

Aus dem Institut für Pathologie der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. A. Erbersdobler

**Validierung der Zytologie in der Diagnose primärer und sekundärer Lungentumoren und
Mutationsanalyse des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-Gens an zytologischem Material
aus Pleuraergüssen bei pulmonalen Adenokarzinomen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock
vorgelegt von
Antonia Deborah Polak
aus Berlin
Rostock, 2012

Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Erbersdobler, Institut für Pathologie, Universitätsmedizin
Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Lommatzsch, Abteilung für Pneumologie,
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Weichert, Institut für Pathologie, Universitätsmedizin
Heidelberg

Datum der Einreichung: 13.11.2012

Datum der öffentlichen Verteidigung: 19.06.2013

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Bronchoskopie, Lungenzytologie und Lungenhistologie.....	1
1.2 Epidemiologie, Ätiologie, Symptome, Diagnostik, Prognose und Prävention des Lungenkarzinoms.....	3
1.3 Einteilung des Lungenkarzinoms nach WHO-Klassifikation, TNM-Stadien, UICC-Stadien und histologisches Grading.....	6
1.4 Morphologische Charakterisierung der häufigsten Typen des Lungenkarzinoms.....	9
1.5 Therapie des Lungenkarzinoms.....	14
1.6 Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor.....	16
2 Ziele der Arbeit.....	20
3 Material und Methoden.....	21
3.1 Validierung der Zytologie.....	21
3.1.1 Gewinnung der Proben in der Klinik für Pneumologie.....	21
3.1.2 Datenerhebung.....	22
3.1.3 Endoskopisch sichtbare und nicht sichtbare Tumoren.....	23
3.1.4 Nachverfolgung der zytologisch falsch positiven Fälle.....	23
3.1.5 Vergleich der zytologischen Diagnose vor und nach Biopsie.....	23
3.1.6 Reevaluation.....	24
3.1.7 Statistische Definitionen.....	24
3.2 EGFR-Mutationsanalyse im Pleuraerguss.....	25
3.2.1 Patienten-DNA.....	25
3.2.2 Entparaffinierung.....	26
3.2.3 DNA-Gewinnung.....	26
3.2.4 PCR.....	26
3.2.5 Sequenzierung.....	27
4 Ergebnisse.....	29
4.1 Validierung der Zytologie mit der Histologie als Referenz.....	29
4.1.1 Alters- und Geschlechterverteilung.....	29
4.1.2 Endoskopische Befunde.....	30
4.1.3 Diagnostizierte Tumorentitäten.....	31
4.1.4 Nachverfolgung der acht zytologisch falsch positiven Fälle.....	32
4.1.5 Trefferquote der BL/BAL vor bzw. nach Biopsieentnahme.....	33

4.1.6	Sensitivität und Spezifität der zytologischen Untersuchung	33
4.2	EGFR-Mutationsanalyse im Pleuraerguss.....	35
5	Diskussion.....	37
5.1	Methodendiskussion.....	37
5.1.1	Validierung der Zytologie	37
5.1.2	EGFR-Mutationsanalyse im Pleuraerguss.....	37
5.2	Ergebnisdiskussion.....	39
5.2.1	Validierung der Zytologie	39
5.2.1.1	Gesamttreffsicherheit der Zytologie.....	39
5.2.1.2	Falsch positive Zytologie-Diagnosen hinsichtlich Malignität.....	39
5.2.1.3	Falsch negative Zytologie-Diagnosen hinsichtlich Malignität.....	41
5.2.1.4	Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert der Zytologie	41
5.2.1.5	Zytologische Subklassifizierung der NSCLC.....	42
5.2.1.6	Treffsicherheit der Zytologie vor und nach Biopsie.....	46
5.2.1.7	Trefferquote in Abhängigkeit von der Lokalisation der Läsion	48
5.2.2	EGFR-Mutationsanalyse im Pleuraerguss.....	51
5.2.2.1	Wahrscheinlichkeit, mit der eine EGFR-Mutation in einem Pleuraerguss gefunden wird	51
5.2.2.2	Die Vielfalt und die Bedeutung der verschiedenen EGFR-Mutationen	53
5.2.2.3	Alternative EGFR-gerichtete Therapien.....	59
6	Zusammenfassung.....	61
7	Literaturverzeichnis.....	62
8	Danksagung..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Lungenkarzinoms	7
Tabelle 2: Stadieneinteilung nach UICC-TNM-Klassifikation	8
Tabelle 3: Zytologische Charakterisierung des Lungenkarzinoms	9
Tabelle 4: Histologische Charakterisierung des Lungenkarzinoms	14
Tabelle 5: Primersequenzen und Amplikongrößen	26
Tabelle 6: Altersverteilung	29
Tabelle 7: Trefferquote bei endoskopisch sichtbaren und nicht sichtbaren Tumoren insgesamt.....	30
Tabelle 8: Trefferquote bei endoskopisch sichtbaren und nicht sichtbaren Tumoren für alle Fälle mit doppelter Zytologie und positiver Histologie.....	30
Tabelle 9: Endoskopische Sichtbarkeit der positiven Histologien	31
Tabelle 10: Endoskopische Sichtbarkeit der positiven Zytologien	31
Tabelle 11: Ermittelte Tumorentitäten	32
Tabelle 12: TP, FP, TN, FN der zytologischen Untersuchung.....	33
Tabelle 13: Sensitivität, Spezifität, PPW, NPW der zytologischen Untersuchung	34
Tabelle 14: TP, FP, TN, FN der zytologischen Untersuchung nach Reevaluation	34
Tabelle 15: Sensitivität, Spezifität, PPW, NPW der zytologischen Untersuchung nach Reevaluation.....	34
Tabelle 16: Ergebnisse der EGFR-Mutationsanalyse.....	35
Tabelle 17: Zytologische Treffsicherheit für die verschiedenen NSCLC-Subentitäten.....	42
Tabelle 18: Vergleich Trefferquote der BL/BAL vor und nach Biopsie.....	47
Tabelle 19: Rate gefundener EGFR-Mutationen in verschiedenen Studien.....	51
Tabelle 20: Vergleich der in den verschiedenen Studien gefundenen EGFR-Mutationen.....	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: SCLC (Papanicolaou 40x)	10
Abbildung 2: SCLC (Papanicolaou 100x).....	10
Abbildung 3: PECA (Papanicolaou 20x).....	11
Abbildung 4: PECA (Papanicolaou 100x).....	11
Abbildung 5: PECA (Papanicolaou 100x).....	11
Abbildung 6: PECA (Papanicolaou 40x).....	11
Abbildung 7: AC (Papanicolaou 20x).....	12
Abbildung 8: AC (Papanicolaou 100x).....	12
Abbildung 9: AC (Papanicolaou 40x).....	12
Abbildung 10: LC (Papanicolaou 20x).....	13
Abbildung 11: LC (Papanicolaou 100x).....	13
Abbildung 12: Signalwege des EGF-Rezeptors.....	16
Abbildung 13: Entstehung der Flocke.....	25
Abbildung 14: Flocke vor Paraffineinbettung.....	25
Abbildung 15: Eingebettete Flocke.....	26
Abbildung 16: Flocke durch das Mikroskop (HE 20x).....	26
Abbildung 17: Ergebnis der direkten Sequenzierung (Nukleotidsequenz des EGFR-Gens).....	28
Abbildung 18: Altersverteilung.....	30
Abbildung 19: Tumorentitäten histologisch und zytologisch.....	31
Abbildung 20: Sequenzierung Exon 19 Deletion.....	35
Abbildung 21: Sequenzierung Exon 20 Punktmutation.....	36
Abbildung 22: Undifferenziertes PECA (Papanicolaou 100x).....	44
Abbildung 23: Die verschied. EGFR-Kinase-Mutationen aus Sharma et al. 2007.....	54

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	A Disintegrin and Metalloprotease
ADH	Anti-diuretisches Hormon
AC	Adenokarzinom
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AIS	Adenokarzinom in situ
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchioalveoläre Lavage
BL	Bronchiallavage
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
EBUS	endobronchialer Ultraschall
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
et al.	und andere
EURTAC-Studie	European Tarceva versus Chemotherapy-Studie
F	Forward (vorwärts)
FDG	Fluordesoxyglucose
FNA	Feinnadelaspiration
GDP	Guanosindiphosphat
ggf.	gegebenenfalls
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER	Human Epidermal growth factor Receptor
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancerf
JAK	Januskinasen
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
LC	Großzelliges Karzinom

LUSI	Lungenkrebs-Screening-Interventionsstudie
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MET-Gen	MNNG-HOS transforming Gen
mg	Milligramm
min.	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimol
mmHG	Millimeter-Quecksilbersäule
MSCT	Mehrschichtcomputertomographie
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NSCLC-NOS	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom not otherwise specified (nicht subklassifiziert)
PAS-Färbung	Periodic acid-Schiff-Färbung
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
PCR	engl. Polymerasekettenreaktion
PECA	Plattenepithelkarzinom
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
pmol	Picomol
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
R	Reverse (rückwärts)
Raf	Rat Fibrosarcoma
Ras	Rat Sarcoma
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
sek.	Sekunde/n
SH2	Src-homology 2
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBB	Transbronchiale Biopsie
TGF α	transformierender Wachstumsfaktor alpha
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TTF1	Thyroid Transcription Factor 1

U	Unit
u. a.	unter anderem
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
° C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
3D	dreidimensional

1 Einleitung

Noch vor rund 100 Jahren war das Lungenkarzinom eine seltene Erkrankung. So schrieb Eduard von Rindfleisch in seinem Lehrbuch der pathologischen Gewebelehre: „Die Lunge ist zur primären Geschwulstbildung ausserordentlich wenig geneigt“ (Rindfleisch 1869). Heute ist das Lungenkarzinom eine der häufigsten Krebstodesursachen weltweit (Travis et al.: WHO 2004; Hirsch 2009; Rosell et al. 2012). In Deutschland gehört es zu den häufigsten natürlichen Todesursachen (Heigener 2010). Die Prognose dieser Tumorerkrankung ist schlecht, es sei denn der Tumor wird früh entdeckt. Aufgrund des initial oft symptomarmen Verlaufs wird das Lungenkarzinom aber häufig erst in den fortgeschrittenen Stadien IIIb oder IV diagnostiziert (Hirsch 2009; Goeckenjan 2010; Heigener 2010; Rekhtman et al. 2011).

Zur Diagnose von Lungentumoren gibt es verschiedene Methoden: Üblich sind bildgebende Verfahren, wie das Röntgen oder die Computertomographie des Thorax und endobronchialer Ultraschall (EBUS). Endoskopische Verfahren ermöglichen es, Lungenbiopsien, Bronchiallavagen (BL) und bronchioalveoläre Lavagen (BAL) mit einem Bronchoskop zu gewinnen (Heigener 2010).

Entscheidend für die individuelle Therapiewahl ist die histopathologische Untersuchung des Tumors, da sich die Behandlung des Lungenkarzinoms innerhalb der verschiedenen Tumorentitäten unterscheidet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Nutzen zytologischer Proben für die Lungenkarzinom-Diagnostik charakterisiert werden.

Die Etablierung von Untersuchungen an zytologischem Material aus der Lunge ist von großer Relevanz, da zytologisches Material leicht gewonnen werden kann. Bei schwer kranken Patienten gibt es oft Kontraindikationen gegen die Entnahme von transbronchialen Biopsien und erst recht gegen eine Lungenlappenresektion im Rahmen eines größeren operativen Eingriffs. In fortgeschrittenen Stadien sind ca. 60 % der Patienten ohnehin nicht operabel (Rekhtman et al. 2011). Überdies hinaus wird bei einer Lungenbiopsie nur sehr wenig Material gewonnen, an dem eine Diagnose gestellt werden muss. Eine zusätzliche zytologische Untersuchung bietet eine Möglichkeit zur Absicherung der histologischen Diagnose.

1.1 Bronchoskopie, Lungenzytologie und Lungenhistologie

Bronchoskopie

Sowohl histologische Proben (Biopsie) als auch zytologische Proben (BL/BAL) können im Rahmen einer Bronchoskopie gewonnen werden.

Die endoskopische Untersuchung der Lunge lässt sich bis in das 19. Jahrhundert zurückverfolgen, als

starre Lichtröhren genutzt wurden, um den Bronchialbaum zu untersuchen (Lee 2007).

Die erste Bronchoskopie führte der deutsche Hals-Nasen-Ohren-Arzt Gustav Kilian mit einem Gastroskop durch. Er entfernte damit am 18. März 1897 einen Knochensplitter aus dem rechten Hauptbronchus eines Schwarzwaldbauern (Nakhosteen 2009).

Ein weiterer Schritt in der Geschichte der Bronchoskopie war die Einführung des flexiblen Bronchoskops 1966 durch Dr. Shigeto Ikeda (Nakhosteen 2009). Diese Technik verbreitete sich schnell (Reynolds 1987).

Heute hat die Bronchoskopie einen zentralen Platz in der pneumologischen Diagnostik. Die Entnahme von BL/BAL und transbronchialen Biopsien mit dem Bronchoskop ist inzwischen ein standardisiertes Verfahren (Schumann 2004).

Absolute Kontraindikationen für eine Bronchoskopie an sich gibt es nicht; zu den relativen gehören: frischer Herzinfarkt, manifeste respiratorische oder schwere kardiale Dekompensation und pO_2 unter 50 mmHg bzw. pCO_2 über 50 mmHg (Nakhosteen 2009). Soll im Rahmen der Bronchoskopie aber eine Biopsie entnommen werden, gibt es folgende absolute Kontraindikationen: pulmonal-arterielle Hypertonie, therapierefraktäre hämorrhagische Diathese und nicht korrigierbare respiratorische Insuffizienz (Nakhosteen 2009). Auch wenn die Bronchoskopie zur Gewinnung einer Biopsie eine relativ gut verträgliche Untersuchung ist, ist sie dennoch invasiv. Bei sehr schlechtem Allgemeinzustand eines Patienten, wie das bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom oft der Fall ist, ist eine Bronchoskopie nicht immer durchführbar, da sie zu belastend wäre (Hung et al. 2006).

Lungenzytologie

Die Charakterisierung zytologischer Untersuchungen ist Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. An Flüssigkeiten aus bronchoskopisch gewonnener Bronchiallavage (BL) oder bronchioalveolärer Lavage (BAL) erfolgen zytologische Untersuchungen (Nakhosteen 2009). Bei der BAL wird mehr Flüssigkeit tiefer im Bronchialbaum instilliert (Becker 1990). So können auch peripher gelegene Lungenabschnitte gespült werden. Außerdem unterscheiden sich BL und BAL etwas in der diagnostischen Zielstellung. Die BAL wird in erster Linie angewandt, um entzündliche Lungenerkrankungen zu diagnostizieren (Becker 1990). Sekundär kann sie aber auch genutzt werden, um Material aus peripher gelegenen tumorverdächtigen Arealen zu gewinnen. Insbesondere mit Anstieg der Inzidenz peripherer Lungenkarzinome ist die Wertigkeit der BAL gestiegen (Koss und Melamed 2006). Die BL, bei der etwas weniger Flüssigkeit instilliert wird, wird genutzt, um Material für eine zytologische Tumordiagnostik zu gewinnen. Zur genauen Technik über die Gewinnung der zytologischen Proben für die vorliegende Arbeit siehe unter 3.1.1.

Für diese Arbeit ist die Differenzierung zwischen BL und BAL letztlich nicht relevant. Beide Verfahren werden im Rahmen einer Bronchoskopie zusammen mit einer Zangenbiopsie durchgeführt und im hiesigen pathologischen Institut auf Tumorzellen untersucht.

Zytologische Proben können bronchoskopisch gewonnen werden, aber auch durch Punktierung eines Pleuraergusses.

Lungenhistologie

Zur histologischen Sicherung eines Lungenkarzinoms wird in der Regel eine Biopsie entnommen. Hierfür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die Biopsie kann zum einen transbronchial mit einem flexiblen oder starren Bronchoskop erfolgen. Hierbei wird mit einer Biopsiezange ein kleines Stück Gewebe entnommen. Zum anderen kann die Biopsie auch transthorakal durchgeführt werden und zwar im Rahmen einer CT-gesteuerten Punktion unter sterilen Kautelen. Dann ist jedoch das gleichzeitige Gewinnen von Bronchialflüssigkeit zur zytologischen Untersuchung nicht möglich, außerdem besteht erhöhte Gefahr für einen Pneumo- oder Hämatothorax (Heigener 2010).

1.2 Epidemiologie, Ätiologie, Symptome, Diagnostik, Prognose und Prävention des Lungenkarzinoms

Epidemiologie

Der erste durch eine Obduktion gesicherte Fall eines primären Lungenkarzinoms wurde 1871 von Langerhans veröffentlicht (Dohm 2004). Damals war der Lungenkrebs noch eine seltene Erkrankung. Mit der Zunahme des Tabakkonsums stieg auch die Inzidenz des Lungenkarzinoms, sodass dieses heute die führende Krebstodesursache weltweit ist (Travis et al.: WHO 2004; Goeckenjan 2010).

Die Inzidenz von Lungenkarzinomen in einer Bevölkerung reflektiert das jeweilige Rauchverhalten (Travis et al.: WHO 2004). 1980 lag der Schwerpunkt des Krankheitsgeschehens noch in den Industrieländern, heute hat er sich in die Länder der Dritten Welt verlagert. Ursache dafür ist der steigende Tabakkonsum in den Entwicklungsländern, der mit einer Zunahme der Inzidenz und Mortalität des Lungenkarzinoms verbunden ist (Becker 2010). Hinsichtlich der Geschlechterverteilung zeichnet sich ab, dass die Inzidenz des Lungenkarzinoms bei Männern kontinuierlich sinkt, vermutlich infolge des Rückgangs der Rauchprävalenz. Bei Frauen hingegen haben sich Inzidenz und Mortalität in den letzten dreißig Jahren fast verdoppelt (Goeckenjan 2010; Becker 2010).

Im Jahr 2010 starben in Deutschland 42.972 Menschen am Lungenkarzinom, 29.357 Männer und 13.615 Frauen (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2010). Damit steht der Lungenkrebs hierzulande an vierter Stelle aller Todesursachen und ist die häufigste Krebstodesursache bei Männern sowie die zweithäufigste Krebstodesursache bei Frauen nach dem Mammakarzinom. Im Jahr 2008 starben weltweit 1,8 Millionen Menschen an Lungenkrebs. Das durchschnittliche 5-Jahres-Überleben beträgt für Patienten mit Lungenkarzinom in Deutschland ca. 15 % für Männer und 18 % für Frauen (Goeckenjan et al.: S3-Leitlinie 2010). In den USA liegt das mediane 5-Jahres-Überleben bei ca. 15 %, in Europa bei etwa 10 % und in den Ländern der Dritten Welt bei knapp 9 % (Becker 2010).

Ätiologie

Die Hauptursache für die Entstehung des Lungenkarzinoms ist das Rauchen. 85 % aller Lungenkrebstodesfälle sind auf Tabakkonsum zurückzuführen. Im Zigarettenrauch sind eine Vielzahl an Karzinogenen und inflammatorischen Stoffen enthalten (Travis et al.: WHO 2004). Aber auch Noxen, wie etwa polyzyklische Kohlenwasserstoffe, Asbest, Arsen, Chrom, Nickel, Dieselabgase u. a. können Lungenkrebs verursachen. In 9-15 % der Lungenkrebstodesfälle ist eine berufliche Exposition gegenüber Kanzerogenen ursächlich. Bereits 1943 wurde der Lungenkrebs in Verbindung mit Asbestose in die Liste der Berufskrankheiten aufgenommen. Auch die ionisierende Strahlung, die durch den radioaktiven Zerfall von Radon entsteht, kann Lungenkrebs hervorrufen. So wird die natürliche Radonkonzentration in Wohnungen, unabhängig von beruflicher Exposition, für bis zu 5 % der Lungenkarzinome verantwortlich gemacht. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine hohe Schadstoffbelastung der Außenluft das Risiko für Lungenkrebs erhöht. Aufgrund einer multiplikativen Wirkung in Kombination mit Tabakkonsum ist das Risiko für Raucher besonders hoch (Becker 2010; Goeckenjan 2010; Travis et al.: WHO 2004).

Des Weiteren wird auch eine genetische Disposition diskutiert. So fand man heraus, dass in den USA Afroamerikaner häufiger erkranken als die weiße Bevölkerung, während „Hispanics“ und Asiaten geringere Erkrankungsraten aufweisen (Parker et al. 1998; Haiman et al. 2006; Vallée 2007).

Symptome

Die Symptome, die das Lungenkarzinom verursacht, werden durch lokale Infiltration, Invasion in umgebende Strukturen, paraneoplastische Syndrome und Metastasierung hervorgerufen. Im Frühstadium kommt es nur selten zu deutlichen Symptomen, da das zunächst lokale Wachstum des Lungenkarzinoms anfänglich unbemerkt bleibt (Goeckenjan 2010). Im Spätstadium kann es zu Husten, Thoraxschmerz, Hämoptysen, Dyspnoe infolge von Pleuraergüssen, Stenosen oder Atelektasen, rezidivierenden Pneumonien (Retentionspneumonien) und B-Symptomatik (Gewichtsabnahme, Nachtschweiß und Fieber) kommen (Travis et al.: WHO 2004; Kirchbacher 2009). Teilweise führen auch Symptome bzw. Syndrome, wie das Horner-Syndrom (Ptosis, Miosis und Enophthalmus) oder Heiserkeit aufgrund einer Parese des Nervus laryngeus recurrens zum Verdacht auf das Vorliegen eines Lungenkarzinoms (Kirchbacher 2009). Oftmals sind es erst Metastasen, die Symptome hervorrufen. Dies gilt insbesondere für das Kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC), hier finden sich oft paraneoplastische und endokrine Syndrome, z. B. Myasthenien (Lambert-Eaton-Syndrom), Dermatomyositis oder abnorme ACTH- und ADH-Spiegel. 10 % der SCLC-Patienten haben außerdem eine obere Einflusstauung (Vena-cava-superior-Syndrom) (Travis et al.: WHO 2004).

Oft schon frühzeitig beginnt eine lymphogene Metastasierung des Lungenkarzinoms. Zunächst werden intrapulmonale Lymphknoten befallen, gefolgt von parabronchialen und hilären Lymphknoten. Hämato gene Metastasen finden sich zu 25 % in der Leber, zu 20 % im Skelettsystem, zu 15 % in den

Nebennieren und zu 10 % im Gehirn (Travis et al.: WHO 2004).

Diagnostik

Bei Verdacht auf ein Lungenkarzinom ist der erste Schritt meist eine Röntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen. Hierbei gilt aber zu beachten, dass Herde, die kleiner als zwei Zentimeter sind in ca. 50 % der Fälle röntgenologisch nicht erkannt werden (Heigener 2010). Sensitivität und Spezifität der Röntgendiagnostik sind relativ gering (Goeckenjan 2010). Dennoch eignet sich aufgrund der geringen Strahlenbelastung ein Thorax-Röntgen auch zur Verlaufskontrolle der Tumorerkrankung, z. B. vor einem neuen Chemotherapiezyklus (Heigener 2010).

Die CT (Computertomographie) des Thorax stellt das Lungenparenchym sehr genau dar und ermöglicht eine Größenbeurteilung der mediastinalen Lymphknoten (Heigener 2010). Durch die CT ist ein genaues Staging des Lungenkarzinoms möglich, dennoch ist die Spezifität relativ gering, sodass auch viele falsch positive Befunde erhoben werden (Goeckenjan 2010).

Immer mehr an Bedeutung für Diagnose und Staging des Lungenkarzinoms gewinnt die Positronenemissionstomographie (PET). Sie basiert auf dem erhöhten Glucosestoffwechsel in malignen Zellen, da sich hier der radioaktive Tracer ¹⁸F-Fluordesoxyglucose (FDG) anreichert. Die Anreicherung kann mit Scannern detektiert werden (Heigener 2010). Gewöhnlich wird die PET mit einer CT kombiniert. Studien belegen, dass die FDG-PET hinsichtlich des Lymphknotenstagings beim Lungenkarzinom eine höhere Sensitivität und Spezifität hat als die CT (Goeckenjan 2010). Nachteile der PET sind ihre derzeit noch limitierte Verfügbarkeit und die hohen Kosten, die in Deutschland nicht immer von der Krankenkasse getragen werden (Heigener 2010).

Endoskopische Verfahren wie die flexible oder starre Bronchoskopie und die Mediastinoskopie ermöglichen die Entnahme von Biopsien aus dem Tumor, sodass ein genaues histologisches Staging durchgeführt werden kann. Die Kombination der Bronchoskopie mit endoskopischen Ultraschallverfahren erlaubt eine besonders gute Visualisierung der mediastinalen Lymphknoten (Heigener 2010). Im Rahmen einer Bronchoskopie werden auch BL und BAL gewonnen, die zytologisch untersucht werden.

