	60	54/60	3/20	90,0	85,0
D-PAS	34	3/34	-	-	91,18
Anti-Thr	73	71/73	0/20	97,26	100,0
Anti-Vim	54	32/54	7/20	59,26	65,0
Anti-HEA	22	1/22	20/20	100,0	95,45
Anti-CEA	29	3/29	17/20	85,0	89,65
Anti-TPA	22	13/22	13/20	65,0	33,0

Tabelle 27: Übersicht über die ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten der zytochemischen und immunzytochemischen Reaktionen im Patientenkollektiv B. AP=Alkalische Phosphatase, PAS=Periodic Acid Schiff Reaction, D-PAS=PAS mit Diastasevorbehandlung, Anti-Thr=Anti-Thrombomodulin, Anti-HEA=Anti-Human-Epitheliales Antigen, Anti-CEA=Anti-Carcino-Embryonic-Antigen, Anti-TPA=Anti-Tissue-Polypeptid Antigen.

4.6 Vergleich zytologischer und histologischer Befunde

In allen 151 untersuchten Fällen wurde als Ergebnis der zytomorphologischen Untersuchungen ein Pleuramesotheliom diagnostiziert (Patientenkollektiv A). Die Angaben zu dem Wachstumsmuster sind bereits unter Punkt 4.3.1 beschrieben worden. In 107 Fällen (Anzahl Mesotheliom A-C) stimmten die Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen der pleuralen Probeexzisionen überein, das entspricht einem Prozentsatz von 70,86 %. Die Mesotheliome A-C teilten sich wie folgt auf: 67 Mesotheliome der Gruppe A (44,37 %), 34 Mesotheliome der Gruppe B (22,52 %) und 6 Mesotheliome der Gruppe C (3,97 %). In 12 Fällen (7,95 %) wurde eine sekundäre Pleurakarzinose favorisiert, ein Pleuramesotheliom konnte jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden (Mesotheliom D). Keine Übereinstimmungen in den Ergebnissen der zytomorphologischen und histopathologischen Untersuchungen (Mesotheliom E) gab es in 10,6 % (16/151) der Fälle. 16 mal konnte in den Probeexzisionen histologisch kein Tumor nachgewiesen werden. Die unten stehende Tabelle vergleicht die zytologische und histopathologische Untersuchungsergebnisse.

Zyto- pathologische Beurteilungen	Histopathologische Beurteilungen						
	Mesotheliom					Kein Tumor	Anzahl n
	A	B	C	D	E	X	
Epitheliales Mesotheliom	41	41	6	10	11	15	124
Biphasisches Mesotheliom	6	2	2	1	1	0	12
Fibromatöses Mesotheliom	0	1	0	1	2	0	4
Biphasisches/fibromatöses Mesotheliom	0	1	0	0	0	0	1
Keine Angaben zu Wachstumsmuster	3	3	1	0	2	1	10
Summe	50	48	9	12	16	16	151

Tabelle 28:

Vergleich der zytologischen und histologischen Untersuchungsbefunde.

4.6.1 Immun- und enzymzytochemische Gesichtspunkte

In 16 Fällen gab es in den Ergebnissen der zytomorphologischen und histologischen Untersuchungen keine Übereinstimmungen (Mesotheliom E), in weiteren 12 Fällen (Mesotheliom D) wurde aus histologischer Sicht eine sekundäre Pleurakarzinose favorisiert, ein Mesotheliom war aber nicht völlig auszuschließen (siehe Punkt 4.6 und Tabelle 28, S. 88). In den beiden folgenden Abschnitten werden alle 28 Fälle, bei denen histologisch ein Mesotheliom D bzw. Mesotheliom E diagnostiziert worden ist, in Abhängigkeit der immunzytochemischen und zytochemischen Reaktionen der luftgetrockneten Ausstrichpräparate dargestellt.

Zyto- und immunzytochemische Reaktionen bei histologischer Diagnose „Mesotheliom D“.

Die histopathologisch-anatomische Untersuchungen der pleuralen Probeexzisionen ergaben in 12 Fällen die Diagnose „Mesotheliom D“, d.h. ein Pleuramesotheliom ist zwar unwahrscheinlich, kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Tabelle 29 (siehe S. 91) zeigt eine Übersicht über die zytochemischen und die immunzytochemischen Ergebnisse dieser 12 Fälle. Die schattierten Zeilen markieren die zytochemischen bzw. immunzytochemischen Reaktionen, die regulär nicht zu einem zytomorphologisch diagnostizierten Pleuramesotheliom passen. In diesen Fällen wurde aufgrund der zytomorphologischen Kriterien auf ein malignes Mesotheliom der Pleura entschieden.

Bei einem Patienten (Code 16882) fiel die Anti-TPA-Reaktion stark positiv aus, die parallel durchgeführte Anti-CEA-Reaktion war deutlich negativ. Histologisch wurde eine sekundäre Pleurakarzinose favorisiert. Differentialdiagnostisch wurde ein Adenokarzinom als Metastase eines Lungen- oder Nierentumors angegeben. Aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität des Anti-TPA Tumormarkers (siehe Tabellenübersicht 27, S. 87) sollte die stark positive Reaktion nicht ins Gewicht fallen, die hohe Sensitivität des Anti-CEA Tumormarkers für die Reaktivität mit Adenokarzinomen (85,0 %) hätte hier jedoch positiv ausfallen müssen.

Bei einem anderen Patienten (Code 88594) fiel die Anti-TPA-Reaktion ebenfalls stark positiv aus, die Anti-Thrombomodulin-Reaktion dagegen fiel negativ aus. Zu der zytomorphologischen Diagnose eines Pleuramesothelioms passen jedoch der negative Nachweis der Alkalischen Phosphatase sowie der negative Nachweis des intrazytoplasmatischen Glykogens (D-PAS) und die mässig positive Anti-Vimentin-Reaktion.

Der histopathologische Befund favorisierte ein gering differenziertes Adenokarzinom der Lunge.

Bei einem weiteren Patienten (Code 35276) passt die stark positive D-PAS-Reaktion nicht zu einem Pleuramesotheliom, die stark positiven Anti-Thrombomodulin und Anti-Vimentin-Reaktionen sprechen jedoch eindeutig für die zytomorphologische Diagnose. Der histologische Befund hielt ein Adenokarzinom für wahrscheinlicher.

In einem Fall (Code 60985) fielen die Anti-Thrombomodulin und die Anti-TPA-Reaktionen stark positiv aus, die parallel durchgeführte Anti-CEA-Reaktion fiel eindeutig negativ aus. Das histopathologische Gutachten konnte keine konkrete Diagnose eines anderen Tumors angeben.

Nicht zu einem Pleuramesotheliom passend fiel in einem weiteren Fall (Code 39878) die negative Anti-Thrombomodulin-Reaktion aus, für ein Mesotheliom sprechen jedoch die stark positive Anti-Vimentin- sowie die negativen PAS, D-PAS und Anti-CEA-Färbungen. Der histopathologische Befund favorisierte in diesem Fall ein Sarkom.

Bei einem Patienten (Code 03683) unterstützen die mässig positive Anti-Thrombomodulin und Anti-Vimentin sowie die negative Anti-CEA-Reaktion die zytomorphologische Diagnose. Als nicht regulär anzusehen wäre in diesem Fall die mässig positive Anti-TPA-Reaktion. Auch hier wurde im histologischen Gutachten keine konkrete Differentialdiagnose angegeben.

Zusammenfassung: Bei 50 % der 12 aufgeführten Fälle sprechen die zytochemischen- bzw. immunzytochemischen Reaktionen eindeutig für das Vorliegen eines diffusen und damit malignen Pleuramesothelioms. In den 6 anderen Fällen kam es zwar zu nicht regulären Reaktionen mit einigen Tumormarkern, dennoch überwiegen die enzym- und immunzytochemischen Reaktionen, die für ein malignes Mesotheliom der Pleura sprechen (siehe auch Tabelle 29, S. 91). Die nicht regulären Reaktionen teilen sich wie folgt auf: 4 x positive Anti-Tissue-Polypeptide Antigen (TPA)-Reaktionen, 2 x negative Anti-Thrombomodulin (Anti-Thr)-Reaktionen sowie eine positive PAS-Reaktion trotz Diastasevorbehandlung.

Lfd. Nr.	Patienten-code	Zytochemische Reaktionen			Immunzytochemische Reaktionen				
		AP	PAS	D-PAS	Vim	CEA	Thr	TPA	HEA
1.	94516	-					++	-	
2.	31544				+			-	
3.	16882					-		+++	
4.	88594	-		-	++		-	+++	
5.	35276	-		+++	+++		+++		
6.	76342							-	-
7.	60985					-	+++	+++	
8.	39878		-	-	+++	-	-		
9.	60047				++		++		
10.	03683				++	-	++	++	
11.	34882				++	-	+++		
12.	84039	-	++		++		++		

Tabelle 29:

Immunzytochemische und zytochemische Reaktionen bei histologischer Diagnose „Mesotheliom D“.

Legende: AP = Alkalische Phosphatase; PAS = Periodic Acid Schiff; D-PAS = Periodic Acid Schiff mit Diastasevorbehandlung; Vim = Anti-Vimentin-Reaktion; CEA = Anti-Carcinoembryonales Antigen-Reaktion; Thr = Anti-Thrombomodulin-Reaktion; TPA = Anti-Tissue-Polypeptide-Antigen-Reaktion; HEA = Anti-Human-Epithelial-Antigen-Reaktion.

In einem Fall konnten wir Dank ausreichendem Materials weitere immunhistochemische sowie molekularbiologische (elektrophoretische Proteinauftrennung und Detektion immunogener Proteine nach Westernblotting) Untersuchungen durchführen. Diese Untersuchungen wurden am Institut für Pathologie des Nordstadtkrankenhauses in Hannover vorgenommen. Als Material stand eine Probeexzision des linken Oberlappens zur Verfügung. Klinisch wurde ein Adenokarzinom vermutet, ein Pleuramesotheliom wurde für weniger wahrscheinlich gehalten. Die immunhistochemischen Reaktionen ergaben nachstehende Ergebnisse. Positive Reaktionen: Anti-HEA (Ber-EP4) und Anti-CEA. Negative Reaktionen: Anti-Cytokeratin 5/6, Anti-Vimentin sowie Anti-HBME1. Die durchgeführten zytochemischen und immunzytochemischen Reaktionen der luftgetrockneten Ausstrichpräparate des Pleuraergusses fielen wie folgt aus: Negativer Nachweis der alkalischen Phosphatase bei mässig positiven Anti-Thrombomodulin und Anti-Vimentin-Reaktionen. Die histopathologische Beurteilung der untersuchten PE des linken Oberlappens lautet Adenokarzinom mittlerer Differenzierung.

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung mittels SDS-PAGE sowie Westernblot und anschließender Detektion immunogener Proteine sind unter Punkt 4.6.3 (S. 102) aufgeführt.

Zyto- und immunzytochemische Reaktionen bei histologischer Diagnose „Mesotheliom E“.

Die histopathologisch-anatomische Untersuchungen der pleuralen Probeexzisionen ergab in 16 Fällen die Diagnose „Mesotheliom E“, d.h. es liegt mit Sicherheit kein Pleuramesotheliom vor. Die Tabelle 30 (siehe S. 93) zeigt eine Übersicht über die zytochemischen und immunzytochemischen Ergebnisse dieser 16 Fälle. Die schattierten Zeilen markieren die zytochemischen bzw. immunzytochemischen Reaktionen, die regulär nicht zu dem zytomorphologisch diagnostiziertem Pleuramesotheliom passen. Nicht markiert sind die Patienten bei denen die PAS-Reaktion positiv ausgefallen ist und eine Diastasevorbehandlung nicht durchgeführt werden konnte, wenn ansonsten alle anderen zytochemische und immunzytochemische Reaktionen die zytomorphologische Diagnose stützen.

Bei einem Patienten (Code 48217) fielen die Anti-Vimentin und die Anti-CEA-Reaktionen negativ aus, die parallel durchgeführte Anti-Thrombomodulin-Färbung zeigte eine leicht positive Reaktion. Die pleuralen Probeexzisionen wurden parallel im Deutschen Mesotheliomregister sowie von einem weiteren Referenzpathologen in Bremen untersucht. Die vom Deutschen Mesotheliomregister gestellte Diagnose lautete „Mesotheliom E“, der Referenzpathologe diagnostizierte ein Pleuramesotheliom.

In einem anderen Fall (Code 63983) zeigte sich eine stark positive PAS-Reaktion, die jedoch nach einer Diastasevorbehandlung reduziert werden konnte. Der Nachweis der alkalischen Phosphatase verlief negativ, die immunzytochemischen Anti-CEA und Anti-Thrombomodulin-Färbungen zeigten eine stark positive Reaktion. Die parallel durchgeführte Anti-Vimentin-Reaktion fiel negativ aus.

Die PAS-Reaktion brachte bei einem weiteren Patienten (Code 35362) trotz einer Diastasevorbehandlung eine mässig positives Ergebnis, der Nachweis der alkalischen Phosphatase verlief negativ. Stark positiv verliefen die Reaktion gegen das Thrombomodulin sowie gegen das Tissue Polypeptide Antigen (TPA). Die Anti-Vimentin-Reaktion fiel mässig positiv aus.

Die zytochemischen und immunzytochemischen Ergebnisse eines weiteren Patienten (Code 56240) passen gut zu der zytomorphologischen Diagnose des diffusen Pleuramesothelioms. Die pleuralen Probeexzisionen wurden parallel im Deutschen Mesotheliomregister sowie von einem weiteren Referenzpathologen in Bochum untersucht. Die vom Deutschen Mesotheliomregister gestellte Diagnose lautete „Mesotheliom E“, der Referenzpathologe diagnostizierte ein Pleuramesotheliom.

Zusammenfassung: In den hier vorliegenden Fällen gab es keine übereinstimmenden zyto- und histopathologischen Diagnosen. Die histopathologische Untersuchungen ergaben die Diagnose „Mesotheliom E“, ein malignes Mesotheliom wird also mit Sicherheit ausgeschlossen. In allen Fällen wurde im Gutachten ein anderer Tumor angegeben. Aus zytologischer Sicht gab es jedoch lediglich in 3/16 untersuchten Fällen (18,75 %) nicht reguläre enzym- und immunzytochemische Reaktionen. Hierzu gehören 1 positive PAS-Reaktion mit Diastasevorbehandlung, 2 negative Anti-Vimentin-Reaktionen, eine stark positive Anti-CEA-Reaktion sowie eine stark positive Anti-TPA-Reaktion. Trotz dieser nicht regulär ausgefallenen Nachweise überwiegen bei den 3 genannten Proben die regulären und damit erwarteten Reaktionen im Sinne eines malignen Mesothelioms.

Lfd. Nr.	Patienten-code	Zytochemische Reaktionen			Immunzytochemische Reaktionen				
		AP	PAS	D-PAS	Vim	CEA	Thr	TPA	HEA
(1)	58472						+++		
(2)	59989						++		
(3)	18532	-	++	-					
(4)	53679		+++				+++		
(5)	48217				-	-	+		
(6)	22321				+++		+++		
(7)	56240	-	++		+		+		
(8)	48612	-	++				++	-	
(9)	66411				+++	-	+++		
(10)	63983	-	+++	-	-	+++	+++		
(11)	55701	-		-	+++		+++		
(12)	09094				+++				
(13)	100464				+				
(14)	35362	-		++	++		+++	+++	
(15)	86257	-	++			-			
(16)	03392	-	+				+	-	

Tabelle 30:

Immunzytochemische und zytochemische Reaktionen bei histologischer Diagnose „Mesotheliom E“.

Legende: AP = Alkalische Phosphatase; PAS = Periodic Acid Schiff; D-PAS = Periodic Acid Schiff mit Diastasevorbehandlung; Vim = Anti-Vimentin-Reaktion; CEA = Anti-Carcinoembryonales Antigen-Reaktion; Thr = Anti-Thrombomodulin-Reaktion; TPA = Anti-Tissue-Polypeptide-Antigen-Reaktion; HEA = Anti-Human-Epithelial-Antigen-Reaktion.

4.6.2 DNA-zytometrische Gesichtspunkte

151 zytomorphologisch diagnostizierte Pleuramesotheliome wurden am Deutschen Mesotheliomregister oder von einem Referenzpathologen anhand von Probeexzisionen bzw. von Operationsgut parallel analysiert. Im Deutschen Mesotheliomregister werden jedoch nur Fälle aufgenommen, bei denen, aufgrund ausreichendem und nicht autolytischem Material, einwandfrei ein Mesotheliom diagnostiziert werden kann. In vielen Fällen wird die Diagnose Mesotheliom A erst am Obduktionsgut festgestellt. In einigen Fällen mussten wir, da das Material für die histopathologische Diagnose Mesotheliom A nicht ausreichte und der Patient deshalb nicht im Mesotheliomregister gemeldet werden konnte, auf einen Referenzpathologen ausweichen. Die Ergebnisse des direkten Vergleiches (Zytologie und Histologie) sind im Einzelnen unter Punkt 4.6 (S. 88 ff.) aufgeführt. Von den insgesamt 151 zytologisch diagnostizierten Pleuramesotheliome konnte in 16 Fällen histologisch kein Tumor nachgewiesen werden (10,6 %). Hierbei sind allerdings 2 Möglichkeiten in Betracht zu ziehen: Zum Einen kann davon ausgegangen werden, dass die Probeexzision der Pleura für die histopathologische Untersuchung einer tumorfreien Lokalität entnommen wurde und die Tumorkomponenten nur im zytologisch untersuchtem Erguss, nicht aber im Gewebe vorhanden waren. Zum Anderen besteht natürlich auch die Möglichkeit der unterschiedlichen Bewertung des unterschiedlichen Materials. Das könnte unter anderem bedeuten, dass die zytopathologische Diagnose überbewertet oder die histopathologische Bewertung „falsch negativ“ im Sinne einer Fibrose oder stark proliferierenden Gewebes ausgefallen ist. Mit der molekularbiologischen Methode der DNA-zytometrischen Untersuchung wird der DNA-Gehalt in den Kernen der zytologisch diagnostizierten, malignen Mesotheliome der Pleura gemessen, um damit gegebenenfalls eine Aneuploidie und damit einen malignen Tumor nachzuweisen (siehe auch Punkt 2.4.1, Schrifttum, S. 25 ff.). Alle 16 Fälle sind im Rahmen dieser Studie entfärbt, nach Feulgen gefärbt, DNA-zytometrisch untersucht, wieder entfärbt und zu guter letzt zur abschließenden Archivierung wieder nach Pappenheim gefärbt worden (siehe auch Abbildung 8, S. 37). Um einen Vergleich ziehen zu können wurden nicht-maligne Pleuraergüsse von 2 Patienten ebenfalls nach Feulgen gefärbt und DNA-zytometrisch untersucht.

Die einzelnen Parameterangaben in den Histogrammauswertungen haben dabei folgende Bedeutung:

MMExkt Referenzzellen:

Gemittelte mittlere Extinktion der Referenzzellen. Sie ist ein Maß für die Dichte der Kerne. Je größer der Wert, um so stärker sind die Kerne gefärbt.

Fehler Referenzzellen:

Fehler der Referenzzellpopulation. Diese Angabe ist eine Verknüpfung aus dem Variationskoeffizient der Referenzzellen und deren Anzahl. Die Größe sollte unter 5% liegen.

VarKoeff:

Variationskoeffizient. Es ist ein statistisches Maß für die Streuung der Zellpopulation.

Mittelwert Diagnosezellen:

Arithmetischer Mittelwert der Diagnosezellen.

2cDI = 2c Deviation Index:

quadratische Abweichung der Diagnosezellen von 2c.

MG = Malignitätsgrad:

Logarithmische Umrechnung des 2cDI.

5cER / 5cEE = 5c Exceeding Rate / Events:

prozentualer Anteil der Zellen über 5 c bzw. deren Anzahl.

9cER / 9cEE = 9c Exceeding Rate / Events:

prozentualer Anteil der Zellen über 9 c bzw. deren Anzahl.

S-Phase:

Prozentualer Anteil der Diagnosezellen zwischen 2.5 c und 3.8 c.

DNA-Index (modal):

Rechnerisch häufigster DNA-Wert durch 2.

DNA-zytometrische Ergebnisse nicht-maligner Pleuraergüsse.

Im ersten Fall konnten 160 Referenzzellen und 70 Diagnosezellen gemessen werden. Die DNA-zytometrische Untersuchung ergab keinen DNA-Gehalt jenseits von 5c bzw. 9c, die Diagnosezellen werden als nicht aneuploid interpretiert. Abbildung 20 (siehe S. 96) zeigt das dazugehörige Histogramm. Die DNA-Parameter im Einzelnen:

Anzahl	Referenzzellen	:	160	
MMExkt	Referenzzellen	:	0,11	
Fehler	Referenzzellen	:	0,53 %	
VarKoeff	Referenzzellen CV	:	6,70 %	
Art	Diagnosezellen	:	ZellType A	
Anzahl	Diagnosezellen	:	70	
MMExkt	Diagnosezellen	:	0,09	
Mittelwert	Diagnosezellen	:	2,64 c	
VarKoeff	Diagnosezellen CV	:	13,45 %	
2cDI	2c Deviation Index	:	0,53 c ²	
MG	Malignitätsgrad	:	0,33	
5cER	>5c Exeeding Rate	:	0,00	5cEE=0
9cER	>9c Exeeding Rate	:	0,00	9cEE=0
S-Phase	>=2,5c<=3,8c	:	74,29 %	Anz=52
5cEE	Interpretation	:	euploid	(nicht polyploid)
9cEE	Interpretation	:	euploid	(polyploid)
Stammlinie		:	2,73c	
DNA Index (modal)		:	1,36	
Stammlinien Interpretation		:	aneuploid	(nicht polyploid)
Stammlinien Interpretation		:	aneuploid	(polyploid)

Tabelle 31: Parameterwerte eines lymphozytären,- mesothelialen,- erythrozytären,- Ergusses.

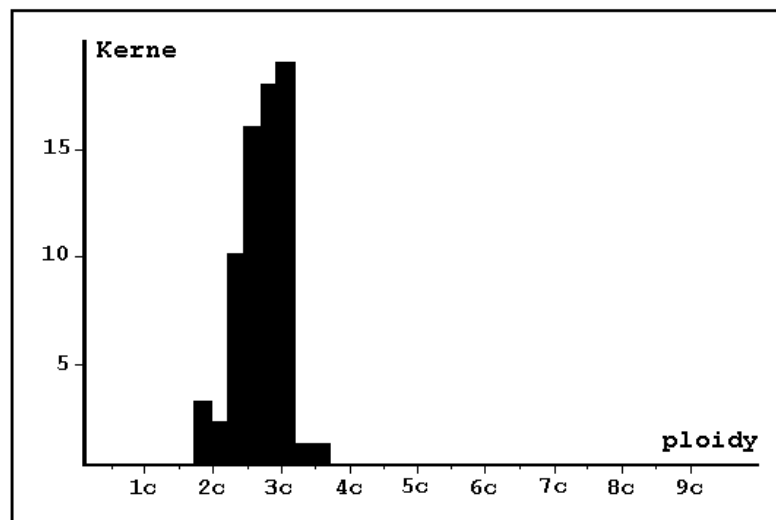


Abbildung 20: Histogramm eines lymphozytären,- mesothelialen,- erythrozytären Ergusses.

In der zweiten DNA-zytometrischen Untersuchung eines granulocytären-, lymphocytären-, mesothelialen (nicht-malignen) Ergusses konnten 122 Referenzzellen und lediglich 28 Diagnosezellen untersucht werden. In keiner Zelle konnte ein DNA-Gehalt jenseits von 5c bzw. 9c gemessen werden. Abbildung 21 (S. 98) zeigt das dazugehörige Histogramm, die Parameterwerte des untersuchten Ergusses sind in der nachfolgenden Tabelle 32 aufgeführt.

Anzahl	Referenzzellen	:	122	
MMExkt	Referenzzellen	:	0,12	
Fehler	Referenzzellen	:	0,86 %	
VarKoeff	Referenzzellen CV	:	9,53 %	
Art	Diagnosezellen	:	ZellType A	
Anzahl	Diagnosezellen	:	28	
MMExkt	Diagnosezellen	:	0,12	
Mittelwert	Diagnosezellen	:	2,69 c	
VarKoeff	Diagnosezellen CV	:	14,93 %	
2cDI	2c Deviation Index	:	0,63 c ²	
MG	Malignitätsgrad	:	0,37	
5cER	>5c Exeeding Rate	:	0,00	5cEE=0
9cER	>9c Exeeding Rate	:	0,00	9cEE=0
S-Phase	>=2,5c<=3,8c	:	71,43 %	Anz=20
5cEE	Interpretation	:	euploid	(nicht polyploid)
9cEE	Interpretation	:	euploid	(polyploid)
Stammlinie		:	2,51c	
DNA Index (modal)		:	1,25	
Stammlinien Interpretation		:	aneuploid	(nicht polyploid)
Stammlinien Interpretation		:	aneuploid	(polyploid)

Tabelle 32: Parameterwerte eines granulocytären- lymphocytären- und mesothelialen Ergusses.

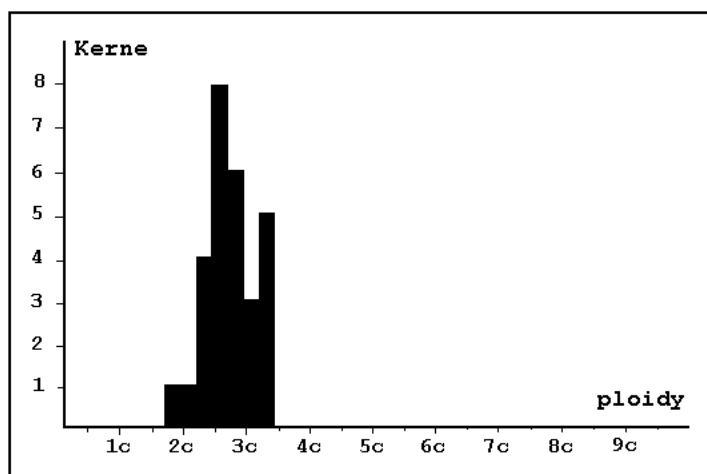


Abbildung 21: Histogramm eines granulozytären-, lymphozytären-, mesothelialen-, Ergusses.

DNA-zytometrische Ergebnisse maligner Ergüsse

16 zytomorphologisch diagnostizierte Pleuramesotheliome, in denen histologisch kein Tumor nachgewiesen werden konnte, sind nach Feulgen gefärbt und anschliessend DNA-zytometrisch untersucht worden. In 6 Fällen handelte es sich um sehr zellarme Ergüsse; die Anzahl der zu messenden Diagnosezellen betrug weniger als 10. Aufgrund der dadurch bedingten, stark erhöhten Fehlerquote wurde, trotz einer 5c Exceeding Rate von mehr als 3 Zellkernen, auf eine Auswertung verzichtet. In allen anderen untersuchten Proben (n = 10) konnte DNA-zytometrisch eindeutig eine Aneuploidie festgestellt werden. Die Anzahl der Zellen mit einer 5c bzw. 9c –Exceeding-Rate variieren in den einzelnen Fällen zwischen 4 bis 34 Zellen. Die DNA-zytometrische Ergebnisse müssen als Tumordiagnose interpretiert werden. In den uns vorliegenden und zytologisch als maligne Mesotheliome eingestuft Ergüssen konnte mittels der DNA-Zytometrie in 10 von 16 untersuchten Fällen ein Tumor diagnostiziert werden. Die Tabelle 33 (S. 99) zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse der DNA-zytometrischen Untersuchungen. Die Abbildungen 22 – 31 zeigen die Histogramme dieser Fälle.

Patienten-code	Anzahl der gemessenen Diagnosezellen	Anzahl der Zellen mit 5c	Anzahl der Zellen mit 9c
27216	6	Keine Auswertung	Keine Auswertung
66175	7	Keine Auswertung	Keine Auswertung
80727	5	Keine Auswertung	Keine Auswertung
12737	8	Keine Auswertung	Keine Auswertung
83693	10	Keine Auswertung	Keine Auswertung
81490	10	Keine Auswertung	Keine Auswertung
16031	21	8	0
40523	70	34	17
105977	37	13	1
88855	28	5	0
14521	33	23	10
57984	22	8	2
16622	19	10	2
50718	29	19	1
88312	36	17	0
49466	30	4	1

Tabelle 33: Anzahl der gemessenen Diagnosezellen, Anzahl der 5c bzw. 9c Exceeding Rate.