Prognose

Die Prognose des Lungenkarzinoms ist nach wie vor schlecht, die Mortalität ist hoch. Die mediane 5-Jahres-Überlebenszeit liegt bei 9-18 % für Lungenkarzinome insgesamt (Goeckenjan et al.: S3-Leitlinie 2010; Becker et al. 2010). Sowohl beim SCLC als auch beim NSCLC (Nicht-kleinzelligen Karzinom) hängt die Prognose überwiegend vom Stadium der Erkrankung bei Erstdiagnose ab. Patienten in Stadium I und II können häufiger kurativ behandelt werden als Patienten in Stadium III und IV (Raab und Silverman 1994). Aufgrund der geringen Symptome im Frühstadium wird das Lungenkarzinom aber meistens erst im späten Stadium diagnostiziert und ist dann nicht mehr heilbar (Heigener 2010).

Prävention

Die wichtigste Primärprävention ist die Reduzierung des Tabakkonsums, wodurch vermutlich ein größerer Effekt erzielt werden könnte als durch jeglichen diagnostischen und therapeutischen Fortschritt (Goeckenjan 2010). In den 1970er und 1980er Jahren wurden Studien zur Sekundärprävention des Lungenkarzinoms durchgeführt. Jährliche Thoraxübersichtsaufnahmen und Sputumuntersuchungen führten jedoch nicht zur Senkung der Lungenkrebsmortalität in der gescreenten Gruppe (Goeckenjan 2010). Seit 2007 werden nun Probanden für eine neue Studie zur Sekundärprävention rekrutiert, nämlich die LUSI-Studie (Lungenkrebs-Screening-Interventionsstudie), die im Rahmen einer Zusammenarbeit zwischen den Abteilungen Krebs Epidemiologie und Radiologie des deutschen Krebsforschungszentrums sowie der Thoraxklinik in Heidelberg zustande gekommen ist. In der LUSI-Studie soll geprüft werden, ob eine jährliche Mehrschichtcomputertomographie (MSCT) als Lungenkrebscreening geeignet ist. Die Screening-Probanden werden in zwölfmonatigen Abschnitten insgesamt vier Mal mit MSCT untersucht, die Kontroll-Probanden füllen jährlich einen Fragebogen aus (Becker 2010). Die Ergebnisse dieser Studie stehen noch aus.

1.3 Einteilung des Lungenkarzinoms nach WHO-Klassifikation, TNM-Stadien, UICC-Stadien und histologisches Grading

Die WHO teilt das Lungenkarzinom nach histologischen Kriterien ein. Es gibt vier Hauptentitäten: Kleinzelliges Lungenkarzinom (SCLC), Plattenepithelkarzinom (PECA), Adenokarzinom (AC), hierzu gehört auch das Adenokarzinom in situ (AIS, frühere Bezeichnung: bronchioalveoläres Karzinom), und Großzelliges Karzinom (LC). Letztere drei sind Subentitäten der Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome (NSCLC). Außerdem existieren neuroendokrine Tumoren und weitere seltene Karzinome (Travis et al.: WHO 2004).

SCLC machen ca. 20 % aller Bronchialkarzinome aus. Die restlichen 80 % verteilen sich auf die verschiedenen Subentitäten des NSCLC. Die Inzidenzen der Subgruppen des NSCLC unterscheiden sich in Abhängigkeit vom Geschlecht, dem Rauchverhalten und der ethnischen Zugehörigkeit. Sie verändern sich kontinuierlich. Vor rund 30 Jahren hatte das PECA die höchste Inzidenz, mittlerweile hat das AC aufgeholt und ist momentan das am häufigsten diagnostizierte NSCLC (Travis et al.: WHO 2004).

Grundlage der Stadieneinteilung (Staging) der NSCLC ist das TNM-System, welches anerkannten Regeln der UICC (Union internationale contre le cancer) folgt. Wie in den Tabellen 1 und 2 ersichtlich erfolgt die Zuordnung in die Stadien I bis IV anhand der Faktoren Tumorausmaß (T0-4), Lymphknotenbefall (N1-3) und Vorhandensein von Fernmetastasen (M0-1) (Wittekind 2010). Beim Kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC) kann auch das TNM-System zur Stadieneinteilung genutzt werden, gewöhnlich erfolgt jedoch die Einteilung in „Limited Disease“ (auf einen Hemithorax

begrenzt, eventuell mit regionären Lymphknoten-Metastasen, äquivalent zu TNM-Stadium I-III) und „Extensive Disease“ (Ausbreitung über einen Hemithorax hinaus, äquivalent zu TNM-Stadium IV) (Travis et al.: WHO 2004; Kirchbacher 2009).

UICC-TNM-Klassifikation des Lungenkarzinom (7. Auflage, gültig seit 2010)	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar, radiologisch und bronchoskopisch nicht sichtbar, aber positive Zytologie (Sputum etc.)
T1	Tumor bis 3 cm, Hauptbronchus frei
T1a	Läsion bis 2 cm
T1b	Läsion > 2 cm bis 3 cm
T2	Tumor > 3 cm ≤ 7 cm mit <ul style="list-style-type: none"> - Befall von Hauptbronchus ≥ 2 cm von der Carina oder - Infiltration viszeraler Pleura - Atelektase oder partielle obstruktive Entzündung
T2a	Läsion > 3 cm ≤ 5 cm
T2b	Läsion > 5cm ≤ 7 cm
T3	Tumor größer als 7 cm oder Tumor jeder Größe mit Infiltration von <ul style="list-style-type: none"> - Brustwand, - Zwerchfell, - Nervus phrenicus - mediastinaler Pleura oder - parietalem Perikard Befall des Hauptbronchus ≤ 2 cm von der Carina, Atelektase oder obstruktive Entzündung der ganzen Lunge (ehem. T4)
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration von <ul style="list-style-type: none"> - Mediastinum, - Herz, - großen Gefäße, - Trachea, - N. laryngeus recurrens - Ösophagus, - Wirbelkörpern oder - Carina Tumorherde in anderen ipsilateralen Lungenlappen (ehem. M1)
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Befall ipsilateraler peribronchialer/ hilärer Lymphknoten
N2	Befall ipsilateraler mediastinaler/ subkarinaler Lymphknoten
N3	Befall kontralateraler mediastinaler, hilärer, ipsi- oder kontralateraler Skalenus- oder supraklavikulärer Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Tumor mit malignem Pleura- oder Perikarderguss Tumorherde in anderen kontralateralen Lappen
M1b	Andere Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Lungenkarzinoms

(Travis et al.: WHO 2004; Goeckenjan et al.: S3-Leitlinie 2010; Wittekind 2010)

Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms nach UICC-TNM-Klassifikation				
Stadium 0	Tis	N0	M0	Tumor auf Schleimhaut begrenzt, kein Lymphknotenbefall, keine Fernmetastasen
Stadium IA	T1a,b	N0	M0	Lungentumor ohne Lymphknotenbefall und ohne Fernmetastasen
Stadium IB	T2a	N0	M0	
Stadium IIA	T1a,b T2a,b	N0-1	M0	Lungentumor mit begrenztem Lymphknotenbefall ohne Fernmetastasen
Stadium IIB	T2b T3 T3 (m. Herd im gleichen Lappen)	N0-1	M0	
Stadium IIIA	T1,2,3,4 T3 (m. Herd im gleichen Lappen) T4 (m. Herd in anderem Lappen ipsilateral)	N0-2	M0	Lungentumor mit fortgeschrittenem Lymphknotenbefall oder größerer Ausdehnung ohne Fernmetastasen
Stadium IIIB	Jedes T	N2-3	M0	
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1a,b	Lungentumor mit Fernmetastasen

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach UICC-TNM-Klassifikation

(Goeckenjan et al. 2010; Travis et al.: WHO 2004)

Neben dem Staging nach TNM-Klassifikation gibt es noch eine histologische Beurteilung der Tumordifferenzierung, das Grading (Graduierung des Tumors). Beim Grading wird die Ähnlichkeit der Tumorzellen mit gesunden Organzellen verglichen. Dies gibt Aufschluss über die Bösartigkeit eines Tumors. Folgende Grading-Stadien können mikroskopisch bestimmt werden: G1 (gut differenziert, d.h. dem Ursprungsgewebe noch sehr ähnlich, weniger aggressiv), G2 (mäßig differenziert), G3 (schlecht differenziert) und G4 (undifferenziert, d. h. kaum Ähnlichkeit mit Ursprungsgewebe, sehr aggressiv) (Travis et al.: WHO 2004).

1.4 Morphologische Charakterisierung der häufigsten Typen des Lungenkarzinoms

Die Validierung zytologischer Untersuchungen an Material aus BL und BAL ist ein thematischer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Voraussetzung hierfür sind Kenntnisse über die morphologischen Charakteristika des Lungenkarzinoms, auf deren Basis die Diagnose gestellt wird und die Zuteilung zu einer Tumorentität erfolgt – sowohl zytologisch als auch histologisch.

Zytologische Charakterisierung

Tumorentität	Zellform/ Wachstum	Kern	Zytoplasma	Besonderheiten
SCLC	klein, Wachstum in Strängen / Verbänden	rundlich, ,nuclear moulding‘, Nukleolen nicht sichtbar	kaum vorhanden	Quetschartefakte
Plattenepithelkarzinom	spindelrig, kaulquappen- förmig, relativ groß	polymorph, hyperchro- matisch	eosinophil	evtl. Verhornung, Nekrosen
Adenokarzinom	relativ groß, lockere Haufen oder Verbände,	bläschen- förmig, exzentrisch, große Nukleolen	meist reichlich	evtl. Schleim- vakuolen im Zytoplasma
Großzelliges Karzinom	relativ groß, einzeln oder in lockeren Haufen	mono- bis polymorph, unterschiedl. groß, deutliche Nukleolen	breiter Zytoplasma- saum	

Tabelle 3: Zytologische Charakterisierung des Lungenkarzinoms

(Feichter und Dalquen 2000; Travis et al.: WHO 2004; Koss und Melamed 2006)

Kleinzelliges Karzinom (SCLC)

Die Tumorzellen des SCLCs wachsen meist in Strängen. Aufgrund ihrer hohen Artefaktanfälligkeit erscheinen sie im selben Tumor histologisch und zytologisch in verschiedener Größe. Die Kerne der in Haufen und Verbänden liegenden Zellen schmiegen sich eng an- und ineinander, was als so genanntes „nuclear moulding“ imponiert. Die Kerne sind rundlich bis haferkornartig eingedellt („oat cell carcinoma“) und mehr oder weniger hyperchromatisch; Nukleolen sind nicht zu sehen. Zytoplasma ist nur spärlich vorhanden (Feichter und Dalquen 2000; Koss und Melamed 2006). Die genannten zytologischen Charakteristika des SCLCs werden in Abbildung 1 und 2 verdeutlicht.

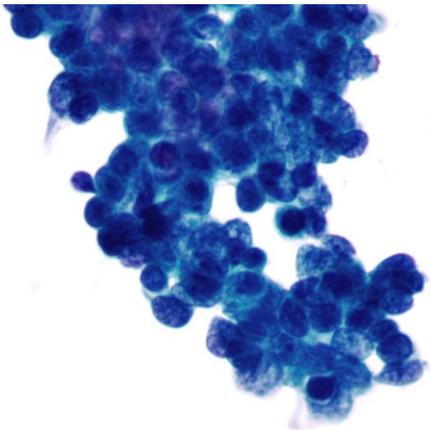


Abbildung 1: SCLC (Papanicolaou 40x)

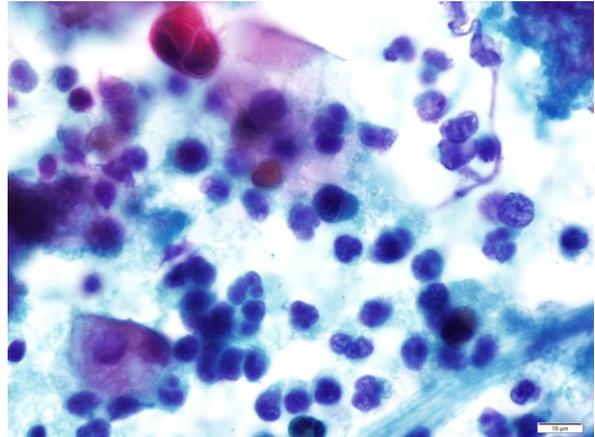


Abbildung 2: SCLC (Papanicolaou 100x)

Die häufigsten NSCLC sind das Plattenepithelkarzinom, das Adenokarzinom und das Großzellige Karzinom (Travis et al.: WHO 2004).

Plattenepithelkarzinom (PECA)

Das PECA zeichnet sich durch atypische Plattenepithelien aus, die je nach Differenzierungsgrad verhornen können. Die Tumorzellen liegen vereinzelt, überwiegend aber in Verbänden vor. Ihre Form ist rundlich, spindelig oder - wie in Abbildung 5 ersichtlich - kaulquappenförmig. Das Zytoplasma der Tumorzellen ist eosinophil, die Kerne sind polymorph wie Lavabrocken und das Chromatin ist hyperchromatisch. Der Hintergrund des PECAs ist oft schmutzig und entzündlich. Zahlreiche Nekrosen sind ein indirekter Tumorphinweis (Feichter und Dalquen 2000; Koss und Melamed 2006).

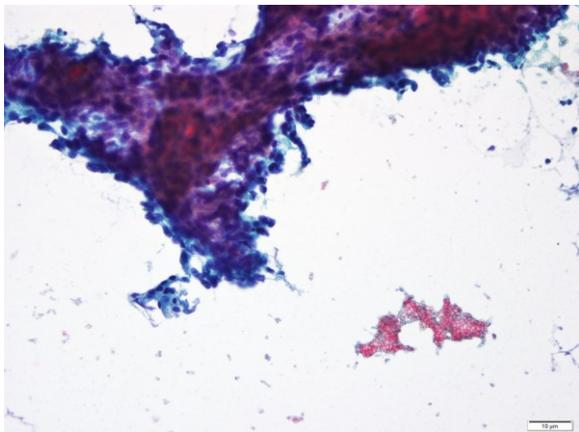


Abbildung 3: PECA (Papanicolaou 20x)

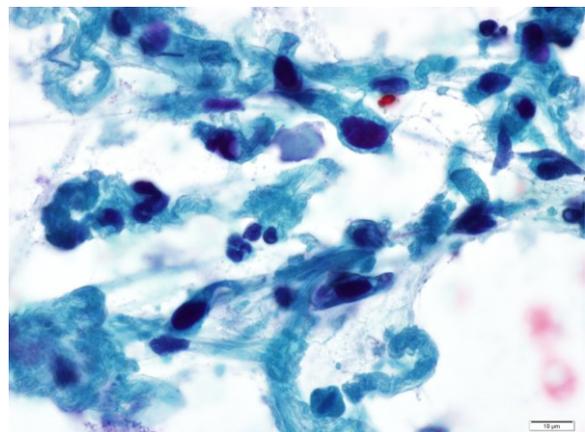


Abbildung 4: PECA (Papanicolaou 100x)

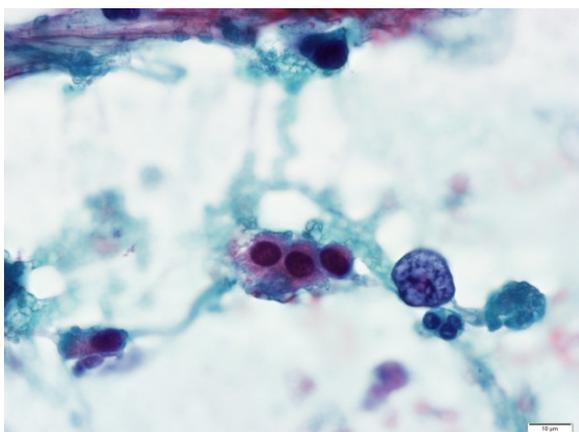


Abbildung 5: PECA (Papanicolaou 100x):
Kaulquappenzelle links unten

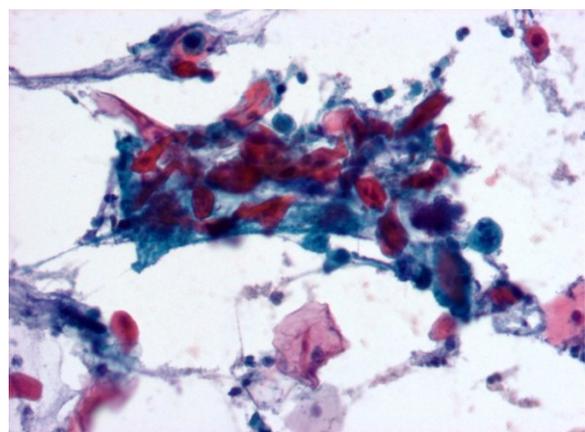


Abbildung 6: PECA (Papanicolaou 40x)

Adenokarzinom (AC)

Beim AC liegen die relativ großen Tumorzellen je nach Differenzierungsgrad in lockeren Haufen, Verbänden oder einzeln vor. Im Zytoplasma finden sich manchmal Schleimvakuolen (siehe hierzu Abbildung 8). Die Kerne sind meist bläschenförmig, exzentrisch gelegen und haben deutliche Nukleolen. ACs können solide, tubulär oder papillär aufgebaut sein, was auf ihre Abstammung vom Drüsenepithel kleiner Bronchien und Bronchiolen hinweist (Feichter und Dalquen 2000; Koss und Melamed 2006).

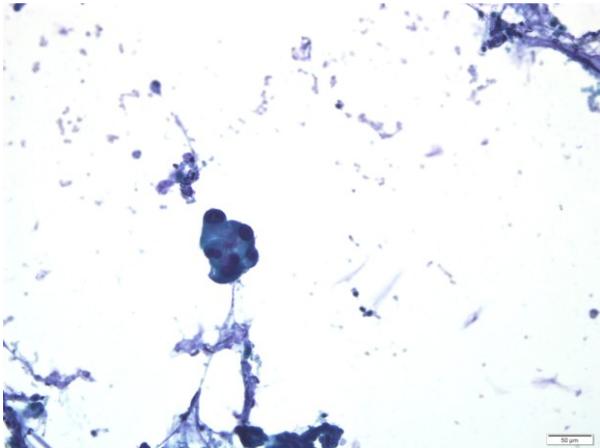


Abbildung 7: AC (Papanicolaou 20x)

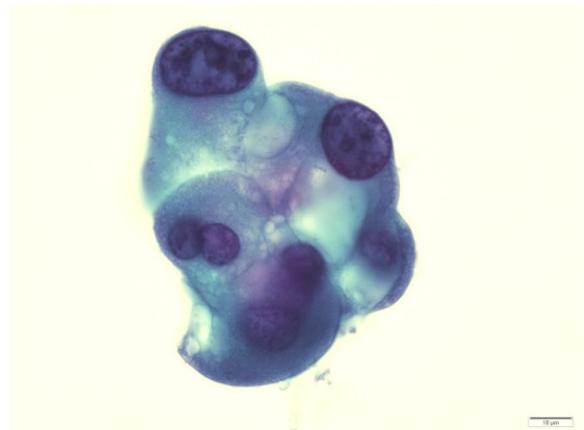


Abbildung 8: AC (Papanicolaou 100x) mit Schleimvakuolen

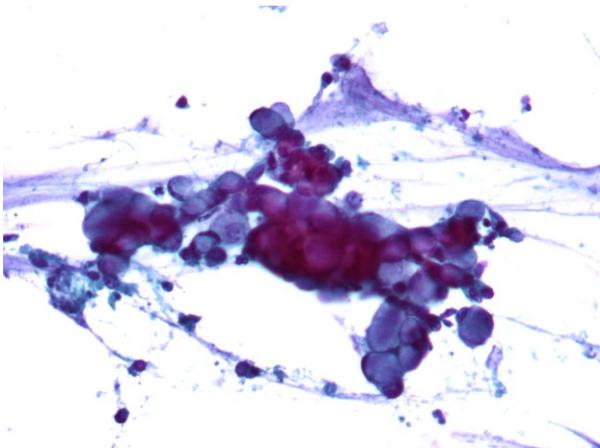


Abbildung 9: AC (Papanicolaou 40x)

Großzelliges Karzinom (LC)

Die Zellen des LCs sind größer als die des SCLCs und haben einen breiteren Zytoplasmasaum. Die Tumorzellen liegen einzeln oder in lockeren Gruppen, ihre Kerne sind monomorph bis polymorph, hyperchromatisch und von unterschiedlicher Größe. Die Nukleolen sind in der Regel gut sichtbar und teilweise multipel vorhanden. Zytoplasma gibt es meist reichlich. Schleimbildung oder Verhornung finden sich nicht. Das LC ist ein anaplastischer, wenig differenzierter Tumortyp und oft schwer zu diagnostizieren (Feichter und Dalquen 2000; Koss und Melamed 2006).

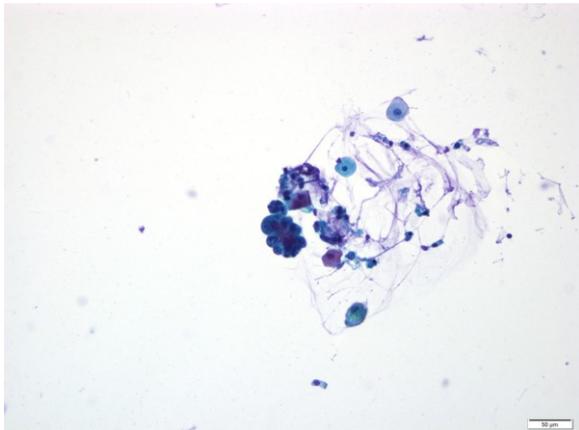


Abbildung 10: LC (Papanicolaou 20x)

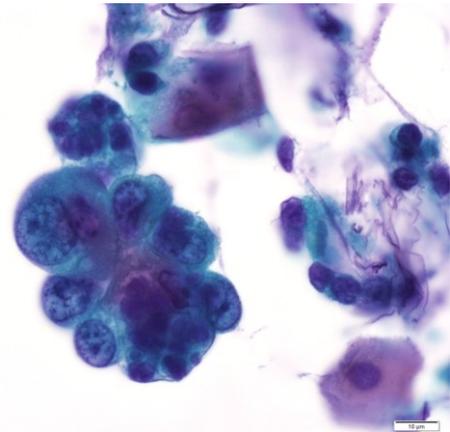


Abbildung 11: LC (Papanicolaou 100x)

Histologische Charakterisierung

Tumorentität	Histologische Charakteristika
SCLC	zentrale Lage in großen Bronchien, relativ kleine Tumorzellen, wenig kohäsiv, Quetschartefakte, palisadenartiges Wachstum entlang kleiner Blutgefäße, hohe Mitoserate
Plattenepithelkarzinom	zentrale Lage in großen und mittleren Bronchien, unterschiedliche Differenzierungsgrade: hoch differenziert mit Interzellularbrücken, zwiebelschalenähnlichen Hornperlen und gleichförmig atypischen Epithelkomplexen oder undifferenziert mit ausgedehnten Nekrosen bis hin zu Pseudozysten (Tumorkavernen), knotenförmiges Wachstum
Adenokarzinom	periphere Lage, Unterscheidung in azinäre, papilläre, solide und Schleim bildende Formen, ausgedehnte zentrale Vernarbung, knotenförmiges Wachstum, Besonderheit: Adenokarzinom in situ (AIS) mit tapetenförmiger Auskleidung der Alveolarräume durch das Karzinom
Großzelliges Karzinom	geringe Differenzierung, es fehlen eindeutige glanduläre oder plattenepitheliale Strukturen, charakteristisch sind Zellen mit großem Zellkern

Tabelle 4: Histologische Charakterisierung des Lungenkarzinoms

(Travis et al.: WHO 2004)

1.5 Therapie des Lungenkarzinoms

Die genaue zytologische und histologische Klassifizierung des Lungenkarzinoms ist von elementarer Bedeutung für die Wahl der Therapie, da sich aufgrund neuer Erkenntnisse die therapeutischen Strategien innerhalb der verschiedenen Tumorentitäten mehr und mehr unterscheiden (Travis et al.: WHO 2004).

Zunächst einmal ist hier die Differenzierung zwischen SCLC und NSCLC wichtig.

Beim SCLC stehen Bestrahlung und Chemotherapie an erster Stelle (Kirchbacher 2009).

Beim NSCLC ist die therapeutische Methode der Wahl die chirurgische Entfernung des Tumors, sofern dieser operabel ist. Der Standardeingriff ist heute die Lobektomie, die die Pneumektomie abgelöst hat (Goeckenjan 2010). Keil- oder Segmentresektionen zeigen funktionelle Vorteile, haben aber eine höhere Rezidivrate (Goeckenjan 2010). Zusätzlich zur Lobektomie wird heute standardmäßig eine systematische Lymphadenektomie durchgeführt, um das Rezidivrisiko zu verringern. In Abhängigkeit vom Tumorstadium schließt sich an die Operation eine Chemo- und/oder Strahlentherapie an (Kirchbacher 2009). Beim nicht operablen NSCLC stehen Radio- und Chemotherapie mit palliativer Zielsetzung zur Verfügung. Bei der Radiotherapie ist die Standarddosis 60-70 Gy, die Bestrahlung erfolgt 3D-konformal (Goeckenjan 2010). Die Standardchemotherapie ist eine Kombination von Cisplatin oder Carboplatin mit Vinorelbin, Gemcitabin, Docetaxel oder Pemetrexed (Goeckenjan 2010). Eine Kombination von Chemotherapie und Radiotherapie verbessert die mediane Überlebenszeit und das Langzeitüberleben (Goeckenjan 2010). Dennoch sind die Erfolge der konventionellen Therapie des NSCLC, insbesondere in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien, begrenzt, die Chemotherapie erreicht oft nur marginale Effekte (Paez et al. 2004; Kobayashi et al. 2005; Engelman et al. 2005).

Lange Zeit gab es nur die genannten Therapieoptionen, in den letzten Jahren sind einige neue, vielversprechende Therapiestrategien für das NSCLC hinzugekommen. Sodass neben der Differenzierung von SCLC und NSCLC die Subklassifizierung von NSCLC an Bedeutung gewonnen hat. Eine personalisierte Therapie rückt immer mehr in den Vordergrund. Aktuell wird intensiv nach Markern gesucht, die das Ansprechen auf eine Therapie vorhersagen können. Die Therapie soll individuell auf die Tumor-Charakteristika des einzelnen Patienten abgestimmt werden, damit dieser mit möglichst großer Wahrscheinlichkeit auch von der Therapie profitiert (Kerr 2012). Immunhistochemische Antikörper wie TTF1 (Thyroid Transcription Factor 1) oder p63 sind schon länger bekannt. Ihre Expression weist auf den Ursprung des Tumorgewebes hin und erleichtert so eine genauere Subklassifizierung der NSCLC (Kerr 2012). Mehr hierzu unter Kapitel 5.2.1.2. Neuer sind molekulare Marker. So sind z. B. aktivierende Mutationen im EGFR-Gen Prädiktoren für das Ansprechen auf eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs). Die Behandlung mit TKIs ist eine relativ neue, molekulare Therapiestrategie, die meist verträglicher ist als eine herkömmliche Chemotherapie und das progressionsfreie Überleben signifikant verlängert (Heigener 2010; Cappuzzo et al. 2010; Rosell et al. 2012). Zu den häufigsten, wenn auch insgesamt selten auftretenden Nebenwirkungen der TKI-Therapie gehören Diarrhö, Hautexantheme und Müdigkeit (Cappuzzo et al. 2010; Rosell et al. 2012). In einer multizentrischen, offenen, randomisierten Phase-III-Studie (EURTAC-Studie) von Rosell et al. wird empfohlen den TKI Erlotinib sogar als Erstlinientherapie für europäische Patienten mit fortgeschrittenem EGFR-Mutation-positiven NSCLC einzusetzen (Rosell et al. 2012). Mehr hierzu unter 1.6 und 5.2.2.

Auch für konventionelle Chemotherapeutika gibt es mittlerweile Vorhersagewerte wie z. B. die gesteigerte Aktivität des Enzyms Thymidylat-Synthase. Diese Überaktivität ist ein potentieller Biomarker für eine Therapie mit Pemetrexed, einem Folsäure-Antagonist, dessen Hauptangriffspunkt die Thymidylat-Synthase ist. Ist die Enzymaktivität gesteigert, was vor allem in SCLC und PECA der Fall ist, wird von der Therapie mit Pemetrexed eher abgeraten (Kerr 2012).

1.6 Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor

Neben der Validierung von BL/BAL ist die EGFR-Mutationsanalyse an zytologischem Material aus Pleuraergüssen ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

Das Gen für den Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR) ist auf dem Chromosom 7p12 lokalisiert. Der EGFR gehört zur Familie der ErbB-Rezeptoren, zu der noch drei weitere Rezeptoren zählen (ErbB-2, -3 und -4 bzw. HER2, 3 und 4) (Heukamp et al. 2011). Der EGFR ist aus drei Abschnitten aufgebaut: einer extrazellulären Domäne zur Ligandenbindung, einer transmembranen Domäne und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität (Rude Voldborg et al. 1997). Liganden der ErbB-Rezeptoren sind Wachstumsfaktoren wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der transformierende Wachstumsfaktor α (TGF- α) oder auch Neuroreguline (Gazdar 2009; Heukamp et al. 2011).

EGFR vermitteln verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden, die zu Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Angiogenese und verminderter Apoptose führen, sie sind in Abbildung 12 zusammengefasst (Soh et al. 2007).

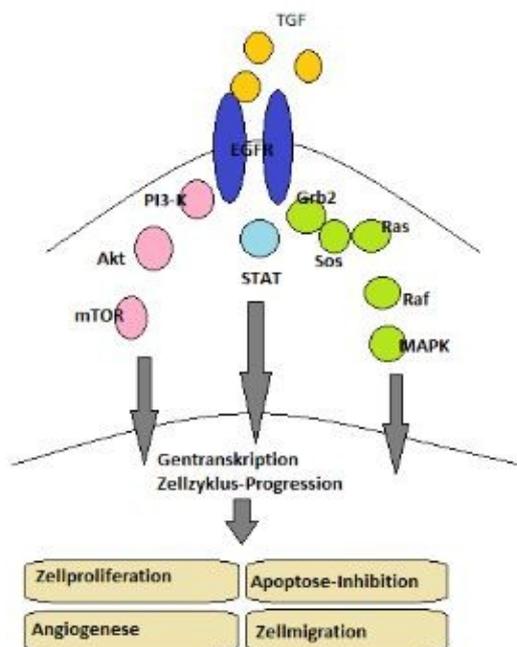


Abbildung 12: Signalwege des EGF-Rezeptors

Die Aktivierung des EGFR durch Ligandenbindung führt zur Homodimerisierung des Rezeptors mit einem anderen EGFR oder zur Heterodimerisierung mit einem anderen Mitglied der Erb-Rezeptor-Familie (Gazdar 2009). Infolge der Dimerisierung kommt es zur dreidimensionalen Rotation des EGFR, wodurch die Aktivierung der Tyrosinkinase durch Autophosphorylierung ermöglicht wird (Heukamp et al. 2011). Die aktivierte Tyrosinkinase ist Startpunkt der verschiedenen Signalkaskaden (Kumar et al. 2008; Lurje und Lenz 2009; Gazdar 2009).

Zu den wichtigsten gehört der Ras/Raf/MAPK-Signalweg: Rekrutiert durch das SH2-Adaptor-Protein Grb2 vermittelt der Ras-GDP/GTP-exchange-factor Sos die Aktivierung von Ras. Ras aktiviert Raf, welches die Aktivierung einer MAPK induziert (Rude Voldborg et al. 1997). Aktivierte MAPK phosphorylieren und regulieren spezifische intranukleäre Transkriptionsfaktoren, die die Zellmigration und -proliferation induzieren (Lurje und Lenz 2009).

Ein weiterer Signalweg ist der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg: Nach Tyrosinkinase-vermittelter Aktivierung von PI3K katalysiert dessen p110-Untereinheit die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3. PIP3 aktiviert die Serin-/Threonin-Kinase Akt, die als Protoonkogen die Apoptose hemmt und mTOR aktiviert. mTOR ist eine weitere Serin-/Threonin-Kinase, die Zellwachstum, Proteinsynthese und Transkription reguliert (Lurje und Lenz 2009).

Bei einem dritten Signalweg werden Jak-vermittelt STAT-Proteine aktiviert, die in den Nukleus translozieren und dort die Expression bestimmter Zielgene induzieren (Lurje und Lenz 2009).

EGFR werden an der Oberfläche der meisten normalen Zellen exprimiert. In vielen soliden Tumoren, wie etwa im Glioblastom, kolorektalen Karzinom, Mammakarzinom und Ovarialkarzinom ließ sich eine verstärkte EGFR-Expression nachweisen (Rude Voldborg et al. 1997; Sharma et al. 2007). So wurde eine Überexpression an EGFR auch bei 60-90 % der Patienten mit NSCLC gefunden (Engelman et al. 2005; Han et al. 2011). Die reine Überexpression des EGFR und auch die Gen-Amplifikation korrelieren jedoch nicht mit einem verbesserten Ansprechen auf Tyrosinkinaseinhibitoren (Paez et al. 2004; Marchetti et al. 2005). Nur aktivierende EGFR-Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors sind mit einem besseren Ansprechen auf eine molekulare Therapie assoziiert, sie finden sich allerdings nur in 5-20 % der NSCLC bzw. der NSCLC-Entität Adenokarzinom (Heukamp et al. 2011). 90 % aller aktivierenden EGFR-Mutationen befinden sich auf den Exons 18-21 des EGFR-Gens (Heukamp et al. 2011). Mutationen in diesen Genabschnitten führen zu gesteigerter Aktivität der Tyrosinkinase und so zu Zellproliferation, verminderter Apoptose und gesteigerter Angiogenese vermittelt durch oben genannte Signalwege. Dies ist eine Grundlage des Tumorwachstums (Tapia et al. 2009). Viele Studien haben gezeigt, dass aktivierende EGFR-Mutationen besonders häufig bei weiblichen, nichtrauchenden Patienten mit der NSCLC-Subentität Adenokarzinom gefunden werden (Kosaka 2004; Paez et al. 2004; Pao et al. 2004; Marchetti et al. 2005; Mitsudomi et al. 2005; Shigematsu und Gazdar 2006; Sharma et al. 2007; Wu et al. 2008; Jian et al. 2010).

Der EGFR kann medikamentös durch zwei unterschiedliche Strategien gehemmt werden.

Zum einen durch monoklonale Anti-EGFR-Antikörper, wie z. B. Cituximab und Panitumumab. Diese binden an die extrazelluläre Domäne des EGFR an der Oberfläche von Tumorzellen und verdrängen spezifische Liganden, sodass der EGFR nicht mehr aktiviert wird. Monoklonale Anti-EGFR-Antikörper kommen u. a. in der Therapie des kolorektalen Karzinoms zum Tragen, sie werden intravenös verabreicht (Anderson et al. 2001; Heukamp et al. 2011).

Eine andere Möglichkeit ist die kompetitive Inhibition der ATP-Bindung an die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne des EGFR, sodass der Rezeptor nicht mehr phosphoryliert und die intrazelluläre Signalkaskade nicht ausgelöst wird. Die derzeit dafür zur Verfügung stehenden TKIs, Gefitinib (ZD1839, Iressa®, AstraZeneca) und Erlotinib (OSI-774, Tarceva®, Roche), können per os eingenommen werden und blockieren die Tyrosinkinase reversibel (Anderson et al. 2001; Marchetti et al. 2005; Zhang et al. 2008; Heukamp et al. 2011). Irreversible Inhibitoren befinden sich derzeit in klinischen Studien (Sharma et al. 2007). Durch Blockade der Tyrosinkinase-Aktivität werden verschiedene Signalwege, die zu Tumorwachstum (Zellmigration und -proliferation) führen, blockiert, Apoptose wird ausgelöst (Marchetti et al. 2005; Lurje und Lenz 2009).

Mehrere Studien zeigen, dass Adenokarzinom-Patienten mit einer somatischen EGFR-Mutation von einer Therapie mit TKIs profitieren (Pao et al. 2005; Kimura et al. 2006a; Boldrini et al. 2007). Das Ansprechen auf die Therapie zeigt sich durch Verbesserung der Symptome und auch durch radiologische Regression (Cavalli et al. 2006). Eine Studie von Han et al. belegt eine signifikant längere Zeit bis zu einem Progress und ein signifikant längeres Gesamtüberleben für Patienten, die eine EGFR-Mutation haben und mit dem TKI Gefitinib behandelt werden (Han et al. 2005). Dies eröffnet eine neue Therapieoption auch in fortgeschrittenem Erkrankungsstadium.

Üblicherweise erfolgt eine EGFR-Mutationsanalyse an Lungengewebematerial (Biopsie oder OP-Resektat). Es stellt sich die Frage, ob eine EGFR-Mutationsanalyse auch an zytologischem Material aus Pleuraergüssen möglich ist. Dies böte eine gute Alternative, für die Patienten, die eine invasivere Untersuchung (Biopsie, OP) nicht verkraften würden z. B. aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes (Hung et al. 2006).

Pleuraergüsse sind ein häufiges Ereignis im Rahmen einer Lungenkrebserkrankung, ca. 15 % der Patienten haben bereits bei Erstdiagnose einen Pleuraerguss und 50 % entwickeln einen im Laufe der Erkrankung (Cavalli et al. 2006; Zhang et al. 2008). Besonders häufig treten Pleuraergüsse bei Adenokarzinomen auf, da diese peripher wachsen und die Pleurahöhle leicht infiltrieren können (Hung et al. 2006; Zhang et al. 2008). In Adenokarzinomen finden sich auch am häufigsten aktivierende EGFR-Mutationen, was den Nutzen von Pleuraerguss-Material zur EGFR-Mutationsanalyse unterstreicht (Wu et al. 2008). Ein Pleuraerguss bereitet dem Patienten Beschwerden wie Dyspnoe, Thoraxschmerz und Husten, sodass allein schon zur Linderung der Beschwerden der Pleuraerguss in der Regel behandelt werden muss und sonographisch-gesteuert apunktiert wird (Soh et al. 2006; Zhang

et al. 2008). Das gewonnene Material wird in der Pathologie zunächst zytologisch untersucht. Nach längerem Liegen oder durch Zentrifugation des eiweißreichen Pleuraerguss-Materials entsteht ein Fibrinpräzipitat, die sog. Flocke. Dieses Präzipitat kann in Paraffin eingebettet, gefärbt und mikroskopisch untersucht werden. Für diese Studie wurden die Fibrinpräzipitate für eine EGFR-Mutationsanalyse aufgearbeitet.

2 Ziele der Arbeit

Das Lungenkarzinom ist eine sehr häufige Erkrankung. Wenn Symptome auftreten, ist die Krankheit meist schon fortgeschritten. Der Zustand des Patienten kann so schlecht sein, dass es nicht möglich ist, eine Gewebeprobe bronchoskopisch oder operativ zu gewinnen. Zytologische Proben dagegen lassen sich weniger invasiv gewinnen.

Das Ziel dieser Arbeit ist den Nutzen zytologischer Untersuchungen in der Diagnostik des Lungenkarzinoms zu charakterisieren.

Zwei verschiedene Gesichtspunkte sollen in dieser Arbeit erörtert werden:

- Die zytologischen Untersuchungsmethoden an Material aus BL/BAL sollen validiert werden, indem deren Sensitivität, Spezifität sowie positiver und negativer prädikativer Wert bestimmt werden. Hieraus ergibt sich eine Qualitätssicherung in der Zusammenarbeit des Instituts für Pathologie und der Klinik für Pneumologie der Universität Rostock. Die hier übliche simultane Gewinnung und Untersuchung von zytologischen und histologischen Proben ist ein standardisiertes Verfahren, dessen Nutzen charakterisiert werden soll. Eine sich ergebende Frage ist, wann der richtige Zeitpunkt für die Entnahme der BL/BAL ist: vor der Biopsie, danach oder davor und danach.
Außerdem soll geprüft werden, wie gut eine Subklassifizierung Nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome an zytologischem Material gelingt, da dies aufgrund neuer Entwicklungen in der Therapie von großer Relevanz ist.
- In einer kleinen Anzahl ausgewählter Fälle von Adenokarzinomen der Lunge wurde eine Mutationsanalyse des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-Gens an Material aus Pleuraergüssen durchgeführt. Dass dies prinzipiell möglich ist zeigen bereits einige Studien vor allem aus Asien. In Deutschland allerdings ist dieses Verfahren noch wenig etabliert. Es soll gezeigt werden, dass die EGFR-Mutationsanalyse an zytologischem Material eine wenig invasive und grundsätzlich aufschlussreiche Methode zur Diagnosesicherung ist, die eine weitere Therapieoption für Patienten mit fortgeschrittenem Adenokarzinom der Lunge eröffnet.

3 Material und Methoden

3.1 Validierung der Zytologie

3.1.1 Gewinnung der Proben in der Klinik für Pneumologie

Die Proben, die als Grundlage dieser Arbeit dienen, stammen aus der Klinik für Pneumologie der Universität Rostock. Dort wurden sie im Rahmen einer Bronchoskopie gewonnen. Bei ca. einem Drittel aller Patienten, die bronchoskopisch untersucht werden, besteht der Verdacht auf ein Lungenkarzinom. Dieser Verdacht ergibt sich zumeist aus einer bildgebenden Untersuchung oder entsprechender Symptomatik. Andere häufige Indikationen für eine Bronchoskopie sind der Erregernachweis bei Patienten mit pulmonalem Infekt, die Diagnostik interstitieller Lungenerkrankungen sowie der Verdacht auf Sarkoidose, Lymphozytose oder exogen-allergische Alveolitis.

Ablauf der Untersuchung: Zur Vorbereitung inhaliert der Patient eine Lösung aus dem β 2-Sympathomimetikum Salbutamol und Lidocain zur Betäubung der Schleimhäute. Auf Wunsch des Patienten werden während der Untersuchung 3-5 mg Midazolam zur Beruhigung intravenös verabreicht. Während der gesamten Untersuchung wird Sauerstoff über eine Nasensonde verabreicht, um eine gute Sauerstoffsättigung sicherzustellen. Außerdem werden Blutdruck, Puls und Sauerstoffsättigung per Monitor überwacht.

Das Bronchoskop wird über die Nase, alternativ über den Mund, eingeführt und in die Bronchien vorgeschoben. Direkt zu Beginn der Untersuchung wird nochmals eine lokale Anästhesie mit Lidocain von Kehlkopf, Trachea sowie linkem und rechtem Bronchialsystem über das Bronchoskop verabreicht. Bei Husten- oder Würgereiz während der Untersuchung kann dies wiederholt werden.

Der nun folgende Untersuchungsablauf ist abhängig von der Indikationsstellung.

Besteht der Verdacht auf ein Lungenkarzinom, das biopsiert werden soll, erfolgt ein standardisierter Ablauf. Zunächst wird eine BL durchgeführt. Hierfür wird das Bronchoskop nicht ganz so tief vorgeschoben, die Bronchien werden sozusagen nur angespült. Die applizierte Natriumchlorid (NaCl) - Lösungsmenge ist nicht festgelegt. Der Rückfluss wird über das Bronchoskop gewonnen. Nach der ersten BL erfolgt die Biopsie. Hierbei werden mit einer Biopsiezange mehrere Gewebeprobe aus dem Tumor entnommen. Zentrale Tumoren sind meist gut endoskopisch sichtbar und leicht zu biopsieren. Peripher gelegene Tumoren können nicht immer gut gesichtet werden. Die Biopsie erfolgt dann unter röntgenologischer Durchleuchtung, aber dennoch mehr oder weniger blind, sodass die Wertigkeit der BL steigt, da diese auch weniger zentral gelegene Tumoren komplett umspült. Nach der Biopsie erfolgt eine weitere BL.

Bei Verdacht auf eine interstitielle Lungenerkrankung, zum Erregernachweis sowie bei Verdacht auf einen peripher gelegenen Tumor wird zumeist eine BAL durchgeführt. Hierfür wird das Bronchoskop soweit in die Bronchien vorgeschoben, bis der Durchmesser der Bronchien ein tieferes Eindringen

verhindert und die Bronchien durch das Bronchoskop verschlossen werden (Wedge-Position). Anschließend wird eine festgelegte Menge von 100 ml NaCl 0,9 % in 20 ml Aliquoten appliziert und der Rückfluss über das Bronchoskop aspiriert. Die Menge der zurückfließenden Flüssigkeit beträgt meist 50-60 ml. Vor oder nach BAL findet oftmals auch eine Zangenbiopsie statt.

Nach der Untersuchung sollte der Patient noch kurz liegen. Im Falle einer peripher durchgeführten Zangenbiopsie muss zwei bis drei Stunden nach der Untersuchung ein Röntgenbild des Thorax angefertigt werden, um die Entwicklung eines Pneumothorax auszuschließen. Der Pneumothorax ist die häufigste Komplikation von Biopsien, insbesondere bei peripherer Lokalisation.

3.1.2 Datenerhebung

Für diese Arbeit wurden alle zytologischen Untersuchungen gesammelt, die simultan mit einer Biopsie im Zeitraum von September 2008 bis Oktober 2010 stattfanden.

Grundlage der Datenerhebung war das Computerprogramm Pathix. In Pathix werden alle Untersuchungen des pathologischen Instituts elektronisch gespeichert. Hier sind Daten zum Patienten, Informationen, die auf dem Einsendezettel der Klinik stehen und die Diagnose des Pathologen einsehbar.

Aus der Pathix-Datenbank wurden Fälle heraus gesucht, in denen eine Lungenbiopsie erfolgt war (dies ergab sich meist aus den Einsendeinformationen des Klinikers). War dies der Fall, galt es zu prüfen, ob simultan zu der Biopsie eine Zytologie entnommen und eingeschickt wurde. Traf dies auch zu, wurde der Fall anonymisiert in die Datenbank für diese Arbeit aufgenommen. So konnten nach und nach alle histologischen Sendungen im genannten Zeitraum elektronisch gesichtet und die passenden Fälle in einer Excel-Tabelle gesammelt werden.

In diese Tabelle flossen folgende Informationen ein: Ifd-Nummer, E-Nummer, Z-Nummer, Alter, Geschlecht, klinische Angaben, endoskopische Angaben, histologische Diagnose, verschlüsselte histologische Diagnose, zytologische Diagnose, verschlüsselte zytologische Diagnose, Informationsgewinn durch zusätzliche histologische Stufen, angewendete immunhistochemische Verfahren und Diagnose nach ICD-O.

Es ergab sich eine Rohdatenliste. Aus der Rohdatenliste wurden doppelte und dreifache Untersuchungen entfernt, sodass pro Fall (Patient) nur eine Untersuchung blieb. In der Regel beließ man die letzte Untersuchung.

Histologische und zytologische Diagnosen wurden verschlüsselt, in dem man eine ‚0‘ für keinen Tumornachweis oder eine ‚1‘ für Tumornachweis vergab.

Das Ergebnis der histologischen Untersuchung wurde als Goldstandard gesetzt, mit dem das Ergebnis der zytologischen Untersuchung verglichen wurde. So konnte jede zytologische Diagnose als ‚richtig positiv‘, ‚richtig negativ‘, ‚falsch positiv‘ oder ‚falsch negativ‘ eingeordnet werden. Anhand der ermittelten Werte erfolgte die Berechnung von Sensitivität, Spezifität, positivem und negativem

prädiktiven Wert der zytologischen Diagnose, um deren Treffsicherheit hinsichtlich der Tumordiagnostik beurteilen zu können.

Sowohl die histologisch als auch die zytologisch malignen Proben wurden durch Zuordnung zu einer Lungenkarzinom-Entität klassifiziert.

3.1.3 Endoskopisch sichtbare und nicht sichtbare Tumoren

Für alle Fälle der Datenbank erfolgte eine Bestimmung anhand der endoskopischen Angaben auf den Einsendeformularen, ob bei der bronchoskopischen Untersuchung ein Tumor endoskopisch sichtbar war oder nicht. Ein Tumor wurde als endoskopisch sichtbar eingestuft, wenn es bronchoskopisch direkte Tumorzeichen gab, wie z. B. eine endoluminale Raumforderung, ein exophytisches Tumorwachstum oder eine Schleimhautinfiltration. Indirekte Tumorzeichen, wie Stenose der Ostien durch Kompression von außen oder fehlender Nachweis einer endoluminalen Raumforderung, sind als endoskopisch nicht sichtbar festgelegt worden. Anschließend wurde ausgewertet, ob das Vorhandensein eines sichtbaren Tumors in Zusammenhang mit dem Ergebnis der histologischen und zytologischen Diagnose steht.

Analog zu anderen Studien lassen sich endoskopisch sichtbare Tumoren als zentral und endoskopisch nicht sichtbare Tumoren als peripher im Bronchialsystem gelegen definieren (Buccheri et al. 1991; Kawaraya et al. 2003).

3.1.4 Nachverfolgung der zytologisch falsch positiven Fälle

Für die Fälle, die zytologisch falsch positiv waren, wurde mit Hilfe von Pathix geprüft, ob im Nachhinein eine zusätzliche Untersuchung wie eine Re-Biopsie, Re-Lavage, CT-gesteuerte transkutane Punktion der Lunge, Punktion anderer Organe oder Pleuraergusspunktion stattfand. Die Resultate dieser Untersuchungen verglich man mit den Ergebnissen der primär durchgeführten Bronchoskopie.

3.1.5 Vergleich der zytologischen Diagnose vor und nach Biopsie

In allen Fällen, bei denen eine zytologische Untersuchung (BL/BAL) vor und nach der Biopsieentnahme durchgeführt wurde, wurde das Ergebnis der zytologischen Diagnose (positiv oder negativ) vor der Biopsie mit demjenigen danach hinsichtlich Übereinstimmung verglichen. Die Differenz der Ergebnisse vor und nach Biopsie wurde auf Signifikanz geprüft. Zur Signifikanzprüfung ist ein Chi-Quadrat-Test bzw. der exakte Test nach Fisher durchgeführt worden; das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ % festgelegt.

3.1.6 Reevaluation

Alle falsch positiven und falsch negativen Fälle wurden zusammen mit einer zytopathologisch sehr erfahrenen Fachärztin für Pathologie reevaluiert. Hierfür wurden die Präparate erneut mikroskopisch gesichtet und ohne Kenntnis der vorherigen Diagnose neu bewertet.