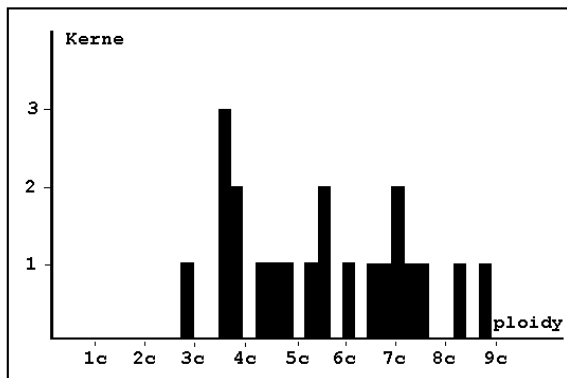


Abbildung 22: Histogramm Fall 16031

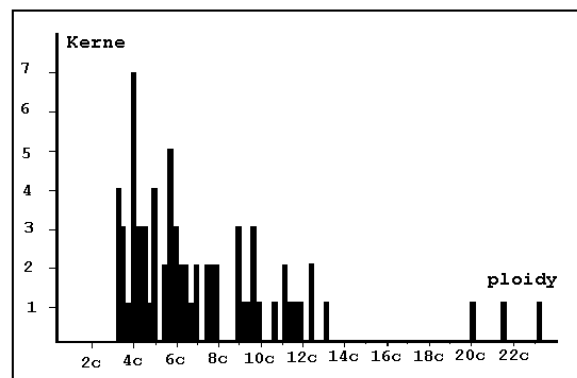


Abbildung 23: Histogramm Fall 40523

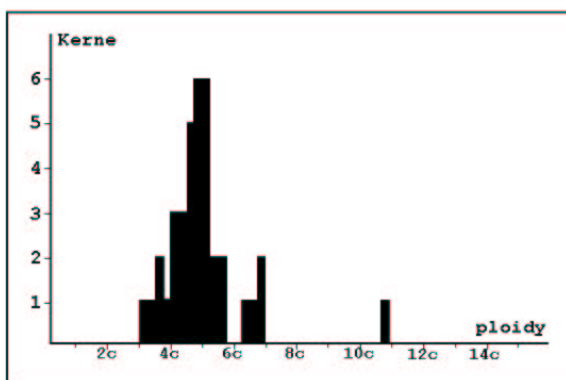


Abbildung 24: Histogramm Fall 105977

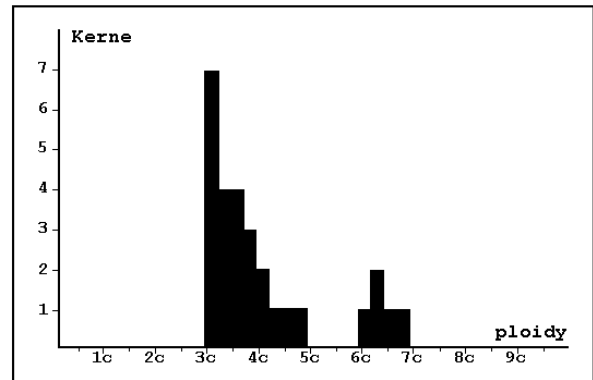


Abbildung 25: Histogramm Fall 88855

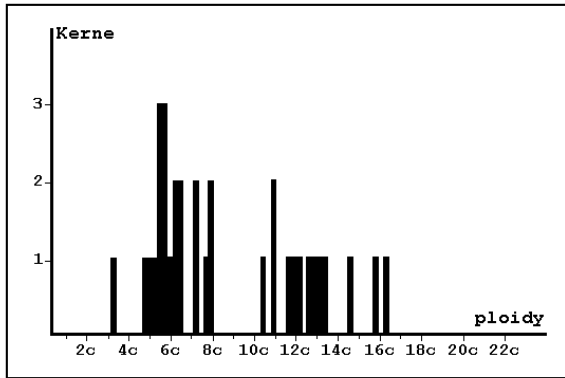


Abbildung 26: Histogramm Fall 14521

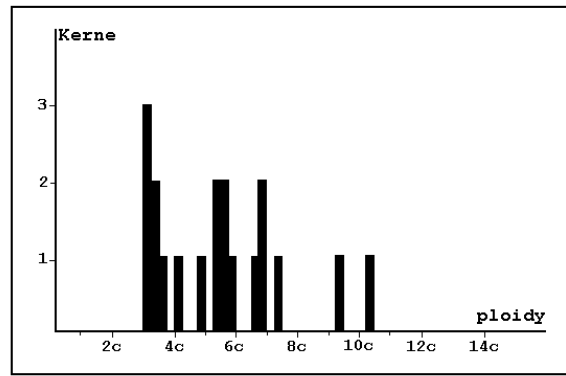


Abbildung 27: Histogramm Fall 57984

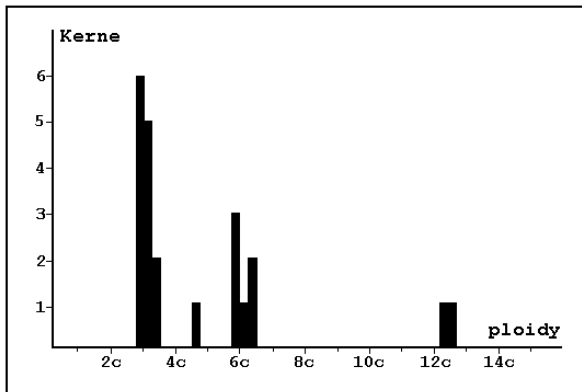


Abbildung 28: Histogramm Fall 16622

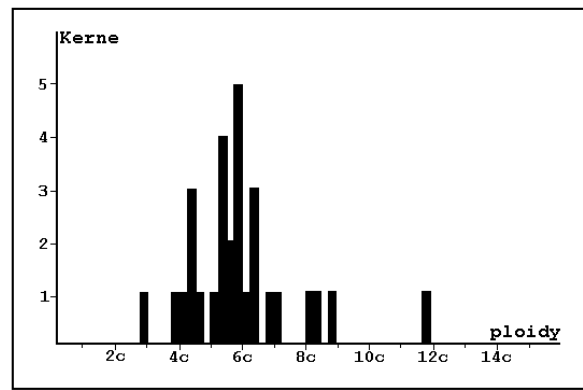


Abbildung 29: Histogramm Fall 50718

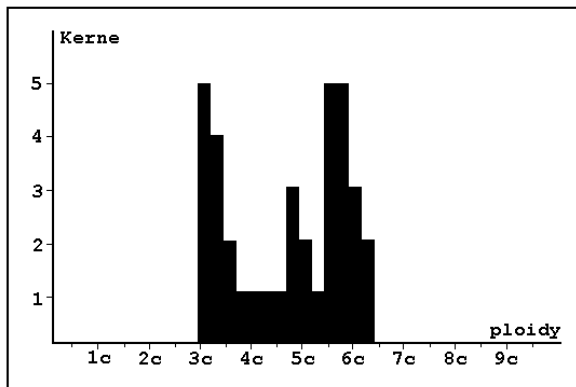


Abbildung 30: Histogramm Fall 88312

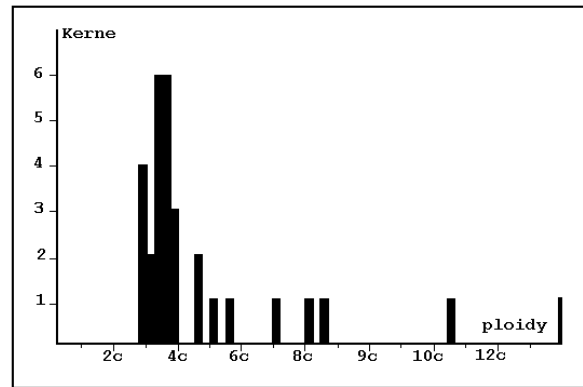


Abbildung 31: Histogramm Fall 49466

4.6.3 Darstellung immunogener Proteine

In 2 Fällen konnten wir, aufgrund ausreichendem Materials, eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE durchführen. Im Westernblot wurden die aufgetrennten Proteine auf NC-Filter transferiert; die immunogenen Proteine wurden anschliessend mit dem monoklonalen Antikörper gegen das Thrombomodulin detektiert und dargestellt. Dieses geschieht, um bei zytologisch und histopathologisch nicht übereinstimmenden Diagnosen (malignes Mesotheliom der Pleura versus „Mesotheliom D“ bzw. „Mesotheliom E“) eine Aussage über die tatsächliche Antigenexpression treffen zu können (siehe auch Abbildung 8, S. 37).

Im ersten Fall (Patientencode 84039) ergaben die enzymzytochemischen und immunzytochemischen Nachweise folgende Reaktionen: Negativer Nachweis der alkalischen Phosphatase bei mässig positiven Anti-Thrombomodulin- und Anti-Vimentin-Reaktionen. Die zusätzlich durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen am Institut für Pathologie des Nordstadtkrankenhauses in Hannover ergaben folgende Reaktionen: Positive Anti-HEA (BerEP4) und Anti-CEA sowie negative Anti-Cytokeratin 5/6, Anti-Vimentin und Anti-HBME1-Reaktionen. Diese Untersuchungen wurden anhand einer Probeexzision des linken Oberlappens durchgeführt. Die histopathologische Diagnose lautet „Mesotheliom D“, vermutlich Adenokarzinom mittlerer Differenzierung. Die ausserdem durchgeführte molekularbiologische Untersuchung des malignen Pleuraergusses zeigte keine Reaktion des Antikörpers gegen das Thrombomodulin-Antigen.

Im zweiten Fall (Patientencode 56240) passten die zytomorphologischen Kriterien gut zu einem malignem Pleuramesotheliom. Die Ergebnisse der enzymzytochemischen und immunzytochemischen Untersuchungen fielen wie folgt aus: Negativer Nachweis der alkalischen Phosphatase bei positiver PAS-Reaktion und positiven Reaktionen gegen das Vimentin- und Thrombomodulin-Antigen.

In der molekularbiologischen Untersuchung konnte das Thrombomodulin-Antigen mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa dargestellt werden. Abbildung 32 zeigt die Reaktion des Antikörpers gegen das Thrombomodulin-Antigen. Der monoklonale Antikörper wurde in einer 1:100-Verdünnung eingesetzt. Die Molekulargewichte der Marker-Proteine sind am linken Abbildungsrand, das Molekulargewicht des immunogenen Proteins ist am rechten Abbildungsrand angegeben.

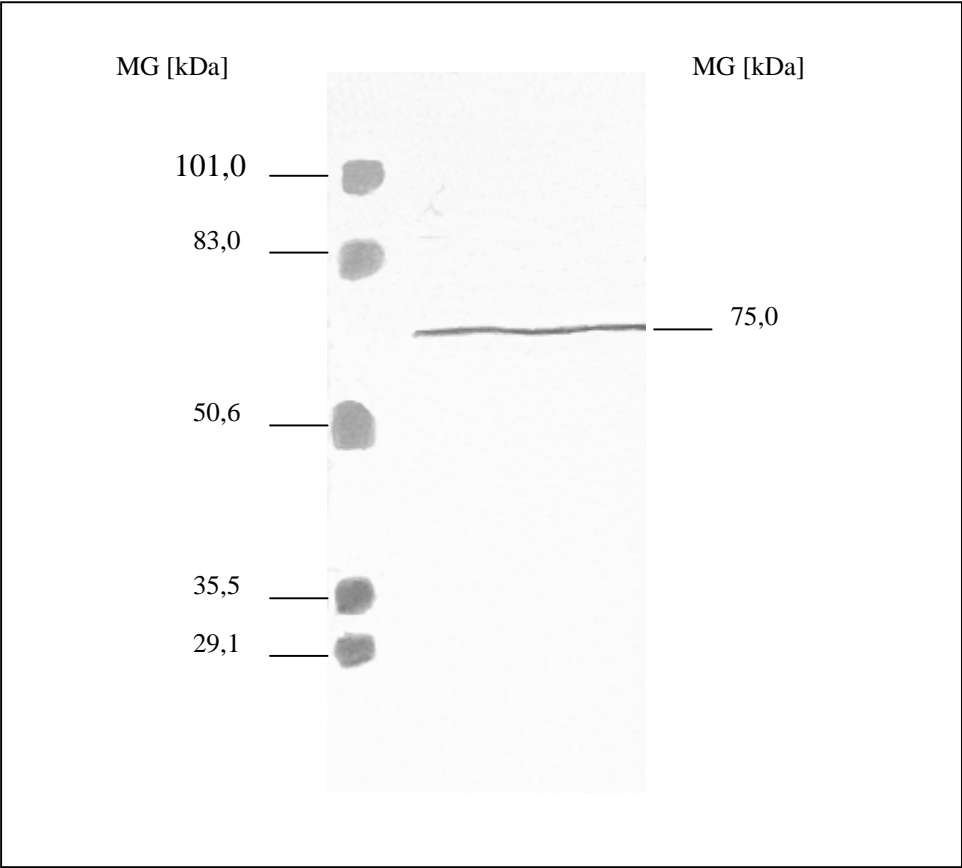


Abbildung 32: Westernblot, Reaktion eines immunogenen Proteins mit Anti-Thrombomodulin nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-PAGE.

5. Diskussion

5.1 Allgemeine Gesichtspunkte

Die pathologische Referenz (Deutsche Mesotheliomregister) als Kontrollfunktion muss in dieser Studie kritisch betrachtet werden. Zum Einen liegen unterschiedliche Materialien vor. In dieser Studie handelt es sich hauptsächlich um Ergüsse (109/151), die zytopathologisch untersucht wurden. Bei den histopathologischen Untersuchungen handelt es sich hingegen in 100% der Fälle um Probeexzisionen. Zum Anderen sind entsprechend den Aufgaben des Registers asbestexponierte Mesotheliompatienten im Vergleich zu nicht exponierten deutlich überrepräsentiert. Ebenso muss davon ausgegangen werden, dass Kinder und Jugendliche sowie Frauen aufgrund einer fehlenden beruflichen Asbestexposition im Register deutlich unterrepräsentiert sind.

Weiterhin werden im Deutschen Mesotheliomregister nur Fälle aufgenommen, bei denen, aufgrund ausreichendem und nicht autolytischem Material, einwandfrei ein Mesotheliom diagnostiziert werden kann. In vielen Fällen wird die Diagnose Mesotheliom A am Obduktionsgut festgestellt. Der zytopathologische Befund wird dagegen hauptsächlich an Ergüssen der serösen Höhlen erhoben, der wiederum häufig das erste für eine Untersuchung zur Verfügung stehende Material ist. Um trotzdem eine histopathologische Referenz aufweisen zu können, mussten in einigen Fällen andere Pathologen konsultiert werden, die auch an kleineren Gewebeproben eine Befundung vornehmen konnten.

5.2 Altersverteilung

Der Altersmedian der Patienten mit zytopathologischen und histologischen Mesotheliombefund (Patientnekollektiv B) beträgt 66 Jahre, der Mittelwert liegt bei 65,58 (\pm 10,23) Jahren. Das deutsche Mesotheliomregister gibt einen Altersmedian im Gesamtkollektiv von 57 Jahren an (*Brockmann und Müller, 1992*). Der Median des Operationsgutes liegt bei 55 Jahren, der des Obduktionsgutes bei 62 Jahren. Der Altersmedian des britischen Mesotheliomregisters liegt zwischen dem 60. und dem 65. Lebensjahr (*Greenberg und Lloyd Davies, 1974*). Der geringe Unterschied zu den Altersmedianen des deutschen und britischen Mesotheliomregisters ist durchaus zu vernachlässigen; der in dieser Studie ermittelte

Altersmittelwert der Patienten mit diffusem und damit malignem Mesotheliom stimmt somit mit den oben angegebenen Ergebnissen des deutschen und britischen Mesotheliomregisters überein.

5.3 Geschlechtsverteilung

Das Mesotheliomkollektiv mit zytologisch und histologisch übereinstimmendem Befund (n = 107, Patientenkollektiv B) umfasst 101 Männer und lediglich 6 Frauen. Das starke Überwiegen des männlichen Geschlechts muss auf eine ursächliche Asbestexposition zurückgeführt werden. Dieses begründet sich darin, dass in den sogenannten Staubberufen fast ausschließlich Männer tätig sind. 90 % aller Mesotheliome sind mit einer Asbestexposition assoziiert (*Müller, 1984*).

Aufgrund des zytologisch zu untersuchendem Materials (Ergüsse und Abtupfpräparate von Probeexzisionen) konnte keine Lungenstaubanalyse durchgeführt werden, um die beschriebene Hypothese beweisen zu können. Eine Analyse asbestassoziierter Lungenveränderungen konnte nur eingeschränkt mittels einer Berliner-Blau-Reaktion durchgeführt werden. Dabei konnten in lediglich 2 Fällen Asbestfasern in geringer Anzahl nachgewiesen werden. Diese quantitative Untersuchung ist aufgrund der geringen Trefferquote in Ergüssen sowie Tupfpräparaten von Probeexzisionen zu vernachlässigen und deshalb nur bei begründetem Verdacht (starke Pigmentspeicherungen) anzuordnen.

5.4 Zytochemische Reaktionen

5.4.1 Alkalische Phosphatase

Mit Wirkung vom 1. Januar 1977 ist das maligne Mesotheliom als Folge eines stattgehabten Asbestkontaktes als Berufskrankheit zu entschädigen. Aufgrund versicherungsmedizinischer Aspekte wird sowohl für den Betroffenen als auch für epidemiologische Fragestellungen eine frühzeitige und korrekte Diagnose gefordert. Bei der schwierigen Differentialdiagnose zwischen malignem Mesotheliom und sekundären Pleurakarzinosen kann der Nachweis der alkalischen Phosphatase hilfreich sein. Laut den Ergebnissen mehrerer Forschungsprojekte spricht ein positiver Reaktionsausfall der alkalischen Phosphatase gegen das Vorliegen eines Mesothelioms (*Bollinger et al. 1989, Coffin und Dehner 1992, Wick et al. 1987 und 1988*).

Im Vergleich mit den vom Deutschen Mesotheliomregister bestätigten Mesotheliomdiagnosen, liegen die negativen, zytochemischen AP-Reaktionen in unserer Studie bei einem Prozentsatz von 98,48 %. Von den 20 Positivkontrollen (primäre Adenokarzinome des Bronchus) zeigten 17 dabei eine positive Reaktion, das entspricht einem Prozentsatz von 85 %.

Insgesamt sind in dieser Studie 87 zytologisch diagnostizierte Pleuramesotheliome auf den Nachweis der alkalischen Phosphatase überprüft worden. 86 Fälle zeigten dabei eine negative Reaktion, was einem Prozentsatz von 98,85 % entspricht. Nur in einem Fall ergab der zytochemische Nachweis der alkalischen Phosphatase eine stark positive Reaktion. Die zytomorphologischen Kriterien sprachen hier eindeutig für das Vorliegen eines malignen Pleuramesothelioms und gegen eine sekundäre Pleurakarzinose, weshalb wir in diesem Fall die zytochemische Reaktion untergeordnet bewertet haben. Die histopathologische Untersuchung der Pleura-PE ergab ein epitheliales Pleuramesotheliom, der Fall ist im Deutschen Mesotheliomregister gemeldet.