Für die ermittelten Werte nach Reevaluation wurden analog Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert bestimmt.

3.1.7 Statistische Definitionen

In dieser Studie wurden Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert der zytologischen Untersuchung bestimmt.

Der Sensitivität und Spezifität liegt der Zusammenhang zu Grunde, dass ein positives Testergebnis richtig positiv oder falsch positiv sein kann. Ebenso kann ein negatives Testergebnis richtig oder falsch negativ sein.

Die Sensitivität gibt an, wie viele der betroffenen Patienten ein positives Testergebnis haben; die Spezifität, wie viele der Gesunden ein negatives Testergebnis haben.

Sie lassen sich durch folgende Formeln berechnen:

$$\text{Sensitivität} = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{TN}{TN + TP}$$

(TP = true positive (richtig positiv), FN = false negative (falsch negativ), TN = true negative (richtig negativ), FP = false positive (falsch positiv))

Weder Sensitivität noch Spezifität beantworten jedoch die Frage, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein Untersuchter mit einem positiven Testergebnis auch wirklich erkrankt ist, bzw. mit einem negativen Ergebnis wirklich gesund ist. Um diese Aussage treffen zu können, bedarf es der positiven und negativen prädiktiven Werte, die sich mit folgenden Formeln berechnen lassen:

$$\text{Positiver prädiktiver Wert} = \frac{TP}{TP + FP}$$

$$\text{Negativer prädiktiver Wert} = \frac{TN}{TN + FN}$$

Sensitivität und Spezifität sind Eigenschaften eines Tests. Positiver und negativer prädiktiver Wert hingegen sind abhängig von den Eigenschaften eines Tests, aber auch von der Prävalenz einer Krankheit (Motulsky 1995).

3.2 EGFR-Mutationsanalyse im Pleuraerguss

3.2.1 Patienten-DNA

In die Analyse eingeschlossen wurden 14 Fibrinpräzipitate (Flocken) von Adenokarzinom-Patienten mit malignem Pleuraerguss. Die Pleuraergüsse wurden im Zeitraum 2009 bis 2011 in der Klinik für Pneumologie abpunktiert und anschließend in das hiesige Institut für Pathologie zur Untersuchung eingeschickt. Im Institut für Pathologie wird das Pleuraerguss-Material standardmäßig aufgearbeitet, indem zwei bis vier Ausstriche zur zytologischen Untersuchung angefertigt und mit Papanicolaou gefärbt werden. Außerdem wird das Fibrinpräzipitat, welches bei längerer Liegezeit oder ggf. durch Zentrifugierung des Pleuraergussmaterials ausfällt, in Paraffin eingebettet. Die eingebetteten Flocken können mit HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbt und mikroskopisch untersucht werden. Für die Untersuchung wurde Zellmaterial vom Fibrinpräzipitat-Paraffinblock mit dem Mikrotom geschnitten und in ein Tube gefüllt. Die DNA wurde aus den in Paraffin eingebetteten Fibrinpräzipitaten extrahiert.

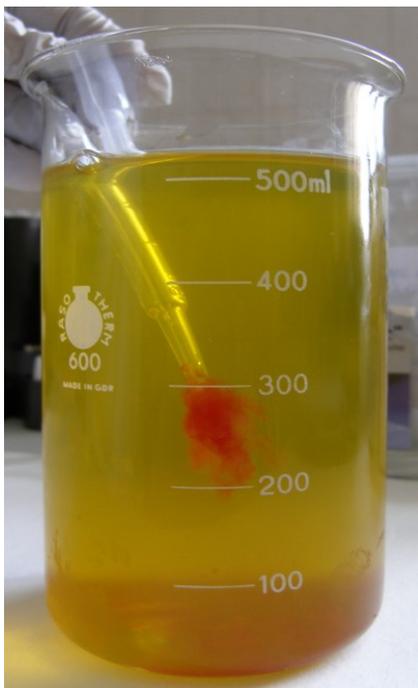


Abbildung 13: Entstehung der Flocke



Abbildung 14: Flocke vor Paraffineinbettung

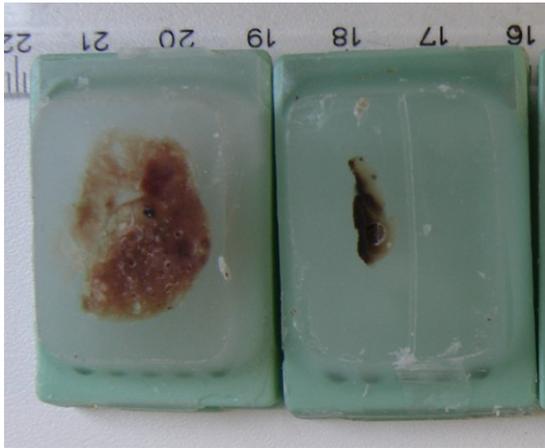


Abbildung 15: eingebettete Flocke

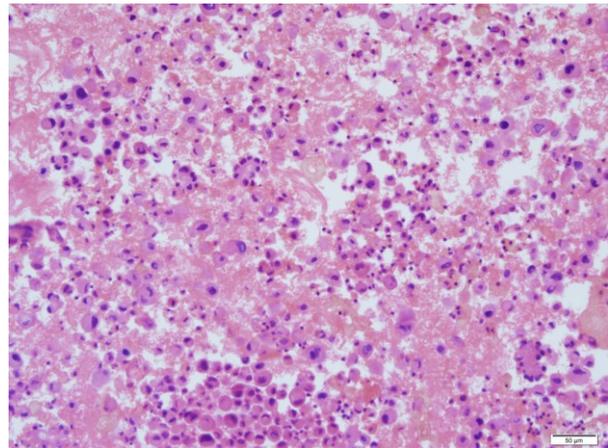


Abbildung 16: Flocke durch das Mikroskop (HE 20x)

3.2.2 Entparaffinierung

Das Gewebe wurde mit 1 ml Xylol entparaffiniert und anschließend mit Ethanol rehydriert.

3.2.3 DNA-Gewinnung

Der Verdau erfolgte je nach Gewebemenge mit 20-30 μ l Proteinase K (20 mg/ml) (Roche Diagnostics, Mannheim) über Nacht bei 56 °C im Wasserbad, anschließend Hitzeinaktivierung bei 95 °C. Die DNA wurde mit dem Wizardkit (Promega, Mannheim) aus dem Verdau extrahiert.

Im Anschluss wurde die DNA spektrophotometrisch vermessen.

3.2.4 PCR

Primersequenzen und Amplikongrößen

18 (234 bp)	
18F:	GCATGGTGAGGGCTGAGGTGA
18R:	CCCCACCAGACCATGAGAGGC
19 (158 bp)	
19F:	TGCCAGTTAACGTCTTCCTTC
19R:	GTTTCTGCTTTGCTGTGTGG
20 (268 bp)	
20F:	CCACCATGCGAAGCCCACTGA
20R:	GAGATACGGGGAGGGGAGATAAGGA
21 (264 bp)	
21F:	AGCTTCTCCCATGATGATCTGTCC
21R:	GACACCAGGGACCAGGCTGCC

Tabelle 5: Primersequenzen und Amplikongrößen

Die PCR wurde in einem Ansatz von 25 µl durchgeführt.

Reaktionsansatz: DNA: 50-70 ng

Primer (Biomers, Ulm): 10 pmol

Polymerase AmpliTaq Gold (Biosystems, Darmstadt): 1 U

5 x Puffer

dNTPs (1,25 mM)

Magnesiumchlorid (25 mM)

Von den 25 µl Gesamtvolumen wurden 10 µl für die Gelelektrophorese und 15 µl für einen Verdau genutzt.

Cyclerprogramm: Initial 10 min. bei 95 °C

35 Zyklen: 30 sek. bei 95 °C

30 sek. bei 61 °C

40 sek. bei 42 °C

Final 5 min. bei 72 °C

Abkühlung auf 4 °C

Zur Kontrolle der PCR wurde eine Gelelektrophorese mit 2 % Agarosegel durchgeführt, anschließend wurden die PCR-Produkte mit 3 µl FastAP thermosensitiver Alkalinephosphatase (1 U/µl) und 1,5 µl Exonuklease 1 (20 U/µl) (Fermentas, St. Leon-Rot) aufgereinigt. Danach folgte eine Hitzeinaktivierung für 15 min bei 85 °C.

3.2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde in einem Ansatz von 10 µl durchgeführt.

Reaktionsansatz: PCR-Produkt: 1-2 µl (je nach Stärke der Bande im Gel)

Primer: 10 pmol

BigDye Terminator v 1.1 ready reaction mix: 2 µl

5 x Sequencing Puffer: 2 µl

Cyclerprogramm: Initial 3 min. bei 94 °C

24 Zyklen: 30 sek. bei 94 °C

Final 4 min. bei 60 °C

Abkühlung auf 4 °C

Anschließend wurde die Sequenzierreaktion mit dem BigDye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) aufgereinigt. Die genetische Analyse erfolgte mit dem Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, Darmstadt). Die erhaltene Gensequenz wurde mit dem SeqScape-Programm am Computer ausgewertet.

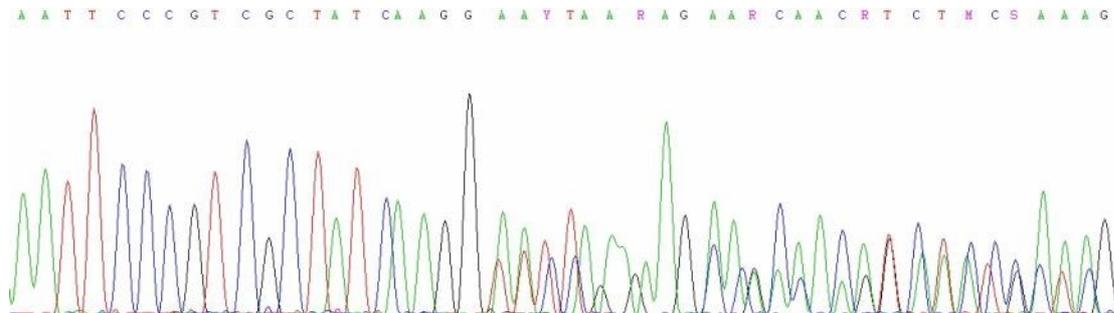


Abbildung 17: Ergebnis der direkten Sequenzierung (Nukleotidsequenz des EGFR-Gens (Ausschnitt))

4 Ergebnisse

4.1 Validierung der Zytologie mit der Histologie als Referenz

Für den Zeitraum September 2008 bis Oktober 2010 konnten 276 Untersuchungen, von 251 Patienten, ermittelt werden, bei denen eine BL oder BAL zusammen mit einer transbronchialen Biopsie durchgeführt wurde. Da einige Patienten mehrfach untersucht wurden, blieben nach Abzug der doppelten bzw. dreifachen noch 251 Fälle, die in die Statistik einbezogen wurden.

In 186 der 251 Fälle gab es eine BL/BAL vor und nach Entnahme einer Biopsie. In sechs Fällen fand nur eine BL/BAL davor und in 59 Fällen nur danach statt. War innerhalb der 186 doppelten Untersuchungen eine BL/BAL positiv und eine negativ, galt dieser Fall als zytologisch positiv, bedeutet maligne.

4.1.1 Alters- und Geschlechterverteilung

Von den 251 waren 94 Patienten weiblich (37%) (Altersspanne: 33-85 Jahre) und 157 männlich (63%) (Altersspanne: 16-88 Jahre). Das mediane Alter männlicher und weiblicher Patienten zusammen genommen betrug 68 Jahre.

Von den 251 Fällen hatten 146 (58 %) ein positives histologisches Ergebnis, dies bedeutet eine maligne oder malignitätssuspekte Diagnose nach Untersuchung einer transbronchialen Biopsie. 105 Fälle (42%) waren in der Histologie negativ. Von den 146 Patienten mit einem positiven Ergebnis waren 47 weiblich (50 % aller Frauen, Altersspanne: 41-85 Jahre) und 99 männlich (63 % aller Männer, Altersspanne: 16-88 Jahre). Das mediane Alter der Patienten mit positiver Histologie betrug 69 Jahre. Zur Altersverteilung siehe Tabelle 6 und Abbildung 18.

Altersverteilung						
Altersgruppen	Insg.	Insg. W	Insg. M	Pos. Histo	Pos. Histo W	Pos. Histo M
< 40 J.	9	3	6	2	0	2
41 – 50 J.	28	17	11	11	7	4
51 – 60 J.	52	20	32	32	13	19
61 – 70 J.	62	19	43	39	9	30
71 – 80 J.	85	29	56	50	14	36
> 80 J.	15	6	9	12	4	8

Tabelle 6: Altersverteilung

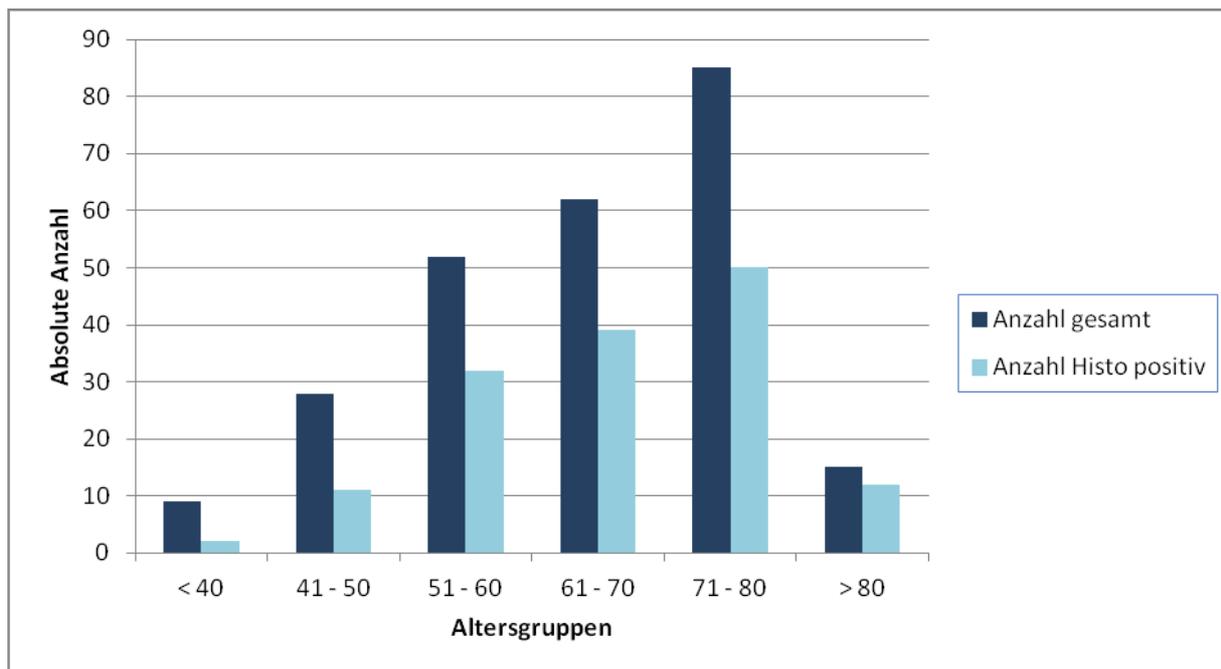


Abbildung 18: Altersverteilung

4.1.2 Endoskopische Befunde

In 236 von 251 Fällen konnte bestimmt werden, ob ein Tumor durch das Bronchoskop sichtbar war oder nicht. In 15 Fällen lagen keine endoskopischen Angaben vor. In 123 von 236 Fällen (52 %) war ein Tumor endoskopisch sichtbar, in 113 von 236 Fällen (48 %) nicht.

Treffersicherheit in Abhängigkeit von endoskopischer Sichtbarkeit eines Tumors für alle Fälle:

	Endoskopisch sichtbare Tumoren	Endoskopisch nicht sichtbare Tumoren
Insgesamt	123	113
Davon histologisch positiv	102/123 (83 %)	34/113 (30 %)
Davon zytologisch positiv	87/123 (71 %)	21/113 (19 %)

Tabelle 7: Trefferquote bei endoskopisch sichtbaren und nicht sichtbaren Tumoren insgesamt

Treffersicherheit in Abhängigkeit von endoskopischer Sichtbarkeit eines Tumors für alle Fälle, in denen eine BL/BAL vor und nach der Biopsie stattgefunden hat und die positiv in der Histologie waren:

	Positiv in Histologie	Davon Zytologie vor Biopsie positiv	Davon Zytologie nach Biopsie positiv
Endoskopisch sichtbare Tumoren	92	68/92 (74 %)	72/92 (80 %)
Endoskopisch nicht sichtbare Tumoren	24	10/24 (42 %)	15/24 (63 %)

Tabelle 8: Trefferquote bei endoskopisch sichtbaren und nicht sichtbaren Tumoren für alle Fälle mit doppelter Zytologie und positiver Histologie

Endoskopische Sichtbarkeit der histologisch positiven Fälle unabhängig von der Zytologie:

	Histologisch positive Fälle insgesamt	Davon endoskopisch sichtbar	Davon endoskopisch nicht sichtbar	Fehlende endoskopische Angaben
Fallanzahl	146	102 (70 %)	34 (23 %)	10

Tabelle 9: Endoskopische Sichtbarkeit der positiven Histologien

Endoskopische Sichtbarkeit der zytologisch positiven Fälle unabhängig von der Histologie:

	Zytologisch positive Fälle insgesamt	Davon endoskopisch sichtbar	Davon endoskopisch nicht sichtbar	Fehlende endoskopische Angaben
Fallanzahl	116	87 (75 %)	21 (18 %)	8

Tabelle 10: Endoskopische Sichtbarkeit der positiven Zytologien

4.1.3 Diagnostizierte Tumorentitäten

In 146 Fällen konnte ein maligner Tumor histologisch diagnostiziert werden. Von diesen waren 108 Fälle auch zytologisch maligne (74 %).

Von den 146 malignen Fällen wurden 95 als NSCLC, 36 als SCLC, einer als pulmonales B-Zell-Lymphom und zehn als Metastasen diagnostiziert. In vier Fällen war das Zellmaterial zwar tumorverdächtig, konnte aber nicht näher klassifiziert werden.

Die 95 histologischen NSCLC ließen sich in 89 Fällen subklassifizieren. 67 der histologischen NSCLC ließen sich auch zytologisch diagnostizieren. Siehe Abbildung 19 und Tabelle 11.

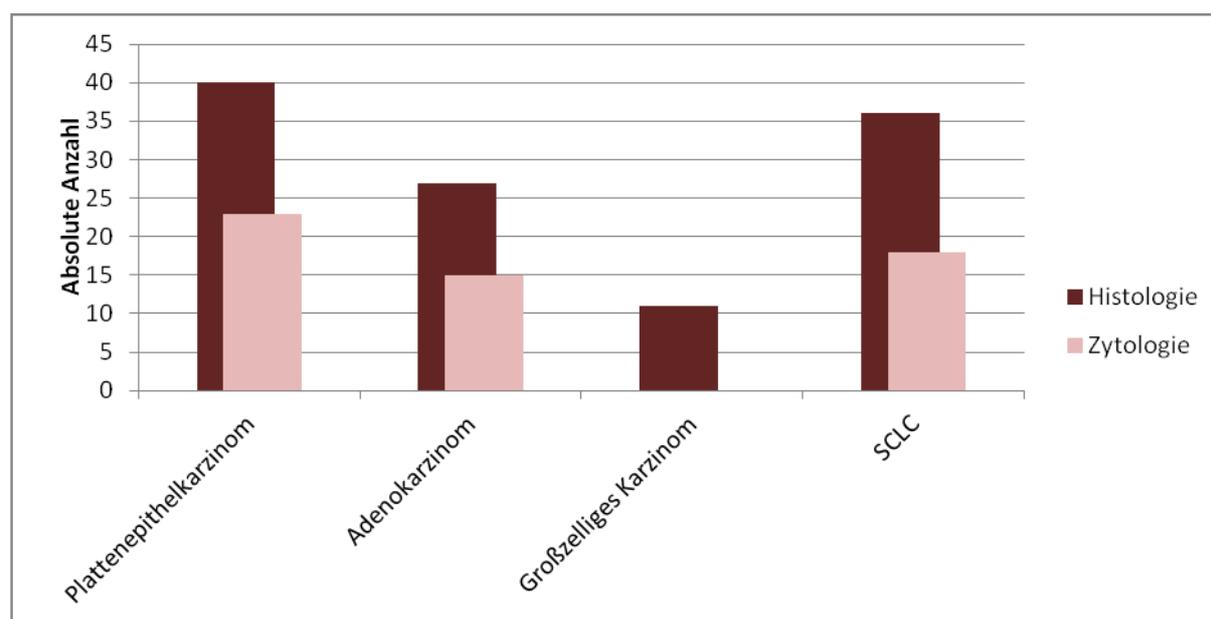


Abbildung 19: Tumorentitäten histologisch und zytologisch

Tumorentität	Histologisch	Zytologisch
Nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC) insgesamt	95	67
NSCLC-NOS (not otherwise specified)	6	3 (davon 1 AC)
Plattenepithelkarzinom (PECA)	50	31
Adenokarzinom (AC)	22	12
Großzelliges Karzinom (LC)	11	0
Atypisches Karzinoid	2	1
Pleomorphes Karzinom	3	0
Adenosquamöses Karzinom	1	0
Kleinzellige Lungenkarzinome (SCLC)	36	18
Pulmonales B-Zell-Lymphom	1	0
Metastasen anderer Tumoren (1 malignes Malignom, 2 Mammakarzinome, 2 Ösophaguskarzinome, 1 klarzelliges Nierenkarzinom, 1 Oropharynxkarzinom, 1 kolorektales und 2 gastrointestinale Karzinome)	10	5 (aber Primarius zytologisch nicht sicher zuordbar, 3 klassifizierbar in PECA/AC)
Tumorverdächtig - nicht näher klassifizierbar	4	3 (davon zytologisch 1 AC)

Tabelle 11: Ermittelte Tumorentitäten

4.1.4 Nachverfolgung der acht zytologisch falsch positiven Fälle

In drei Fällen ergab eine im Nachhinein durchgeführte CT-gesteuerte transkutane Punktion der Lunge doch eine maligne Diagnose (1x NSCLC-NOS, 1x SCLC, 1x LC). Somit war die zytologische Diagnose, was die Malignität betraf, im Gegensatz zur primären histologischen Diagnose richtig. Allerdings erbrachte die Zytologie im Fall des SCLC atypische Plattenepithelien und im Fall des Großzelligen Karzinoms lediglich atypische, aber nicht genauer klassifizierbare Zellen. Das NSCLC-NOS war auch zytologisch ein nicht sicher subtypisierbares NSCLC.

Eine zusätzliche Punktion der Leber ergab in einem weiteren Fall Metastasen eines SCLC, wodurch die maligne zytologische Diagnose bestätigt wurde. Allerdings favorisierte die Zytologie in diesem Fall die Diagnose Adenokarzinom und nicht SCLC.

In einem Fall zeigte sich in einer späteren Re-Biopsie mit gleichzeitiger Re-BL ein entzündliches Bild, sodass dieser Fall tatsächlich falsch positiv zu sein scheint.

In drei Fällen war eine zusätzliche Untersuchung nicht evaluierbar.

Nach der Nachverfolgung blieben also vier Fälle, die falsch positiv bzw. nicht überprüfbar waren.

Die Rate der falsch positiven Ergebnisse sinkt somit von 3 % auf 1,6 %.

4.1.5 Trefferquote der BL/BAL vor bzw. nach Biopsieentnahme

Neben dem Vergleich der histologischen und zytologischen Diagnosen wurde außerdem die zytologische Diagnose der BL/BAL vor der Biopsie mit der Diagnose nach der Biopsie (Zytologie 1 und 2) verglichen und das Ergebnis auf Signifikanz geprüft.

Diese doppelte BL/BAL wurde in 186 von 251 Fällen durchgeführt.

Von diesen 186 Fällen wurde in 126 Fällen ein maligner Tumor histologisch gesichert. Ein positives histologisches Ergebnis gilt als Maßstab für die Beurteilung der Treffsicherheit von BL/BAL.

Vor der Biopsie war die BL/BAL in 89 von 126 Fällen (71 %) auch zytologisch positiv und nach der Biopsie in 105 von 126 Fällen (83 %).

Um den Unterschied zwischen den Diagnosen von Zytologie 1 und 2 auf Signifikanz zu prüfen wurde der Chi-Quadrat-Test bzw. der exakte Test nach Fisher durchgeführt mit einem statistischen Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Für die Treffsicherheit der BL/BAL vor bzw. nach Biopsie, 71 % versus 83 %, ließ sich ein p-Wert von 0,03 ermitteln. Damit ist Treffsicherheit der BL/BAL nach Biopsie signifikant höher.

4.1.6 Sensitivität und Spezifität der zytologischen Untersuchung

Zytologisch (in BL/BAL) konnten 116 Fälle als positiv und 135 als negativ diagnostiziert werden. Unter Festlegung der histologischen Diagnose als Goldstandard ließ sich das Ergebnis der zytologischen Untersuchung mit dem der histologischen vergleichen und als richtig positiv (TP), falsch positiv (FP), richtig negativ (TN) oder falsch negativ (FN) bezeichnen.