Der Einsatz dieser enzymcytochemischen Untersuchung kann als Zusatzinformation bei der Differentialdiagnose Pleuramesotheliom / sekundäre Pleurakarzinose mit einer berechneten Sensitivität von 85 % und einer Spezifität von 98,48 % hilfreich sein. Die in unserer Studie ermittelte Sensitivität und Spezifität für den Nachweis der alkalischen Phosphatase stimmen mit den Ergebnissen anderer Studien überein. *Bollinger (1989)* und *Coffin und Dehner (1992)* errechneten ebenfalls Sensitivitäten zwischen 85 und 100 %. Die Problematik dieser

Nachweisreaktion liegt in diesem Fall aber in der Möglichkeit einer falschpositiven Reaktion (positiver Nachweis eines sicheren, malignen Pleuramesothelioms) mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 zu 66. Hier muss den zytomorphologischen Kriterien während der Primärbegutachtung eindeutig Vorrang eingeräumt werden. Sprechen die zytomorphologischen Kriterien für das Vorliegen eines malignen Mesothelioms, so sollte, bei einem positiven Nachweis der alkalischen Phosphatase, die enzymzytochemische Untersuchung unbedingt wiederholt werden oder durch den Einsatz einer immunzytochemischen Reaktion überprüft werden.

5.4.2 PAS/D-PAS

Für die Auswertung einer PAS-Reaktion zur Differenzierung zwischen malignen Pleuramesotheliomen und sekundären Pleurakarzinosen sind alleine die intrazellulären Reaktionen zu bewerten. Feingranuläres, PAS-positives, nach Diastasevorbehandlung PAS-negatives, intrazelluläres Glykogen kann die Diagnose eines Pleuramesothelioms bestätigen (*Klima et al., 1976 und Suzuki et al., 1976*). Dagegen schließt intrazellulärer, PAS-positiver und Diastase-resistenter, epithelialer Schleim ein Mesothelium aus (*Kannerstein et al., 1977b; Adams und Unni, 1984; Cibas et al., 1987*). Eine extrazelluläre PAS-positive Reaktion lässt sich auf zelluläre Bestandteile zurückführen, die einen hohen Anteil an Mucopolysacchariden aufweisen (*Rogli et al., 1987*). Da diese vor allem in der Basalmembran lokalisiert sind, werden die extrazellulären Reaktionen nicht für die Differentialdiagnose malignes Mesothelium der Pleura versus sekundäre Pleurakarzinose herangezogen.

In dieser Studie liegen 60 Fälle vor, in denen die zytologische Diagnose eines malignen Pleuramesothelioms mit der histologischen Befundung übereinstimmen und eine enzymzytochemische PAS-Untersuchung durchgeführt wurde (Patientenkollektiv B). 54 mal konnte mittels einer PAS-positiven-Reaktion feingranuläres Glykogen, jedoch keine intrazelluläre Schleimvakuolen in den Pleuramesotheliomen nachgewiesen werden. Die 20 untersuchten Adenokarzinome dagegen zeigten in allen Fällen (20/20) PAS-positiven Schleim. Bezüglich des Nachweises von epithelialen Schleims erweist sich die PAS / D-PAS-Reaktion für die Differentialdiagnose zwischen malignem Pleuramesothelium und sekundäre Pleurakarzinose mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % als sehr hilfreich. Schwieriger erweist sich die zytochemische PAS / D-PAS Untersuchung auf Glykogen. Bei 5 zytologisch sowie histologisch bestätigten Pleuramesotheliomen konnte kein intrazelluläres

Glykogen nachgewiesen werden. Bei 3 Adenokarzinomen (3/20) hingegen fiel dieser Nachweis positiv aus. Hier muss erwähnt werden, dass der Nachweis von intrazellulärem Glykogen wegen des vorherrschendem PAS-positiven, epithelialem Schleims, vor allem auch bei den Adenokarzinomen des Bronchus, sehr problematisch ist und davon ausgegangen werden kann, dass die Zahl an glykogenhaltigen und damit PAS-positiven Adenokarzinomen tatsächlich sehr viel höher liegt. Die ermittelten Werte für die Sensitivität (90,0 %) und die Spezifität (85,0 %) zeigen, dass ein hoher Gehalt an intrazellulärem Glykogen zwar eher für das Vorliegen eines malignen Mesothelioms der Pleura sprechen, die Wahrscheinlichkeit einer „falsch-positiven“ Reaktion bei Adenokarzinomen jedoch sehr hoch liegt. Die Auswertung dieses enzymzytochemischen Nachweises muss deshalb sehr detailliert erfolgen und auch hier hat die zytomorphologische Begutachtung des Materials zunächst Vorrang.

Im Patientenkollektiv A, also dem Gesamtkollektiv aller Patienten mit zytologisch diagnostiziertem, malignem Mesotheliom der Pleura, sind insgesamt 75 Proben enzymzytochemisch auf eine PAS-Reaktion untersucht worden. In 7 Fällen wurde weder intrazelluläres Glykogen noch epithelialer Schleim in Form einer positiven PAS-Reaktion nachgewiesen. Aus den oben ermittelten Werten für die Sensitivität und Spezifität im Patientenkollektiv B lässt sich folgern, dass das Fehlen von intrazellulären Glykogen den Nachweis eines malignen Mesothelioms nicht ausschliesst, das Fehlen epithelialem Schleims die Diagnose eines malignen Pleuramesothelioms jedoch bestätigt. 6 von 7 Fällen sind tatsächlich auch histopathologisch bestätigt worden (siehe auch Patientenkollektiv B), in einer Probe (Patientencode 16031) wurde histopathologisch kein Tumor diagnostiziert. Der letztgenannte Fall wurde in dieser Studie einer DNA-zytometrischen Untersuchung (siehe Punkt 4.6.2, S. 94) unterzogen. Das Ergebnis dieser DNA-zytometrischen Untersuchung deutet mit einer 5c- Exceeding-Rate von 8 Zellen auf eine Aneuploidie und damit auf das Vorliegen eines malignen Tumors. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Probeexzision für die histopathologische Paralleluntersuchung an einer tumorfreien Stelle entnommen wurde und deshalb keine Positiv-Diagnose erstellt werden konnte. Trotzdem wird von der Richtigkeit der aufgestellten Hypothese ausgegangen.

Im Patientenkollektiv A wurde bei 42 Proben zunächst eine PAS-Reaktion durchgeführt, anschliessend erfolgte eine PAS-Reaktion mit einer Diastasevorbehandlung. 37 mal fiel die anschliessende PAS-Reaktion negativ aus; das intrazelluläre Glykogen konnte durch die Diastasevorbehandlung reduziert werden. Wie bereits erwähnt bestätigt der Nachweis von Glykogen ein malignes Pleuramesotheliom. Lediglich 5 Pleuraergüsse zeigen trotz einer

Diastasevorbehandlung PAS-positives Material. Hierbei handelt es sich um feingranuläre Pigmente, die als intrazelluläres Glykogen gedeutet werden. Intrazellulärer Schleim ist in den Präparaten nicht festzustellen. Da intrazelluläres Glykogen durch eine Diastase- oder Amylasevorbehandlung jedoch reduziert wird, ist anzunehmen, dass die Behandlung mit der Diastase nicht ausgereicht hat, um die erwartete Reduktion festzustellen. Die letztgenannten fünf zytologisch diagnostizierten Mesotheliome mit D-PAS resistenten Glykogennachweis wurden histologisch wie folgt bewertet: 2 x Mesotheliom A, 1 x Mesotheliom B, 1 x Mesotheliom D und in einem Fall Mesotheliom E. Die D-PAS-positiven Reaktionen passen bei den histologisch nicht bestätigten Mesotheliomen (Mesotheliom D und E) zu den 3 pulmonalen Adenokarzinomen (n = 20), bei denen ebenfalls PAS-positives Glykogen nachgewiesen werden konnte. Es muss folglich davon ausgegangen werden, dass es sich in beiden Fällen um eine sekundäre Pleurakarzinose mit PAS-positiven feingranulären Glykogen handelt.

Glykogen ist wasserlöslich. In wässriger Lösung (Formalin) fixierten, histologischen Präparaten wird Glykogen oftmals herausgelöst, die PAS-Reaktion ist hier nur eingeschränkt beurteilbar. Dieses ist bei den luftgetrockneten Ausstrichpräparaten nicht der Fall, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Wertigkeit einer zytochemischen PAS-Reaktion grösser als bei einer histochemischen Untersuchung ist. In einigen Studien konnte in lediglich 50 von 100 formalinfixierten Pleuramesotheliomen glykogenhaltiges Material gefunden werden (*Brockmann, 1992*); in dieser Studie mit luftgetrockneten Ausstrichpräparaten hingegen wurde in 52 von 57 Fällen intrazelluläres Glykogen nachgewiesen. Die Wertigkeit einer zytochemischen PAS-Untersuchung ist somit eindeutig höher einzustufen als der histochemisch geführte Nachweis.

Zusammenfassung: Mit einer Sensitivität von 90 % und einer Spezifität von 85 % ist die enzymzytochemische PAS-Reaktion bei der Differentialdiagnose gut geeignet. Bedingung ist allerdings eine detaillierte Begutachtung des PAS-positiven Materials. Das Fehlen von PAS-positiven, intrazellulären Glykogen spricht nicht gegen das Vorliegen eines malignen Mesothelioms der Pleura. Intrazytoplasmatisches, PAS-positives Glykogen kann in 15 % der Fälle auch bei pulmonalen Adenokarzinomen nachgewiesen werden. Hier muss vor allem die zytomorphologische Begutachtung im Vordergrund stehen. Das Fehlen von intrazytoplasmatischen Schleimvakuolen spricht eindeutig für das Vorliegen eines malignen Mesothelioms der Pleura.

5.5 Immunzytochemische Reaktionen

5.5.1 Allgemeine Gesichtspunkte

Wie wichtig eine korrekte Differentialdiagnose zwischen einem malignen Pleuramesotheliom und einer sekundären Pleurakarzinose ist, ist bereits in den einführenden Kapiteln dieser Arbeit besprochen worden. Für die Differentialdiagnose sind die zytochemischen sowie immunzytochemischen Nachweise als Standardverfahren in der Routine inzwischen etabliert.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wertigkeit der in der zytologischen Routine eingesetzten Tumormarker und die Wertigkeit der zytomorphologischen Untersuchung anhand histologischer Referenzen zu überprüfen (siehe auch Punkt 1.1 Problemstellung, S. 4). Wichtig für die Ergebnisse und den Vergleich mit anderen Studien ist dabei die Einhaltung identischer Versuchsbedingungen. Dieses stellt ein Problem dar, denn im Gegensatz zu den bekannten Studien wurden die immunzytochemische Untersuchungen ausnahmslos an luftgetrockneten Präparaten durchgeführt. Ein Vergleich mit den immunhistochemischen Verfahren, die ja eine andere Gewebepreparation aufweisen sowie ein Vergleich mit den alkohol- oder formalinfixierten Materialien anderer zytologischer Studien ist also nur im geringen Maße möglich.

Weiterhin stellt sich die Frage, wie eine negative Reaktion eines Tumormarkers zu bewerten ist. Ist das entsprechende Antigen tatsächlich nicht nachweisbar oder sind andere Faktoren — z.B. Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion — für den negativen Ausgang des immunzytochemischen Nachweisverfahrens anzunehmen? Insbesondere sollte dies bei zytomorphologisch und histologisch unterschiedlichen Enddiagnosen eingehend diskutiert werden.

5.5.2 Anti-Thrombomodulin

Das Thrombomodulin gehört zu den transmembranen Glykoproteinen. Der hier verwendete Antikörper DAKO-TM 1009 bindet an die epidermal growth factor (EGF)-Domänen 4-6. Die Reaktion ist daher mit der Zellmembran assoziiert, das Reaktionsprodukt ist oftmals als hauchzarte Linie an der Zelloberfläche zu erkennen.

In dieser Studie wurden an 73 zytopathologisch und histologisch übereinstimmenden Diagnosen (Patientenkollektiv B) eines malignen Pleuramesothelioms ein Thrombomodulinnachweis geführt. In 71 Fällen fiel der immunzytochemische Nachweis positiv aus, 2 Untersuchungen verliefen negativ. Die Sensitivität der Thrombomodulin-Reaktion beträgt somit 97,26 %, die ermittelte Spezifität beträgt 100 %. Die für dieses Kollektiv errechneten Werte demonstrieren eine hohe Zuverlässigkeit dieses Tumormarkers hinsichtlich der Differentialdiagnose malignes Mesotheliom der Pleura versus einer sekundären Pleurakarzinose.

Etwas anders sieht es im Patientenkollektiv A (Proben aller Patienten mit zytologisch diagnostiziertem Mesotheliom der Pleura und einer immunzytochemischen Untersuchung gegen das Thrombomodulin) aus. Hier wurden 103 zytologisch diagnostizierte Pleuramesotheliome auf eine Thrombomodulin-Expression untersucht. 99 Fälle zeigten eine positive Anti-Thrombomodulin-Reaktion, die 4 negativen Reaktion wurden histologisch als Mesotheliom B (n = 2) und als Mesotheliom D (n = 2) bewertet. Es ergeben sich somit 2 „falsch-negative“ Reaktionen (siehe auch Patientenkollektiv B). Die histologisch als Mesotheliom E bewerteten Fälle (n = 12) zeigten alle immunzytochemisch eine Thrombomodulin-Expression. Geht man von der Richtigkeit dieser histopathologischen Befunde aus, so liegt die Rate der „falsch-positiven“ Reaktionen des Tumormarkers damit bei 12. Die parallel immunzytochemisch analysierten 20 Adenokarzinome des Bronchus zeigten allerdings keine Reaktion mit dem Anti-Thrombomodulin Antikörper. Es wurden also auf der einen Seite in 11,65 % aller untersuchten Proben ein „falsch-positiver“ Nachweis, auf der anderen Seite – das sind die 20 Adenokarzinome des Bronchus, die als Negativkontrolle eingesetzt wurden - keine „falsch-positiv“-Rate gefunden. In der Literatur wird eine gelegentliche Thrombomodulin-Expression bei adenosquamösen Karzinomen der Lunge erwähnt (*Ordonez, 1997*). Histopathologisch wurde bei diesen 12 Proben jedoch kein einziges Adenosquamöses Karzinom diagnostiziert, lediglich bei 5 Patienten wurde der Befund eines Adenokarzinoms des Bronchus erhoben. In allen anderen Fällen wurde auf das Vorliegen von Nieren- und Kolonkarzinome sowie Schilddrüsenkarzinome erkannt. Der Anteil adenosquamöser Karzinome am Gesamtvorkommen aller Lungentumoren wird in der Literatur mit 1-2 % angegeben. Die Wahrscheinlichkeit eines Durchbruchs eines solch seltenen Karzinoms in die Pleura muss zudem noch weit geringer sein, so dass ich diesen Erklärungsansatz speziell für die grosse Anzahl dieser Fälle (n = 12) für nicht relevant halte. *Ordonez (1998)* erkannte in seinen Studien, dass Tumordegenerationen und Nekrosen bei

Adenokarzinomen des Bronchus eine starke, granuläre Anfärbung als mögliche Folge einer passiven Absorption des Thrombomodulin-Antigens aus dem Serum bewirken. Diese Färbung ist jedoch nicht als wirkliche Thrombomodulin-Expression anzusehen, die sich bekanntlich als membran-assoziierte Färbung manifestiert. In allen 12 Materialien sind auf zytopathologischer Seite jedoch sowohl starke, granuläre Anfärbungen der Tumorzellen als auch hauchzarte Linien an der Zellmembran der malignen Zellen als positive Reaktion des Thrombomodulin Antikörpers zu beobachten. Anscheinend bewirkt diese passive Aufnahme des Thrombomodulin-Antigens aus dem Serum auch gleichzeitig eine Linie an der Zellmembran, nämlich dort wo die Absorption passiert. Dieses Phänomen erschwert die Interpretation von Anti-Thrombomodulinnachweisen. Die von uns errechnete Sensitivität (97,26 %) im Patientenkollektiv B spricht jedoch für eine hohe Affinität des Antikörpers, zumal diese Zahl auf einen hohen Stichprobenumfang ($n = 73$) von malignen Pleuramesotheliomen in dieser Studie basiert. Die in der Literatur angegebenen Sensitivitäten und Affinitäten für diesen Antikörper (siehe Tabelle 2, S. 19) variieren zwischen 49 und 100%. Die geringe Anzahl der Stichproben der malignen Pleuramesotheliome, im Durchschnitt beläuft sich der Stichprobenumfang der in Tabelle 2 aufgeführten Studien bei $n = 35$, ist jedoch als sehr kritisch und als nur bedingt aussagefähig zu beurteilen. Die Schwierigkeit liegt somit nicht in einer geringen Sensitivität bzw. Affinität des Antikörpers, sondern allein in der Interpretation des Reaktionsergebnisses. Die zytomorphologischen Kriterien sollten auch hier vorwiegend für das Vorliegen eines malignen Mesothelioms sprechen. Die positive immunzytologische Reaktion mit dem Thrombomodulin-Antikörper sollte deutlich an der Zellmembran zu erkennen sein; eine überwiegend starke granuläre Anfärbung mit untergeordnetem Reaktionsmuster an der Zellmembran ist nach den Ergebnissen dieser Studie nicht zur eindeutigen Diagnostik geeignet. Bei einem quantitativen Nachweis einer immunologischen Reaktion mit dem Thrombomodulin-Antikörper ist eine Interpretation des Ergebnisses somit nicht möglich; er ist daher für den quantitativen Nachweis nicht geeignet.

5.5.3 Anti-Vimentin

Wie bereits im einführenden Kapitel beschrieben ist Vimentin ein Intermediärfilamentprotein mit einem Molekulargewicht von 57 kDa. Es ist in nichtepithelialen, nichtneuronalen Zellen *in situ* sowie in den meisten Zelltypen *in vitro* enthalten. Zu den Zellen, die nach maligner

Transformation Vimentin exprimieren gehören u.a. auch die malignen Mesotheliome (*Churg, 1985*). Einige Autoren fanden bei der Mehrzahl der Mesotheliome eine starke Vimentin-Expression (*Churg, 1985*), andere dagegen berichteten über eine nur geringe Sensitivität des Vimentin-Antikörpers bei malignen Pleuramesotheliomen (*Ordonez, 1989*). Der Einsatz dieses Antikörpers wird bis zum heutigen Zeitpunkt sehr kontrovers diskutiert.

In dieser Studie sind 54 Fälle auf eine Vimentin-Expression untersucht worden, bei denen sowohl die zytomorphologische als auch die histologische Enddiagnosen im Sinne eines malignen Pleuramesothelioms übereinstimmten (Patientenkollektiv B). 32 der untersuchten Mesotheliome zeigten dabei einen positiven Reaktionsausfall, 22 Mesotheliome zeigten eine negative Reaktion. Die 20 Adenokarzinome wiesen in 7 Fällen eine positive, 13 eine negative Vimentin-Reaktion auf. Als Validitätskontrolle diente je einmal ein Präparat mit Kapillarendothelien. Die Sensitivität für eine Vimentin-Expression bei Pleuramesotheliomen liegt demnach lediglich bei 59,26 %, die Spezifität bei 65,0 %. In einigen Studien kommen die Autoren (*Churg, 1985*) zu dem Schluss, dass mit zunehmender Fixierungsdauer eine Abschwächung der Vimentin-Reaktion zu erwarten ist. Die Validitätskontrolle mit gleicher Fixierungsdauer zeigte jedoch eine starke Vimentin-Expression.

Die Ergebnisse dieser Studie bezüglich der Adenokarzinome mit positiver Vimentin-Reaktion sind mit anderen Studien vergleichbar (*Jasani et al., 1985*). Auch *Upton und seine Mitarbeiter (1986)* wiesen eine Antigenexpression bei Adenokarzinomen nach, zudem konnten sie eine Erhöhung der Positivitätsrate in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades aufzeigen.

Die geringe Sensitivität des Vimentin-Antikörpers und die positiven Vimentin-Nachweise bei den Adenokarzinomen des Bronchus als Ergebnisse dieser Studie, zeigen, dass der Vimentin-Antikörper nur eine geringe Aussagekraft bezüglich einer Differentialdiagnose Pleuramesotheliom versus sekundäre Pleurakarzinose aufweist. Unterstützt werden diese Resultate von den oben bereits erwähnten Autoren, die auf eine Abhängigkeit der Positivitätsrate vom Differenzierungsgrad erkannten sowie bei Schilddrüsenkarzinomen (*Miettinen et al., 1984*), Ovarialkarzinomen (*Moll, 1986*) und Nierenzellkarzinomen (*Holthöfer et al., 1983*) ebenfalls eine Vimentin-Expression nachweisen konnten. Es wird hier postuliert, diesen Antikörper in der Routinediagnostik für die Differentialdiagnose malignes Mesotheliom der Pleura versus sekundäre Pleurakarzinose nicht einzusetzen.

5.5.4 Anti-Human-Epitheliales Antigen (Anti-HEA)

Der Klon Ber-EP4 des humanen epithelialen Antikörpers (HEA) reagiert mit 2 Glykoproteinen von 34 und 49 kDa, welches von Epithelzellen auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Einige immunzytochemische Untersuchungen mit diesem Antikörper zeigten eine hohe Sensitivität für Adenokarzinome in Gewebsschnitten, Zytospins und Ausstrichpräparaten mit einer ausgeprägten, positiven Reaktion (*Bailey et al., 1996*).

Im Patientenkolektiv B, also in allen Fällen mit zyto- und histopathologisch übereinstimmenden Befunden im Sinne eines malignen Mesothelioms der Pleura und durchgeführten immunzytochemischen Reaktionen gegen das HE-Antigen, sind in unserer Studie 22 Fälle auf eine Antigen-Expression untersucht worden. 21 maligne Mesotheliome der Pleura zeigten dabei eine negative Reaktion mit dem HEA- Antikörper, in einem Fall fiel die Reaktion stark positiv aus. Die errechnete Spezifität des Antikörpers bei der Erkennung maligner Pleuramesotheliome beträgt 95,45 %. Die Reaktionen der immunzytochemischen Untersuchungen an den 20 Adenokarzinomen fielen alle positiv aus. Die Sensitivität des Antikörpers für Adenokarzinome liegt somit bei 100 %. Die hohe Sensitivität für Adenokarzinome stimmt mit der Studie von *Hastka und Pfiester (1988)* überein, die außerdem eine positive Reaktion des Antikörpers mit Mammakarzinomen, Lungentumoren, Magenkarzinomen, Pankreaskarzinomen und Kolonkarzinomen nachweisen konnten.

Insgesamt wurden 26 zytologisch diagnostizierte Pleuramesotheliome auf eine HEA-Expression untersucht (Patientenkollektiv A). 25 Fälle zeigten eine negative Reaktion mit dem Antikörper, lediglich ein Mesotheliom wies eine stark positive Reaktion auf. Der letztgenannte Fall ist als Pleuramesotheliom im deutschen Mesotheliomregister gemeldet (Mesotheliom A). Histologisch ist ein Mesotheliom als Mesotheliom der Gruppe D bewertet worden, die immunzytochemische Reaktion mit dem HEA- Antikörper fiel negativ aus.

Die in der Literatur angegebene Reaktivität des HEA-Antikörpers mit malignen Mesotheliomen variiert zwischen 0 und 26 %, der errechnete Durchschnitt liegt bei 9,13 %. Der Stichprobenumfang dieser Studien liegt im Durchschnitt bei 48,55 Pleuramesotheliomen. Die in dieser Studie errechnete Reaktivität des Antikörpers mit den histologisch gesicherten Mesotheliomen liegt bei 4,54 %, das Ergebnis stimmt mit den in der Literatur erhobenen Werten überein. Dabei liegt der Stichprobenumfang dieser Studie unterhalb des oben errechneten Durchschnitts. Die Sensitivität des Antikörpers für die Reaktivität mit

Adenokarzinomen variiert in der Literatur zwischen 56 und 100 %, der Durchschnitt liegt bei 82, 85 %. Der Stichprobenumfang liegt durchschnittlich bei 89,36 Adenokarzinomen. Die in dieser Studie errechnete Sensitivität liegt bei 100 % und stimmt somit mit den Studien von *Latza et al. (1990)*, *Kuhlman et al. (1991)*, *Ascoli et al. (1995)*, *Doglioni et al. (1996)* und *Ordonez (1998)* überein. Dabei ist der im Vergleich niedrige Stichprobenumfang dieser Studie zu berücksichtigen.

Abschliessend lässt sich aus den Ergebnissen dieser Studie folgern, dass das humane epitheliale Antigen regelmässig von Adenokarzinomen exprimiert wird, hingegen die Antigenexpression bei Pleuramesotheliomen sehr selten vorkommt. Der von uns verwendete Klon trägt bei der Differentialdiagnose Pleuramesotheliom versus sekundäre Pleurakarzinose wesentlich bei.

5.5.5 Anti-Carcino Embryonic Antigen (Anti-CEA)

Das carcinoembryonale Antigen ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 180 kDa. Der zur Analyse benutzte Klon II-7 des carcinoembryonalen Antikörpers gehört in die Epitopgruppe GOLD 1 und weist damit eine hohe Spezifität für das Antigen auf. In klinischen Studien allerdings wird die Wertigkeit des Antikörpers kontrovers diskutiert. Während *Wang und seine Mitarbeiter (1979)* über eine 100%ige CEA-Expression bei Adenokarzinomen und eine 0%ige Expression bei malignen Pleuramesotheliomen berichteten, ergaben die Ergebnisse von *Ordonez (1989)* eine Reaktivität des Antikörpers von 15-45 % mit malignen Pleuramesotheliomen.

In dieser Studie wurden 29 Fälle, die sowohl zytomorphologisch als auch histologisch übereinstimmend als malignes Pleuramesotheliom bewertet wurden (Patientenkollektiv B), auf eine CEA-Expression immunzytochemisch untersucht. 26 mal fiel die immunzytochemische Reaktion der untersuchten Pleuramesotheliome negativ aus, in 2 Fällen ergab die Untersuchung eine leicht positive, in einem Fall eine mässig positive Reaktion. Bei den 20 Adenokarzinomen konnte in 17 Fällen eine positive Reaktion und damit eine CEA-Expression nachgewiesen werden. Die errechnete Spezifität für die histologisch bestätigten Pleuramesotheliome beträgt hier 89,65 % (richtig negative Ergebnisse), die Sensitivität für die histologisch bestätigten Adeno-Karzinome beträgt 85 % (richtig positive Ergebnisse).

Insgesamt wurden in dieser Studie 42 zytologisch diagnostizierte Pleuramesotheliome auf eine CEA-Expression untersucht. 38 mal konnte keine Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden. In 2 Fällen fiel die Reaktion positiv aus (1 x mässig positiv, 1 x stark positiv). Die histologische Untersuchung ergab 1 x die Diagnose eines Mesothelioms der Gruppe A und 1 x die Diagnose eines Mesothelioms E.

Die in dieser Studie errechneten Sensitivitäten für den CEA-Antikörper bestätigen nicht die von Wang und seinen Mitarbeitern publizierten Werte. Diese Diskrepanzen in den Ergebnissen unterstreichen die Interpretationsschwierigkeiten der immunzytochemischen Ergebnisse in der Literatur. Materialaufarbeitung und der immunzytochemische Prozess sind in der Zytopathologie nur wenig standardisiert, die unterschiedlichen Resultate sind daher nur eingeschränkt vergleichbar. Die Studie von Wang und seinen Mitarbeitern muss hier sehr kritisch betrachtet werden. Zum Einen fixierten sie das Material mit Formalin; dieses führt zu einer Zunahme von unspezifischen Hintergrundfärbungen und zu einer starken Schrumpfung der Zellen. Beides erschwert die Identifikation der Zellen und die damit verbundene, korrekte Interpretation des Resultates. Zum Anderen wurde in den hier im Schriftum erwähnten Studien nur eine geringe Anzahl von malignen Mesotheliomen untersucht (12 bzw. 16). Aufgrund der hier benutzten, luftgetrockneten Präparate und der grösseren Anzahl von immunzytochemisch untersuchten Pleuramesotheliome sind die Ergebnisse höher zu bewerten als die Studien von Wang und Ordonez. Kreuzreaktionen bzw. unspezifische Reaktionen sind zudem eher in den Studien von Wang und Ordonez zu erwarten, da der hier benutzte Klon (II-7) in die Epitopgruppe GOLD 1 gehört und damit eine hohe Spezifität aufweist. Als Fazit dieser vorliegenden Ergebnisse schliesst eine positive Reaktion des CEA-Antikörpers ein malignes Mesotheliom weitgehend aus. Auch wenn bei 3 von 20 Adenokarzinomen kein carcinoembryonales Antigen nachzuweisen ist, trägt der Antikörper wesentlich zu der Differentialdiagnose malignes Pleuramesotheliom versus sekundäre Pleurakarzinose bei.

5.5.6 Anti-Tissue Polypeptide Antigen

Tissue Polypeptide –Antigene werden von verschiedenen Tumoren exprimiert, vor allem ist eine signifikante Erhöhung des Antigens bei Harnblasenkarzinomen, Prostatakarzinom sowie beim Ovarialkarzinom festzustellen. Das TPA zählt zu der Gruppe der Zytokeratine, einer Gruppe von Intermediärfilamenten mit mittlerweile an die 30 verschiedenen Polypeptiden, die

das sogenannte Cytoskelett bilden und sich teilweise unterschiedlichen Epithelien zuordnen lassen (Moll, 1988). Der in dieser Studie benutzte Antikörper weist Kreuzreaktionen gegen die Epitope 8,18 und 19 der Zytokeratine auf. Über die Wertigkeit des Tumormarkers bei der Differentialdiagnose Pleuramesotheliom versus sekundäre Pleurakarzinose sind nur vereinzelt Publikationen erschienen. Tokuyama et al. (1997) untersuchten 16 Pleuramesotheliome auf eine TPA-Expression; bei 14 Patienten wurde immunhistochemisch das TP-Antigen im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen.

In dieser Studie wurden an 27 Fällen ein immunzytochemischer Nachweis auf eine TPA-Expression geführt. Alle 27 Fälle stimmten sowohl in den zytomorphologischen als auch in den histologischen Diagnosen im Sinne eines malignen Pleuramesothelioms überein (Patientenkollektiv B). 18 Pleuramesotheliome zeigten dabei eine TPA-Expression, 9 Fälle waren TPA-negativ. Von 20 Adenokarzinomen zeigten 13 eine positive Reaktion, 7 Nachweise verliefen negativ.

Insgesamt wurden 36 zytomorphologisch diagnostizierte Pleuramesotheliome auf eine TPA-Expression untersucht. 17 Reaktionen ergaben eine negative Reaktion, 19 eine positive.

Insgesamt ist in dieser Studie der Umfang von positiven Nachweisen bei malignen Mesotheliomen der Pleura fast genauso groß, wie bei den Adenokarzinomen des Bronchus. Der positive Nachweis von TP-Antigenen bei malignen Mesotheliomen ist wahrscheinlich auf die dem Tumor begleitende Entzündung und Reizung des mesothelialen Epithels zurückzuführen. Bekannt ist dieser hohe Level an TP-Antigenen bei nicht-malignen Erkrankungen wie Hepatitis, Leberzirrhose oder Diabetes. Nach Beendigung der akuten Phase ist jedoch ein Abklingen des TPA-Levels zu verzeichnen. Die hier erhobenen Ergebnisse mit einem relativ hohen Anteil an TPA-positiven Adenokarzinomen und TPA-positiven Mesotheliomen sprechen eindeutig dagegen, dass der immunzytochemische TPA-Nachweis zur Differentialdiagnose Pleuramesotheliom versus sekundäre Pleurakarzinose beitragen kann.