Folgende Werte konnten bestimmt werden:

TP	FP	TN	FN
108 (43 %)	8 (3 %)	97 (39 %)	38 (15 %)

Tabelle 12: TP, FP, TN, FN der zytologischen Untersuchung

Für das Ergebnis der zytologischen Untersuchung ließen sich somit anhand der in Kapitel 3.1.7 erläuterten Formeln berechnen:

Sensitivität	74 %
Spezifität	92 %
Positiver prädiktiver Wert	93 %
Negativer prädiktiver Wert	72 %

Tabelle 13: Sensitivität, Spezifität, PPW, NPW der zytologischen Untersuchung

In den insgesamt 46 falsch negativen und falsch positiven Fällen wurde eine erneute mikroskopische Sichtung der Präparate zur Reevaluation durchgeführt. Nach der Reevaluation verblieben alle acht falsch positiven Fälle falsch positiv. Von den falsch negativen blieben nur noch fünf von 38 falsch negativ, 33 stellten sich in der Reevaluation doch als positiv dar. Ein Fall wurde aus der Statistik ausgeschlossen, da das Material nicht repräsentativ war. Dadurch ergaben sich nach Reevaluation folgende Werte:

TP	FP	TN	FN
140	8	97	5

Tabelle 14: TP, FP, TN, FN der zytologischen Untersuchung nach Reevaluation

Es ließen sich für die Situation nach Reevaluation analog berechnen:

Sensitivität	97 %
Spezifität	92 %
Positiver prädiktiver Wert	95 %
Negativer prädiktiver Wert	95 %

Tabelle 15: Sensitivität, Spezifität, PPW, NPW der zytologischen Untersuchung nach Reevaluation

4.2 EGFR-Mutationsanalyse im Pleuraerguss

Patienten-Nr.	Alter	Geschlecht	Ergebnis der EGFR-Mutationsanalyse
1	86	W	Deletion Exon 19 (K745_A750del)
2	82	W	WT(Q787Q)
3	49	M	WT(Q787Q)
4	60	M	WT(Q787Q)
5	61	M	WT(Q787Q)
6	66	W	WT(Q787Q)
7	77	M	WT
8	69	M	WT(Q787Q)
9	67	W	WT
10	77	W	Punktmutationen in Exon 20 (V769M, G779F)
11	78	W	WT
12	69	W	WT
13	83	W	Deletion Exon 19 (L747_S752del)
14	48	M	WT

Tabelle 16: Ergebnisse der EGFR-Mutationsanalyse

In allen 14 Fällen konnte eine komplette EGFR-Mutationsanalyse durchgeführt werden. Die untersuchte DNA stammte von acht weiblichen und sechs männlichen Patienten. Das mediane Alter der Patienten betrug 67 Jahre (Altersspanne: 48 bis 86 Jahre).

In elf der 14 Fälle konnte keine relevante Mutation im EGFR-Gen gefunden werden, allerdings lag in sechs der elf Fälle die Punktmutation Q787Q vor, die jedoch die Aminosäuresequenz des EGFR-Gens nicht verändert und deswegen keinen Einfluss auf die Aktivität des EGFR hat. In drei Fällen konnte eine EGFR-Mutation nachgewiesen werden, einmal sogar zwei Mutationen in einem Fall. Alle drei Fälle stammten von weiblichen Patienten.

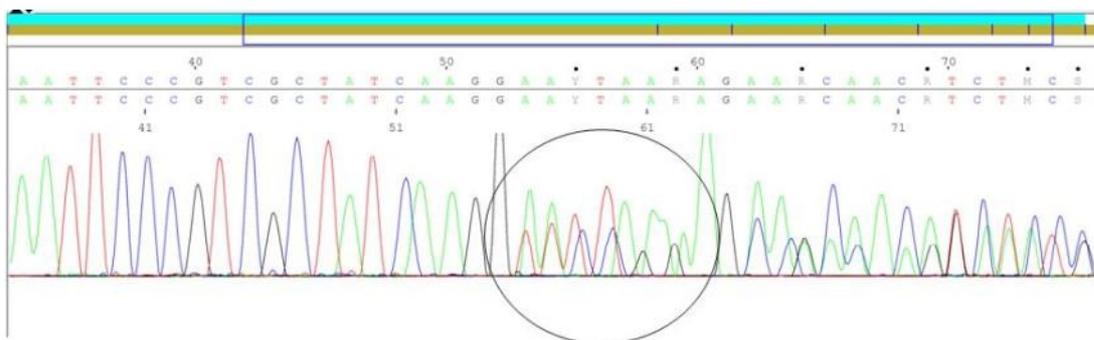


Abbildung 20: Sequenzierung Exon 19 Deletion

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

5.1.1 Validierung der Zytologie

Aus dem Zeitraum September 2008 bis September 2010 wurden alle Fälle zusammen getragen, bei denen simultan eine Histologie (Gewebeprobe aus der Lunge) und eine Zytologie (BL/BAL) gewonnen wurden. Anschließend wurden doppelte Untersuchungen aus der Datensammlung herausgenommen, sodass pro Fall eine Untersuchung blieb. Belassen wurde in der Regel die zweite Untersuchung, die dann oftmals eine positive histologische Diagnose erbrachte. Re-Bronchoskopien finden meist nur dann statt, wenn der starke klinische Verdacht auf das Vorliegen eines Lungenkarzinoms vorliegt, die erste Bronchoskopie aber nicht diagnostisch war. Hierin liegt unsere Entscheidung begründet, die zweite positive Untersuchung in die Statistik aufzunehmen.

Nachteil der genannten Vorgehensweise ist einerseits, dass es sich um eine retrospektive Untersuchung handelt und andererseits, dass die Studie nicht verblindet war. Der untersuchende Pathologe war bei Diagnose der Zytologie oft bereits in Kenntnis der Histologie, sodass ein bestimmtes Ergebnis erwartet und die Diagnose nicht völlig unvoreingenommen gefällt wurde.

Ein positiver Aspekt dieser Studie ist, dass ein homogenes Patientenkollektiv untersucht wurde. Alle Untersuchungen stammen aus einem Zentrum, der Klinik für Pneumologie und dem Institut für Pathologie der Universität Rostock. Das Besondere an der hiesigen Lungenkarzinomdiagnostik ist, dass es sich um einen standardisierten Prozess handelt, bei dem Histologie und Zytologie simultan innerhalb einer bronchoskopischen Untersuchung gewonnen werden. Das Gewinnen der Proben und deren Untersuchung liegen in den Händen einer kleinen Anzahl von Ärzten. Auch die pathologischen Beurteilungskriterien der Proben am hiesigen Institut sind homogen und standardisiert, sodass die Ergebnisse verschiedener untersuchender Pathologen vergleichbar sind.

5.1.2 EGFR-Mutationsanalyse im Pleuraerguss

Es wurden 14 Fibrinpräzipitate aus Adenokarzinomen herausgesucht, deren Material geeignet für eine Mutationsanalyse war. Dies traf zu, wenn möglichst wenig Entzündungszellen und möglichst viele Tumorzellen mikroskopisch erkennbar waren. An diesen 14 Fibrinpräzipitaten wurde eine molekulare EGFR-Mutationsanalyse, bestehend aus enzymatischer DNA-Extrahierung, Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation der DNA und Sanger-Sequenzierung (direkte Sequenzierung), durchgeführt. Die Proben stammten allesamt aus Adenokarzinomen, die bereits histologisch oder zytologisch gesichert waren. Die Entscheidung, nur ACs zu untersuchen, beruhte auf den Ergebnissen verschiedener Studien, die zeigen, dass eine EGFR-Mutation, die mit positivem Ansprechen auf TKIs assoziiert ist, eher in

Adenokarzinomen und kaum in anderen Subentitäten der NSCLC zu erwarten ist (Wu et al. 2008; Jian et al. 2010).

Nachteilig war, dass es zum Zeitpunkt der Studie noch kein Laser-Capture-Mikrodissektionsgerät zur Anreicherung der Proben mit Tumorzellen am Institut für Pathologie gab. Das zu untersuchende Material wurde per Hand vom Objektträger gekratzt (manuelle Mikrodissektion), weshalb nicht so hohe Reinheitswerte der Tumorzellen wie im Wege der Laser-Mikrodissektion erreicht werden konnten. Dennoch war die Tumorzellzahl in den Proben ausreichend, um eine Sequenzierung durchzuführen und auch eine Studie von Boldrini et al. konnte zeigen, dass die manuelle Mikrodissektion suffizient ist (Boldrini et al. 2007).

Die hier angewandte Methode der direkten Sequenzierung wird nicht von allen Autoren als geeignete Methode zur EGFR-Mutationsanalyse an zytologischem Material gesehen, da die normalen Zellen in den relativ heterogenen zytologischen Proben die Detektion der Mutation beeinträchtigen können (Kimura et al. 2006b; Jian et al. 2010). Einige Studien zeigen, dass es sensitivere Methoden gibt, z. B. Scorpion ARMS, Light Cycling PCR oder SSCP Assay (Marchetti et al. 2005; Kimura et al. 2006b; Jian et al. 2010). Der Nachteil dieser Methoden ist, dass sie nicht die Exone 18-21 des Kinase-Gens komplett auf das Vorhandensein einer Mutation untersuchen, sondern jeweils nur für die in der jeweiligen Studie gesuchten Mutationen konstruiert sind. Meistens sind dies die Inframe-Mutation E746_A750del in Exon 19 und die Punktmutation L858L in Exon 21 (Malapelle et al. 2011; Kerr 2012). Diese zwei Mutationen machen zwar 90 % aller Mutationen aus, neuere Studien finden aber immer mehr klinisch relevante Mutationen, z. B. die Punktmutation T790M auf Exon 20, die mit einer Resistenz für TKIs assoziiert ist (Gazdar 2009). Die direkte Sequenzierung ist derzeit der Goldstandard in der EGFR-Mutationsanalyse, weil sie die einzige Methode ist, die alle Mutationen detektieren kann (Smouse et al. 2009; Malapelle et al. 2011). Unsere Studie und auch andere konnten zeigen, dass sich eine EGFR-Mutationsanalyse zuverlässig mit direkter Sequenzierung durchführen lässt (Hung et al. 2006; Wu et al. 2008).

Die Anzahl der untersuchten Fälle in der vorliegenden Arbeit war gering und die Studie retrospektiv. Das Ziel war, zunächst experimentell eine neue Untersuchungsmethode an der Universität Rostock einzuführen. Die Beschränkung auf die geringe Zahl ermöglichte eine zügige Durchführung der Untersuchung, sodass Ergebnisse nach kurzer Zeit zur Verfügung standen. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieses Manuskripts hat die EGFR-Mutationsanalyse an Material aus malignen Pleuraergüssen bereits Einzug in den klinischen Alltag der Universität Rostock gehalten und eröffnet Patienten mit fortgeschrittenem Adenokarzinom eine neue Therapiestrategie mit Tyrosinkinaseinhibitoren.

5.2 Ergebnisdiskussion

5.2.1 Validierung der Zytologie

5.2.1.1 Gesamttreffsicherheit der Zytologie

Die vorliegende Arbeit ermittelte eine Gesamttrefferquote für die Zytologie von 74 % hinsichtlich Malignität (unter Festlegung der Histologie als Referenz).

Dies bedeutet, dass in 74 % der Fälle die Diagnose der Zytologie mit der der Histologie korrelierte. Ähnliche Ergebnisse finden sich auch in der Literatur. So publizierten Naryshkin et al. eine Übereinstimmung von Histologie und Zytologie in 74,6 % und Mak et al. in 76 % (Mak et al. 1990; Naryshkin et al. 1992).

5.2.1.2 Falsch positive Zytologie-Diagnosen hinsichtlich Malignität

116 zytologische Proben wurden als maligne diagnostiziert, 108 davon waren auch histologisch positiv. Acht Fälle waren allerdings histologisch negativ und müssen unter Festlegung der Histologie als Referenz als falsch positiv konstatiert werden. Somit ergibt sich eine Rate falsch positiver zytologischer Ergebnisse von 3 %. Durch eine Nachverfolgung konnten vier der acht Fälle als tatsächlich maligne identifiziert werden, sodass vier falsch positive Fälle verbleiben. Dies entspricht einer Rate von 1,6 %. Diese Werte liegen etwas über den in der Literatur publizierten Werten, dort wird überwiegend eine Rate falsch positiver zytologischer Ergebnisse von 1 % angegeben (Thivolet-Béjui 1997; Policarpio-Nicolas und Wick 2008), bei Piaton nur 0,08 % (Piaton et al. 1995). Ein möglicher Grund für die etwas höhere Rate am hiesigen Institut ist, dass in dieser Arbeit auch zytologisch suspekta Fälle als maligne definiert wurden.

Warum ein eigentlich benigner Befund als maligne verkannt wird ist abhängig vom vermuteten Tumortyp, was im Folgenden aufgeführt wird.

Fallstricke bei der Diagnose Adenokarzinom

Hier sind an erster Stelle entzündlich-reaktive Veränderungen des Bronchialepithels zu nennen (Crapanzano et al. 2011; Idowu und Powers 2012).

Aber auch atypische epitheliale Zellen nach Radiatio, durch physikalische Schäden oder durch ungenügende Fixierung bzw. Konservierung können irritierend sein (Policarpio-Nicolas und Wick 2008; Idowu und Powers 2012).

Ebenso können chronische Lungenerkrankungen wie Silikose und Pneumonie oder eine Lungenarterienembolie zu reaktiven Zellatypien führen, die maligne anmuten können (Thivolet-Béjui 1997).

Ein weiterer möglicher Fallstrick sind Zellveränderungen, die durch Aspiration von Nahrungsresten hervorgerufen werden (Policarpio-Nicolas und Wick 2008).

Besondere Probleme ergeben sich bei der Diagnose des Adenokarzinoms in situ (AIS, frühere Bezeichnung: bronchioalveoläres Karzinom). Das AIS ist schwer zu unterscheiden von der Typ-2-Pneumocyten-Hyperplasie, insbesondere bei zytologischen Proben aus dem tiefen Respirationstrakt (Thivolet-Béjui 1997; Crapanzano et al. 2011). Außerdem können Entzündungen und Verletzungen zu reaktiven Veränderungen führen, die dem AIS stark ähneln, z. B. virale Infektionen, chronisch interstitielle Pneumonitis, Fibrose, Lungenarterienembolie, Asthma bronchiale und Zustand nach Radiatio (Thivolet-Béjui 1997). Diese reaktiven Veränderungen haben, wie das AIS, meist einen entzündlichen Hintergrund und atypische Epithelien mit oftmals fehlenden Zilien. Die Kerne und das Zytoplasma zeigen Atypiezeichen. Ein wichtiger Unterschied ist aber, dass es beim AIS in der Regel zwei getrennte Zellpopulationen gibt, eine benigne und eine maligne. Bei reaktiven Veränderungen und Typ-2-Pneumocyten-Hyperplasie zeigt sich eher ein polymorphes Zellbild mit normalen Zellen und Zellen in allen möglichen Atypiestadien (große Variationen hinsichtlich Kernform und Zytoplasmabeschaffenheit) (Crapanzano et al. 2011).

Auch die Verwechslung mit einem sehr seltenen pulmonalen Hamartom ist denkbar. Das Hamartom hat zytologisch bis zu vier Komponenten in unterschiedlicher Verteilung: epitheliale Zellen, mesenchymales Gewebe, Knorpel und fibromyxoides Stroma. Das Fehlen von Knorpel bzw. der fibromyxoiden Komponente des Hamartoms oder das Vorherrschen von Epithelzellen können zur Verwechslung mit einem Adenokarzinom führen, außerdem kann die fibromyxoide Komponente Mucin ähneln, was zur Diagnose eines mucinösen Adenokarzinoms verleiten kann (Policarpio-Nicolas und Wick 2008; Crapanzano et al. 2011).

Fallstricke bei der Diagnose Plattenepithelkarzinom

Zellatypien durch Pilzinfektion, insbesondere *Aspergillus fumigatus*, können ein Plattenepithelkarzinom vortäuschen. Aspergillome können bereits radiologisch mit Tumorkavernen des Plattenepithelkarzinoms verwechselt werden (Policarpio-Nicolas und Wick 2008; Crapanzano et al. 2011).

Andere Fallstricke sind Degeneration bzw. reaktive Veränderungen des metaplastischen Plattenepithels; hier bereitet vor allem ein stark nekrotisches Zellbild Probleme bei der Diagnostik, da das Plattenepithelkarzinom typischerweise auch Nekrosen zeigt (Crapanzano et al. 2011).

Auch reaktive Zellveränderungen durch eine Tracheostoma-Anlage können irreleiten. Diese Veränderungen können auch an weiter vom Tracheostoma entfernt liegender Schleimhaut und auch noch Jahre nach der Entfernung des Tracheostomas auftreten (Policarpio-Nicolas und Wick 2008).

Fallstricke bei der Diagnose Kleinzelliges Karzinom

Die Reservezell-Hyperplasie, die vor allem bei chronischen Erkrankungen der Lunge wie Bronchiolitis oder Bronchiektasen auftritt, kann leicht mit einem SCLC verwechselt werden. Weiterhin sind hier die follikuläre Bronchitis und Lymphome zu nennen (Koss und Melamed 2006; Policarpio-Nicolas und Wick 2008; Crapanzano et al. 2011).

5.2.1.3 Falsch negative Zytologie-Diagnosen hinsichtlich Malignität

In 38 Fällen (14 %) war die Zytologie negativ, obwohl die Histologie positiv war. Diese Fälle sind demnach falsch negativ.

Als Gründe für falsch negative Ergebnisse werden in der Literatur hauptsächlich Fehler bei Entnahme und Aufarbeitung der Proben angegeben (Crapanzano et al. 2011). Dem können wir uns anschließen. Offenbar werden nicht immer Tumorzellen mit der Lavageflüssigkeit erfasst. Ein Plattenepithelkarzinom, das stark nekrotisch und akut entzündlich erscheint, kann zytologisch und auch radiologisch als Lungenabszess verkannt werden (Saad und Silverman 2009).

Auch pulmonale Karzinoide werden häufig übersehen, was auf die blassen Zellen und die meist geringe Tumorgroße zurückzuführen ist (Saad und Silverman 2009).

5.2.1.4 Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert der Zytologie

Die vorliegende Arbeit berechnete folgende Werte: Sensitivität 74 %, Spezifität 92 %, Positiver prädiktiver Wert 93 % und Negativer prädiktiver Wert 92 %.

Die von uns ermittelte Sensitivität der Zytologie übertrifft die in der Literatur publizierten Werte. So fanden Kvale et al. eine Sensitivität von 65 % und Bhat et al. von nur 36 % (Kvale et al. 1976; Bhat et al. 1990). Gründe dafür könnten sein, dass diese Studien über 20 Jahre alt sind und sich die Zytologie in den letzten Jahrzehnten deutlich weiterentwickelt hat. Leider ließen sich keine aktuellen vergleichbaren Studien finden, vermutlich weil heute in zytopathologisch-arbeitenden Zentren oft Feinnadelaspirationen (FNA) der BL/BAL vorgezogen werden, da diese meist mehr Material liefern. Zum anderen könnten die guten Ergebnisse auch auf das standardisierte Verfahren der Probengewinnung und Probenuntersuchung am Universitätsklinikum Rostock zurückzuführen sein.

Eine andere ähnliche Studie aus dem hiesigen Pathologieinstitut untersuchte eine größere Fallzahl und kam zu vergleichbaren Ergebnissen (Zimpfer et al. 2012).

5.2.1.5 Zytologische Subklassifizierung der NSCLC

Der Erfolg der zytologischen Subklassifizierung hängt vom Tumortyp ab. Folgende Quoten konnte die vorliegende Arbeit verzeichnen:

NSCLC-Subentität	Zytologische Trefferquote
Plattenepithelkarzinom	62%
Adenokarzinom	55%
Großzelliges Karzinom	0%
Atypisches Karzinoid	50% (insgesamt nur 2 gefunden)
Pleomorphes Karzinom	0%
Adenosquamöses Karzinom	0%

Tabelle 17: Zytologische Treffsicherheit für die verschiedenen NSCLC-Subentitäten

An dieser Stelle ist anzumerken, dass die WHO-Einteilung eine Empfehlung zur histologischen Klassifikation von Lungenresektaten ist. Da sich die Mehrheit der Patienten aber mit unresektablen Krankheitsstadien präsentiert stehen in der Regel nur kleine Biopsieproben oder Zytologien für die pathologische Diagnostik zur Verfügung. Dies wird in der WHO-Klassifikation nicht berücksichtigt (Nicholson et al. 2010; Kerr 2012). Im Zuge neuer minimal-invasiver Biopsiemethoden werden die Proben immer kleiner, die Herausforderung für den Pathologen hingegen immer größer, da mehr und mehr Untersuchungen, wie z. B. auch molekulare Analysen, am wenigen Material gefordert werden (Travis et al. 2010; Kerr 2012).

In dieser Studie wurden 95 NSCLC histologisch gesichert, von denen 89 histologisch subklassifiziert werden konnten. Von diesen 95 NSCLC konnten 67 auch zytologisch gesichert werden, eine Subklassifizierung wurde allerdings nur in 44 Fällen (66 %) angegeben. Die restlichen 23 wurden als nicht weiter subtypisierte NSCLC (NSCLC-NOS) bezeichnet.

Neue Therapiestrategien unterscheiden sich innerhalb der NSCLC-Subentitäten maßgeblich. Dies beruht auf Erkenntnissen, die so neu sind, dass sie im Untersuchungszeitraum der vorliegenden Studie noch nicht die gleiche Relevanz für die Diagnosestellung hatten wie heute. So muss diskutiert werden, ob es auch in mehr als 44 von 67 Fällen möglich gewesen wäre, eine Subtypisierung durchzuführen, dies aber nicht getan wurde, weil es zum damaligen Zeitpunkt nicht nötig war. Bis dato genügte in der Regel die Unterscheidung von SCLC und NSCLC für die Therapiewahl. Aktuell reicht diese Einteilung nicht mehr aus (Kerr 2012).

Die Möglichkeit an zytologischen Proben eine Subklassifizierung von NSCLC durchführen zu können, wird kontrovers diskutiert. Ein häufiges Argument dagegen ist, dass die Zerstreuung der Zellen im

Ausstrich und das Fehlen der Gewebsarchitektur ein korrektes Subklassifizieren behindern (Sigel et al. 2011). Trotz nicht vorhandener konventioneller Architektur gibt es aber auch in der Zytologie strenge morphologische Kriterien, die zu einer richtigen Diagnose führen. Tatsächlich bietet die Zytologie sogar einige Vorteile gegenüber histologischen Proben. Zum einen ist die zumeist für Zellausstriche verwendete Papanicolaou-Färbung sehr sensitiv für das Plattenepithelkarzinom und macht bereits eine minimale Verhornung sichtbar. Dieses kann eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung nicht leisten. Zum anderen bilden sich in Zellausstrichen charakteristische morphologische Muster aus, die auf einen Tumortyp hinweisend sein können. In histologischen Proben sind diese typischen Muster nicht zu finden. Außerdem gibt es bei zytologischen Proben keine Artefakte durch Formalin-Fixierung, die bei der Diagnostik Schwierigkeiten bereiten können (Mazzone et al. 2002; Rekhtman et al. 2011).

Ein weiterer Kritikpunkt ist die geringe Zellzahl in zytologischen Proben, die weitere immunhistochemische Untersuchungen oder molekulare Analysen erschwert, da hierfür mehr Gewebe benötigt wird als bei einer konventionellen morphologischen Diagnostik allein (Rekhtman et al. 2011; Kerr 2012). In der Tat ist die Zellularität in zytologischen Proben, vor allem in BL/BAL, oftmals eher gering. Feinnadelaspirate erreichen aber eine Zellzahl, die mit kleinen Biopsien vergleichbar ist, wenn nicht gar höher (Mazzone et al. 2002). Außerdem können aus zytologischen Proben, bei denen Zellen in Suspension vorliegen, in Paraffin eingebettete Zellblöcke hergestellt werden, wie auch in dieser Studie die Fibrinpräzipitate aus Pleuraergüssen. An solchen Zellblöcken lassen sich durchaus immunhistochemische Untersuchungen und molekulare Analysen durchführen (Rekhtman et al. 2011).

Fallstricke bei der Unterscheidung von Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom

Diese beiden Tumortypen haben unterschiedliche und klar abgrenzbare Charakteristika. Zeigen sie aber eine schlechte Differenzierung, können sie vor allem in zytologischen Proben leicht verwechselt werden (Travis et al. 2010; Idowu and Powers 2012;).