5.5.7 Schlussfolgerungen der immunzytochemischen Ergebnisse

Die zytochemischen Untersuchungen haben im Hinblick auf eine Differentialdiagnose Pleuramesotheliom versus sekundäre Pleurakarzinose einen hohen Stellenwert. Eine negative Reaktion der alkalischen Phosphatase sowie der negative Nachweis von epithelialeem Schleim

mittels einer PAS-Reaktion deuten auf ein Vorliegen eines malignen Pleuramesothelioms. Der Nachweis von intrazytoplasmatischen Glykogen mittels der zytochemischen PAS-Reaktion, die nach einer Diastasevorbehandlung negativ verläuft, ist aufgrund der 5 PAS-negativen Reaktionen bei bestätigten Pleuramesotheliomen und positiver Glykogennachweise bei 3 Adenokarzinomen nur bedingt aussagekräftig.

Weitere Zusatzinformationen können jedoch die immunzytochemischen Untersuchungen liefern. Nach den vorliegenden Ergebnissen weisen ein positiver Thrombomodulinnachweis sowie eine negative HEA (BerEP4)-Reaktion mit einer hohen Sensitivität auf ein Vorliegen eines malignen Pleuramesothelioms. Negative Thrombomodulin- und positive HEA (BerEP4)-Nachweise deuten dagegen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf eine sekundäre Pleurakarzinose im Sinne eines Adenokarzinoms hin. Eingeschränkt verwertbar ist die Antikörperreaktion gegen das Carcinoembryonale Antigen (CEA), die Sensitivität bei dem Nachweis eines Adenokarzinoms liegt bei 85% und damit unterhalb der Sensitivitäten für die Thrombomodulin bzw. HEA-Expression. Die monoklonalen Antikörper gegen das Vimentin und das Tissue Polypeptide Antigen (TPA) können nach den vorliegenden Ergebnissen nicht wesentlich zur Differentialdiagnose beitragen.

Unerwartete negative immunzytochemische Ergebnisse sollten wiederholt werden und anhand mitgeführter Validitätskontrollen begutachtet werden.

Zusammenfassend wird ein Kombinationskonzept vorgeschlagen, welches die zytochemischen Nachweise der alkalischen Phosphatase und einer PAS-Reaktion beinhaltet. Zusätzlich wird empfohlen, aufgrund der hohen Sensitivitäten in den Ergebnissen dieser Studie, den Thrombomodulin- und / oder den HEA (BerEP4)-Antikörper einzusetzen.

Basis der zytologischen Untersuchung sollte allerdings die morphologische Untersuchung bleiben. Es sollte darauf geachtet werden, dass die zytomorphologischen Kriterien überwiegend für das Vorliegen eines malignen Mesothelioms der Pleura sprechen. Die Wertigkeit der morphologischen Untersuchung wird unter Punkt 5.8 diskutiert.

5.6 DNA-zytometrische Untersuchungen

An 10 Pleuraergüssen wurde eine DNA-zytometrische Untersuchung durchgeführt. In allen 10 Fällen ist zytomorphologisch ein malignes Pleuramesotheliom diagnostiziert worden, histologisch konnte dagegen kein Tumor nachgewiesen werden. Die Auswertung der DNA-Histogramme unterstützen die zytopathologische Diagnose in allen 10 Fällen. Die Messungen ergaben jeweils eine 5c bzw. 9c-Exceeding-Rate von mindestens 5 Zellen, was für ein Vorliegen einer Aneuploidie spricht.

Zu vermuten ist das tatsächliche Vorliegen von malignen Prozessen im Frühstadium. Diese Prozesse werden histologisch aufgrund der geringen Grösse des Tumors nur sehr schwer erfasst. Die DNA-zytometrische Untersuchung stellt somit ein geeignetes Verfahren dar, mit dem maligne Prozesse in Ergüssen selbst im Frühstadium diagnostiziert erfasst werden können. Leider handelt es sich in diesen Fällen zwar um zytomorphologisch und DNA-zytometrisch nachgewiesene, maligne Prozesse, histologisch konnte jedoch kein Tumor nachgewiesen werden. Um eine generelle Aussage treffen zu können, müssten die Patienten in eine Langzeitstudie aufgenommen werden, damit die hier aufgestellte Hypothese später auch durch die Histopathologie bestätigt werden kann. Dieses ist aber im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass die Probeexzisionen der Pleura für die histopathologische Untersuchung an den falschen Stellen entnommen wurden. Das würde jedoch bedeuten, dass für die histopathologische Untersuchungen eine einzige Probeexzision für eine sichere Diagnose nicht ausreicht, zumal der Umfang der Probeexzision bereits ein Mindestumfang haben muss (siehe auch Punkt 5.1, Seite 103), um eine Aussage überhaupt treffen zu können. Dieses würde wiederum eine Zusatzbelastung - aufgrund der Invasivität der Prozedur - für den Patienten bedeuten. Dieser Diskussionsansatz wird eingehend unter Punkt 5.8 (Vergleich zytologischer und histologischer Diagnosen) besprochen.

5.7 Molekularbiologische Untersuchung im Westernblot

In 2 Fällen wurde jeweils eine elektrophoretische Proteinauftrennung der malignen Pleuraergüsse im SDS-PAGE durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden im Westernblot auf NC-Filter transferiert und die Reaktionen mit dem monoklonalen

Thrombomodulin-Antikörper anschliessend optisch dargestellt. In beiden Fällen deuteten sowohl die zytomorphologischen Kriterien als auch die enzymzytochemischen und immunzytochemischen Untersuchungen auf ein malignes Pleuramesotheliom: Negativer Nachweis der alkalischen Phosphatase bei positiver PAS-Reaktion und positiven Anti-Vimentin und Anti-Thrombomodulin Nachweisen.

In Fall 1 (Patientencode 84039) konnte nach der elektrophoretischen Auftrennung des malignen Ergusses und Transfer der Proteine auf NC-Filter keine Reaktion mit dem eingesetzten Thrombomodulin-Antikörper nachgewiesen werden. Das Thrombomodulin-Antigen wurde in diesem Fall nicht exprimiert. Aufgrund der bereits vorher berechneten Sensitivität des Antikörpers und der ausserdem durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen anhand einer Probeexzision des linken Oberlappens des Patienten am Institut für Pathologie des Nordstadtkrankenhauses in Hannover ist in diesem Fall ein Adenkarzinom als sekundäre Pleurakarzinose anzunehmen.

In Fall 2 (Patientencode 56240) konnte jedoch eine Reaktion mit dem Thrombomodulin-Antikörper nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht des detektierten Proteins liegt bei 75 kDa und entspricht dem Molekulargewicht des Thrombomodulin-Antigens. In diesem Fall muss von einem malignen Pleuramesotheliom ausgegangen werden, zumal neben der Diagnose „Mesotheliom E“ des Deutschen Mesotheliomregisters, ein Referenzpathologe die Diagnose „Mesotheliom B“ gestellt hat.

5.8 Vergleich zytologischer und histologischer Diagnosen

Wie Eingangs bereits beschrieben, muss die pathologische Institution als Kontroll- und Referenzfunktion für diese Studie kritisch betrachtet werden. Zum Einen sind die Materialien, die für eine jeweilige Untersuchung zur Verfügung stehen, sehr unterschiedlich. Zytopathologisch werden hauptsächlich Ergüsse untersucht. Dies ist das erste Material, welches bei Auftreten eines Malignoms zur Verfügung steht und untersucht werden kann. Die Histologie untersucht hauptsächlich Probeexzisionen, also Gewebeproben von bestimmter Größe; das Stadium des malignen Prozesses muss also bereits deutlich fortgeschritten sein. Zudem werden im Deutschen Mesotheliomregister nur Fälle registriert, bei denen,

entsprechend den Aufgaben des deutschen Mesotheliomregisters, eine zweifelsfreie Befundung möglich ist. Autolytische und zu kleine Proben werden ausgeschlossen.

In 107 von insgesamt 151 Fällen stimmten die zytologischen und histologischen Diagnosen überein (70,86 %). In 12 Fällen favorisierte der histologische Befund eine sekundäre Pleurakarzinose, ein Mesotheliom konnte jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden (Mesotheliom D, 7,95 %). Keine Übereinstimmungen in den Ergebnissen der zytologischen und histologischen Befunden gab es in 10,6 % der Fälle (Mesotheliom E). 16 mal konnte histologisch kein Tumor nachgewiesen werden.

Die 16 zytomorphologisch diagnostizierte Pleuramesotheliome, in denen histologisch kein Tumor nachgewiesen werden konnte, sind nach Feulgen gefärbt und anschliessend DNA-zytometrisch untersucht worden.

6 mal wurde auf eine Auswertung, aufgrund der zu geringen Anzahl an zu messenden Diagnosezellen, verzichtet. In allen anderen Fällen konnte eine Auswertung erfolgen. In diesen 10 Fällen spricht die Auswertung des DNA-Histogramm für das Vorliegen einer Aneuploidie, d. h. in allen 10 DNA-zytometrisch untersuchten Ergüssen sind jeweils mindestens 5 Zellen mit einer 5c bzw. 9c-Exceeding-Rate gemessen worden. In den genannten Ergüssen muss aufgrund der Ergebnisse der DNA-zytometrischen Untersuchungen, der zytochemischen und immunzytochemischen Nachweisverfahren und der zytomorphologischen Untersuchungen ein maligner Prozess unbedingt angenommen werden. Da dieser Prozess nicht histologisch erfasst wurde, müssen zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden:

1. Es ist zu vermuten, dass es sich in diesen Fällen um einen malignen Prozess im Frühstadium handelt. Der Prozess kann aufgrund der geringen Grösse histologisch nicht erkannt werden, im Erguss sind jedoch vereinzelt Tumorzellen eindeutig nachweisbar.

2. Es besteht die Möglichkeit, dass die Probeexzisionen den falschen Stellen entnommen wurden. Dieses würde jedoch wieder bedeuten, dass für die histopathologische Untersuchung eine grössere Anzahl von Probeexzisionen benötigt wird, um eine sichere Diagnose stellen zu können. Eine Probeexzision reicht somit nicht aus, um einen malignen Prozess histologisch mit der gleichen Wertigkeit wie der Zytopathologie auszuschliessen.

Beide hier aufgestellten Thesen widersprechen jedoch der unter Punkt 1.1 (Problemstellung, S. 4) aufgeführten Anforderung an immer kleineren Proben sichere Diagnosen zu stellen. Der Vorteil der zytopathologischen Untersuchung liegt hier also eindeutig in der Früherkennung

von malignen Prozessen durch die Möglichkeit der Untersuchung des früh auftretenden Ergusses. Ein weiterer Vorteil liegt in der Methodik des Eingriffs. Um den Erguss zu gewinnen reicht eine Punktion aus. Die Gewinnung der Probeexzision mit entsprechender Grösse für die histopathologische Untersuchung ist – zumal die Proben an mehreren Stellen entnommen werden müssen, um eine hohe Wertigkeit in der Befundung zu erzielen – stärker invasiv als die Punktion, der Patient wird deutlich stärker durch den Eingriff belastet.

Die Beantwortung der Fragestellung wie es mit der Treffsicherheit der zytopathologischen Diagnose bezüglich der Differenzierung zwischen einer sekundären Pleurakarzinose und einem malignen Mesotheliom der Pleura aussieht, gelingt wie folgt: Von den 151 zytopathologischen Diagnosen wurden 70,86 % (n = 107) histologisch bestätigt. In 18,54 % ergab die histopathologische Untersuchung eine sekundäre Pleurakarzinose (Mesotheliom D = 12; Mesotheliom E = 16). Die Treffsicherheit liegt hier eindeutig auf Seiten der histopathologischen Untersuchung. Dabei müsste allerdings mit einbezogen werden, dass die Diagnosen nur an auserwähltem Material (nicht autolytisch und geeigneter Grösse) vorgenommen wurde und die Überprüfbarkeit der histologischen Diagnose nicht gegeben ist (bei der Diagnose „Mesotheliom D“ wird keine Angaben über die Histogenese des Tumors gemacht).

In dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass mit der zytopathologischen Untersuchung frühzeitiger maligne Prozesse erkannt werden, als dies histopathologisch möglich wäre. Die Wertigkeit bezüglich der Differenzierung zwischen einem Adenokarzinom und einem malignen Pleuramesotheliom liegt, obwohl hier der Erguss und nicht die direkte Tumorprobe untersucht wird, bei 70,86 %. Auf der Basis dieser Studienergebnisse wäre somit eine stärkere Einbindung der zytopathologischen Untersuchung vorzuschlagen. Die Anforderung der Kliniker sichere Diagnosen an immer kleineren Proben zu stellen, könnte damit mittels der zytopathologischen Untersuchung entsprochen werden.

6. Zusammenfassung

Das maligne Pleuramesotheliom ist ein seltener Tumor, dessen Vorkommen eng mit einer stattgehabten Asbestexposition assoziiert ist. Mesotheliome werden seit der Verordnung vom 01. Januar 1977 als Berufskrankheit anerkannt und entsprechend finanziell abgegolten. Die hierfür zuständigen Berufsgenossenschaften fordern daher von den Pathologen eine exakte Diagnosestellung. Die Differenzierung zwischen malignen Pleuramesotheliomen und sekundären Pleurakarzinosen, also Tumoren, die in die Pleura metastasiert sind, ist jedoch aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit im histologischen Schnittpräparat problematisch. Aufgrund der diffusen, nicht lokalisierten Lage der Tumoren und des oftmals stark nekrotisierten Materials kann ein korrekter, histopathologischer Befund an den meist sehr kleinen Proben in vielen Fällen erst gar nicht erfolgen.

Eine alternative Methode die Diagnose „malignes Pleuramesotheliom“ zu stellen, wäre die zytopathologische Untersuchung, also die morphologische Untersuchung einzelner Zellen im Pleuraerguss. Durch eine einfache Punktion wird die Ergussflüssigkeit gewonnen, Tumorzellen können dann, nach entsprechender Färbung, lichtmikroskopisch erkannt werden. Diese Methode ist jedoch bezüglich der Anerkennung von malignen Pleuramesotheliomen als Berufskrankheit nicht etabliert, für den endgültigen Befund, muss derzeit die zytologische Diagnose immer noch durch die Histopathologie bestätigt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, molekularbiologische-, immunologische- und DNA-zytometrische Verfahren zu entwickeln, um die malignen Tumoren der Pleura (primäre Pleuramesotheliome und sekundäre Pleurakarzinosen) im Erguss qualitativ und quantitativ zu charakterisieren. Anhand dieser Charakterisierung und dem direkten Vergleich mit den parallel erstellten histologischen sowie zytologischen Befunden soll festgestellt werden, ob die zytologische Untersuchungsmethode zu einer Verbesserung bei der Differenzierung zwischen einem malignen Pleuramesotheliom und einer sekundären Pleurakarzinose beitragen kann.

Im Rahmen der experimentellen Untersuchungen wurden enzymzytochemische, immunologische, molekularbiologische sowie DNA-zytometrische Verfahren erarbeitet, um die Tumorzellen von 151 malignen Ergüssen zu charakterisieren. Für die immunologische Charakterisierung standen acht monoklonale Antikörper zur Verfügung. Enzymzytochemische Verfahren wurden zum Nachweis von Zellbestandteilen sowie zum

Nachweis von Enzymaktivitäten geführt. Die Auswertung dieser spezifischen Reaktionen erfolgte qualitativ am Präparat. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde ein Kombinationskonzept erarbeitet, welches den Nachweis der intrazellulären Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie den Nachweis intrazellulären Glykogens umfasst. Der zusätzliche Einsatz eines Thrombomodulin- und / oder eines HEA (BerEP4)-Antikörpers verbessert die Sensitivität dieser qualitativen Nachweise.

Ein Teil der vorhandenen Ergüsse wurden zur Charakterisierung der Tumoroberflächenantigene elektrophoretisch im SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels Westernblot auf Nitrocellulose-Filter transferiert und immunologisch detektiert. Im Westernblot konnte ein immunogenes Protein mit einem Molekulargewicht von 75 kDa dargestellt werden. Die Darstellung des Thrombomodulin-Antikörpers bestätigt die zytopathologische Diagnose eines malignen Mesothelioms. In einem weiteren Fall konnte keine Reaktion mit dem Thrombomodulin-Antikörpers dargestellt werden; hier ist das Vorliegen eines Adenokarzinoms anzunehmen.

Zeitgleich wurden pleurale Probeexzisionen derselben Patienten vom deutschen Mesotheliomregister in Bochum durch Herrn Prof. Dr. Müller histologisch analysiert. Durch den direkten Vergleich der zyto- und histopathologisch gestellten Diagnosen mit den Ergebnissen der Tumorcharakterisierung wurden die Sensitivitäten und Spezifitäten der zytopathologischen Methode errechnet. Im direkten Vergleich gab es in 107 von 151 Fällen eine Übereinstimmung in den Diagnosen im Sinne eines malignen Pleuramesothelioms. In weiteren 12 Fällen favorisierte die histopathologische Diagnose eher eine sekundäre Pleurakarzinose (Mesotheliom D), In jeweils 16 Proben konnte histopathologisch eine sekundäre Pleurakarzinose bzw. kein Tumor diagnostiziert werden.

Um bei zytopathologisch und histologisch stark differenten Diagnosen („Vorliegen eines malignen Tumors“ gegenüber „kein Tumor nachweisbar“) dennoch eine Entscheidung zu treffen, wurde das quantitative DNA-zytometrische Verfahren spezifisch auf das Messen von Zellen im luftgetrockneten Ausstrich von Pleuraergüssen entwickelt und ein Standard erarbeitet. Aufgrund der vorgenommenen DNA-zytometrischen Untersuchungen an 10 möglichen Proben konnte eine Aneuploidie und somit das Vorliegen eines malignen Tumors nachgewiesen werden, obwohl histopathologisch kein Tumor diagnostiziert wurde.

Die Wertigkeit der zytopathologischen Untersuchung für die Treffsicherheit der Diagnose bezüglich der Differenzierung zwischen einer sekundären Pleurakarzinose und einem malignen Mesotheliom der Pleura liegt bei mindestens 70 %, die Treffsicherheit der

histopathologischen Untersuchung liegt höher. Allerdings können die histopathologischen Diagnosen nur an ausgewähltem Material (das Material darf nicht autolytisch und zu klein sein) vorgenommen wurden. Zudem konnte die histopathologische Diagnose in dieser Studie nur in Einzelfällen durch einen Referenzpathologen überprüft werden (bei der Diagnose „Mesotheliom D“ wird z.B. keine Angaben über die Histogenese des Tumors gemacht). Die Vorteile der zytopathologischen Untersuchung liegen in der Früherkennung von malignen Prozessen durch den bereits früh auftretenden Erguss sowie der geringeren Invasivität der Probenentnahme. Die Anforderung an die Pathologie sichere Diagnosen an immer kleineren Proben vorzunehmen kann durch die Zytologie entsprochen werden. In diesem Bereich ist also eine stärkere Zusammenarbeit der beiden unterschiedlichen Untersuchungsverfahren zur gegenseitigen Ergänzung anzuraten.

7. Literaturverzeichnis

- Achatzy-R. et al.:** The diagnosis, therapy and prognosis of diffuse malignant mesothelioma. *Eur. J. Cardio-thorac. Surg.*; 3: 445-448; 1989.
- Adams-V.I., Unni-K.K.:** Diffuse malignant mesothelioma of pleura. Diagnostic criteria based on an autopsy study. *Am. J. Clin. Pathol.*; 82: 15-23; 1984.
- Altmannsberger-M. et al.:** Mesenchymale Tumormarker. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*; 70: 51-63; 1986.
- Ascoli-V. et al.:** Platelet-Derived Growth Factor Receptor Immunoreactivity in Mesothelioma and Nonneoplastic Mesothelial Cells in Serous Effusions. *Acta Cytol.*; 39: 613-622; 1995.
- Ascoli-V. et al.:** The diagnostic value of thrombomodulin immunolocalization in serous effusions. *Arch. Pathol. Lab. Med.*; 119: 1136-1140; 1995.
- Atay-Z., Topalidis-T.:** Zytodiagnostik der serösen Höhlen. *Atlas und Lehrbuch. W. Papst Verlag, Lengerich, Berlin, Prag, Riga 1994.*
- Attanoos-R.L., Goddard-H., Gibbs-A.R.:** Mesothelioma-binding Antibodies: Thrombomodulin, OV 632 and HBME-1 and their use in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Histopathol.*; 29: 209-215; 1996.
- Azumi-N., Battifora-H.:** The distribution of vimentin and keratin in epithelial and non-epithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin- and alcohol-fixed tumors. *Am. J. Clin. Pathol.*; 88: 286-296; 1987.
- Bailey-M.E. et al.:** Ber-EP4 for Differentiating Adenocarcinoma from Reactive and Neoplastic Mesothelial Cells in Serous Effusions. *Acta Cytol.*; 40: 1212-1216; 1996.
- Barberis-M.C.P. et al.:** Calretinin: A selective marker of normal and neoplastic mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol.*; 41: 1757-1761; 1997.
- Bollinger-D.J. et al.:** Peritoneal malignant mesothelioma versus serous papillary adenocarcinoma. A histochemical and immunohistochemical comparison. *Am. J. Surg. Pathol.*; 13 (8): 659-670; 1989.
- Brockmann-M.:** Malignes diffuses Pleuramesotheliom. *Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften (Hrsg.); 1992.*
- Brenner-J.B., Sordillo-P.P.:** Malignant Mesotheliomas Of The Pleura: Review of 123 Patients. *Cancer*; 49: 2431-2435; 1982.
- Brown-R.W. et al.:** Multiple-Marker Immunohistochemical Phenotypes Distinguishing Malignant Pleural Mesothelioma from Pulmonary Adenocarcinoma. *Hum. Pathol.*; 24: 347-354; 1993.

Buley-I.D., et al.: Expression of intermediate filament proteins in normal and diseased thyroid glands. *J. Clin. Pathol.*; 40: 136-142; 1987.

Burck-H.-C.: Histologische Technik. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 1973.*

Burnette-W.N.: „Westernblotting“: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112; 195-203; 1981.

Cardozo-P.L.: A critical evaluation of 3.000 cytologic analysis – of pleural fluid, ascites fluid and pericardial fluid. *Acta Cytol.*; 10: 455-460; 1966.

Churg-A.: Immunohistochemical staining for vimentin and keratin in malignant mesothelioma. *Am. J. Surg. Pathol.*; 9: 360-365; 1985.

Cibas-E.S., Corson-J.M., Pinkus-G.S.: The Distinction of Adenocarcinoma from Malignant Mesothelioma in All Blocks of Effusions: The Role of Routine Mucin Histochemistry and Immunohistochemical Assessment of CEA-Antigen, Keratin Proteins, Epithelial Membrane Antigen and Milk Fat Globule-Derived Antigen. *Hum. Pathol.*; 18: 67-74; 1987.

Clover-J., Oates-J., Edwards-C.: Anti-cytokeratin 5/6: A positive marker for epitheloid mesothelioma. *Histopathol.*; 31: 140-143; 1997.

Coffin-C.M., Dehner-L.D.: Mesothelial and related neoplasms in children and adolescents: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of eight cases. *Ped. Pathol.*; 12: 333-347; 1992.

Colby-T.V., Koss-M.N., Travis-W.D.: Atlas of tumor pathology. Third series. Fascicle 13: Tumors of the lower respiratory tract. *Armed Forces Institute of Pathology; 1995.*

Collins-C.L., et al.: Thrombomodulin Expression in Malignant Pleural Mesothelioma and Pulmonary Adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.*; 141: 827-833; 1992.

DeAngelis-M., et al.: Immunocytochemical staining of serous effusions with the monoclonal antibody Ber-EP4. *Cytopathol.*; 3: 111-117; 1992.

Dejmek-A., Brockstedt-U., Hjerpe-A.: Optimization of a battery using nine immunocytochemical variables for distinguishing between epithelial mesothelioma and adenocarcinoma. *APMIS*; 105(11): 889-94; 1997.

Dejmek-A., Hjerpe-A.: Immunohistochemical reactivity in mesothelioma and adenocarcinoma: A stepwise logistic regression analysis. *APMIS*; 102: 255-264; 1994.

Dejmek-A., et al.: Prognostic importance of the DNA ploidy pattern in malignant mesothelioma of the pleura. *Analyt. Quant. Cytol.*; 14: 217-221; 1992.

- Dogliani-C., et al.:** Calretinin: A Novel Immunocytochemical Marker for Mesothelioma. *Am. J. Surg. Pathol.*; 20(9): 1037-1046; 1996.
- Duggan-M.A., Masters-C.B., Alexander-F.:** Immunohistochemical Differentiation of Malignant Mesothelioma, Mesothelial Hyperplasia and Metastatic Adenocarcinoma in Serous Effusions, Utilizing Staining for Carcinoembryonic Antigen, Keratin and Vimentin. *Acta Cytol.*; 31: 807-814; 1987.
- Dündar-M.:** Die cytologische Diagnose maligner Pleuraergüsse unter besonderer Berücksichtigung der Inzidenz maligner Fälle, Histogenese und Ausgangsorgane metastatischer Tumoren. *Dissertation; Medizinische Hochschule Hannover; 1988.*
- Eckert-H.:** Praxisbezogene Anwendung histochemischer Methoden in der Lungenheilkunde. *Gegenbaurs Morphol. Jahrb.*; 127 (5): 702-705; 1981.
- EL-Habashi-A.H. et al.:** DNA Ploidy and Proliferating Cell Nuclear Antigen Image Analysis of Peritoneal and Pleural Effusions. *Acta Cytol.*; 41: 636-648; 1997.
- Feulgen-R., Rossenbeck-H.:** Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende selektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z. Physiol. Chemie*; 135: 203-248; 1924.
- Fink-L. et al.:** Thrombomodulin activity and localization. *Intl. J. Develop. Biol.*; 37:221; 1993.
- Fischer-M., Günther-S., Müller-K.M.:** Faserjahre, Asbestbelastung der Lungen, Asbestosen. *Pneumologie*; 54: 155-159; 2000.
- Fisher-E.R., Hellstrom-H.R.:** The periodic acid-Schiff reaction as an aid in the identification of mesothelioma. *Cancer*; 13: 837-841; 1960.
- Fishman-W.H.:** Immunologic and biochemical approaches to alkaline phosphatase isoenzyme analysis: the regan isoenzyme. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*; 166: 745-757; 1969.
- Friemann-J., Otto-H., Müller-K.M.:** Immunhistochemische Befunde zur Differentialdiagnose primärer und sekundärer Pleuratumoren. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*; 70: 311-316; 1986.
- Frisman-D.M., et al.:** Immunocytochemistry in the differential diagnosis of effusions: Use of logistic regression to select a panel of antibodies to distinguish adenocarcinomas from mesothelial proliferations. *Mod. Pathol.*; 6: 179-184; 1993.
- Fuhrmann-C. et al.:** Use of tumor markers for differential diagnosis of mesothelioma and secondary pleural malignancies. *Clin. Biochem.*; 33(5): 405-410; 2000.
- Gaffey-M.J., et al.:** Immunoreactivity for Ber-EP4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors, and malignant mesotheliomas. *Am. J. Surg. Pathol.*; 16: 593-599; 1992.

Garcia-Prats-M.D., et al.: A comparative evaluation of immunohistochemical markers for the differential diagnosis of malignant pleural tumours. *Histopathol.*; 32: 462-472; 1998.

Giorno-R.: A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diag. Immunol.*; 2: 161; 1984.

Gotzos-V., et al.: Expression of the calcium-binding protein calretinin in Wi Dr cells and its correlation to their cell cycle. *Exp. Cell Res.*; 202: 292-302; 1992.

Greenberg-M., Lloyd Davies-T.A.: Mesothelioma register 1967-86. *Br. J. Ind. Med.*; 31: 91-104; 1974.

Guesdon-J.L.: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem. Cytochem.*; 27: 1131; 1979.

Hamilton-B.A., et al.: Alkaline phosphatase releasing activity in human tissues. *Clinica Chimica Acta*; 186: 249-254; 1989.

Hammar-S.P., et al.: Mucin-positive Epithelial Mesotheliomas: A Histochemical, Immunohistochemical and Ultrastructural Comparison with Mucin-producing Pulmonary Adenocarcinomas. *Ultrastruct. Pathol.*; 20: 293-325; 1996.

Hammarstrom-S., et al.: Antigenic sites in carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.*; 49: 4852-4858; 1989.

Hansen-R.M. et al.: Benign mesothelial proliferation with effusion. Clinicopathologic entity that may mimic malignancy. *Am. J. Med.*; 77: 887-892; 1984.

Hastka-J., Pfister-P.: Zellmarker zur Differentialdiagnose maligner Mesotheliome. *Pathologie*; 9: 245-247; 1988.

Hedin-A., et al.: Epitope specificity and cross-reactivity pattern of a large series of monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen. *Mol. Immunol.*; 23:1053-1061; 1986.

Holden-J., Churg-A.: Immunohistochemical staining for keratin and carcinoembryonic antigen in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Am. J. Surg. Pathol.*; 8: 277-279; 1984.

Holthöfer-H., et al.: Cellular origin and differentiation of renal carcinomas. A fluorescence microscopic study with kidney-specific antibodies, antiintermediate filament antibodies, and lectins. *Lab. Invest.*; 49: 317-326; 1983.

Hsu-S.M., Raine-L., Fanger-H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*; 29: 577-580; 1981.

Huzly-A.: Parietale Pleurektomie bei der sekundären Pleurakarzinose. *Z. Herz-Thorax-Gefäßchir.*; 3 (Suppl.1): 80-83; 1989.

- Irani-D.R., et al.:** Malignant Pleural Effusions. A Clinical Cytopathologic Study. *Arch. Intern. Med.*; 6: 1133-1136; 1987.
- Isobe-H. et al.:** Prognostic significance of DNA aneuploidy in diffuse malignant mesothelioma. *Cytometry*; 19(1): 86-91; 1995.
- Jasani-B., et al.:** The use of vimentin antibodies in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Virchows Arch. A*; 406: 441-448; 1985.
- Jones-J.S.P., Lund-C., Planteydt-H.T.:** Colour atlas of mesothelioma. *MTP Press, Lancaster/ Boston/ The Hague/ Dordrecht*; 1985.
- Kannerstein-M., Churg-J.:** Peritoneal mesothelioma. *Hum. Pathol.*; 8: 83-94; 1977.
- Kennedy-A.D., King-G., Kerr-K.M.:** HBME-1 and anti-thrombomodulin in the differential diagnosis of malignant mesothelioma of pleura. *J. Clin. Pathol.*; 50: 859-862; 1997.
- Kim-S.J. et al.:** Thrombomodulin is a new biological and prognostic marker for breast cancer: An immunohistochemical study. *Anticancer Res.*; 17: 2319-2324; 1997.
- Klemperer-P., Rabin-C.B.:** Primary neoplasms of the pleura. A report of five cases. *Arch. Pathol.*; 11: 385-412; 1931.
- Klima-M., Spjut-H.J., Seybold-W.D.:** Diffuse malignant mesothelioma. *Am. J. Clin. Pathol.*; 65: 583-600; 1976.
- König-J.-E., et al.:** Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) in malignen Pleuramesotheliomen. *Atemw. Lungenkrkh*; 26: 428-430; 2000.
- Kortsik-C.S., et al.:** Immunocytochemical characterization of malignant mesothelioma and carcinoma metastatic to the pleura: IOB3 - a new tumor marker. *Lung.*; 173(2): 79-87; 1985.
- Krisman-M., Müller-K.M.:** Malignes Mesotheliom der Pleura, des Perikards und des Peritoneums. *Chirurg*; 71: 877-886; 2000.
- Kuonen-Boumeester-V., et al.:** Quality Control of Immunocytochemical Staining of Effusions Using a Standardized Method of Cell Processing. *Acta Cytol.*; 40:475-479; 1996.
- Kuhlmann-L., Berghauser-K.H., Schaffer-R.:** Distinction of Mesothelioma from Carcinoma in Pleural Effusions. *Pathol. Res. Pract.*; 187: 467-471; 1991.
- Laemmli-U.K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685; 1970.
- Latza-U., et al.:** Ber-EP4: New monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelioma. *J. Clin. Pathol.*; 43: 213-219; 1990.