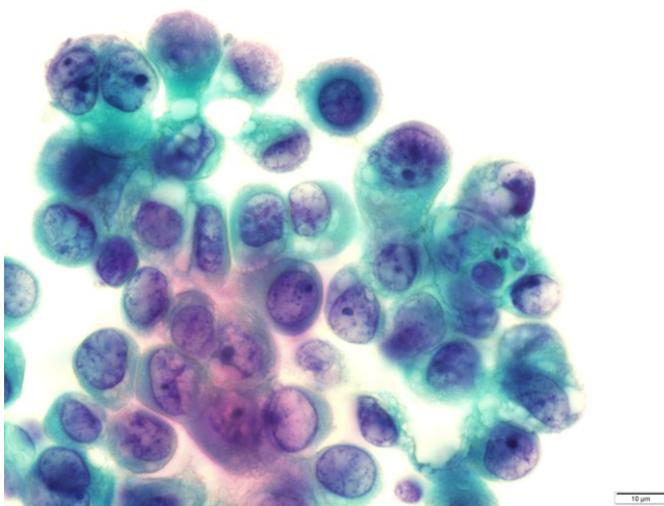


Abbildung 22: undifferenziertes PECA (Papanicolaou 100x)

Abbildung 22 verdeutlicht wie ähnlich sich schlecht differenzierte Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome sein können. Morphologische Charakteristika des Plattenepithelkarzinoms, wie Spindel-, Kaulquappenzellen oder Verhornung, sind hier nicht zu sehen. Hingegen wirken die Zellen bläschenartig, die Kerne liegen zum Teil exzentrisch, sodass man an ein Adenokarzinom denken könnte. Letztlich sind die Zellen bzw. Zellkerne zu polymorph für ein Adenokarzinom, sodass davon auszugehen ist, dass es sich um ein wenig differenziertes Plattenepithelkarzinom handelt.

Bei der Unterscheidung von Plattenepithel- und Adenokarzinomen bietet eine histologische Untersuchung (Biopsie) den Vorteil, dass die Zellen im Verband gesehen werden und so auch Interzellularbrücken deutlich werden, die charakteristisch für das Plattenepithelkarzinom sind. Außerdem lässt sich durch Immunhistochemie die Expression bestimmter Proteine nachweisen, wodurch der Ursprung des Gewebes identifiziert werden kann. So wird der Transkriptionsfaktor TTF1 häufiger in Adenokarzinomen exprimiert und das Stammzellregulatorgen P63 häufiger in Plattenepithelkarzinomen. TTF1 und P63 können also die Unterscheidung zwischen PECA und AC erleichtern (Travis et al. 2010; Nicholson et al. 2010; Kerr 2012). Sie sind jedoch nicht diagnostisch, da sie auch in vielen anderen Tumortypen exprimiert werden und es Ausnahmen gibt bei denen z. B. p63 auch in Adenokarzinomen exprimiert wird (Nicholson et al. 2010; Crapanzano et al. 2011; Sigel et al. 2011; Kerr 2009, 2012). Durch eine einfache PAS-Färbung kann außerdem Mucin in schleimproduzierenden Adenokarzinomen identifiziert werden (Nicholson et al. 2010). Mucinöse Adenokarzinome sind jedoch in der Minderheit (Kerr 2012).

Insbesondere die Unterscheidung zwischen Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom ist im Zuge der Entwicklung neuer Therapiestrategien von großer Relevanz. Der Trend geht immer mehr in Richtung der personalisierten Therapie des Lungenkarzinoms (Kerr 2012). So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine bestimmte Subgruppe von Lungenkarzinomen, Adenokarzinome mit aktivierender EGFR-Mutation, positiv mit dem Ansprechen auf Tyrosinkinaseinhibitoren assoziiert sind (Sharma et al. 2007; Wu et al. 2008). Diese Mutation findet sich aber quasi nie in Plattenepithelkarzinomen. Eine große Studie der International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) empfiehlt deswegen eine EGFR-Mutationsanalyse grundsätzlich nur an Adenokarzinomen und NSCLC-NOS durchzuführen (Travis et al. 2011). Weiteres hierzu unter 5.2.2.

Darüber hinaus sind bestimmte neue Medikamente wie Bevacicumab (VEGF-Inhibitor) oder Pemetrexed (Folsäure-Antagonist) für Plattenepithelkarzinome kontraindiziert bzw. nicht geeignet. Bevacicumab wird im Zusammenhang mit der Entstehung lebensbedrohlicher pulmonaler Blutungen gesehen und Pemetrexed scheint im PECA im Gegensatz zum AC kaum effektiv zu sein (Kerr 2009; Travis et al. 2010, 2011; Sigel et al. 2011).

Die Unterscheidung von Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom kann also für den einzelnen Patienten von vitaler Bedeutung sein.

Schwierigkeiten bei der Diagnose Adenokarzinom

Neben der Verwechslungsgefahr von Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom ist außerdem zu berücksichtigen, dass das Adenokarzinom generell mehr Schwierigkeiten bei der zytologischen Diagnostik bereitet. In der vorliegenden Arbeit konnten Adenokarzinome zytologisch weniger sicher diagnostiziert werden als Plattenepithelkarzinome, 55 % versus 62 %. Auch in der Literatur zeigt sich ein ähnliches Verhältnis: Lam et al. ermittelten eine Treffsicherheit von 87 % versus 92 % und Mak et al. 54 % versus 80 % für Adenokarzinom bzw. Plattenepithelkarzinom (Lam et al. 1983; Mak et al. 1990). Gründe, weshalb das Adenokarzinom mehr Schwierigkeiten bei der Diagnose bereitet als das Plattenepithelkarzinom, liegen vermutlich in der Natur dieser Tumorentität. Auch histologisch ist es oftmals schwierig zu diagnostizieren. Das Adenokarzinom ist ein sehr inhomogener und facettenreicher Tumortyp, es gibt verschiedene Muster und Wuchsformen. Zu nennen sind hier azinäre, solide, papilläre und mucinöse Adenokarzinome sowie das Adenokarzinom in situ (ehemals bronchioalveoläres Karzinom), welches multipel in der Lunge auftritt und die Alveolarwände tapetenartig auskleidet. Die verschiedenen Muster sind häufig in einem Tumor kombiniert. Gelegentlich finden sich in einem Adenokarzinom auch plattenepitheliale Komponenten, was leicht zu Verwechslungen führen kann (Kerr 2009; Travis et al. 2010). Die geringe Größe von Biopsien stellt also bei der Diagnostik des Adenokarzinoms ein besonderes Problem da. Nicht immer wird die ganze Architektur eines Tumors dargestellt, weil das Adenokarzinom in sich eben oft inhomogen ist (Kerr 2009).

Wie viele der histologisch und zytologisch nicht subklassifizierbaren NSCLC tatsächlich Adenokarzinome waren, ließ sich im Rahmen dieser Studie nicht eruieren, da leider nicht für alle Fälle eine Nachverfolgung durch Untersuchung eines OP-Resektats oder einer Autopsie möglich war.

Fallstrick bei der Unterscheidung von pulmonalen Adenokarzinomen und Metastasen extrapulmonaler Adenokarzinome

Insbesondere wenn sich ein extrapulmonales Adenokarzinom mit Metastasen in der Lunge erstmanifestiert, kann es versehentlich als primäres pulmonales Adenokarzinom verkannt werden; hier sind vor allem das kolorektale Karzinom und das Nierenzellkarzinom zu nennen. In diesen Fällen sind ergänzende immunhistochemische Untersuchungen sinnvoll, um den Primarius zu identifizieren (Idowu und Powers 2012). Wir konnten pulmonale Metastasen eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms und eines kolorektalen Karzinoms histologisch sichern. Zytologisch konnten wir diese Metastasen leider nicht diagnostizieren. Die zytologische Probe des kolorektalen Karzinoms zeigte Zellen eines Adenokarzinoms, dessen Primarius nicht identifizierbar war. Die zytologische Probe des Nierenzellkarzinoms war falsch negativ und zeigte nur ein entzündliches Zellbild.

Schwierigkeiten bei der Diagnose Großzelliges Karzinom

Die schlechtesten Ergebnisse bei der zytologischen Subklassifizierung hat das Großzellige Karzinom. Wir konnten kein einziges zytologisch sichern, und auch in der Literatur erreicht die zytologische Treffsicherheit für das Großzellige Karzinom kaum 40 % (Lam et al. 1983; Mak et al. 1990). Dieser Sachverhalt ist laut Raab et al. am ehesten auf die zumeist geringe Differenzierung der Großzelligen Karzinome zurückzuführen (Raab und Silverman 1994). Es muss hier allerdings erwähnt werden, dass in der Literatur empfohlen wird, die Diagnose ‚Großzelliges Karzinom‘ generell nicht an kleinen Proben, wie BL/BAL oder transbronchialer Biopsie, zu stellen (Travis et al. 2011; Kerr 2012). In dieser Studie wurde die Diagnose Großzelliges Karzinom nie an zytologischem Material gestellt und an histologischem Material nur, wenn bei entsprechender großzellig-anaplastischer Morphologie nicht ein Adenokarzinom immunhistochemisch zu sichern war. In der klinischen Praxis am hiesigen Institut für Pathologie wird vorsichtshalber auch an Großzelligen Karzinomen eine EGFR-Mutationsanalyse durchgeführt, um keine entdifferenzierten Adenokarzinome zu verpassen.

In sechs von 95 Fällen (6 %) gelang keine histologische Subtypisierung der NSCLC. Die Rate sowohl histologisch als auch zytologisch nicht-subklassifizierbarer NSCLC liegt in dieser Studie somit bei 5 %. Laut Literatur liegt die Grauzone nicht subklassifizierbarer NSCLC bei 40-50 %. Eine Rate von 5 % soll angestrebt werden, was allerdings an den zumeist sehr kleinen Biopsie- und Zytologieproben schwierig ist (Kerr 2009; Travis et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit war die Rate nicht-subklassifizierbarer NSCLC also gering. Aus unserer Sicht konnte dies erreicht werden, weil sich die simultanen histologischen und zytologischen Untersuchungen ergänzen. Hinzu kommt ein Zugewinn durch die Doppeluntersuchung der Zytologie (vor und nach Biopsie), der im Falle dieser Arbeit statistisch signifikant war. Auch Franke et al. empfehlen die Durchführung mehrerer zytologischer Untersuchungen, um die Aussagekraft der gesamten bronchoskopischen Untersuchung zu steigern (Franke et al. 2006b).

Zusätzliche zytologische Proben können die Sicherheit der Diagnose erhöhen und die Subklassifizierung der NSCLC erleichtern. Sie stellen deshalb eine wichtige Ergänzung zur Biopsie da. In der vorliegenden Studie gab es sogar einen Fall, der histologisch als NSCLC-NOS diagnostiziert wurde, aber zytologisch als Adenokarzinom zu subklassifizieren war.

5.2.1.6 Treffsicherheit der Zytologie vor und nach Biopsie

Der richtige Zeitpunkt der Durchführung der BL/BAL, also der Entnahme der Zytologie, wird kontrovers diskutiert (Mazzone et al. 2002). Im Jahr 2001 publizierte das British Thoracic Society Bronchoscopy Guidelines Committee in ihren ‚Guidelines on flexible Bronchoscopy‘, dass die beste

Reihenfolge der Probenentnahme während der Bronchoskopie nicht gesichert ist und weitere Studien darüber nötig sind. Bis heute ist diese Frage nicht abschließend geklärt.

Die vorliegende Arbeit ermittelte eine Treffsicherheit der Zytologie (BL/BAL) vor Entnahme der Biopsie von 71 % und danach von 83 %.

Die Prüfung auf Signifikanz mit Fishers-Exact-Test oder Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,03. Somit ist der Unterschied der Treffsicherheit der Zytologie vor und nach Biopsie signifikant.

Einige Studien haben den gleichen Sachverhalt untersucht (Siehe Tabelle 18). Zusammenfassend kamen diese Studien alle zu dem Ergebnis, dass die Treffsicherheit der Zytologie nach Entnahme der Biopsie etwas höher lag. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie war der Unterschied zwischen der Zytologie vor bzw. nach Biopsie jedoch nie signifikant (van der Drift et al. 2005; Sompradeekul et al. 2006; Lee et al. 2007).

Studie	Trefferquote bzw. Sensitivität vor Biopsie	Trefferquote bzw. Sensitivität nach Biopsie	p-Wert
Van der Drift et al. 2005	72 % für endoskopisch sichtbare Tumoren 36 % für endoskopisch nicht sichtbare Tumoren	74 % für endoskopisch sichtbare Tumoren 42 % für endoskopisch nicht sichtbare Tumoren	0,37
Sompradekul et al. 2006	37,8 %	37,8 %	nicht angegeben
Fernández-Villar et al. 2006	53,7 %	57,7 %	0,6
Lee et al. 2007	57,3 %	55,8 %	0,88
Vorliegende Studie	71 % (74 % für endoskopisch sichtbare, 42 % für endoskopisch nicht sichtbare Tumoren)	83 % (80 % für endoskopisch sichtbare, 63 % für endoskopisch nicht sichtbare Tumoren)	0,03

Tabelle 18: Vergleich Trefferquote der BL/BAL vor und nach Biopsie

Als hauptsächlicher Grund, weshalb die Zytologie nach der Biopsie eventuell bessere Ergebnisse erreicht, wird angegeben, dass bei der Manipulation durch die Biopsie mehr Tumorzellen freigesetzt

werden, die dann mit der BL/BAL erfasst werden (Chaudhary et al. 1978; Lundgren et al. 1983; Lee et al. 2007). Wirklich bestätigt wurde diese Annahme bisher aber nicht. Eine gegenläufige These besagt, dass die Zytologie vor der Biopsie eigentlich erfolgreicher sein müsste, da es durch die Biopsie zu Blutungen kommen kann und das Blut die zytologische Probe schlechter auswertbar macht (Mazzone et al. 2002; Fernández-Villar et al. 2006).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die Zytologie nach der Biopsie oft blutiger war als die vor der Entnahme. Dennoch wurde eine höhere Trefferquote für die zweite Zytologie ermittelt, was aus unserer Sicht durchaus auf das vermehrte Vorhandensein von Tumorzellen in den Proben zurückzuführen sein kann.

Wann nun letztlich der beste Zeitpunkt für die Entnahme der Zytologie ist, scheint nicht unbedingt entscheidend zu sein. Es stimmen aber alle aufgezeigten Studien überein, dass die höchste diagnostische Ausbeute erreicht wird, wenn sowohl eine zytologische Probe vor der Biopsie, als auch danach entnommen und untersucht wird. So konnte beispielsweise eine Studie von Fernández-Villar keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Zeitpunkts der Zytologie feststellen, jedoch erzielten die Zytologien 1 und 2 zusammen (davor und danach) eine signifikant höhere diagnostische Ausbeute von 69,3 %, als jede für sich allein (Zytologie 1: 53,7 %, $p=0,001$ und Zytologie 2: 57,7 %, $p=0,004$) (Fernández-Villar et al. 2006).

5.2.1.7 Trefferquote in Abhängigkeit von der Lokalisation der Läsion

Eine weitere Fragestellung lautet, ob die Trefferquote der Zytologie und auch der Biopsie davon abhängig ist, ob der Tumor endoskopisch sichtbar ist. Endoskopisch sichtbare Tumoren sind zumeist zentral im Bronchialsystem gelegen. Peripher gelegene Tumoren zeigen überwiegend keine endobronchialen Veränderungen.

Periphere Läsionen werden in der Regel unter Röntgendurchleuchtung bioptiert, dennoch ist die Treffsicherheit zumeist geringer als bei bronchoskopisch sichtbaren Tumoren (Wong et al. 1999 ; Mazzone et al. 2002 ; Franke et al. 2006 a).

Die vorliegende Studie ermittelte eine histologische Trefferquote für endoskopisch sichtbare Tumoren von 83 % und für endoskopisch nicht sichtbare Läsionen von 34 %. In der Zytologie (Zytologie vor und nach Biopsie zusammen gerechnet) wurde eine diagnostische Ausbeute von 71 % für endobronchiale Tumoren und 19 % für periphere Läsionen berechnet.

Diese Werte finden sich auch in der Literatur, hier wird eine bioptische Trefferquote für endobronchial sichtbare Tumoren von ca. 90 % angegeben (Wong et al. 1999; Mazzone et al. 2002; Franke et al. 2006a). Für periphere, nicht sichtbare Tumoren schwankt die diagnostische Ausbeute zwischen 27 % und 87 %

(Wong et al. 1999; Mazzone et al. 2002; Franke et al. 2006a). In einer zusammenfassenden Studie von Schreiber und McCrory wurde für endobronchiale Tumoren eine mittlere diagnostische Ausbeute von 74 % in der Histologie und 48 % in BL/BAL angegeben. Für periphere Läsionen betrug die mittlere diagnostische Ausbeute in der Histologie nur 46 %, für BL/BAL allerdings 43 % (Schreiber und McCrory 2003). Eine ähnliche Studie von Mazzone et al., in der ebenfalls die Ergebnisse mehrere Studien zusammengefasst wurden, gibt eine durchschnittliche Treffsicherheit der Zytologie von 68 % für zentrale und von 28 % für periphere Läsionen an (Mazzone et al. 2002).

Neben der Trefferquote beider Zytologien zusammen (vor und nach Biopsie) wurde in dieser Arbeit außerdem die diagnostische Ausbeute für jede Zytologie einzeln berechnet: Für die Zytologie vor der Biopsie konnte eine Treffsicherheit von 74 % für endoskopisch sichtbare und 42 % für endoskopisch nicht sichtbare Tumoren ermittelt werden. Analog dazu ergab die Zytologie nach der Biopsie eine Treffsicherheit von 80 % für endoskopisch sichtbare und 63 % für endoskopisch nicht sichtbare Tumoren. Eine Studie von van der Drift et al. bestätigt diese Ergebnisse. Auch hier finden sich höhere zytologische Trefferquoten für endoskopisch sichtbare Tumoren und höhere Trefferquoten für die Zytologie nach Biopsie (van der Drift et al. 2005). Interessant ist aber, dass in beiden Studien die Zytologie nach Biopsie die Trefferquote für endoskopisch nicht sichtbare Tumoren deutlich aufwertet (36 % versus 42 % bei van der Drift et al., 42 % versus 63 % in der vorliegenden Studie).

Diese Ergebnisse stützen die These, dass insbesondere bei peripheren Malignomen eine zusätzliche zytologische Untersuchung die diagnostische Sicherheit relevant verbessert (Mazzone et al. 2002; Wong et al. 1999; Franke et al. 2006a).

Es wird deutlich, dass die Zytologie wertvolle Beiträge zur Diagnosesicherung von Lungenkarzinomen liefert.

In einigen Studien werden sogar bessere Trefferquoten und eine höhere Sensitivität als für die Biopsie postuliert (Chaudhary et al. 1978; Koss et al. 1992; Piaton et al. 1995; Nicholson et al. 2010). Allerdings betrifft dies eher Punktionszytologien wie Feinnadelaspirationen als BL/BAL. Mak et al. ermittelten in ihrer Studie sogar, dass die Zytologie in einigen Fällen das einzige positive Ergebnis erbrachte und diagnostisch aussagekräftiger war als die Histologie (Mak et al. 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Gewinnung zytologischer Proben eine BL oder eine BAL durchgeführt. Andere zytologische Untersuchungsmethoden sind die genannte Feinnadelaspiration, der Bürstenabstrich, die Katheteraspiration, die Sputumzytologie oder die transbronchiale Nadelaspiration. Die verschiedenen Methoden unterscheiden sich geringfügig in ihrer Treffsicherheit und Sensitivität (Franke et al. 2006a). Auch die Erfahrung des Zytopathologen hat Einfluss auf Sensitivität und Spezifität der zytologischen Untersuchung (Kerr 2012).

Vereinzelt finden sich auch Studien, die die Zytologie nicht für ausreichend diagnostisch halten und empfehlen, sie nur in Kombination mit anderen Methoden zu verwenden (Taheri et al. 2007).

Der Konsensus in der Literatur ist, dass zwar die Histologie der Zytologie überlegen ist, die Kombination der beiden Methoden aber die größte diagnostische Sicherheit bietet (Naryshkin et al. 1992; Mak et al. 1990; Mazzone et al. 2002; Kawaraya et al. 2003; Crapanzano et al. 2011; Sigel et al. 2011).

Eine zusätzliche zytologische Untersuchung erhöht die Gesamt-Sensitivität der bronchoskopischen Untersuchung (Chaudhary et al. 1978; Lam et al. 1983; Mak et al. 1990; Govert et al. 1996; Dobler und Crawford 2009). Für endoskopisch sichtbare Tumoren wird in der Literatur eine Steigerung der Sensitivität der Bronchoskopie durch die Zytologie von sechs bis 20 % angegeben. Für endoskopisch nicht sichtbare Läsion wird die Sensitivität sogar um zwölf bis 30 % gesteigert (Kvale et al. 1976; Chaudhary et al. 1978; Lundgren et al. 1983; Lam et al. 1983; Mak et al. 1990; Govert et al. 1996).

Eine Studie von Lundgren et al. verglich die Treffsicherheit verschiedener bronchoskopischer Entnahme-Verfahren (Zangenbiopsie, BL, Bürstenbiopsie, transbronchiale FNA) und kam zu dem Ergebnis, dass die Kombination von Zangenbiopsie und BL eine signifikant höhere diagnostische Ausbeute liefert, als die Zangenbiopsie für sich genommen ($p < 0,05$). Für endoskopisch sichtbare Tumoren lag die Trefferquote dieser Kombination bei nahezu 100 % (33/34) (Lundgren et al. 1983).

Ähnliche Ergebnisse zeigt eine Studie von Dobler und Crawford: Hier hatte die Biopsie allein eine Treffsicherheit von 77 % für endoskopisch sichtbare Tumoren. Das Hinzunehmen der Zytologie (Bürstenabstriche oder BLs) erhöhte die diagnostische Ausbeute signifikant um 11 % auf insgesamt 88 % ($p=0,001$) (Dobler und Crawford 2009).

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen den enormen Zugewinn von zusätzlichen zytologischen Untersuchungen. Die Kombination von zytologischen und histologischen Untersuchungen innerhalb einer Bronchoskopie erhöht die Gesamttrefferquote maßgeblich. Re-Bronchoskopien oder weitere aufwendige Untersuchungen wie CT-gesteuerte Punktionen, die im Falle negativer Biopsien, aber starkem klinischen Verdacht für ein Lungenkarzinom durchgeführt werden müssten, können dem Patienten so eventuell erspart werden (Kawaraya et al. 2003).

Hinsichtlich der Rentabilität der Zytologie kommen verschiedene Studien zu dem Ergebnis, dass sich zusätzliche zytologische Untersuchungen lohnen (Kvale et al. 1976; Govert et al. 1996; van der Drift et al. 2005). Sie sind kosteneffektiv und wirtschaftlicher als eine Re-Bronchoskopie. Der finanzielle Mehraufwand ist als eher gering anzusehen und der Zugewinn für die Diagnosesicherheit eindeutig (Govert et al. 1996).

5.2.2 EGFR-Mutationsanalyse im Pleuraerguss

In drei der 14 untersuchten Proben konnte jeweils eine Mutation im EGFR-Gen gefunden werden (21%). In zwei der drei Fälle waren die Mutationen in Exon 19 lokalisiert. Es handelte sich hier um die Inframe-Mutationen K745_A750del und L747_S752del. In einem weiteren Fall fanden sich gleichzeitig die Punktmutationen V769M und G779F in Exon 20. Die Proben, in denen eine Mutation gefunden wurde, stammten alle drei aus weiblichem Patienten. Das mediane Alter der Patientinnen betrug 83 Jahre.

5.2.2.1 Wahrscheinlichkeit, mit der eine EGFR-Mutation in einem Pleuraerguss gefunden wird

Studie	Anzahl Proben (n)	Tumorentitäten	Methode	Mutationen insgesamt -absolut (%) -
Kimura et al. Juli 2006	24	23 AC 1 NSCLC-NOS	Direkte Sequenzierung Scorpion ARMS	3 (12,5 %) 8 (33,3 %)
Kimura et al. Oktober 2006	43	39 AC 1 PECA 1 GC 2 NSCLC-NOS	Direkte Sequenzierung	11 (25,6 %)
Hung et al. 2006	29	26 AC 3 NSCLC-NOS	Direkte Sequenzierung	12 (41,0 %)
Wu et al. 2008	136	136 AC	Direkte Sequenzierung	93 (68,4 %)
Jian et al. 2010	32	Fortgeschrittene NSCLC (AC und PECA, Zahlen nicht genauer angegeben)	LightCycling PCR	9 (28,1 %)
Vorliegende Studie	14	14 AC	Direkte Sequenzierung	3 (21,4 %)

Tabelle 19: Rate gefundener EGFR-Mutationen in verschiedenen Studien

Die in Tabelle 19 zum Vergleich angeführten Studien haben alle Material aus Pleuraergüssen untersucht. Andere Studien haben EGFR-Mutationsanalysen an anderem zytologischen Material, z. B.

FNA und BL/BAL, durchgeführt; sie liefern ähnliche Ergebnisse (Riely et al. 2006; Boldrini et al. 2007; Rekhtman et al. 2011).

Es herrscht Konsensus darüber, dass zytologisches Material für eine EGFR-Mutationsanalyse geeignet ist (Hung et al. 2006; Kimura et al. 2006a, 2006b; Soh et al. 2006; Wu et al. 2008; Zhang et al. 2008; Jian et al. 2010). Für die Zytologie spricht, dass sie wenig invasiv und gegebenenfalls auch mehrmals im Laufe der Erkrankung entnommen werden kann. So können genetische Alterationen, die während der Behandlung auftreten, wie z. B. der Erwerb der T790M-Resistenzmutation, frühzeitig aufgedeckt werden. (Gazdar 2009; Malapelle et al. 2011).

Der Vorteil von Material aus Pleuraergüssen ist, dass die Punktion zugleich therapeutischen als auch diagnostischen Nutzen hat. Eine zusätzliche bronchoskopische Untersuchung ist in der Regel nicht nötig (Soh et al. 2006). Auch wenn eine Bronchoskopie zur Gewinnung einer FNA oder BL/BAL ohne Biopsie relativ risikoarm ist, ist es dennoch eine unangenehme und nicht völlig ungefährliche Untersuchung, für die auch Kontraindikationen bestehen. Außerdem lassen sich aus Pleuraergussmaterial sehr einfach in Paraffin eingebettete Zellblöcke (Fibrinpräzipitate) herstellen, die eine hohe Zellularität haben und für molekulare Analysen gut geeignet sind (Nicholson et al. 2010).

Die in der Literatur publizierte Rate gefundener EGFR-Mutationen in Pleuraergüssen schwankt zwischen 12,5 % und 68,4 %. Die vorliegende Studie ermittelte eine Rate von 21,4 % und ist damit eher im unteren Drittel anzusiedeln. Allerdings wurde hier nur eine geringe Fallzahl untersucht.

Erschwert wird der Vergleich dadurch, dass die Proben in den anderen Studien nur zum überwiegenden Teil aus Adenokarzinomen stammten. Die vorliegende Studie untersuchte dagegen ausschließlich Pleuraergussmaterial aus Adenokarzinomen, da für diese eine höhere Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins einer EGFR-Mutation bekannt ist (Soh et al. 2006). Dies wurde durch die aufgelisteten Studien, die zum Teil verschiedene NSCLC-Subentitäten untersucht haben, letztlich bestätigt. Außerdem finden alle Studien einen Zusammenhang zwischen EGFR-Mutation, weiblichem Geschlecht und Nichtraucher-Status (Hung et al. 2006; Kimura et al. 2006a, 2006b; Wu et al. 2008; Zhang et al. 2008; Jian et al. 2010).

Die Studien, bei denen zusätzlich das Ansprechen auf eine TKI-Therapie untersucht wurde, bestätigen außerdem die Assoziation zwischen bestimmten aktivierenden EGFR-Mutationen und dem Erfolg der spezifischen Therapie (Kimura et al. 2006b; Hung et al. 2006; Jian et al. 2010).

5.2.2.2 Die Vielfalt und die Bedeutung der verschiedenen EGFR-Mutationen

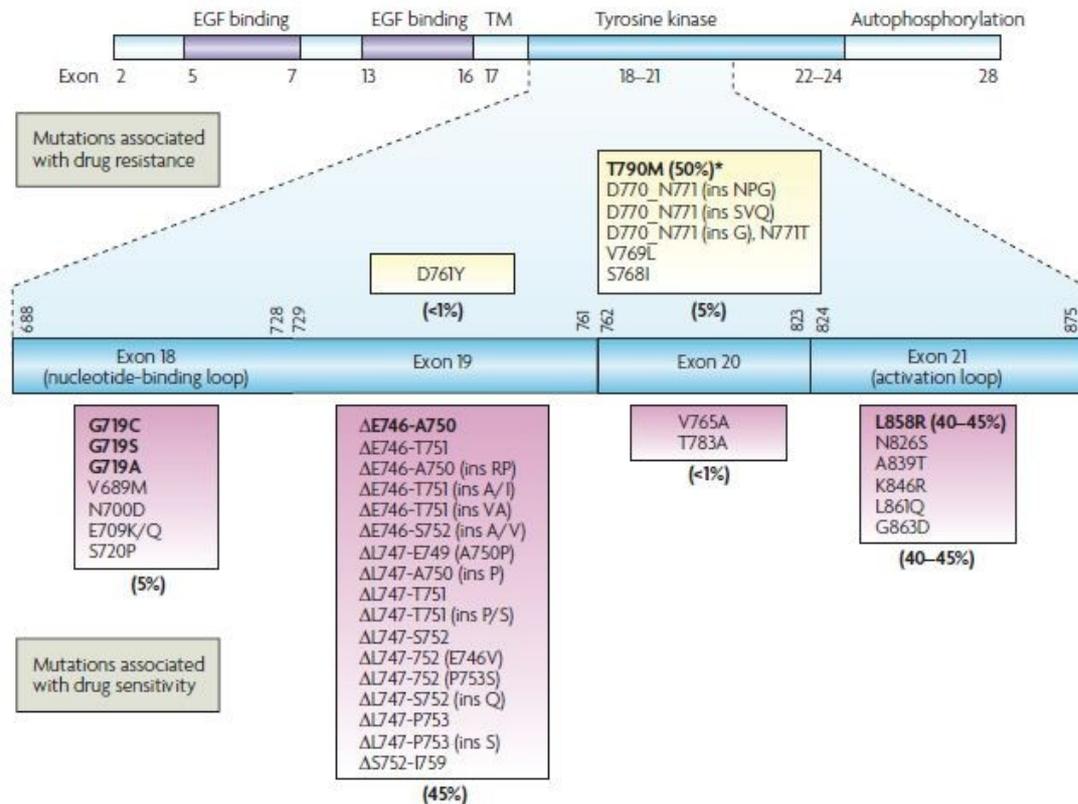


Abbildung 23: Die verschiedenen EGFR-Kinase-Mutationen aus Sharma et al. 2007

Diese Abbildung zeigt eine Auswahl der bisher am häufigsten beschriebenen Mutationen in der Kinasedomäne des EGFR. Die Häufigkeit der gefundenen Mutationen ist ebenfalls dargestellt. Aus dieser Abbildung geht hervor, dass die Inframe-Mutationen in Exon 19 und die Punktmutationen in Exon 21 die häufigsten aktivierenden Mutationen sind und die T790M Mutation in Exon 20 die häufigste Resistenzmutation ist (Shigematsu und Gazdar 2006; Sharma et al. 2007). Die Deletionsmutation E746_A750del in Exon 19 und die Punktmutation L858R in Exon 21 machen zusammen ca. 90% aller gefundenen EGFR-Mutationen aus und werden deswegen auch als klassische Mutationen bezeichnet (Murray et al. 2008; Gazdar 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde keine der beiden Mutationen gefunden.

Wir fanden die Mutation L747_S752del in Exon 19, die sich auch in der Abbildung wiederfindet. Sie wird als Exon 19-Mutation vermutlich mit dem Ansprechen auf eine TKI-Therapie assoziiert sein (Murray et al. 2008). In den Studien von Jian et al. und Jang et al. wurde diese Mutation auch gefunden, allerdings hinsichtlich ihrer Bedeutung für eine TKI-Therapie nicht genauer beschrieben (Jang et al. 2009; Jian et al. 2010).

Murray et al. erstellten 2008 eine analytische Datenbank, in der 3.381 EGFR-Kinase-Mutationen aus 202 wissenschaftlichen Artikeln mit ihren Inzidenzen, demographischen und klinischen

Charakteristika, sowie ihrem Ansprechen auf TKIs zusammengefasst wurden. Hier wird für die Mutation L747_S752del eine Inzidenz von 0,79 % angegeben. Sie wurde 22-mal beschrieben. Sie gehört nach Murray et al. zu den häufigsten somatischen EGFR-Mutationen, ist jedoch wesentlich seltener als die Exon 19-Mutation E746_A750del, die eine Inzidenz von 28,89 % aufweist (Murray et al. 2008; www.somaticmutations-EGFR.org).

Auch die anderen von uns gefundenen Mutationen finden sich in der Literatur.

Die Mutation K745_A750del in Exon 19 ist in der Datenbank von Murray et al. 4-mal verzeichnet. Hinsichtlich ihres Ansprechens auf TKIs ist sie nicht genauer beschrieben. Es ist aber anzunehmen, dass auch sie als Exon 19-Mutation sensitiv für TKIs ist (Murray et al. 2008).

Die Punktmutation G779F in Exon 20 fanden Yang et al. bei einem 80-jährigen, kaukasischen Patienten mit Adenokarzinom. Ob dieser Patient auf TKIs ansprach wurde nicht erläutert, vermutlich hat er diese Therapie gar nicht erhalten (Yang et al. 2005).

In einer Studie von Huang et al., die taiwanesischen Lungenkarzinom-Patienten auf EGFR-Mutationen untersuchte, ist die Punktmutation V769M in Exon 20 beschrieben. Sie fand sich dort bei einem 62-jährigen Patienten, der zusätzlich die Mutation delE746_T751insA in Exon 19 hatte (Huang et al. 2004). Auch hier ist die Bedeutung der Mutation V769M hinsichtlich TKI-Ansprechens nicht genauer beschrieben. Interessant ist aber, dass bei diesem Patienten sowohl eine mit Ansprechen auf TKIs assoziierte Exon 19-Deletion gefunden wurde als auch eine Punktmutation in Exon 20, die wahrscheinlich eine Resistenzmutation darstellt.

Murray et al. fanden die Mutation G779F 3-mal und V769M 2-mal. Als Exon 20 Mutationen werden wahrscheinlich beide nicht sensitiv für eine molekulare Therapie sein (Sharma et al. 2007; Murray et al. 2008)

Weitere beschriebene Mutationen:

Studie	Gefundene Mutationen
Kimura et al. Juli 2006	6 x E746_A750del Exon 19 2 x L858R Exon 21
Kimura et al. September 2006	7 x E746_A750del Exon 19 1 x E746_751del Exon 19 1 x L747_T751del Exon 19 2 x L858R Exon 21
Hung et al. 2006	7 x E746_A750del Exon 19 2 x E746_S752insV Exon 19 2 x L858R Exon 21 1 x L861Q Exon 21 1 x S768_D770dup Exon 20

Wu et al. 2008	2 x G719A 1 x L747P 9 x E746_A750 del 1 x E746_T751insVA 29 x L858R 1 x L861R 2 x L858R + T790M 1 x G719A + S720F 1 x R776H + L861Q 1 x L858R + R776G 1 x L747_A750ins P
Jang et al. 2009	4 x K745_A750del Exon 19 2 x E746_A750del Exon 19 4 x E746_T752del Exon 19 1 x L747_S752del Exon 19 1 x E746_P753del Exon 19 1 x E747_E749del Exon 19 10 x L858R Exon 21 1 x G719S Exon 18 1 x M766I Exon 20 1 x P772L Exon 20
Jian et al. 2010	15 x E746_A750del Exon 19 4 x L747_S752del Exon 19 3 x L858R Exon 21
Vorliegende Studie	1 x K745_A750del Exon 19 1 x L747_S752del Exon 19 1 x V769M + G779F Exon 20

Tabelle 20: Vergleich der EGFR-Mutationen, die in den verschiedenen Studien gefunden wurden

Auch die in Tabelle 20 zum Vergleich herangezogenen Studien fanden die zwei klassischen Mutationen (E746_A750del in Exon 19 und L858R in Exon 20) am häufigsten. Die Studien zeigen aber auch, dass es sehr viele andere Mutationen gibt, deren Bedeutung teilweise noch gar nicht geklärt ist. An dieser Stelle wird noch einmal deutlich, dass die Analyse-Methode der Wahl - zumindest im wissenschaftlichen Bereich - die direkte Sequenzierung ist, da nur sie die Vielfalt der Mutationen darstellen kann.

Neben Mutationen in der Kinasedomäne des EGFR lassen sich auch andere molekulare Abnormitäten bei Karzinompatienten finden, z. B. Genamplifikation oder Überexpression des EGFR (Shigematsu und Gazdar 2006; Gazdar 2009). Diese molekularen Läsionen scheinen nicht mit dem Ansprechen auf TKI-Therapie assoziiert zu sein (Lynch et al. 2004; Bell et al. 2005; Sharma et al. 2007).

Aktivierende Mutationen

Aktivierende Mutationen führen zu Liganden-unabhängiger Aktivität der Tyrosinkinase des EGFR, sodass die EGFR-vermittelten Signalwege unkontrolliert initiiert werden. Das Vorhandensein dieser Mutationen korreliert mit dem Ansprechen auf TKIs (Gazdar 2009; Lynch et al. 2004). Sie befinden sich in den ersten vier Exonen der Kinasedomäne (Exon 18-21) und innerhalb der ATP-Binde-Tasche, an die auch TKIs binden (Kumar et al. 2008; Shigematsu and Gazdar 2006). Die häufigsten aktivierenden Mutationen sind die bereits genannten und generell häufigsten Mutationen: die Inframe-Deletionen in Exon 19 und die Punktmutation L858R in Exon 21 (Sharma et al. 2007; Murray et al. 2008; Gazdar 2009).

Die mutierten Kinasen zeigen eine reduzierte Affinität zu ATP, was die molekulare Erklärung für die gesteigerte Sensitivität von TKIs ist, da diese mit ATP konkurrieren (Shigematsu und Gazdar 2006; Kumar et al. 2008). Die Inzidenz der aktivierenden Mutationen bei Patienten, die auf TKIs ansprechen, liegt bei ca. 77 % (Pao et al. 2005). Bei Patienten, die nicht ansprechen liegt die Inzidenz nur bei 7 %. Das Gesamtansprechen auf TKIs aller Patienten mit und ohne Mutation liegt bei 10-30 % (Gazdar 2009). Dies spiegelt die Rate insgesamt vorhandener aktivierender Mutationen wieder (Heukamp et al. 2011).

Eine TKI-Therapie verlängert das mediane Gesamt-Überleben und das Progress-freie Überleben für Patienten mit einer aktivierenden EGFR-Mutation (Soh et al. 2006; Capuzzo et al. 2010; Rosell et al. 2012).

Nicht alle aktivierenden Mutationen führen jedoch gleichermaßen zu gesteigerter Kinaseaktivität (Gazdar 2009). Patienten mit einer Deletionsmutation in Exon 19 zeigen höhere Ansprechraten auf TKIs (70-100 %) als Patienten mit Punktmutationen in Exon 21 (20-67 %) (Mitsudomi et al. 2005; Sharma et al. 2007). Eine Studie von Riely et al. zeigt außerdem, dass durch die TKI-Therapie ein signifikant längeres Progress-freies Überleben (12 versus fünf Monate; $p=0,01$) und Gesamt-Überleben (34 versus acht Monate; $p=0,01$) für Patienten mit Exon 19 Deletionsmutation im Gegensatz zu Patienten mit Exon 21 Punktmutation erreicht werden kann (Riely et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse liefert eine retrospektive Studie von Jackman et al.: Hier wurde eine signifikant längere Zeit bis zu einem Progress (24 versus 10 Monate, $p=0,04$) und eine signifikant längere mediane Gesamtüberlebenszeit (38 versus 17 Monate, $p=0,04$) für Patienten mit Exon 19 Deletion verglichen mit Patienten, die eine L858Mutation in Exon 21 haben, ermittelt. Allerdings scheint die Punktmutation L858R noch eher mit einem Therapieansprechen assoziiert zu sein als die Punktmutation G719S in

Exon 21 (Jiang et al. 2005). Bisher wurden noch keine Mutationen in Exon 20 gefunden, bei denen ein Ansprechen auf TKIs beschrieben wurde (Greulich et al. 2005).

Patienten mit Exon 19 Deletionen scheinen also die beste Prognose hinsichtlich Therapieansprechen und Überlebenszeit zu haben, weshalb diese Mutation ein relevanter prognostischer Faktor zu sein scheint (Gazdar 2009; Jackman et al. 2006).

Resistenzmutationen

Nicht alle Kinasemutationen sind mit einer höheren Sensitivität für TKIs assoziiert. Manche Patienten sprechen trotz vorhandener Mutation gar nicht auf TKIs an (primäre Resistenz). Ein häufig beschriebenes Phänomen ist eine sich nach sechs bis zwölf Monaten entwickelnde Resistenz nach initial gutem Ansprechen auf TKIs (erworbene oder sekundäre Resistenz).

Ursachen primärer Resistenz

Insertionsmutationen in Exon 20, wie z. B. D770_N771insNPG, scheinen zu herabgesetzter Sensitivität des Rezeptors gegenüber TKIs zu führen (Greulich et al. 2005; Kumar et al. 2008; Gazdar 2009); doch inwiefern sich diese Mutationen von aktivierenden Mutationen unterscheiden ist unklar. Insgesamt lässt sich jedoch feststellen, dass eine primäre TKI-Resistenz eher andere genetische Läsionen als Ursache hat als eine EGFR-Resistenzmutation (Sharma et al. 2007).

In 15-30 % der NSCLC werden aktivierende Mutationen im KRAS-Gen gefunden, am häufigsten in Codon 12 und 13 von Exon 2 (Rodenhuis et al. 1988; Pao et al. 2005; Sharma et al. 2007; Han et al. 2011). Die KRAS-Mutation ist mit Raucherstatus, schlechter Prognose und dem Nicht-Ansprechen auf TKIs assoziiert (Ahrendt et al. 2001; Han et al. 2011). Die KRAS-Mutation tritt nach derzeitigem Erkenntnisstand nie zusammen mit einer EGFR-Mutation auf (Kosaka 2004; Pao et al. 2005; Marchetti et al. 2005; Shigematsu and Gazdar 2006; Jackman et al. 2006; Jang et al. 2009). Unter anderem eine wichtige Studie von Pao et al. belegt dies: Hier wurden 60 Adenokarzinom-Patienten, die mit TKIs behandelt wurden, auf das Vorhandensein einer EGFR- oder KRAS-Mutation untersucht. Von 22 Patienten, die auf die Therapie ansprachen, wiesen 17 (77%) eine EGFR-Mutation auf, keiner von ihnen hatte eine KRAS-Mutation. 38 Patienten sprachen nicht auf die TKIs an, von ihnen hatten neun (24%) eine KRAS-Mutation, eine EGFR-Mutation ließ sich nicht nachweisen (Pao et al. 2005). Pao et al. sehen die KRAS-Mutation als Ursache für primäre Resistenz gegen TKIs und empfehlen, dass im Rahmen der Entscheidung für oder gegen eine TKI-Therapie die Patienten sowohl auf EGFR-Mutationen als auch auf KRAS-Mutationen untersucht werden sollten.

Vergleichbare Ergebnisse liefert ein Studie von Jang et al. (Jang et al. 2009). Auch wir untersuchten in einer anderen Studie das Vorhandensein von EGFR-, KRAS-Mutation und anderen Mutationen an Pleuraergussmaterial. EGFR- und KRAS-Mutationen zeigten sich nie zusammen (Zimpfer et al. 2012).

Ob nun aber die KRAS-Mutation die tatsächliche Ursache für die Resistenz ist oder aber das Fehlen der EGFR-Mutation in den Fällen des Nichtansprechens auf TKIs ist noch unklar (Sharma et al. 2007).

Neben der KRAS-Mutation werden außerdem der Verlust des Tumorsuppressor-Gens PTEN und die damit verbundene unkontrollierte Akt-Aktivität als mögliche Ursachen primärer Resistenz diskutiert. Tumorzellen, die auf TKIs ansprechen, sind charakterisiert durch einen schnellen Abfall der Akt-Aktivität durch die Therapie (Anderson et al. 2001; Engelman et al. 2005). Die Serin/Threonin-Kinase Akt ist ein Mediator des bereits unter 1.6 genannten PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs, der zu Zellüberleben und Zellproliferation führt (Anderson et al. 2001; Lurje and Lenz 2009). Die fehlende Downregulation der Akt-Aktivität ist ein Kennzeichen der Resistenz gegen TKIs (Sordella et al. 2004; Engelman et al. 2005). Die Akt-Aktivierung ist indirekt kontrolliert durch den Tumorsuppressor PTEN, der in vielen Malignomen verloren gegangen ist (Cully et al. 2006). Ursächlich für den Verlust von PTEN sind vermutlich Mutationen; auch eine epigenetische Inaktivierung von PTEN durch Promotor Methylierung wird diskutiert (Soria et al. 2002). Bisher konnte jedoch keine Studie den tatsächlichen Zusammenhang zwischen PTEN und TKI-Therapie aufdecken (Sharma et al. 2007).

Ursachen erworbener Resistenz

Viele Patienten entwickeln trotz des Vorliegens einer aktivierenden EGFR-Kinase-Mutation und initial gutem Ansprechen auf TKIs innerhalb von sechs bis zwölf Monaten nach Therapiebeginn eine Resistenz gegen TKIs. Bei 50 % dieser Patienten lässt sich die Punktmutation T790M in Exon 20 nachweisen (Kwak et al. 2005; Kosaka et al. 2006). Diese Mutation kann schon vor Therapiebeginn vorhanden sein, scheint sich aber in der Regel erst im Laufe der Therapie zu entwickeln (Bell et al. 2005). Sie ist mit einer sekundären Resistenz gegen TKIs assoziiert.

In einem Case-Report von Taus et al. wird der Fall einer 78 jährigen, kaukasischen, Nichtraucherin Adenokarzinom-Patientin vorgestellt. Diese Patientin präsentierte sich bei Erstdiagnose im Krankheitsstadium IV mit bilateralen pulmonalen und pleuralen Metastasen. Eine konventionelle Chemotherapie blieb erfolglos, sodass die Patientin mit Erlotinib als Zweitlinientherapie behandelt wurde. Nach initial gutem Ansprechen auf die Therapie und stabil bleibender Erkrankung über 20 Monate wurde eine Lymphknotenmetastase in der Brust der Patientin gefunden. Diese Metastase wurde positiv auf das Vorhandensein der L858R-Mutation in Exon 21 sowie der Mutation T790M in Exon 20 getestet. Außerdem wurden nun auch Hirnmetastasen bei der Patientin gefunden, die kurz darauf verstarb. Die Punktmutation L858R erklärt das initial gute Ansprechen der Patientin auf Erlotinib, die T790M-Mutation scheint die Ursache für die sekundäre Resistenz nach 20 Monaten zu sein (Taus et al. 2011).

Eine weitere, wesentlich seltenere Sekundärmutation, die mit TKI-Resistenz assoziiert ist, ist die Punktmutation D761Y, die von Balak et al. in einer Hirnmetastase einer asiatischen NSCLC-Patientin gefunden wurde (Balak et al. 2006).

Der genaue Mechanismus, der zur erworbenen Resistenz führt, ist noch nicht hinreichend geklärt. Die T790M Mutation scheint zu sterischen Veränderungen in der ATP-Binde-Tasche der Kinasedomäne zu führen und so die Affinität zu ATP zu verändern (Kumar et al. 2008). Kobayashi et al. stützen diese These durch kristallographische Darstellung der Bindung eines TKI an einen EGFR mit und ohne Anwesenheit einer T790M-Mutation (Kobayashi et al. 2005). Es wird angenommen, dass die sterischen Veränderungen dazu führen, dass reversible TKIs nicht mehr binden können, wodurch sich eine Resistenz erklären ließe (Kobayashi et al. 2005; Kwak et al. 2005; Pao et al. 2005). Ein ähnlicher möglicher Mechanismus ist, dass die T790M-Mutation die Affinität der Kinasedomäne zu ATP erhöht, was zu erniedrigter Potenz ATP-kompetitiver Liganden führen würde (Yun et al. 2008).

Die Existenz dieser erworbenen Resistenzmutation limitiert die Effektivität von TKIs wesentlich. Medikamente, die die T790M-Mutation bezwingen können, werden derzeit gesucht (Sharma et al. 2007).

Neben der T790M-Mutation als Resistenzursache legen Zhou et al. nahe, dass ein ADAM17 vermittelter und Heregulin abhängiger autokriner Loop ERBB2- und ERBB3-Signalwege in NSCLC aktiviert und so eine erworbene Resistenz gegen TKIs entsteht (Zhou et al. 2006). Auch eine gesteigerte MET-Aktivität spielt möglicherweise eine Rolle in der Entwicklung sekundärer Therapie-Resistenz. So wird in ca. 20 % der Patienten mit Therapieversagen nach initialem Ansprechen auf TKIs eine Amplifikation im MET-Gen gefunden (Kerr 2012; Turke et al. 2010).

5.2.2.3 Alternative EGFR-gerichtete Therapien

Derzeit sind nur die reversiblen Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib und Erlotinib zur Therapie des fortgeschrittenen NSCLC zugelassen. Ihr großer Nachteil ist, dass sie unwirksam werden, wenn die erworbene Resistenzmutation T790M in Exon 20 auftritt (Kwak et al. 2005; Sharma et al. 2007). Es wird nach Alternativen gesucht, die auch gegen den EGFR bzw. dessen Kinasedomäne gerichtet sind, aber trotz einer T790M-Mutation wirken. Vielversprechend scheinen irreversible TKIs wie HKI-272, EKB-569 und andere zu sein, die sich momentan in klinischen Studien befinden (Rabindran 2004; Kwak et al. 2005; Gazdar 2009). Eine experimentelle Studie von Kwak et al. zeigte, dass die irreversiblen TKIs in einer bronchioalveolären Zelllinie mit der Gefitinib-sensitiven Mutation L858R effektiver die Tumorzellen töten als Gefitinib und auch noch dann, wenn die Resistenzmutation T790M zusätzlich vorhanden war (Kwak et al. 2005).