- Lee-J.S., et al.:** Immunohistochemical Panel for Distinguishing Between Carcinoma and Reactive Mesothelial Cells in Serous Effusions. *Acta Cytol.*; 40: 631-636; 1996.
- Leong-A.S-Y., Vernon-R.E.:** The Immunohistochemistry of Malignant Mesothelioma. *Pathol. Annu.*; 29: 157-179; 1994.
- Leonhardt-H.:** Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. *Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1990.*
- Lobeck-H., et al.:** Generation and characterization of monoclonal antibodies to cytokeratin no. 4 and 5. *Abstract: European Symposium on the biology of the cytoskeleton; Helsinki: 18.-21.06.1989.*
- Lidang-Jensen-M., Johansen-P.:** Immunocytochemical Staining of Serous Effusions: An Additional Method in the Routine Cytology Practice. *Cytopathol.*; 5: 93-103; 1994.
- Maguire-B., et al.:** Monoclonal antibody Ber-Ep4: Its use in the differential diagnosis of malignant mesothelioma and carcinoma in cell blocks of malignant effusions and FNA specimens. *Diagn. Cytopathol.*; 10: 130-134; 1994.
- Miettinen -M., et al.:** Expression of intermediate filament proteins in thyroid gland and thyroid tumors. *Lab. Invest.*; 50: 262-270; 1984.
- Merkle-N.M., et al.:** Staging und operatives Vorgehen beim Pleuramesotheliom. *Z. Herz-Thorax-Gefäßchir.*; 3: 106-109; 1989.
- Mezger-J., et al.:** Identifacation of carcinoma cells in ascitic and pleural fluid: Comparison of four panepithelial antigens with carcinoembryonic antigen. *Acta Cytol.*; 36: 75-85; 1992.
- Moldenhauer-G. et al.:** Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br. J. Cancer*; 56: 714-721; 1987.
- Moll-R.:** Epitheliale Tumormarker. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*; 70: 28-50; 1986.
- Moll-R., Dhouailly-D., Sun-T.:** Expression of keratin 5 as a distinctive feature of epithelial and biphasic mesotheliomas. An immunohistochemical study using monoclonal antibody AE14. *Virchows Archiv B Cell Pathol.*; 58: 129-145; 1989.
- Momburg-F. et al.:** Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res.*; 47:2883-2891; 1987.
- Motoyama-T., et al.:** Immunohistochemical Properties of Malignant Mesothelioma Cells in Histologic and Cytologic Specimens. *Acta Cytol.*; 39: 164-170; 1995.
- Müller-K.M.:** Pleura. In: *Doerr-W. und Seifert-G. (Hrsg.): Spezielle pathologische Anatomie. Vol. 16/II, Springer-Verlag, 1983, 1295-1398.*

- Müller-K.M., Theile-A.:** Lungentumoren. Pathologisch-anatomische Diagnostik. *Internist*; 35: 710-723; 1994.
- Müller-K.M.:** Erkrankungen der Pleura – pathologische Anatomie. In: *Nakhosteen-J.A. und Inderbitzi-R.: Atlas und Lehrbuch der thorakalen Endoskopie, Bronchoskopie, Thorakoskopie. Springer-Verlag, 3.Auflage.*
- Müller-K.M.:** Mesotheliome. In: *Brockmann: Pneumologie*; 51: 335-344; Georg Thieme Verlag; 1997.
- Ordonez-N.G.:** Role of Immunohistochemistry in distinguishing epithelial peritoneal mesotheliomas from peritoneal and ovarian serous carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.*; 22: 1203-1214; 1998.
- Ordonez-N.G.:** The Immunohistochemical Diagnosis of Epithelial Mesothelioma. *Hum. Pathol.*; 30: 313-323; 1999.
- Ordonez-N.G.:** Value of Antibodies 44-3A6, SM3, HBME-1 and Thrombomodulin in Differentiating Epithelial Pleural Mesothelioma from Lung Adenocarcinoma: A Comparative Study with other Commonly Used Antibodies. *Am. J. Surg. Pathol.*; 21: 1399-1408; 1997.
- Ordonez-N.G.:** Value of calretinin immunostaining in differentiating epithelial mesothelioma from lung adenocarcinoma. *Mod. Pathol.*; 10: 929-933; 1998.
- Ordonez-N.G.:** Value of cytokeratin 5/6 immunostaining in distinguishing epithelial mesothelioma of the pleura from lung adenocarcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.*; 22(10): 1215-1221; 1998.
- Ordonez-N.G.:** Value of thrombomodulin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Histopathol.*; 31: 25-30; 1997.
- Papanicolaou-G.N.:** New Cancer Diagnosis. Proceedings of the Race Betterment. *Conference*; 528: 142-153; 1928.
- Pinto-M.M.:** CA-15.3 Assay in Effusions. Comparison with Carcinoembryonic Antigen and CA-125 Assay and Cytologic Diagnosis. *Acta Cytol.*; 40:437-442; 1996.
- Popper-H., et al.:** Immunohistochemical and Histochemical Markers of Primary Lung Cancer, Lung Metastases and Pleural Mesotheliomas. *Cancer Detection and Prevention*; 10: 167-174; 1987.
- Qua-J.C., Rao-U.N.M., Takita-H.:** Malignant Pleural Mesothelioma: A Clinocopathologic Study. *J. Surg. Oncol.*; 54: 47-50; 1993.
- Raymond-W.A., Leong-A.S.-Y.:** Co-expression of cytokeratin and vimentin intermediate filament proteins in benign and neoplastic breast epithelium. *J. Pathol.*; 157: 299-306; 1989.

- Rick-W.:** Klinische Chemie und Mikroskopie. *Springer Verlag, 1977.*
- Riede-U.N.:** Brustfell. In: *Riede-U.N. und Schaefer-H.E.: Allgemeine und Spezielle Pathologie, Lehrbuch. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; 4.Auflage; 1995.*
- Riedel-U, et al.:** Diagnostic value of the tumor markers TPA-M, Cyfra 21-1 and CEA in pleural effusion. Prospective comparison of thorascopic investigations in patients with pleural effusion. *Pneumologie; 53(10): 471-476; 1999.*
- Riera-J.R., Astengo-Osuna-C., Longmate-J.A.:** The immunohistochemical diagnostic panel for epithelial mesothelioma: a reevaluation after heat-induced epitope retrieval. *Am. J. Surg. Pathol.; 21(12): 1409-19; 1997.*
- Robinson-R.J., Royston-D.:** Comparison of Monoclonal Antibodies AUA 1 and Ber EP4 with Anti-CEA for Detecting Carcinoma Cells in Serous Effusions and Distinguish them from Mesothelial Cells. *Cytopathol.; 4: 267-271; 1993.*
- Rogli-V.L., et al.:** Pathology of human mesothelioma. Etiologic and diagnostic considerations. *Pathol. Annu.; 22: 91-131; 1987.*
- Rosenstock-H.:** The Pleural Manifestations of Asbestos Exposure. *State Art Rev. Occup. Med.; 2: 283-407; 1987.*
- Ruffie-P., Feld-R., Minkin-S.:** Diffuse malignant mesothelioma of the pleura in Ontario and Quebec: A retrospective study of 332 patients. *J. Clin. Oncol.; 113: 27-32; 1989.*
- Rusch-V.W.:** Clinical Features and Current Treatment of Diffuse Malignant Pleural Mesotheliomas. *Lung Cancer; 12(Suppl 2): 127-146; 1995.*
- Said-J.W., et al.:** Keratin proteins and carcinoembryonic antigen in lung carcinoma: An immunoperoxidase study of 54 cases, with ultrastructural correlations. *Hum. Pathol.; 14: 70-76; 1983.*
- Schwaller-B., et al.:** Characterization of a polyclonal antiserum against the purified human recombinant calcium binding protein calretinin. *Cell calcium; 14: 639-648; 1993.*
- Sheahan-K., et al.:** Differential Reactivities of Carcinoembryonic Antigen (CEA) and CEA-Related Monoclonal and Polyclonal Antibodies in Common Epithelial Malignancies. *Am. J. Clin. Pathol.; 94: 157-164; 1990.*
- Sheibani-K., et al.:** Ber-Ep4 antibody as a discriminant in the differential diagnosis of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.; 15: 779-784; 1991.*
- Soost-H.J.:** Lehrbuch der Zytodiagnostik. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 1976.*
- Tao-L.C., et al.:** False „false-positive“ results in diagnostic cytology. *Acta cytol.; 28 (4): 450-456; 1984.*

Tiniakos-D.G., et al.: p53 Immunostaining as a Marker of Malignancy in Cytologic Preparations of Body Fluids. *Acta Cytol.*; 39: 171-176; 1995.

Tokuyama-T., et al.: Tissue polypeptide antigen as a biological marker of malignant pleural mesothelioma. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*; 35(6): 609-615; 1997.

Towbin-H., Staehelin-T., Gordon-J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 76: 4350-4354; 1976.

Upton-M.P., et al.: Expression of vimentin in surgically resected adenocarcinomas and large cell carcinomas of lung. *Am. J. Surg. Pathol.*; 10: 560-567; 1986.

Valle-M.T., et al.: Immunobiology and immune defense mechanisms of mesothelioma cells. *Monaldi Arch. Chest. Di.s*; 53(2): 219-27; 1998.

Vortmeyer-A.O., et al.: Immunocytochemical differential diagnosis of diffuse malignant pleural mesotheliomas – A clinicomorphological study of 158 cases. *Anticancer Res.*; 11: 889-894; 1991.

Wang-N., Huang-S., Gold-P.: Absence of carcinoembryonic antigen-like material in mesothelioma. An immunohistochemical differentiation from other lung cancers. *Cancer*; 44: 937-943; 1979.

Westermeier-R.: Elektrophorese-Praktikum. *VCH-Verlag, Weinheim – New York*; 1990.

WHO: International histological classification of tumours. *N^o 3; histological typing of soft tissue tumours*, Geneva; 1969.

WHO: International histological classification of tumours; *N^o 1; histological typing of lung tumours*; 2nd edition, Geneva; 1981.

Wick-M.R., Swanson-P.E., Manivel-J.C.: Placental-like alkaline phosphatase reactivity in human tumors: an immunohistochemical study of 520 cases. *Hum. Pathol.*; 18 (9): 946-954; 1987.

Wick-M.R.: Monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen in diagnostic immunohistochemistry. In: Wick-M.R. and Siegal-G.P. (Hrsg.): *Monoclonal antibodies in diagnostic immunohistochemistry*. Marcel Dekker, New York/ Basel, S. 539-567; 1988.

Wilson-J.D., et al.: Mesothelioma vs. Adenocarcinoma: Does immunohistochemistry help? *Lab. Invest.*; 76: 174A; 1997.

Wirth-P.R., Legier-J., Wright-G.L. Jr: Immunohistochemical evaluation of seven antibodies for differentiation of pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma. *Cancer*; 67: 655-662; 1991.

8. Anhang

In dieser Studie wurden folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien verwendet:

Mikroskope

Olympus BH2 (Routine)	Olympus, Hamburg.
Leitz, Laborlux D512795 (DNA)	Leica, Solms.

pH-Meter

pH-Meter CG 707	Schott, Hofheim.
-----------------	------------------

Trockenofen

Typ: T5042; 0-250 °C	Heraeus. Art.nr.: 26261010
----------------------	----------------------------

Rechner (DNA-Zytometrie)

Standardrechner PC 486-33
33 MHz, 256 KByte Cache
8 MB RAM
Festplatte 213 MB, AT-Bus
Mitsubishi EUM 1491 A (Monitor)
HP DeskJet 500 (Drucker)
PULNIX Monochrom TM 7CN

Kühlschränke

Kühlschrank (0-8 °C)	Küleg
----------------------	-------

Elektrophorese- und Blottinggeräte

Spannungsquelle PS 500 XT DC Power.	Hofer Scientific Instruments, San Francisco/USA.
Elektrophoresekammer TE Series T Elektrophoresis Unit.	Hofer Scientific Instruments, San Francisco/USA.
Blotting-Steuergerät Transphor Power Lid	Hofer Scientific Instruments, San Francisco/USA.
Blotting-Kammer SE 600 Series Vertical Slab Gel Unit.	Hofer Scientific Instruments, San Francisco/USA.

Mischgeräte

Magnetrührer mit Heizplatte LR 12.
Red Rocker PR 50.

Mettler, Gießen.
Hofer Scientific Instruments,
San Francisco/USA.

Spektralphotometer

Spektralphotometer Ultrospec III.

Pharmacia LKB, Freiburg.

Zentrifugen

Tischzentrifuge 5402.
Kühlzentrifuge 5415 C.

Eppendorf, Hamburg.
Eppendorf, Hamburg.

Verbrauchsmaterialien

Objektträger (geputzt)
Gel-Blotting-Papier 300 x 600 mm
Mikroküvetten, 1 ml
Nitrocellulose; 0,45 µm.

Medizin- und Labortechnik, Edermünde.
Schleicher & Schuell, Dassel.
Ratiolab, Dreieich.
Schleicher & Schuell, Dassel.

Danksagung

Meinen ganz besonderen Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Drommer, für die wertvollen Anregungen und die hilfreiche und freundliche Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. S. Steinlechner möchte ich mich herzlich für die Hilfe und für die wertvollen Anregungen während der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. K.M. Müller danke ich für die freundliche Überlassung der histopathologischen Befunde. Herrn Dr. rer. nat. Thorsten Wiethage danke ich für das ständige Abgleichen und Aktualisieren der Daten.

Herrn PD Dr. rer. nat. Norbert Gässler und Herrn Dr. rer. nat. Martin Runge danke ich für Anregungen bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen. Besonders wichtig war mir die moralische Unterstützung, die ich in dieser Zeit erfahren habe.

Prof. Dr. med. Z. Atay und Herrn Dr. med. Th. Topalidis danke ich für die Überlassung der zytologischen Präparate.

Herrn Andreas Köppen danke ich für die Hilfe bei der Auswertung und den Korrekturen dieser Arbeit.

Schliesslich möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Frau für die Unterstützung und den vielen Aufmunterungen bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum/ -ort: 13.03.1968 in Hildesheim.

Nationalität: deutsch.

Schulbildung:

1974-1978: Grundschule, Letter.

1978-1980: Orientierungsstufe, Letter.

1980-1987: Gymnasium, Letter (Abschluss: Abitur).

Wehrdienst:

1988-1989: Feldartilleriebataillon 11, Hannover.

Studium:

10/89 – 07/92: Grundstudium Biologie, Universität Hannover.

07/92: Vordiplom.

07/92 – 04/95: Hauptstudium Biologie (Fachrichtung: Mikrobiologie).

05/95 – 07/96: Diplomarbeit.

12/96: Studienabschluss als Diplom-Biologe.

Berufstätigkeit:

03/1997-06/2001 Wissenschaftlicher Angestellter im Zytopathologischen Institut Hannover
(Prof. Dr. med. Z. Atay)

Seit 07/2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der Cytop GmbH Hannover.

Erklärung nach § 5, Nr. c der Promotionsordnung

Ich erkläre, dass ich die der Universität Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Entwicklung molekularbiologischer, immunologischer und DNA-zytometrischer Verfahren zur Charakterisierung von Tumorzellen am Beispiel maligner Pleuramesotheliome des Menschen

in dem Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover unter Betreuung von Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Drommer durch Zusammenarbeit mit dem zytopathologischen Institut in Hannover (Prof. Dr. med. Z. Atay und Dr. med. Topalidis), mit dem pathologischen Institut des Klinikums Hannover im Krankenhaus Nordstadt (Dr. med. C. Förster), mit dem Labor des akademischen Bernward-Krankenhauses in Hildesheim (PD Dr. rer. nat. N. Gässler und Dr. rer. nat. M. Runge) sowie mit dem Deutschen Mesotheliomregister in Bochum (Prof. Dr. med. K.M. Müller) ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Hannover, den

Mario Bachmann