Eine andere Alternative könnten selektive ADAM-Inhibitoren (Zhou et al. 2006) oder Hsp90-Inhibitoren darstellen, wie z. B. IPI-504 und Geldanamycin (Yang et al. 2006). Es wurde beobachtet, dass EGFR-Mutationen, die die Punktmutationen L858R und T790M beinhalten, mit dem molekularen Chaperon Hsp90 interagieren. Diese Interaktion kann spezifisch unterbrochen werden durch Hsp90-Inhibitoren. Diese Unterbrechung führt zur Ubiquitin-vermittelter Degradation mutierter TKI-

resistenter EGFR und zur Apoptose EGFR-abhängiger Tumorzellen, die die mutierten Rezeptoren tragen (Shimamura et al. 2005; Yang et al. 2006). Die ADAM-Inhibitoren sowie die Hsp90-Inhibitoren befinden sich derzeit auch noch in der klinischen Forschung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Durchführung von EGFR-Mutationsanalysen einen wichtigen diagnostischen Schritt in der Behandlung des Lungenkarzinoms darstellt. Die personalisierte molekulare Therapie ist die Therapie der Zukunft. Weitere Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet werden mit Spannung erwartet.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Analysen durchgeführt: Zum einen wurden zytologische Untersuchungen an Material aus BL/BAL validiert. Es erfolgte die Bestimmung von Sensitivität, Spezifität, positivem und negativem prädiktiven Wert der zytologischen Diagnose. Als Referenz dienten histologische Untersuchungen an Biopsien, die gleichzeitig mit der zytologischen Probe gewonnen wurden. Zum anderen erfolgte an ausgewählten Fällen eine EGFR-Mutationsanalyse an zytologischem Material aus Pleuraergüssen von Adenokarzinom-Patienten.

Ziel der genannten Analysen war den Stellenwert und den Nutzen zytologischer Proben zu prüfen.

Die Validierung der Zytologie konnte zeigen, dass an zytologischem Material eine sichere Diagnose gestellt werden kann. Insbesondere die Kombination von histologischen und zytologischen Untersuchungen wertet die diagnostische Sicherheit relevant auf und hat eine höhere Trefferquote als die Histologie allein.

Die EGFR-Mutationsanalyse an Pleuraerguss-Material ließ sich problemlos durchführen. Es fand sich eine Mutationsrate, die mit den Angaben aus der Literatur übereinstimmt.

Da infolge neuer minimalinvasiver Biopsieentnahme-Techniken immer kleinere Proben für die pathologische Diagnostik zur Verfügung stehen, zum Teil sogar nur zytologische Proben, sind die Ergebnisse dieser Studie von deutlicher Relevanz. Es konnte gezeigt werden, dass die Zytologie von großem Nutzen für die Diagnostik des Lungenkarzinoms ist.

Im Zuge der Entwicklung neuer Medikamente in der Behandlung des Lungenkarzinoms, wie z. B. Tyrosinkinaseinhibitoren, wird die Analyse von EGFR-Mutationen in Zukunft zur Routinediagnostik des NSCLC gehören. EGFR-Mutationen finden sich am häufigsten in der NSCLC-Subentität Adenokarzinom. Gleichzeitig ist das Adenokarzinom auch die Entität, bei der es am häufigsten zu Pleuraergüssen kommt. Der maligne Pleuraerguss ist ein gut geeignetes Material für genetische Analysen, da es sich in der Regel um ein eiweißreiches Exsudat handelt. In eiweißreichen Flüssigkeiten fallen Präzipitate aus, die oft reich an Tumorzellen-, und deswegen gut geeignet für die EGFR-Mutationsanalyse sind. Da der Pleuraerguss zur Linderung der Beschwerden in der Regel ohnehin abpunktiert werden muss, sind Therapie und Diagnostik hier in einem Schritt möglich. Eine weitere bronchoskopische Untersuchung zur Biopsieentnahme bleibt dem Patienten so eventuell erspart.

Die Möglichkeit der Durchführung von EGFR-Mutationsanalysen an Pleuraerguss-Material kann Patienten mit fortgeschrittenem Adenokarzinom eine weitere Therapieoption eröffnen.

7 Literaturverzeichnis

1. Ahrendt SA, Decker P, Alawi EA et al. (2001) Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 92(6):1525–1530
2. Anderson N, Ahmad T, Chan K et al. (2001) ZD1839 (Iressa), a novel epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, potently inhibits the growth of EGFR-positive cancer cell lines with or without erbB2 overexpression. *Int. J. Cancer* (94):774-782
3. Balak MN, Gong Y, Riely GJ et al. (2006) Novel D761Y and Common Secondary T790M Mutations in Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Lung Adenocarcinomas with Acquired Resistance to Kinase Inhibitors. *Clinical Cancer Research* 12(21):6494–6501
4. Becker HD (1990) *Atlas der Bronchoskopie: Technik, Diagnose, Differentialdiagnose, Therapie.* Schattauer, Stuttgart, New York
5. Becker N (2010) Epidemiologie des Bronchialkarzinoms. *Der Radiologe*(50):654–661
6. Bell DW, Gore I, Okimoto RA et al. (2005) Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet* 37(12):1315–1316
7. Bhat N, Bhagat P, Pearlman ES et al. (1990) Transbronchial needle aspiration biopsy in the diagnosis of pulmonary neoplasms. *Diagn Cytopathol* 6(1):14–17
8. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S et al. (2007) Mutational analysis in cytological specimens of advanced Lung Adenocarcinomas: A sensitive method for molecular diagnosis. *J Thorac Oncol*(2):1086–1090
9. British Thoracic Society Bronchoscopy Guidelines Committee (2001) British Thoracic Society Bronchoscopy Guidelines on diagnostic flexible bronchoscopy. *Thorax* (56): i1-i21
10. Buccheri G, Barberis P, Delfino MS (1991) Diagnostic, morphologic and histopathologic correlates in bronchogenic carcinoma. A review of 1.045 bronchoscopic examinations. *Chest* 99(4):809-814

11. Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L et al. (2010) Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 11(6):521–529
12. Cavalli P, Riboli B, Generali D et al. (2006) EGFR genotyping in pleural fluid specimens in NSCLC patients. *Lung Cancer* 54(2):265–266
13. Chaudhary BA, Yoneda K, Burki NK (1978) Fiberoptic bronchoscopy. Comparison of procedures used in the diagnosis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 76(1):33–37
14. Crapanzano JP, Saqi A, Baloch Z (2011) Pitfalls in pulmonary cytopathology. *Diagn. Cytopathol* 39(2):144–154
15. Cully M, You H, Levine AJ et al. (2006) Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 6(3):184–192
16. Dobler CC und Crawford ABH (2009) Bronchoscopic diagnosis of endoscopically visible lung malignancies: should cytological examinations be carried out routinely? *Internal Medicine J*(39):806-811
17. Dohm G (2004) Zur Geschichte des Bronchialkarzinoms. *Pneumologie*(58):680–685
18. Engelman J, Jänne PA, Mermel C et al. (2005) ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *PNAS* 102(10):3788–3793
19. Feichter G, Dalquen P (2000) *Zytopathologie: Mit 94 Tabellen*. Springer, Berlin
20. Fernández-Villar A, González A, Leiro V et al. (2006) Effect of Different Bronchial Washing Sequences on Diagnostic Yield in Endoscopically Visible Lung Cancer. *Arch Bronconeumol* 6(42):278–282
21. Franke K, Nilius G, Rühle K (2006a) Bronchoskopische Diagnostik des peripheren Lungenherdes. *Dtsch med Wochenschr* 131(40):2229–2233
22. Franke K, Nilius G, Rühle K (2006b) Frequency of Cytological Procedures in Diagnostic Bronchoscopy of peripheral Pulmonary Modules and Masses. *Pneumologie*(60):663–666

23. Gazdar AF (2009) Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 28:24–31
24. Goeckenjan G (2010) Lungenkrebs - Geschichtliche Entwicklung, derzeitiger Stand und Ausblick. *Pneumologie*(64):555–559
25. Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M et al. (2010) Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms: Interdisziplinäre S3-Leitlinie. *Pneumologie*(64):23–155
26. Govert JA, Kopita JM, Matchar D et al. (1996) Cost-effectiveness of Collecting Routine Cytologic Specimens During Fiberoptic Bronchoscopy for Endoscopically Visible Lung Tumor. *Chest* 109(2):451–456
27. Greulich H, Chen T, Feng W et al. (2005) Oncogenic Transformation by Inhibitor-Sensitive and -Resistant EGFR Mutants. *Plos Med* 2(11):e313
28. Haiman CA, Stram DO, Wilkens LR et al. (2006) Ethnic and Racial Differences in the Smoking-Related Risk of Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine* 354(4):333–342
29. Han C, Ma J, Zhao J et al. (2011) EGFR mutations, gene amplification, and protein expression and KRAS mutations in primary and metastatic tumors of non small cell lung cancers and their clinical implications: a meta-analysis. *Cancer investigation* 29(9):626–634
30. Han S, Kim T, Hwang P et al. (2005) Predictive and Prognostic Impact of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Gefitinib. *Journal of Clinical Oncology* 23(11):2493–2501
31. Heigener D (2010) Diagnostik und Staging beim Lungenkarzinom: Anamnese, Bildgebung, Histologie, Stadieneinteilung. *Schweizer Zeitschrift für Onkologie*(2):5–8
32. Heukamp L, Wolf J, Büttner R (2011) Molekulardiagnostik zur Therapiestratifizierung des Lungenkarzinoms. *Der Internist*(52):146–154
33. Hirsch FR (2009) The role of genetic testing in the prediction of response to EGFR inhibitors in NSCLC. *Oncogene* 28:1–3

34. Huang S, Liu H, Li L et al. (2004) High Frequency of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations with Complex Patterns in Non-Small Cell Lung Cancers Related to Gefitinib Responsiveness in Taiwan. *Clinical Cancer Research*(10):8195–8203
35. Hung M, Lin C, Leu S et al. (2006) Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Cells from Non-Small Cell Lung Cancer Malignant Pleural Effusions. *Chang Gung Med J*(29):373–379
36. Idowu MO, Powers CN (2012) Lung cancer cytology: potential pitfalls and mimics - a review. *Int J Clin Exp Pathol* 4(3):367–385
37. Jackman DM, Yeap BY, Sequist LV et al. (2006) Exon 19 Deletion Mutations of Epidermal Growth Factor Receptor are Associated with Prolonged Survival in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Gefitinib or Erlotinib. *Clinical Cancer Research* 12(13):3908–3914
38. Jang TW, Oak CH, Chang HK et al. (2009) EGFR and KRAS Mutations in Patients with Adenocarcinoma of the Lung. *Korean J Intern Med* 24(1):48
39. Jian G, Songwen Z, Ling Z et al. (2010) Prediction of epidermal growth factor receptor mutations in the plasma/pleural effusion to efficacy of gefitinib treatment in advanced non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* (2010) 136: 1341-1347
40. Jiang J, Greulich H, Jänne PA et al. (2005) Epidermal Growth Factor-Independent Transformation of Ba/F3 Cells with Cancer-Derived Epidermal Growth Factor Receptor Mutants Induces Gefitinib-Sensitive Cell Cycle Progression. *Cancer Research* 65(19):8968–8974
41. Kawaraya M, Gemba K, Ueoka H et al. (2003) Evaluation of various cytological examinations by bronchoscopy in the diagnosis of peripheral lung cancer. *Br J Cancer* 89(10):1885–1888
42. Kerr KM (2009) Pulmonary adenocarcinomas: classification and reporting. *Histopathology* 54(1):12–27
43. Kerr KM (2012) Personalized medicine for lung cancer: new challenges for pathology. *Histopathology* 60(4):531–546
44. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T et al. (2006a) EGFR mutation status in tumour-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to gefitinib. *Br J Cancer* 95(10):1390–1395

45. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T et al. (2006b) High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Sci* 97(7):642–648
46. Kirchbacher K (2009) Das Lungenkarzinom. *Facharzt*(4):33–36
47. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T et al. (2005) EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *The New England Journal of Medicine*(352):786–792
48. Kosaka T (2004) Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Lung Cancer: Biological and Clinical Implications. *Cancer Research* 64(24):8919–8923
49. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H et al. (2006) Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutation in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer and Acquired Resistance to Gefitinib. *Clinical Cancer Research* 12(19):5764–5769
50. Koss L, Woyke S, Olszewski W (1992) *Aspiration biopsy: Cytologic interpretation and histologic bases*, 2nd edn. Igaku-Shoin, New York
51. Koss LG, Melamed M (2006) *Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases*, 5th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
52. Kumar A, Petri ET, Halmos B et al. (2008) Structure and Clinical Relevance of the Epidermal Growth Factor Receptor in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26(10):1742–1751
53. Kvale P, Bode F, Kini S (1976) Diagnostic accuracy in lung cancer; comparison of techniques used in association with flexible fiberoptic bronchoscopy. *Chest* 69(6):752–757
54. Kwak EL, Sordella R, Bell D et al. (2005) Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *PNAS* 102(21):7665–7670
55. Lam WK, So SY, Hsu C et al. (1983) Fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of bronchial cancer: comparison of washings, brushings and biopsies in central and peripheral tumours. *Clin Oncol* 9(1):35–42
56. Lee HS, Kwon SY, Kim DK et al. (2007) Bronchial washing yield before and after forceps biopsy in patients with endoscopically visible lung cancers. *Respirology* 12(2):277–282

57. Lee P (2007) Indications and limitations of bronchoscopy. *Journal of Thoracic Oncology* 2(Supplement 4):278
58. Lundgren R, Bergmann F, Angström F (1983) Comparison of transbronchial fine needle aspiration biopsy, aspiration of bronchial secretion, bronchial washing, brush biopsy and forceps biopsy in the diagnosis of lung cancer. *Eur J Respir Dis* 64(5):378–385
59. Lurje G, Lenz H (2009) EGFR Signaling and Drug Discovery. *Oncology* 77(6):400–410
60. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. (2004) Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *The New England Journal of Medicine* 350(21):2129–2139
61. Mak V, Johnston I, Hetzel M et al. (1990) Value of washings and brushings at fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of lung cancer. *Thorax*(45):373–376
62. Malapelle U, Bellevisine C, Zeppa P et al. (2011) Cytology-based gene mutation tests to predict response to anti-epidermal growth factor receptor therapy: A review. *Diagn. Cytopathol.* 39(9):703–710
63. Marchetti A, Martella C, Feliconi L et al. (2005) EGFR Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: Analysis of a Large Series of Cases and Development of a Rapid and Sensitive Method for Diagnostic Screening with Potential Implications on Pharmacologic Treatment. *Journal of Clinical Oncology* 23(4):857–865
64. Mazzone P, Jain P, Arroliga A et al. (2002) Bronchoscopy and needle biopsy techniques for diagnosis and staging of lung cancer. *Clin Chest Med* 23(1):137-58, ix
65. Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H et al. (2005) Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene Predict Prolonged Survival After Gefitinib Treatment in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer With Postoperative Recurrence. *Journal of Clinical Oncology* 23(11):2513–2520
66. Motulsky H (1995) *Intuitive biostatistics*. Oxford University Press, New York
67. Murray S, Dahabreh IJ, Linardou H et al. (2008) Somatic Mutations of the Tyrosine Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor and Tyrosine Kinase Inhibitor Response to TKIs in Non-small Cell Lung Cancer: An Analytical Database. *J Thorac Oncol.* 2008 3(8):832-839

68. Nakhosteen JA (2009) Atlas und Lehrbuch der thorakalen Endoskopie: Bronchoskopie, Thorakoskopie; mit 58 Tabellen, 4th edn. Springer Medizin, Heidelberg
69. Naryshkin S, Daniels J, Young NA (1992) Diagnostic correlation of fiberoptic bronchoscopic biopsy and bronchoscopic cytology performed simultaneously. *Diagn Cytopathol* 8(2):119–123
70. Nicholson A, Gonzalez D, Shah P et al. (2010) Refining the Diagnosis and EGFR Status of Non-small Cell Lung Carcinoma in Biopsy and Cytologic Material, Using a Panel of Mucin Staining, TTF-1, Cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR Mutation Analysis. *Journal of Thoracic Oncology* 5(4):436–441
71. Paez JG, Jänne PA, Lee JC et al. (2004) EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* 304(5676):1497–1500
72. Pao W, Miller V, Zakowski M et al. (2004) EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *PNAS* 101(36):13306–13311
73. Pao W, Wang TY, Riely GJ et al. (2005) KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. *Plos Med* 2(1):e17
74. Parker SL, Davis KJ, Wingo PA, et al. (1998) Cancer statistics by race and ethnicity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 48(1):31–48
75. Piaton E, Grillet-Ravigneaux M, Saugier B et al. (1995) Prospective study of combined use of bronchial aspirates and biopsy specimens in diagnosis and typing of centrally located lung tumor. *BMJ* 310:624–627
76. Policarpio-Nicolas MLC, Wick MR (2008) False-positive interpretations in respiratory cytopathology: Exemplary cases and literature review. *Diagn. Cytopathol* 36(1):13–19
77. Raab SS, Silverman J (1994) Clinical Utility of Cytologic Typing of Lung Tumors. *Diagn Cytopathol* 10(4):376–382
78. Rabindran SK (2004) Antitumor Activity of HKI-272, an Orally Active, Irreversible Inhibitor of the HER-2 Tyrosine Kinase. *Cancer Research* 64(11):3958–3965

79. Rekhman N, Brandt SM, Sigel CS et al. (2011) Suitability of Thoracic Cytology for New Therapeutic Paradigms in Non-small Cell Lung Carcinoma. *J Thorac Oncol*(6):451–458
80. Reynolds HY (1987) Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 135(1):250–263
81. Riely GJ, Pao W, Pham D et al. (2006) Clinical Course of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer and Epidermal Growth Factor Receptor Exon 19 and Exon 21 Mutations Treated with Gefitinib or Erlotinib. *Clinical Cancer Research* 12(3):839–844
82. Rindfleisch E (1869) *Lehrbuch der pathologischen Gewebelehre*. Wilhelm von Engelmann Verlag, Leipzig:374
83. Rodenhuis S, Siebos RJC, Boot AJM et al. (1988) Incidence and Possible Clinical Significance of K-ras Oncogene Activation in Adenocarcinoma of the Human Lung. *Cancer Research*(48):5738–5741
84. Rosell R, Carcereny E, Gervais R et al. (2012) Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13(3):239–246
85. Rude Voldborg B, Damstrup L, Spang-Thomsen M et al. (1997) Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of Oncology* 8: 1197-1206, 1997(8):1197–1206
86. Saad RS, Silverman JF (2009) *Respiratory Cytology: Differential Diagnosis and Pitfalls*. *Diagn. Cytopathol* 38(4):297–307
87. Schreiber G, McCrory DC (2003) Performance Characteristics of Different Modalities for Diagnosis of Suspected Lung Cancer: Summary of Published Evidence. *Chest* 123(90010):115–128
88. Schumann C (2004) Expansion von alphaEbeta7+ CD4+-T-Lymphozyten in der bronchioalvolären Lavage als Marker für pulmonale Fibrosen: Beziehung zu interstitiellen Lungenkrankheiten und diagnostische Relevanz. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena

89. Sharma SV, Bell DW, Settleman J et al. (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 7(3):169–181
90. Shigematsu H, Gazdar AF (2006) Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int. J. Cancer* 118(2):257–262
91. Shimamura T, Lowell AM, Engelman J et al. (2005) Epidermal Growth Factor Receptors Harboring Kinase Domain Mutations Associate with the Heat Shock Protein 90 Chaperone and Are Destabilized following Exposure to Geldanamycins. *Cancer Research* 65(14):6401–6408
92. Sigel CS, Moreira AL, Travis WD et al. (2011) Subtyping of Non-small Cell Lung Carcinoma: A Comparison of Small Biopsy and Cytology Specimens. *J Thorac Oncol*(6):1849–1856
93. Smouse JH, Cibas ES, Jänne PA et al. (2009) EGFR Mutations Are Detected Comparably in Cytologic and Surgical Pathology Specimens of Nonsmall Cell Lung Cancer. *Cancer Cytopathology*(117):67–72
94. Soh J, Toyooka S, Aoe K et al. (2006) Usefulness of EGFR mutation screening in pleural fluid to predict the clinical outcome of gefitinib treated patients with lung cancer. *Int. J. Cancer* 119(10):2353–2358
95. Soh J, Toyooka S, Ichihara S et al. (2007) EGFR mutation status in pleural fluid predicts tumor responsiveness and resistance to gefitinib. *Lung Cancer* 56(3):445–448
96. Sompradeekul S, Chinvetkitvanich U, Suthinon P et al. (2006) Difference in the yields of bronchial washing cytology before and after forceps biopsy for lung cancer. *J Med Assoc Thai* 89(5):37–45
97. Sordella R, Bell DW, Haber DA et al. (2004) Gefitinib-Sensitizing EGFR Mutations in Lung Cancer Activate Anti-Apoptotic Pathways. *Science* 305(5687):1163–1167
98. Soria J, Lee H, Lee JI et al. (2002) Lack of PTEN Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Could Be Related to Promoter Methylation. *Clinical Cancer Research*(8):1178–1184
99. Statistisches Bundesamt (Destatis) Fachserie 12, Reihe 4 - Todesursachenstatistik 2010

100. Taheri Z, Mohammadi F, Karimi S et al. (2007) Fiberoptic Bronchoscopy: Correlation of Cytology and Biopsy Results. *Tanaffos* 2(6):46–50
101. Tapia C, Savic S, Bihl M et al. (2009) EGFR-Mutationsanalyse beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom: Erfahrungen aus der Routinediagnostik. *Pathologe* 30(5):384–392
102. Taus Á, Vollmer I, Arriola E (2011) Activating and Resistance Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Gene and Non-Small Cell Lung Cancer: A Clinical Reality. *Arch Bronconeumol* 47(2):103–105
103. Thivolet-Béjui F (1997) Cytological Pitfalls in Bronchopulmonary Tumors. *Diagn Cytopathol* 17(6):412–416
104. Travis W, Brambilla E, Müller-Hermelink HK et al. (2004) World Health Organization Classification of Tumours: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press. Lyon 2004.:9–124
105. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M et al. (2011) International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology* 6(2)
106. Travis WD, Rekhtman N, Riely GJ et al. (2010) Pathologic Diagnosis of Advanced Lung Cancer Based on Small Biopsies and Cytology: A Paradigm Shift. *Journal of Thoracic Oncology* 5(4):411–414
107. Turke AB, Zejnullahu K, Wu Y et al. (2010) Preexistence and Clonal Selection of MET Amplification in EGFR Mutant NSCLC. *Cancer Cell* 17(1):77–88
108. Vallée M (2007) Epidemiologische Untersuchung der Lungenkarzinome unter Berücksichtigung der Histologie. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
109. van der Drift MA, van der Wilt G, Thunissen F et al. (2005) A Prospective Study of the Timing and Cost-Effectiveness of Bronchial Washing During Bronchoscopy for Pulmonary Malignant Tumors. *Chest* 128(1):394–400
110. Wittekind C (ed) (2010) TNM - Klassifikation maligner Tumoren, 7th edn. Wiley-Blackwell; Wiley-VCH-Verl, Weinheim

111. Wong PC, Lee J, Lam FM et al. (1999) Fibreoptic bronchoscopy in the diagnosis of lung cancer. *Monaldi Arch Chest Dis* 54(5):394–398
112. Wu S, Gow C, Yu C et al. (2008) Frequent epidermal growth factor receptor gene mutations in malignant pleural effusion of lung adenocarcinoma. *Eur Respir J* 32(4):924–930
113. Yang S, Qu S, Perez-Tores M et al. (2006) Association with Hsp90 Inhibits Cbl-Mediated Down-regulation of Mutant Epidermal Growth Factor Receptors. *Cancer Research* 66(14):6990–6997
114. Yang SH, Mechanic LE, Yang P et al. (2005) Mutations in the Tyrosine Kinase Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* 11(6):2106–2110
115. Yun C, Mengwasser KE, Toms AV et al. (2008) The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *PNAS* 105(6):2070–2075
116. Zhang X, Zhao Y, Wang M et al. (2008) Detection and comparison of epidermal growth factor receptor mutations in cells and fluid of malignant pleural effusion in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 60(2):175–182
117. Zhou BS, Peyton M, He B et al. (2006) Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell* 10(1):39–50
118. Zimpfer A, Polak A, Bier A et al. (2013) Assessment of Diagnostic Accuracy of Bronchoalveolar Lavage Cytology in the Diagnosis of Lung Tumors and Contribution to the Classification of Non-Small Cell Lung Cancer Entities: A Retrospective Clinopathological Study. *Open Journal of Pathology* 3:107-112
119. Zimpfer A, Schneider B, Polak A et al. (2012) Epidermal growth factor receptor mutation analysis in pleural effusions of advanced non-small cell lung cancer patients: When only cells are available. Bisher veröffentlicht als Abstract in *Der Pathologe* Band 33, Sonderheft zur 96. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pathologie, Mai 2012:49-5